

# Abteilung Vegetative Physiologie

Prof. Dr. med. Gerolf Gros

## I. Forschungsprofil der Abteilung

Der Forschungsschwerpunkt der Abteilung liegt auf den Gebieten Muskelphysiologie und CO<sub>2</sub>-Transport. 1.) 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 in Anpassung an verschiedene Belastungen und Belastungsformen. 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 der Abteilung zugeordnet ist und Untersuchungen zur Struktur und Funktion des skelettmuskulären Dihydropyridinrezeptors anstellt. 2.) Der CO<sub>2</sub>-Transport im Skelettmuskel wird anhand der im Skelettmuskel identifizierten Carboanhydrase-Isoenzyme untersucht: hier sind zwei membrangebundene Isoformen von besonderem Interesse, die Carboanhydrasen IV, IX und XIV, die z.T. an der elektromechanischen Kopplung und am muskulären Milchsäure-Membrantransport beteiligt sind. Ein weiteres Projekt zum CO<sub>2</sub>-Transport stellt die Frage nach den Mechanismen, die manche biologischen Membranen extrem gut permeabel für CO<sub>2</sub> 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 zwei Membranproteine, das Aquaporin-1 und das Rhesus-assoziierte Glykoprotein "CO<sub>2</sub>-Kanäle" darstellen, die an dieser Membran für nahezu den gesamten Transport von gasförmigem CO<sub>2</sub> verantwortlich sind und damit eine optimale Anpassung des Erythrocyten an seine Funktion beim Gasaustausch vermitteln. Dass Gase nicht hauptsächlich durch die Lipidphase der Membran sondern durch Proteinkanäle permeieren, revidiert ein seit langem bestehendes Paradigma des Membrantransports.

## II. Forschungsprojekte

### 1. Die membrangebundenen Carboanhydrasen des Skelettmuskels

**Einleitung.** - Die Carboanhydrase (CA) ist ein Zink-bindendes Metalloenzym, das die reversible Hydratationsreaktion von  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  katalysiert. Fünfzehn verschiedene CA-Isoformen sind bisher beschrieben worden. CA I, CA II, CA III, CA VII und CA XIII sind zytosolische Enzyme, wohingegen es sich bei CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV und CA XV um membrangebundene Isoformen handelt. CA V ist eine mitochondriale und CA VI eine sezernierte Form. Drei sog. CA-Related Proteine, CA-RP VIII, CA-RP X und CA-RP XI, sind durch eine homologe "CA-like" Domäne charakterisiert, sind aber katalytisch nicht aktiv.

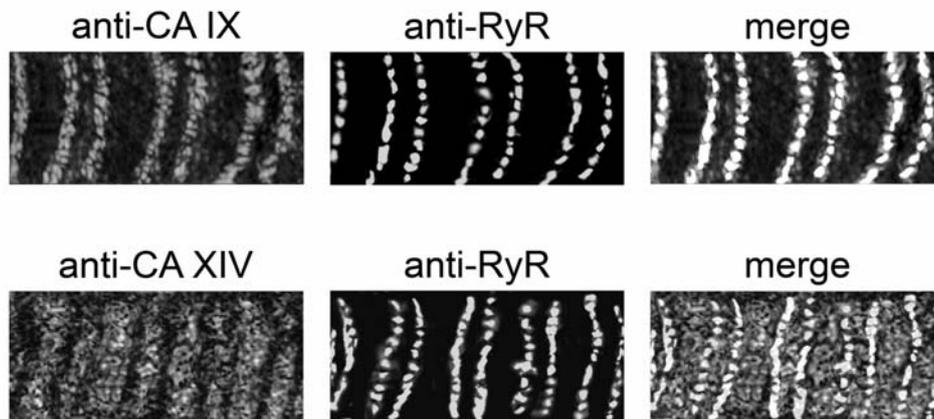
Membrangebundene CA Isoformen in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) von Skelettmuskelfasern. Bei der elektromechanischen Kopplung in Skelettmuskelfasern werden Ca<sup>++</sup> Ionen innerhalb weniger ms aus dem SR durch den Ryanodin-Rezeptor in das Zytoplasma freigesetzt. Durch die Ca<sup>++</sup>-ATPase (SERCA) werden sie wieder in das SR zurück gepumpt. Sowohl die Ca<sup>++</sup>-Freisetzung als auch die Ca<sup>++</sup>-Wiederaufnahme werden von einem H<sup>+</sup> Transport begleitet, um die positiven Ladungen, die mit den transportierten Ca<sup>++</sup> Ionen an der SR Membran verschoben werden, teilweise auszugleichen. Eine in der SR

Membran lokalisierte CA kann durch Katalyse des intrazellulären  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  Puffersystems eine ausreichend schnelle Bereitstellung von zu transportierenden  $\text{H}^+$  Ionen bzw. eine ausreichend schnelle Abpufferung von transportierten  $\text{H}^+$  Ionen garantieren.

