

Abteilung Vegetative Physiologie

Prof. Dr. med. Gerolf Gros

I. Forschungsprofil der Abteilung

Der Forschungsschwerpunkt der Abteilung liegt auf den Gebieten Muskelphysiologie und CO₂-Transport. Auf dem Gebiet der Muskelphysiologie werden die Mechanismen der Muskelplastizität untersucht, d.h. der Anpassung des Skelettmuskels an verschiedene Belastungsformen. Solche Anpassungen sind zum einen Muskelhypertrophie, und zum anderen die Umwandlung des Muskelfasertyps z.B. bei mäßiger aber anhaltender Dauerbelastung. Hierbei stehen das Verhalten des Muskelstoffwechsels und der Myosine sowie die intrazellulären Signalwege, die deren Änderungen vermitteln, im Zentrum des Interesses. - Der CO₂-Transport im Skelettmuskel wird anhand der im Skelettmuskel identifizierten Carboanhydrase-Isoenzyme untersucht: hier sind zwei membrangebundene Isoformen von besonderem Interesse, die Carboanhydrasen IV und XIV, die offenbar an der elektromechanischen Kopplung und am muskulären Milchsäuretransport beteiligt sind. Ein weiteres Projekt zum CO₂-Transport stellt die Frage nach den Mechanismen, die manche biologischen Membranen extrem gut permeabel für CO₂ und andere Gase machen (wie z.B. die Erythrocytenmembran), andere Membranen dagegen sehr schlecht permeabel (wie z.B. die apikalen Epithelmembranen in Colon und Magen). Im Fall der Erythrocytenmembran haben wir gezeigt, daß einige integrale Membranproteine bzw. membranassoziierte Proteine zusammenwirken um einen "CO₂-Kanal" in der Membran zu erzeugen, der eine optimale Anpassung des Erythrocyten an seine Funktion beim Gasaustausch darstellt.

II. Forschungsprojekte

1. Muskelplastizität.

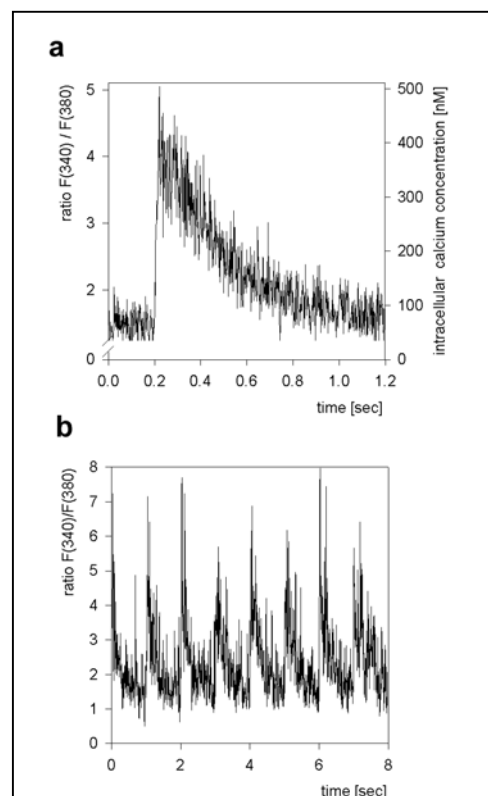
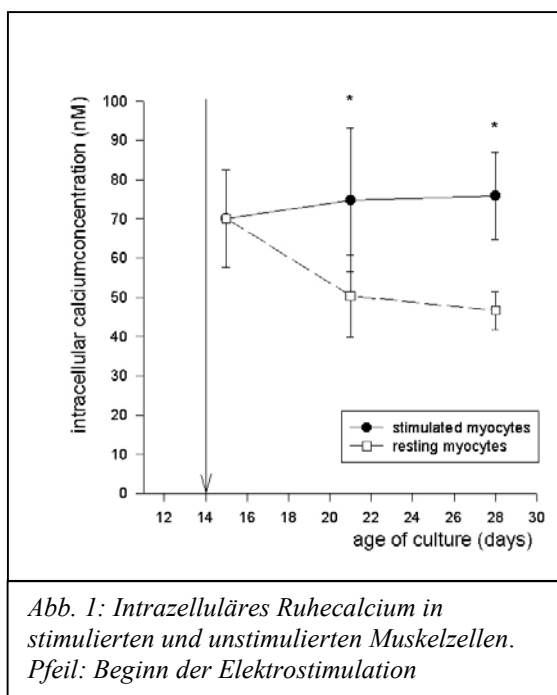
Adulte Skelettmuskelzellen sind als enddifferenzierte Zellen nicht mehr in der Lage, sich zu teilen. Trotzdem besitzen sie eine ausgeprägte Fähigkeit, auf Belastungen, beispielsweise muskuläres Training, mit einer Änderung der Expression von kontraktilen Proteinen und metabolischen Enzymen zu reagieren. Dieses kann zu einem Wechsel des Muskelfasertyps (z.B. vom schnell kontrahierenden, schnell ermüdenden Typ II zum langsam kontrahierenden, ermüdungsresistenten Typ I) oder auch zur Hypertrophie der Zellen führen. Die unterschiedlichen Stimuli, die während der Belastung auf die Muskelzellen wirken (z.B. passive mechanische Kräfte, aktive Kraftentwicklung, Ionenströme an der Zellmembran, Sauerstoffpartialdruck, Wachstumsfaktoren und vieles andere) müssen von der Zelle in Signaltransduktionswege umgesetzt werden, die die Transkription von Genen und deren Translation steuern. Beispielsweise führt wiederholtes kurzzeitiges Training mit hohen Gewichten zu einer Hypertrophie der schnellen, ermüdenden Typ II Fasern, langandauerndes Training mit niedriger Belastungsintensität zu einer stärkeren Entwicklung von langsamen, ermüdungsresistenten Typ I Fasern. Wie Muskelzellen die bei Belastung auftretenden Stimuli in spezifische Genaktivität umsetzen, ist nur sehr unvollständig bekannt. Das Ziel unseres Projektes "Muskelplastizität" ist die Aufklärung der Signalwege, die die Entscheidung über die Expression der verschiedenen Fasertypen (langsam oder schnell) und über eine Hypertrophie von Fasern treffen.

