

**Beteiligung der Carboanhydrase-Isoenzyme
IV, IX und XIV an H⁺- oder HCO₃⁻ - gekoppelten
Transportprozessen, untersucht an
Skelettmuskelfasern von
Carboanhydrase-*knockout* Mäusen**

**Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer**

**Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation von

**Dipl.-Biol. Janine Hallerdei
geboren am 15.08.1980 in Greven**

2009

Referent: Prof. Dr. Gerolf Gros
Institut für Vegetative Physiologie
Zentrum Physiologie
Medizinische Hochschule Hannover

Koreferent: Prof. Dr. Jürgen Alves
Institut für Biophysikalische Chemie
Zentrum Biochemie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 09. Juli 2009

Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass im Skelettmuskel membranständige Carboanhydrase vorkommt. Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, welche membranständigen Isoenzyme der Carboanhydrase vorkommen, und es sollte ihre Verteilung und ihre funktionelle Bedeutung im Skelettmuskel der Maus untersucht werden. Hierzu wurden Membranfraktionen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und des Sarkolemm (SL) aus Wildtyp-, Carboanhydrase IV-, Carboanhydrase XIV- und Carboanhydrase IV + XIV *knockout*-Mäusen isoliert. Mittels *Western Blot* wurde nachgewiesen, dass die CA IV, die CA IX und die CA XIV in Wildtyp-Mäusen sowohl im Sarkolemm als auch im sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind. Die CA XII konnte im Skelettmuskel der Maus dagegen nicht nachgewiesen werden. Um die Verteilung der einzelnen Carboanhydrasen auf Sarkolemm und sarkoplasmatisches Retikulum zu bestimmen, wurden die *Western Blots*, nach Auftragen von SL- und SR-Fractionen mit jeweils gleicher Carboanhydrase-Aktivität, quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass im Sarkolemm der Anteil der CA IV 5 mal und der CA XIV 7,5 mal höher ist als im sarkoplasmatischen Retikulum, wohingegen der Anteil der CA IX im sarkoplasmatischen Retikulum 3,5 höher ist als im Sarkolemm. Durch *Western Blot*-Bestimmungen konnte für die *knockout*-Mäuse CA IV *ko*, CA XIV *ko* und CA IV / CA XIV *ko* bestätigt werden, dass die jeweils ausgeschalteten Carboanhydrasen nicht exprimiert werden.

Carboanhydrasen katalysieren die Reaktion $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Die am Skelettmuskel der Maus nachgewiesenen membranständigen Carboanhydrasen könnten daher bei Protonen- oder Bikarbonat-Transportprozessen über die Zellmembran eine funktionelle Bedeutung haben. Zwei wichtige Transportprozesse mit Protonenbeteiligung sind der Laktat-Protonen-Kotransport durch die Transporter MCT1, MCT4 und die pH-Regulation durch die Transporter AE1 (*Anion-exchanger 1*), NBC (Natrium-Bikarbonat-Kotransporter) und NHE (Natrium- H^+ -*exchanger*). Die Beteiligung der Carboanhydrasen an diesen Transportvorgängen wurde an Muskelfaserbündeln des *musculus extensor digitorum longus* (EDL) und Muskelfaserbündeln des *musculus soleus* (Soleus) mittels pH-Mikroelektroden untersucht.

Hierbei wurden gleichzeitig intrazelluläre pH-Änderungen mittels einer pH_i-Elektrode und extrazelluläre pH-Änderungen an der Zelloberfläche mittels einer pH_s-Elektrode registriert. Laktat-Transportraten wurden aus den zeitlichen Änderungen des intrazellulären pH-Wertes durch Multiplikation mit dem intrazellulären Pufferfaktor ermittelt.

Die Laktat-Transporter MCT1 und MCT4 weisen eine unterschiedliche Verteilung am Skelettmuskel auf; der MCT4 kommt vorwiegend am *EDL* vor, während der MCT1 hauptsächlich am *Soleus* vorkommt. Durch Untersuchungen an Wildtyp- und verschiedenen Carboanhydrase-*knockout*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass alle membranständigen Carboanhydrasen CA IV, CA IX und CA XIV eine funktionelle Bedeutung für den Laktat-Transport am *EDL* haben.

Die CA XIV ist verantwortlich für ~60% der Carboanhydrase-Aktivität am SL. Sie hat einen großen Einfluss auf den Laktat-Transport, obwohl sie nicht streng mit dem MCT4 kolokalisiert ist. Die CA IV hingegen ist relativ genau mit dem MCT4 kolokalisiert, trägt jedoch nur zu 30% der Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität des SL bei. Darauf ist wohl ihr geringer Einfluss auf den Laktat-Transport im *EDL* zurückzuführen. In den CA XIV-*knockout*-Mäusen ist dagegen der Laktat-Transport stark erniedrigt, und in den CA IV / CA XIV-Doppel-*ko*-Mäusen sind die Transportraten noch zusätzlich etwas erniedrigt. Da der Laktat-Transport in den CA XIV-*ko*-Muskeln so stark verringert ist, ist davon auszugehen, dass die Carboanhydrase CA IV das Fehlen der CA XIV nicht mehr kompensieren kann, umgekehrt kann die CA XIV das Fehlen der CA IV wohl weitgehend kompensieren. Angesichts dessen ist es überraschend, dass das isolierte Fehlen der CA IX einen ähnlich starken Effekt auf die Transportraten der Laktat-Transporter hat wie das Fehlen der CA XIV, obwohl die CA IX nur ca. 15% zur Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität des Sarkolemms beiträgt. Dies wird dadurch gedeutet, dass die CA IX im Oberflächen-SL fehlt und ausschließlich in den T-Tubuli mit dem MCT4 kolokalisiert ist, wo ihre Aktivität durch die in den Oberflächen-Membranen lokalisierten Isoenzyme IV und XIV nicht ersetzt werden kann. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass ein wesentlicher Teil der Laktatelimination der Muskelzelle durch die T-Tubuli erfolgt und dass hierfür ein Zusammenwirken der T-tubulären CA IX mit den Oberflächen-sarkolemmalen Isoenzymen CA IV und CA XIV erforderlich ist. Da

dieser Mechanismus in Abwesenheit beider sarkolemmalen Carboanhydrasen CA IV und CA XIV nicht mehr funktioniert, kann dadurch die Beobachtung erklärt werden, dass beim Vergleich von CA IV / CA XIV-Doppel-ko-Muskeln mit CA IV / CA IX / CA XIV-Tripel-ko-Muskeln nur noch eine kleine zusätzliche Verminderung der Transportraten zu finden ist. Nachdem die beiden Carboanhydrasen IV und XIV ausgeschaltet wurden, gibt es also nur einen sehr geringen Effekt auf den Laktat-Transport durch das zusätzliche Ausschalten der CA IX. Dagegen existiert ein großer Effekt der CA IX auf den Laktat-Flux bei Untersuchung der CA IX-Einzel-ko-Maus. Die Hypothese zur Erklärung dieser Befunde ist, dass die CA IX in der Tiefe des T-Tubulus die durch den Laktat-Transport hervorgerufenen pH-Veränderungen abpuffert und dabei die H^+ -Ionen der Milchsäure mit Bikarbonat zu CO_2 reagieren, welches Richtung Interstitium aus dem Tubulus herausdiffundieren kann. Dabei werden in der Tiefe des T-Tubulus sehr große Mengen an Bikarbonat verbraucht, welches aus dem Bereich der Tubulusöffnung mittels Diffusion in den T-Tubulus hinein nachgeliefert werden muss. An der Tubulusöffnung müssen also die beiden Oberflächen-Carboanhydrasen CA IV und CA XIV die schnelle Bereitstellung von Bikarbonat aus CO_2 zum Hineintransport in den Tubulus katalysieren. Wenn diese fehlen, wird der gesamte T-tubuläre Transportzyklus ebenso ineffizient, als wenn die CA IX fehlt.

Die Amplituden der, mit der oberflächlichen pH_s -Elektrode gemessenen, pH_s -Transienten werden durch die CA IV- und CA IX- und CA IX-Einzel-*knockout*-Mäuse nicht beeinflusst. Einen hochsignifikanten Effekt bewirkt das Fehlen der CA IV und CA XIV in den CA IV / CA XIV-Doppel-ko-Mäusen bzw. der Einfluss des CA-Hemmers Benzolamid. Damit wird an der Zelloberfläche infolge mangelhafter Nachlieferung von H^+ aus der CO_2 -Hydratationsreaktion ein starker Protonenmangel verursacht, der sich in einem vergrößerten alkalischen Oberflächen-pH-Transienten widerspiegelt.

Im *Soleus* haben die Carboanhydrasen IV, IX und XIV in der Einzel-ko-Maus keinen nachweisbaren Einfluss auf die Laktatfluxe und die Amplituden der pH_s -Transienten. Auch durch Benzolamid werden im *Soleus* die Fluxe nicht beeinflusst, allerdings gibt es einen signifikanten Effekt auf die von der pH_s -Elektrode gemessenen Oberflächen-Transienten. Dieses kann als Nachweis dafür gewertet werden, dass die membranständigen Carboanhydrasen auch

beim *Soleus* einen Einfluss auf den oberflächlichen pH-Wert haben, der aber für den Laktat-Transport am *Soleus* keine große Bedeutung hat. Die vorliegenden Messungen zeigen, dass die Milchsäuretransportkapazität im *Soleus* nur halb so groß ist wie im *EDL*. Deshalb wird vermutet, dass der Milchsäuretransport im *Soleus* in viel geringerem Maße als im *EDL*, oder gar nicht, von der Mitwirkung einer Carboanhydrase abhängt. Dies kann die im *Soleus* fehlenden Effekte der *CA-knockouts* und des Hemmers Benzolamid auf die Laktatfluxe erklären.

Um den Einfluss der membranständigen Carboanhydrasen auf die pH-Regulation zu untersuchen, wurden extrazellulär Lösungswechsel zwischen einer Krebs-Henseleit-Lösung und einer zusätzlich Ammoniumsulfat enthaltenden Krebs-Henseleit-Lösung, durchgeführt. Ammoniumsulfat befindet sich im Gleichgewicht mit NH_3 . Dieses NH_3 diffundiert in die Zelle, was zu einer intrazellulären Alkalinisierung führt. Als Gegenregulation versucht die Zelle mittels der Transporter *AE1*, *NBC* und *NHE* den normalen intrazellulären pH-Wert wiederherzustellen. Die damit verbundenen pH-Veränderungen wurden intra- und extrazellulär durch pH_i - und pH_s - Elektroden registriert. In diesen Untersuchungen hatte weder das einzelne Fehlen der Carboanhydrasen *CA IV* oder *CA XIV*, noch das Ausschalten aller membranständigen Carboanhydrasen durch Benzolamid einen nachweisbaren Einfluss auf die Transportraten. Allerdings war hier die Anzahl der Untersuchungen gering.

Schlagworte: Carboanhydrase, *musculus extensor digitorum longus*, *musculus soleus*, Monocarboxylattransporter, Anion Exchanger, Natrium-Protonen-Austauscher, Natrium-Bikarbonat-Kotransporter

Abstract

It is well known that membrane-bound carbonic anhydrase occurs in skeletal muscle. As a part of this dissertation the occurrence of different isoenzymes of membrane-bound carbonic anhydrase, their distribution and their functional relevance in mice skeletal muscle was to be determined. For this purpose, membrane fractions of sarcoplasmic reticulum (SR) and sarcolemma (SL) from the muscle *extensor digitorum longus* of wildtype-, carbonic anhydrase IV-, carbonic anhydrase XIV- and carbonic anhydrase IV + XIV-knockout mice were isolated. It was demonstrated that CA IV, CA IX and CA XIV are localized in sarcolemma as well as in sarcoplasmic reticulum of wildtype mice. CA XII could not be detected in mouse skeletal muscle. In order to determine the distribution of the carbonic anhydrases between sarcolemma and sarcoplasmic reticulum in detail, Western Blots using anti-CA IV, anti-CA IX and anti-CA XIV were quantified. For quantification, SL- and SR-fractions with equal activity of carbonic anhydrase were applied to the Western Blots.

It was demonstrated that the presence of CA IV is 5-fold higher and of CA XIV is 7,5-fold higher in sarcolemma than in sarcoplasmic reticulum, whereas the contribution of CA IX is 3,5-fold higher in sarcoplasmic reticulum than in sarcolemma. The deficiency of carbonic anhydrase has been confirmed in each case for CA IV ko, CA XIV ko and CA IV / CA XIV ko mice by the Western Blots.

Carbonic anhydrases catalyze the following hydration/dehydration reaction: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Therefore the membrane-bound carbonic anhydrases of mouse skeletal muscle could be of functional significance for proton- or bicarbonate-associated transport processes. Two major transport systems in skeletal muscle membranes depend on protons: the lactate-proton-cotransport mediated by the transporters MCT1 and MCT4 and the pH-regulation mediated by the transporters AE1 (anion exchanger 1), NBC (sodium-bicarbonate cotransporter) and NHE (sodium-H⁺-exchanger). The influence of carbonic anhydrases on these transport processes was analysed in muscle fibre bundles from *musculus extensor digitorum longus* (EDL) and muscle fibre bundles from *musculus soleus* (Soleus) via pH-microelectrodes.

Simultaneously, intracellular pH changes were recorded with a pH_i-electrode and extracellular pH-changes on the surface of the cell with a pH_s-electrode. Transport rates of lactate were determined from the change of pH_i with time and the initial slopes of these records were multiplied by the intracellular buffer factor giving lactic acid fluxes in mmol/l/min.

The lactate transporters MCT1 and MCT4 show different distribution pattern in skeletal muscle. MCT4 occurs especially in EDL, whereas MCT1 mainly occurs in Soleus. The results with wildtype- and different carbonic anhydrase single-, double- and triple-knockout mice showed that all three membrane-bound carbonic anhydrases, CA IV, CA IX and CA XIV play a functional role in lactate transport in EDL.

CA XIV, which is responsible for ~60 % of sarcolemmal carbonic anhydrase activity, has a marked influence on lactate transport, although no stringent colocalization with MCT4 has been observed. CA IV and MCT4, on the other hand, appear fairly well colocalized, but only 30 % of the total carbonic anhydrase of the SL CA-activity is constituted by CA IV. This presumably explains the minor influence of CA IV on the transport of lactate in EDL.

Since the transport rates of lactate are even a little further decreased in CA IV / CA XIV-double-ko muscles in comparison to CA XIV-single-ko muscles, we conclude that CA XIV on the sarcolemmal surface plays a major role in lactate transport due to its high activity there, but CA IV plays an additional minor role due to its lower activity. In the absence of CA IV the CA XIV can largely take over the role of CA IV, but in the absence of CA XIV the CA IV can take over its role only to a minor extent. Given these observations, it is surprising that the elimination of CA IX has a similarly strong effect of lactic acid transport as the elimination of CA XIV. This is unexpected, because CA IX contributes only about 15% to the total carbonic anhydrase activity of sarcolemma. It is proposed that this is due to colocalization of CA IX and MCT4 in T-Tubuli, where its activity cannot be replaced by the other isoenzymes CA IV and CA XIV that are exclusively localized in the sarcolemmal surface membrane. Elimination of CA IX additionally to that of CA IV and CA XIV (CA IV / CA IX /

CA XIV-triple-ko mouse) has only a small additional effect on lactate transport in comparison to the CA IV / CA XIV-double-ko muscle. This is in apparent contradiction to the large effect of CA IX on lactate-flux seen with the CA IX-single-ko muscle. A hypothetical explanation of these findings is a new model of t-tubular lactic acid release of the muscle cell: that CA IX buffer pH-variations in the T-tubule caused by lactic acid efflux into the deeper portions of the T-tubule. For this bicarbonate is necessary, which combines with H^+ to give CO_2 , which then, along with the lactate anion, diffuses out of the T-tubule towards the interstitium. For this mechanism, bicarbonate has to be constantly replenished by bicarbonate diffusion from the cell surface into the deeper portions of the T-tubule. The bicarbonate necessary for this diffusion process can be generated from CO_2 by the carbonic anhydrases on the cell surface, CA IV and CA XIV. There, the CA IV appears to especially ideally localized, as it is enriched in the area around the T-tubular openings. This mechanism is expected to be interrupted when either CA IX is lacking in the T-tubuli or when CA IV and CA XIV are lacking on the cell surface. This explains the drastic effect of elimination of CA IX, but also explains, why elimination of CA IX, after CA IV and CA XIV have already been eliminated, has so little effect.

The amplitudes of pH_s -transients, measured by a surface pH_s -electrode, are not influenced in CA IV, CA IX or CA XIV single knockout-mice. The absence of CA IV and CA XIV in CA IV / CA XIV double knockout mice, or the CA inhibitor benzolamide, which inhibits all these extracellular carbonic anhydrases, both cause a highly significant effect. The effect on the pH_s -transient is due to a transient lack of protons at the cell surface, caused by a slowed CO_2 -hydration reaction. This extracellular lack of protons is the cause of the decreased influx rates of lactic acid seen when more than two CA isozymes are eliminated or when benzolamide blocks all of them.

In soleus the carbonic anhydrases IV, IX und XIV in single-ko-mice do not have a detectable influence on fluxes and amplitudes of pH_s -transients. The lactic acid fluxes in soleus are not influenced by benzolamide as well. But benzolamide has a significant effect on the surface pH-transients as measured by a pH_s -electrode. This can be taken as evidence that membrane-bound

carbonic anhydrases have an influence on the surface pH in soleus as well, but the effects do not seem large enough to affect lactate transport rates of soleus. As evident from the transport rates in soleus reported here, the capacity for lactic acid transport in soleus is two times lower than the capacity of the EDL. Hence, it may be assumed that the transport of lactic acid in soleus depends to a lesser extent on the presence of carbonic anhydrase compared to the EDL. This explains the lacking effects of CA knockouts and of the inhibitor benzolamide.

In order to determine the influence of membrane-bound carbonic anhydrases on pH regulation, the muscles were exposed to the following acid-base challenge: experiments using alternately Krebs-Henseleit-solution and Krebs-Henseleit solution containing ammonium sulfate for superfusion of the muscle fibers were carried out. Ammonium is in equilibrium with ammonia, which is the species diffusing into the cell, causing an intracellular alkalisation. To regulate the alkaline (or, during the phase of NH_3 efflux, acid) pH the cell, the transporters AE1, NBC and NHE are activated. The ensuing alterations of pH were recorded by intra- and extracellular pH_i - and pH_s -electrodes. In these analyses neither the absence of a single carbonic anhydrase CA IV or CA XIV nor the deactivation of all membrane-bound carbonic anhydrases by benzolamide had a measurable influence on the pH regulating transport rates.

Keywords: carbonic anhydrase: *musculus extensor digitorum longus*, *musculus soleus*, monocarboxylattransporter, anion exchanger, sodium-proton-exchanger, sodium-bicarbonat-cotransporter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Bedeutung von spezifischen Transportproteinen für die Zelle	1
1.2	Die Skelettmuskulatur	1
1.3	Laktat-Transport im Skelettmuskel:.....	2
1.4	Der Laktat-Protonen-Kotransporter	3
1.5	Die HCO ₃ ⁻ -Transporter der Familie SLC4	4
1.6	Der Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ - Austauscher	5
1.7	Der Natrium-Bikarbonat-Kotransporter (NBC)	5
1.8	Der Natrium-Protonen Austauscher (NHE) der Familie SLC9	5
1.9	Die Carboanhydrase	6
1.10	Die Carboanhydrase im Muskel.....	7
1.11	Die Carboanhydrase IV.....	7
1.12	Die Carboanhydrase IX.....	7
1.13	Die Carboanhydrase XII.....	8
1.14	Die Carboanhydrase XIV	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Verwendete Tiere.....	9
2.2	Genotypisierung der Mäuse / DNA-Isolierung.....	9
2.3	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	10
2.4	Genotypisierung der CA IV <i>ko</i> -Mäuse.....	11
2.5	Genotypisierung der CA XIV <i>ko</i> -Mäuse	12
2.6	Genotypisierung der CA IX <i>ko</i> -Mäuse.....	14
2.7	Genotypisierung der CA IV / CA XIV <i>ko</i> - und CA IV / CA IX / CA XIV <i>ko</i> -Mäuse	15
2.8	Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	16
2.9	Trennung von DNA- Fragmenten auf einem Agarosegel	16
2.10	Präparation gereinigter Membranvesikel	17
2.11	Proteinbestimmung nach Lowry.....	20
2.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	21
2.13	Western-Blot	23
2.14	Semi-trockener <i>Blot</i>	24
2.15	Detektion mit Film	25
2.16	Quantifizierung der Banden	26

2.17	Herstellung der Agarbrücken	26
2.18	Herstellung der Membranpotential- und pH-Elektroden	27
2.19	Silanisierung der pH-Elektroden:	28
2.20	Füllen der silanisierten Elektroden	28
2.21	Chlorieren der Silberdrähte	29
2.22	Präparation des <i>EDL</i> -Faserbündels	30
2.23	Präparation des Muskels	31
2.24	Versuchsaufbau	33
2.25	Signalregistrierung	35
2.26	Eichung der pH-Elektroden	35
2.27	Durchführung einer Messung	36
2.28	Bestimmung des Nicht-Bikarbonat-Pufferfaktors	37
2.29	Ein- und Ausstrom von Laktat	39
2.30	Auswertungsparameter	41
2.31	pH-Regulation unter Ammonium-Exposition	44
2.32	Statistische Auswertung der Ergebnisse	46
3	Zielsetzung	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Western Blots	49
4.2	Nachweis der CA IV im <i>Western Blot</i>	49
4.3	Nachweis der CA IX im <i>Western Blot</i>	54
4.4	Nachweis der CA XII im <i>Western Blot</i>	57
4.5	Nachweis der CA XIV im <i>Western Blot</i>	58
4.6	Laktat-Versuche	62
4.7	pH _i vor Laktat-Einstrom im <i>EDL</i>	65
4.8	pH _i vor Laktat-Einstrom im <i>EDL</i> , Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen	66
4.9	Laktat-Influx (mM/min) im <i>EDL</i>	67
4.10	Laktat-Influx (mM/min) im <i>EDL</i> , Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen	68
4.11	Laktat-Efflux (mM/min) im <i>EDL</i>	69
4.12	Laktat-Efflux (mM/min) im <i>EDL</i> , Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen	70
4.13	Laktat _{i,c.} (mM) im <i>EDL</i>	71

4.14	Laktat _{i,c.} (mM) im <i>EDL</i> , Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen	72
4.15	dpH _s /dt des Oberflächen-pH-Transienten beim Laktat-Einstrom im <i>EDL</i>	73
4.16	dpH _s /dt des Oberflächen-pH-Transienten beim Laktat-Einstrom in den <i>EDL</i> , Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen	74
4.17	pH _s -Amplitude bei Laktat-Einstrom im <i>EDL</i>	75
4.18	pH _s -Amplitude beim Laktat-Einstrom in den <i>EDL</i> , Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen.....	76
4.19	dpH _s /dt beim Laktat-Ausstrom im <i>EDL</i>	77
4.20	dpH _s /dt beim Laktat-Ausstrom im <i>EDL</i> , Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen.....	78
4.21	pH _s -Amplitude beim Laktat-Ausstrom aus dem <i>EDL</i>	79
4.22	pH _s -Amplitude beim Laktat-Ausstrom im <i>EDL</i> , Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen.....	80
4.23	pH _i vor Laktat-Einstrom in Muskelfasern des <i>Soleus</i>	81
4.24	Laktat-Influx im <i>Soleus</i>	82
4.25	Laktat-Efflux im <i>Soleus</i>	83
4.26	dpH _s /dt beim Laktat- Einstrom im <i>Soleus</i>	84
4.27	pH _s -Amplitude beim Laktat-Einstrom im <i>Soleus</i>	85
4.28	dpH _s /dt beim Laktat-Ausstrom im <i>Soleus</i>	86
4.29	pH _s -Amplitude beim Laktat-Ausstrom im <i>Soleus</i>	87
4.30	Transportraten des Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ , des Na ⁺ /H ⁺ - Austauschers und Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ Kotransporters	88
4.31	dpH _i /dt bei Ammonium-Einstrom im <i>EDL</i>	90
4.32	dpH _i /dt beim Ammonium-Ausstrom im <i>EDL</i>	91
5	Diskussion.....	92
5.1	Verteilung der membrangebundenen Carboanhydrase-Isoenzyme im Skelettmuskel	92
5.2	Lokalisation der CA IV im Skelettmuskel	97
5.3	Lokalisation der CA IX im Skelettmuskel	97
5.4	Lokalisation der CA XII im Skelettmuskel	98
5.5	Lokalisation der CA XIV im Skelettmuskel.....	98

5.6	Veränderungen von pH_i und pH_s während des Laktat-Einstroms	98
5.7	Einfluß der Carboanhydrasen auf die intrazelluläre Laktat-Konzentration im <i>EDL</i>	100
5.8	Beteiligung der Carboanhydrasen an den durch den Laktat-Transport bedingten transienten Veränderungen des Oberflächen-pH beim <i>EDL</i>	101
5.9	Beteiligung der CA IV an den Milchsäure-Transportraten am <i>EDL</i> ..	102
5.10	Beteiligung der CA IX an den Milchsäure-Transportraten am <i>EDL</i> ..	103
5.11	Beteiligung der CA XIV an den Milchsäure-Transportraten am <i>EDL</i>	103
5.12	Milchsäure-Transportraten am <i>EDL</i> von CA IV / CA XIV-Doppel-ko-Mäusen	104
5.13	Effekt von Benzolamid auf die Milchsäure-Transportraten am <i>EDL</i> .	104
5.14	Milchsäure-Transportraten am <i>EDL</i> von CA IV / CA IX / CA XIV- Tripel-ko-Mäusen	104
5.15	Effekt von Ethoxzolamid auf die durch 20 mM Laktat bedingten Transportraten des <i>EDL</i>	105
5.16	Zusammenfassung der Carboanhydrase-Wirkungen auf den Laktat-Transport am <i>EDL</i>	105
5.17	Beteiligung der Carboanhydrasen an den Transportraten des MCT im <i>Soleus</i>	108
5.18	Beteiligung der Carboanhydrasen an den Transportraten der Transporter <i>AE</i> , <i>NHE</i> und <i>NBC</i> im Rahmen der pH-Regulation	109
	Literaturverzeichnis	112
	Abkürzungsverzeichnis	119
	Danksagung	122
	Erklärung zur Dissertation.....	123
	Wissenschaftliche Publikationen	124

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von spezifischen Transportproteinen für die Zelle

Viele polare Moleküle und Ionen können die Lipiddoppelmembran der Zelle nicht durch einfache Diffusion überwinden. Diese gelangen mithilfe von Transportproteinen durch die Membran. Jedes Transportprotein besitzt eine spezifische Bindungsstelle für eine entsprechende gelöste Substanz. Die Transportproteine katalysieren, im Gegensatz zu Enzymen, jedoch keine chemischen Reaktionen, sondern bewirken einen transmembranalen Stofftransport. So können auch Moleküle die Membran passieren, deren Lipidgrundgerüst für die betreffende Substanz ansonsten nahezu undurchlässig wäre. Die erleichterte Diffusion stellt trotz der beteiligten Transportproteine eine Form des passiven Transports dar, weil die gelöste Substanz entlang ihres Konzentrationsgefälles transportiert wird.

Transportproteine, die gelöste Substanzen durch erleichterte Diffusion transportieren, werden als *Solute Carriers* (SLC) zusammengefasst (Hediger *et al.*, 2004).

1.2 Die Skelettmuskulatur

Als Skelettmuskeln bezeichnet man diejenigen Muskeln, die für die willkürlichen, aktiven Körperbewegungen zuständig sind. Die Skelettmuskeln gehören wie die Herzmuskulatur zur quergestreiften Muskulatur. Die Skelettmuskeln werden in langsam-kontrahierende (rote) und schnell-kontrahierende (weiße) Muskulatur unterteilt. Die rote Muskulatur, die ihre Rotfärbung einem höheren Gehalt an Muskelfasern mit oxidativer Energiegewinnung und hohem Myoglobingehalt verdankt, ist eher für Ausdauerleistungen zuständig. Die weiße Muskulatur kann schneller kontrahieren und mehr Kraft entfalten, ermüdet allerdings schneller. Diesen Unterschieden liegt die Existenz verschiedener Muskelfasertypen zugrunde. Es gibt FG-Fasern (*fast twitch glycolytic*), die schnell kontrahieren und ihre Energie anaerob aus der Glykolyse gewinnen können, FOG-Fasern (*fast twitch oxidative and glycolytic*), die schnell kontrahieren und ihre Energie sowohl aerob über den Zitratzyklus als auch anaerob aus der Glykolyse gewinnen und SO-Fasern (*slow twitch oxidative*), die langsam kontrahieren und ihre Energie

ausschließlich aerob aus dem Zitratzyklus gewinnen. Viele Muskeln besitzen alle Fasertypen, jedoch in sehr unterschiedlichen Verteilungen. Der *musculus soleus* besteht hauptsächlich aus SO-Fasern (~84%), und aus FOG-Fasern (~16%) und enthält überhaupt keine FG-Fasern. Er wird daher zu den langsam-kontrahierenden Muskeln gezählt und ist einer der Muskeln mit dem größten Anteil an SO-Fasern überhaupt. Der *musculus extensor digitorum longus* (EDL) besitzt einen großen Anteil an FG-Fasern (~40%), einen großen Anteil an FOG-Fasern (~57%) und einen sehr geringen Anteil an SO-Fasern (~3%) und wird daher zu den schnell-kontrahierenden Muskeln gezählt (Barnard *et al.*, 1971, Ariano *et al.*, 1973).

Ein Skelettmuskel besteht aus vielen mehrkernigen Muskelfasern (Zellen). Jede einzelne Faser enthält zahlreiche Myofibrillen, die wiederum aus dicken und dünnen Filamenten bestehen, die in kontraktile Einheiten angeordnet sind, den Sarkomeren. Dünne Filamente bestehen aus zwei Strängen des Proteins Actin und einem Strang des Proteins Tropomyosin. Sie bilden den Bereich der I-Bande. In der Mitte der I-Bande befindet sich die Z-Scheibe, die zur Befestigung der dünnen Filamente dient, gleichzeitig die Trennlinie zwischen einzelnen Sarkomeren bildet und die Ursache für die Querstreifung ist, die mit dem Mikroskop zu erkennen ist. Dicke Filamente bestehen aus zahlreichen Myosin-Proteinen. Als A-Bande wird der Bereich bezeichnet, in dem sich dicke und dünne Filamente überlappen, wobei in der Mitte, der H-Zone, meist nur dicke Filamente vorhanden sind.

Die Muskelzelle ist von einer Zellmembran, dem Sarkolemm (SL), umgeben. Das Sarkolemm bildet röhrenförmige Einfaltungen, die weit ins Sarkoplasma reichen und Transversal-(T)-Tubuli genannt werden.

Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist ein spezialisiertes endoplasmatisches Retikulum der Muskelzellen. Es dient als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher zur Regulation der Muskelkontraktion.

1.3 Laktat-Transport im Skelettmuskel:

Der Skelettmuskel gewinnt Energie durch Aufspaltung des energiereichen Moleküls Glukose aus den Glykogenspeichern bzw. aus dem Blut in Pyruvat. Entweder wird dieses bei Vorhandensein von Sauerstoff aerob über den Zitratzyklus vollständig in CO_2 und Wasser umgewandelt, oder bei Sauerstoffmangel über die anaerobe Glykolyse direkt zum Laktat reduziert,

ohne dass CO_2 als Abfallprodukt entsteht. Diese Reaktion wird von der Laktat-Dehydrogenase katalysiert.

Laktat ist ein energiereiches Molekül, das von Muskelzellen sowohl freigesetzt als auch aufgenommen werden kann. Laktat wird von schnellen Muskelfasern produziert, da die anaerobe Energiebereitstellung durch Glykolyse wesentlich schneller erfolgt als der aerobe Weg der Energiebereitstellung. Außerdem wird Laktat während intensiver körperlicher Betätigung produziert, weil die Glykolyse eine größere maximale Kapazität besitzt als der aerobe Weg. Es ist ein Stoffwechselzwischenprodukt des anaeroben Energiestoffwechsels im Muskel. Dieser gibt Laktat an das Blut ab, so kann es anderen Organen, die Laktat verwerten können, zur Energieversorgung dienen. Nur ein geringer Teil des Laktats permeiert das Sarkolemm durch einfache Diffusion von undissoziierter Milchsäure (Bakker & van Dam, 1974). Der Hauptteil des Laktats wird über spezielle Transportproteine des Laktat-Protonen-Kotransporters durch das Sarkolemm geschleust. Dieser Transport zeigt eine Sättigungscharakteristik und kann inhibiert werden (Juel, 1997) Diese *Carrier* transportieren Laktat und Proton immer gekoppelt im Verhältnis 1:1 (Juel *et al.*, 1999).

1.4 Der Laktat-Protonen-Kotransporter

Die Monocarboxylat-Transporter (MCT) gehören zu der SLC16 Genfamilie des Menschen und 14 Isoformen wurden bereits für diesen Laktat-Protonen-Kotransporter beschrieben (Halestrap & Meredith, 2004).

Der Laktat-Protonen-Kotransporter des Skelettmuskels existiert in zwei Isoformen. Beide Isoformen können Laktat und Protonen in beide Richtungen transportieren. Bei Belastung des Muskels können sich Laktat und Protonen im Muskel anhäufen. Um eine intrazelluläre Azidifizierung zu begrenzen bzw. wieder zu beseitigen, müssen die Protonen wieder aus den Zellen entfernt werden. Besonders während intensiver Muskel-Belastung, bei der große Mengen Laktat produziert werden, findet der Großteil des Protonen-Abtransports aus den Muskelzellen mittels der Laktat-Protonen-Kotransporter MCT1 und MCT4 statt. Der Laktat-Protonen-Kotransporter dient somit auch der pH- Regulation.

Schnell-kontrahierende Muskelfasern exprimieren hauptsächlich den Monocarboxylat-Transporter 4 (MCT4) als Protonen-Laktat-Kotransporter und zu einem geringeren Anteil auch MCT1. Langsam-kontrahierende Muskelfasern

exprimieren überwiegend die Isoform MCT1 und in einem geringeren Maß MCT4 (Bonen *et al.*, 2000). Die Verteilung der Monocarboxylat-Transporter in FG-Fasern sieht wie folgt aus: Wenn das Vorkommen des MCT1 im SL 100% gesetzt wird, so finden sich in den Triaden 31,6%, im SR 15%, in T-Tubuli 14% und in anderen intrazellulären Membranen 1,7%.

Hingegen kommt der MCT4 im SL zu 100%, in den Triaden zu 66,5%, im SR zu 43%, in T-Tubuli zu 36% und in intrazellulären Membranen zu 24% vor. Die Expression des MCT1 wird durch transkriptionale und posttranskriptionale Mechanismen reguliert, während der MCT4 ausschließlich posttranskriptional reguliert wird (Bonen *et al.*, 2000). Diese unterschiedlichen Regulationsmechanismen lassen vermuten, dass die beiden Monocarboxylat-Transporter im Muskel verschiedene Funktionen übernehmen können.

Der MCT1 ist in verschiedenen Geweben weit verbreitet (Halestrap & Price 1999).

Die Expression von MCT1 in verschiedenen Muskeln korreliert mit dem prozentualen Anteil von SO-Fasern und FOG-Fasern im Muskel. Daher wird der MCT1 stark im *Soleus* exprimiert, der hauptsächlich aus SO- und FOG-Fasern besteht und wenig im *EDL*, der hauptsächlich aus FG- und FOG-Fasern besteht. Hingegen wurde berichtet, dass der MCT4 hauptsächlich in FG-Muskeln, wie dem *EDL* exprimiert wird, und die Expression im *Soleus*, der hauptsächlich aus SO-Fasern besteht, sehr klein ist und wahrscheinlich nur auf den geringen Anteil an FOG-Fasern zurückzuführen ist. (Wilson *et al.*, 1998). MCT1 ermöglicht hauptsächlich die Aufnahme von Laktat aus dem Interstitium und aus dem Plasma (Brooks, 2002). Damit kann er den oxidativen Muskelfasern, in denen er hauptsächlich vorkommt, Laktat als energiereiches Molekül zur Oxidation bereitstellen.

Es wird vermutet, dass der MCT4 hauptsächlich die Rolle der zellulären Laktat-Ausschleusung übernimmt (Dimmer *et al.*, 2000). Damit kann er das Produkt Laktat aus glykolytischen Fasern transportieren, in denen er hauptsächlich vorkommt.

1.5 Die HCO_3^- -Transporter der Familie SLC4

Die Transportproteine der SLC4-Familie dienen in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen, deren biochemische und physiologische Mechanismen besonders empfindlich auf Änderung der Protonen-Konzentration reagieren, zur

pH-Wert-Regulation. Die Transportproteine der SLC4-Familie spielen beim Na^+ - oder Cl^- -vermittelten Transport in unterschiedlichen Geweben von Säugetieren eine wesentliche Rolle. Zusätzlich zur pH-Wert Regulation können sie zum vektoriellen transepithelialen Basen-Transport in vielen Organen beitragen.

Sowohl die $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (*Anion-Exchanger, AE*) als auch die $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter werden der Proteinfamilie SLC4 zugeordnet (Alper *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2004)

1.6 Der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - Austauscher

Eine Zelle reagiert auf intrazelluläre pH-Änderungen durch eine Gegenregulation. Hierfür kann die Zelle entweder Protonen durch Protonentransporter über die Zellmembran transportieren oder sie transportiert Bikarbonat über die Zellmembran, welches über die Reaktion $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ den intrazellulären pH-Wert korrigiert. Einige der wichtigsten Bikarbonat-Transporter in der Zellmembran sind die Chlorid-Bikarbonat- ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$)- Austauscher (*Anion Exchanger, AE*). Diese *Carrier* transportieren Bikarbonat und gleichzeitig Chlorid im Antiport über die Zellmembran und können auf diese Weise den intrazellulären pH-Wert regulieren. Gleichzeitig haben sie Einfluss auf die intrazelluläre Chlorid-Konzentration und sind darüber hinaus auch an der Regulation des Zellvolumens beteiligt.

1.7 Der Natrium-Bikarbonat-Kotransporter (NBC)

Der elektrogene $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter wurde zuerst in der Niere entdeckt. Er vermittelt den Transport von einem Na^+ -Ion zusammen mit bis zu drei HCO_3^- -Ionen. Er wirkt elektrogen und hängt nicht von dem Vorhandensein von intra- oder extrazellulärem Cl^- ab. Dieser Kotransporter wurde in Säugetieren bereits in verschiedenen Geweben und Zelltypen gefunden (Boron *et al.*, 1997). Die molekulare DNA-Sequenz dieses Transporters zeigt eine Verwandtschaft mit der von elektroneutralen Bande-3-Transportern, wie dem *AE1* (Romero *et al.*, 1997).

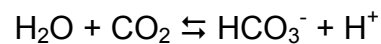
1.8 Der Natrium-Protonen Austauscher (NHE) der Familie SLC9

Die Natrium-Protonen-Austauscher (*Natrium-Proton-Exchanger, NHE*) werden der Proteinfamilie SLC9 zugeordnet. Sie sind integrale Membranproteine und katalysieren in Säugetieren hauptsächlich den Austausch von Na^+ und H^+ in

Richtung ihres Konzentrations-Gradienten. Außerdem regulieren sie den intrazellulären pH-Wert und das Zellvolumen. Zusätzlich spielen sie eine Rolle bei zellulären Mechanismen wie z.B. Adhäsion und Zellteilung (Orlowski *et al.*, 2004).

1.9 Die Carboanhydrase

Die Aktivität der Carboanhydrase wurde erstmals in Rindererythrozyten entdeckt (Meldrum & Roughton, 1933). Bei der Carboanhydrase handelt es sich um ein Enzym, das die reversible Hydratation von CO₂ katalysiert und damit die Einstellung des Hydratationsgleichgewichtes beschleunigt.



Diese Reaktion, die ohne die Carboanhydrase als Katalysator relativ langsam abläuft, kann durch die Carboanhydrase um Größenordnungen beschleunigt werden. Das aktive Zentrum der Carboanhydrasen beinhaltet ein Zink-Ion (Zn²⁺). Aufgrund dessen werden sie als Metalloenzyme klassifiziert. Es kommen zahlreiche Carboanhydrase-Isoformen in der Natur vor. In der α -Carboanhydrase-Form, die in Tieren vorkommt, ist das Zink-Ion tetrakoordiniert. In drei Positionen ist es mit den Imidazol-Ringen der drei Histidin-Reste His94, His96 und His119 koordiniert.

Die vierte Koordinationsstelle ist von Hydroxid-Liganden besetzt. Dies bewirkt eine Polarisierung der Wasserstoff-Sauerstoff-Bindung. Es gibt mindestens fünf eindeutige CA-Familien (α , β , γ , δ und ϵ), die aufgrund ihrer Primärstrukturen klassifiziert werden. Diese Familien weisen keine signifikante Ähnlichkeit auf. Die α -Carboanhydrasen, die in Tieren vorkommen, werden wiederum in vier Untergruppen aufgeteilt.

Bei den α -Carboanhydrasen sind bisher 15 Isoformen bekannt, die mit römischen Zahlen gekennzeichnet werden. Bei den Carboanhydrasen CA I, CA II, CA III, CA VII und CA XIII handelt es sich um zytosolische Enzyme, bei den Carboanhydrasen CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV und CA XV um membranständige Isoenzyme. Die CA V ist eine mitochondriale und die CA VI eine sekretorische Isoform. Die CA VIII, CA X und CA XI sind nicht katalytisch aktiv, da sie kein Zink-Ion im aktiven Zentrum besitzen. Die letzteren haben

eine CA-ähnliche Struktur und werden deshalb als CA-RP (Carboanhydrase-related-proteins) bezeichnet.

Inhibitoren hemmen die Katalyse, also die Beschleunigung der Umwandlung von CO_2 in HCO_3^- . Diese Inhibitoren konkurrieren mit dem Wasser um die freie Koordinationsstelle am Zink, oder sie koordinieren direkt an das Metallion, indem sie die Koordinationssphäre des Metalls aufweiten. Beispiele für Letzteres sind Sulfonamide, die über den Sulfonamid-Stickstoff direkt an das Metall-Ion gebunden sind. Sulfonamide wurden ursprünglich als Antibiotika gegen Infektionen eingesetzt, bis die hemmende Wirkung auf die Carboanhydrase entdeckt wurde (Keilin & Mann, 1940).

1.10 Die Carboanhydrase im Muskel

Im Muskel sind folgende CA-Isoformen vorhanden: Die membrangebundene CA IV, CA IX und CA XIV in der Plasmamembran von Herz- und Skelettmuskelzellen, die membrangebundene CA IV, CA IX und CA XIV in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums von Herz- und Skelettmuskelzellen und die zytosolische CA III in oxidativen, langsam-kontrahierenden Muskelfasern vom Typ-1.

1.11 Die Carboanhydrase IV

Die CA IV ist ein membranständiges Isoenzym, das durch einen Phosphoinositolglykan-Anker mit der Membran verbunden ist (Waheed *et al.*, 1992). Es ist im Extrazellularraum katalytisch aktiv. Es wird angenommen, dass es mit der sarkolemmalen Plasmamembran und kapillären Endothelzellen des Skelettmuskels in Mensch und Ratte assoziiert ist (Decker *et al.*, 1996, Sender *et al.*, 1994).

