

Elektrophysiologische Untersuchungen zur
pH-Abhängigkeit
stationärer und transienter
Pumpenströme
der Na^+/K^+ -ATPase

Diplomarbeit

im Fachbereich Physik
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main

vorgelegt von
Petrus Stephan Salonikidis

Max-Planck-Institut für Biophysik
Frankfurt am Main
Dezember 1998

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis Dezember 1998 am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Wolfgang Schwarz angefertigt

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITENDER TEIL.....	A.3.1-5
A.1. FRAGESTELLUNG.....	A.3.1-5
A.2. ZUSAMMENFASSUNG.....	A.3.1-5
A.3. EINLEITUNG.....	A.3.1-7
A.3.1. Die Na^+/K^+ -ATPase.....	A.3.1-7
I. Einleitung.....	A.3.1-7
II. Struktur.....	A.3.1-9
III. Normaler Pumpenmodus.....	A.3.1-9
IV. Na/Na-Austausch.....	A.3.1-10
V. Inhibierung durch Ouabain.....	A.3.1-10
A.3.2. <i>Xenopus laevis</i> Südafrikanischer Krallenfrosch.....	A.3.2-11
I. Klassifikation:.....	A.3.2-11
II. Vorkommen:.....	A.3.2-11
III. Morphologie:.....	A.3.2-11
IV. Ökologie:.....	A.3.2-12
A.3.3. Oozyten des <i>Xenopus laevis</i>	A.3.3-13
I. Einleitung:.....	A.3.3-13
II. Entwicklungsphysiologie:.....	A.3.3-13
A.4. METHODEN.....	A.3.3-14
A.4.1. Haltung des <i>Xenopus laevis</i>	A.4.1-14
A.4.2. Gewinnung und Behandlung der Oozyten.....	A.4.2-14
I. Einleitung:.....	A.4.2-14
II. Ovar:.....	A.4.2-14
III. Operation:.....	A.4.2-15
IV. Mechanische und enzymatische Defollikulierung:.....	A.4.2-16
V. Aufbewahrung der Oozyten:.....	A.4.2-16
VI. RNA-Injektion:.....	A.4.2-17
VII. Devitelinisierung:.....	A.4.2-18
VIII. Na-Beladung für Voltage-Clamp-Experimente.....	A.4.2-18
A.4.3. Das Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Verfahren.....	A.4.3-19
I. Einleitung:.....	A.4.3-19
Spannungsklemme.....	A.4.3-19
III. Meßstand:.....	A.4.3-20
IV. Elektroden.....	A.4.3-20
V. Herstellung Agar-gefüllter Mikroelektroden.....	A.4.3-21
VI. Meßkammer und Lösungswechsel:.....	A.4.3-22
A.4.4. Das Patch-Clamp-Verfahren.....	A.4.4-23
I. Einleitung:.....	A.4.4-23
II. Spannungsklemme:.....	A.4.4-24
III. Meßstand.....	A.4.4-26
IV. Elektroden:.....	A.4.4-26
Herstellung der Glaspipette für die Mikroelektrode.....	A.4.4-27
VI. Meßkammer und Lösungswechsel.....	A.4.4-28
VII. Sealbildung.....	A.4.4-29
VIII. Konfigurationen des Patch-Clamp.....	A.4.4-29
A.4.5. Methodik der Auswertung aufgenommener Ströme.....	A.4.5-31
I. Einleitung:.....	A.4.5-31
II. Auswertung von steady-state-Strömen:.....	A.4.5-31
III. Auswertung transienter Ströme:.....	A.4.5-31
A.5. MATERIAL.....	A.4.5-32
A.5.1. Lösungen.....	A.5.2-32
I. Standardlösungen:.....	A.5.2-32
A.5.2. Chemikalien.....	A.5.3-34
A.5.3. Geräte.....	A.5.4-34
A.5.4. Arbeitsmaterial.....	A.5.5-35
A.5.5. Software.....	A.5.6-35

B. ERGEBNISTEIL.....	A.5.6-36
B.1. ERGEBNISSE PH-ABHÄNGIGER KALIUMDIFFERENZEN.....	A.5.6-36
B.1.1. Einleitung.....	B.1.1-36
B.1.2. pH-Abhängigkeit eines kaliumaktivierten Pumpenstroms bei Abwesenheit von extrazellulärem Natrium.....	B.1.2-36
B.1.3. Einfluß des Protonen-Einwärtsstroms bei Abwesenheit von extrazellulärem Kalium und Natrium auf die Ergebnisse.....	B.1.3-38
B.1.4. pH-Abhängigkeit eines kaliumaktivierten Pumpenstroms bei Anwesenheit von extrazellulärem Natrium.....	B.1.4-40
B.2. ERGEBNISSE DER TRANSIENTEN STROMPULSE DES NA/NA-AUSTAUSCHES.....	B.1.4-42
B.2.1. Einleitung.....	B.2.1-42
B.2.2. pH-Abhängigkeit der durch den Austausch verschobenen Ladung beim Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Verfahren.....	B.2.2-43
B.2.3. pH-Abhängigkeit der Relaxationszeitkonstanten beim Patch-Clamp-Verfahren.....	B.2.3-47
B.2.4. pH-Abhängigkeit der Amplituden beim Patch-Clamp-Verfahren.....	B.2.4-52
B.3. EINFLUß DES ENDOGENEN STROMANTEILS BEI DEN ERGEBNISSEN DER OUABAINSENSITIVEN (OS) Na^+/K^+ -ATPASE.....	B.2.4-56
C. DISKUSSIONSTEIL.....	B.2.4-60
C.1. DISKUSSION DER ERGEBNISSE PH-ABHÄNGIGER KALIUMDIFFERENZEN.....	B.2.4-60
C.2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE TRANSIENTER STROMPULSE.....	B.2.4-62
D. ANHANG.....	B.2.4-64
D.1. LITERATURVERZEICHNIS.....	B.2.4-64
D.2. ERKLÄRUNG.....	B.2.4-68
D.3. DANKSAGUNG.....	B.2.4-68

A. Einleitender Teil

A.1. Fragestellung

Das in der Plasmamembran tierischer Zellen vorkommende Enzym "Na⁺/K⁺-ATPase" setzt katalytisch ATP in ADP um. Als transmembranes Protein vollführt es während der Katalyse einen elektrogenen Zyklus von Konformationsänderungen, wobei 3 intrazelluläre Na⁺ gegen 2 extrazelluläre K⁺ ausgetauscht werden, und besitzt damit die Funktion eines primär aktiven Ionentransporters. Bisherige Aktivitätsmessungen, z.B. von B. Vilsen (Vilsen, 1994), an dem in Lösung befindlichen Enzym ergaben deutliche pH-Abhängigkeiten der Aktivität, die auf eine intrazelluläre Wechselwirkung des Protons mit der ATPase zurückgeführt wurden. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit war nun die Frage zu klären, inwieweit der extrazelluläre pH-Wert auf die Transportfunktion der in der Membran liegenden Na⁺/K⁺-ATPase einen Einfluß ausübt. Es wurden daher elektrophysiologische Messungen mit dem Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Verfahren und dem Giant-Patch-Clamp-Verfahren an der Zellmembran von Oozyten des *Xenopus laevis* durchgeführt und die pH-Abhängigkeit von durch die Na⁺/K⁺-ATPase verursachten transmembranen stationären als auch transienten Ionenströmen analysiert. Die stationären (steady-state) Ströme sind ein Maß für die Pumpaktivität, während die transienten auf Partialreaktionen des Enzyms schließen lassen.

A.2. Zusammenfassung

Die elektrophysiologischen Messungen wurden an der ouabainsensitiven und der ouabainresistenten Na⁺/K⁺-ATPase des *Torpedo californica* durchgeführt. Als Expressionssystem diente die Oozyte des *Xenopus laevis*. Die Messungen wurden mit Hilfe des Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Verfahrens sowie des Giant-Patch-Clamp-Verfahrens durchgeführt. Um eine pH-Abhängigkeit zu untersuchen, wurden steady-state- als auch transiente Ströme bei den pH-Werten pH6, pH7,5 und pH9 gemessen. Als Pumenströme wurden die K⁺-aktivierbaren oder Ouabain-inhibierbaren Stromkomponenten betrachtet. Zunächst wurde die pH-Abhängigkeit von Pumpenströmen der im normalen Modus arbeitenden, ouabainsensitiven Na⁺/K⁺-ATPase untersucht. Die Pumpenströme wurden durch [K⁺]_o=5mM aktiviert und durch [K⁺]_o=0mM inhibiert. Die Messungen in einem natriumfreien extrazellulären Medium ergaben eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit der Strom-Spannungskennlinien der Pumpenströme. Dieser Effekt wurde zum großen Teil auf einen, bei J.Rettinger (Rettinger, 1996) beschriebenen, Protonen-Einwärtsstrom zurückgeführt. Durch eine Korrektur konnten die vom Protoneneinwärtsstrom unbeeinflussten Pumpenströme analysiert werden, und es zeigte sich Potentialunabhängigkeit der Strom-Spannungskennlinien bei pH6 und pH9, während bei pH7,5 Potentialabhängigkeit (positive Steigung im negativen Potentialbereich) zu erkennen war. Dies wurde auf eine protonierbare im "access-channel" angenommene Stelle zurückgeführt, welche dann einen Einfluß auf die Affinität der Kationenbindung ausüben könnte. In hochnatriumhaltigem extrazellulären Medium (100mM) war dieser pH-

abhängige Effekt nicht nachweisbar, die Strom-Spannungskennlinien folgten dem schon bekannten Verlauf (Rakowski *et al.*, 1997) mit einer positiven Steigung im negativen Potentialbereich.

Weiterhin wurden transiente Ströme des Na/Na-Austausches sowohl an der ouabainsensitiven (OS) als auch an der ouabainresistenten (OR) Na⁺/K⁺-ATPase untersucht. Hierfür wurde in hochnatriumhaltigem (100mM) und kaliumfreiem extrazellulären Medium gemessen. Der Na/Na-Austausch der OS Pumpe wurde extrazellulär mit 100µM Ouabain inhibiert, während der der OR Pumpe mit 10mM Ouabain inhibiert wurde. Messungen mit dem Two-Elektrode-Voltag-Clamp-Verfahren ergaben auf Grund der zu geringen Zeitauflösung keine analysierbare pH-Abhängigkeit. Für die bei diesen Messungen festgestellte Ladungsverschiebung konnte eine effektive Wertigkeit von $z_q = 0,80 \pm 0,02$ ermittelt werden, was mit den Angaben von J. Rettinger *et al.* (Rettinger *et al.*, 1994) vergleichbar ist.

Die Messungen mit dem Giant-Patch-Clamp-Verfahren an der OR und OS Pumpe ergaben für transiente Ströme einen relaxierenden Strom-Zeitverlauf, der einer Linearkombination aus drei unterschiedlich schnell relaxierenden Exponentialfunktionen mit verschiedenen Amplituden entspricht. Die Zeitkonstanten ließen keine signifikante pH-Abhängigkeit erkennen. Ihre Werte lagen in den Bereichen 10-10 µs, 1-5ms und 10-200ms, wobei die am schnellsten relaxierende Funktion nicht analysiert werden konnten. Die langsam relaxierende Exponentialfunktion ließ sich der Konformationsänderung zuordnen, die mittelschnell relaxierende der extrazellulären Wechselwirkung mit den Na⁺-Ionen. Die Amplituden hingegen zeigten eine pH-Abhängigkeit. Im depolaren Potentialbereich hatten die Amplituden der mittelschnell relaxierenden Funktion bei pH6 eine größere Potentialabhängigkeit als bei pH9. Die Amplituden der langsam relaxierenden Funktion hatten im hyperpolaren Potentialbereich bei pH6 eine geringere Potentialabhängigkeit als bei höheren pH-Werten. Im ersten Fall könnte eine Protonierung an einer Stelle der ATPase die Potentialabhängigkeit über eine Veränderung des "access-channels" verstärken, im zweiten Fall könnte diese in die Konformationsänderung eingebunden sein.

A.3. Einleitung

A.3.1. Die Na^+/K^+ -ATPase

I. Einleitung

Die meisten tierischen Zellen benötigen für ihre zellulären Funktionen intrazellulär eine hohe Kalium- und eine niedrige Natriumkonzentration, wohingegen extrazellulär das Verhältnis genau das umgekehrte sein muß. Da jedoch die Membran eine passive Permeabilität gegenüber Na^+ und K^+ aufweist, muß es einen gegen die Konzentrationsgradienten arbeitenden Pumpenmechanismus in der Membran geben, welcher die Gradienten aufrechterhält: die Na^+/K^+ -ATPase. Sie wurde 1957 von J.C. Skou entdeckt (Skou, 1957). Biochemisch gesehen ist die Na^+/K^+ -ATPase ein Enzym, welches ATP (Adenosintriphosphat), einen für Stoffwechselprozesse der Zellen wichtigen Energieträger, katalytisch in ADP (Adenosindiphosphat) umsetzt. Viele tierische Zellen, hier sind vor allem Nerven- und Muskelzellen zu nennen, bauen dieses durch Proteinbiosynthese ihrer Ribosomen gewonnene Enzym in ihre Zellmembran ein. In der Membranlipiddoppelschicht und dem Zytoskelett verankert vollführt dieses transmembrane Protein einen Ionentransport durch die Membran, indem es durch intrazelluläres ATP phosphoryliert wird. Man unterscheidet Grundsätzlich zwei Transportarten von Ionen durch die Zellmembran: eine passive und eine aktive. Ist die passive hauptsächlich von Diffusionskräften und dem Membranpotential bestimmt und findet sie über transmembrane Ionenkanäle statt, so ist der aktive Transport durch eine negative Änderung der freien Enthalpie gekennzeichnet und ermöglicht somit einen Transport auch gegen Diffusions- und Potentialgradienten. Ist das Protein allein auf die Anwesenheit der zu transportierenden Ionen angewiesen, spricht man von einem sekundär aktiven Transport. Müssen jedoch weitere Substanzen, wie zum Beispiel das ATP bei der Na^+/K^+ -ATPase, in den Energieumsatz zur freien Enthalpieniedrigung einfließen, liegt ein primär aktiver Transport vor. Während der Umsetzung von ATP in ADP durchläuft die Na^+/K^+ -ATPase unter physiologischen Bedingungen einen elektrogenen Zyklus von Konformationsänderungen, wobei sie 2 extrazelluläre K^+ gegen 3 intrazelluläre Na^+ austauscht bzw. pumpt; man bezeichnet diesen Zyklus auch als den normalen Pumpenmodus. Alle Membranpumpen, die wie die Na^+/K^+ -ATPase, H^+/K^+ -ATPase und auch Ca^{2+} -ATPase Kationen über die Membran transportieren, faßt man unter dem Begriff "P-type ATPasen" zusammen. Sie alle haben die zeitweise Phosphorylierung an einem Aspartatrest während des Transportzyklus gemeinsam. Es sei hierzu auf (Schwarz, 1994) verwiesen.

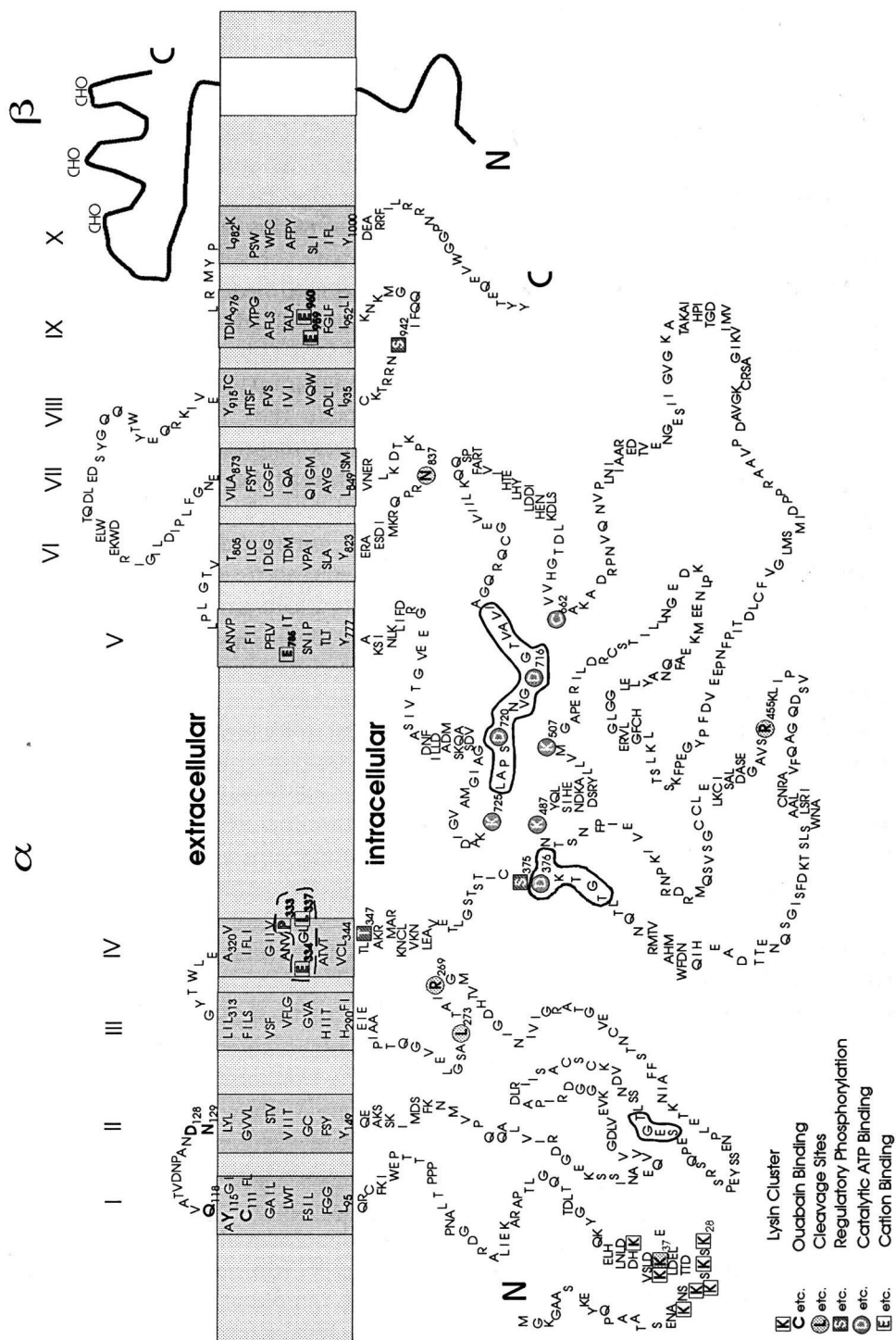


Abb.1: Aminosäuresequenz der α -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo* electroplax mit einer möglichen Orientierung der Pumpe in der Membran. Die für die ATP- und Kationenbindung funktionell relevant gehaltenen Aminosäuren wurden markiert. Der lange graue Balken symbolisiert die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran. Wie man deutlich erkennt, hat die α -Untereinheit 10 Transmembransequenzen (I-X). Die glykosylierte β -Untereinheit ist nur ihrer möglichen Orientierung nach schematisch abgebildet. Die Abbildung entstammt (Vasilets & Schwarz, 1994).

II. Struktur

Die Na^+/K^+ -ATPase gehört, wie schon erwähnt, zu den P-type ATPasen. Das integrale Membranprotein ist ein Heterodimer und besteht aus 3 Untereinheiten: einer katalytischen α -Untereinheit aus 112 kD, einer kleineren glykosilierten β -Untereinheit aus 55 kD und einer γ -Untereinheit aus ungefähr 10 kD {Abb.1}.

Die α -Untereinheit ist im wesentlichen verantwortlich für die katalytische ATP-Umsetzung und den Kationentransport. Sie hat 10 transmembrane Sequenzen, wobei sowohl ihr N- als auch ihr C-Terminus auf der intrazellulären Seite sich befinden. Es wurden bisher 4 verschiedene Isoformen der α -Untereinheit gefunden. Funktionell unterscheiden sie sich vor allem in ihrer Ouabainsensitivität {V}. Häufig sind die jeweiligen Isoformen zwischen den Spezies strukturell sehr ähnlich, während sie innerhalb einer Spezies stärker voneinander abweichen. Von der α -Untereinheit der Spezies *Torpedo californica* und *Xenopus laevis* hingegen ist bisher nur eine ouabainsensitive Isoform bekannt. Zu dem obigen sei auf (Vasilets & Schwarz, 1994) und (Schwarz, 1994) verwiesen.

Die β -Untereinheit gewährleistet eine korrekte Faltung der α -Untereinheit und bildet eine Voraussetzung für den Einbau des $\alpha\beta$ -Komplexes und den Kationentransport. Sie hat eine einzige Transmembransequenz, wobei ihr N-Terminus auf der intrazellulären und ihr C-Terminus auf der extrazellulären Seite sich befindet. Bei der β -Untereinheit sind bisher 3 Klassen strukturell unterschiedlicher Isoformen identifiziert. Jedoch besitzen die Spezies *Torpedo californica* und *Xenopus laevis* jeweils nur eine Isoform. Es sei hierzu auf (Schmalzing & Gloor, 1994) verwiesen.

Die γ -Untereinheit besteht aus 58 Aminosäuren. Sie hat eine einzige hydrophobe Domäne, was dennoch ausreicht, die Membran zu durchqueren, und besitzt dadurch eine Transmembransequenz (Mercer *et al.*, 1993). Die Funktion dieser Untereinheit war bisher noch unklar. Neuere Forschungen (Therien *et al.*, 1997) deuten jedoch darauf hin, daß die γ -Untereinheit ein gewebespezifischer Regulator ist, der das stationäre Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen Konformationen der Na^+/K^+ -ATPase hin zur E_1 -Konformation {III} verschieben kann.

III. Normaler Pumpenmodus

Der Reaktionszyklus der Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Na^+/K^+ -ATPase wird von Konformationsänderungen des Proteins und von Okklusionen und Deokklusionen der gebundenen Kationen begleitet, wobei hier ganz wesentlich die umgebenden Ionenkonzentrationen und das elektrische Feld eine Rolle spielen. Unter physiologischen Bedingungen findet man vorwiegend den in Abbildung {Abb.2} dargestellten Reaktionszyklus vor. In der Konformation E_1 mit ATP ($E_1\text{ATP}$) binden 3 Na^+ intrazellulär an die Kationenbindungsstellen des Proteins, wobei angenommen wird, daß zwei der drei Bindungsstellen negativ geladen sind ($3\text{Na}E_1\text{ATP}$). Dadurch wird die Phosphorylierung und eine darauf folgende spontane Okklusion der 3 Na^+ eingeleitet ($(3\text{Na})E_1\text{P}$), bei der die Kationen auf Grund einer hohen Energiebarriere an der Dissoziation gehindert werden. Nach einer Änderung der Konformation zu E_2 hin ($3\text{Na}E_2\text{P}$) werden die Natriumionen durch eine Deokklusion in das extrazelluläre Medium entlassen ($E_2\text{P}$). An die negativ geladenen Bindungsstellen binden nun 2 K^+ ($2\text{K}E_2\text{P}$), wodurch eine Dephosphorylierung und damit eine Okklusion der Kationen eingeleitet wird ($(2\text{K})E_2$). Durch das Binden von ATP findet eine Konformationsänderung hin zu E_1 statt ($2\text{K}E_1\text{ATP}$). Eine Deokklusion entläßt

die 2 K^+ in das intrazelluläre Medium (E_1ATP) und der Reaktionszyklus hat sich hiermit geschlossen.

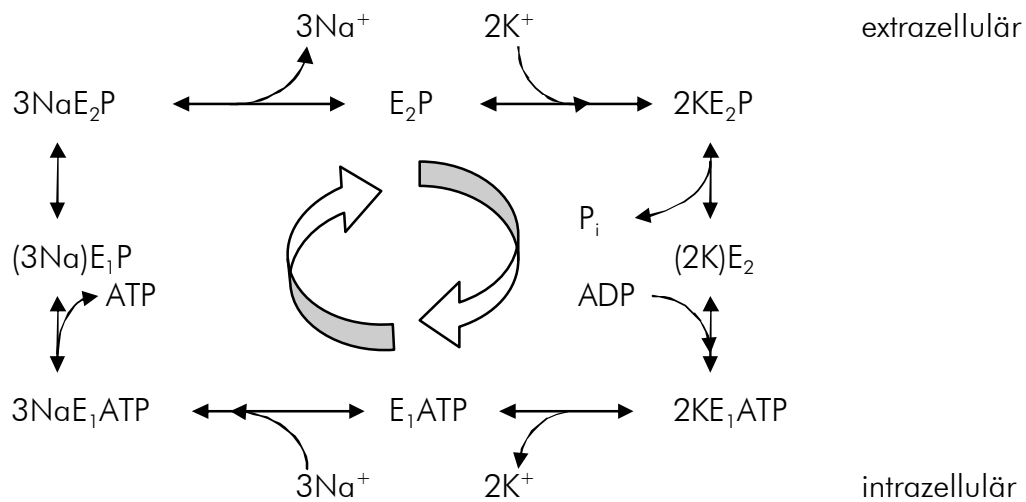


Abb.2: Das vereinfachte Reaktionsschema für den normalen Pumpenmodus der Na^+/K^+ -ATPase nach R.W. Albers (Albers, 1967) und R.L. Post et al. (Post et al., 1969). Die breiten Pfeile beschreiben die Richtung des Pumpzyklus.

IV. Na/Na -Austausch

Neben dem normalen Pumpenmodus existieren noch viele andere Modi der Na^+/K^+ -ATPase, deren Auftreten wesentlich von den die Pumpe umgebenden Bedingungen abhängig ist. Ist zum Beispiel kein extrazelluläres Kalium vorhanden, kann der normale Pumpenmodus nicht mehr vollständig durchlaufen werden. Es wird nun von der Pumpe hauptsächlich ein elektroneutraler Modus bevorzugt, bei dem ein $3Na^+/3Na^+$ -Austausch stattfindet. Dabei wird die Hälfte des Reaktionszyklus aus Abbildung {Abb.2} mit Aufnahme und Abgabe der $3Na^+$ in beide Richtungen durchlaufen. Die Anwesenheit von intrazellulärem ATP ist zwar erforderlich, es findet aber keine Netto-ATP-Hydrolyse statt. Hierzu sei auch auf I.M. Glynn und S.J.D. Karlish (Glynn & Karlish, 1975) sowie auf R.F. Rakowski (Rakowski, 1993) verwiesen

V. Inhibierung durch Ouabain

Die Pumpfunktion der Na^+/K^+ -ATPase kann extrazellulär durch das im Fingerhut (*Digitalis*) oder im Wabajobaum (*Strophanthus*) vorkommende Gift Ouabain inhibiert werden. Die Sensitivität der für die Inhibierung verantwortlichen Rezeptoren der Pumpe ist von der Isoform der α -Untereinheit abhängig. Die Lage der Rezeptoren in dieser Untereinheit ist jedoch noch nicht uitgemaakt. Hingegen gilt als sicher, daß die Aminosäurereste Gln118 und Asn129 {Abb.1}, welche an den Endstellen der ersten extrazellulären Schleife der Untereinheit sitzen, die Ouabainbindung wesentlich beeinflussen. Werden diese elektrisch neutralen Aminosäurereste durch geladene ersetzt, wird die Pumpe um ein vielfaches ouabaininsensitiver, wie bei der für diese Arbeit verwandten ouabainresistenten Na^+/K^+ -

ATPase des *Torpedo californica* geschehen. Weiteres hierzu findet man in den Arbeiten von E.M. Price und J.B. Lindgrel (Price & Lingrel, 1988) sowie L. Vasilets und W. Schwarz (Vasilets & Schwarz, 1994).

A.3.2. *Xenopus laevis* Südafrikanischer Krallenfrosch

I. Klassifikation:

Die Spezies *Xenopus laevis* oder auch südafrikanischer Krallenfrosch, gehört zu der Klasse der Amphibien, der Unterklasse der Apsidopondyli, der Ordnung der Anura, der Unterordnung der Opisthocoela, der Familie der Pipidea und schließlich der Unterfamilie der Xenopoinae (Kado R.T., 1997).

II. Vorkommen:

Die Familie der Pipidea spaltet sich in zwei Verbreitungsgebiete auf. Zum einen findet man sie im tropischen Südamerika östlich der Anden und im benachbarten Panama, zum anderen in südlich der Sahara gelegenen Teilen Afrikas; dort trifft man auch die Unterfamilie der Xenopoinae an {Abb: 3}.

