

Festkörperunterstützte Membranen zur Untersuchung von elektrogenen Transportvorgängen und deren Potential für die Hochdurchsatz-Wirkstoffsuche

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich
Chemische und pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Robin Krause
aus Bochum

Frankfurt am Main
2006
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der Johan Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen:

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Fendler, Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation:

Für Samson, Babsi, Kirstin und Ron...
...ein bisschen auch für Benni.

Heureka

Archimedes von Syrakus, um 250 v. Chr.

Inhaltsverzeichnis

1	Theoretische Grundlagen und Eingrenzung der Thematik	1
1.1	Motivation	1
1.2	Grundlagen	1
1.2.1	Biologische Membranen	1
1.2.2	Aktiver Transport	4
1.2.3	Transportkinetik	11
1.2.4	Kapazitive Kopplung und Elektrogenizität	14
1.3	Stand der Technik	17
1.3.1	Sensoraufbau	17
1.3.2	Aktivierungsprotokolle	19
1.3.3	Ersatzschaltbild	24
1.3.4	Elektrische Charakterisierung	27
1.3.5	Hochdurchsatztechnik	33
1.4	Verwendete Proteine	36
1.4.1	Der Glutamatttransporter EAAC1	36
1.4.2	Der bakterielle Natrium-Protonen-Austauscher NhaA	40
1.4.3	Das Bacteriorhodopsin BR	42
2	Material und Methoden	45
2.1	Verwendete Chemikalien	45
2.2	Verwendete Messlösungen	47
2.3	Herstellung der biologischen Proben	48
2.3.1	Zellkultur	48
2.3.2	Membranpräparation	49
2.3.3	Solubilisierung von Bacteriorhodopsin aus Purpurmembranen	50
2.3.4	Rekonstitution von solubilisiertem Protein	51
2.4	Charakterisierung der biologischen Proben	52
2.4.1	Proteinbestimmung mit BCA	53
2.4.2	Phosphatbestimmung nach Fiske-Subbarow	53
2.4.3	Elektronenmikroskopie	54
2.4.4	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	54
2.4.5	Quarzmikrowaage	55
2.5	Vorbereitung der Sensoren	56
2.5.1	Herstellung der 96er Elektrodenarrays	57
2.5.2	Biochemische Sensorvorbereitung	57
2.6	Messaufbau	58
2.7	Schnelle Lösungswechsel	59
2.7.1	Lichtaktivierung	60

2.8	Verwendete Geräte	61
2.9	Softwaregestützte Auswertung	63
2.9.1	Verwendete Software	63
2.9.2	Verwendete Annäherungsfunktionen	63
2.9.3	Numerische Methoden	64
3	Charakterisierung der Methode	67
3.1	Der Lösungswechsel	67
3.1.1	Zuleitungsdispersion	68
3.1.2	Vergleich des Modells mit den experimentellen Daten	74
3.2	Transportkinetische Modelle	77
3.2.1	Vereinfachtes Transportmodell	77
3.2.2	Sprunghafte Substratfreisetzung und schnelle Lösungswechsel	80
3.3	Ersatzschaltbild und Messströme	83
3.3.1	Diskussion des Ersatzschaltbildes	85
3.3.2	Einfluss des Belegungsgrades	89
3.3.3	Potential über die Membranen	90
3.3.4	Selbstbeeinflussung durch Potentialabbau	90
3.4	Elektrisches Verhalten	91
3.4.1	Elektrische Eigenschaften der Sensoren	91
3.4.2	Störquellen	94
4	Anlagerungsverhalten	97
4.1	Physikalische Eigenschaften der biologischen Proben	97
4.1.1	Proteingehalt der Proben	97
4.1.2	Lipidgehalt der Proben	98
4.1.3	Topologie der Proben	99
4.1.4	Größe und dynamisches Verhalten der Liposomen	100
4.2	Theoretisches Anlagerungsmodell	103
4.2.1	Mittlere Anlagerungsdauer	103
4.2.2	Zeitliche Abhängigkeit der Massenbelegung	107
4.3	Anlagerungsexperimente mit Bacteriorhodopsin	108
4.3.1	Charakterisierung des Proteins	108
4.3.2	Anlagerungskinetik	110
4.3.3	Vergleich mit anderen Methoden	113
4.3.4	Diskussion des Anlagerungsverhaltens	115
4.4	Einfluss des Lösungsmittels	116
4.4.1	Versuchsdurchführung	116
4.4.2	Elektrische Eigenschaften	117
4.4.3	Proteinaktivität	118
4.4.4	Schlussfolgerungen	118
5	Kinetische Untersuchungen	119
5.1	Der neuronale Glutamattransporter EAAC1	119
5.1.1	Messungen mit dem EAAC1	120
5.1.2	Diskussion der Ergebnisse mit dem EAAC1	137
5.2	Der Natrium-Protonen-Austauscher NhaA	149
5.2.1	Messungen mit dem NhaA	149
5.2.2	Diskussion der Ergebnisse mit dem NhaA	154

6 Anwendung als Hochdurchsatzsystem	159
6.1 Entwicklung der Messapparatur	159
6.1.1 Lösungshantierung und Proteinaktivierung	160
6.1.2 Messkreis und Referenzelektrode	161
6.1.3 Programmierung und Datenerfassung	161
6.1.4 Injektionseinheit	161
6.2 Messprotokoll	162
6.3 Beispielmessungen	163
6.3.1 Messungen mit dem NhaA	163
6.3.2 Messungen mit dem EAAC1	165
6.4 Ausblick und Anwendungsmöglichkeiten	167
Zusammenfassung	171
Literaturverzeichnis	173
Danksagungen	179
Lebenslauf	181

Kapitel 1

Theoretische Grundlagen und Eingrenzung der Thematik

1.1 Motivation

Die Forschung auf dem Gebiet der Membranproteine eröffnet tiefgehende Einblicke in die molekularen Grundlagen von verschiedenen physiologischen Prozessen. Oftmals sind die makroskopischen Zusammenhänge bekannt und können durch weitergehende Studien detaillierter beschrieben werden. Andererseits können veraltete Vorstellungen durch neuere und bessere Modelle ersetzt oder an neue Erkenntnisse angepasst werden. Daran ist auch der Einsatz von neuen Techniken beteiligt, der eine Umsetzung von neuen Ideen zulässt. Festkörperunterstützte Membranen [76, 75, 64, 65] sind ein gutes Beispiel dafür. Sie bestehen aus einer biologischen Komponente, der Lipidmembran, die über eine physikalische Schnittstelle an einen Stromkreis gekoppelt ist. Dieser kann in der Lipidmembran auftretende elektrogene Vorgänge (z.B. biochemische Reaktionszyklen) erfassen, wenn man die richtigen chemischen Substanzen zur Verfügung stellt. Mit Hilfe der festkörperunterstützten Membran als Werkzeug können insbesondere Membranproteine, die als Transporter arbeiten, charakterisiert und untersucht werden. Die relativ hohe mechanische Stabilität und die gute Handhabbarkeit beinhalten zusätzlich zu den wissenschaftlichen Möglichkeiten ein großes Potential für die industrielle Anwendbarkeit im Bereich der pharmazeutischen Wirkstoffsuche und für die Durchführung von präklinischen Studien, z.B. als Ersatz für Tierversuche. Dabei ist auch maßgeblich, ob ein Verfahren dazu geeignet ist, einen hohen Durchsatz an Messungen zu ermöglichen. Um ein Messsystem industriell anwenden zu können, muss allerdings ein hoher Grad an Qualität und Reproduzierbarkeit erfüllt sein, was ein tiefgehendes Verständnis des Systems voraussetzt. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Grundlagen der festkörperunterstützten Membranen erläutert und erweitert. Es werden verschiedene biologische Transportsysteme charakterisiert und die technischen Möglichkeiten für die Herstellung eines hochdurchsatzfähigen Systems basierend, auf festkörperunterstützten Membranen, untersucht.

1.2 Grundlagen

1.2.1 Biologische Membranen

Biologische Membranen bilden die äußere Umhüllung von Zellen (*Cytoplasmamembran*) und verschiedene Zellorganellen (z.B. *Endoplasmatisches Retikulum* oder *Golgi-Apparat*).

Sie bestehen primär aus einer Doppelschichtmembran von amphiphilen Lipid-Molekülen und darin inserierten Proteinen.

Lipiddoppelschicht

Die Lipidmoleküle bestehen aus einer polaren Kopfgruppe und meist zwei langkettigen hydrophoben Fettsäureresten. Sie bilden in wässrigen Umgebungen spontan Doppelschichtstrukturen aus, in denen sich die hydrophoben Fettsäurereste zusammenlagern und das Innere der Membran bilden. Die hydrophilen Kopfgruppen weisen dabei nach außen und grenzen die Membran nach dorthin ab. Ein prominentes Beispiel in einer biologischen Membran ist das Phospholipid, das in der polaren Kopfgruppe ein Phosphat trägt, welches meist über ein Glycerin-Molekül mit den Fettsäureresten verbunden ist (siehe Abb. 1.1). Verschiedenartige Lipide können unterschiedliche physikalische Eigenschaften (vorwiegend mechanischer Natur, wie z.B. Dichte, Festigkeit oder Elastizität) der Membran beeinflussen. Eine Membran, die nur aus Lipiden besteht, ist sehr dicht gegenüber dem Durchtritt von polaren Molekülen und Ionen. Sie stellt quasi eine impermeable Barriere dar, was in elektrischer Hinsicht der Eigenschaft eines Isolators mit einem hohen Widerstand entspricht [81, 48]. Die Lipide bleiben dabei in den jeweiligen Membranhälften beweglich, die dadurch den Charakter einer zweidimensionalen Flüssigkeit aufweisen, in der die Lipide um die eigene Längsachse rotieren und lateral diffundieren können. Ein Wechsel eines Lipids von der einen Membranhälfte zur anderen (sogenannter Flip-Flop) findet spontan in der Regel nicht statt. Eine wichtige Rolle spielt in Prokaryoten (Bakterienzellen) das Vorhandensein bzw. die Anzahl von Doppelbindungen¹ in den Kohlenwasserstoffketten des Lipids, da diese durch Verringerung der membranversteifenden, intermolekularen Wechselwirkungen die Elastizität bzw. Fluidität erhöhen. In eukaryotischen Organismen (tierische und pflanzliche Zellen) erfolgt die Regulierung der Elastizität bzw. Fluidität über das Cholesterol, welches in Membranen inseriert und die Beweglichkeit der Lipide einschränkt. In biologischen Membranen sind die Lipidzusammensetzungen in beiden Schichten der Doppelstruktur nicht gleich, weshalb man von einer strukturellen Asymmetrie spricht. In der äußeren Membranhälfte der Cytoplasmamembran kommen z.B. Glykolipide vor (siehe Abb. 1.2 f), die in der inneren Seite nie zu finden sind. Bestimmte Verteilungen von Zusammensetzungen können z.B. den Krümmungsradius der Membran beeinflussen.

Membranproteine

Proteine sind Makromoleküle, die aus einer Sequenz von Aminosäuren aufgebaut sind. Diese bilden zusammen ein Polypeptid (Primärstruktur). Die Reihenfolge der insgesamt ca. 20 existierenden Aminosäuren bestimmt die räumliche Anordnung der Sekundärstruktur (α -Helices, β -Faltblätter). Die Teile der Sekundärstruktur falten sich zu einer Tertiärstruktur, wobei Wasserstoffbrückenbindungen und Disulfidbrücken von Bedeutung sind. Wenn ein Protein aus mehreren Untereinheiten besteht, ordnen sich diese zur Quartärstruktur. Die Proteine, die in und an den äußeren Zellmembranen (*Cytoplasmamembran*) von biologischen Systemen vorliegen, vermitteln den Hauptanteil dynamischer Prozesse, die dort stattfinden. Zu den wichtigsten Vorgängen gehört der Austausch von Material, Information und Energie mit der Umgebung. Weitere Aufgaben von Membranproteinen betreffen

¹Man spricht bei dem Vorhandensein von Doppelbindungen in einer Kohlenwasserstoffkette von ungesättigten Fettsäuren. Die Fettsäuren werden dabei entsprechend des Sättigungsgrades als „einfach“ bis „ n -fach“ (mehrfach) ungesättigt bezeichnet.

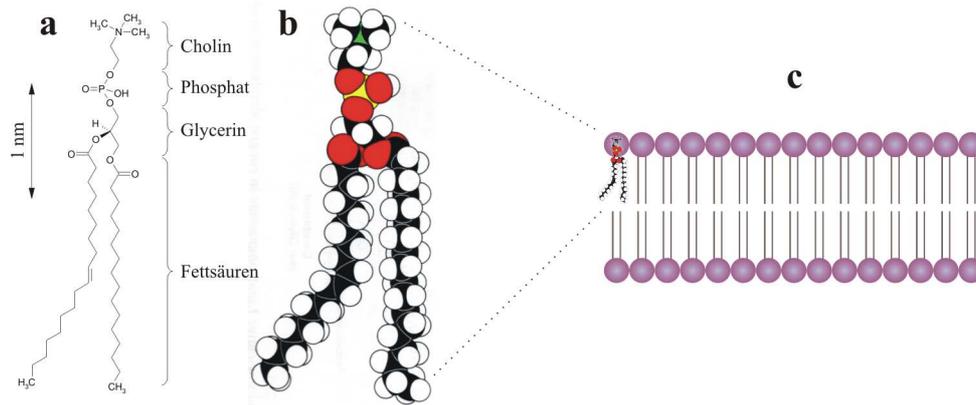


Abbildung 1.1: Darstellung eines Phospholipides als Lewisformel (a), als Kalottenmodell (b) und das Ensemble einer Lipiddoppelschicht (c). Das Lipid besitzt die Kopfgruppe Phosphatidylcholin (PC), einen Palmitinsäurerest (C₁₆) und einen Fettsäurerest der Ölsäure (C₁₈).

z.B. die mechanische Stabilität zur Unterstützung der Lipiddoppelschicht oder die Anheftung der Extrazellulärmatrix auf der Außenseite bzw. dem Cytoskelett auf der Innenseite der Membran. Der Aufbau von Verflechtungen auf der Innen- bzw. der Außenseite der Lipidmembran kann wiederum zur Ankopplung von Enzymen dienen, die wichtige Reaktionen in der Nähe der Membran katalysieren (z.B. die Acetylcholinesterase, die in der Nähe der postsynaptischen Membran einer motorischen Endplatte den Neurotransmitter Acetylcholin deaktiviert). Die integralen Membranproteine besitzen in ihrer globalen Struktur hydrophobe Bereiche, die über die Seitenketten der Aminosäuren gegeben sind, mit denen sie in der Membran abtauchen und diese vollständig durchspannen. Die außenliegenden Bereiche des Proteins sind polar. Proteine, die einen Transport vermitteln, sind fast immer integrale Membranproteine. Der Transport von Materie, Information und Energie ist in den meisten Fällen stoffbasiert, d.h. es werden z.B. Aminosäuren für den Aufbau von Proteinen in die Zelle befördert (Material), oder es bindet ein Hormon an einen Rezeptor, der in der Zelle zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bildet, das dort bestimmte Stoffwechselreaktion in Gang setzt (Information), oder es wird ein Ion durch die Membran transportiert, wodurch ein Molekül Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) phosphoryliert wird (Energie). Gleich welche Bestimmung ein Transportvorgang hat, kann physikalisch zwischen verschiedenen Arten unterschieden werden. Je nachdem, ob bei einem Transportereignis die Änderung des thermodynamischen Potentials (Gibbs-Energie oder freie Enthalpie) ΔG_{trans} des Vorgangs kleiner oder größer Null ist, unterscheidet man zwischen passivem und aktivem Transport. Ist die Änderung der freien Enthalpie kleiner Null, so findet ein Transport entlang des Gradienten für diesen Übergang statt. Das ist dann der Fall, wenn es sich bei den Transport vermittelnden Proteinen um Poren oder um Kanäle handelt, die entweder immer offen sind oder über einen Öffnungs- bzw. Schließmechanismus verfügen, wobei im offenen Zustand eine Verbindung zwischen beiden Membranseiten hergestellt wird, durch die ein Stoff, wenn er eine entsprechende Größe hat, hindurchdiffundieren kann. Kanalproteine können also eine Selektivität für bestimmte Stoffe bzw. Ionen aufweisen, der Transport ist immer passiv. Ist die Änderung der freien Enthalpie größer Null, findet ein aktiver Transport statt, der im nächsten Abschnitt genauer behandelt werden soll.

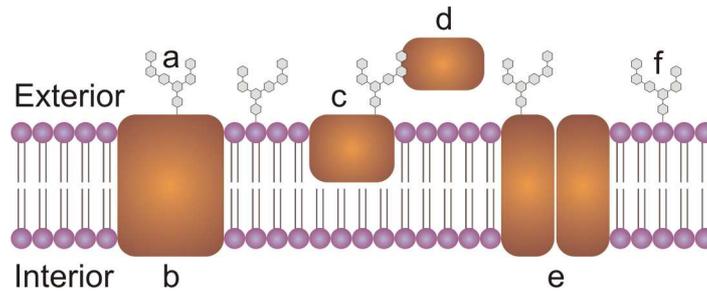


Abbildung 1.2: Modell einer biologischen Membran. Viele Membranproteine sind auf der Extrazellulärseite glykosyliert (a). Einige Proteine durchspannen die Membran vollständig (b), andere sind nur teilweise eingelagert (c). Durch Kopplungsmechanismen können Proteine auch einfach nur in der Nähe der Membran immobilisiert sein (d). Mehrere Proteine lagern sich zu Komplexen zusammen (e), die z.B. Kanäle bilden. Von den Lipiden in der Doppelschichtmembran sind einige, ebenfalls nur zur Extrazellulärseite hinweisend, an der Kopfgruppe glykosyliert (f).

1.2.2 Aktiver Transport

Aktiver Transport durch Biomembranen wird von Membranproteinen vermittelt, die im folgenden auch als Transporter oder Transportproteine bezeichnet werden. Ein wesentliches Merkmal von aktivem Transport ist die Tatsache, dass der Transport einer Spezies i gegen den Gradienten des elektrochemischen Potentials für diesen Vorgang stattfindet. Daraus resultiert eine Änderung des thermodynamischen Potentials ΔG_{trans} , das größer als Null ist, was für eine Reaktion spricht, die eigentlich nicht spontan stattfindet. Dieses Phänomen kann nur dadurch in Einklang mit den Gesetzen der Thermodynamik gebracht werden, dass diesem Prozess äußere Energie in der Form einer freien Enthalpie ΔG_{act} zur Verfügung gestellt wird. Diese sorgt als treibende Kraft des Transportvorgangs dafür, dass die freie Gesamtenthalpie ΔG_{tot} des Systems kleiner als Null ist. Mit diesen Bedingungen können folgende Zusammenhänge formuliert werden:

$$\Delta G_{trans} > 0 \quad (1.1)$$

$$\Delta G_{tot} = \Delta G_{trans} + \Delta G_{act} < 0 \quad (1.2)$$

Nun sollen die Gegebenheiten an der Membran betrachtet werden. Unter physiologischen Bedingungen stellen sich über biologische Membranen Konzentrationsungleichgewichte von verschiedenen Ionen (vorwiegend Natrium-, Kalium- und Chloridionen) ein, so dass es zur Ausbildung einer elektrischen Potentialdifferenz über die Membran kommt. Generell ist die intrazelluläre Natriumionenkonzentration klein und die Kaliumionenkonzentration groß. Auf der Extrazellulärseite verhält es sich genau umgekehrt. Dort ist die Natriumionenkonzentration größer als die Kaliumionenkonzentration. Die Konzentrationen gleichen sich bei einer intakten Zellphysiologie nie aus, wie es der Fall sein müsste, wenn lediglich passive Transportmechanismen vorhanden wären, durch die Ionen nahezu frei diffundieren könnten. Der Grund für die Aufrechterhaltung der Gradienten ist ein aktives Transportsystem, das mit externer Energie versorgt wird, um permanent Kaliumionen in die Zelle zu transportieren und Natriumionen aus ihr zu entfernen. Die Rede ist von der Natrium-Kalium-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase), die eines der wichtigsten aktiven Transportsysteme in der Zelle ist. Um einen aktiven Transportprozess hinsichtlich der transportierten Substanzen thermodynamisch zu beschreiben, kann man deren chemisches Potential heranziehen,

wobei die jeweiligen Substanzen als Stoffe der Spezies i bezeichnet werden sollen.

Das elektrochemische Potential $\bar{\mu}_{i,k}$ einer Spezies i am Ort k ist definiert durch das chemischen Potential $\mu_{i,k}$ und das elektrische Potential φ_k :

$$\bar{\mu}_{i,k} = \mu_{i,k} + z_i \cdot F \cdot \varphi_k = \mu_{i,k,0} + R \cdot T \cdot \ln a_{i,k} + z_i \cdot F \cdot \varphi_k \quad (1.3)$$

Dabei sind R die Gaskonstante, T die Temperatur, $a_{i,k}$ die Aktivität der Spezies i am Ort k , z_i die Wertigkeit der Spezies i , F die Faradaykonstante und φ_k das Potential des elektrischen Feldes am Ort k .

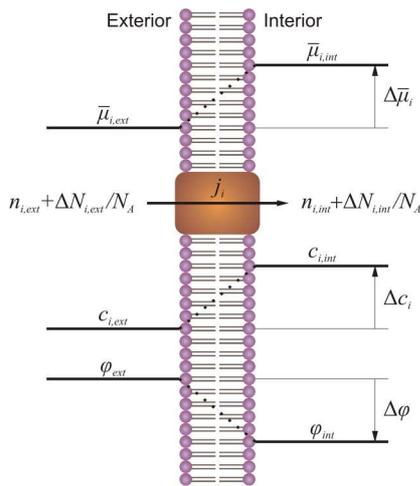


Abbildung 1.3: Die Situation an der Membran aus thermodynamischer Sicht zur Veranschaulichung der Größen die eine Rolle beim aktiven Transport spielen. Die Extrazellulärseite der Membran ist der Anfangspunkt einer Stoffverschiebung. Das Protein transportiert $\Delta N_i = \Delta N_{i,int} = -\Delta N_{i,ext}$ Moleküle der Spezies i aktiv zur Intrazellulärseite. Der Transport findet entgegen dem Konzentrationsgradienten Δc_i der Spezies i und entlang eines elektrischen Gradienten $\Delta \varphi$, der unabhängig von der Spezies i sein kann, statt. Die elektrochemische Potentialdifferenz $\Delta \bar{\mu}_i = \Delta \bar{\mu}_{i,trans}$ über die Membran ist bei aktivem Transport größer als Null. Dem System, wie es abgebildet ist, muss also zusätzliche Energie zugeführt werden, um thermodynamisch bestehen zu können.

Die elektrochemische Potentialdifferenz über eine Membran (siehe Abb. 1.3) ist dann über die Differenz der einzelnen Potentiale auf den beiden Membranseiten gegeben, wobei für die Orte k die Membranaußenseite (ext) und die Membraninnenseite (int) gegeben sind. Die Differenz wird entlang des Stofftransports (Fluss j_i) gebildet, wobei der Startpunkt die Extrazellulärseite und der Endpunkt die Intrazellulärseite ist.

$$\Delta \bar{\mu}_{i,trans} = \bar{\mu}_{i,int} - \bar{\mu}_{i,ext} = R \cdot T \cdot \ln \frac{a_{i,int}}{a_{i,ext}} + z_i \cdot F \cdot (\varphi_{int} - \varphi_{ext}) \quad (1.4)$$

Der Fluss j_i durch die Membran (genauer gesagt durch das Protein in der Membran) ist definiert als Anzahl der Teilchen, die in der Zeit t durch die Fläche A treten. Dabei ist die Änderung der Anzahl der Teilchen auf beiden Seiten der Membran vom Betrag her gleich groß ($\Delta N_i = \Delta N_{i,int} = -\Delta N_{i,ext}$).

$$j_i = \frac{1}{A} \cdot \frac{dN_i}{dt} = \frac{1}{A} \cdot \frac{dN_{i,int}}{dt} = -\frac{1}{A} \cdot \frac{dN_{i,ext}}{dt} \quad (1.5)$$

An dem Ort k (Extern oder Intern der Membran) ändert sich die lokale freie Enthalpie dadurch, dass die Substanz der Spezies i entweder hinzugefügt oder weggenommen wird. Die freie Enthalpie $\Delta G_{i,k}$ ist gegeben durch das Integral über das elektrochemische Potential $\bar{\mu}_{i,k}$ nach der Stoffmengenänderung. Die Änderung der lokalen freien Enthalpie am Ort k durch die Änderung der Stoffmenge um den Betrag $\Delta N_{i,k}/N_A$, verursacht durch den Stofftransport (Fluss j_i), ist also:

$$\Delta G_{i,k} = \int_{n_{i,k,0}}^{n_{i,k,0} + \frac{\Delta N_{i,k}}{N_A}} \bar{\mu}_{i,k} dn = [\Delta G_0 + n \cdot \bar{\mu}_{i,k}]_{n_{i,k,0}}^{n_{i,k,0} + \frac{\Delta N_{i,k}}{N_A}} = \frac{\Delta N_{i,k}}{N_A} \cdot \bar{\mu}_{i,k} \quad (1.6)$$

Wobei $n_{i,k,0}$ die Molzahl der Spezies i am Ort k vor der Enthalpieänderung und N_A die Avogardokonstante ist. Die Enthalpieänderung in der Situation, so wie sie in Abb. 1.3 dargestellt ist, wird nach Gleichung 1.6 auf der Extrazellulärseite negativ, und intern positiv, da der Stofftransport von Außen nach Innen stattfindet. Die Enthalpie $\Delta G_{i,trans}$, die für den Transportprozess der Spezies i aufgebracht werden muss, ist nun gleich der Summe der freien Enthalpien an den Orten k und ist wie das elektrochemische Potential eine Zustandsänderung bezüglich der betrachteten Ortsdifferenz (externe und interne Seite der Membran), da mit den Einzelenthalpien gilt:

$$\Delta G_{i,trans} = \Delta G_{i,int} + \Delta G_{i,ext} = \frac{\Delta N_i}{N_A} \cdot (\bar{\mu}_{i,int} - \bar{\mu}_{i,ext}) = \frac{\Delta N_i}{N_A} \cdot \Delta \bar{\mu}_{i,trans} \quad (1.7)$$

Die Transferenthalpie für einen Stoff der Spezies i von der einen Membranseite zur anderen ist also proportional zur Änderung des elektrochemischen Potentials (das elektrochemische Potential kann als stoffmengenbezogene freie Enthalpie angesehen werden). Wenn mehrere Stoffe während eines Transportvorgangs über die Membran gelangen, dann muß über die Einzelenthalpien summiert werden, um die freie Gesamtenthalpie zu erhalten. Zusammen mit Gleichung 1.4 und der Bedingung, dass die Aktivitäten² $a_{i,k}$ der Substanzen mit deren Konzentration $c_{i,k}$ gleichgesetzt werden können, ergibt sich dann:

$$\begin{aligned} \Delta G_{trans} &= \sum_i \Delta G_{i,trans} \\ &= \frac{R \cdot T}{N_A} \sum_i \left(\Delta N_i \cdot \ln \frac{c_{i,int}}{c_{i,ext}} \right) \\ &\quad + \frac{1}{N_A} \cdot \sum_i (\Delta N_i \cdot z_i) \cdot F \cdot (\varphi_{int} - \varphi_{ext}) \end{aligned} \quad (1.8)$$

Für alle transportierten Stoffe der Spezies i gilt, wenn man den Fluss j_i und die Anzahl der Moleküle der jeweiligen umgesetzten Substanzen ν_i pro Reaktionszyklus³ ins Verhältnis setzt [1]:

$$\frac{1}{\nu_i} \cdot j_i = \text{konst.} \quad (1.9)$$

Wenn mehrere Substanzen gleichzeitig in einem Transportzyklus über die Membran bewegt werden, muss unterschieden werden, in welche Richtung die Stoffe transportiert werden, da davon das Vorzeichen des Flusses abhängt. Werden zwei Substanzen in die gleiche Richtung transportiert, handelt es sich um Symport oder Cotransport, und das Vorzeichen des Flusses j_i ist für beide Substanzen gleich. Ist die Transportrichtung von zwei Substanzen entgegengesetzt, spricht man von Antiport oder Countertransport und die Vorzeichen der jeweiligen Flüsse sind ebenfalls entgegengesetzt. Wird in einem Trans-

²In verdünnter wässriger Lösung ist die Aktivität eines gelösten Stoffes gleich seiner Konzentration.

³ ν_i entspricht dabei dem stöchiometrischen Koeffizienten für die einzelnen Spezies, der sich aus der Summengleichung des Transportzyklusses ergibt

portvorgang nur eine Substanz transportiert, handelt es sich um Uniport. Das Vorzeichen ist dann trivial. Wenn sich das Transportsystem im Fließgleichgewicht befindet, gilt für den Fluss (Gleichung 1.5), wobei die Substratmengenänderung ΔN_i der Spezies i das Vorzeichen vom Fluss j_i übernimmt bzw. vorgibt:

$$j_i = \frac{1}{A} \cdot \frac{\Delta N_i}{\Delta t} \quad (1.10)$$

Die zuvor erwähnte Na^+/K^+ -ATPase transportiert z.B. pro Transportzyklus (siehe Kapitel 1.2.3) 3 Natriumionen aus der Zelle heraus und 2 Kaliumionen in sie hinein. Die jeweiligen Konzentrationsgradienten sind der Transportrichtung entgegengesetzt. Mit Gleichung 1.9 ergibt sich für die Flussbilanz $-j_{\text{Na}^+}/3 = j_{\text{K}^+}/2$, wodurch die Anzahl der pro Reaktionszyklus umgesetzten Natriumionen negativ ($\Delta N_{\text{Na}^+} = -3$) und die Anzahl der pro Zyklus umgesetzten Kaliumionen positiv ($\Delta N_{\text{K}^+} = 2$) wird. Das ist der Fall, weil in der Anfangssituation (siehe Abb. 1.3) ein Stofftransport in die Zelle als positiv definiert wurde. Typische Werte für die Konzentrationsverhältnisse in der Zelle sind 100 mM Na^+ und 5 mM K^+ auf der Extrazellulärseite und 10 mM Na^+ und 150 mM K^+ auf der Intrazellulärseite. Die sich dabei einstellende Potentialdifferenz $\Delta\varphi$ von außen nach innen beträgt ca. -60 mV. Die freie Enthalpie des Transportprozesses ist dann für einen vollständigen Transportzyklus gegeben durch:

$$\Delta G_{\text{trans}} = \frac{R \cdot T}{N_A} \left(-3 \cdot \ln \frac{c_{\text{int}}(\text{Na}^+)}{c_{\text{ext}}(\text{Na}^+)} + 2 \cdot \ln \frac{c_{\text{int}}(\text{K}^+)}{c_{\text{ext}}(\text{K}^+)} \right) + \frac{-3 + 2}{N_A} \cdot F \cdot \Delta\varphi \quad (1.11)$$

Für eine Temperatur T von 298 K ergibt sich dann ein Wert von $\Delta G_{\text{trans}} = 6,60 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ für ein Transportprotein pro Zyklus. Gibt man die molare freie Enthalpie bezogen auf ein Mol Transporter an so erhält man mit $\Delta G_{n,\text{trans}} = N_A \cdot \Delta G_{\text{trans}}$ einen Wert von 39,8 kJ/mol. Die in der Gleichung vorkommenden Konstanten haben die Werte: $R = 8,314 \text{ J}/(\text{mol K})$, $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ 1/mol}$ und $F = 9,649 \cdot 10^4 \text{ As/mol}$. Bei dem Transportvorgang der Na^+/K^+ -ATPase findet in Bezug auf die Natriumionen eine Erhöhung der freien Enthalpie ($\Delta G_{n,\text{trans}}^{\text{Na}^+} = 34,5 \text{ kJ/mol}$) statt, bei der die Transportrichtung gegen den Konzentrationsgradienten und das elektrische Feld verläuft. Die Enthalpieänderung für die Kaliumionen ($\Delta G_{n,\text{trans}}^{\text{K}^+} = 5,3 \text{ kJ/mol}$) ist um ein Vielfaches kleiner als bei den Natriumionen, da hier zwar entgegen dem Kaliumionengradienten transportiert wird, aber in Richtung des elektrischen Feldes.

Die freie Enthalpie ΔG_{act} , die als treibende Kraft in den Transportvorgang einfließt, kann auf verschiedene Arten zur Verfügung gestellt werden. Generell unterscheidet man dabei primär aktive und sekundär aktive Transportprozesse, die im Folgenden separat beschrieben werden.

Primär aktiver Transport

Bei primär aktivem Transport erfolgt die Zufuhr der benötigten Energie aus externen Quellen, die dem Protein unmittelbar zur Verfügung stehen. Als Energiequellen können dabei chemische Energielieferanten, elektromagnetische Strahlung oder das Elektronenübertragungspotential aus Redoxreaktionen dienen. Primär aktive Transportproteine werden auch als „Pumpen“ bezeichnet. Ein bekannter primärer Energielieferant, der in jedem lebenden Organismus zur Verfügung steht ist das Adenosintriphosphat (ATP). Bei der Hy-

Hydrolyse zu Adenosindiphosphat (ADP) oder zu Adenosinmonophosphat (AMP) wird die benötigte Energie freigesetzt. Die molare freie Standardenthalpie⁴ ΔG_0 der ATP-Hydrolyse hat einen Wert von $-30,5 \text{ kJ/mol}$. Die tatsächlich bei der Hydrolyse freigesetzte freie Enthalpie ΔG beträgt unter physiologischen Bedingungen im Zellinnern ca. -50 kJ/mol . Dieser Betrag resultiert aus den Konzentrationen des ATP und der Hydrolyse-Produkte ADP und Phosphat, die durch den Metabolismus in der jeweiligen Zelle aufrecht gehalten wird. Die vorher als Beispiel behandelte Na^+/K^+ -ATPase benutzt ATP als Energiequelle für die Aufrechterhaltung der externen Natriumionenkonzentration und der internen Kaliumionenkonzentration [85]. Es wurde gezeigt, dass die Erhöhung der freien Enthalpie bei dem Transportvorgang pro Transportzyklus für 1 Mol Proteine $39,8 \text{ kJ/mol}$ betrug. Die ATP-Hydrolyse, bei der pro Transportzyklus eine Phosphatgruppe auf die Na^+/K^+ -ATPase übertragen wird, stellt dabei ca. -50 kJ/mol (pro Mol ATP) als freie Enthalpie ΔG_{act} zur Verfügung. Bei der Hydrolyse von 1 mol ATP ist die Gesamtänderung der freien Enthalpie mit $\Delta G_{tot} = \Delta G_{trans} + \Delta G_{act} = 39,8 \text{ kJ/mol} - 50 \text{ kJ/mol} = -10,2 \text{ kJ/mol}$ negativ. Der Transportvorgang ist also eine spontan ablaufende Reaktion, die durch die ATP-Hydrolyse angetrieben wird.

Eine weitere für primär aktiven Transport genutzte Energiequelle ist Licht (elektromagnetische Strahlung). Ein großer Teil aller biologischen, vor allem pflanzlichen Systeme ist an die Lichtenergie, die von der Sonne ausgeht, gebunden (Photosynthese), um einen ausgeglichenen Stoffwechsel durchführen zu können. Aber auch Bakterien bzw. Archaeen und tierische Zellen nutzen Lichtenergie für verschiedene Zwecke. Der Mechanismus der Energieumsetzung kann dabei erstaunlich ähnlich sein. Als Beispiel soll der Chromophor Retinal dienen. Retinal ist ein Derivat des Vitamins A (Retinol) und dient als prosthetische Gruppe in Rhodopsinen. Darunter fallen die eukariotischen Vertreter, die in den Stäbchenzellen in der Netzhaut des Auges zu finden sind und als metabotrope Rezeptoren arbeiten. Diese übertragen die aus einem Lichtimpuls gewonnene Energie an einen nachgeschalteten Metabolismus. In dem Archea *Halobacterium salinarium* existiert eine lichtgetriebene Protonenpumpe (Bacteriorhodopsin), die ebenfalls ein Retinalmolekül als prosthetische Gruppe aufweist, wobei durch eine lichtinduzierte *trans-cis*-Isomerisierung die notwendige Energie für den Aufbau eines Protonengradienten über die Zellmembran aufgebracht wird [60]. Näheres zu diesem Mechanismus ist in Abschnitt 1.4.3 zu finden.

Ein Beispiel für die Nutzung der Energie aus einem Redoxsystem ist die Cytochrom-c-Oxidase, die Cytochrom c oxidiert und dadurch selbst reduziert wird. Mit den transferrierten Elektronen katalysiert sie die Reduktion von elementarem Sauerstoff zu Wasser. Dabei wird ein Protonengradient und ein Potential über die Membran aufgebaut, der für die Erzeugung von ATP verwendet werden kann. Die Cytochrom-c-Oxidase ist als Membranprotein an der Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) beteiligt, die an der Innenmembran von Mitochondrien stattfindet [85]. Die freie Enthalpie ΔG_{act} ergibt sich hierbei aus den Reduktions- bzw. Elektronenübertragungspotentialen für die beteiligten Substanzen. Aus der Summgleichung $4 (\text{Cyt } c)_{red} + 4 \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4 (\text{Cyt } c)_{ox} + 2 \text{H}_2\text{O}$ kann auf das Reduktionspotential der Gesamtreaktion geschlossen werden. Für die Reduktion eines Cytochrom c beträgt das Reduktionspotential $0,22 \text{ V}$, und für die Reduk-

⁴Die freie Standardenthalpie ist die Enthalpie, bei der alle an einer Reaktion beteiligten Substanzen die Aktivität 1 erreichen. Für diesen Fall gilt $\Delta G = \Delta G_0$. Der Wert von ΔG^0 kann leicht bestimmt werden, da im Gleichgewicht $\Delta G = \Delta G_0 + R \cdot T \cdot \ln K = 0$ ist. Als Kriterium für die Spontanität einer Reaktion ist allerdings nur ΔG verwendbar, da die freie Standardenthalpie nur eine reaktionsspezifische Konstante ist.

tion von $1/2 \text{ O}_2$ beträgt es $0,82 \text{ V}$. Man erhält also ein Gesamtredoxpotential von $\Delta E = 2 \cdot 0,82 \text{ V} - 4 \cdot 0,22 \text{ V} = 0,76 \text{ V}$. Mit $\Delta G_{act} = -n \cdot F \cdot \Delta E$ ergibt sich für die Änderung der freien Enthalpie bei dieser Redoxreaktion -293 kJ/mol (mit $n = 4$ für die Anzahl der transferierten Elektronen). Für einen Protonengradienten über die Membran, bei dem der pH-Wert außen um $1,4 \text{ pH-Einheiten}$ größer ist als innen, folgt mit Gleichung 1.8 für ein Membranpotential von 140 mV [85] eine notwendige Transportenthalpie ΔG_{trans} von $86,0 \text{ kJ/mol}$ (bei einem Nettotransport von 8 Protonen pro Reduktion eines Sauerstoffmoleküls). Die Summe aus beiden Werten ergibt eine Gesamtenthalpieänderung, die kleiner als Null ist. Der Transportvorgang erfolgt also spontan und wird durch die Elektronenübertragungspotentiale aufrecht erhalten.

Sekundär aktiver Transport

Sekundär aktive Transportsysteme nutzen die elektrochemischen Gradienten aus, die von primär aktiven Systemen zur Verfügung gestellt werden bzw. aufgebaut wurden. Viele der eukariotischen sekundär aktiven Transporter nutzen dabei den von der Na^+/K^+ -ATPase aufgebauten Natriumgradienten vom Zelläußeren zum Zellinnern aus, um Substrate wie z.B. Ionen, Zucker oder Aminosäuren in die Zelle hinein (Symport) oder aus ihr heraus (Antiport) zu transportieren. In bakteriellen Organismen (Prokarioten) werden Protonengradienten oder Natriumionengradienten als Energiequelle für sekundär aktiven Transport verwendet. Die ATPase (H^+ -ATPase), die in der inneren⁵ Membran von Mitochondrien oder von Bakterien sitzt, nutzt einen Protonengradienten für die Synthese von ATP aus ADP. Das zuvor erwähnte Bacteriorhodopsin baut einen Protonengradienten für die ATP-Synthese auf, wenn sich der Organismus in einer sauerstoffarmen Umgebung befindet. In Anwesenheit von Sauerstoff wird ein Protonengradient primär durch die Atmungskette, z.B. wie von der zuvor erwähnten Cytochrom-c-Oxidase, aufgebaut. Ohne primär aktiven Transport käme der sekundäre Transport zum Erliegen, da die Gradienten sich über passive und sekundär aktive Transportmechanismen ausgleichen würden, wenn sich das thermodynamische Gleichgewicht einstellt. Da die freie Enthalpie für alle transportierten Substrate von dem elektrochemischen Potential abhängt, folgt ΔG_{act} dem gleichen Formalismus mit dem einen Unterschied, dass die erhaltenen Enthalpieänderungen nicht größer, sondern kleiner als Null sind. Für die Änderung der freien Enthalpie für ein aktiv transportiertes Substrat der Spezies i (Gleichung 1.7) folgt mit Gleichung 1.10:

$$\Delta G_{i,trans} = \frac{j_i \cdot A \cdot \Delta t}{N_A} \cdot \Delta \bar{\mu}_{i,trans} \quad (1.12)$$

Für die Änderung der freien Enthalpie von Substraten der Spezies j , die durch die existierenden Gradienten als treibenden Kraft transportiert werden, folgt analog dazu:

$$\Delta G_{j,act} = \frac{j_j \cdot A \cdot \Delta t}{N_A} \cdot \Delta \bar{\mu}_{j,act} \quad (1.13)$$

Die Gesamtenthalpieänderung ΔG_{tot} ist dann gleichzusetzen mit:

$$\Delta G_{tot} = \Delta G_{trans} + \Delta G_{act} = \sum_i \Delta G_{i,trans} + \sum_j \Delta G_{j,act}, \quad (1.14)$$

⁵Bakterien, Mitochondrien und Archaeen besitzen oft zwei Doppelschichtmembranen, die durch das Periplasma getrennt sind. Die innere Membran umschließt das Cytoplasma und wird Cytoplasmamembran genannt. Die äußere Membran umschließt das Periplasma und heißt deswegen periplasmatische Membran

wobei für die Gesamtänderung der freien Enthalpie $\Delta G_{tot} < 0$ gelten muss. Zusammen mit den Gleichungen 1.12 und 1.13 ergibt sich dann:

$$\Delta G_{tot} = \sum_i \frac{j_i \cdot A \cdot \Delta t}{N_A} \cdot \Delta \bar{\mu}_{i,trans} + \sum_j \frac{j_j \cdot A \cdot \Delta t}{N_A} \cdot \Delta \bar{\mu}_{j,act} < 0 \quad (1.15)$$

Da der Term $A \cdot \Delta t / N_A$ konstant ist, lässt sich vereinfachend schreiben:

$$\sum_i j_i \cdot \Delta \bar{\mu}_{i,trans} + \sum_j j_j \cdot \Delta \bar{\mu}_{j,act} < 0 \quad (1.16)$$

Das bedeutet, dass die Summe aus allen an dem Transportprozess teilnehmenden Substanzen, multipliziert mit deren Flussrate, kleiner als Null sein muss, damit sekundär aktiver Transport vorliegt. Die Ungleichung 1.16 kann verwendet werden, um auszurechnen, wie groß ein durch sekundär aktiven Transport aufgebauter Gradient maximal werden kann.

Als Beispiel soll für den eukariotischen Natrium-Protonen-Austauscher NHE bestimmt werden, wie groß der durch den Natriumionengradienten getriebene maximale Konzentrationsunterschied von Protonen über die Membran ist. Der NHE transportiert in einem Zyklus ein Natriumion entlang des Gradienten, den die Na^+/K^+ -ATPase von außen nach innen aufbaut, in die Zelle hinein und transportiert dafür ein Proton nach außen (Antiport). Aus der Ungleichung 1.16 folgt mit diesen Voraussetzungen:

$$j_{\text{H}^+} \cdot \Delta \bar{\mu}_{\text{H}^+,trans} + j_{\text{Na}^+} \cdot \Delta \bar{\mu}_{\text{Na}^+,act} < 0 \quad (1.17)$$

Nach Gleichung 1.9 folgt entsprechend der Stöchiometrie des Transports, dass $j_{\text{Na}^+} = -j_{\text{H}^+}$ ist. Die Wertigkeiten z_{Na^+} und z_{H^+} sind für beide Ionen gleich 1. Mit Gleichung 1.4 folgt daraus für die Ungleichung:

$$R \cdot T \cdot \ln \frac{c_{int}(\text{H}^+)}{c_{ext}(\text{H}^+)} + F \cdot \Delta \varphi - R \cdot T \cdot \ln \frac{c_{int}(\text{Na}^+)}{c_{ext}(\text{Na}^+)} - F \cdot \Delta \varphi < 0 \quad (1.18)$$

Die Summanden, die das Membranpotential $\Delta \varphi$ enthalten verschwinden aus der Gleichung. Eine Protonenkonzentration wird normalerweise durch den pH-Wert ausgedrückt. Für den Logarithmus des Quotienten aus den Protonenkonzentrationen in Ungleichung 1.18 kann man deshalb schreiben:

$$\ln \frac{c_{int}(\text{H}^+)}{c_{ext}(\text{H}^+)} = -\frac{1}{\log e} \cdot (\text{pH}_{int} - \text{pH}_{ext}) = -2,3 \cdot \Delta \text{pH} \quad (1.19)$$

Damit ergibt sich die für Änderung des pH-Wertes in Abhängigkeit von der Größe des Natriumgradienten die einfache Beziehung:

$$\Delta \text{pH} < -\log \frac{c_{int}(\text{Na}^+)}{c_{ext}(\text{Na}^+)} \quad (1.20)$$

In dem Beispiel mit der Na^+/K^+ -ATPase war der Natriumionengradient durch eine interne Konzentration von 10 mM und eine externe Konzentration von 100 mM gegeben. Hier ergibt sich, dass der Natrium-Protonen-Austauscher NHE den externen pH-Wert unter Zuhilfenahme des vorhandenen Natriumionengradienten um maximal eine pH-Stufe verringern kann ($\Delta \text{pH} < 1$).

Einen anderen Fall stellt die Situation dar, in der die protonenmotorische Kraft des Protonengradienten ausgenutzt wird, um ADP zu ATP zu phosphorylieren (Synthese). Dies erfolgt z.B. durch die bakteriellen oder mitochondrialen ATPasen. Es werden allerdings nur Protonen entlang des Protonengradienten transportiert. Die freie Enthalpie wird nur in die Synthese des ATP eingebracht, und hinsichtlich des Transports ist der Prozess als rein passiv anzusehen. Trotzdem kann ein solcher, mit einer Ladungsverschiebung einhergehender Vorgang in einem kapazitiv gekoppelten Messsystem detektiert werden [9].

1.2.3 Transportkinetik

Ein Protein, das als Enzym oder Transporter arbeitet, katalysiert die Umsetzung eines oder mehrerer Substrate in bestimmte Produkte, oder es befördert ein oder mehrere Substrate aktiv von der einen Membranseite zur anderen. Kinetisch gesehen können beide Systeme ineinander überführt werden, denn beim Transport sind die Substrate die zu transportierenden Stoffe und die Produkte entsprechen den Stoffen, die bereits transportiert worden sind. Für derartige kinetische Systeme können chemische Reaktionsgleichungen aufgestellt werden mit dem Ziel, die enzymatische Umsetzung bzw. den Transportvorgang möglichst genau und möglichst einfach zu beschreiben. Dabei kommen oft vielschrittige Reaktionszyklen vor, für die zwar beschreibende Gleichungssysteme aufgestellt werden können, allerdings oft keine analytische Lösung herzuleiten ist, so dass mit der Hilfe von Methoden der numerischen Mathematik eine Simulation erfolgen muss. Im diesem Abschnitt sollen kurz die Grundlagen der chemischen Reaktionskinetik vorgestellt werden. Danach wird das Gleichungssystem für ein relativ einfaches Transportmodell aufgestellt und erläutert.