a) Fast-to-slow Transformation. Bei unseren Untersuchungen zur Signaltransduktion der Fasertypumwandlung verwenden wir ein Zellkulturmodell des adulten Fasertyps II. Muskelzellen des Kaninchens werden in Primärkultur auf Microcarriern kultiviert und

erlangen hierbei den Differenzierungsgrad einer adulten schnellen Muskelfaser. Diese Muskelzellen wurden mit Reizmustern elektrostimuliert, durch die eine Umwandlung vom schnellen Fasertyp II in den langsamen Fasertyp I zu induzieren ist. In den zurückliegenden Arbeiten konnten wir zeigen, dass die Signaltransduktion für diese Fasertyptransformation durch den Signalweg Calcium-Calmodulin-Calcineurin-NFATc1 kontrolliert wird. Hierbei wird durch Anstieg des intrazellulären Calciums via der Proteinphosphatase Calcineurin der Kernimport des Transkriptionsfaktors NFATc1 bewirkt, der insbesondere die Transkription des langsamen Myosins (hier die schwere Kette MHC I) induziert. Eine offene Frage bei der Kontrolle dieses Signalweges war, welcher Art die Calciumsignale sein müßten, die ihn aktivieren können. Sind hierzu langanhaltende Änderungen des intrazellulären Calciumspiegels nötig? Oder sind extrem kurze Calciumtransienten, wie sie bei der elektromechanischen Kopplung im Muskel erzeugt werden, für die Aktivierung des Calcineurin-NFATc1-Weges verantwortlich?

Methoden. Für die Untersuchungen der für eine Aktivierung des Calcineurin-NFATc1-Weges notwendigen Calciumsignale wurden die Muskelzellkulturen mit einem Muster, welches den langsamen Fasertyp induziert, über mehrere Tage hinweg gereizt und hierauf der intrazelluläre Ruhecalciumspiegel in den Zellen gemessen. Hierzu wurde der calciumabhängiger Fluoreszenzfarbstoff (Fura-2) verwendet, der in Verbindung mit einem Mikroskopphotometer die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration ermöglicht. Zusätzlich wurden Calciumtransienten von Einzelzellen während der Elektrostimulation gemessen. Um die Calciumkonzentration zu bestimmen, die erreicht werden muß, um Calcineurin-NFATc1 zu aktivieren, wurden Muskelzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Calciumionophor A23187 inkubiert, die intrazelluläre Calciumkonzentration gemessen, und parallel hierzu der Kernimport von NFATc1 als Mass für die Aktivierung des Signalweges beobachtet.

