

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 Belastung. Hierbei stehen das Verhalten des Muskelstoffwechsels und der Myosine sowie die intrazellulären Signalwege, die deren Änderungen vermitteln, im Zentrum des Interesses. Die elektromechanische Kopplung des Skelettmuskels wird von der Juniorprofessur Papadopoulos bearbeitet, die sich mit Untersuchungen zur Struktur und Funktion des skelettmuskulären Dihydropyridinrezeptors beschäftigt. - Der CO₂-Transport im Skelettmuskel wird anhand der im Skelettmuskel identifizierten Carboanhydrase-Isoenzyme untersucht: hier sind drei membrangebundene Isoformen von besonderem Interesse, die Carboanhydrasen IV, IX 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, Alveolarepithelmembran), 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 "CO₂-Kanäle" in der Membran bilden, die zu einer optimalen Anpassung des Erythrocyten an seine Funktion beim Gasaustausch beitragen.

II. Forschungsprojekte

1. Untersuchungen zur elektromechanischen Kopplung, insbesondere zu Struktur und Funktion des Dihydropyridinrezeptors (Juniorprofessur Papadopoulos)

Einleitung: Im Skelettmuskel führt die intrazelluläre Freisetzung von Kalziumionen zur Kontraktion. Die Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (sR) wird über das Membranpotential gesteuert (elektromechanische Kopplung, im Englischen: EC-coupling). Ein spezialisierter Kalziumkanal, der muskuläre Dihydropyridinrezeptor (DHPR), hat hierbei eine Schlüsselstellung als Spannungssensor: Er gibt die während der Membrandepolarisation erfasste Konformationsänderung weiter an einen anderen Kalziumkanal, den in der Membran des sR verankerten Ryanodinrezeptor (RyR). Daraufhin öffnet sich dieser und entläßt Kalziumionen in das Sarkoplasma. Anders als am Herzen ist im Skelettmuskel dafür kein Kalziumstrom durch den DHPR in die Zelle notwendig. Voraussetzung für diese spezielle Art der DHPR-RyR Kommunikation ist eine hoch geordnete Positionierung von DHP-Rezeptoren in Form von Tetraden an den elektronenmikroskopisch nachweisbaren Annäherungen von transversal-tubulärer und sR-Membran ("junctions"). Es ist nicht bekannt, welche molekularen Strukturen und Interaktionen die präzise Zusammenführung von DHPR und RyR während der Ausdifferenzierung von Muskelfasern vermitteln. Auch gibt es noch keine klaren Vorstellungen darüber, welche molekularen Bereiche von DHPR und RyR bei der Assoziation der beiden Proteine beteiligt sind. Noch weniger ist bekannt über das Zusammenspiel solcher Bereiche während der elektromechanischen Kopplung.

