

Abteilung Vegetative Physiologie

Prof. Dr. med. Gerolf Gros

CO₂-Permeabilität biologischer Membranen

CO₂ wird innerhalb der Zellen gebildet und verläßt diese über die Zellmembranen. Hierfür ist es notwendig, dass die Zellmembran gut permeabel für CO₂ ist, was in den meisten Fällen auch in hohem Maß der Fall ist. Auf der anderen Seite gibt es Räume im Magen-Darm-Trakt wie z.B. Magencavum oder Colonlumen, in denen große Mengen an CO₂ entstehen können und deren auskleidendes Epithel dann vor den toxischen Wirkungen der hohen CO₂ Partialdrücke geschützt werden muss. Es gibt Hinweise darauf, daß die luminalen Membranen der Epithelzellen in diesen Fällen völlig impermeabel für CO₂ sind.

Wir haben zunächst an Erythrocytenmembranen, die eine extrem hohe Permeabilität für CO₂ aufweisen, Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, die Mechanismen zu identifizieren, die Membranen eine hohe CO₂-Permeabilität verleihen. Hierbei haben wir festgestellt, daß DIDS, ein Hemmstoff für den Bikarbonat-Chlorid-Austauscher (Bande-3 Protein) der Zellmembran, Effekte zeigt, die nur durch eine durch DIDS verringerte CO₂ Permeabilität der Zellmembran zu erklären sind.

Die bisherige Theorie, nach der Zellmembranen kein Hindernis für Gase wie CO₂ darstellen und Gase die Zellmembran problemlos per Diffusion durch deren Lipidphase durchdringen, kann diese Ergebnisse nicht erklären. Man muß folgern, daß Membranproteine einen sehr großen Einfluss auf die CO₂-Permeabilität von Membranen haben können. Messungen der CO₂-Permeabilität waren bisher dadurch schwierig, daß es keine gute Methode gab, die CO₂-Permeabilität von Zellen zu messen. Die meisten Verfahren basierten auf indirekten Messungen z.B. mithilfe der durch den CO₂-Einstrom erfolgenden Veränderung des intrazellulären pH-Wertes. Uns ist es gelungen, eine massenspektrometrische Methode zu entwickeln, mit der man einen sehr direkten Zugang zur Größe der CO₂-Membranpermeabilität von nativen Zellen erhält. Wir konnten nun mit dieser Methode an Erythrocytenmembranen nachweisen, daß der Wasserkanal Aquaporin-1 (AQP 1) und der Bikarbonat-Chlorid-Austauscher (Bande-3 Protein) Transportwege für CO₂ darstellen und einen sehr großen Beitrag zur CO₂-Permeabilität dieser Zellmembranen leisten.