Ergebnisse und Diskussion. Abb. 1 zeigt die Messung des intrazellulären Ruhecalciumspiegels in gereizten und ungereizten Muskelzellen. Es ist deutlich zu erkennen,



dass der intrazelluläre Ruhecalciumspiegel der für einige Tage gereizten Zellen dauerhaft erhöht ist und im Mittel um 70 nM liegt. Während der Stimulation der Muskelzellen weisen die Calciumtransienten jedoch ein Maximum von bis zu 500 nM Calcium auf (Abb. 2). Um nun einschätzen zu können, ob der langanhaltende Anstieg im Ruhecalcium auch den Calcineurin-NFATc1 Signalweg aktivieren kann, wurden die Zellen mit Calciumionophor verschiedener Konzentrationen inkubiert und der Kernimport von NFATc1 quantifiziert (Abb. 3 a+b). Hierbei konnte festgestellt werden, dass zur Induktion des Kernimports in 50% der Zellen eine Ionophorkonzentration von $5 \times 10^{-8} \text{M}$ notwendig war. Die parallele Messung der Calciumkonzentration ergab, dass bei dieser Ionophorkonzentration eine Calciumkonzentration von 120 nM in den Muskelzellen vorliegt (Tab. 1). Dies bedeutet, dass der beobachtete Anstieg des Ruhecalciums auf 70 nM nicht ursächlich für eine 50%ige Aktivierung des Calcineurin-NFATc1-Weges sein und damit nicht verantwortlich für die Aktivierung des Signalweges während der Fasertransformation sein kann. Vielmehr müssen die Calciumtransienten, die im Zuge der elektromechanischen Kopplung induziert werden, die Quelle der Aktivierung des Calcineurin-NFATc1-Weges sein. Es lässt sich somit für die Fast-to-slow Transformation schließen, dass während langer Phasen von Muskelaktivität durch die hierbei auftretenden kurzen Calciumtransienten Calcineurin aktiviert wird und hierdurch der Transkriptionsfaktor NFATc im Kern angereichert werden kann. Dieses führt zur Induktion von Genen des langsamen Fasertyps I, beispielsweise des Gens der langsamen schweren Myosinkette MHC I.

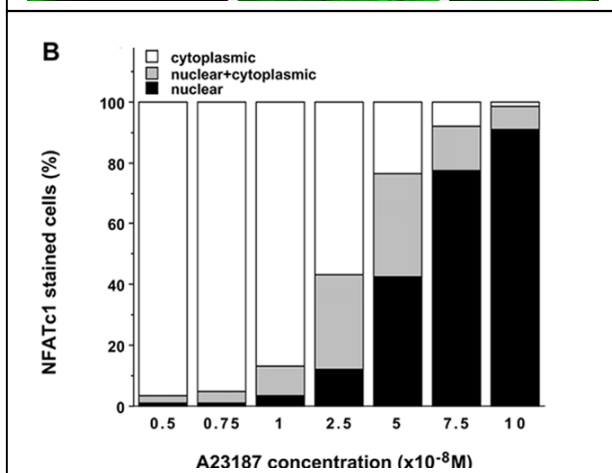
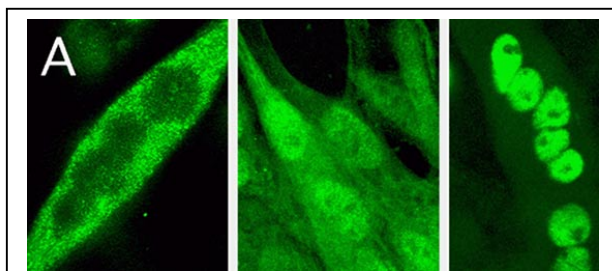


Abb. 3: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Muskelzellen, die mit Anti-NFATc1 markiert wurden (A). Abhängigkeit des Kernimports von NFATc1 von der Calcium-Ionophorkonzentration (B).