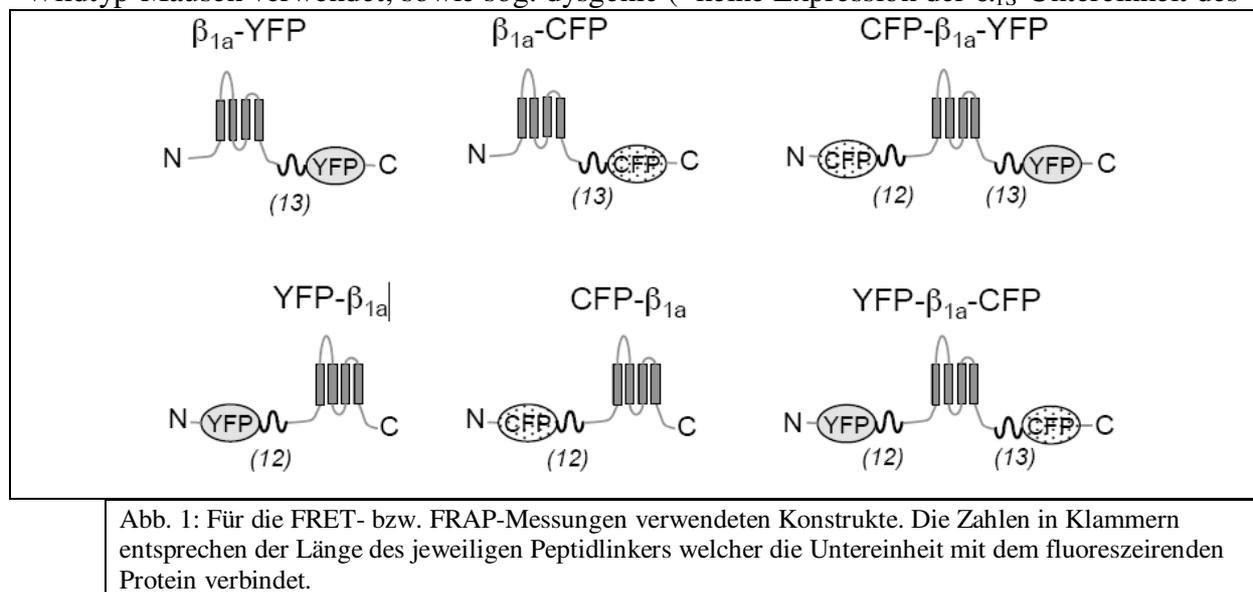
Aktuelle Projekt-Schwerpunkte:

(a) Mittels einer speziellen Fluoreszenzmethode (fluorescence resonance energy transfer, FRET) wird die Topologie von DHPR-Untereinheiten bzw. -Domänen innerhalb des intakten DHPR-RyR Komplexes in Muskelzellen untersucht. Später sollen "dynamische" DHPR-Bereiche identifiziert werden, die während der elektromechanischen Kopplung Konformationsänderungen durchlaufen und damit die Öffnung des RyR bewirken könnten.

(b) Zytoplasmatische Domänen des DHPR werden rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Dann erfolgen Untersuchungen bezüglich ihrer Struktur, Funktion und ihrer Affinität zu den junctions. Insbesondere soll hier die Bedeutung der DHPR:Calmodulin-Interaktion für den Skelettmuskel geklärt werden.

Zu (a): Topologie von DHPR-Untereinheiten

In vorangegangenen Arbeiten konnten mittels einer speziellen FRET-Methode putative Interaktionsbereiche zwischen dem DHPR und dem skelettmuskulären Ryanodinrezeptor (RyR1) identifiziert werden (Papadopoulos et al., 2004). In weiteren Untersuchungen lag der Schwerpunkt bei Messungen zur Anordnung der funktionell sehr wichtigen β -Untereinheit (genauer: $\beta_{1\alpha}$) des Kanals (Leuranguer, Papadopoulos & Beam, 2006). Dazu wurde die cDNA für $\beta_{1\alpha}$ mit der Sequenz für cyan und/oder yellow fluorescent protein (CFP bzw. YFP) versehen (Abb. 1). Das entsprechende Plasmid wurde mittels Mikroinjektion in einzelne Zellkerne von Mäuse-Myotuben in Primärkultur transferriert. Es wurden Myotuben von Wildtyp-Mäusen verwendet, sowie sog. dysgenic (=keine Expression der α_{1S} -Untereinheit des