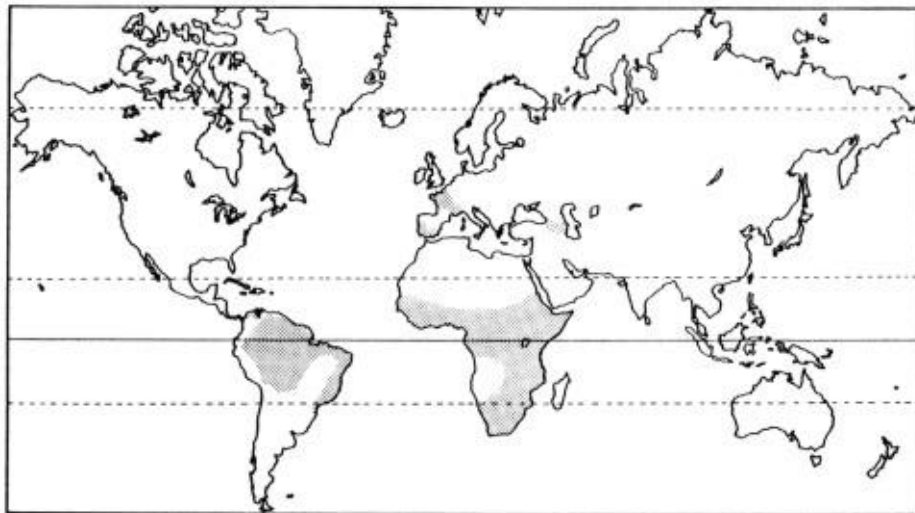


Abb: 3: Vorkommen lebender Mitglieder der Familie Pipidae in Süd-Amerika und der Familie Pelodytidae in Europa und Süd-west-Asien. (Duellman & Trueb, 1994)

III. Morphologie:

Die Weibchen des *Xenopus laevis* können länger als 10 cm werden {Abb. 4}. Die Männchen sind in der Regel 10-30% kleiner. Die Haut ist weich und auf der Oberseite dunkel pigmentiert, sie kann ihre Farbe jedoch je nach Umgebung recht schnell ändern. Sie bildet ein schleimiges Sekret, das ein Antibiotikum sowie ein Toxin enthält, wobei

letzteres für den Menschen sich als ungefährlich erweist. Farbwechsel und Sekretion stellen im übrigen die wirksamsten Abwehrmechanismen des Frosches dar. Die Männchen zeichnen sich zudem noch durch viele Pusteln auf dem Kopf aus. *Xenopus laevis* gab man seinen Namen wegen seiner, mit jeweils drei langen Krallen besetzten Hinterfüße (Kobel et al., 1996b).

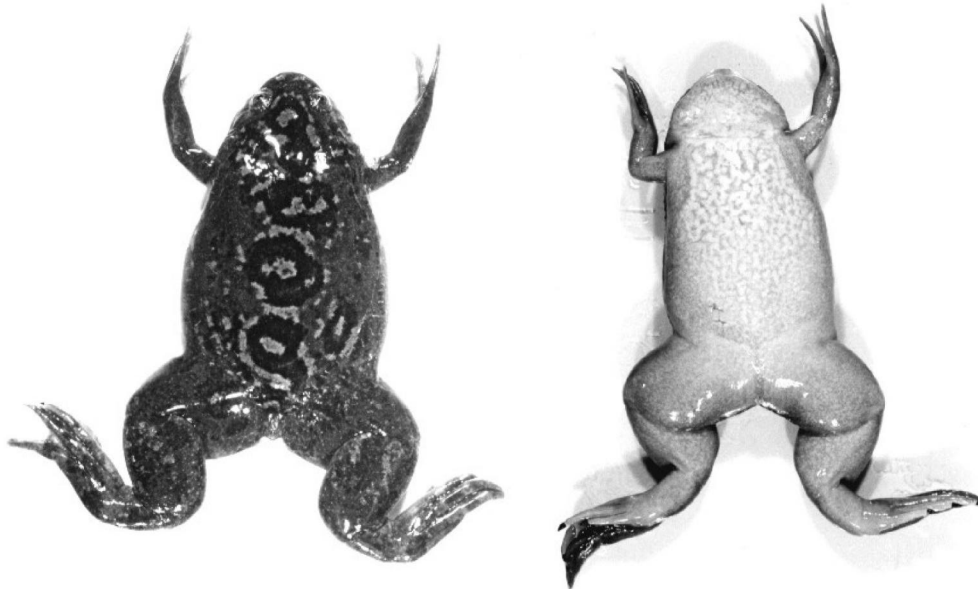


Abb. 4: ausgewachsenes *Xenopus laevis* Weibchen in Rückenansicht (links) und Bauchansicht (rechts).

IV. Ökologie:

Xenopus laevis lebt in so gut wie allen Gewässern: Man findet ihn in Flüssen, Seen, Sümpfen, überfluteten Gruben und Mulden. Er vermehrt sich sowohl in saurem als auch in alkalischem Wasser. Experimente zeigen, daß er bis zu 40% Seewasser für mehrere Tage toleriert, was für Amphibien sehr ungewöhnlich ist. *Xenopus laevis* hat sich in Regionen unterschiedlichster Temperaturen angesiedelt. Seine natürlichen Lebensräume verlassend hat er sogar in eisüberfrorenen Seen Virginias und in den Wüstenseen Arizonas, die großer Hitze ausgesetzt sind, überlebt. Alle Studien zeigen, daß *Xenopus* ein mehr oder weniger nicht-selektiver Räuber ist, der alles frißt, was sein Organismus nur aufnehmen kann. Die Beute wird vom Frosch durch ihre Bewegung wahrgenommen. Anschließend schaufelt der Frosch mit den Vorderfüßen die Beute zu seinem Maul, um sie mit dem zahnigen Kiefer festzuhalten. Mit den Krallen der Hinterfüße reißt er schließlich maulgerechte Stücke aus seiner Beute (Kobel et al., 1996a).

A.3.3. Oozyten des *Xenopus laevis*

I. Einleitung:

In der Forschung im Bereich der Biophysik, Biochemie, Elektrophysiologie und Entwicklungsphysiologie haben sich die Oozyten des *Xenopus laevis* als zelluläres Expressions- und Translationssystem, sowie als entwicklungsphysiologisches Modell als äußerst erfolgreich erwiesen. Diese weitgehend undifferenzierten Zellen eignen sich auf Grund ihrer hohen Translationsraten, die auf die große Anzahl an Ribosomen zurückgeführt werden können, ausgesprochen für Untersuchungen an exprimierten oozytenfremden Proteinen. Ihre schnelle Proteinbiosynthese ermöglicht *Xenopus* eine kurze Embryonalentwicklung. Betrachtet man die Größe der Oozyten (Durchmesser = 1,3 mm; tatsächliche Oberfläche = 22 mm²), eröffnen auch hier sich der Forschung viele Möglichkeiten.

II. Entwicklungsphysiologie:

Die Oogenese kann man bei Wirbeltieren in drei Phasen unterteilen: die Vermehrungs-, die Wachstums- und die Reifungsphase.

In der Proliferationsphase, der Vermehrungsphase, bilden sich aus der Urgeschlechtszelle über mitotische Teilungen bis zu 30000 Oozyten, die von Follikel- und Thekazellen umgeben sind. Zudem bildet sich hier der Translations-Apparat für die Boten-RNS (messenger-RNS bzw. mRNS) in den Oozyten vollständig aus.

In der Wachstumsphase findet eine wesentliche Volumenzunahme gegenüber der Proliferationsphase statt. Innerhalb dieser Phase unterscheidet man nach Dumont 6 Stadien (Duellman & Trueb, 1994). Während im Stadium I die Oozyte noch transparent ist, einen großen Zellkern und einen Durchmesser von 50-300 μm hat, wird im Stadium II das Zytoplasma bereits weißlich und es beginnt eine Protein- und Lipoid-Dotterbildung. Im Stadium III ist die Oozyte auf 450-650 μm angewachsen, weshalb sie jetzt zur Stabilisierung ein Exoskelett auf ihre Außenmembran auflagert, die sog. Vitellinhülle, die eine Dicke von 1 μm hat. Das Zytoplasma hat jetzt eine braun-schwarze Färbung. Im Stadium IV lagert sich der weißliche Dotter auf Grund seiner hohen Dichte unter das dunkle, ribosomenreiche leichtere Zytoplasma. Die sich so ausbildende, weißgelbe Hemisphäre der Oozyte bezeichnet man als die vegetative, die dunkle als die animale. Im Stadium V hat die Oozyte bereits einen Durchmesser von 1000-1200 μm erreicht. Ihr Kern ist nun auf Grund großer vakuolisierter Nukleoli in die animale Hemisphäre gestiegen, während sich 15 μm große Dotterorganellen in der vegetativen gesammelt haben. Schließlich löst sich die Oozyte in Stadium VI vom Follikelepithel, und die Aktivität der Transportsysteme in der Membran vermindert sich. Dieses Stadium tritt allerdings jeweils kurz vor dem Laichen ein.

In der Reifungsphase, in der sich die Oozyte zu einem besamungsfähigen Ei entwickelt, treten gravierende Veränderungen auf. So entsteht z.B. durch das Auflösen der Kernhülle eine unpigmentierte Kernsphäre am animalen Pol. Siehe hierzu auch Richter (Richter, 1997).

A.4. Methoden

A.4.1. Haltung des *Xenopus laevis*

Seine Unempfindlichkeit gegenüber Wasserqualität und Temperatur und die Tatsache, daß er ein Allesfresser ist, machen *Xenopus laevis* zu einem geeigneten Labortier. Auch Operationen können an dem Frosch auf Grund seiner Hautsekretion {A.3.2.III} unsteril vorgenommen werden, was einen weiteren Vorteil darstellt.

Da wir die Frösche in unserer Arbeitsgruppe nur zur Oozytengewinnung benötigen, halten wir nur die Weibchen. Gezüchtet werden unsere Frösche in großen Zuchtstationen in Südafrika. Die Frösche werden in großen Becken von 200 - 300 l Wasser bei schwacher Beleuchtung mit bis zu 20 Tieren pro Becken gehalten. Bei dem Wasser handelt es sich um normales Leitungswasser, welches zusätzlich über handelsübliche Aquariumkohle gefiltert wird. Die Wassertemperatur ist auf 18°C reguliert, was die Vitalität der Frösche herabsetzt, dafür aber Fäulnisprozesse und bakterielles Wachstum verlangsamt. Gefüttert werden die Frösche mit Herzmuskelfleisch vom Rind und mit Vitaminpräparaten.

A.4.2. Gewinnung und Behandlung der Oozyten

I. Einleitung:

Für die Versuche wurden Oozyten des Stadium V {A.3.3.II} des *Xenopus laevis* {0} verwendet, da sie auf Grund ihrer Größe für die RNA-Injektion {VI}, die Devitellinisierung {VII} und Defollikulierung {IV} und die Positionierung in der Meßkammer {A.4.3.VI u. A.4.4.VI} am besten geeignet sind. Zudem kann man sicher sein, bei der RNA-Injektion nicht den Kern zu treffen, da er sich im Stadium V in der animalen Hemisphäre befindet. Durch eine Operation {III} wird dem Frosch ovariales Gewebe {II} entnommen, in dem sich die Oozyten befinden. Die Oozyten werden von dem sie umgebenden Gewebe enzymatisch bzw. mechanisch gereinigt und vereinzelt {IV}. Die ausselektierten Oozyten des Stadiums V werden dann vor und nach der RNA-Injektion in G-ORI {A.5.2.I} aufbewahrt und sind so bis zu 3 Wochen brauchbar. Um bei Patch-Clamp-Experimenten {A.4.3} eine Sealbildung {A.4.4.VII} zu erreichen, müssen die Oozyten noch devitellinisiert {VII} werden, damit ein direkter Kontakt zwischen Patchpipette und Membran besteht. Zu allen Abschnitten dieses Kapitels sei auch auf Richter (Richter, 1997) verwiesen.

II. Ovar:

Die Oozyten des *Xenopus laevis* befinden sich in den Stadien I-VI {A.3.3.II} in sackförmigen Gebilden, den sog. Mesovarien im Bauchraum des Frosches. Die Oozyten der verschiedenen Stadien werden hierbei von Gewebe eingeschlossen, das aus Follikel-epithel, der bindegewebigen Theka und Ovar-epithel besteht. Eine Hauptaufgabe dieses mit Blutkapillaren durchdrungenen Gewebes besteht in der Nährstoffzuführung.

III. Operation:



Abb.6: Ovarentnahme

Zunächst muß dem Frosch durch eine Operation das Ovar entnommen werden. Man wählt hierfür ein Exemplar mit gut entwickelten Ovarien. Den Frosch legt man dann in eine Schale mit einem Betäubungsmedium, dessen Wirkstoff der Frosch über seine Haut absorbiert. Es wird hierfür MS222 {A.5.2} verwendet, das man normalerweise bei 4° Celsius lagert. Nach etwa 10 min überprüft man, ob bei dem Tier immer noch ein respiratorischer Schluckreflex vorhanden ist, indem man ihm in Rückenlage mit dem Finger leicht über die Kehlgion

streicht. Wenn dies nicht der Fall ist, ist die Betäubung ausreichend und wird etwa eine halbe bis eine Stunde anhalten. Da, wie schon erwähnt {A.4}, die Haut des Tieres ein Antibiotikum sekretiert, ist es möglich, die Operation unter nicht sterilen Bedingungen durchzuführen. Zur eigenen Sicherheit wird hierbei das Tier mit Leitungswasser vom MS 222 gereinigt und dann in einer Operationsschale rücklings auf Eis gelegt. Da der Frosch zu der Klasse der Amphibien gehört, hat er einen wechselwarmen Stoffwechsel, der durch das Eis herabgesetzt wird, wodurch ein zu frühes Aufwachen des Tieres aus seiner Betäubung verhindert wird. Der Schnitt wird am unteren Bereich des Bauchraumes entweder rechts- oder linksseitig vorgenommen, um den zentral gelegenen Ovarienstamm und die Abdominalarterie nicht zu verletzen. Mit einer Schere schneidet man nun einen etwa 1 cm langen Schnitt in die Lederhaut, und durchtrennt anschließend die darunterliegende Haut, sowie das Muskelgewebe. Durch die so entstandene Öffnung ergreift man mit Pinzetten das Ovar, das sich zwischen der Bauchdecke und den Organen jeweils rechts und links befindet. Vorsichtig zieht man einen ausreichenden Anteil des Ovar heraus {Abb.6}, schneidet es dann direkt über der Öffnung ab und legt es in eine Petrischale mit G-ORI {A.5.2.1}. Die Öffnung wird nun mit Nadel und steriler Nähseide mit zwei Stichen vernäht, wobei jeder Faden durch sämtliche Gewebsschichten der Bauchdecke geführt und dann verknotet wird {Abb.5}. Der Faden löst sich nach ein paar Wochen von selbst auf, während die Wunde schon längst verheilt ist. Nach Beendigung der Operation wird der Frosch zum Aufwachen aus seiner Betäubung in eine leicht gefüllte Wanne mit Leitungswasser gelegt, so daß er einerseits noch atmen kann, andererseits aber nicht austrocknet. Nach etwa einer viertel Stunde ist der Frosch erwacht und wird nun in ein abgedunkeltes Gefäß mit 0,05%iger Seesalzlösung gegeben (einfaches Leitungswasser ist zu keimbelastet), um dann nach einem Tag Erholung wieder in ein mit wenig Fröschen besetztes Haltebecken zu kommen.

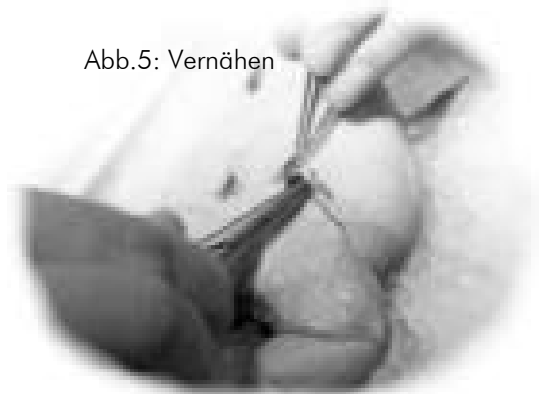


Abb.5: Vernähen

IV. Mechanische und enzymatische Defollikulierung:

Grundsätzlich gibt es zwei Methoden, Oozyten aus dem ovarialen Gewebe zu vereinzeln. Um die Oozyten aus der sie umgebenden Follikelschicht zu befreien, kann man zwischen einer mechanischen und einer enzymatischen Defollikulierung wählen. Beide haben ihre Vor- und Nachteile.

Bei der mechanischen Defollikulierung werden die Oozyten, die man in eine große, mit G-ORI gefüllte Petrischale legt, aus ihrem größeren ovarialen Gewebeverband separiert, was relativ einfach ist. Danach sind die nun einzeln vorliegenden Oozyten noch von einer Follikel-Theka-Schicht umgeben. In diesem Zustand kann man die Oozyten erfahrungsgemäß für eine längere Zeit aufbewahren, als wenn die Follikelschicht, wie weiter unten beschrieben, bereits enzymatisch entfernt ist. Dies stellt den Hauptvorteil der mechanischen Defollikulierung dar. Die Nachteile bei vorhandener Follikelschicht liegen in der erschwerten RNA-Injektion {A.4.2.VI} und vor allem in dem mühsamen und zeitraubenden Schritt der eigentlichen mechanischen Defollikulierung am Tag des Experiments. Hierbei faßt man mit zwei Pinzetten, die man dicht nebeneinander plaziert, die Follikelschicht, ohne die darunterliegende Vitellinhülle zu zerstören, und reißt sie durch auseinanderziehen der Pinzetten auf. Da die Follikelschicht durch sog. Gap junction mit der Oozytenmembran verbunden ist, verursacht das Abreißen kleine „Löcher“ in der Membran, wodurch die Zelle elektrisch vorübergehend undicht wird und solange für Voltage-Clamp-Messungen unbrauchbar ist {A.4.3}. Die Zelle muß sich nach dieser Prozedur mindestens 2 Stunden in G-ORI erholen.

Bei der enzymatischen Defollikulierung werden die Oozyten in eine Calcium-freie G-ORI-Lösung mit 0,15% bzw. 0,3% Collagenase {A.5.2.1} gegeben. Collagenase ist ein aus mehreren Enzymen bestehendes Produkt {A.5.3}. Diese Enzyme werden aus dem Pilz *Clostridium histolyticum* gewonnen und haben eine proteolytische Eigenschaft mit Hilfe derer sie das Bindegewebe und damit die Follikelschicht auflösen. Bei zu langer Inkubationszeit der Oozyten in Collagenase können auch Membranbestandteile aufgelöst werden. Wenn die Oozyten innerhalb einer kurzen Zeit defollikuliert werden sollen, werden mit Pinzetten die sackförmigen Mesovarien geöffnet und das Ovar in einem Petrischälchen in 0,3%-iger Collagenase-Lösung, die zuvor gefiltert wurde (Porengröße 450nm), auf einen Rüttler gestellt (Frequenz: 2Hz). Nach 4 Stunden sind die Oozyten vom Follikel-Theka-Epithel befreit und werden zuerst 7 mal mit Calcium-freiem und dann noch 3 mal mit normalem G-ORI gespült. Will man die Oozyten über eine längere Zeit defollikulieren, vollführt man die selbe Prozedur wie oben, mit dem Unterschied, daß man das Ovar mit 0,15%-iger Collagenaselösung 12 Stunden einlegt und keinen Rüttler verwendet.

V. Aufbewahrung der Oozyten:

Die Oozyten werden für gewöhnlich in gefilterter (200nm Porengröße) G-ORI- oder SP-ORI-Lösung {A.5.2.1} in Petrischälchen bei 19°C im Brutschrank aufbewahrt. Jedoch habe ich auch versucht, nach RNA-Injektion {VI} und nach etwa 3-tägiger Aufbewahrung in zunächst 19°C zur Expression die Oozyten bei 4°C aufzubewahren, was sich als erfolgreich erwiesen hat. Sie bleiben hierbei etwa doppelt so lange haltbar, wie bei der ersten Methode. Bei der verwendeten Standardlösung ORI (Oozyten-Ringer-Lösung), handelt es sich um eine physiologische Lösung. Sie schafft der Oozyte somit eine, den Umständen entsprechende, bestmögliche extrazelluläre Umgebung. G bzw. SP stehen für Gentamecin

bzw. Streptomycin und Penicillin {A.5.5}. Alle drei Substanzen sind Antibiotika und werden der Oozyten-Ringer-Lösung beigemischt, um die Oozyten vor bakteriellen Keimen zu schützen. Auch die zuvor durchgeführte Filterung der Lösung hält Bakterien und Pilzsporen zurück. Eine kühlere Umgebung verlangsamt den Stoffwechsel sowohl der Oozyten als auch den der Bakterien und anderer parasitärer Organismen. Dies verhindert eine vorzeitige Reifung {A.3.3.II} der Oozyten und hält die Oozyten länger intakt. Allerdings dürfen die Oozyten bei der 4°C-Methode nicht plötzlich in ein wärmeres Medium bei Zimmertemperatur gesetzt werden, weil durch den Temperaturschock eine frühzeitige Reifung induziert werden kann. Die Lösungen in den Petrischälchen werden täglich gewechselt, um eine möglichst keimfreie Umgebung beizubehalten, wobei man abgestorbene oder reife Oozyten herausnimmt, da sie andere Oozyten ebenfalls zum Reifen anregen. Müssen zu viele Oozyten entfernt werden, bietet sich auch an, sie gleich in neue Schälchen umzusetzen. Es sei hier noch erwähnt, daß jegliche Art der Umbettung einzelner Oozyten von Schälchen zu Schälchen oder in die Meßkammer mit Hilfe einer Pasteurpipette mit Gummisauger vorgenommen wurde, deren Öffnung etwa einen Durchmesser von $\varnothing=1,5$ mm hatte und durch Anschmelzen abgerundet war, um die empfindlichen Oozyten nicht zu verletzen. Die Pipette wurde von Zeit zu Zeit mit 70% Ethanol {A.5.5} und G-ORI gereinigt.

VI. RNA-Injektion:

Um oozytenfremde Proteine durch Proteinbiosynthese in der Oozyte zu erzeugen, wird in ihr Zytoplasma cRNA mit der entsprechenden Information des Proteins injiziert. Die cRNA wird durch Transkription aus cDNA gewonnen. Die cDNA für die α -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica* {A.3.1} wurde zum ersten Mal von K. Kawakami et al. (Kawakami et al., 1985) komplementär zu der mRNA dieses Fisches geklont und sequenziert. Die cDNA der β -Untereinheit wurde von S. Noguchi et al. (Noguchi et al., 1986) geklont und sequenziert. Da die α -Untereinheit etwa doppelt so groß ist wie die β -Untereinheit und jeweils genau eine Untereinheit der einen Sorte mit einer der anderen von der Zelle zur Na^+/K^+ -ATPase in die Membran eingebaut wird, muß beim Mischen der beiden, in Wasser gelösten RNAs auf das richtige Verhältnis geachtet werden. Nach dem Mischen werden ein paar μl der RNA in den Deckel eines Eppendorfröhrchens gegeben, und mit Mineralöl {A.5.3} abgedeckt, um Verdunstung zu vermeiden. Es muß hier noch erwähnt werden, daß alle Gefäße und Pipetten, mit denen die RNA in Berührung kommt autoklaviert (eine Wasserdampfbehandlung unter einem Druck von 2 bar und einer Temperatur von 120°C) werden müssen und mit Handschuhen gearbeitet werden muß, um RNAasen zu eliminieren, die die RNA enzymatisch abbauen könnten. Nun wird eine Glaskapillare, die man mit Mineralöl füllt, auf eine Mikroinjektionspumpe {A.5.4} aufgebracht. Die Glaskapillare wurde zuvor an einem Ziehgerät (engl. Puller) {A.4.3.V}, wie man es für Voltage-Clamp-Elektroden {A.4.3.IV} verwendet, gezogen. Sie besteht aus Borosilikatglas mit einem Außendurchmesser von $\varnothing=1,1$ mm und einem Innendurchmesser von $\varnothing=0,6$ mm. Durch das Ziehen erhält man eine Spitze mit einem Durchmesser von ungefähr $\varnothing=1\mu\text{m}$. Die Spitze wird nach der Ölfüllung mit einer Pinzette ein wenig erweitert ($\varnothing=10-20\mu\text{m}$), um ein ungehindertes Injizieren zu ermöglichen. Man plaziert die Spitze innerhalb des RNA-Tropfens und saugt ihn in die Kapillare. Die Oozyten legt man nun in ein mit G-ORI {A.5.2.I} gefülltes und mit Vertiefungen für die Positionierung der Zellen versehenes Petrischälchen. Mit der Glaskapillare wird zwischen

die animale und vegetative Hemisphäre der Oozyte gestochen, um nicht den Zellkern zu treffen, und es werden 46nl injiziert. Nach der Injektion werden die Zellen in G-ORI aufbewahrt {V}.

VII. Devitellinisierung:

Vor einem Patch-Experiment {A.4.3} muß zunächst die Vitellinhülle {A.3.3.II} der Oozyte mechanisch entfernt werden, damit zwischen Patchpipette {A.4.4.V} und Membran ein Seal {A.4.4.VII} sich ausbilden kann. Die Vitellinhülle verhindert hierbei den direkten Kontakt zwischen Membran und Glas. Da sie als Exoskelett direkt auf der Membran aufliegt, ist es äußerst schwer, sie unter diesen Umständen mechanisch zu entfernen, ohne die Membran selbst erheblich zu verletzen. Zu diesem Zweck wird die Oozyte kurzzeitig (etwa 1 min) in eine hochosmolare (300mM) Saccharose-Lösung {A.5.2} gegeben. Da die Vitellinhülle, nicht aber die Membran für Saccharose permeabel ist, schrumpft die Oozyte unter der Vitellinhülle auf Grund eines osmotischen Unterdruckes zusammen. Die nun locker um die Oozyte liegende Vitellinhülle, welche durchsichtig ist und nur unter schrägem Lichteinfall durch Reflexion unter dem Lupenmikroskop {A.5.4} betrachtet werden kann, wird mit zwei Pinzetten ergriffen und aufgerissen. Danach wird sie möglichst schnell mit einer Pasteurpipette in die Messkammer des Patch-Clamp-Aufbaus umgebettet, in der sich ORI befindet, um eine zu lange Inkubation in dieser Schrumpflösung zu vermeiden; denn dies ist erfahrungsgemäß der Sealbildung abträglich. Die Oozyten müssen sich nach dieser Prozedur etwa 15 min erholen.

VIII. Na-Beladung für Voltage-Clamp-Experimente

Vor Messungen an ganzen Oozyten mit dem Voltage-Clamp-Verfahren {A.4.3}, bei denen die Na^+/K^+ -ATPase untersucht werden soll, ist es sinnvoll, die intrazelluläre Natriumkonzentration $[\text{Na}^+]_i$ zu erhöhen. Dadurch wird eine höhere Pumprate erzielt, und es können größere Pumpenströme gemessen werden. Hierzu behandelt man die Oozyten mindestens eine Stunde vor den Messungen für eine $\frac{3}{4}$ Stunde mit einer Natriumbeladelösung (engl. Na-loading-solution) {A.5.2.1}, welche 110mM Na^+ , 2,5mM Na-Citrat und als Puffer 5mM MOPS (pH7,6) enthält. Das calziumfreie extrazelluläre Medium sowie das Natriumcitrat macht die Oozytenmembran für Na^+ permeabel. Durch die hohe extrazelluläre Natriumkonzentration $[\text{Na}^+]_o$ diffundiert Na^+ in die Zelle und erhöht dort die $[\text{Na}^+]_i$. Nach der Natriumbeladung werden die Oozyten für mindestens $\frac{1}{4}$ Stunde bis zu Beginn der Messungen in eine Postladelösung (engl. post-loading-solution) {A.5.2.1} gegeben. Sie enthält 100mM Na^+ , 2mM Ca^{2+} sowie 10mM Ba^{2+} , 20mM TEA und als Puffer 5mM MOPS (pH7,6). Hierbei bewirkt das extrazelluläre Calcium eine Regeneration der Membran. Die Kaliumfreiheit des extrazellulären Mediums blockiert die Na^+/K^+ -ATPase und verhindert, daß die Pumpe die nun hohe $[\text{Na}^+]_i$ wieder auf ein physiologisches Maß bringt.

A.4.3. Das Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Verfahren

I. Einleitung:

Wenn die Leitfähigkeit einer Zellmembran sich nur partiell ändert und diese Änderung klein gegenüber der Gesamtleitfähigkeit der ganzen Zelle bleibt, ist es möglich, mit Hilfe zweier intrazellulärer Mikroelektroden {IV} die Zelle auf ein Potential zu zwingen, indem das vorhandene Potential gemessen und gleichzeitig Strom in die Zelle injiziert wird. Dieses Verfahren, das man mit Two-Microelectrode-Voltage-Clamp bezeichnet hat, wurde zuerst erfolgreich von Takeuchi und Takeuchi (Takeuchi & Takeuchi, 1959) angewandt. Es ermöglicht eine ganze Zelle, wie z.B. eine Oozyte, innerhalb weniger Millisekunden (2-5 msec bei Oozyten des Stadiums V) auf jedes beliebige Potential zu zwingen und transmembrane, elektrische Ströme in der Größenordnung von min. 10nA mitzuverfolgen, die auf Grund einer potentialabhängigen Leitfähigkeitsänderung der Membran verursacht werden. Als Prinzip des Verfahrens, mit dem die Zelle auf ein Potential gezwungen, man sagt auch „geklemmt“ (wegen engl. clamp = Klammer) wird, liegt der im Abschnitt {II} behandelte Schaltkreis zu Grunde.