Immunhistochemische Untersuchungen sollten klären, welche der bekannten membran-assoziierten CA Isoformen in der SR Membran von Skelettmuskelfasern der Maus exprimiert werden. CA Aktivitätsmessungen an isolierten SR Membranvesikeln von Wildtyp (WT) und CA knockout (ko) Mäusen sollten Aufschluss darüber geben, welche Aktivität das einzelne CA Isoenzym zu der Gesamt-SR-CA-Aktivität beiträgt. Isometrische Kontraktionsmessungen an isolierten Skelettmuskelfasern von CA ko Mäusen sollten zeigen, ob das Fehlen eines oder zweier CA Enzyme in der SR Membran die normale Muskelfunktion in den ko Mäusen beeinträchtigt.

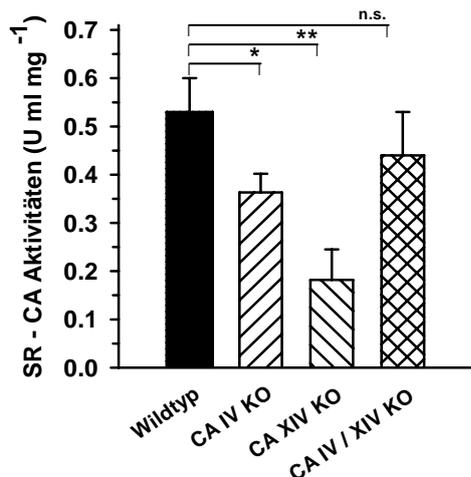
**Methodik und Ergebnisse.** – Muskelfaserbündel, die noch aus ca. 20 Einzelfasern bestanden, wurden aus dem schnell-kontrahierenden M. extensor digitorum longus (EDL) von WT Mäusen isoliert, mit 3% Paraformaldehyd und 100% Methanol fixiert und in 0.1% Triton X-100 für 5 min permeabilisiert. Für die doppelte Immunfärbung wurden anti-CA/FITC und anti-Ryanodin Rezeptor (RyR)/TRITC bzw. anti-CA/FITC und anti-SERCA 1/TRITC Antikörper verwendet. Die subzelluläre Lokalisation von CA, RyR und SERCA 1 wurde mit einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica DMIRBE, Wetzlar, Germany) untersucht.

Abb. 1 zeigt, dass die CA IX in der Region des terminalen SR lokalisiert ist, wohingegen die CA XIV ausschließlich nur im longitudinalen SR zu finden ist. Die CA IV ist sowohl auf das longitudinale als auch auf das terminale SR verteilt (Abb. nicht gezeigt). Diese Lokalisationsverteilung wurde durch die Immunfärbung mit anti-CA/FITC und anti-SERCA 1/TRITC bestätigt. Versuche mit anti-Maus CA XII Antikörpern konnten im Skelettmuskel keine CA XII-Isoform nachweisen.