DHPR) bzw. β_1 -null (=keine Expression der β_1 -Untereinheit) Muskelzellen. FRET- sowie FRAP-Messungen (fluorescence recovery after photobleaching) erfolgten dann mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskopes (LSM-Meta, Zeiss) an intakten Zellen, welche das jeweilige β_{1A} -CFP/YFP Fusionsprotein einige Stunden nach Plasmid-Injektion exprimierten. In Abwesenheit des DHPR (in dysgenic Myotuben) zeigten die exprimierten $\beta_{1\alpha}$ -Konstrukte eine diffuse Verteilung innerhalb des Sarkoplasmas (Abb. 2 a). FRAP-Messungen wiesen auf eine hohe Mobilität der diffus verteilten Untereinheit hin, in Abwesenheit des DHPR erfolgte also keine nennenswerte Bindung von β_{1A} an andere Strukturen. Wurde β_{1A} jedoch mit der cDNA für den DHPR in dysgenic Myotuben koexprimiert, so konzentrierte sich die Fluoreszenz in oberflächennahen Foci (Abb. 2 b). Von

diesen Foci ist aus früheren Arbeiten bekannt, dass sie physiologische Orte der DHPR-RyR1-Lokalisation und Interaktion darstellen, also Bereiche der junctions. Innerhalb dieser Bereiche konnte bei FRAP-Experimenten kein nennenswertes recovery β_{1A} -assoziierter Fluoreszenz beobachtet werden.

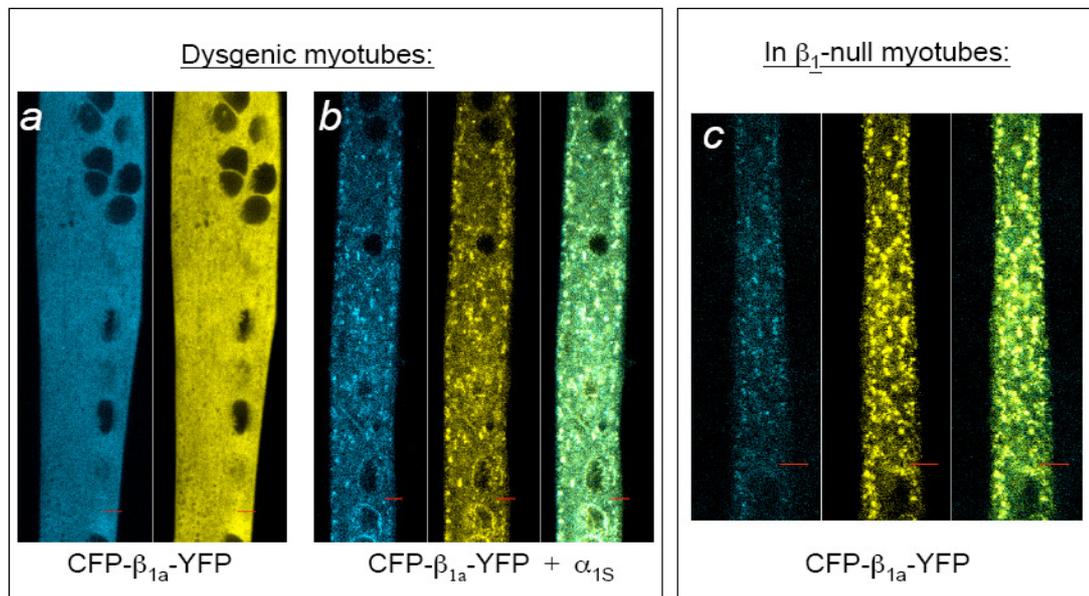


Abb. 2: Verteilung von blauer (CFP) bzw. gelber (YFP) Fluoreszenz der markierten β_{1A} -Untereinheit, wenn sie in lebenden dysgenic (a, b) bzw. β_{1A} -null Myotuben (c) exprimiert wird (Einzelheiten im Text).