Ein einzelner Reaktionsschritt, der im Folgenden in der Form $E_k \rightleftharpoons E_{k+1}$ abgekürzt wird, hat definitionsgemäß die in Gleichung 1.21 gezeigte allgemeine Stöchiometrie. Der Übergang vom Zustand E_k zum nächsten Zustand E_{k+1} trägt dabei den Index i .

$$\sum_n |\nu_n| \cdot J_n \stackrel{i}{\rightleftharpoons} \sum_m |\nu_m| \cdot J_m \quad (1.21)$$

Mit J_n sind die chemischen Stoffe bzw. Komplexe gekennzeichnet, die als Edukte in der Reaktionsgleichung auftauchen, wobei die Konstanten ν_n deren stöchiometrischen Koeffizienten⁶ sind. Die resultierenden, aus der Reaktion hervorgehenden chemischen Stoffe bzw. Komplexe J_m sind die Produkte der Reaktion. Deren stöchiometrischen Koeffizienten werden hier mit ν_m bezeichnet.

Für Übergang (Fluss Φ_i) eines Reaktionsschritts, wie er in Gl. 1.21 dargestellt ist, gilt im Allgemeinen:

$$\Phi_i = k_i^+ \cdot \prod_n c^{|\nu_n|}(J_n) - k_i^- \cdot \prod_m c^{|\nu_m|}(J_m) \quad (1.22)$$

wobei k_i^+ die Geschwindigkeitskonstante der Vorwärtsreaktion und k_i^- die Geschwindigkeitskonstante der Rückwärtsreaktion ist. Die Einheit der jeweiligen Geschwindigkeitskonstante ist 1/s, wenn die Reaktion aus dieser Richtung monomolekular ist. Ansonsten ist sie

⁶Für verschiedene thermodynamische Berechnungen sind die stöchiometrischen Koeffizienten von Edukten per Definition negativ und die von Produkten positiv. In den Gleichungen 1.21 und 1.22 sind allerdings nur die Beträge, also die positiven Werte, von Interesse.

konzentrationsabhängig und enthält im Nenner zusätzlich eine Konzentrationseinheit mit einem Exponenten, der um 1 kleiner ist als die Summe aller Beträge der stöchiometrischen Koeffizienten auf der beteiligten Seite der Reaktionsgleichung.

In Abb. 1.4 ist ein einfaches Reaktionsschema dargestellt, das den möglichen Transportweg eines Substrats S über die Membran, katalysiert durch ein Transporterprotein T, darstellt. Das Substrat liegt in den Formen S_{ext} und S_{int} vor, wobei die Indizes den Aufenthaltsort bezüglich des von der Membran umschlossenen wässrigen Kompartiments (z.B. Zellinneres) beschreiben (*ext* außerhalb und *int* innerhalb des Membrankomplexes). Alle Reaktionsschritte in dem Modell sind reversibel. D.h., die Reaktion kann in beide Richtungen ablaufen. In welche Richtung der Transport vorzugsweise stattfindet, hängt von den Konzentrationsverhältnissen und den Geschwindigkeitskonstanten ab. Im ersten Transportschritt wird das Substrat auf der Membranaußenseite an den Transporter gebunden. Aus dem Transporterzustand T_1 , der den Transporter mit Bindungsstelle für das Substrat zur Membranaußenseite darstellt, wird der Komplex T_1S . Dieser Komplex geht in die Konformation T_2S über. Dieser Vorgang entspricht der Translokation zur gegenüberliegenden Membranseite. Die Bindungsstelle für das Substrat liegt dabei auf der Innenseite der Membran und der Transporter kann das Substrat dort abgeben. Durch die Substratabgabe geht er in den Zustand T_2 über. Im letzten Schritt führt der Transporter die Relokation durch. Er liegt dann wieder mit seiner Substratbindungsstelle auf der Membranaußenseite im Zustand T_1 vor, bereit, ein weiteres Substratmolekül von der externen Membranseite entgegenzunehmen. Die beschriebene Transportrichtung kann ebenso gut in genau die andere Richtung stattfinden, wenn die Bedingungen entsprechend gegeben sind.

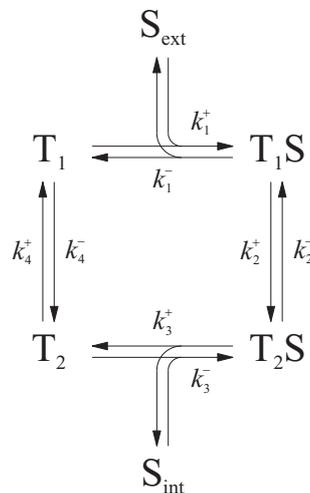


Abbildung 1.4: Kinetisches 4-Zustands-Modell eines Transporters

Nach Gl. 1.22 kann für einen Übergang von einem Transporterzustand E_k in den darauf folgenden Zustand E_{k+1} geschrieben werden ⁷:

⁷Die hier verwendete konzentrationsunabhängige Geschwindigkeitskonstante \tilde{k} setzt sich zusammen aus der Geschwindigkeitskonstanten k einer Teilreaktion und dem Produkt der Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer, die nicht in der Flussgleichung auftreten. Wird der Fluss für die Reaktionsgleichung $A + S \rightleftharpoons B$ in der Form $\Phi = k^+ \cdot c(A) - k^- \cdot c(B)$ geschrieben, so ist $\tilde{k}^+ = k^+ \cdot c(S)$ und $\tilde{k}^- = k^-$. In beiden Fällen besitzt die Geschwindigkeitskonstante \tilde{k} nur die Einheit 1/s.

$$\Phi_i = \tilde{k}_i^+ \cdot c(E_k) - \tilde{k}_i^- \cdot c(E_{k+1}) \quad (1.23)$$

Schreibt man für die Konzentrationen $c(E_k) = n_k/V$ und drückt n_k durch den Molenbruch $x_k = n_k/n_T$ (n_k : Stoffmenge der Transporter im Zustand k , n_T : Gesamtstoffmenge der Transportermoleküle) aus, dann ergibt sich mit $n_T = N_T/N_A$ eine andere Form der Flussgleichung:

$$\phi_i = \frac{N_A \cdot V}{N_T} \cdot \Phi_i = \tilde{k}_i^+ \cdot x(E_k) - \tilde{k}_i^- \cdot x(E_{k+1}) \quad (1.24)$$

Darin sind ϕ_i der Molenbruch-bezogene Fluss, N_T die Gesamtanzahl an Transportermolekülen und N_A die Avogadrokonstante. Für das beschriebene Reaktionsschema (Abb. 1.4) kann somit folgendes Gleichungssystem hinsichtlich der 4 Übergänge (ϕ_1 bis ϕ_4) aufgestellt werden, das beschreibt, wie sich eine Population an Proteinen in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Substanzen S_{ext} und S_{int} verhält.

$$\phi_1 = k_1^+ \cdot c(S_{ext}) \cdot x(T_1) - k_1^- \cdot x(T_1S) \quad (1.25)$$

$$\phi_2 = k_2^+ \cdot x(T_1S) - k_2^- \cdot x(T_2S) \quad (1.26)$$

$$\phi_3 = k_3^+ \cdot x(T_2S) - k_3^- \cdot c(S_{int}) \cdot x(T_2) \quad (1.27)$$

$$\phi_4 = k_4^+ \cdot x(T_2) - k_4^- \cdot x(T_1) \quad (1.28)$$

Für die Konzentrationen der in dem Transportermodell vorkommenden chemischen Stoffe (S_{ext} und S_{int}) und für die Molenbrüche der Transporterzustände T_1 , T_1S , T_2S und T_2 können mit Hilfe der Gleichungen für ϕ_1 bis ϕ_4 die zeitlichen Ableitungen gebildet werden, die gleich der Differenz aus deren Bildungs- und Zerfallstermen sind.

$$\frac{dc(S_{ext})}{dt} = -\frac{N_T}{N_A \cdot V} \cdot \phi_1 \quad (1.29)$$

$$\frac{dx(T_1)}{dt} = \phi_4 - \phi_1 \quad (1.30)$$

$$\frac{dx(T_1S)}{dt} = \phi_1 - \phi_2 \quad (1.31)$$

$$\frac{dx(T_2S)}{dt} = \phi_2 - \phi_3 \quad (1.32)$$

$$\frac{dx(T_2)}{dt} = \phi_3 - \phi_4 \quad (1.33)$$

$$\frac{dc(S_{int})}{dt} = \frac{N_T}{N_A \cdot V} \cdot \phi_3 \quad (1.34)$$

Summiert man die Ratengleichungen für die Transporterzustände, so ergibt sich, dass die Gesamtzerfallsrate an Transportermolekülen gleich Null ist.

$$\begin{aligned} & \frac{dx(T_1)}{dt} + \frac{dx(T_1S)}{dt} + \frac{dx(T_2S)}{dt} + \frac{dx(T_2)}{dt} \\ &= (\phi_4 - \phi_1) + (\phi_1 - \phi_2) + (\phi_2 - \phi_3) + (\phi_3 - \phi_4) = 0 \end{aligned} \quad (1.35)$$

Integration über Gleichung 1.35 liefert demnach eine Konstante, die gemäß der Definition

des Molenbruchs gleich Eins sein muss.

$$x(\text{T}_1) + x(\text{T}_1\text{S}) + x(\text{T}_2\text{S}) + x(\text{T}_2) = 1 \quad (1.36)$$

In der Reaktionsgleichung selbst wird somit bereits vorgegeben, dass die Anzahl der Transportermoleküle pro Volumen in einem Kreislauf (Zyklus) konstant ist.

1.2.4 Kapazitive Kopplung und Elektrogenizität

Ein System ist dann kapazitiv mit einem anderen System gekoppelt, wenn es einen Einfluss auf das elektrische Feld des anderen Systems ausüben kann und dort eine Ladungsänderung hervorruft [48], die in der Form einer Strom- oder Spannungsänderung detektiert werden kann. Als Beispiel für ein biologisches, kapazitiv gekoppeltes System, wie es in Abb. 1.5 anhand eines Plattenkondensators gezeigt wird, kann eine Lipiddoppelschicht (Membran) herangezogen werden. Die Doppelschicht bildet dabei als Isolator das Kapazitätsvolumen. Er trennt zwei wässrige Kompartimente, die gut leitfähige Elektrolyten enthalten und somit als Kondensatorplatten aufgefasst werden können. Beide Kompartimente werden mit nicht-polarisierbaren Elektroden nach außen abgeleitet und sind an eine Spannungsquelle angeschlossen, die ein konstantes elektrisches Feld E über die Membran hervorruft. Dieses Szenario entspricht recht gut dem in Abb. 1.5 gezeigten Ersatzschaltbild. Befindet sich in der Doppelschichtmembran ein Transportprotein, das zumindest an einer Stelle eine positive oder negative Ladung q_p aufweist, die während des Transportzyklusses bewegt wird, oder transportiert das Protein ein geladenes Substrat vom einen Kompartiment in das andere, so kann in dem System entlang der Feldlinien des elektrischen Feldes Arbeit verrichtet werden. Man spricht dann von einem elektrogenen Transportvorgang des Membranproteins. Die verrichtete Arbeit vergrößert die gespeicherte Energie ΔW im Kapazitätsvolumen. Wenn E das elektrische Feld ist und während eines Transportschritts die Ladung q_p um eine Distanz Δr_i entlang der Feldlinien verschoben wird, so gilt für die Erhöhung der Energie:

$$\Delta W = E \cdot q_p \cdot \Delta r_i = E \cdot \Delta q_i \cdot d \quad (1.37)$$

Der rechte Teil der Gleichung stellt die der Energieerhöhung äquivalente Ladungsänderung Δq_i auf den Kondensatorplatten, bezogen auf deren Abstand d , dar, die durch die Ladungsverschiebung des kapazitiv gekoppelten Proteins hervorgerufen wird.

Mit Gl. 1.37 kann für die Erhöhung der Ladung auf den Kondensatorplatten als Folge eines elektrogenen Schritts geschrieben werden:

$$\Delta q_i = q_{p,i} \cdot \frac{\Delta r_i}{d} \quad (1.38)$$

Ein elektrogener Übergang i in der Form $E_k \rightleftharpoons E_{k+1}$ bewirkt einen über ein Strommessgerät detektierbaren mittlerern Stromfluß von $\Delta q_i / (t_{k+1} - t_k)$ von der einen Kondensatorplatte zur anderen.

Erweitert man Gleichung 1.38 um die Elementarladung e und setzt $q_{p,i}/e = \gamma_i$ so ergibt sich:

$$\Delta q_i = \frac{q_{p,i}}{e} \cdot \frac{\Delta r_i}{d} \cdot e = \gamma_i \cdot \frac{\Delta r_i}{d} \cdot e, \quad (1.39)$$

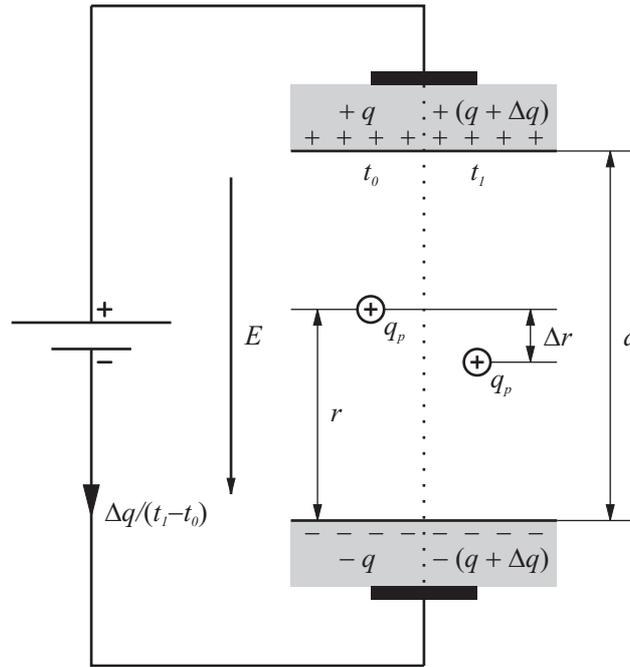


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung zur kapazitiven Kopplung. Eine Ladungsverschiebung um eine Distanz Δr in dem bestehenden elektrischen Feld sorgt für eine Umladung der Kondensatorplatten um den Betrag Δq . Der Isolator zwischen den Platten kann z.B. eine biologische Membran sein. Als Kondensatorplatten kann ein gut leitfähiger Elektrolyt auf beiden Seiten der Membran angesehen werden, wobei beide Seiten von außen über Elektroden abgegriffen und miteinander verbunden werden. Die kapazitiv gekoppelte Punktladung kann dabei eine geladene Seitenkette eines Membranproteins sein, die durch Konformationsänderungen im elektrischen Feld bewegt wird.

wobei γ_i eine dimensionslose Konstante ist. Gleichung 1.39 beschreibt den elektrogenen Übergang i von einem Zustand E_k zu einem Zustand E_{k+1} , bei der nur eine Ladung in eine Richtung bewegt wird. Finden nun mehrere elektrogene Vorgänge während eines Übergangs statt, so muss über deren Anzahl n summiert werden, woraus eine Ladungsmenge Q_i resultiert:

$$Q_i = \sum_n \Delta q_{i,n} = \sum_n \gamma_{i,n} \cdot \frac{\Delta r_{i,n}}{d} \cdot e = \alpha_i \cdot e \quad (1.40)$$

Dabei wird α_i als charakteristischer Dielektrizitätskoeffizient des Übergangs i bezeichnet. Man kann daraus, dass sie gleich der Ladung Q_i pro Elementarladung ist, erkennen, dass sie gleich der Anzahl der Elementarladungen ist, die bei einem Übergang i verschoben werden. Wenn in einem vollständigen Zyklus des Transportproteins eine Anzahl von geladenen Substratmolekülen N_{cyc} mit der Wertigkeit z von der einen Membranseite zur anderen transportiert werden, so ist die Gesamtladung Q_{cyc} eines Zyklusses:

$$Q_{cyc} = N_{cyc} \cdot z \cdot e \quad (1.41)$$

Andererseits muss sich diese Gesamtladung durch die Summe über alle Teilschritte i mit der jeweiligen Teilladung Q_i ergeben:

$$Q_{cyc} = \sum_i Q_i = \sum_i \alpha_i \cdot e \quad (1.42)$$

Mit den Gleichungen 1.41 und 1.42 ergibt sich folgender Zusammenhang [48]:

$$N_{cyc} \cdot z = \sum_i \alpha_i \quad (1.43)$$

Der Term $N_{cyc} \cdot z$ kann bei einem Transportprozess, der mit der Verschiebung von mehreren Substraten verbunden ist, als Analogon zu der Anzahl der insgesamt verschobenen Nettoladungen in eine Richtung verstanden werden. In welche Richtung sein Wert positiv ist, muss definiert werden. In dieser Arbeit soll die Bewegung einer positiven Ladung zur Membraninnenseite bzw. in die Richtung, in der sich die festkörperunterstützte Membran befindet (siehe 1.3.1), als positiv gelten.

Elektrogene Reaktionsschritte

Aus dem vorher Gesagten wird ersichtlich, dass der Strom, der im äußeren Kreis von der einen Kondensatorplatte zur anderen fließt, Null wird, wenn die Ladungsbewegung im Kapazitätsvolumen zum Erliegen kommt, da sich dann eine Gleichgewichtssituation einstellt. Wenn eine Proteinpopulation einen stationären Zustand erreicht, wird der Strom hingegen konstant. Der Strom, der im äußeren Messkreis erfasst werden kann, soll im Folgenden als Proteinstrom i_p bezeichnet werden. Er lässt sich als die Summe von den in den elektrogenen Schritten des Transportzyklusses verschobenen Ladungen $q_{tot,i}$ in der Zeit t formulieren. Die Ladung $q_{tot,i}$ bezieht sich dabei auf eine Population an Proteinen, die sich in der Membran befindet.

$$i_p = \sum_i \frac{dq_{tot,i}}{dt} \quad (1.44)$$

Nun wird der Fluss ϕ_i hinzugezogen, der den zeitlichen Verlauf des Übergangs von E_k nach E_{k+1} darstellt (siehe 1.2.3). Der Fluss ist die zeitliche Ableitung des Molenbruchs x_i und beschreibt somit die Anzahl der erfolgten Übergänge N_i bezogen auf die Gesamtanzahl von Transportermolekülen N_T .

$$\phi_i = \frac{dx_i}{dt} = \frac{1}{N_T} \cdot \frac{dN_i}{dt} \quad (1.45)$$

Durch die Anzahl der durchgeführten Übergänge der Proteinpopulation kann mit der Ladung Q_i , die für ein Einzelereignis gilt, die Ladungsmenge $q_{tot,i}$ bestimmt werden, die insgesamt pro Übergang i bewegt wird:

$$q_{tot,i} = N_i \cdot Q_i \quad (1.46)$$

Zusammen mit Gleichung 1.40 ergibt sich dann für N_i :

$$N_i = \frac{q_{tot,i}}{Q_i} = \frac{q_{tot,i}}{\alpha_i \cdot e} \quad (1.47)$$

Setzt man Gleichung 1.47 in Gleichung 1.45 ein, so erhält man folgende Beziehungen:

$$\phi_i = \frac{1}{\alpha_i \cdot e \cdot N_T} \cdot \frac{dq_{tot,i}}{dt} \quad (1.48)$$

Für den Proteinstrom folgt dann nach Gleichung 1.44 [48]:

$$i_p = e \cdot N_T \cdot \sum_i \alpha_i \cdot \phi_i = e \cdot N_T \cdot \phi_{el} \quad (1.49)$$

Die Summe in Gl. 1.49 kann auch als elektrogener Fluss ϕ_{el} abgekürzt werden (dadurch gilt $i_p \sim \phi_{el}$).

Als einfaches Beispiel soll hier angenommen werden, dass ein Transportprotein ein doppelt positiv ($z = 2$) geladenes Substrat nach der in 1.2.3 gezeigten Kinetik auf die innere Membranseite verschiebt. Die Translokation (Übergang $i = 2$) und die Relokation (Übergang $i = 4$) sollen mit einer Ladungsverschiebung verbunden, also elektrogen sein. Für den Proteinstrom folgt mit den entsprechenden Flüssen ϕ_i :

$$i_p = e \cdot N_T \cdot (\alpha_2 \cdot \phi_2 + \alpha_4 \cdot \phi_4) \quad (1.50)$$

Wenn bei der Relokation 3 positive Ladungen zur Membraninnenseite bewegt werden ($\alpha_2 = 3$) und bei der Relokation 1 positive Ladung zur Membranaußenseite ($\alpha_4 = -1$), ist Gleichung 1.43 erfüllt. Der Wert von α_4 ist negativ, obwohl eine positive Ladung verschoben wird, weil die Ladung in die entgegengesetzte Richtung zu der Translokation verschoben wird und folglich in dem gekoppelten Messkreis einen Strom in die entgegengesetzte Richtung erzeugt (Das geht auch aus Gleichung 1.43 hervor).

$$N_{cyc} \cdot z = 1 \cdot 2 = \sum_i \alpha_i = \alpha_2 + \alpha_4 = 3 - 1 = 2 \quad (1.51)$$

Für den Proteinstrom kann dann geschrieben werden:

$$i_p = e \cdot N_T \cdot (3 \cdot \phi_2 - \phi_4) \quad (1.52)$$

1.3 Stand der Technik

Der Stand der Technik bezeichnet in dieser Arbeit den vorhandenen Kenntnisstand und die daraus abgeleiteten experimentellen Konzepte, sowie den schematischen Aufbau von Messsystemen, die auf festkörperunterstützten Membranen basieren. Des weiteren soll ein Einblick in die Methoden der pharmakologischen Wirkstoffsuche gegeben und der derzeitige Stand bezüglich hoher quantitativer Durchsatzraten erläutert werden.

1.3.1 Sensoraufbau

Der Begriff Sensor soll im folgenden eine gesamte präparierte Einheit, bestehend aus Goldelektrode und der aufgetragenen mechanischen, biologischen bzw. biochemischen Komponenten, betreffen. Auch wenn die Präparation noch nicht abgeschlossen ist, sondern nur als Zwischenprodukt vorliegt, soll die gesamte Einheit, die später für eine Messung verwendet werden kann, Sensor genannt werden.

In Abb. 1.6 ist schematisch der Schichtaufbau einer festkörperunterstützten Membran (SSM: *Solid supported membrane*) gezeigt. Der Sensor besteht in diesem Präparationsstadium aus einer Goldelektrode mit einer aufgetragenen Alkanthiolschicht und einer abschließenden Monolage aus Lipidmolekülen. Die Goldelektrode wird auf gereinigtes Glas aufgedampft und danach in einer Octadecanthyollösung (auch Octadecylmercaptan

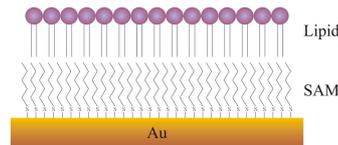


Abbildung 1.6: Darstellung des Schichtaufbaus einer festkörperunterstützten Membran. Auf einer Goldelektrode wird zuerst eine selbstorganisierende Thiolmonolage etabliert (SAM), die einen langkettigen Kohlenwasserstoff trägt. Auf dieser hydrophoben Oberfläche organisieren sich Lipidmoleküle entsprechend einer halben Doppellipidmembran.

genannt) inkubiert, wodurch sich selbstorganisierend eine Monolage des Thiols an der Goldoberfläche aufbaut (SAM: *Self assembling monolayer*) [100]. Dabei gehen die Schwefelatome kovalente Bindungen zu den Goldatomen ein, und die hydrophobe Kohlenwasserstoffkette stellt sich unter einem 30° -Winkel zur Flächennormalen auf (in Abb. 1.6 nicht dargestellt). Von oben betrachtet bildet sich ein hexagonales, dicht gepacktes Muster. Ziel dieser sogenannten Mercaptanisierung ist eine Hydrophobisierung der Goldoberfläche, auf die nach Vollendung des SAM eine weitere Monolage aus Lipidmolekülen etabliert wird. Der Sensor wird nun mit einem wässrigen Medium (Puffer) benetzt gehalten, und die Lipidmoleküle ordnen sich entsprechend ihrer polaren Eigenschaften so auf der Thiolschicht an, dass die hydrophoben Fettsäurereste nach unten weisen (weiteres zur Vorgehensweise findet sich in Kapitel 2.5). Von oben, aus der wässrigen Phase heraus, sieht die Oberfläche nun wie eine Lipidmembran aus. Der Vorteil dieser hybriden Lipidmembran gegenüber einer freistehenden Lipidmembran ist, dass sie sehr stabil ist, nach Belieben manipuliert werden kann und dass durch die Nähe zur Goldoberfläche ein kapazitiv gekoppeltes System entsteht, wenn man elektrogene Transportproteine in spezieller Weise an der Oberfläche immobilisiert.

Die hier vorgestellte festkörperunterstützte Hybridmembran neigt dazu, mit anderen Membranstrukturen bislang nicht genau aufgeklärte Wechselwirkungen einzugehen, die in einer Immobilisierung der hinzugefügten Membranstruktur auf der Oberfläche resultieren [76, 65, 29, 57, 104, 105]. Aus diesem Grund können Transportproteine, die an der SSM untersucht werden sollen, in synthetische Vesikel (Liposomen) eingebaut werden (Rekonstitution), die dann an der Oberfläche adsorbieren. Die Liposomen bilden jeweils ein wässriges, von Lipidmembranen umschlossenes Kompartiment, das vor der Elektrodenoberfläche befestigt ist (siehe Abb. 1.7 a). Die Transporter liegen in der Membran des Liposoms vor und können durch die Zugabe von entsprechenden Substraten aktiviert werden. Die dabei auftretenden elektrogenen Reaktionsschritte induzieren Ladungsverschiebungen in dem durch die Membranen gebildeten Netzwerk. Die Ladungsverschiebungen können mit einem äußeren Messsystem als Strom detektiert werden (siehe 1.3.3). Neben Liposomen können auch andere Membransysteme auf festkörperunterstützten Membranen adsorbiert werden. Bisher sind Fragmente von nativen Cytoplasmamembranen aus verschiedenen Organismen erfolgreich angewendet worden, die bereits auf freistehenden Lipidmembranen angelagert werden konnten [20, 84, 58]. Die nativen Fragmente werden aus einer sogenannten Membranpräparation gewonnen und können geschlossene Vesikel und eher flächige Membranteppiche (*membrane sheets*) enthalten [12, 51]. Die endogenen oder von dem Organismus überexprimierten Proteine liegen innerhalb dieser Membranstrukturen vor, die sich entsprechend dem zuvor vorgestellten Modell an der festkörperunterstützten Membran anlagern. Bei den flächigen Membranstrukturen sorgen wahrscheinlich mehrere und/oder flächige Aufsetzungsgebiete (siehe Abb. 1.7 b) für eine Bildung von getrennten

wässrigen Kompartimenten, in die ein proteinvermittelter Transport möglich ist.

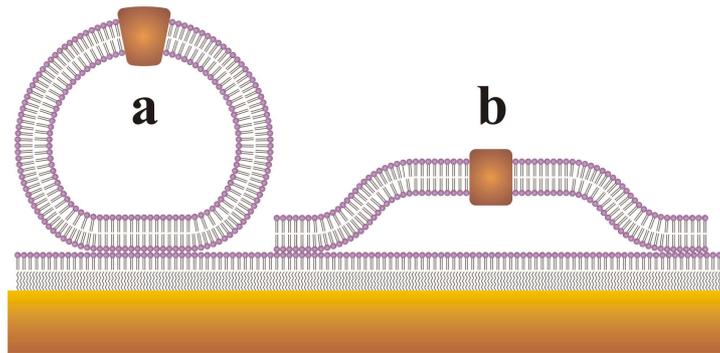


Abbildung 1.7: Formen der Anlagerung von vesikulären Strukturen bzw. Liposomen (a) und Membranfragmenten, die keine geschlossene Fläche bilden (b)

1.3.2 Aktivierungsprotokolle

Die Aktivierung der Proteine, die in den Membranen auf der Elektrodenoberfläche sitzen, erfolgt durch schnelle Lösungswechsel (RSE: *Rapid solution exchange*). Dabei wird der oben beschriebene Sensor in ein Durchflusssystem integriert (siehe Kapitel 2.6), das aus mehreren Komponenten besteht. Sie sind schematisiert in den Abb. 1.8 und 1.10 dargestellt. Es stehen bis zu 3 verschließbare Behälter zur Verfügung, in denen sich die verwendeten Messlösungen befinden und die mit einem Druck p beaufschlagt werden können (Druckluft oder Stickstoff). In den Abbildungen sind die Lösungen mit A, NA, und R bezeichnet, wobei A für aktivierende Lösung, NA für nicht-aktivierende Lösung und R für Ruhelösung steht. Über eine Verschaltung von mehreren elektromagnetisch ansteuerbaren Ventilen V_n kann jeder der vorhandenen Behälter über ein Schlauchsystem mit dem Sensor S verbunden werden. Die aktivierende Lösung A enthält dabei normalerweise ein Substrat für das zu vermessende Protein, so dass ein elektrogener Transportvorgang induziert wird, wenn diese Lösung den Sensor erreicht. Der Lösungsfluss wird durch einen angelegten Überdruck von bis zu 1 bar angetrieben, wobei Flussraten von bis zu 2,5 mL/s erreicht werden können. Nachdem die Messlösung den Sensor passiert hat, wird sie in ein Abfallgefäß geleitet. Anhand der Steuerleitungen v_1 und v_2 , mit denen die Ventile V_n geschaltet werden, können verschiedene Messsequenzen realisiert werden. Dabei erweisen sich zwei verschiedene Protokolle als sinnvoll, die im Folgenden als einfacher und doppelter Lösungswechsel bezeichnet werden.

Einfacher Lösungswechsel

Beim einfachen Lösungswechsel (siehe Abb. 1.8) werden zwei Lösungen verwendet. Im Ruhezustand liegt der Sensor in einer nicht-aktivierenden Lösung NA vor, die auch zuerst über den Sensor fließt, wenn ein Experiment gestartet wird. Das obere Ventil V_1 wird in dieser Situation mit Steuerleitung v_1 auf Durchfluss geschaltet. Danach schaltet Steuerleitung v_2 das Ventil V_3 dazu, das als Wechsler ausgelegt ist und nun die aktivierende Lösung mit dem Sensor verbindet (Das Ventil V_2 wurde bereits im vorhergehenden Schritt zusammen mit V_1 auf Durchfluss geschaltet.). Mit einer zeitlichen Verzögerung, die durch die Flussgeschwindigkeit und den Abstand von V_3 zum Sensor gegeben ist, erreicht die aktivierende Lösung den Sensor und induziert dort ein Transportereignis. Da bereits nach

dem ersten Lösungswechsel (von NA nach A) eine Aktivierung der Proteine erfolgt, wird diese Sequenz als einfacher Lösungswechsel bezeichnet. Im Anschluss daran schaltet das System die Steuerleitung v_2 aus, wodurch die nicht-aktivierende Lösung wieder mit dem Sensor verbunden ist und die restlichen aktivierenden Substanzen weg wäscht. Wird nun auch v_1 ausgeschaltet, so befindet sich das System wieder in Ruhe, d.h. in der gleichen Ausgangssituation wie zuvor und kann für das nächste Experiment verwendet werden. Die Einschaltzeiten der Ventile können variiert werden. Als sinnvoll hat sich eine Einschaltdauer von 1 s pro Schritt bei einer Flussrate von 1 mL/s erwiesen.

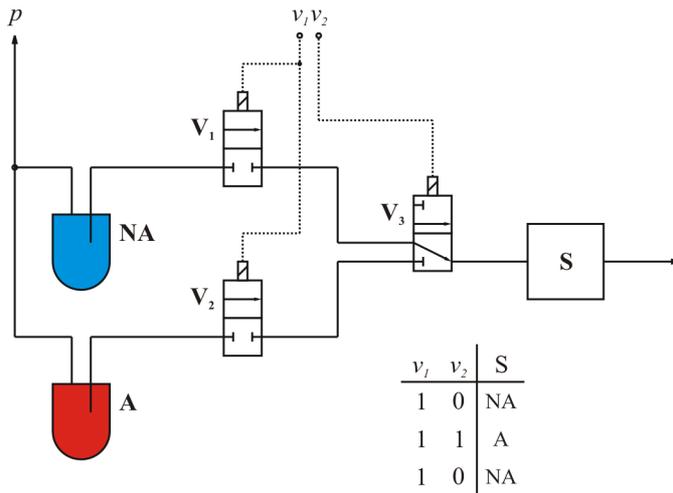


Abbildung 1.8: Konfiguration des fluidischen Systems zur Realisierung von einfachen Lösungswechseln. Zwei Behälter bevorraten die aktivierende Lösung A und die nicht-aktivierende Lösung NA. Über elektromagnetisch ansteuerbare Ventile kann eine der beiden Lösungen mit dem Sensor S verbunden werden. Der Lösungsfluss wird durch eine Druckbeaufschlagung (Druck p) der Lösungsbehälter getrieben. Die Sequenz folgt der angegebenen Tabelle.

Für den späteren Gebrauch wurde eine Schreibweise definiert, aus der hervorgehen soll, dass es sich bei einem Experiment um einen einfachen Lösungswechsel handelte und welche Substanzen daran maßgeblich beteiligt waren. Die Bezeichnung erfolgt in der folgenden Art:

$$\Delta[A] \text{ (NA)} \quad (1.53)$$

Dabei bedeutet $\Delta[A]$, dass zur Aktivierung ein Konzentrationssprung mit der aktivierenden Substanz A stattgefunden hat. Die Angabe von NA in Klammern bezieht sich auf ein zusätzliches Substrat (Cosubstrat, Inhibitor etc.), das konstant im Hintergrund, also in der aktivierenden und in der nicht-aktivierenden Lösung vorlag. Für ein Experiment, bei dem ein Puffer mit Natriumchlorid verwendet wurde und bei dem in der aktivierenden Lösung die Aminosäure L-Glutamat vorhanden war, würde die Schreibweise $\Delta[\text{L-Glu}] \text{ (NaCl)}$ lauten. Hinsichtlich des abgegrenzten Kompartiments unter einem adsorbierten Membranfragment ergibt sich durch die Anwendung eines einfachen Lösungswechsels eine Situation wie sie in Abb. 1.9 dargestellt ist.

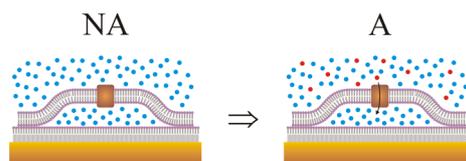


Abbildung 1.9: Sensor und einfacher Lösungswechsel. Von einer nicht-aktivierenden Lösung NA wird zu einer substrathaltigen Lösung A gewechselt.

Doppelter Lösungswechsel

Beim doppelten Lösungswechsel (siehe Abb. 1.10) kommen insgesamt 3 Messlösungen zum Einsatz. Die Anzahl der Ventile bleibt erhalten; allerdings wird V_2 gegenüber der Situation beim einfachen Lösungswechsel gegen einen Wechsler ausgetauscht, an den die zusätzliche Ruhelösung R angeschlossen wird. Der Sensor liegt im Ruhezustand in Ruhelösung vor. Ein Experiment beginnt damit, dass die Steuerleitung v_2 das Ventil V_3 betätigt. Da V_2 ungeschaltet eine Verbindung mit dem Behälter, der die Ruhelösung enthält, herstellt, fließt zuerst diese Lösung über den Sensor. Danach wird zusätzlich v_1 geschaltet, und das Ventil V_2 wechselt zur nicht-aktivierenden Lösung, die dadurch die Ruhelösung über dem Sensor verdrängt. Gleichzeitig wird V_1 auf Durchgang geschaltet, um die im nächsten Schritt erfolgende Aktivierung zu ermöglichen. Der Austausch der nicht-aktivierenden Lösung über dem Sensor mit der aktivierenden Lösung erfolgt nach dem zweiten Lösungswechsel, weshalb diese Sequenz den Namen doppelter Lösungswechsel trägt. Der Austausch wird dadurch ausgelöst, dass V_3 in die Ruheposition fällt (Ausschalten von v_2), während die Steuerleitung v_1 geschaltet bleibt. Im Anschluss an die Aktivierung wird sukzessiv wieder zurück zur nicht-aktivierenden und zur Ruhelösung geschaltet, so dass nach Beendigung des Experiments die Ausgangssituation wiederhergestellt ist. Die Einschaltzeiten der Ventile für die einzelnen Schritte liegen bei einer Flussrate von 1 mL/s bei 1 s für die Aktivierung und bei bis zu 1,5 s für den Austausch von Ruhelösung durch die nicht-aktivierende Lösung, weil die Lösung hier eine größere Strecke zurücklegen muss und nach 1 s eventuell noch kein vollständiger Austausch über dem Sensor stattgefunden hat. Das gilt genauso für den Rücktausch von nicht-aktivierender Lösung zur Ruhelösung nach der Aktivierung.

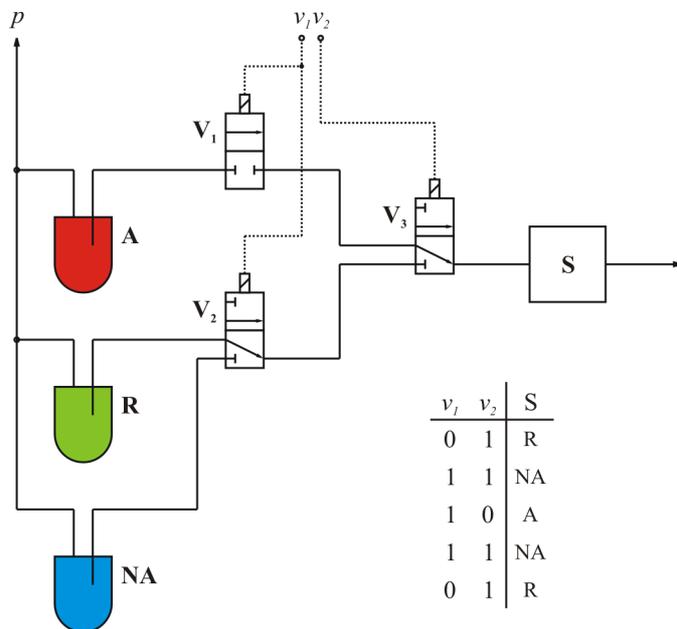


Abbildung 1.10: Konfiguration des fluidischen Systems zur Realisierung von doppelten Lösungswechseln. Drei Behälter bevorraten die aktivierende Lösung A, eine Ruhelösung R und die nicht-aktivierende Lösung NA. Über elektromagnetisch ansteuerbare Ventile kann eine der 3 Lösungen mit dem Sensor S verbunden werden. Der Lösungsfluss wird durch eine Druckbeaufschlagung (Druck p) der Lösungsbehälter getrieben. Die Sequenz folgt der angegebenen Tabelle.

Analog zu der Vorgehensweise bei dem einfachen Lösungswechsel wurde eine Schreibweise definiert, aus der hervorgehen soll, dass es sich bei einem Experiment um einen doppelten Lösungswechsel handelte und welche Substanzen daran beteiligt waren. Die Bezeichnung erfolgt hier in der Art:

$$\Delta[A] (R \rightarrow NA) \quad (1.54)$$

Dabei bedeutet $\Delta[A]$, dass zur Aktivierung ein Konzentrationsprung mit der aktivierenden Substanz A stattgefunden hat. Die Angaben in Klammern bezieht sich auf die Substanzen, die in der Ruhelösung R und in der nicht-aktivierenden Lösung NA vorhanden waren. Der Pfeil symbolisiert den vor der Aktivierung stattfindenden Lösungswechsel, in dem die nicht-aktivierende Lösung die Ruhelösung verdrängt. Die Substanz, die in der nicht-aktivierenden Lösung vorliegt, bleibt auch in der Aktivierungsphase erhalten. Für ein Experiment, bei dem ein Ruhepuffer mit Kaliumchlorid und eine nicht-aktivierende Lösung mit Natriumchlorid verwendet wurde und bei dem in der aktivierenden Lösung die Aminosäure L-Glutamat vorhanden war, würde die Schreibweise $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{KCl} \rightarrow \text{NaCl})$ lauten. Hinsichtlich des abgegrenzten Kompartiments unter einem adsorbierten Membranfragment ergibt sich durch die Anwendung eines doppelten Lösungswechsels eine Situation wie sie in Abb. 1.11 dargestellt ist.

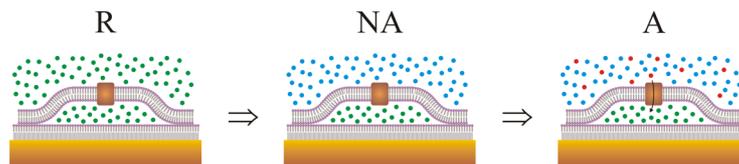


Abbildung 1.11: Sensor und doppelter Lösungswechsel. Im ersten Schritt wird von einer Ruhelösung R zu einer nicht-aktivierenden Lösung NA gewechselt. Im Inneren des von dem Membranfragment umschlossenen Kompartiments liegt weiterhin die Ruhelösung vor. In einem zweiten Schritt erfolgt ein Wechsel zu einer substrathaltigen aktivierenden Lösung A.

Aktivierungsprinzip und Elektrodenverhalten

Das Messsystem ist so aufgebaut, dass sich der Sensor in einer Messkammer befindet, die als Injektionskammer ausgelegt ist. In ihr wird er durch eine Kapillare konzentrisch mit der fließenden Lösung angeströmt (Näheres zu den technischen Details siehe 2.6). Für den Wechsel der Lösung sind die peripher angebrachten Ventile zuständig (siehe voriger Abschnitt). Der Aktivierungsvorgang der beginnt, wenn die aktivierende Lösung die Sensoroberfläche erreicht, ist schematisch in Abb. 1.12 dargestellt.

Die in der aktivierenden Lösung vorhandenen Substrate sind in Abb. 1.12 als positive (linke Seite) oder negative (rechte Seite) Ladungsträger bzw. Ionen dargestellt, die in Richtung Sensoroberfläche strömen. Die Sensoroberfläche besteht aus einer festkörperunterstützten Membran auf der ein Membranfragment angelagert ist. In dessen Membran liegt ein Protein vor, das die jeweiligen Substrate in einen von dem Membranfragment abgegrenzten Zwischenraum transportiert. Der Sensor ist nach außen mit einem Strommessgerät verbunden. Um die Außenseite der Membran des Fragmentes elektrisch ableiten zu können, ist eine Referenzelektrode vorhanden, die den Stromkreis über die Flüssigkeit zwischen Membranaußenseite und der Referenzelektrode selbst zum Strommessgerät schließt. Durch den Transport von Ladungen in Richtung der Goldoberfläche wird das Kompartiment zwischen festkörperunterstützter Membran und dem Membranfragment mit Ladungsträgern einer Sorte angereichert. Dadurch erfolgt eine Ladungstrennung, die mit der Ausbildung bzw. einer Änderung des elektrischen Feldes über der Membran des Fragmentes einhergeht. Da das elektrische Feld ebenfalls über den äußeren Messkreis anliegt, kommt es an den Grenzschichten (Flüssig/Fest-Schnittstellen) zur Ausbildung einer Oberflächenladungsdichte, die das resultierende elektrische Feld innerhalb der leitfähigen Festkörper im Messkreis eliminiert [88]. Auf die Ladungstrennung reagieren also die freien

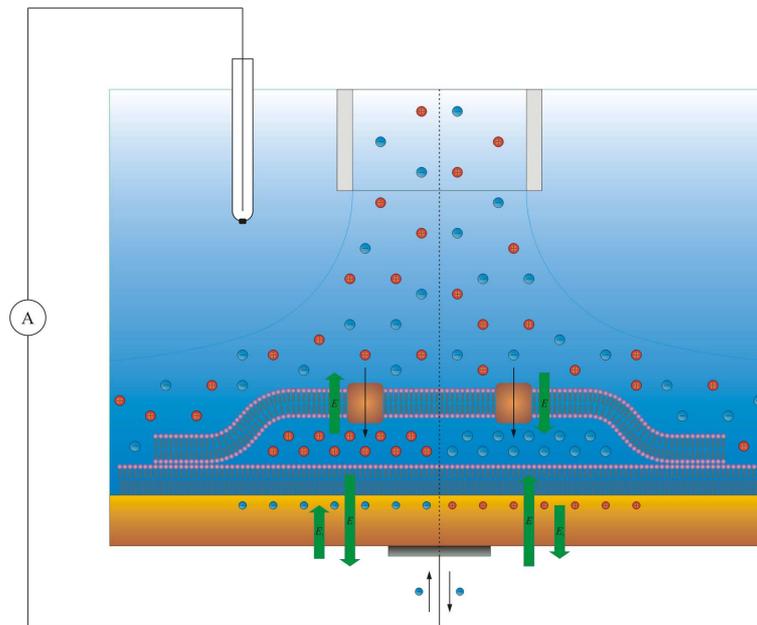


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der Proteinaktivierung und der resultierenden Ladungstrennung. Als Substrate sind positive (links) und negative (rechts) Ladungsträger dargestellt, die von einem Transportprotein in das Kompartiment transportiert werden (Ladungstrennung). Die Elektrode reagiert auf diese Anreicherung von Ladungsträgern mit der Ausbildung einer Oberflächenladung, die das entgegengesetzte Vorzeichen trägt und das äußere elektrische Feld im Festkörper eliminiert. Dadurch fließen im äußeren Stromkreis entweder Elektronen zur Elektrode hin (links) oder von der Elektrode weg (rechts).

Elektronen, die sich in der Goldelektrode befinden. Wenn der Zwischenraum vor der Elektrodenoberfläche positiv aufgeladen wird, bildet sich eine negative Oberflächenladung aus (Abb. 1.12 links). In dem rechts dargestellten Fall, wenn sich der Zwischenraum negativ auflädt, erfolgt die Ausbildung einer positiven Oberflächenladung (Abb. 1.12 rechts). In beiden Fällen resultiert im äußeren Messkreis aus der Ladungstrennung durch den Transportvorgang des Proteins ein Strom, weil durch die Bildung der Oberflächenladung an der Goldelektrode eine Ladungsbewegung erfolgen muss.

Die Verfügbarkeit des Substrats für das Transportprotein erfolgt nicht schlagartig, sondern ist an die strömungsmechanischen Gegebenheiten und die daraus resultierende Zuleitungsdispersion gebunden. Der Fluss in der Zuleitung zur Injektionskammer ist laminar und hat daher die Form eines Rotationsparaboloiden, der sich in Richtung Sensor ausbreitet. Die Konzentrationsänderung an der Sensoroberfläche weist dadurch ein hyperbolisches Profil auf, mit dem die Konzentration von der Anfangskonzentration auf ihren Endwert ansteigt. Auf die strömungsmechanische Situation an der Sensoroberfläche wird näher in Kapitel 3.1.1 eingegangen.

Artefakte

Bei Experimenten, bei denen schnelle Lösungswechseln angewendet werden, muss man darauf achten, dass die verwendeten Lösungen bei den relevanten Lösungswechseln keine Artefakte hervorrufen. Als Artefakt ist dabei eine transiente Signalförmung im Messstrom zu verstehen, die durch eine Polarisierung der Sensoroberfläche hervorgerufen werden kann. Wenn sich z.B. die nicht-aktivierende und die aktivierende Lösung in ihrer Ionenstärke

unterscheiden, dann kommt es beim Wechsel zwischen den Lösungen zu einem Stromfluss [64]. Die Größe dieses Stromes ist abhängig von der Dichte der Membran auf der Sensoroberfläche. Bei einer reinen mercaptanisierten Goldoberfläche ist der Artefakt-Strom größer als bei einer ausgebildeten festkörperunterstützten Membran. Dennoch müssen die verwendeten Puffer darauf getestet werden, ob sie Artefakte erzeugen, da die entstehenden Artefakte unter Umständen mit dem proteininduzierten Messstrom verwechselt werden, oder diesen kompensieren könnten. Ein solcher Test kann z.B. mit proteinfreien Membranen durchgeführt werden. Wenn dabei Artefakte auftreten, muss in den Lösungen ein Ausgleich der Ionenstärke stattfinden. Das kann z.B. dadurch erreicht werden, dass, wenn in der aktivierenden Lösung ein Substrat (z.B. NaCl) vorhanden ist, der nicht-aktivierenden Lösung eine äquivalente Menge eines inerten Stoffes (z.B. ChCl) hinzugefügt wird.