Das Gen für CA IV befindet sich auf dem Chromosom 17q23 und besteht aus 7 Introns und 8 Exons (Okuyama *et al.*, 1993). In den CA IV *knockout*-Mäusen wurden aus dem Genlokus die Exone 1b bis 3 und ein Teil von Exon 4 deletiert (Shah *et al.*, 2005).

1.12 Die Carboanhydrase IX

Die Carboanhydrase IX nimmt neben ihrer Rolle in der pH-Regulation wahrscheinlich an anderen zellulären Vorgängen wie Zellteilung, Zelladhäsion und Tumorbildung teil. Die CA IX ist eine membrangebundene CA, die eine

transmembranäre Domäne besitzt (Opavský *et al.*, 1996) und wahrscheinlich auch eine besonders hohe Wechselzahl, 10 mal größer als die der Carboanhydrase II. Zwar wurde bereits die mRNA im Skelettmuskel der Maus nachgewiesen, jedoch noch nicht das CA IX-Protein (Hilvo *et al.*, 2004). Die CA IX enthält eine intramolekulare Disulfidbrücke und eine N-gekoppelte Glykosylierungsstelle und eine O-gekoppelte Glykosylierungsstelle (Hilvo *et al.*, 2008). In den CA IX *knockout*-Mäusen wurden aus dem Genlokus Teile von Exon 1 deletiert (Gut *et al.*, 2002).

1.13 Die Carboanhydrase XII

Die CA XII wurde ursprünglich als ein Tumor-assoziiertes Gen identifiziert, das in Karzinom-Zellen von Niere und Lunge exprimiert wird, aber auch in nicht-malignen-Zellen der Niere vorkommt. (Türeci *et al.*, 1998; Ivanov *et al.*, 1998)

1.14 Die Carboanhydrase XIV

Die CA XIV wurde erstmals aus Nieren der Maus isoliert und ist im Extrazellularraum katalytisch aktiv (Mori *et al.*, 1999). Sie besitzt in der Skelettmuskulatur von Mäusen ein Molekulargewicht von 54 kDa (Shah *et al.*, 2005). Das Protein wird neben der Muskulatur im Gehirn (Parkkila *et al.*, 2001), in der Niere (Kaunisto *et al.*, 2002), in der Leber und im Colon (Parkkila *et al.*, 2002) sowie im Auge (Nagelhus *et al.*, 2005) exprimiert. Außerdem wurde die CA XIV sowohl im SL als auch im SR des Herzmuskels der Maus nachgewiesen (Scheibe *et al.*, 2006). Das Gen für CA XIV befindet sich auf dem Chromosom 1q22 (Fujikawa-Adachi *et al.*, 1999) und besteht aus 10 Introns und 11 Exons. In den CA XIV *knockout*-Mäusen wurde aus dem Genlokus das Exon 4 deletiert (Shah *et al.*, 2005).

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Tiere

Die Haltung und Zucht der Mäuse vom Stamm C57BL/6J erfolgte im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover. Die Tötung von Mäusen zur Organentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken wurde unter der Tierversuchsnummer 509I-42502-00/240 gemäß §4 TSchG bei der Bezirksregierung Hannover angezeigt. Die CA IV und CA XIV *knockout*-Mäuse wurden von Prof. Dr. W. S. Sly (Dept. Biochemistry and Molecular Biology, Saint Louis University, Saint Louis, MO63104, USA) und die CA IX *knockout*-Maus von Prof. Dr. Seppo Parkkila (Universität Tampere, Tampere, Finnland) für die Zucht der Einzel- und Mehrfach- *knockout*-Mäuse zur Verfügung gestellt.

2.2 Genotypisierung der Mäuse / DNA-Isolierung

Zunächst werden mit 500 µl Lysis-Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) im Eisbad aufgetaut. Währenddessen wird ein ca. 1 cm langes Stück Schwanz der zu genotypisierenden Maus abgeschnitten und in den Puffer gegeben. Die Reaktionsgefäße werden dann über Nacht (ÜN) rüttelnd bei 50 °C im Thermomixer (Eppendorf) 5436 inkubiert. Anschließend wird das Lysat 30 min bei Raumtemperatur (RT) und 13000 rpm zentrifugiert. Unterdessen werden 450 µl Isopropanol in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, in den 450 µl des Überstandes überführt werden. Die Gefäße werden kurz invertiert, bis das Isopropanol die DNA ausgefällt hat. Der DNA-Faden wird zum Waschen in 500 µl 70% Ethanol überführt und 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Ethanol wird vorsichtig abgenommen und die DNA in TE-Puffer aufgenommen. Damit sich die DNA löst, wird sie 2 h bei RT und danach 1 h bei 65 °C inkubiert. Die DNA wird nun bei 4 °C aufbewahrt und kann mittels PCR analysiert werden.

Lysis-Puffer

1 M Tris, pH 8,0

5 M NaCl

0,5 M EDTA, pH 8,0

2 % SDS

10 % Proteinase K

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA (pH 8,0)

2.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR (Saiki *et al*, 1988) handelt es sich um ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz. Das Prinzip der PCR beruht auf der enzymatischen Verdopplung einer DNA-Sequenz. Benötigt werden zwei Oligonukleotide, die *Primer*, die jeweils komplementär homolog zu dem (+)-Strang des einen Endes und zu dem (-)-Strang des anderen Endes der zu amplifizierenden DNA-Region sind, Didesoxyribonukleotide, und eine thermostabile Polymerase (z.B. *Thermus aquaticus*, „*Taq*“-Polymerase). Dieses Enzym wird nicht durch Hitzedenaturierung inaktiviert und übersteht auch längere Inkubationszeiten bei 95 °C. Eine PCR wird in drei sich immer wiederholenden Schritten durchgeführt, einem Hitze-denaturierungsschritt, einem *Annealings*schritt und einem Elongationsschritt. Bei der Hitzedenaturierung, die meist bei 95 °C abläuft, trennen sich die komplementären Stränge der DNA. Aus einem Doppelstrang werden zwei Einzelstränge. Diese dienen dann der hitzestabilen DNA-Polymerase als *Template*. Darauf folgt der *Annealings*schritt, wobei die Temperatur auf 50-60 °C gesenkt wird. Somit wird eine Hybridisierung der beiden *Primer* an die komplementären Einzelstränge erreicht. Die DNA-Polymerase heftet die Nukleotide an die 3'-OH-*Primer*enden und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen.

Die *Annealing*temperatur variiert zwischen den *Primer*paaren und ergibt sich aus dem GC-Gehalt jedes spezifischen Paares. Die beiden *Primer* müssen so gewählt sein, dass sie jeweils an einem der beiden DNA-Stränge hybridisieren, und zwar an den Randbereichen des zu amplifizierenden Genabschnittes.

Bei der Elongation erstellt die hitzestabile Polymerase, ausgehend vom 3'-OH-Ende des *Primers*, durch *Primer*-Extension eine Kopie der DNA-Matrize. Dabei werden die Einzelstränge durch die Aktivität der Polymerase, deren Arbeitsoptimum im Fall der *Taq*-Polymerase bei 72 °C liegt, mit dNTPs aufgefüllt. Dadurch erhält man zwei neue, doppelsträngige DNA-Moleküle. Da die *Primer* während der PCR abgebaut werden, die zu amplifizierende DNA jedoch mit jedem Zyklus an Menge steigert, wird durch Autoextension die Extensionszeit nach jedem Zyklus um die entsprechende Autoextensionszeit verlängert. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert ist, werden die Stränge durch Hitzeeinwirkung wieder voneinander getrennt. Durch erneute

schnelle Absenkung der Temperatur wird eine spezifische Bindung der *Primer* an die entstandenen DNA-Stücke ermöglicht. Durch dreißig bis vierzigfaches Wiederholen des Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten Genabschnittes. Diese DNA gleicht der Ausgangs-DNA exakt. Die Ausbeute und Spezifität der PCR ist abhängig von Faktoren wie der Magnesiumkonzentration, dem pH-Wert im Ansatz, der Menge und Qualität des *Templates*, der Anzahl der Zyklen und Dauer und Temperatur der einzelnen Schritte. Die Reaktion wird automatisiert im PCR-Thermocycler durchgeführt. Die doppelsträngigen PCR-Produkte werden nach Beendigung der Reaktion in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

Alle Vorbereitungen finden auf Eis statt. 48 µl von Mastermix I bzw. II werden in vorbeschriftete PCR-Reaktionsgefäße (200 µl, dünnwandig, Eppendorf) pipettiert. Dann werden jeweils 2 µl DNA bzw. H₂O hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße werden kurz anzentrifugiert, in den Thermocycler (Biometra) gestellt und das entsprechende PCR-Programm wird gestartet.

2.4 Genotypisierung der CA IV *ko*-Mäuse

PCR-Programm

<u>Zyklus</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Reaktion</u>
Vorzyklus	1x	2 min	94 °C	Initiale Denaturierung
Hauptzyklus	35x	60 sek	94 °C	Denaturierung
		3 min	68 °C	<i>Annealing</i> / Extension
Endzyklus	1x	10 min	68 °C	Finale Elongation
	1x	4 °C		Abkühlung

Mastermix I		Mastermix II	
32 µl	H ₂ O, nukleasefrei	32 µl	H ₂ O, nukleasefrei
0,5 µl	<i>Primer Exon 2 5'</i>	0,5 µl	<i>Primer Intron 1A 5'</i>
0,5 µl	<i>Primer Exon 6 3'</i>	0,5 µl	<i>Primer Exon 6 3'</i>
1 µl	Nukleotide	1 µl	Nukleotide
5,5 µl	Mg-freier Puffer	5,5 µl	Mg- freier Puffer
8 µl	MgCl ₂	8 µl	MgCl ₂
0,5 µl	<i>taq</i> -Polymerase	0,5 µl	<i>taq</i> -Polymerase

Verwendete Primer.

CA IV Exon 2 5', *forward primer*.

5' CAC CCT TCA TCC TCG TCG GCT ATG ACC AAA AGC

CA IV Exon 6 3', *reverse primer*.

5' TGT GGA TCT TGA TGG GTT GTT TGT ACA CAG TCC

CA IV Intron 1A 5', *forward primer*.

5' TGA GTT CAA TTC CCA GCT CCC ACA TTG TGG C

Die *Primer* werden vor dem Einsetzen in die PCR auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt.

Bei Wildtyp- und heterozygoten Mäusen stellt sich ein DNA-Fragment von 1,5 kb dar. Bei heterozygoten und bei homozygoten CA IV *knockout*-Mäusen stellt sich ein 850 bp DNA-Fragment dar.

2.5 Genotypisierung der CA XIV *ko*-Mäuse

PCR-Programm 1

<u>Zyklus</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Reaktion</u>
Vorzyklus	1x	2 min	95 °C	Initiale Denaturierung
Hauptzyklus		15 sek	92 °C	Denaturierung
	30x	2 min	68 °C	<i>Annealing</i> / Extension
		2 sek	68 °C	Autoextension
Endzyklus	1x	7 min	68 °C	Finale Elongation
	1x	4 °C		Abkühlung

Mastermix

35,6 µl	H ₂ O, nukleasefrei
0,5 µl	<i>Primer</i> Intron 3 5'
0,5 µl	<i>Primer</i> Intron 4 3'
1 µl	Nukleotide
5,5 µl	Mg-freier Puffer
4,4 µl	MgCl ₂
0,5 µl	<i>taq</i> -Polymerase

Verwendete Primer.

CA XIV Intron 3 5', *forward primer*:

5' AGG CTC CTG CAG CTA AGG TGG GAT CAG ACG

CA XIV Intron 4 3', *reverse primer*:

5' TCC ATC CTC TGA GCT CCA CTG GAC CGA ACC

Die *Primer* werden vor dem Einsetzen in die PCR auf eine Konzentration von 20 µM verdünnt.

Wildtyp-Mäuse weisen ein 420 bp Fragment auf, homozygote CA XIV *knockout*-Mäuse ein 380 bp (277bp + loxp) DNA-Fragment, heterozygote Mäuse zeigen beide Banden. Da es sich bei den homozygoten Mäusen auch um ein heterozygotes Tier handeln könnte, bei dem das Wildtyp-Allel nicht amplifiziert wurde, wird die DNA der homozygoten Mäuse für eine zweite PCR eingesetzt.

PCR-Programm 2

<u>Zyklus</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Reaktion</u>
Vorzyklus	1x	2 min	94 °C	Initiale Denaturierung
Hauptzyklus	33x	15 sek	94 °C	Denaturierung
		40 sek	65 °C	<i>Annealing</i>
		5 min	68 °C	Extension
		5 sek	68 °C	Autoextension
Endzyklus	1x	10 min	68 °C	Finale Elongation
	1x	4 °C		Abkühlung

Mix I

35,6 µl	H ₂ O, nukleasefrei
0,5 µl	<i>Primer Exon 3 5'</i>
0,5 µl	<i>Primer Exon 4 3'</i>
1 µl	Nukleotide
5,5 µl	Mg-freier Puffer
4,4 µl	MgCl ₂
0,5 µl	<i>taq</i> -Polymerase

Verwendete Primer.

CA XIV Exon 3 5', *forward primer*.

5' GCC CAC ACG GTC AGG ACC ATT GGC CAA CC

CA XIV Exon 4 3', *reverse primer*.

5' ATC CTC TCT GAC CCC AGT GCA GGT GGA GC

Die *Primer* werden vor dem Einsetzen in die PCR auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt.

Wildtyp-Mäuse heterozygote Mäuse und weisen ein 1 kb Fragment auf, homozygote CA XIV *knockout*-Mäuse zeigen keine Bande.

2.6 Genotypisierung der CA IX ko-MäusePCR-Programm 1

Zyklus	Anzahl	Zeit	Temperatur	Reaktion
Vorzyklus	1x	5	96 °C	Initiale Denaturierung
Hauptzyklus		30 sek	96 °C	Denaturierung
	35x	1 min	66 °C	<i>Annealing</i>
		1 min	72 °C	Extension
Endzyklus	1x	4 °C		Abkühlung

Mastermix

37 µl	H ₂ O, nukleasefrei
0,5 µl	<i>Primer CA IX Sense 5'</i>
0,5 µl	<i>Primer CA IX Antisense 3'</i>
1 µl	Nukleotide
5,5 µl	Mg-freier Puffer
3 µl	MgCl ₂
0,5 µl	<i>taq</i> -Polymerase

Verwendete Primer.

CA IX *Sense 5'*, *forward primer*.

5' CTC CTA TTT CCG ATG CAC GTA CAG

CA IX *Antisense 3'*, *reverse primer*.

5' CTT ACC ZGA GCC TAG ATT TGG AAG

Die *Primer* werden vor dem Einsetzen in die PCR auf eine Konzentration von 20 µM verdünnt.

Wildtyp-Mäuse und heterozygote Mäuse weisen ein 441 bp Fragment auf.

PCR-Programm 2

Zyklus	Anzahl	Zeit	Temperatur	Reaktion
Vorzyklus	1x	5	96 °C	Initiale Denaturierung
Hauptzyklus	35x	30 sek	96 °C	Denaturierung
		1 min	59 °C	<i>Annealing</i>
		1 min	72 °C	Extension
Endzyklus	1x	4 °C		Abkühlung

Mastermix

37 µl	H ₂ O, nukleasefrei
0,5 µl	<i>Primer CA IX Neosense 5'</i>
0,5 µl	<i>Primer CA IX Antisense 3'</i>
1 µl	Nukleotide
5,5 µl	Mg-freier Puffer
3 µl	MgCl ₂
0,5 µl	<i>taq</i> -Polymerase

Verwendete *Primer*.

CA IX *Neosense 5'*, *forward primer*.

5' CTC CTA TTT CCG ATG CAC GTA CAG

CA IX *Antisense 3'*, *reverse primer*.

5' CTT ACC ZGA GCC TAG ATT TGG AAG

Die *Primer* werden vor dem Einsetzen in die PCR auf eine Konzentration von 20 µM verdünnt.

CA IX *ko*-Mäuse und heterozygote Mäuse weisen ein 561 bp Fragment auf

2.7 Genotypisierung der CA IV / CA XIV *ko*- und CA IV / CA IX / CA XIV *ko*-Mäuse

Die Differenzierungen erfolgen analog der Differenzierungen der CA IV *ko*-, CA IX *ko*- und CA XIV *ko*-Mäuse

2.8 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

Für die Elektrophorese von Nukleinsäuren werden Agarose- und Polyacrylamid-Gel-Systeme unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen verwendet. Beide Gelarten eignen sich sowohl zur Analyse als auch zur präparativen Isolierung von Nukleinsäuren. Die Polyacrylamidgele zeichnen sich durch ein besonderes Auflösungsvermögen aus, während Agarosegele über einen weitaus größeren Längenbereich trennen.

2.9 Trennung von DNA- Fragmenten auf einem Agarosegel

Agarosegelelektrophorese (Ogden & Adams, 1987) wird verwendet, wenn große Poren für die Analyse von Molekülen über 10 nm benötigt werden. Durch die Variation der Agarosekonzentration können lineare DNA-Fragmente der Größe 0,1-60 kb aufgetrennt werden.

Agarose besteht aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose. Sie dient als inerte Matrix, in dem DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von verschiedenen Faktoren, wie der Agarosekonzentration, der angelegten Gleichspannung sowie der Molekülgröße und Konformation der DNA ab. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Anhand von Größenstandards ist nachzuvollziehen, welchen Fragmentgrößen die Banden im Gel entsprechen.

Für ein 2%iges Agarosegel wird 1,5 g Agarose auf 75 ml TAE-Puffer eingewogen. Um die Agarose zu lösen, muss sie in dem TAE-Puffer aufgeköcht werden. In die vorbereitete Kammer mit eingesteckten Kämmen wird das Gel luftblasenfrei gegossen und geliert bei Abkühlung. Dabei bilden sich Doppelhelices der Zuckerketten aus, die sich in Gruppen parallel zu Fäden zusammenlagern. Anschließend werden die Kämmen gezogen, und das Gel wird mit TAE-Puffer überschwemmt. In die Taschen des Gels können nun die Proben aufgetragen werden. Die Proben werden mit Auftragspuffer versetzt, der die Proben beschwert und einen Farbstoff enthält, so dass zu erkennen ist, wie weit die Proben schon gelaufen sind. Es wird nun eine Spannung von ca. 70 V angelegt. Die Laufzeit beträgt ca. 2 Stunden.

Der Nachweis der entstandenen DNA-Banden geschieht durch Anfärben mit dem organischen Farbstoff Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid). Aufgrund seiner planaren Struktur kann Ethidiumbromid in die DNA interkalieren. Dabei interagieren seine aromatischen Ringe mit den heteroaromatischen Ringen der Basen der Nukleinsäuren. Der interkalierende Stoff kann durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt werden und emittiert Licht im orange-roten Bereich (590 nm). Die Bindung an DNA bewirkt eine Verstärkung der Fluoreszenz, so dass die Färbung der Nukleinsäuren auch in Gegenwart des freien Ethidiumbromid im Gel gut zu sehen ist. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 25 ng DNA. Zur Dokumentation wird das Gel fotografiert.

50x TAE-Puffer:

2 M TRIS

17,5 % Eisessig

0,05 M EDTA

6x Auftragspuffer:

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylen Cyanol FF

15 % Ficoll (Typ 400, Pharmacia)

Ethidiumbromid-Stammlösung:25,4 mM (Im Versuch wird eine Konzentration von 1,27 μ M verwendet.)**2.10 Präparation gereinigter Membranvesikel**

Die Präparation wurde erstmals an Kaninchen durchgeführt (Seiler & Fleischer, 1982) und hier für Mäuse modifiziert.

Um eine ausreichende Menge an Muskelmasse zu erhalten, werden 22 Mäusen Bein- und Rückenmuskulatur entnommen und in Waschpuffer aufbewahrt. Die Herzen werden ebenfalls entnommen und separat in Waschpuffer gegeben. Alle finden auf Eis statt. Die Muskulatur wird von Sehnen, Bindegewebe und Fett befreit und dann so stark wie möglich zerkleinert.

Das Muskelfeuchtgewicht wird in 5 Vol. Waschpuffer gegeben und im Mixer *Waring commercial blender* im *Low-Modus* zerkleinert. Anschließend erfolgt eine 25-minütige Zentrifugation bei 15.000 *rpm* in der Kühlzentrifuge Centikon T-124 mit dem Rotor A.24.

Während der Zentrifugation bleiben die zytosolischen Bestandteile der Zellen im Überstand und die Membranen im Pellet. Der Überstand wird verworfen und die Pellets in 250 ml Waschpuffer mittels eines Magnetrührers resuspendiert.

Erneut folgt eine Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wie zuvor. Danach werden die Pellets in der Sukroselösung resuspendiert. Wieder schließt sich eine 25-minütige Zentrifugation unter den bekannten Bedingungen an und wieder wird das Pellet in der Sukroselösung resuspendiert. Daraufhin wird das Pellet im Mixer im *full-speed*-Modus 1 min durchmixt.

Dann wird alles 20 min bei 9.000 *rpm* im Rotor A.26 in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Daraufhin werden ca. 200 ml Überstand durch 2 Lagen Telatrast ES-Kompressen gefiltert und das Pellet wird verworfen.

Eine Zentrifugation von zwei Stunden bei 40.000 *rpm* im Rotor 70 Ti wird in der Beckman Optima TM LE-80K *Ultracentrifuge* durchgeführt. Die Pellets werden in 10 ml 0,6 M KCl-5mM-Imidazol-Puffer im *loose-fitting* Dounce-Homogenisator resuspendiert und 2 Stunden auf Eis gelagert. Die Herz-Mikrosomen werden hingegen direkt in 600 µl Imidazolpuffer aufgenommen und tröpfchenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Wasch-Puffer, pH 7,4 (HCl)

0,75 M KCl

5 mM Imidazol

Sukroselösung, pH 7,4 (HCl)

0,3 M Sukrose

5 mM Imidazol

Danach wird das resuspendierte Pellet auf einen Sukrose- Gradienten gegeben.

Die Fraktionen werden vorsichtig mit einer Pumpe übereinander geschichtet.

Sukrose-Gradient:

5 ml 17% Sukrose, 5 mM Imidazol

7 ml 23% Sukrose, 5 mM Imidazol

7 ml 28% Sukrose, 5 mM Imidazol

6 ml 35% Sukrose, 5 mM Imidazol

3 ml 40% Sukrose, 5 mM Imidazol

pH 7,4 (HCl) / w/w

Darauf folgt eine Ultrazentrifugation im *swinging bucket* TST 28.38 für 14 Stunden bei 20.000 *rpm*.

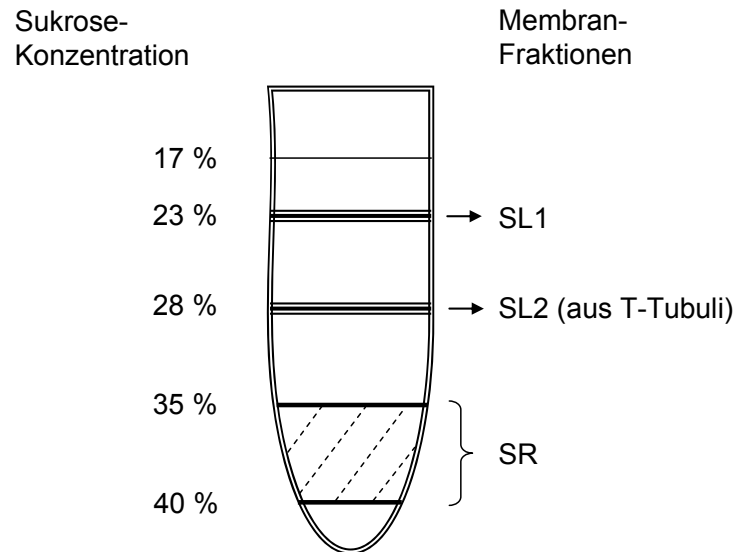


Abb. 1: Schematische Darstellung des Sukrose-Gradienten nach der Zentrifugation mit den isolierten Fraktionen

Die SR- Phase und die SL-Phasen werden mit einer Pumpe abgesaugt und jeweils separat 1:1 mit Imidazol-Puffer versetzt. Der Puffer wird langsam zu den Fraktionen gegeben, um einen osmotischen Schock zu vermeiden. Die Proteine würden sonst präzipitieren. Es folgt eine 2-stündige Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 40.000 *rpm*. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, die SR-Pellets in Imidazol-Puffer resuspendiert und tröpfchenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die SL-Fractionen werden in Imidazol-Puffer aufgenommen und auf einen Dextran-Gradienten gegeben.

Imidazol-Puffer:

5 mM Imidazol

Dextran-Gradient:

4 ml 8,7 % Dextran T70

4 ml 18 % Dextran T70

} pH 7,4 (HCl)

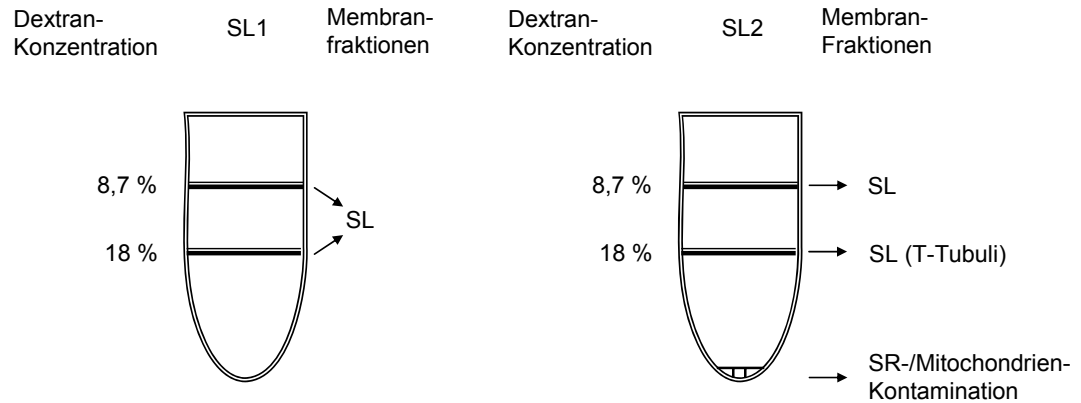


Abb. 2: Schematische Darstellung der Dextran-Gradienten nach der Zentrifugation mit den isolierten Fraktionen

Es folgt eine Zentrifugation in der Ultrazentrifuge im *swinging bucket* SW 41 Ti bei 28.000 *rpm* für eine Dauer von 17 Stunden. Alle SL-Fraktionen werden abgesaugt, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 1:1 mit Imidazol-Puffer versetzt. Danach folgt eine 2-stündige Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 40.000 *rpm*. Der Überstand wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Die Pellets werden in 950 μ l Imidazol-Puffer homogenisiert, tröpfchenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.11 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung dient der Quantifizierung von löslichen Proteinen und lehnt sich an die Micro-Methode an (Lowry *et al.*, 1951). Sie wurde dahingehend modifiziert (Peterson, 1979), das SDS im Lowry-Reagenz enthalten ist, um auch nahezu unlösliche Lipoproteine in Lösung zu bringen. Dazu wird das Protein Assay Kit No. P 5656 (Sigma) verwendet. Sowohl für die Proteinbestimmung als auch für die BSA-Eichkurve wird eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Es werden 62,5 μ l, 125 μ l, 187,5 μ l, 250 μ l, 375 μ l und 500 μ l der Proteinlösung auf 1 ml mit H₂O aufgefüllt. Als Leerwert wird 1 ml H₂O verwendet.

Dann wird jeweils 1 ml Lowry-Reagenz hinzugegeben und der Ansatz wird gemischt. Danach stehen die Proben exakt 20 min bei Raumtemperatur. In dieser Zeit findet eine Biuret-Reaktion statt, die Bildung eines blau-violetten, quadratisch-planaren Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. Anschließend erfolgt die Zugabe von 0,5

ml Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz (1:6 in H₂O, Sigma). Es erfolgt eine exakt 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur. In dieser Zeit findet die Farbentwicklung statt. Aus dem Lowry-Reagenz werden Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert. Diese Kupfer(I)-Ionen wiederum reduzieren das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau. Die Färbung ist proportional zur Proteinmenge. Die Extinktion wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Die Proben werden dabei gegen H₂O gemessen, anschließend wird der Leerwert abgezogen. Für die Eichkurve wird eine BSA-Standard-Lösung (0,4 mg/ml) verwendet, die genauso wie die Proteine behandelt wird. Anhand dieser Kurve lassen sich die Proteinkonzentrationen ablesen.

2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Bei diesem Verfahren werden Proteine in Anwesenheit von SDS aufgrund ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode getrennt (Laemmli, 1970). Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der elektrischen Feldstärke, der Nettoladung des Proteins und dem Reibungskoeffizienten ab. Der Zusatz von SDS, einem Detergenz, bewirkt die Zerstörung aller nicht kovalenten Wechselwirkungen. Das negativ geladene SDS umlagert die Proteine außerdem, so dass ihre eigene Ladung weitgehend irrelevant wird. Während der Elektrophorese verlieren Proteine SDS, daher wird es ständig aus dem Puffer nachgeliefert. DTT bricht als Reduktionsmittel vorhandene Disulfidbrücken auf, damit die Proteine linear sind und folglich nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Die Proteine müssen zunächst ein Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite (5% AA) passieren. Der Sammelgelpuffer enthält Chlorid-Ionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit größer ist, als die der Proteinprobe. Der Elektrophoresepuffer hingegen enthält Glycin, das bei dem gewählten pH-Wert von 6,8 nur zu 50% zu Glycinat-Ionen dissoziiert ist und dessen elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit deshalb geringer ist. Die Proteine stapeln sich entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit im Feldstärke-Gradienten zwischen Ionen mit einer niedrigen (Glycin-Glycinat-System) und Ionen mit einer hohen Mobilität (Chlorid-Ionen). Somit wird eine Vortrennung und Aufkonzentrierung erreicht, was sich in einer scharfen Proteinbande äußert. Das Trenngel (10% AA) besitzt eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration sowie

einen höheren pH-Wert (pH 8,8) im Vergleich zum Sammelgel (pH6,8). Beim Eintreten der Proben in das Trenngel tritt eine Verschärfung der Banden ein. Die großen Proteine werden an dieser Gelgrenze zunächst zurückgehalten, so dass die bei pH 8,8 vollständig dissoziierten Glycinat-Ionen passieren können. Im Puffersystem des Trenngels löst sich der Proteinstapel auf und die Proteine werden aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt.

Bei der Herstellung wird zunächst wird das Trenngel zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet, um eine möglichst glatte Oberfläche zu erreichen. Ist es auspolymerisiert, wird das restliche Wasser abgegossen, und das Sammelgel wird direkt darüber gegossen. Der Kamm wird sofort luftblasenfrei gesteckt. Nach der Polymerisation wird das Gel mit den Glasplatten in eine Laufkammer gestellt (Mini-PROTEAN® 3Cell, Biorad). Oben in der Kammer befindet sich der *Upper Buffer*, der den Farbstoff Bromphenolblau enthält, der aufgrund seines geringen Molekulargewichtes zuerst durch das Gel läuft, so dass sich eine feine blaue Line im Gel bildet. So ist zu erkennen, wie weit die Proben schon gelaufen sind, und unten in der Kammer befindet sich der *Lower-Buffer*. Oben muss der Puffer die Taschen komplett überdecken, erst dann wird der Kamm gezogen. Die Proben können nun aufgetragen werden. Die Proben werden mit Probenpuffer versetzt, der sie beschwert. Als Standard dient der SDS-PAGE *Molecular weight standards Low range*, Biorad. Das Gel läuft bei konstantem Strom 30 min angeschlossen an das *PowerPac™ HC Power Supply*, Biorad.

Trenngel:

4 ml H₂O
 2,5 ml 1,5 mM Tris-HCl, pH 8,8
 3,3 ml 30 % Acrylamid / 0,8 %
 Bisacrylamid
 100 µl 10 % SDS
 100 µl 10 % Ammoniumpersulfat
 10 µl TEMED

Sammelgel

2,8 ml H₂O
 1,25 ml 0,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
 850 µl 30 % Acrylamid / 0,8 %
 Bisacrylamid
 50 µl 10 % SDS
 50 µl 10 % Ammoniumpersulfat
 10 µl TEMED

Upper Buffer

25 mM Tris-Base
 192 mM Glycin
 0,001 % SDS
 0,3 % Bromphenolblau

2x Probenpuffer

3,12 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
 0,5 g SDS
 2,5 ml Glycerol
 0,07715 g DTT
 4,38 ml H₂O

Lower Buffer

25 mM Tris-Base
 192 mM Glycin

2.13 Western-Blot

Unter *Blotten* versteht man den Transfer von Makromolekülen aus einem Gel auf eine immobilisierende Membran. Das Verfahren wurde von E. M. Southern für den Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulose eingeführt (Southern, 1975), der entsprechende Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel (Renart *et al.*, 1979) wird *Western-Blot* genannt und zumeist elektrophoretisch durchgeführt (Towbin *et al.*, 1979).

Der Western-Blot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Antikörpern. Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden nach Anlegen einer elektrischen Spannung in wässrigem Milieu auf eine Membran transferiert. Dazu wird eine auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran (Immobilon™-P-Transfer-Membran von Millipore) in Methanol getränkt, mit Wasser gewaschen und anschließend 5 min in *Blot*-Puffer getränkt. Das ungefärbte SDS-Gel wird 20 min im *Blot*-Puffer äquillibriert. Daraufhin wird die *Blot*-Apparatur entsprechend beladen, wobei auch die Filterpapiere (*Extra thick blot paper, mini blot size, 7 x 8,4 cm, Biorad*) zuvor 5 min in *Blot*-Puffer getränkt werden.

Blot-Puffer, pH 8,3

25 mM Tris-Base
 192 mM Glycin
 20 % Methanol

2.14 Semi-trockener *Blot*

Beim semi-trockenen *Blotten* (Kyhse-Andersen, 1984) wird das elektrische Feld direkt an das Polyacrylamidgel angelegt. Die benötigten Komponenten werden aus dem *Blot*-Puffer sofort luftblasenfrei auf der planare Kathode der *Blot*-Apparatur gestapelt (*Trans-Blot*® *SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell*, Biorad): Eine Lage Filterpapier in der Größe des Polyacrylamidgels, darauf das Polyacrylamidgel, darauf die Membran und darüber eine Lage Filterpapier. Nach Aufsetzen der Anode erfolgt der Transfer bei konstantem Strom von 40 mA für 22 min durch das *PowerPac*™ *HC Power Supply*, Biorad.

Schematischer Aufbau einer *Blot*-Apparatur



Abb. 3: Schematischer Aufbau einer *Blot*-Apparatur

Direkt nach dem *Blot* wird der Teil der Membran abgeschnitten, auf der sich der Standard befindet. Dieses Stück wird 3 min in Färbelösung schüttelnd angefärbt und anschließend kurz in Entfärbelösung entfärbt. Die Proteine werden durch Farbstoffe wie z.B. das negativ geladene Coomassie- *Blue* sichtbar gemacht. Dies ist ein Farbstoff, der unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Später dient dieser Membranteil als Referenz der Proteingrößen. Der restliche Membranteil wird bei RT 30 min schüttelnd in Block-Lösung inkubiert, um die Proteinbindestellen abzusättigen.

Anschließend wird sie 2 h bei RT mit dem Primär-Antikörper in TBST (1:3000) verdünnt in einer verschweißten Plastikfolie schüttelnd inkubiert. Dafür wird sie in eine auf Membrangröße zugeschnittene Plastiktüte eingeschweißt, um den Verbrauch an Antikörper zu minimieren. Der Antikörper bindet spezifisch an das entsprechende Protein. Nach fünfmaligem Waschen mit TBST, das den Antikörper, der nicht an den Proteinbindestellen hängt, entfernt, wird die Membran ÜN bei 4 °C mit dem Sekundär-Antikörper in TBST (1:5000) in einer

verschweißten Plastikfolie schüttelnd inkubiert. In dieser Zeit bindet der Sekundär-Antikörper an den Primär-Antikörper. Die Membran wird erneut 5 x in TBST gewaschen, um den nicht gebundenen SekundärAntikörper zu entfernen. Danach kann die Detektion erfolgen. Dies geschieht durch das *SuperSignal® Wes Femto Maximum Sensivity Substrate*, Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL. Dies ist ein Chemilumineszenz-Kit, das Licht emittiert, sobald es an den Meerrettichperoxidase-konjugierten SekundärAntikörper bindet und somit die Position des Proteins visualisiert. Dokumentiert werden die Signale durch Exposition eines Röntgenfilms.

Färbelösung:

50 % Methanol
10 % Essigsäure
0,05 % Coomassie blue

Entfärbelösung:

50 % Methanol
10 % Essigsäure

TBST:

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM NaCl
0,02 % Tween-20

Block-Lösung:

2 % Casein
10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM NaCl
0,02 % Tween-20

Antikörper:

- 1.) Kaninchen-IgG, Anti-Maus CA IV (Parkkila *et al.*, 2001)
- 2.) Kaninchen-IgG, Anti-Maus CA IX (Kivala *et al.*, 2000)
- 3.) Kaninchen-IgG, Anti-Maus CA XII (Kyllonen *et al.*, 2003)
- 4.) Kaninchen-IgG, Anti-Maus CA XIV (Kanuisto *et al.*, 2003)
- 5.) *Anti-Rabbit IgG, H&L Chain Specific Goat Peroxidase Conjugate*, Calbiochem, EMD Biosciences Inc. La Jolla, CA

2.15 Detektion mit Film

Zur Detektion erfolgt eine 5-minütige Inkubation der Membran im ECL-Kit (1:30 in TBST). Anschließend wird der Puffer vorsichtig von der Membran abgetropft und diese in eine in der Belichtungskassette aufgelegte Klarsichtfolie gelegt. Danach wird der Film in der Dunkelkammer aufgelegt. Die Expositionsdauer variiert in Abhängigkeit vom erhaltenen Signal von 5 s bis 1 min. Die Entwicklung des Films erfolgt in der Dunkelkammer im Entwicklungsgerät.

2.16 Quantifizierung der Banden

Mithilfe des Programms *ImageMaster 1D* (Version 3.1) von Pharmacia Biotech können die Filme eingescannt und die optische Dichte der Banden quantifiziert werden.

2.17 Herstellung der Agarbrücken

Zunächst werden die benötigten Glaselektroden gezogen. Dazu werden die Glaselektroden GC200-15 in einen vertikalen *Puller* der Firma Hugo-Sachs Elektronik gespannt. Das Gerät besteht aus zwei Teilen, dem Versorgungs- und Stellreglerteil und der eigentlichen vertikalen Zieheinrichtung. Die Kapillare wird so in die Backenfutter gespannt, dass sie mittig eine Heizspirale aus Kantal-Draht durchlaufen, die drei Windungen besitzt, die möglichst eng zusammen liegen müssen. Sie haben einen Durchmesser von 4,5 mm. Die Vorrichtung ist in einer Art Turm aufgebaut. Der untere Teil der Einspannvorrichtung muss so weit nach oben gezogen werden, dass es zweimal knackt. Wird nun durch den Stellregler die Heizspannung so reguliert (60 mV), dass der Heizdraht glüht, verlängert und verjüngt sich die Glaskapillare in der Mitte durch das Eigengewicht der Zugstange. Fällt diese nun zurück über die beiden zuvor überwundenen Punkte, wird der Stromkreis durchbrochen, so dass der Draht nicht mehr glüht. In beiden Kapillarhalterungen hängt nun eine halb so lange Kapillare mit einer dünnen Spitze, die als Agarbrücke dient. Diese wird am stumpfen Teil noch etwas gekürzt und am spitzen Teil in ca. 1 cm Abstand über der Bunsenbrennerflamme um 90 ° gebogen. Das stumpfe Ende wird über der Bunsenbrennerflamme geglättet, damit der später einzusetzende Silberdraht nicht beschädigt wird. Danach wird Luft durch die Kapillare in ein mit Wasser gefülltes Becherglas gepustet, um zu überprüfen, ob die Spitzenöffnung durchlässig ist.

Ein kleinerer Spitzendurchmesser als 100 µm ist allgemein von Vorteil, da weniger K⁺ während der Versuche in das Bad gelangen kann, das eine unerwünschte Kontraktion des Muskelbündels auslösen könnte. Bricht jedoch eine zu dünne Spitze, werden ebenfalls sehr hohe K⁺-Konzentrationen freigesetzt. Ein kleinerer Spitzendurchmesser als 50 µm könnte bewirken, dass die Elektrode einen zu großen Widerstand besitzt. Durch diesen

Übergangswiderstand würden die gemessenen Spannungen verfälscht werden, da durch einen erhöhten Agarbrückenwiderstand der Strom kleiner wird.

Für die Befüllung der Elektroden werden 200 ml einer 2 M KCl-Lösung hergestellt. gelöst. 100 ml dieser Lösung werden aufgekocht, dann wird 3% Agar-Pulver (Bacto-Agar, Difco) eingerührt. Die Lösung wird aufgekocht, bis der Agar gelöst ist.

Die Glaskapillaren werden über einen Schlauch mit einer Kunststoffspritze verbunden, die es ermöglicht, die Agar-Lösung über das spitze Ende in die Kapillare zu saugen. Nachdem die Kapillaren aus der Lösung genommen werden, wird mit der Kunststoffspritze ein wenig der Lösung zurückgepresst, dass ein winziger Tropfen an der Kapillarspitze erscheint, da sich durch Kapillarkräfte ansonsten leicht Luftblasen in die Spitze ziehen und die Agarbrücke unbrauchbar machen würden. Wenn keine Luftblasen vorhanden sind, werden die fertigen Agarbrücken in der restlichen 3 M KCl-Lösung aufbewahrt. Dabei muss der Agar in den Kapillaren an beiden Enden Kontakt zur KCl-Lösung haben, um nicht auszutrocknen.

Das Lösungsbad der Messkammer, in der sich der Muskel befindet, wird über die Agarbrücke geerdet. Von hinten wird ein chlorierter Silberdraht in die Agarbrücke gesteckt und mit dem Verstärker verbunden.

2.18 Herstellung der Membranpotential- und pH-Elektroden

Es werden Borosilikatkapillaren GC150T-7.5 (Harvard Apparatus) verwendet. Die Kapillaren werden am Flaming / Brown *Micropipette Puller* Model P-97 (Sutter Instrument Co.) gezogen. Er beinhaltet ein geschlossenes Filament mit einem Durchmesser von 2,5 mm.

<u>Programm für die pH_i- und Potentialelektrode</u>				<u>Programm für die pH_s-Elektrode</u>			
<i>Heat</i>	<i>Pull</i>	<i>Velocity</i>	<i>Time</i>	<i>Heat</i>	<i>Pull</i>	<i>Velocity</i>	<i>Time</i>
675	20	15	50	675	20	15	20
675	30	32	50	686	20	20	50

Der *Puller* ist so konzipiert, dass es möglich ist, durch spezifische Einstellung der verschiedenen Parameter *Heat*, *Pull*, *Velocity* und *Time* in verschiedenen Stufen eine individuelle Elektrodenform zu erreichen.

Potential- und pH_i-Elektrode besitzen eine sehr dünne, lange Spitze, die sich optimal zum Einstechen in eine Muskelzelle eignet. Sie sind aufgrund dessen mechanisch sehr empfindlich und besitzen einen hohen Widerstand.

Die pH_s-Elektrode hingegen besitzt eine breite kurze Spitze, die daher gut auf die Oberfläche der Zellmembran aufgelegt werden kann.