Für die diffus verteilte, doppelt markierte β_{1A} -Untereinheit (CFP- β_{1A} -YFP) wurden intramolekulare FRET-Effizienzen von ~ 6-7 % gemessen, was den Abstand zwischen N- und C-terminus für das "freie" Protein auf < 10 nm festlegt. Ähnliche Werte wurden für die DHPR-assozierte, wieder doppelt markierte β_{1A} -Untereinheit gemessen, wenn diese in β_{1A} -null Myotuben exprimiert wurde. Da jedoch an Mixturen einfach markierter β_{1A} -Untereinheit (z.B. eine 1:1-Mixtur von CFP- β_{1A} und β_{1A} -YFP), exprimiert in β_{1A} -null Myotuben, kein FRET zu messen war, ist für β_{1A} innerhalb von Tetraden von intermolekulären Abständen > 10 nm auszugehen. (Bearbeitung: Dr. rer. nat. Symeon Papadopoulos. Förderung: DFG)

Zu (b): Zytoplasmatische Domänen des DHPR: Interaktion mit Calmodulin

Hintergrund: Ein definierter Bereich, Aminosäurereste 1609-1685 im C-terminus der DHPR-Herzisoform, beinhaltet eine für die - kalziumabhängige - Inaktivierung des Kanals verantwortliche Sequenz. Innerhalb dieser scheinen mindestens zwei, aufgrund von Peptidstudien sogar drei, Bindungsstellen für Calmodulin zu existieren (eine davon stellt ein sog. IQ-Motiv dar). Inwieweit eine Interaktion mit Calmodulin auch am skelettmuskulären DHPR stattfindet und ob sie *in vivo* eine Rolle bei der Zielsteuerung des Kanals spielt, bleibt noch zu klären.

Der zytoplasmatische, carboxyterminale Bereich des Dihydropyridinrezeptor (DHPR) wird auf seine Struktur und Funktion hin untersucht. Zur Zeit liegt der Schwerpunkt der Arbeit in dem Vergleich der DHPR-Calmodulin-Interaktion zwischen skelettmuskulärer und kardialer Isoform (Kaninchen). Verschiedene skeletale bzw. kardiale Abschnitte, die sich auch in der Länge der Sequenz unterscheiden (Abb. 3), werden rekombinant in Bakterien hergestellt, isoliert und aufgereinigt.

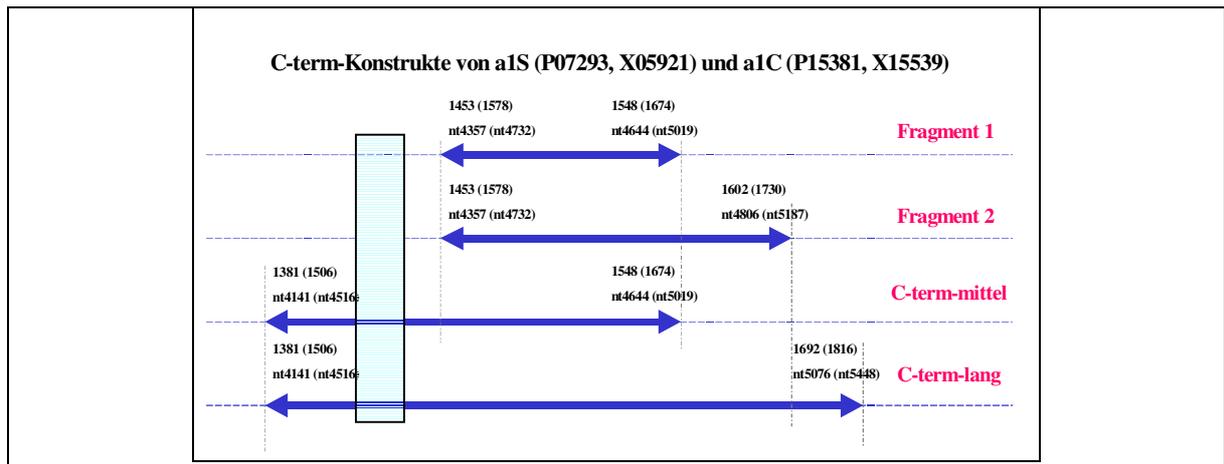


Abb. 3: Die z.Z. für die Untersuchung des Carboxyterminus des DHPR in E. coli exprimierten und aufgereinigten Kanalabschnitte. Die Zahlen geben die jeweiligen Aminosäure- bzw. Nucleotidpositionen ("nt") innerhalb des kompletten Kanals wieder (in Klammern die Werte für die kardiale Isoform). Der senkrechte Balken überlagert den Bereich der (wahrscheinlich!) minimalen Interaktionssequenz mit Calmodulin.