II. Spannungsklemme

Für die Spannungsklemme des Two-Microelectrode-Voltage-Clamp finden zwei Mikroelektroden, die in die Zelle gestochen werden, und zwei Badelektroden Anwendung. Die Mikroelektroden sind so konstruiert, daß sie nur mit dem Zellinneren elektrischen Kontakt haben. Das Membranpotential V_m wird zunächst zwischen einer der Mikroelektroden (ME1), die man als die Spannungselektrode bezeichnet, und einer sog. virtuellen Badeelektrode (B1) gemessen {Abb 7}. Über eine zweite Badeelektrode (B2) ist das Bad tatsächlich geerdet. Diese Anordnung der getrennten Badelektroden erlaubt es, mit Hilfe von Impedanzwandlern (IW1 und IW2) niederohmige Signale zu erhalten. Die Signale werden an einen Proportional-Integralregler (PI1) gegeben, der als Ausgangsspannung (voltage-output) V_m erzeugt. Das Sollpotential (engl. command voltage) V_c sowie das Membranpotential V_m dienen einem weiteren Proportional-Integralregler (PI2) als Eingangssignale. Besteht zwischen den beiden Potentialen eine Differenz (ein sog. Regelfehler), wird diese verstärkt und aufintegriert, wodurch am Regler eine Ausgangsspannung (engl. output voltage) V_o erzeugt wird. V_o wiederum dient als Signal für eine Stromquelle (V/C-Conv.) zur Strominjektion. Die Stromquelle erlaubt es, den Strom I_m , der durch die Stromelektrode

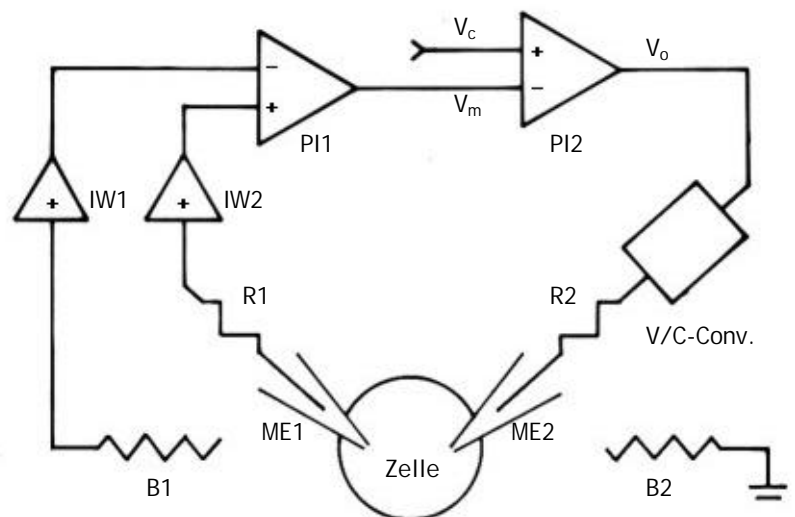


Abb 7: Schaltskizze der Spannungsklemme.

(ME2) und über die Zellmembran zur Badelektrode (B2) fließt, zu messen. Die Verstärkung (engl. Gain) und somit die Größe von I_m wird durch einen einstellbaren Proportionalfaktor μ bestimmt. Eigentlich sollte, je größer der Faktor μ ist, der Regler das Potential V_m umso schneller auf den Wert V_o geregelt haben. Wegen eines Zeitverzugs der Regelung übersteuert diese aber ab einer bestimmten Größe von μ . Dies macht sich dann durch Oszillationen in der Stromantwort I_m bemerkbar. Neben transmembranen Anteilen hat der Strom I_m in den ersten Millisekunden einen bedeutenden kapazitiven Anteil, wofür die Ursache in der Oberfläche der Membran zu suchen ist. Die Oberfläche wirkt hier als Kondensator, den es erst einmal aufzuladen gilt, um das gewünschte Potential zu erhalten. Durch Differenzbildung aus Strömen gleicher Potentialsprünge, bei denen die gewünschten transmembranen Anteile einmal vorhanden waren, ein andermal nicht, werden die kapazitiven Anteile einfach eliminiert, und man erhält nur den transmembranen Stromanteil. Es sei hier noch erwähnt, daß es für die ganze Spannungsklemme wichtig ist, die Widerstände (R1 und R2), welche durch die Mikroelektroden selbst dargestellt werden, möglichst gering zu halten, was durch eine (weiter unten beschriebene) spezielle Behandlung {V} der Elektroden erfolgen kann. Die Spannungsklemme selbst wurde durch den Verstärker TURBO-TEC-System {A.5.4} verwirklicht. Er verfügt über spezielle Filter- und Kompensationseigenschaften, die hier aber nicht näher beschrieben werden sollen. Der Verstärker ist über einen A/D-Wandler {A.5.4} mit einem Computer verbunden. Dieser steuert den Verstärker mit einer spezieller Software {A.5.6} und erhält von ihm über diese Schnittstelle die zur Aufzeichnung und Weiterverarbeitung bestimmten Signale. Man vergleiche hierzu A. Finkel und P. Gage (Finkel & Gage, 1985).

III. Meßstand:

Der Meßstand ist folgendermaßen aufgebaut: Über der Meßkammer {VI}, in der die Messungen an der Oozyte bei verschiedenen Lösungen stattfinden, ist ein Lupenmikroskop {A.5.4} angeordnet. Eine Kaltlichtlampe {A.5.4} neben der Meßkammer leuchtet dieselbe aus. Lösungen laufen von an dem Meßstand befestigten Flaschen über Schläuche und Ventile in die Meßkammer. Die beiden Mikroelektroden werden von einer Seite her über Mikromanipulatoren {A.5.5} an die Kammer herangefahren. Der Stromelektrode ist noch ein Stromspannungswandler als Stromquelle {II} vorgeschaltet. Dieser Teil des Meßstandes ist vibrationsarm gelagert und von einem Drahtkäfig umgeben, der zur Abschirmung elektromagnetischer Strahlung dient. Zudem sind sämtliche metallenen Gegenstände innerhalb des Käfigs, die Meßkammer selbst und alle sich anschließenden Geräte sternförmig geerdet. Die Stromquelle der Stromelektrode und die Spannungselektrode sind mit dem Verstärker TURBO-TEC-System {A.5.4} verbunden. Mit dem TURBO-TEC-System sind weiterhin ein A/D-Wandler {A.5.4}, ein Computer {A.5.4}, ein Schreiber {A.5.4}, unter Umständen auch ein Speicheroszilloskop {A.5.4} verbunden. Das Absaugen der Lösung übernimmt eine Membranpumpe.

IV. Elektroden

Für die Spannungsklemme {II} des Voltage-Clamp-Verfahrens werden zwei Mikroelektroden und zwei Badeelektroden benötigt. Die Mikroelektroden, die in die Zelle eingestochen werden, haben die Aufgabe, ein vom Außenbad unabhängige elektrische Leitung in das Zellinnere zu schaffen. Beide Mikroelektroden, sowohl die Spannungs- als

auch die Stromelektrode {II}, bestehen aus einer mit 3mM KCl-Lösung {A.5.2} gefüllten Glaspipette, die in einem Kunststoffhalter ruht, der mit einer Ag/AgCl-Elektrode versehen ist. Näheres zur Ag/AgCl-Elektrode und dem Elektrolyt findet sich im Abschnitt: {A.4.4.IV}. Durch Erhitzen und Ziehen einer Glaskapillare, wie im nächsten Abschnitt über die Herstellung der Mikroelektroden {V} beschrieben, erhält man Glaspipetten mit einem Durchmesser von 1-2 μ m und einem Pipettenwiderstand von 2-10M Ω . Für die in dieser Arbeit erforderlichen Messungen von transienten Strömen war eine hohe Zeitauflösung, und deshalb eine schnelle Regelung in der Spannungsklemme von großer Bedeutung. Es ist aber aus der Erfahrung bekannt, daß ein Pipettenwiderstand von über 2M Ω vor allem bei der Stromelektrode eine inakzeptable Zeitauflösung liefert, da der Regelkreis einige Millisekunden benötigt, um die Zelle auf ein gewünschtes Potential zu klemmen. Einerseits senkt nun eine Vergrößerung der Spitzenöffnung den Widerstand, andererseits darf das Membranloch um die eingestochene Mikroelektrode jedoch nicht zu groß werden, damit es sich wieder schließen kann und zwischen Membran und Glas auf Grund von später beschriebenen Wechselwirkungen {A.4.4.VII} ein hoher Widerstand sich ausbildet. Durch ein schräges Anschleifen der Pipette {V} wird man beiden Forderungen gerecht. Aus der erweiterten Öffnung könnte nun aber hochkonzentrierte Elektrolytlösung in die Zelle fließen, weshalb man die Spitze mit Agar (genauer: Agar-agar) füllt, einem aus Tang gewonnenen Polysaccharid-Komplex von gelartiger Konsistenz, der permeabel für alle Ionen ist, aber eine Diffusion größeren Ausmaßes unmöglich macht. Man erhält so Mikroelektroden mit einem Pipettenwiderstand von <0,5M Ω .

Die Badelektroden bestehen ebenfalls aus Ag/AgCl. Sie stehen im Gegensatz zur Anordnung beim Patch-Clamp-Verfahren {A.4.4} direkt mit der Badlösung in Kontakt. Die an ihnen sich ausbildenden Grenzflächenpotentiale {A.4.4.IV} werden abgeglichen.

V. Herstellung Agar-gefüllter Mikroelektroden

Die Pipetten für die Mikroelektroden werden aus Borosilikatglaskapillaren mit Filament hergestellt. Die Kapillare besitzen einen Außendurchmesser von 1,5mm und einen Innendurchmesser von $\varnothing_i=0,87$ mm. Das Filament hat einen Durchmesser von $\varnothing_{Fil}=0,2$ mm. Eine solche Glaskapillare wird in einen sog. Puller {A.5.6} gespannt. Dieses Gerät vermag die Kapillare mittig anzuschmelzen und magnetkraftbetrieben in die Länge zu ziehen, bis sie in zwei Hälften zerreißt und dadurch zwei Pipetten sich bilden. Die Pipettenspitzen haben einen Öffnungsdurchmesser, der in der Größenordnung von 1-2 μ m liegt. Indem man die Heizleistung und die Stärke des Magnetfeldes variiert, kann man unterschiedliche Geometrien bei den Pipettenspitzen und deren Öffnungen erzeugen. In einem weiteren Schritt wird die Pipette mit einer 3mM KCl-Lösung gefüllt, wobei das Filament dafür sorgt, daß die Lösung luftblasenfrei bis in die Spitze dringen kann. Man erhält bereits eine Mikroelektrode mit einem Pipettenwiderstand von >2M Ω , wenn man die so gefüllte Pipette in einen Kunststoffhalter verbringt, in dem eine Ag/AgCl-Elektrode sich befindet. Indem man die Mikroelektrode auf einen Mikomanipulator spannt und schräg auf eine rotierende Glasschleifscheibe {A.5.5} setzt, wird die Pipettenspitze schräg angeschliffen, wodurch sich ihre Öffnung vergrößert. Durch zwischenzeitliche Widerstandsmessungen kann so eine optimale Mikroelektrode mit einem Widerstand <0,5M Ω hergestellt werden. Die Pipette wird daraufhin (ohne Halter) in erhitztes flüssiges Agar getaucht, welches durch Anlegen eines leichten Unterdrucks in die Spitze gesogen wird. Nach Abkühlung ist die Mikroelektrode sofort einsetzbar.

VI. Meßkammer und Lösungswechsel:

Während der Messungen muß die Oozyte im Wechsel von verschiedenen Lösungen umspült werden. Man benötigt deshalb eine nach oben offene Meßkammer mit einem Lösungszulauf und einer Lösungsabsaugung. Die für diese Arbeit verwendete Meßkammer ist aus einem Plexiglasblock gefräst und kann auf Grund ihrer Transparenz gut beleuchtet werden. Die Kammer hat eine längliche Form, was das Einstechen der beiden Mikroelektroden in die Zelle vereinfacht und für ein laminaren Lösungsfluß sorgt. In der Mitte der Kammer befindet sich eine Kerbe, in der die Oozyte einen guten Halt findet. An der einen schmalen Seiten der Kammer befindet sich eine Bohrung für den Lösungszufluß. An der anderen ein Überlauf in eine weitere, kleine Kammer mit Bohrung zum Absaugen. Die Meßkammer wird so von den durch das Absaugen entstehenden Vibrationen abgeschirmt. An jeder der beiden Längsseiten der Meßkammer führt eine weitere Bohrung zu einer kleineren Seitenkammer, in der eine Badelektrode liegt. Die Lösungen werden in Flaschen über Kunststoff- und Silikonschläuche bis an die Zuleitung der Kammer herangeführt. Über Kunststoffhähne und -zwingen wird der Lösungsfluß gesteuert. Ein optimal vorgenommener kompletter Lösungswechsel in der Meßkammer geht so in etwa 1-2min vonstatten. Ein schnellerer Lösungsfluß würde die Oozyte wegspülen. Eine Temperaturregelung über Petier-Elemente ist zwar vorhanden, findet aber bei der Durchführung unserer Experimente keine Anwendung, da durch eine klimatisierte Umgebung die Temperatur der Lösungen zwischen 20°C und 22 °C konstant bleibt.

A.4.4. Das Patch-Clamp-Verfahren

I. Einleitung:

Während meiner Voltage-Clamp-Experimente {B.2.2} zeigte sich bald, daß die zeitliche Auflösung dieses Verfahrens zu gering und auf Grund der hohen elektrischen Kapazität der Oozytenoberfläche und des elektrischen Widerstandes der Stromelektrode auch nicht mehr zu steigern war. Um eine bessere Zeitauflösung zu erreichen, war es notwendig, ein Verfahren zu wählen, bei dem nicht mehr an der ganzen Zelle gemessen wurde, sondern nur noch an einem zellunabhängigen Membranstück, welches gegenüber einer ganzen Zelle eine wesentlich geringere elektrische Kapazität aufwies. 1976 wurde solch ein Verfahren, das sog. Patch-Clamp-Verfahren, von Neher und Sackmann entwickelt (Neher *et al.*, 1978), um Ströme einzelner Ionenkanäle in Zellmembranen zu messen. Bei diesem Verfahren kann ein einzelner Membranfleck auf einer Zelle (Cellattached-Konfiguration {VIII}) oder von ihr isoliert untersucht werden, wobei dann auf beiden Seiten des Membranflecks die Lösungen definiert werden können. Hierzu wird die hitzepolierte {V} und reingehaltene Spitzenöffnung einer mit Lösung gefüllten Glaspipette an die Membran einer ebenfalls in Lösung befindlichen Zelle gedrückt (siehe auch Abb. 8). An der Kontaktstelle zwischen Membran und Glas bildet sich recht schnell ein hoher Widerstand von etwa 1-100 G Ω aus: Ein sog. Seal {VII} ist entstanden. Der Seal ist derart stabil, daß durch Wiederwegziehen der Pipette das Membranstück aus der Zelle gerissen wird und in der Öffnung kleben bleibt, wobei man weiterhin einen stabilen Seal hat. Bei einer Cellattached-Konfiguration besteht auch die Möglichkeit, mit einem Stromstoß das Membranstück zu zerstören. Durch Kombination dieser zwei Möglichkeiten erhält man die verschiedensten Patch-Konfigurationen {VIII}, von denen bei dieser Arbeit die Outside-Out-Konfiguration {VIII} verwendet wird. Im Gegensatz zum herkömmlichen Voltage-Clamp-Verfahren arbeitet man beim Patch-Clamp-Verfahren nur mit zwei Elektroden, einer Mikroelektrode {IV}, wovon die Glaspipette ein Bestandteil ist, und einer Badelektrode {IV}. Mit Hilfe eines speziellen Spannungsverstärkers (EPC9 {A.5.4}), der an die zwei Elektroden angeschlossen ist, wird die Membran auf eine bestimmte Spannung geklemmt und zugleich der durch sie abfließende Strom gemessen {II}. Weil man derart hohe Widerstände beim Seal hat, können Ströme im pA-Bereich rauscharm gemessen werden. Bei dem anfangs von Neher und Sackmann entwickelten Patch-Clamp-Verfahren hat man, um Einzelkanalereignisse zu sehen, mit Patchpipettendurchmessern von $\varnothing=1-2\mu\text{m}$ gearbeitet. Da aber transiente Ströme der Na⁺/K⁺-ATPase wesentlich geringer sind als Kanalströme, muß das Signal einer sehr großen Zahl von ATPasen gemessen werden. Daher wurden für diese Arbeit Durchmesser von mindestens $\varnothing=20\mu\text{m}$ benötigt. Das Verfahren, welches mit so großen Pipettendurchmessern arbeitet, nennt man das Giant-Patch-Clamp-Verfahren und wurde zum ersten Mal 1989 von Hilgemann (Hilgemann, 1989) vorgestellt. Dieses Verfahren wurde in der

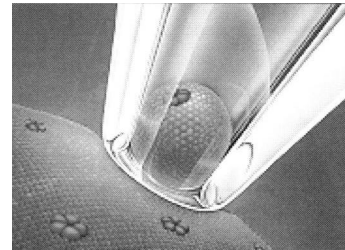


Abb. 8: Sealbildung aus (Manual EPC9, 1990)

selben Arbeitsgruppe, in der auch diese Arbeit erstellt worden ist, durch J. Rettinger 1994 (Rettinger, 1994) in einer Weise verbessert und vereinfacht, wie es auch hier zur Anwendung kommt. Es zeigte sich dabei, daß das Verfahren in der Outside-Out-Konfiguration effektiv angewandt werden kann. Zum Patch-Clamp-Verfahren sei hierzu auch auf P. Hamill et al. (Hamill et al., 1981) verwiesen.

II. Spannungsklemme:

Beim Patch-Clamp-Verfahren schließt ein Membranfleck die Öffnung der Pipettenöffnung derart gut ab, daß sich ein Widerstand von mehreren $G\Omega$ ausbildet (Sealbildung {VII}). Will man die Membran auf ein bestimmtes Potential V_{ref} klemmen, muß das Potential natürlich genau an diesem Sealwiderstand abfallen. Da die Ströme, die fließen müssen, zu gering sind, um dieses Potential aufrecht zu erhalten, werden sie nicht selbst gemessen, sondern der Spannungsabfall V_{output} , den sie an einem hochohmigen Widerstand R bewirken {Abb. 9 }.

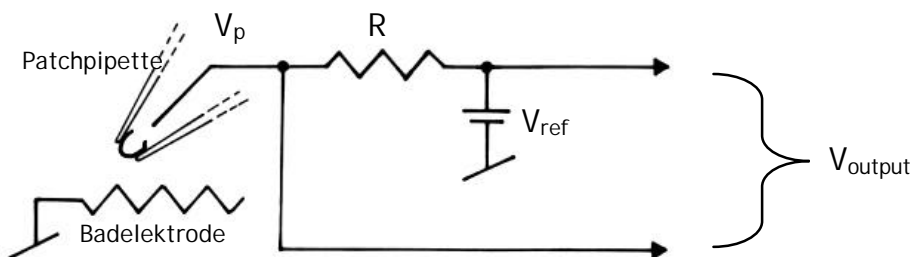


Abb. 9: einfache Schaltskizze einer Spannungsklemme ohne Kontrolle von V_p . der über die Pipettenelektrode geflossene Strom ergibt sich aus: $I_p = V_{output} / R$.

Diese Schaltskizze verdeutlicht, wie man sich den Aufbau einer solchen Spannungsklemme einfach vorstellen kann: Die Patchpipette befindet sich in der Badlösung. Das Membranstück in der Patchpipettenspitze bildet einen Sealwiderstand R_p aus. Die dem Bad zugewandte Seite der Membran steht mit der Badelektrode im elektrischen Kontakt. Die dem Pipetteninneren zugewandte Seite steht mit der Pipettenelektrode im elektrischen Kontakt. Mit der Pipettenelektrode ist der Widerstand R in Reihe geschaltet. Zwischen R und der Badelektrode liegt eine feste Spannung V_{ref} an. Die Spannung V_{output} wird an R abgegriffen. Der über die Pipettenelektrode geflossene Strom ergibt sich aus: $I_p = V_{output} / R$. Leider birgt dieser Aufbau einen Nachteil: Man kann die Spannung V_p , die am Sealwiderstand R_p abfällt, nicht genau vorgeben, da man nicht vorher weiß, wie hoch der Strom I_p sein wird. Deshalb ist ein anderer Aufbau ersonnen worden, bei dem zwar immer noch der Strom I_p am Widerstand R gemessen wird; die zwischen R und Badelektrode angelegte Spannung V_B wird nun aber variabel gestaltet {Abb: 10}.

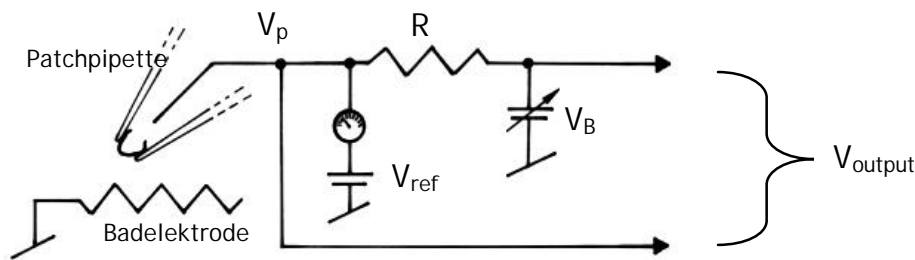


Abb: 10: verbesserter Schaltkreis, indem V_p durch Variation von V_B immer gleich V_{ref} gehalten wird. Ansonsten ist wieder $I_p = V_{output} / R$.

Es wird zudem die Differenz zwischen der Spannung V_p direkt an der Pipettenelektrode und einer festen Spannung V_{ref} gemessen und V_B solange variiert, bis die Differenz verschwindet und somit $V_p = V_{ref}$ ist. Den Vorgang, V_B zu variieren bzw. die Differenz abzugleichen, kann man automatisieren. Ein Operationsverstärker erhält hierbei als Eingang das Referenzpotential V_+ und das Potential der Patchelektrode V_- {Abb 11}.

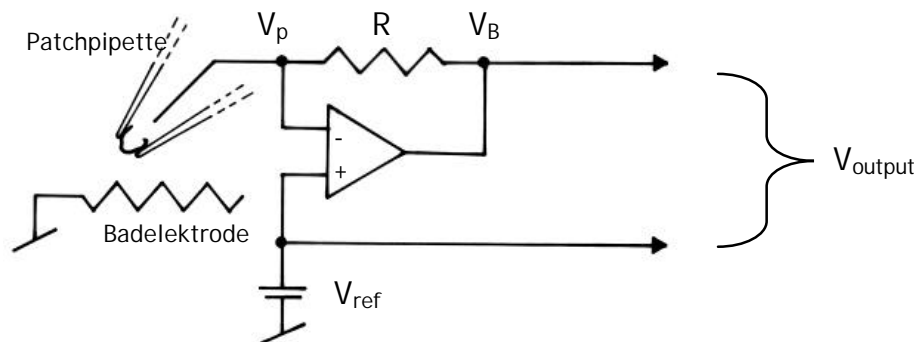


Abb 11: durch einen Operationsverstärker wird automatisch $V_p = V_{ref}$ gehalten, indem $dV_B/dt = \omega_A (V_+ - V_-)$.

Die Potentialantwort V_B des Operationsverstärkers ändert sich umso mehr, je größer die Differenz $V_+ - V_-$ ist:

$$dV_B/dt = \omega_A (V_+ - V_-)$$

ω_A ist hier die Verstärkungsbandbreite des Operationsverstärkers, angegeben in Winkelfrequenz; sie ist gerätespezifisch. Ein großer Vorteil dieses Schaltkreises liegt in seiner Eigenschaft, daß bei erreichtem Potential V_p kein Strom mehr durch den Operationsverstärker fließt, welcher die Messung stören könnte. In der Versuchsanordnung dieser Arbeit wird der Schaltkreis durch das EPC9 {A.5.4} realisiert. Das EPC9 beinhaltet aber noch weitere Komponenten, die z.B. der Kompensation kapazitiver Ströme dienen, denn der oben gezeigte Schaltkreis {Abb 11} birgt nämlich einige kapazitive Anteile in sich, die z.B. von der Geometrie der Glaspipette oder von der Größe des ohmschen Widerstandes herrühren. Das EPC9 verfügt über zwei Kompensationsarten: Durch die „schnelle Kompensation“ werden kapazitive Anteile im Bereich der ersten 10-30 μm kompensiert. Die „langsame Kompensation“ ist für kapazitive Ströme langsamerer Zeitkonstanten bei whole-cell-Messungen {VIII} gedacht. Obwohl in dieser Arbeit keine whole-cell-Messungen durchgeführt werden, findet die „langsame Kompensation“ als Ergänzung zur „schnellen“ dennoch eine Anwendung. Die Einstellung der entsprechenden Parameter für die Kompensation nimmt das EPC9 automatisch vor, wenn man zum entsprechenden Zeitpunkt über die Software-Steuerung {A.5.6} den Befehl dazu gibt. Zu diesem Abschnitt vergleiche man auch Sigworth (Sigworth, 1983).

III. Meßstand

Der Meßstand ist folgendermaßen angeordnet: Die Meßkammer {VI}, in der die Sealbildung und die Messung am Membranfleck bei verschiedenen Lösungen stattfindet, ist über einem inversen Mikroskop {A.5.4} angeordnet. Das Mikroskop verfügt neben seinem normalen Okular noch über eine Kamera und einen Monitor zur Beobachtung. Eine Lampe oberhalb der Meßkammer leuchtet diese aus. Lösungen laufen von an den Meßstand angebrachten Flaschen über Schläuche und Magnetventile {A.5.4} in die Meßkammern. Von einer Seite her wird die Patchpipette mit Halterung und Vorverstärker über einen groben {A.5.5} sowie einen feinen Manipulator {A.5.5} an die Kammer herangefahren. Dieser Teil des Meßstandes ist vibrationsarm gelagert und von einem Drahtkäfig umgeben, der zur Abschirmung elektromagnetischer Strahlung dient. Zudem sind sämtliche metallenen Gegenstände innerhalb des Käfigs, die Meßkammer selbst und alle sich anschließenden Geräte geerdet. An den Vorverstärker der Pipettenhalterung schließt sich ein spezieller Verstärker mit einem integrierten A/D-Wandler an, das EPC9. Das EPC9 wird über einen Computer mit spezieller Software bedient und Signalaufzeichnungen finden auch über diese Schnittstelle am Computer statt. Mit dem EPC9 sind weiterhin ein Schreiber, unter Umständen auch ein Speicheroszilloskope verbunden. Das Absaugen der Lösung übernimmt eine Membranpumpe.

IV. Elektroden:

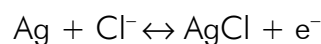
Für die Spannungs-klemme {II} des Patch-Clamp-Verfahren benötigt man zwei Elektroden: eine Mikroelektrode und eine Badelektrode.

Die Mikroelektrode hat die Aufgabe, eine Seite des zu messenden Membranflecks gegenüber der Badlösung mechanisch und elektrisch zu isolieren, um auf dieser Seite mit einer definierten Lösung eine elektrische, vom Bad unabhängige Leitung zu erhalten. Der Membranfleck darf dabei aber nur einen Durchmesser von etwa 20-30µm haben.

Realisieren läßt sich das am einfachsten mit einer Glaspipette, wie sie im nächsten Abschnitt {V} beschrieben wird. Diese Pipette hat einen geeigneten Spitzendurchmesser. Mit Lösung gefüllt und einem chlorierten Silberdraht (Ag/AgCl) versehen bildet sie so die Mikroelektrode. Sie selbst steckt in einem Halter aus Polycarbonat, der wiederum an einen geerdeten Vorverstärker angeschlossen ist. Der Halter besitzt eine zusätzliche Öffnung, über den der Pipetteninnendruck reguliert wird.

Die Badelektrode aus Ag/AgCl befindet sich in einer KCl-Bezugslösung, die über eine Agar-Salzbrücke mit dem Bad in elektrischem Kontakt steht. Der Agar hat die Konsistenz eines Gels und ist in einen Kunststoffschlauch eingesogen, welcher selbst in einem Halter steckt, in dem sich die KCl-Lösung und die Ag/AgCl-Elektrode befinden.

Da sich in den Pipettenlösungen der Mikroelektrode verschiedene Kationen mit unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten befinden, aber hauptsächlich nur ein Anion, nämlich Cl⁻, ist es sinnvoll, eine Elektrode zu verwenden, die selektiv mit Cl⁻ reagiert. Ein chlorierter Silberdraht ist eine solche Elektrode:



Da die Lösung und das Ag/AgCl unterschiedliche chemische Potentiale haben, bildet sich an den Grenzflächen zwischen Lösung und Elektrode beim Einstellen eines elektrochemischen Potentialgleichgewichts ein elektrisches Potential, ein sog. Grenzflächenpotential. Ein solches Grenzflächenpotential tritt sowohl bei beiden Elektorden als auch an den Grenzflächen der Agar-Salzbrücke auf. Alle diese Potentiale können abgeglichen werden, wenn man vor der Sealbildung {VII} die Mikroelektrode in das Bad hält und einen Spannungsabgleich durchführt. Es ist hierbei natürlich wichtig, daß im Laufe der Messung die Grenzflächenpotentiale sich nicht ändern. Deshalb sollte die Cl⁻-Konzentration der Bezugslösung der Badelektrode und in der Pipettenlösung der Mikroelektrode konstant bleiben.