2.19 Silanisierung der pH-Elektroden:

Um die Elektroden am spitzen Ende lipophil für das anzusaugende Ionophor zu machen, werden sie mit TMSDMA (N,N-Dimethyltrimethylsilylamin) silanisiert, wodurch die Glasoberfläche hydrophob wird.

Die gezogenen Kapillaren werden in einem Glaskästchen von 140 cm³ Größe, in dem zuvor 25 min auf 210 °C vorgeheizten Wärmeschrank 20 min gebacken, um die Glasoberfläche zu trocknen.

Mit einer 100 µl Hamilton-Spritze werden ca. 20 µl des TMSDMA in ein kleines Glasröhrchen gegeben. Dieses wiederum wird mithilfe einer Pinzette in das Glaskästchen gelegt. Der Deckel des Glaskästchens wird wieder geschlossen, und die Elektroden 15-20 min silanisiert. Danach wird der Deckel des Glaskästchens etwas nach hinten geschoben, damit das überschüssige TMSDMA entweichen kann.

Parallel dazu wird die Abluftklappe des Wärmeschrankes geöffnet. Nach weiteren 10 min wird der Wärmeschrank abgestellt und die Tür geöffnet, bis das Glaskästchen etwas abgekühlt ist. Zum weiteren Abkühlen wird es auf ein Metallblech gezogen.

Nur die pH-Elektroden werden mit Ionophor befüllt. Trotzdem wird auch die Potential-Elektrode silanisiert. Damit wird eine bessere Haftung der Elektrode in der hydrophoben Lipiddoppelmembran der Zelle erreicht.

2.20 Füllen der silanisierten Elektroden

Die *Filling Solution* wird mithilfe einer 1ml- Kunststoff-Spritze mit dünner lang gezogener Spitze von hinten in die Elektroden gefüllt. Indem die Elektrode über einen Schlauch mit einer Kunststoffspritze verbunden wird, ist es möglich, ein kleines Tröpfchen der *Filling Solution* aus der Spitze der Elektrode zu pressen, um zu gewährleisten, dass sich keine Luftblasen in der Spitze befinden.

Die Spitze der pH-Elektrode wird mit Ionophor, einem Ionenaustauscher befüllt, der hydrophobe Eigenschaften besitzt. In Wasser gelöste Ionen können das

hydrophobe Lösungsmittel somit nicht durchdringen, es sei denn, sie werden an den ionenselektiven Ionophor gebunden und damit durch das Lösungsmittel transportiert werden. Das hier verwendete Hydrogen Ionophore I - Cocktail A (Fluka) ist sensitiv für Protonen und ermöglicht deren Transport. Das Ionophor wird in die Spitze gebracht, indem die Elektrode in einen Elektrodenhalter gespannt, und die Spitze in das Ionophor- Fläschchen getaucht wird. Die Flüssigkeit zieht sich durch Kapillarkräfte selbst in die Elektrode.

Die Kontrolle erfolgt bei 160-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Zeiss). Die Elektrode sollte luftblasenfrei sein und der Ionophor sollte Kontakt zur *Filling Solution* haben.

pH-Filling Solution

100 mM NaCl

200 mM HEPES

100 mM NaOH

Vm-Filling Solution, pH 6,6 mit HCl

1,5 M KCl

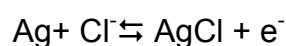
1,5 M KAc

2.21 Chlorieren der Silberdrähte

Potentialdifferenzen zwischen den Elektroden sollen immer Null betragen. Das wird durch die Benutzung von gleichmäßig chlorierten Silberdrähten erreicht.

Von einem ca. 10 cm langen mit Teflon ummantelten Silberdraht (Advent, Suffolk, England) mit 0,27 mm Durchmesser, wird das Teflon an beiden Enden ein Stückchen entfernt. Das eine Ende wird an einen Stecker gelötet, der in den jeweils zugehörigen Vorverstärker passt.

Dieser Stecker wird an die Anode eines Gleichspannungsnetzteils gesteckt. Die Anode mit dem Silberdraht und die Kathode aus Platin werden nun in eine 3%ige KCl-Lösung getaucht. Durch Abzug von Elektronen durch die verschiedenen Standardelektrodenpotentiale verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht auf die rechte Seite. Am Silberdraht der Anode bildet sich nun eine Silberchloridschicht.



Gleichmäßig chlorierte Silberdrähte besitzen einen mattgrauen Überzug. Alle Silberdrähte werden täglich neu chloriert. Weisen die Silberdrähte Defekte in

der Chloridschicht auf, kommt es zu Potentialdifferenzen zwischen den Elektroden, die sich auf das Membranpotential aufaddieren können.

Später werden die Silberdrähte an die entsprechenden Vorverstärker angeschlossen. Der chlorierte Teil wird von hinten in die Kapillarelektroden gesteckt, so dass sie Kontakt zur *Filling Solution* haben. Dadurch wird die Weiterleitung an die Verstärker erreicht.

2.22 Präparation des EDL-Faserbündels

Etwa 150 ml Krebs-Henseleit-Lösung werden auf Raumtemperatur erwärmt. Die Lösung wird 15 min mit Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂) äquilibriert. Das Gas gelangt über eine Gaswaschflasche in die Lösung, wobei das Gas mittels eines Tauchrohres gezwungen wird, durch eine Flüssigkeit zu perlen, bevor es den Behälter wieder verlässt.

Die eigentliche Einleitung des Gases sollte über eine Fritte erfolgen. Auf diese Weise sollen möglichst kleine Gasblasen erzeugt werden, so dass eine große Kontaktfläche zwischen Gas und Flüssigkeit entsteht. Die Methode dient zur Gasreinigung und zur Befeuchtung, wobei die Verunreinigungen des Gases im Wasser verbleiben. Das befeuchtete und gereinigte Gas kann danach durch ein zweites Rohr oben im Gefäß wieder abziehen.

Carbogen dient zur Versorgung des Muskels mit Sauerstoff und hält den pH der Lösung auf 7,4. Die äquilibrierte Lösung befindet sich in einem Glasgefäß, das von der Gaswaschflasche aus ebenfalls über eine Fritte begast wird. Dieses ist über zwei Tygonschläuche, die sich in zwei Peristaltik-Pumpen (LKB-Pump P-1, Pharmacia) befinden, mit einer mit Silikon ausgegossenen Petrischale verbunden. Die Petrischale wird über die Pumpe geflutet und dient als Präparierschale. Die Lösung wird von dort aus wieder abgepumpt und wieder dem Lösungsgefäß zugeführt und neu äquilibriert, so dass ein Kreislauf entsteht.

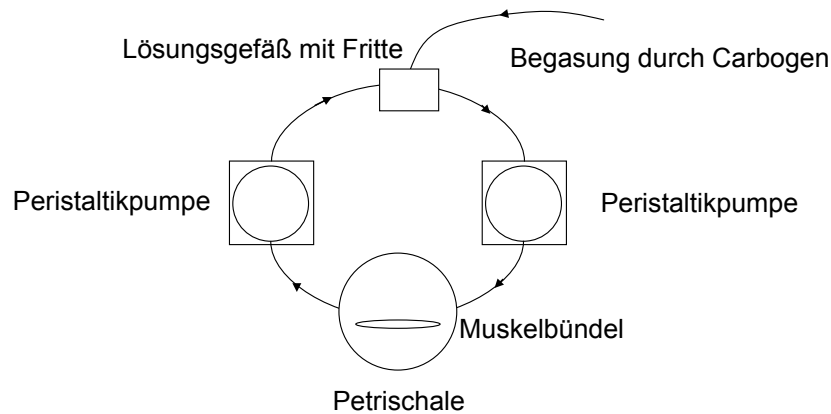


Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus des Präparierplatzes mit Lösungszirkulation

In der Zwischenzeit werden zwei Platinringe pro Muskel vorbereitet. Dazu wird chirurgisches Nahtmaterial verwendet. Etwa 5 cm werden abgeschnitten, durch den Platinring gefädelt und mit drei Knoten befestigt. Ein halber offener Knoten, durch den später die Sehne gelangen soll, wird schon vorbereitet.

50 ml begaste Lösung werden separat begast und während der Präparation weiter begast. Diese dient zur Aufbewahrung der entnommenen Muskeln.

Der *musculus extensor digitorum longus* (langer Zehenstrecker) ist ein Skelettmuskel des Beines und gehört zu den Streckern am Unterschenkel. Er läuft fußwärts in 4 Sehnen aus, die zu den einzelnen Zehenrücken ziehen. Er ist verantwortlich für die Dorsalflexion (Hochziehen) des Fußes und der Zehen. Der *EDL* liegt unter dem *Tibialis anterior*.

Der *musculus soleus* (Schollenmuskel) ist ein weiterer Skelettmuskel des Unterschenkels. Er wird mit dem *musculus gastrocnemius* als *musculus triceps surae* zusammengefasst. Trotzdem ist er ein eigenständiger Muskel.

2.23 Präparation des Muskels

Eine Maus wird durch Genickbruch getötet. Das Fell an den Hinterläufen wird rund um den Knöchel eingeschnitten, dann wird über dem Knie entlanggeschnitten und das Fell über dem Bein abgezogen. Am Fuß sind die Sehnen von beiden Muskeln zu sehen. Sie liegen sehr dicht beieinander und sind durch ein Band verbunden, das zunächst durchtrennt werden muss. Anschließend wird die Sehne des *Tibialis anterior* durchtrennt. Er wird hochgezogen und am Knie abgeschnitten, so dass der *EDL* freigelegt wird. Die Kniesehne des *EDL* ist noch durch ein Band am Knie befestigt, das ebenfalls

nicht sichtbar ist, aber durchtrennt werden muss. Generell ist es von Vorteil, möglichst viel Sehne mit herauszupräparieren.

Der *EDL* wird nun in der voräquilibrierten Lösung aufbewahrt. Die Entnahme der Muskeln sollte möglichst schnell erfolgen, um eine Hypoxie zu vermeiden, allerdings sollte ebenfalls eine Beschädigung des Muskels vermieden werden.

Die Präparation des Faserbündels findet unter einer Stereolupe (Olympus) mit Beleuchtung einer Kaltlichtlampe (Schott, KL 1500 LCD) in der mit Lösung gefüllten Petri-Schale statt. Verwendet werden kleine geschliffene Pinzetten und Irisscheren.

Die Kniesehne wird durch einen halben Knoten von einem Platinring geschoben und mit insgesamt 3 Knoten befestigt. Anschließend wird der Platinring über eine Nadel geschoben, die im Silikon der Petrischale steckt.

Die Fußsehne teilt sich in 4 Sehnen für die Zehen. Die 4., d.h. kürzeste Sehne wird von einer Nadel durchstochen und im Silikon befestigt. Nun werden die beiden längsten Sehnen mit der Pinzette genommen und vorsichtig durch sanftes Ziehen und leichtes Drücken der Schere gegen den Muskel von Sehne 2 von dem Rest abgelöst und kurz vor der Kniesehne abgeschnitten. Die dritte Sehne wird mit der Pinzette durch vorsichtiges Ziehen und leichtes Drücken der Schere gegen Bündel 4 getrennt, kurz vor Ende wird Bündel 4 abgeschnitten.

Der andere Platinring mit einem halben Knoten wird verwendet, um Sehne 3 mit insgesamt 3 Knoten zu befestigen. Der Platinring wird über eine Nadel geschoben und der Muskel wird ganz leicht gespannt. $\frac{2}{3}$ des verbleibenden Muskels werden noch vorsichtig entfernt, es sollten möglichst wenige Zellen verletzt werden. Am Ende entsteht ein flaches Muskelbündel aus wenigen Muskelfasern. Während der gesamten Präparation sollte eine gleichmäßige Begasung stattfinden.

Die Präparation des *Soleus* findet unter gleichen Bedingungen statt. Der einzige Unterschied ist, dass hier aus dem kompletten Muskel ein Muskelfaserbündel präpariert wird.

Das Muskelfaserbündel wird in eine Messkammer aus Glas eingespannt, in deren Mitte ein kleines Stück eines Deckglases geklebt ist. Durch zwei Löcher am Rand der Messkammer befinden sich zwei umgebogenen Kanülenspitzen. Darüber werden die Platinringe gestreift, so dass das Faserbündel in der Kammer hängt. Jetzt wird es leicht gedehnt. Durch das Aufliegen auf dem Stück

des Deckglases und das Dehnen wird störendes Verrutschen des Bündels während der Versuche verhindert.

Krebs-Henseleit-Lösung für die Präparation:

120 mM	NaCl
3,3 mM	KCl
1,2 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1.3 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
25 mM	NaHCO ₃

2.24 Versuchsaufbau

Der eigentliche Versuchsaufbau befindet sich in einem Faraday-Käfig (1 m x 0,8 m x 0,65 m). Dadurch wird der Versuchsablauf von äußeren elektrischen Feldern oder elektromagnetischen Wellen abgeschirmt. Darin befindet sich eine auf vier Luftfederelemente (SLM 1-L, Barry Controls) geschraubte Eisenplatte, auf der alle Geräte angebracht werden. Die Federelemente vermeiden weitestgehend Vibrationen. Zur Betrachtung des Bündels dient ein Mikroskop (Leitz) mit 100x Vergrößerung. Als Lichtquelle wird eine Kaltlichtlampe (Schott, KL 1500 LCD) verwendet, die das Bündel von unten durch die Messkammer durchleuchtet. Die Elektroden werden jeweils in Elektrodenhalter (H7, Narishige, Japan) gespannt. Diese sind an in drei Achsen beweglichen Mikromanipulatoren (Leitz) befestigt.

Für die Perfusion der Kammer werden Gefäße mit den entsprechenden Lösungen außerhalb des Faraday-Käfigs mit Carbogen äquilibriert. Zwei verschiedene Lösungen können über eine Stativrollerpumpe (Mini S 860, Ismatec) über gasundurchlässige Tygonschläuche (Tygon R 3603) ins Innere des Faraday-Käfigs transportiert werden. Für das Einpumpen der Lösungen werden Tygonschläuche der Firma Ismatec mit dem Farbcode *black-black* verwendet. Diese besitzen einen Innendurchmesser von 0,76 mm und einer Wanddicke von 0,86 mm. Dabei beträgt die Fließgeschwindigkeit 2 ml/min. Direkt dahinter befinden sich Luftblasenfallen, die verhindern, dass störende Luftblasen die Messung stören. Um einen Lösungswechsel durchzuführen, sind zwei Drei-Wege-Magnetventile (360T031, NR-Research, Maplewood, USA) hintereinander in den Aufbau eingeschaltet. Diese Ventile reagieren über eine Hochleistungsmagnetspule und haben dadurch extrem kurze Ansprechzeiten.

Eine Lösung wird von dort aus direkt zur Messkammer gepumpt. Dort endet der Schlauch an einem äußeren Rand der Messkammer und flutet sie so mit der Lösung. Die andere Lösung wird über die Magnetventile in ein Abfallgefäß gepumpt. Durch Anlegen einer Spannung an die Magnetventile wechseln die Lösungen ihre Wege und somit wird ein schneller Lösungswechsel erreicht. Um einen Druckpuls während des Umschaltens, und damit eine Zerstörung der Faseroberfläche durch die Elektrodenspitze, zu vermeiden, müssen die Drücke in den beiden zuführenden Schläuchen exakt gleich sein. Dies wird erreicht, indem der Widerstand des die Kammer versorgenden Schlauches mittels einer Schraubklemme so reguliert wird, dass es beim Umschalten zwischen den Lösungen zu keiner Änderung des Flüssigkeitsspiegels in den Luftblasenfallen kommt.

Die Lösung gelangt wieder aus der Kammer, indem eine gebogene Kanüle am anderen Rand der Messkammer als Absauger dient. Diese ist wiederum mit einem Schlauch verbunden, der auch an der Rollerpumpe hängt, und die Lösung aus der Kammer saugt. Die Lösung gelangt in ein Abfallgefäß. Zum Abpumpen wird ein Schlauch der Firma Ismatec mit einem Innendurchmesser von 1,86 mm und einer Wanddicke von 0,86 mm verwendet. Der Farbcode dieser Schläuche ist *green-green*.

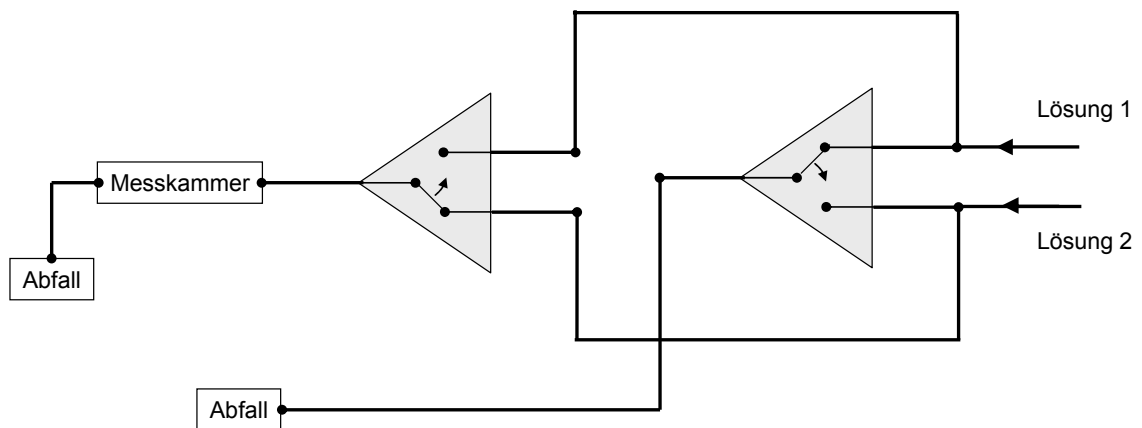


Abb. 5: Schematische Darstellung der über die Magnetventile gesteuerten Lösungs-zirkulation durch die Messkammer

Sowohl der Faraday-Käfig als auch die Geräte und Schläuche, durch metallene Schlauchverbinder unterbrochen, sind geerdet. Dies ist nötig, da die salzhaltigen Lösungen im Schlauch als Antenne wirken und elektrische

Störungen von außen in den Käfig leiten können. Durch die Erdung wird dies verhindert.

2.25 Signalregistrierung

Die Elektroden-Signale werden mittels der Silberdrähte über einen Vorverstärker mit 10facher Verstärkung an den Verstärker Biotronics (gebaut vom Institut für Zoologie, Universität Helsinki, Finnland) weitergeleitet, der die Signale nochmals um das 10fache verstärkt. Die analogen Signale werden dann von einem 10 bit Analog-Digital-Wandler (ADC 11) in digitale umgewandelt. Die Maximalspannung des AD-Wandlers beträgt 2,5 V und der Quantisierungsfehler 1,2 mV. Die Signale der Potential- und pH-Elektroden werden digital mithilfe der Software Picolog (Pico technology Ltd., Version 1.9, 1994) aufgezeichnet. Diese ermöglicht es, alle 200 ms einen Datenpunkt aufzunehmen.

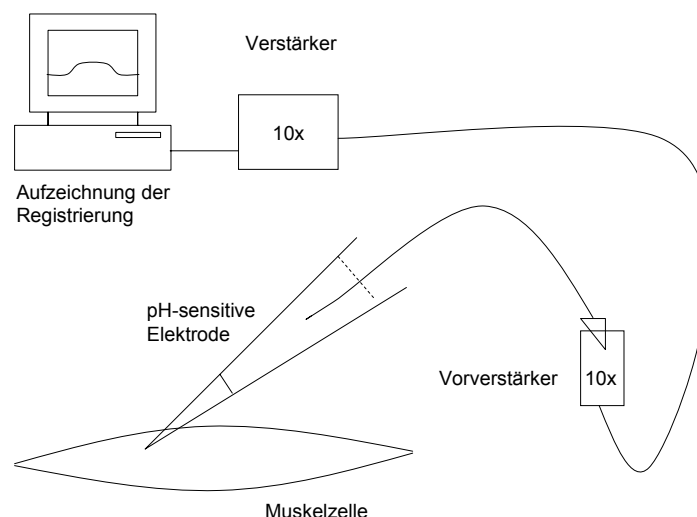


Abb. 6: Schematische Darstellung der Verstärkung und Registrierung des Elektrodensignals

2.26 Eichung der pH-Elektroden

Hier werden zwei Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten angesetzt und deren pH-Wert mittels einer konventionellen pH-Elektrode samt pH-Meter bestimmt. Die pH-Mikroelektroden werden nun in mehrfachem Lösungswechsel diesen beiden Pufferlösungen ausgesetzt und das Signal jeweils mittels Picolog aufgezeichnet. Den dort gemessenen Spannungen werden dann die beiden bekannten pH-Werte zugeordnet.

Ein typisches Beispiel: aus der pH-Differenz von 0,69 der beiden Puffer und der gemessenen mit Picolog erfassten Spannungsdifferenz von 39,44 mV bei der

pH_i-Elektrode und 39,55 mV bei der pH_s-Elektrode errechnet sich ein Eichfaktor von 0,0175 pH/mV für die pH_i-Elektrode und ein Eichfaktor von 0,0174 pH/mV für die pH_s-Elektrode. Damit werden dann alle folgenden Messungen von mV in pH-Einheiten umrechnen.

Lösungen für pH-Elektroden zum Eichen

Eichlösung A:

100 mM NaCl
10 mM HEPES
3 mM NaOH
pH: 7,198

Eichlösung B:

100 mM NaCl
10 mM HEPES
7 mM NaOH
pH: 7,888

2.27 Durchführung einer Messung.

Eine breite Stelle des Muskels wird ausgesucht und in das Sichtfeld des Mikroskops gerückt. Nun werden die eingespannten Elektroden in das Sichtfeld gebracht und in die Lösung getaucht. Die Elektroden sollten stabil sein und zeigen den Ausgangs-pH von 7,4 in der Lösung an. Zur Kontrolle wird der Widerstand gemessen. Er beträgt bei der Potentialelektrode 2 MΩ, bei der pH_s-Elektrode 5-10 GΩ und bei der pH_i-Elektrode 20-30 GΩ. Wichtig ist, dass der Widerstand nach der Messung noch derselbe ist, ansonsten wäre die Messung ungültig. Widerstandsänderungen treten z.B. durch Verstopfen oder Abbrechen der Spitze oder Verlust des Ionophors auf.

Zuerst werden nun pH_i-Elektrode und Potentialelektrode eingestochen. Eine gut sichtbare Zelle des Faserbündels wird ausgewählt. Es ist sehr wichtig, dass sich die Elektroden in derselben Zelle befinden. Mit den Mikromanipulatoren werden die schräg nach unten zeigenden Elektroden vorsichtig in Richtung Muskel bewegt. Auf der Oberfläche angelangt, werden sie vorsichtig ein wenig in die Zelle geschoben. Dies bewirkt einen Potentialsprung bei beiden Elektroden, der sich auf die pH-Änderung zwischen Lösung und Muskelinnerem und das Membranpotential zurückführen lässt. Die Potentialelektrode zeigt das Ruhemembranpotential der Zelle an, die pH_i-Elektrode das Ruhemembranpotential plus einem dem intrazellulären pH-Wert entsprechenden Potential. Um den intrazellulären pH-Wert zu erhalten, wird später das Ruhemembranpotential von der Registrierung der pH_i-Elektrode abgezogen.

Die pH_s -Elektrode wird vorsichtig der Zelle angenähert und knapp über der Oberfläche auf die Zelle aufgelegt. In diesem Bereich gibt es auch bei gut gerührter Badlösung kaum noch Konvektion und Austauschvorgänge mit der Badlösung werden größtenteils durch Diffusion bestimmt. Dieser Bereich wird auch als eine die Zelle umgebende *unstirred layer* bezeichnet. Dort besitzt die Lösung einen leicht alkalischeren pH-Wert als der große Rest der Lösung ("*bulk*"). Die Elektroden brauchen etwas Zeit, um sich zu stabilisieren.

2.28 Bestimmung des Nicht-Bikarbonat-Pufferfaktors

Abgesehen vom Bikarbonat hat die Zelle noch weitere Puffersysteme, wie z.B. Proteine und Phosphate, deren Anteil an der Gesamt-Pufferkapazität der Zelle bestimmt wurde. Die Ermittlung des Nicht-Bikarbonat-Pufferfaktors erfolgte mittels dreier verschiedener Bikarbonat-gepufferter Krebs-Henseleit-Lösungen mit gleichem pH -Wert bei CO_2 -Partialdrücken. Gasmischpumpen stellen die gewünschten prozentualen Anteile von CO_2 in dem Gasgemisch ein, mit dem die Lösungen äquilibriert werden.

Zwischen diesen Lösungen wird ein schneller Wechsel vollzogen und dann wird solange gewartet, bis die pH_i -Elektrode einen konstanten Wert und damit ihr Plateau erreicht hat. Dabei diffundiert CO_2 in die Zelle und reagiert intrazellulär zu Protonen und Bikarbonat. Diese Protonen werden intrazellulär weitgehend abgepuffert, wobei das Bikarbonat-System an dieser Pufferung nicht beteiligt ist. Es wird also nur das Nicht-Bikarbonat-Puffersystem zur Pufferung herangezogen. Der Nicht-Bikarbonat-Pufferfaktor ergibt sich aus der Menge gepufferter Protonen pro intrazellulärem Volumen und aus der Änderung des intrazellulären pH_i -Werts, wobei die Menge gepufferter Protonen praktisch identisch ist mit der Änderung der intrazellulären Bikarbonat-Konzentration (s.u.). Diese Messungen wurden an *EDL* und *Soleus* durchgeführt und zwar sowohl an WT- als auch an Faserbündeln von CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen. Die Pufferfaktoren der Muskelfasern von Wildtyp- und *knockout*-Mäusen sind nicht signifikant verschieden. Es ergibt sich für den *EDL* ein durchschnittlicher Nicht-Bikarbonat-Pufferfaktor von 24,2 $\text{mM}/\Delta\text{pH}$ und für den *Soleus* ein Faktor von 36,4 $\text{mM}/\Delta\text{pH}$. Diese Werte werden bei allen Messungen für die Berechnung des totalen Pufferfaktors angewendet. Sie liegen am unteren Rand der bekannten Literaturwerte (Beekley *et al.*, 2006).

Krebs-Henseleit-Lösung, 14% CO₂

98 mM	NaCl
3,7 mM	KCl
1,2 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1,3 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
52 mM	NaHCO ₃

Krebs-Henseleit-Lösung, 2% CO₂

98 mM	NaCl
3,7 mM	KCl
1,2 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1,3 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
10 mM	NaHCO ₃
42 mM	Methansulfonsäure

Krebs-Henseleit-Lösung, 5% CO₂

98 mM	NaCl
3,7 mM	KCl
1,2 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1,3 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
25 mM	NaHCO ₃
27 mM	Methansulfonsäure

Die intrazelluläre Bikarbonat-Konzentration wird für jede der drei Lösungen separat anhand der Henderson-Hasselbach-Gleichung errechnet.

$$\text{pH}_i = \text{pK}' + \lg \frac{[\text{HCO}_3^-]_i}{\alpha \cdot \text{pCO}_2}$$

- pH_i = der gemessene intrazelluläre pH-Wert
 pK' = der negative dekadische Logarithmus der apparenten Dissoziationskonstante der Kohlensäure
 = 6,18 bei 22 °C und einer Ionenstärke von $\mu = 0,155$
 α = Löslichkeitskoeffizient von CO₂
 = $4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot (\text{mmHg} \cdot \text{l})^{-1}$ bei 22 °C und einer Ionenstärke von $\mu = 0,155$
 pCO_2 = CO₂ – Partialdruck bei 22 °C, der aus Proben der Kammerflüssigkeit in einem Blut-Gas-Analysator (Radiometer) experimentell bestimmt wurde, und der sowohl extra- wie intrazellulär vorliegt

Die intrazelluläre Bikarbonat-Konzentration wird sowohl vor dem Lösungswechsel als auch nach dem Lösungswechsel, wenn die pH_i -Elektrode ihr Plateau erreicht hat, bestimmt. Daraus lässt sich dann die durch die verschiedenen Lösungs-Konzentrationen bedingte Änderung der Bikarbonat-Konzentration $\Delta[\text{HCO}_3^-]_i$ ermitteln. Wird $\Delta[\text{HCO}_3^-]_i$ durch ΔpH_i geteilt, ergibt sich die Nicht-Bikarbonat-Pufferkapazität des Muskels.

2.29 Ein- und Ausstrom von Laktat

Die mögliche Beschleunigung der Transportrate des Protonen-Laktat-Kotransporters durch eine CA-Isoform soll untersucht werden, indem die isolierten Muskelfasern zunächst mit einer Krebs-Henseleit-Lösung, die kein Natriumlaktat enthält, superfundiert werden und dann ein schneller Wechsel auf eine 20 mM Natriumlaktat enthaltende Krebs-Henseleit-Lösung vollzogen wird. Wird das Laktat durch den Protonen-Laktat-Kotransporter in die Zelle transportiert, entsteht im Zellinneren ein Protonenüberschuß und das Milieu in der Zelle wird azidifiziert.

An der Zelloberfläche im *unstirred layer* entsteht ein Protonenmangel, weil die Badlösung nicht Milchsäure sondern Laktat enthält. Die dadurch notwendige Mobilisierung von Protonen für die Beladung des *Carriers* mit Milchsäure bewirkt in dieser *unstirred layer* eine Alkalinisierung.

Nachdem die anfängliche vom Milchsäureeinstrom in die Zelle dominierte Phase zu Ende geht, wird sichtbar, dass die Zelle gegen die Azidose mittels ihrer pH-Regulationsmechanismen gegenreguliert, also Protonen aus der Zelle herausbefördert, bis sich ein neues Gleichgewicht eingestellt hat.

Beim Ausstrom von Laktat passiert genau das Gegenteil. Der schnelle Protonentransport bewirkt eine Azidifizierung der Oberfläche und alkalisiert das Innere der Zelle, wogegen die pH-Regulation "anarbeitet", bis sich wiederum ein neues Gleichgewicht eingestellt hat.

Sowohl der Einstrom von Laktat in die Muskelzelle als auch ihr Ausstrom werden mithilfe einer pH-sensitiven intrazellulären Mikroelektrode registriert (pH_i). Aus diesen Registrierungen wird unter Verwendung des totalen Pufferfaktors der Muskelzelle die Transportrate für Laktat ermittelt. Eine weitere pH-Mikroelektrode, die auf die Muskelzelle aufgesetzt wird, dient zur Registrierung von extrazellulären pH-Transienten, die ebenfalls beim Transport von Milchsäure auftreten (pH_s). Untersuchungen dieser Größen an

Muskelfasern der verschiedenen *knockout*-Mäuse, sollen zeigen, ob und welche Carboanhydrasen möglicherweise einen Effekt auf den Laktat-Protonen-Kotransporter haben.

Krebs-Henseleit-Lösung

100 mM NaCl
 3,3 mM KCl
 1,2 mM MgSO₄ x 7 H₂O
 1.3 mM CaCl₂ x 2 H₂O
 25 mM NaHCO₃
 20 mM Na⁺-L-Laktat
 oder 20 mM Methansulfonsäure

Methansulfonsäure-Stammlösung,

1M, pH 7,0
 13 ml Methansulfonsäure (98%,
 Fluka)
 100 ml 2 M NaOH

Carboanhydrase-Hemmstoffe:

Benzolamid (2-Benzenesulfonamido-1,3,4-thiadiazol-5-sulfonamid)

Stammlösung $1 \cdot 10^{-2}$ M in 0,02 M NaOH (portionsweise gelagert bei -20 °C)

Konzentration im Versuchsansatz: $1 \cdot 10^{-5}$.

Ethoxolamid (6-Ethoxy-2-Benzothiazol-sulfonamid)

Stammlösung $1 \cdot 10^{-2}$ M in 0,02 M NaOH. Die Stammlösung wurde jeweils frisch angesetzt und die Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 302 nm überprüft.

Konzentration im Versuchsansatz: $1 \cdot 10^{-4}$.

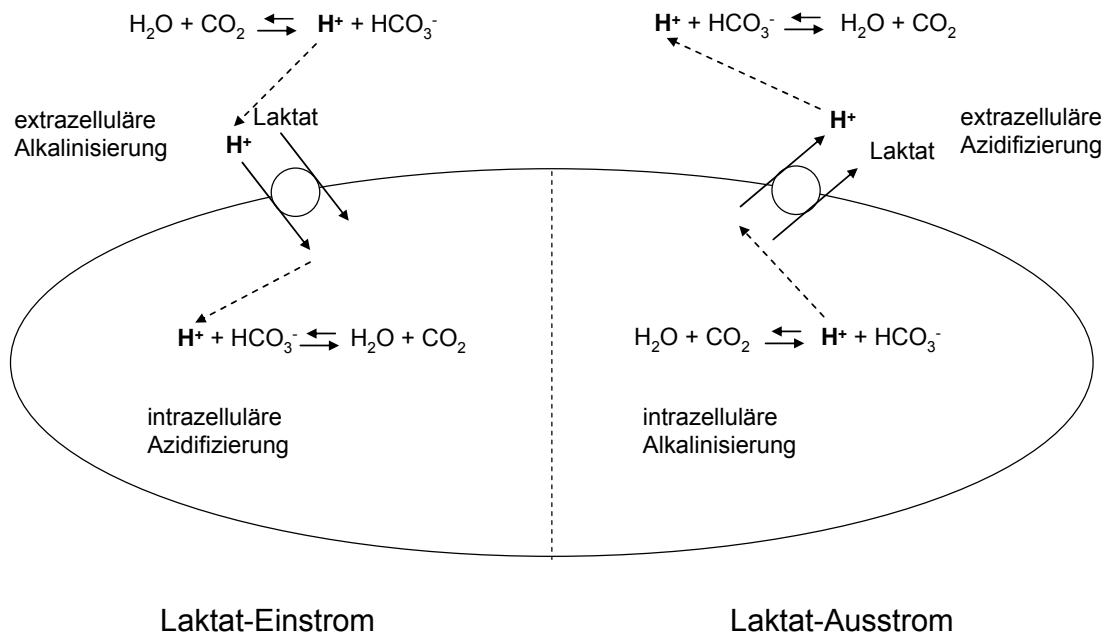


Abb. 7: Schematische Darstellung der Effekte von Laktat-Fluxen mittels des Protonen-Laktat-Kotransporters auf die Muskelzelle

2.30 Auswertungsparameter

Beim Laktat-Einstrom bzw. Ausstrom wird die initiale Steigung des pH_s -Transienten ermittelt und als $\Delta pH_s/dt$ (min) angegeben. Die Amplitude des Transienten (ΔpH_s) wird beim Laktat-Einstrom als Differenz der Ausgangslinie und dem maximalen Ausschlag in Richtung eines pH-Wertes ($+\Delta pH_s$) und beim Laktat-Ausstrom als Differenz zwischen der Ausgangslinie und dem maximalen Ausschlag in Richtung eines sauren pH-Wertes ($-\Delta pH_s$) bestimmt. Aus dem Signal des pH_i -Transienten werden ebenfalls die initialen Steigungen als $\Delta pH_i/dt$ (min) für die Phase des Laktat-Einstroms als auch für die Phase des Laktat-Ausstroms bestimmt. Die Amplitude des pH_i -Transienten ist für den Laktat-Einstrom definiert als Differenz zwischen dem Ausgangswert des pH_i und dem maximal erreichten sauren pH-Wert ($-\Delta pH_i$). Für den Laktat-Ausstrom ist die Amplitude definiert als Differenz zwischen dem maximal sauren pH_i -Wert und dem pH_i -Wert nach abgeschlossenem Laktat-Ausstrom. In der Regel sind beide pH_i -Amplituden gleich groß. Mithilfe des Gesamt-Pufferfaktors wird aus diesen pH_i -Differenzen die intrazelluläre Laktat-Konzentration berechnet. Aus der Registrierung der Potentialelektrode wurde der entsprechende Wert des Ruhepotentials in mV abgelesen.

Berechnung der intrazellulären Bikarbonat-Konzentration (HCO_3^-)_i

Die intrazelluläre Bikarbonat-Konzentration wird anhand der Henderson-Hasselbach-Gleichung errechnet:

$$\text{pH}_i = \text{pK}' + \lg \frac{[\text{HCO}_3^-]_i}{\alpha \cdot \text{pCO}_2}$$

- pH_i = der gemessene intrazelluläre pH-Wert
- pK' = der negative dekadische Logarithmus der apparenten Dissoziationskonstante der Kohlensäure
= 6,18 bei 22 °C und einer Ionenstärke von $\mu = 0,155$
- α = Löslichkeitskoeffizient von CO_2
= $4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot (\text{mmHg} \cdot \text{l})^{-1}$ bei 22 °C und einer Ionenstärke von $\mu = 0,155$
- pCO_2 = CO_2 – Partialdruck bei 22 °C, der aus Proben der Badflüssigkeit mit einem Blut-Gas-Analysator (Radiometer) experimentell bestimmt wurde.

Die intrazelluläre Bikarbonat-Konzentration wird im Skelettmuskel sowohl vor der Laktat-Zugabe als auch nach Laktat-Zugabe bestimmt, und zwar letzteres, wenn die pH_i -Elektrode nach Laktat-Zugabe ihr Plateau erreicht hat. Aus der Änderung der intrazellulären Bikarbonatkonzentration durch die Laktat-Exposition, $\Delta[\text{HCO}_3^-]_i$, ergibt sich die diesem Wert gleiche intrazelluläre Laktatkonzentration unter Laktatexposition nach Erreichen des Gleichgewichts. Dieser Wert, zusammen mit der extrazellulären Laktatkonzentration von 20 mM, ergibt dann die Gleichgewichtsverteilung des Laktats.

Berechnung des Bikarbonat-Pufferfaktors ($\text{PF}_{\text{HCO}_3^-}$):

Der Bikarbonat-Pufferfaktor ($\text{PF}_{\text{HCO}_3^-}$) beschreibt die Protonen-Pufferung in der Zelle, soweit sie durch Reaktion mit intrazellulärem HCO_3^- zustande kommt. Er wird mit folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{PF}_{\text{HCO}_3^-} (\text{mM}/\Delta\text{pH}) = \frac{\Delta[\text{HCO}_3^-]_i (\text{mM})}{\Delta\text{pH}_i}$$

ΔpH_i = maximale Änderung des intrazellulären pH-Wertes durch Laktat-Zugabe, damit einhergehende Änderung der intrazellulären Bikarbonat-Konzentration $\Delta[\text{HCO}_3^-]_i$.

Der Bikarbonat-Pufferfaktor ($\text{PF}_{\text{HCO}_3^-}$) wird für jede Laktat-Exposition bestimmt und ergibt zusammen mit dem Nicht-Bikarbonat-Pufferfaktor den totalen Pufferfaktor.

Berechnung des totalen Pufferfaktors (PF_{total})

Der totale Pufferfaktor errechnet sich aus der Summe des Bikarbonat-Pufferfaktors und des Nicht-Bikarbonat-Pufferfaktors und stellt damit die totale Pufferkapazität der Muskelfaser dar.

$$\text{PF}_{\text{total}} (\text{mM}/\Delta\text{pH}) = \text{PF}_{\text{HCO}_3^-} (\text{mM}/\Delta\text{pH}) + \text{PF}_{\text{Nicht-HCO}_3^-} (\text{mM}/\Delta\text{pH})$$

Die Ermittlung des Nicht-Bikarbonat-Pufferfaktors erfolgte sowohl am *EDL* als auch am *Soleus* experimentell durch CO_2 -Belastung der Muskelfaser. Er stellt die intrazelluläre Pufferung durch anorganisches Phosphat, organische Phosphate, Peptide und Proteine dar, wobei der Hauptanteil der Pufferung durch Proteine zustande kommt.

PF_{total} wird für jede Laktat-Exposition aus dem jeweiligen $\text{PF}_{\text{HCO}_3^-}$ und dem unabhängig ermittelten Wert für $\text{PF}_{\text{Nicht-HCO}_3^-}$ bestimmt.

Berechnung der Laktat-Fluxe

Die Laktat-Konzentrationsänderung pro Zeit wird als Laktat-Flux bezeichnet. Dieser errechnet sich aus dem Produkt von PF_{total} und dpH_i/dt

$$\text{Laktat-Flux (mM/min)} = \text{PF}_{\text{total}} (\text{mM}/\Delta\text{pH}) \cdot \text{dpH}_i/\text{dt} (\Delta\text{pH}/\text{min})$$

Die initiale pH_i -Steigung des Laktat-Einstroms wird verwendet, um den initialen Laktat-Influx zu erhalten, und die initiale pH_i -Steigung des Laktat-Ausstroms für den initialen Laktat-Efflux.

Berechnung der intrazellulären Laktat-Konzentration [Laktat]_i

Die intrazelluläre Laktat-Konzentration [Laktat]_i ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$[\text{Laktat}]_i \text{ (mM)} = \text{PF}_{\text{total}} \text{ (mM}/\Delta\text{pH}) \cdot \Delta\text{pH}$$

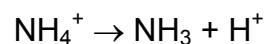
Sie gibt die tatsächliche Konzentration von Laktat in der Zelle wieder, nachdem dieses durch Bereitstellung der Laktat-haltigen Krebs-Henseleit-Lösung in die Zelle transportiert wurde.

2.31 pH-Regulation unter Ammonium-Exposition

Die Superfusion der Muskelfasern mit einer 25 mM (NH₄)₂SO₄ enthaltenden Krebs-Henseleit-Lösung bewirkt einen Einstrom von NH₃ in die Zelle, das dort mit einem Proton reagiert. Dies bewirkt eine intrazelluläre Alkalinisierung (Aickin & Thomas, 1977, Vanheel *et al.*, 1986).

Eine Gegenregulation der Zelle gegen den intrazellulären pH-Anstieg wird durch den HCO₃⁻/Cl⁻-Austauscher bewirkt. Dies wird mittels der intrazellulären pH_i-Elektrode registriert. Hier wird jedoch nicht die initiale pH_i-Steigung während des Ammonium-Einstromes bestimmt, sondern die initiale pH_i-Steigung bei Sichtbarwerden der pH-Gegenregulation der Zelle. Diese spiegelt die Transportrate des HCO₃⁻/Cl⁻-Austauschers wieder.

Die pH_s-Elektrode auf der Oberfläche der Zelle registriert während des Ammoniak-Einstroms eine extrazelluläre Azidifizierung, die durch die Reaktion



auf der Zelloberfläche zurückzuführen ist. Beim schnellen Wechsel von NH₄⁺ - enthaltender Krebs-Henseleit-Lösung auf NH₄⁺-freie Lösung strömt NH₃ wieder aus der Muskelzelle heraus, was eine intrazelluläre Azidifizierung erzeugt. Die Zelle reguliert gegen, indem sowohl Protonen durch den Na⁺/H⁺-Austauscher aus der Zelle heraus, als auch HCO₃⁻-Ionen durch den Na⁺/HCO₃⁻-Kotransporter in die Zelle hinein transportiert werden (Lagadic-Gossmann *et al.*, 1992, Vaughan-Jones *et al.*, 2006). Auch diese Gegenregulation wird mit der intrazellulären pH_i-Elektrode registriert.

Die pH_s-Elektrode hingegen registriert hier während des NH₃-Ausstroms eine extrazelluläre Alkalinisierung. Wiederum werden bei der pH_i-Elektrode die initialen Steigungen der Gegenregulation der Zelle bestimmt, wobei auf diese Steigung beide Transporter, also der Na⁺/H⁺-Austauscher wie auch der Na⁺/HCO₃⁻-Kotransporter einen Einfluss haben.