1.3.3 Ersatzschaltbild

Biologische Membranen weisen zum Teil kapazitive und zum Teil ohmsche Eigenschaften auf [66, 83, 82]. Vom elektrischen Standpunkt aus ist eine Membran vergleichbar mit der Parallelschaltung aus einer Kapazität C und einem Widerstand R . Diese Tatsache leitet sich vorwiegend aus einer eingeschränkten Isolations- bzw. Barrierewirkung der Lipiddoppelschicht gegenüber Ionen und anderen Molekülen ab. Genau genommen muss sich ein Ersatzschaltbild, wie es hier angegeben wird, physikalisch nicht genau mit den geometrischen oder mechanischen Verhältnissen des Objektes, das erklärt werden soll, decken. Es reicht im allgemeinen aus, wenn ein Ersatzschaltbild ein beobachtetes Verhalten hinreichend genau beschreibt. Im Falle einer biologischen Membran sind die physikalischen Verhältnisse jedoch so gegeben, dass die Membranstruktur, ihre Materialeigenschaften und deren Geometrie für die Erklärung des Ersatzschaltbildes herangezogen werden können. Die Kapazität einer Membran ist gegeben durch ihre Eigenschaft als Isolator, wobei sich an den Grenzschichten zwischen der Membran und der wässrigen (leitfähigen) Phase auf beiden Seiten Ladungsträger (Ionen) frei bewegen können. Da eine Membran eine nahezu konstante Dicke aufweist und die beiden Grenzschichten, von Krümmungen und Unebenheiten abgesehen, als planparallel zueinander angesehen werden können, ist das Ersatzschaltbild für diese Membran ein Plattenkondensator. Des weiteren ist eine Membran nicht unendlich impermeabel für alle Ionen und Moleküle, sondern mit sehr geringen Raten können selbst Kalium- und Natriumionen durch eine reine Lipidmembran permeieren. Enthält die Membran eine natürliche Proteinflora, dann findet ein proteinvermittelter permanenter Fluss von Ionen durch die Membran statt, der für die Erhaltung des Ruhepotentials sorgt. Weil bewegte Ladungen einen Strom darstellen und dieser Strom durch die Membran fließt, muss die Membran einen endlichen Widerstand aufweisen, der die Größe des Stromes bei gegebener Spannung reguliert. Aus diesem Grund muss im Ersatzschaltbild zu dem Plattenkondensator, den die Membran bildet, ein Widerstand parallel geschaltet werden. Dieses einfache Ersatzschaltbild gibt das elektrische Verhalten einer biologischen Membran sehr gut wieder.

Betrachtet man nun einen Sensor, wie er im vorigen Abschnitt beschrieben wurde, so befinden sich auf der Oberfläche Membranstrukturen, wie in Abb. 1.7 gezeigt. Die festkörperunterstützte Membran als Untergrund unterscheidet sich in der Struktur nur unwesentlich von einer freistehenden Lipidmembran. Sie weist allerdings mit der Goldelektrode als Festkörperunterstützung eine echte ideale Kondensatorplatte auf, in der freie Elektronen vorhanden sind, die direkt auf eine Ladungsverschiebung vor der Elektrode reagieren

können. Das Ersatzschaltbild dieser Hybridmembran ist also ebenfalls ein Kondensator parallel zu einem Widerstand. Sieht man die leitfähige Elektrolytlösung in dem Kompartiment als idealen Leiter an, so kann das Ersatzschaltbild des gesamten Membransystems, das die Sensoroberfläche bildet, mit Hilfe des Ersatzschaltbildes einer einzelnen Membran aufgebaut werden. Wendet man dieses Verfahren auf die in Abb.1.7 gezeigten Membransysteme an, so ergeben sich Ersatzschaltbilder, wie sie in Abb. 1.13 dargestellt sind.

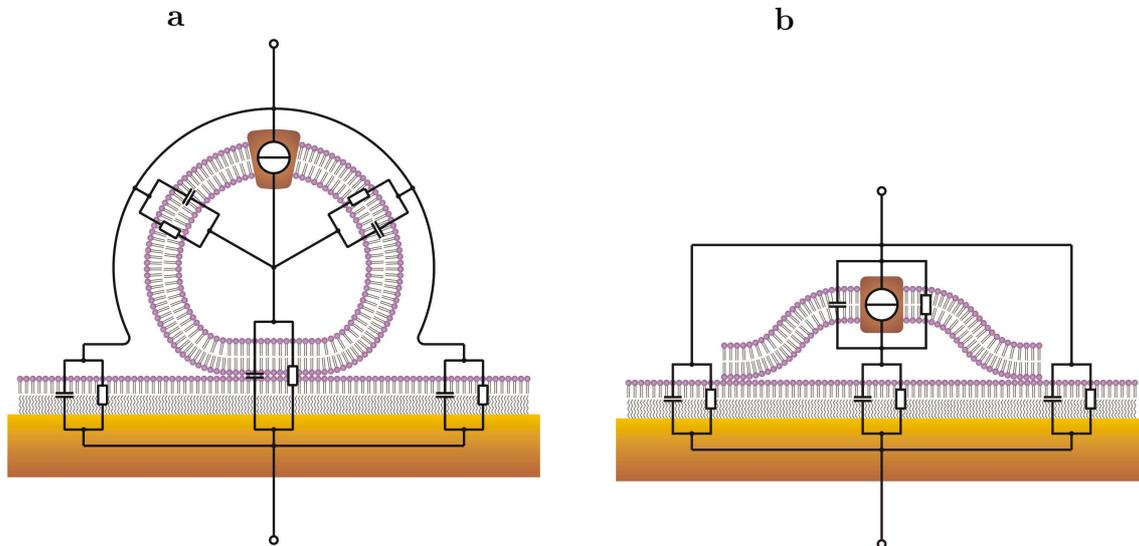


Abbildung 1.13: Anordnung der elektrischen Ersatzelemente bei adsorbierten Vesikeln bzw. Liposomen (a) oder flächigen Membranfragmenten (b). Jede Membran in dem System kann durch eine Parallelschaltung aus einem Kondensator und einem Widerstand beschrieben werden. Das Gesamtersatzschaltbild sieht für beide Varianten gleich aus.

In beiden Fällen (Abb. 1.13 a und b) ergibt sich ein Ersatzschaltbild, bei dem der Bereich, in dem eine Membranstruktur (Vesikel oder flächiges Membranfragment) immobilisiert ist, durch eine Reihenschaltung von zwei RC -Gliedern gegeben ist (Die RC -Glieder, die in Abb. 1.13 a über die Vesikelmembran nach außen gehen, können durch ein einzelnes Glied repräsentiert werden). Die Glieder werden über das wässrige Kompartiment miteinander verbunden. Seitlich von der immobilisierten Membranstruktur liegen einzelne RC -Glieder vor, die zu der gerade beschriebenen Reihenschaltung parallel anzuordnen sind und die einen Bereich repräsentieren, der frei von Membranstrukturen ist. In beiden Ersatzschaltbildern ist an der Stelle, an der das Protein in der Membran sitzt, das elektrische Schaltzeichen einer Stromquelle eingezeichnet. Dieses Element ist als Ort der Entstehung des Proteinstromes zu verstehen, weil das Protein durch elektrogene Reaktionsschritte im Transportzyklus einen Aufladestrom der Membran bzw. der Kapazität hervorruft, die durch die Membran gebildet wird. Um das Ersatzschaltbild zu komplettieren müssen die Elemente hinzugezogen werden, die den Sensor an den beiden Enden oben und unten abgreifen und den Stromkreis schließen. In Abb. 1.14 ist das vollständige Messsystem dargestellt. Der Sensor wird elektrisch von der Festkörperseite her abgegriffen. Der Abgriff der äußeren Sensoroberfläche erfolgt über eine Referenzelektrode. Beide Abgriffe werden über ein Strommessgerät miteinander verbunden. Da Strommessungen im Idealfall widerstandslos durchgeführt werden, ist das Strommessgerät als direkte Verbindung anzusehen. In dem Ersatzschaltbild auf der rechten Seite taucht ein zusätzlicher Widerstand R_z auf, der die durch den Messabgriff hinzukommenden Impedanzen (Lösung, Referenzelektrode,

Leitungen) beinhaltet. Die Abgiffe an dem Ersatzschaltbild sind die Stellen, an denen das Strommessgerät angeschlossen wird. Sie sind also als miteinander verbunden anzusehen. Die zusätzlichen RC -Glieder, die durch freie Membranbereiche ohne Adsorbat gekennzeichnet sind wurden in das Ersatzschaltbild nicht übernommen (weitere Erläuterungen in Kapitel 3.3).

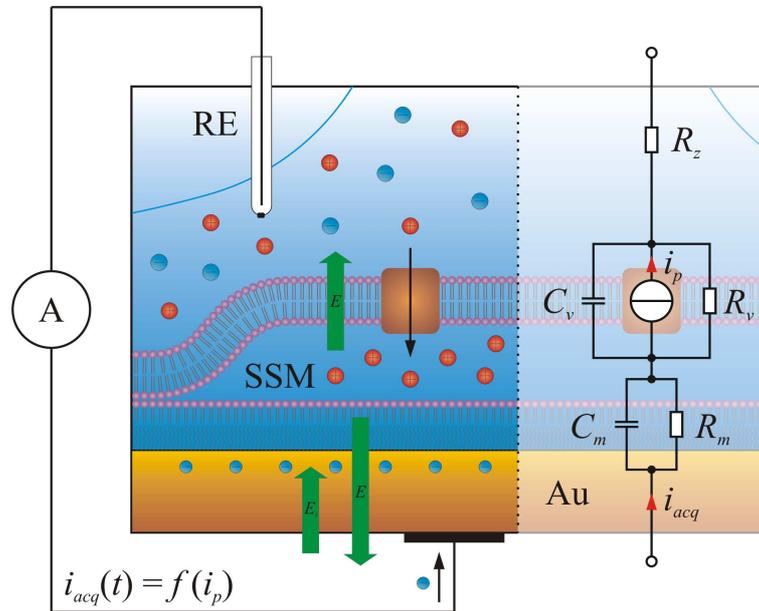


Abbildung 1.14: Funktionsprinzip der Proteinaktivierung mit dem Ersatzschaltbild, das die gesamte Messkette beschreibt. Es besteht aus den Parallelschaltungen der RC -Glieder, die durch die festkörperunterstützte Membran (R_m und C_m) und die angelagerte Membranstruktur (R_v und C_v) gegeben sind. Das Protein wird als Stromquelle in dem Ersatzschaltbild berücksichtigt. Zusätzlich ist ein Zugriffswiderstand R_z vorhanden, der die aufsummierten Übergangswiderstände enthält (Lösung, Referenzelektrode, etc.).

Aus dem Ersatzschaltbild kann die Abhängigkeit des Messstromes i_{acq} (*acq*: acquire, erfassen) von dem Proteinstrom i_p hergeleitet werden. Mit Hilfe der Stromkontenregel und der Spannungsmaschenregel (1. und 2. Kirchhoffsche Gesetze⁸) kann folgendes Gleichungssystem aufgestellt werden:

$$i_p = i_{C,v} + i_{R,v} + i_{acq} = C_v \cdot \frac{du_v}{dt} + \frac{u_v}{R_v} + i_{acq} \quad (1.55)$$

$$i_{acq} = i_{C,m} + i_{R,m} = C_m \cdot \frac{du_m}{dt} + \frac{u_m}{R_m} \quad (1.56)$$

$$u_v = u_p = u_z + u_m = R_z \cdot i_{acq} + u_m \quad (1.57)$$

Dabei tragen die Ströme i und die Spannungen u als Indizes die Namen der Elemente (siehe Abb. 1.14) bzw. Membrankomponenten (m : festkörperunterstützte Membran, v : adsorbiertes Vesikel oder Membranfragment, p : Protein), durch die sie fließen bzw. über die sie abfallen. Als Lösung des Gleichungssystems hinsichtlich des Messstromes i_{acq} in

⁸Nach den Kirchhoffschen Gesetzen ist 1. die Summe aller Ströme in einem Knoten (abfließende und zufließende Ströme) gleich Null und 2. die Summe aller abfallenden Spannungen in einem geschlossenen Umlauf (Masche) gleich Null.

Abhängigkeit von dem Proteinstrom i_p ergibt sich eine gewöhnliche inhomogene Differentialgleichung mit konstanten Koeffizienten:

$$\frac{d^2 i_{acq}}{dt^2} + \alpha_1 \cdot \frac{di_{acq}}{dt} + \alpha_0 \cdot i_{acq} = \beta_1 \cdot \frac{di_p}{dt} + \beta_0 \cdot i_p \quad (1.58)$$

Die konstanten Koeffizienten $\alpha_{1/0}$ und $\beta_{1/0}$ setzen sich aus den ohmschen und kapazitiven Anteilen im Ersatzschaltbild zusammen und besitzen als Einheit die einer reziproken Zeit bzw. deren Quadrat. Die Lösung der Differentialgleichung 1.58 liefert für den Messstrom:

$$i_{acq} = \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} \cdot \left((\beta_1 \cdot \lambda_1 + \beta_0) \cdot e^{\lambda_1 \cdot t} \cdot \int i_p \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} dt - (\beta_1 \cdot \lambda_2 + \beta_0) \cdot e^{\lambda_2 \cdot t} \cdot \int i_p \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} dt \right) \quad (1.59)$$

Die Gleichung setzt die Kenntnis des Proteinstromes i_p voraus, der von der Elektrogenizität des Transportproteins und von der Kinetik des Transportvorgangs und demnach auch von der Zeit abhängt. Zudem müssen die Größen der ohmschen und kapazitiven Anteile bekannt sein, von denen die Koeffizienten $\alpha_{1/0}$ und $\beta_{1/0}$ abhängen. Die Parameter λ_1 und λ_2 in Gleichung 1.59 sind die Lösungen des charakteristischen Polynoms der Differentialgleichung:

$$\lambda_{1/2} = -\frac{\alpha_1}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{\alpha_1}{2}\right)^2 - \alpha_0} \quad (1.60)$$

Für die Koeffizienten $\alpha_{1/0}$ und $\beta_{1/0}$ gilt:

$$\alpha_1 = \frac{1}{R_v \cdot C_v} + \frac{1}{R_z \cdot C_v} + \frac{1}{R_z \cdot C_m} + \frac{1}{R_m \cdot C_m} \quad (1.61)$$

$$\alpha_0 = \left(\frac{1}{R_v \cdot R_z} + \frac{1}{R_v \cdot R_m} + \frac{1}{R_z \cdot R_m} \right) \cdot \frac{1}{C_v \cdot C_m} \quad (1.62)$$

$$\beta_1 = \frac{1}{R_z \cdot C_v} \quad (1.63)$$

$$\beta_0 = \frac{1}{R_z \cdot R_m \cdot C_v \cdot C_m} \quad (1.64)$$

Da der zeitliche Verlauf des Proteinstroms unter Umständen relativ kompliziert ist, können die hier vorgestellte Gleichungen nur in seltenen Fällen analytisch gelöst werden. In Kapitel 3.3 werden daher die beteiligten Größen des Ersatzschaltbildes diskutiert, das Gleichungssystem vereinfacht und unter Zuhilfenahme von numerischen Methoden gelöst.

1.3.4 Elektrische Charakterisierung

Um die Größen der ohmschen und der kapazitiven Anteile des Systems zu erfassen, werden sogenannte Kapazitäts- und Leitfähigkeitsmessungen durchgeführt. Dabei wird der Stromkreis an einer Stelle geöffnet, und es wird eine externe Spannungsquelle u_{ref} angeschlossen. Durch diese von außen auferlegte Spannung wird in dem System ein Stromfluss induziert, der an der gleichen Stelle aufgezeichnet wird, wie zuvor der Messstrom i_{acq} bei einem Lösungswechsel-Experiment (hier mit i_{ref} bezeichnet). Allgemein kann über

die Strom-Spannungs-Kennlinien eines Systems auf dessen Ersatzschaltbild bzw. auf die Größen und die Anordnung der enthaltenen Komponenten geschlossen werden. Oftmals kommt dabei die Impedanzspektroskopie zum Einsatz, bei der das Amplitudenverhältnis und die Phasenverschiebung von einer auferlegter Sinusspannung zu dem resultierenden, ebenfalls sinusförmigen Strom bestimmt und in Abhängigkeit von der Frequenz dargestellt werden. Dabei ist das frequenzabhängige Amplitudenverhältnis der Betrag und die Phasenverschiebung der Arcustangens des Quotienten aus Imaginär- und Realanteil der komplexen Impedanz. Sinusspannungen eignen sich besonders gut, um ein System anhand seiner Frequenzabhängigkeit zu charakterisieren. Da die Impedanzspektroskopie allerdings eine aufwendige Messanordnung erfordert und ein relativ langwieriges⁹ Verfahren darstellt, können andere Spannungsformen verwendet werden, die eine schnelle Qualitätskontrolle der Schichtstruktur des Sensors zulassen. Wählt man eine Spannung in der Form eines Dreiecks, bei der im zeitlichen Verlauf eine konstante Steigung auftritt, die im Umkehrpunkt lediglich das Vorzeichen ändert, so eignet sich diese, um die kapazitiven Eigenschaften des Systems zu charakterisieren. Wenn man einen einfachen Spannungssprung auf einen konstanten Wert anwendet, so kann mit der daraus resultierenden Stromantwort eine Aussage über die Leitfähigkeit bzw. die ohmschen Anteile des Systems getroffen werden. In dem Fall der festkörperunterstützten Membran kann das im vorigen Abschnitt erläuterte Ersatzschaltbild für die elektrische Charakterisierung auf eine einfache Parallelschaltung eines Widerstandes R und einer Kapazität C reduziert werden.

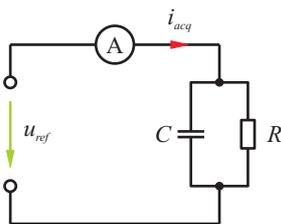


Abbildung 1.15: Ersatzschaltbild für die elektrische Charakterisierung. Das durch die Membranstruktur gebildete elektrische Netzwerk kann als einfache Parallelschaltung eines Widerstandes R und einer Kapazität C angenähert werden. Der Messstrom i_{acq} ergibt sich dabei als Funktion der auferlegten Spannung u_{ref} .

Für das Ersatzschaltbild in Abb. 1.15 kann folgende Gleichung aufgestellt werden, die die Abhängigkeit des Messstroms i_{ref} von der auferlegten Referenzspannung u_{ref} beschreibt:

$$i_{ref} = \frac{u_{ref}}{R} + C \cdot \frac{du_{ref}}{dt} \quad (1.65)$$

Da für die Charakterisierung des Systems mit einer auferlegten Spannung eine definierte Referenzspannung u_{ref} verwendet wird, deren zeitlicher Verlauf bekannt ist, kann die oben angegebene Gl. 1.65 für die verschiedenen erwähnten Fälle gelöst werden.

Kapazitätsbestimmung

Für die Bestimmung der kapazitiven Anteile des Ersatzschaltbildes wird eine dreiecksförmige Referenzspannung verwendet. Eine Dreiecksspannung kann als abschnittsdefinierte Funktion angegeben werden, die durch zwei lineare Gleichungen definiert ist. Die Gleichungen weisen vom Betrag her die gleichen Steigungen und Achsenabschnittpunkte auf und unterscheiden sich lediglich durch das Vorzeichen. Sie sind jeweils für die Hälfte einer Periodendauer T gültig.

⁹Für relativ hohe Zeitkonstanten, die für eine Lipidmembran bei 100 s liegen können, muss mittels Impedanzspektroskopie bis zu Frequenzen $< 0,01$ Hz gemessen werden. Jeder Messpunkt um diesen Wert herum dauert also ca. $100 \text{ s} \approx 1,7 \text{ min}$ und länger, je weiter man zu niedrigeren Frequenzen geht. Bei einer herkömmlichen Impedanzanalyse kann der Membranwiderstand nicht bestimmt werden.

$$u_{ref} = \begin{cases} \frac{2 \cdot U_{pp}}{T} \cdot (t - t_0) - \frac{U_{pp}}{2} & ; \quad n \cdot T \leq t - t_0 < (n + \frac{1}{2}) \cdot T \\ -\frac{2 \cdot U_{pp}}{T} \cdot (t - t_0) + \frac{U_{pp}}{2} & ; \quad (n + \frac{1}{2}) \cdot T \leq t - t_0 < n \cdot T \end{cases} \quad (1.66)$$

In Abb. 1.16 ist der Verlauf der angegebenen Gleichung in Abhängigkeit von der Zeit t dargestellt. Dabei sind U_{pp} die Spitzen-Spitzen-Spannung, T die Periodendauer, t_0 der Startpunkt eines Abschnitts mit positiver Steigung und n die Nummer der Periode, ausgehend vom Zeitpunkt t_0 gemessen.

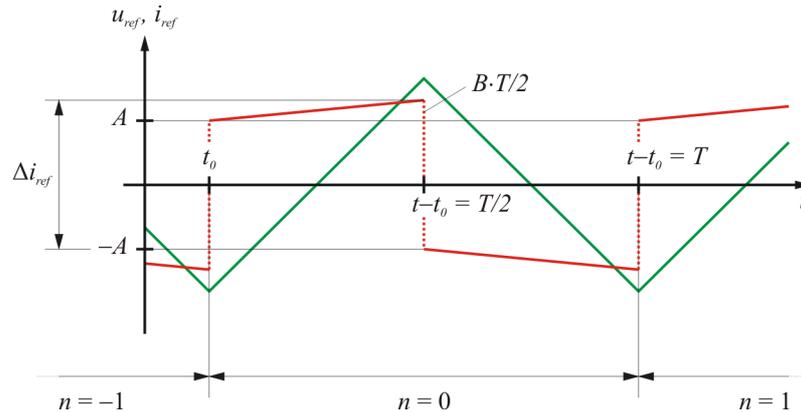


Abbildung 1.16: Zeitlicher Verlauf einer Dreiecksspannung (grün), die bei der Kapazitätsbestimmung als Referenzspannung u_{ref} eingesetzt wird. Die ansteigenden und abfallenden Flanken weisen vom Betrag her die gleiche Steigung auf. Nach jeweils einer halben Periodendauer T wechselt die Funktion das Vorzeichen. Die Größen t_0 , U_{pp} und n dienen zur mathematischen Beschreibung des Dreiecksverlaufs. Der resultierende Messstrom i_{ref} (rot) ist ebenfalls abschnittsweise definiert und wechselt in den Umkehrpunkten der Referenzspannung u_{ref} das Vorzeichen. Er ist dort nicht stetig, wodurch eine Stromstufe Δi_{ref} auftritt, deren Größe ein Maß für die Kapazität des Systems ist.

Zur Lösung der Gl. 1.65 müssen die zeitlichen Ableitungen der Referenzspannung gebildet werden. Aus Symmetriegründen braucht nur ein Abschnitt mit positiver Steigung für ein Zeitintervall $t_0 \leq t < t_0 + T/2$ betrachtet zu werden. Als Ableitungen nach der Zeit ergibt sich für u_{ref} :

$$u_{ref} = \frac{2 \cdot U_{pp}}{T} \cdot (t - t_0) - \frac{U_{pp}}{2} \quad (1.67)$$

$$\frac{du_{ref}}{dt} = \frac{2 \cdot U_{pp}}{T} \quad (1.68)$$

Setzt man diese Ableitungen in Gl. 1.65 ein, folgt:

$$\begin{aligned} i_{ref} &= \frac{2 \cdot U_{pp}}{T \cdot R} \cdot (t - t_0) - \frac{U_{pp}}{2 \cdot R} + C \cdot \frac{2 \cdot U_{pp}}{T} \\ &= \frac{2 \cdot U_{pp}}{T} \cdot \left(C - \frac{T}{4 \cdot R} \right) + \frac{2 \cdot U_{pp}}{T \cdot R} \cdot (t - t_0) = A + B \cdot (t - t_0) \end{aligned} \quad (1.69)$$

Die Herleitung erfolgte hier nur für einen Abschnitt, in dem die Referenzspannung u_{ref} positiv war. In Anlehnung an die Referenzspannung als abschnittsweise definierte Funk-

tion kann für den daraus resultierenden Strom i_{ref} ebenfalls eine Funktion in dieser Form aufgestellt werden. Die Vorgehensweise bei dem zweiten Funktionsabschnitt erfolgt analog zu dem gezeigten Weg; die Lösung weist hier lediglich ein anderes Vorzeichen auf.

$$i_{ref} = \begin{cases} A + B \cdot (t - t_0) & ; \quad n \cdot T \leq t - t_0 < (n + \frac{1}{2}) \cdot T \\ -A - B \cdot (t - t_0) & ; \quad (n + \frac{1}{2}) \cdot T \leq t - t_0 < n \cdot T \end{cases} \quad (1.70)$$

In Abb. 1.16 ist der zeitliche Verlauf des Messstromes i_{ref} rot dargestellt. Im Umkehrpunkt der Dreiecksspannung u_{ref} (grün) findet ein unstetiger Übergang (Sprung) Δi_{ref} statt, der auf das Verhalten der Kapazität in dem Erstatzschaltbild zurückzuführen ist. Der lineare Spannungsverlauf sorgt für einen konstanten Ladestrom auf der Kondensatorplatte (Sprung um den Betrag der Größe A). Der Strom durch den parallel geschalteten Widerstand folgt der Spannung linear, wodurch sich der Stromstufe ein linearer Verlauf in der Form $B \cdot (t - t_0)$ aufaddiert. Nach einer halben Periodendauer ($t = t_0 + T/2$) weist dieser ohmsche Stromanteil den Betrag $B \cdot T/2$ auf. Für die resultierende Stromstufe Δi_{ref} ergibt sich also:

$$\Delta i_{ref} = 2 \cdot A + B \cdot \frac{T}{2} \quad (1.71)$$

Setzt man A und B hier ein, so erhält man:

$$\Delta i_{ref} = \frac{4 \cdot U_{pp}}{T} \cdot \left(C - \frac{T}{4 \cdot R} \right) + \frac{2 \cdot U_{pp}}{T \cdot R} \cdot \frac{T}{2} = \frac{4 \cdot U_{pp} \cdot C}{T} \quad (1.72)$$

Durch Umstellen ergibt sich für die Kapazität:

$$C = \frac{\Delta i_{ref} \cdot T}{4 \cdot U_{pp}} \quad (1.73)$$

Für eine festkörperunterstützte Membran ohne adsorbierte Membranstrukturen ist $C_0 = C_m$. Wenn die festkörperunterstützte Membran mit adsorbierten Membranstrukturen belegt ist, dann ist $1/C_{ad} = 1/C_m + 1/C_v$, so dass gilt:

$$C_{ad} = \frac{C_m \cdot C_v}{C_m + C_v} \quad (1.74)$$

Wenn man annimmt, dass beide Kapazitäten in der gleichen Größenordnung vorliegen ($C_m \approx C_v$), dann kann geschrieben werden:

$$C_{ad} = \frac{C_m}{2} \quad (1.75)$$

Mit dieser Betrachtung kann gezeigt werden, dass bei einer festkörperunterstützten Membran die Kapazität C_0 kleiner ist als die Kapazität C_{ad} einer Membran mit angelagerten Membranstrukturen, sofern andere Einflüsse vernachlässigt werden können. Ist die Oberfläche vollständig mit Membranstrukturen belegt, so beträgt der Kapazitätswert die Hälfte dessen einer freien Membran ($C_{ad} = C_0/2$).

Leitfähigkeitsbestimmung

Für die Bestimmung der ohmschen Anteile des Ersatzschaltbildes wird als Referenzspannung u_{ref} ein Spannungssprung verwendet. Die Sprungfunktion kann als abschnittsdefiniert

nierte Funktion angegeben werden, die vor dem Spannungssprung Null ist und ab dem Einschalt- bzw. Sprungzeitpunkt t_0 einen Wert U_p annimmt:

$$u_{ref} = \begin{cases} 0 & ; t < t_0 \\ U_p & ; t \geq t_0 \end{cases} \quad (1.76)$$

Abb. 1.17 zeigt den zeitlichen Verlauf eines idealen Spannungssprungs, der entsprechend der abschnittsweise definierten Funktion erfolgt.

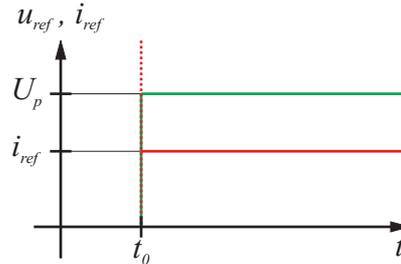


Abbildung 1.17: Zeitlicher Verlauf eines Spannungssprungs und der Stromantwort. Die Spannung (grün) ändert zum Zeitpunkt $t = t_0$ ihren Wert von Null auf U_p . Zum Sprungzeitpunkt $t = t_0$ ändert sich der Strom (rot) von Null auf einen großen Wert. Danach erreicht er einen konstanten Wert, der nur noch von der angelegten Spannung u_{ref} und dem Widerstandswert des Ersatzschaltbildes abhängt.

Der resultierende Strom i_{ref} , der als Reaktion auf die Sprungfunktion auftritt, wird für Zeiten $t > t_0$ untersucht. Um die hier gültige Differentialgleichung aufzustellen, müssen die zeitlichen Ableitungen gebildet werden.

$$u_{ref} = U_p \quad (1.77)$$

$$\frac{du_{ref}}{dt} = 0 \quad (1.78)$$

Setzt man die Ableitungen in Gl. 1.65 ein, so vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$i_{ref} = \frac{U_p}{R} \quad (1.79)$$

Für die Leitfähigkeit ergibt sich damit:

$$G = \frac{1}{R} = \frac{i_{ref}}{U_p} \quad (1.80)$$

Für eine festkörperunterstützte Membran ohne adsorbierte Membranstrukturen ist $G_0 = 1/R_m$. Wenn die festkörperunterstützte Membran mit adsorbierten Membranstrukturen belegt ist, dann ist $1/G_{ad} = R_m + R_v$, so dass gilt:

$$G_{ad} = \frac{1}{R_m + R_v} \quad (1.81)$$

Wenn man annimmt, dass beide Widerstände in der gleichen Größenordnung vorliegen ($R_m \approx R_v$), dann kann geschrieben werden:

$$G_{ad} = \frac{1}{2 \cdot R_m} \quad (1.82)$$

Ebenso wie bei der Kapazitätsbestimmung kann mit dieser Betrachtung gezeigt werden, dass bei einer festkörperunterstützten Membran die Leitfähigkeit G_0 kleiner ist als die Leitfähigkeit G_{ad} einer Membran mit angelagerten Membranstrukturen. Ist die Oberfläche vollständig mit Membranstrukturen belegt, so beträgt die Leitfähigkeit die Hälfte dessen einer freien Membran ($G_{ad} = G_0/2$).

Zur Leitfähigkeitsbestimmung nach der hier beschriebenen Methode muss als Bemerkung hinzugefügt werden, dass die real gemessenen Signalverläufe ein reaktiv langsames Abklingverhalten aufweisen. Dieses Phänomen ist einerseits darauf zurückzuführen, dass die Leitfähigkeitsmessung idealisiert dargestellt wurde (die Stromantwort ist im Zeitpunkt $t = t_0$ undefiniert und weist dort eine unendlich große Steigung auf). Andererseits besitzt jede Messvorrichtung eine begrenzte Auflösung hinsichtlich der in einem Signalverlauf auftretenden Frequenzen. Im Allgemeinen hat die Messvorrichtung das Verhalten eines Bandpasses, der für zu hohe Frequenzen wie ein Tiefpassfilter wirkt und für zu niedrige Frequenzen wie ein Hochpassfilter arbeitet. In Abb. 1.18 ist gezeigt, wie sich ein Tiefpassfilter durch Einflussnahme auf die sehr hohen Frequenzanteile der durch den Spannungssprung erzeugten Stromspitze auf den Signalverlauf auswirkt. Dargestellt sind jeweils die ungefilterten und die gefilterten Signale für eine unbelegte festkörperunterstützte Membran (durchgängige Linien) und eine vollständig mit Membranstrukturen belegte Membran (gestrichelte Linien).

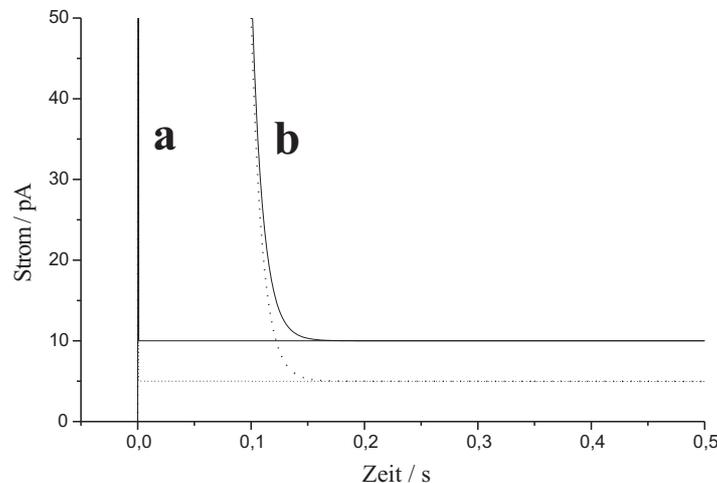


Abbildung 1.18: Einfluss eines Filters auf die Verlaufsform der Stromantwort bei der Leitfähigkeitsmessung. Das Diagramm zeigt die theoretischen ungefilterten Signale (a) und die mit einem Tiefpassfilter gefalteten Signale (b). Die Signale entsprechen den Grenzwerten der Oberflächenbelegung $\Theta = 0$ (durchgängige Linien) und $\Theta = 1$ (gestrichelte Linien). Als Filter wurde ein Tiefpassfilter 1. Ordnung mit einer Zeitkonstanten von 10 ms simuliert.

Der undefinierte Anteil der theoretisch auftretenden Ströme zum Zeitpunkt $t = t_0$ wurde durch eine Exponentialfunktion mit sehr kleiner Zeistkonstante angenähert. Die Funktion relaxiert sehr schnell und ist bei dem gewählten Maßstab des Diagramms nur als scharfe senkrechte Linie sichtbar. Der Verlauf des gefilterten Signals ist wesentlich langsamer, geht aber für $t \rightarrow \infty$ gegen den gleichen konstanten Stromwert wie das ungefilterte Signal. Das

Integral unter beiden Kurven ist gleich groß¹⁰. Aus diesen Gegebenheiten geht hervor, dass das zeitliche Verhalten des Stromsignals bei der Leitfähigkeitsbestimmung nicht für Interpretationen der Elemente des Ersatzschaltbildes herangezogen werden sollte, da die dort enthaltenen Informationen durch die Messeinrichtung gegeben sind. Nur der konstante Stromwert, auf den sich das Signal einstellt, kann sinnvoll interpretiert werden. Dieser Wert kann in der Regel nach ca. einer Sekunde aus dem Signal abgelesen werden.

1.3.5 Hochdurchsatztechnik

In vielen chemischen und biochemischen Bereichen nehmen mittlerweile Untersuchungsmethoden, die einen hohen Durchsatz (HTS: High Throughput Screening) aufweisen, einen hohen Stellenwert ein. Die Vielzahl an Genen (Genom), an Proteinen (Proteom) und an Stoffwechselreaktionen (Metabonom) setzt hinsichtlich der Kombinations- und Untersuchungsmöglichkeiten neue Maßstäbe und Anforderungen an Methoden, mit denen diese große Menge an dynamischen Informationen verarbeitet und untersucht werden kann. Vom wesentlichen Messprinzip her ist ein hochdurchsatzfähiges System meistens reaktiv einfach gehalten bzw. basiert auf gängigen Messmethoden für verschiedene Anwendungen. Die Herausforderung liegt eher in der Realisierung einer automatisierten Durchführung der Messung und der korrekten Interpretation der Ergebnisse innerhalb kürzester Zeit. Diese Notwendigkeiten erfordern den Einsatz von hochoptimierten technischen Systemen, die gemeinsam Robotertechnik, Datenverarbeitung, Steuerung bzw. Regelung und Messtechnik beinhalten und verwalten können. Die Einrichtungen müssen robust und wartungarm sein und sollten zudem eine einfache Bedienung aufweisen. In vielen Bereichen, in denen Hochdurchsatztechniken angewendet werden, kommen Robotersysteme in Kombination mit Fluoreszenzmessungen oder photometrischen Detektionsmechanismen zum Einsatz. Die Koordination der oftmals aus mehreren Stationen bestehenden Ereignisse erfolgt über komplexe Datenverarbeitungsanlagen. Möglichst frei zugängliche Schnittstellen, die einen großen Manipulationsspielraum lassen, ermöglichen eine Integration von neuen Geräten und Techniken in ein bestehendes System. Ein verbreiteter Standard sind in der Hochdurchsatztechnik sogenannte Mikrotiterplatten, die in verschiedenen Formaten vorkommen. Sie bestehen aus Kunststoff und weisen eine Matrix von symmetrisch angeordneten Vertiefungen auf, die als Messkammern, Reaktionsräume oder sensorische Einheiten dienen können und auch als *Well* bezeichnet werden. Die Matrix auf den Mikrotiterplatten weist meistens ein Verhältnis von 2:3 auf und ist bei kleiner werdendem Innendurchmesser mit einer Anzahl von 96 (8 x 12), 384 (16 x 24), 1536 (32 x 48), usw. Kammern versehen. Die Abmessungen dieser Platten und der jeweilige Kammerabstand sind standardisiert und können problemlos mit einer Vielzahl von Geräten verwendet werden, wodurch ein hohes Maß an Kompatibilität erreicht wird.

Die Vorgehensweise bei Hochdurchsatzuntersuchungen folgt vom essentiellen Ansatz her einer Schrotschuss- bzw. *brute-force*-Methode, bei der eine sehr große Menge von experimentellen Daten darüber gesammelt wird, wie eine biologische oder chemische Komponente mit einer anderen wechselwirkt. Ein Faktor wird dabei konstant gehalten und ein anderer variiert, so daß ein Wechselwirkungsspektrum für den konstanten Faktor entsteht. Ein naheliegendes Beispiel beinhaltet als konstante biologische Komponente ein Enzym oder Protein, für das die Wechselwirkungen mit einer Reihe von variablen Sub-

¹⁰Bei dem gewählten Maßstab ist nicht sichtbar, dass die Amplitude des ungefilterten Signals um mehrere Zehnerpotenzen größer als die des gefilterten Signals ist.

stanzen untersucht werden soll. Umgekehrt kann aber auch eine bestimmte Substanz auf ihre Wechselwirkung mit vielen unterschiedlichen Proteinen oder Enzymen untersucht werden. In herkömmlichen Methoden benutzt man dabei z.B. Fluoreszenzfarbstoffe, die sensitiv gegenüber der Konzentration bestimmter Stoffe (z.B. Protonen oder Kationen) sind, die das Enzym als Substrat verwendet. In Abhängigkeit davon, ob das Enzym in der Reaktionskammer aktiv ist oder nicht, wird die Konzentration dieses Stoffes verändert, und die Fluoreszenz des Farbstoffes ändert sich. Erhöht ein Enzym z.B. den pH-Wert der Lösung, so kann ein pH-sensitiver Farbstoff darauf reagieren. Liegt das Protein in Liposomen rekonstituiert vor und transportiert es ein Kation von innen nach außen oder umgekehrt, so kann ein entsprechend sensitiver Farbstoff, der entweder in den Liposomen oder außerhalb vorliegt, auf diese lokale Änderung der Konzentration reagieren. Kommt es bei einer Probe zu einem interessanten Ergebnis, das weiter untersucht werden soll bzw. vorgegebene Spezifikationen erfüllt, so handelt es sich um einen *Hit* (Treffer). Neben der Anwendung im wissenschaftlichen bzw. akademischen Bereich ist die größte industrielle Anwendung der Hochdurchsatzuntersuchungen im Bereich der pharmazeutischen Wirkstoffsuche zu finden.

Pharmazeutische Wirkstoffsuche

Das Ziel in der pharmazeutischen Wirkstoffsuche ist es, ein Medikament zu entwickeln, das zur Behandlung einer bislang nicht therapierbaren Krankheit eingesetzt werden kann, oder das günstigere Eigenschaften (z.B. in Bezug auf Nebenwirkungen und Verträglichkeit) aufweist als Medikamente, die auf dem Markt vorhanden sind. Nach Angaben der Pharmaindustrie kostet die Entwicklung eines neuen Medikaments insgesamt 800 Millionen US-Dollar und dauert bis zur erfolgreichen Zulassung ca. 12 Jahre [95]. Am Anfang einer Entwicklung steht die Identifizierung eines Zielobjektes, dem Target. Das Target ist die biologische Komponente, die durch gezielte Manipulation durch einen Wirkstoff eine Änderung im Krankheitsverlauf hervorruft, die sich als Linderung von Beschwerden oder als Heilung der Krankheit auswirkt. Oft beschäftigen sich viele Forschungsgruppen (sowohl akademische als auch industrielle) mit den physiologischen Grundlagen, die zur Identifizierung möglicher Targets führen. Dabei ist es nicht selten, dass sich als potentieller Kandidat ein Enzym bzw. ein Protein entpuppt, das auf eine entsprechende Stoffwechselreaktionen einwirkt. Als einfaches Beispiel könnte ein solches Protein in einer bestimmten pathologischen Situationen den Stoffwechsel negativ beeinflussen. Es wäre also wünschenswert, dieses Protein deaktivieren zu können. Um einen geeigneten Wirkstoff zu finden, wird das Target nun auf Wechselwirkungen mit verschiedenen Substanzen getestet. Es existieren Datenbanken mit mehreren Millionen Substanzen, die an dem Zielobjekt ausprobiert werden müssen, um die Anzahl auf eine engere Auswahl begrenzen zu können. Die zeitliche Begrenzung der Möglichkeit, eine Auswahl an positiven getesteten Substanzen (*Hits*) zu sammeln, stellen den Flaschenhals in der Entwicklung eines Medikaments dar, und Hochdurchsatztechniken sind dabei unverzichtbar. Einzelne Geräte können im Durchschnitt 1000 Messpunkte pro Tag erreichen. Ganze Anlagen erreichen in der gleichen Zeit die Abarbeitung von bis zu 200 000 Substanzen. Die positiv getesteten Substanzen gehen in die nächste Testrunde, in der die Wirkstoffe chemisch optimiert und biochemisch charakterisiert werden. Ein Wirkstoff sollte natürlich so effizient wie möglich sein, aber gleichzeitig auch genauso spezifisch. Wenn das Targetprotein neben der pathologischen Situation auch in anderen Geweben und Metabolismen essentielle Aufgaben erfüllt, dürfen die Nebenwirkungen auf diese Bereiche nur sehr gering sein. Derartige Studien müssen durch Tierversuche an Nagern und Nichtnagern belegt werden. Allerdings können parallel

bestimmte *in-vitro*-Verfahren oder Simulationen verwendet werden, um die Anzahl der verwendeten Tiere zu minimieren. Dazu kann auch die Hochdurchsatzuntersuchung der Wechselwirkung eines Wirkstoffes mit verschiedenen Proteinen gezählt werden, die bereits als Beispiel aufgeführt wurde (siehe oben). Nachdem ein Wirkstoff durch die beschriebenen Methoden untersucht und optimiert wurde, kann er für klinischen Studien zugelassen werden, in denen die Auswirkungen auf den menschlichen Organismus getestet werden.

Bewertungsfaktor z'

Um eine Methode hinsichtlich ihrer Tauglichkeit für den Einsatz in der Hochdurchsatz-Wirkstoffsuche zu bewerten, wurde 1999 von Zhang et. al. der sogenannte z' -Faktor entwickelt [103]. Als Methode muß dabei die gesamte Messeinheit zusammen mit einem speziellen Untersuchungsprotokoll für eine biologische Komponente betrachtet werden (im englischen wird von *Assay* gesprochen). Die Methode bzw. der *Assay* liefert bei einer Positivkontrolle eine Messgröße, die ein Maß der normalen Aktivität der biologischen Komponente ist. Bei einer Negativkontrolle, die ansonsten möglichst unter den gleichen Bedingungen aufgenommen wurde, wie die Positivkontrolle, liefert die Methode eine Messgröße, bei der die biologische Probe keine Aktivität aufweist. Die Negativkontrolle ist also ein Maß für die Störgrößen bzw. Hintergrundaktivitäten der Methode. Bei einer großen Anzahl von Positiv- und Negativkontrollen kann man aus deren Messgrößen die Mittelwerte $\bar{\mu}$ und deren Standardabweichungen σ bestimmen. Diese Werte gehen dann in die Berechnung des z' -Faktors ein.

$$z' = 1 - 3 \cdot \frac{\sigma_p + \sigma_n}{|\bar{\mu}_p - \bar{\mu}_n|} \quad (1.83)$$

Die Positivkontrolle besitzt dabei den Index p , die Negativkontrolle den Index n . Die jeweiligen Mittelwerte und deren Standardabweichungen lassen sich aus der Anzahl N von Einzelmessungen μ_i nach den folgenden Gleichungen berechnen:

$$\bar{\mu} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \mu_i \quad (1.84)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^N (\mu_i - \bar{\mu})^2} \quad (1.85)$$

Die Differenz der Mittelwerte von Positiv- und Negativkontrolle stellen den Messbereich der Methode dar, in dem ein Messwert läge, wenn z.B. ein Protein durch einen Wirkstoff inhibiert würde und sich dadurch die Aktivität des Proteins verringerte. Die Summe der Standardabweichungen, bezogen auf den Messbereich, ergibt eine Größe, die qualitativ ein Fenster zwischen der Positiv- und der Negativkontrolle definiert. Der konstante Faktor 3 ist willkürlich festgelegt und wurde von Zhang et. al. als Maß dafür eingesetzt, wie klein das Fenster werden darf. Die Werte, die der z' -Faktor annehmen kann, lassen sich in 4 Klassen einteilen. Der Wert Eins kann nicht erreicht werden, da die Standardabweichungen nicht Null bzw. die Differenz der Mittelwerte nicht unendlich groß werden kann. Bei einem Wert von Null oder kleiner ist die Methode unbrauchbar, da Positiv- und Negativkontrolle nicht auseinandergelassen werden können. Im Bereich zwischen Null und Eins ist eine Methode für die Hochdurchsatzuntersuchung geeignet. Hierbei ist die Erfüllung der Überschreitung der Grenze bei 0,5 für einen exzellenten Assay Mindestvoraussetzung, um eine Methode

im Bereich der Hochdurchsatz-Wirkstoffsuche zu etablieren. Tabelle 1.1 zeigt in Kurzform die Interpretation der Größe des z' -Faktors.

z'	Interpretation
= 1	Idealverhalten (kann nicht erreicht werden)
$0,5 \leq z' < 1$	exzellente Methode
$0 \leq z' < 0,5$	geringwertige Methode
< 0	Methode unbrauchbar

Tabelle 1.1: Interpretation des z' -Faktors für die Beurteilung einer Methode (Assay) hinsichtlich ihrer Eignung für die Hochdurchsatz-Wirkstoffsuche.

1.4 Verwendete Proteine

1.4.1 Der Glutamattransporter EAAC1

Der neuronale Glutamattransporter EAAC1 (*Excitatory Amino Acid Carrier 1*) ist ein eukaryotisches Protein, das in prä- und postsynaptischen Cytoplasmamembranen von glutamatergen Neuronen im zentralen Nervensystem vorkommt [34, 33]. Ebenso wie andere Mitglieder der Familie der Glutamattransporter, wie z.B. die glialen Membranproteine GLT-1 (*Glutamate Transporter 1*) und GLAST (*Glutamate-Aspartate-Transporter*), dient er zur Wiederaufnahme des als Neurotransmitter fungierenden Glutamats¹¹, das zur Signalweiterleitung in den synaptischen Spalt abgesondert wird, wenn eine neurogene Stimulation erfolgt. Die Reduzierung der Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt ist die Grundvoraussetzung, um die synaptische Erregung abzubauen, die durch Glutamatrezeptoren an der postsynaptischen Membran weitervermittelt wird. Es wurden bisher insgesamt 5 verschiedene eukaryotische Glutamattransporter kloniert. Die humanen Varianten werden mit EAAT1-5 (EAAT: *Excitatory Amino Acid Transporter*) bezeichnet.

