

# Abteilung Vegetative Physiologie

Prof. Dr. med. Gerolf Gros

Tel. 0511-5322735

e-mail: gros.gerolf@mh-hannover.de

## 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, Magen und teilen der renalen Tubuluszellen). 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. Transportwege von molekularem CO<sub>2</sub> in der Erythrozytenmembran

In der Biologie war es bisher etablierte Vorstellung, dass niedermolekulare Gase wie z.B. O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> Zellmembranen problemlos über die Lipidphase durchdringen können und daher alle Zellmembranen sehr große Permeabilitäten für diese Gase besitzen. In den letzten Jahren wurde aber in mehreren Untersuchungen gezeigt, dass in manchen Fällen Zellmembranen existieren, die eine sehr geringe Permeabilität gegenüber CO<sub>2</sub> oder NH<sub>3</sub> aufweisen, wie z.B. die apikalen Membranen vom Colonepithel des Meerschweinchens oder die apikale Membran einiger Tubuluszellen der Niere. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Gaspermeabilitäten von Zellmembranen extrem unterschiedlich sein können. Die Ursache dieser großen

Permeabilitätsunterschiede waren bisher ungeklärt, es könnten Unterschiede in der Lipid- oder Proteinzusammensetzung der Zellmembranen dafür verantwortlich sein.

Wir haben die Transportwege von molekularem CO<sub>2</sub> in der Erythrozytenmembran untersucht und konnten nachweisen, dass zwei Gaskanäle, Aquaporin-1, AQP-1, und das Rhesusprotein, für die sehr hohe CO<sub>2</sub>- Permeabilität der Erythrozytenmembran verantwortlich sind, wogegen der Lipidananteil dieser Membran nur einen minimalen Beitrag zur Gaspermeabilität leistet.