Durch Untersuchungen an Muskelfasern von Carboanhydrase-*knockout*-Mäusen sollte ermittelt werden, ob und welche der Carboanhydrasen möglicherweise einen aktivitätssteigernden Einfluss auf diese Transporter haben.

Krebs-Henseleit-Lösung

- 80 mM NaCl
- 3,3 mM KCl
- 1,2 mM MgSO₄ x 7 H₂O
- 1.3 mM CaCl₂ x 2 H₂O
- 25 mM NaHCO₃
- 25 mM (NH₄)₂SO₄
- oder
- 40 mM Methansulfonsäure

1M Methansulfonsäure-Stammlösung,

- pH 7,0
- 13 ml Methansulfonsäure
- 100 ml 2 M NaOH
- ad 200 ml bidest

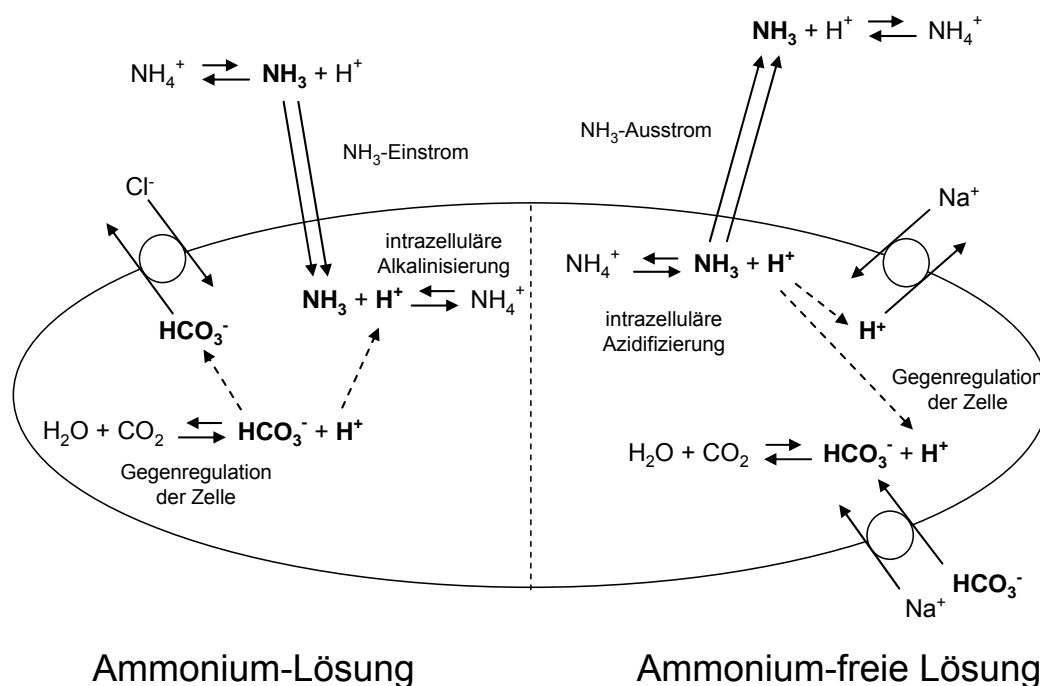


Abb. 8: Schematische Darstellung des Einflusses von 25 mM (NH₄)₂SO₄ auf die Muskelzelle

2.32 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen werden signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten \pm SD in Prism 3.0 mit *One-way ANOVA (Analysis of variance)* gefolgt von *Dunnett's Multiple Comparison Post Test* berechnet. Dieser Test wird angewandt, um signifikante Unterschiede in Bezug auf eine Kontrollgruppe zu erheben. Das ist in diesem Fall immer die WT-Gruppe.

Die Auswertung des Vergleichs zwischen WT und WT + BZ bzw. CA IV / CA XIV *ko* und CA IV / CA XIV *ko* + BZ in ein- und derselben Muskelzelle erfolgt statistisch über einen gepaarten t-Test.

Unterschiede zwischen Variablen sind signifikant verschieden, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit gering ist. Ein p-Wert von $< 0,05$ bedeutet, dass die maximal zulässige Wahrscheinlichkeit für Irrtum 5% beträgt. In diesem Fall wird das Ergebnis als signifikant betrachtet.

3 Zielsetzung

In der geplanten Promotionsarbeit sollte untersucht werden, welche der bekannten membranständigen Carboanhydrasen im Skelettmuskel der Maus vorkommen. Dazu wurden isolierte Membranfraktionen vom Sarkolemm (SL) und vom sarkoplasmatischen Retikulum (SR) von Skelettmuskeln präpariert. Mit spezifischen Antikörpern gegen CA IV, CA IX, CA XII und CA XIV sollte im *Western Blot* untersucht werden, ob diese Isoenzyme in den Membranen des SL und des SR exprimiert werden, und falls ja, sollte zusätzlich ihre Verteilung auf SL- und SR-Membranen quantifiziert werden.

In einem zweiten Teil der Fragestellung sollte die funktionelle Rolle der einzelnen CA-Isoenzyme, die mit der SL-Membran assoziiert sind, untersucht werden. Die in der SL-Membran verankerten Carboanhydrasen sind im Extrazellularraum katalytisch aktiv. Dort beschleunigen sie sowohl die CO_2 - Hydratationsreaktion als auch die Dehydratationsreaktion. Damit dienen sie sowohl einer schnellen Bereitstellung von HCO_3^- - und H^+ -Ionen, die von pH-regulierenden Transportproteinen in die Muskelzelle hineintransportiert werden, als auch der schnellen Pufferung von Ionen, die von Transportproteinen aus der Zelle heraustransportiert werden. H^+ -Ionen-gekoppelte Transporter im Skelettmuskel sind der Protonen-Laktat-Kotransporter und der Na^+/H^+ - Austauscher. HCO_3^- -transportierende Proteine sind der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher und der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter. Es sollte die Frage geklärt werden, ob eines der membranständigen CA-Isoenzyme mit einem dieser genannten Transporter funktionell interagiert und somit dessen Transportrate beschleunigt.

Dazu sollten kleine Muskelfaserbündel von einem schnell-kontrahierenden Muskel, dem *musculus extensor digitorum longus*, und von einem langsam-kontrahierenden Muskel, dem *musculus soleus*, manuell präpariert werden. Die Muskeln sollten sowohl Wildtyp-Mäusen entnommen werden, als auch CA-*knockout* Mäusen, die entweder für CA IV oder für CA IX oder für CA XIV oder für CA IV und XIV oder für CA IV, CA IX und CA XIV defizient sind. An einzelnen Fasern dieser Bündel sollten mittels pH-Mikroelektroden pH_i und der Oberflächen-pH (pH_s) gemessen und daraus entweder Milchsäure-Fluxe oder

pH-Regulationsvorgänge erfasst und quantifiziert werden. Die Effekte der CA-Defizienzen und die Effekte von Carboanhydrase-Inhibitoren sollten dann über Art und Ausmaß der Beteiligung der Carboanhydrasen an diesen Prozessen Auskunft geben.

4 Ergebnisse

4.1 Western Blots

Die *Western Blots* werden durchgeführt, um zu prüfen, ob die SR- oder SL-Membranen von WT- oder *knockout*-Mäusen, die CA IV, CA IX, CA XII und CA XIV enthalten. Dafür werden die zuvor aufgereinigten Membranvesikel verwendet und mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

4.2 Nachweis der CA IV im Western Blot

Verglichen werden Membranvesikelfractionen aus WT-Mäusen des SR und des SL. Sie werden mit dem Primär-Antikörper Anti-CA IV nachgewiesen.

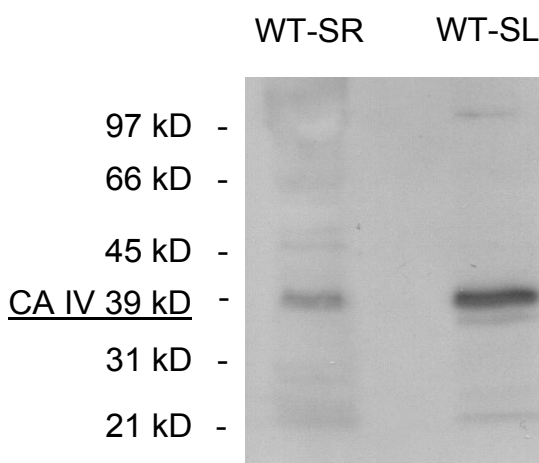


Abb. 9: *Western Blot* der Carboanhydrase IV von Membranvesikelfractionen des SR und des SL aus Wildtyp-Mäusen. Das CA IV-Protein (39 kDa) ist sowohl im SR als auch im SL in der WT-Fraktion vorhanden. Aufgetragen sind Proben von jeweils gleicher Enzymaktivitäts-Menge mit 0,033 Enzymeinheiten.

In Abb. 9 ist deutlich zu sehen, dass das Carboanhydrase IV-Protein mit einer Größe von 39 kDa sowohl im SR als auch im SL der Muskelzellen von WT-Mäusen vorhanden ist. Hier wurden gleiche Enzymmengen aufgetragen. Daraus folgt, dass die aufgetragenen Proteinmengen die gleichen Mengen an Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität besitzen. Die SR-Fraktion beinhaltet 71,8 µg Protein, die SL-Fraktion beinhaltet 6,4 µg Protein. Dies entspricht jeweils derselben Menge von 0,033 Enzymeinheiten. Der Primär-Antikörper Anti-CA IV

ist 1:2000 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 1 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 15 Sekunden.

Es ist zu erkennen, dass die Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität des SL einen größeren Anteil an CA IV enthält als das SR. Allerdings, wie weiter unten gezeigt wird, ist der Anteil des SL an CA XIV noch erheblich größer.

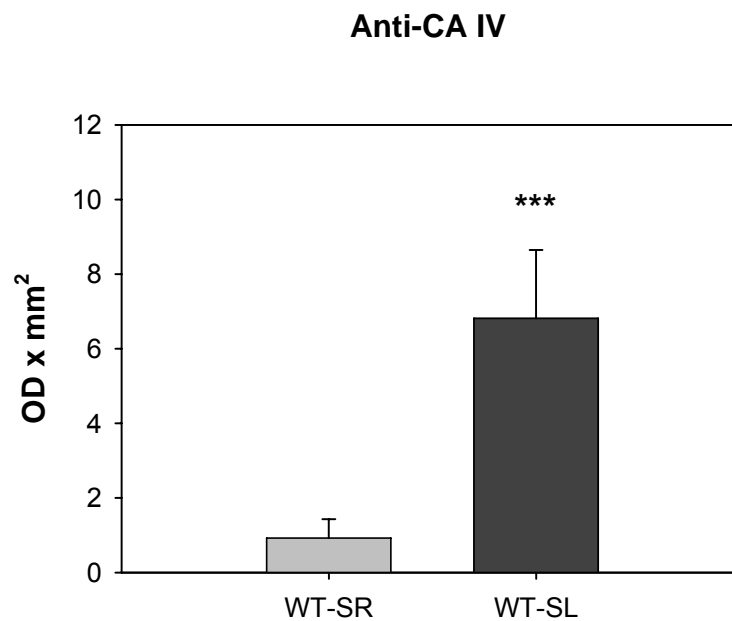


Abb. 10: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der ausgewerteten Banden der *Western Blots* der Carboanhydrase IV von Membranvesikelfractionen des SR und des SL mit gleichen Mengen an Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität. WT-SR: n=7, WT-SL: n=7, *** = P<0,001

Aus Abb. 10 kann abgeleitet werden, welchen Anteil die CA IV im SR und im SL an der Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität besitzt. Der SL-Anteil der CA IV ist signifikant verschieden ($P < 0,001$) zum Anteil des SR. Wird der Mittelwert der SL-Werte auf 100% gesetzt, ergibt sich ein CA IV-Anteil für das SR von 13,54%.

Um herauszufinden, wie der Anteil der CA IV in Muskelfasern von WT-Mäusen im Vergleich zu Muskelfasern von CA IV *ko*-Mäusen ist, werden Membranvesikelfractionen von WT-SR- und CA IV-*ko*-SR und von WT-SL und CA IV-*ko*-SL im *Western Blot* analysiert. Um einen direkten Vergleich zu erreichen, werden jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen.

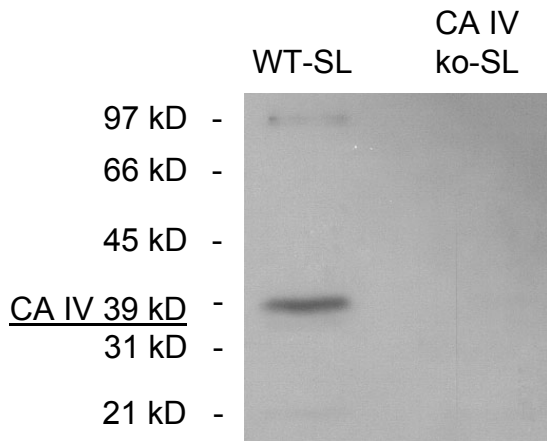


Abb. 11: *Western Blot* der Carboanhydrase IV von Membranvesikelfractionen des SL aus WT und CA IV *ko*-Mäusen. Das CA IV-Protein (39 kDa) ist nur in der WT-Fraktion vorhanden, nicht jedoch in der CA IV *ko*-Fraktion. Aufgetragen sind Proben gleicher Proteinmenge mit 1,7 μ g Protein.

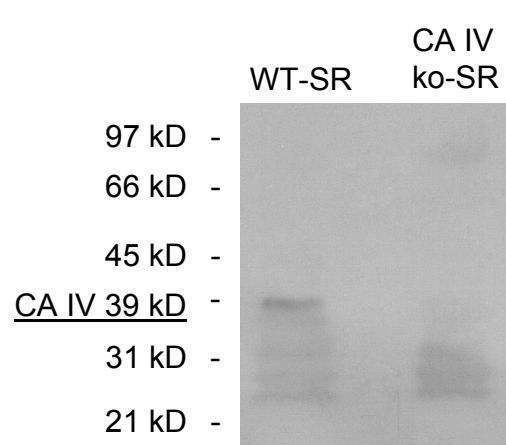


Abb. 12: *Western Blot* der Carboanhydrase IV von Membranvesikelfractionen des SR aus WT und CA IV *ko*-Mäusen. Das CA IV-Protein (39 kDa) ist im SR der WT-Fraktion aber nicht im SR der CA IV-*ko*-Fraktion vorhanden. Aufgetragen sind Proben etwa gleicher Proteinmengen mit 27,4 μ g und 30 μ g Protein.

Verglichen werden Membranvesikelfractionen aus WT-Mäusen und CA IV *ko*-Mäusen des SL (Abb. 11) und des SR (Abb. 12) und CA IV wird mit dem Primär-Antikörper Anti-CA IV nachgewiesen. In Abb. 11 ist deutlich zu sehen, dass das Carboanhydrase IV-Protein mit einer Größe von 39 kDa nur im SL der Muskelzellen von WT-Mäusen vorhanden ist und nicht im SL der Muskelzellen von CA IV *ko*-Mäusen. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die Proben der SL-Fractionen enthielten 1,7 μ g Protein. Der Primär-Antikörper Anti-CA IV ist 1:47000 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 1 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 15 Sekunden.

In Abb. 12 ist deutlich zu sehen, dass das Carboanhydrase IV-Protein mit der Größe von 39 kDa nur im SR der Muskelzellen von WT-Mäusen vorhanden ist, nicht jedoch im SR der Muskelzellen von CA IV *ko*-Mäusen. Es wurden sowohl in Abb. 11 als auch in Abb. 12 im Verhältnis gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die Probe mit der WT-SR-Fraktion enthielt 27,4 μ g Protein, die CA IV *ko*-Fraktion beinhaltet 30 μ g Protein. Der Primär-Antikörper Anti-CA IV ist 1:117000 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 1 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 1 Minute.

Als Nachweis dafür, dass in den Membranvesikelfractionen der CA IV *ko*-Mäuse nur die CA IV ausgeschaltet ist und nicht auch noch andere Carboanhydrasen, werden WT- und CA IV *ko*-SL-Fractionen verglichen und nicht nur mit dem Anti-CA IV Antikörper behandelt, sondern zusätzlich mit dem Anti-CA XIV Antikörper.

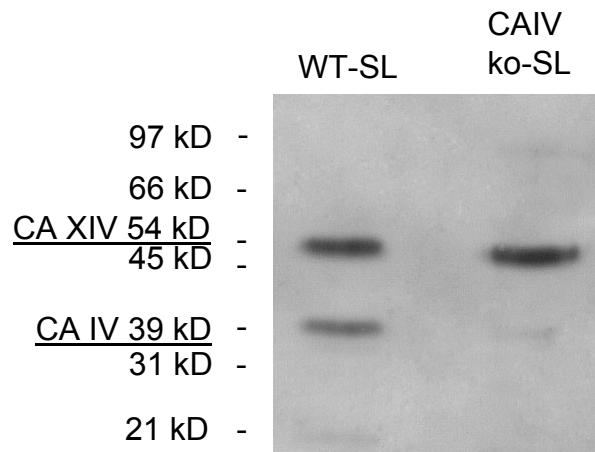


Abb. 13: *Western Blot* der Carboanhydrase IV und XIV von Membranvesikelfractionen des WT-SL und CA IV *ko*-SL. Das CA IV-Protein (39 kDa) ist nur in der WT-Fraktion vorhanden, nicht jedoch in der CA IV *ko*-Fraktion. Das CA XIV Protein (54 kDa) ist sowohl in der WT- als auch in der CA IV-*ko*-Fraktion vorhanden. Aufgetragen sind gleiche Proteinmengen mit 1,13 μ g Protein.

In Abb. 13 ist deutlich zu sehen, dass das CA IV-Protein mit einer Größe von 39 kDa nur in der WT-SL-Fraktion vorhanden ist, das CA XIV Protein mit einer Größe von 54 kDa jedoch sowohl in der WT- als auch in der CA IV *ko*-Fraktion. Die Proben der SL-Fractionen enthielten jeweils 1,13 μ g Protein. Der Primär-Antikörper Anti-CA IV ist 1:3000 verdünnt und der Primär-Antikörper Anti-CA XIV ist 1:6000 verdünnt. Der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 1 ng/ml. Die Belichtungszeit beträgt 15 Sekunden.

Außerdem wurden die Anteile der CA IV in Muskelfasern von CA IV / CA XIV-*ko*-Mäusen im Vergleich zu Muskelfasern von WT-Mäusen bestimmt. Hier werden Membranvesikelfractionen von WT-SR- und CA IV / CA XIV *ko*-SR Mäusen und von WT-SL und CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen im *Western Blot*

analysiert. Um einen direkten Vergleich zu erreichen, wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen.

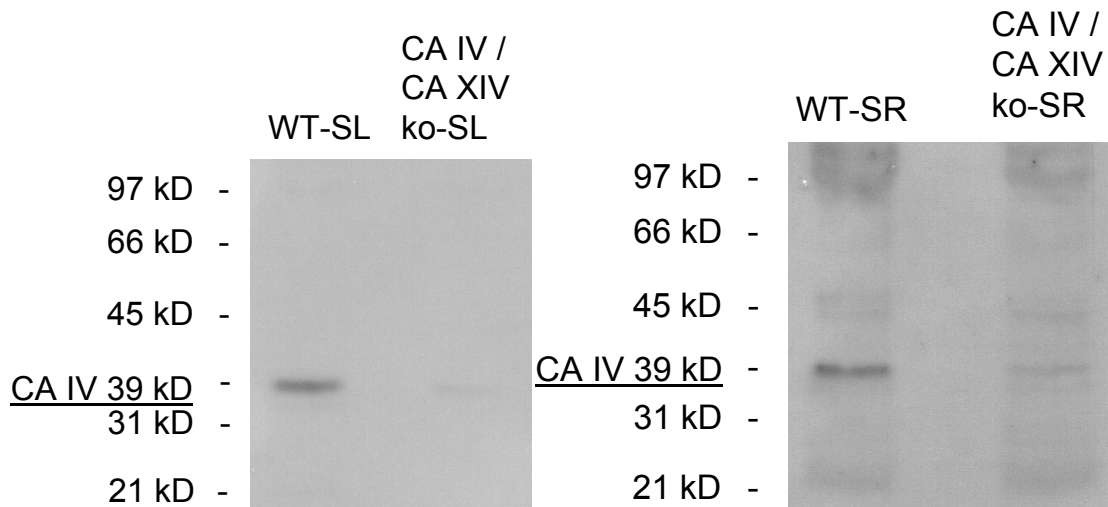


Abb. 14: *Western Blot* der Carboanhydrase IV von Membranvesikelfractionen des SL aus WT und CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen. Das CA IV-Protein (39 kDa) ist nur in der WT-SL-Fraktion vorhanden, nicht jedoch in der CA IV / CA XIV *ko*-SL Fraktion. Aufgetragen sind gleiche Proteinmengen mit 1,7 μ g Protein.

Abb. 15: *Western Blot* der Carboanhydrase IV von Membranvesikelfractionen des SR aus WT und CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen. Das CA IV-Protein (39 kDa) ist nur in der WT-Fraktion vorhanden, nicht jedoch in der CA IV / CA XIV *ko*-SR-Fraktion. Aufgetragen sind etwa gleiche Proteinmengen mit 27,5 und 25,6 μ g Protein.

Verglichen werden SL- Membranvesikelfractionen aus WT-Mäusen und CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen (Abb. 14) und des SR (Abb. 15). CA IV wird mit dem Primär-Antikörper Anti-CA IV nachgewiesen. In Abb. 14 ist deutlich zu sehen, dass das Carboanhydrase IV-Protein mit einer Größe von 39 kDa nur im SL der Muskelzellen von WT-Mäusen vorhanden ist, nicht jedoch im SL der Muskelzellen von CA IV / CA XIV-*ko*-Mäusen. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die Proben der SL-Fractionen enthalten 1,7 μ g Protein. Der Primär-Antikörper Anti-CA IV ist 1:47000 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 1 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 30 Sekunden.

In Abb. 15 ist deutlich zu sehen, dass das Carboanhydrase IV-Protein mit der Größe von 39 kDa nur im SR der Muskelzellen von WT-Mäusen vorhanden ist, praktisch nicht jedoch im SR der Muskelzellen von CA IV *ko*-Mäusen. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die Probe der WT-SR-Fraktion

enthält 27,5 µg Protein, die Probe der CA IV / XIV *ko*-SR-Fraktion enthält 25,6 µg Protein. Der Primär-Antikörper ist 1:9300 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 0,5 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 15 Sekunden.

4.3 Nachweis der CA IX im *Western Blot*

Verglichen werden Membranvesikelfraktionen aus WT-Mäusen des SR und des SL. Sie werden mit dem Primär-Antikörper Anti-CA IX nachgewiesen.

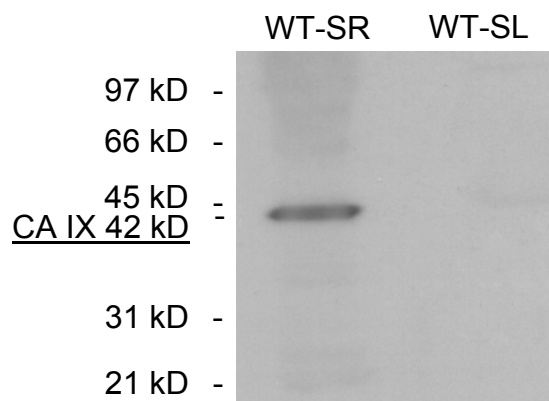


Abb. 16: *Western Blot* der Carboanhydrase IX von Membranvesikelfraktionen des SR und des SL aus WT-Mäusen. Das CA IX-Protein (42 kDa) ist sowohl im SR als auch im SL in der WT-Fraktion vorhanden. Aufgetragen sind gleiche Enzymmengen mit 0,02 Enzymeinheiten.

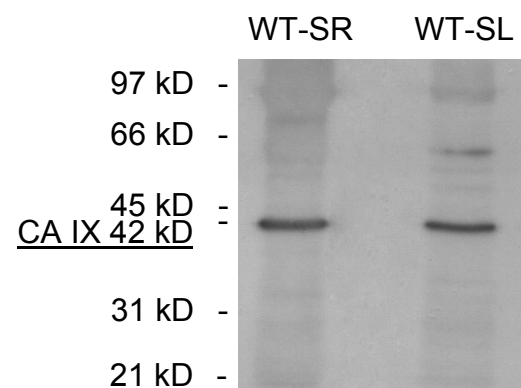


Abb. 17: *Western Blot* der Carboanhydrase IX von Membranvesikelfraktionen des SR und des SL aus WT-Mäusen. Das CA IX-Protein (42 kDa) ist sowohl im SR als auch im SL in der WT-Fraktion vorhanden. Aufgetragen sind für das SR 28,4 µg Protein und für das SL 19,2 µg Protein.

In Abb. 16 ist zu sehen, dass das Carboanhydrase IX-Protein mit einer Größe von 42 kDa sowohl im SR als auch im SL der Muskelzellen von WT-Mäusen vorhanden ist. Es wurden gleiche Enzymmengen aufgetragen. Das heißt, dass die aufgetragenen Proteinmengen den gleichen Anteil an Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität besitzen. Die SR-Fraktion beinhaltet 43,08 µg Protein, die SL-Fraktion beinhaltet 3,84 µg Protein. Dies entspricht jeweils derselben Menge von 0,02 Enzymeinheiten. Der Primär-Antikörper ist 1:3500 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 1 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 15 Sekunden. Da beim Auftragen von gleichen Enzymeinheiten vom SR nur eine äußerst schwache Bande zu erkennen ist (Abb. 16), werden zum Nachweis der CA IX noch einmal größere

Proteinmengen im Vergleich aufgetragen, wobei SR- und SL-Fraktion nicht die gleichen Enzymmengen beinhalten (Abb. 17). Die SR-Fraktion beinhaltet 28,4 μg Protein, die SL-Fraktion beinhaltet 19,2 μg Protein. Der Primär-Antikörper ist 1:3500 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 0,5 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 15 Sekunden. Da bereits zu erkennen ist, dass der SL-Anteil größer ist, als der SR-Anteil, wurden mehrere *Blots* mit gleichen aufgetragenen Enzymmengen angefertigt, die optische Dichte bestimmt und ausgewertet.

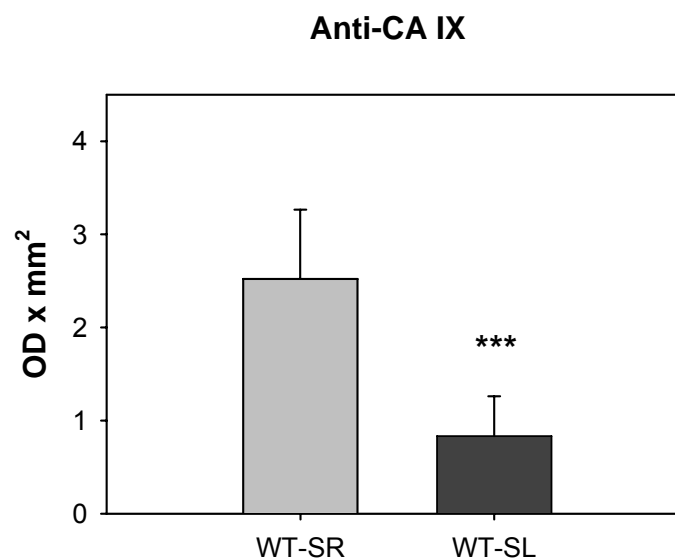


Abb. 18: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der ausgewerteten Banden der *Western Blots* der Carboanhydrase IX von Membranvesikelfraktionen des SR und des SL mit gleichen Mengen an Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität. WT-SR: n=8, WT-SL: n=8 *** = $P < 0,001$

In Abb. 18 ist dargestellt, welchen Anteil die CA IX im SR und im SL an Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität besitzt. Der SL-Anteil der CA IX ist signifikant verschieden ($P < 0,001$) zum Anteil des SR. Der Mittelwert der SR-Werte wurde auf 100% gesetzt. Dabei ergibt sich ein Anteil für die SL-Werte von 33%.

Um herauszufinden, wie der Anteil der CA IX in Muskelfasern von WT- Mäusen im Vergleich zu Muskelfasern von CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen ist, werden Membranvesikelfraktionen von WT-SR- und CA IV / CA XIV *ko*-SR und von WT-SL und CA IV / CA XIV *ko*-SL im *Western Blot* analysiert. Um einen

direkten Vergleich zu erreichen, werden jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen.

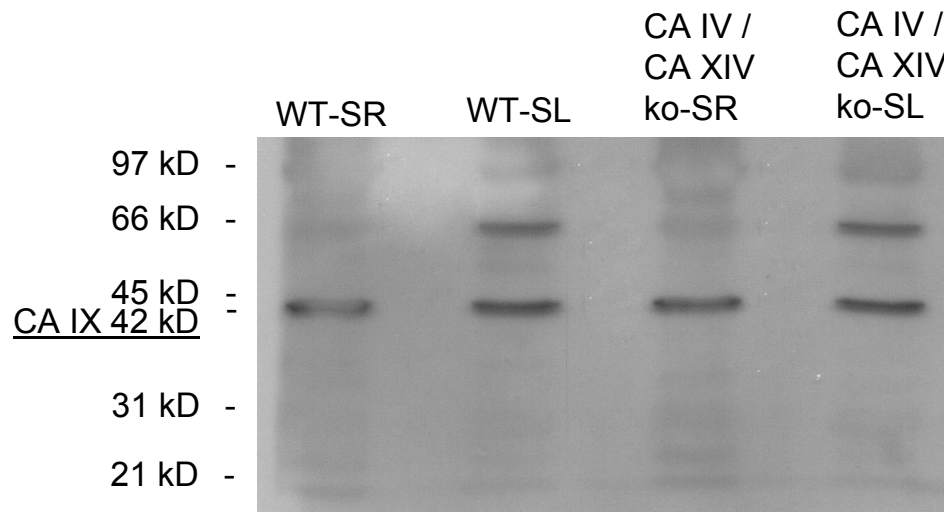


Abb. 19: *Western Blot* der Carboanhydrase IX von Membranvesikelfractionen des SR und des SL aus WT- und CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen. Das CA IX-Protein (42 kDa) ist sowohl im SR und im SL in der WT-Fractionen vorhanden, als auch im SR und SL der CA IV / CA XIV-*ko* Fractionen. Aufgetragen sind 28,7 µg bzw. 28,4 µg SR und 19,2 µg und 17,7 µg Protein, also nicht ganz genau vergleichbare Mengen.

Verglichen werden Membranvesikelfractionen aus WT-Mäusen und CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen des SR und des SL (Abb. 19). Die CA IX wird mit dem Primär-Antikörper Anti-CA IX nachgewiesen. Es ist deutlich zu sehen, dass das Carboanhydrase IX-Protein mit einer Größe von 42 kDa sowohl im SL und im SR der Muskelzellen von WT-Mäusen vorhanden ist, als auch im SL und SR der Muskelzellen von CA IV / CA XIV-*ko*-Mäusen existiert. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die WT-SR-Fraktion beinhaltet 28,7 µg Protein, die WT-SL-Fraktion beinhaltet 19,2 µg Protein. Die CA IV / CA XIV *ko*-SR-Fraktion beinhaltet 28,4 µg Protein, die CA IV / CA XIV-*ko*-SL-Fraktion beinhaltet 17,7 µg Protein. Der Primär-Antikörper Anti-CA IX ist 1:35000 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 1 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 15 Sekunden.

4.4 Nachweis der CA XII im Western Blot

Verglichen werden Membranvesikelfraktionen aus WT- und CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen des SR und des SL. Sie werden mit dem Primär-Antikörper Anti-CA XII nachgewiesen.

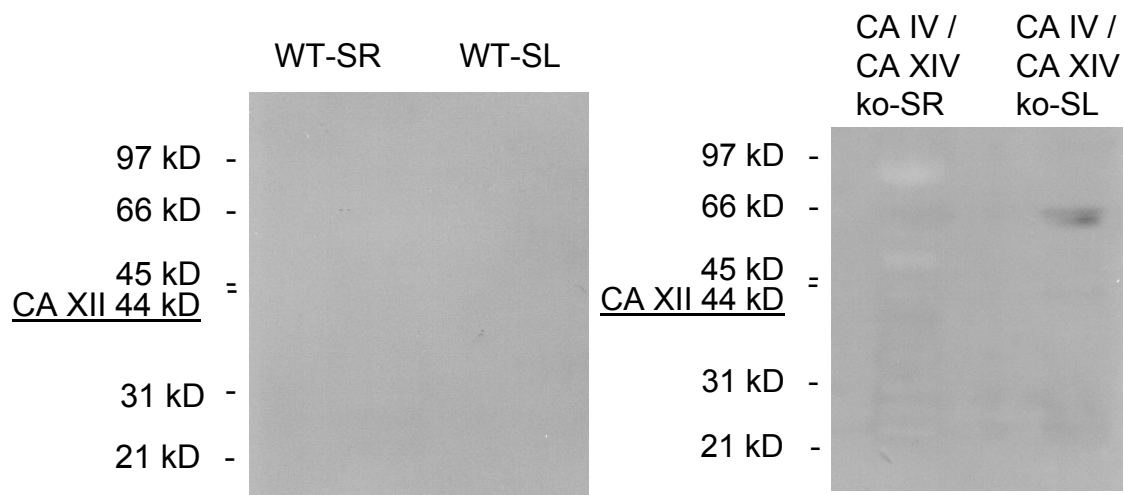


Abb. 20: Western Blot der Carboanhydrase XII von Membranvesikelfraktionen des SR und des SL aus WT-Mäusen. Das CA XII-Protein (44 kDa) ist nicht im SR und nicht im SL in der WT-Fraktion vorhanden. Aufgetragen sind gleiche Enzymmengen mit 0,025 Enzymeinheiten.

Abb. 21: Western Blot der Carboanhydrase XII von Membranvesikelfraktionen des SR und des SL aus CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen. Das CA XII-Protein (44 kDa) ist nicht im SR und nicht im SL in der CA IV / CA XIV *ko*-Fraktion vorhanden. Aufgetragen sind für das SL 5,16 µg und für das SR 42,6 µg.

Hier (Abb. 20) wurden gleiche Enzymmengen aufgetragen. Das bedeutet, dass die aufgetragenen Proteinmengen die gleiche Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität besitzen. Die Probe der WT-SR-Fraktion enthält 68,8 µg Protein, die Probe der WT-SL-Fraktion 3,93 µg Protein. Dies entspricht jeweils derselben Menge von 0,025 Enzymeinheiten in jeder Probe. Der Primär-Antikörper ist 1:3500 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 0,5 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 5 Sekunden.

In Abb. 21 enthalten die Proben der CA IV / CA XIV *ko*-SR-Fraktion 42,6 µg Protein, die CA IV / CA XIV *ko*-SL-Fraktion 5,16 µg Protein. Dies entspricht einem quantitativen Nachweis und ist nicht vergleichbar. Der Primär-Antikörper ist 1:3500 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 0,5 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 5 Sekunden.

Verglichen werden WT-SR, WT-SL sowie CA IV / CA XIV *ko*-SR und CA IV / CA XIV *ko*-SL. Es ist deutlich zu sehen, dass die 44 kD-Bande, die die CA XII darstellen soll, in keinem der Fälle vorhanden ist. Folglich existiert die CA XII weder im SR noch im SL von WT- oder CA IV / XIV *ko*-Mäusen.

4.5 Nachweis der CA XIV im Western Blot

Verglichen werden Membranvesikelfraktionen aus WT-Mäusen des SR und des SL. Sie werden mit dem Primär-Antikörper Anti-CA IV nachgewiesen.

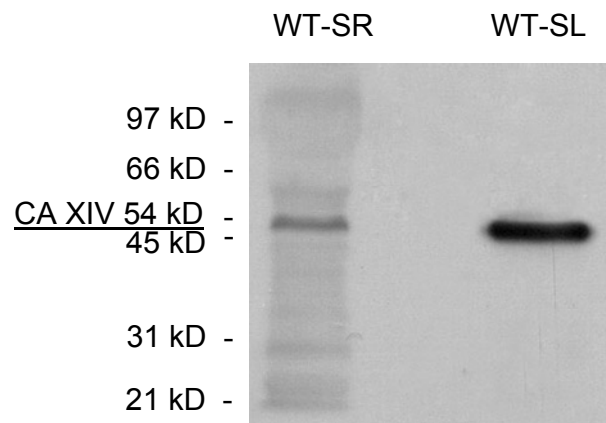


Abb. 22: *Western Blot* der Carboanhydrase XIV von Membranvesikelfraktionen aus WT-Mäusen des SR und des SL. Das CA XIV-Protein (54 kDa) ist sowohl im SR als auch im SL in der WT-Fraktion vorhanden. Aufgetragen sind gleiche Enzymmengen mit 0,033 Enzymeinheiten.

Verglichen werden Membranvesikelfraktionen aus WT-Mäusen des SR und des SL. Die CA XIV wird mit dem Primär-Antikörper Anti-CA XIV nachgewiesen. In Abb. 22 ist deutlich zu sehen, dass das Carboanhydrase XIV-Protein mit einer Größe von 54 kDa sowohl im SR als auch im SL der Muskelzellen von WT-Mäusen vorhanden ist. Es wurden gleiche Enzymmengen aufgetragen. Das heißt, dass die aufgetragenen Proteinmengen die gleiche Gesamt-Carboanhydrase-Aktivitäts-Menge besitzen. Die Probe der SR-Fraktion enthält 71,8 µg Protein, die der SL-Fraktion 6,4 µg Protein. Dies entspricht jeweils derselben Menge von 0,033 Enzymeinheiten. Der Primär-Antikörper Anti-CA XIV ist 1:3000 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 1 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 15 Sekunden.

Da aus Abb. 22 zu erkennen ist, dass der Anteil der CA XIV an der Gesamt-Aktivität des SL größer ist als derjenige des SR, wurden mehrere gleichbehandelte *Blots* mit gleichen Enzymmengen angefertigt, gescannt, die optische Dichte der Banden bestimmt und ausgewertet. Trotz der Beobachtungen der Abb. 9 und 22, gilt, dass das SL erheblich mehr CA XIV als CA IV enthält (s. Diskussion).

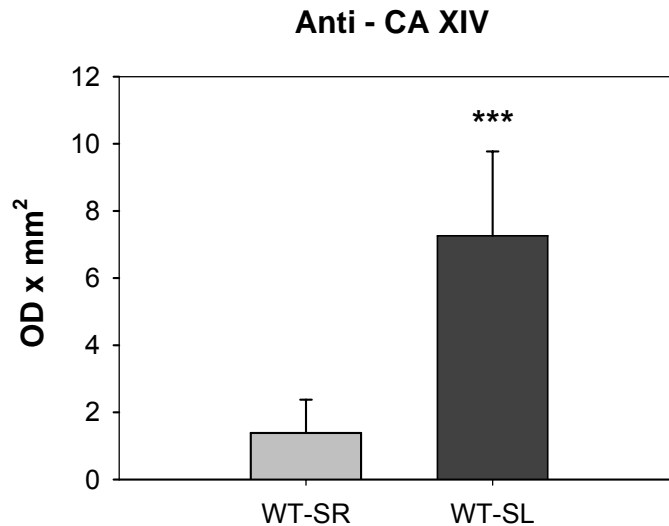


Abb. 23: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der *Western Blots* aus Membranvesikeln von WT-Mäusen, jeweils mit gleichen Mengen an Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität. Getestet wurde mit Anti-CA XIV. Jeweils $n = 7$. *** = $P < 0,001$.

In Abb. 23 ist dargestellt, welchen Anteil die CA XIV im SR und im SL an der Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität besitzt. Der der CA XIV-Anteil im SL ist signifikant verschieden ($P < 0,001$) zum Anteil im SR. Wird der Mittelwert der SL-Werte auf 100% gesetzt, so ergibt sich ein Anteil der CA XIV für das SL von 19,11%.

Um den absoluten Gehalt an CA XIV der SL- mit dem der SR-Membran vergleichen zu können, wurden, wie in Abb. 24 dargestellt, jeweils Proben gleicher Proteinmengen von WT-SR, WT-SL, CA XIV *ko*-SR und CA XIV *ko*-SL aufgetragen. Die CA XIV wird wiederum mit dem Primär-Antikörper Anti-CA XIV nachgewiesen.

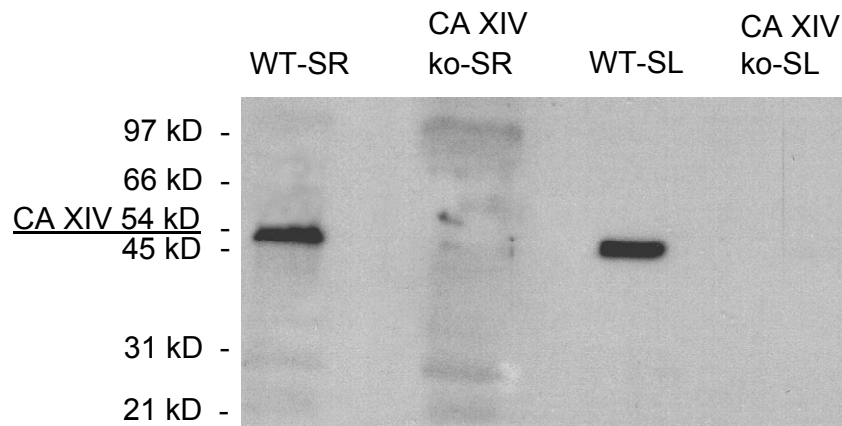


Abb. 24: *Western Blot* der Carboanhydrase XIV von Membranvesikelfractionen des SR und des SL aus WT- und CA XIV *ko*-Mäusen. Das CA XIV-Protein (54 kDa) ist sowohl im SR als auch im SL nur in der WT-Fraktion vorhanden, nicht jedoch in der CA XIV *ko*-Fraktion. Aufgetragen sind gleiche Proteinmengen mit 3,32 µg Protein für das SL und 86,1 µg für das SR.

In Abb. 24 ist deutlich zu sehen, dass das Carboanhydrase XIV-Protein mit einer Größe von 54 kDa nur im SL und im SR der Muskelzellen von WT-Mäusen vorhanden ist, nicht jedoch im SL und SR der Muskelzellen von CA XIV *ko*-Mäusen. In Abb. 24 wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die Proben der SL-Fractionen enthalten 3,32 µg und die SR-Fractionen 86,1 µg Protein. Der Primär-Antikörper Anti-CA XIV ist 1:47000 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 1 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 15 Sekunden.

Der Primär-Antikörper ist im Fall für das SR 1:2000 verdünnt, im Fall für das SL 1:3000. Der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 1 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 5 Sekunden.

Um zu prüfen, wie die Anteile der CA XIV in Muskelfasern von CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen im Vergleich zu Muskelfasern von WT-Mäusen sind, werden hier Membranvesikelfractionen von WT-SL, CA IV / CA XIV *ko*-SL, WT-SR und CA IV / CA XIV *ko*-SR im *Western Blot* analysiert. Um einen direkten Vergleich zu erreichen, werden gleiche Proteinmengen aufgetragen.