Methode

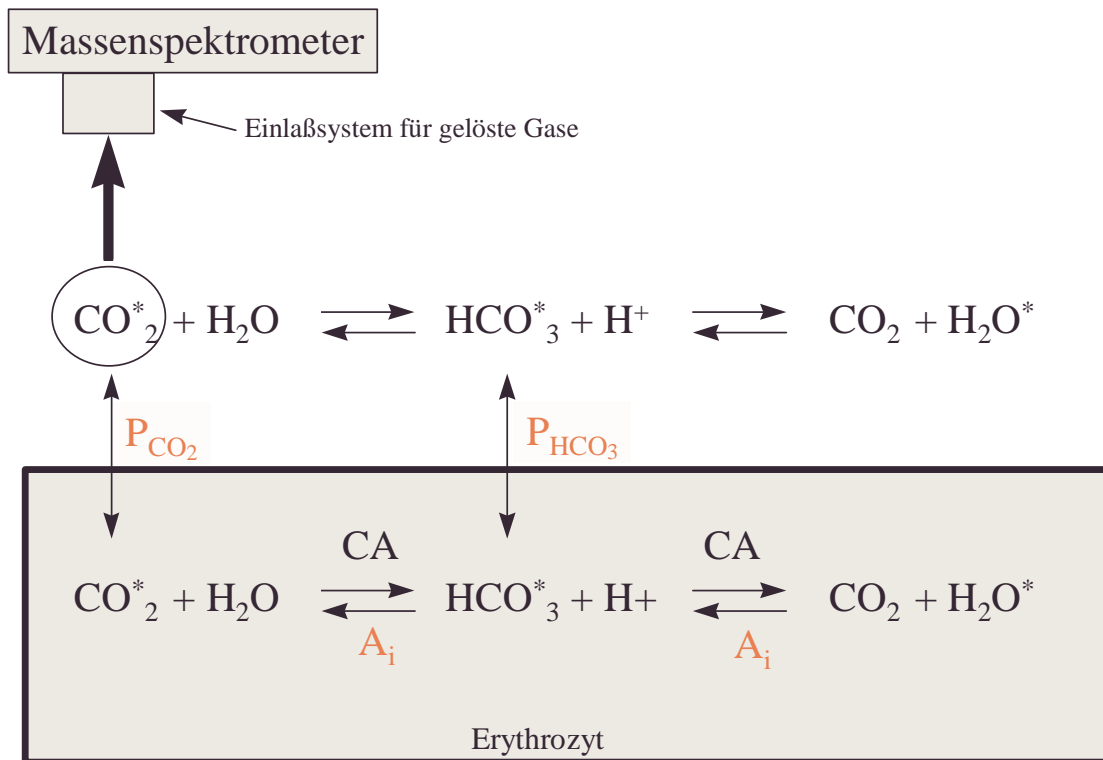


Abb. 1

Bikarbonat wird mit ^{18}O markiert, in NaCl-Lösung gelöst und in eine Messkammer gefüllt. Kurze Zeit später werden die Zellen hinzugefügt. Innerhalb der Messkammer reagiert das markierte Bikarbonat ($\text{HCOO}^{18}\text{O}^-$) zu markiertem CO_2 (CO^{18}O) oder zu markiertem H_2O (H_2^{18}O). Die Konzentration des markierten CO_2 in der Flüssigkeit der Meßkammer wird über das an die Messkammer angeschlossene spezielle Einlaßsystem des Massenspektrometers kontinuierlich gemessen. Im Verlauf der Messung verschwindet immer mehr ^{18}O aus dem Pool $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ in den viel größeren Wasserpool, so dass die Konzentration von markierten CO_2 immer weiter abnimmt. Enthalten die Zellen Carboanhydrase, wird die Bikarbonat-Reaktion drastisch beschleunigt und die Konzentration des markierten CO_2 nimmt dann sehr schnell ab (s. Abb. 2). Der zeitliche Verlauf der CO_2 Konzentration nach Zellzugabe ist abhängig von der Aktivität (A_i) der Carboanhydrase in der Zelle, von der Bikarbonatpermeabilität (P_{HCO_3}) der Zellmembran und von der CO_2 Permeabilität (P_{CO_2}) der Zellmembran. Mathematisch kann dieser Vorgang durch ein Differentialgleichungssystem beschrieben werden. Wir lösen dieses Differentialgleichungssystem numerisch und die Parameter A_i , P_{HCO_3} und P_{CO_2} werden über eine Fitprozedur so angepasst, dass der gemessene und der berechnete Kurvenverlauf optimal übereinstimmen. P_{CO_2} entspricht dann der gesuchten CO_2 - Membranpermeabilität. Die verwendeten Zellen waren humane Erythrozyten und Rindererythrozyten. Um gezielt die Auswirkungen des Fehlens eines einzelnen Membranproteins auf die CO_2 -Permeabilität zu untersuchen, wurden zum einen AQP-1-defiziente humane Erythrozyten (sogenanntes Colton-Null-Blut) verwendet und zum anderen Bande-3-defiziente Rindererythrozyten. Als Kontrolle dienten jeweils normale humane Erythrozyten bzw. normale Rindererythrozyten.