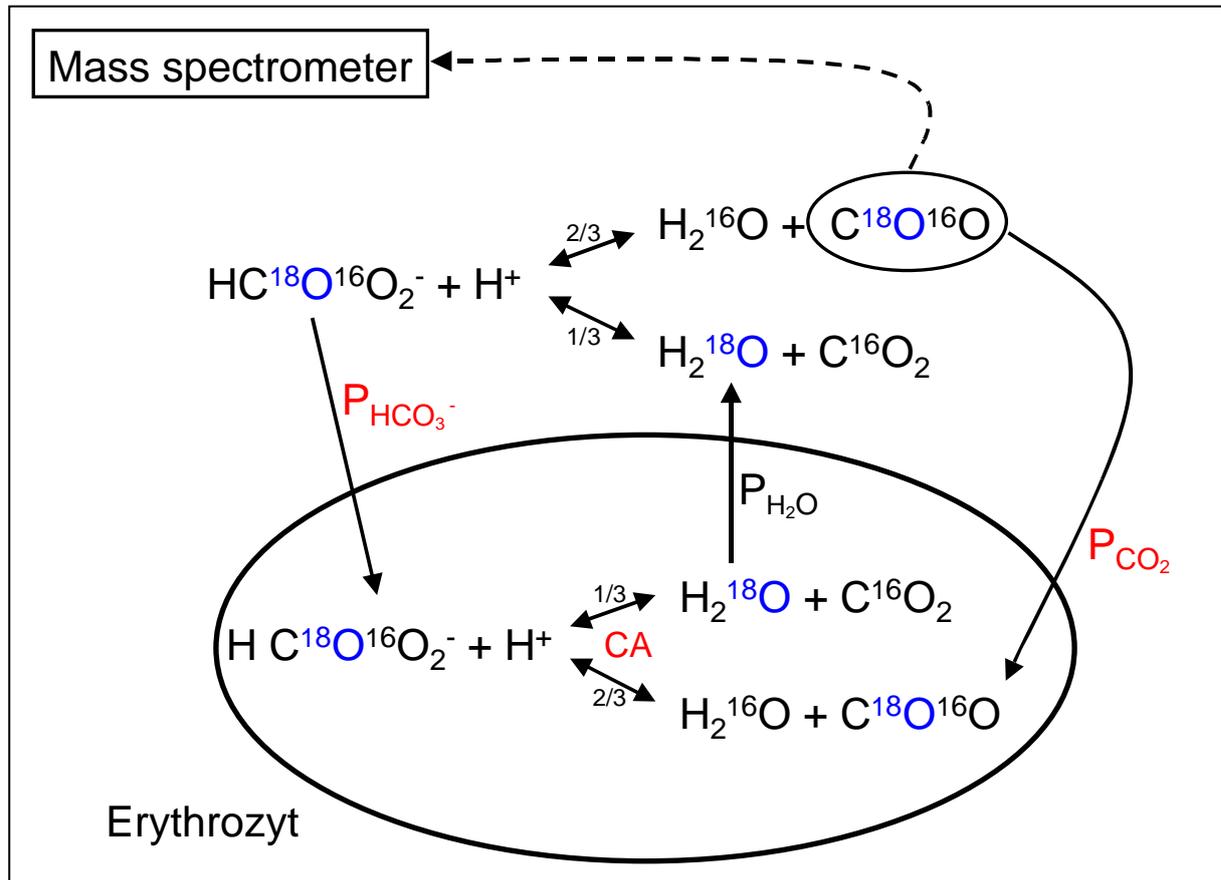


Abb. 1

**Methode und Ergebnisse.-** Wir haben eine massenspektrometrische Methode entwickelt, mit der man die CO<sub>2</sub>-Permeabilität und die Bikarbonat-Permeabilität einer Zellmembran gleichzeitig bestimmen kann. Diese Methode basiert darauf, dass <sup>18</sup>O-markiertes Bikarbonat in wässriger Lösung zu <sup>18</sup>O-markiertem CO<sub>2</sub> bzw. zu <sup>18</sup>O-markiertem Wasser reagieren kann. Aufgrund des im Vergleich zum CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Pool sehr großen Wasserpools ist der Rücktransfer von <sup>18</sup>O aus markiertem Wasser zum Bikarbonat sehr selten und damit nimmt der Markierungsgrad von Bikarbonat und CO<sub>2</sub> kontinuierlich ab. Nach Zugabe von Zellen, die Carboanhydrase enthalten, wird der gesamte beschriebene Vorgang intrazellulär stark beschleunigt und damit auch die Abnahme an markiertem CO<sub>2</sub>. Der zeitliche Verlauf der extrazellulären C<sup>18</sup>O<sup>16</sup>O-Konzentration wird durch die intrazelluläre Carboanhydrase-Aktivität (CA), sowie die Bikarbonat-Permeabilität,  $P_{\text{HCO}_3^-}$ , und die CO<sub>2</sub>-Permeabilität,  $P_{\text{CO}_2}$ , der Zellmembran bestimmt. Er wird mit einem Massenspektrometer registriert werden (s. Abb.1).

Aus dieser Messkurve werden dann mittels einer Fitprozedur die beiden genannten Permeabilitäten errechnet. Die CA-Aktivität wird unabhängig aus Zell-Lysaten ermittelt.

Tab. 1 zeigt die  $\text{HCO}_3^-$ -Permeabilitäten und  $\text{CO}_2$ -Permeabilitäten von normalen Erythrozyten und AQP1-defizienten Erythrozyten (Colton Null Blut). Außerdem sind die Wirkungen von pCMBS (einem Hemmstoff der die AQP-1 Wasserpermeabilität) und DIDS (einem Hemmstoff des AE1-Bikarbonat-Chlorid-Austauschers) angegeben. Die  $\text{CO}_2$ -Permeabilität von Colton Null Blut ist im Vergleich zum Normalwert von 0,15 cm/s stark verringert auf