In Abb. 1.19 sind die Stoffwechselwege des exzitatorischen Glutamats gezeigt. Glutamat wird in glutamatergen Synapsen aus einem Zwischenprodukt des in den Mitochondrien ablaufenden Zitratzyklusses, dem α -Ketoglutarat, hergestellt und entsteht demnach aus Glukose [63, 36, 54]. Dieses Vorgehen ist notwendig, weil Glutamat nicht oder nur geringfügig über die Hirn-Blutschranke in das zentrale Nervensystem vordringen kann. Das in den Neuronen freigesetzte Glutamat wird durch vesikuläre Transportmechanismen in Vesikel transportiert, die bei einem eintreffenden Aktionspotential mit der Cytoplasmamembran fusionieren und den Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freisetzen. Das im synaptischen Spalt vorhandene Glutamat aktiviert in der postsynaptischen Membran spezielle Glutamatrezeptoren [63], die einen Ioneneinstrom bewirken (ionotrope Glutamatrezeptoren: iGluR) oder durch die Glutamatbindung einen intrazellulären Metabolismus aktivieren (metabotrope Glutamatrezeptoren: mGluR). Werden diese Rezeptoren über längere Zeit einer erhöhten Glutamatkonzentration ausgesetzt, ergibt sich eine kritische Situation. Verschiedene Transportmechanismen sind daher dafür zuständig, die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt nach einer erfolgten Ausschüttung möglichst schnell und vollständig zu verringern. Es existieren mehrere aktive Glutamattransportsysteme,

¹¹Glutamat stellt die Salzform der Aminosäure Glutaminsäure dar

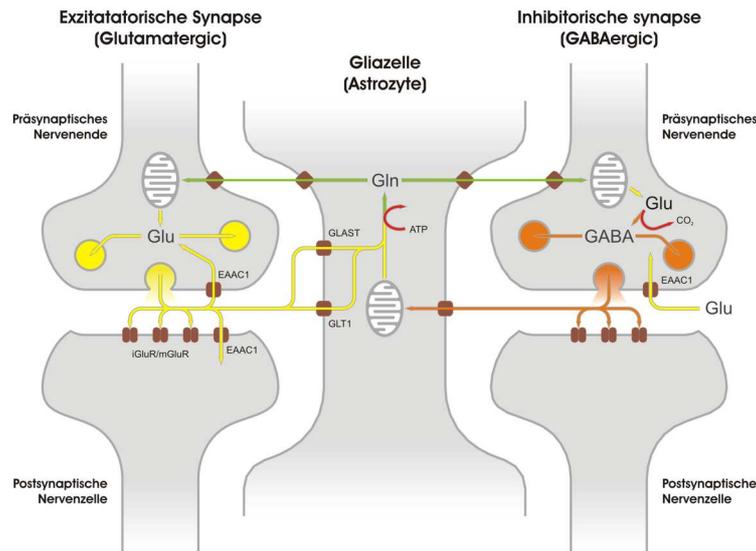


Abbildung 1.19: Neuronale Stoffwechselwege im zentralen Nervensystem. Dargestellt sind die durch Transportproteine und Vesikelfusion vermittelten Pfade für den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat (gelb), für den inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (orange) und für das nicht erregende Glutamin (grün).

die sich dieser Aufgabe annehmen. Sie weisen alle die gleiche Stöchiometrie und einen engen familiären Zusammenhang auf [63, 11]. Im Neuron selbst übernimmt der EAAC1 die Aufgabe, den Neurotransmitter Glutamat zurück ins Neuroneninnere zu transportieren. Etwas weiter entfernt in den die Synapsen umgebenden Gliazellen sorgen die Glutamattransporter GLT-1 und GLAST für die Resorption des Glutamats, das bis dorthin vorge-drungen ist. Durch den Einsatz dieser Transportsysteme kann die Glutamatkonzentration in der Synapse innerhalb weniger Millisekunden von einigen mM auf wenige μ M herabgesetzt werden [55], so dass die verbleibende Glutamatkonzentration außerhalb der Affinität der postneuronalen Rezeptoren liegt. Das Glutamat, das in die präsynaptischen Neuronen aufgenommen wurde, kann direkt wiederverwendet werden, um neue Transmittervesikel zu füllen. Das in die Gliazellen transportierte Glutamat wird dort durch ATP-Hydrolyse von der Glutamin-Synthetase in dessen Amidderivat Glutamin umgewandelt. Glutamin kann problemlos zwischen Gliazelle und Neuron ausgetauscht werden, da es keinerlei stimu-lierende Wirkung besitzt und kann dort wieder in aktives Glutamat umgewandelt werden. Der Glutamatstoffwechsel im zentralen Nervensystem korrespondiert innerhalb der Glia-zellen mit benachbarten inhibitorischen Synapsen [10], die durch den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA: γ -aminobutyric acid) betrieben werden. Die GABA-Anteile, die in die Gliazelle aufgenommen werden, werden ebenfalls in Glutamin umgewandelt und in dieser Form zurück in die GABA-ergen Neuronen transportiert. Dort wird zuerst Glutamat hergestellt, das dann durch die Glutamat-Decarboxylase zu GABA hydrolysiert wird. Es hat sich herausgestellt, dass diesen inhibitorischen Synapsen Glutamat auch di-rekt durch den Transport aus dem synaptischen Spalt zur Verfügung gestellt wird. Dabei soll ebenfalls der EAAC1 zum Einsatz kommen [10, 77]. Bestimmte Krankheitsformen scheinen aus der Abwesenheit des EAAC1 und der daraus folgenden unzureichenden Ver-sorgung mit Glutamat an inhibitorischen Synapsen zu resultieren [77].

Der durch den EAAC1 vermittelte Transport von Glutamationen in das Neuroneninnere

ist an die elektrochemischen Gradienten von Natrium- und Kaliumionen gebunden, wodurch der Transport als sekundär aktiv eingestuft werden kann, da eine vorgelagerte bzw. unabhängige Instanz die Gradienten zur Verfügung stellen muss. Sind die Gradienten vorhanden, so transportiert der EAAC1, wie in Abb. 1.20 a dargestellt, drei Natriumionen, ein Glutamat und ein Proton in das Zellinnere, was mit dem Gegentransport von einem Kaliumion zur Extrazellulärseite einhergeht. Diese Stöchiometrie führt zu einem Netto-transport von zwei positiven Ladungen in das Zellinnere. Die Aktivität des Transporters bleibt auch dann erhalten, wenn die Natriumionen durch Lithiumionen substituiert werden oder wenn anstelle von Glutamat Aspartat an den Transporter bindet. Im Gegensatz zum Glutamat, bei dem ein wesentlicher Unterschied in der Spezifität zu den Enantiomeren (L-Glu \gg D-Glu) besteht, werden beide Aspartatformen gleich behandelt [62]. Neben dem aktiven Transportmechanismus verfügt der Glutamatttransporter über eine thermodynamisch ungekoppelte Anionenleitfähigkeit [19], wobei zwei Arten unterschieden werden, die beide Natrium-abhängig sind. Zum einen ist das die Substrat-unabhängige Anionenleitfähigkeit, die auch Leckleitfähigkeit genannt wird und die auftritt, wenn der Transporter ein Natriumion gebunden hat. Zum anderen handelt es sich um eine Substrat-induzierte Anionenleitfähigkeit, bei der sich das Protein wie ein ligandengesteuerter Kanal verhält. Im Falle der Anionenleitfähigkeit können Lithiumionen nicht an die Stelle von Natriumionen treten [5]. In Abb. 1.20 b sind der postulierte vollständige Transportzyklus und die Transporterstadien dargestellt, in denen der Transporter die Anionenleitfähigkeit vermittelt [92, 67, 42, 43].

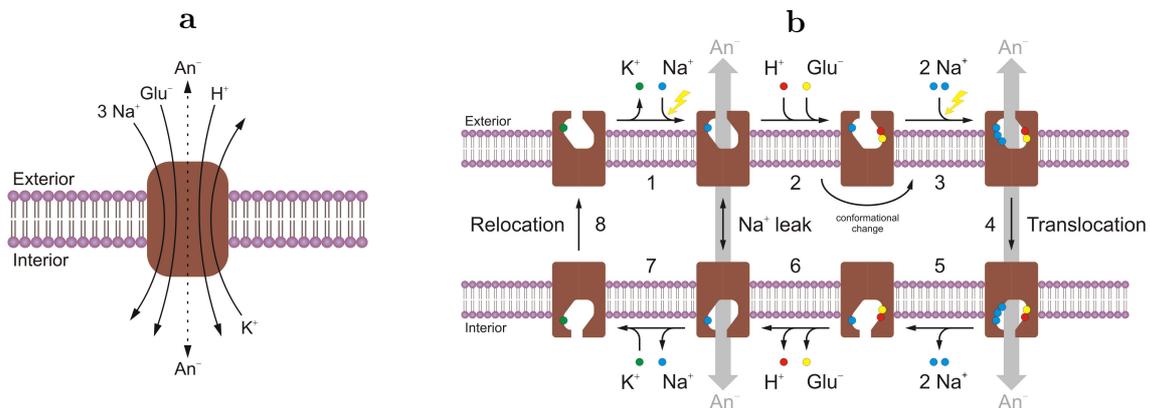


Abbildung 1.20: Stöchiometrie (a) und Transportzyklus (b) des neuronalen Glutamatttransporters EAAC1.

Im ersten Schritt des Transportzyklusses nimmt der EAAC1 von der Extrazellulärseite ein Natriumion auf, woraufhin er in der Lage ist, Anionen passieren zu lassen (Substrat-unabhängige Anionenleckleitfähigkeit). Danach bindet der Glutamatttransporter ein Proton und das Glutamat, um nach einer Konformationsänderung zwei weitere Natriumionen aufzunehmen. In diesem Stadium erhöht sich die Anionenleitfähigkeit des Transporters um ein Vielfaches (Substrat-induzierte Anionenleitfähigkeit). Nach der Translokation im vollständig besetzten Zustand gibt der EAAC1 sukzessive zwei Natriumionen, das Glutamat und das Proton und schließlich das noch verbleibende Natriumion in das Zellinnere ab. Bevor der Transporter die mit ca. 30 1/s ratenlimitierende Relokation vollzieht, nimmt er ein Kaliumion auf, das er direkt danach auf der Extrazellulärseite freisetzt. Nun wieder in vollständig unbesetztem Zustand beginnt er den Zyklus von vorn. In Abwesenheit von Kaliumionen ist der Glutamatttransporter in der Lage, eine Abkürzung vor Schritt 7 und

nach Schritt 1 zu nehmen (wenn ein Natriumion gebunden ist). Dieser alternative Relokationsschritt wird als Natriumleck oder Natriumaustauschmodus bezeichnet [62, 43]. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass der Transporter im leeren, ungeladenen Zustand und langsamer als mit gebundenen Kaliumionen reloziert [62, 43].

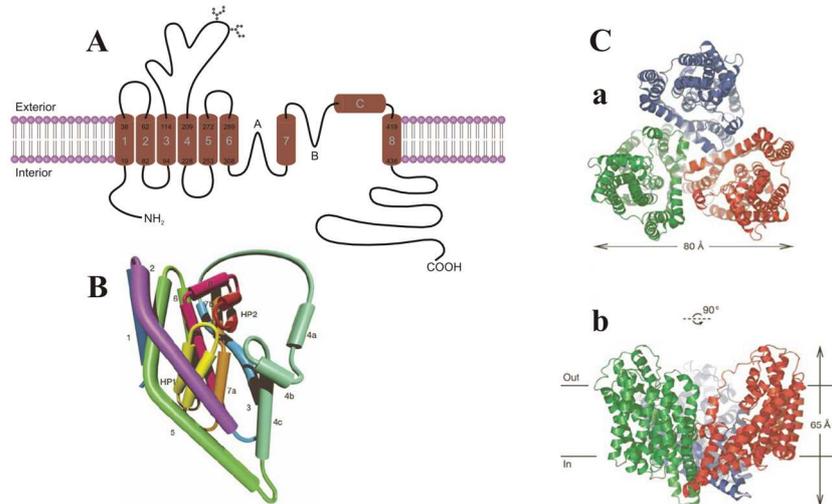


Abbildung 1.21: Struktur des neuronalen Glutamattransporters EAAC1. A zeigt die Sekundärstruktur des EAAC1. In B und C sind die 3-dimensionalen Strukturen des Glutamattransporters Glt_{Ph} aus *Pyrococcus horikoshii* gezeigt [102], der homolog zu den eukariotischen Glutamattransportern ist. B zeigt die Tertiärstruktur und in C ist die Quartärstruktur (ein Trimer) in zwei Ansichten (a: Draufsicht, b: Seitenansicht) dargestellt.

Abb. 1.21 zeigt die Struktur der Familie der Glutamattransporter. Ein Monomer besitzt insgesamt acht Transmembrandomänen, eine große extrazelluläre Schleife mit zwei Glykosylierungsstellen und zwei wiedereintretende (*Reentrant*) Schleifen A und B sowie eine extrazelluläre helikale Struktur C [30, 79, 49, 102]. Die genauen Bindungsstellen für die jeweiligen Substrate und der Mechanismus der Anionenleitfähigkeit sind bislang ungeklärt. Die Primärstruktur der 5 klonierten Glutamattransporter (GLT-1, GLAST, EAAC1, EAAT4 und EAAT5) sind sich sehr ähnlich [63, 62, 35, 4], so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass sie alle der gleichen Faltungsvorschrift folgen. Die in Abb. 1.21 A dargestellte Sekundärstruktur wurde von vielen Arbeitsgruppen unter Zuhilfenahme verschiedener Familienmitglieder der Glutamattransporter ausgearbeitet. Erste Maßnahmen dabei sind die Erstellung von Hydrophobizitätsprofilen der primären Aminosäurestruktur [78, 79]. Des Weiteren kommen Zugänglichkeitsstudien, bei denen verschiedene Aminosäuren gezielt ausgetauscht werden und die so entstehenden Mutationsformen eines Proteins untersucht werden, zum Einsatz. Dabei konnten viele topologischen Eigenschaften [30, 78] und verschiedene Bereiche, die eine mögliche Beteiligung an der Substratbindung aufweisen, entschlüsselt werden. Eskandari et. al. entdeckten, dass sich in der Plasmamembran von EAAC1-exprimierenden Zellen Oligomere ausbildeten, deren Anzahl mit der gemessenen Aktivität des EAAC1 korrelierte [18]. Sie postulierten dabei eine pentamere Struktur, die aus fünf identischen Einheiten besteht. Neuere Untersuchungen an dem homologen Glutamattransporter Glt_{Ph} aus *Pyrococcus horikoshii* haben gezeigt, dass der Glutamattransporter in der Quartärstruktur Trimere ausbildet (siehe Abb. 1.21 C), die eine wannenartige Struktur besitzen und mit der Öffnung zur Extrazellulärseite weisen, um eine schnelle Substratassimilation aus der wässrigen Phase zu gewährleisten [102]. Die

Schleifen A und B könnten dabei einen Verschluss bzw. Öffnungsmechanismus für die Bindungsstelle des Glutamates zur Intra- bzw. Extrazellulärseite darstellen. Das kristallisierte Protein wies zwischen den geschlossenen Schleifen eine okkludierte Elektronenverteilung auf, die möglicherweise durch ein gebundenes Glutamatmolekül hervorgerufen wurde, da sie nicht dem Protein zugeschrieben werden konnte. Die Kationenbindungsstellen sollen sich im nahen Umfeld zur Glutamatbindungsstelle befinden. Jedes einzelne Monomer soll in der Lage sein, Glutamat zu binden und dieses zusammen mit den Kosubstraten zu transportieren. Die Anionenleitfähigkeit soll dahingegen nur Proteinen in oligomerer Struktur gestattet sein [18], was für die Ausbildung einer kanalartigen Struktur durch das Homooligomer spricht.

Der in dieser Arbeit verwendete Glutamattransporter ist der murine¹² EAAC1 mit einer Länge von 523 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 56,7 kDa. Das humane Analogon zu dem EAAC1 ist der EAAT3 mit 90 % Identität in der primären Aminosäuresequenz.

1.4.2 Der bakterielle Natrium-Protonen-Austauscher NhaA

Natrium-Protonen-Austauscher (Na^+/H^+ -Austauscher) sind integrale Membranproteine, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind und in nahezu jedem Zelltyp eines Organismus vorkommen. Sie sind sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen zu finden und arbeiten als Antiporter, die Natriumionen gegen Protonen über die Membran austauschen [86, 8]. Dabei sind die Transportrichtungen der Transportproteine aus Säugerzellen und Pilzen genau entgegengesetzt zu denen aus Bakterien und Hefen und weisen zum Teil eine unterschiedliche Stöchiometrie auf [94]. In allen Fällen ist der Transport sekundär aktiv und wird durch das jeweilige Substrat getrieben, das entlang seines Gradienten transportiert wird. Der humane NHE1 (Na^+/H^+ Exchanger 1) z.B. transportiert, durch die hohe externe Natriumionenkonzentration getrieben, ein Proton auf die Extrazellulärseite und erniedrigt dort den pH-Wert (siehe Beispiel in Kapitel 1.2.2) bzw. erhöht den cytosolischen pH-Wert. Der Gesamtprozess des Transportvorgangs ist dabei elektroneutral [94]. Die bakteriellen Natrium-Protonen-Austauscher nutzen dahingegen den intern orientierten Protonengradienten, um externe Protonen gegen intern vorliegende Natriumionen auszutauschen. Der in dieser Arbeit untersuchte NhaA (Na^+/H^+ Antiporter A) aus dem zur Darmflora gehörenden Enterobakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) transportiert für zwei Protonen ein Natriumion zur Außenseite der Cytoplasmamembran ins Periplasma (Abb. 1.22) [86]. Dieser Transportvorgang weist eine elektrogene Stöchiometrie auf und besitzt eine extreme pH-Wert-Abhängigkeit, wobei sich die Aktivität des Austauschers im alkalischen Bereich (pH 8,5) gegenüber dem physiologischen Bereich (pH 7) um 3 Zehnerpotenzen erhöht [87, 105]. Die Wechselzahl des NhaA beträgt bei maximaler Aktivität 1500 1/s, was den schnellsten aktiven Transportvorgang darstellt, der bislang beobachtet wurde [87, 80]. Die Funktion des Austausches von Natriumionen und Protonen ist die Aufrechterhaltung des physiologischen Zellmilieus in Bezug auf die Regulation der internen Protonen- bzw. Natriumionenkonzentrationen. Die interne Protonenkonzentration, die durch den inneren pH-Wert ausgedrückt wird, ist von essentieller Bedeutung für viele Zellfunktionen. Bereits relativ kleine Änderungen des internen pH-Wertes können sich negativ auf die Zellteilung auswirken und andere Stoffwechselmechanismen beeinflussen [87]. Die regulatorische Funktion der Na^+/H^+ -Antiporter bezieht sich daher auf die Puf-

¹²Dieser Glutamattransporter stammt aus der Maus und wird deshalb auch mit mEAAC1 bezeichnet

ferung des internen pH-Wertes und wirkt somit pH-Wertänderungen entgegen, die durch verschiedene Metabolismen innerhalb einer Zelle verursacht oder durch äußere Einflüsse hervorgerufen werden [94]. Bei einem physiologischen pH-Wert im Cytoplasma sind die Na^+/H^+ -Austauscher größtenteils inaktiv [8]. Bakterielle Na^+/H^+ -Austauscher sorgen für die protonengetriebene Aufrechterhaltung eines Natriumgradienten über die Membran, der Voraussetzung für verschiedenen sekundäraktive Transportmechanismen ist.

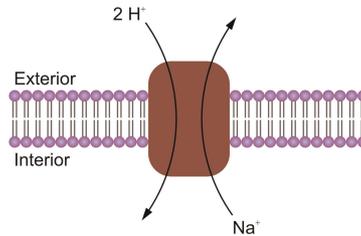


Abbildung 1.22: Stöchiometrie von *NhaA*

Die prokaryotischen, protonengetriebenen Na^+/H^+ -Austauscher weisen nur geringfügige Identität hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen (Primärstruktur) mit ihren eukaryotischen Analogen auf [94, 22, 7]. Nur wenige einzeln oder paarweise vorkommende polare Aminosäuren sind in der Gesamtstruktur konserviert. Sie stehen allerdings in engem Zusammenhang mit dem Kationenbindungsmechanismus. Nicht die Erhaltung der Primärstruktur, sondern die Erhaltung der 3-dimensionalen Anordnung dieser polaren Gruppen, die sich aus der Tertiärstruktur ergibt, scheint den familiären Zusammenhang der unterschiedlichen Na^+/H^+ -Austauscher wiederzuspiegeln. Ein weiteres Indiz für die Verwandtschaft der Na^+/H^+ -Austauscher ist, dass alle Vertreter in der Lage sind anstelle von Natrium- auch Lithiumionen gegen Protonen zu transportieren. Die Erkennung und Bindung des Kations erfolgt dabei über eine koordinative Bindung (Komplexbildung) mit den polaren Gruppen der beteiligten Aminosäuren. Bei dem *NhaA* aus *E.coli* sind diese konservierten polaren Aminosäuren die Aspartate Asp^{133} , Asp^{163} und Asp^{164} . Werden sie durch deren Amidderivate Asparagin (Asn) substituiert, verliert die entstehende Mutationsform (Mutante) des Proteins jegliche Transportaktivität [40]. Strukturanalysen des 388 Aminosäuren langen und 41,4 kDa schweren *NhaA* haben gezeigt, dass das Protein über 12 Transmembranhelizes (Abb. 1.23) verfügt, von denen die Helizes 4 und 5 die an der Bindung beteiligten Aspartate tragen und diese in räumliche Nähe bringen [73, 72, 99, 98, 39]. Zudem scheint die Konformation der Transmembranhelizes 4 und 11 eine entscheidende Rolle bei der Freigabe der Bindungsstelle zu spielen. Ihre Helizes sind in der Mitte der Membran unterbrochen und interagieren miteinander. Dies ist ein Phänomen, das in jüngster Zeit auch bei anderen sekundär aktiven Transportern durch Strukturanalysen aufgedeckt wurde [102, 101].

Die Fähigkeit der pH-Wertregulation der Na^+/H^+ -Austauscher legt die Anwesenheit eines „pH-Sensors“ innerhalb der Proteinstruktur nahe, der eine Änderung der Protonenkonzentration detektiert. Ein potentieller Kandidat für die Bildung eines pH-sensitiven Systems ist die Aminosäure Histidin (His), da sie als Restgruppe ein Imidazol trägt. Unter allen Aminosäureresten stellt das Imidazol die einzige Gruppe dar, die innerhalb des physiologischen pH-Bereichs direkt ionisierbar ist [94]. Beim *NhaA* konnte durch gezielte Substitution der 8 in dem Protein vorhandenen Histidine eines gefunden werden,

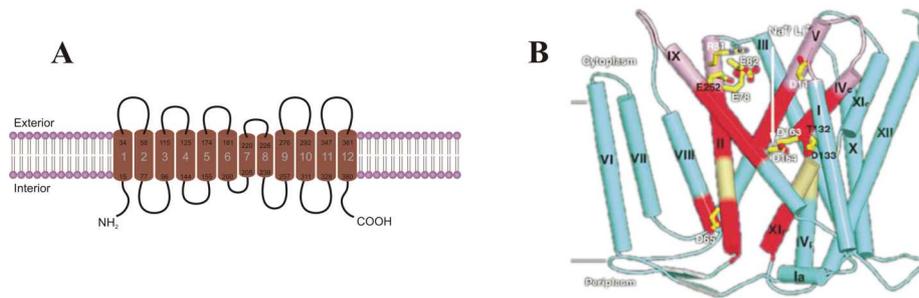


Abbildung 1.23: Struktur des NhaA. In A ist die Sekundärstruktur gezeigt. B zeigt die 3-dimensionale Tertiärstruktur [39].

das an dem pH-sensorischen System beteiligt ist (His²⁵⁵) [26, 71]. Überraschenderweise stellte sich durch Zugänglichkeitsstudien und die später durchgeführten Strukturanalysen (siehe oben) heraus, dass dieses Histidin an der periplasmatischen Seite der Membran lokalisiert ist [61]. Es mussten also weitere sensorische Gruppen existieren, die eine Detektion des cytosolischen pH-Werts ermöglichen, und His²⁵⁵ ist eventuell nur indirekt an diesem System beteiligt. Weitere Studien entschlüsselten eine Reihe von Aminosäuren in der Verbindungsschleife zwischen den Transmembranhelizes 8 und 9, die einen Einfluss auf die pH-Sensitivität des NhaA aufweisen [25, 89]. Den größten Effekt hat dabei eine Punktmutation, bei der das Glutamat Glu²⁵² gegen Cystein (Cys) ausgetauscht wird. Im Gegensatz zu der ersten His²⁵⁵-Mutante (His²⁵⁵ → Arg), bei der eine Verschiebung des pH-Profiles in den sauren Bereich stattfindet, bewirkt die Punktmutation des Glu²⁵² eine Verschiebung um eine vollständige Dekade in den alkalischen pH-Bereich [89]. Durch eine bereits zuvor durchgeführte Punktmutation innerhalb der Transmembranshelix 11 an der Stelle des Glycins Gly³³⁸ durch Serin resultierte ein Transporter, der keine pH-Wert-Abhängigkeit mehr aufweist [70, 105]. In der Arbeit von Hunte et. al. [39] wird vermutet, dass die Transmembranhelix 9 über polare Wechselwirkungen den Mechanismus der zuvor erwähnten Kationenbindungsstelle beeinflusst. Eine Konformationsänderung unter Einbeziehung der Verbindungsschleife zwischen den Helizes 8 und 9, die bei alkalischem pH auftritt, wurde bereits vorher beschrieben [25]. Dieser Mechanismus könnte auch Aufschluss über die Beteiligung der Aminosäure Gly³³⁸ geben, die in der Mitte von Helix 11 angesiedelt ist. Sie bildet zusammen mit Helix 4 die Kationenbindungsstelle. Wenn der Substituent des Gly³³⁸ auf die polaren Wechselwirkungen zwischen Helix 9 und der Bindungsstelle Einfluss nähme, könnte die Blockierung der Bindungsstelle bei niedrigen pH-Werten behindert sein, und das Protein würde seine pH-Wert-Abhängigkeit verlieren. Der genaue Mechanismus der pH-Wert-Detektion und die Summe der beteiligten Aminosäuren konnten allerdings bisher nicht vollständig aufgeklärt werden.

1.4.3 Das Bacteriorhodopsin BR

Bacteriorhodopsin ist ein Protein aus dem Archaea *Halobacterium salinarium*. Dieser extremophile Organismus kommt in Gewässern mit hohem Salzgehalt (z.B. Salinen) vor und bevorzugt eine optimale Natriumchloridkonzentration von 4,3 M [48, 44]. In solchen extrem salzhaltigen Umgebungen sind oft erhöhte Temperaturen vorherrschend, und der Sauerstoffgehalt des Mediums ist gering. Aus diesem Grund nutzen die Halobakterien zusätzlich mit Hilfe des Bacteriorhodopsins die Lichtenergie zur Erzeugung eines Protonengradienten über die Cytoplasmamembran, der für die ATP-Synthese notwendig ist

[96]. Bacteriorhodopsin (BR) ist eine lichtgetriebene Protonenpumpe, die ihre Transportenergie aus der Adsorption von Photonen bestimmter Wellenlänge erhält und demnach ein primär aktives Transportsystem darstellt. Es liegt in den Halobakterien in Bereichen der Cytoplasmamembran vor, die wegen ihrer violetten Farbe Purpurchromatophoren genannt werden. Diese Membrananteile weisen ein gewichtsanteiliges Lipid- zu Protein-Verhältnis von 1:3 auf [48]. BR ist das einzige Protein, das in den Purpurchromatophoren vorkommt, und es formiert sich zusammen mit den wenigen Lipiden zu einer 2-dimensionalen hexagonalen Kristallstruktur, wobei sich die BR-Moleküle als Trimere zusammenlagern. Die violette Farbe erhalten die Purpurchromatophoren durch ein Derivat des Vitamins A, dem Retinal, das stark im grünen Bereich absorbiert und kovalent an BR gebunden ist. Retinal ist als Chromophor die Grundlage der Photoaktivierung des BR und wird auch als dessen prosthetische Gruppe bezeichnet. Ohne Retinal spricht man von dem Protein als Opsin.

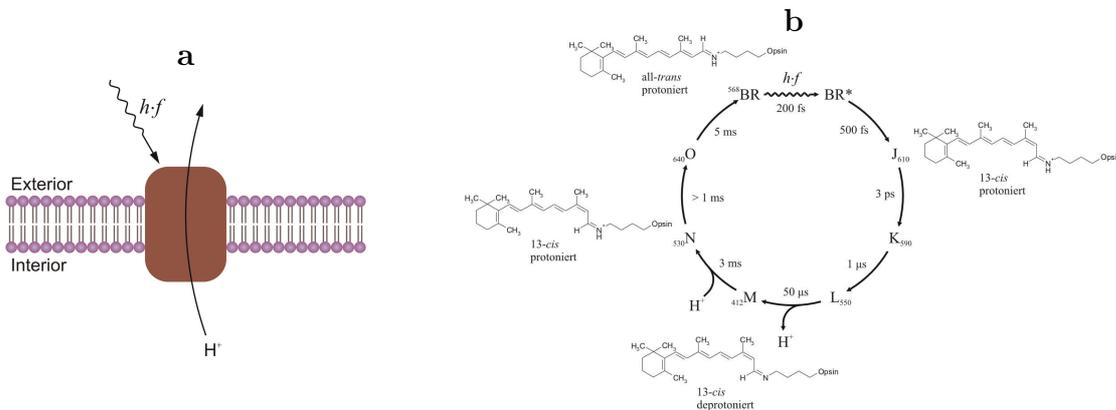


Abbildung 1.24: Stöchiometrie (a) und Photozyklus (b) des Bacteriorhodopsins mit den Zeitkonstanten der Übergänge und den Retinalisomerationsstadien sowie der Protonierung der Schiff-Base.

Mit einem Molekulargewicht von 26,7 kDa und einer Länge von 248 Aminosäuren ist BR ein relativ kleines Protein. Es besteht aus 7 integralen Transmembranhelizes (Abb. 1.25), die sich zu einer Art zweireihigen Pyramidenstumpfes (hinten vier, vorne drei Helizes) zusammenfalten, von denen 5 Helizes einen Kanal bilden in dessen Mitte der Chromophor Retinal angesiedelt ist. Es wird von den Helizes vollständig umschlossen. Die Verbindung des Retinals mit dem Opsin erfolgt über das Lysin Lys²¹⁶ in der siebten Transmembranhelix, die mit G bezeichnet wird [48]. Lys²¹⁶ bildet mit der Aldehydgruppe des Retinals eine Schiff-Base aus, die im Ausgangszustand des Transportzyklusses protoniert vorliegt. Der Transportzyklus, der auch als Photozyklus bezeichnet wird, ist im Gegensatz zur scheinbaren Einfachheit der Proteinstruktur relativ komplex, da er an mehrere simultan ablaufende Zyklen gebunden ist (Ladungsbewegung, Konformationsänderungen, Lichtadsorption und Retinalkonfiguration) [13]. Der Photozyklus ist schematisch in Abb. 1.24 b dargestellt. Es existieren mehrere spektroskopisch unterscheidbare Zustände. Den ersten Übergang im Photozyklus stellt die Absorption eines Photons dar, durch das ein angeregtes Photoprodukt BR* entsteht. Dieses fällt entweder direkt in den Ausgangszustand zurück, oder es durchläuft den Photozyklus und erlangt den Ausgangszustand auf diesem Weg wieder. Im letzteren Fall wird das Retinal durch das absorbierte Photon am 13. Kohlenstoff isomerisiert. Es geht von der all-trans-Konfiguration in die 13-cis-Form über (siehe Abb. 1.24 b). Es folgen die Übergänge zu den Zuständen J, K und L, die wie alle anderen Zustände (M, N und O) durch ihre absorbierende Wellenlänge gekennzeichnet

sind. Die mit der Isomerisierung einhergehende Änderung des temporären pK-Werts der Schiff-Base veranlasst im Übergang vom Zustand L nach M die Deprotonierung der Schiff-Base [75], wobei sich als Akzeptor ein Aspartat in der Helix C anbietet. Es handelt sich um das Aspartat Asp⁸⁵, welches das Proton aufnimmt und in einem der nächsten Schritte wieder abgibt, so dass es ins Periplasma gelangt. Im nächsten Übergang von M nach N wird die Schiff-Base des Retinals von der cytoplasmatischen Seite reprotoniert, wobei ein protoniertes Aspartat Asp⁹⁶, das ebenfalls in der Helix C sitzt, als Protonendonor dient. Nun geht das Protein in zwei weiteren Schritten in den Ausgangszustand zurück, wobei das Retinal in die all-*trans*-Konformation reisomerisiert und das Aspartat Asp⁹⁶ aus der cytosolischen Phase reprotoniert wird.

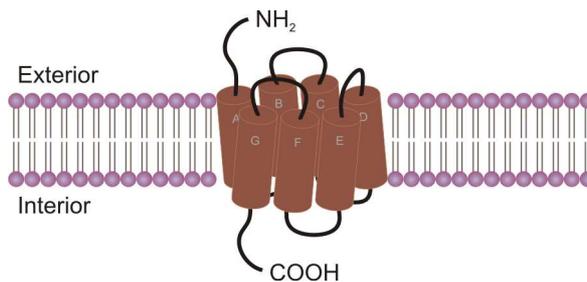


Abbildung 1.25: Struktur von Bacteriorhodopsin

In Tabelle 1.2 sind die dielektrischen Koeffizienten α_i für die einzelnen Übergänge dargestellt [47], die in dem Photozyklus in Abb. 1.24 b gezeigt sind. Da pro Reaktionszyklus ein Proton transportiert wird, wurde die Summe der Werte auf Eins normiert.

Übergang	α_i
BR \rightarrow K	-0,024
K \rightarrow L	-0,004
L \rightarrow M	0,1
M \rightarrow O	0,62
O \rightarrow BR	0,3
$\sum \alpha_i$	0,992

Tabelle 1.2: Dielektrizitätskoeffizienten der einzelnen Übergänge im Photozyklus von BR

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Im folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, deren Abkürzungen und die Bezugsquelle, alphabetisch nach dem Namen der Chemikalie sortiert, in der Form einer Tabelle zusammengefasst. Die Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a. (*pro analysi*: zur Analyse).

Name	Abkürzung	Mol.-Gew. (g/mol)	Bezugsquelle
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol	Tris	121,14	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
2-Aminoperimidin	AP	264,13	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Ammoniummolybdat	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	1163,8	APPLICHEM, Darmstadt, Deutschland
Bicinchoninsäure	BCA	344,33	PIERCE BIOTECHNOLOGIES, INC, Rockford, USA
Bovine Serum Albumin	BSA		PIERCE BIOTECHNOLOGIES, INC, Rockford, USA
Chloroform	CHCl_3	119,38	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Cholinchlorid	ChCl	139,63	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Cholindihydrogencitrat	Ch-Citrat	295,3	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Complete (Protease Inhibitor Cocktail)			ROCHE DIAGNOSTICS, Basel, Schweiz
2-(N-Cyklohexylamino)ethansulfonsäure	CHES	207,3	APPLICHEM, Darmstadt, Deutschland
n-Dekan	$\text{C}_{10}\text{H}_{22}$	142,3	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Dihydrokainat	DHK	215,25	TOCRIS BIOSCIENCE, Bristol, UK
Diisothiocyanostilbene-disulphonsäure	DIDS	498,5	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_2	174,18	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_2	141,96	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland

Name	Abkürzung	Mol.-Gew. (g/mol)	Bezugsquelle
1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DiPhyPC	846,26	AVANTI POLAR LIPIDS INC., Alabaster, USA
Dithiothreiol	DTT	154,25	APPLICHEM, Darmstadt, Deutschland
n-Dodekan	C ₁₂ H ₂₆	170,34	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Dodekyl- β -D-maltosid	DDM	510,63	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
<i>E. coli</i> polarer Lipidextrakt	EPL	\approx 921,0	AVANTI POLAR LIPIDS INC., Alabaster, USA
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	46,07	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Fluoreszin (Natriumsalz)		376,27	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
L-Glutamat	L-Glu	147,13	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
D-Glutamat	D-Glu	147,13	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Glycerin	C ₃ H ₅ (OH) ₃	92,10	APPLICHEM, Darmstadt, Deutschland
n-Hexadekan	C ₁₆ H ₃₄	226,45	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
n-Hexan	C ₆ H ₁₄	86,17	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
3-Hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]isoxazole-6-carboxylsäure	HIP-B	172,14	TOCRIS BIOSCIENCE, Bristol, UK
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperatinethansulfonsäure	HEPES	238,31	APPLICHEM, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	C ₃ H ₈ OH	60,1	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	KCl	74,55	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₂	136,09	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid	KOH	56,11	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumthiocyanat	KSCN	97,18	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Kupfersulfat	CuSO ₄	249,68	PIERCE BIOTECHNOLOGIES, INC, Rockford, USA
Lithiumchlorid	LiCl	42,39	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	203,3	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumaspartat	Na-Asp, L-Asp	173,10	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Natriumchlorid	NaCl	58,44	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Na-Citrat	258,07	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₂	119,98	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland

Name	Abkürzung	Mol.-Gew. (g/mol)	Bezugsquelle
Natriumhydroxid	NaOH	40,0	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiocyanat	NaSCN	81,07	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
N-Methyl-D-glukamin	NMG	195,22	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
n-Oktadekan	C ₁₈ H ₃₈	254,50	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Oktadekanthiol	ODT	285,6	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Oktaethylenglycol- monododecylether	C ₁₂ E ₈	538,8	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
n-Oktan	C ₈ H ₁₈	114,22	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
n-Pentan	C ₅ H ₁₂	72,15	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Perchlorsäure	HClO ₄	100,46	MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethansulfonylflourid	PMSF	174,19	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Polystyroldivinylbenzol	Bio-Beads		BIO-RAD LABORATORIES, INC., Hercules, USA
Rhodamin 6G	Rh6G	479,01	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342,30	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	HCl	36,46	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄	98,08	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
DL-threo-β-benzyloxyaspartat	TBOA	257,25	TOCRIS BIOSCIENCE, Bristol, UK
Zitronensäure	C ₆ H ₈ O ₇	192,13	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Chemikalien

2.2 Verwendete Messlösungen

Im folgenden sind die standardmäßig verwendeten Grundpuffer für die verschiedenen Messprotokolle mit den jeweiligen Proteinen angegeben, mit denen die Experimente an festkörperunterstützten Membranen durchgeführt wurden. Abweichungen von diesen Puffersystemen sind an den entsprechenden Stellen in dieser Arbeit angegeben.

- **Grundpuffer für Bacteriorhodopsin:**
10 mM Na-Citrat, 100 mM NaCl, pH 6,0/NaOH.
- **Grundpuffer für Natrium-Protonen-Austauscher:**
25 mM HEPES, 25 mM Tris, 50 mM KCl, 6 mM MgCl₂, pH 8.5/KOH (nicht-aktivierende und aktivierende Lösung).
- **Grundpuffer für EAAC1:**
30 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 140 mM NaCl, pH 7.4/NMG (nicht-aktivierende und

aktivierende Lösung),
30 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 140 mM KCl, pH 7.4/NMG (Ruhelösung),
oder
120 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4 (nicht-aktivierende und aktivierende Lösung),
120 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.4 (Ruhelösung).

2.3 Herstellung der biologischen Proben

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine bzw. proteinhaltigen Membranen lagen in verschiedenen Aufreinigungsstufen vor, oder sie wurden bei der IONGATE BIOSCIENCES GMBH, Frankfurt, aus kultivierten Zellen präpariert. Der über eine Ni-NTA-Säule¹ gereinigte Natrium-Protonen-Austauscher NhaA aus *E. coli* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Etana Padan vom INSTITUTE OF LIFE SCIENCE der HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM zur Verfügung gestellt und für den Einsatz auf festkörperunterstützten Membranen im Rahmen dieser Arbeit in Liposomen rekonstituiert (Proteoliposomen). Das Bacteriorhodopsin wurde aus Purpurmembranen des *Halobacterium salinarium* gereinigt und ebenfalls in Liposomen rekonstituiert. Zu Vergleichszwecken wurde Bacteriorhodopsin heterolog in chinesischen Hamsteroovarien (CHO: Chinese Hamster Ovary) exprimiert und über eine Membranpräparation aufgereinigt. Dabei erhält man Cytoplasmamembranen und Membranen aus dem *Endoplasmatischen Reticulum* der Zelle, die direkt auf der festkörperunterstützten Membran verwendet werden können. Analog zum Bacteriorhodopsin wurde auch der neuronale Glutamattransporter EAAC1 in CHO-Zellen überexprimiert und durch eine anschließende Membranpräparation zugänglich gemacht.

2.3.1 Zellkultur

Die Klonierung und die Kultivierung der für diese Arbeit verwendeten Zellen wurde freundlicherweise von Dr. Renate Gauß aus der Molekularbiologie der IONGATE BIOSCIENCES GMBH und ihren MitarbeiterInnen durchgeführt. Der neuronale Glutamattransporter EAAC1 und das archeale Bacteriorhodopsin wurden heterolog in Zellen aus chinesischen Hamsteroovarien (CHO: Chinese Hamster Ovary) exprimiert. Dazu wurden jeweils stabile rekombinante Zelllinien hergestellt. Für den EAAC1 kam als Vektor ein kommerziell erwerbbares Plasmid (Fa. INVITROGEN, San Diego, USA) zum Einsatz, in den die aus mRNA für Froschoozyten mittels Umkehrtranskription gewonnene cDNA umkloniert wurde. Der EAAC1-Klon verfügte über einen zusätzlichen N-terminalen HA-Tag² und wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Wolfgang Schwarz vom MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIK in Frankfurt zur Verfügung gestellt. Der Herkunftsorganismus war die Maus (*Mus musculus*), weshalb auch die Abkürzung mEAAC1 verwendet wird. Die Transfektion der Zellen mit dem Vektor wurde durch das Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Fa. ROCHE, Basel, Schweiz) eingeleitet, von dem lediglich bekannt ist, dass es sich um eine spezielle, nicht liposomenbildende Mischung von Lipiden und anderen Substanzen handelt, die eine hohe Transfektionseffizienz aufweisen soll. Über ein zusätzlich auf dem eingebrachten Plasmid vorhandenes Resistenzgen gegenüber dem Antibiotikum Zeocin ist

¹Nitriloessigsäure (NTA: *Nitrilotriacetic acid*) ist ein Komplexbildner und geht eine Chelatverbindung mit Nickelionen (Ni²⁺) ein.

²HA (Hämagglutinin) ist ein integrales Membranprotein des Influenzavirus A, und weist eine Bindungsstelle (Antigen) für Antikörper auf.

es möglich, eine antibiotische Selektion durchzuführen. Für 14 bis 17 Tage wurden die Zellen adhärent in Medium mit Hams F12 Nährlösung mit Glutamin, fötalem Kälberserum (beides Fa. PAA, Parsching, Österreich) und Zeocin (Fa. INVITROGEN) selektiert, wobei nur die Zell-Kolonien die Zeocinbehandlung überlebten, die das Resistenzgen, also auch den EAAC1, stabil³, exprimieren. Die Expression wurde mittels Westernblot (siehe 2.1) mit einem anti-HA-Antikörper und elektrophysiologischen Messungen verifiziert. Die so gewonnene Zelllinie wurde in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Bei Bedarf konnten Zellen aufgetaut und in Medium kultiviert werden. Nach der Ernte wurden die Zellen in Calcium- und Magnesium-freien Dulbeccos PBS-Puffer (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,15 g/L Na₂HPO₄, 0,2 g/L KH₂PO₄) gesammelt, gewaschen und in einem Zentrifugationsschritt für 20 Minuten bei 1000 g/+4°C pelletiert. Mit dem Zellpellet wurde entweder direkt eine Membranpräparation durchgeführt, oder es wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -75°C gelagert. Die Herstellung der CHO-Zelllinie mit rekombinant exprimiertem Bacteriorhodopsin erfolgte analog zu dem Protokoll für den EAAC1. Das Bacteriorhodopsin enthielt zur Expressionskontrolle ein fusioniertes GFP-Molekül (GFP: Green fluorescent protein), und das Zellmaterial wurde von der Fa. CCS (CELL CULTURE SERVICE, Hamburg, Deutschland) bezogen.

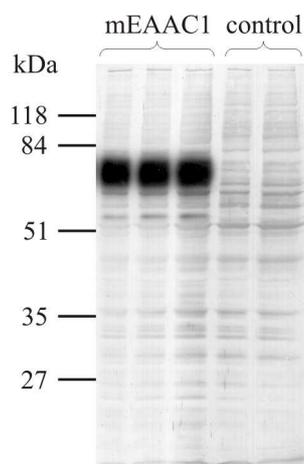


Abbildung 2.1: Westernblot mit CHO-mEAAC1 und HA-Antikörper. Die in Gegenwart von Benzonase lysierten CHO-Zellen wurden mit einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) aufgetrennt. Der Westernblot erfolgte über eine Immunodetektion mit einem primären HA-Antikörper und einem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper (HRP: Horse radish peroxidase), wobei die HRP die zur Filmbelichtung notwendige Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Die 3 Banden auf der linken Seite zeigen den mEAAC1 bei ca. 80 kDa (wegen Glykosilierung). Kontrollzellen (rechts) zeigen keine Bande. Die Gewichtsmarkierungen stammen aus einer parallel aufgetrennten Standardproteinmischung (Molecular weight marker).

2.3.2 Membranpräparation

Die Durchführung der Membranpräparationen wurde durch freundliche Hilfe von Dr. Kerstin Dieckert von der IONGATE BIOSCIENCES GMBH unterstützt. Mit Ausnahme der

³Stabil bedeutet, dass die eingebrachte Fremd-DNA mit repliziert wird und bei der Mitose an beide Tochterzellen weitergegeben wird, so dass im Gegensatz zu einer transienten Transfektion keine Verdünnungserscheinungen auftreten.

Pufferzusammensetzung, in der später die Zellmembranen aufgenommen wurden, war die Vorgehensweise identisch für die oben angegebenen Zelllinien. Zuerst wurden die eingefrorenen Zellen (ca. 2 g pro Aliquot) bei 37 °C aufgetaut und in einem Puffer (pH 7,5) aufgenommen, der 250 mM Saccharose, 5 mM Tris, 2 mM DTT, 0,5 µL/mL ethanolische Lösung, gesättigt mit Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), und 1 Tablette/50 mL Complete (Protease Inhibitoren) enthielt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Scherung mit einem Wheaton Glas/Glas-Homogenisator. Von der lysierten Zellsuspension wurden anschließend in zwei aufeinander folgenden Zentrifugationsschritten die Zellkerne (10 min bei 700 g/+4 °C) und Mitochondrien (10 min bei 6100 g/+4 °C) präzipitiert. Der von den Zellkernen und Mitochondrien befreite Überstand wurde dann in einer Ultrazentrifuge für eine Stunde bei 100 000 g/+4 °C in einem Ausschwingrotor (SW41) pelletiert und im Anschluss in Puffer (5 mM Tris, pH 7,5) und 70 %iger Saccharoselösung (5 mM Tris, pH 7,5) aufgenommen, so dass eine Gesamtzuckerkonzentration von 51 %⁴ entstand. Diese Lösung wurde in einem Polycarbonatröhrchen sukzessiv mit Saccharoselösungen verschiedener Konzentrationen (45 %, 31 % und 9 %) überschichtet, so dass ein stufenförmiger Dichtegradient entstand, der für 1 Stunde und 30 Minuten bei 100 000 g/+4 °C in einem Ausschwingrotor (SW41) zentrifugiert wurde. Durch die Zentrifugation des Dichtegradienten entstehen Fraktionen aus Zellmaterial, die sich entsprechend ihrer eigenen Dichte an den Phasengrenzen der Dichtestufen sammeln, wobei sich bei den hier vorgegebenen Dichtestufen vorzugsweise Membranen aus der Cytoplasmamembran und dem *Endoplasmatischen Reticulum* anreichern. Die nach der Zentrifugation erhaltenen Fraktionen an den Phasengrenzen 31 %/45 % und 9 %/31 % wurden separat gesammelt und in Grundpuffer für das jeweilige Protein aufgenommen (10 mM Na-Citrat, 100 mM NaCl, pH 6,0 für BR und 30 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 140 mM KCl, pH 7,4 für EAAC1). In einem weiteren Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 150 000 g/+4 °C mit einem Festwinkelrotor (Ti70.1) wurden die Membransuspensionen pelletiert und in Grundpuffer, der zusätzlich 10 % Glycerin enthielt, resuspendiert. Abschließend wurden die Membranen in 10 µL-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -75°C gelagert. Der Erfolg der Membranpräparation wurde mittels Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA: bicinchoninic acid) und Elektronenmikroskopie (siehe 2.4.3) nachgewiesen.