A23187 concentration ($\times 10^{-8} \text{M}$)	Fluorescence ratio F_{340}/F_{380}	Intracellular calcium concentration (nM)
---	1.51 ± 0.17	62.4 ± 13.7
1.0	1.65 ± 0.21	73.9 ± 17.2
2.5	1.71 ± 0.18	78.9 ± 15.5
5.0	2.12 ± 0.18	120.3 ± 15.8
7.5	2.35 ± 0.30	136.4 ± 26.9
10.0	2.50 ± 0.21	151.1 ± 18.2

Values are means \pm SD for n = 6 - 11 experiments. The age of the culture was 2 weeks

Tab. 1: Intrazelluläre Calciumkonzentration bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von A23187.

b) Hypertrophie. Durch Training können Muskelzellen zum Dickenwachstum angeregt werden - sie exprimieren große Mengen kontraktiler Proteine, wie z.B. Myosin. Diese

Anpassung an starke mechanische Belastungen (große Gewichte) wird als Hypertrophie bezeichnet. Da nur der trainierte Muskel hypertrophiert, muss es sich um Signale handeln, die lokal wirken. Es ist bekannt, dass Muskelzellen durch passive Dehnung und/oder muskuläre Aktivität zur Bildung von Wachstumsfaktoren angeregt werden können, die mit IGF-1 (insulin-like-growth-factor) identisch sind, und zusätzlich einer Splicevariante von IGF-1, MGF (mechanical-growth-factor). Diese beiden Wachstumsfaktoren werden als Vermittler hypertropher Anpassung des Muskels gesehen. Sie wirken sowohl autokrin als auch parakrin und führen einerseits zu einer vermehrten Expression von kontraktilen Proteinen in differenzierten Muskelzellen, andererseits auch zur Proliferation von Muskelstammzellen, die mit adulten Fasern fusionieren oder neue Fasern bilden können, den sogenannten Satellitenzellen. Es wird vermutet, dass die Signaltransduktion des IGF-1-Rezeptors bei der Vermittlung der Hypertrophie über die Aktivierung des AKT-mTOR-Signaltransduktionsweges gesteuert wird. Jedoch ist völlig unbekannt, welche Signalwege zur Expression von IGF-1 und MGF führen und ob diese Wachstumsfaktoren gleichermaßen zum Wachstum langsamer und schneller Muskelfasern beitragen.

Methoden. Um die Signale zu untersuchen, die zu einer Expression von IGF/MGF führen, wurden Muskelzellen in Carrierkultur für 14 Tage durch Schütteln der Kulturflaschen passiven mechanischen Kräften (Scherkräften) ausgesetzt. Nach 14 Tagen wurde ein Teil der Kultur ohne Schütteln weiterkultiviert und nach 3 und 6 Tagen Ruhe Proben genommen. Zusätzlich wurden Kulturen der Muskelzellen elektrostimuliert. Die Proben wurden mit Multiplex RT-PCR auf MGF, langsame MHC I, schnelle MHC II und IGF-Rezeptor hin untersucht.

Ergebnisse und Diskussion. - Abb. 4 zeigt, dass nach 3 Tagen Ruhe die Expression von MGF stark abfällt, jedoch die Expression der schweren Myosinketten (MHC I und II) nicht betroffen ist. Nach 6 Tagen jedoch (Abb. 5) ist die Expression des Wachstumsfaktors weiterhin reduziert und jetzt auch die des schnellen Myosins MHC II deutlich reduziert. Die Transkription der langsamen Myosinkette MHC I ist jedoch nicht vermindert. Ebenfalls unverändert ist das Transkript des IGF 1-Rezeptors. Elektrostimulation mit einem Muster, welches zur Umwandlung des Fasertyps II zum Fasertyp I führt, induziert die langsame MHC I (Abb. 7), was durch passive mechanische Kräfte nicht erreicht werden konnte. Somit konnte gezeigt werden, dass die Transkription des Wachstumsfaktors MGF und der schnellen Myosinkette MHC II von passiven mechanischen Kräften abhängen, jedoch die langsame Myosinkette MHC I nur durch kontraktile Aktivität des Muskels zu induzieren ist. Welche Signalwege die passiven mechanischen Kräfte in Signaltransduktionswege umsetzen bedarf weiterer Untersuchungen.