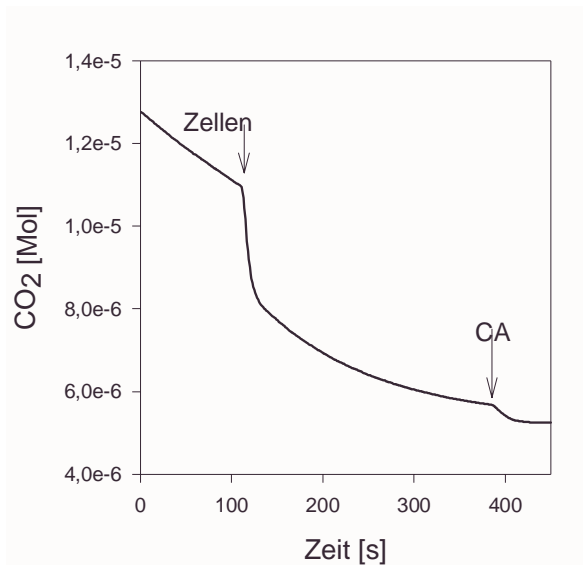


Abb.2

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 3 zeigt die CO_2 Permeabilitäten von normalem Kontrollblut und von Colton-Null-Blut. An beiden wurden die Effekte der Hemmstoffe pCMBS, einem Hemmstoff der Aquaporin-Kanäle, und DIDS, einem Hemmstoff des Bikarbonat-Chlorid-Austauschers, untersucht. Man erkennt 1.) daß P_{CO_2} in Colton-Null Erythrocyten gegenüber den Kontrollerythrocyten signifikant verringert ist (von 0,25 cm/s auf 0,06 cm/s). Gleichzeitig kann man feststellen, daß 2.) pCMBS, ein Hemmstoff des Aquaporins, in Kontrollerythrocyten eine Verringerung des P_{CO_2} auf einen ähnlichen Wert hervorruft wie er in unbehandelten Colton-Null-Erythrocyten vorliegt; daß pCMBS dagegen auf die CO_2 -Permeabilität von Colton-Null-Erythrocyten keine Wirkung hat. Hieraus kann man schließen, das Aquaporin einen Transportweg für CO_2 darstellt und daß dieser Weg durch pCMBS blockiert wird.

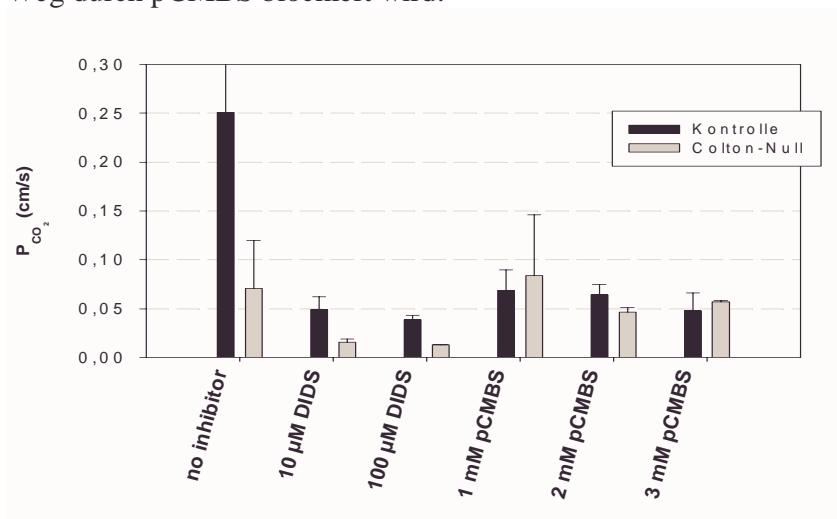


Abb.3

3.) erkennt man, daß DIDS die CO_2 -Permeabilität von Kontrollerythrocyten signifikant verringert (von 0,25cm/s auf 0,04 cm/s) und aber auch die CO_2 -Permeabilität von Colton-Null-Erythrocyten noch weiter verringert. Daraus folgern wir, daß es noch einen zweiten, von Aquaporin

unabhängigen und durch DIDS hemmbaren, Transportweg zu geben scheint. Da DIDS ein Hemmstoff von Bande-3 ist, haben wir die CO₂-Permeabilität von Bande-3-defizienten Rindererythrocyten gemessen, um diesen zweiten CO₂-Transportweg zu identifizieren.