2.3.3 Solubilisierung von Bacteriorhodopsin aus Purpurmembranen

Bacteriorhodopsin in Purpurmembranen wurde nach dem folgenden Protokoll aufgereinigt. Die Prozedur wurde immer direkt vor einer geplanten Rekonstitution des Proteins in Liposomen durchgeführt. Eine Stammlösung mit einer BR-Konzentration von 9 mg/mL (Purpurmembranen) aus *Halobacterium salinarium* wurde volumenanteilig 1:4 mit Puffer (10 mM Na-Citrat, 100 mM NaCl, pH 6,0) verdünnt und mit einer Lösung gemischt, die das Detergenz C₁₂E₈ enthielt, so dass sich eine Proteinkonzentration von 2 mg/mL und eine Detergenzkonzentration⁵ von 10 mg/mL ergab. Das Protein-Detergenz-Gemisch

⁴Für die Angabe in % ist hier definiert: 1 % = 1 g/100 mL. Dadurch ergibt sich für eine Lösung mit x % Zucker eine Dichte von $(x/100 + 1)$ kg/L, wenn für das wässrige Lösungsmittel eine Dichte von 1 kg/L vorausgesetzt wird.

⁵Die kritische Mizellenkonzentration (CMC: critical micellar concentration) liegt für C₁₂E₈ bei 0,06 mg/mL. Um ein Membranprotein in Lösung zu halten, muss die Detergenzkonzentration signifikant über der CMC liegen, weil das Detergenz bei Unterschreitung lediglich als Monomer vorliegt.

wurde dann für 5 Minuten bei 55 °C in einem Thermomixer bei 1400 U/min geschüttelt, um das Bacteriorhodopsin aus den Purpurmembranen zu lösen, und anschließend bei Raumtemperatur für 5 Minuten mit 5000 U/min zentrifugiert. Der aus der Zentrifugation resultierende violettfarbene Überstand enthielt das solubilisierte Protein, das, wie im nächsten Abschnitt erläutert wird, weiterverarbeitet wurde.

2.3.4 Rekonstitution von solubiliertem Protein

Das aufgereinigte Protein liegt üblicherweise solubilisiert in einer detergentenhaltigen Lösung vor. Um es gezielt in einem künstlichen Membransystem zu rekonstituieren, können verschiedene Methoden zur Erzeugung von Proteoliposomen angewendet werden. Allen Verfahren gemein ist die Tatsache, dass zur Ausbildung der liposomalen Doppelschicht Lipide hinzugefügt und die vorhandenen Detergenzien aus dem System entfernt werden müssen. Entscheidend für die Verwendung eines speziellen Verfahrens ist die Verträglichkeit für das Protein hinsichtlich seiner Aktivität, die es möglichst in vollem Umfang erhalten sollte. Im folgenden sind die Rekonstitutionsprotokolle für den Natrium-Protonen-Austauscher (NhaA) und das Bacteriorhodopsin (BR) angegeben, die sich in der Art der Lipidzugabe unterscheiden. Als Basis für die Rekonstitution wurde in beiden Fällen in Chloroform gelöster polarer Lipidextrakt aus *E.coli* (Fa. Avanti, St. Louis, USA) in ein Glasröhrchen gefüllt und mit einem Rotationsverdampfer mit Stickstoff vom Lösungsmittel befreit. Der entstandene Lipidfilm wurde anschließend für eine Stunde im Vakuum getrocknet. Die Lipidzusammensetzung des polaren *E.coli*-Extrakts besteht in Gewichtsanteilen aus 67 % Phosphatidylethanolaminen, 23,2 % Phosphatidylglycerolen und 9,8 % Cardiolipinen mit jeweils unbekanntem Längen der Fettsäurereste. Die Raumstruktur dieser Lipide, besonders der Phosphatidylethanolamine, ist gut für die Herstellung von Liposomen geeignet. Der Erfolg der Rekonstitutionen wurde mittels Proteinbestimmung mit BCA, Phosphatbestimmung und Elektronenmikroskopie (siehe 2.4.3) nachgewiesen.

NhaA

Der Natrium-Protonen-Austauscher NhaA lag solubilisiert in dem Detergenz Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) in einer Konzentration von 2,5 mg/mL vor. Vor der Zusammenführung von Protein und Lipid wurden die, wie oben beschrieben, getrockneten polaren *E.coli*-Lipide in Puffer (25 mM HEPES, 25 mM Tris, 100 mM ChCl, pH 7,0/KOH) aufgenommen und mit einer Glasperle gevortext, bis der Lipidfilm vollständig suspendiert war. Danach wurde der Lipidsuspension das Detergenz DDM zugegeben (eingestellte Endkonzentration⁶ 10 mg/mL) und die Mischung mit einem Ultraschallstab (Dr. Hielscher UP50H, 50 W, 30 kHz, 1 mm Sonotroden Durchmesser) bei maximaler Leistung beschallt, bis die Mischung opaleszent war. Die Aufklärung der Lipidsuspension ist auf die Lösung der Lipide im detergentenhaltigen Medium zurückzuführen, weil sich dadurch Mischmizellen bilden, die eine Änderung der Lichtstreuung hervorrufen. Diese Lösung wurde dann mit dem solubilierten Protein und Puffer gemischt, so dass sich die gewünschten Endkonzentrationen ergaben. Die Lipidkonzentration wurde auf 10 mg/mL eingestellt, und die Proteinkonzentration wurde auf 1 mg/mL, 0,1 mg/mL oder auf 0,02 mg/mL eingestellt. Dadurch sollten die sich später bildenden Proteoliposomen ein Lipid- zu Protein-Verhältnis von LPR 10, LPR 100 oder LPR 500 (LPR: *Lipid to protein ratio*) aufweisen. Die Lipid-Protein-Mischung wurde für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Entfernung

⁶Die kritische Mizellenkonzentration liegt für DDM bei 0,3 mg/mL (25 °C).

des überschüssigen Detergenz erfolgte danach über eine Behandlung mit Polystyrolkugeln (Bio-Beads der Fa. BIO-RAD, Hercules, USA). Dabei wurde die Protein-Liposomen-Lösung mit den in Puffer gewaschenen Bio-Beads im Volumenverhältnis 1:3 in einem Glasfläschchen gemischt und für ca. 12 Stunden bei +4 °C magnetisch gerührt. Nach dieser Zeit wurde die Proteoliposomenlösung abgenommen, erneut mit Bio-Beads im Verhältnis 1:5 gemischt und nochmals 1 Stunde bei +4 °C gerührt. Die so gereinigten Proteoliposomen wurden von den Bio-Beads getrennt und bei Raumtemperatur für 6 Minuten mit 10 000 U/min zentrifugiert. Der resultierende Überstand war von verbliebenen Bio-Bead-Partikeln befreit und wurde in 10 µL-Portionen aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -75 °C gelagert.

BR

Für die Rekonstitution von Bacteriorhodopsin in Liposomen wurden zuerst vorgeformte detergentfreie Liposomen mit einem Extruder (LiposoFast-Basic der Fa. AVESTIN, Ottawa, Kanada) hergestellt. Dazu wurden die oben angegebenen polaren *E.coli*-Lipide in Puffer (10 mM Na-Citrat, 100 mM NaCl, pH 6,0) aufgenommen und mit einer Glasperle gevortext, bis der Lipidfilm vollständig suspendiert war. Die erhaltene Lipidsuspension wurde in einer Spritze aufgenommen und an den Extruder angeschlossen, in dem die Suspension 21 mal eine Polycarbonatmembran mit einer definierten Porengröße von 100 nm passieren musste. Durch die Membranpassage entstehen nach Herstellerangaben unilamellare Liposomen mit homogener Größenverteilung. Die extrudierte Liposomenlösung war opaleszent und wurde mit dem solubilisierten Bacteriorhodopsin gemischt. Die Konzentrationsverhältnisse wurden dabei über die Mischvolumina mit Puffer so eingestellt, dass die Lipidkonzentration 10 mg/mL, und die Proteinkonzentration 1 mg/mL betrug, also ein Lipid- zu Protein-Verhältnis von LPR 10 vorlag. Die weitere Vorgehensweise ist analog zu dem Protokoll für den Natrium-Protonen-Austauscher. Die Protein-Liposomen-Mischung wurde in Volumenanteilen 1:3 mit Bio-Beads gemischt und für ca. 12 Stunden der Bio-Bead-Behandlung unterzogen. Die Bio-Beads wurden danach ausgetauscht, nun im Verhältnis 1:5 gemischt und die Behandlung für eine Stunde fortgesetzt. Nach der Abnahme der Proteoliposomen wurden sie bei Raumtemperatur für 6 Minuten mit 10 000 U/min zentrifugiert und der Überstand in 10 µL-Portionen aliquotiert. Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Aliquots wurden bei -75 °C gelagert.

2.4 Charakterisierung der biologischen Proben

Die biologischen Proben, deren Herstellung im letzten Abschnitt behandelt wurde, sind mit Hilfe von verschiedenen Untersuchungsmethoden charakterisiert worden. Dazu zählen Messungen, durch die der Proteingehalt oder die Lipidkonzentration einer Probe bestimmt werden können. Desweiteren wurden bildgebende Verfahren eingesetzt, um topologische bzw. geometrische Merkmale der verschiedenen Membranstrukturen (Liposomen, Vesikel und flächige Membranfragmente) zu untersuchen. Andere Methoden wurden genutzt, um physikalische Parameter, wie z.B. die Diffusionskonstanten der Membranstrukturen aufzuklären. Bezüglich des Verhaltens einer Probe als Teil des Sensors wurden elektrische Eigenschaften und Anlagerungszeiten bestimmt. Im Folgenden sollen die zur Anwendung gekommenen Methoden kurz erläutert werden.

2.4.1 Proteinbestimmung mit BCA

Die Bicinchoninsäure (BCA: bicinchoninic acid) ist ein Komplexbildner, wobei zwei Moleküle mit einwertigen Kupferionen eine koordinative Bindung eingehen. Der Komplex absorbiert grünes Licht und ist deshalb violettfarben. Um BCA für die quantitative Proteinbestimmung einzusetzen, wird eine biologische Probe, die die zu detektierenden Proteine enthält, zusätzlich mit zweiwertigen Kupferionen versehen. Das zweiwertige Kupferion wird durch polare Aminosäurereste (z.B. Cystein, Cystin, Tryptophan, Tyrosin) reduziert und verbindet sich dann mit der Bicinchoninsäure. Als biologische Proben wurden Proteoliposomen mit rekonstituiertem Protein und CHO-Fragmente aus einer Membranpräparation verwendet, die entsprechend der Vorgehensweise bei der Sensorvorbereitung verdünnt wurden. Eine BCA-Lösung wurde mit Kupfersulfat angereichert und im Verhältnis 1:8 mit einer gewünschten Anzahl der verdünnten Proben gemischt. Diese Mischungen wurden in einer Mikrotiterplatte untergebracht und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die durch die Färbung auftretende Absorption mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert. Für die Kalibrierung der daraus bestimmten optischen Dichten wurde ein Standardprotein verwendet, das während der gesamten Prozedur separat in verschiedenen Mengen vorhanden war. Dabei kam Rinderserumalbumin (BSA: Bovine serum albumine) in Massenanteilen von 0 bis 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ zum Einsatz.

2.4.2 Phosphatbestimmung nach Fiske-Subbarow

Die Phosphatbestimmung nach Fiske-Subbarow [21] ist dazu geeignet, die Konzentration von Phospholipiden in einer biologischen Probe zu bestimmen, wenn das Lipid die einzige bzw. dominierende phosphathaltige chemische Spezies ist. Als biologische Proben wurden hier Proteoliposomen mit rekonstituiertem Protein oder aus CHO-Zellen präparierte Membranfragmente verwendet. Die Proben wurden in Glasröhrchen gegeben und im Ofen bei 200 °C für 25 min eingetrocknet. Danach wurde ein Volumen von 300 μL 70 %iger Perchlorsäure (HClO_4) in je ein Röhrchen pipettiert und jedes einzelne Röhrchen mit einer Glasmurmeln abgedeckt. Die so vorbereiteten Röhrchen wurden für 3 Stunden in ein 180 °C warmes, beheiztes Sandbecken gestellt. Die Perchlorsäure spaltet die Lipide und setzt dabei die Phosphatgruppe frei. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurde in jedes Röhrchen 3 mL einer Ammoniummolybdat-Lösung (1,8 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ in verdünnter Schwefelsäure (20 % H_2SO_4)) und 120 μL des Fiske-Subbarow-Reagenz (0,7 M Natriumdisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 40 mM Natriumsulfit (Na_2SO_3) und 2,5 mg/mL 1-Amino-2-naphthalen-4-sulfonsäure) gegeben. Das Ammoniummolybdat fällt das gelöste Phosphat zu Phosphomolybdat, welches dann durch das Fiske-Subbarow-Reagenz reduziert wird und eine blaue Farbe annimmt. Die Mischung wurde gevortext und danach für 15 Minuten im Wasserbad gekocht (wiederum mit Glasmurmeln abgedeckt). Nach Abkühlung wurden die Proben in eine Mikrotiterplatte abgefüllt. Deren Konzentrationen konnten durch Lichtadsorptionsmessungen bei 830 nm mit einem Spektralphotometer bestimmt werden. Für die Kalibrierung der gemessenen Proben wurde bei der Durchführung der geschilderten Prozedur ein Phosphatstandard mitbehandelt, der aus verschiedenen Konzentrationen (10 bis 80 nM) einer Kaliumdihydrogenphosphatlösung (KH_2PO_4) bestand.

2.4.3 Elektronenmikroskopie

Da das Auflösungsvermögen von bildgebenden Verfahren über die Wellenlänge des verwendeten Informationsträgers (z.B. Photonen bei Lichtmikroskopie) begrenzt ist, können die Membranstrukturen, die hier vorlagen (Liposomen, Vesikel, flächige Membranfragmente) nicht mittels lichtmikroskopischer Methoden erfasst werden, weil der mittlere zu erwartende Durchmesser eine Größenordnung von 100 nm aufwies. Daher wurde die Elektronenmikroskopie eingesetzt, um die Größe und die Topologie der Membranstrukturen zu untersuchen. Die elektronenmikroskopischen Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Winfried Haase vom MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIK in Frankfurt durchgeführt. Dabei wurden entweder Proteoliposomen mit rekonstituiertem Protein oder CHO-Membranfragmente, die aus einer Membranpräparation hervorgehen, mit der Gefrierbruchmethode untersucht. Vor einer elektronenmikroskopischen Untersuchung wurde mit den biologischen Proben hinsichtlich Verdünnung und Beschallung die gleiche Prozedur wie bei der Vorbereitung eines Sensors durchgeführt, damit die Proben genau so vorlagen, wie es der Fall ist, wenn sie in das Sensorreservoir gegeben werden (siehe 2.5). Die vorbereiteten Proben wurden zwischen zwei Kupfertellerchen gegeben, deren Oberflächen durch Abstandshalter getrennt waren. Zusammen mit den Proben wurden sie dann in flüssigem Methan eingefroren, das in flüssigem Stickstoff unterhalb der Siedetemperatur gehalten wurde. Die gefrorene Probe wurde auseinandergebrochen und mit Platin bedampft. Die dadurch abbildbaren Strukturen sind größtenteils über die Bruchstellen durch die Mitte einer biologischen Membran gegeben. Die Lipiddoppelschicht einer Membranstruktur bricht vorzugsweise genau zwischen den zwei Membranhälften auseinander. Das Platinabbild der Gefrierbruchprobe wurde mit einem Transmissionselektronenmikroskop durchleuchtet. Die Transmissionsvariante der Elektronenmikroskopie ähnelt vom Prinzip her der Durchlichtmikroskopie. Die Probe muss entsprechend dünn sein, damit sie von den zur Probe hin beschleunigten Elektronen durchdrungen werden kann. Auf der Unterseite der Probe wird die Elektronenintensität detektiert und orts aufgelöst in der Form von Bildpunkten dargestellt. Die für ein kontrastreiches Bild notwendigen Inhomogenitäten in der Platinschicht kommen durch einen schrägen Bedampfungswinkel zustande, wenn die Gefrierbruchprobe platinisiert wird (Schrägbeschattung).

2.4.4 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS: Fluorescence correlation spectroscopy) basiert auf dem konfokalen Prinzip [52, 53]. Das dazu verwendete konfokale Lasermikroskop fokussiert den Laser auf die Probe. Die Optik des Mikroskops ist so ausgelegt, dass das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht mit der gleichen Brennweite folgend auf eine Blende trifft, durch deren Öffnung somit nur das aus dem Fokus (der in der Probe liegt) stammende Licht scharf abgebildet werden kann. Als Messgröße dient die Intensität der Photonen, die die Blende passieren und dort mit einem Photomultiplier detektiert werden. Wird ein konfokales Mikroskop zur Bildgebung eingesetzt, kann der Fokus in allen 3 Raumrichtungen durch die Probe bewegt werden. Regt der Laser dabei in der Probe vorhandene (oder angebrachte) Fluoreszenzfarbstoffe an, wird dieses induzierte Licht detektiert und kann über die Raumkoordinaten des Fokus einem Bildpunkt zugeordnet werden. Die Probe wird Schritt für Schritt ausgemessen (gerastert), und die Auflösung des Verfahrens ist über die Größe des Fokus gegeben. Der Fokus hat die Form eines Rotationsellipsoiden mit Abmessungen im Bereich von wenigen μm . Diese Größe ist nicht ausreichend, um Partikel, die kleiner als $1 \mu\text{m}$ sind, darzustellen, weshalb mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie

keine Oberflächenanalysen vorgenommen werden konnten. Die FCS hingegen basiert auf Änderungen der Fluoreszenz im Fokus, der an einer bestimmten Stelle in der Probe ruht. Als biologische Proben kamen dabei Liposomen zum Einsatz, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszin gefüllt waren. Fluoreszin besitzt ein Adsorptionsmaximum bei 497 nm und emittiert die Fluoreszenzphotonen mit 521 nm. Die Herstellung der Liposomen erfolgte durch Extrusion nach dem Protokoll, das im vorigen Abschnitt für Bacteriorhodopsin erläutert wurde. Es erfolgte jedoch keine Proteinzugabe. Stattdessen wurde der Farbstoff Fluoreszin hinzugemischt und zusammen mit den Liposomen beschallt, damit der Farbstoff in das Liposomeninnere gelangt. Durch einen Waschvorgang mit einer PD-10-Säule (Größenausschlusschromatographie) wurden die farbstoffgefüllten Liposomen von dem freien Farbstoff getrennt. Der Teil des Eluats, in dem sich die Liposomenfraktion befand, wurde durch fluorometrische Messungen bestimmt (siehe Abb. 2.2). Die gewonnenen farbstoffgefüllten Liposomen wurden in ein Probeneinsatzgefäß für das konfokale Mikroskop gegeben und dort eingesetzt. Der Fokus wurde manuell in die Probe gefahren und die Anregung erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm. In dem Detektionspfad war ein Bandpassfilter vorhanden, der für Wellenlängen von 530 nm bis 600 nm durchlässig war. Die Aufzeichnung des Fluoreszenzkorrelationspektrogramms erfolgte durch die dem Gerät beiliegende Steuersoftware. Dabei wird über die Intensitätsänderungen im Fokus die mittlere Aufenthaltsdauer eines Partikels im Fokus bestimmt, wodurch z.B. auf die Partikelgröße und die Diffusionskonstante geschlossen werden kann. Die Messungen während dieser Arbeit wurden am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR POLYMERFORSCHUNG in Mainz mit einem LSM/FCS 510 der Fa. CARL ZEISS (Jena, Deutschland) durchgeführt.

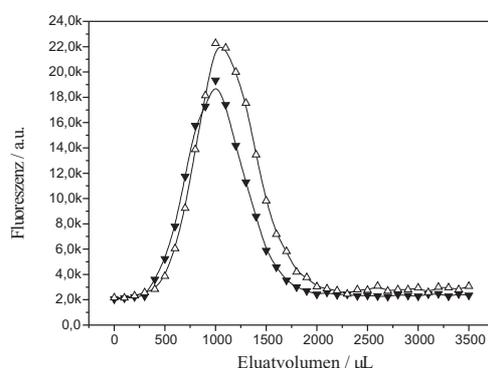


Abbildung 2.2: Eluatfluoreszenz zur Bestimmung der Liposomenfraktion. Die mit Fluoreszin gefüllten Liposomen wurden vor der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie über eine PD-10-Säule gewaschen. Es wurden Volumenproben des Eluats entnommen, um über die jeweilige Fluoreszenz die Volumenfraktion zu bestimmen, in der sich die Liposomen befinden. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, befinden sich die Liposomen im Bereich von 600 bis 1600 µL. Dieses Volumen wurde für die Messungen verwendet. Die zwei dargestellten Kurven stellen Liposomensuspensionen mit verschiedenen Fluoreszinkonzentrationen dar. (Δ) 10 µM Fluoreszin und (\blacktriangledown) 1 µM Fluoreszin. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 485 nm, und die Emission wurde bei 525 nm aufgezeichnet.

2.4.5 Quarzmikrowaage

Bei der Quarzmikrowaage handelt es sich um ein System, mit dem die Interaktion der biologischen Proben mit einer Sensoroberfläche hinsichtlich der durch die Adsorption erfolgenden Massenzunahme detektiert werden kann [41]. Als Sensoroberfläche kamen Gol-

delektroden mit etablierter festkörperunterstützter Membran zum Einsatz, die nach dem im nächsten Abschnitt beschriebenen Protokoll hergestellt wurden. Die Goldschicht war abweichend von dem Protokoll auf ein spezielles Quarzglas aufgedampft, und auf der Rückseite war ebenfalls eine Goldelektrode als Gegenkontakt vorhanden. Zwischen diesen beiden Elektroden wurde ein hochfrequentes elektrisches Feld angelegt, wodurch der Quarz in Schwingung versetzt wird. Das Schwingungsverhalten des Quarzes hängt unter anderem davon ab, wie seine Kristallstruktur zum elektrischen Feld orientiert vorliegt [41]. Hier wurden AT-Schnitt-Quarze verwendet, die eine geringe Temperaturanfälligkeit aufweisen und bei denen eine Scherschwingung senkrecht zur Feldrichtung entsteht. Bei Messungen mit der Quarzmikrowaage wird der Strom in Abhängigkeit von der angelegten Spannung gemessen. Über die Änderung der Frequenz der Spannung kann somit die Resonanzfrequenz⁷ des Systems bestimmt werden. Wenn nun eine Anlagerung bzw. Massenzunahme an der Goldelektrode stattfindet, die den für die biologische Probe zugänglich gemachten Sensor bildet, so verändert sich das Schwingverhalten des Systems, was mit einer Änderung der Resonanzfrequenz einhergeht. Diese Änderung ist nun proportional zur Massenzunahme an der Sensoroberfläche. Des Weiteren kann das Dämpfungsverhalten (Dissipation) der adsorbierten Probe untersucht werden, indem das Abklingverhalten der Schwingung des Quarzes nach Wegnahme des Feldes aufgezeichnet wird. Diese Zeitkonstante kann Aufschluss über die Viskosität der adsorbierten Probe geben, da viskosere Anhaftungen ein langsames Abklingen hervorrufen, denn sie hemmen den Abklingvorgang. Wie zuvor bei der Fluoreszenzkorelationsspektroskopie wurden Liposomen, die kein Protein enthalten, auf ihr Anlagerungsverhalten hin untersucht. Die vorbereiteten Sensoren wurden dabei in eine speziell konstruierte Messküvette eingebaut, in der sämtliche notwendigen Kontakte, verbunden mit der Messeinrichtung vorhanden waren. Eine Schlauchpumpe förderte Puffer in einem geschlossenen Kreislauf zur Messküvette, wobei der Sensor in der Küvette mit relativ geringer Durchflussgeschwindigkeit (ca. 1 mL/min) konzentrisch angeströmt wurde. An einem Punkt des fluidischen Kreislaufs war ein Ausgleichsbehälter vorhanden, der die Zugabe der biologischen Probe bei laufendem Experiment gestattete. Die Zugabe erfolgte im Regelfall, nachdem das System equilibriert vorlag und wenige Minuten, nachdem die Aufzeichnung der Resonanzfrequenz gestartet wurde. Die in dieser Arbeit präsentierten Messungen mit der Mikroquarzwage wurden am INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE CHEMIE der JOHANNES-GUTENBERG-UNIVERSITÄT in Mainz durchgeführt.

2.5 Vorbereitung der Sensoren

Die Sensoren, deren Schichtaufbau in Kapitel 1.3.1 bereits erläutert wurde, sollten in der Form von 96er Elektrodenarrays ausgelegt sein (siehe Abb. 2.3), wobei gängige 96er Mikrotiterplatten als Basis verwendet wurden, um die Übertragbarkeit auf ein Hochdurchsatzsystem zu gewährleisten. Dabei sollten die fertiggestellten Sensoren eine biochemisch behandelte Elektrode auf dem Boden einer jeden Kammer der 96er Platte aufweisen, in denen durch einen speziellen Einsatz die Injektionskammer für den schnellen Lösungswechsel realisiert wurde. Zusätzlich sollte durch das dadurch gebildete Reservoir über der Elektrodenoberfläche die biochemische Sensorvorbereitung erleichtert werden. Die Herstellung der 96er Elektrodenarrays und die biochemische Präparation werden im Folgenden beschrieben.

⁷Resonanz liegt vor, wenn das frequenzabhängige Amplitudenverhältnis maximal ist.

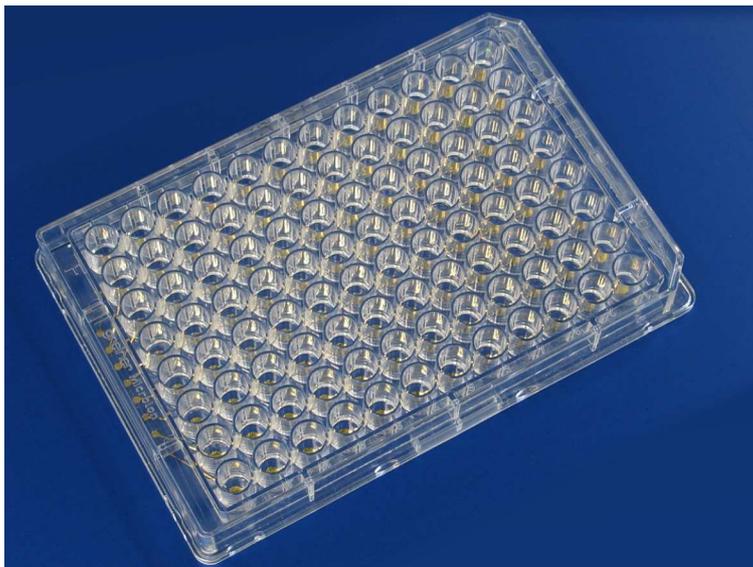


Abbildung 2.3: 96er Elektrodenarray

2.5.1 Herstellung der 96er Elektrodenarrays

Als Basis für die Sensoren diente ein Glassubstrat, das als Boden für eine 96er Mikrotiterplatte (Fa. GREINER BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgelegt war. Für die Herstellung der auf dem Glassubstrat aufgebrachtten Goldelektroden wurden rechteckige, mit Isopropanol gereinigte Borosilikatgläser (BOROFLOAT33 der Fa. SCHOTT AG, Mainz, Deutschland) mit einer Kantentänge von 115 mal 77,5 mm verwendet und in eine speziell dafür konstruierte Schattenmaske eingebaut. In einer Bedampfungsanlage (IMM, Mainz, Deutschland) wurde mittels Elektronenstrahlverdampfung eine 200 nm dicke Goldschicht auf das Substrat aufgebracht, die entsprechend der freien Strukturen in der Schattenmaske organisiert waren. Eine vor dem Gold aufgedampfte, 5 nm dicke Titanschicht diente dabei als Haftvermittler. Das Glassubstrat mit den aufgedampften Goldstrukturen (Elektroden Durchmesser 1 mm) wurde im Anschluss an den Bedampfungsvorgang direkt in eine isopropanolische Lösung mit 1 mM Oktadekanthiol eingelegt und für mindestens 6 Stunden inkubiert, damit sich die selbstorganisierende Monolage (SAM) des Alkanthiols ausbilden konnte. Nach der Inkubation wurden die Glassubstrate mit Isopropanol und Reinstwasser gespült und im Anschluss mit Stickstoff trockengeblasen. Das Glassubstrat mit den nun mercaptanisieren vorliegenden Goldelektroden wurde als Boden für eine 96er Mikrotiterplatte, die ohne Boden von der Fa. Greiner bezogen wurde, verwendet. Die Verklebung erfolgte nach betriebsinternen Vorschriften der IONGATE BIOSCIENCES GMBH.

2.5.2 Biochemische Sensorvorbereitung

Um ein Experiment vorzubereiten, musste die mercaptatisierte Goldelektrode zuerst mit einer Lipidmembran versehen werden, um die festkörperunterstützte Membran auszubilden. Dafür wurde eine Lipidlösung verwendet, bei der das Lipid Diphytanoylphosphatidylcholin (DiPhyPC) in einer Konzentration von 5 mg/mL oder 10 mg/mL in n-Dekan gelöst vorlag. DiPhyPC (Abb. 2.4) ist ein synthetisches Lipid und wird gemeinhin wegen seiner

guten Temperaturstabilität⁸ eingesetzt [69]. Zum Teil wurden in dieser Arbeit andere organische Lösungsmittel (z.B. n-Oktan oder -Dodekan) verwendet. An den entsprechenden Stellen in dieser Arbeit wird darauf hingewiesen. Von der verwendeten Lipidlösung wurde ein 1 μL -Tropfen mit einer Pipette vorsichtig auf der Elektrodenoberfläche abgesetzt und anschließend 50 μL Puffer (im Regelfall die nicht-aktivierende Lösung oder die Ruhelösung, die auch für das Experiment verwendet wurde) hinzugegeben. Für einen kurzen Zeitraum, in dem die proteinhaltigen Proben vorbereitet wurden, ruhte die festkörperunterstützte Membran. Ein Aliquot von 10 μL der bei $-75\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrten, proteinhaltigen Proben (Proteoliposomen oder Membranfragmente aus einer Membranpräparation) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und mit dem gleichen Puffer, der zuvor schon für die Ausbildung der Lipidmembran verwendet wurde, auf ein Viertel verdünnt. Die verdünnte Probe wurde dann mit einem Ultraschallstab der Fa. DR. HIELSCHER (UP50H, 50 W, 30 kHz, 1 mm Sonotrodendurchmesser) mit 10 Impulsen bei 50 % Amplitude und einem Taktverhältnis von 0,5 beschallt, um die Membranstrukturen zu homogenisieren. Im Anschluss wurde die Probe nochmals um einen Faktor 5 bis 7,5 mit Puffer verdünnt und gut gemischt, bevor sie mit der festkörperunterstützten Membran in Kontakt gebracht wurde. Dabei wurde das im Sensorreservoir vorhandene Volumen vollständig abgenommen und direkt danach ein gleich großes Volumen (50 μL) der proteinhaltigen Probe hinzugegeben. Durch diese Vorgehensweise sollte gewährleistet werden, dass eine homogene Verteilung der proteinhaltigen Membranstrukturen vor der Elektrode vorliegt und ein Anlagerungsvorgang immer den gleichen Ausgangszustand aufweist. Der so beladene Sensor wurde für mindestens 2 Stunden bei $+4\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, damit sich die Membranstrukturen auf der Oberfläche anlagern. Oft wurde die beschriebene Sensorvorbereitung auch am Vorabend eines geplanten Experiments durchgeführt und der Sensor über Nacht bei $+4\text{ }^\circ\text{C}$ ruhen gelassen. Um Verdampfung des Puffers bei längeren Inkubationszeiten zu vermeiden, wurde ein Tesafilmstreifen über die Öffnung des Sensorreservoirs geklebt und erst vor dem Experiment wieder entfernt.

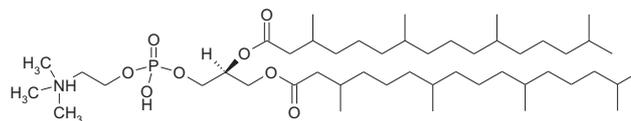


Abbildung 2.4: Diphytanoylphosphatidylcholin

2.6 Messaufbau

Kernstück einer jeden Messung ist die Injektionskammer, in der ein Sensor konzentrisch mit Lösung angeströmt wird. Um eine solche Messkammer direkt in einem einzelnen Kammervolumen einer 96er Mikrotiterplatte zu realisieren, wurde ein spezieller Einsatz konstruiert, der in die Kammer gesteckt wurde und über O-Ringe zur Kammerwand hin abdichtete, so dass keine Lösung über undefinierte Wege aus dem System entweichen konnte. Der schematische Aufbau der entstandenen Injektionskammer ist in Abb. 2.5 dargestellt. Zum Abfluss aus der Messkammer war eine exzentrische Bohrung vorhanden, durch die die Lösung zu einem angeschlossenen Müllbehälter fließen konnte. Über eine zweite, exzentrische Bohrung war das Volumen über dem Sensor mit der Referenzelektrode verbunden.

⁸DiPhyPC weist keine Phsenübergänge bei Standardbedingungen auf.

Die Referenzelektrode war entweder eine Silber-Silberchloridelektrode (Ag/AgCl), oder eine ITO-Elektrode (ITO: Indiumzinnoxid), die jeweils in direktem Flüssigkeitskontakt mit der Lösung stand. Durch die Unterbringung in einem Seitenzweig, in dem die Lösung ruhte, wurde die Bildung von elektrischen Artefakten unterbunden, die durch leicht unterschiedliche Salzkonzentrationen bei einem Lösungswechsel auftreten können, weil sie das Potential der Referenzelektrode stören. Die unbewegte Flüssigkeitssäule vor der Referenzelektrode (Abstand zur Sensoroberfläche ca. 4-5 cm) erfüllte den Zweck einer Salzbrücke. Die darin enthaltene Lösung konnte über eine anschließbare Spritze bequem ausgetauscht und den Pufferverhältnissen des jeweiligen Experimentes angepasst werden.

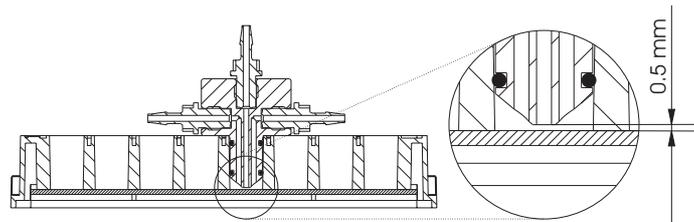


Abbildung 2.5: Technische Zeichnung des Injektionseinsatzes, der zusammen mit einer Kammer (Well) des 96er Sensorarrays die Injektionskammer bzw. Messkammer bildet. Die Zeichnung zeigt einen Schnitt durch den Injektionseinsatz und die 96er Mikrotiterplatte, in dem die Kanäle der Lösungszufuhr (Mitte) und die Ausgangskanäle (links und rechts) sichtbar sind. Einer der Ausgangskanäle wurde mit der Referenzelektrode und der andere Ausgangskanal mit einem Abfallgefäß verbunden.

2.7 Schnelle Lösungswechsel

In Abb. 2.6 ist der Messaufbau gezeigt, der in dem Gerät der IONGATE BIOSCIENCES GMBH realisiert wurde. Die Produktreihen, die Messungen mit Sensoren auf der Basis von festkörperunterstützten Membranen erlauben, heißen SURF²ER (*Surface Electrogenic Event Reader*). Der hier verwendete SURFE²R besaß den Status eines Experimentiergerätes, das auf der technologischen Seite für die Entwicklung eines Prototypen verwendet wurde. Auf der biochemischen Seite wurde mit dem Gerät Grundlagenforschung und Assayentwicklung durchgeführt. Fast alle in dieser Arbeit präsentierten Messungen von schnellen Lösungswechseln wurden mit dem dargestellten Setup aufgezeichnet. Als Ausnahme sind die mit einem Hochdurchsatzsystem realisierten Messungen zu nennen. Der SURFE²R wies eine große Öffnung auf, in der ein auswechselbarer Einsatz mit Montageplatte (gerasterte Lochplatte mit Innengewinde) untergebracht werden konnte, auf dem der experimentelle Fluidikaufbau mit Hilfe von 2/2-Wege- und 3/2-Wegeventilen der Fa. NRESEARCH (West Caldwell, USA) und Tygon-Schläuchen realisiert wurde. Auf der rechten Seite wurden bis zu 3 Vorratsbehälter mit Pufferlösungen und das Abfallgefäß untergebracht. Als Vorratsbehälter kamen dabei 100 mL oder 200 mL Duranglasflaschen (Schott AG, Mainz, Deutschland) zum Einsatz, die mit Schraubdeckeln verschlossen waren. Die Schraubdeckel besaßen Luer-Lock-Anschlüsse, über die einerseits eine Verbindung zu den Ventilen hergestellt wurde und andererseits die Lösungen mit Druck beaufschlagt werden konnten. Auf der rechten Seite in der Geräteöffnung ist die Schalt- bzw. Anschlussleiste sichtbar, an der Steuerleitungen für bis zu 8 Ventile und ein Druckluft- bzw. Stickstoffanschluss vorhanden waren. Für die elektrische Kontaktierung waren Anschlüsse für die Arbeitselektrode (Sensor) und die Referenzelektrode auf der Schalttafel untergebracht.

Die Ventilschaltung wurde mit dem mittleren Anschluss des Injektionseinsatzes verbunden, der in der 96er Mikrotiterplatte steckt (in Abb. 2.6 handelt es sich um eine schwarze Mikrotiterplatte). Von den seitlichen Anschlüssen geht einer zum Abfallbehälter und der andere zur Referenzelektrode. In Abb. 2.6 handelt es sich bei der Referenzelektrode um eine ITO-Elektrode, die auf einen Ventilfuß geklebt wurde und mit einer Klemme abgegriffen wird, die die Verbindung zur Schalttafel herstellt. Unten in der 96er Mikrotiterplatte steckt ein Kontaktstift, der die Verbindung zum Sensor herstellt und zur Schalttafel geführt wird. Die Öffnung im SURFE²R, in der der Messaufbau realisiert wurde, war aus Edelstahl und konnte mit einem Deckel verschlossen werden (rechts im Bild ist die Gasdruckfeder sichtbar, mit der der Deckel offen gehalten wird). Im geschlossenen Zustand war das System gut degenüber äußeren elektrischen Einflüssen abgeschirmt.

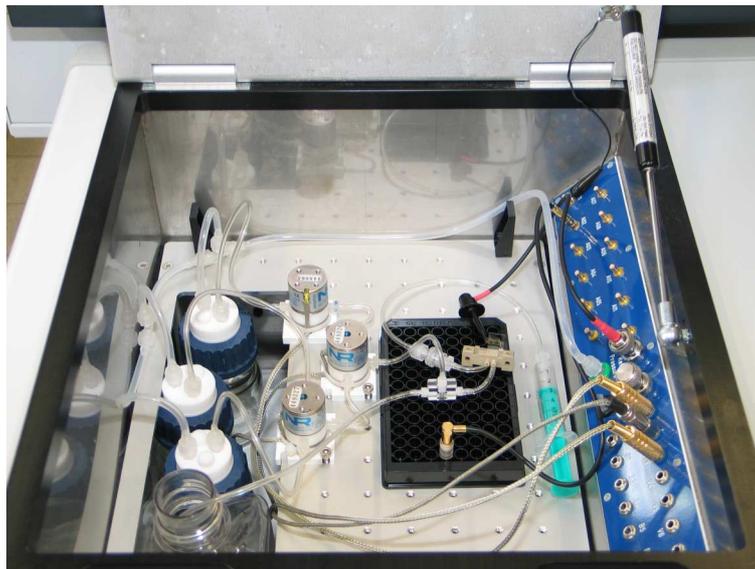


Abbildung 2.6: Messaufbau

Die Messungen erfolgten im geschlossenen Zustand und wurden computergestützt gesteuert. Eine speziell für das Gerät entwickelte Mess- und Steuersoftware auf der Basis von LabView (NATIONAL INSTRUMENTS INC. Austin, USA) erlaubte die Programmierung der Sequenzen (siehe 1.3.2) und die Synchronisierung der Messdatenerfassung, die parallel zur Durchführung einer Sequenz erfolgte. Bei einer Sequenz wurden die im Gerät vorhandenen Ventiltreiber entsprechend der Programmierung geschaltet, und die Stromerfassung erfolgte über einen integrierten Strom-Spannungswandler mit einer nachgeschalteten Analog-Digital-Umsetzungseinheit. Der für die elektrische Charakterisierung notwendige Referenzspannungsgenerator war ebenfalls in das Gerät integriert und konnte manuell eingestellt werden.

2.7.1 Lichtaktivierung

Bei dem lichtaktivierbaren Protein Bacteriorhodopsin war keine Aktivierung über einen schnellen Lösungswechsel notwendig. Die Messung erfolgte dennoch mit dem gleichen Gerät (SURFE²R), das im vorigen Abschnitt beschrieben wurde. Dabei erfolgt eine Anpassung des Messaufbaus, der auf dem variablen Geräteeinsatz vorhanden war. Auf den fluidischen Teil des Messaufbaus (Lösungsbehälter, Ventile, Druckleitungen) konnte voll-

ständig verzichtet werden. Der Injektionseinsatz, der in die 96er Sensorplatte gesteckt wurde, um die Injektionskammer zu bilden (Abb. 2.5), wurde über die zwei seitlichen Anschlüsse mit einer Spritze zum Durchspülen und mit dem Referenzkanal für den elektrischen Abgriff verbunden. In dem konzentrischen Kanal (Injektionskapillare) des Injektionseinsatzes, der bei Lösungswechsel-Experimenten zum Anströmen des Sensors genutzt wurde, wurde ein Lichtleiter eingesetzt (siehe Abb. 2.7), der somit auf den Sensor ausgerichtet vorlag. Um ein Auskapillieren von Pufferlösung zu verhindern, wurde die Kapillare mit Glycerin abgedichtet. Auf das äußere Ende des Lichtleiters wurde eine angebohrte superhelle Leuchtdiode (Luxeon der Fa. LUMILEDS LIGHTING, San Jose, USA) mit 1 W Aufnahmehleistung und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gesteckt. Die Ansteuerung der Leuchtdiode erfolgte über eine der 12 V Ventiltreiberstufen, die von der Anschlussleiste abgegriffen wurde und die ohne weitere Anpassung zu diesem Zweck verwendet werden konnte. In das Anschlusskabel für die Leuchtdiode wurde ein der Diodenleistung entsprechender Vorwiderstand integriert. Die Programmierung der Sequenzen (Lichtzyklen) und die Messdatenerfassung erfolgten mit der vorher erwähnten Software, wobei lediglich der Ventiltreiber, an den die Leuchtdiode angeschlossen war, angesprochen werden musste.

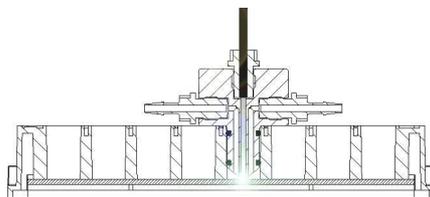


Abbildung 2.7: BR-Messeinsatz mit Lichtleiter in der Kammer (Well) eines 96er Sensorarrays. Eine in den Lichtleiter eingekoppelte Leuchtdiode (nicht gezeigt) diente als Lichtquelle.

2.8 Verwendete Geräte

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte in Form einer Tabelle zusammenfasst. Zusätzlich ist in Abb. 2.8 die verwendete Entwicklungsstufe des SURFE²R-Messgerätes dargestellt.

Gerät	Modell	Hersteller
Extruder	Liposofast-Basic	AVESTIN, Ottawa, Kanada
Fluoreszenzleser	FLEX-Station	MOLECULAR DEVICES CORP, Sunnyvale, USA
Heizplatte/Magnetrührer	ARE heating magnetic stirrer	UNIEQUIP LABORGERÄTEBAU & VERTRIEBS GMBH, Martinsried, Deutschland
Impedanzanalysator	SI-1260	SOLARTRON ANALYTICAL, Hampshire, UK
Konfokales Mikroskop	LSM/FCS 510	CARL ZEISS, Jena, Deutschland
pH-Meter	inoLab pH Level 2	WTW GMBH, Weilheim, Deutschland
Pipettierroboter	MicroLab Duo	HAMILTON COMPANY, Reno, USA
Pipettierroboter	MiniPrep 60	TECAN AG, Männedorf, Schweiz
Reinstwasseranalge	Astacus Reagent	MEMBRAPURE GMBH, Bodenheim, Deutschland

Gerät	Modell	Hersteller
Rotationsverdampfer	RV 05	JANKE & KUNKEL KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Spektralphotometer	Multiscan Spectrum 1500	THERMO LABSYSTEMS, Waltham, USA
SURFE ² R		IONGATE BIOSCIENCES GMBH, Frankfurt, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort 1,5 mL	EPPENDORF AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	5415R	EPPENDORF AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	5810R	EPPENDORF AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad	Transsonic T310	ELMA HANS SCHMIDBAUER GMBH & Co KG, Singen, Deutschland
Ultraschallstab	UP50H	DR. HIELSCHER GMBH, Teltow, Deutschland
Ultrazentrifuge	Optima L-100 XP	BECKMANN COULTER GMBH, Krefeld, Deutschland
Vakuumpumpe	AEPF 63BL-4-S0	ATMA ANTRIEBSTECHNIK, Schwarzenbach/Saale, Deutschland
Vortexer	Top Mix 11118	FISHER BIOBLOCK SCIENTIFIC, Illkirch Cedex, Frankreich

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Geräte



Abbildung 2.8: SURFE²R-Messsystem. Die gezeigte Version, die in dieser Arbeit benutzt wurde, war ein Experimentiergerät, das für die Prototypen-Entwicklung verwendet wurde.

2.9 Softwaregestützte Auswertung

2.9.1 Verwendete Software

Die in dieser Arbeit vorgestellten Diagramme und die darin enthaltenen Annäherungsfunktion wurden mit der Messdatensoftware Origin 6.1 der Fa. MICROCAL SOFTWARE INC. (Northampton, USA) erstellt. Für die Simulation von Konzentrationsanstiegen, Protein- und Messströmen wurde die Tabellenkalkulation Excel aus der Produktfamilie Office der Fa. MICROSOFT CORP. (Redmond, USA) verwendet. Einige Simulationen wurden mit einer selbstprogrammierten Anwendung durchgeführt, die in der objektorientierten Programmierumgebung Visual Basic 6.0 (MICROSOFT) erstellt wurde. Die Auswertung der erhaltenen Messsignale erfolgte mit verschiedenen Programmen. Die Signalamplituden und Integrale (Fläche unter der Kurve) wurden mit der Messdatenerfassungssoftware, die Bestandteil des SURFE²R-Messsystems ist, bestimmt. Integrationen wurden zusätzlich mit Origin 6.1 und Excel durchgeführt. Die Bestimmung von Zeitkonstanten aus einer Signalform erfolgte mit Origin 6.1. Die in dieser Arbeit abgebildeten schematischen Zeichnungen und Illustrationen wurden mit dem Zeichnungsprogramm Corel Draw 11.0 der Fa. COREL CORP. (Ottawa, Kanada) erstellt.