V. Herstellung der Glaspipette für die Mikroelektrode

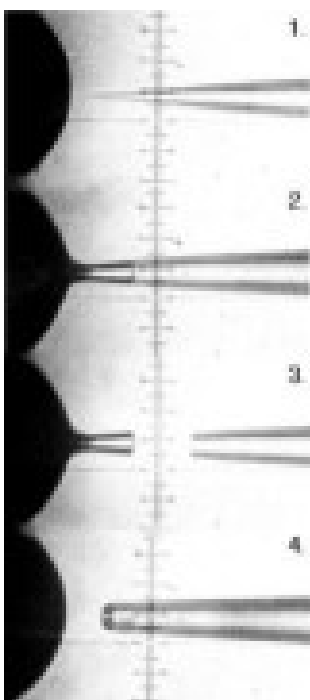


Abb.12: Heatpolishing einer

Die Kapillare, aus denen die Elektroden {IV} gezogen werden, besteht aus Borosilikat und hat einen Innendurchmesser von $\varnothing = 0,87\text{mm}$ und einen Außendurchmesser von $\varnothing = 1,5\text{mm}$. Eine solche Glaskapillare mit einer Länge von ca. 10cm wird in einen Puller {A.5.4} gespannt. Das Gerät ist derart beschaffen, daß es die Kapillare mit einer Heizspule mittig anheizt, um sie dann mit Hilfe eines Gewichts in die Länge zu ziehen. Dies geschieht in zwei Stufen, wobei bei der zweiten die Kapillare in zwei Teile gerissen wird. Beide Teile besitzen dann eine Spitze mit einer Öffnung von ungefähr $\varnothing = 1\mu\text{m}$ (außen). Da eine Giantpatchpipette aber eine wesentlich größere Öffnung haben muß, wird die Pipette in einen Heatpolisher {A.5.4} gespannt, auf den an Stelle der Lupe ein Mikroskop installiert ist. Es besitzt einen hauchdünnen Heizdraht, dessen Temperatur regelbar ist und auf den ein Glastropfen mit einer niedrigeren Schmelztemperatur, als sie das Borosilikatglas aufweist, aufgeschmolzen ist. Die Pipette wird unter dem Mikroskop so an den Tropfen herangefahren, daß sie ihn leicht berührt {Abb.12}(1.). Der Heizdraht wird soweit erhitzt, daß der Tropfen sich verflüssigt und in die Pipette eingezogen wird. Mit Hilfe der im Mikroskop befindlichen μm -Skala läßt sich kontrollieren, daß

das flüssige Glas genau bis zu einer Höhe in die Pipette steigt, bei der der innere Durchmesser etwas mehr als der der gewünschten Öffnung ist (2.). Wenn man dann die Heizung abschaltet, bricht die Pipette an eben dieser Stelle völlig glatt ab, weil der Glastropfen durch Erkaltung geschrumpft ist (3.). In einem zweiten darauffolgenden Schritt findet das eigentliche Hitze-polieren (engl. Heatpollishing) statt, indem man die Spitze der Pipette wieder in die Nähe des Tropfen bringt, der in diesem Schritt wesentlich heißer ist und die durch das Abbrechen entstandene scharfkantige Öffnung der Pipette anschmilzt (4.). Dadurch werden die Kanten abgerundet, was die Sealeigenschaft {VII} deutlich verbessert, und die Öffnung nimmt im Durchmesser wieder ein wenig ab. Für die dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuche wurden Giant-Patch-Pipetten mit einem Durchmesser von $\varnothing=20\text{-}30\mu\text{m}$ hergestellt.

VI. Meßkammer und Lösungswechsel

Ein Vorteil des Patch-Clamp-Verfahrens in extrazellulären Konfigurationen {VIII} besteht darin, die Lösung auf beiden Seiten des zu messenden Membranflecks vorgeben zu können. Ein Lösungswechsel findet an der Pipettenaußenseite statt. Die Lösung im Pipetteninneren zu wechseln ist zwar möglich, aber auf Grund von Druckschwankungen ein wesentlich diffizileres Unterfangen, das bei dieser Arbeit auch nicht angewandt wurde. Da der Seal vor allem bei den großen Durchmessern der Giant-Patch-Methode häufig nicht allzulange stabil ist und die Messung deshalb nicht länger als 5 min dauern sollte (wohingegen beim Voltage-Clamp-Verfahren Messungen von 1-2 h möglich sind), müssen die Lösungswechsel dementsprechend schnell gestaltet werden. Zudem ist es sinnvoll, bei der Patch-Clamp-Methode mit extrazellulärer Konfiguration die eigentliche Messung mit verschiedenen Lösungen in einer anderen Meßkammer durchzuführen als für die Sealbildung {VII} an der Oozyte. Da die devitellinisierte Oozyte sehr empfindlich ist und sie als ganze auch nicht bei unterschiedlichen Lösungen untersucht werden soll (denn es wurden hier keine whole-cell-Messungen {VIII} durchgeführt), benötigt sie eine Kammer, in der eine physiologische Lösung (hier ORI {VII und A.5.2.1}) kontinuierlich und langsam fließt und die Oozyte von allen Seiten umspült. Das langsame Fließverhalten ist auch für eine gute Sealbildung wichtig. Die Kammer ist deshalb kreisförmig. Nach der Sealbildung und der Erstellung einer extrazellulären Konfiguration benötigt man eine zweite Meßkammer, um den Membranflecken bei verschiedenen Lösungen zu messen. Diese zweite Kammer hat eine längliche, ovale Form, da die Lösung wesentlich schneller fließt und ein möglichst laminares Strömungsverhalten am Meßort herrschen soll. Die zwei Meßkammern sind in eine einzige runde Plexiglasscheibe eingefräst. So kann man, indem man sie überflutet, mit der Pipette schnell zwischen ihnen hin und her wechseln; der Seal bleibt dabei stabil. Da mit einem inversen Mikroskop die Meßkammern von unten her betrachtet werden und die Entfernung zwischen dem zu beobachtenden Objekt und dem Objektiv eines solchen Mikroskops sehr klein ist, besteht der Boden der Meßkammern nur aus einem mit Silikonfett angebrachten Deckglas. Die Meßkammern verfügen jeweils über eine Bohrung für den Zulauf von Lösungen. Beide Kammern haben eine Oberflächenabsaugung, die aber nicht in der Kammer selbst, sondern daneben in einer Kerbe stattfindet, um Vibrationen zu verhindern. In eine weitere Bohrung der ovalen Kammer ist die Badelektrode eingeführt. Damit auch die runde Kammer mit der Badelektrode im elektrischen Kontakt steht, sind beide Kammern durch ein kleines kommunizierendes Rohr verbunden. Die Lösungen werden in Flaschen über Kunststoff- und Silikonschläuche bis an die Zuleitungen der Kammern herangeführt. Für einen schnellen Lösungswechsel in der ovalen Kammer führt man eine feine Kunststoffkanüle mit $\varnothing=50\mu\text{m}$ Innendurchmesser in den Strom der Badlösung und läßt durch sie die verschiedenen Lösungen gesteuert über Magnetventile {A.5.4} fließen. In den nun gebildeten feinen laminaren Lösungstrahl der Kanüle wird die Spitze der Patchpipette plaziert. Der kleinen Ausmaße der Kanüle wegen ist das Totvolumen beim Lösungswechsel ebenfalls gering, und man kann einen kompletten Lösungswechsel in ca. 10 sec erreichen. Entwickelt wurde dieser Lösungswechsel von J. Rettinger (Rettinger, 1994) nach Methoden, wie sie bei Franke et al (Franke et al., 1987) beschrieben sind. Die Meßkammer wurde ebenfalls von J.Rettinger in der genannten Arbeit konzipiert.

VII. Sealbildung

Um einen Seal an einer Oozyte in der kreisförmigen Meßkammer des Patch-Setup {VI} zu erreichen, füllt man eine Glaspipette, die man vorher aus einer Glaskapillare gezogen und hitzepoliert hat {V}, von hinten mit einer entsprechenden Pipettenlösung auf, schraubt sie auf den Elektordenhalter mit der Ag/AgCl-Elektrode und legt einen leichten Überdruck von etwa +2mm Hg im Pipetteninneren an, damit die Spitze keinen Schmutz aufsaugt und somit sauber bleibt. Die Oberfläche der Badlösung in der Meßkammer muß ebenfalls gut abgesaugt sein, so daß kein Staub sich darauf befindet. Dann taucht man die Pipette in die Badlösung, führt einen Spannungsabgleich am Verstärker über die Software {A.5.6} aus und fährt die Pipettenspitze an die Oozyte mit Hilfe eines Mikromanipulators {A.5.5} heran. Berührt die Spitze die Oozyte, steigt der Pipettenwiderstand, was man mit Hilfe der Software des EPC9 sichtbar und hörbar mitverfolgen kann. Hatte die Pipette in der Badlösung noch einen Widerstand von unter $1\text{M}\Omega$, so hat sie bei Berührung der Zelloberfläche einen Widerstand von etwa $2\text{-}10\text{M}\Omega$. Legt man jetzt in der Pipette langsam einen leichten Unterdruck von etwa -2mm Hg an, so daß die Oozytenmembran sich ein wenig in die Spitze hineinwölbt, steigt der Pipettenwiderstand auf mehrere $\text{G}\Omega$ an und bleibt auch erhalten, wenn der Unterdruck wieder abgelassen wird: Ein Gigaseal hat sich ausgebildet. Wie ist dies Phänomen zu erklären? Vier Wechselwirkungen, die zwischen dem Borosilikatglas und der Membran stattfinden, kann man für diese Sealbildung verantwortlich machen. Zunächst sind hier elektrostatische Ionenbindungskräfte zu nennen. Sie treten an den jeweiligen Oberflächen zwischen den positiven Ladungen der Membran und den negativen Ladungen des Borosilikatglases auf. Dann entstehen noch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Sauerstoff- oder Stickstoffatomen der Phospholipide und den Sauerstoffatomen der Glasoberfläche. Weiterhin gibt es Wechselwirkungen, die unter Einbeziehung zweiwertiger Ionen, wie Ca^{2+} , Salzbrücken zwischen negativ geladenen Gruppen der Glas- und Membranoberflächen ausbilden. Schließlich muß man bei den Abständen zwischen den Oberflächen im Bereich von 1\AA Van-der-Waals-Kräfte in Betracht ziehen. Alle vier Wechselwirkungen tragen zur Sealbildung bei, wobei aber die zuerst angeführte elektrostatische Wechselwirkung eine untergeordnete Rolle spielt. Man vergleiche hierzu Corey & Stevens (Corey & Stevens, 1983).

VIII. Konfigurationen des Patch-Clamp

Cellattached-Konfigurationen

Wenn, wie in obigem Abschnitt beschrieben, ein Gigaseal zwischen Patchpipette und Zellmembran sich ausgebildet hat, liegt bereits eine einfache Cellattached-Konfiguration vor. Sie ermöglicht, einen Membranfleck einer intakten Zelle zu untersuchen.

Eine Weiterentwicklung dessen stellt die Wholecell-Konfiguration dar. Man erhält sie, indem man bei der Cellattached-Konfiguration durch einen Spannungspuls den Membranfleck zerstört, ohne daß der Kontakt zwischen Membran und Glas sich ändert, wobei der Gigaseal erhalten bleibt. Die Mikroelektrode erhält dadurch einen direkten elektrischen Kontakt zum Zellinneren. Allerdings ist diese Methode nur bei Zellen kleinen Durchmessers (nicht bei Oozyten) geeignet, weil diese eine entsprechend geringe

elektrische Kapazität aufweisen und somit eine hohe Zeitauflösung der Messungen gewährleistet ist.

Extrazelluläre Konfigurationen

Wenn man nach Erreichen einer Cellattached-Konfiguration die Pipette einfach von der Zelle wegzieht, wird dadurch der Membranfleck aus der Zelle herausgerissen. Durch die gute Haftung der Membran an das Glas (siehe Abschnitt Sealbildung {VII}) bleibt der Gigaseal erhalten. Damit sich der Membranfleck nicht an seinen Rändern wieder schießt und ein Vesikel (Kugel aus einer Lipiddoppelschicht) bildet, muß die Badlösung calciumfrei und magnesiumhaltig sein. In dieser Konfiguration zeigt die an der Zelle ursprünglich innensitzende Seite des Membranflecken nach außen in die Badlösung. Deshalb nennt man dies die Inside-Out-Konfiguration.

Eine weitere Möglichkeit ist, wie bei der Wholecell-Konfiguration, den Membranfleck erst einmal zu zerstören und dann die Pipette langsam wegzuziehen. Ist die Badlösung calciumhaltig schnürt sich hierbei das entstandene Loch wieder zu einem neuen Membranfleck zusammen und reißt von der Zelle ab. Damit liegen die Seitenverhältnisse aber umgekehrt zur Inside-Out Konfiguration, weshalb man dies die Outside-Out-Konfiguration nennt, welche auch für diese Arbeit verwandt wurde.

Zu allen Konfigurationen sei auf Hamill et. al. (Hamill *et al.*, 1981) verwiesen, sowie auf M. Cahalan und E. Neher (Cahalan & Neher, 1992)

A.4.5. Methodik der Auswertung aufgenommener Ströme

I. Einleitung:

Für die hier vorliegende Arbeit ist sowohl die Zeitabhängigkeit transmembraner Ströme als auch ihre Potentialabhängigkeit von Bedeutung. Um beide Abhängigkeiten mittels eines Experiments zu untersuchen, wird eine Folge von ausgesuchten Membranpotentialen durchlaufen und für jedes Potential der Zeitverlauf des Stromes gemessen. Die Spannungsfolge ist derart gestaltet, daß man von einem Haltepotential ausgehend auf ein Potential der Folge und wieder zurück auf das Haltepotential springt, wobei eine aufsteigende Spannungsfolge in 10mV- oder 20mV-Schritten von -150mV bis +40mV durchlaufen wird. Die Länge eines Rechteckspannungspulses beträgt 80ms bis 100ms. Die aufgenommenen Ströme besitzen sowohl eine relaxierende Komponente, die sich aus kapazitiven und transienten Strömen zusammensetzt, als auch eine stationäre Komponente (engl. steady-state). Da die auszuwertenden Ströme durch Differenzbildung zwischen gemessenen Strömen errechnet werden, wie im Ergebnisteil noch näher beschrieben wird, ist folglich der kapazitive Stromanteil eliminiert. Ein Beispiel für eine solchen Stromaufnahme ist in Abbildung {Abb.19} gezeigt. Die Auswertung beider Komponenten sei im folgenden beschrieben:

II. Auswertung von steady-state-Strömen:

Um den stationären Strom bei einer bestimmten Spannung zu erhalten, muß gewährleistet sein, daß die transienten und kapazitiven Ströme soweit relaxiert sind, daß ihr Anteil gegenüber dem des stationären vernachlässigbar klein ist. Bei den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit sind sie das nach etwa 40ms. Die letzten 10-20% der Stromantwort jedes einzelnen Spannungspulses sind deshalb bei einer Pulslänge von 80-100ms als stationär anzusehen und werden gemittelt. Man erhält somit für jedes Potential einen dazugehörigen Stromwert und kann daraus eine Strom-Spannungskennlinie generieren.

III. Auswertung transienter Ströme:

Um die durch die transienten Ströme verursachte Ladungsverschiebung zu bestimmen, integriert man die Stromantwort eines Spannungspulses über die Zeit, wobei der Wert des stationäre Anteils als Basislinie genommen wird. Aus den so erhaltenen Werten kann eine Ladungs-Spannungskennlinie generiert werden.

Weiterhin werden zur Bestimmung der Relaxationszeiten von Exponentialfunktionen und deren Amplituden mit einem Näherungsverfahren des Programms Origin 5.0 {A.5.6} diese Funktionen an den zeitlichen Stromverlauf angepaßt.

A.5. Material

A.5.1. Versuchstiere

Xenopus laevis

African Xenopus Facility, Südafrika

A.5.2. Lösungen

I. Standardlösungen:

Substanzen / Lösungen		ORI	G-ORI	SP-ORI	Ca-freies G-ORI	Na- loading	post- loading	Collage- nase- Lösung
Salze	NaCl	90mM	90mM	90mM	90mM	110mM	100mM	90mM
	KCl	2mM	2mM	2mM	2mM	–	–	2mM
	CaCl ₂	2mM	2mM	2mM	–	–	1mM	–
	MgCl ₂	–	–	–	2mM	–	–	2mM
	BaCl ₂	–	–	–	–	–	5mM	–
	TEA	–	–	–	–	–	20mM	–
	Na-Citrat	–	–	–	–	2,5mM	–	–
Antibiotika	Gentamicin	–	70mg/l	–	70mg/l	–	–	70mg/l
	Streptomycin	–	–	25mg/l	–	–	–	–
	Penicillin	–	–	20mg/l	–	–	–	–
Enz	Collagenase	–	–	–	–	–	–	15g/l 30g/l
Puffer	MOPS	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM
	NaOH	<1mM (titriert)	<1mM (titriert)	<1mM (titriert)	<1mM (titriert)	<1mM (titriert)	<1mM (titriert)	<1mM (titriert)
pH-Wert		7,4	7,4	7,4	7,4	7,6	7,6	7,4

II. Lösungen der Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Messungen

Lösung in den Mikroelektroden:

3mM KCl

Badlösungen jeweils für pH6, pH7,5 und pH9:

0mM / 5mM KCl

100mM NaCl / TMA-Cl

20mM TEA-Cl

5mM BaCl₂

5mM NiCl₂

5mM MES(pH6) / MOPS (pH7,5) / Tricine(pH9)

0μM / 5μM Ouabain

Titration mit Tris

III. Lösungen der Patch-Clamp-Messungen

Lösung in den Badelektroden mit Agar-Brücke:

3mM KCl

Pipettenlösung (pH7,5):

70mM NaCl

25mM NaOH(Pufferung)

5mM MgCl₂

5mM EGTA

5mM MOPS

5mM ATP

Badlösungen jeweils für pH6, pH7,5 und pH9:

0mM / 5mM KCl

100mM NaCl

5mM NaOH (Titration)

20mM TEA-Cl

5mM BaCl₂

(5mM NiCl₂)

5mM MES(pH6) / MOPS (pH7,5) / Tricine(pH9)

5μM / 10mM Ouabain

Saccharose-Lösung (Oozytenschrumpflösung) (pH7,4):

300mM Saccharose

90mM NaCl

2mM Ca₂Cl

5mM MOPS

1mM NaOH(Titration)

IV. Sonstige Lösungen

Zur Betäubung des Frosches:

MS222-Lösung: 3-Aminobenzoessäure Ethylester Methansulfonat (=Tricaine)
0,2% in Leitungswasser, pH 7,2

A.5.3. Chemikalien

BaCl ₂	Fluka, Neu-Ulm
Bencylpenicillin Natriumsalz	Fluka, Neu-Ulm
CaCl ₂	Fluka, Neu-Ulm
Collagenase	Sigma, Deisenhofen
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Gentamicine Sulfat	Fluka, Neu-Ulm
KCl	Fluka, Neu-Ulm
MES	Fluka, Neu-Ulm
MgCl ₂	Fluka, Neu-Ulm
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
MOPS	Sigma, Deisenhofen
MS222	Sandoz, Basel, Scheiz
Na ₂ ATP	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Fluka, Neu-Ulm
NaOH	Sigma, Deisenhofen
NiCl ₂	Sigma, Deisenhofen
Ouabain	Fluka, Neu-Ulm
Saccharose	Fluka, Neu-Ulm
Streptomycine Sulfat	Fluka, Neu-Ulm
TEA-Cl	Fluka, Neu-Ulm
TMA-Cl	Fluka, Neu-Ulm
Tricine	Fluka, Neu-Ulm
TRIS	Fluka, Neu-Ulm

A.5.4. Geräte

Analog/Digital-Wandler, CED 1401	Cambridge Electronic
CCD-Vidiokamera (s/w)	Kappa, Gleichen
Computer, Pentium Celeron 266MHz	Vobis, Frankfurt
Computer, XT	IBM, GB
Elektrodenschleifapparatur	MPI-Werkstatt
EPC9	Heka, Lambrecht
Heat Pollisher MF-78	Narishige, Japan
Inkubationsschrank	Leibold Haereus, Hanau
Kaltlichtlampe, KL 1500	Schott, Mainz
Lupenmikroskop, Wild M3Z	Heerbrugg, Schweiz
Mikroinjektionspumpe	Drummond, USA

Oszillograph	Bürklin, München
Patchelektrodenpuller PP-83	Narishige, Japan
Puller Modell 753	Campden; England
Reistwasseranlage, Milli-Q	Millipore, Eschborn
S/W-Video-Monitor	Kappa, Gleichen
Temperaturkontrolle	MPI-Werkstatt
Tiefkühltruhe	Liebherr, Frankfurt
Vakuumpumpe	Kühn&Bayer, Nidderau
Voltage-clamp-Verstärker, Turbo TEC01	npi electronics, Tamm
x-t Schreiber	Sekonic
XY-Schreiber	Gould, Darmstadt

A.5.5. Arbeitsmaterial

Elektrodenhalter	Zimmer, Elz
Faradaykäfig	MPI-Werkstatt
Glaskappilare Ø 1,2	Drummond, USA
Glaskappilare Ø 1,5	Hilgenberg, Malsfeld
Injektionskammer	MPI-Werkstatt
Kulturschalen	Nunc, Dänemark
Messkammer	MPI-Werkstatt
Mikromanipulator, mechanisch	Bachhofer, Reutlingen
Mikromanipulatoren, hydraulisch	Narishige, Japan
Patchelektrodenhalter	Bode, Göttingen
Peltierrelemente	MPI-Werkstatt
Stative	Bachhofer, Reutlingen
Teflon-Magnetventile	Novodirect, Kehl
U-Rohr-Manometer	Fischer, Frankfurt

A.5.6. Software

Corel Draw	Corel Corporation, USA
IQV	W.Schwarz, L.Vasilets MPI
Microcal Origin 5.0	Microcal, Northampton, USA
Puls+Puls-Fit	Heka, Lambrecht
Reference Manager 6.0	Research Information Systems, USA
Word 97	Micorsoft

B. Ergebnisteil

B.1. Ergebnisse pH-abhängiger Kaliumdifferenzen

B.1.1. Einleitung

Die Na^+/K^+ -ATPase benötigt wie im Abschnitt {A.3.1.III} beschrieben zum Durchlaufen eines vollen Pumpenzyklus im normalen Modus von der Konfiguration P-E_2 über $\text{E}_2\cdot\text{K}_2$, $\text{E}_1\cdot\text{ATP}$, $\text{Na}_3\cdot\text{E}_1\cdot\text{ATP}$ und $\text{P-E}_2\cdot\text{Na}_3$ zurück zu P-E_2 sowohl intrazelluläres Natrium als auch extrazelluläres Kalium. Durch diesen Pumpenzyklus werden 2K^+ in die Zelle und 3Na^+ hinaus gepumpt. Man erhält somit pro Zyklus und Pumpe einen Nettoladungstransport von $1e^+$. Unter physiologischen Bedingungen, d.h. einer Potentialdifferenz intrazellulär gegenüber extrazellulär von -60mV und $[\text{Na}^+]_o=10\text{mM}$ sowie $[\text{K}^+]_o=2\text{mM}$, wird der Zyklus 10-100mal in der Sekunde durchlaufen. Befindet sich extrazellulär kein Kalium mehr in der Lösung, dafür aber Natrium, kann kein voller Pumpenzyklus im normalen Modus durchlaufen werden, und man beobachtet auch keinen Nettostrom der Pumpe. Die Pumpenfunktion der Na^+/K^+ -ATPase ist somit blockiert. Durch einen Wechsel der extrazellulären Lösung zwischen 0mM und 5mM Kalium kann man somit steady-state-Ströme {A.4.5.II} bei jeweils aus- und wiedereingeschalter Pumpenfunktion messen. Durch Differenzbildung erhält man die Summe aller Nettoströme der gemessenen Pumpen. Bei Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Messungen an ganzen, Na^+ -beladenen {A.4.2.VIII} Oozyten des Stadiums V {A.3.3.II} liegen die Nettoströme endogener Na^+/K^+ -ATPasen in einer Größenordnung von 30-80nA. Bei in Oozyten exprimierten Na^+/K^+ -ATPasen können Ströme von über 200nA erreicht werden. Bei Patch-Clamp-Messungen mit einem Membranflecken von ca. $\varnothing=30\mu\text{m}$ Durchmesser erhält man hingegen Ströme um 5-10pA von endogenen sowie um 10-50pA von exprimierten Pumpen.

B.1.2. pH-Abhängigkeit eines kaliumaktivierten Pumpenstroms bei Abwesenheit von extrazellulärem Natrium

Während der Transientenstrommessungen {B.2.2} mit dem Voltage-Clamp-Verfahren an der ouabainsensitiven Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica* {A.3.1} war es zweckmäßig, die Anzahl der in den Oozyten exprimierten Pumpen durch die Höhe des kaliumaktivierten Pumpenstroms herauszufinden, um sich genügend großer Stromantworten sicher zu sein. Deshalb wurden diese Pumpenströme am Anfang eines jeden Experiments gemessen, und zwar bei drei verschiedenen extrazellulären pH-Werten, um eine pH-Abhängigkeit zu untersuchen. Für jeden pH-Wert wurden eine Lösungsabfolge von 0mM - 5mM - 0mM Kalium gewählt, wobei die Lösungen natriumfrei waren, denn es sollte ein Einfluß von extrazellulärem Natrium ausgeschlossen werden. Für jede Lösung

wurden steady-state-Ströme einer Spannungsfolge von -150mV bis 30mV mit 10mV-Potentialsprüngen gemessen, wobei das Haltepotential bei -60mV lag. Durch Differenzbildung der Ströme bei 5mM und 0mM erhielt man den kaliumabhängigen Pumpenstrom und konnte durch Mittelung der Ströme bei 0mM Kalium eine Driftkorrektur durchführen. Die Lösungen enthielten zudem 20mM TMA und 5mM Ba²⁺ zur Inhibierung von Strömen durch Kaliumkanäle, sowie 5mM Ni²⁺ zur Inhibierung von Strömen des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers, desweiteren einen Puffer für den jeweiligen pH-Bereich: für pH6 5mM MES, für pH7.5 5mM MOPS und für pH9 5mM Tricine. Zur Einstellung des pH-Bereichs wurde TRIS verwendet. Die Lösungen enthielten ferner 100mM TMA⁺, da sich an die steady-state-Messungen noch Messungen transienter Ströme mit Lösungen von 100mM Na⁺ anschlossen und darauf geachtet werden mußte, daß man die Oozyten nicht Lösungen unterschiedlicher Osmolarität aussetzte. Die Lösungen hatten eine Osmolarität von 150-200mOsm, welches physiologischen Bedingungen gerecht wird. Die Temperatur der Lösungen lag im Bereich von 20°C bis 22°C. Genauere Angaben zu den Lösungsrezepten finden sich in Abschnitt {A.5.2}.

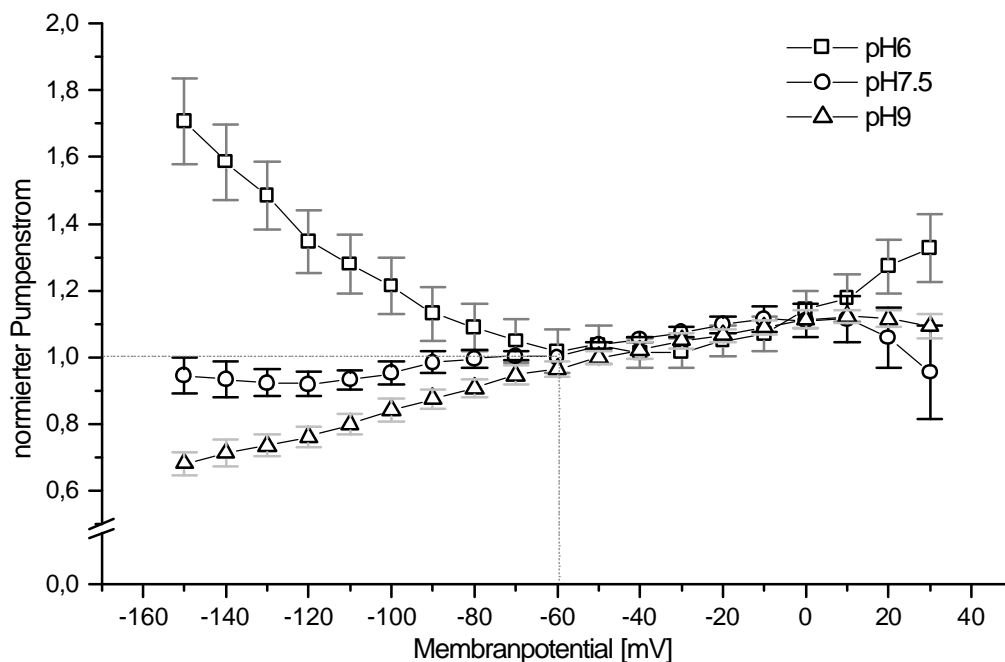


Abb.13: Strom-Spannungskennlinien $[K^+]_o$ -abhängiger Pumpenströme bei verschiedenen pH-Werten in einer $[Na^+]_o$ von 0mM. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainsensitive Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica*. Die Pumpenströme wurden aus einer Differenz von steady-state-Strömen der Lösungen mit 5mM K^+ sowie mit 0mM K^+ gebildet und bei pH7.5 und -60mV auf den Wert 1 normiert.