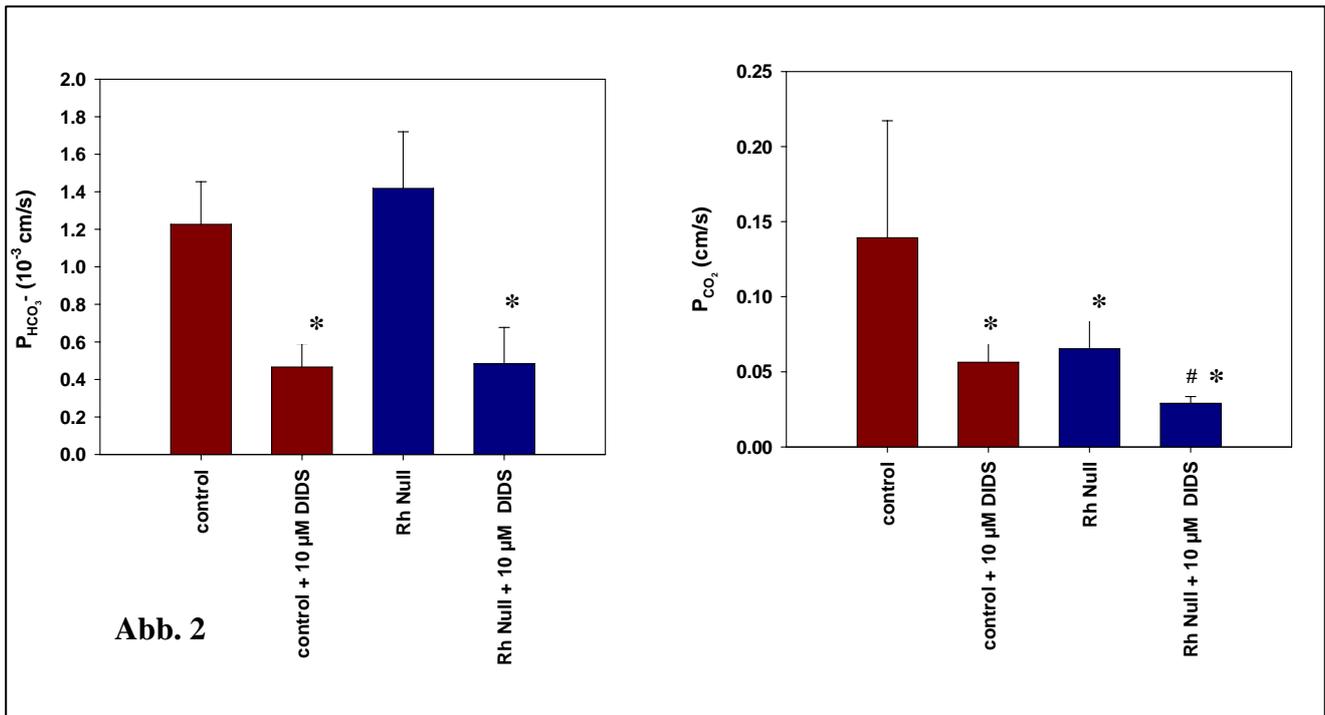
	$P_{\text{HCO}_3^-}$ ( $10^{-3}$ cm/s)	$P_{\text{CO}_2}$ (cm/s)
Normale Erythrozyten	$1,3 \pm 0,3$	$0,15 \pm 0,08$
Normale Erythrozyten + 1 mM pCMBS	$1,1 \pm 0,4$	$0,074 \pm 0,03$
Normale Erythrozyten + 10 $\mu\text{M}$ DIDS	$0,4 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,01$
AQP1 <sub>NULL</sub> Blut	$1,3 \pm 0,3$	$0,065 \pm 0,03$
AQP1 <sub>Null</sub> Blut + 1 mM pCMBS	$1,2 \pm 0,3$	$0,06 \pm 0,01$
AQP1 <sub>Null</sub> Blut + 10 $\mu\text{M}$ DIDS	$0,43 \pm 0,06$	$0,015 \pm 0,003$