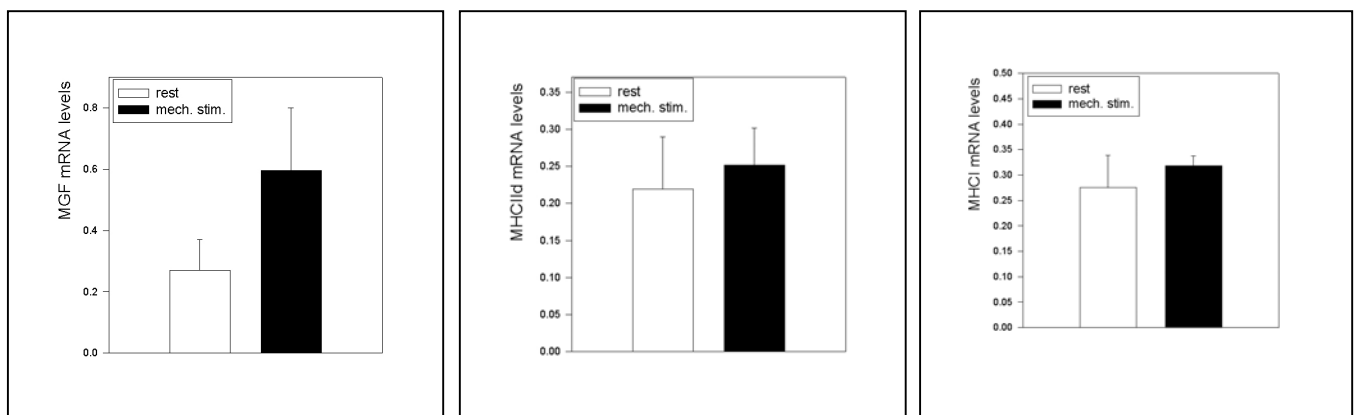


Abb. 4: MGF, MHCII und MHCI mRNA nach 3 Tagen Ruhe (rest) bzw. Schütteln (mech, stim.).

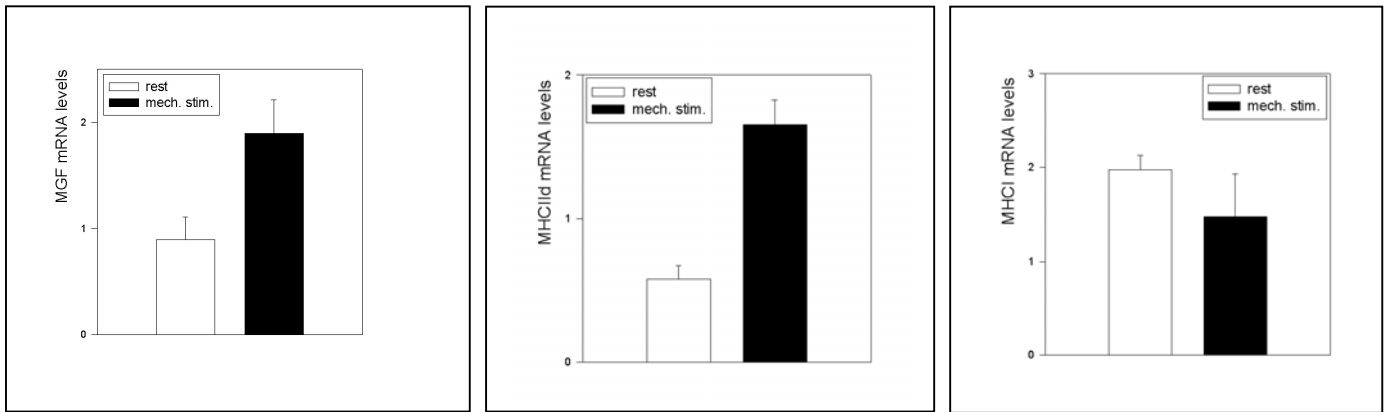


Abb. 5: MGF, MHCIIId und MHCI mRNA nach 6 Tagen Ruhe (rest) bzw. Schütteln (mech. stim.).