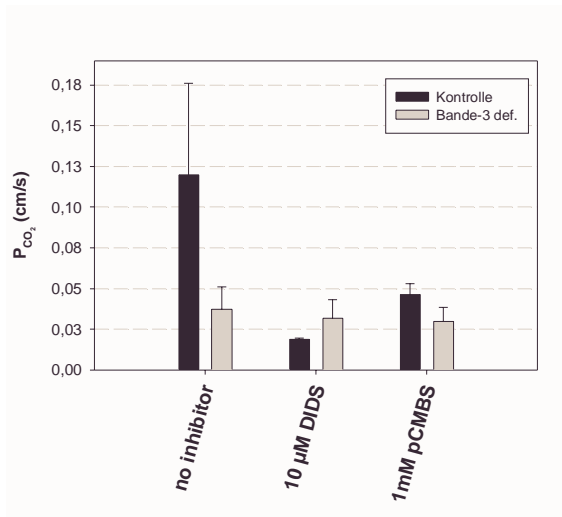


Abb.4

Abb. 4 illustriert die gemessenen Permeabilitäten. Die CO₂ Permeabilität von Bande-3-defizientem Rinderblut ist signifikant geringer als die von normalem Rinderblut. DIDS verringert die Permeabilität des Kontrollblutes etwa auf die Permeabilität des defizienten Blutes. Es hat aber keinen Einfluss auf den P_{CO₂} des defizienten Blutes. Dies zeigt klar, daß Bande-3 ein weiterer Transportweg für CO₂ ist.

Zusammenfassend kann man sagen, daß wir zwei Transportwege für CO₂ identifiziert haben. Beide erhöhen die CO₂ Permeabilität der Zellmembran drastisch und sind durch Hemmstoffe (pCMBS für AQP-1, DIDS für Bande-3) blockierbar. Zumindest in Erythrocytenmembranen leisten damit Membranproteine einen weit wichtigeren Beitrag zur CO₂-Permeabilität als die Lipidphase der Membran.

Mitarbeiter: V. Endeward, G. Gros. Kooperationen: Prof. W.F. Boron, Yale University, USA; Prof. P. Agre, Johns-Hopkins University, USA; Dr. L. Peters, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA; Prof. K. Kaila, Helsinki, Finnland. Förderung: SFB 621, Projekt C5.

Weitere Forschungsprojekte

Zelluläre Mechanismen der Muskelplastizität und der Muskelhypertrophie.

Wir untersuchen diese beiden Eigenschaften von Skelettmuskelzellen an Zellkultur-Modellen (Muskelzellprimärkulturen, Satellitenzellkulturen). Elektrostimulation von Myotuben in Kultur und die dadurch ausgelösten Einzelkontraktionen bewirken je nach Reizmuster (Stimulationsfrequenz, Dauer der Stimulationsphasen) eine Weiß-Rot-Muskelfasertransformation oder eine Hypertrophie der Myotuben. Wir untersuchen, welche Reizmuster das eine bzw. das andere Phänomen auslösen. Wir untersuchen zugleich, welche intrazellulären Signale bzw. Signalkaskaden bei der Transformation bzw. bei der Hypertrophie beteiligt sind. So scheint der über die Zeit gemittelte intrazelluläre Ca⁺⁺-Spiegel eine entscheidende Rolle für die Triggerung dieser Phänomene zu spielen. Im Falle der Transformation scheint die Umschaltung von schnellen Myosinisoformen (im "schnellen" Muskel) auf langsame Myosinisoformen (im

"langsamen" Muskel) durch die Signalkette $\text{Ca}^{++} \rightarrow \text{Calcineurin} \rightarrow \text{NFAT}$ vermittelt zu sein. Das zeitliche Verhalten dieses Signalweges korreliert ausgezeichnet mit dem zeitlichen Verhalten der Faserumwandlung bei Elektrostimulation. Die intrazellulären Signalwege, die die mit der Transformation verbundene Stoffwechsellage von anaerober Glykolyse auf aerobe Glykolyse bewirken, werden derzeit in unserem Labor untersucht. Ebenso untersuchen wir derzeit, welche Signalwege, wie z.B. der Akt/mTOR-Weg, an unserem Zellkulturmodell Hypertrophie vermitteln.