2.9.2 Verwendete Annäherungsfunktionen

Michaelis-Menten-Kinetik

Gleichung 2.1 stellt die Michaelis-Menten-Kinetik dar, die sich aus einer Enzymreaktion der Form $S + E \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ herleitet [85]. Sie stellt den Zustand in dieser Reaktion dar, in dem sich das Substrat S, die Enzymkomplexe E und ES sowie das Produkt P im Gleichgewicht befinden. In Gl. 2.1 wurden die gebräuchlichen Geschwindigkeiten V und V_{max} durch die äquivalenten Ströme i und i_{max} ersetzt. Anstelle der Michaelis-Menten-Konstante K_m wurde die Halbsättigungskonstante $K_{0,5}$ verwendet, da diese Gleichung auch in Situationen verwendet werden kann, bei denen sich eine Reaktion nicht im stationären Zustand befindet und die Bezeichnung K_m somit irreführend ist.

$$i = i_{max} \cdot \frac{c(S)}{K_{0,5} + c(S)} \quad (2.1)$$

Hillfunktion

Die Hillfunktion berücksichtigt bei einer Enzymreaktion die Beteiligung von mehreren Substraten bzw. die Kooperativität, die sich dadurch ergibt [85]. Dafür wird der sogenannte Hillkoeffizient h eingeführt.

$$i = i_{max} \cdot \frac{c^h(S)}{K_{0,5}^h + c^h(S)} \quad (2.2)$$

Für einen Hillkoeffizient von $h = 1$ geht die Hillfunktion genau in die Michaelis-Menten-Kinetik (Gl. 2.1) über.

Kompetitive Inhibition

Das Modell der kompetitiven Inhibition setzt eine Enzymreaktion voraus, bei der das Substrat S mit einem Inhibitor I um die Bindungsstelle an dem Enzym konkurriert [85]. Dabei

tritt die zusätzliche Reaktion $I + E \rightleftharpoons EI$ auf, die eine Reduzierung der aktiven Enzymmenge verursacht. In Gl. 2.3 wird dieser Umstand durch einen Faktor berücksichtigt, der die InhibitorKonzentration und die Inhibitionskonstante K_i enthält. Dadurch ergibt sich eine um diesen Faktor veränderte apparente Halbsättigungskonstante. Verwendet man die halbmaximale Inhibitionskonzentration IC_{50} (hinterer Teil in Gl. 2.3), dann kommt in der Gleichung nicht mehr der sättigende Maximalstrom i_{max} vor, sondern der Strom i_0 , der für die eingesetzte Substratkonzentration in Abwesenheit des Inhibitors erhalten wird.

$$i = i_{max} \cdot \frac{c(S)}{K_{0,5} \cdot \left(1 + \frac{c(I)}{K_i}\right) + c(S)} = i_0 \cdot \frac{IC_{50}}{IC_{50} + c(I)} \quad (2.3)$$

Der IC_{50} lässt sich für eine bestimmte Substratkonzentration $c(S)$ aus K_i bestimmen, wenn die Halbsättigungskonzentration $K_{0,5}$ bekannt ist:

$$IC_{50} = K_i \cdot \left(1 + \frac{c(S)}{K_{0,5}}\right) \quad (2.4)$$

Exponentialfunktion

Zur Bestimmung von Zeitkonstanten τ aus dem Signalverlauf der erhaltenen Messströme wurde eine Funktion an die Messdaten angenähert, die aus der Summe von i Exponentialfunktionen in der angegebenen Form (Gl. 2.5) besteht. Der präexponentielle Faktor A wird als Amplitude der Exponentialfunktion bezeichnet. Für $t \rightarrow \infty$ geht die Funktion gegen einen konstanten Wert A_∞ , der im Regelfall gleich Null ist.

$$f(t) = A_\infty + \sum_{i=1}^N A_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2.5)$$

2.9.3 Numerische Methoden

Integration

Die in dieser Arbeit durchgeführten Integrationen über Signalformen, die in der Form von äquidistanten diskreten Datenpunkten (Messintervall Δt) vorlagen, wurden durch die Anwendung des Trapezverfahrens realisiert [17]. Dabei erfolgt eine Aufsummierung der einzelnen Flächen, die durch die linear verbundenen, benachbarten Datenpunkte gegeben sind. Die Gesamtfläche entspricht dem angenäherten Integral über die, von den Datenpunkten beschriebenen Funktion $y = f(t)$:

$$I = \int_0^t y dt \approx \sum_{k=1}^{N-1} \frac{y_k + y_{k+1}}{2} \cdot \Delta t \quad (2.6)$$

Differentiation

Numerische Differentiationen wurden in dieser Arbeit zur Simulationen von gegebenen Differentialgleichungssystemen durchgeführt. Sie erfolgten durch die Anwendung des Polygonzugverfahrens nach *Euler-Cauchy* [2, 97]. Bei einem gegebenen System von linearen Differentialgleichungen 1. Ordnung erfolgt eine Diskretisierung der Funktionen $dy/dt = f(y, t)$, bei der ein Funktionswert in die Form $y_k = f(k \cdot \Delta t)$ übergeht. Gelöst wird das

Gleichungssystem durch die Annäherung $(dy/dt)_k \approx \Delta y/\Delta t = (y_{k+1} - y_k)/\Delta t$. Der Folgewert y_{k+1} kann somit direkt aus seinen Vorgängern berechnet werden:

$$y_{k+1} \approx y_k + \Delta t \cdot \left(\frac{dy}{dt}\right)_k \quad (2.7)$$

Der Wert der Ableitung lässt sich bei bekanntem y_k durch die lineare Dgl. $(dy/dt + a \cdot y = b)$ bestimmen:

$$\left(\frac{dy}{dt}\right)_k = b - a \cdot y_k \quad (2.8)$$

Als Randbedingungen müssen die Funktionswerte y_0 und $(dy/dt)_0$ zum Zeitpunkt $t = 0$ bzw. $k = 0$ bekannt bzw. bestimmbar sein.

Die angenäherte Funktion wird um so genauer, je kleiner das Diskretisierungsintervall Δt gewählt wird [97]. Gegebenenfalls kann eine Anpassung der Größe entsprechend der Größenordnung der Steigung $(dy/dt)_k$ erfolgen, wodurch die erhaltenen Datenpunkte nicht Äquidistant sind. Bei den Simulationen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde Δt konstant gehalten. Es betrug minimal $\Delta t = 10^{-5}$ s. Bei entsprechender Notwendigkeit wurde das Zeitintervall so weit verringert, dass bei weiterer Verringerung keine Änderung des simulierten Kurvenverlaufs mehr auftrat.

Kapitel 3

Charakterisierung der Methode

3.1 Der Lösungswechsel

Der Konzentrationsanstieg an der Sensoroberfläche hängt von den gegebenen strömungsmechanischen Eigenschaften in der Injektionskammer ab. In 1.3.2 wurde bereits erwähnt, dass in dem Schlauchsystem vor dem Injektionseinsatz, der zusammen mit der Kammer der 96er Mikrotiterplatte die Injektionskammer bildet, ein laminarer Fluss vorherrscht, wobei ein Geschwindigkeitsprofil in der Form eines Rotationsparaboloiden vorliegt. Ob es sich um laminaren Fluss handelt kann mit Hilfe der Reynoldszahl bestimmt werden [90, 88]. Die verwendeten Tygon-Schläuche besaßen einen Innendurchmesser d von $1/16''$ (ca. 1,59 mm). Zusammen mit der Dichte ρ , der Viskosität η des fließenden Mediums, dem Innendurchmesser d und der mittleren Fließgeschwindigkeit $\bar{v} = \dot{V}/A$ gilt für die Reynoldszahl Re , wenn man von einer starren Rohrleitung ausgeht:

$$Re = \frac{\rho \cdot \bar{v} \cdot d}{\eta} = \frac{\rho \cdot \dot{V} \cdot d}{A \cdot \eta} = \frac{4 \cdot \rho \cdot \dot{V}}{\pi \cdot d \cdot \eta} \quad (3.1)$$

Dabei sind \dot{V} die Flussrate und $A = \pi \cdot d^2/4$ die Querschnittsfläche des Schlauches. Die Flussrate des Systems wird durch den Druck vorgegeben, mit dem die Vorratsbehälter, die den Puffer für das jeweilige Experiment enthalten, beaufschlagt sind. In Abb. 3.1 ist die Abhängigkeit der Flussrate des Messsystems (SURFE²R) von dem angelegten Druck dargestellt. Die Abhängigkeit wurde für einen Bereich von 50 mbar bis zu dem Maximaldruck von 1000 mbar, der mit dem Messsystem realisiert werden konnte, bestimmt. Die einzelnen Volumina wurden für eine vorgegebene Zeit, in der Druck angelegt war, an dem Abfallschlauch des Systems aufgefangen und abgewogen. Das Messsystem war entsprechend eines gewöhnlichen Experiments vollständig aufgebaut. Die drei Lösungswege (Ruhelösung, nicht-aktivierende und aktivierende Lösung) wiesen, durch gleichlange Schlauchverbindungen zwischen den Behältern und den Ventilen gleichgroße Flussraten auf. Die in Abb. 3.1 dargestellte Abhängigkeit zeigt die Flussrate dV/dt der aktivierenden Lösung, da in dieser der relevante Lösungswechsel stattfand, wenn ein Protein aktiviert werden sollte. Bei linearer Auftragung der Flussrate gegen den Druck (links) wird deutlich, dass der Zusammenhang über den gesamten Messbereich nicht linear ist. Da bei laminarem Fluss ein linearer Zusammenhang erwartet werden sollte muss die Nicht-linearität auf Elemente in dem System zurückgeführt werden, die ein nicht-lineares Verhalten aufweisen. Eine mögliche Erklärung ist, dass der gesamte Messaufbau teilturbulent ist. Allerdings kann der Einfluss von nicht-linearen Elementen auf das Strömungsverhalten in dem Schlauchstück vor dem Sensor vernachlässigt werden, weil der relevante Lösungswech-

sel im letzten Ventil vor dem Sensor stattfindet. Die Nicht-linearität des Fluss-Druck-Verhaltens kann jedoch zur Grenzwertbetrachtung für die Bestimmung der maximalen Reynoldszahl herangezogen werden. Auf der rechten Seite von Abb. 3.1 sind jeweils die Kehrwerte der Flussrate und des Drucks gegeneinander aufgetragen. Es entsteht eine Gerade, die einen Ordinatenschnittpunkt aufweist, der die maximale Flussrate bei unendlich hohem Druck beschreibt. Sein Wert liegt bei $0,133 \text{ 1/(mL/s)}$ und ergibt somit eine maximale mögliche Geschwindigkeit von $7,5 \text{ mL/s}$. Mit der Dichte und der Viskosität von Wasser $\rho = 1 \text{ kg/L}$, $\eta = 10^{-3} \text{ Ns/m}^2$ und dem Innendurchmesser $d = 1,59 \text{ mm}$ ergibt sich die maximale Reynoldszahl zu $Re_{max} = 6006$. Der kritische Wert Re_{krit} , der den Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung darstellt, liegt für Rohrleitungen bei 2300. Das heißt, es ist durchaus möglich, turbulente Strömung zu erzeugen, wenn der Druck entsprechend hoch gewählt wird. Der kritische Wert Re_{krit} liegt genau dann vor, wenn die Flussrate $2,9 \text{ mL/s}$ beträgt. Dieser Wert der Flussrate befindet sich allerdings gerade oberhalb der durch die Regeleinrichtung des Messsystems gesetzten Grenze von 1000 mbar als anlegbarem Druck. Es kann hier somit davon ausgegangen werden, dass über den gesamten Druckbereich hinweg laminare Strömung vorliegt, die den Gesetzmäßigkeiten nach *Hagen-Poiseuille* [90, 88] folgt. Die hinsichtlich des Aktivierungsprozesses eventuell vorteilhafte Tatsache, dass ein turbulentes Strömungsprofil eine homogenere Lösungsfront aufweist als der laminare Rotationsparaboloid, konnte mit diesem Messsystem nicht untersucht werden.

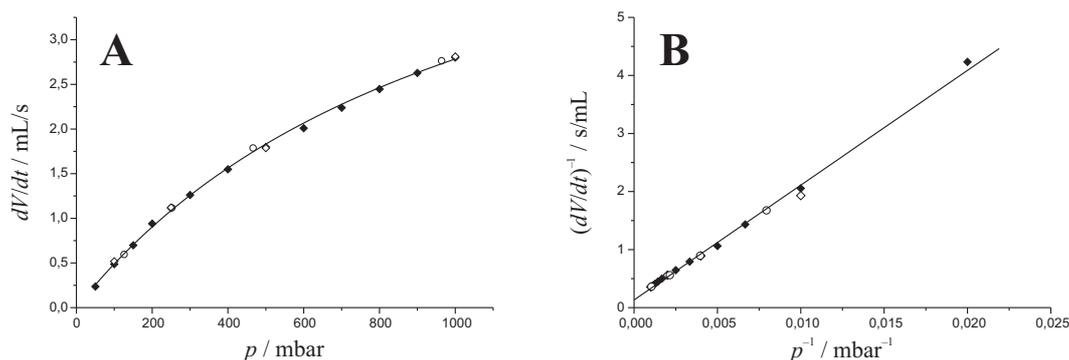


Abbildung 3.1: Flussrate in Abhängigkeit von dem angelegten Druck. In A ist die aus dem Druck resultierende Flussrate des SURFE²R-Messsystems in linearer Auftragung dargestellt. B zeigt die gleichen Datenpunkte mit einer reziproken Skalierung der Achsen. Die geschlossenen Rauten stellen eine zusammenhängende Messung über den gesamten zur Verfügung stehenden Druckbereich dar. Die offenen Symbole sind stichprobenartig durchgeführte Flussratenmessungen, die innerhalb einer Zeitperiode von ca. einem Jahr ermittelt wurden.

3.1.1 Zuleitungsdispersion

Wenn das Ventil vor dem Sensor zur aktivierenden Lösung schaltet, bewirkt das Geschwindigkeitsprofil in der Schlauchleitung, dass sich die Lösung vom Ventil ausgehend ebenfalls in der Form eines Rotationsparaboloiden auf die Sensoroberfläche zubewegt. Dabei kann angenommen werden, dass keine Vermischung der in dem Rotationsparaboloiden vorhandenen aktivierenden Lösung mit der nicht-aktivierenden Lösung stattfindet, die von der aktivierenden Lösung verdrängt wird. Um den Konzentrationsanstieg der verdrängenden Lösung an der Sensoroberfläche zu beschreiben, wurde bislang ein idealer Mischvorgang in einer Schnittfläche parallel zur Sensoroberfläche angenommen [64]. Die

Schematik, die für die physikalische Beschreibung der Zuleitungsdispersion¹ des Lösungswechsels herangezogen werden kann, ist in Abb. 3.2 dargestellt. Sie zeigt den Schnitt durch eine vereinfachte Injektionskammer (a) mit den vorhandenen Geschwindigkeits- und Streckenprofilen ($v(r)$, $s(r,t)$) und die Form eines Rotationsparaboloiden (b).

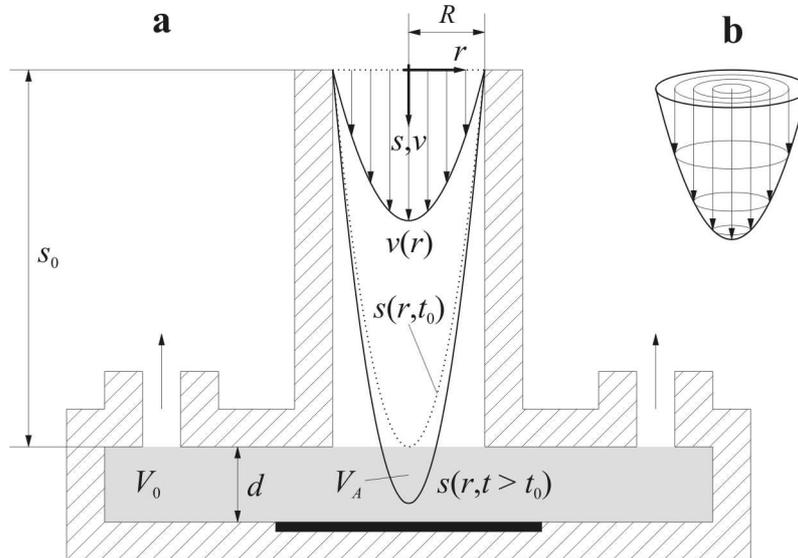


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Lösungswechsels. Die Skizze repräsentiert den vereinfachten Aufbau der Injektionskammer (a) mit angeschlossenen Zuleitungen und Ausgangsöffnungen. Der Abstand von dem Startpunkt des Lösungswechsels ($s = 0$) zur Austrittsöffnung der Injektionskapillaren ist s_0 . Von dort aus liegt die Sensoroberfläche im Abstand d vor, der zusammen mit der Grundfläche der Injektionskammer das Mischvolumen V_0 (grauer Bereich) bildet. Im Zuleitungskanal (Radius R) sind das Geschwindigkeitsprofil $v(r)$ bei $s = 0$ und von dort ausgehend die Streckenprofile $s(r,t)$ für $t = t_0$ und $t > t_0$ eingezeichnet. Das in den Mischbereich eingedrungene Volumen des Streckenprofils ist V_A . Zusätzlich ist die 3-dimensionale Darstellung eines Rotationsparaboloiden abgebildet (b).

Die Geschwindigkeit in dem Schlauchstück zwischen Ventil und Sensor (der Schlauch mit dem Radius R ist durch den Kanal mit der Länge s_0 dargestellt) ist in jedem Punkt über den Abstand r von der Mittellinie aus definiert. Genau an der Schlauchwand ($r = R$) ist die Geschwindigkeit Null. Für das Geschwindigkeitsprofil gilt:

$$v(r) = v_{max} \cdot \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right) \quad ; \quad r \leq R \quad (3.2)$$

Die Strecke, die die aktivierende Lösung im Abstand r von der Mittellinie in der Zeit t nach dem Ventilschaltvorgang zurückgelegt hat, ist mit der Bedingung $s(r, t = 0) = 0$:

$$s(r, t) = \int v(r) dt = v_{max} \cdot t \cdot \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right) \quad ; \quad r \leq R \quad (3.3)$$

Bei einem idealen Mischvorgang, der an einer Stelle $s(r, t)$ stattfindet, ist die resultierende Konzentration c gegeben durch die Konzentration c_A eines Substrats in der aktivierenden Lösung und das Verhältnis der entsprechenden Volumina ΔV und ΔV_A . Die Volumina

¹Der Begriff Dispersion wird hier hinsichtlich der zeitlichen Ausbreitung der Lösung verwendet.

werden als Zylinder² mit einer Höhe Δs angegeben. Der hier beschriebene Mischvorgang kann als Flächenmischung bezeichnet werden, weil er unabhängig von der Zylinderhöhe Δs ist und die Mischkonzentration über die Quadrate der Radien r und R gegeben ist:

$$c = \frac{c_A \cdot \Delta V_A}{\Delta V} = \frac{c_A \cdot \pi \cdot r^2 \cdot \Delta s}{\pi \cdot R^2 \cdot \Delta s} = \frac{c_A \cdot r^2}{R^2} \quad (3.4)$$

Findet der Mischvorgang z.B. genau an der Stelle $s(r, t) = s_0$ statt, so ergibt sich durch Umstellen von Gl. 3.3 für den Radius r , der ein Maß für die in der Schnittfläche vorhandenen Substratmoleküle ist:

$$r^2 = R^2 \cdot \left(1 - \frac{s_0}{v_{max} \cdot t}\right) \quad (3.5)$$

Für den Konzentrationsanstieg an der Stelle s_0 gilt dann mit $v_{max} = 2 \cdot \bar{v} = 2 \cdot \dot{V}/A$, $A = \pi \cdot R^2$ und $t_0 = s_0/v_{max}$ [64]:

$$c = c_A \cdot \left(1 - \frac{t_0}{t}\right) \quad ; \quad t \leq t_0 = \frac{\pi \cdot R^2 \cdot s_0}{2 \cdot \dot{V}} \quad (3.6)$$

Mit dieser Gleichung konnten in der Vergangenheit erfolgreich Simulationen zur Beschreibung von transienten Messströmen durchgeführt werden, die z.B. von der Na^+/K^+ -ATPase auf festkörperunterstützten Membranen durch die Aktivierung mit einer ATP-haltigen aktivierenden Lösung in Anwesenheit von Natriumionen (und Kaliumionen) hervorgerufen wurden [64, 65]. Durch Absorptionsmessungen mit gefärbtem Wasser konnte der zeitliche Verlauf des Konzentrationsanstieges in einer Rohrleitung bestätigt werden [64]. In Abb. 3.3 A sind die zeitabhängigen Konzentrationsänderungen für verschiedene Flussraten bzw. Drücke (100, 250, 500 und 1000 mbar) gezeigt, die man mit Gl. 3.6 erhält, wenn man die Parameter einsetzt, die durch die SURFE²R-Messeinrichtung gegeben sind. Dabei beträgt der Radius der Schlauchleitung $R = 0,79$ mm und die Länge des Schlauches vom Ventilanschluss zur Eintrittsöffnung der Injektionskapillaren 8,5 cm. Das Schlauchstück war deshalb so lang, weil mit dem flexiblen Injektionseinsatz jede Kammer in der 96er Mikrotiterplatte erreicht werden sollte und das Ventil als Ausgangspunkt des Lösungswechsels auf der Montageplatte des Messgeräteinsatzes fixiert war.

Die mittleren Kurven in Abb. 3.3 B zeigen den tatsächlichen Konzentrationsanstieg an der Sensoroberfläche, der mit dem hier vorliegenden Messsystem aufgezeichnet wurde. Dafür wurden einfache Lösungswechsel mit Lösungen, die sich in der Ionenstärke unterscheiden, verwendet. Die dargestellten Kurven wurden mit einem unkompensierten Salzsprung $\Delta[\text{NaCl}]$ bei einem neutralen pH-Wert (pH 7) mit einem 30 mM HEPES-Puffer aufgenommen. Durch die große Differenz der Ionenstärke von nicht-aktivierender und aktivierender³ Lösung erfolgt eine Polarisierung der Sensoroberfläche. Der Sensor bestand bei diesen Experimenten lediglich aus einer mercaptanisierten Goldelektrode. Dies hat den Vorteil, dass polare Wechselwirkungen auf der Sensoroberfläche ausgeschlossen werden können, da die Mercaptanschicht unpolar ist. Sie stellt in diesem Fall die Isolationsschicht dar. Diese bildet den Kondensator aus, der sich über den Lösungswechsel mit der größer werdenden Ladungsmenge auflädt (Wechselwirkungen der Ionen mit der Oberfläche). Die

²Das Volumen des Paraboloidenabschnitts an der Stelle $s(r, t)$ wird näherungsweise als Zylinder betrachtet.

³In diesem Fall wird die aktivierende Lösung nicht zur Aktivierung, sondern zur Polarisierung der Goldelektrode verwendet. Der Begriff wird verwendet, um den Bezug zum Lösungsbehälter herzustellen.

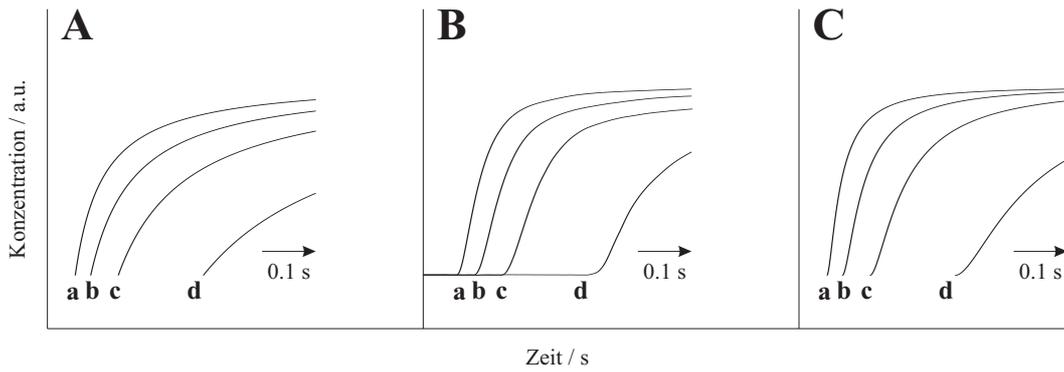


Abbildung 3.3: Simulierte und experimentelle Konzentrationsanstiege für verschiedene Flussraten. Für die dargestellten Kurven wurden die geometrischen Gegebenheiten des verwendeten SURFE²R-Messsystems zugrunde gelegt. Die linken Kurven (A) wurden nach dem Modell für eine ideale Querschnittsmischung berechnet. In der Mitte (B) sind exemplarisch die experimentell erhaltenen Daten gezeigt. Die Kurven in der rechten Abbildung (C) wurden nach der Differentialgleichung 3.16 für die Volumenmischung numerisch berechnet. Jede Kurvenschar wurde mit vier verschiedenen Flussraten von 2,8 (a), 1,8 (b), 1,1 (c) und 0,5 (d) mL/s berechnet bzw. ermittelt.

Menge an Ladungsträgern an der Sensoroberfläche erhöht dort das Potential, wodurch ein Kompensationsstrom zur Elektrode fließt, der proportional zur zeitlichen Änderung des Potentials ist. Der Salzsprung erzeugt also transiente Ströme, die in integrierter Form den Konzentrationsanstieg wiedergeben. Die in Abb. 3.3 B gezeigten Kurven wurden mit verschiedenen Flussraten aufgenommen und stellen die integrierten Stromkurven dar. Man erkennt, dass die Form dieser Kurven von den in Abb. 3.3 A abgebildeten Kurven abweicht, die durch das vorher theoretisch hergeleitete Mischungsmodell berechnet wurden (Gl. 3.6). Besonders unterscheiden sich die Kurven in der Tatsache, dass die realen Kurven mit einer Steigung von Null beginnen und einen Wendepunkt durchlaufen, wohingegen die Kurven in A mit einer endlichen Steigung beginnen, die kein Maximum für $t > t_0$ aufweist. Auf der rechten Seite der Abbildung (3.3 C) sind die theoretischen Kurven für eine Annäherung an den Konzentrationsanstieg an der Sensoroberfläche gezeigt, bei der der angenommene ideale Mischvorgang nicht über die Querschnittsfläche, sondern über das Volumen der in die Injektionskammer eingedrungenen Lösung in Form eines Rotationsparaboloiden beschrieben wird. Um das Volumen V_A der aktivierenden Lösung zu bestimmen, die nach einer Zeit $t \geq t_0$ in dem Volumen V_0 der Injektionskammer (grauer Bereich in Abb. 3.2) vorliegt, muss über alle Querschnittsflächen $\pi \cdot r^2$ integriert werden, die entlang der Strecke $s_0 \leq s \leq s(r=0, t)$ auftreten:

$$V_A = \pi \cdot \int_{s_0}^{s(r=0,t)} r^2 ds \quad ; \quad t \geq t_0 \quad (3.7)$$

Der Zeitpunkt t_0 liegt vor, wenn der Scheitelpunkt des Rotationsparaboloiden der Lösungsfront gerade an der Stelle $s_0 = v_{max} \cdot t_0$ ankommt. Im Folgenden wird t_0 auch als Totzeit des Systems bezeichnet. Mit Gleichung 3.3 erhält man r^2 und $s(r=0, t) = v_{max} \cdot t$. Für das Volumen V_A ergibt sich dann:

$$V_A = \pi \cdot R^2 \cdot \int_{s_0}^{v_{max} \cdot t} \left(1 - \frac{s}{v_{max} \cdot t}\right) ds \quad ; \quad t \geq t_0 \quad (3.8)$$

Die Lösung dieses Integrals ist:

$$V_A = \frac{\pi \cdot R^2 \cdot (v_{max} \cdot t - s_0)^2}{2 \cdot v_{max} \cdot t} \quad ; \quad t \geq t_0 \quad (3.9)$$

Dieses Volumen soll sich nun mit dem in der Injektionskammer vorhandenen Volumen V_0 ideal mischen. Wie ein idealer Volumenmischer funktioniert, wird in Abb. 3.4 schematisch illustriert und kann mit einer einfachen Verdünnungsgleichung (Gl. 3.10) erklärt werden, mit der eine Stoffmenge $c(t) \cdot V_0$ um den Betrag $c_0 \cdot \Delta V$ erhöht wird. Die resultierende Konzentration $c(t + \Delta t)$ ist die neue Konzentration in dem Volumen V_0 .

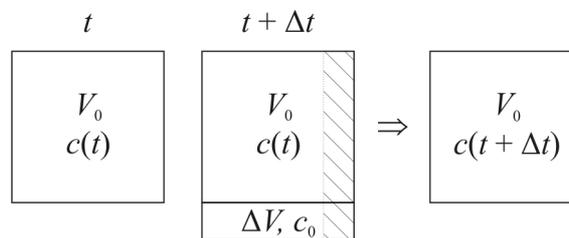


Abbildung 3.4: Idealer Mischer. Zum Zeitpunkt t ist die Konzentration im Volumen V_0 gleich $c(t)$. In einem Zeitintervall Δt kommt nun ein Volumen ΔV mit der Konzentration c_0 hinzu und mischt sich sofort mit dem Volumen V_0 . Da ein kontinuierlicher Durchfluss herrscht, wird in der gleichen Zeit von dem gerade gemischten Volumen der gleiche Teil, der hinzugekommen ist, wieder weggenommen (schraffierter Bereich). Die in dem wegfallenden Volumen enthaltene Lösung hat allerdings schon die Konzentration der Mischung. Übrig bleibt das Volumen V_0 , in dem die Lösung eine Konzentration $c(t + \Delta t)$ aufweist.

Für die Konzentration nach der Zeit $t + \Delta t$ gilt:

$$c(t + \Delta t) = \frac{c(t) \cdot V_0 + c_0 \cdot \Delta V}{V_0 + \Delta V} \quad (3.10)$$

Ehe sich das hinzugefügte Volumen mit dem Volumen in der Injektionskammer mischt, liegen in dem Schlauch aktivierende und nicht-aktivierende Lösung parallel nebeneinander vor⁴. Die Substratkonzentration c_0 in dem hinzugefügte Volumen ΔV ist also durch das Verhältnis der entsprechenden Volumina bestimmt:

$$c_0 = \frac{c_A \cdot \Delta V_A}{\Delta V} \quad (3.11)$$

Dabei ist c_A die Substratkonzentration in der aktivierenden Lösung. Setzt man c_0 in Gleichung 3.10 ein, erhält man:

$$c(t + \Delta t) = \frac{c(t) \cdot V_0 + c_A \cdot \Delta V_A}{V_0 + \Delta V} \quad (3.12)$$

Da ein kontinuierlicher Fluss herrscht ist $\Delta V = \dot{V} \cdot \Delta t$. Zusammen mit dieser Bedingung lässt sich die Gleichung 3.12 durch Umformung folgendermaßen formulieren:

⁴Das Volumen der aktivierenden Lösung hat die Form eines Rotationsparaboloiden und ist von nicht-aktivierender Lösung umgeben.

$$\frac{c(t + \Delta t) - c(t)}{\Delta t} \cdot V_0 + c(t + \Delta t) \cdot \dot{V} = c_A \cdot \frac{\Delta V_A}{\Delta t} \quad (3.13)$$

Für $\Delta t \rightarrow 0$ ergibt sich daraus die Differentialgleichung:

$$\frac{dc}{dt} \cdot V_0 + c \cdot \dot{V} = c_A \cdot \frac{dV_A}{dt} \quad (3.14)$$

Die zeitliche Ableitung von V_A kann aus Gl. 3.9 berechnet werden:

$$\frac{dV_A}{dt} = \dot{V} \cdot \left(1 - \frac{s_0^2}{v_{max}^2 \cdot t^2} \right) \quad (3.15)$$

Mit $\dot{V} = \pi \cdot R^2 \cdot v_{max}/2$ und $t_0 = s_0/v_{max}$ folgt damit für die Dgl.:

$$\frac{dc}{dt} \cdot V_0 + c \cdot \dot{V} = c_A \cdot \dot{V} \cdot \left(1 - \frac{t_0^2}{t^2} \right) \quad (3.16)$$

Dabei gilt wie zuvor die Bedingung:

$$t \geq t_0 = \frac{\pi \cdot R^2 \cdot s_0}{2 \cdot \dot{V}} \quad (3.17)$$

Die Lösung der Dgl. liefert folgendes Integral:

$$c = c_A \cdot \left(1 - \frac{\dot{V}}{V_0} \cdot t_0^2 \cdot e^{-\frac{\dot{V}}{V_0} \cdot t} \cdot \int \frac{1}{t^2} \cdot e^{\frac{\dot{V}}{V_0} \cdot t} dt \right) \quad (3.18)$$

Diese Gleichung kann analytisch nicht gelöst werden, weshalb die in Abb. 3.3 C dargestellten Kurven numerisch mit der Dgl. 3.16 bestimmt wurden. Die dafür festgelegten Parameter entsprachen den geometrischen Bedingungen, die an dem Messsystem vorlagen. Wie schon bei der Berechnung der Reynoldszahl und der Kurven in Abb. 3.3 A wurden für den Abstand s_0 der Wert, der sich aus der Totzeit des Systems ergibt (siehe Abschnitt 3.1.2), und für den Schlauchradius $R = 0,79$ mm eingesetzt. Das Mischvolumen wurde durch das Volumen $V_0 = 14,1$ mm³ der Injektionskammer⁵ angegeben, und für die dargestellten Flussraten wurden die Werte gewählt, die durch die an den Lösungsbehältern angelegten Drücke von 100, 250, 500 und 1000 mbar hervorgerufen werden. Zur phänomenologischen Beschreibung der Kurven kann eine hyperbolische Funktion (Gl. 3.19) verwendet werden, die sich sehr gut sowohl an die simulierten als auch an die experimentell erhaltenen Konzentrationsverläufe anpasst.

$$c = c_A \cdot \frac{(t - t_0)^n}{(t - t_0)^n + \tau^n} \quad ; \quad t \geq t_0 \quad (3.19)$$

In dieser Gleichung ist t_0 gleich der vorher definierten Zeitkonstanten, die für die Totzeit steht, in der die Lösungsmittelfront bis zum Sensor wandert. Die zweite Zeitkonstante τ ist ein Parameter, der relativ zum Zeitpunkt t_0 die Lage des Wendepunktes (t_w) in Abhängigkeit von der Ordnung n der Hyperbel beschreibt. Sie ist ebenso zusammen mit der Ordnung n ein Maß für die Steigung im Wendepunkt (Anstiegszeit) des Konzentrationsverlaufs. Für $n = 1$ geht Gl. 3.19 genau in Gl. 3.6 über, die keinen Wendepunkt aufweist.

⁵Das angegebene Volumen der Injektionskammer wurde näherungsweise aus der Grundfläche der Messkammer und dem Abstand der Injektionskapillaren zur Sensoroberfläche bestimmt.

Das hier hergeleitete Modell für die Konzentrationsänderung eines Substrats durch einen schnellen Lösungswechsel basiert auf der idealen Mischung in einem Volumen V_0 und lässt sonstige strömungsmechanische Phänomene an der Sensoroberfläche unberücksichtigt. Im Folgenden werden die experimentell ermittelten Messdaten und das hergeleitete Modell unter Verwendung von Gl. 3.19 miteinander verglichen.

3.1.2 Vergleich des Modells mit den experimentellen Daten

Die Anpassung der Messdaten und der simulierten Kurven, die aus Dgl. 3.16 erhalten wurden, erfolgte mit Gl. 3.19. Die Parameter, die sich bei der Anwendung dieser Funktion ergeben, sind in Abb. 3.5 für die experimentellen Daten zusammengefasst (geschlossene Rauten mit Fehlerbalken). Zum Vergleich sind in den entsprechenden Diagrammen die Parameter, die aus der Simulation hervorgehen, dargestellt (offene Rauten). Für die Auswertung der Messdaten wurden die Integrale über transiente Stromsignale herangezogen, die unter den gleichen Bedingungen, stichprobenartig über einen Zeitraum von ca. einem Jahr verteilt aufgezeichnet wurden. Als Messlösungen wurde, wie bereits oben erwähnt, ein 30 mM HEPES-Puffer, pH 7,0 verwendet. Ein unkompensierter NaCl-Konzentrationsprung $\Delta[\text{NaCl}]$ mit $c_A = 10$ mM erzeugte den Umladevorgang an der Sensoroberfläche. Ein Konzentrationsprungexperiment wurde an einem Sensor bei vier verschiedenen Drücken jeweils mindestens 3 mal wiederholt. Für jeden Druck wurde der Mittelwert aus den erhaltenen transienten Signalen gebildet und das Resultat integriert. Die verwendeten Drücke waren 100, 250, 500 und 1000 mbar. Sie rufen eine Flussrate von 0,5, 1,1, 1,8 und 2,8 mL/s hervor. Die bei einem bestimmten Druck erzielten Flussraten sind bei sachgemäßem Umgang und regelmäßiger Wartung des Systems sehr konstant. Das in Abb. 3.1 gezeigte Druck-Flussraten-Verhältnis beinhaltet ebenfalls Messdaten, die über den Zeitraum von ca. einem Jahr aufgenommen wurden. Sie weisen eine außerordentliche Konstanz auf.

Die Integration der gemittelten Messdaten erfolgte nach dem Trapezverfahren und wurde für alle Datensätze von dem gleichen Zeitpunkt aus gestartet, der willkürlich gewählt wurde, aber zeitlich nach dem Ventilschaltartefakt⁶ lag, weil dieses Artefakt ansonsten die Integration gestört hätte. Dadurch ergab sich bei der Annäherung mit Gl. 3.19 eine arbiträre Totzeit $t_{0,arb}$, die kleiner war als die tatsächliche Totzeit t_0 . Nach der Mittelung über alle Datensätze erfolgte eine Rückrechnung auf die tatsächliche Weglänge s_0 , die das Totvolumen enthält und die für die Verzögerung verantwortlich ist, mit der das Messsignal nach dem Ventilschaltvorgang zur aktivierenden Lösung auftritt. Mit der arbiträren Totzeit $t_{0,arb}$ kann die Strecke s_0 nach Gl. 3.17 ermittelt werden, wenn die Zeitdifferenz $\Delta t = t_0 - t_{0,arb}$ bekannt ist. Um die tatsächliche Strecke s_0 zu bestimmen wurde sie als Funktion der Variablen Δt bestimmt. Die Festlegung erfolgte näherungsweise für den Wert von $t_0 = t_{0,arb} + \Delta t$, bei dem die Standardabweichung der Mittelwerte der berechneten Einzelstrecken s_0 für die vier verschiedenen Flussraten minimal war. Mit dieser Vorgehensweise konnte die tatsächliche Strecke zwischen dem Umschaltort im Ventil und der Austrittsöffnung der Injektionskammer zu $s_0 = (14,7 \pm 0,8)$ cm bestimmt werden. Die in Abb. 3.3 dargestellten Simulationen, die für den Vergleich mit den experimentellen Daten berechnet wurden, enthielten diesen Wert als Parameter. Des Weiteren wurden für die Simulation die dem vorgegebenen Druck entsprechenden Werte der Flussraten \dot{V} sowie

⁶Wie aus später gezeigten Messsequenzen ersichtlich wird, verursacht der elektrische Schaltvorgang eines Ventils ein sichtbares hochfrequentes Artefakt mit großer Amplitude.

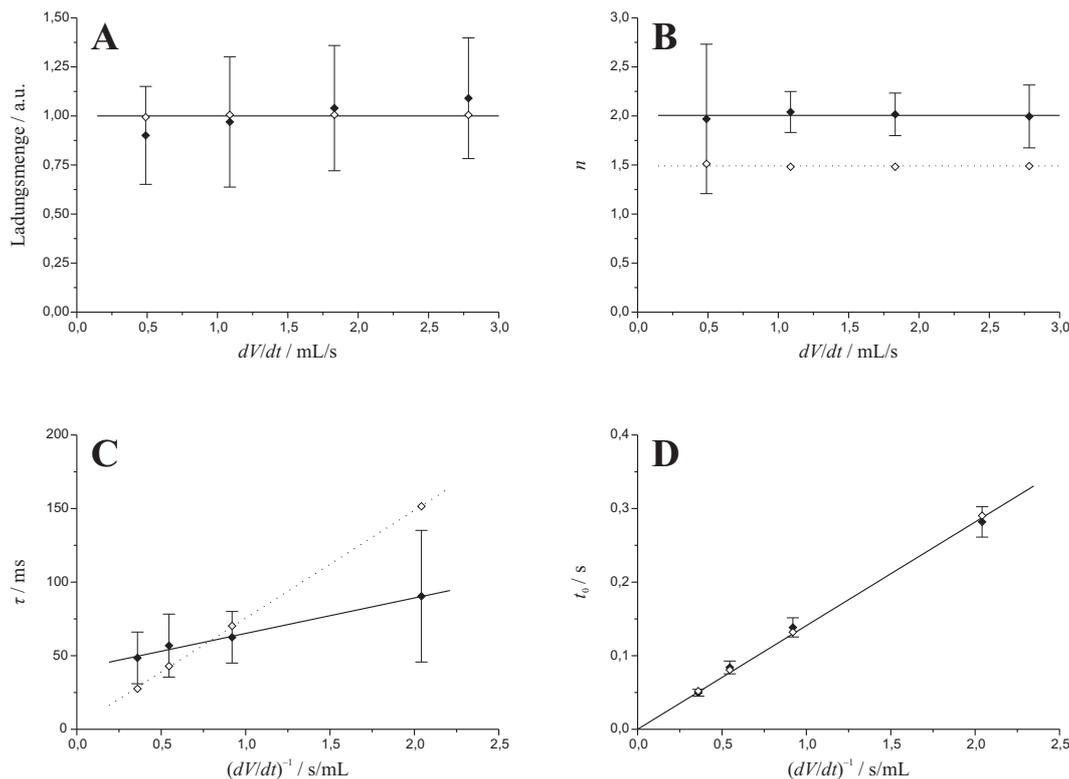


Abbildung 3.5: Zusammenfassung der Parameter des schnellen Lösungswechsels. Die hier dargestellten Parameter ergaben sich aus der Annäherung der Messdaten und Simulationen mit Gl. 3.19. Die geschlossenen Rauten stellen die Parameter dar, die aus den experimentellen Messdaten erhaltenen wurden. Zum Vergleich sind die Parameter, die sich für die Simulationen ergaben, als offene Rauten gezeigt. Die Parameter sind: (A) Maximale Ladungsmenge, die als Sättigungswert der hyperbolischen Funktion das Maximum der Substratkonzentration repräsentiert, (B) Ordnung (Exponent n) der Funktion, (C) Zeitkonstante, die ein Maß für die Anstiegszeit ist und (D) Totzeit des Systems.

der Schlauchdurchmesser $R = 0,79$ mm und das Volumen $V_0 = 14,1$ mm³ der Injektionskammer vorgegeben.

Maximum und Ordnung der Funktion

In Abb. 3.5 A ist die normierte maximale Ladungsmenge, die durch den Konzentrationsprung hervorgerufen wurde, gegen die Flussrate $\dot{V} = dV/dt$ aufgetragen. Die dargestellte Ladungsmenge entspricht der Maximalkonzentration, also der Substratkonzentration in der aktivierenden Lösung, die sich als Sättigungswert der hyperbolischen Funktion an der Sensoroberfläche einstellt. Die Datenpunkte wurden dabei auf den Mittelwert normiert, der sich aus den Sättigungswerten der experimentellen Daten ergab. Die relativ große Streuung ist auf die Variabilität der verwendeten Sensoren zurückzuführen, da verschiedene Sensoren mit unterschiedlichen Signalamplituden auf die Konzentrationsprünge reagierten. Es wird dennoch ersichtlich, dass die resultierende Maximalkonzentration für alle verwendeten Flussraten nahezu gleich groß ist. Die Mittelwerte für die jeweiligen Flussraten liegen nahe beieinander und weisen einen nahezu konstanten Fehler auf. Die maximal erreichbare Konzentration, die sich durch die Simulation ergibt, liegt für sämtliche Flussraten genau bei Eins. Ebenso wie für die Maximalkonzentration wurde für die Ordnung n der Funktion ein konstanter Wert erhalten. Abb. 3.5 B zeigt die Ordnung der

hyperbolischen Funktion, die sich aus der Anpassung an die Messdaten ergab. Als Abhängigkeit von der gewählten Flussrate resultierte ein Wert, der über den gesamten Bereich konstant bei $n = 2$ lag. Bei der Annäherung der simulierten Kurven mit Gl. 3.19 wurde ebenfalls ein konstanter Wert erhalten, der mit $n = 1,5$ etwas unterhalb des Wertes für die experimentellen Daten angesiedelt war. Der Konzentrationsanstieg erfolgt dadurch bei der Simulation im vorderen Kurventeil etwas schneller und flacht dafür eher ab, so dass das Maximum etwas später erreicht wird.

Zeitkonstanten

Die Zeitkonstante τ , die die Anstiegszeit des Konzentrationsverlaufs repräsentiert, ist in Abb. 3.5 C in Abhängigkeit von dem Kehrwert der Flussrate dargestellt. Die Zeitkonstante, die aus der Simulation erhalten wurde, geht für große Flussraten gegen Null und verhält sich über den gesamten untersuchten Bereich linear. Sie stellt somit den Verlauf unter idealen Bedingungen dar, bei denen die Flussrate unendlich groß werden kann und dadurch ein immer schnellerer Anstieg des Konzentrationsverlaufs stattfindet. Die experimentellen Daten weisen ebenfalls ein lineares Verhalten zum Kehrwert der Flussrate auf, gehen aber nicht durch den Nullpunkt, wenn man die Gerade auf unendlich große Flussraten ($(dV/dt)^{-1} \rightarrow 0$) extrapoliert. Im Unterschied zum idealen Fall muss beim realen Verhalten berücksichtigt werden, dass Komponenten im System vorhanden sein können, die eine weitere Erhöhung der Anstiegszeit ab einer bestimmten Flussrate verhindern. Das kann z.B. durch die Öffnungszeit eines Ventils gegeben sein. Der Wert für die ermittelte Zeitkonstante τ weist bei geringeren Flussraten (0,5 mL/s bei 100 mbar) eine relativ große Standardabweichung auf. Daher ist es theoretisch vorstellbar, dass die experimentell ermittelten Daten wie die simulierten Datenpunkte zuerst eine größere Steigung aufweisen. Treten die systembedingten Beschränkungen der Anstiegszeit auf, sollte die Steigung in einen konstanten Wert übergehen, der wie bei den experimentellen Daten größer als Null ist. Der untersuchte Flussratenbereich lässt allerdings keine konkrete Aussage darüber zu, ob dies der Fall ist, weil die Messwerte bei 0,5 mL/s (2 s/mL) relativ weit streuen. Für die verwendeten Flussraten von 1,1 mL/s (250 mbar) und 1,8 mL/s (500 mbar) lagen die Zeitkonstanten sehr nahe an den Werten, die durch die Simulation erhalten wurden.

In Abb. 3.5 D sind die Totzeiten t_0 gegen die reziproke Flussgeschwindigkeit aufgetragen. Die Werte entsprechen denen, die sich aus der Zurückrechnung der wahren Strecke s_0 ergeben haben und stimmen somit sehr gut mit den theoretischen Werten überein, die sich mit Gl. 3.17 berechnen lassen. Die Funktion ist eine Ursprungsgerade. Für kleiner werdende Flussraten sind größer werdende Totzeiten zu beobachten, die sich nach Gl. 3.17 umgekehrt proportional zur Flussrate verhalten. Im Gegensatz zur Zeitkonstanten τ weist die Totzeit des Systems keine offensichtliche Beschränkung auf. Das kann einerseits daran liegen, dass die Totzeit bedingt durch die lange Zuleitung noch nicht in dem Bereich liegt, in dem sich die Beschränkung bemerkbar macht. Andererseits könnte bei einer Beschränkung der Anstiegszeit durch die Öffnungszeit eines Ventils der Zeitpunkt, zu dem die aktivierende Lösung zuerst auf den Sensor trifft, lediglich von der weiterhin konstantem Flussrate abhängen. Dadurch träte keine Beschränkung der Totzeit auf.