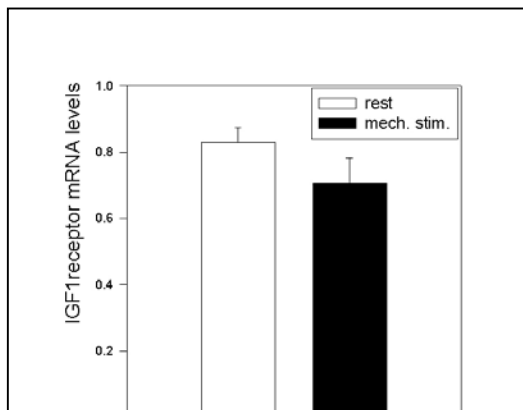


Abb. 6: IGF-1-Rezeptor mRNA in Muskelzellen nach 6 Tagen Ruhe (rest) bzw. Schütteln (mech.stim.).

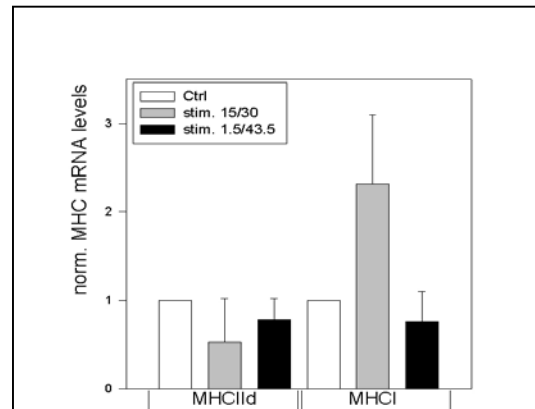


Abb. 7: MHCIIId und MHCI mRNA in elektrostimulierten Muskelzellen (15/30), 15min 1Hz - 30min Pause; (1,5/43,5), 1,5min 10Hz - 43,5min Pause.

Verantwortlich: Hans-Peter Kubis, Joachim Meißner, Renate Scheibe, Michael Scholz, Nina Hanke, Gerolf Gros. Förderung: DFG, Projekt Muskelplastizität Gr 489/15

2. Untersuchung der Rolle der MAP-Kinase p38 bei der Weiß-Rot-Transformation.

Joachim Meißner, Renate Scheibe. Förderung: DFG, Muskelplastizität

2. Membrangebundene Carboanhydrasen im Skelett-und Herzmuskel.

Petra Wetzels, Gerolf Gros; Kooperation W.S. Sly, St. Louis/USA

3. Carboanhydrase III des Skelettmuskels.

Cornelia Geers-Knörr, Petra Wetzels, Gerolf Gros. Kooperation: R. Levine, NIH/USA

4. Molekulare Mechanismen der CO₂-Permeabilität der Erythrocytenmembran.

Volker Endeward, Gerolf Gros. Kooperationen: P. Agre, Johns Hopkins/USA; J.-P. Cartron, Paris/Frankreich; L. Peters, Bar Harbor/USA.

5. CO₂-Permeabilität der Zellmembranen von Colon- und Magenepithel.

Anja Sommer, Volker Endeward, Gerolf Gros. Förderung: DFG / SFB 621, Projekt C5

6. Rolle des Myoglobin beim Sauerstofftransport in Herz- und Skelettmuskel.

Klaus-Dieter Jürgens, Gerolf Gros.

III. Publikationen

Kubis HP, Hanke N, Scheibe RJ, Meißner JD, Gros G. 2003. Ca²⁺ transients activate calcineurin/NFATc1 and initiate fast-to-slow transformation in a primary skeletal muscle culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C56-C63.

Endeward V., Kleinke, T., Gros, G. 2003. Carbonic Anhydrase in the Gastrointestinal Mucus of Mammals. Possible Protective Role Against Carbon Dioxide. *Comp. Biochem. Physiol.* 136: 281-287.

Gros G. 2003. Atmung. In: *Lehrbuch Vorklinik*, Hrsg. R.F. Schmidt und K. Unsicker. Köln. Deutscher Ärzteverlag, S. 235-291

Es wurden 7 Abstracts publiziert.

IV. Promotionen

C. Franke. Cloning and Functional Analysis of a Novel Aquaporin from *Xenopus laevis* Oocytes. Medizinische Dissertation 2003.

V. Gutachtertätigkeiten

G. Gros ist als Gutachter für mehrere internationale Journale und als Sondergutachter für die DFG tätig. P. Wetzel und H.P. Kubis sind als Gutachter für internationale Journale tätig.