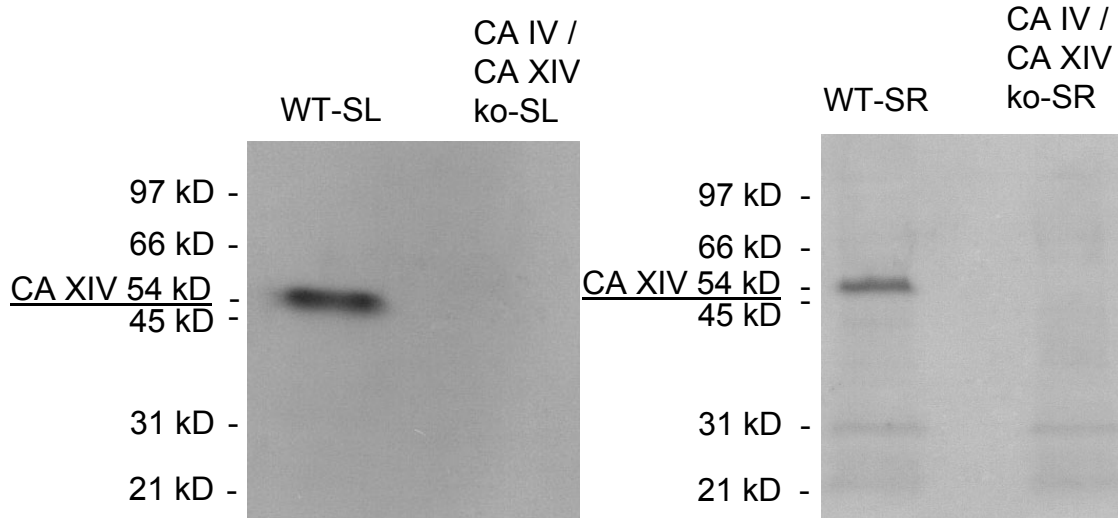


Abb. 25: *Western Blot* der CA XIV von Membranvesikelfractionen des SL CA XIV *ko*-Mäusen. Das CA XIV-Protein (54 kDa) ist nur in der WT-Fraktion vorhanden, nicht jedoch in der CA IV / CA XIV *ko*-Fraktion. Aufgetragen sind gleiche Proteinmengen mit 1,7 μ g Protein.

Abb. 26: *Western Blot* der Carboanhydrase XIV von Membranvesikelfractionen des SR aus CA XIV *ko*-Mäusen. Das CA XIV-Protein (54 kDa) ist nur in der WT-Fraktion vorhanden, nicht jedoch in der CA IV / CA XIV *ko*-Fraktion. Aufgetragen sind etwa gleiche Proteinmengen mit 41,3 μ g und 42,6 μ g Protein.

Verglichen werden Membranvesikelfractionen aus WT-Mäusen und CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen des SL (Abb. 25) und des SR (Abb. 26). Die CA XIV wird mit dem Primär-Antikörper Anti-CA XIV nachgewiesen. In Abb. 25 ist deutlich zu sehen, dass das Carboanhydrase XIV-Protein mit einer Größe von 54 kDa nur im SL der Muskelzellen von WT-Mäusen vorhanden ist, nicht jedoch im SL der Muskelzellen von CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen. Um einen direkten Vergleich zu erhalten, wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die Proben der SL-Fractionen enthielten jeweils 1,7 μ g Protein. Der Primär-Antikörper Anti-CA XIV ist 1:7000 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 0,5 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 30 Sekunden.

In Abb. 26 ist deutlich zu sehen, dass das Carboanhydrase IV-Protein mit der Größe von 54 kDa nur im SR der Muskelzellen von WT-Mäusen vorhanden ist, nicht jedoch im SR der Muskelzellen von CA IV *ko*-Mäusen. Auch hier wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die Probe der WT-SR-Fraktion enthält 41,3 μ g Protein, die der CA IV / XIV *ko*-SR-Fraktion 42,6 μ g. Der Primär-Antikörper ist 1:5600 verdünnt, der Sekundär-Antikörper besitzt eine Konzentration von 0,5 ng/ml. Die Belichtungszeit des Films beträgt 15 Sekunden.

4.6 Laktat-Versuche

Die Gruppe der WT-Mäuse dient jeweils als Kontrollgruppe. Hier sind alle Carboanhydrasen vorhanden, damit wird der am normalen Muskel stattfindende Einstrom und Ausstrom von Laktat dargestellt. In eine Muskelzelle eingestochen, nimmt die Potentialelektrode das Ruhemembranpotential der Zelle auf. Dieses verändert sich im Laufe des Versuches nicht. Dies gilt für alle Muskeltypen, auch für die *ko*-Mäuse. Die pH_i -Elektrode wird in dieselbe Muskelzelle eingestochen wie die Potentialelektrode. Sie registriert pH-Wert-Änderungen im Inneren der Zelle, die beim Laktat-Einstrom durch die per Symport hineintransportierten Protonen entstehen. Durch die Anreicherung der Protonen im Inneren der Zelle wird das Zellinnere sauer. Die pH_s -Elektrode liegt auf der Oberfläche derselben Zelle. Sie registriert die dort in entgegengesetzter Richtung ablaufenden pH-Änderungen.

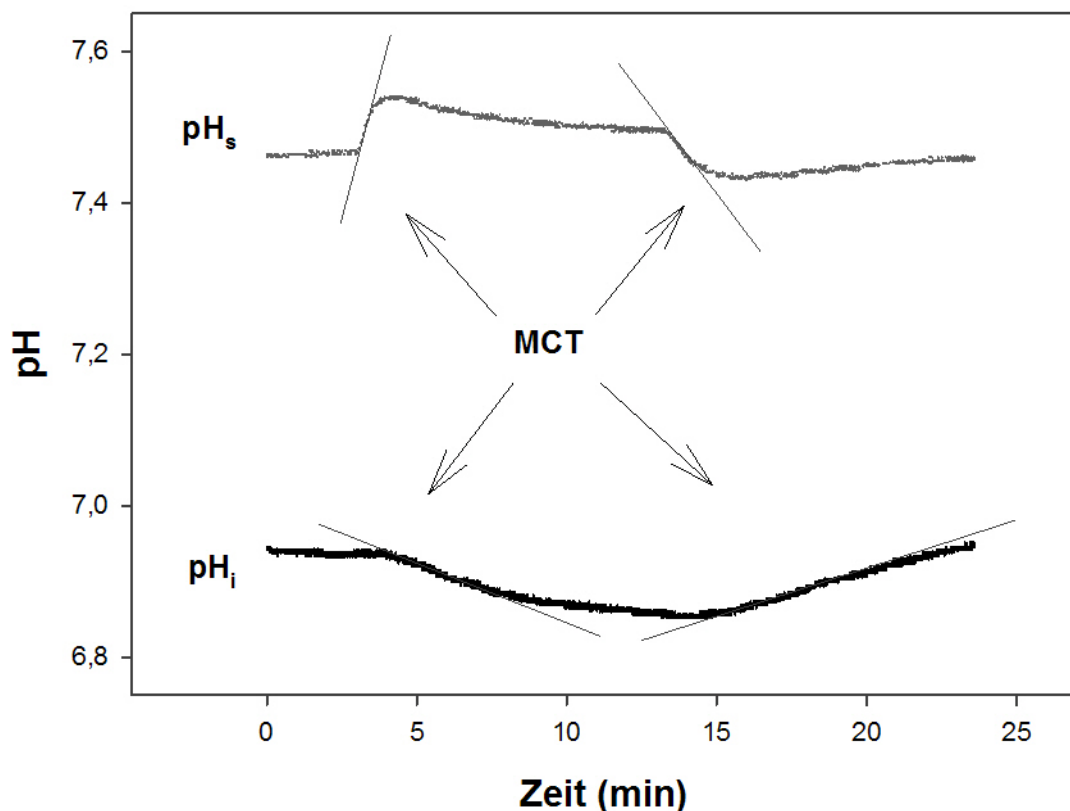


Abb. 27: Beispielhafte Darstellung der Antwort der pH_i - und pH_s -Elektrode beim Ein- und Ausstrom von Laktat bei einer Muskelzelle des *EDL* einer Wildtyp-Maus. Die Pfeile zeigen die Phasen, in denen ein MCT-vermittelter Laktat-Nettoflux erfolgt.

In Abb. 27 ist dargestellt, wie eine typische Messung während des Ein- und Ausstroms von Laktat in einer WT-Maus aussieht. Sowohl die pH_i - als auch die pH_s -Elektrode zeigen zunächst den intrazellulären Ausgangs-pH an, der sich während einer Superfusion mit einer Krebs-Henseleit-Lösung einstellt. Nach Umschalten auf eine 20 mM Laktat enthaltende Krebs-Henseleit-Lösung wird das Zellinnere, durch den MCT-vermittelten Transport von Protonen zusammen mit Laktat in die Zelle, sauer und die Zelloberfläche im *unstirred layer* alkalisch. Wenn sich nach ca. 15 Minuten intrazellulär ein Gleichgewicht eingestellt hat, wird dem Muskel das Laktat entzogen. Das bewirkt einen Transport von Protonen und Laktat durch den MCT aus der Zelle heraus. Damit wird das Zellinnere alkalisch und die Zelloberfläche im *unstirred layer* sauer (Abb. 25 rechts).

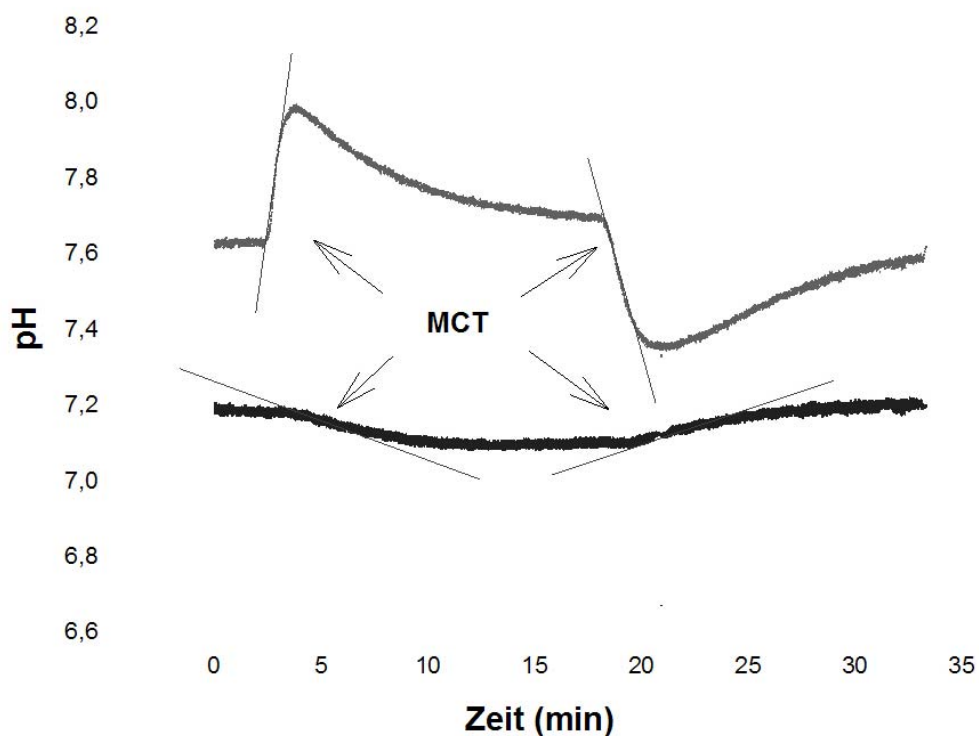


Abb. 28: Beispielhafte Darstellung der Antwort der pH_i - und pH_s -Elektrode beim Ein- und Ausstrom von Laktat an einer Muskelzelle vom *EDL* einer CA IV / CA XIV *ko*-Maus.

In Abb. 28 ist dargestellt, wie eine typische Messung während des Ein- und Ausstroms von Laktat in einer CA IV / CA XIV *ko*-Maus aussieht. Sowohl die pH_i - als auch die pH_s -Elektrode zeigen zunächst den intrazellulären Ausgangs-

pH an. Durch die Superfusion mit einer 20 mM enthaltenden Krebs-Henseleit-Lösung, wird das Zellinnere aufgrund des Transports von Protonen zusammen mit Laktat durch den MCT in die Zelle viel weniger stark sauer als in der WT-Maus und die Zelloberfläche im *unstirred layer* viel stärker alkalisch. Dies zeigt den Einfluss des Fehlens der beiden Carboanhydrasen CA IV und CA XIV. Ein ähnlicher Effekt wird ebenfalls unter Einfluss des extrazellulären Carboanhydrase-Hemmers Benzolamid erreicht.

Um den direkten Vergleich des Effekts von Benzolamid und der Kontroll-Situation an ein- und derselben Zelle zu ermöglichen, wurden die Elektroden in eine WT- Muskelfaser eingestochen. Durch einen schnellen Lösungswechsel wurde Laktat in die Zelle und auch wieder aus der Zelle herausgebracht. Danach wurde am selben Präparat Benzolamid in die Lösung ohne und in die Lösung mit Laktat gegeben. Die Elektroden waren in dieser Zeit weiterhin in derselben Muskelzelle eingestochen. Erneut wurde ein schneller Lösungswechsel von der Lösung ohne Laktat auf die Lösung mit Laktat vollzogen. So konnte überprüft werden, ob Benzolamid in ein- und derselben Muskelzelle einen vergleichbaren Einfluss erreicht. Dies wurde sowohl an Muskelfasern von Wildtyp- als auch an CA IV / CA XIV Doppel – *knockout*-Mäusen vollzogen.

4.7 pH_i vor Laktat-Einstrom im *EDL*

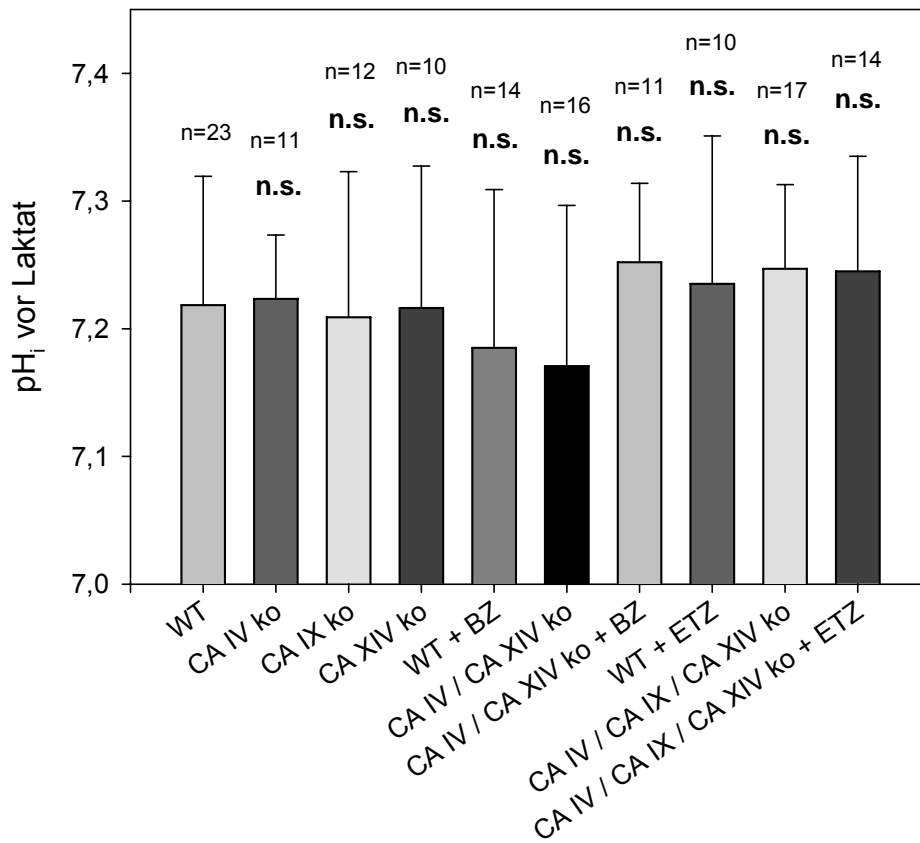


Abb. 29: Darstellung der Mittelwerte \pm SD des intrazellulären pH-Wertes vor Laktat-Einstrom in den verschiedenen Muskelfasertypen im *EDL*. WT: n=23, CA IV ko: n=11, CA IX ko: n=12, CA XIV ko: n=10, WT + BZ: n=14, CA IV / CA XIV ko: n=16, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=11, WT + ETZ: n=10, CA IV / CA IX / CA XIV ko: n=17, CA IV / CA IX / CA XIV ko + ETZ: n=14, n.s. = nicht signifikant verschieden von WT.

Um zu überprüfen, ob der intrazelluläre Ausgangs-pH bei allen Fasertypen der gleiche ist, wurde der durchschnittliche pH_i vor Laktatexposition bestimmt. Es ist ersichtlich, dass sich der Ausgangs- pH_i vor Laktat-Einstrom im *EDL* bei allen Fasertypen und auch bei Zusatz der Hemmstoffe nicht signifikant von der Wildtyp-Kontrollgruppe unterscheidet. Damit ist sichergestellt, dass der Laktat-Ein- und Ausstrom bei allen Versuchen unter gleichen Bedingungen erfolgt.

4.8 pH_i vor Laktat-Einstrom im *EDL*, Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen

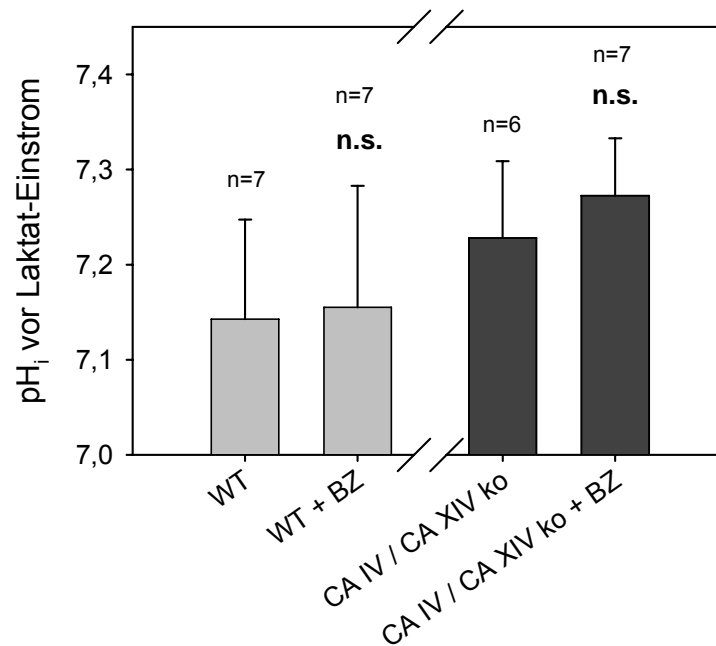


Abb. 30: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der intrazellulären pH_i -Werte vor Laktat-Einstrom in ein- und derselben Muskelzelle des *EDL*. Verglichen wird sowohl WT gegen WT + BZ, als auch CA IV / CA XIV *ko* gegen CA IV / CA XIV *ko* + BZ. WT: n=7, WT + BZ: n=7, CA IV / CA XIV *ko*: n=6, CA IV / CA XIV *ko* + BZ: n=7, n.s. = nicht signifikant verschieden vom Wert ohne BZ.

In Abb. 30 ist dargestellt, dass das Benzolamid sowohl bei Wildtyp- als auch bei CA IV / CA XIV *ko*-Fasern ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Ausgangs- pH_i hervorruft, wenn die danach erfolgenden Laktatmessungen ohne und mit Benzolamid jeweils an derselben Muskelfaser erfolgen. Das heißt, die Versuche mit und ohne Benzolamid der Abb. 30 erfolgen an derselben Zelle, während diejenigen der Abb. 29 an unterschiedlichen Zellen erfolgt sind. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass der Effekt in ein- und derselben Zelle der gleiche ist, wie bei der Messung in verschiedenen Zellen.

Aus der initialen Steigung der pH_i -Registrierung während des Einstroms bzw. des Ausstroms von Milchsäure wird die Transportrate für Milchsäure ermittelt,

indem die initiale Steigung (dpH/min) mit dem totalen Pufferfaktor multipliziert wird. Diese Produkte werden dann als Fluxe bezeichnet.

4.9 Laktat-Influx (mM/min) im *EDL*

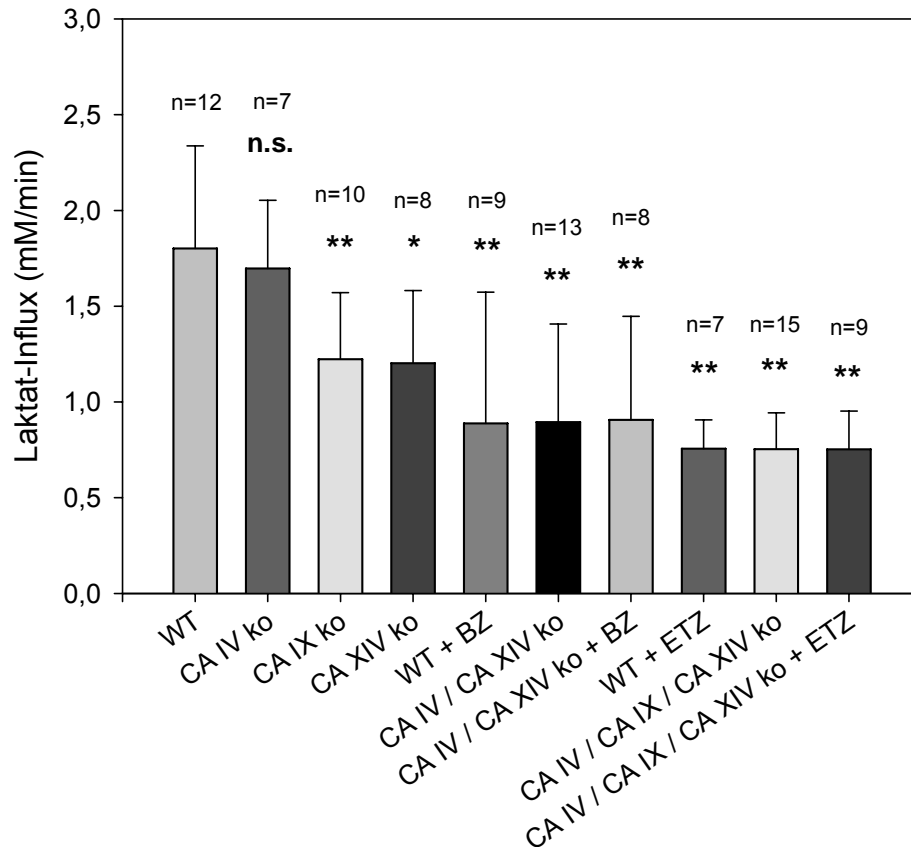


Abb. 31: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der Laktat-Influxe (mM/min) in *EDL*-Muskel Fasern der verschiedenen Mäustämme: WT: n=12, CA IV ko: n=7, CA IX ko: n=10, CA XIV ko: n=8, WT + BZ: n=9, CA IV / CA XIV ko: n=13, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=8, WT + ETZ: n=7, CA IV / CA IX / CA XIV ko: n=15, CA IV / CA IX / CA XIV ko + ETZ n=9, n.s. = nicht signifikant von WT verschieden, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$

In Abb. 31 ist zu sehen, dass sich der Laktat-Influx bei den CA IV ko-Mäusen nicht signifikant von der WT- Kontrollgruppe unterscheidet. Alle anderen Gruppen sind signifikant verschieden von der WT- Gruppe. Die CA IX ko- und CA XIV ko-Mäuse vermindern den Laktat Influx um 1/3, die WT + BZ-, CA IV / CA XIV ko-, CA IV / CA XIV ko + BZ-, WT + ETZ-, CA IV / CA IX / CA XIV ko- und CA IV / CA IX / CA XIV ko + ETZ- Gruppen reduzieren den Laktat-Influx

etwa um die Hälfte, wobei die drei zuletzt genannten Gruppen noch etwas unter den zuvor genannten liegen.

4.10 Laktat-Influx (mM/min) im *EDL*, Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen

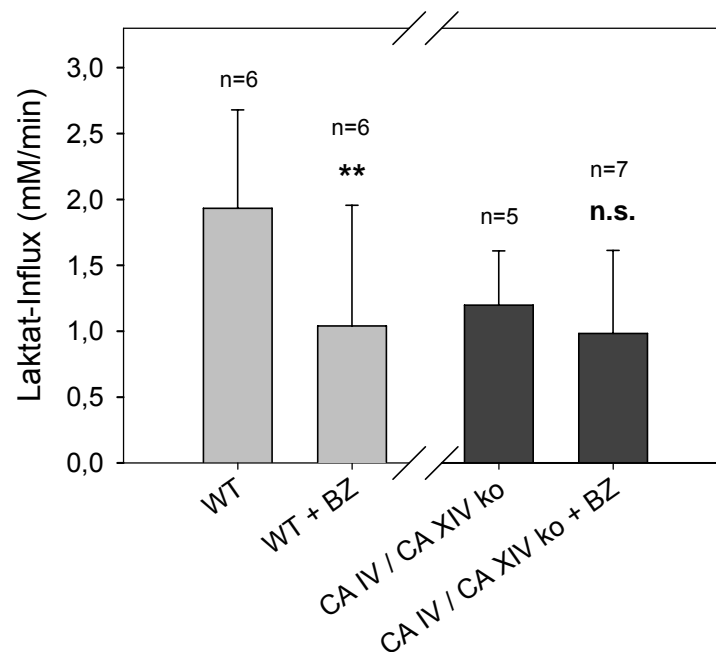


Abb. 32: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der Laktat-Influxe, gemessen jeweils in ein- und derselben Muskelzelle des *EDL*. Verglichen wird sowohl WT gegen WT + BZ, als auch CA IV / CA XIV ko gegen CA IV / CA XIV ko + BZ. WT: n=6, WT + BZ: n=6, CA IV / CA XIV ko: n=5, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=7, n.s. = nicht signifikant verschieden vom Wert ohne BZ, ** = $P < 0,01$.

Hier sind die Laktat-Influxe im *EDL*, jeweils in ein- und derselben Zelle gemessen, dargestellt. Es wird deutlich, dass sich die Gruppe WT + BZ signifikant von der WT- Gruppe unterscheidet, wohingegen die CA IV / CA XIV ko + BZ-Gruppe nicht signifikant verschieden zur CA IV / CA XIV ko-Gruppe ist. Somit stimmen die Messungen mit den an verschiedenen Muskelzellen durchgeführten überein.

4.11 Laktat-Efflux (mM/min) im EDL

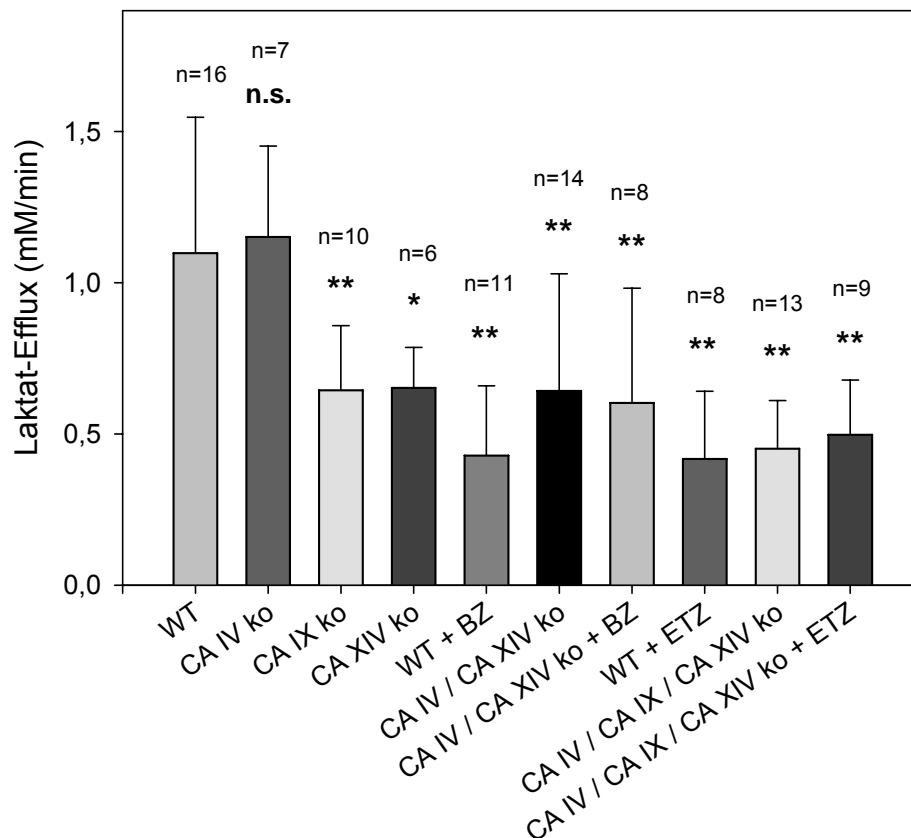


Abb. 33: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der Laktat-Efflux (mM/min) an EDL der verschiedenen Mausstämme: WT: n=16, CA IV ko: n=7, CA IX ko: n=10, CA XIV ko: n=6, WT + BZ: n=11, CA IV / CA XIV ko: n=14, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=8, WT + ETZ: n=8, CA IV / CA IX / CA XIV ko: n=13, CA IV / CA IX / CA XIV ko + ETZ n=9, n.s. = nicht signifikant verschieden von WT, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$

Die Abb. 33 zeigt, dass sich der Laktat-Efflux bei den CA IV ko-Mäusen nicht signifikant von denen der WT-Kontrollgruppe unterscheidet. Alle anderen Gruppen sind signifikant verschieden von der WT-Gruppe. Bei den CA IX ko- und CA XIV ko-Gruppen ist der Laktat-Efflux um die Hälfte vermindert. Ähnliches zeigt sich bei den WT + BZ-, CA IV / CA XIV ko-, CA IV / CA XIV ko + BZ- Gruppen, auch hier ist der Efflux etwa um die Hälfte herabgesetzt, während bei den WT + ETZ-, CA IV / CA IX / CA XIV ko- und CA IV / CA IX / CA XIV ko + ETZ- Gruppen eine kleine statistisch nicht signifikante zusätzliche Reduktion zu sehen ist. Insgesamt ist der Efflux in allen Gruppen deutlich geringer als der Influx, bei den WT-Versuchen etwa halb so groß wie die Influxe.

4.12 Laktat-Efflux (mM/min) im *EDL*, Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen

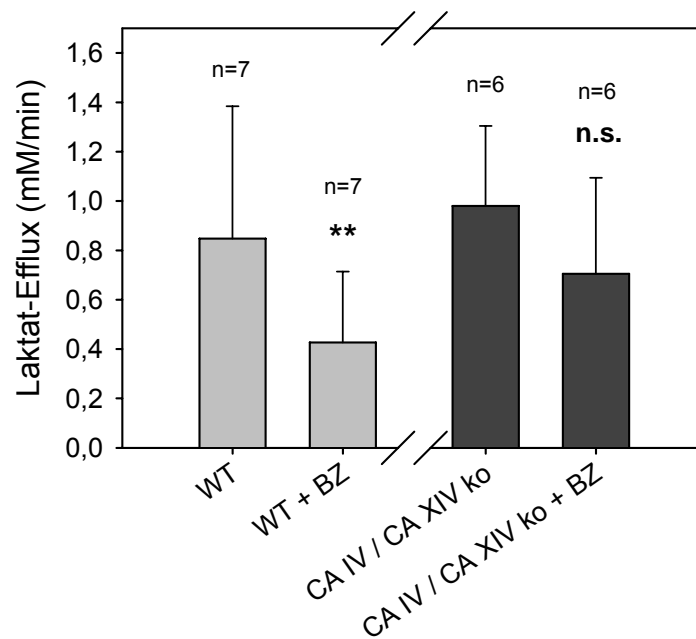


Abb. 34: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der Laktat-Effluxen, jeweils gemessen in ein- und derselben Muskelzelle des *EDL*. Verglichen wird sowohl WT gegen WT + BZ, als auch CA IV / CA XIV ko gegen CA IV / CA XIV ko + BZ. WT: n=7 WT + BZ: n=7, CA IV / CA XIV ko: n=6, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=6, n.s. = nicht signifikant, ** = $P < 0,01$

Hier sind die Laktat-Effluxen im *EDL*, jeweils gemessen in ein- und derselben Zelle, dargestellt. Es wird deutlich, dass sich die Gruppe WT + BZ signifikant von der WT-Gruppe unterscheidet, wohingegen die CA IV / CA XIV ko + BZ-Gruppe nicht signifikant verschieden zur CA IV / CA XIV ko-Gruppe ist. Somit stimmen die Messungen mit denen der Abb. 33, die aus verschiedenen Muskelzellen erhalten wurden, überein.

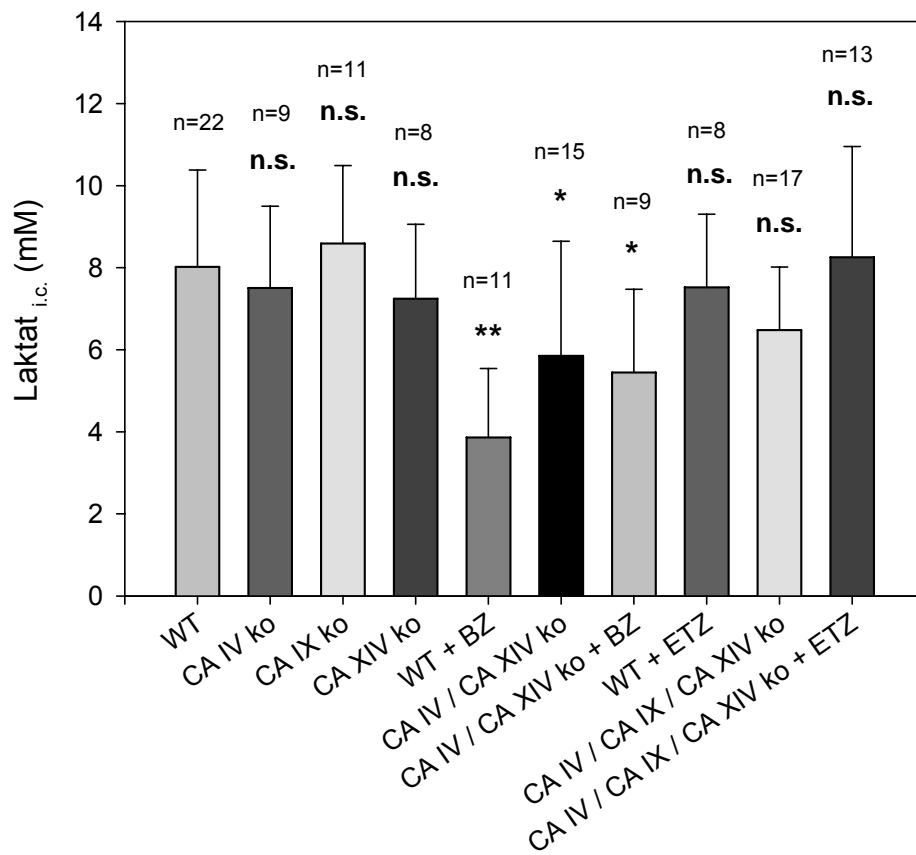
4.13 Laktat_{i.c.} (mM) im *EDL*

Abb. 35 Darstellung der Mittelwerte \pm SD der intrazellulären Laktat-Konzentrationen (mM) nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes beim Laktat-Einstrom an den *EDL*-Fasern der verschiedenen Mäusestämme. WT: n=22, CA IV ko: n=9, CA IX ko: n=11, CA XIV ko: n=8, WT + BZ: n=11, CA IV / CA XIV ko: n=15, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=9, WT + ETZ: n=8, CA IV / CA IX / CA XIV ko: n=17, CA IV / CA IX / CA XIV ko + ETZ n=13, n.s. = nicht signifikant von WT verschieden, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$

Abb. 35 zeigt die intrazellulären Laktat-Konzentrationen, die sich durch Laktat-Einstrom im *EDL* nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes eingestellt haben. Die Gruppen WT + BZ, CA IV / CA XIV ko und CA IV / CA XIV ko + BZ unterscheiden sich signifikant von der WT-Gruppe. Die anderen Gruppen sind von WT nicht signifikant verschieden. Dies bedeutet, dass die intrazelluläre Laktat-Konzentration signifikant erniedrigt ist, sobald die beiden extrazellulären Carboanhydrasen CA IV und CA XIV gleichzeitig fehlen oder gehemmt werden. Wenn alle drei Carboanhydrasen gehemmt oder nicht vorhanden sind, gibt es allerdings keinen signifikanten Unterschied mehr im Vergleich zum Wildtyp.

4.14 Laktat_{i.c.} (mM) im *EDL*, Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen

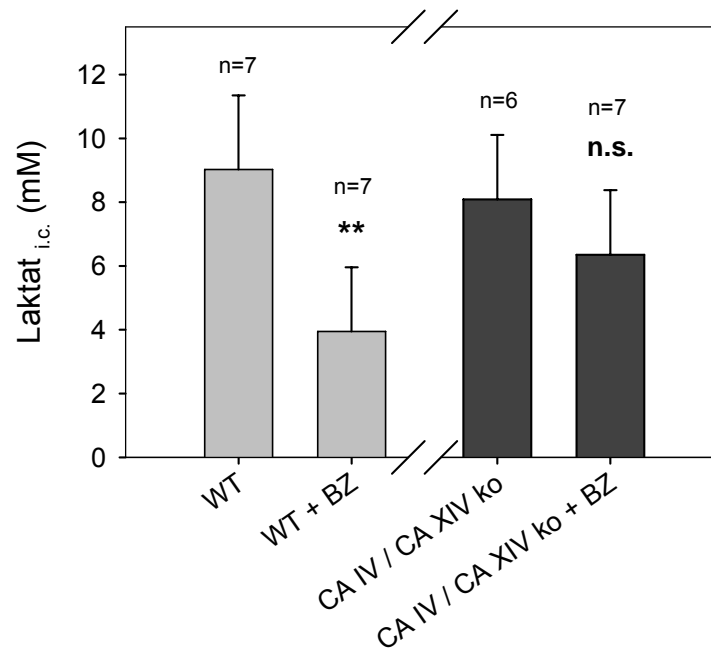


Abb 36: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der intrazellulären Laktat-Konzentrationen (mM) des *EDL* im Gleichgewichtszustand, bei Messungen ohne und mit BZ in ein- und derselben Zelle. Verglichen wird sowohl WT gegen WT + BZ, als auch CA IV / CA XIV ko gegen CA IV / CA XIV ko + BZ. WT: n=7, WT + BZ: n=7, CA IV / CA XIV ko: n=6, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=7, n.s. = nicht signifikant, ** = $P < 0,01$

Die intrazelluläre Laktat-Konzentration, wenn die Messung mit und ohne CA-Hemmer in ein- und derselben Zelle durchgeführt wird, spiegelt dieses Ergebnis ebenfalls wider. In Bezug auf die WT-Gruppe ist die Gruppe WT + BZ signifikant erniedrigt. Die Gruppen CA IV / CA XIV ko und CA IV / CA XIV ko + BZ unterscheiden sich untereinander nicht signifikant. Dieses Ergebnis bestätigt die Messungen (Abb. 35), bei denen Kontroll- und Hemmstoffversuche in verschiedenen Muskelzellen durchgeführt wurden.

4.15 dpH_s/dt des Oberflächen-pH-Transienten beim Laktat-Einstrom im EDL

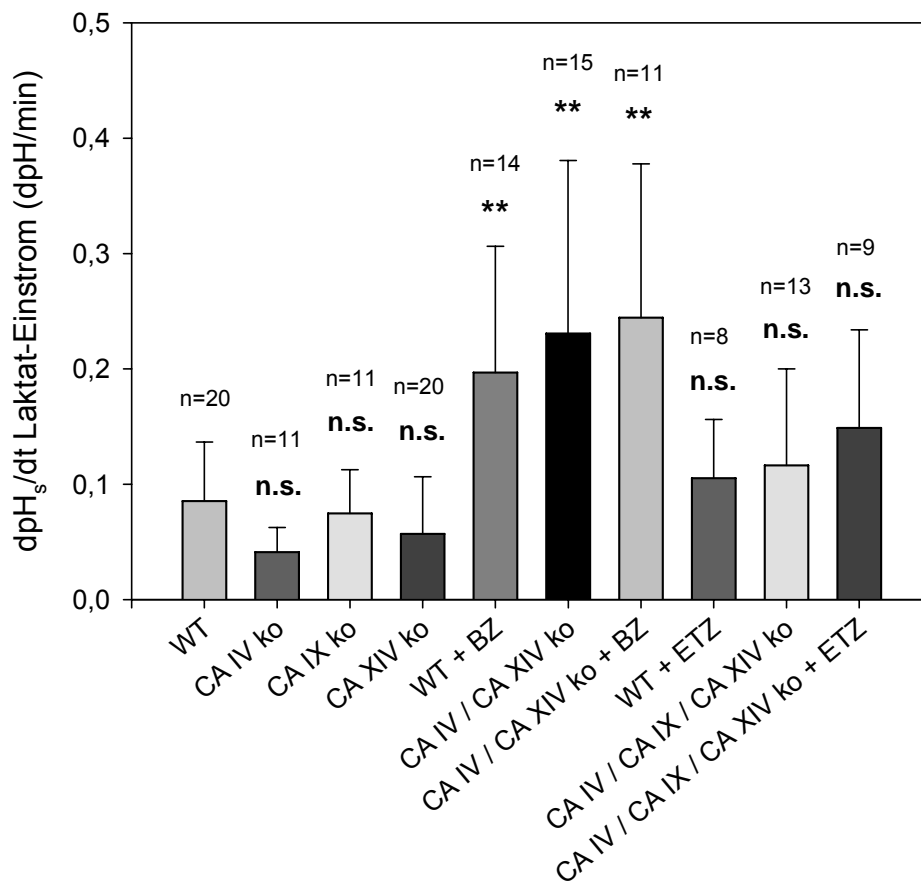


Abb. 37: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der initialen Steigung der pH_s -Transienten an der Oberfläche des EDL während des Laktat-Einstroms. WT: n=20, CA IV ko: n=11, CA IX ko: n=11, CA XIV ko: n=20, WT + BZ: n=14, CA IV / CA XIV ko: n=15, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=11, WT + ETZ: n=8, CA IV / CA IX / CA XIV ko: n=13, CA IV / CA IX / CA XIV ko + ETZ n=9, n.s. = nicht signifikant von WT verschieden, ** = $P < 0,01$

Dargestellt sind die mit der pH_s -Elektrode gemessenen initialen Steigungen bei Laktat-Einstrom im EDL. Sie spiegeln die Geschwindigkeit wider, mit der sich ein Protonen-Mangel an der Zelloberfläche entwickelt. Die Einzel-*knockout*-Gruppen CA IV ko, CA IX ko und CA XIV ko sind leicht erniedrigt im Vergleich zu der WT-Gruppe, jedoch nicht signifikant verschieden. Das gemeinsame Fehlen der sarkolemmalen Carboanhydrasen CA IV und CA XIV bewirkt eine hochsignifikante Erhöhung der initialen Steigungen der pH_s -Elektrode. Dies ist bei den drei Gruppen WT + BZ, CA IV / CA XIV ko und CA IV / CA XIV ko + BZ der Fall. Fehlen hingegen alle drei Carboanhydrasen CA IV, CA IX und CA XIV

wie bei den WT + ETZ, CA IV / CA IX / CA XIV *ko*- und CA IV / CA IX / CA XIV *ko* + ETZ- Gruppen, ist der Effekt zwar erhöht, aber nicht signifikant verschieden zur WT-Gruppe.