**Abb. 1. Immunfärbung von EDL Muskelfasern von WT Mäusen mit anti-CA IX/FITC bzw. anti-CA XIV/FITC und anti-RyR**

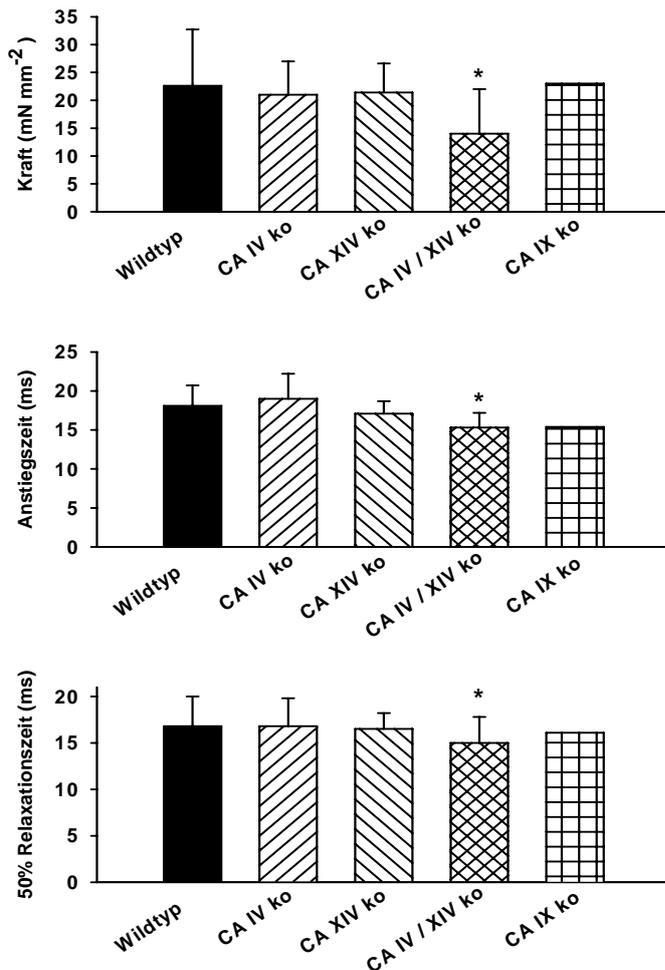
Die Mikrosomenfraktionen von WT bzw. CA ko Mäusen wurden auf einen diskontinuierlichen Saccharose – Dichtegradienten geschichtet. Nach Zentrifugation wurde aus der Fraktion, die sich in der 35%igen Saccharose-Phase anreicherte, die SR Membranfraktion gewonnen.



**Abb. 2. CA-Aktivitäten von WT- und CA-ko-SR-Membranfraktionen**

Die CA IV trägt ca. 30% und die CA XIV ca. 60% zur Gesamtaktivität bei. Die Aktivität in der CA IV / XIV ko Fraktion beruht auf der Aktivität von CA IX. Diese scheint in den doppelt ko Mäusen verstärkt exprimiert zu werden.

EDL Muskelfaserbündel von WT und CA ko Muskeln wurden direkt mit Platinelektroden stimuliert. Isometrische Einzelzuckungen wurden durch Reize von 1 ms Dauer und supramaximaler Spannung ausgelöst. Die Messkammer wurde mit oxygenierter Krebs-Henseleit Lösung perfundiert, die mit 25 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ 5% CO<sub>2</sub> gepuffert war, pH = 7.4 bei 25°C ± 0.2°C. Aus den Registrierungen der Einzelzuckungen wurden die Kraftamplitude, die Anstiegszeit und die 50% Relaxationszeit bestimmt.