Diskussion des Modells

Im Ergebnis kann gesagt werden, dass sich Gl. 3.19 durch die Verifikation mit dem hergeleiteten Modell für die Zuleitungsdispersion als geeignet herausgestellt hat, um einen Konzentrationsanstieg an der Sensoroberfläche, der durch einen schnellen Lösungswechsel hervorgerufen wird, phänomenologisch zu beschreiben. Ein Schwachpunkt in dem hergeleiteten Modell ist, dass die Wahl des Mischvolumens V_0 , das bei den durchgeführten Simulationen gleich dem Volumen der Injektionskammer gesetzt wurde, willkürlich ist. Es konnte bislang keine sinnvollere Größe für dieses Volumen angenommen werden als die Verwendung des Injektionskammervolumens, das hier auf $V_0 = 14,1 \text{ mm}^3$ festgelegt wurde. Grenzwertbetrachtungen für $V_0 \rightarrow 0$ ergeben eine Hyperbel, die keinen Wendepunkt aufweist und die experimentellen Daten nicht hinreichend gut beschreibt. Über ein größer gewähltes Volumen kann die Differenz in der Ordnung n der Näherungsgleichung ausgeglichen werden, was allerdings mit einer Verschlechterung der Fehlerquadratsumme einhergeht. Trotz der guten Annäherungsergebnisse soll angemerkt werden, dass Gl. 3.19 keine Lösung der Dgl. 3.16 für ein konstantes Volumen V_0 ist. Rückrechnungen auf dieses Volumen unter Verwendung von Gl. 3.19 als Konzentration in Gl. 3.16 ergaben ein zeitlich variierendes Volumen, das nicht in Einklang mit den strömungsmechanischen Bedingungen in der Injektionskapillaren zu bringen war.

Im Folgenden wird der Konzentrationsanstieg mit Gleichung 3.19 beschrieben, bei der die Zeitkonstante dem vorliegenden Druck bzw. der Flussrate angepasst wird und die von der Ordnung $n = 2$ sein soll, weil mit diesem Parameter die beste Anpassung an die realen Konzentrationskurven erzielt wurde. Als vorgegebene Größe für eine Substratkonzentration in einer kinetischen Gleichung nimmt der schnelle Lösungswechsel einen wesentlichen Stellenwert in der resultierenden Form des Proteinstroms ein.

3.2 Transportkinetische Modelle

In Kapitel 1.2.3 wurde bereits ein kinetisches Transportmodell vorgestellt, das für die Beschreibung der Kinetik eines Membranproteins herangezogen werden kann. In diesem Abschnitt soll die Kinetik unter Verwendung einiger vereinfachenden Annahmen untersucht werden. Besondere Beachtung soll dabei der Verhaltensweise des Membranprotein zukommen, wenn es unter den Bedingungen an der festkörperunterstützten Membran arbeitet und mit schnellen Lösungswechseln aktiviert wird, wie sie im vorigen Abschnitt behandelt wurden.

3.2.1 Vereinfachtes Transportmodell

Das in Kapitel 1.2.3 vorgestellte 4-Zustandsmodell eines Transportvorgangs über eine biologische Membran kann zu einem 3-Zustandsmodell vereinfacht werden (siehe Abb. 3.6). Das 3-Zustandsmodell besitzt den Vorteil, dass es unter bestimmten Bedingungen recht gut analytisch gelöst werden kann. Die analytische Lösung des 4-Zustandsmodells ist im Regelfall nicht möglich.

Bei der Übertragung des 4-Zustandsmodells in das 3-Zustandsmodell wird davon ausgegangen, dass die Zustände T_2S und T_2 zusammen mit der Dissoziation des Substrats S_{int} auf der Innenseite in einem Zustand T_iS zusammengefasst werden können. Das ist der Fall, wenn das Substratbesetzungsgleichgewicht dieses Übergangs sehr schnell erreicht

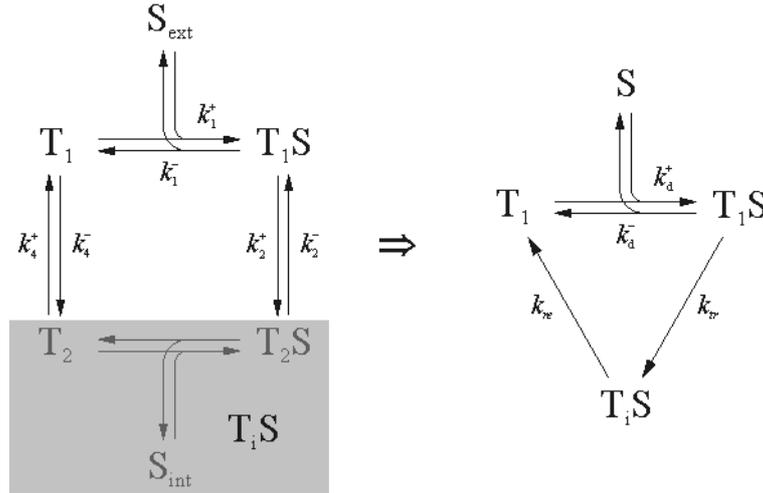


Abbildung 3.6: Vereinfachtes kinetisches Modell

wird. Des Weiteren können die die Geschwindigkeitskonstanten der Rückreaktionen bei der Translokation und der Relokation vernachlässigt bzw. gleich Null gesetzt ($k_2^- = k_4^- = 0$), wenn man annimmt, dass sie klein gegenüber den Geschwindigkeitskonstanten der Vorwärtsreaktionen sind. Um die Nomenklatur übersichtlicher zu halten, wurden einige Größen umbenannt. Das akkumulierte Substrat wird $S (= S_{ext})$ und die Geschwindigkeitskonstanten für die Trans- und die Relokation werden $k_{tr} (= k_2^+)$ bzw. $k_{re} (= k_4^+)$. Bei der Substratbindung wurde der Index d für Dissoziation⁷ eingesetzt: $k_d^+ (= k_1^+)$ und $k_d^- (= k_1^-)$. Das Gleichungssystem für das vereinfachte Modell lautet:

$$\phi_d = k_d^+ \cdot c(S) \cdot x(T_1) - k_d^- \cdot x(T_1S) \quad (3.20)$$

$$\phi_{tr} = k_{tr} \cdot x(T_1S) \quad (3.21)$$

$$\phi_{re} = k_{re} \cdot x(T_iS) \quad (3.22)$$

Für die Raten der Substratkonzentration und der Transporterzustände gilt:

$$\frac{dc(S)}{dt} = -\frac{N_T}{N_A \cdot V} \cdot \phi_d \quad (3.23)$$

$$\frac{dx(T_1)}{dt} = \phi_{re} - \phi_d \quad (3.24)$$

$$\frac{dx(T_1S)}{dt} = \phi_d - \phi_{tr} \quad (3.25)$$

$$\frac{dx(T_iS)}{dt} = \phi_{tr} - \phi_{re} \quad (3.26)$$

$$(3.27)$$

Werden die Translokation und die Relokation als elektrogen vorausgesetzt, so ergibt sich für den resultierenden Proteinstrom mit Gl. 1.49:

⁷Eine Bindung bzw. Assoziation wird ebenso wie die Dissoziation in der Regel über eine Dissoziationskonstante beschrieben. Liegt das Gleichgewicht auf der Seite des gebundenen Zustands, ist die Dissoziationskonstante $K_d = k_d^-/k_d^+$ kleiner als Eins.

$$i_p = e \cdot N_T \cdot (\alpha_{tr} \cdot \phi_{tr} + \alpha_{re} \cdot \phi_{re}) \quad (3.28)$$

Um das Gleichungssystem des 3-Zustandmodells analytisch zu lösen, kann zusätzlich angenommen werden, dass die Substratbindung schnell erfolgt. Der Fluss ϕ_d dieses Übergangs ist dann Null. Das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten k_d^-/k_d^+ ergibt somit die Dissoziationskonstante K_d :

$$\phi_d = 0 \quad \Rightarrow \quad K_d = \frac{k_d^-}{k_d^+} = \frac{c(S) \cdot c(T_1)}{c(T_1S)} \quad (3.29)$$

Für einen diskreten Anstieg der Substratkonzentration ($c(S) \neq f(t)$) ergibt sich für die Flüsse $\phi_{tr/re}$ mit den Anfangsbedingungen $x(T_1S)(t=0) = 0$ und $x(T_iS)(t=0) = c(S) \cdot x(T_1)/K_d = c(S) \cdot (1 - x(T_iS)(t=0))/K_d$ (siehe Gln. 3.29):

$$\phi_{tr} = \phi_\infty \cdot \frac{c(S)}{K_\infty + c(S)} + \left(\phi_0 \cdot \frac{c(S)}{K_d + c(S)} - \phi_\infty \cdot \frac{c(S)}{K_\infty + c(S)} \right) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{app}}} \quad (3.30)$$

$$\phi_{re} = \phi_\infty \cdot \frac{c(S)}{K_\infty + c(S)} \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{app}}} \right) \quad (3.31)$$

Dabei sind:

$$\phi_0 = k_{tr} \quad (3.32)$$

$$\phi_\infty = \frac{k_{tr} \cdot k_{re}}{k_{tr} + k_{re}} \quad (3.33)$$

$$K_\infty = \frac{k_{re} \cdot K_d}{k_{tr} + k_{re}} \quad (3.34)$$

$$\frac{1}{\tau_{app}} = k_{tr} \cdot \frac{c(S)}{K_d + c(S)} + k_{re} \quad (3.35)$$

Die Abhängigkeiten der Signalamplitude (amp) und des stationären Anteils (stat) ergeben sich aus den Grenzwerten für $t \rightarrow 0$ und $t \rightarrow \infty$ zu $\phi_{i,amp}$ und $\phi_{i,stat}$ in der gleichen Reihenfolge. Für den Proteinstrom kann dann mit Gl. 3.28 in diesen Grenzwertsituationen geschrieben werden:

$$\begin{aligned} i_{p,amp} &= e \cdot N_T \cdot \alpha_{tr} \cdot \phi_0 \cdot \frac{c(S)}{K_d + c(S)} \\ &= i_{amp,max} \cdot \frac{c(S)}{K_d + c(S)} \end{aligned} \quad (3.36)$$

$$\begin{aligned} i_{p,stat} &= e \cdot N_T \cdot (\alpha_{tr} + \alpha_{re}) \cdot \phi_\infty \cdot \frac{c(S)}{K_\infty + c(S)} \\ &= i_{stat,max} \cdot \frac{c(S)}{K_\infty + c(S)} \end{aligned} \quad (3.37)$$

Hinsichtlich der Amplituden und der stationären Anteile gleichen die oben dargestellten Abhängigkeiten der Michaelis-Menten-Kinetik mit unterschiedlichen Maximalwerten und Halbsättigungskonstanten. Die Maximalströme können folgendermaßen formuliert werden:

$$\begin{aligned} i_{amp,max} &= e \cdot \alpha_{tr} \cdot \phi_0 \cdot N_T \\ &= e \cdot \alpha_{tr} \cdot k_{tr} \cdot N_T \end{aligned} \quad (3.38)$$

$$\begin{aligned} i_{stat,max} &= e \cdot (\alpha_{tr} + \alpha_{re}) \cdot \phi_\infty \cdot N_T \\ &= e \cdot (\alpha_{tr} + \alpha_{re}) \cdot \frac{k_{tr} \cdot k_{re}}{k_{tr} + k_{re}} \cdot N_T \end{aligned} \quad (3.39)$$

Wechselzahl

Die Wechselzahl v eines Proteins ist definiert als die Anzahl der Moleküle, die in einer Zeit t über die Membran transportiert werden. Mit der Zeit t_{cyc} , die einen Zyklus dauert und der Anzahl an Molekülen N_{cyc} , die pro Zyklus transportiert werden, ergibt sich die Wechselzahl zu $v = N_{cyc}/t_{cyc}$. Da der Proteinstrom in der Zeit t_{cyc} eine Ladung $q_{cyc} = N_T \cdot N_{cyc} \cdot z \cdot e$ beschreibt, kann mit $i = q_{cyc}/t_{cyc}$ für die Wechselzahl geschrieben werden:

$$v = \frac{N_{cyc}}{t_{cyc}} = \frac{i}{N_T \cdot z \cdot e} \quad (3.40)$$

Im stationären Zustand sind die maximale Wechselzahl $v = v_{max}$ und der Strom $i = i_{stat,max}$. Zusammen mit Gl. 1.43 ergibt sich dann für die Wechselzahl:

$$v_{max} = N_{cyc} \cdot \frac{k_{tr} \cdot k_{re}}{k_{tr} + k_{re}} \quad (3.41)$$

Da in dem 3-Zustandsmodell nur ein repräsentatives Substrat S transportiert wird, ist die Anzahl $N_{cyc} = 1$. Die Wechselzahl im stationären Zustand ist also allein von den Geschwindigkeitskonstanten der Translokation und der Relokation abhängig. Aus der Art, in der die Geschwindigkeiten miteinander verknüpft sind, folgt, dass die maximale Wechselzahl nicht größer werden kann als die kleinere der vorkommenden Geschwindigkeitskonstanten. Wenn eine der Geschwindigkeitskonstanten sehr viel größer ist als die andere, dann wird die Wechselzahl nur durch die kleine Geschwindigkeitskonstante bestimmt. Sind die Raten der Translokation und der Relokation gleich groß, dann beträgt die Wechselzahl genau die Hälfte einer der Geschwindigkeitskonstanten.

3.2.2 Sprunghafte Substratfreisetzung und schnelle Lösungswechsel

In Abb. 3.7 sind Konzentrationsabhängigkeiten des Proteinstroms gezeigt, der als Reaktion auf die zwei dargestellten Möglichkeiten der Substratzufuhr auftritt. A.1 und B.1 stellen die vorgegebenen Konzentrationsänderungen c des Substrats S dar, die für die numerische Lösung des Gleichungssystems der Proteinkinetik (3-Zustandsmodell nach Gl. 3.20 bis 3.22) als Eingangsgrößen verwendet wurden. In A.1 erfolgte ein sprunghafter Anstieg der Substratkonzentration, die für $t \geq 0$ konstant ist. Diese Situation entspricht z.B. der schnellen photolytischen Substratfreisetzung, die bei der Untersuchung von vorstationären Proteinströmen eingesetzt wird. Bei den in B.1 gezeigten Kurven handelt es sich um hyperbolische Konzentrationsanstiege nach Gl. 3.19, wie sie an einer Sensoroberfläche mit festkörperunterstützter Membran bei der Durchführung von schnellen Lösungswechseln auftreten. In den Diagrammen darunter sind die mit den jeweiligen Konzentrationsfunktionen ermittelten Proteinströme gezeigt. In beiden Fällen wurde der Transportvorgang

mit den gleichen Geschwindigkeitskonstanten simuliert. Die Substratbindung erfolgte mit $k_d^+ = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_d^- = 500 \text{ s}^{-1}$. Für die Translokation und die Relokation wurden die Geschwindigkeiten $k_{tr} = 40 \text{ s}^{-1}$ und $k_{re} = 10 \text{ s}^{-1}$ eingesetzt. Die maximale Wechselzahl im stationären Zustand ergibt sich damit zu $v_{max} = 8 \text{ s}^{-1}$ und wird hauptsächlich durch die Relokation bestimmt. Die virtuelle Konzentrationen des Substrats wurden von $0,5 \mu\text{M}$ bis $1,5 \text{ mM}$ variiert.

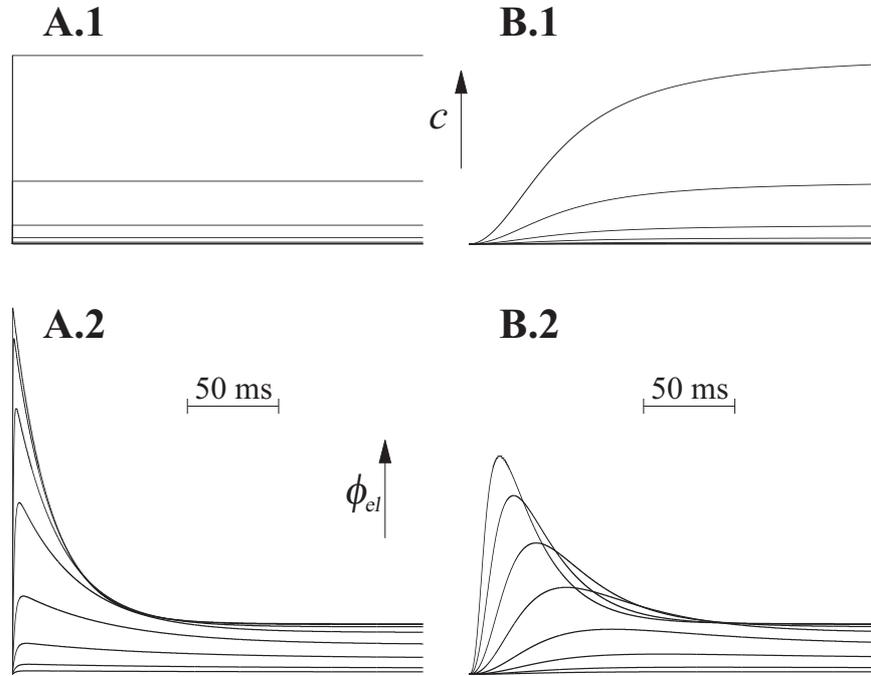


Abbildung 3.7: Proteinstrom bei sprunghafter Substratfreisetzung und schnellen Lösungswechseln. A.1 und B.1 zeigen die zeitlichen Funktionen der Konzentration c des Substrats S . Bei der Simulation wurde die Konzentration des virtuellen Substrats von 1 bis $3000 \mu\text{M}$ variiert. In A.1 ist der Konzentrationsanstieg diskret und für $t \geq 0$ konstant. In B.1 ist ein kontinuierlicher Konzentrationsanstieg dargestellt, der einen schnellen Lösungswechsel repräsentiert. Repräsentativ für den simulierten Proteinstrom ist in A.2 und B.2 der elektrogene Fluss in der Form $\phi_{el} = 3 \cdot \phi_{tr} - \phi_{re}$ dargestellt, bei dem sich die entsprechenden Übergänge aus dem 3-Zustandsmodell ergeben (Gln. 3.20 bis 3.22). Die Geschwindigkeitskonstanten der Bindung waren dabei $k_d^+ = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_d^- = 500 \text{ s}^{-1}$. Die Translokation und die Relokation wurden mit den Geschwindigkeiten $k_{tr} = 40 \text{ s}^{-1}$ und $k_{re} = 10 \text{ s}^{-1}$ angegeben. In A.2 ist der Proteinstrom gezeigt, der sich aus der sprunghaften Konzentrationsänderung (A.1) ergibt. B.2 stellt den Proteinstrom dar, der durch den kontinuierlichen Konzentrationsanstieg in B.1 erhalten wird.

Man erkennt, dass sich die transienten Ströme ($i_p \sim \phi_{el}$), die in den gezeigten Signalformen A.2 und B.2 auftreten, deutlich voneinander unterscheiden. Die durch eine diskrete Substratfreisetzung erhaltenen Kurven (A.2) weisen ein Verhalten auf, das mit dem analytisch gelösten Gleichungssystem aus dem vorigen Abschnitt beschrieben werden kann. Der Anstieg der Kurven auf die maximale Signalamplitude erfolgt sehr schnell und fällt nach Überschreitung des Maximums mit der apparenten Zeitkonstante nach Gl. 3.35 ab. Die Signalamplitude weist bei den hohen Substratkonzentrationen bereits Sättigungsverhalten auf. Bei dem Proteinstrom, der mit schnellen Lösungswechseln simuliert wurde

(B.2), steigt das Signal nur langsam auf sein Maximum an. Der Betrag der maximalen Signalamplitude ist gegenüber der diskreten Substratfreisetzung reduziert. Das Maximum wird bei hohen Konzentrationen deutlich vor dem Zeitpunkt erreicht, in dem die Konzentration die Hälfte ihres Maximalwertes aufweist. Im Vergleich mit dem Proteinstrom, der aus dem diskreten Konzentrationsanstieg resultiert, befindet sich die Signalamplitude bei dem kontinuierlichen Konzentrationsanstieg noch nicht so nahe am Sättigungsverhalten, wenn hohe Substratkonzentrationen eingesetzt werden. Die stationären Werte, die sich nach ca. 200 ms einstellen, weisen in beiden Fällen die gleiche Abhängigkeit und den gleichen Betrag auf.

Die Signalformen des Proteinstroms, die man mit schnellen Lösungswechseln und diskreten Substratfreisetzungen erhält, unterscheiden sich vorwiegend in der Darstellung der vorstationären Kinetik. Die stationären Stromanteile, die den Gleichgewichtszustand des Transportzyklusses repräsentieren, unterscheiden sich nicht. Der schnelle Signalanstieg kann bei sprunghafter Substratfreisetzung Aufschluss über die schnellen vorstationären Reaktionen (z.B. Substratbindung) geben. Bei schnellen Lösungswechseln wird dieser schnelle Anteil durch den Konzentrationsanstieg an der Sensoroberfläche bestimmt. Die Zeitkonstante, mit der die vorstationären Zustände in den stationären Gleichgewichtszustand abreagieren, hängt von den Geschwindigkeitskonstanten im Transportzyklus ab. Ob in dem Signal, das aus einem schnellen Lösungswechsel resultiert, Anteile dieser Zeitkonstante enthalten sind, oder ob es allein durch den Konzentrationsanstieg bestimmt wird, kann nicht allgemeingültig beantwortet werden. Je nach Situation muss dieser Sachverhalt durch den Vergleich mit Literaturdaten oder durch Verifikation mit anderen Methoden geprüft werden. Weitere Hinweise kann auch der Vergleich der Signalformen einer aufgenommenen Konzentrationsabhängigkeit liefern. Dabei muß berücksichtigt werden, dass der stationäre Signalanteil wegfällt, wenn der Proteinstrom mit dem elektrischen Erstatzschaltbild des Systems gefaltet wird, weil das System an festkörperunterstützten Membranen kapazitiv mit der Elektrode gekoppelt ist (siehe Abschnitt 3.3.1).

Anstiegszeit von schnellen Lösungswechsel

In Abschnitt 3.1 wurde festgestellt, dass die Fließgeschwindigkeit der Lösung (Flussrate), die für schnelle Lösungswechsel verfügbar ist, systembedingt begrenzt ist. Ungeachtet dieser Tatsache ist in Abb. 3.8 der Proteinstrom dargestellt, der sich für variierende Flussraten ergibt. Als vorgegebene zeitliche Änderung der Konzentration wurde eine Funktion nach Gl. 3.19 angewendet, bei der die Zeitkonstante τ als Maß für die vorherrschende Flussgeschwindigkeit angesehen werden kann. Die Ordnung der hyperbolischen Funktion wurde $n = 2$ gesetzt.

Für die in Abb. 3.8 A dargestellten zeitabhängigen Konzentrationsanstiege wurde die Zeitkonstante τ , beginnend bei 200 ms, jeweils halbiert, bis ein Wert von 0,15625 ms erreicht wurde. Die Proteinströme, die mit dem vorgegebenen kontinuierlichen Konzentrationsanstieg berechnet wurden, sind in Abb. 3.8 B gezeigt. Die Lage der Signalamplitude verschiebt sich mit schneller werdenden Lösungswechseln nach rechts und nimmt einen größeren Betrag an. Die abfallende Signalkomponente wird ebenfalls schneller, wobei die größten Veränderungen zu beobachten sind, wenn die Zeitkonstante des Konzentrationsanstiegs von 200 ms auf 25 ms verringert wird. Danach liegt die apparente Zeitkonstante der abfallenden Signalkomponenten bereits nahe an dem tatsächlichen Wert. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Zeitkonstante des abklingenden Signalverlaufs, der durch

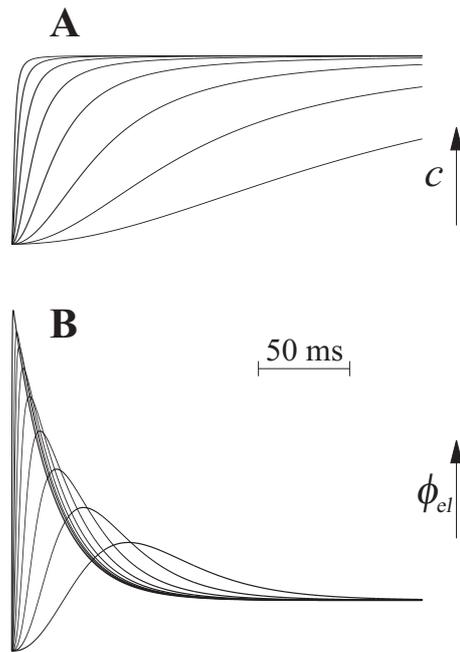


Abbildung 3.8: Proteinstrom in Abhängigkeit von der Flussrate. Dargestellt sind die zeitlich abhängigen Konzentrationsänderungen an der Sensoroberfläche (A) und der resultierende Proteinstrom (B). Bei der Funktion, die den Konzentrationsanstieg beschreibt (Gl. 3.19), wurde $n = 2$ gesetzt und die Zeitkonstante τ von 200 ms bis 0,15625 ms variiert (jeweils durch 2 geteilt). Die Proteinströme wurden mit dem Gleichungssystem für das 3-Zustandsmodell (Gln. 3.20 bis 3.22) und der vorgegebenen Konzentrationsänderung aus A berechnet. Dabei wurden die gleichen Parameter verwendet wie in Abb. 3.7. Der hervorgehobene Proteinstrom (höhere Strichstärke) ergab sich aus der Simulation eines diskreten Konzentrationsanstiegs an der Sensoroberfläche.

schnelle Lösungswechsel erhalten wird, durchaus mit der Zeitkonstanten verglichen werden kann, die aus der analytischen Lösung des 3-Zustandsmodells hervorgeht (siehe Gl. 3.35). Das ist natürlich abhängig von der Größe der Geschwindigkeitskonstanten des Transportzyklusses. Bei dem Konzentrationsanstieg mit der kleinsten angewendeten Zeitkonstanten liegt der Signalverlauf des resultierenden Proteinstroms bereits sehr nahe an der Form, die erhalten wird, wenn eine sprunghafte Substratfreisetzung erfolgt (Signal mit erhöhter Strichstärke). Wäre es möglich, die Flussrate der fließenden Lösung unendlich zu erhöhen, dann könnte mit einem schnellen Lösungswechsel ein Proteinstrom in der gleichen Form erhalten werden, wie er auch bei einer sprunghaften Substratfreisetzung auftritt.

3.3 Ersatzschaltbild und Messströme

Das Ersatzschaltbild einer festkörperunterstützten Membran mit adsorbierten Membranstrukturen (Liposomen, Vesikel oder flächige Membranfragmente) wurde bereits in Kapitel 1.3.3 vorgestellt. Für die hier durchgeführte numerische Simulation der Messströme i_{acq} kann das dort aufgestellte Gleichungssystem verwendet werden, wobei der aus der Transportkinetik resultierende Proteinstrom für die Differentialgleichung 1.58 als Eingangsgröße dient. In Abb. 3.9 sind für variierende Substratkonzentrationen die Zwischenschritte dargestellt, die unter Berücksichtigung des Konzentrationsanstieges bei einem schnellen Lösungswechsel zu dem Messstromes i_{acq} führen. Als Ausgangspunkt der Berechnung ist in Abb. 3.9 A der Konzentrationsanstieg nach Gl. 3.19 mit $\tau = 50$ ms und $n = 2$ für verschiedene Substratkonzentrationen gezeigt. Aus dem zeitabhängigen Konzentrationsverlauf wurde mit dem Gleichungssystem für das 3-Zustandsmodell, das im vorigen Abschnitt erläutert wurde, der Proteinstrom bestimmt⁸ (Abb. 3.9 B). Mit der Annahme, dass die Translokation und die Relokation elektrogen sind und dass die Dielektrizitäts-

⁸In diesem Fall stimmt der Proteinstrom mit dem in Abb. 3.7 B.2 gezeigten Verlauf überein.

konstanten $\alpha_{tr} = 3$ und $\alpha_{re} = -1$ sind, ist der Proteinstrom durch den elektrogenen Fluss $\phi_{el} = 3 \cdot \phi_{tr} - \phi_{re}$ gegeben. Der Messstrom i_{acq} , der in Abb. 3.7 C.2 dargestellt ist, wurde in einem weiteren Schritt durch die Faltung des Proteinstroms mit dem Ersatzschaltbild berechnet. Die eingesetzten Größen waren dabei $R_m = 10 \text{ G}\Omega$, $C_m = 10 \text{ nF}$, $R_v = 10 \text{ M}\Omega$, $C_v = 10 \text{ nF}$ und $R_z = 1 \text{ k}\Omega$ (Nach Gl. 3.58 beträgt die Systemzeitkonstante dabei $\tau_{sys} = 200 \text{ ms}$).

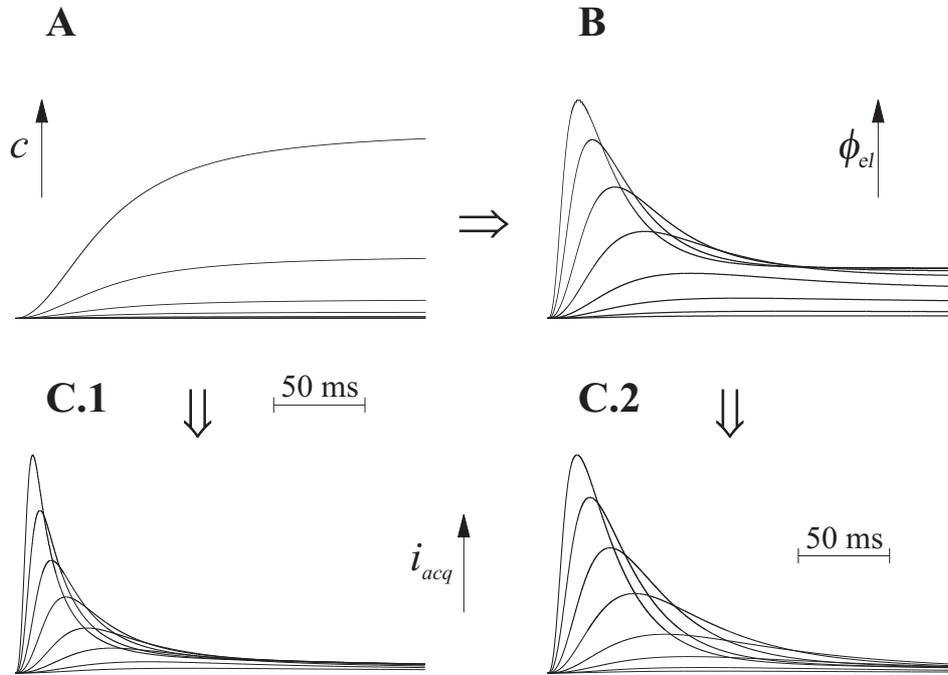


Abbildung 3.9: Messstromformen bei kapazitiver Kopplung mit der Elektrode. In A ist der kontinuierliche Konzentrationsanstieg des Substrats S dargestellt, der nach Gl. 3.19 mit $n = 2$ und $\tau = 50 \text{ ms}$ berechnet wurde. Die virtuelle Konzentration variierte von 1 bis $3000 \mu\text{M}$. Als kinetisches Transportmodell wurde das 3-Zustandsmodell aus dem vorigen Abschnitt verwendet (Gln. 3.20 bis 3.22). Die Parameter waren identisch mit denen aus Abb. 3.7. In B und C.2 ist zuerst der Übergang von dem kontinuierlichen Konzentrationsanstieg zum Proteinstrom (B) und danach das Ergebnis der Faltung des Proteinstroms mit dem vereinfachten Ersatzschaltbild gezeigt (siehe Abschnitt 3.3.1), woraus sich der Messstrom i_{acq} ergibt (C.2). Als Parameter des Ersatzschaltbildes wurde $C_v = C_m = 10 \text{ nF}$ und $R_v = 10 \text{ M}\Omega$ gesetzt (Systemzeitkonstante $\tau_{sys} = 200 \text{ ms}$). In C.1 ist der Übergang des kontinuierlichen Konzentrationsanstieges in den Messstrom i_{acq} dargestellt, der sich durch die Rückkopplung des Membranpotentials u_p auf die Transportkinetik ergibt (spannungabhängige Transportschritte, siehe Abschnitt 3.3.4). Dabei wurden für die Translokation und die Relokation jeweils $\delta_{tr/re} = -0,5$ und die Geschwindigkeitskonstanten bei 0 V gleich den spannungunabhängigen Werten gesetzt. Abweichend von den in C.2 dargestellten Kurven wurde für das vereinfachte Ersatzschaltbild ein Membranwiderstand von $R_v = 10 \text{ G}\Omega$ verwendet.

Die vierte Kurvenschar in Abb. 3.9 C.1 zeigt den numerisch simulierten Faltungsvorgang, wenn die Spannungsabhängigkeiten der elektrogenen Schritte in dem Transportzyklus berücksichtigt werden. Die Berechnung des Messstromes erfolgte dabei ohne Zwischenschritt direkt aus dem Konzentrationsanstieg. Die Vorgehensweise und Interpretation dieser Sachlage erfolgt später in diesem Abschnitt. Zunächst sollen die elektrischen Größen, die das Ersatzschaltbild bestimmen, untersucht werden.

3.3.1 Diskussion des Ersatzschaltbildes

In Kapitel 1.3.3 wurde das Ersatzschaltbild für proteinhaltige Membranstrukturen vorgestellt, die an festkörperunterstützten Membranen adsorbiert sind (siehe Abb. 1.14). Das Ersatzschaltbild wird durch die elektrischen Größen R_z , R_v , C_v , R_m und C_m bestimmt, die repräsentativ für die verschiedenen vorkommenden Membranstrukturen bzw. Elektroden und Lösungen stehen. In diesem Abschnitt soll der Einfluss der Größen auf den resultierenden Messstrom diskutiert werden, wenn ein Proteinstrom nach Gl. 3.28 mit dem Gleichungssystem gefaltet wird, das zur Herleitung der Dgl. 1.58 für den Messstrom aufgestellt wurde (Gln. 1.55 bis 1.57). Abb. 3.10 zeigt den Einfluss der Widerstände R_z (A), R_m (B) und R_v (C) auf den Messstrom i_{acq} , der aus dem Gleichungssystem für das Ersatzschaltbild erhalten wurde. Als Proteinstrom wurde ein Signal vorgegeben, das mit dem 3-Zustandsmodell aus dem vorigen Abschnitt berechnet wurde und das durch die Simulation eines schnellen Lösungswechsels nach Gl. 3.19 zustande kam. Die Diskussion soll sich hier auf die drei Größen beschränken, die in Abb. 3.10 dargestellt sind, da durch sie eine wesentliche Vereinfachung des Gleichungssystems bzw. der Differentialgleichung, die den Messstrom in Abhängigkeit des Proteinstroms beschreibt, durchgeführt werden kann.

In Abb. 3.10 A ist anhand von Simulationsrechnungen zu sehen, wie sich der Messstrom verhält, wenn der Zugriffswiderstand R_z variiert wird. Für Werte, die kleiner als 1 M Ω sind, findet nahezu keine Änderung der Signalform statt. Erst ab diesem Grenzwert geht mit der weiteren Erhöhung eine Reduzierung der Signalamplitude einher, die mit einer Erhöhung der abfallenden Zeitkonstanten verbunden ist. Für sehr große Zugriffswiderstände im Bereich von mehreren G Ω wird der Messstrom Null. Impedanzspektroskopische Messungen haben gezeigt, dass der reale Zugriffswiderstand eine Größenordnung im Bereich von 100 k Ω aufweist [75]. Mit dieser Voraussetzung kann für das Ersatzschaltbild der Übergang $R_z \rightarrow 0$ durchgeführt werden. Der Widerstand wird zwar nicht wirklich Null, aber sein Einfluss ist, wie die Simulation zeigt, bis zu einem Wert in der Größenordnung von 1 M Ω verschwindend gering⁹, so als ob er gar nicht vorhanden wäre.

Für die Vereinfachung ($R_z \rightarrow 0$) muss die Dgl. 1.58 mit R_z multipliziert werden. Dadurch ergibt sich:

$$R_z \cdot \frac{d^2 i_{acq}}{dt^2} + R_z \cdot \alpha_1 \cdot \frac{d i_{acq}}{dt} + R_z \cdot \alpha_0 \cdot i_{acq} = R_z \cdot \beta_1 \cdot \frac{d i_p}{dt} + R_z \cdot \beta_0 \cdot i_p \quad (3.42)$$

Die Parameter der Dgl. können somit folgendermaßen formuliert werden:

$$\alpha_{z,1} = R_z \cdot \alpha_1 = \frac{R_z}{R_v \cdot C_v} + \frac{1}{C_v} + \frac{1}{C_m} + \frac{R_z}{R_m \cdot C_m} \quad (3.43)$$

$$\alpha_{z,0} = R_z \cdot \alpha_0 = \left(\frac{1}{R_v} + \frac{R_z}{R_v \cdot R_m} + \frac{1}{R_m} \right) \cdot \frac{1}{C_v \cdot C_m} \quad (3.44)$$

$$\beta_{z,1} = R_z \cdot \beta_1 = \frac{1}{C_v} \quad (3.45)$$

$$\beta_{z,0} = R_z \cdot \beta_0 = \frac{1}{R_m \cdot C_v \cdot C_m} \quad (3.46)$$

⁹Bis zu einem Wert in der Größenordnung von $R_z = 1$ M Ω gilt $R_z \ll R_v, R_m$

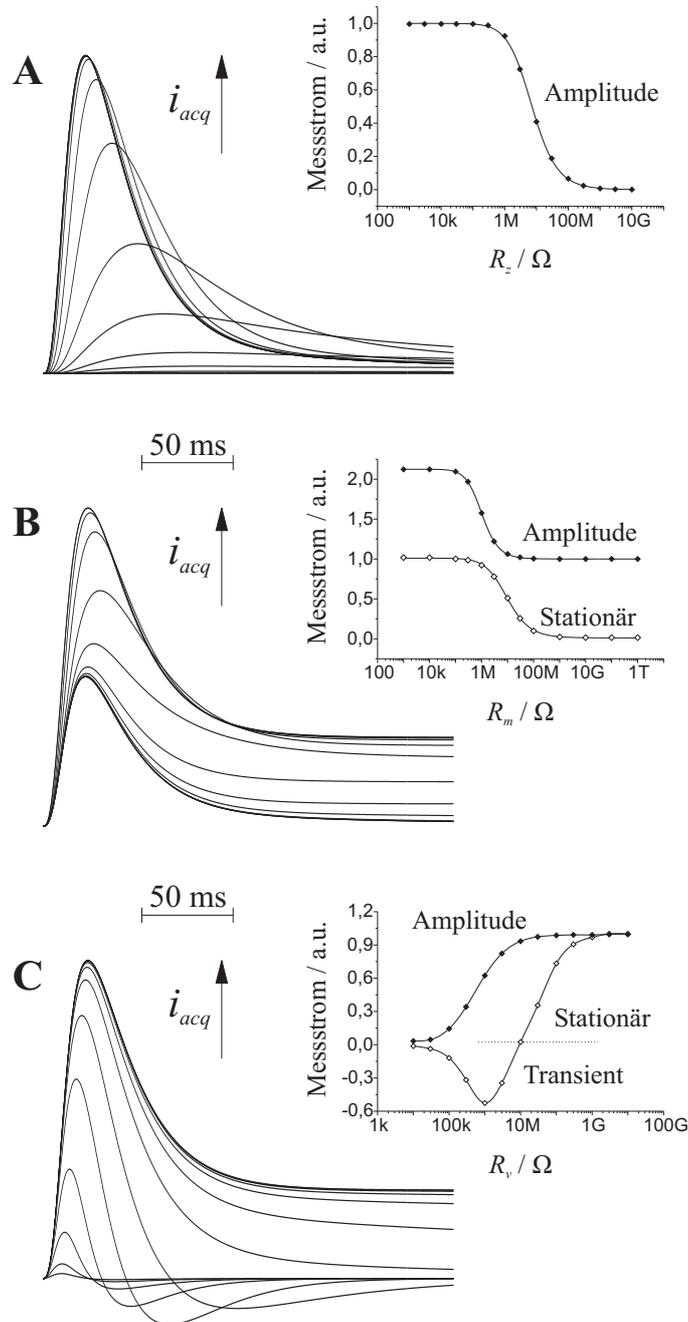


Abbildung 3.10: Einfluss der Größen im Ersatzschaltbild. Dargestellt sind die simulierten Messströme für variierende Widerstandswerte R_z (A), R_m (B) und R_v (C). Als Proteinstrom wurde ein Signal vorgegeben, das durch einen schnellen Lösungswechsel nach Gl. 3.19 mit den Parametern $c(S) = 1000 \mu M$, $\tau = 50 \text{ ms}$ und $n = 2$ bestimmt wurde. Als kinetisches Modell diente das 3-Zustandsmodell aus Abschnitt 3.2.1 mit den Parametern $k_d^+ = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_d^- = 500 \text{ s}^{-1}$, $k_{tr} = 40 \text{ s}^{-1}$ und $k_{re} = 10 \text{ s}^{-1}$. Der Proteinstrom wurde in der Form $i_p \sim \phi_{el} = 3 \cdot \phi_{tr} - \phi_{re}$ vorgegeben. Für alle Abhängigkeiten wurden die Kapazitäten C_v und C_m gleich 10 nF gesetzt. In A waren die Widerstände $R_v = 10 \text{ M}\Omega$ und $R_m = 10 \text{ G}\Omega$. In B waren die Widerstände $R_z \rightarrow 0$ und $R_v = 10 \text{ M}\Omega$. In C galt für die Widerstände $R_z \rightarrow 0$ und $R_m \rightarrow \infty$.

Führt man nun den Übergang $R_z \rightarrow 0$ aus, so verschwindet die zweite Ableitung des Messstromes und die Dgl. geht in die folgende Form über:

$$\alpha_{z,1} \cdot \frac{di_{acq}}{dt} + \alpha_{z,0} \cdot i_{acq} = \beta_{z,1} \cdot \frac{di_p}{dt} + \beta_{z,0} \cdot i_p \quad (3.47)$$

Die Parameter der Dgl. ergeben sich für den Übergang $R_z \rightarrow 0$ zu:

$$\alpha_{z,1} = \frac{1}{C_v} + \frac{1}{C_m} \quad (3.48)$$

$$\alpha_{z,0} = \left(\frac{1}{R_v} + \frac{1}{R_m} \right) \cdot \frac{1}{C_v \cdot C_m} \quad (3.49)$$

$$\beta_{z,1} = \frac{1}{C_v} \quad (3.50)$$

$$\beta_{z,0} = \frac{1}{R_m \cdot C_v \cdot C_m} \quad (3.51)$$

Die Abhängigkeit des simulierten Messstroms von dem Membranwiderstand R_m , der repräsentativ für die Hybridmembran steht, auf der die proteinhaltigen Membranstrukturen angelagert sind, ist in Abb. 3.10 dargestellt. Für kleine Werte ist die erhaltene Signalform bis auf einen Proportionalitätsfaktor identisch mit dem Proteinstrom, der als Eingangsgröße des Gleichungssystems des Ersatzschaltbildes dient. Dadurch weist der Signalverlauf einen stationären Anteil auf. Im Bereich von 50 k Ω bis 500 M Ω findet ein Übergang statt, der in einer Signalform resultiert, die keinen stationären Anteil mehr aufweist und die für immer größer werdende Widerstandswerte keine Änderung mehr aufweist. In der Übergangsphase erfolgt also eine Reduzierung der Signalamplitude, die mit geringer Verzögerung von einem Rückgang des stationären Anteils begleitet wird. Die Möglichkeit, dass der Membranwiderstand R_m einen Widerstandswert besitzt, der im Bereich von 500 M Ω oder kleiner liegt, ist sehr unwahrscheinlich. Die Hybridmembran wird von einer ideal polarisierbaren Goldelektrode als Festkörperunterstützung gebildet, die bei geringen Potentialen nicht stromtragend ist [32, 38]. Dadurch ist eher ein unendlich hoher Widerstand der Membrankomponenten R_m zu erwarten, was konform mit der Tatsache ist, dass bei Messungen an festkörperunterstützten Membranen normalerweise keine stationären Ströme auftreten. Führt man den Übergang $R_m \rightarrow \infty$ mit den Parametern der Dgl. 3.47 aus, dann werden alle Quotienten, die den Membranwiderstand R_m im Nenner tragen, Null:

$$\alpha_{z,1} = \frac{1}{C_v} + \frac{1}{C_m} \quad (3.52)$$

$$\alpha_{z,0} = \frac{1}{R_v \cdot C_v \cdot C_m} \quad (3.53)$$

$$\beta_{z,1} = \frac{1}{C_v} \quad (3.54)$$

$$\beta_{z,0} = 0 \quad (3.55)$$

Die Dgl. lautet dann:

$$\frac{di_{acq}}{dt} + \frac{\alpha_{z,0}}{\alpha_{z,1}} \cdot i_{acq} = \frac{\beta_{z,1}}{\alpha_{z,1}} \cdot \frac{di_p}{dt} \quad (3.56)$$

Setzt man die vereinfachten Parameter in die Dgl. ein, dann ergibt sich:

$$\frac{di_{acq}}{dt} + \frac{1}{\tau_{sys}} \cdot i_{acq} = \frac{C_m}{C_v + C_m} \cdot \frac{di_p}{dt}, \quad (3.57)$$

wobei

$$\tau_{sys} = R_v \cdot (C_v + C_m) \quad (3.58)$$

die Systemzeitkonstante darstellt, die durch die verbleibenden Größen R_v , C_v und C_m im Ersatzschaltbild gegeben ist. Der Einfluss der Systemzeitkonstanten auf die simulierten Messströme wird in Abb. 3.10 C gezeigt, wobei die Größe des Widerstandes R_v repräsentativ für die Zeitkonstante ist (die Kapazitäten C_v und C_m sind wie in den Fällen zuvor als konstant vorgegeben). Für große Widerstandswerte R_v ergibt sich ebenfalls eine Situation, in der sich der Messstrom proportional zu dem vorgegebenen Proteinstrom verhält. Erst für einen Bereich, in dem der Widerstand zwischen 100 k Ω und 50 M Ω liegt, sind Messströme zu beobachten, die eine realistische Signalform widerspiegeln. Der Wert der Systemzeitkonstanten liegt in diesem Bereich zwischen 2 ms und 1 s, wenn für die Kapazitäten wie angenommen $C_v = C_m = 10$ nF gilt. Der Messstrom weist in dem angegebenen Bereich eine Abhängigkeit der Signalamplitude von dem Widerstandswert R_v auf, die gleichzeitig eine Änderung des abklingenden Anteils, der den stationären Anteil des Proteinstroms repräsentiert, im Signalverlauf bewirkt. Der abklingende Anteil führt dabei einen Vorzeichenwechsel durch und stellt sich ab einer bestimmten Grenze als negative transiente Komponente im Signal dar. Diese negative Komponente durchläuft ein Maximum und klingt danach ebenso wie die Signalamplitude gegen Null ab, wenn der Widerstandswert R_v gegen Null geht. Bisher durchgeführte Simulationen von Messströmen, die zur Beschreibung von Membranproteinen, adsorbiert an festkörperunterstützten Membranen, herangezogen wurden, verwendeten Systemzeitkonstanten im Bereich von 100 bis 200 ms [64, 65]. Dieser Bereich wird durch einen Membranwiderstand R_v von 5 bis 10 M Ω repräsentiert, wenn die Werte der Kapazitäten wie oben mit 10 nF angenommen werden. Diese Werte erscheinen unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich bei den adsorbierten Strukturen z.B. um rekonstituierte Systeme (Proteoliposomen) handelt, die eine sehr dichte Membran aufweisen sollten, sehr gering. Das kann entweder dadurch erklärt werden, dass die Größen im Ersatzschaltbild nur repräsentativ für die phänomenologische Beschreibung der Situation an der festkörperunterstützten Membran sind, oder dass zusätzlich anderen Mechanismen eine Rolle bei der Bestimmung des Messstromes aus dem Proteinstrom zukommt. In den folgenden Abschnitten soll dabei unter anderem der Einfluss der Spannungsabhängigkeit der elektrogeneren Schritte eines Transportvorgang vorgestellt werden. Als Basis wird noch das Gleichungssystem des vereinfachten Ersatzschaltbildes angegeben.