**Tab. 1**

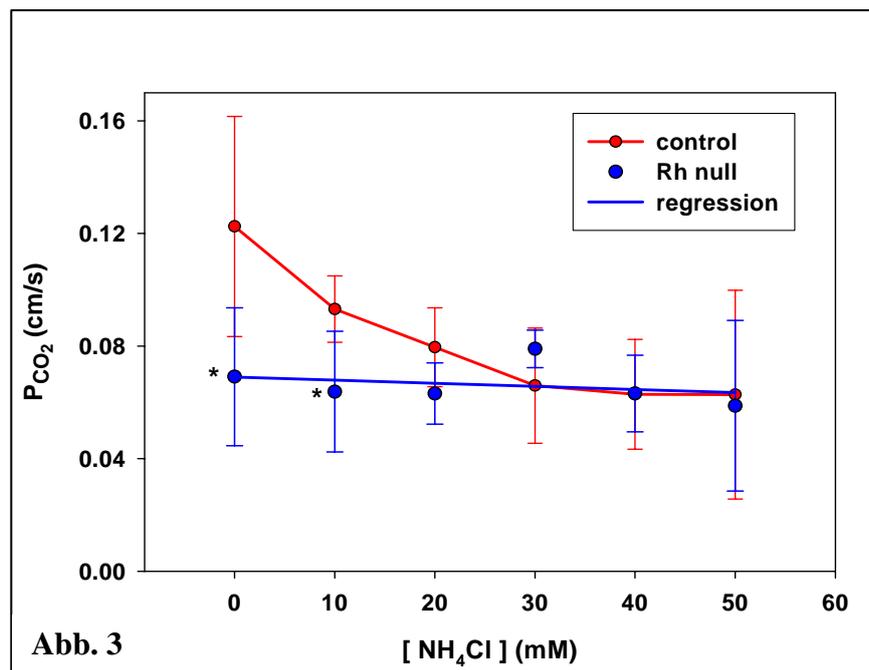
einen Wert von  $P_{\text{CO}_2} = 0,065$  cm/s. Der Hemmstoff pCMBS verursacht eine der Defizienz von AQP-1 ähnliche Reduktion der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität von normalen Blut auf 0,074 cm/s, während pCMBS erwartungsgemäß bei Colton Null Blut keine Wirkung auf  $P_{\text{CO}_2}$  mehr hat. Beide Befunde zeigen, dass der Wasserkanal AQP-1 zusätzlich ein  $\text{CO}_2$ -Kanal ist. DIDS als AE1-Hemmstoff reduzierte wie erwartet die Bikarbonat-Permeabilität (Tab. 1, dritte Zeile), gleichzeitig wurde aber auch der  $P_{\text{CO}_2}$  besonders stark auf 0,05 cm/s reduziert. DIDS wirkt also zusätzlich auch als wirkungsvoller Hemmstoff der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität. Dieser Effekt trat auch abgeschwächt bei AQP-1<sub>Null</sub> Blut auf (Tab. 1, letzte Zeile) und ist ein Zeichen dafür, dass es außer AQP-1 noch einen weiteren DIDS-abhängigen Transportweg in der Erythrozytenmembran geben muss.

Dieser Transportweg wurde von uns in weiteren Experimenten identifiziert. Wir führten Experimente mit Rhesus Null Blut (Rh<sub>Null</sub>) durch und konnten auch mit diesen Blut eine Reduktion der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität auf etwa die Hälfte des Kontrollwerts messen (Abb. 2, rechts). Die Behandlung von Rh<sub>Null</sub> Blut mit DIDS ergab eine weitere Verringerung des  $P_{\text{CO}_2}$  auf