Mitarbeiter: H.P. Kubis, J.D. Meißner, R. Scheibe, M. Scholz, N. Hanke, G. Gros. Förderung: DFG Gr 489/13

Diffusivität von Myoglobin in Herz- und Skelettmuskelzellen.

Myoglobin ist ein sauerstoffbindendes Hämprotein in Muskelzellen. Es fungiert als Sauerstoffspeicher und kann in kurzen Phasen eines Abfalls des Gewebs- P_{O_2} die Sauerstoffversorgung der Zellen überbrücken, so z.B. im Herzmuskel während der Systole, in der die Kammerdurchblutung fast sistiert. Eine weitere denkbare Funktion des Myoglobins ist es, daß die intrazelluläre Diffusion von Oxy-myoglobin zu einem nennenswerten intrazellulären O_2 -Transport führt, der die Diffusion von physikalisch gelöstem Sauerstoff ergänzt und den O_2 -Transport von der Zellmembran bis zum Mitochondrium unterstützt. Um diese Hypothese zu prüfen, messen wir die Diffusivität von Myoglobin im Cytoplasma intakter Herz- und Skelettmuskelzellen. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß die Diffusionsfähigkeit von Myoglobin in diesen Zellen sehr niedrig ist, sodaß es unwahrscheinlich ist, daß Myoglobindiffusion wesentlich zum intrazellulären O_2 -Transport beiträgt. Mit Hilfe von Modellrechnungen wird untersucht, welche Rolle Oxy-myoglobin als O_2 -Lieferant z.B. im Herzmuskel während der Systole bei den experimentell gefundenen Diffusionseigenschaften tatsächlich spielen kann.

Mitarbeiter: K.D. Jürgens, V. Endeward, G. Gros

Muskelfunktion von Carboanhydrase II- und Carboanhydrase III-defizienten Mäusen.

Beide Carboanhydrase-Isoenzyme scheinen eine nicht bzw. nur teilweise verstandene Rolle für die Funktion von Skelettmuskeln, Muskelkontraktion und/oder Muskelstoffwechsel, zu spielen. Wir untersuchen die kontraktile Eigenschaften von Faserbündeln aus Hinterlaufmuskeln der beiden knockout-Mäuse, von denen wir hier eine Zucht aufgebaut haben. Daneben werden die Muster der Isomyosine und einige Stoffwechsel-Leitenzyme in diesen Muskeln untersucht, um evtl. erfolgte Anpassungen zu erfassen. Bisherige Ergebnisse zeigen, daß die Kontraktionszeiten der langsamen Muskeln von Carboanhydrase III-defizienten Tieren stark verlangsamt sind, daß ihre isometrische Kraftentwicklung vermindert ist und daß insbesondere die Ermüdbarkeit der langsamen Fasern stark erhöht ist. Um diesen Befund interpretieren zu können, sind detaillierte Untersuchungen des Energiestoffwechsels dieser Muskeln geplant.

Mitarbeiter: C. Geers-Knörr, P. Wetzel, H.P. Kubis, G. Gros. Kooperation: Dr. R. Levine, NIH, Bethesda, USA

Membrangebundene Carboanhydrasen im Skelettmuskel

Nach dem erfolgten physiologischen Nachweis wichtiger Funktionen einer extrazellulären (sarkolemmalen) und einer intrazellulären (L-System) membrangebundenen Carboanhydrase für Milchsäureabgabe, Muskelkontraktion und Ca^{++} -Transient soll die Identität dieser Enzyme aufgeklärt und ihre vermutete subzelluläre Lokalisation überprüft werden. Dazu wurden

Membranpräparationen vom Sarkolemm und vom sarkoplasmatischen Retikulum hergestellt, deren Carboanhydrase(n) in Zusammenarbeit mit Prof. W.S. Sly charakterisiert werden.

Funktionelle Untersuchungen an Skelettmuskeln sind für zwei membrangebundene Carboanhydrase-Isoformen unter Verwendung von CA IV- und von CA XIV-defizienten Tieren geplant. Dabei soll mittels Messung der kontraktiven Eigenschaften der Muskeln dieser Tiere und evtl. mittels Messung der kontraktionsauslösenden Ca^{++} -Transienten die funktionelle Rolle dieser beiden Carboanhydrasen bestimmt werden.