Die obige Abbildung {Abb.13} zeigt die Ergebnisse dieser steady-state-Messungen für die drei verschiedenen pH-Werte. Die steady-state-Ströme wurden für pH7.5 bei -60mV auf den Wert 1 normiert. Zur Mittelung wurden hierbei mehrere Experimente herangezogen (Bei pH6 waren es 8, bei pH7.5 waren es 10 und bei pH9 waren es 3 Experimente). Es zeigte sich, wie erwartet {C.1}, daß bei pH7.5 der Pumpenstrom annähernd potentialunabhängig ist. Die Ströme der anderen pH-Werte wiesen bei starker Hyperpolarisierung allerdings eine starke Potentialabhängigkeit auf. Bei pH6 verursacht

eine zunehmende Hyperpolarisierung ein Anwachsen des auswärts gerichteten Pumpenstroms (dh. eines Stroms von intra- nach extrazellulär). Hingegen bewirkt die Hyperpolarisierung bei pH9 eine Verringerung des Stroms. Anhand der Abbildung erkennt man ebenfalls potentialabhängiges Verhalten der Ströme bei einer Depolarisierung von mehr als 10mV. In diesem Bereich sind die Ergebnisse aber mit Vorsicht zu behandeln, da es hier große Auswärtsströme von Ca^{2+} -insensitiven Chloridkanälen geben kann, die nach bisherigem Kenntnisstand nicht zu inhibieren sind.

B.1.3. Einfluß des Protonen-Einwärtsstroms bei Abwesenheit von extrazellulärem Kalium und Natrium auf die Ergebnisse

Es ist seit der Arbeit von J.Rettinger (Rettinger, 1996) bekannt, daß im Falle von $[\text{K}^+]_o = [\text{Na}^+]_o = 0\text{mM}$ die Na^+/K^+ -ATPase einen Modus mit zwei Zyklen hat, von denen der eine bei einem Durchlauf ein extrazelluläres Proton in die Zelle pumpt. Der zweite Zyklus pumpt 3Na^+ aus der Zelle, hat aber eine wesentlich geringer Pumpenrate, als der erste. Der Modus sei hier beschrieben:

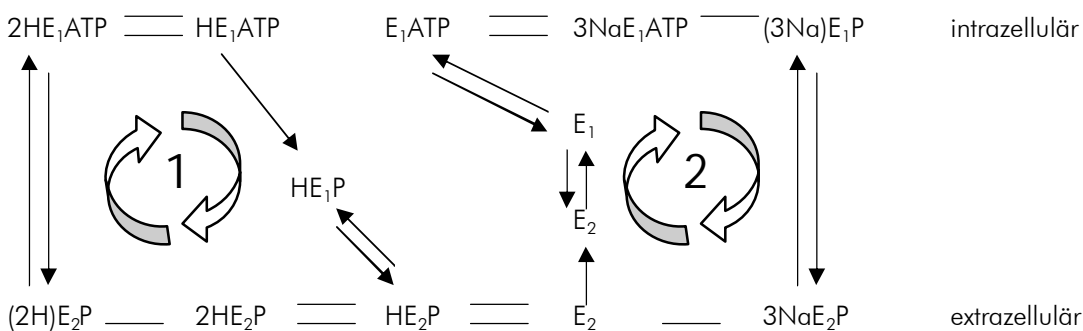


Abb.14: In der Arbeit von J. Rettinger vorgeschlagenes Reaktionsschema einer Na^+/K^+ -ATPase bei Abwesenheit von extrazellulärem K^+ und Na^+ . Ein einwärts gerichteter Pumpenstrom würde bedeuten, daß die Pumpenrate des Zyklus 1 wesentlich höher als die des Zyklus 2 ist.

Dieser Modus kommt aber weder bei $[\text{Na}^+]_o \neq 0\text{mM}$ noch bei $[\text{K}^+]_o \neq 0\text{mM}$ vor. Die Differenzbildung für die Ergebnisse des vorherigen Abschnittes {B.1.2} wurde aus Strömen bei zwei verschiedenen Lösungen gebildet. Eine der Lösungen hatte 0mM K^+ und 0mM Na^+ , weswegen die Na^+/K^+ -ATPase dabei im Pumpenmodus mit Protoneneinwärtsstrom arbeitete. Da die andere Lösung 5mM K^+ besaß, arbeitete die Pumpe im normalen Modus ohne Protoneneinwärtsstrom. Die aus der Differenzbildung erhaltenen kaliumabhängigen Pumpenströme wurden somit durch den Anteil des Protoneneinwärtsstroms verfälscht. Um diesen Anteil zu eliminieren und den so korrigierten Pumpenstrom zu betrachten, war es zweckmäßig, die steady-state-Ströme einer Lösung mit 5mM K^+ und 0mM Na^+ , sowie einer mit 0mM K^+ und 100mM Na^+ zu vergleichen. Ansonsten unterschieden sich die Lösungen in ihrer Rezeptur nicht von der im vorigen Abschnitt angeführten. Bei der ersten Lösung läuft die Pumpe im normalen Modus, während der einwärtsgerichtete Protonenstrom durch das Kalium blockiert ist. Bei der zweiten ist der normale Modus durch die Abwesenheit von Kalium und der Modus des Protonenstroms durch das Vorhandensein von Natrium blockiert. Für jede Lösung wurden steady-state-Ströme einer Spannungsfolge von -150mV bis 30mV mit 10mV -Potentialsprüngen gemessen, wobei das Haltepotential bei -60mV lag. Durch Differenzbildung der Ströme der beiden Lösungen erhielt man den

kaliumabhängigen Pumpenstrom, der in {Abb.15} durch Strom-Spannungskennlinien bei verschiedenen pH-Werten dargestellt ist. Eine Driftkorrektur konnte aber auf Grund des Lösungsprotokolls nicht durchgeführt werden.

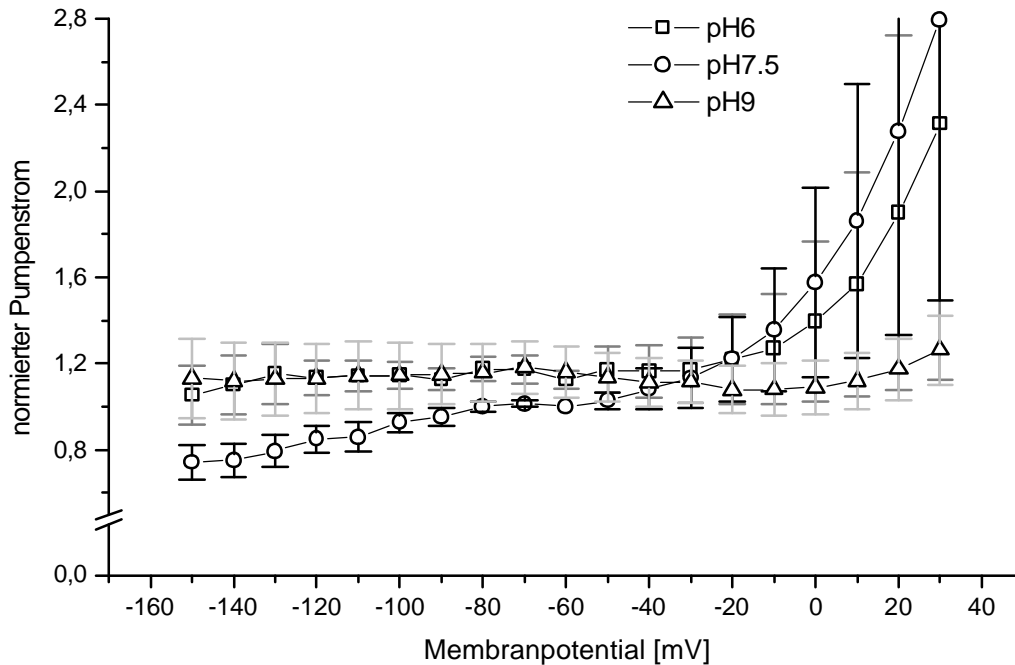


Abb.15: Korrektur der Strom-Spannungskennlinien $[K^+]_o$ -abhängiger Pumpenströme bei verschiedenen pH-Werten in einer $[Na^+]_o$ von 0mM durch Abzug des einwärtsgerichteten H^+ -Stroms bei $[K^+]_o=[Na^+]_o=0mM$. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainsensitiven Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica*. Die Pumpenströme wurden aus einer Differenz von steady-state-Strömen der Lösungen mit 5mM K^+ und 0mM Na^+ , sowie mit 0mM K^+ und 100mM Na^+ gebildet und bei pH7.5 und -60mV auf den Wert 1 normiert.

Die steady-state-Ströme wurden für pH7.5 bei -60mV auf den Wert 1 normiert. Zur Mittelung wurden hierbei mehrere Experimente herangezogen (Bei pH6 waren es 4, bei pH7.5 waren es 6 und bei pH9 waren es 3 Experimente). Wie man an Hand dieser Abbildung deutlich sieht, haben sich die Potentialabhängigkeiten der Strom-Spannungskennlinien bei verschiedenen pH-Werten gegenüber denen des vorherigen Abschnitts grundlegend geändert. D.h., der Anteil des einwärtsgerichteten Protonenstroms an den im vorherigen Abschnitt ermittelten kaliumabhängigen Pumpenstrom war doch erheblich. Die in {Abb.15} gezeigten Ergebnisse weisen nun keinen Unterschied mehr zwischen den Strom-Spannungskennlinien von pH6 und pH9 im hyperpolarisierten Bereich auf. Auch haben die Ströme bei diesen pH-Werten kaum eine Potentialabhängigkeit im Bereich $<-30mV$. Hingegen reduziert sich der auswärtsgerichtete Pumpenstrom bei pH7.5 umso mehr, je größer die Hyperpolarisation ist. Eine Beurteilung der Depolarisation ist auch hier aus den oben genannten Gründen mit Vorsicht anzugehen, zumal eventuelle Unterschiede in der Potentialabhängigkeit durch den in diesem Bereich großen Standardfehler überdeckt werden.

B.1.4. pH-Abhängigkeit eines kaliumaktivierten Pumpenstroms bei Anwesenheit von extrazellulärem Natrium

Weiter bot sich die Frage dar, wie sich extrazelluläres Natrium auf die pH-Abhängigkeit des kaliumaktivierten Pumpenstroms auswirkt. Alle Badlösungen enthielten deshalb bei dieser Versuchsreihe 100mM Na^+ . Es wurde wieder an der ouabainsensitiven Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica* bei drei verschiedenen pH-Werten gemessen: pH6, pH7.5 und pH9. Für jeden pH-Wert wurde eine Abfolge der Badlösungen von 0mM - 5mM - 0mM Kalium gewählt. Für jede Lösung wurden steady-state-Ströme einer Spannungsfolge von -150mV bis 30mV mit 10mV-Potentialsprüngen gemessen, wobei das Haltepotential bei -60mV lag. Durch Differenzbildung der Ströme bei 5mM und 0mM erhielt man den kaliumabhängigen Pumpenstrom und konnte durch Mittelung der Ströme bei 0mM Kalium eine Driftkorrektur durchführen. Die durch die Differenzbildung erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung {Abb.16} dargestellt. Wurden die vorangegangenen Messungen der steady-state-Ströme noch mit dem Voltage-Clamp-Verfahren durchgeführt, so wurde hier das Patch-Clamp-Verfahren eingesetzt. Der Grund hierfür lag jedoch nicht an den kaliumabhängigen Strömen, sondern ist allein darin zu suchen, daß diese Messungen zusammen mit Messungen transienter Ströme innerhalb eines Protokolls durchgeführt wurden und die letzteren einen Wechsel des Verfahrens nötig machten {B.2.2}. Die Badlösungen enthielten auch hier 20mM TMA und 5mM Ba^{2+} zur Inhibierung von Kaliumkanälen, sowie 5mM Ni^{2+} zur Inhibierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (für die defollikulierte und devitellenisierte Oozytenmembran beim Patch-Clamp-Verfahren nicht mehr notwendig, aber zum Vergleich mit den Voltage-Clamp-Ergebnissen nötig). Folgende Konzentrationen eines Puffers wurden für den jeweiligen pH-Bereich gewählt: für pH6 5mM MES, für pH7.5 5mM MOPS und für pH9 5mM Tricine. Die Pipettenlösung beinhaltete 5mM ATP zur Aktivierung der Pumpe, 100mM Na^+ , 5mM Mg^{2+} als Ca^{2+} -Ersatz, 5mM EGTA zur Komplexbindung von freiem Ca^{2+} , und 5mM MOPS als Puffer. Zur Einstellung des pH-Bereichs der Badlösungen wurde TRIS verwendet und für die Pipettenlösung NaOH. Die Lösungen hatten eine Osmolarität von 150-200mOsm, welches physiologischen Bedingungen gerecht wird. Die Temperatur der Lösungen lag im Bereich von 20°C bis 22°C. Genauere Angaben zu den Lösungsrezepten finden sich in Abschnitt {A.5.2}.

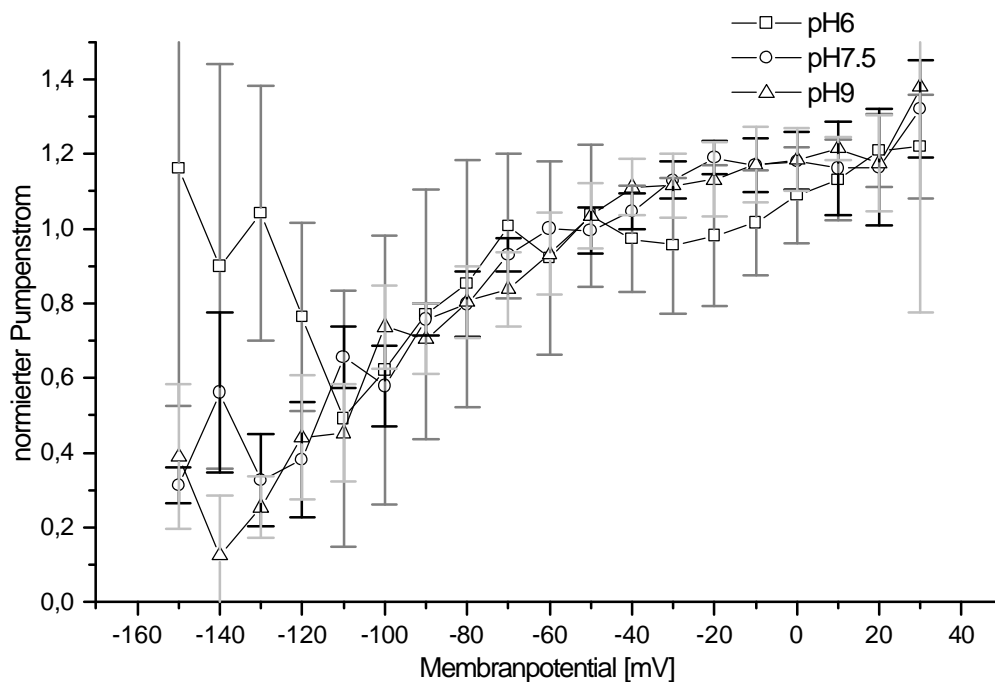


Abb.16: Strom-Spannungskennlinien $[K^+]_o$ -abhängiger Pumpenströme bei verschiedenen pH-Werten in einer $[Na^+]_o$ von 100mM. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainsensitive Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica*. Die Pumpenströme wurden aus einer Differenz von steady-state-Strömen der Lösungen mit 5mM K^+ sowie mit 0mM K^+ gebildet und bei pH7.5 und -60mV auf den Wert 1 normiert.

Die obige Abbildung {Abb.16} zeigt die aus der Differenzbildung entstandenen Strom-Spannungskennlinien $[K^+]_o$ -abhängiger Pumpenströme bei den verschiedenen pH-Werten. Die steady-state-Ströme wurden für pH7.5 bei -60mV auf den Wert 1 normiert. Zur Mittelung wurden hierbei 4 Experimente herangezogen. Aus der Abbildung erkennt man eine, für alle pH-Werte gleichermaßen geltende, Potentialabhängigkeit bei Hyperpolarisation im Bereich von -110mV bis -60mV: Bei steigender Hyperpolarisation sinkt der auswärts gerichtete Pumpenstrom im Bereich von -110mV bis -30mV um fast die Hälfte. Zwischen den Kennlinien der verschiedenen pH-Werte lassen sich aber im Rahmen der Fehlerbalken keine Unterschiede feststellen. Für den stark hyperpolarisierten Bereich < -100 mV ist eine Aussage auf Grund des Fehlers unmöglich. Im Bereich > -30 mV der Depolarisation ist eine Sättigung zu erkennen. Die beim Voltage-Clamp-Verfahren störenden Chloridkanäle im Bereich der Depolarisation bilden beim Patch-Clamp-Verfahren kaum ein Problem, weil die Faktoren, die das Öffnen dieser Kanäle begünstigen, durch die Vorgabe der Lösung auf der Membraninnenseite unterbunden werden.

B.2. Ergebnisse der transienten Ströme des Na/Na-Austausches

B.2.1. Einleitung

Wie schon in dem Abschnitt {A.3.1.IV} beschrieben, durchläuft die Na^+/K^+ -ATPase in einer extrazellulären kaliumfreien, aber natriumhaltigen Lösung eine Konformationsänderung, deren Modus einen elektroneutralen Na/Na-Austausch (engl. Na/Na-Exchange) darstellt. Wie ebenfalls beschrieben, existieren noch andere elektrogene Modi, die aber von der Pumpe wesentlich seltener durchlaufen werden {B.2.2}. Beim Pumpenzyklus des hier zu betrachtenden Modus wird der halbe Zyklus des normalen Modus mit Natriumaufnahme und -abgabe durchlaufen, d.h. von $\text{E}_1\cdot\text{ATP}$ über $\text{E}_1\text{P}\cdot(\text{Na}_3)$, E_2PNa_3 nach P-E_2 und wieder zurück. Obwohl der Na/Na-Austausch elektroneutral ist, also keinen Nettostrom produziert, ist er dennoch potentialabhängig. Es hat sich jedoch gezeigt (wie in (Vasilets *et al.*, 1993) und (Rakowski *et al.*, 1991) beschrieben), daß nicht die Konformationsänderung an sich potentialabhängig ist, sondern ein auf der extrazellulären Seite der Na^+/K^+ -ATPase befindlicher Zugangskanal (engl. access-channel), der zu einer potentialabhängigen Bindung der Kationen führt. Unter den oben genannten Bedingungen für einen Na/Na-Austausch bewirkt eine Hyperpolarisierung somit eine Erhöhung der Na^+ -Konzentration $[\text{Na}^+]_{\lambda}$ direkt an den Bindungsstellen. Das elektrochemische Reaktionsgleichgewicht zwischen den verschiedenen Konformationen des Austauschmodus wird sich somit weg von der P-E_2 -Konformation verschieben, d.h. ab einer bestimmten Größe der Hyperpolarisation befinden sich, statistisch gesehen, keine Pumpen der Zellmembran mehr in diesem Zustand. Umgekehrt verschiebt eine Depolarisation auf Grund einer Erniedrigung von $[\text{Na}^+]_{\lambda}$ das Gleichgewicht zur P-E_2 -Konformation, so daß hier ab einer bestimmten Größe des Membranpotentials alle Pumpen sich nun in dieser Konformation befinden. Durch einen Potentialsprung von einem dieser Extremwerte zum anderen kann man den über die Pumpen geflossenen transienten Strompuls messen, der während der Änderung von einem Schritt des Zyklus zum anderen entsteht und erhält durch Integration die zu dieser Änderung notwendige Ladungsverschiebung. Um nur den über die Pumpe geflossenen Strompuls zu erhalten, bildet man für gleiche Potentialsprünge eine Differenz zwischen Strömen, bei denen die Pumpe zum Na/Na-Austausch fähig ist, und Strömen, bei denen die Pumpe gänzlich blockiert ist. Diese Blockierung erreicht man durch eine Zugabe von Ouabain {A.3.1.V}, weshalb man die erhaltene Stromdifferenz auch Ouabaindifferenz nennt. Durch Messung einer ganzen Spannungsfolge, wie sie im Abschnitt {A.4.5} beschrieben ist, erhält man vom Membranpotential abhängige transiente Strompulse, deren Nullpunkt im Haltepotential definiert ist. Da beim Durchlauf der Spannungsfolge Ströme von Potentialsprüngen auf das Haltepotential und wieder auf den Wert zurück gemessen werden, erhält man so einwärtsgerichtete und auswärtsgerichtete transiente Strompulse (engl. On-Puls und Off-Puls) innerhalb einer Messung, die einzeln ausgewertet werden.

B.2.2. pH-Abhängigkeit der durch den Austausch verschobenen Ladung beim Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Verfahren

Um den Na/Na-Austausch {A.3.1.IV} auf eine extrazelluläre pH-Abhängigkeit zu untersuchen, war es sinnvoll, sich die Ladungsverschiebung zu betrachten, welche durch die transienten Ströme beim Austausch verursacht werden. Gemessen wurde zunächst mit Hilfe des Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Verfahrens {A.4.3} an der ouabainsensitiven Na⁺/K⁺-ATPase des *Torpedo californica* {A.3.1}. Es wurde mit pH-Werten von pH6, pH7.5 und pH9 gearbeitet. Sämtliche für diese Messungen benötigten Lösungen enthielten 100mM Na⁺ und waren kaliumfrei. Um die transienten Ströme zu erhalten, mußten Ouabaindifferenzen bei jedem pH-Wert ermittelt werden. Hierfür wurde ein Lösungsprotokoll durchlaufen, bei dem zunächst nacheinander für jeden pH-Wert eine ouabainfreie Lösung auf die Zelle gegeben wurde und schließlich für jeden pH-Wert eine Lösung mit 100µM Ouabain. Da es sich aber bei der hier verwendeten Na⁺/K⁺-ATPase um eine ouabainsensitive gehandelt hat, erhält man durch die oben beschriebenen Ouabaindifferenz natürlich nicht nur den transienten Stromanteil dieser Pumpe, sondern auch einen der endogenen Pumpe, welche ebenfalls ouabainsensitiv ist. Jedoch ist dieser endogene Anteil, wie in Experimenten eines späteren Kapitels {B.3} bewiesen, vernachlässigbar gegenüber dem der exprimierten Pumpe.

Sämtliche Lösungen enthielten zudem 20mM TMA und 5mM Ba²⁺ zur Inhibierung von Strömen durch die Kaliumkanäle sowie 5mM Ni²⁺ zur Inhibierung von Strömen des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers, desweiteren ein Puffer für den jeweiligen pH-Bereich: für pH6 5mM MES, für pH7.5 5mM MOPS und für pH9 5mM Tricine. Zur Einstellung des pH-Bereichs wurde TRIS verwendet. Die Lösungen hatten eine Osmolarität von 150-200mOsm, welches physiologischen Bedingungen gerecht wird. Die Temperatur der Lösungen lag im Bereich von 20°C bis 22°C. Genauere Angaben zu den Lösungsrezepten finden sich in Abschnitt {A.5.2}. Für jede Lösung wurden Ströme einer Spannungsfolge von -150mV bis 30mV mit 10mV-Abständen gemessen, wobei das Haltepotential bei -60mV lag {A.4.5} (Allerdings traten bei sehr hohen und sehr niedrigen Potentialen Stromsättigungen bei der Verstärkung auf, weshalb diese Ströme nicht ausgewertet wurden). Die aus diesen Strömen mit Hilfe der Ouabaindifferenz gewonnen transienten Ströme besaßen ein On- sowie ein Off-Signal. Sie wurden mit einem Tiefpaßfilter mit einer Eckfrequenz $f_c=0,5\text{kHz}$ gefiltert. On- und Off-Signale wurden separat integriert und die so gewonnenen Ladungs-Spannungs-Beziehungen für die pH-Werte pH6, pH7.5 und pH9 in der {Abb.16} als Kennlinien dargestellt:

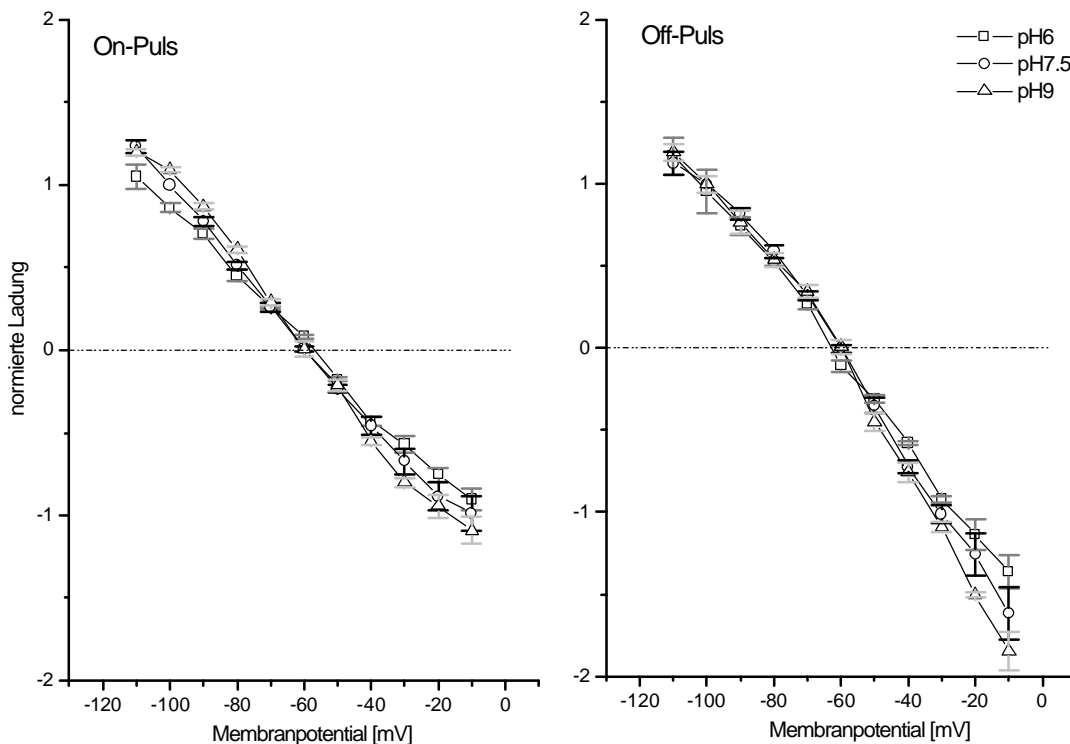


Abb.17: pH-Abhängigkeit von Ladungs-Spannungskennlinien einer durch transiente Ströme des Na/Na-Austauschers verschobenen Ladung. Die Ergebnisse sind jeweils nach On- und Off-Pulsen in zwei Graphen getrennt. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainsensitive Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica*. Die transienten Strompulse wurden aus einer Ouabaindifferenz von $[\text{Ouabain}]_o = 0 \mu\text{M}$ mit $[\text{Ouabain}]_i = 100 \mu\text{M}$ gebildet. Die Ladung wurde bei pH7.5 und -100mV auf den Wert 1 normiert. Gefiltert wurde mit $>5\text{kHz}$.

Die in der obigen Abbildung {Abb.17} dargestellten Ergebnisse ergaben sich aus Mittelung der Resultate mehrerer Experimente (Bei pH6 waren es 3, bei pH7.5 waren es 5 und bei pH9 waren es 3 Experimente). Die Ladung wurde für pH7.5 bei -100mV auf den Wert 1 normiert. Wie man der Abbildung unschwer entnehmen kann, läßt sich im Rahmen des Fehlerbereichs kein Unterschied zwischen den Ladungs-Spannungskennlinien weder beim On-, noch beim Off-Signal erkennen und somit auch keine pH-Abhängigkeit. Für den Verlauf der Kennlinien ist eine Fermi-Verteilung (bzw. Boltzmann-Verteilung) zu erwarten: Jede Konformation einer Na^+/K^+ -ATPase kann man als Zustand in einem Energieniveauschema betrachten. Hierbei bilden sämtliche Konformationen des Na/Na-Austauschs das Energieniveauschema für die Zustandsbesetzung. Das einwirkende Kraftfeld ist das des Membranpotentials. Da die Ladungsverschiebung im access-channel, wie in der Einleitung beschrieben, direkt mit der Konformationsänderung gekoppelt ist, steht sie in gleicher Beziehung zum Membranpotential wie eine Zustandsänderung im Energieniveauschema. Es ergibt sich daraus eine Fermi-Verteilung für die Ladung Q in Abhängigkeit vom Membranpotential V_m die folgendermaßen aussieht:

$$Q(V_m) = Q_{\min} + \frac{Q_{\text{tot}}}{1 + \exp\left[z_q \cdot (V_m - V) \cdot \frac{F}{R \cdot T}\right]}$$

- Q_{tot} = größtmögliche Ladung, die bei einem Sprung vom extrem depolaren zum extrem hyperpolaren Potentialbereich über die Pumpen fließen kann
 Q_{\min} = Minimalwert der Ladung.
 V = Mittelpunktspotential
 F/RT = 25mV bei 20°C
 z_q = effektive Wertigkeit

Diese Fermi-Verteilung wurde nun mit Hilfe eines Näherungsverfahrens (engl. fit) an die Kennlinien der {Abb.17} angepasst, wobei jeweils für das On- und Off-Signal nur je eine Funktion durch die drei Kennlinien der verschiedenen pH-Werte gelegt wurden, da sich diese nicht unterschieden. Das Näherungsverfahren wurde mit dem Programm Origin 5.0 {A.5.6} durchgeführt. In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse dieser Näherung dargestellt:

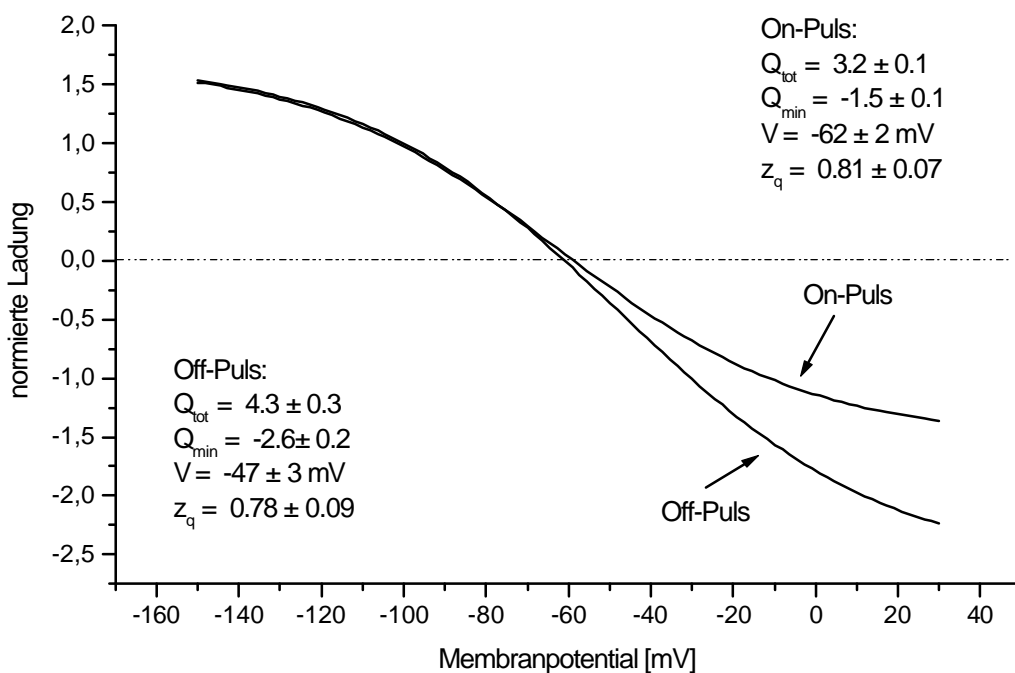


Abb.18:Näherung einer Fermi-Verteilung an die Ergebnisse aus {Abb.17}, wobei die Kennlinien der 3 pH-Werte zusammengenommen wurden. Die Funktion mit ihren Parametern findet sich im Text oben.