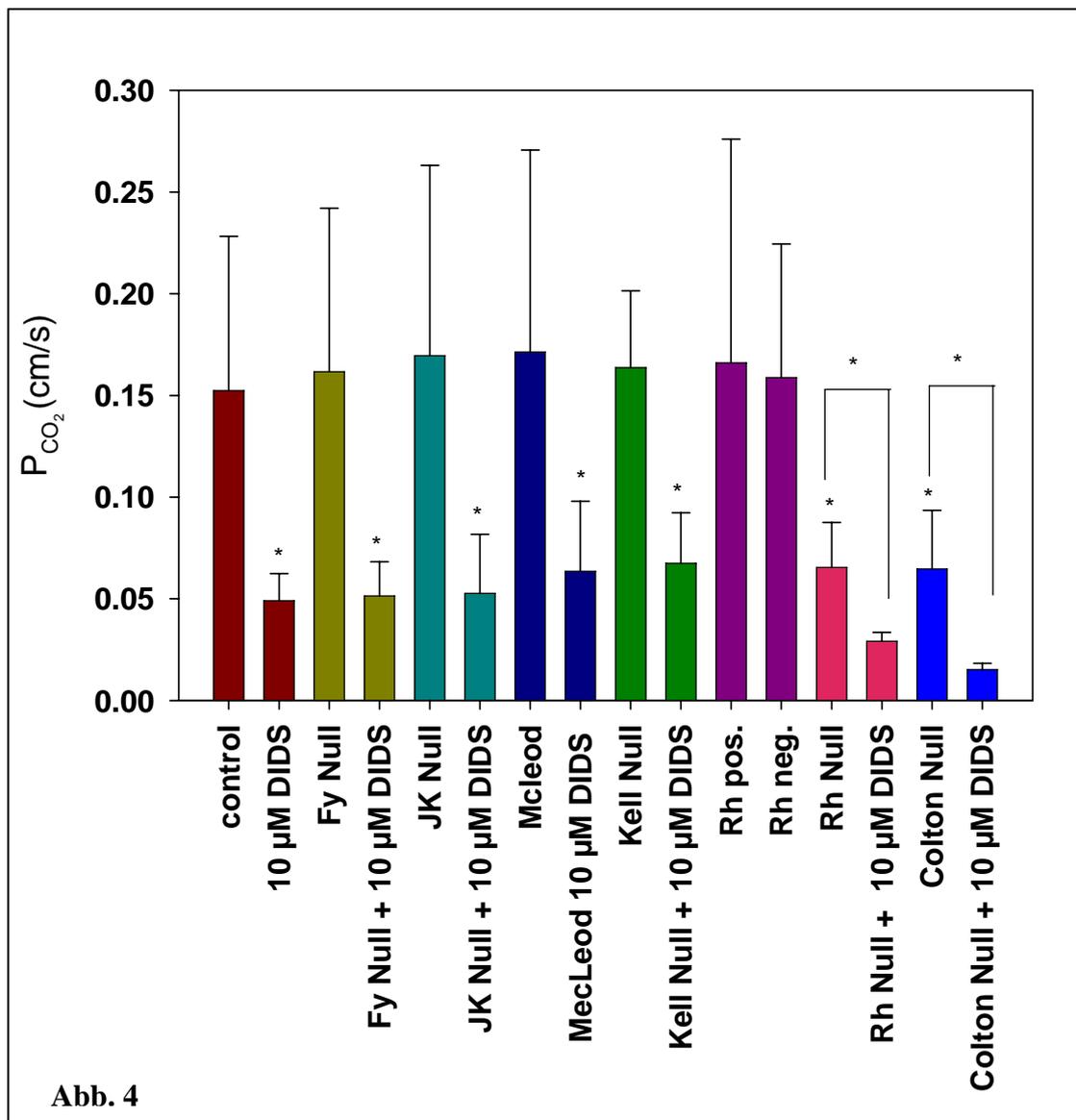
0,025 cm/s, was ein Zeichen dafür ist, dass DIDS nicht nur teilweise die CO<sub>2</sub>-Permeabilität von Rhesus-Protein hemmt, sondern auch partiell die von AQP-1.



In der Literatur ist seit kurzem Rhesus-Protein als NH<sub>3</sub>-Kanal bekannt und wir konnten mit unseren Messungen erstmalig zeigen, dass es in der Erythrozytenmembran auch als CO<sub>2</sub>-Kanal wirkt. Dieser Befund wurde auch dadurch bestätigt, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit von NH<sub>3</sub> gefunden wird, dass  $P_{\text{CO}_2}$  als Ausdruck der Konkurrenz zwischen NH<sub>3</sub> und CO<sub>2</sub> reduziert ist (Abb. 3). Beide Gasmoleküle konkurrieren um den Rhesus-Gas-Kanal und behindern sich gegenseitig beim Durchtritt, wodurch die CO<sub>2</sub>-Permeabilität herabgesetzt wird.



Sowohl AQP-1 als auch Rhesus-Protein sind Blutgruppenantigene und wir haben daher in weiteren Experimenten Blutproben untersucht, denen jeweils ein Blutgruppenantigen fehlte. In keiner dieser Blutproben konnten wir eine Reduktion der CO<sub>2</sub>-Permeabilität gegenüber normalem Blut feststellen und der DIDS-Effekt auf P<sub>CO<sub>2</sub></sub> entsprach in allen Fällen dem DIDS-Effekt auf normales Blut (Abb. 4). Also nur die beiden Blutgruppenproteine AQP-1 und Rh fungieren danach als Gaskanäle, was auch dadurch bestätigt wird, dass beide Kanäle jeweils etwa die Hälfte des Gesamtgaspermeabilität der Erythrocytenmembran ausmachen.



Die geringste CO<sub>2</sub>-Permeabilität fanden wir bei diesen gesamten Untersuchungen für AQP-1-defiziente Erythrozyten, die mit DIDS behandelt wurden (P<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 0,015cm/s; s. in Abb. 4, Säule ganz rechts). Unter diesen Bedingungen fehlt einer der beiden CO<sub>2</sub>-Kanäle und der andere ist durch DIDS fast vollständig blockiert. Daher nehmen wir an, dass dieser P<sub>CO<sub>2</sub></sub> der durch die Lipidschicht bedingten "basalen" CO<sub>2</sub>-Permeabilität der Erythrocytenmembran entspricht. Die beiden CO<sub>2</sub>-Kanäle vergrößern also die CO<sub>2</sub>-Permeabilität der

Erythrozytenmembran um den Faktor 10 und sind damit hauptverantwortlich für die sehr hohe CO<sub>2</sub>-Durchlässigkeit dieser Membran.