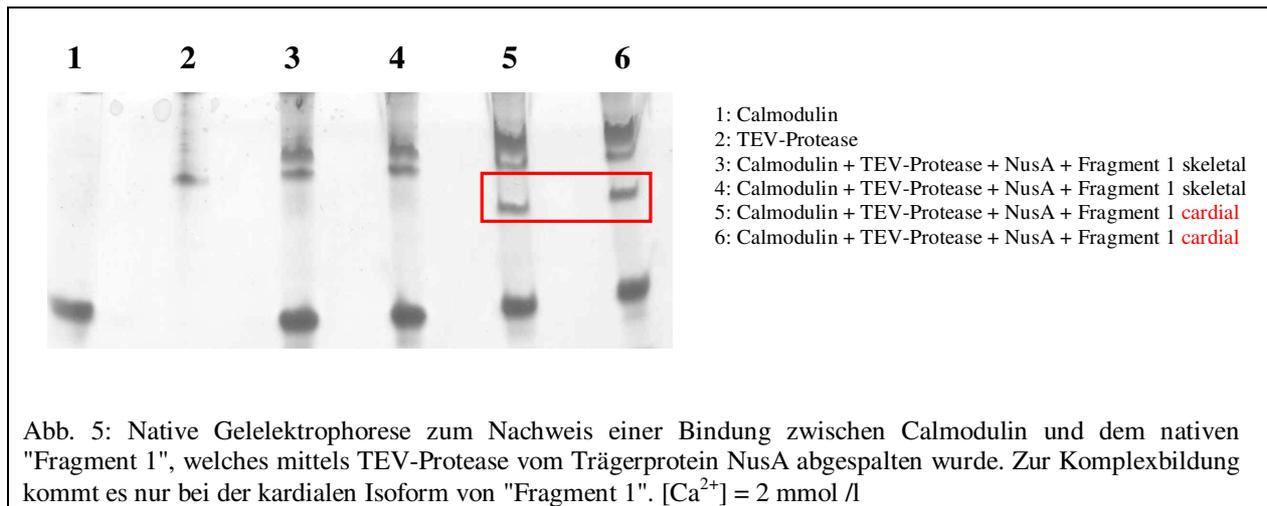
Da es sich größtenteils um Proteine mit nur geringer Löslichkeit handelt, werden zwei methodische Strategien für die Bereitstellung der Proteine in nativer Form beschrieben: Zum einen werden die als sog. "inclusion bodies" innerhalb der Bakterien vorliegenden Kanalabschnitte mit 8M Harnstoff solubilisiert und nach ihrer Aufreinigung mittels Metal-Affinitätschromatographie (His-Tag!) einer Dialyse unterzogen, während derer sie sich in den nativen Zustand "rückfalten" können. Um die $[Ca^{2+}]$ -Abhängigkeit der DHPR - Calmodulin - Interaktion zu untersuchen, wird die Rückfaltung des jeweiligen Proteins - in Anwesenheit von rekombinant hergestelltem Calmodulin und bei unterschiedlichen $[Ca^{2+}]$ vollzogen. Die Resultate nach Anwendung dieses Protokolls werden mittels nativer Gelelektrophorese dokumentiert (Abb. 4).