4.16 dpH_s/dt des Oberflächen-pH-Transienten beim Laktat-Einstrom in den *EDL*, Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen

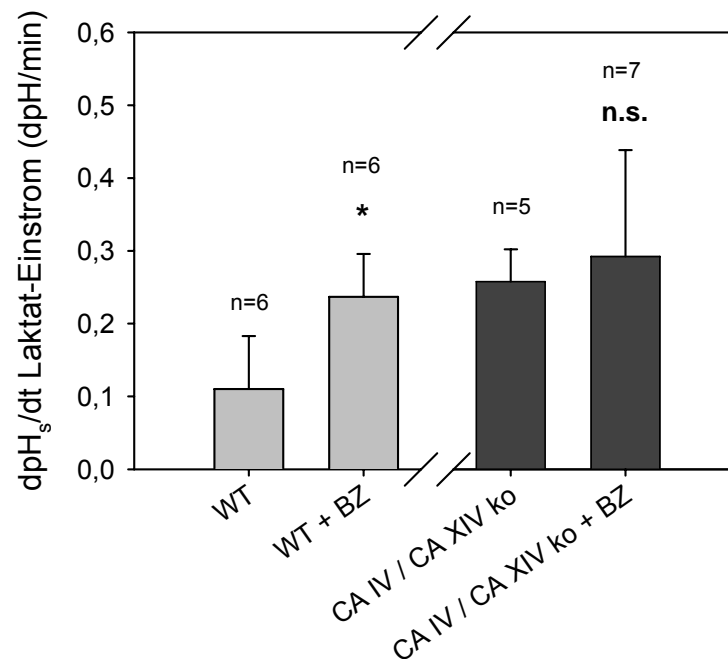


Abb. 38: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der initialen Steigungen des Oberflächen-pH-Transienten (dpH/min) bei Laktat-Einstrom in den *EDL*. Verglichen wird sowohl WT mit WT + BZ, als auch CA IV / CA XIV *ko* mit CA IV / CA XIV *ko* + BZ. WT: n=6, WT + BZ: n=6, CA IV / CA XIV *ko*: n=5, CA IV / CA XIV *ko* + BZ: n=7, n.s. = nicht signifikant verschieden von Messung ohne BZ.

In Abb. 38 sind die initialen Steigungen der Oberflächen-pH-Transienten bei Laktat-Einstrom am *EDL* dargestellt, Messung von Kontrolle und BZ an ein- und derselben Muskelzelle. Die Gruppe WT + BZ zeigt einen signifikanten erhöhten Effekt im Vergleich zur WT-Gruppe. Die Gruppen CA IV / CA XIV *ko* und CA IV / CA XIV *ko* + BZ unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Damit werden die Resultate aus Abb. 37 bestätigt.

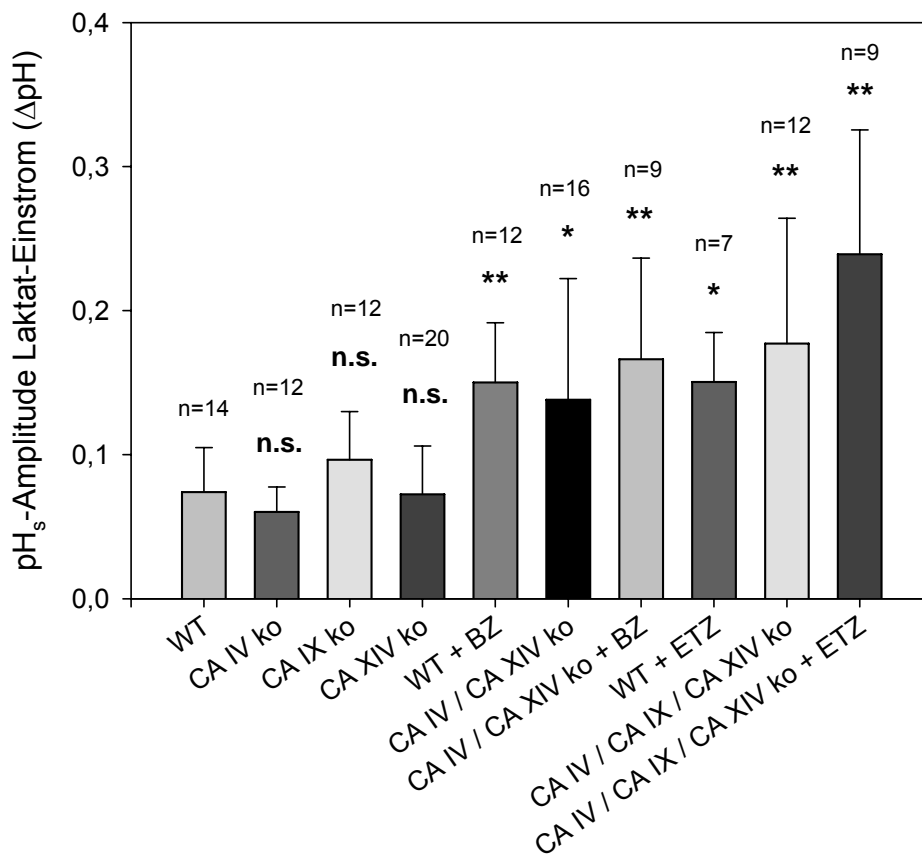
4.17 pH_s-Amplitude bei Laktat-Einstrom im *EDL*

Abb. 39: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der maximal erreichten pH_s-Amplituden (Δ pH) bei Laktat-Einstrom in den *EDL* bei Muskelfasern der verschiedenen Mausstämme. WT: n=14, CA IV ko: n=12, CA IX ko: n=12, CA XIV ko: n=20, WT + BZ: n=12, CA IV / CA XIV ko: n=16, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=9, WT + ETZ: n=7, CA IV / CA IX / CA XIV ko: n=12, CA IV / CA IX / CA XIV ko + ETZ n=9, n.s. = nicht signifikant von WT verschieden, * = P<0,05, ** = P<0,01

In Abb. 39 sind die maximalen Amplituden des Oberflächen-pH-Transienten bei Laktat-Einstrom in den *EDL* dargestellt. Sie spiegeln das Ausmaß des Protonen-Mangels an der Zelloberfläche wider. Die Einzel-*knockout*-Gruppen CA IV ko, CA IX ko und CA XIV ko sind nicht signifikant verschieden zur WT-Gruppe. Das gemeinsame Fehlen der sarkolemmalen Carboanhydrasen CA IV und CA XIV oder aller Carboanhydrasen bewirkt eine hochsignifikante Erhöhung der Amplituden der pH_s-Elektrode. Dies ist bei den Gruppen WT + BZ-, CA IV / CA XIV ko- und CA IV / CA XIV ko + BZ-, WT + ETZ-, CA IV / CA IX / CA XIV ko- und CA IV / CA IX / CA XIV ko + ETZ- Gruppen der Fall.

4.18 pH_s -Amplitude beim Laktat-Einstrom in den *EDL*, Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen

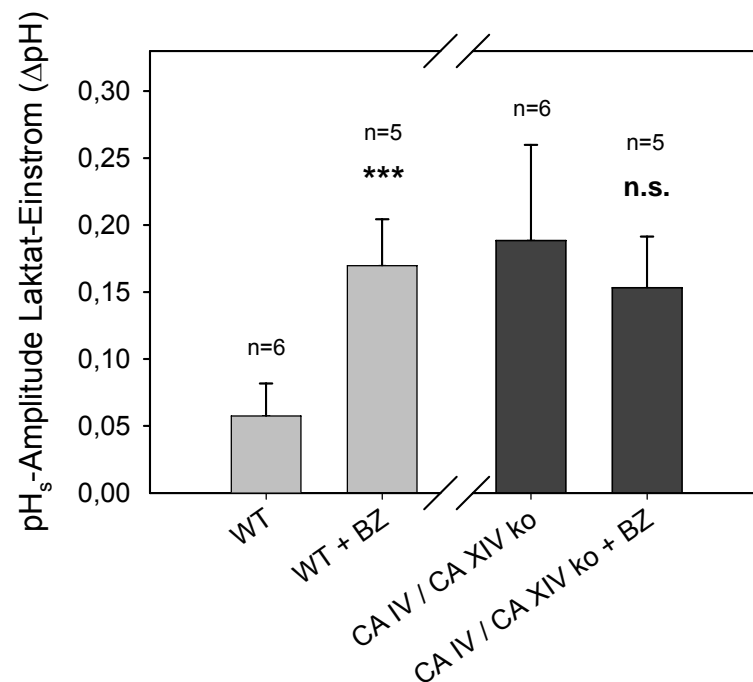


Abb. 40: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der pH_s -Amplitude (ΔpH) bei Laktat-Einstrom in den *EDL*, Wertepaar mit und ohne Hemmstoff an derselben Muskelzelle gemessen. Verglichen wird sowohl WT mit WT + BZ, als auch CA IV / CA XIV ko mit CA IV / CA XIV ko + BZ. WT: n=6, WT + BZ: n=5, CA IV / CA XIV ko: n=6, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=5, n.s. = nicht signifikant verschieden von Messwert mit BZ, *** = $P < 0,001$

In Abb. 40 sind die Amplituden der Oberflächen-pH-Transienten bei Laktat-Einstrom in den *EDL* dargestellt. Messung der Paare + und – BZ an derselben Muskelfaser. Die Gruppe WT + BZ zeigt ein signifikant erhöhtes ΔpH_s im Vergleich zur WT-Gruppe. Die Gruppen CA IV / CA XIV ko und CA IV / CA XIV ko + BZ unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Damit werden die Resultate der Abb. 39 bestätigt.

4.19 dpH_s/dt beim Laktat-Ausstrom im *EDL*

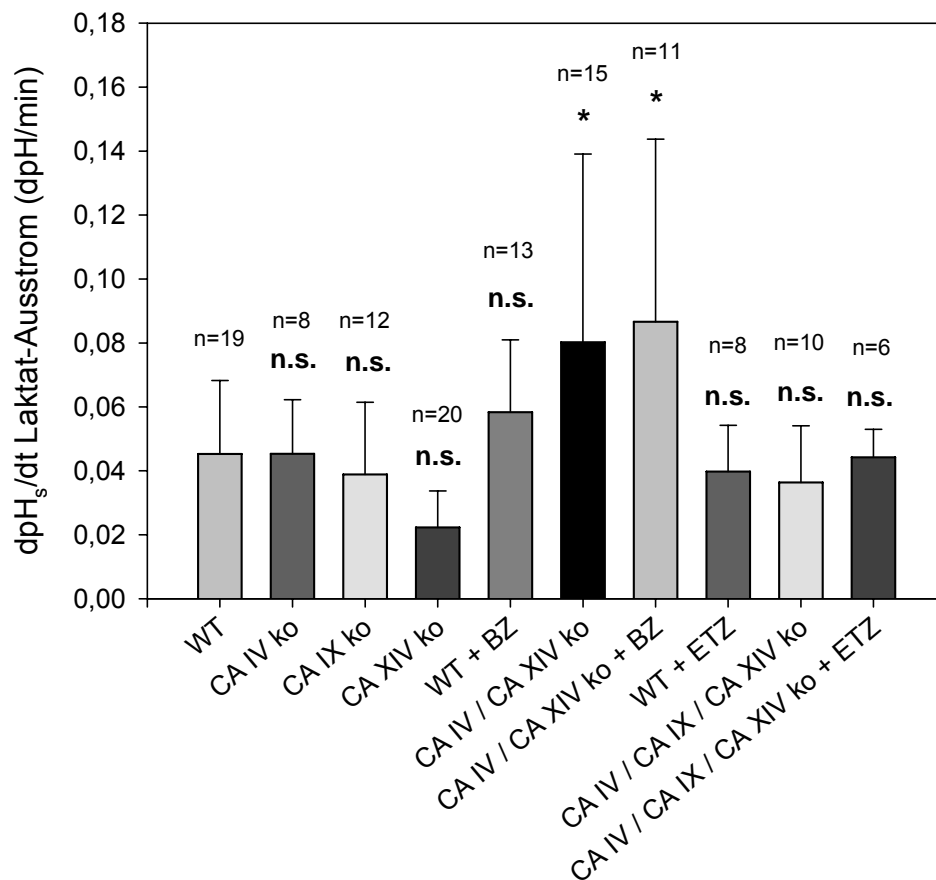


Abb. 41: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der initialen Steigung der pH_s -Elektrode (dpH/min) bei Laktat-Ausstrom der verschiedenen Muskelfasertypen im *EDL*. WT: n=19, CA IV ko: n=8, CA IX ko: n=12, CA XIV ko: n=20, WT + BZ: n=13, CA IV / CA XIV ko: n=15, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=11, WT + ETZ: n=8, CA IV / CA IX / CA XIV ko: n=10, CA IV / CA IX / CA XIV ko + ETZ: n=6, n.s. = nicht signifikant von WT verschieden, * = $P < 0,05$

Hier sind die initialen Steigungen der während des Laktat-Ausstroms aus dem *EDL* entstehenden Oberflächen-pH-Transienten dargestellt. Sie spiegeln die Geschwindigkeit wider, mit der ein Protonen-Überschuß an der Zelloberfläche eintritt. Die CA XIV ko-Gruppe ist leicht erniedrigt im Vergleich zu der WT-Gruppe, jedoch nicht signifikant verschieden. Das gemeinsame Fehlen der sarkolemmalen Carboanhydrasen CA IV und CA XIV, bewirkt eine signifikante Erhöhung der initialen Steigungen der pH_s -Elektrode. Dies gilt für die Gruppe CA IV / CA XIV ko und CA IV / CA XIV ko + BZ. Bei der Gruppe WT + BZ, bei der auch die sarkolemmalen Carboanhydrasen gehemmt sind, lässt sich trotz leichter Erhöhung kein signifikanter Effekt nachweisen. Fehlen hingegen alle drei Carboanhydrasen CA IV, CA IX und CA XIV wie bei den WT + ETZ, CA IV /

CA IX / CA XIV *ko* und CA IV / CA IX / CA XIV *ko* + ETZ- Gruppen, ist der Effekt etwa gleich dem der WT-Gruppe und damit nicht signifikant verschieden.

4.20 dpH_s/dt beim Laktat-Ausstrom im *EDL*, Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen

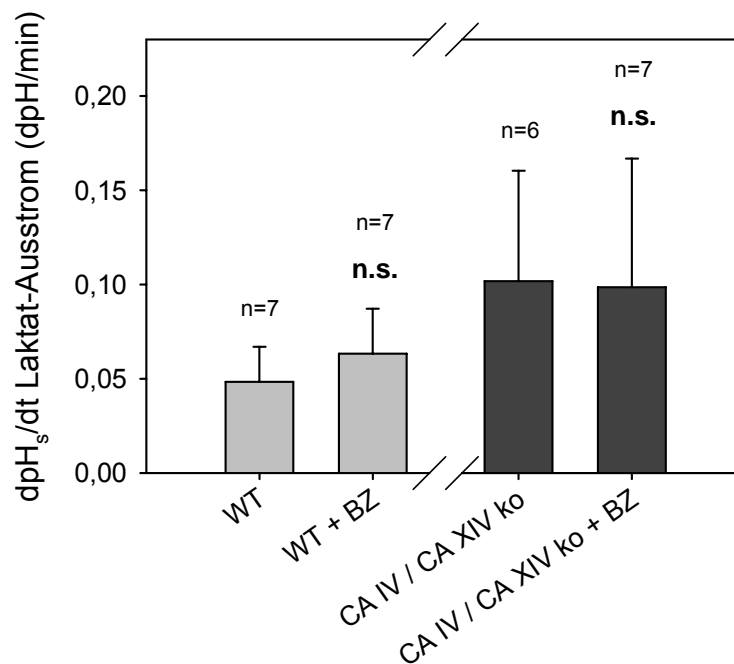


Abb. 42: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der initialen Steigung der Oberflächen-pH-Transienten bei Laktat-Ausstrom aus dem *EDL*, Messpaare \pm Hemmstoff in ein und derselben Muskelzelle. Verglichen wird sowohl WT mit WT + BZ, als auch CA IV / CA XIV *ko* mit CA IV / CA XIV *ko* + BZ. WT: n=7, WT + BZ: n=7, CA IV / CA XIV *ko*: n=6, CA IV / CA XIV *ko* + BZ: n=7, n.s. = nicht signifikant von WT ohne Hemmstoff verschieden.

In Abb. 42 sind die initialen Steigungen der Oberflächen-pH-Transienten dargestellt, die beim Laktat-Ausstrom im *EDL* entstehen. Die Messpaare \pm Benzolamid wurden jeweils an ein- und derselben Zelle erhoben. Die Gruppe WT + BZ zeigt kein signifikant erhöhtes dpH_s/dt im Vergleich zur WT-Gruppe. Die Gruppen CA IV / CA XIV *ko* und CA IV / CA XIV *ko* + BZ unterscheiden sich ebenfalls nicht voneinander. Damit werden die Resultate der Abb. 41 bestätigt.

4.21 pH_s -Amplitude beim Laktat-Ausstrom aus dem *EDL*

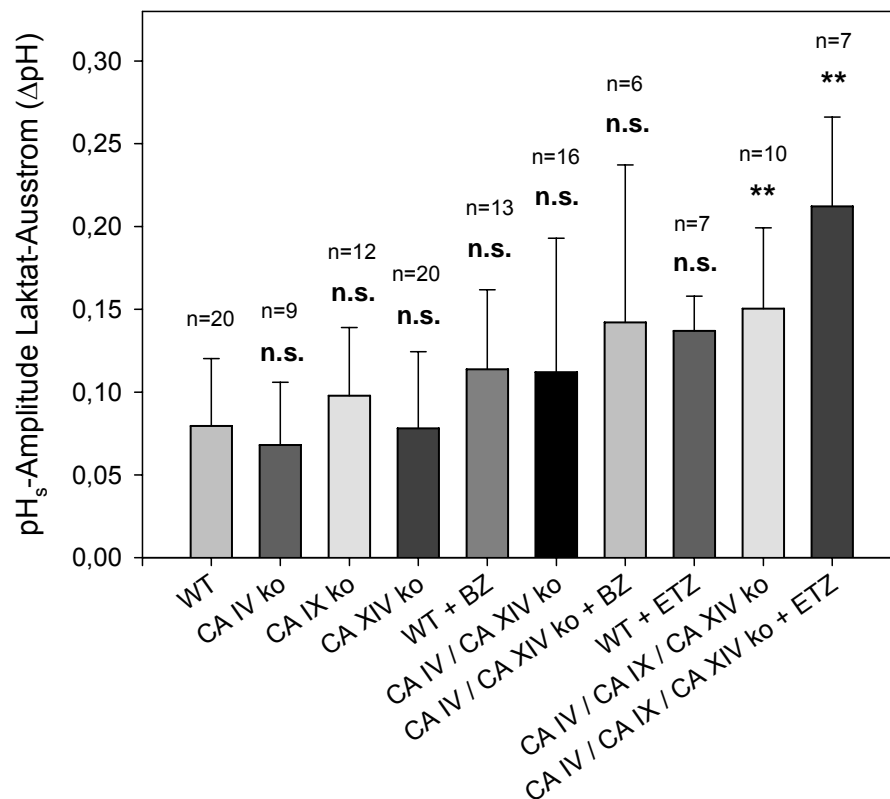


Abb. 43: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der pH_s -Amplitude (ΔpH) bei Laktat-Ausstrom aus dem *EDL* der verschiedenen Mausstämme. WT: n=20, CA IV ko: n=9, CA IX ko: n=12, CA XIV ko: n=20, WT + BZ: n=13, CA IV / CA XIV ko: n=16, CA IV / CA XIV ko + BZ: n=6, WT + ETZ: n=7, CA IV / CA IX / CA XIV ko: n=10, CA IV / CA IX / CA XIV ko + ETZ: n=7, n.s. = nicht signifikant von WT verschieden, ** = $P < 0,01$

Abb. 43 stellt die Amplituden der Oberflächen-pH-Transienten bei Laktat-Ausstrom aus dem *EDL* dar. Sie spiegeln das Ausmaß des Protonen-Überschusses an der Zelloberfläche wider. Die Einzel-*knockout*-Gruppen CA IV ko, CA IX ko und CA XIV ko sind nicht signifikant verschieden zur WT- Gruppe. Das gemeinsame Fehlen der sarkolemmalen Carboanhydrasen CA IV und CA XIV oder aller Carboanhydrasen bewirkt jedoch eine Erhöhung der Amplituden des pH_s -Transienten. Dies ist bei den Gruppen WT + BZ, CA IV / CA XIV ko und CA IV / CA XIV ko + BZ der Fall, jedoch ist dieser Effekt nicht signifikant. Die WT + ETZ-Gruppe zeigt ebenfalls einen erhöhten Effekt, aber keinen signifikanten Unterschied. Hingegen zeigen die CA IV / CA IX / CA XIV ko- und

CA IV / CA IX / CA XIV *ko* + ETZ- Gruppen, bei der alle drei Carboanhydrasen fehlen, eine hochsignifikante Erhöhung.

4.22 pH_s -Amplitude beim Laktat-Ausstrom im *EDL*, Wertepaare mit und ohne Benzolamid an derselben Muskelfaser gemessen

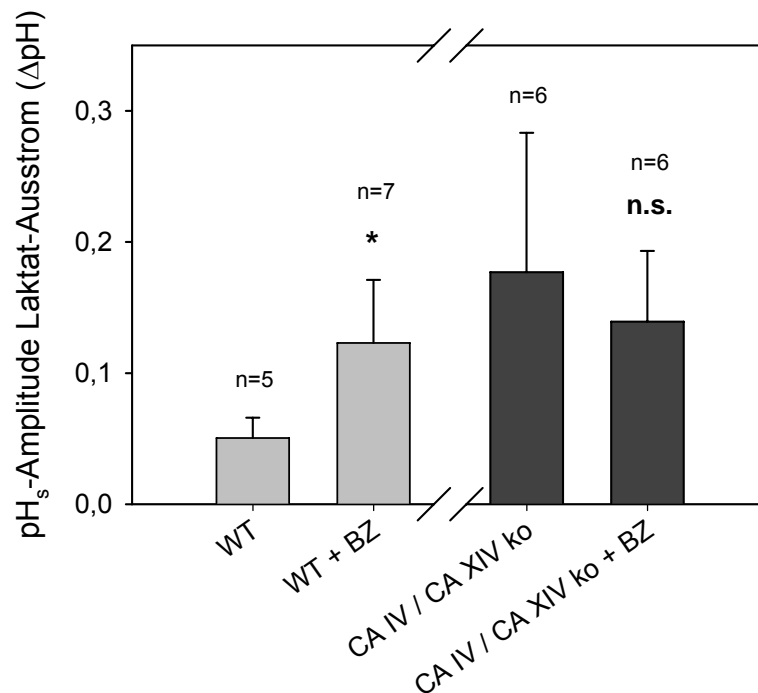


Abb. 44: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der pH_s -Amplitude (ΔpH) bei Laktat-Ausstrom aus dem *EDL*, Messungen jeweils an derselben Muskelzelle des *EDL*. Verglichen wird sowohl WT mit WT + BZ, als auch CA IV / CA XIV *ko* mit CA IV / CA XIV *ko* + BZ. WT: n=5, WT + BZ: n=7, CA IV / CA XIV *ko*: n=6, CA IV / CA XIV *ko* + BZ: n=6, n.s. = nicht signifikant von WT ohne BZ verschieden, * = $P < 0,05$

Abb. 44 zeigt die Amplituden der Oberflächen-pH-Transienten bei Laktat-Ausstrom aus dem *EDL*, Wertepaare \pm BZ an ein- und derselben Muskelzelle. Die Gruppe WT + BZ zeigt ein signifikant erhöhtes ΔpH im Vergleich zur WT-Gruppe. Die Gruppen CA IV / CA XIV *ko* und CA IV / CA XIV *ko* + BZ unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Damit werden die Resultate der Abb. 43 aus verschiedenen Muskelzellen ergänzt: Der dort nicht signifikante Unterschied zwischen WT und WT + BZ ist hier signifikant.

4.23 pH_i vor Laktat-Einstrom in Muskelfasern des *Soleus*

Um zu gewährleisten, dass die Versuche an den Muskelfasern des *Soleus* der verschiedenen Carboanhydrase *knockout*-Mäuse unter gleichen Bedingungen starten, wird hier der Ausgangs-pH in der *Soleus*-Muskelzelle dargestellt.

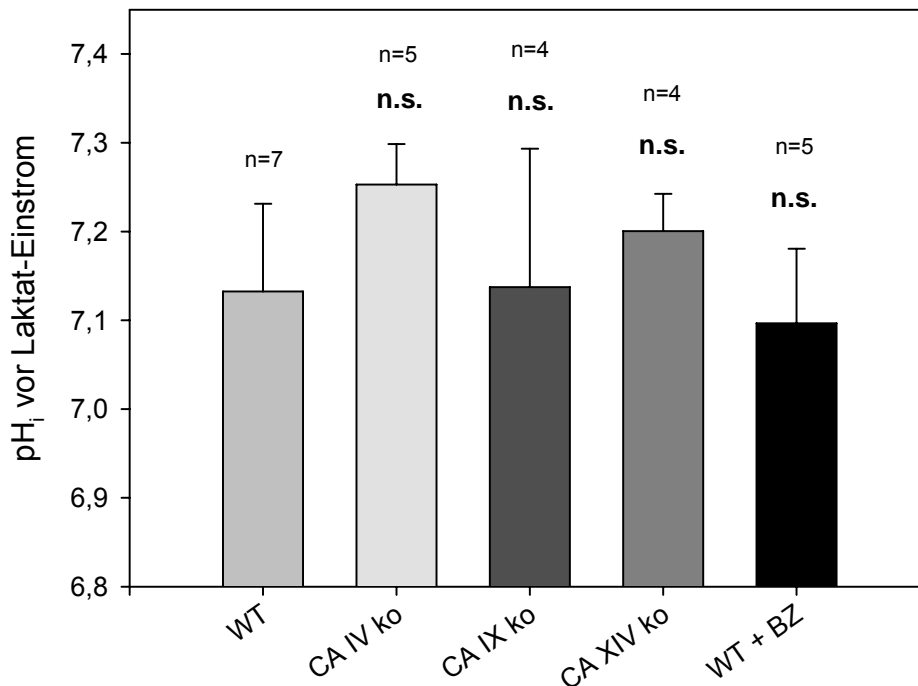


Abb. 45: Darstellung der Mittelwerte \pm SD des intrazellulären pH-Wertes vor Laktat-Einstrom an Muskelfasern des *Soleus*. WT: n=7, CA IV ko: n=5, CA IX ko: n=4, CA XIV ko: n=4, WT + BZ: n=5, n.s. = nicht signifikant von WT verschieden.

Die Muskelfasern des *Soleus* von den verschiedenen Einzel-*knockout*-Mäusen CA IV, CA IX und CA XIV und auch die WT-Fasern bei Hemmung mit Benzolamid weisen keine signifikanten Unterschiede im Ausgangs-pH vor Laktat-Exposition auf.

4.24 Laktat-Influx im *Soleus*

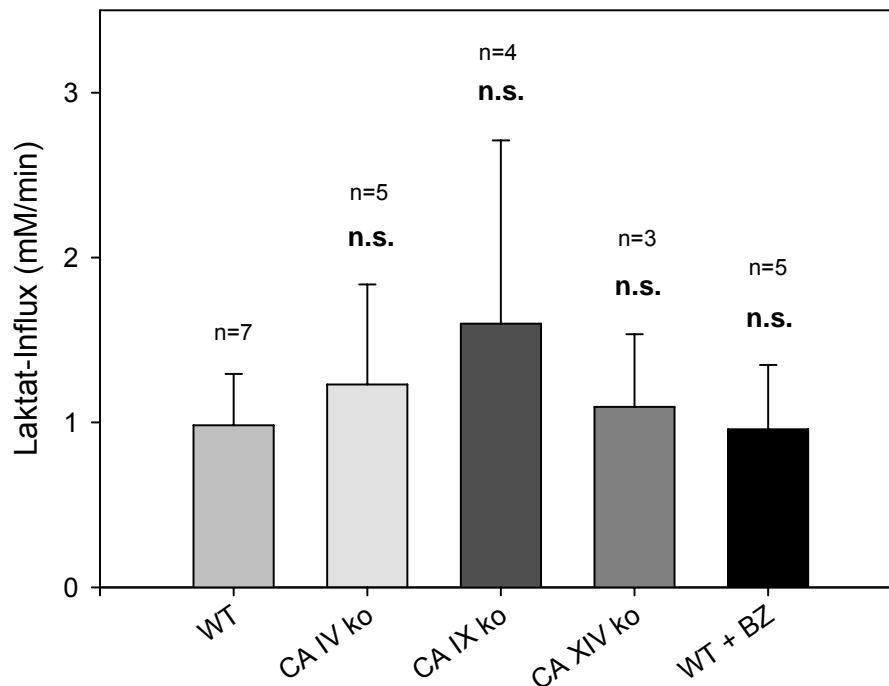


Abb. 46: Darstellung der Mittelwerte \pm SD des Laktat-Influges (mM/min) der *Soleus*-Fasern verschiedener Mausstämmen. WT: n=7, CA IV ko: n=5, CA IX ko: n=4, CA XIV ko: n=3, WT + BZ: n=5, n.s. = nicht signifikant von WT verschieden.

In Abb. 46 wird deutlich, dass Muskelfasern des *Soleus* von den Einzel-*knockout*-Mäusen CA IV, CA IX und CA XIV und sogar die Hemmung der extrazellulären sarkolemmlen Carboanhydrasen durch Benzolamid keinen signifikanten Effekt auf den Laktat-Influx im Vergleich zu Wildtyp-Muskelfasern aufweisen.

4.25 Laktat-Efflux im *Soleus*

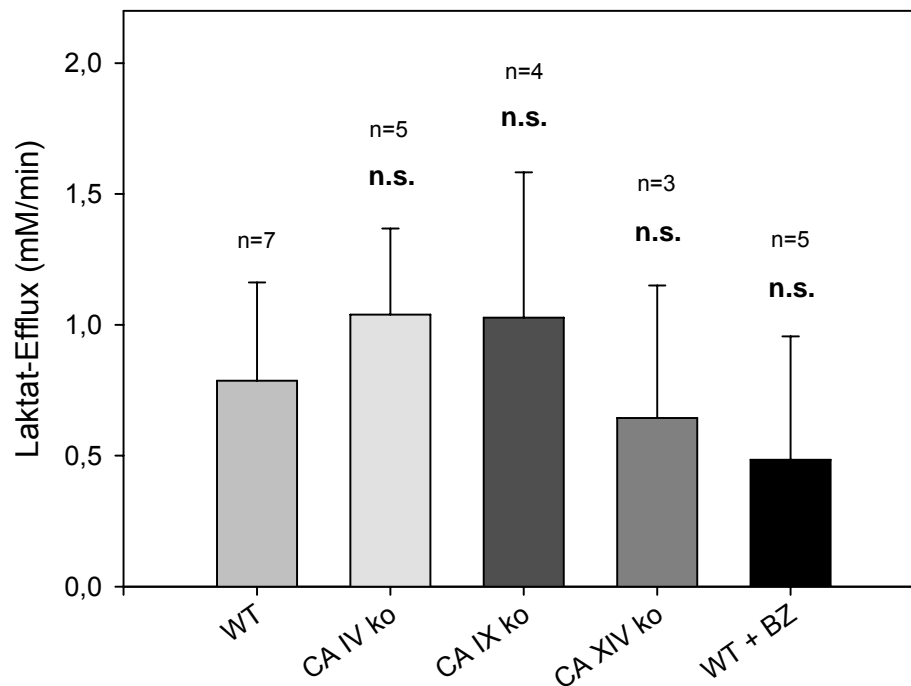


Abb 47: Darstellung der Mittelwerte \pm SD des Laktat-Effluxes am *Soleus* der verschiedenen Mausstämme. WT: n=7, CA IV ko: n=5, CA IX ko: n=4, CA XIV ko: n=3, WT + BZ: n=5, n.s. = nicht signifikant von WT verschieden.

In Abb 47. ist zu sehen, dass Muskelfasern des *Soleus* von den Einzel-*knockout*-Mäusen CA IV, CA IX und CA XIV allein keine signifikanten Unterschiede im Laktat-Efflux gegenüber Wildtyp-Mäusen zeigen. Auch die Hemmung der beiden sarkolemmalen Carboanhydrasen durch Benzolamid bewirkt keine signifikante Veränderung des Laktat-Effluxes.

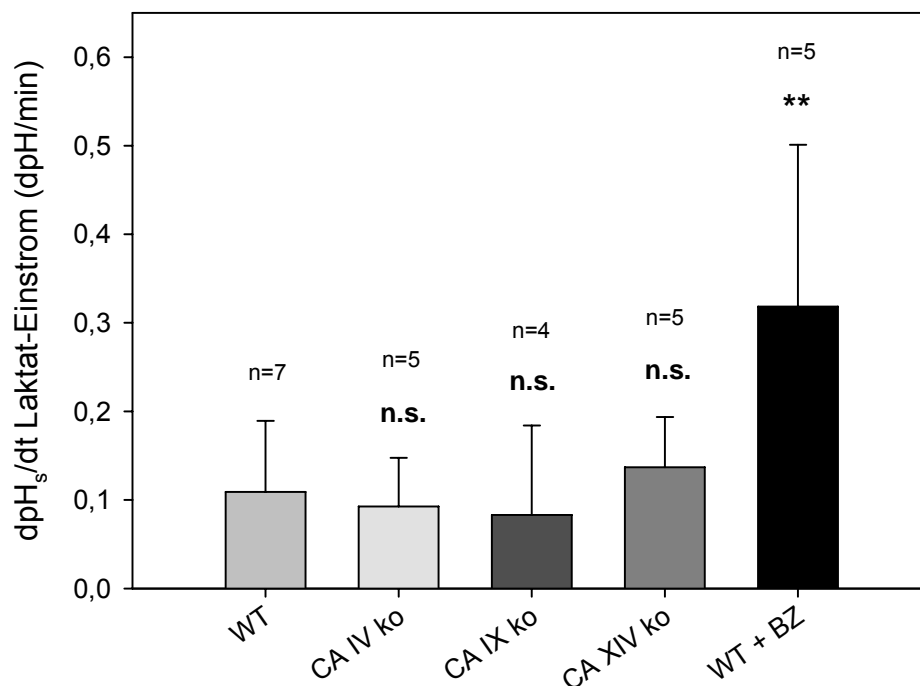
4.26 dpH_s/dt beim Laktat- Einstrom im *Soleus*

Abb. 48: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der initialen Steigung des Oberflächen- pH_s -Transienten (dpH/min) bei Laktat-Einstrom in *Soleus*-Fasern der verschiedenen Mausstämme. WT: n=7, CA IV ko: n=5, CA IX ko: n=4, CA XIV ko: n=5, WT + BZ: n=5, n.s. = nicht signifikant, * = $P < 0,05$

In Abb 48 ist zu sehen, dass Muskelfasern des *Soleus* von den Einzel-*knockout*-Mäusen CA IV, CA IX und CA XIV allein keinen signifikanten Unterschied in der initialen Steigung des Oberflächen-pH-Transienten beim Laktat-Einstrom gegenüber Wildtyp-Fasern aufweisen. Allein die Hemmung der beiden sarkolemmalen Carboanhydrasen durch Benzolamid bewirkt eine hochsignifikante Erhöhung der initialen Steigung der pH_s -Elektrode.

4.27 pH_s-Amplitude beim Laktat-Einstrom im *Soleus*

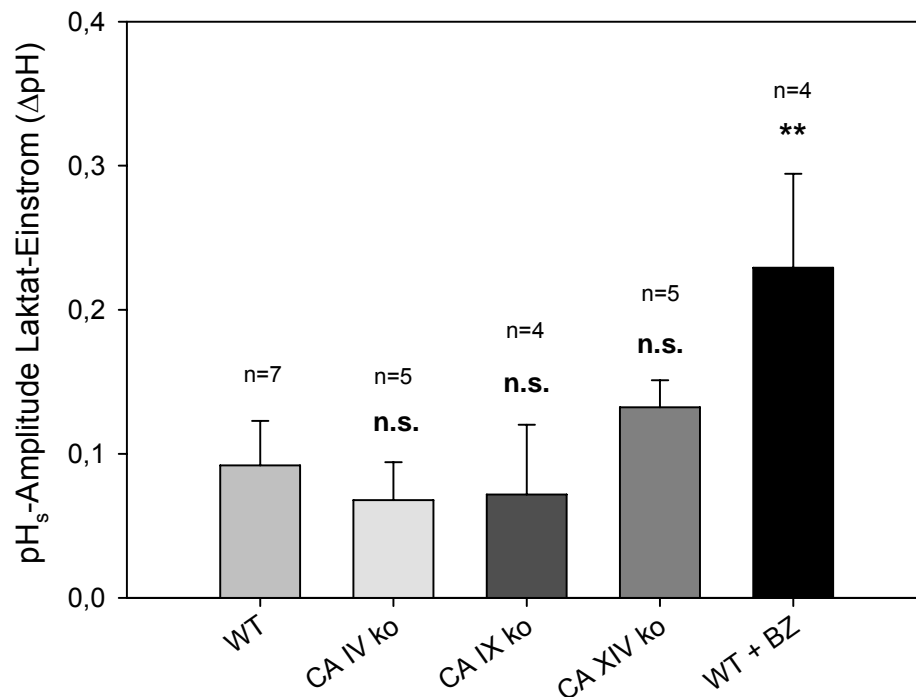


Abb. 49: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der pH_s-Amplitude bei Laktat-Einstrom in *Soleus*-Fasern von den verschiedenen Mausstämmen. WT: n=7, CA IV ko: n=5, CA IX ko: n=4, CA XIV ko: n=5, WT + BZ: n=4, n.s. = nicht signifikant verschieden von WT, ** = P<0,01

In Abb. 49 ist dargestellt, dass Muskelfasern des *Soleus* von den Einzel-*knockout* Mäusen CA IV, CA IX und CA XIV allein keinen signifikanten Unterschied in der Amplitude des pH_s-Transienten während des Laktat-Einstroms gegenüber Wildtyp-Fasern vom *Soleus* aufweisen. Allein die Hemmung der sarkolemmalen Carboanhydrasen durch Benzolamid bewirkt eine hochsignifikante Erhöhung der Amplitude der pH_s-Elektrode.

4.28 dpH_s/dt beim Laktat-Ausstrom im *Soleus*

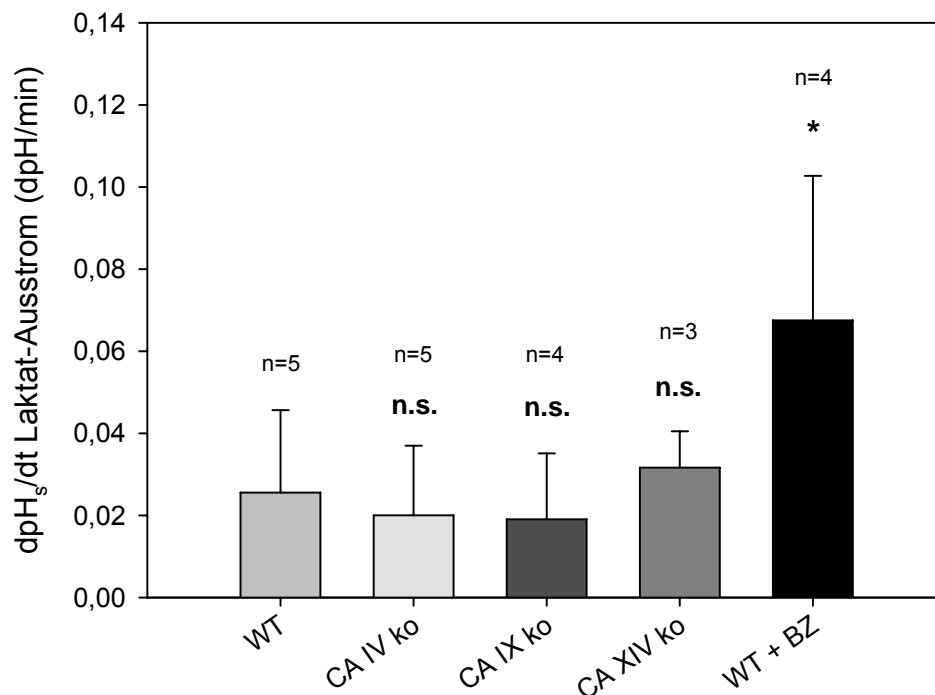


Abb. 50: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der initialen Steigung der pH_s -Transienten bei Laktat-Ausstrom aus *Soleus*-Fasern der verschiedenen Mausstämme. WT: n=5, CA IV ko: n=5, CA IX ko: n=4, CA XIV ko: n=3, WT + BZ: n=4, n.s. = nicht signifikant verschieden von WT, * = $P < 0,05$

In Abb. 50 ist zu sehen, dass Muskelfasern des *Soleus* von den Einzel-*knockout*-Mäusen CA IV, CA IX und CA XIV allein keinen signifikanten Effekt auf den initialen pH_s -Transienten Laktat-Ausstrom gegenüber WT-Muskelfasern zeigen. Nur die Hemmung der sarkolemmalen Carboanhydrasen durch Benzolamid bewirkt eine signifikante Erhöhung der initialen Steigung des pH_s -Transienten.

4.29 pH_s -Amplitude beim Laktat-Ausstrom im *Soleus*

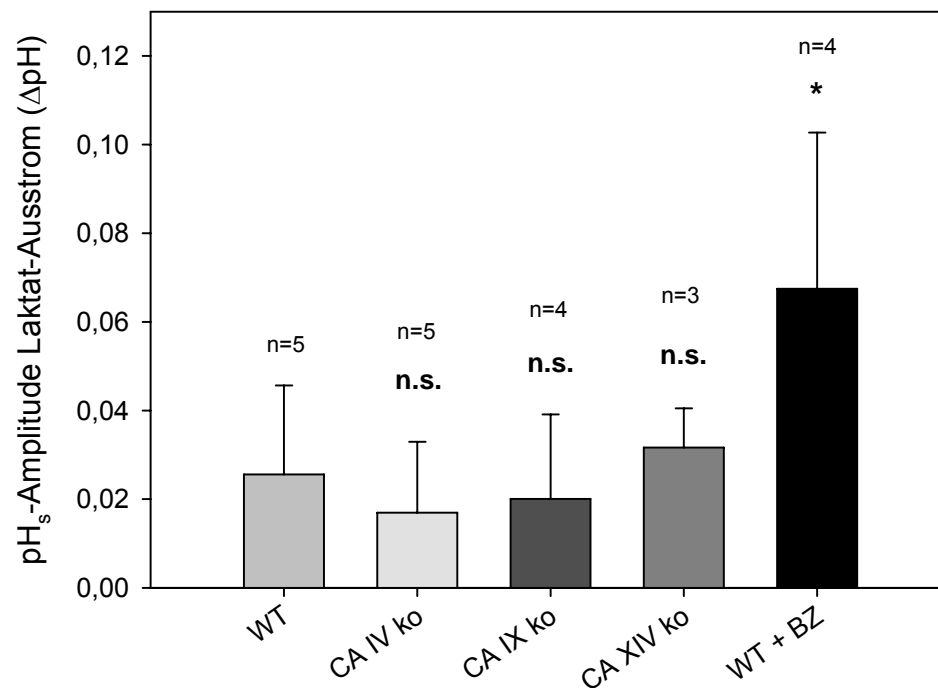


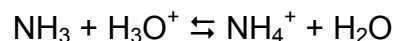
Abb. 51: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der pH_s -Amplitude bei Laktat-Ausstrom im *Soleus* der verschiedenen Mausstämme. WT: n=5, CA IV ko: n=5, CA IX ko: n=4, CA XIV ko: n=3, WT + BZ: n=4, n.s. = nicht signifikant verschieden von WT, * = $P < 0,05$.