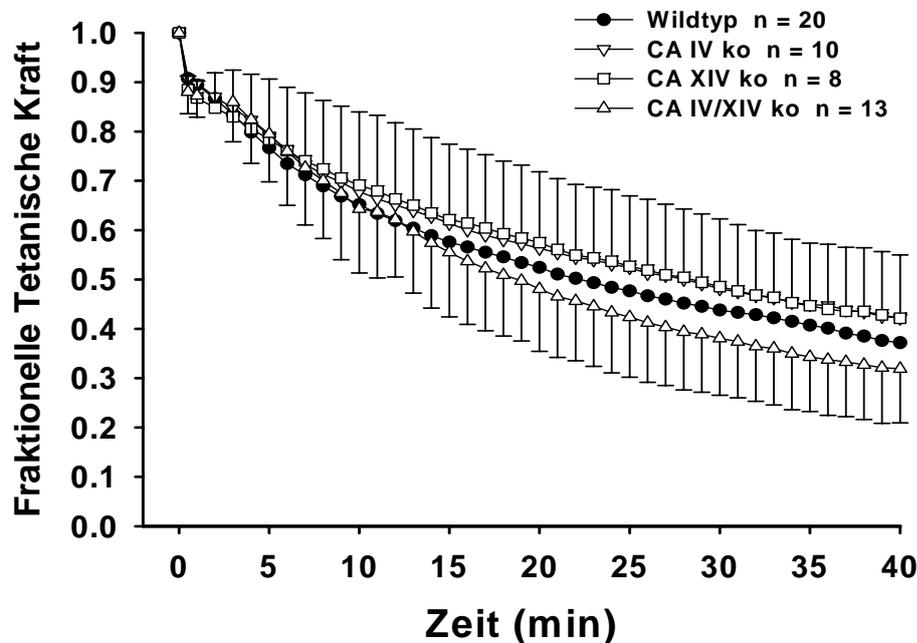


**Abb. 3. Kräfte, Anstiegszeiten, und 50%-Relaxationszeiten**

aus Einzelzuckungen von WT und CA ko Faserbündeln Mittelwerte ± S.D. Anzahl der Faserbündel (n), WT n=39, CA IV ko n=11, CA XIV ko n=12, CA IV / XIV ko n= 24, CA IX ko n=2. \* p< 0.05 vs. WT, ANOVA mit Dunnett's Post-Test.

Abb. 3 illustriert, dass die Kontraktionsparameter der isometrischen Einzelzuckungen von den CA IV ko, CA IX ko und CA XIV ko Muskelfasern verglichen mit den Werten der WT Fasern nicht verändert sind. Die Parameter der CA IV / XIV ko Fasern sind signifikant von den Parametern der WT Fasern verschieden. Sie sind aber nicht so verändert, wie sie durch

CA Hemmstoffe beeinflusst werden, sondern eher im Sinne einer intrazellulären Azidose. Das Fehlen von CA IV und CA XIV in der Plasmamembran dieser Muskelfasern bewirkt eine abgeschwächte pH Regulation und macht dadurch eine Azidose wahrscheinlich. Während des Ermüdungsprotokolls wurden die Fasern mit Reizserien von 0.2 s Dauer und einer Frequenz von 55 Hz, die sich alle 12.5 s wiederholten, für 40 min gereizt.



#### Abb. 4. Ermüdungskurven von EDL Faserbündeln von WT und CA ko Mäusen

Die Amplitude des ersten Tetanus zum Zeitpunkt 0 min wurde gleich 1.0 gesetzt. Die Ermüdungskurven der WT, CA IV ko und CA XIV ko Fasern sind nicht signifikant voneinander verschieden. Die Fasern der CA IV / XIV ko Mäuse ermüden etwas stärker als die der WT Mäuse, wahrscheinlich aufgrund des Vorhandenseins einer Azidose in diesen Fasern. Dieser etwas stärkere Ermüdungseffekt ist jedoch auch nicht signifikant.

**Schlussfolgerungen.** – Eine schnelle Bereitstellung bzw. Abpufferung von Protonen an der SR Membran wird durch das Vorhandensein von drei CA Isoformen im SR abgesichert. Der Ausfall einer CA führt im Falle der CA IV zu einer 30% Abnahme und im Falle der CA XIV zu einer 60% Abnahme der SR-Gesamt-CA-Aktivität. Dieser Aktivitätsverlust führt jedoch nicht zu einer Beeinträchtigung der Muskelfunktion in den entsprechenden ko Mäusen. Die Muskelfasern der CA IV / XIV ko Mäuse weisen eine CA IX Aktivität auf, die anscheinend in diesen Fasern verstärkt exprimiert wird, was immunzytochemische Untersuchungen bestätigen. Daher könnten Untersuchungen an Muskelfasern von triple-ko Mäusen wertvolle Ergebnisse zur weiteren Beschreibung der Funktion der SR-CA liefern.

**Verantwortlich:** Petra Wetzels, Renate Scheibe, Janine Hallerdei, Gerolf Gros. Kooperation mit W.S. Sly, St. Louis/USA. Förderung: DFG-Projekt Muskelcarboanhydrase We 1962/4-1

**2. Elektromechanische Kopplung: Untersuchungen zur Struktur und Funktion des skelettmuskulären Dihydropyridinrezeptors.**

Projektleiter: Prof. Dr. Symeon Papadopoulos, Junior-Professor; Barbara Ritter; Förderung: VW-Vorab und DFG-Projekt "DHP-Rezeptor" PA 801/3

**3. Untersuchung des Einflusses von Kalziumkanälen auf das Muskelproteom unter Verwendung zweier Tiermodelle: "dysgenic" und "dyspedic" Mäuse im Vergleich zum Wildtyp.**