Mitarbeiter: P. Wetzel, C. Geers-Knörr, G. Gros. Kooperation: Prof. W.S. Sly, St. Louis, USA

Carboanhydrase im gastrointestinalen Mucus

Nach dem Nachweis hoher Aktivitäten von Carboanhydrase im Mucus und deren Charakterisierung als ein besonderes Isoenzym, sollen folgende Ziele verfolgt werden: 1. Aufklärung der Primärstruktur von Mucuscarboanhydrase vom Meerschweinchen und vom Menschen, Erzeugung von Antikörpern und Identifizierung des Synthesorts im Magen-Darm-Trakt. 2. Überprüfung einer Arbeitshypothese zur Funktion dieser Carboanhydrase, wonach die Anwesenheit dieses Enzyms im Mucus die unter der Mucusschicht liegenden Epithelzellen vor den hohen im Lumen von Darm und Magen herrschenden CO_2 -Partialdrücken (bis zu 0,5 atm) schützt. Hierzu werden CO_2 -Mikroelektroden eingesetzt.

Die letztere Hypothese wird auch anhand eines theoretischen Modells überprüft, das wir entwickelt haben. Dabei wird der Transport von CO_2 , die Reaktion $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ und der Transport der CO_2 -Reaktionsprodukte in der dem Epithel aufliegenden Mucusschicht mathematisch formuliert. Dabei zeigt sich, daß in Anwesenheit einer Carboanhydrase im Mucus der CO_2 -Partialdruck unmittelbar auf der Epitheloberfläche tatsächlich erheblich niedriger sein kann als auf der Mucusoberfläche bzw. als im Lumen von Magen oder Colon.

Mitarbeiter: V. Endeward, G. Gros. Förderung: SFB 621, Projekt C5.

Originalarbeiten:

Kubis, H-P, Scheibe, RJ, Meißner, JD, Hornung, G., and Gros, G. Fast-to-slow transformation and nuclear import/export kinetics of the transcription factor NFATc1 during electrostimulation of rabbit muscle cells in culture. *J Physiol* 2002; 541: 835-847

Kofidis, T, Akhyari, P, Boublik, J, Theodorou, P, Martin, U, Ruhparwar, A, Fischer, S, Eschenhagen, T, Kubis, HP, Kraft, T, Leyh, R, Haverich, A. In vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124: 63-9

Jürgens, KD, Gros, G. Phylogeny of gas exchange systems. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2002; 37: 185-98

Wetzel, P, Papadopoulos, S, Gros, G. Inhibition of muscle carbonic anhydrase increases rise and relaxation times of twitches in rat skeletal muscle fibres. *Pflügers Arch* 2002; 443: 762-70

Wetzel P, Kleinke T, Papadopoulos S, Gros G. Inhibition of muscle carbonic anhydrase slows the Ca^{2+} transient in rat skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 283: C1242-53

Adams, HA, Gros, G. Anesthesiologist and phylogenesis - what are the conclusions based on biology? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2002; 37: 65

Jürgens, KD. The consequences of being small: Etruscan shrew muscle. *J Exp Biol* 2002; 205: 2161-2166

Diplom- und Promotionsarbeiten

Cornelia Siebrands: Einfluss von Elektrostimulation auf die Muskelatrophie. Beteiligung des Akt/mTOR-Weges und des Calcineurin/NFAT-Signalweges. Diplom/Biochemie.

Melanie Märkisch und Björn Silberhorn: Der Einfluß von Carboanhydrasehemmung und von Acidose auf die Kontraktion des Papillarmuskels der Ratte. Promotion/Zahnmedizin.

Habilitation

Petra Wetzel: Die Carboanhydrasen des Sarkolemm und des sarkoplasmatischen Retikulums: Charakterisierung und physiologische Rolle bei H⁺-Transporten. Habilitation "Physiologie".

Abstracts

2002 wurden 6 Abstracts publiziert.