In Abb. 51 ist zu sehen, dass Muskelfasern des *Soleus* von den Einzel-*knockout*-Mäusen CA IV, CA IX und CA XIV allein sich in der pH_s -Amplitude nicht signifikant von Wildtyp-Muskelfasern unterscheiden. Einzig die Hemmung der sarkolemmalen Carboanhydrasen durch Benzolamid bewirkt eine signifikante Erhöhung der pH_s -Amplitude.

4.30 Transportraten des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, des Na^+/H^+ - Austauschers und $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Kotransporters

Die Transportraten des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - (AE) und des Na^+/H^+ - Austauschers (NHE) sowie des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ - Kotransporters (NBC) sollen an *EDL*-Fasern von CA IV *ko*-, CA IX *ko*- und CA XIV *ko*-Mäusen bestimmt werden, um eine Aussage darüber machen zu können, inwieweit die CA IV, die CA IX bzw. die CA XIV diese Transportraten beschleunigen. Versuche an *EDL*-Fasern der WT-Mäuse bilden die Kontrollgruppe. Versuche an *EDL*-Fasern von WT-Mäusen in Anwesenheit von 10 μM Benzolamid liefern die Transportraten ohne Katalyse einer sarkolemmalen Carboanhydrase. Diese Transportraten unter Benzolamid sollten denen an *EDL*-Fasern der CA IV / XIV *ko*- bzw. CA IV / CA IX / CA XIV-*ko*-Mäusen entsprechen.

Die Muskelzelle wird künstlich alkalisiert, indem sie mit 25 mM Ammoniumsulfat exponiert wird. Das Ammonium-Ion ist die konjugierte Säure zu Ammoniak, mit dem sie ein Dissoziationsgleichgewicht bildet. Wegen der Beteiligung eines Oxonium-Ions ist dieses Gleichgewicht vom pH-Wert abhängig. Der Anteil des Ammoniaks steigt mit zunehmendem pH-Wert und steigender Temperatur.



Da Ammoniumsulfat in Lösung Ammoniak bildet, wird dieses wegen der hohen NH_3 -Gaspermeabilität schnell in den Muskel transportiert. Dort wird es wieder zu Ammonium. Der Muskel wird so künstlich alkalisiert und reguliert über seine pH-Regulations-Mechanismen den intrazellulären pH-Wert wie folgt: Um das Zellinnere wieder in die Richtung des normalen pH-Wertes zu bringen, kann der AE HCO_3^- aus der Zelle heraustransportieren. Das stellt die pH-Regulation im Anschluss an die NH_3 -Einwaschphase dar. Wird der Zelle daraufhin die Ammonium-Lösung entzogen, gelangt das Ammoniak wieder aus der Zelle heraus. Durch den vorherigen Transport von HCO_3^- aus der Zelle heraus, ist diese jetzt zu sehr azidifiziert. Für die jetzt erforderliche erneute Gegenregulation kommen gleich zwei Transporter in Betracht. Erstens transportiert der NHE Protonen im Austausch gegen Na^+ aus der Zelle heraus. Zweitens kann der NBC Na^+ gekoppelt mit HCO_3^- in die Zelle

hineintransportieren. Somit wird die Zelle wieder alkalisiert bzw. Richtung normalem pH-Wert gebracht.

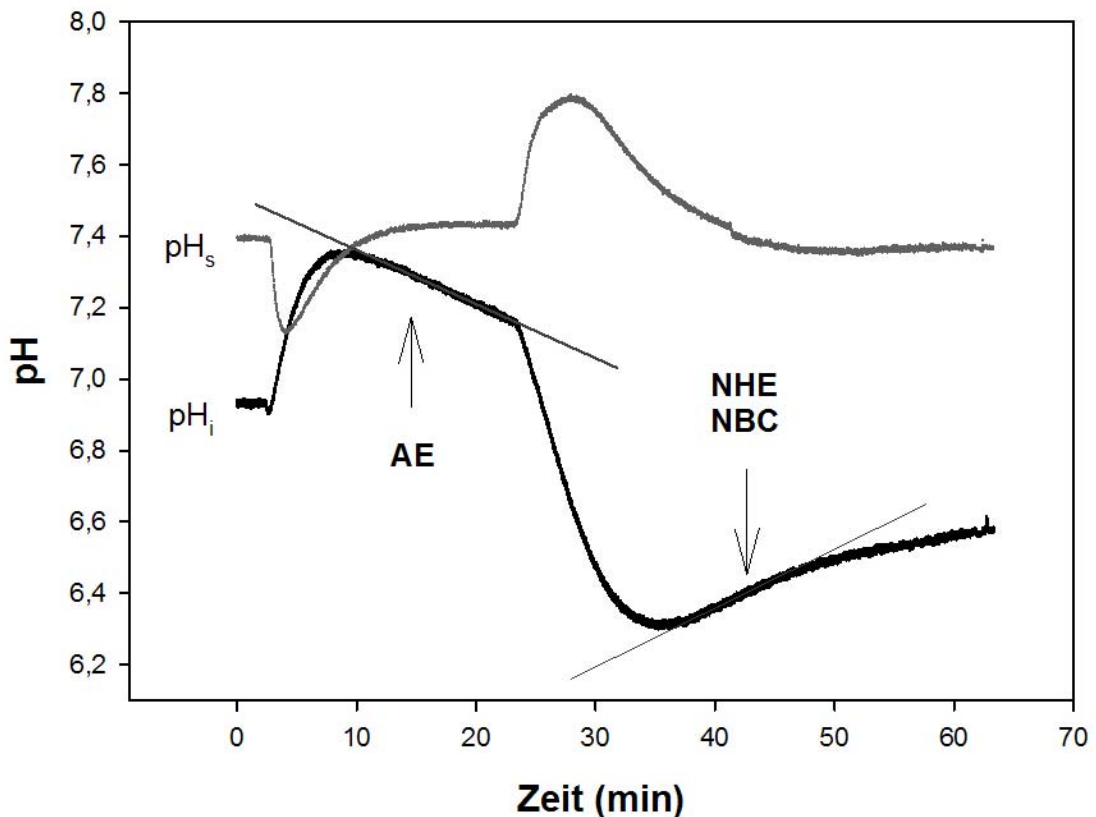


Abb. 52: Beispielhafte Darstellung einer typischen Messung am *EDL* bei Beginn und Ende der Ammoniumsulfat-Exposition

In Abb. 52 ist eine beispielhafte Messung dargestellt, die die Rolle der drei Transporter bei der Ammoniumsulfat-Exposition widerspiegelt. Die Transporter sind jeweils nicht an dem initialen Transport von Ammoniak beteiligt, sondern ausschließlich an der Gegenregulation der Zelle. Für den Heraustransport von HCO_3^- aus der Zelle nach Ammonium-Einstrom ist der *AE* verantwortlich, für den Hereintransport von HCO_3^- in die Zelle der *NBC* nach Ammonium-Ausstrom. Den Auswärtstransport von Protonen nach Ammonium-Ausstrom bewirkt der *NHE*. Anhand dieser Graphik ist sehr gut zu erkennen, wie die einzelnen Transporter wirken. Auch die pH_s -Elektrode reagiert auf die Ammoniakbewegungen genau entgegengesetzt, da sie extrazellulär in der *unstirred layer* liegt und dort den Mangel bzw. Überschuss an Protonen registriert.

4.31 dpH_i/dt bei Ammonium-Einstrom im *EDL*

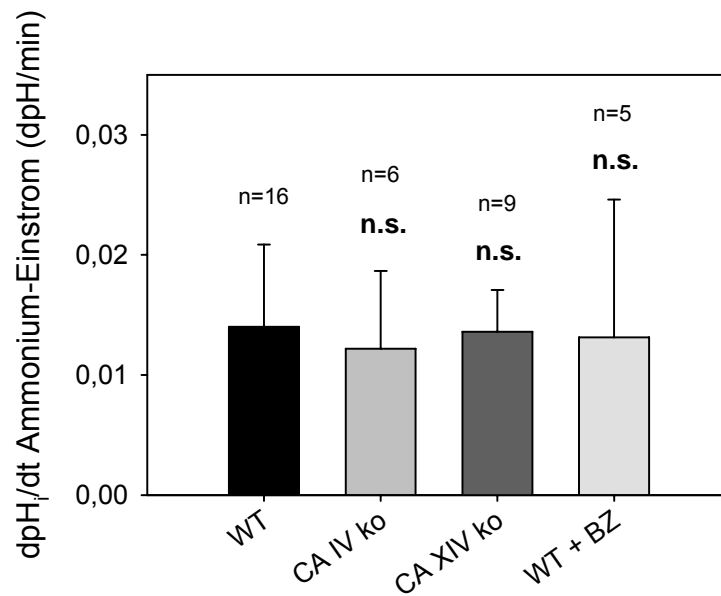


Abb. 53: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der initialen Steigung des pH_i beim Ammonium-Einstrom in *EDL*-Fasern von verschiedenen Mausstämmen. WT: n=16, CA IV ko: n=6, CA XIV ko: n=9, WT + BZ: n=5, n.s. = nicht signifikant von WT verschieden.

Hier ist dargestellt, dass die Abwesenheit sowohl von CA IV, als auch von CA XIV, als auch die Hemmung durch Benzolamid keinen nachweisbaren Effekt auf die Transportraten des AE1 aufweisen. Vielmehr sind die Transportraten nahezu identisch zu der WT-Kontrollgruppe.

4.32 dpH_i/dt beim Ammonium-Ausstrom im *EDL*

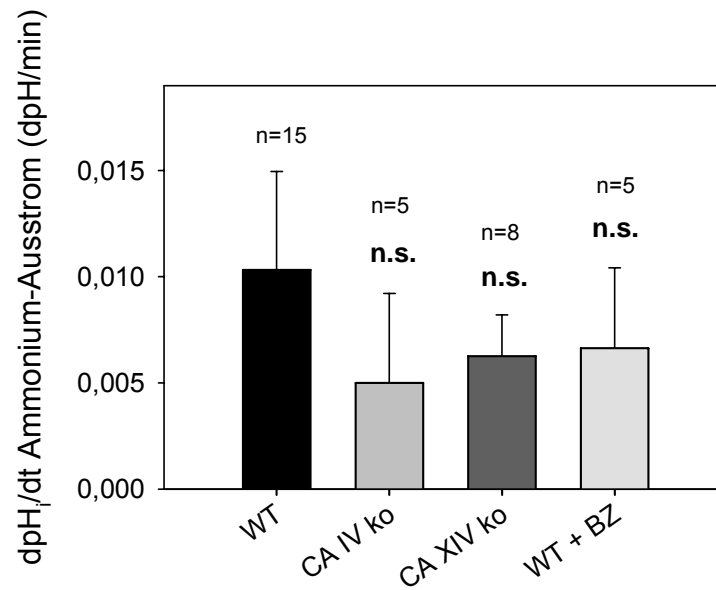


Abb. 54: Darstellung der Mittelwerte \pm SD der initialen Steigung des pH_i (dpH/min) bei Ammonium-Ausstrom aus *EDL*-Fasern verschiedener Mausstämme. WT: n=15, CA IV ko: n=5, CA XIV ko: n=8, WT + BZ: n=5, n.s. = nicht signifikant von WT verschieden.

In Abb. 54 ist dargestellt, dass Muskelfasern von CA IV und CA XIV Einzel-*knockout*-Mäusen, sowie von WT-Fasern in Anwesenheit von Benzolamid, verminderte dpH_i/dt -Werte zeigen. Sie weisen somit leicht erniedrigte Transportraten des NHE und des NBC bei der pH-Regulation auf, jedoch ist dieser Effekt nicht signifikant im Vergleich zur WT-Gruppe.

5 Diskussion

5.1 Verteilung der membrangebundenen Carboanhydrase-Isoenzyme im Skelettmuskel

In Membranvesikelfractionen, in denen die Membranen des SR angereichert sind, ist, wie schon vor längerem gezeigt wurde (Bruns *et al.*, 1986), CA-Aktivität messbar. Die *Western Blot* - Untersuchungen dieser Arbeit zeigen die Carboanhydrasen CA IV, CA IX und CA XIV in den SR- und SL-Membranvesikelfractionen, die aus Skelettmuskeln von Wildtyp-, CA IV *ko*-, CA XIV *ko*- und CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen gewonnen wurden. Die CA XII ist weder in WT- noch in CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen nachzuweisen. Damit ist belegt, dass sie im Skelettmuskel der Maus nicht vorkommt.

Zunächst seien hier die Ergebnisse immuncytochemischer Untersuchungen der membrangebundenen Carboanhydrasen IV, IX und XIV zusammengefasst (Scheibe *et al.*, 2007; Wetzel *et al.*, 2007).

	Plasmamembran	T-Tubulus / Terminales SR	Longitudinales SR
CA IV	+	+ (gering)	+
CA IX	-	+	-
CA XIV	+	-	+
MCT4	+	+	-

Tab. 1: Lokalisierung der Carboanhydrasen und des MCT4 in den subzellulären Membranen des EDL. Nach immuncytochemischen Untersuchungen im konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Scheibe *et al.*, 2007, Wetzel *et al.*, 2007).

Tab. 1 ist zu entnehmen, dass die CA IX im T-Tubulus und evtl. noch im terminalen SR lokalisiert ist, dagegen ist sie in der Oberflächenmembran als auch im longitudinalen SR abwesend. Die CA XIV ist hingegen ausschließlich im Oberflächen-SL und im longitudinalen SR zu finden, sie ist im T-Tubulus nicht vorhanden. Die CA IV ist neben dem Oberflächen-SL sowohl auf das longitudinale als auch mit sehr geringem Anteil auf das terminale SR verteilt, im T-Tubulus ist sie nicht vertreten.

Da diese Befunde für die Interpretation der folgenden biochemischen Untersuchungen (Tabellen 2-4) essentiell sind, seien sie noch einmal schlagwortartig zusammengefasst:

- 1a. CA IV findet sich in der SL-Oberflächenmembran, nicht jedoch im T-Tubulus
- 1b. CA IV findet sich ebenfalls im longitudinalen SR
- 2a. CA XIV findet sich in großem Maße in der SL-Oberflächenmembran, nicht jedoch im T-Tubulus
- 2b. CA XIV findet sich wie CA IV ebenfalls im longitudinalen SR, möglicherweise zusätzlich auch im terminalen SR
- 3a. CA IX ist im Oberflächen-SL nicht vorhanden
- 3b. CA IX findet sich vermutlich ausschließlich im T-Tubulus, allenfalls zusätzlich in geringerem Maße im terminalen SR

Tab. 2 gibt die Ergebnisse von *Western Blot*-Untersuchungen mit Antikörpern gegen die Isoenzyme CA IV, CA IX und CA XIV wieder. Die einzelnen Banden wurden mittels eines *Imaging*-Verfahrens quantifiziert und die resultierenden Größen werden in der Einheit OD x mm² angegeben.

Spalte	1	2	3	4	5	6
	SL (OD· x mm ²)	SR (OD· x mm ²)	Aufgetragene SL-Protein-Menge (µg)	Aufgetragene SR-Protein-Menge (µg)	Ratio SR-Protein / SL-Protein	SR-Wert aus Spalte 2 / Protein-Ratio in Spalte 5
CA IV	6,8	0,9	6,4	71,8	11,2	0,08
CA IX	0,8	2,5	3,84	43,1	11,2	0,22
CA XIV	7,3	1,4	6,4	71,8	11,2	0,125

Tab. 2: Ergebnisse der Quantifizierung der Banden der *Western Blots* mit Antikörpern gegen CA IV, CA IX und CA XIV. Bei den *Western Blots* waren jeweils solche Proteinmengen der SL- bzw. SR-Fractionen aufgetragen worden, so dass die CA-Aktivitätsmengen für SL und SR gleich waren. In Spalte 1 und 2 sind die Quantifizierungen der Carboanhydrase-Isoenzym-Banden in OD x mm² ausgedrückt. Es handelt sich dabei um eine Größe, die proportional zur aufgetragenen Menge des betreffenden CA-Isoenzyms ist. Die Spalten 3 und 4 geben die im Fall von SL und SR im *Western Blot* aufgetragenen Proteinmengen an, Spalte 5 gibt das Verhältnis von aufgetragenem SR-Protein zu aufgetragenem SL-Protein an. Spalte 6 gibt den

Zahlenwert für SR (aus Spalte 2) an, der erhalten worden wäre, wenn für SR die gleiche Proteinmenge wie für SL aufgetragen worden wäre, d.h. es handelt sich um den SR-Wert aus Spalte 2, dividiert durch das Proteinverhältnis SR/SL aus Spalte 5. Aus den immunocytochemischen Ergebnissen ergibt sich, dass sowohl die CA IV- als auch die CA XIV-Banden nicht nur in der SL-Membran, sondern trotz der niedrigen Werte in Spalte 6 auch im SR jeweils intrinsisch vorhandene Proteine darstellen.

Aus der Tabelle 2, Spalte 1 und 2, ist zu entnehmen, dass bei gleicher Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität in der SL- und der SR-Fraktion die CA IV und CA XIV in der SL-Fraktion ca. 5 bzw. 7,5 fach stärker als in der SR-Fraktion vertreten sind. Für die CA IX ergibt sich ein umgekehrtes Bild, sie ist unter dieser Bedingung in der SR-Fraktion ca. 3 mal so stark vorhanden wie in der SL-Fraktion. Allerdings ist dieser Vergleich auf jeweils gleiche Gesamt-Carboanhydrase-Aktivitäten von SL und SR bezogen. Um diese Gesamt-Carboanhydrase-Aktivitäten zu erhalten, war es nötig, ca. 11 mal soviel SR-Protein wie SL-Protein aufzutragen (Spalte 5). Wenn auf gleiche Proteinmengen, anstatt auf gleiche Gesamt-Carboanhydrase-Aktivitäts-Mengen, normiert wird, ergibt sich ein anderes Bild (Spalte 7): Die Carboanhydrase-Isoenzyme sind im SL sehr viel stärker vertreten als im SR; die Carboanhydrasen CA IV und CA XIV 85 mal bzw. 58 mal, und auch die CA IX ist im SL vorhanden, sie ist ca. 3,5 mal weniger stark vertreten als im SR. Daraus ergibt sich, dass auch die Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität im SL erheblich, nämlich 11,2 mal größer ist als im SR. Unter der Voraussetzung, dass beide Membranen etwa den gleichen Proteingehalt aufweisen, heißt das auch, dass die in der intakten Muskelzelle im SL vorliegenden CA-Aktivitäten um die o.g. Faktoren höher liegen als im SR.

Bei den Ergebnissen für die SR-Fraktion muß jedoch berücksichtigt werden, dass die SR-Fraktionen immer mit einem geringen Anteil von T-tubulären Membranen verunreinigt sind. Um den Grad der Kontamination zu bestimmen, wird für die jeweilige Fraktion die Aktivität spezifischer Markerproteine gemessen. Die Aktivitäten der Na^+/K^+ -ATPase stellen einen Marker für die Membran der T-Tubuli und der SL-Oberflächenmembran dar (Clausen, 2003), die Mg^{2+} -ATPase einen Marker für die Membranen der T-Tubuli, während die Aktivität Ca^{2+} -ATPase einen zuverlässigen Marker für SR-Membranen des

longitudinalen Systems darstellt. Messungen dieser Marker wurden auch für unsere Präparationen durchgeführt (Scheibe *et al.*, 2007, Wetzel *et al.*, 2007) und es ergibt sich daraus anhand der Na^+/K^+ -ATPase- und der Mg^{2+} -ATPase-Aktivität eine Kontamination der SR-Fractionen vorwiegend mit T-tubulären Membranen von zwischen 1 bis 10%. Aufgrund der genannten Marker ist zu vermuten, dass auch die hier vorliegenden SL-Präparationen eine erhebliche Kontamination mit T-Tubuli aufweisen.

Zusammen mit den bereits dargestellten Informationen zur subzellulären Lokalisation der Carboanhydrasen, führt dies zu dem Schluss, dass die beobachteten Mengen von CA IV und CA XIV im SR und im SL tatsächlich intrinsische Eigenschaften dieser beiden Membranen darstellen, da die T-Tubuli weder CA IV noch CA XIV enthalten und somit eine Kontamination mit T-tubulären Membranen keine Verfälschung dieser beiden Werte verursachen kann. Umgekehrt besteht die Möglichkeit, dass die in SL und SR gefundenen CA IX-Mengen ausschließlich durch die Kontamination beider Präparationen mit T-Tubuli zustandekommen.

Eine weitere Möglichkeit, die Verteilung der Carboanhydrasen im Skelettmuskel zu bestimmen, ist die Messung der Carboanhydrase-Aktivitäten der SL- und SR-Fractionen von Wildtyp- bzw. *knockout*-Mäusen. Dies ist mit unseren Präparationen durchgeführt worden (Scheibe *et al.*, 2007, Wetzel *et al.*, 2007). Die Tabelle 3 zeigt die jeweiligen Ergebnisse der Aktivitätsmessungen von Wildtyp, CA IV *ko*-Maus und CA IV / XIV – Doppel-*ko*-Maus.

	SL (U*ml/mg)	SR (U*ml/mg)	SL (% gesamt Aktivität)	SR (% gesamt Aktivität)
Wildtyp	6,5	0,44	100	100
CA IV Ko	4,6	0,36	71	82
CA IV / XIV dKo	1	0,25	15	57

Tab. 3: Ergebnisse der Gesamt-Carboanhydrase-Aktivitätsmessungen an SL- und SR-Präparationen von WT-, CA IV und CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen. Nach Scheibe *et al.*, 2007 und Wetzel *et al.*, 2007.

Aus der Reduktion der Carboanhydrase-Aktivitäten der *ko*-Mäuse gegenüber den Wildtyp-Mäusen kann der Beitrag des jeweiligen Carboanhydrase-Isoenzyms zur Gesamt-Aktivität von SL- bzw. SR-Fraktion berechnet werden. Dies wird in Tabelle 4 dargestellt.

	SL (U*ml/mg)	SR (U*ml/mg)	SL (% Gesamt- Aktivität im SL)	SR (% Gesamt- Aktivität im SR)
CA IV	1,9	0,08	29 (34)	18 (42)
CA IX	1	0,25	15 (0)	57 (0)
CA XIV	3,6	0,11	56 (66)	25 (58)

Tab. 4: Aus Tab. 3 berechnete Verteilung der Aktivitäten der CA IV, CA IX und CA XIV auf die Membranen von SL und SR. Die Zahlen stehen grob im Einklang mit den aus den *Western Blots* abgeleiteten Zahlen (Tab. 2). Die Prozentzahlen in Klammern gelten für den Fall, dass die CA IX weder im SL noch im SR ein intrinsisches Protein darstellt.

Im SL sind ca. 2/3 der Aktivität durch die CA XIV bedingt, die CA IV trägt nur 1/3 bei. Im SR ist dieses Verhältnis ähnlich: Die CA XIV trägt ca. 60% bei, während die CA IV ca. 40% der gesamten Carboanhydrase-Aktivität stellt. Erwartungsgemäß ist die Gesamt-Aktivität im SR erheblich geringer als im SL. Die Zahlen der Tab. 4 stehen in grober Übereinstimmung mit denen aus *Western Blots* abgeleiteten Zahlen der Tab. 2.

Die obige Interpretation der Befunde der Tab. 2 und 4 war nur unter Einbeziehung der immunhistochemischen Untersuchungen im KLSM möglich (Scheibe *et al.*, 2007, Wetzels *et al.*, 2007; Tabelle 1). Diese Autoren konnten an Muskelfasern des *EDL* der Maus mit spezifischen Anti-CA-Antikörpern sowie mit Anti-Ryanodin-Rezeptor- und Anti-SERCA-Antikörpern zeigen, dass die CA-Isoenzyme unterschiedlich in der SR- und SL-Membran verteilt sind. Der Ryanodin-Rezeptor ist an der Kontaktstelle von terminaler SR-Membran und T-Tubulus zu finden und die SERCA ist im longitudinalen SR lokalisiert. Aufgrund ihrer spezifischen Verteilung dienen diese Proteine als Marker für jeweils terminales SR / T-Tubulus bzw. für das longitudinale SR. Als Marker für die

Oberflächenmembran (und den T-Tubulus) wurde der Milchsäuretransporter MCT4 verwendet.

5.2 Lokalisation der CA IV im Skelettmuskel

Die *Western Blot*-Untersuchungen der CA IV an aufgereinigten SL- und SR-Vesikeln konnten deren Lokalisation in der sarkolemmalen Plasmamembran bestätigen. Zusätzlich konnte die CA IV im sarkoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden. Die Anwesenheit der CA IV im SR wurde durch immunhistochemische Befunde untermauert, die zeigen, dass die CA IV im longitudinalen SR und wohl auch im terminalen SR lokalisiert ist (Scheibe *et al.*, 2007). Zwar ist der Anteil der CA IV am SR im Gegensatz zum SL deutlich geringer, jedoch ist sie eindeutig dort nachzuweisen. Bei der CA IV zeigt die konfokale Mikroskopie ein Vorkommen der CA IV in hauptsächlich zwei Membranen: An der Plasmamembran, mit einer Anreicherung insbesondere am Eingang zum T-Tubulus, und im longitudinalen SR. Am SL deuten die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie auf eine eventuelle Kolo-kalisation von MCT4 und CA IV im Oberflächen-SL hin. Interessant ist die Anhäufung der CA IV im Bereich der T-Tubuluseingänge. Hierfür wird weiter unten ein Vorschlag für eine mögliche funktionelle Bedeutung gemacht.

5.3 Lokalisation der CA IX im Skelettmuskel

Western Blot-Untersuchungen an aufgereinigten SL-Vesikeln bzw. an aufgereinigten SR-Vesikeln von WT-Mäusen mit Anti-CA IX-Serum zeigen das Vorkommen des CA IX- Protein von 43 kDa in beiden Fraktionen. Immunhistochemische Untersuchungen mit Anti-CA IX/FITC und Anti-RyR/TRITC Antikörpern an isolierten EDL-Fasern im KLSM ergaben, dass die CA IX in der Region der Triaden lokalisiert ist (Scheibe *et al.*, 2007). Hierbei ist zunächst nicht zu unterscheiden, ob die CA IX im terminalen SR oder aber im T-Tubulus lokalisiert ist. Weitere Untersuchungen mittels konfokaler Lasermikroskopie zeigen jedoch klar, dass die CA IX auch außerhalb der Triaden an den T-Tubuli lokalisiert ist, nicht jedoch am longitudinalen SR und nicht an der Oberflächen-SL-Membran (R. Scheibe, persönliche Mitteilung; Scheibe *et al.* 2007; Wetzel *et al.*, 2007). Die in der SR-Fraktion (Tab. 2 und 4) gefundenen CA IX-Mengen beruhen also auf einer Kontamination des SR mit T-Tubuli, und sind nicht dem longitudinalen SR zuzuordnen, allenfalls zu einem

nicht bekannten Anteil dem terminalen SR. Diese Befunde zeigen zum ersten Mal die Expression und Lokalisation des CA IX-Proteins im Skelettmuskelgewebe (Scheibe *et al.*, 2007).

5.4 Lokalisation der CA XII im Skelettmuskel

Die CA XII konnte weder in Membranvesikeln von WT- noch in CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen nachgewiesen werden. Dies ist ein eindeutiger Beweis dafür, dass die CA XII nicht im Skelettmuskel vorkommt.

5.5 Lokalisation der CA XIV im Skelettmuskel

Die CA XIV wurde bereits in Muskel-Homogenisaten des Menschen (Juel *et al.*, 2003) und der Maus (Shah *et al.*, 2005) nachgewiesen. Normalerweise beinhalten Muskel-Homogenisate neben den cytosolischen Proteinen und weiteren zellulären Membranen eine Mischung aus SL-, SR- und mitochondrialen Membranen. Da hier isolierte Membranfraktionen von SL und SR für die *Western Blot*-Analyse verwendet wurden, konnte deutlich gezeigt werden, dass die CA XIV sowohl mit SL- als auch mit SR-Membranen assoziiert ist. Die WT-SR-Membran-Fractionen weisen sowohl geringe Na⁺/K⁺-ATPase- und Mg²⁺-ATPase-Aktivitäten auf, als auch eine geringere Gesamt-Carboanhydrase-Aktivität im Vergleich zur WT-SL-Fraktion. Jedoch zeigt die konfokale Mikroskopie, dass die CA XIV entlang der Plasmamembran und des longitudinalen Teils des SR verteilt ist, aber nicht im T-Tubulussystem vorkommt. Die CA XIV Aktivität im SR beruht daher nicht auf Kontamination, vielmehr sprechen *Western Blot*, Aktivitätsmessungen und besonders die konfokale Mikroskopie für ein Vorkommen der CA XIV im SR neben ihrem Vorkommen im Oberflächen-SL (Wetzel *et al.*, 2007).

5.6 Veränderungen von pH_i und pH_s während des Laktat-Einstroms

Der Ein- bzw. Ausstrom von Laktat über die Zellmembran verursacht durch den gleichzeitigen Protonentransport vorübergehende Veränderungen des pH-Wertes an der Zelloberfläche. Diese Veränderungen können mit der pH_s-Elektrode registriert werden. Die Amplitude (ΔpH_s) dieser pH-Schwankungen ist ein direktes Zeichen dafür, wie stark sich während des Laktat-Transportes Protonen an der Zellmembran anhäufen bzw. wie stark die Zelloberfläche an Protonen verarmt. Es ist anzunehmen, dass die extrazellulären

Carboanhydrasen den Laktat-Transport dadurch verbessern, dass sie beim Laktat-Austritt Protonen schnell von der Zelloberfläche beseitigen und dadurch den Protonengradienten über die Zellmembran aufrechterhalten. Beim Laktat-Einstrom würden sie für eine schnelle Bereitstellung von Protonen für den Laktat-Transport sorgen. Eine Hemmung der extrazellulären Carboanhydrasen sollte daher sowohl den Laktat-Flux über die Zellmembran verringern als auch zu einer Vergrößerung der Amplitude des Oberflächen-pH-Transienten (ΔpH_s) und der Steigung ($\Delta\text{pH}_s/\text{dt}$) des pH_s -Transienten an der Zelloberfläche führen. Die pH-Schwankungen können dann nicht mehr so schnell durch das CO_2 - HCO_3^- - System abgepuffert werden.

Der Kcotransport von Laktat und Protonen führt im Zellinneren zu entsprechenden pH_i -Veränderungen, die mit der pH_i -Elektrode registriert werden. Da Laktat und Protonen von den Laktat-Transportern MCT1 und MCT4 im Verhältnis 1:1 transportiert werden, kann aus der initialen Steigung der pH_i -Veränderung (dpH_i/dt) unter Berücksichtigung des Pufferfaktors der initiale Laktat-Flux berechnet werden. Aus der Differenz der pH_i -Werte vor und nach Laktat-Einstrom (ΔpH_i), multipliziert mit dem Pufferfaktor, kann dann die intrazelluläre Laktatkonzentration nach Laktat-Einstrom bestimmt werden.

Das Einstechen der Potential- und pH_i -Elektrode ist eine sichere Methode, bei der sich die Elektrode erkennbar innerhalb der Zelle befindet. Durch das Einstechen wird bei beiden Elektroden ein Potentialsprung erreicht. Sobald sich das, durch das Einstechen hervorgerufene, Loch in der Lipiddoppelmembran um die Glaskapillaren herum geschlossen hat, sind die Elektroden stabil.

Das Aufsetzen der pH_s -Elektrode ist weniger zuverlässig. Zwar wird das Aufsetzen immer gleichartig durchgeführt, allerdings ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass immer derselbe Abstand von der Zellmembran erreicht wird. Somit ist möglicherweise die Position der pH_s -Elektrode im *unstirred layer* der Zelle nicht immer dieselbe. Je weiter die Elektrode von der Zellmembran entfernt ist, desto kleiner wird der zu beobachtende pH_s -Transient ausfallen. Außerdem ist es möglich, dass sich die pH_s -Elektrode im Bereich einer T-Tubulus-Öffnung befindet. Zudem ist das Präparat nicht stets gleich. Mögliche Zellverletzungen oder Bindegewebsreste könnten die pH_s -Elektrode behindern und so die Messung beeinträchtigen. Dennoch streuen die Messungen mit der pH_s -Elektrode mäßig und durch die hohe n-Zahl können gesicherte Ergebnisse

vorgelegt werden. Der pH_s -Transient dient als Nachweis dafür, dass der hier vorgeschlagene Mechanismus der Beteiligung extrazellulärer Carboanhydrasen am Milchsäuretransport korrekt ist.

5.7 Einfluß der Carboanhydrasen auf die intrazelluläre Laktat-Konzentration im *EDL*

Ein durch die Carboanhydrase-Hemmstoffe veränderter transmembranärer Protonengradient könnte die Ursache für eine verminderte pH_i -Amplitude und damit auch für die oben gezeigte verminderte intrazelluläre Laktat-Konzentration sein. Die Gleichgewichtsverteilung von Laktat hängt vom transmembranären Protonengradienten ab (Roos, 1975). Je größer der in die Zelle gerichtete Protonengradient ist, desto mehr Laktat wird von der Zelle aufgenommen. In den Versuchen mit BZ bzw. durch das Fehlen der beiden extrazellulären Carboanhydrasen CA IV und CA XIV wird der oberflächliche pH-Wert während des Laktat-Einstroms stark in den alkalischen Bereich verschoben. Der transmembranäre Protonengradient wird damit vermindert. Die Gleichgewichtsverteilung zwischen extra- und intrazellulärem Raum ist durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\text{Laktat}_i = \frac{10^{-\text{pH}_s}}{10^{-\text{pH}_i}} \cdot \text{Laktat}_{\text{extrazellulär}}$$

Daher kann die unter CA-Hemmung verringerte intrazelluläre Laktat-Konzentration durch einen kleineren transmembranären Protonengradienten verursacht sein.

Eine alternative Betrachtungsweise ergibt sich aus der Tatsache, dass generell Säuren zwischen intra- und extrazellulärem Raum entweder Potential- oder pH-Wert-abhängig verteilt sein können. Die Potential-Verteilung dominiert, wenn die Membran eine hohe Permeabilität für das Anion der Säure aufweist. Dies ist meist bei starken Säuren der Fall. Eine pH-Wert-abhängige Verteilung dominiert, wenn die Membran eine hohe Permeabilität für die undissoziierte Säure besitzt. Schwache Säuren unterliegen oft einer pH-Wert-abhängigen Verteilung. Es wurde bereits gezeigt, dass die Laktat-Verteilung einer pH-Wert-abhängigen Verteilung folgt. (Roos, 1975, Roth & Brooks, 1990a, Roth & Brooks, 1990b). Die Membran der Muskulatur weist dementsprechend eine

hohe Permeabilität für Milchsäure auf. Dies beinhaltet sowohl die freie Diffusion der undissoziierten Säure, als auch den durch den MCT bewirkten Laktat-H⁺-Kotransport. Dies ist der Grund dafür, dass sich unter diesen Bedingungen ein Gleichgewicht einstellt, bei dem sich auf beiden Seiten der Membran die gleiche Milchsäure-Konzentration, jedoch unterschiedliche Laktat-Konzentrationen einstellen. Entsprechend der extra- und intrazellulären pH-Werte von 7,4 bzw. 7,2 liegt dann die intrazelluläre Laktatkonzentration ca. 40% unter der extrazellulären. Zwar wurden auch Hinweise dafür gefunden, dass ein geringer Teil der Laktat-Verteilung Potential-abhängig ist (Roos, 1975), allerdings ist dieser Anteil unter normalen Bedingungen zu klein, um die Laktat-Verteilung nennenswert zu beeinflussen. Wenn durch Benzolamid bzw. beim Fehlen der beiden extrazellulären Carboanhydrasen CA IV und CA XIV der Protonen-Laktat-Kotransporters gehemmt ist, sinkt damit auch die Permeabilität der Membran für Milchsäure, und die Gleichgewichts-Verteilung des Laktats verschiebt sich zugunsten der Potential-Verteilung. Die Potential-Verteilung bedeutet – analog z.B. zur Cl⁻ - Verteilung – , dass die intrazelluläre Laktatkonzentration erheblich niedriger liegt als bei der pH-abhängigen Verteilung. Daher könnte unter BZ bzw. beim Fehlen der beiden extrazellulären Carboanhydrasen CA IV und CA XIV die intrazelluläre Laktat-Konzentration, die sich aus der pH_i-Amplitude errechnet, verringert sein.

5.8 Beteiligung der Carboanhydrasen an den durch den Laktat-Transport bedingten transienten Veränderungen des Oberflächen-pH beim EDL

Bei den Messungen mit den pH_s-Elektroden zeigte sich in allen Fällen, dass es in den Amplituden der pH-Transienten keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und Einzel- *ko*-Mäusen gab. Dies gilt, obwohl der Laktat-Fluxe sowohl bei den CA IX *ko*-Mäusen, als auch bei den CA XIV *ko*-Mäusen eine signifikante Verringerung zeigt. Erst wenn mehr als eine extrazelluläre Carboanhydrase fehlte (CA IV / CA XIV Doppel-*ko*-Mäuse, CA IV / CA IX / CA XIV Tripel-*ko*-Mäuse), oder gehemmt (Benzolamid- und Ethoxzolamid-Versuche) wurde, vergrößerte sich die Amplitude signifikant. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, dass die pH_s-Elektrode einen gewissen Abstand zur Zelloberfläche hat und die Veränderungen des pH-Wertes an der Zelloberfläche bei den Einzel-*ko*-Mäusen zu gering waren, um von der pH_s-

Elektrode registriert zu werden. Erst bei der größeren pH-Veränderung, die auftritt, wenn mehrere Carboanhydrasen fehlen, wurde der Effekt unter Umständen groß genug, um von der pH_s -Elektrode erfasst zu werden. Eine weitere Überlegung hierzu ist, dass sowohl CA IV als auch CA XIV an der SL-Oberflächenmembran lokalisiert sind und sich gegenseitig "vertreten" können, und dass weiterhin die CA IX möglicherweise exklusiv im T-Tubulus lokalisiert ist und damit die Oberflächen-pH-Werte nicht beeinflussen kann.

Die initiale Steigung (dpH_s/dt) der extrazellulären pH-Transienten ist bei Laktat-Einstrom, als auch bei Laktat-Ausstrom nur in den Benzolamid-Versuchen und den Versuchen mit CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen signifikant erhöht. Obwohl zu erwarten wäre, dass dpH_s/dt auch in den Versuchen mit CA IX und CA XIV *ko*-Mäusen vergrößert sein müsste, da in diesen Versuchen der Laktat-Flux signifikant verringert ist, konnte keine vergrößerte Steigung gezeigt werden. Möglicherweise ist der Effekt aber in den Versuchen mit Einzel *ko*-Mäusen zu gering und kann, wie bei den pH_s -Amplituden, nur registriert werden, wenn mehr als nur eine Carboanhydrase ausgeschaltet ist.

Überraschend sind die dpH_s/dt -Ergebnisse bei den Messungen, in denen alle drei Carboanhydrasen fehlen (CA IV / CA IX / CA XIV *ko*- Mäuse), oder durch Ethoxzolamid gehemmt wurden. In diesen Versuchen gibt es keine Veränderung der initialen Steigung gegenüber den Wildtyp-Mäusen, obwohl der Laktat-Flux in diesen Versuchen erniedrigt ist, und die pH_s -Amplituden zeigen, dass es entsprechende pH-Transienten an der Zelloberfläche gibt. Es ist zu vermerken, dass dpH_s/dt ein wesentlich unklarer definierter Parameter für das pH-Ungleichgewicht an der Zelloberfläche ist als die pH_s -Amplituden, so dass letzteren der Vorzug zu geben ist.

5.9 Beteiligung der CA IV an den Milchsäure-Transportraten am EDL

Den nun folgenden Abschnitten über die Rolle der Carboanhydrasen für den Milchsäure-Transport am *EDL* sei vorausgeschickt, dass vorwiegend der Laktat-Influxe betrachtet werden sollen, da die Effluxraten deutlich geringer sind und die Carboanhydrase-Aktivität für den Efflux wahrscheinlich eine geringere Bedeutung hat als für den Influx.

In der Literatur wird die Hypothese diskutiert, dass Membrantransporter (HCO_3^- / Cl^- – Austauscher) (Sterling *et al.*, 2002) mit CA IV kolokalisiert sind und die Transportrate der Transporter dadurch verbessert wird. Die konfokale

Mikroskopie des *EDL* zeigt für die CA IV und den MCT4 ein ähnliches Verteilungsmuster und eine Kolo-kalisation der beiden Membranproteine ist daher möglich. Der Vergleich der Laktat-Transportraten von Wildtyp- und CA IV *ko*-Mäusen belegt aber, dass die CA IV keinen signifikanten Einfluss auf den Laktat-Transport hat. Mögliche Ursachen dafür sind eventuell der geringe Anteil der CA IV an der Gesamt-Aktivität der Plasmamembran, bzw. eine Kompensation der fehlenden CA IV-Aktivität durch die anderen membranständigen Carboanhydrasen, insbesondere durch die CA XIV.

5.10 Beteiligung der CA IX an den Milchsäure-Transportraten am *EDL*

Die CA IX hat scheinbar nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamt-Aktivität der Plasmamembran (Tab. 4). Daher ist es überraschend, dass ein Fehlen der CA IX einen genauso großen Effekt auf den Laktat-Transport wie ein Fehlen der CA XIV hat. Die Ursache für diesen starken Effekt trotz geringer Aktivität kann daher nur in der Lokalisation der CA IX liegen. Die CA IX ist im Wesentlichen extrazellulär im Tubulussystem lokalisiert. Eine Wirkung wäre daher durch die benachbarte Lokalisation von CA IX und MCT4 im Tubulussystem erklärbar, wobei die (teilweise) Lokalisation des MCT4 im T-Tubulus sowohl aus Tab. 4 als auch aus der Literatur (Bonen *et al.*, 2000) hervorgeht. Dann müssten aber noch zusätzliche, bisher ungeklärte Mechanismen eine Rolle spielen, wie z.B. eine direkte Bindung von CA IX an MCT4 oder ein Zusammenwirken von extrazellulärer CA IX im T-Tubulus mit den, an der Oberflächenmembran lokalisierten, extrazellulären Carboanhydrasen CA IV und CA XIV (siehe 5.16).

5.11 Beteiligung der CA XIV an den Milchsäure-Transportraten am *EDL*

Die CA XIV hat einen signifikanten Einfluss auf die Laktat-Transportrate, wie der Vergleich der Transportraten von Wildtyp- und CA XIV *ko*-Mäusen zeigt. Obwohl die CA XIV ein anderes Verteilungsmuster als der MCT4 aufweist und daher nicht mit ihm kolokalisiert ist, macht ihre Aktivität 2/3 der Oberflächen-Membranaktivität aus. Wie die Ergebnisse belegen, wird die Laktat-Transportrate durch die Carboanhydrase-Aktivität in der Plasmamembran gefördert, und das Fehlen von 2/3 der Aktivität kann nicht mehr durch die anderen Carboanhydrasen, insbesondere durch die CA IV, kompensiert werden.