Wir konnten durch Expression von AE1 in einer Zelllinie zeigen, dass trotz des starken Effekts von DIDS auf die CO<sub>2</sub>-Permeabilität in der Tat AE1 in keiner Weise am Transport von molekularem CO<sub>2</sub> beteiligt ist, sondern lediglich den Bikarbonat-Transport vermittelt.

## **Literatur**

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.

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 Bio 113:123-127.

Endeward V, Cartron JP, Ripoche P, Gros G. 2007. RhAG protein of the Rhesus complex is a CO<sub>2</sub> channel in the human red cell membrane. FASEB J. 2007 Sep 27; [Epub ahead of print] PMID: 17712059

**Verantwortlich:** Volker Endeward, Gerolf Gros. Kooperation mit JP Cartron (Paris), WF Boron (Yale University, New Haven), LS King (Johns Hopkins, Baltimore). Förderung: DFG-Projekt CO<sub>2</sub>-Permeabilität Gr 489/19

## **2. Die membrangebundenen Carboanhydrasen des Skelettmuskels**

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

## **3. 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

## **4. 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"

## **5. 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

## **6. 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.

### **7. Carboanhydrase III des Skelettmuskels.**

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

### **8. 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

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

Klaus-Dieter Jürgens, Gerolf Gros.

## **III. Publikationen**

### **(1) Originalpublikationen**

**Scheibe RJ, Mundhenk K, Becker T, Hallerdei J, Waheed A, Shah GN, Sly WS, Gros G, Wetzol P.** 2007. Carbonic anhydrases IV and IX - their subcellular localization and functional role in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 Nov 14; [Epub ahead of print] PMID: 18003750

**Endeward V, Cartron JP, Ripoché P, Gros G.** 2007. RhAG protein of the Rhesus complex is a CO<sub>2</sub> channel in the human red cell membrane. *FASEB J.* 2007 Sep 27; [Epub ahead of print] PMID: 17712059

**Hanke N, Meissner JD, Scheibe RJ, Endeward V, Gros G, Kubis H-P.** 2007. Metabolic transformation of rabbit skeletal muscle cells in primary culture in response to low glucose. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* Published online, doi:10.1016/j.bbamcr. 2007. 12.012

**Meissner JD, Chang KC, Kubis HP, Nebreda AR, Gros G, Scheibe RJ.** 2007. The p38alpha/beta mitogen-activated protein kinases mediate recruitment of CREB-binding protein to preserve fast myosin heavy chain IId/x gene activity in myotubes. *J Biol Chem* 282: 7265-7275.

**Meissner JD, Umeda PK, Chang KC, Gros G, Scheibe RJ.** 2007. Activation of the beta myosin heavy chain promoter by MEF-2D, MyoD, p300, and the calcineurin/NFATc1 pathway. *J Cell Physiol* 211:138-148.

da Costa N, Edgar J, Ooi PT, Su Y, **Meissner JD**, Chang KC. 2007. Calcineurin differentially regulates fast myosin heavy chain genes in oxidative muscle fibre type conversion. *Cell Tissue Res* 329: 515-27.

**Wetzel P**, **Scheibe RJ**, Hellmann B, **Hallerdei J**, Shah GN, Waheed A, **Gros G**, Sly WS. 2007. Carbonic anhydrase XIV in skeletal muscle – subcellular localization and function from wild-type and knockout mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C358-C366.

## (2) Buchbeiträge und Herausgeberschaft von Büchern

**Jürgens KD**. 2007. Energy turnover and oxygen transport in the smallest mammal, the Etruscan shrew *Suncus etruscus*. In: W.C. Aird (Hrsg): Endothelial Biomedicine, Cambridge University Press, pp 107-111

Huch R, **Jürgens KD** (Hrsg) Mensch, Körper, Krankheit. 5.Auflage, Elsevier Urban & Fischer, 2007

(3) **Publizierte Abstracts**: 2007 wurden 5 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.