Die Abbildung zeigt deutlich, daß On- und Off-Signale im Bereich der Hyperpolarisierung sich bis fast zum Mittelpunktspotential gleichen. Danach entzweien die beiden Funktionsverläufe sich im Bereich der Depolarisierung. Nach den obigen theoretischen Erwägungen hätte man aber einen identischen Verlauf für On- und Off-Puls erwarten können, da der Na/Na-Austausch elektroneutral ist. Ein Grund für die Abweichung wäre in

der Totzeit der Voltage-Clamp-Regelung {A.4.3.II} des Verstärkers zusammen mit einer unterschiedlichen Kinetik der Ladungsverschiebung zu suchen, wie sie auch R.F. Rakowski in (Rakowski, 1993) allerdings für eine Erklärung der Abweichung in der Hyperpolarisierung heranzieht. Als effektive Wertigkeit ergab sich für die Fermi-Verteilung beim On-Puls $z_q = 0,81 \pm 0,07$ und beim Off-Puls $z_q = 0,78 \pm 0,09$. Beide Werte sind also recht nahe beieinander und bilden einen Mittelwert von $\bar{z}_q = 0,80 \pm 0,02$. Messungen von J.Rettinger et al. (Rettinger et al., 1994) ergaben bei entsprechenden Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Versuchen einen Wert von $z_q = 0,7$ bei Patch-Clamp-Versuchen, die eine wesentlich bessere zeitliche und damit kinetische Auflösung haben, einen Wert von $z_q = 0,9$. Dies stimmt also sehr gut mit den in Abbildung {Abb.18} dargestellten Ergebnissen überein. Das in der Arbeit von J.Rettinger et al angegebene Mittelpunktspotential lag mit -78mV gleichwohl tiefer als die Mittelpunktspotentiale von $V = -62 \pm 2\text{mV}$ für den On-Puls und $V = -48 \pm 3\text{mV}$ für den Off-Puls.

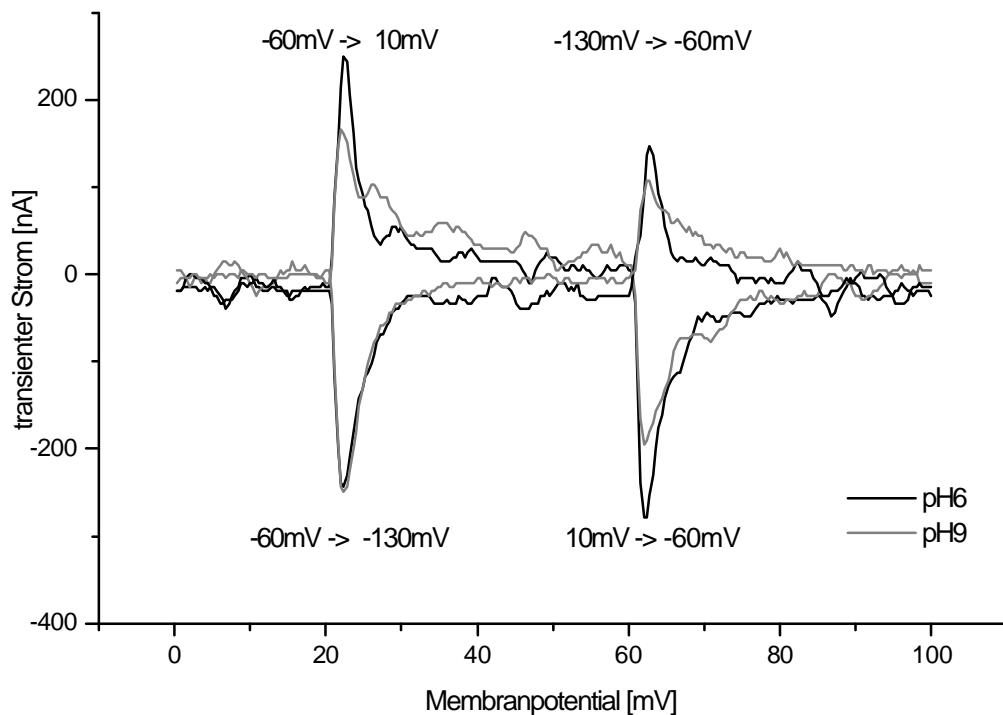


Abb.19: Strom-Spannungskurven transienter Strompulse zweier Spannungssprünge ($-60\text{mV} \leftrightarrow -130\text{mV}$ u. $-60\text{mV} \leftrightarrow -10\text{mV}$) eines Experiments bei zwei verschiedenen pH-Werten (pH6 u. pH9). Das Experiment wurde an der ouabainsensitiven Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica* durchgeführt. Die transienten Strompulse wurden aus einer Ouabaindifferenz von $[\text{Ouabain}]_a = 0\mu\text{M}$ mit $[\text{Ouabain}]_c = 100\mu\text{M}$ gebildet.

Obwohl die in Abbildung {Abb.17} dargestellten Ergebnisse keine Unterschiede zwischen den Ladungs-Spannungskennlinien der einzelnen pH-Werte zeigten, mußte man doch bei Betrachtung der Strom-Spannungskurven von einer unterschiedlichen Kinetik der Strompulse bei verschiedenen pH-Werten ausgehen. Die Abbildung {Abb.19}, die On- und Offsignale zweier Spannungssprünge bei zwei verschiedenen pH-Werten darstellt, soll das Gesagte verdeutlichen. Um jedoch eine Analyse der Kinetik der transienten Stromsignale durchführen zu können, hat das Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Verfahren

eine zu geringe Zeitauflösung, um akzeptable, dem Patch-Clamp-Verfahren gleichwertige, Ergebnisse zu liefern, wie es J. Rettinger et al. (Rettinger *et al.*, 1994) in ihrer Arbeit zeigten. Es wurde deshalb beschlossen, weitere Experimente zur Untersuchung der Kinetik transienter Ströme mit dem von der Zeitauflösung dem Voltage-Clamp-Verfahren her überlegenen Patch-Clamp-Verfahren durchzuführen.

B.2.3. pH-Abhängigkeit der Relaxationszeitkonstanten beim Patch-Clamp-Verfahren

Wie bereits im vorherigen Kapitel {B.2.2} erwähnt, war es während der Experimente nötig geworden, vom Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Verfahren auf das Patch-Clamp-Verfahren umzusteigen, da das zweite für kinetische Untersuchungen eine wesentlich bessere zeitliche Auflösung hat. Die Experimente wurden sowohl an der ouabainsensitiven (OS) als auch an der ouabainresistenten (OR) Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica* durchgeführt. Die transienten Strompulse wurden wieder durch eine Ouabaindifferenz gewonnen. Da die endogene Pumpe der Oozyte bereits bei $1\mu\text{M}$ [Ouabain]_o blockiert ist und die OR Pumpe erst bei einigen $100\mu\text{M}$ [Ouabain]_o, wurde, um den transienten Stromanteil endogener Pumpen zu eliminieren, für den jeweiligen pH-Wert eine Ouabaindifferenz einer Badlösung mit 1mM Ouabain und einer mit $5\mu\text{M}$ Ouabain durchgeführt. Dadurch erhielt man die transienten Ströme der OR Na^+/K^+ -ATPase beim Na/Na-Austausch. Für die OS Pumpe wurde die Ouabaindifferenz einer Badlösung mit 1mM Ouabain und einer mit 0mM durchgeführt. Die Badlösungen hatten sämtlich 100mM Na^+ . Desweiteren enthielten sie 20mM TMA und 5mM Ba^{2+} zur Inhibierung von Strömen durch die Kaliumkanäle. Nickel war beim Patch-Clamp-Verfahren nicht mehr notwendig, da sich der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nur in der Membran der Follikelzellen aufhält und auch kein direkter Vergleich mehr mit den Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Messungen nötig war. Als Puffer für den jeweiligen pH-Bereich dienten: für pH6 5mM MES, für pH7.5 5mM MOPS und für pH9 5mM Tricine. Die Pipettenlösung beinhaltete 5mM ATP zur Aktivierung der Pumpe, 100mM Na^+ , 5mM Mg^{2+} als Ca^{2+} -Ersatz, 5mM EGTA zur Komplexbindung von freiem Ca^{2+} , und 5mM MOPS als Puffer. Zur Einstellung des pH-Bereichs der Badlösungen und der Pipettenlösung wurde NaOH verwendet. Die Lösungen hatten eine Osmolarität von $150\text{-}200\text{mOsm}$, welches physiologischen Bedingungen gerecht wird. Die Temperatur der Lösungen lag bei 20°C . Genauere Angaben zu den Lösungsrezepten finden sich in Abschnitt {A.5.2}.

Für jede Lösung wurden Stromsignale in Antwort auf Spannungspulse von -140mV bis 40mV mit 20mV -Abständen {A.4.5} gemessen. Das Haltepotential lag hier bei -30mV , da dieser Wert für die Stabilität des Seals sich als am geeignetsten erwiesen hat. Die Ströme wurden mit einem Tiefpassfilter mit $f_c=10\text{kHz}$ bei der OR und $f_c=5\text{kHz}$ bei OS Na^+/K^+ -ATPasen gemessen. Die Filterung bei erst höheren Frequenzen beginnen zu lassen, um schnellere Zeitkonstanten messen zu können, wäre unnötig gewesen, da die Aufnahmezeit der Meßpunkte (engl. sampling-rate) bereits gerätebedingt begrenzt war und eine sinnvolle Auswertung von Zeitkonstanten größer $1/10\text{kHz}^{-1}$ nicht zuließ.

Nimmt man zunächst einen spannungsabhängigen Schritt im Reaktionszyklus des Na/Na-Austausches an, wobei während dieses Schritts die Na^+/K^+ -ATPase vom Zustand ① in den Zustand ② übergeht, so wird je nach vorherrschendem Membranpotential einer der

beiden Zustände bevorzugt eingenommen. Definiert man den Zustand ② als den, bei dem Na^+ in den access-channel freigelassen wird, ist der transiente Strom I proportional zur Besetzungswahrscheinlichkeit p_1 des Zustands ① und es gilt folgende Beziehung:

$$I(t) = N \cdot p_1 \cdot g \cdot \Delta V(t)$$

N = Anzahl der Pumpen
 g = Leitfähigkeit
 ΔV = Potentialsprung

Hat die Hinreaktion von ① nach ② eine Geschwindigkeit von k_2 und die Rückreaktion eine Geschwindigkeit von k_1 , so gilt für die Zeitableitung der Besetzungswahrscheinlichkeit p_1 :

$$\frac{dp_1}{dt} = k_1(1 - p_1) - k_2 \cdot p_1$$

Es ist hier zu beachten, daß die Geschwindigkeiten potentialabhängig sein können. Mit folgendem Exponentialansatz kann diese Gleichung nach p_1 aufgelöst werden:

$$p_1 = p_\infty - (p_\infty - p_0)e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Für den transienten Strom erhält man somit das gleiche exponentielle Verhalten. Sind mehrere spannungsabhängige Schritte im Zyklus des Na/Na-Austausches, die während einer Potentialänderung durchlaufen werden, ist der Zeitverlauf des transienten Strom aus einer Linearkombination mehrerer Exponentialfunktionen der obigen Art anzusehen.

Der Zeitverlauf, der bei der vorliegenden Arbeit gemessenen, transienten Ströme entsprach einer Linearkombination von 3 verschieden schnell relaxierenden Exponentialfunktionen mit unterschiedlichen Amplituden. Die am schnellsten relaxierende Exponentialfunktion mit Zeitkonstanten von 10-100 μs konnte auf Grund der Filtereinstellung nicht analysiert werden. Die Exponentialfunktionen wurden mit einem Näherungsverfahren des Programms Origin5.0 {A.5.6} angepaßt. Die Resultate der Zeitkonstanten werden im folgenden dargestellt.

Zunächst sollen hier die Ergebnisse der OR Na^+/K^+ -ATPase dargestellt werden. Sie entstanden aus 4 gemittelten Experimenten. Gezeigt werden im folgenden die aus dem Näherungsverfahren gewonnenen Zeitkonstanten der mittelschnell {Abb.20} und der langsam {Abb.21} abfallenden Exponentialfunktion, wobei jeweils zwischen On- und Off-Antworten auf Spannungspulse unterschieden wird.

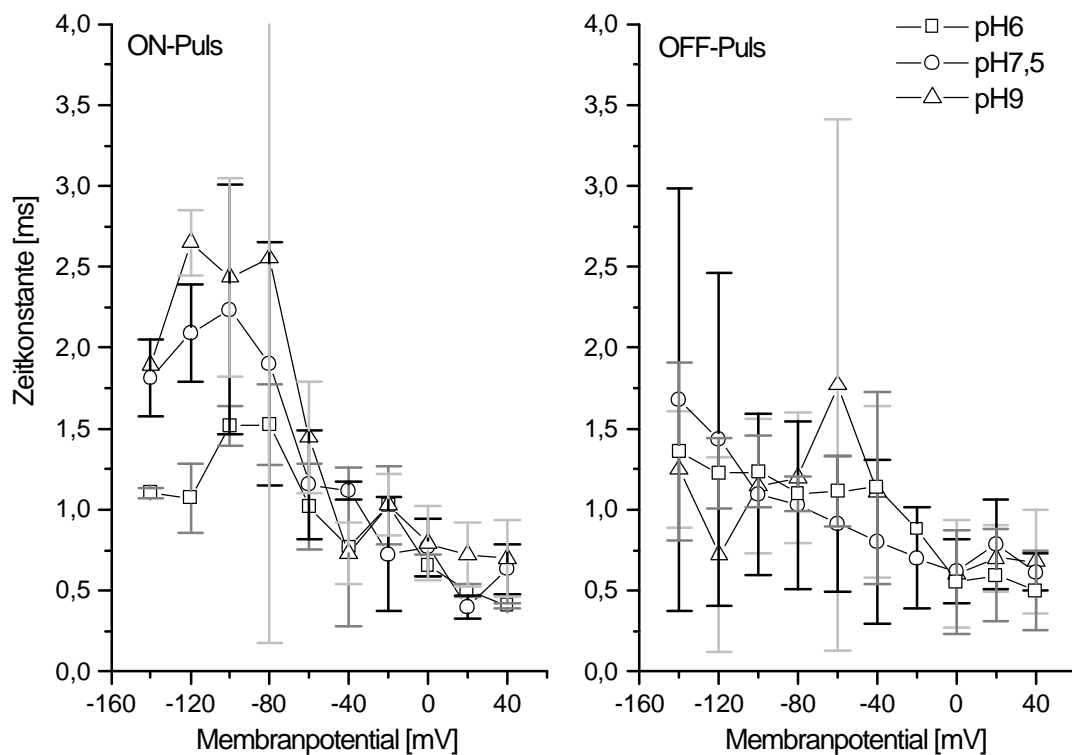


Abb.20: pH-Abhängigkeit von Zeitkonstanten der an transiente Ströme des Na^+/Na^+ -Austausches angenäherten mittelschnellen Exponentialfunktionen. Die Ergebnisse sind jeweils nach On- und Off-Pulsen in zwei Graphen getrennt. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainresistente (OR) Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica*. Die transienten Strompulse wurden aus einer Ouabaindifferenz von $[\text{Ouabain}]_o = 1 \text{ mM}$ mit $[\text{Ouabain}]_i = 5 \mu\text{M}$ gebildet. Gefiltert wurde mit 10kHz.

In Abbildung {Abb.20} erkennt man weder beim On- noch beim Off-Signal der transienten Stöme einen Unterschied zwischen den Zeitkonstanten bei verschiedenen pH-Werten im Rahmen des Fehlerbereichs. Vielmehr zeigen alle im Mittel die gleiche Potentialabhängigkeit. Grob gesehen fallen beim On-Signal die Zeitkonstanten von 2ms bei -150 mV auf 0,5ms bei 40 mV ab. Beim Off-Signal ist ein geringer Abfall im selben Potentialbereich zu erkennen.

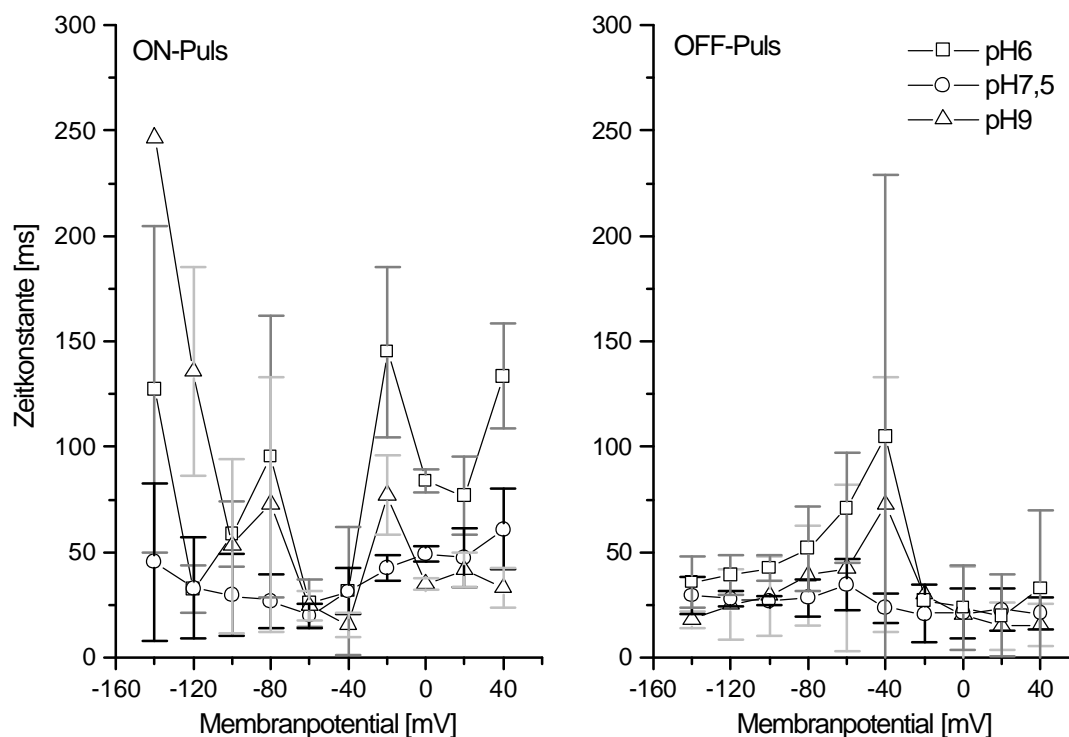


Abb.21: pH-Abhängigkeit von Zeitkonstanten der an transiente Ströme des Na/Na-Austausches angenäherten langsamen Exponentialfunktionen. Die Ergebnisse sind jeweils nach On- und Off-Pulsen in zwei Graphen getrennt. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainresistente (OR) Na⁺/K⁺-ATPase des *Torpedo californica*. Die transienten Strompulse wurden aus einer Ouabaindifferenz von [Ouabain]_o=1mM mit [Ouabain]_i=5μM gebildet. Gefiltert wurde mit 10kHz.

Wie in Abbildung {Abb.20} ist auch in Abbildung {Abb.21} kein Unterschied der Zeitkonstanten transienter Ströme bei verschiedenen pH-Werten im Rahmen des Fehlerbereichs zu erkennen. Auch eine Potentialabhängigkeit läßt sich aus den Graphen nicht ersehen. Die Zeitkonstanten des Off-Signals zeigen gegenüber denen des On-Signals eine geringere Variabilität. Umfaßt die Schankungsbreite der Zeitkonstanten beim On-Signal einen Wertebereich von 10ms bis 250ms, so hat sie beim Off-Puls einen Wertebereich von 10ms bis 100ms, nimmt man die Werte nahe des Haltepotentials aus, die auf Grund kleiner transienter Stromsignale ungenau sind.

Nun folgen die Ergebnisse für die OS Na⁺/K⁺-ATPase. Da hier die Experimente weniger erfolgreich verliefen, sei hier nur ein gelungenes Experiment aufgeführt. Gezeigt werden im folgenden die aus dem Näherungsverfahren gewonnen Zeitkonstanten der mittelschnell {Abb.22} und der langsam {Abb.23} abfallenden Exponentialfunktion, wobei jeweils zwischen On- und Off-Antworten unterschieden wird. Die in den Graphen angegebenen Fehlerbalken symbolisieren einen vom Origin5.0-Programm berechneten Näherungsfehler.

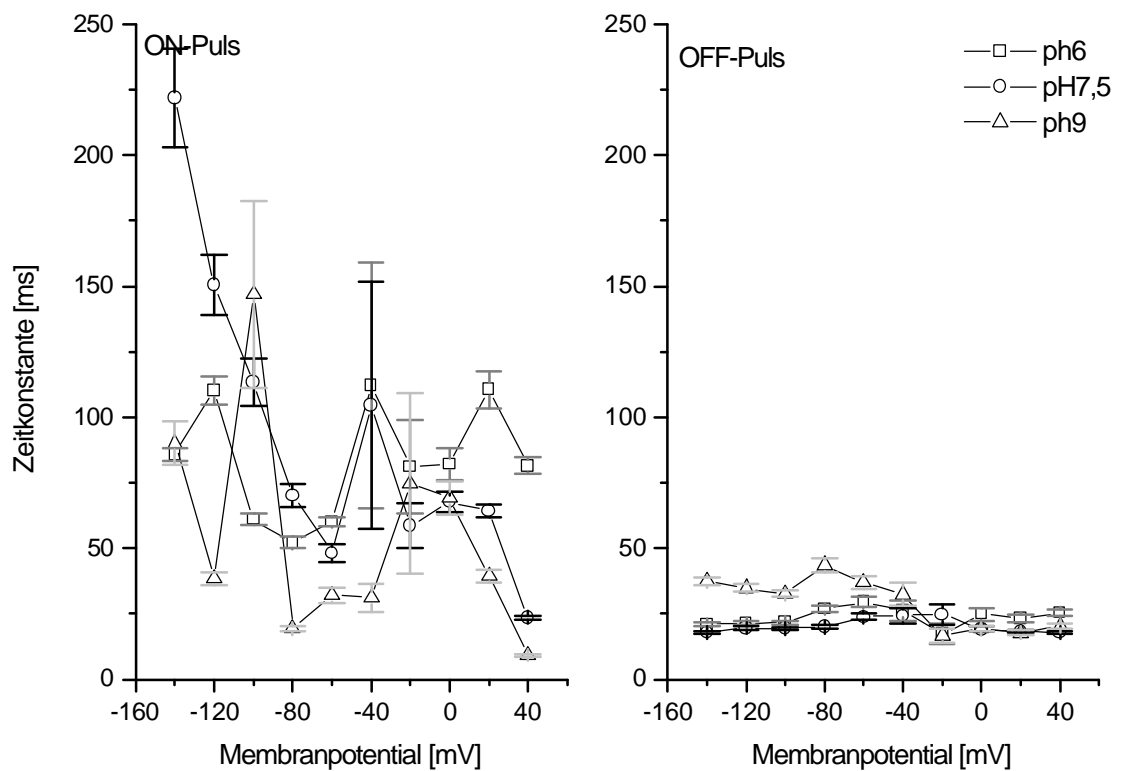


Abb.22: pH-Abhängigkeit von Zeitkonstanten der an transiente Ströme des Na/Na-Austausches angenäherten langsamen Exponentialfunktionen. Die Ergebnisse des Einzelexperimentes sind jeweils nach On- und Off-Pulsen in zwei Graphen getrennt. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainsensitive (OS) Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica*. Die transienten Strompulse wurden aus einer Ouabaindifferenz von $[\text{Ouabain}]_o = 1 \text{ mM}$ mit $[\text{Ouabain}]_i = 0 \text{ mM}$ gebildet. Gefiltert wurde mit 5kHz.

Die Zeitkonstanten der langsamen Exponentialfunktionen zeigen, wie man in Abbildung {Abb.22} sieht, auch bei der OS Na^+/K^+ -ATPase zumindest bei den On-Signalen keine Unterschiede bei verschiedenen pH-Werten. Die Werte der Zeitkonstanten schwanken stark zwischen 10ms und 250ms. Eine Potentialabhängigkeit ist hier nicht festzustellen. Für die Zeitkonstanten des Off-Signals sind hingegen Unterschiede festzustellen. Bei pH-9 weisen im hyperpolaren Bereich die Zeitkonstanten eine Potentialabhängigkeit mit negativer Steigung auf während sie bei pH6 und pH7,5 potentialunabhängig sind. Zudem ist der Wertebereich kleiner. Er reicht von 20ms bis 50ms.

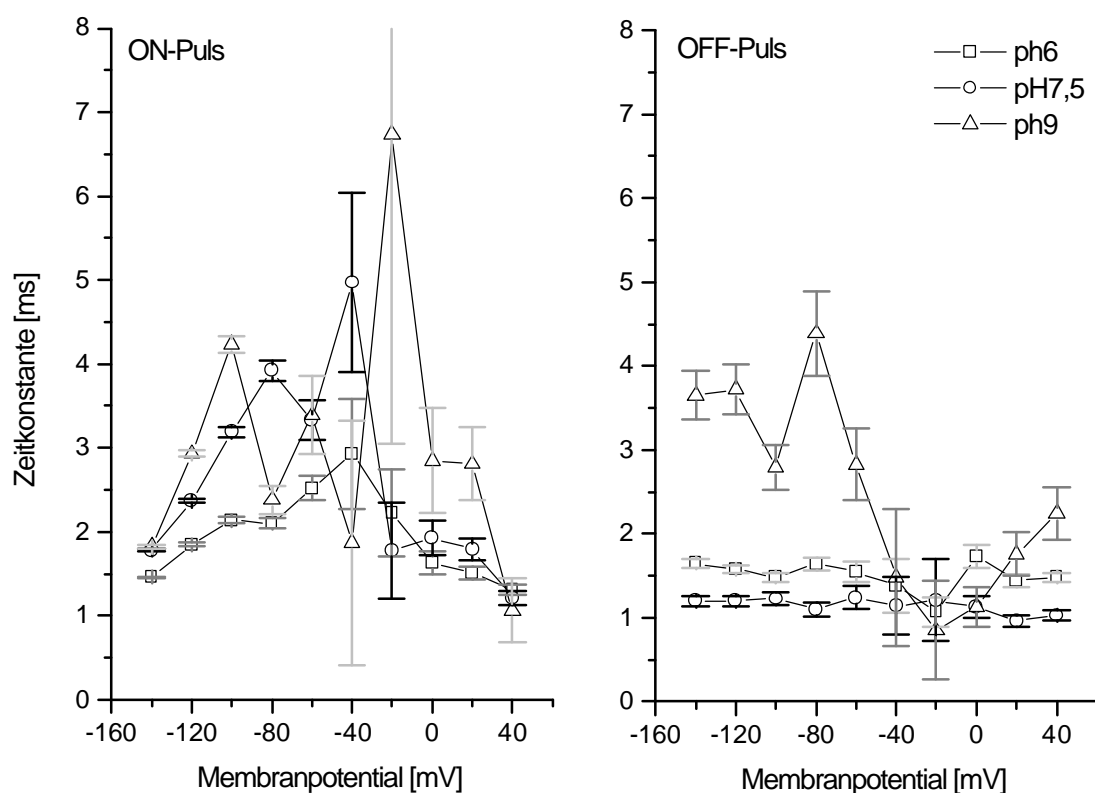


Abb.23: pH-Abhängigkeit von Zeitkonstanten der an transiente Ströme des Na/Na-Austausches angenäherten mittleren Exponentialfunktionen. Die Ergebnisse des Einzelexperimentes sind jeweils nach On- und Off-Pulsen in zwei Graphen getrennt. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainsensitive (OS) Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica*. Die transienten Strompulse wurden aus einer Ouabaindifferenz von $[\text{Ouabain}]_a = 1 \text{ mM}$ mit $[\text{Ouabain}]_a = 0 \text{ mM}$ gebildet. Gefiltert wurde mit 5 kHz.