5.12 Milchsäure-Transportraten am *EDL* von CA IV / CA XIV-Doppel-*ko*-Mäusen

Im Vergleich der Ergebnisse der Versuche mit den CA IV / XIV Doppel-*ko*-Mäusen und der Ergebnisse der CA XIV und CA IX Einzel-*ko*-Mäusen ist zu sehen, dass das Ausschalten von zwei Carboanhydrasen die Laktat-Transportrate beim Laktat-Influx noch einmal verringert. Dies könnte durch eine Teilkompensation der fehlenden CA-Aktivität in den CA XIV- bzw. CA IX-Einzel-*ko*-Mäusen durch die CA IV bedingt sein. Diese Kompensation fehlt in den CA IV / CA XIV Doppel-*ko*-Mäusen. Beim Laktat-Efflux ist kein zusätzlicher Effekt gegenüber den Einzel-*ko*-Mäusen zu erkennen. Allerdings ist der Laktat-Efflux deutlich geringer als der Laktat-Influx, so dass zu erwarten ist, dass hier der Bedarf an CA-Aktivität deutlich geringer wird.

5.13 Effekt von Benzolamid auf die Milchsäure-Transportraten am *EDL*

Benzolamid ist ein extrazellulärer Carboanhydrase-Hemmstoff am Muskel. In den Versuchen mit Benzolamid werden daher die extrazellulären Wirkungen der CA IV, CA IX und CA XIV komplett aufgehoben, und es ist nur noch intrazelluläre CA Aktivität (SR) vorhanden. Die Laktat-Transportraten in den Benzolamid-Versuchen sind genauso groß wie die der CA IV / CA XIV Doppel-*ko*-Mäuse. Die zusätzliche Hemmung der CA IX in den Benzolamid-Versuchen gegenüber den CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen zeigt keinen zusätzlichen Effekt auf den Laktat-Transport. Eine mögliche Erklärung hierfür wird weiter unten geliefert. Allein beim Laktat-Efflux ist aber in den Versuchen mit Wildtyp-Mäusen + Benzolamid ein stärkerer Effekt als bei den CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen zu beobachten, der allerdings nicht signifikant ist.

5.14 Milchsäure-Transportraten am *EDL* von CA IV / CA IX / CA XIV-Tripel-*ko*-Mäusen

Ein Vergleich der Transportraten von CA IV / CA IX / CA XIV *ko*-Mäusen mit Wildtyp-Mäusen zeigt eine signifikante Verringerung des Laktat-Transports, dieser ist auch im Vergleich zu den CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen verringert. Im Vergleich zu den CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen und zu den Benzolamid-Versuchen ist jedoch nur noch ein mäßiger zusätzlicher Effekt zu sehen, der beim Laktat-Efflux etwas deutlicher ist als beim Laktat-Influx. Das zusätzliche Fehlen der CA IX in den CA IV / CA IX / CA XIV *ko*-Versuchen im Vergleich zu

den CA IV / CA XIV *ko*-Versuchen verringert zwar den Laktat-Transport, dieser Effekt ist aber mit der bisherigen Versuchszahl statistisch nicht zu sichern.

5.15 Effekt von Ethoxzolid auf die durch 20 mM Laktat bedingten Transportraten des *EDL*

Ethoxzolid ist ein intra- und extrazellulär wirkender Carboanhydrase-Hemmstoff. In der eingesetzten Konzentration hemmt Ethoxzolid alle Carboanhydrase-Isoformen und folglich ist in den entsprechenden Versuchen keinerlei Carboanhydrase-Aktivität im *EDL* mehr vorhanden. Die Laktat-Fluxe sind in den Versuchen mit Ethoxzolid, Wildtyp + Ethoxzolid und CA IV / CA IX / CA XIV Tripel-*ko* + Ethoxzolid, nicht verändert gegenüber den Laktat-Fluxen in den CA IV / CA IX / CA XIV Tripel-*ko*-Muskeln. Hieraus ist zu entnehmen, dass eventuell im *EDL* vorhandene weitere Carboanhydrasen, z.B. zytosolische Carboanhydrasen, für den Laktat-Transport keine Rolle spielen. Die drei untersuchten Carboanhydrasen CA IV, CA IX und CA XIV sind somit die entscheidenden Carboanhydrasen für den Laktat-Transport am *EDL*.

5.16 Zusammenfassung der Carboanhydrase-Wirkungen auf den Laktat-Transport am *EDL*

Die Laktat-Transportrate am *EDL* wird durch Carboanhydrasen gesteigert. Entscheidenden Einfluss auf den Laktat-Transport haben nur die drei membranständigen Carboanhydrasen CA IV, CA IX und CA XIV, denn die Laktat-Fluxe, die in den Versuchen in Abwesenheit jeder Carboanhydrase-Aktivität (Ethoxzolid-Versuche) gemessen wurden, sind nicht signifikant unterschiedlich gegenüber den Laktat-Fluxen, die an der CA IV / CA IX / CA XIV Tripel-*ko*-Maus gemessen wurden.

Von diesen drei Carboanhydrasen hat die CA IV die geringste Bedeutung, denn ein Fehlen der CA IV allein hat keinen Einfluss auf den Laktat-Transport, erst wenn zusätzlich die CA XIV fehlt (CA IV / CA XIV Doppel-*ko*-Maus), macht sich der Effekt der CA IV auf den Laktat-Transport bemerkbar: Die Transportrate der Doppel-*ko*-Maus ist dann geringer als die der CA XIV-Einzel-*ko*-Maus. Diese Befunde zeigen, dass ein Fehlen der CA IV durch die beiden verbliebenen Carboanhydrasen CA IX und CA XIV kompensiert werden kann, obwohl die CA IV ~1/3 der gesamten Carboanhydrase-Aktivität am SL ausmacht.

Die CA XIV ist in Bezug auf die Aktivität die wichtigste Carboanhydrase am SL, sie ist für ~ 2/3 der Carbonhydrase-Aktivität am SL verantwortlich und der Einfluss der CA XIV auf den Laktat-Transport ist entsprechend groß. Das Ausschalten der CA XIV (CA XIV *ko*-Maus) kann nicht durch die beiden verbliebenen Carboanhydrasen kompensiert werden und der Laktatflux verringert sich signifikant.

Die CA IX hat einen gleich starken Effekt auf den Laktat-Transport wie die CA XIV, der Laktat-Flux ist bei der CA IX *ko*-Maus signifikant verringert. Die Reduktion der Laktat-Transportrate ist ungefähr genauso groß wie bei der CA XIV *ko*-Maus, obwohl die CA IX nur einen Anteil von ~15 % an der gesamten Carboanhydrase-Aktivität der hier untersuchten SL-Präparation hat. Desweiteren fällt beim Vergleich der Laktat-Transportraten von CA IV / CA XIV Doppel-*ko*-Maus und CA IV / CA IX / CA XIV Tripel-*ko*-Maus ± Benzolamid auf, dass die Transportraten in allen Fällen gleich groß sind. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als dass das Fehlen der CA IX im Einzel-*ko*-Versuch einen deutlichen Effekt auf die Transportrate hat. Man würde daher einen Unterschied in den Laktat-Transportraten zwischen CA IV / CA XIV Doppel-*ko*-Mäusen (CA IV und CA XIV fehlen) und den CA IV / CA XIV Doppel-*ko* + Benzolamid bzw. CA IV / CA IX / CA XIV-Tripel-*ko* wie auch Wildtyp + Benzolamid (CA IV, CA IX und CA XIV fehlen oder sind blockiert) erwarten. In den Benzolamid-Versuchen sind alle extrazellulären Carboanhydrasen einschließlich der CA IX ausgeschaltet. Der erwartete CA IX-Effekt ist aber in diesen Experimenten nicht zu sehen. Es gibt bei den Versuchen mit CA IV / CA IX / CA XIV-Tripel-*ko*-Muskeln im Vergleich mit den CA IV / CA XIV Doppel-*ko*-Muskeln nur einen sehr kleinen, nicht signifikanten, zusätzlichen CA IX Effekt. Die CA IX ist am SL nur im T-Tubulus lokalisiert, dort sind auch MCT4-Transporter in großer Dichte vorhanden. Eine mögliche Erklärung für die oben genannten CA IX-Effekte wäre daher ein Zusammenwirken von CA IX im T-Tubulussystem mit den extrazellulären Carboanhydrasen CA IV und CA XIV bei einem wichtigen Mechanismus des Laktat-Transports am *EDL*. Abb. 55 zeigt die schematische Darstellung einer Denkmöglichkeit für eine solche Zusammenarbeit.

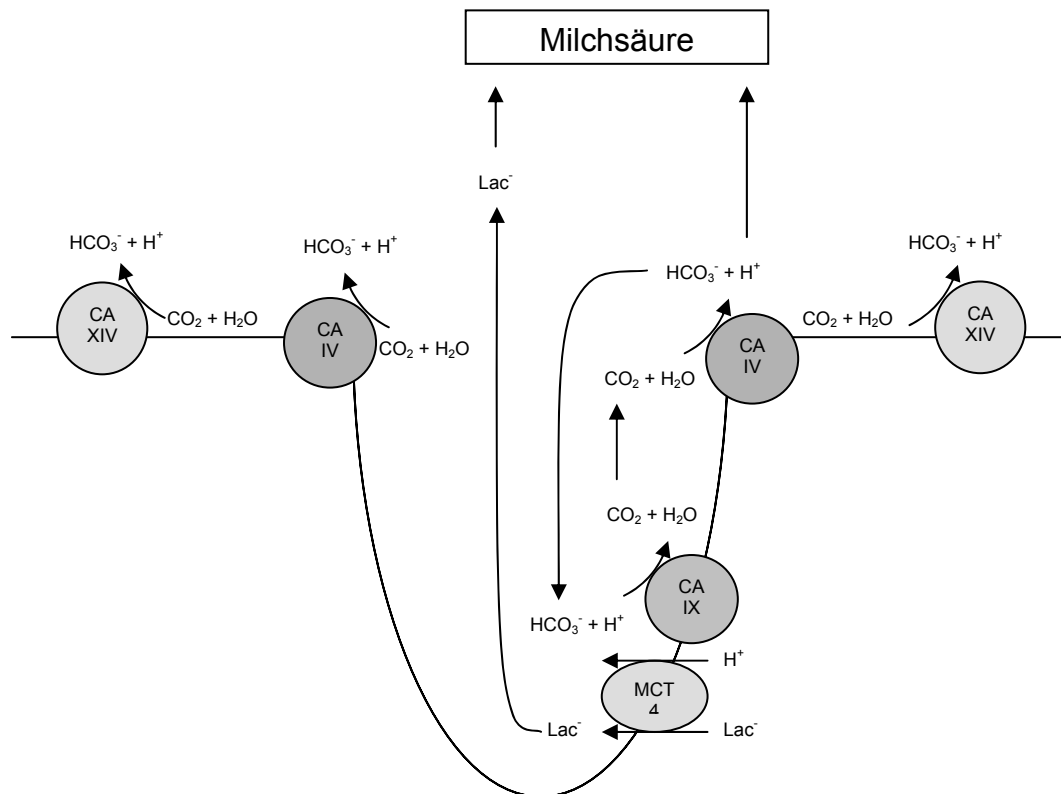


Abb. 55: Zusammenwirken der drei membrangebundenen Carboanhydrase-Isoenzyme beim Laktat-Transport im Skelettmuskel

Der MCT4 ist am *EDL* zu einem erheblichem Anteil im T-Tubulussystem vorhanden (Bonen *et al.*, 2000), so dass offenbar ein großer Beitrag zum Laktat-Transport auch über den T-Tubulus geleistet wird. Im Falle des Laktat-Ausstroms wird der T-Tubulus sehr stark azidifiziert und die anfallenden Protonen müssen den T-Tubulus entweder durch Diffusion verlassen, was aufgrund der geringen H^+ -Gradienten ein langsamer Vorgang ist, oder die CA IX sorgt lokal für eine große Carboanhydrase-Aktivität und die Protonen reagieren sehr schnell mit Bikarbonat zu CO_2 . Dieser Mechanismus würde den großen Einfluss der CA IX auf den Laktat-Transport erklären. Das Bikarbonat für diese Reaktion müsste vom Tubuluseingang in die Tiefe des Tubulus hinein diffundieren, wobei dort neben der CA XIV insbesondere die CA IV, die nach den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie verstärkt im Eingangsbereich der T-Tubuli sitzt, aus CO_2 dieses Bikarbonat nachliefern könnte. In den CA IV / CA XIV Doppel-*ko*-Mäusen fehlt dieser letzte Teil des Mechanismus, so dass der

Laktat-Transport durch den T-Tubulus weitgehend stillgelegt ist. Damit würde auch der Beitrag der CA IX nicht mehr wirksam werden können, so dass eine zusätzliche Hemmung / Elimination der CA IX keinen größeren Einfluss mehr auf die Transportrate hat. Im Falle der CA IV Einzel-*ko*-Mäuse kann wahrscheinlich der Ausfall der CA IV durch die hohe CA XIV-Aktivität im gesamten Bereich der Oberflächenmembran kompensiert werden, so dass hier ein Fehlen der CA IX einen großen Effekt erzeugt. Der Kompensations-Mechanismus des Ersatzes fehlender CA IV-Aktivität durch die Aktivität der CA XIV ist bei den CA IV / CA XIV Doppel-*ko*-Mäusen erwartungsgemäß nicht vorhanden.

5.17 Beteiligung der Carboanhydrasen an den Transportraten des MCT im *Soleus*

Sowohl das Fehlen der Carboanhydrasen CA IV, CA IX und CA XIV als auch die Hemmung der sarkolemmalen Carboanhydrasen bewirkt keine signifikante Änderung des Laktat-Influges und des Laktat-Effluxes im *Soleus*. Bei den initialen Steigungen und Amplituden der pH_s -Elektrode gibt es keine signifikanten Unterschiede bei den Einzel-*knockout*-Mäusen. Die Hemmung der sarkolemmalen Carboanhydrasen mit Benzolamid bewirkt jedoch in allen Fällen eine signifikante Erhöhung der pH_s -Amplituden. Die fehlenden Effekte der Carboanhydrasen auf den Laktatflux könnten damit zusammenhängen, dass die Fluxe im *Soleus* insgesamt ca. 50% kleiner sind als im *EDL*. Dies könnte widerspiegeln, dass der *Soleus*, der seine Energie hauptsächlich oxidativ gewinnt, kaum auf den Auswärtstransport von Laktat angewiesen ist. Ähnliche Unterschiede um den Faktor 2 zwischen langsamen und schnellen Skelettmuskelfasern sind auch in der Literatur zu finden (Bonen *et al.*, 2000). Für diese deutlich geringeren Transportraten könnte eine schnelle Bereitstellung bzw. Beseitigung von Protonen durch die katalytische Wirkung der Carboanhydrasen nicht mehr zwingend notwendig sein. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass im *EDL* nach Hemmung aller Carboanhydrasen die Laktat-Transportrate auf ähnliche Werte sinkt, wie sie im *Soleus* bei Wildtyp-Mäusen gemessen werden. Desweiteren können bei geringen Transportraten und den großen Standardabweichungen mögliche kleine Unterschiede durch Carboanhydrase-Effekte nicht mehr eindeutig differenziert werden. Daher gibt es evtl. keinen signifikanten Unterschied bei

den Fluxen. Beim Fehlen beider sarkolemmaler Carboanhydrasen gibt es allerdings einen signifikanten Effekt auf den pH_s -Transienten. Dieses kann als Zeichen dafür gewertet werden, dass sehr wohl an der Zelloberfläche pH-Transienten auftreten, deren Größe durch extrazelluläre Carboanhydrasen verringert wird. Dieses wird erst sichtbar, wenn mehrere Carboanhydrasen ausgeschaltet wurden. Einen deutlichen Einfluss auf den Laktat-Transport haben diese stärkeren pH-Abweichungen an der Zelloberfläche aber offensichtlich nicht. Es muss zusätzlich angemerkt werden, dass die Ergebnisse am *Soleus* aufgrund der niedrigen n-Zahl weniger verlässlich sind als diejenigen am *EDL*.

5.18 Beteiligung der Carboanhydrasen an den Transportraten der Transporter AE, NHE und NBC im Rahmen der pH-Regulation

Frühe Untersuchungen zeigen eine Bindung zwischen der zytosolischen CA II und dem AE1 an menschlichen Erythrozyten-Membranen (Vince & Reithmeier, 1998). Weitere Untersuchungen zeigen die Bindungsdomäne am C-terminalen Ende des AE1 (Vince & Reithmeier, 2000) sowie am N-terminalen Ende der CA II, sowie Bindungen der CA II an AE2 und AE3 (Vince *et al.*, 2000). Untersuchungen an AE-transfizierten HEK-293 Zellen zeigen, dass CA II die Transportraten von AE1, 2 und 3 erhöht (Sterling & Casey, 1999; Sterling *et al.*, 2001). Neuere Befunde über die Abwesenheit einer *in vitro* Bindung der CA II am C-terminalen Ende des AE1 widerlegen allerdings teilweise diese Vorstellungen (Piermarini *et al.*, 2007; V. Endeward, persönliche Mitteilung).

Von Interesse sind auch Untersuchungen an CA IV und AE, die beschleunigte Transportraten von AE1, AE2 oder AE3 in Anwesenheit von CA IV aufweisen (Sterling *et al.*, 2002). Es gibt zusätzliche Befunde (Morgan *et al.*, 2007), wonach die CA IX mit ihrer katalytischen Domäne an AE2 bindet und die Transportraten von AE1, AE2 und AE3 beschleunigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der pH-Regulation, die aufgrund von NH_3 -Exposition und auf NH_3 -Entzug erfolgt, gezeigt werden, dass weder das Fehlen der CA IV noch das Fehlen der CA XIV und auch nicht die Hemmung aller sarkolemmalen Carboanhydrasen CA IV, CA IX und CA XIV durch Benzolamid, signifikante Unterschiede zu den Transportraten von Muskelfasern aus Wildtyp-Mäusen ergeben. Auf die Untersuchung des speziellen Einflusses der CA IX wurde aufgrund der nicht signifikanten Benzolamid-Befunde

verzichtet. Auch die Untersuchung an CA IV / CA XIV *ko*-Mäusen entfiel angesichts der Vorstellung, dass hierbei keine größeren Effekte als unter Benzolamid zu erwarten wären.

Es wurde bereits gezeigt, dass CA II und NBC1 *in vitro* aneinander binden können, und dass die Anwesenheit von CA II die Transportrate von NBC1 erhöht (Gross *et al.*, 2002; Pushkin *et al.*, 2004; Becker & Deitmer, 2007). Außerdem konnte eine Bindung von CA II an NBC3 und eine daraus resultierende Erhöhung der Transportrate (Loiselle *et al.*, 2004) nachgewiesen werden. Allerdings gibt es keinen Beleg dafür, dass die CA II an den Transporter gebunden sein muss. Andere Befunde (Lu *et al.*, 2006) widerlegen diese Annahme. Dort wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von CA II die Transportraten von NBC1 nicht steigert. Weitere Befunde, die im Einklang mit der genannten Vorstellung stehen, sind die Berichte, dass eine Bindung zwischen CA IV und NBC1 besteht und dass die Anwesenheit von CA IV die Transportrate von NBC1 beschleunigt (Alvarez *et al.*, 2003). Über eine Bindung von CA II an den NHE1, und auch eine daraus resultierende erhöhte Transportrate, wurde ebenfalls berichtet (Li *et al.*, 2002 / Li *et al.*, 2006).

Zwar zeigen diese Arbeiten einen grundsätzlichen Zusammenhang zwischen der Carboanhydrase und den entsprechenden Transportern, allerdings konnte dies in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Bei der durch den Ausstrom von Ammonium aus der Zelle heraus bewirkten Gegenregulation der Zelle werden zwar die Transportraten der pH-regulatorischen Transporter in CA IV *ko*-, CA XIV *ko*- und Wildtyp-Muskeln, die durch Benzolamid gehemmt sind, leicht erniedrigt, jedoch ist dieser Effekt nicht signifikant.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Carboanhydrase keinen nachweisbaren Einfluss auf die genannten Transporter hat. Da diese Studien erstmals im Skelettmuskel durchgeführt wurden und infolge des negativen Ergebnisses nicht weiter verfolgt wurden, gibt dieser Ansatz dennoch Spielraum für weitere Mutmaßungen. Würde beispielsweise die Ammonium-Konzentration noch weiter erhöht, oder würden die Transporter einzeln ausgeschaltet, um eine mögliche Interaktion bzw. gegeneinander gewandte Regulation auszuschließen, wäre es dennoch möglich, dass sich ein völlig anders Bild ergibt. Es wäre

außerdem denkbar, die Rolle der CA IX zu untersuchen. Aufgrund der Vorstellung, dass sie hauptsächlich im T-Tubulussystem vorkommt, könnten sich unter Umständen noch weitere interessante Fragestellungen ergeben, die jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit waren.

Literaturverzeichnis

- Aickin, C. C. & Thomas, R. C. (1977). An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres. *J.Physiol* **273**, 295-316.
- Alper, S. L., Darman, R. B., Chernova, M. N., & Dahl, N. K. (2002). The AE gene family of Cl/HCO₃-exchangers. *J.Nephrol.* **15 Suppl 5**, S41-S53.
- Alper, S. L. (2006). Molecular physiology of SLC4 anion exchangers. *Exp.Physiol* **91**, 153-161.
- Alvarez, B. V., Loiselle, F. B., Supuran, C. T., Schwartz, G. J., & Casey, J. R. (2003). Direct extracellular interaction between carbonic anhydrase IV and the human NBC1 sodium/bikarbonate co-transporter. *Biochemistry* **42**, 12321-12329.
- Ariano, M. A., Armstrong, R. B., & Edgerton, V. R. (1973). Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J.Histochem.Cytochem.* **21**, 51-55.
- Bakker, E. P. & van Dam, K. (1974). The movement of monocarboxylic acids across phospholipid membranes: evidence for an exchange diffusion between pyruvate and other monocarboxylate ions. *Biochim.Biophys.Acta* **339**, 285-289.
- Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Furukawa, T., & Peter, J. B. (1971). Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am.J.Physiol* **220**, 410-414.
- Becker, H. M., Hirnet, D., Fecher-Trost, C., Sultemeyer, D., & Deitmer, J. W. (2005). Transport activity of MCT1 expressed in *Xenopus* oocytes is increased by interaction with carbonic anhydrase. *J.Biol.Chem.* **280**, 39882-39889.
- Becker, H. M. & Deitmer, J. W. (2007). Carbonic anhydrase II increases the activity of the human electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporter. *J.Biol.Chem.* **282**, 13508-13521.
- 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. *Pflugers Arch.* **452**, 453-463.
- Bonen, A., Miskovic, D., Tonouchi, M., Lemieux, K., Wilson, M. C., Murette, A., & Halestrap, A. P. (2000). Abundance and subcellular distribution of MCT1 and MCT4 in heart and fast-twitch skeletal muscles. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **278**, E1067-E1077.
- Boron, V. F., Hediger, M. A., Boulpaep, E. L., & Romero, M. F. (1997). The renal electrogenic Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter. *J.Exp.Biol.* **200**, 263-268.
- Brooks, G. A. (2002). Lactate shuttles in nature. *Biochem.Soc.Trans.* **30**, 258-264.
- Bruns, W., Dermietzel, R., & Gros, G. (1986). Carbonic anhydrase in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J.Physiol* **371**, 351-364.

- Clausen, T. (2003). Na⁺-K⁺ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol.Rev.* **83**, 1269-1325.
- Decker, B., Sender, S., & Gros, G. (1996). Membrane-associated carbonic anhydrase IV in skeletal muscle: subcellular localization. *Histochem.Cell Biol.* **106**, 405-411.
- Dimmer, K. S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J. W., & Broer, S. (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem.J.* **350 Pt 1**, 219-227.
- Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., & Onishi, S. (1999). Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1. *Genomics* **61**, 74-81.
- Gross, E., Pushkin, A., Abuladze, N., Fedotoff, O., & Kurtz, I. (2002). Regulation of the sodium bicarbonate cotransporter kNBC1 function: role of Asp(986), Asp(988) and kNBC1-carbonic anhydrase II binding. *J.Physiol* **544**, 679-685.
- Gut, M. O., Parkkila, S., Vernerova, Z., Rohde, E., Zavada, J., Hocker, M., Pastorek, J., Karttunen, T., Gibadulinova, A., Zavadova, Z., Knobeloch, K. P., Wiedenmann, B., Svoboda, J., Horak, I., & Pastorekova, S. (2002). Gastric hyperplasia in mice with targeted disruption of the carbonic anhydrase gene Car9. *Gastroenterology* **123**, 1889-1903.
- Halestrap, A. P. & Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem.J.* **343 Pt 2**, 281-299.
- Halestrap, A. P. & Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* **447**, 619-628.
- Hashimoto, T., Masuda, S., Taguchi, S., & Brooks, G. A. (2005). Immunohistochemical analysis of MCT1, MCT2 and MCT4 expression in rat plantaris muscle. *J.Physiol* **567**, 121-129.
- Hediger, M. A., Romero, M. F., Peng, J. B., Rolfs, A., Takanaga, H., & Bruford, E. A. (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch.* **447**, 465-468.
- Heinicke, E., Kumar, U., & Munoz, D. G. (1992). Quantitative dot-blot assay for proteins using enhanced chemiluminescence. *J.Immunol.Methods* **152**, 227-236.
- Hilvo, M., Rafajova, M., Pastorekova, S., Pastorek, J., & Parkkila, S. (2004). Expression of carbonic anhydrase IX in mouse tissues. *J.Histochem.Cytochem.* **52**, 1313-1322.
- Hilvo, M., Baranauskiene, L., Salzano, A. M., Scaloni, A., Matulis, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Monti, S. M., Di Fiore, A., De Simone, G., Lindfors, M., Janis, J., Valjakka, J., Pastorekova, S., Pastorek, J., Kulomaa, M. S., Nordlund, H. R., Supuran, C. T., & Parkkila, S. (2008). Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J.Biol.Chem.* **283**, 27799-27809.

- Ivanov, S. V., Kuzmin, I., Wei, M. H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B. E., Stanbridge, E. J., & Lerman, M. I. (1998). Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 12596-12601.
- Juel, C. (1997). Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev.* **77**, 321-358.
- Juel, C. & Halestrap, A. P. (1999). Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J.Physiol* **517 (Pt 3)**, 633-642.
- Juel, C., Lundby, C., Sander, M., Calbet, J. A., & Hall, G. (2003). Human skeletal muscle and erythrocyte proteins involved in acid-base homeostasis: adaptations to chronic hypoxia. *J.Physiol* **548**, 639-648.
- Kaunisto, K., Parkkila, S., Rajaniemi, H., Waheed, A., Grubb, J., & Sly, W. S. (2002). Carbonic anhydrase XIV: luminal expression suggests key role in renal acidification. *Kidney Int.* **61**, 2111-2118.
- Keilin, D. & Mann, T. (1940). Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem.J.* **34**, 1163-1176.
- Kim, G., Lee, T. H., Wetzel, P., Geers, C., Robinson, M. A., Myers, T. G., Owens, J. W., Wehr, N. B., Eckhaus, M. W., Gros, G., Wynshaw-Boris, A., & Levine, R. L. (2004). Carbonic anhydrase III is not required in the mouse for normal growth, development, and life span. *Mol.Cell Biol.* **24**, 9942-9947.
- Kivela, A. J., Parkkila, S., Saarnio, J., Karttunen, T. J., Kivela, J., Parkkila, A. K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W. S., & Rajaniemi, H. (2000). Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours. *Histochem.Cell Biol.* **114**, 197-204.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys.Methods* **10**, 203-209.
- Kyllonen, M. S., Parkkila, S., Rajaniemi, H., Waheed, A., Grubb, J. H., Shah, G. N., Sly, W. S., & Kaunisto, K. (2003). Localization of carbonic anhydrase XII to the basolateral membrane of H⁺-secreting cells of mouse and rat kidney. *J.Histochem.Cytochem.* **51**, 1217-1224.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Li, X., Alvarez, B., Casey, J. R., Reithmeier, R. A., & Fliegel, L. (2002). Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J.Biol.Chem.* **277**, 36085-36091.
- Li, X., Liu, Y., Alvarez, B. V., Casey, J. R., & Fliegel, L. (2006). A novel carbonic anhydrase II binding site regulates NHE1 activity. *Biochemistry* **45**, 2414-2424.

- Loiselle, F. B., Morgan, P. E., Alvarez, B. V., & Casey, J. R. (2004). Regulation of the human NBC3 Na⁺/HCO₃ cotransporter by Carbonic Anhydrase II and PKA. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **286**, C1423-C1433.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.
- Lu, J., Daly, C. M., Parker, M. D., Gill, H. S., Piermarini, P. M., Pelletier, M. F., & Boron, W. F. (2006). Effect of human carbonic anhydrase II on the activity of the human electrogenic Na/HCO₃ cotransporter NBCe1-A in *Xenopus* oocytes. *J.Biol.Chem.* **281**, 19241-19250.
- Meldrum, N. U. & Roughton, F. J. (1933). Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J.Physiol* **80**, 113-142.
- Morgan, P. E., Pastorekova, S., Stuart-Tilley, A. K., Alper, S. L., & Casey, J. R. (2007). Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CAIX, with bikarbonate transporters. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **293**, C738-C748.
- Mori, K., Ogawa, Y., Ebihara, K., Tamura, N., Tashiro, K., Kuwahara, T., Mukoyama, M., Sugawara, A., Ozaki, S., Tanaka, I., & Nakao, K. (1999). Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. *J.Biol.Chem.* **274**, 15701-15705.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Nagelhus, E. A., Mathiisen, T. M., Bateman, A. C., Haug, F. M., Ottersen, O. P., Grubb, J. H., Waheed, A., & Sly, W. S. (2005). Carbonic anhydrase XIV is enriched in specific membrane domains of retinal pigment epithelium, Muller cells, and astrocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 8030-8035.
- Ogden, R. C. & Adams, D. A. (1987). Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods Enzymol.* **152**, 61-87.
- Okuyama, T., Batanian, J. R., & Sly, W. S. (1993). Genomic organization and localization of gene for human carbonic anhydrase IV to chromosome 17q. *Genomics* **16**, 678-684.
- Olleschik-Elbheim, L., el Baya, A., & Schmidt, M. A. (1996). Quantification of immunological membrane reactions employing a digital desk top scanner and standard graphics software. *J.Immunol.Methods* **197**, 181-186.
- Opavsky, R., Pastorekova, S., Zelnik, V., Gibadulinova, A., Stanbridge, E. J., Zavada, J., Kettmann, R., & Pastorek, J. (1996). Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* **33**, 480-487.
- Orlowski, J. & Grinstein, S. (2004). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* **447**, 549-565.

- Parkkila, S., Parkkila, A. K., Rajaniemi, H., Shah, G. N., Grubb, J. H., Waheed, A., & Sly, W. S. (2001). Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 1918-1923.
- Parkkila, S., Kivela, A. J., Kaunisto, K., Parkkila, A. K., Hakkola, J., Rajaniemi, H., Waheed, A., & Sly, W. S. (2002). The plasma membrane carbonic anhydrase in murine hepatocytes identified as isozyme XIV. *BMC.Gastroenterol.* **2**, 13.
- Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal.Biochem.* **100**, 201-220.
- Piermarini, P. M., Kim, E. Y., & Boron, W. F. (2007). Evidence against a direct interaction between intracellular carbonic anhydrase II and pure C-terminal domains of SLC4 bikarbonate transporters. *J.Biol.Chem.* **282**, 1409-1421.
- Pilegaard, H., Bangsbo, J., Richter, E. A., & Juel, C. (1994). Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from human muscle biopsies: relation to training status. *J.Appl.Physiol* **77**, 1858-1862.
- Pilegaard, H., Terzis, G., Halestrap, A., & Juel, C. (1999). Distribution of the lactate/H⁺ transporter isoforms MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. *Am.J.Physiol* **276**, E843-E848.
- Pushkin, A., Abuladze, N., Gross, E., Newman, D., Tatishchev, S., Lee, I., Fedotoff, O., Bondar, G., Azimov, R., Ngyuen, M., & Kurtz, I. (2004). Molecular mechanism of kNBC1-carbonic anhydrase II interaction in proximal tubule cells. *J.Physiol* **559**, 55-65.
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 3116-3120.
- Romero, M. F., Hediger, M. A., Boulpaep, E. L., & Boron, W. F. (1997). Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *Nature* **387**, 409-413.
- Romero, M. F., Fulton, C. M., & Boron, W. F. (2004). The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters. *Pflugers Arch.* **447**, 495-509.
- Roos, A. (1975). Intracellular pH and distribution of weak acids across cell membranes. A study of D- and L-lactate and of DMO in rat diaphragm. *J.Physiol* **249**, 1-25.
- Roth, D. A. & Brooks, G. A. (1990). Lactate and pyruvate transport is dominated by a pH gradient-sensitive carrier in rat skeletal muscle sarcolemmal vesicles. *Arch.Biochem.Biophys.* **279**, 386-394.
- Roth, D. A. & Brooks, G. A. (1990). Lactate transport is mediated by a membrane-bound carrier in rat skeletal muscle sarcolemmal vesicles. *Arch.Biochem.Biophys.* **279**, 377-385.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- 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.
- Scheibe, R. J., Mundhenk, K., Becker, T., Hallerdei, J., Waheed, A., Shah, G. N., Sly, W. S., Gros, G., & Wetzel, P. (2008). Carbonic anhydrases IV and IX: subcellular localization and functional role in mouse skeletal muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **294**, C402-C412.
- Seiler, S. & Fleischer, S. (1982). Isolation of plasma membrane vesicles from rabbit skeletal muscle and their use in ion transport studies. *J.Biol.Chem.* **257**, 13862-13871.
- Sender, S., Gros, G., Waheed, A., Hageman, G. S., & Sly, W. S. (1994). Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase IV in capillaries of rat and human skeletal muscle *J.Histochem.Cytochem.* **42**, 1229-1236.
- Shah, G. N., Ulmasov, B., Waheed, A., Becker, T., Makani, S., Svichar, N., Chesler, M., & Sly, W. S. (2005). Carbonic anhydrase IV and XIV knockout mice: roles of the respective carbonic anhydrases in buffering the extracellular space in brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 16771-16776.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98**, 503-517.
- Sterling, D. & Casey, J. R. (1999). Transport activity of AE3 chloride/bikarbonate anion-exchange proteins and their regulation by intracellular pH. *Biochem.J.* **344 Pt 1**, 221-229.
- Sterling, D., Reithmeier, R. A., & Casey, J. R. (2001). A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bikarbonate exchangers. *J.Biol.Chem.* **276**, 47886-47894.
- Sterling, D., Alvarez, B. V., & Casey, J. R. (2002). The extracellular component of a transport metabolon. Extracellular loop 4 of the human AE1 Cl⁻. *J.Biol.Chem.* **277**, 25239-25246.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 4350-4354.
- Tureci, O., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Gottert, E., Seitz, G., Parkkila, A. K., Shah, G. N., Grubb, J. H., Pfreundschuh, M., & Sly, W. S. (1998). Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 7608-7613.
- Ulmasov, B., Waheed, A., Shah, G. N., Grubb, J. H., Sly, W. S., Tu, C., & Silverman, D. N. (2000). Purification and kinetic analysis of recombinant CA XII, a membrane carbonic anhydrase overexpressed in certain cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 14212-14217.

- Vanheel, B., de Hemptinne, A., & Leusen, I. (1986). Influence of surface pH on intracellular pH regulation in cardiac and skeletal muscle. *Am.J.Physiol* **250**, C748-C760.
- Vince, J. W. & Reithmeier, R. A. (1998). Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte C1-*I*. *J.Biol.Chem.* **273**, 28430-28437.
- Vince, J. W. & Reithmeier, R. A. (2000). Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl(-)/HCO₃(-) anion exchanger AE. *Biochemistry* **39**, 5527-5533.
- Vince, J. W., Carlsson, U., & Reithmeier, R. A. (2000). Localization of the Cl⁻/ HCO₃⁻ anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **39**, 13344-13349.
- Waheed, A., Zhu, X. L., Sly, W. S., Wetzel, P., & Gros, G. (1992). Rat skeletal muscle membrane associated carbonic anhydrase is 39-kDa, glycosylated, GPI-anchored CA IV. *Arch.Biochem.Biophys.* **294**, 550-556.
- Wetzel, P., Hasse, A., Papadopoulos, S., Voipio, J., Kaila, K., & Gros, G. (2001). Extracellular carbonic anhydrase activity facilitates lactic acid transport in rat skeletal muscle fibres. *J.Physiol* **531**, 743-756.
- Wetzel, P., Scheibe, R. J., Hellmann, B., Hallerdei, J., Shah, G. N., Waheed, A., Gros, G., & Sly, W. S. (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.
- Wilson, M. C., Jackson, V. N., Heddle, C., Price, N. T., Pilegaard, H., Juel, C., Bonen, A., Montgomery, I., Hutter, O. F., & Halestrap, A. P. (1998). Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *J.Biol.Chem.* **273**, 15920-15926.

Abkürzungsverzeichnis

%(v/v)	Prozent (Volumen/Volumen)
%(w/v)	Prozent (Gewicht/Volumen)
°C	Grad Celsius
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AE	<i>Anion Exchanger</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bidest	zweifach destilliertes Wasser
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
BZ	Benzolamid / 2-Benzenesulfonamido-1,3,4-thiadiazol-5-sulfonamid
CA	Carboanhydrase
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)
Da / Dalton	(Einheit der relativen Atommasse)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemolumineszenz
EDL	<i>Musculus Extensor Digitorum Longus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid / 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid
ETZ	Ethoxzolamid / 6-Ethoxy-2-Benzothiazol-sulfonamid
FG	<i>fast twitch glycolytic</i>
FOG	<i>fast twitch oxidative and glycolytic</i>
<i>forward</i>	vorwärts
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure

IgG	Immunglobulin G
KBp	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
KLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
<i>ko</i>	<i>knockout</i>
KOH	Kaliumhydroxid
M	Molar
mA	Milliampere
MCT	Monocarboxylat-Transporter
Mg	Magnesium
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NBC	Natrium-Bikarbonat- <i>Cotransporter</i>
NHE	Natrium-Proton- <i>Exchanger</i>
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PF	Pufferfaktor
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
pH _i	pH _{<i>intracellular</i>} , intrazellulärer pH-Wert
pH _s	pH _{<i>surface</i>} , oberflächlicher pH-Wert
<i>reverse</i>	rückwärts
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodin Rezeptor
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERCA 2	SR/ER-Ca ²⁺ -ATPase 2
SL	Sarkolemm
SLC	<i>Solute Carrier</i>
<i>Soleus</i>	<i>Musculus Soleus</i>
SO	<i>slow twitch oxidative</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

TAE	Tris-Eisessig-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TBST	Trisgepufferte Kochsalzlösung/Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMSDMA	N,N-Dimethyltrimethylsilylamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenylpolyethylenglycol
TSchG	Tierschutzgesetz
T-Tubulus	Transversaler Tubulus
Tween 20	Polyoxyehtylen-Sorbitanmonolaureat
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	Über Nacht
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp

Danksagung

Hiermit möchte ich zuallererst allen Personen danken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Ohne sie wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen, da die elektrophysiologische Aufgabenstellung, der Umzug der Abteilung und die unvorhersehbare Quarantäne der Mäuse eine große Herausforderung dargestellt haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerolf Gros bedanken. Er hat das Thema zur Verfügung gestellt, diese Arbeit hauptsächlich finanziert und mit seiner Hilfe und seiner steten Diskussionsbereitschaft maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Jürgen Alves für die spontane und unkomplizierte Übernahme des Koreferates danken. Durch seine rechtzeitige Motivation habe ich diese Arbeit fertig stellen können.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Volker Endeward. Die Verbreitung seiner unerschütterlichen Ruhe und guten Laune im Labor hat diese Arbeit wesentlich beeinflusst. Er konnte all meine (un-)möglichen Fragen jederzeit unkompliziert beantworten. Darüber hinaus hat er mir bei allen physiologischen, physikalischen, technischen Problemen mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Des Weiteren möchte ich Herrn Werner Zingel für die Zucht und Genotypisierung der Mäuse danken, sowie für unzählige Gänge ins Tierhaus, die damit verbunden waren.

Insbesondere danke ich Frau Dr. Nina Hanke und Frau Stefanie Reuß für ihre stets freundschaftliche Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit.

Allen weiteren Mitarbeitern der „Vegetativen Physiologie“ möchte ich für das angenehme und produktive Arbeitsklima danken. Es freut mich sehr, dass hierbei sogar Freundschaften entstanden sind.

Auch viele meiner Freunde bleiben hier namentlich unerwähnt, obwohl sie mir auch in privatem Rahmen den nötigen Halt gegeben haben. Dafür möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Ohne meine Eltern Heike und Horst Hallerdei wäre die Beendigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Durch ihren bedingungslosen Rückhalt, ihre großzügige moralische und finanzielle Unterstützung und ständige Ermutigung haben sie mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht. Dafür möchte ich ihnen von ganzem Herzen danken.

Nicht zuletzt danke ich meinem Lebenspartner René Franz. Seine Unterstützung ging weit über das Maß des Selbstverständlichen hinaus. Er hat mich während dieser Jahre begleitet und mir den Rücken frei gehalten. Auch in besonders schwierigen Zeiten hat er nie den Glauben an mich verloren. Kaum jemand kann nachvollziehen, was das (für mich) bedeutet.

Meine Dankbarkeit ist hier schwierig in Worte zu fassen, daher ein Einfaches:
Ich liebe Dich.

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

Beteiligung der Carboanhydrase-Isoenzyme IV, IX und XIV an H^+ - oder HCO_3^- - gekoppelten Transportprozessen, untersucht an Skelettmuskelfasern von Carboanhydrase-*knockout* Mäusen

selbstständig verfasst habe und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 29.05.09

(Janine Hallerdei)

Wissenschaftliche Publikationen

Originalpublikationen:

- 2007 P. Wetzel, R. J. Scheibe, B. Hellmann, **J. Hallerdei**, G. N. Shah, A. Waheed, G. Gros and W. S. Sly
Carbonic anhydrase XIV in skeletal muscle: subcellular localization and function from wild-type and knockout mice
American Journal of Physiology - Cell Physiology 293: C358-C366
- 2007 R. J. Scheibe, K. Mundhenk, T. Becker, **J. Hallerdei**, A. Waheed, G. N. Shah, W. S. Sly, G. Gros and P. Wetzel
Carbonic anhydrases IV and IX – their subcellular localization and functional role in mouse skeletal muscle
American Journal of Physiology - Cell Physiology 294: C402-C412

Abstracts:

- 2008 P. Wetzel, **J. Hallerdei**, R. J. Scheibe, G. Gros
Lactate transport in skeletal muscle fibers of carbonic anhydrase IV, IX or XIV knockout mice
(*The 87th Annual Meeting of The German Physiological Society, 02/03/2008-05/03/2008, Cologne, Germany*)
- 2007 P. Wetzel, **J. Hallerdei**, A. Waheed, W. S. Sly, G. Gros, R. J. Scheibe
Carbonic anhydrases IV, IX and XIV of the sarcoplasmic reticulum from mouse skeletal muscle fibers
Acta Physiologica 189, supplement 653, 013-4