1 und 2: Calmodulin
 3 und 4: Fragment 2 (die Probe ist nicht ins Gel eingedrungen)
 5 und 6: Fragment 2 Calmodulin Interaktion

Abb. 4: Native Gelelektrophorese zum Nachweis einer Bindung zwischen Calmodulin und dem zurückgefalteten "Fragment 2". Das Fragment wandert nur nach Komplexbildung mit Calmodulin in das Gel ein, wodurch eine herabgesetzte Mobilität von Calmodulin resultiert (lanes 5, 6). $[Ca^{2+}] = 2 \text{ mmol/l}$

Zum anderen wurde eine Methode entwickelt, bei der die verschiedenen Fragmente schon vorab in nativer Form, d.h. ohne vorangegangene Rückfaltung aus der denaturierten Form, untersucht werden können. Hierzu werden die zu untersuchenden Abschnitte zunächst als Fusionsproteine mit dem sehr löslichen Protein NusA in Bakterien exprimiert (NusA-Vektor pETM60). Behandlung der aufgereinigten Fusionsproteine mit der TEV-Protease führt zur Freisetzung der Kanalabschnitte, welche dann - in Gegenwart von Kalzium - von Calmodulin gebunden und so vor dem Ausfallen "gerettet" werden. Auch hierbei wird die $[Ca^{2+}]$ -Abhängigkeit dieser Reaktion für skelettmuskuläre vs. kardiale Konstrukte untersucht (Abb. 5).



DHPR-Calmodulin-Interaktionen konnten sowohl nach Rückfaltung als auch durch Verwendung des Fusionsproteins NusA mittels nativer Elektrophorese nachgewiesen werden. Bei Versuchen in Abwesenheit von Kalzium (EDTA!) ist - für die kardiale Form - keine Komplexbildung zu beobachten, was im Gegensatz zu Arbeiten anderer Gruppen unter Verwendung synthetischer Peptide steht. Auch kann beobachtet werden, daß bei gleicher Kalzium-Konzentration die Calmodulin-Affinität des kardialen Fragment 1 größer zu sein scheint als diejenige der skelettmuskulären Form. Da sich die Aminosäuresequenzen innerhalb (als auch in unmittelbarer Nähe) der Calmodulin-Bindungsstelle zwischen den skelettalmuskulären und kardialen Domänen nur geringfügig unterscheiden, wird nun untersucht, in wieweit die verschiedenen besetzten Positionen die Interaktion mit Calmodulin beeinflussen. (Bearbeitung: Dipl. Biologin Barbara Eckhart).

Projektleiter: Prof. Papadopoulos, Förderung: DFG

2. Lokalisation und Mechanismus des hohen CO_2 -Diffusionswiderstandes des Epithels von Colon und Magen. Volker Endeward, Anja Sommer, Gerolf Gros. Förderung: DFG Gr 489/19, "CO₂-Permeabilität"

3. Molekulare Mechanismen der hohen CO_2 -Permeabilität der Erythrocytenmembran und von Alveolarepithelien Typ 1. Volker Endeward, Gerolf Gros. Kooperationen: P. Agre, Johns Hopkins/USA; J.-P. Cartron, Paris/Frankreich; W.F. Boron, Yale University/USA; L. Peters, Bar Harbor/USA; H. Mairbäurl, Heidelberg. Förderung: DFG Gr 489/19, "CO₂-Permeabilität"

4. Elektromechanische Kopplung: Suche nach Interaktionspartnern intrazellulärer Domänen des DHPR innerhalb einer skelettmuskulären cDNA-Bibliothek mittels Yeast-Two-Hybrid (Bearbeitung: Juniorprof. Dr. S. Papadopoulos, Ulrike Fuhrmann, PTA Förderung: DFG)

5. Elektromechanische Kopplung: Quantitative Proteomanalyse von "dysgenic" und "dyspedic" Muskelgewebe im Vergleich zu Wildtyp-Muskel von Mäusen (Bearbeitung: Juniorprof. Dr. rer. nat. Symeon Papadopoulos. Förderung: DFG)

6. Muskelplastizität - intrazelluläre Mechanismen der Muskelhypertrophie und der Fasertyptransformation. Nina Hanke, Hans-Peter Kubis, Joachim Meißner, Renate Scheibe, Michael Scholz, Gerolf Gros. Förderung: DFG, Projekt "Muskelplastizität" Gr 489/15 und 17.