Die Abbildung {Abb.23} zeigt die Zeitkonstanten der mittleren Exponentialfunktionen. Wie bei denen für die langsamen Exponentialfunktionen {Abb.22} ist auch hier beim On-Signal weder eine Potentialabhängigkeit, noch ein Unterschied bei verschiedenen pH-Werten festzustellen. Die Zeitkonstanten schwanken im Wertebereich von etwa 1 ms bis 7 ms. Beim Off-Signal ist hingegen eine eindeutige Potentialabhängigkeit der Zeitkonstanten für den pH-Wert pH9 im vor allem im hyperpolaren Bereich zu erkennen. Zudem scheint es, daß die Zeitkonstanten in diesem Bereich bei pH6 kleiner sind, als bei pH7,5 und bei pH9 wesentlich größer sind als bei pH6 und pH7,5. Ihr Wertebereich reicht hier von etwa 1 ms bis 4 ms.

B.2.4. pH-Abhängigkeit der Amplituden beim Patch-Clamp-Verfahren

Die Auswertungen dieses Abschnitts beziehen sich auf die im vorherigen Abschnitt {B.2.3} dargestellten Experimente. Wie dort beschrieben, wurden an die gemessenen transienten

Stromantworten mit einem Näherungsverfahren des Programms Origin 5.0 {A.5.6} drei Exponentialfunktionen angepaßt. Die daraus resultierenden Amplituden der mittelschnell {Abb.24} und der langsam {Abb.25} abfallenden Exponentialfunktion bei verschiedenen pH-Werten werden im folgenden dargestellt. Es sind zunächst die Resultate der OR Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica*. Sie entstanden aus 4 gemittelten Experimenten und wurden jeweils nach On- und Off-Puls getrennt in Graphen dargestellt. Der transiente Strom wurde bei pH6 und -100mV auf den Wert 1 normiert.

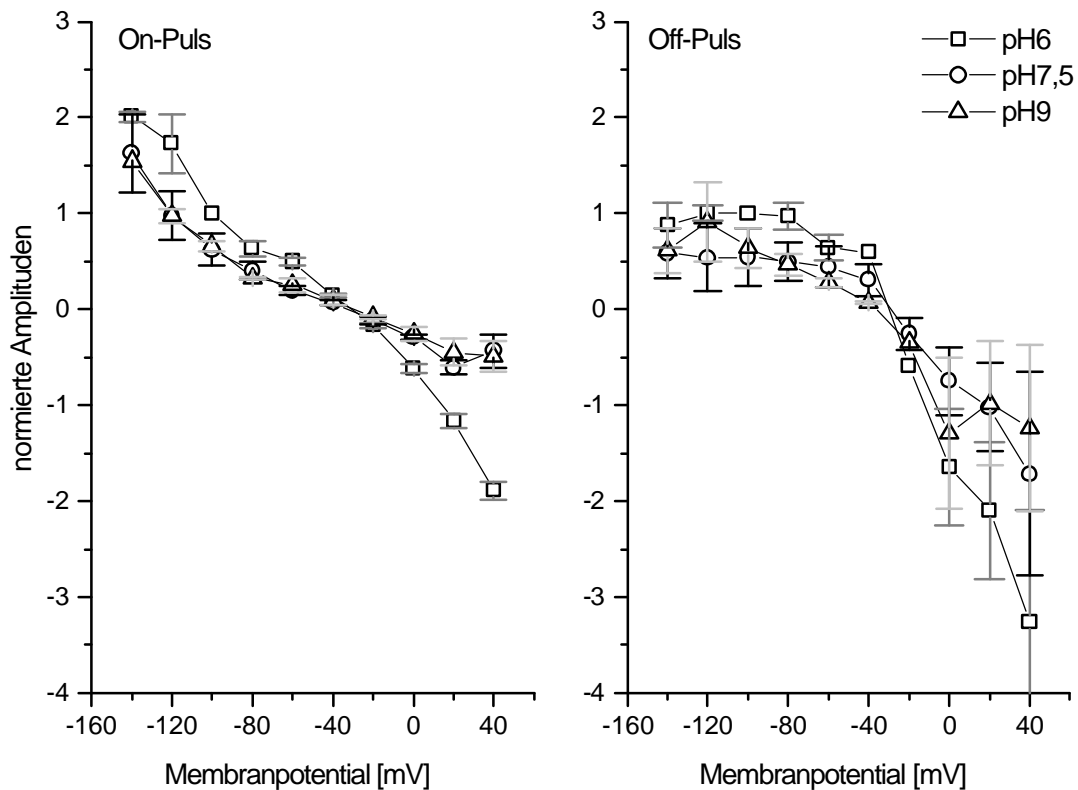


Abb.24: pH-Abhängigkeit von Amplituden der an transiente Ströme des Na^+/K^+ -Austausches angenäherten mittelschnellen Exponentialfunktionen. Die Ergebnisse sind jeweils nach On- und Off-Pulsen in zwei Graphen getrennt. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainresistente (OR) Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica*. Die transienten Strompulse wurden aus einer Ouabaindifferenz von $[\text{Ouabain}]_o = 1\text{mM}$ mit $[\text{Ouabain}]_i = 5\mu\text{M}$ gebildet. Der Strom wurde bei pH6 und -100mV auf den Wert 1 normiert. Gefiltert wurde mit 10kHz.

Wie sich deutlich am On-Puls-Graph der Abbildung {Abb.24} erkennen läßt, haben die Amplituden-Spannungskennlinien von pH9 und 7,5 einen fast identischen Verlauf und sind deshalb voneinander nicht zu unterscheiden. Die Kennlinie von pH6 hingegen ist wesentlich potentialabhängiger als die beiden anderen. Im hyperpolaren und vor allem im depolaren Potentialbereich sind die Amplituden der Kennlinien von pH6 betragsmäßig größer, als die von pH9 und pH7.5. Die Kennlinien des Off-Puls-Graphen zeigen tendenziell ein ähnliches potentialabhängiges Verhalten, wie die des On-Puls-Graphen. Jedoch sind hier die Unterschiede durch die großen Fehlerbereiche überdeckt, so daß eine Aussage nur in Zusammenhang mit den On-Pulsen getroffen werden kann.

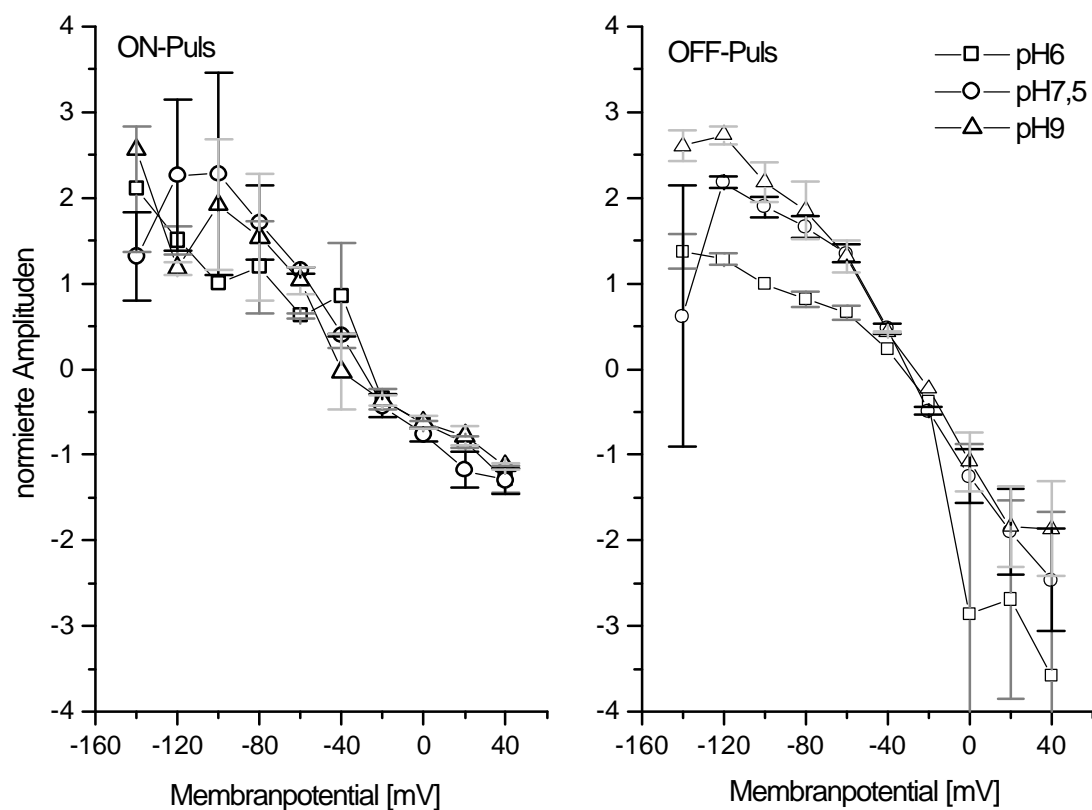


Abb.25: pH-Abhängigkeit von Amplituden der an transiente Ströme des Na⁺/K⁺-Austausches angenäherten langsamen Exponentialfunktionen. Die Ergebnisse sind jeweils nach On- und Off-Pulsen in zwei Graphen getrennt. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainresistente (OR) Na⁺/K⁺-ATPase des *Torpedo californica*. Die transienten Strompulse wurden aus einer Ouabaindifferenz von [Ouabain]_o=1mM mit [Ouabain]_i=5μM gebildet. Der Strom wurde bei pH6 und -100mV auf den Wert 1 normiert. Gefiltert wurde mit 10kHz.

Betrachtet man sich zunächst die Amplituden der langsamen Exponentialfunktionen der Off-Antworten in Abbildung {Abb.25}, so erkennt man, daß die Amplituden bei pH6 im hyperpolaren Bereich um die Hälfte kleiner sind, als die bei pH9. Die Werte bei pH7,5 liegen dazwischen. Ein deutlicher, von den Fehlern abgehobener Unterschied in der Potentialabhängigkeit ist also im Hyperpolaren festzustellen. Ein derartiger Unterschied läßt sich im hyperpolaren Bereich der On-Signale bei den Amplituden auf Grund des Fehlers nicht feststellen. Auch für die Depolarisation zeigt das On-Signal eindeutig keinen Unterschied zwischen den Amplituden bei verschiedenen pH-Werten. Diese Aussage läßt sich treffen, da hier die Fehler im Gegensatz zum Off-Signal gering sind.

Im folgenden sollen nun noch die Ergebnisse der Amplituden für die OS Na⁺/K⁺-ATPase aufgeführt werden. Wie schon erwähnt handelt es sich hierbei um ein Einzelexperiment. Dargestellt sind aus dem Näherungsverfahren gewonnene Amplituden der mittelschell {Abb.26} und der langsam {Abb.27} abfallenden Exponentialfunktion, wobei jeweils zwischen On- und Off-Signal unterschieden wird. Die in den Graphen angegebenen

Fehlerbalken symbolisieren einen vom Origin5.0-Programm berechneten Näherungsfehler.

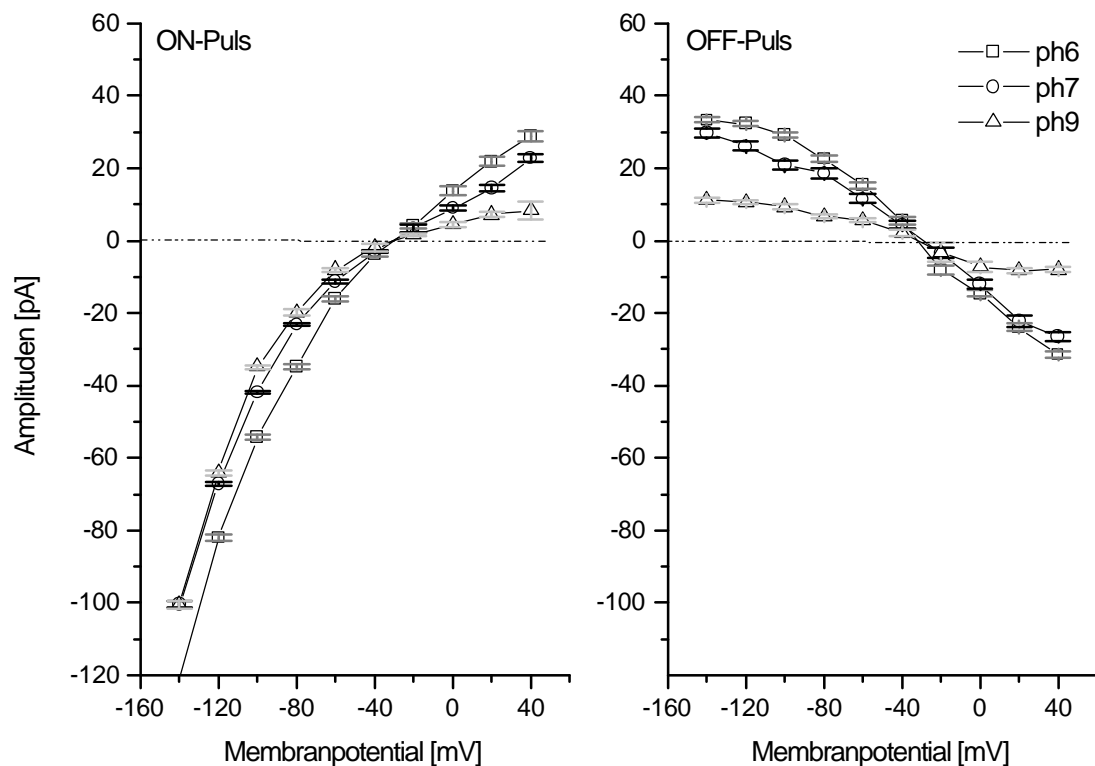


Abb.26: pH-Abhängigkeit von Amplituden der an transiente Ströme des Na⁺/K⁺-Austausches angenäherten mittelschnellen Exponentialfunktionen. Die Ergebnisse des Einzelexperimentes sind jeweils nach On- und Off-Pulsen in zwei Graphen getrennt. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainsensitive (OS) Na⁺/K⁺-ATPase des *Torpedo californica*. Die transienten Strompulse wurden aus einer Ouabaindifferenz von [Ouabain]_o=1mM mit [Ouabain]_i=0mM gebildet. Gefiltert wurde mit 5kHz.

Auch bei der OS Pumpe erkennt man in Abbildung {Abb.26} für die Amplituden der mittelschnellen Exponentialfunktionen, wie auch für die bei der OR Pumpe {Abb.24}, eine größere Potentialabhängigkeit der Amplituden-Spannungskennlinie bei pH6 als bei pH9. Der Unterschied zeigt sich allerdings beim Off-Signal wesentlich deutlicher als beim On-Signal. Die Kennlinie bei pH7,5 liegt zwischen den beiden anderen; hier aber, im Gegensatz zur OR Pumpe, näher an der Kennlinie bei pH6. Die Amplituden bei pH6 sind mehr als doppelt so groß, wie die bei pH9.

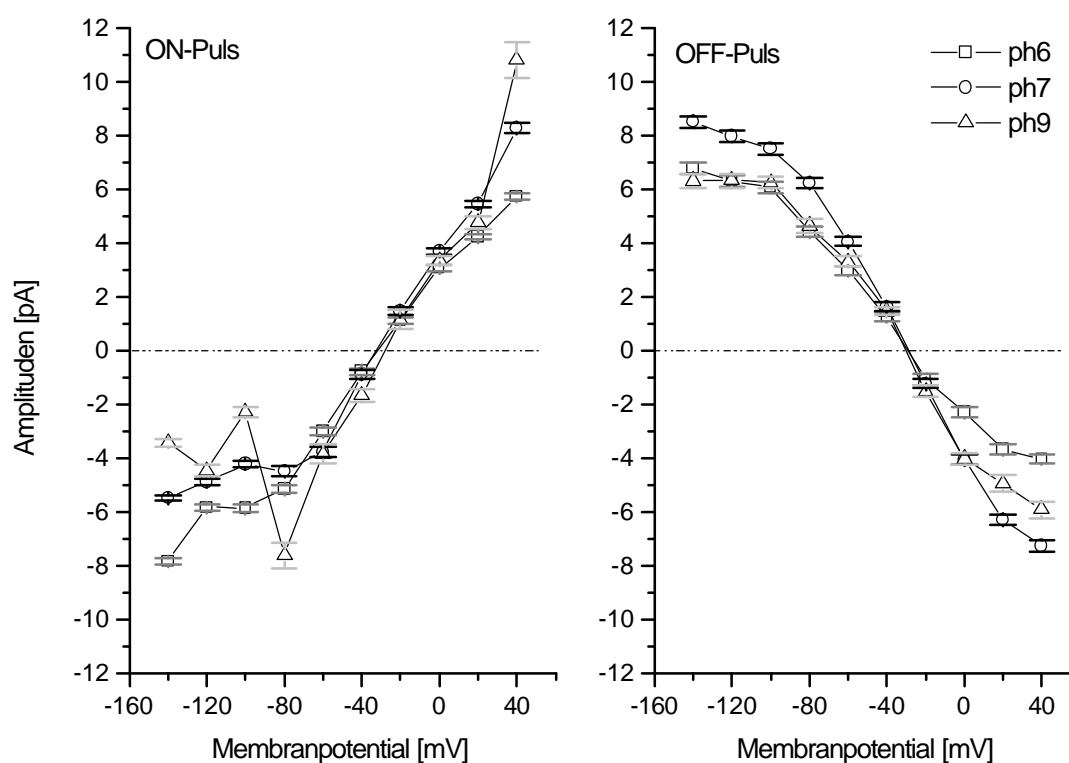


Abb.27: pH-Abhängigkeit von Amplituden der an transiente Ströme des Na⁺/Na-Austausches angenäherten langsamen Exponentialfunktionen. Die Ergebnisse des Einzelexperimentes sind jeweils nach On- und Off-Pulsen in zwei Graphen getrennt. Bei der Pumpe handelt es sich um die ouabainsensitive (OS) Na⁺/K⁺-ATPase des *Torpedo californica*. Die transienten Strompulse wurden aus einer Ouabaindifferenz von [Ouabain]_o=1mM mit [Ouabain]_i=0mM gebildet. Gefiltert wurde mit 5kHz.

Die in Abbildung {Abb.27} dargestellten Amplituden der langsamen Exponentialfunktionen der OS Na⁺/K⁺-ATPase zeigen ein ähnliches Verhalten wie die Amplituden bei der OR, dargestellt in Abbildung {Abb.25}. Hier wie da haben die Amplituden-Spannungskennlinien der Off-Signale bei pH7,5 eine deutlich größere Potentialabhängigkeit als bei pH6. Allerdings zeigt die Kennlinie bei pH9 ein anderes Verhalten und gleicht fast der von pH6. Und hier wie da läßt sich beim On-Signal auf Grund von Schwankungen bzw. Fehlern keine eindeutige pH-Abhängigkeit feststellen.

B.3. Einfluß des endogenen Stromanteils bei den Ergebnissen der ouabainsensitiven (OS) Na⁺/K⁺-ATPase

In Abschnitt {B.2.2} wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Ouabaindifferenz der transienten Ströme der OS Na⁺/K⁺-ATPase sowohl der Stromanteil der in den Oozyten exprimierten Pumpe des *Torpedo californica*, als auch ein Anteil der endogenen Pumpe vorhanden ist. Die in {B.1} und {B.2} dargestellten Ergebnisse von Messungen an der

ouabainsensitiven Pumpe beinhalten also auch einen Effekt eines endogenen Anteils, der natürlich gegenüber dem exprimierten klein sein sollte. Um eine Vorstellung darüber zu erhalten, in wieweit der endogene Anteil die Ergebnisse beeinflusst, wurde ein Experiment an der ouabainresistenten (OR) Na^+/K^+ -ATPase mit dem Patch-Clamp-Verfahren durchgeführt. Die Ouabainresistenz erlaubte es, durch Zugabe von $10\mu\text{M}$ Ouabain die endogenen Pumpen auszuschalten. Es wurden Ströme bei einer Lösungsfolge von Badlösungen mit $0\mu\text{M}$ Ouabain, $10\mu\text{M}$ Ouabain und 100mM Ouabain bei 100mM Na^+ gemessen. Sämtliche Badlösungen hatten einen pH-Wert von $\text{pH}7,5$ und enthielten zusätzlich zum obigen noch 20mM TMA, 5mM Ba^{2+} , als Puffer 5mM MOPS. Die Pipettenlösung beinhaltete 5mM ATP, 100mM Na^+ , 5mM Mg^+ , 5mM EGTA und 5mM MOPS als Puffer. Zur Einstellung des pH-Bereichs der Badlösungen und der Pipettenlösung wurde NaOH verwendet. Die Temperatur der Lösungen lag bei 20°C . Genauere Angaben zu den Lösungsrezepten finden sich in Abschnitt {A.5.2}. Durch eine Ouabaindifferenz einerseits zwischen $0\mu\text{M}$ Ouabain und 100mM Ouabain erhielt man die transienten Ströme der exprimierten Pumpe mit denen der endogenen, wie sie man sie auch bei der ouabainsensitiven Pumpe messen würde. Andererseits eliminierte man die endogenen Ströme durch eine Ouabaindifferenz zwischen $10\mu\text{M}$ Ouabain und 100mM Ouabain und erhielt so ausschließlich den transienten Stromanteil der exprimierten Pumpen. Diese beiden Ouabaindifferenzen sind im folgenden dargestellt. Sie stammen aus einem Einzelexperiment, dessen Ströme bei einer Spannungsfolge von -140mV bis 40mV mit 20mV -Abständen, mit einem Haltepotential von -30mV und einem Tiefpassfilter von $f_c=10\text{kHz}$ {A.4.5} gemessen wurden. Die folgende Abbildung {Abb.28} zeigt zunächst die Strom-Spannungskennlinien von steady-state-Strömen der beiden Ouabaindifferenzen und den, durch eine weitere Differenzbildung zwischen den beiden Ouabaindifferenzen erhaltenen, endogenen Anteil.

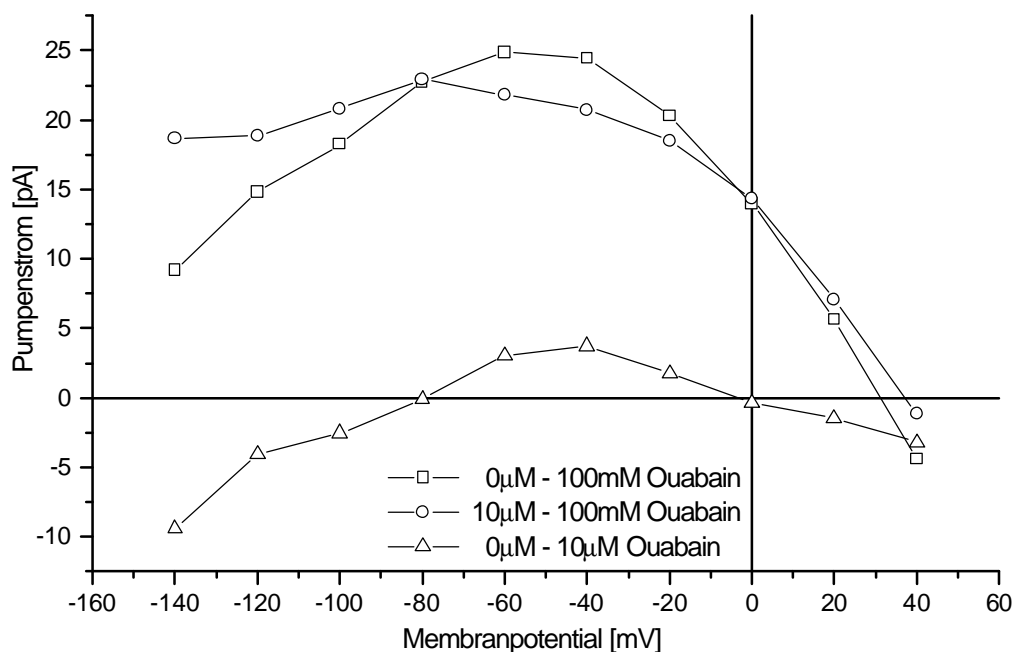


Abb.28: Strom-Spannungskennlinien verschiedener Ouabaindifferenzen Pumpenströme aus steady-state-Messungen an der ouabainsensitiven (OS) Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica*. Gemessen wurde bei $\text{pH}7,5$ und einem Tiefpassfilter von 10kHz .

Aus der Abbildung ersieht man einen durch die exprimierten Pumpen verursachten Strom im Bereich von 10pA bis 25pA (Depolarisation nicht betrachtend), wohingegen der endogene Anteil bei max. 5pA liegt. D.h., daß der Anteil der exprimierten Pumpen in der Zelle wesentlich höher (etwa 5mal) liegt als der der endogenen.

Bei den in Abschnitt {B.2.3} behandelten Ergebnissen der Zeitkonstanten des Na/Na-Austausches bei der ouabainsensitiven Na^+/K^+ ATPase, ist eine nennenswerte pH-Abhängigkeit nur bei den Off-Pulsen ersichtlich. Es soll deshalb an dieser Stelle auch nur die aus dem Einzelexperiment gewonnenen Zeitkonstanten der Off-Pulse bei den beiden Ouabaindifferenzen dargestellt werden. Es folgen nun sowohl die aus dem Näherungsverfahren erhaltenen mittelschnellen und langsamen Zeitkonstanten:

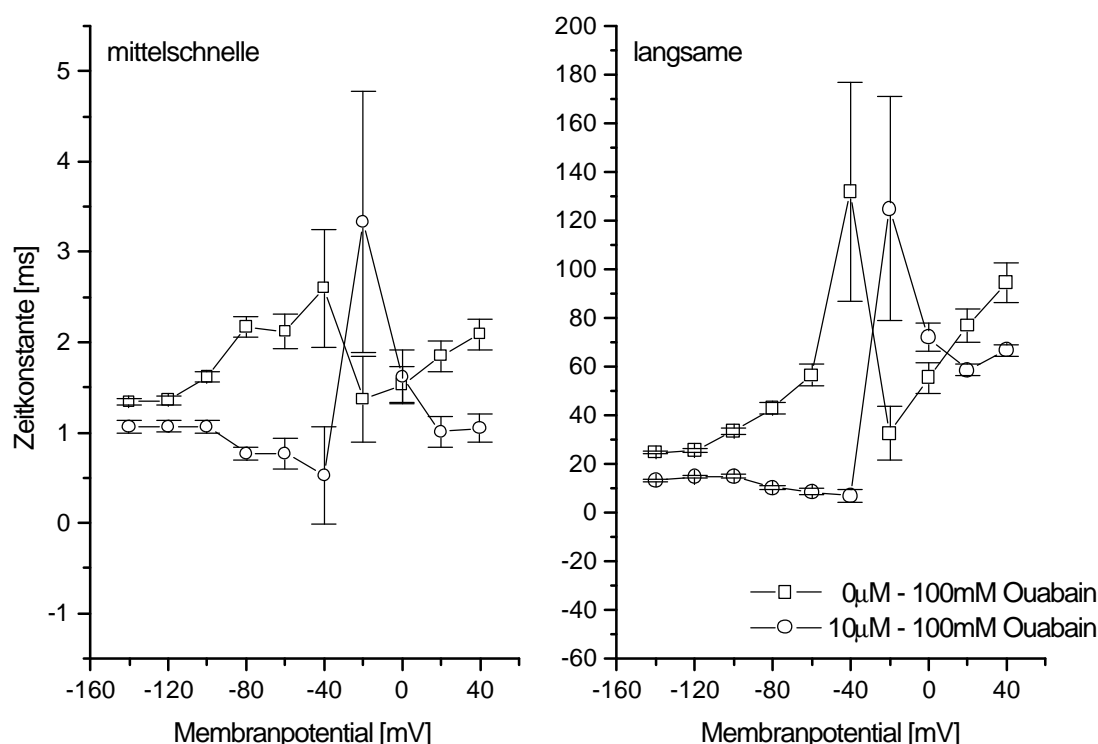


Abb.29: Zeitkonstanten der an transiente Ströme aus verschiedenen Ouabaindifferenzen angenäherten mittelschnellen (links) und langsamen (rechts) Exponentialfunktionen. Es werden nur Off-Pulse gezeigt. Gemessen wurde an der ouabainresistenten (OR) Na^+/K^+ ATPase des *Torpedo californica* bei pH7,5 und einem Tiefpaßfilter von 10kHz.