Projektleiter: Prof. Dr. Symeon Papadopoulos, Junior-Professor; Fabian Tenne; Förderung: DFG - GRK705 "Charakterisierung pathophysiologischer Versuchstiermodelle"

**4. Muskelplastizität – Signale und intrazelluläre Mechanismen der metabolischen Anpassung der Muskelfasertypen bei der Weiß-Rot-Transformation.**

Nina Hanke, Joachim Meissner, Renate Scheibe, Gerolf Gros. Kooperation: H.P. Kubis. Förderung: DFG-Projekt Muskelplastizität Gr 489/20

**5. Promotorstudien zur Regulation der Genaktivität von Isoformen der schweren Myosinketten bei der Weiß-Rot-Transformation des Skelettmuskels.**

Joachim Meißner, Renate Scheibe, Gerolf Gros. Kooperatoren: Patrick K. Umeda, Department of Medicine, University of Alabama, Birmingham, U.S.A. Kin-Chow Chang, Division of Animal Production & Public Health, University of Glasgow Veterinary School, Glasgow, U.K. Hans-Peter Kubis, School of Sport, Health and Exercise Sciences, University of Wales, Bangor, U.K. Angel R. Nebreda, CNIO (Spanish National Cancer Centre), Madrid, Spain. Förderung: DFG- Projekt Muskelplastizität Gr 489/20.

**6. Carboanhydrase III des Skelettmuskels.**

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

**7. Epitheliale CO<sub>2</sub>-Barriere des Colon – Messungen mit einer CO<sub>2</sub>-Mikroelektrode.**

Anja Sommer, Volker Endeward, Gerolf Gros. Förderung: DFG-Projekt CO<sub>2</sub>-Permeabilität Gr 489/19

**8. Molekulare Mechanismen der CO<sub>2</sub>-Permeabilität der Erythrocytenmembran.**

Volker Endeward, Gerolf Gros. Kooperationen: P. Agre, Duke University/USA; J.-P. Cartron, Paris/Frankreich; W.F. Boron, Yale University/USA. Förderung: DFG-Projekt CO<sub>2</sub>-Permeabilität Gr 489/19

**9. Rolle des Myoglobin beim Sauerstofftransport in Herz- und Skelettmuskel.**

Klaus-Dieter Jürgens, Gerolf Gros.

### III. Publikationen

#### (1) Originalpublikationen

1. Meissner JD, Umeda PK, Chang K-C, Gros G, Scheibe R J. 2006. Activation of the  $\beta$ -myosin heavy chain promoter by MEF-2D, MyoD, p300, and the calcineurin/NFATc1 pathway. *J. Cell. Physiol.* 211:138-148
2. Endeward V, Musa-Aziz R, Cooper GJ, Chen LM, Pelletier MF, Virkki LV, Supuran CT, King LS, Boron WF, Gros G. 2006. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO<sub>2</sub> transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB J.* 20:1974-1981.
3. Endeward V, Cartron JP, Ripoche P, Gros G. 2006. Red cell membrane CO<sub>2</sub> permeability in normal human blood and in blood deficient in various blood groups, and effect of DIDS. *Transfus Clin Biol.* 13:123-127
4. Leuranguer V, Papadopoulos S, Beam KG. 2006. Organization of calcium channel beta1a subunits in triad junctions in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 281:3521-3527
5. Beekley M. D., Wetzel P., Kubis H. P., Gros G. 2006. Contractile properties of skeletal muscle fibre bundles from mice deficient in carbonic anhydrase II. *Pflügers Arch.* 452: 453-463
6. Scheibe R. J., Gros G., Parkkila S., Waheed A., Grubb J. H., Shah G. N., Sly W. S., Wetzel P. 2006. Expression of membrane-bound carbonic anhydrases IV, IX, and XIV in the mouse heart. *J. Histochem. Cytochem.* 54:1379-1391

(2) **Publizierte Abstracts:** 2006 wurden 10 Abstracts publiziert.

#### IV. Weitere Tätigkeiten in der Forschung

G. Gros ist als regelmäßiger Gutachter für mehrere internationale Journale und als Sondergutachter für die DFG, den MRC und NSF tätig. P. Wetzel und J. Meissner sind als Gutachter für internationale Journale tätig. G. Gros ist derzeit als Präsident der Deutschen Physiologischen Gesellschaft tätig.