7. Muskelplastizität - Promotorstudie zur Regulation der schweren Myosinketten bei der Weiß-Rot-Transformation des Skelettmuskels. Joachim Meißner, Renate Scheibe. Förderung: DFG Gr 489/15 und 17, "Muskelplastizität"

8. Membrangebundene Carboanhydrasen im Skelett-und Herzmuskel.

Petra Wetzel, Gerolf Gros; Kooperation W.S. Sly, St. Louis/USA. Förderung: DFG-Projekt Wetzel und Gros We 1962/4-1 bzw. /4-2.

9. Carboanhydrase III des Skelettmuskels.

Cornelia Geers-Knörr, Petra Wetzel, Gerolf Gros. Kooperation: R. Levine, NIH/USA. Förderung DFG-Projekt Wetzel und Gros We 1962/4-1 bzw. /4-2.

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

Klaus-Dieter Jürgens, Gerolf Gros.

III. Publikationen

(1) Originalpublikationen

Lang CJ, Postle AD, Orgeig S, Possmayer F, Bernhard W, Panda AK, **Jürgens KD**, Milsom WK, Nag K, Daniels CB. 2005. Dipalmitoylphosphatidylcholine is not the major surfactant phospholipid species in all mammals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 289: R1426-1439

Kubis HP, Hanke N, Scheibe RJ, Gros G. 2005. Accumulation and nuclear import of HIF1 alpha during high and low oxygen concentration in skeletal muscle cells in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta Cell Mol Res.* 1745: 187 - 195

Leppilampi M, Parkkila S, Karttunen T, Gut MO, **Gros G**, Sjoblom M. 2005. Carbonic anhydrase isozyme-II-deficient mice lack the duodenal bicarbonate secretory response to prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:15247-52.

Endeward V, Gros G. 2005. Low carbon dioxide permeability of the apical epithelial membrane of guinea-pig colon. *J Physiol.* 567:253-65.

Kleinke T, Wagner S, John H, Hewett-Emmett D, Parkkila S, Forssmann WG, **Gros G.** 2005. A distinct carbonic anhydrase in the mucus of the colon of humans and other mammals. *J Exp Biol.* 208: 487-96.

Leuranguer V, **Papadopoulos S**, Beam KG. 2005. Organization of calcium channel b1a subunits in triad junctions in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2005 Nov 28 Epub ahead of print, doi:10.1074/jbc.M509566200

Kirschner SE, Becker E, Antognozzi M, **Kubis HP**, Francino A, Navarro-Lopez F, Bit-Avragim N, Perrot A, Mirrakhimov MM, Osterziel KJ, McKenna WJ, Brenner B, Kraft T. 2005. Hypertrophic cardiomyopathy-related beta-myosin mutations cause highly variable calcium sensitivity with functional imbalances among individual muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288: H1242-51.

(2) **Publizierte Abstracts:** 2005 wurden 9 Abstracts publiziert.

IV. Promotionen / Habilitationen

Nina Hanke: "Metabolische Anpassung von Skelettmuskelzellen in Kultur: Stimuli und Signalwege, die zu Veränderungen der metabolischen Kapazität führen".
Promotion, Dr. rer.nat

Volker Endeward: "Low CO₂ permeability of the apical epithelial membrane of guinea pig colon". Promotion, Dr. med.

VI. Weitere Tätigkeiten in der Forschung

G. Gros ist als Gutachter für mehrere internationale Journale und als Sondergutachter für die DFG, den MRC und die NSF tätig. P. Wetzel und H.P. Kubis sind als Gutachter für internationale Journale tätig, H.P. Kubis ist als Gutachter für "The Wellcome Trust" und andere internationale Förderorganisationen tätig.

G. Gros ist gewählter Präsident der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2007.