Wie man in Abbildung {Abb.29} sieht, machen die endogenen Pumpen einen Unterschied in den Zeitkonstanten der mittelschnellen Exponentialfunktionen von max. 1ms und in den Zeitkonstanten der langsamen Exponentialfunktionen von max. 70ms im hyperpolaren Potentialbereich aus. Die Unterschiede der Zeitkonstanten der langsamen Exponentialfunktionen bei verschiedenen pH-Werten{Abb.22} liegen bei max 20ms, und können aufgrund des endogenen Anteils von 70ms nicht auf die ouabainsensitive Pumpe zurückgeführt werden. Bei den Zeitkonstanten der mittelschnellen Exponentialfunktion

{Abb.23} ist zwischen pH9 und pH6 ein max. Unterschied von 4ms. Hier beträgt der endogene Anteil nur max. 1ms. Bei den hier nicht dargestellten On-Pulsen zeigt sich ein endogener Anteil bei den Zeitkonstanten in ähnlicher Größe.

Bei den Amplituden {B.2.4} ist, wie bei den Zeitkonstanten auch, nur beim Off-Puls eine pH-Abhängigkeit deutlich erkennbar, weshalb hier auch nur für den Off-Puls der endogene Anteil der Amplituden dargestellt werden soll:

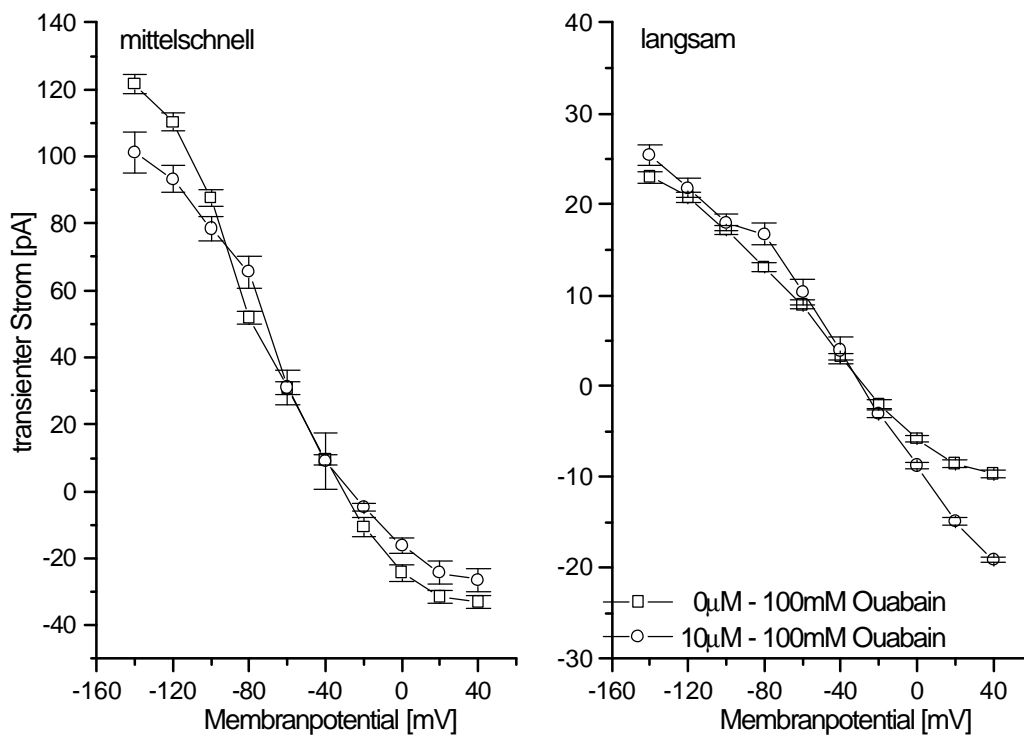


Abb.30: Amplituden der an transiente Ströme aus verschiedenen Ouabaindifferenzen angenäherten mittelschnellen (links) und langsamen (rechts) Exponentialfunktionen. Es werden nur Off-Pulse gezeigt. Gemessen wurde an der ouabainresistenten (OR) Na^+/K^+ ATPase des *Torpedo californica* bei pH7,5 und einem Tiefpaßfilter von 10kHz.

In der hier gezeigten Abbildung {Abb.30} hat der endogene Anteil auf die Amplituden der langsamen Exponentialfunktionen zumindest im hyperpolaren Potentialbereich fast keinen Einfluß. Der endogene Stromanteil ist hier geringer als die pH-Abhängigen Stromunterschiede in Abbildung {Abb.27}. Bei den Amplituden der mittelschnellen Exponentialfunktionen ist der Einfluß des endogenen Stromanteils jedoch größer übersteigt aber längst nicht die pH-abhängigen Stromunterschiede in Abbildung {Abb.26}, da die Amplituden bei pH9 und pH6 dort um mehr als das doppelte sich unterscheiden.

C. Diskussionsteil

C.1. Diskussion der Ergebnisse pH-abhängiger Kaliumdifferenzen

Folgende bereits bekannte Eigenschaften der Na^+/K^+ -ATPase bei physiologischen pH-Werten (pH7.5) sollen des Verständnisses wegen vorweg Erwähnung finden:

Unter physiologischen Bedingungen sind die von der Na^+/K^+ -ATPase generierten stationären (engl. steady-state) Ströme potentialabhängig. Die Strom-Spannungskennlinie weist hierbei im negativen Potentialbereich eine positive Steigung auf (Vasilets *et al.*, 1993). Weiterhin ist bekannt, daß sowohl $[\text{Na}^+]_o$ als auch $[\text{K}^+]_o$ die Potentialabhängigkeit beeinflussen. Als potentialabhängiger Schritt in dem gesamten Pumpvorgang wird eine bereits in Kapitel {B.2.1} erwähnte Diffusion durch einen Zugangskanal (engl. access-channel) in der ATPase angenommen, über welche die Kationen an die extrazellulären Bindungsstellen gelangen und an dem der Hauptteil des Membranpotentials abfällt. Unter physiologischen Bedingungen bedeutet dies, daß bei einer Hyperpolarisation der Membran sich vermehrt die Natriumionen in dem access-channel aufhalten und die Kaliumionen, deren extrazelluläre Konzentration gering ist, aus ihm verdrängen. Dies bewirkt eine Hemmung der Pumpe und erklärt die positive Steigung in der Strom-Spannungskennlinie (Rakowski *et al.*, 1997). In einem natriumfreien extrazellulären Medium ist sowohl für die Pumpe der *Xenopus*-Oozyten, (Rakowski *et al.*, 1991) als auch für die des *Torpedo* (Vasilets & Schwarz, 1992) eine maximale Stimulation bei $[\text{K}^+]_o=5\text{mM}$ gegeben. Auch neuere Adsorptionsmessungen mit dem BLM-Verfahren und caged ATP (Gropp *et al.*, 1998) an der Pumpe des Haifisches (Rektaldrüse) haben in diesem Fall eine maximale Stimulation ergeben. Die Na^+/K^+ -ATPase der *Xenopus*-Oozyten und des Tintenfischaxons zeigen bei diesen Bedingungen fast keine Potentialabhängigkeit (Schwarz & Vasilets, 1991). Bei *Torpedo* allerdings hat die Strom-Spannungskennlinie der Pumpe immer noch eine leicht positive Steigung (persönl. Mitteilung v. W.Schwarz u. L.Vasilets). Für eine niedrigere Kaliumkonzentration und $[\text{Na}^+]_o=0\text{mM}$ findet man eine negative Steigung der Strom-Spannungskennlinie, wobei die Stimulation der Pumpen von *Xenopus* und *Torpedo* qualitativ unterschiedlich ist (Schwarz & Vasilets, 1990). Diese kaliumabhängige Hemmung bei Depolarisierung im natriumfreien extrazellulären Medium läßt sich ebenfalls mit Hilfe des access-channel erklären. Die positiv geladenen Kaliumionen werden durch zunehmende Depolarisierung aus dem Zugangskanal herausgetrieben, so daß eine Okklusion {A.3.1.III} verhindert wird und die Pumprate sinkt. Ist die Kaliumkonzentration hingegen groß genug (5mM), diffundieren trotz des elektrischen Feldes genug K^+ in den access-channel, um die Pumprate konstant zu halten. Weiterhin wird ein, hier nicht näher erläutertes, potentialabhängiger Schritt angenommen, der nicht auf den Einfluß des access-channels zurückzuführen ist (Vasilets *et al.*, 1993) & (Rakowski *et al.*, 1997).

Die für diese Arbeit erbrachten Ergebnisse der pH-abhängigen Pumpenströme zeigen für das natriumfreie extrazelluläre Medium (erhalten aus einer Differenz von Strömen bei $[\text{K}^+]_o=5\text{mM}$ und $[\text{K}^+]_o=0\text{mM}$ (einfache Kaliumdifferenz), dargestellt in Abbildung {Abb.13}) zunächst besonders im hyperpolaren Potentialbereich eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit. Wie sich aber während der Auswertung der Meßdaten ergab, ist die durch

die einfache Kaliumdifferenz erhaltene pH-Abhängigkeit in großem Maße von einem bei $[K^+]_o=0\text{mM}$ und $[Na^+]_o=0\text{mM}$ auftretenden Protoneneinwärtsstrom beinflusst (Rettinger, 1996), was ausführlich in Abschnitt {B.1.3} besprochen wurde. Es war deshalb notwendig, eine Korrektur vorzunehmen, um den Effekt eines Protoneneinwärtsstroms zu eliminieren, was ebenfalls im Abschnitt {B.1.3} nachgelesen werden kann. So gelang es, die vom Protoneneinwärtsstrom unbeeinflussten pH-abhängigen Strom-Spannungskennlinien der kaliumaktivierten Pumpenströme der Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica* zu erhalten, welche in Abbildung {Abb.15} dargestellt sind. Die Kennlinie bei pH7,5 weist mit einer positiven Steigung eine leichte Potentialabhängigkeit im hyperpolaren Bereich auf. Dies stimmt mit dem oben beschriebenen Verhalten der Pumpe des *Torpedo* im natriumfreien Medium mit einer maximalen Stimulation bei $[K^+]_o=5\text{mM}$ überein. Hingegen weichen die aufeinanderliegenden Kennlinien bei pH6 und pH9 davon ab, denn sie sind potentialunabhängig und entsprechen so einem, von anderen Spezies erwarteten, Pumpenverhalten, welches der Theorie des access-channels konform ist. Es stellt sich hier die Frage, worauf man eine derartige pH-Abhängigkeit der Kennlinien zurückführen könne. Eine Hypothese hierfür wäre eine protonierbare, im access-channel befindliche Stelle, welche einen Einfluß auf die Affinität der Kationenbindung ausübt. In einem solchen Fall wäre die Stelle unabhängig vom Membranpotential bei einem hohen pH-Wert unprotoniert und bei niedrigem pH-Wert protoniert. Bei einem physiologischen pH-Wert (7,5) hingegen wäre die Protonierung der Stelle vom Membranpotential abhängig, da dieses Potential die effektive Protonenkonzentration an der Bindungsstelle beeinflussen würde. Somit wäre auch die Affinität der Kationenbindung und damit der Pumpenstrom potentialabhängig.

Für den durch Kalium aktivierten Pumpenstrom im natriumhaltigen (100mM) extrazellulären Medium, dargestellt in Abbildung {Abb.16}, lassen sich keine pH-Abhängigkeiten feststellen. Vielmehr weisen alle Strom-Spannungskennlinien, wie man es auf Grund des oben beschriebenen Pumpenverhaltens bei $[K^+]_o=5\text{mM}$ und $[Na^+]_o=100\text{mM}$ erwartet, eine positive Steigung auf.

C.2. Diskussion der Ergebnisse transienter Strompulse

Der Na/Na-Austausch, ausführlich in den Abschnitten {A.3.1.IV} und {B.2.1} beschrieben, ist elektroneutral, aber dennoch potentialabhängig. Die Na⁺/K⁺-ATPase pumpt hauptsächlich in einem kaliumfreien extrazellulären Medium im Modus des 3Na⁺/3Na⁺-Austausches. Geht man von der Vorstellung aus, daß 2 der 3 Na⁺ beim Austausch elektisch still transportiert werden, weil sie an negativ geladenen Bindungsstellen sitzen, müßte sich im einfachsten Fall als effektive Wertigkeit (siehe Gl. in Abschnitt {B.2.2}) der während eines halben Zyklus verschobenen Ladung ein Wert von $z_q=1$ ergeben (Rakowski, 1993). Die aus den Messungen mit Hilfe des Voltag-Clamp-Verfahrens erhaltenen Ergebnisse {B.2.2} an der OS Na⁺/K⁺-ATPase des *Torpedo californica* ergeben einen Wert von $z_q=0,80\pm 0,02$, wobei hier auf Grund der geringen Zeitauflösung des Verfahrens keine pH-Abhängigkeit festgestellt werden konnte. Messungen von J. Rettinger et al. (Rettinger et al., 1994) ergaben bei entsprechenden Two-Elektrode-Voltage-Clamp-Versuchen eine Wert von $z_q=0,7$, bei Patch-Clamp-Versuchen, die eine wesentlich bessere zeitliche und damit kinetische Auflösung hatten, einen Wert von $z_q=0,9$. Dies stimmt also hervorragend mit den in Abbildung {Abb.18} dargestellten Ergebnissen überein.

Ist der gesamte Zyklus des Na/Na-Austausches elektroneutral, so sind jedoch Teilschritte in der Reaktion von der intrazellulären Bindung bis zur extrazellulären Freisetzung des Na⁺ sowie die Rückreaktion elektrogen und potentialabhängig. Hierbei ist die Freisetzung des ersten Na⁺ in das extrazelluläre Medium, also $P-E_2(Na_3) \leftrightarrow P-E_2(Na_2)$, mit einer Dielektrizitätskonstanten von 0,65 der Schritt im Zyklus, welcher über die größte Elektrogenität verfügt (Wuddel & Apell, 1995). Eine Depolarisation des Membranpotentials würde also die Pumpen in die Konformation P-E₂(Na₂) zwingen. Eine Hyperpolarisation jenseits dieser Konformation hingegen würde die Pumpe in die Richtung der Okklusion und intrazellulären Wechselwirkung lenken. Genauere Angaben, welcher Schritt des Zyklus zwischen Bindung und P-E₂(Na₃) von der Pumpe bevorzugt vollzogen wird, sind allein aus der Feststellung der Tatsache einer elektrogenen extrazellulären Freisetzung des ersten Na⁺ nicht zu ersehen. Die Konformationsänderung von E₁ nach E₂ in $P-E_1(Na_3) \leftrightarrow P-E_2(Na_3)$ ist nämlich mit einer Dielektrizitätskonstante von 0,1 als potentialunabhängig anzusehen. Ebenso ist die extrazelluläre Freisetzung der beiden anderen Na⁺ mit einer Dielektrizitätskonstante von 0,1-0,2 kaum potentialabhängig. Der einzige weitere elektrogene Schritt im Zyklus soll nach I. Wuddel und H.-J. Apell die intrazelluläre Bindung an die ungeladene Bindungsstelle des Na⁺ sein. In diesem Fall würde die Hyperpolarisation die Pumpen in die Konformation E₁ jenseits des Zustands Na₃E₁ ohne ATP zwingen.

Die Auswertung {B.2.3} der für die vorliegende Arbeit gemessenen, pH-abhängigen transienten Ströme des Na/Na-Austausches zeigten im Hinblick auf den Strom-Zeitverlauf ein relaxierendes Verhalten, das einer Linearkombination aus drei Exponentialfunktionen mit verschiedenen Zeitkonstanten und Amplituden entspricht. Die Zeitkonstanten der am schnellsten relaxierenden Exponentialfunktion konnten auf Grund der Zeitauflösung und Filterwahl nicht ausgewertet werden. Sie bewegen sich in einem Größenordnungsbereich von 100-10µs. Die ermittelten Zeitkonstanten der mittelschnell sowie der langsam relaxierenden Exponentialfunktion lassen keine pH-Abhängigkeiten bei der OR Na⁺/K⁺-

ATPase erkennen. Das Einzelexperiment der OS Pumpe jedoch weist zum Teil Unterschiede bei verschiedenen pH-Werten auf, die man aber auf die Streubreite der Werte bei der OR Pumpe zurückführen kann. Die Zeitkonstanten der mittelschnell relaxierenden Exponentialfunktion bewegen sich in einem Bereich von 1-5ms. Wuddel und Apell geben für die extrazelluläre Freisetzung des ersten Na^+ eine Ratenkonstante von 1400s^{-1} bzw. für die des zweiten Na^+ 700s^{-1} , was mit den obigen Werten der Zeitkonstanten vereinbar ist. D.h., daß das Verhalten der mittelschnell relaxierende Exponentialfunktion höchstwahrscheinlich in einem engen Zusammenhang mit der extrazellulären Na^+ -Freisetzung steht.

Die Zeitkonstanten der langsam relaxierenden Exponentialfunktionen bewegen sich in einem Bereich von 200-10ms. Sie sind höchstwahrscheinlich (nach Sokolov et. al. (Sokolov et al., 1998)) auf die Konformationsänderung von E_1 nach E_2 zurückzuführen, welche eine Ratenkonstante von 25s^{-1} hat. Die Konformationsänderung stellt somit den langsamsten Schritt im Zyklus dar und limitiert deshalb die Pumprate. Die oben geäußerte Vermutung, daß durch eine Hyperpolarisation die Pumpen in die Konformation E_1 gezwungen werden, wird hierdurch bestärkt.

Die durch das Anpassen der Exponentialfunktionen gewonnenen Amplituden {B.2.4} zeigen im Gegensatz zu den Zeitkonstanten eine deutliche pH-Abhängigkeit. Da die Zeitkonstanten bei den verschiedenen pH-Werten jedoch gleich bleiben, bedeutet ein Unterschied in den Amplituden immer auch ein Unterschied in der Ladungsverschiebung. Die Amplituden der mittelschnell relaxierenden Exponentialfunktionen haben im depolaren Potentialbereich bei pH6 eine größere Potentialabhängigkeit als bei pH9 sowohl für die OR als auch für die OS Na^+/K^+ -ATPase des *Torpedo californica*. Ein Zusammenhang dieser Werte mit der Freisetzung der ersten beiden Na^+ würde z.B. auf eine durch Protonierung hervorgerufene Verstärkung der Potentialabhängigkeit hindeuten. Hierbei würde das Na^+ das elektrische Feld im access-channel stärker wahrnehmen. Die Amplituden der langsam relaxierenden Funktion hingegen weisen im hyperpolaren Potentialbereich für die OR Pumpe bei pH9 eine größere Potentialabhängigkeit auf, als bei pH6. Für die OS Pumpe gilt dies nur zwischen pH7,5 und pH6. Da diese Amplituden, wie oben gezeigt, höchstwahrscheinlich mit der Konformationsänderung in Zusammenhang stehen, könnte z.B. die Protonierung einer Stelle, welche sich gegenläufig zu den 3Na^+ bewegt, die Ursache der Amplitudenänderung sein.

D. Anhang

D.1. Literaturverzeichnis

- ALBERS R.W. (1967) Biochemical aspects of active transport. *Ann.Rev.Biochem.* 36, 727-756.
- CAHALAHN M. & NEHER E. (1992) Patch Clamp Techniques: An Overview. In *Ion Channels. Methods in Enzymology* Ed. Eds B. Rudy & L. Iverson. London: Academic Press, Inc. pp. 3-14.
- COREY D.P. & STEVENS C.F. (1983) Science and Technology of Patch-Recording Electrodes. In *Single-Channel Recording*. Eds B. Sakmann & E. Neher. New York: Plenum Press. pp. 53-60.
- DUELLMAN W.E. & TRUEB L. (1994) *Biology of Amphibians*. Baltimore and London: Johns Hopkins University Press. pp. 520-522.
- FINKEL A. & GAGE P. (1985) Conventional Voltage Clamping With Two Intracellular Microelectrodes. In *Voltage and Patch Clamping With Microelectrodes*. Eds T.G. Smith jr., H. Lecar, S. Redman & P. Gage. Baltimore, Maryland: Waverly Press. pp. 47-56.
- FRANKE C., HATT H. & DUDEL J. (1987) Liquid filament switch for ultra-fast exchanges of solutions at excised patches of synaptic membrane of crayfish muscle. *Neuroscience Letters* 77, 199-204.
- GLYNN I.M. & KARLISH S.J.D. (1975) The sodium pump. *Ann.Rev.Physiol.* 37, 13-55.
- GROPP T., CORNELIUS F. & FENDLER K. (1998) K⁺-Dependence of electrogenic transport by the NaK-ATPase. *BBA* 1368, 184-200.
- HAMILL O.P., MARTY A., NEHER E., SAKMANN B. & SIGWORTH F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100.
- HILGEMANN D.W. (1989) Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *European Journal of Physiology (Pflügers Arch.)* 415, 247-249.
- Kado R.T. Some of the things we know about the oocytes of *Xenopus laevis*. 1997. Oocyte-course in Shanghai, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire/ Centre National de la Recherche Scientifique/ France. Oocytes for the study of membrane proteins. (GENERIC)
Ref Type: Report

- KAWAKAMI K., NOGUCHI S., NODA M., TAKAHASHI H., OHTA T., KAWAMURA M., NOJIMA H., NAGANO K., HIROSE T., INAYAMA S., HAYASHIDA H., MIYATA T. & NUMA S. (1985) Primary structure of the α -subunit of *Torpedo californica* ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase deduced from cDNA sequence. *Nature* 316, 733-736.
- KOBEL H.R., LOUMONT C. & TINSLEY R.C. (1996a) Geographical distribution and ecology. In *The Biology of Xenopus*. Eds R.C. Tinsley & H.R. Kobel. Oxford: Clarendon Press. pp. 41-46.
- KOBEL H.R., LOUMONT C. & TINSLEY R.C. (1996b) The extant species. In *The Biology of Xenopus*. Eds R.C. Tinsley & H.R. Kobel. Oxford: Clarendon Press. pp. 10-11.
- Manual EPC9(1990) Introducing the EPC9. In *EPC-9 Manual, Version 8.0*. Ed P. Schulze. 67466 Lambrecht/ Germany: HEKA elektronik GmbH, Dr.-Ing. P. Schulze. pp. 4
- MERCER R.W., BIEMESDERFER D., BLISS D.P., COLLINS J.H. & FORBUSH B. (1993) Molecular cloning and immunological characterization of the gamma-polypeptide, a small protein associated with the Na, K-ATPase . *J. Cell Biol.* 121, 579-586.
- NEHER E., SAKMANN B. & STEINBACH J.H. (1978) The Extracellular Patch Clamp: A Method for Resolving Currents through Individual Open Channels in Biological Membranes. *Pflügers Arch. (European Journal of Physiology)* 375, 219-228.
- NOGUCHI S., NODA M., TAKAHASHI H., KAWAKAMI K., OHTA T., NAGANO K., HIROSE T., INAYAMA S., KAWAMURA M. & NUMA S. (1986) Primary structure of the α -subunit of *Torpedo californica* (Na, K)ATPase deduced from the cDNA sequence. *FEBS Letters* 196(N2), 315-320.
- POST R.L., KUME S., TOBIN T., ORCUTT B. & SEN A.K. (1969) Flexibility of an active centre in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. *J. Gen. Physiol.* 54, 306s-326s.
- PRICE E.M. & LINGREL J.B. (1988) Structure-function relationships in the $\text{Na, K-ATPase } \alpha$ subunit: Site-directed mutagenesis of glutamine-11 to arginine and asparagine-122 to aspartic acid generates a ouabain-resistant enzyme. *Biochemistry* 27, 8400-8407.
- RAKOWSKI R.F. (1993) Charge movement by the Na/K pump in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 101, 117-144.
- RAKOWSKI R.F., GADSBY D.C. & DEWEER P. (1997) Voltage-dependence of the Na/K pump. *J. Membrane Biol.* 155, 105-112.
- RAKOWSKI R.F., VASILETS L.A., LATONA J. & SCHWARZ W. (1991) A negative slope in the current-voltage relationship of the Na^+/K^+ pump in *Xenopus* oocytes produced by reduction of external $[\text{K}^+]$. *J. Membrane Biol.* 121, 177-187.
- Rettinger, J. Elektrophysiologische Untersuchungen endogener und exogener Transportproteine in der Membran von Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* mit Hilfe einer neuen Variante der Patch-Clamp-Methode. 1994.

Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main. (GENERIC)
Ref Type: Thesis/Dissertation

- RETTINGER J. (1996) Characteristics of Na⁺/K⁺-ATPase mediated proton current in Na⁺- and K⁺-free extracellular solution. Indications for kinetic similarities between H⁺/K⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1282, 207-215.
- RETTINGER J., VASILETS L.A., ELSNER S. & SCHWARZ W. (1994) Analysing the Na⁺/K⁺-pump in outside-out giant membrane patches of *Xenopus* oocytes. In *The Sodium Pump*. Eds E. Bamberg & W. Schoner. Darmstadt: Steinkopff Verlag. pp. 553-556.
- RICHTER H.-P. (1997) Verwendung von *Xenopus*-Eizellen. In *Der Krallenfrosch Xenopus laevis als Labortier*. Eds G. Hilken, F. Iglauer & H.-P. Richter. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
- SCHMALZING G. & GLOOR S. (1994) Na⁺/K⁺-Pump Beta Subunits: Structure and Functions. *Cellular Physiology and Biochemistry* 4(3-4), 96-115.
- SCHWARZ W. (1994) Ion Pumps, P-Type ATPases, Introductory Remarks. *Cellular Physiology and Biochemistry* 4(3-4), 77-81.
- SCHWARZ W. & VASILETS L.A. (1990) Variations in the negative slope of the current-voltage (I-V) relationship of the Na⁺/K⁺ pump in *Xenopus* oocytes. *J.Gen.Physiol.* 96, 11a(Abstract)
- SCHWARZ W. & VASILETS L.A. (1991) Variations in voltage-dependent stimulation of the Na⁺/K⁺ pump in *Xenopus* oocytes by external potassium. In *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*. Eds P. DeWeer & J.H. Kaplan. New York: Rockefeller Univ. Press. pp. 327-338.
- SIGWORTH F.J. (1983) Electronic Design of the Patch Clamp. In *Single-Channel Recording*. Eds B. Sakmann & E. Neher. New York: Plenum Press. pp. 3-13.
- SKOU J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta* 23, 727-756.
- SOKOLOV V.S., APELL H.J., CORRIE J.E. & TRENTHAM D.R. (1998) Fast transient currents in na,k-atpase induced by atp concentration jumps from the p-3-[1-(3',5'-dimethoxyphenyl)-2-phenyl-5-oxo]ethyl ester of atp. *Biophysical.Journal.* 74, 2285-2298.
- TAKEUCHI A. & TAKEUCHI M. (1959) Active phase of frog's end-plate potential. *J.Neurophysiol.* 22, 395-411.
- THERIEN A.G., GOLDSHLEGER R., KARLISH S.J.D. & BLOSTEIN R. (1997) Tissue-specific distribution and Modulatory Role of the β -Subunit of the Na,K-ATPase. *J.Biological Chemistry* 272/51, 32628-32634.
- VASILETS L.A., OHTA T., NOGUCHI S., KAWAMURA M. & SCHWARZ W. (1993) Voltage-dependent inhibition of the sodium pump by external sodium: Species

differences and possible role of the N-terminus of the β -subunit. *Europ.Biophys.J.* 21, 433-443.

VASILETS L.A. & SCHWARZ W. (1992) Regulation of endogenous and expressed Na^+/K^+ pumps in *Xenopus* oocytes by membrane potential and stimulation of protein kinases. *J.Membrane Biol.* 125, 119-132.

VASILETS L.A. & SCHWARZ W. (1994) The Na^+/K^+ Pump: Structure and Funktion of the Alpha-Subunit. *Cellular Physiology and Biochemistry* 4(3-4), 81-96.

VILSEN B. (1994) Funktional consequences of alterations to Glu329 and other residues in the transmembrane sector of Na^+/K^+ -ATPase. In *The Sodium Pump*. Eds E. Bamberg & W. Schoner. New York: Springer. pp. 405-408.

WUDEL I. & APELL H.J. (1995) Electrogenericity of the sodium-transport pathway in the Na^+/K^+ -atpase probed by charge-pulse experiments. *Biophysical.Journal.* 69, 909-921.

D.2. Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Ich erkläre ferner, daß diejenigen Stellen der Arbeit, die anderen Werken wörtlich oder dem Sinne nach entnommen sind, in jedem einzelnen Falle unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind.

Petrus Stephan Salonikidis

D.3. Danksagung

An Herrn Prof. Dr. W. Schwarz möchte ich meinen größten Dank für die Themenstellung und die engagierte Betreuung aussprechen.

Herrn Prof. Dr. D. Schubert möchte ich für die Stellungnahme der vorliegenden Arbeit danken.

Frau Prof. Dr. L. Vasilets, Frau Dr. U. Eckstein-Ludwig, Herrn Dr. J. Rettinger und E. Wachter möchte ich für die intensive Betreuung und die Einführung in die elektrophysiologischen Verfahren danken.

Frau H. Biehl möchte ich für die cRNA-Präparation und die Einweisung in die Oozytengewinnung danken.

Frau E.-M. Gärtner und Frau H. Fotis möchte ich für die Flux-Messung und die vielen Hilfestellungen danken.

P. Buet danke ich für manchen guten Rat und die schönen Unterhaltungen.

Unserer ganzen Arbeitsgruppe und unseren vielen Gästen gilt mein aufrichtiger Dank für die anregenden Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.