Für das resultierende Ersatzschaltbild, das mit den Vereinfachungen $R_z \rightarrow 0$ und $R_m \rightarrow \infty$ reduziert wurde, lautet das Gleichungssystem:

$$i_p = C_v \cdot \frac{du_v}{dt} + \frac{u_v}{R_v} + i_{acq} \quad (3.59)$$

$$i_{acq} = C_m \cdot \frac{du_m}{dt} \quad (3.60)$$

$$u_p = u_v = u_m \quad (3.61)$$

3.3.2 Einfluss des Belegungsgrades

In Kapitel 1.3.3 wurde das Ersatzschaltbild der festkörperunterstützten Membran vorgestellt. Die dort angegebenen Parameter $\alpha_{1/0}$ und $\beta_{1/0}$ (Gln. 1.61 bis 1.64) der Dgl. 1.58 wurden dort für eine vollständige Belegung der Oberfläche mit adsorbierten Membranstrukturen angegeben. Berücksichtigt man allerdings den Belegungsgrad Θ , der beschreibt welcher Anteil ($0 \leq \Theta \leq 1$) der Sensoroberfläche mit Membranstrukturen belegt ist, so ergibt sich für die Parameter der Dgl. 1.58:

$$\alpha_1 = \frac{\frac{1}{R_v \cdot C_v} + \frac{1}{R_z \cdot C_v} + \frac{1}{R_z \cdot C_m} + \frac{1}{R_m \cdot C_m} + \frac{2 \cdot (1 - \Theta)}{R_m \cdot C_v}}{1 + (1 - \Theta) \cdot \frac{C_m}{C_v}} \quad (3.62)$$

$$\alpha_0 = \frac{\frac{1}{R_v \cdot R_z} + \frac{1}{R_v \cdot R_m} + \frac{1}{R_z \cdot R_m} + \frac{1 - \Theta}{R_m^2}}{C_v \cdot C_m \cdot \left(1 + (1 - \Theta) \cdot \frac{C_m}{C_v}\right)} \quad (3.63)$$

$$\beta_1 = \frac{1}{R_z \cdot C_v \cdot \left(1 + (1 - \Theta) \cdot \frac{C_m}{C_v}\right)} \quad (3.64)$$

$$\beta_0 = \frac{1}{R_z \cdot R_m \cdot C_v \cdot C_m \cdot \left(1 + (1 - \Theta) \cdot \frac{C_m}{C_v}\right)} \quad (3.65)$$

Multipliziert man die Dgl. 1.58 mit dem bei allen Parametern $\alpha_{1/0}$ und $\beta_{1/0}$ im Nenner vorkommenden Term $(1 + (1 - \Theta) \cdot C_m/C_v)$, so ergibt sich die Dgl. zu:

$$\left(1 + (1 - \Theta) \cdot \frac{C_m}{C_v}\right) \cdot \frac{d^2 i_{acq}}{dt^2} + \alpha'_1 \cdot \frac{di_{acq}}{dt} + \alpha'_0 \cdot i_{acq} = \beta'_1 \cdot \frac{di_p}{dt} + \beta'_0 \cdot i_p, \quad (3.66)$$

wobei die Parameter $\alpha'_{1/0}$ und $\beta'_{1/0}$ folgendermaßen lauten:

$$\alpha'_1 = \frac{1}{R_v \cdot C_v} + \frac{1}{R_z \cdot C_v} + \frac{1}{R_z \cdot C_m} + \frac{1}{R_m \cdot C_m} + \frac{2 \cdot (1 - \Theta)}{R_m \cdot C_v} \quad (3.67)$$

$$\alpha'_0 = \left(\frac{1}{R_v \cdot R_z} + \frac{1}{R_v \cdot R_m} + \frac{1}{R_z \cdot R_m} + \frac{1 - \Theta}{R_m^2} \right) \cdot \frac{1}{C_v \cdot C_m} \quad (3.68)$$

$$\beta'_1 = \frac{1}{R_z \cdot C_v} \quad (3.69)$$

$$\beta'_0 = \frac{1}{R_z \cdot R_m \cdot C_v \cdot C_m} \quad (3.70)$$

Diese Parameter unterscheiden sich nur in den jeweils zusätzlichen Summanden, die den Belegungsgrad Θ enthalten, von den Parametern, die bei einem vollständigen Belegungsgrad auftreten. Wenn man mit der Dgl. 3.66 die gleichen Vereinfachungen ($R_z \rightarrow 0$, $R_m \rightarrow \infty$) durchführt wie im vorigen Abschnitt, so ist das Ergebnis exakt identisch mit Gl. 3.57. Das heißt, dass der Messstrom unabhängig von dem Belegungsgrad wird und nur durch die Größen R_v , C_v und C_m des Ersatzschaltbildes und den Proteinstrom bestimmt wird. Es existiert allerdings eine indirekte Abhängigkeit vom Belegungsgrad über den Proteinstrom, der durch die Anzahl der Proteine, die an der Sensoroberfläche vorhanden sind, gegeben ist. Wenn bei beliebiger Belegung der Oberfläche der Proteinstrom $i_p = e \cdot N_T \cdot \phi_{el}$ ist, dann ergibt sich unter Berücksichtigung des Belegungsgrades:

$$i_p = e \cdot \Theta \cdot N_{T,max} \cdot \phi_{el} \quad (3.71)$$

Anschaulich bedeutet das, dass nur der Anteil $N_T = \Theta \cdot N_{T,max}$ an Transportern auf der Sensoroberfläche vorhanden ist, die maximal auf der Oberfläche vorkommen können. Für den Messstrom folgt daraus, dass die Signalform unabhängig vom Belegungsgrad bzw. der Anzahl der vorhandenen Proteine ist. Die Anzahl der Proteine nimmt lediglich Einfluss auf die Größe des Signals.

3.3.3 Potential über die Membranen

Die Möglichkeit, ein Potential über die Membran anzulegen, in der das Protein sitzt, ist mit den Angaben, die in den vorherigen Abschnitten gemacht wurden, unwahrscheinlich, da der Widerstand R_m , der für die Hybridmembran steht, als unendlich groß angesehen werden kann. Die festkörperunterstützte Membran wird demnach nur durch eine Kapazität (C_m) repräsentiert. Im Falle einer konstanten Spannung, die über das Gesamtsystem angelegt wird, ergibt sich ein kurzer Ladestrom des Netzwerkes, aus dem lediglich eine Spannungsspitze über die proteinhaltigen Membranen entsteht. Wenn der Widerstand R_v einen endlichen Wert aufweist fängt die Kapazität C_m nach kurzer Zeit die gesamte Spannung auf. Der Anteil der von außen angelegten Spannung über die Membran der angelagerten Liposomen oder Membranfragmente wird dann Null.

3.3.4 Selbstbeeinflussung durch Potentialabbau

Wird das Potential über die Membran nicht konstant gehalten, ist es sehr wahrscheinlich, dass ein in der Membran vorliegendes Transportprotein durch seine Aktivierung einen Selbsthemmungsmechanismus auslöst. Wie im vorigen Abschnitt erläutert wurde, kann bei Sensoren, die auf festkörperunterstützten Membranen basieren, die Spannung über die Membran, in der sich die Transportproteine befinden, nicht von außen vorgegeben werden. Viele Transporter weisen allerdings spannungsabhängige Geschwindigkeitskonstanten auf, die durch die Potentialänderung beeinflusst werden, die entsteht, wenn der Transporter Ladung über die Membran verschiebt. Das Potential, das die Geschwindigkeitskonstanten beeinflusst, wird von dem Protein selbst aufgebaut und wirkt sich demnach besonders auf die verantwortlichen elektrogenen Schritte im Transportzyklus aus. Liegt ein solcher Selbstbeeinflussungsmechanismus vor, kann nicht mehr diskret zwischen Proteinkinetik und der Bestimmung des Messstromes mit dem Ersatzschaltbild aus dem Proteinstromes getrennt werden, da die durch den Proteinstrom hervorgerufene Spannung, die durch die Größen im Ersatzschaltbild mitbestimmt wird, auf das kinetische Gleichungssystem zurückgekoppelt wird. Für die Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten eines Übergangs i in der Form $E_k \rightleftharpoons E_{k+1}$ gilt [48]:

$$k_i^+ = k_{i,0}^+ \cdot e^{\frac{\alpha_i \cdot \delta_i \cdot F}{R \cdot T} \cdot u_p} \quad (3.72)$$

$$k_i^- = k_{i,0}^- \cdot e^{\frac{\alpha_i \cdot (\delta_i - 1) \cdot F}{R \cdot T} \cdot u_p} \quad (3.73)$$

Dabei ist δ_i ein Symmetriefaktor, der zusätzlich den Anteil des elektrischen Feldes beschreibt, der sich auf die entsprechende Geschwindigkeitskonstante auswirkt. Legt man das in Abschnitt 3.2.1 vorgestellte 3-Zustandsmodell zugrunde, bei dem die Translokation

und die Relokation irreversibel sind und eine Spannungsabhängigkeit aufweisen, so kann das kinetische Gleichungssystem folgendermaßen formuliert werden:

$$\phi_d = k_d^+ \cdot c(S) \cdot x(T_1) - k_d^- \cdot x(T_1S) \quad (3.74)$$

$$\phi_{tr} = k_{tr,0} \cdot e^{\frac{\alpha_{tr} \cdot \delta_{tr} \cdot F}{R \cdot T} \cdot u_p} \cdot x(T_1S) \quad (3.75)$$

$$\phi_{re} = k_{re,0} \cdot e^{\frac{\alpha_{re} \cdot \delta_{re} \cdot F}{R \cdot T} \cdot u_p} \cdot x(T_2S) \quad (3.76)$$

Für die Raten der einzelnen Zustände gelten weiterhin die Gleichungen 3.23 bis 3.26. Die zusätzlich notwendigen Bedingungen erhält man aus dem vereinfachten Ersatzschaltbild (Gl. 3.59 und 3.61). Mit Gleichung 1.49 kann für die Spannung u_p , die das Protein über die Membran aufbaut und die auf die Transportkinetik zurückkoppelt, folgende Differentialgleichung geschrieben werden:

$$\frac{du_p}{dt} + \frac{u_p}{R_v \cdot (C_v + C_m)} = \frac{i_p}{C_v + C_m} = \frac{e \cdot N_T}{C_v + C_m} \cdot \sum_i \alpha_i \cdot \phi_i \quad (3.77)$$

Mit Hilfe des spannungsabhängigen Gleichungssystems und der zurückgekoppelten, proteininduzierten Änderung des Potentials u_p über der Membran wurde die gezeigte Konzentrationsabhängigkeit in Abb. 3.9 C.1 simuliert. Dabei war gegenüber der berechneten Faltung des Proteinstroms mit dem vereinfachten Ersatzschaltbild (siehe Abb. 3.9 C.2) ein deutlicher Unterschied der Signalformen zu beobachten, wenn ein Transportzyklus mit spannungsabhängigen Übergängen simuliert wurde. Die transienten Messströme wurden schmaler, und es ergab sich eine weniger symmetrische Signalform hinsichtlich der Umgebung des Scheitelpunktes der Signalamplitude. Wie sich bei Experimenten mit verschiedenen Proteinen an festkörperunterstützten Membranen herausstellte, war eine solche Signalform eher zu beobachten als die symmetrische Form, die sich durch die Faltung des Proteinstroms mit dem Ersatzschaltbild ergibt. Diese Tatsache ist konform zu der Erkenntnis, dass die Systemzeitkonstante, die vorwiegend durch den Membranwiderstand R_v bestimmt wird, relativ klein angesetzt werden muss um eine Signalform zu erhalten, die keinen stationären Anteil aufweist. Bei einer spannungsabhängigen Reaktion im Transportzyklus wird hingegen bereits der Proteinstrom durch das entstehende Potential begrenzt, so dass auch mit einem hohen Membranwiderstand realistische Signalformen entstehen, die allerdings proportional zum Proteinstrom sind. Im Umkehrschluß bedeutet dies, dass der Proteinstrom, wenn keine Spannungsabhängigkeit in der Transportkinetik und eine hinreichend dichte Membran ($> 1 \text{ G}\Omega$) vorläge, in identischer Form in dem Messstrom abgebildet sein müsste. Das gleiche gilt für den Messstrom, wenn es möglich wäre, ein externes Potential über die Membran anzulegen, in der das Protein vorliegt. In diesem Fall würde ebenfalls der durch den Lösungswechsel hervorgerufene Proteinstrom inklusive der stationären Anteile im Messstrom abgebildet.

3.4 Elektrisches Verhalten

3.4.1 Elektrische Eigenschaften der Sensoren

In Abb. 3.11 sind repräsentativ die erhaltenen Signalformen dargestellt, wenn die verwendeten Sensoren mit den in Kapitel 1.3.4 vorgestellten Protokollen zur elektrischen Charakterisierung untersucht wurden. Die daraus erhaltenen elektrischen Eigenschaften

der Sensoren wurden vor jedem Experiment bestimmt und konnten jederzeit während eines Experiments überprüft werden. Die Daten in Abb. 3.11 A und B repräsentieren die Kapazitätsmessungen (A) und Leitfähigkeitsmessungen (B), die für die verschiedenen Präparationsstufen eines Sensors erhalten wurden. Die gezeigten Messsignale entsprechen in folgender Reihenfolge der reinen Goldelektrode (a), der mercaptanisierten Goldelektrode (b), der mercaptanisierten Goldelektrode mit Lipidschicht (c) und der so gebildeten festkörperunterstützten Membran mit adsorbierten, proteinhaltigen Membranstrukturen (d). Es ist deutlich zu beobachten, dass die Kapazität und die Leitfähigkeit mit jedem Präparationsschritt abnimmt. Die Form der durch eine Dreiecksspannung hervorgerufenen Kapazitätsmessungen entspricht angenähert einem Rechteck, wobei die Ausprägung der Form mit dem Fortschreiten der Präparation deutlicher wird. Die Leitfähigkeitsmessungen, die aus einem Spannungssprung resultieren, weisen einen mehrphasischen Abfall auf, der im Idealfall gegen einen konstanten Stromwert streben sollte. Zum Vergleich sind in Abb. 3.11 C und D die Messströme dargestellt, die mit einer elektrischen Testschaltung, bestehend aus der Parallelschaltung eines Kondensators und einem Widerstand, erhalten wurden. Für diese Testschaltung wurden die gleichen Messprotokolle angewendet wie mit den verwendeten Sensoren. Dabei kamen jeweils zwei verschiedene Kapazitäts- und Widerstandswerte zum Einsatz. Die in Abb. 3.11 C und D mit a bezeichneten Messströme wurden mit einer Parallelschaltung von einem 3 nF Kondensator zu einem 1 G Ω -Widerstand erhalten. Die mit b bezeichneten Messströme ergaben sich, wenn die Parallelschaltung aus einem 1 nF Kondensator und einem 10 G Ω -Widerstand bestand. Für die zuerst genannte Testschaltung war in der Kapazitätsmessung ein linearer Anstieg vorhanden, der sich dem konstanten, durch die Kapazität bestimmten Spannungsplateau aufaddierte. Der lineare Anstieg wurde durch den Widerstand verursacht, der bei der Leitfähigkeitsmessung durch einen konstanten Stromwert sichtbar wurde. Aus beiden Messströmen ergab sich dabei ein Wert, der genau dem eingesetzten Widerstand von 1 G Ω entsprach. Aus dem Spannungssprung, der in der Kapazitätsmessung auftrat, konnte ebenfalls der verwendete Kapazitätswert von 3 nF ermittelt werden. Aus den Messströmen, die mit der zweiten Testschaltung (in Abb. 3.11 C und D mit b bezeichnet) erhalten wurden, ergaben sich ebenfalls die korrekten Werte von 1 nF für die Kapazität und 10 G Ω für den Widerstand. Hier wies der Messstrom bei der Kapazitätsmessung aufgrund der Größe des Widerstandes kein auswertbares lineares Verhalten auf.

Mit den beschriebenen Testschaltungen konnte das ideale Verhalten der festkörperunterstützten Membranen gut simuliert werden. Die tatsächlichen Messströme wiesen jedoch ein abweichendes Verhalten von der idealen Form auf. In jeder Präparationsstufe waren nicht-lineare Komponenten in den Verlaufsformen vorhanden, die nicht auf systembedingtes Filterverhalten zurückgeführt werden können, weil die Messungen mit den Testschaltungen diese Komponenten nicht aufwiesen. Dennoch wurde mit den rechteckähnlichen Messströmen eine Abschätzung der Kapazität des Gesamtsystems durchgeführt, indem daraus die Sprunghöhe ermittelt wurde. Dieser Stromwert wurde nach Gl. 1.73 umgerechnet und ergab die angenäherte Gesamtkapazität des Systems. Zur Bestimmung der Leitfähigkeit wurde der konstante Stromwert, der sich für $t \rightarrow \infty$ ergibt, durch den Stromwert, der sich im Signalverlauf nach 1 s einstellt, angenähert und mit Gl. 1.80 in die Leitfähigkeit umgerechnet. Für die Berechnung der Kapazität lag dabei eine 50 mV (Spitze-Spitze) Dreiecksspannung mit einer Periodendauer von 2 s zugrunde. Zur Bestimmung der Leitfähigkeit wurden Spannungssprünge in der Höhe von 100 mV durchgeführt.

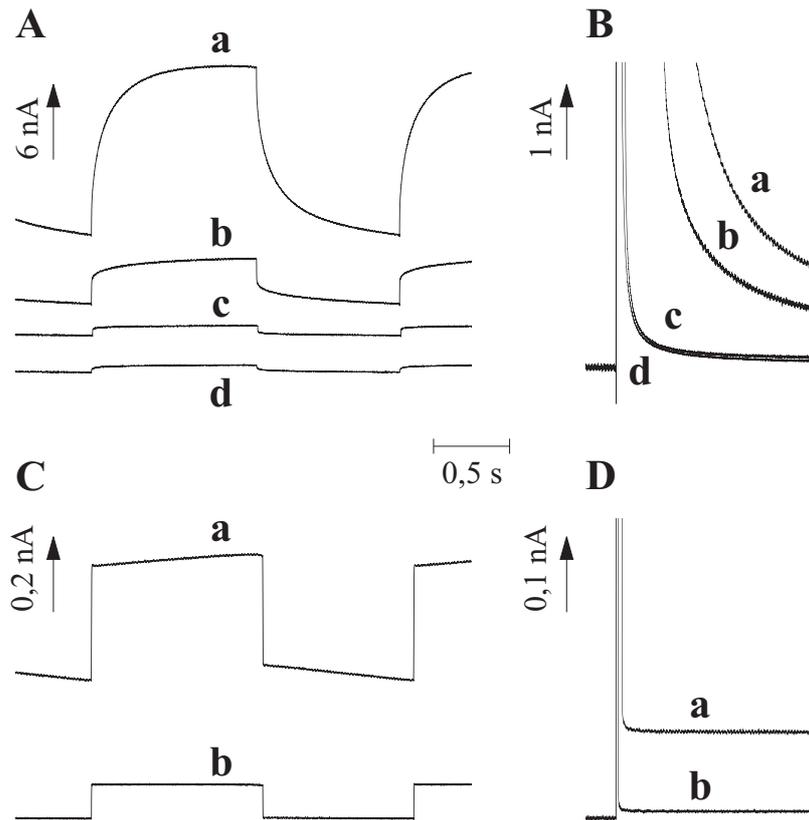


Abbildung 3.11: Elektrische Eigenschaften der verwendeten Sensoren. In A und B sind die Messströme für die Protokolle zur Kapazitätsbestimmung (A) und zur Leitfähigkeitsbestimmung (B) dargestellt. Es handelt sich um einen Sensor, der für verschiedene Präparationsstufen charakterisiert wurde. Dabei stellt a die reine Goldoberfläche, b die mercaptanisierte Oberfläche, c die Oberfläche mit Lipid und d die Oberfläche mit Lipid und angelagerten proteinhaltigen Membranstrukturen dar. In C und D sind ebenfalls Kapazitätsmessungen (C) und Leitfähigkeitsmessungen (D) gezeigt. Diese wurden mit Testschaltungen, bestehend aus der Parallelschaltung von einem Widerstand und einem Kondensator, aufgezeichnet. In a wurden die Werte $C = 3 \text{ nF}$ und $R = 1 \text{ G}\Omega$ verwendet, wohingegen in b $C = 1 \text{ nF}$ und $R = 10 \text{ G}\Omega$ zum Einsatz kamen.

Mit 24 Sensoren, die auf einem 96er Sensorarray vorhanden waren, wurde eine Statistik hinsichtlich der elektrischen Eigenschaften der verwendeten Sensoren erhoben. Dabei wurde die Kapazität und die Leitfähigkeit der Sensoren für jeden Präparationsschritt aufgezeichnet, der zu einem Sensor mit festkörperunterstützter Membran und zu dort angelagerten Membranstrukturen führt. Die erhobenen Größen stehen repräsentativ für die Mercaptanschicht, die festkörperunterstützte Membran, bestehend aus Mercaptanschicht und aufgebrachtener Lipidmonolage, und für den vollständig präparierten Sensor, der zusätzlich die angelagerten Membranstrukturen aufweist. Die Ergebnisse der Statistik sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Für die einzelnen Präparationsstufen ergab sich eine kontinuierliche Reduzierung der Kapazität und der Leitfähigkeit. Die Auswertung von nicht-mercaptanisierten Goldelektroden wurde nicht durchgeführt, weil die Sensoren normalerweise direkt nach der Aufbringung der Goldschicht mercaptanisiert wurden. Die in Abb. 3.11 A und B dargestellten Messun-

Schicht	Kapazität / $\mu\text{F}/\text{cm}^2$	Leitfähigkeit / $\mu\text{S}/\text{cm}^2$
Mercaptan	$2,7 \pm 1,1$	$0,86 \pm 0,56$
Lipid (SSM)	$0,61 \pm 0,35$	$0,18 \pm 0,13$
Lipid + Probe	$0,52 \pm 0,31$	$0,18 \pm 0,16$

Tabelle 3.1: Elektrische Eigenschaften (Mittelwerte und deren Standardabweichungen) der Sensoren bei verschiedenen Präparationsschritten.

gen mit dem Index a stellen eine von wenigen Ausnahmen dar, bei der die Elektrode ohne Mercaptanschicht verwendet wurde. Der Messwert ist dabei nicht repräsentativ, weil bei solchen Sensoren eine große Bandbreite an Kapazitäts- und Leitfähigkeitswerten festgestellt wurde, die auf die schnelle Verunreinigung der Goldoberfläche zurückzuführen sind. Die direkte Inkubation in Mercaptanlösung, nachdem die Goldschicht auf den Glassubstraten etabliert ist, dient deshalb auch als Passivierung, um unerwünschte Fehlstellen zu vermeiden. Bei den Werten, die aus der Statistik erhalten wurden, ist ein deutlicher Rückgang der Kapazitäten und Leitfähigkeiten vorhanden, wenn die Lipidschicht auf die Mercaptanschicht aufgebracht wird. Die Werte der Lipidschicht unterscheiden sich in Anbetracht der relativ großen Streuung (Standardabweichung) nur unwesentlich von den Werten, die mit zusätzlich angelagerten Membranstrukturen auftreten. Eine Halbierung der Werte, wie sie aus der Theorie folgt (siehe Kapitel 1.3.4), wurde nur relativ selten beobachtet. Zudem kam es auch vor, dass sich die Werte erhöhten und trotzdem Signale durch schnelle Lösungswechsel erhalten wurden, die für eine funktionale Anlagerung der proteinhaltigen Membranstrukturen sprachen. Die große Bandbreite an erhaltenen Werten kann in der nahezu unbekanntem Topologie der adsorbierten Membranstrukturen liegen. Die angewendeten Modelle gehen meistens von einer konstanten Oberfläche aus, die durch die makroskopische Geometrie der Sensoroberfläche gegeben ist. Ob die durch die jeweilige Membranstruktur gegebene Effektivfläche in der gleichen Größenordnung liegt oder sich vielleicht während des Anlagerungsprozesses ändert, ist unbekannt. Die elektrischen Eigenschaften von Sensoren mit Mercaptanschicht und Lipidmembran liegen in der gleichen Größenordnung wie vollständig präparierte Sensoren und können anhand dieser Kriterien nicht unterschieden werden. Es existiert ebenfalls keine direkte Korrelation zwischen der erhaltenen Proteinaktivität und der Tatsache, ob sich die elektrischen Eigenschaften des Sensors innerhalb eines bestimmten Bereichs vergrößern oder verkleinern. Lediglich sehr große Änderungen, die z.B. durch die Zerstörung der Membranstrukturen auf der Sensoroberfläche hervorgerufen werden, können als Qualitätskontrolle herangezogen werden, wenn in bestimmten Situationen keine Proteinaktivität mehr auftritt (z.B. wenn Luftblasen über den Sensor strömen).

3.4.2 Störquellen

Verschiedene Einflüsse können sich störend auf das Messsystem auswirken. Dabei sind Luftblasen, die über den Sensor strömen, am gefährlichsten, weil dadurch die Membranen auf der Sensoroberfläche abgerissen bzw. zerstört werden können. Ein solcher Vorgang, der z.B. durch einen nicht nachgefüllten Lösungsbehälter hervorgerufen wird, ist fast immer mit der Beendigung des gerade durchgeführten Experiments verbunden. Im Folgenden sollen kurz weitere Störquellen erläutert werden, die eine Auswirkung auf den beobachteten Messstrom aufweisen und nicht zur Zerstörung der Membranen führen. Zur Veranschaulichung kann ein modifiziertes Ersatzschaltbild verwendet werden, das in Abb.

3.12 dargestellt ist.

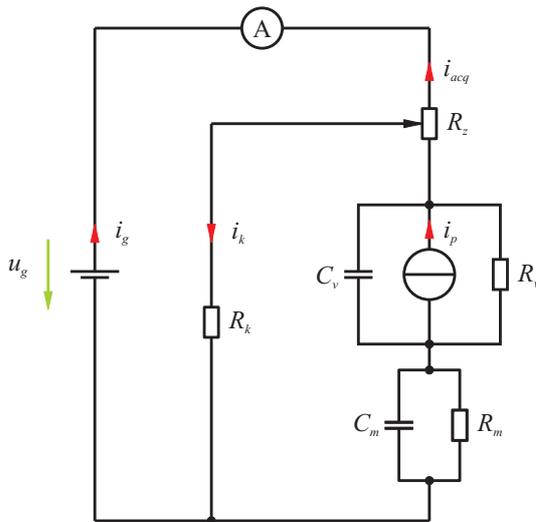


Abbildung 3.12: Störquellen. Das Ersatzschaltbild entspricht der festkörperunterstützten Membran mit angelagerten proteinhaltigen Membranstrukturen. Als zusätzliche Komponenten sind als Störquellen der Kurzschlusswiderstand R_k und eine Spannungsquelle (Galvanielement) u_g vorhanden. Der Kurzschlusswiderstand wirkt als Stromteiler und zweigt den Strom i_k ab. Die Galvanispannung erzeugt einen zusätzlichen Strom i_g , der sich dem Messstrom aufaddiert.

Das Ersatzschaltbild entspricht dem, das in Abb. 1.14 gezeigt wurde, und weist eine Stromquelle auf, die das Protein repräsentiert. Das Protein induziert einen Strom i_p in das Netzwerk, das durch die Membranwiderstände R_m , R_v und die Membrankapazitäten C_m , C_v sowie den Zugriffswiderstand R_z gegeben ist. Der Messstrom i_{acq} ergibt sich durch Strommessung im äußeren Kreis des Ersatzschaltbildes. In Abb. 1.14 sind zwei zusätzliche Elemente in das Ersatzschaltbild eingezeichnet, die repräsentativ für unterschiedliche Störeinflüsse sind. Der Widerstand R_k stellt z.B. einen Kurzschluss über die Membranen dar, der zustande kommen kann, wenn ein Flüssigkeitsfilm von der Messlösung, die über dem Sensor steht, zu einer Kontaktstelle des Elektrodenabgriffs, der außerhalb der Messkammer liegt, entsteht. Dieser Widerstand wird also vom Zugriffswiderstand abgezweigt und ist dem Strommesszweig parallel geschaltet. Wenn der Wert des Widerstandes R_k in der gleichen Größenordnung liegt wie der des Zugriffswiderstands, dann wirkt die Parallelschaltung wie ein Stromteiler. Ein Teil des Stromes, der durch den Proteinstrom hervorgerufen wird, fließt dann bereits zur Elektrode zurück, bevor er das Strommessgerät erreicht. Der eigentliche Messstrom wird demnach um den Betrag i_k verringert, was zu kleineren Messsignalen i_{acq} führt. Eine zweite Störquelle ist das Auftreten von Galvanielementen im Stromkreis, die in dem Ersatzschaltbild durch die Spannungsquelle u_g dargestellt werden. Die Galvanielemente können im Messkreis entstehen, wenn unedle Metalle, die eine Verbindung zum Stromkreis aufweisen, in Kontakt mit der Messlösung kommen. In erster Linie treten solche Störquellen an mechanischen Abgriffspunkten auf (z.B. Federkontaktstifte, die aus vergoldetem Messing bestehen). Das Vorhandensein einer Galvanispannung allein hat theoretisch keine störende Auswirkung, da sie analog zu einer externen Spannungsquelle auftritt. Wie in Abschnitt 3.3.3 erläutert, wird der Messstrom dadurch nicht beeinflusst. Oftmals geht das Auftreten von Galvanielementen allerdings mit der gleichzeitigen Bildung eines Kurzschlusses einher. Dann treten sowohl die Galvanispannung u_g als auch der Kurzschlusswiderstand R_k im Ersatzschaltbild auf. Dadurch ergibt sich ein zusätzlicher geschlossener Stromkreis im Messstromkreis. Die Galvanispannung erzeugt dann einen konstanten Strom $i_g = i_k = u_g / (p \cdot R_z + R_k)$, der sich dem Messstrom aufaddiert. Bei Messsequenzen, die mit einem solchen Störverhalten aufgezeichnet werden, ist die Basislinie um einen konstanten Stromwert (*Offset*) in Richtung der Galvanispannung verschoben. Abhilfe kann in solchen Situationen durch die Trocken-

legung oder den Austausch von betroffenen Elementen bzw. Strukturen geschaffen werden. Eine weitere Störquelle ist das Einstreuen von Netzspannung, die sich bei unsachgemäßer Abschirmung des Messkreises als Brummen (50 Hz Frequenz) mit unterschiedlichen Amplituden im Messstrom bemerkbar machen kann.

Kapitel 4

Anlagerungsverhalten

4.1 Physikalische Eigenschaften der biologischen Proben

Die in dieser Arbeit hergestellten biologischen Proben (Proteoliposomen und CHO-Membranfragmente) wurden mit verschiedenen Verfahren physikalisch charakterisiert. Die Versuchsdurchführungen und die messtechnischen Hintergründe wurden bereits in Kapitel 2.4 erläutert. Hier sollen die Ergebnisse der Charakterisierung zusammengefasst und diskutiert werden.

4.1.1 Proteingehalt der Proben

Die hergestellten Proteoliposomen und CHO-Zellmembranfragmente wurden unter Verwendung von BCA (Bicinchoninsäure) auf ihren Proteingehalt untersucht. Bei den in Liposomen rekonstituierten Proteinen sollte dadurch die eingestellte Proteinkonzentration überprüft werden. Bei den Membranfragmenten aus CHO-Zellen fand eine quantitative Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mit Bicinchoninsäure (BCA) statt. Die Proteinkonzentrationen, die sich dadurch für die unterschiedlichen Proben ergaben, sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. In den Proteoliposomen lagen der Natrium-Protonen-Austauscher (NhaA) und das Bacteriorhodopsin (BR) vor. In der Form von rekombinant exprimierten Proteinen in aufgereinigten CHO-Membranfragmenten lagen ebenfalls Bacteriorhodopsin und der neuronale Glutamattransporter EAAC1 vor. Hierbei wurden die zwei Fraktionen 9/31 und 31/45 (Angaben in %) auf ihren Proteingehalt untersucht, die an den entsprechenden Phasengrenzen unterschiedlicher Dichten (9 %, 31 % und 45 % Saccharose) durch den Saccharosegradienten erhalten wurden.

Protein	Präparation	Gesamtprotein / mg/mL
NhaA	Liposomen (LPR 10)	$0,42 \pm 0,05$
BR	Liposomen (LPR 10)	$0,38 \pm 0,01$
BR	CHO (9/31)	$3,7 \pm 1$
BR	CHO (31/45)	$7,5 \pm 2$
EAAC1	CHO (9/31)	$2,6 \pm 1$
EAAC1	CHO (31/45)	10 ± 3

Tabelle 4.1: Gesamtproteingehalt der verschiedenen Proteoliposomen- und CHO-Membranpräparationen.

Für die Proteoliposomenpräparationen (NhaA und BR) ergab sich bei einem Lipid- zu Protein-Verhältnis LPR 10 (LPR: *Lipid Protein Ratio*) jeweils ein Wert, der unterhalb der Hälfte des Wertes lag, der sich nach dem Präparationsprotokoll theoretisch für die Proteinkonzentration ergeben sollte. In beiden Fällen wurde die Proteinkonzentration auf 1 mg/mL eingestellt (Die Lipidkonzentration betrug 10 mg/mL). Die Diskrepanz zwischen dem vorgegebenen Wert und dem experimentell ermittelten Wert kann neben eventuellen Messungenauigkeiten auf die Behandlung mit Bio-Beads zurückzuführen sein, da hier neben dem Detergenz auch Protein aus der Liposomensuspension entzogen werden kann. Ein weiterer Präparationsschritt, in dem dabei Protein verloren geht, ist die abschließende Zentrifugation, bei der die restlichen Bio-Bead-Partikel pelettiert werden. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass das resultierende Präzipitat bei der Präparation von BR-Liposomen eine violette Farbe aufwies. Die Messung des Proteingehalts der Liposomenpräparation des NhaA mit einem LPR 500 war wegen der sehr geringen Proteinmenge nicht möglich. Für die aufgereinigten CHO-Membranfragmente ergab sich bei der Fraktion 31/45 gegenüber der Fraktion 9/31 ein ca. doppelt so großer Proteingehalt. Dies war sowohl bei den Membranen aus BR-exprimierenden Zellen als auch bei Zellfragmenten, die den EAAC1 enthielten, der Fall. Wie groß der Anteil des Zielproteins (BR oder EAAC1) an der Gesamtproteinmenge war, konnte mit der Untersuchungsmethode nicht bestimmt werden. Anhand der Aktivität der Proteine im Vergleich zu rekonstituierten Systemen kann vermutet werden, dass der Proteingehalt des Zielproteins zwischen 1 % und 10 % der Gesamtproteinmenge liegt.

4.1.2 Lipidgehalt der Proben

Der Lipidgehalt der Liposomenpräparationen wurde mit der Methode zur Phosphatbestimmung nach Fiske-Subbarow durchgeführt. Dabei kamen Proteoliposomen zum Einsatz, die den Natrium-Protonen-Austauscher NhaA in unterschiedlichen Proteindichten (LPR 10 und LPR 500) und das Bacteriorhodopsin BR (LPR 10) enthielten. Bei der Herstellung der Liposomen wurde die Lipidkonzentration so gewählt, dass sich eine Endkonzentration von 10 mg/mL einstellen sollte. Bei der spektralphotometrischen Ausmessung der gefärbten Proben ergab sich durch die Kalibrierung mit anorganischem Phosphat eine Phosphatkonzentration, die in allen Proben nahezu identisch war. Berücksichtigt man, dass für die Liposomenpräparation ein polares Lipidextrakt aus *E.coli* eingesetzt wurde (67 % Phosphatidyethanolamin, 23,2 % Phosphatidylglycerol und 9,8 % aus Cardiolipin), konnte die Lipidkonzentration über das mittlere Molekulargewicht eines Lipidmoleküls (921 g/mol) zu $(10,1 \pm 1,4)$ mg/mL bestimmt werden. Dabei wurde über alle Proben, unabhängig von dem vorhandenen Protein, gemittelt. Das Ergebnis liegt in sehr guter Übereinstimmung mit den theoretischen Werten. Dies kann darin begründet sein, dass bei der Präparation kein Verlust an Lipid stattfindet. Ebenso wahrscheinlich ist die Möglichkeit, dass ein eventuell auftretender Verlust (z.B. durch die Bio-Bead-Behandlung) durch eine höhere Konzentration in der Lipidstammlösung kompensiert wird. Die Lipidstammlösungen liegen in leicht flüchtigen Lösungsmitteln (z.B. Chloroform) vor, wodurch sich durch Verdampfung schnell höhere Konzentrationen an Lipid einstellen können. Bei der Untersuchung von CHO-Membranfragmenten konnte der Lipidgehalt von zwei verwendeten Proben der 31/45-Fraktionen zu $(5,0 \pm 0,4)$ mg/mL bestimmt werden. Berücksichtigt man die Gesamtproteinmenge, die für die 31/45-Fraktion in der Größenordnung von 10 mg/mL lag, so ergibt sich bei der Annahme, dass 1 % des Gesamtproteins durch das exprimierte Protein gestellt wird, ein Lipid- zu Protein-Verhältnis LPR 50.

4.1.3 Topologie der Proben

Die verschiedenen Liposomenpräparationen, bei denen die Proteine NhaA und BR in Liposomen rekonstituiert wurden, sind elektronenmikroskopisch untersucht worden, um die erhaltenen topologischen Bilder quantitativ auszuwerten. Dabei kam die Gefrierbruchmethode zum Einsatz, die ein Bild liefert, das die innere Membranstruktur sowie integrale Membranproteine sichtbar macht. In Abb. 4.1 sind auszugsweise drei vesikuläre Strukturen gezeigt, die für die untersuchten Proben erhalten wurden. In Abb. 4.1 A und B sind Liposomen dargestellt, die den NhaA enthielten. Die Proben wiesen ein unterschiedliches Lipid- zu Protein-Verhältnis von LPR 10 (A) und LPR 500 (B) auf. C zeigt ein BR-Liposom, in dem der Proteingehalt einem LPR 10 entsprach. Die nominativen LPR beziehen sich dabei auf die Präparationsprotokolle, bei denen der gegebenen Lipidmasse anteilig soviel Protein zugegeben wurde, dass sich theoretisch der benannte LPR ergibt. Die hier vorgestellten elektronenmikroskopischen Messungen sollten daher dazu verwendet werden, Aufschluss über den tatsächlichen Proteinanteil in der Liposomenpräparation zu erhalten.

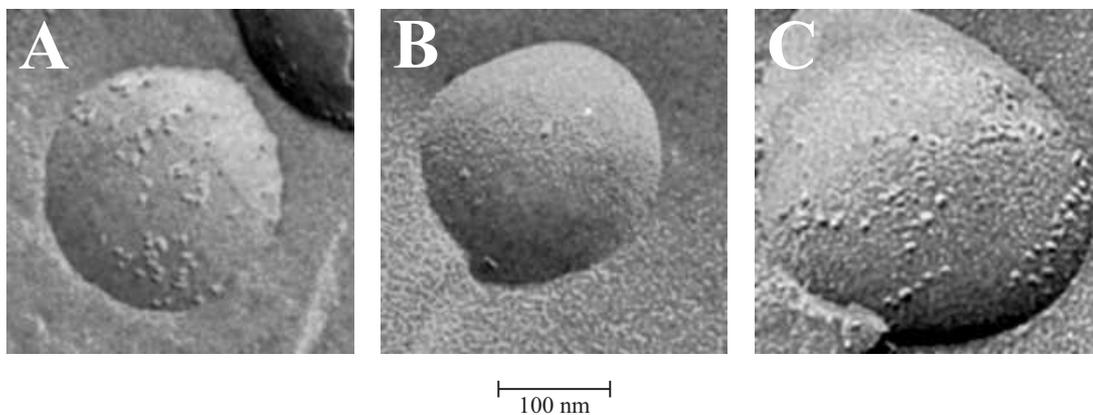


Abbildung 4.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Liposomenpräparationen. Gezeigt sind NhaA-Liposomen mit einem LPR 10 (A) und LPR 500 (B) sowie ein BR-Liposom mit LPR 10 (C). Zur Darstellung wurde die Gefrierbruchtechnik angewendet.

Bei überschlägiger Rechnung kann die Anzahl der Proteine in der Liposomenmembran durch das Molekulargewicht des Proteins bestimmt werden. Die Lipidmasse von einem Liposom mit einem Durchmesser von 100 nm beträgt ca. 10^{-16} g. Die Proteinmasse ist für einen LPR 10 genau ein Zehntel der Lipidmasse. Mit dem Molekulargewicht M_T von 41,4 kDa des NhaA ergibt sich dadurch die Anzahl der Proteinmoleküle pro Liposom zu etwa 150 ($N_T = m_T/M_T \cdot N_A$, wobei N_T die Anzahl der Transporter, m_T die Masse der Transporter und N_A die Avogadrokonstante ist). Bei einem LPR 500 sollten ca. 3 Proteinmoleküle pro Liposom vorhanden sein. Aufgrund des geringeren Molekulargewichts von 26,7 kDa sollten BR-Liposomen, bei denen der LPR 10 eingestellt wurde, ca. 230 Proteinmoleküle pro Liposom mit 100 nm Durchmesser aufweisen. In den elektronenmikroskopischen Bildern der Liposomenpräparationen waren vesikuläre Strukturen sichtbar, die überwiegend deutlich größere Durchmesser als 100 nm aufwiesen. Die in Abb. 4.1 gezeigten Liposomen stellen mit ca. 200 nm Durchmesser die kleinsten sichtbaren Strukturen dar. Zur quantitativen Auswertung wurde daher die Flächendichte der Proteine herangezogen, die durch die Anzahl der Proteinmoleküle in der Liposomenoberfläche definiert ist. Stichprobenartige Auszählungen der als Proteine identifizierten strukturellen Erhebungen in den Gefrierbruchmembranen ergaben für den NhaA mit LPR 10 eine Pro-

teindichte von ca. $2000 \text{ 1}/\mu\text{m}^2$. Für einen LPR 500 ergab sich ein Wert von ca. $60 \text{ 1}/\mu\text{m}^2$. Bei BR-Liposomen waren ca. $1100 \text{ 1}/\mu\text{m}^2$ Proteinstrukturen in der Membran vorhanden. In Abb. 4.1 wird der Unterschied zwischen den LPR 10 und LPR 500 der NhaA-Liposomen besonders deutlich. Bei einem LPR 10 (A) ist die Anzahl der sichtbaren Strukturen, die als Proteinmoleküle identifiziert wurden, signifikant höher als bei einem LPR 500 (B), bei dem gerade zwei Proteinmoleküle in der ansonsten homogenen Liposomenoberfläche sichtbar sind. Das Verhältnis der bestimmten Proteindichten beträgt für den NhaA ca. 30 (Proteindichte bei LPR 10 zu Proteindichte bei LPR 500) und stellt somit eine gute Übereinstimmung mit der theoretischen Vorgabe dar. Die absoluten Werte der beobachteten Proteindichten liegen für alle Proben ein wenig unterhalb der Hälfte der theoretisch bestimmten Werte. Dieses Ergebnis ist konform zu den Messungen, bei denen der Proteingehalt mit BCA bestimmt wurde.

4.1.4 Größe und dynamisches Verhalten der Liposomen

Die Bestimmung der Größe von Liposomen, die durch Extrudieren hergestellt wurden, erfolgte durch die Anwendung der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS: *Fluorescence correlation spectroscopy*), die zusätzlich Informationen über das dynamische Verhalten der Liposomen liefert. Die verwendeten Liposomen enthielten kein Protein und waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszin gefüllt. Die Vorbereitung und Durchführung der Experimente wurde bereits in Kapitel 2.4.4 beschrieben. Der Fokus des konfokalen Mikroskops befindet sich dabei in einer Lösung, die eine fluoreszierende Probe enthält. Die angeschlossene Messdatenerfassung wertet die in dem Fokus auftretenden Fluktuationen in der emittierten Fluoreszenzintensität aus. Dazu wird die sogenannte Autokorrelationsfunktion verwendet, um die Selbstähnlichkeit der Fluoreszenzintensität zu verschiedenen Zeitpunkten zu beschreiben [56, 74, 37]. Mathematisch wird die Ähnlichkeit einer Intensität $I(t)$ mit einer nach dem Zeitintervall τ später auftretenden Intensität $I(t+\tau)$ durch das Produkt $I(t) \cdot I(t+\tau)$ formuliert. Die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ ergibt sich dann aus dem Mittelwert aller Produkte, der auf den Mittelwert der Fluoreszenzintensität normiert ist, mit der Verschiebung τ :

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (4.1)$$

Für jedes mögliche τ kann ein Wert der Autokorrelationsfunktion aus dem vollständigen Datensatz bestimmt werden, wobei die kleinste Verschiebung durch das Abtastintervall Δt zwischen zwei Messpunkten gegeben ist. Ist die Autokorrelation $G(\tau)$ gleich Eins, so sind die Mittelwerte aus den Verschiebeprodukten und den Einzelwerten $I(t)$ gleich groß. In diesem Fall weist die Funktion keine Korrelation auf. Existieren Korrelationen, so weist die Autokorrelationsfunktion in Abhängigkeit von der Art eines Bewegungsvorgangs im Fokus des konfokalen Mikroskops eine bestimmte Form auf. Für die dreidimensionale Diffusion von fluoreszierenden Teilchen durch den Fokus lässt sich folgende Beziehung aufstellen [56, 74, 37]:

$$G(\tau) = 1 + \sum_i \frac{1}{N_i \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,i}}\right) \cdot \sqrt{1 + s^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_{D,i}}}} \quad (4.2)$$

Dabei ist N_i die mittlere Anzahl der fluoreszierenden Teilchen der Spezies i im Fokus, $\tau_{D,i}$ deren mittlere Aufenthaltsdauer bzw. Diffusionszeit im Fokus und s der Struktur-

parameter, der das Verhältnis der Fokusabmessungen beschreibt. Der Strukturparameter ist definiert als $s = \omega_{xy}/\omega_z$, wobei ω_{xy} den Durchmesser des Fokus senkrecht zur Strahlrichtung (transversal) und ω_z den Durchmesser in Strahlrichtung darstellen. Die mittlere Diffusionszeit $\tau_{D,i}$ wird formal durch die Bewegung des Teilchens in der Transversalebene bestimmt, wodurch $\tau_{D,i} = \omega_{xy}^2/(4 \cdot D_i)$ (D_i : Diffusionskoeffizient der Spezies i) gilt. Das effektive Volumen, in dem mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Detektion von Fluoreszenzphotonen erfolgt, ist nicht durch das Volumen des fokalen Rotationsellipsoiden gegeben, sondern berechnet sich nach $V_{eff} = \pi^{3/2} \cdot \omega_{xy}^2 \cdot \omega_z$ [37].

Vor dem eigentlichen Experiment erfolgte eine Eichmessung mit dem Farbstoff Rhodamin 6G (Rh6G), der in wässriger Lösung mit einer Konzentration von $1,3 \mu\text{M}$ vorlag. Da der Diffusionskoeffizient dieses Farbstoffes bekannt ist ($D_{Rh6G} = 2,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$), können aus den Daten, die sich bei einer Annäherung der erhaltenen Messdaten mit einer Funktion nach Gl. 4.2 mit $i = 1$ ergeben, der transversale Fokusbereich ω_{xy} und das effektive Volumen V_{eff} berechnet werden. Die Auswertung der Eichmessung lieferte eine Diffusionszeit von $\tau_D = 24,6 \mu\text{s}$ und einen Strukturparameter von $s = 0,12$. Damit ergab sich $\omega_{xy} = 0,17 \mu\text{m}$ und $V_{eff} = 0,21 \text{ fL}$. Diese Werte wurden benötigt, um die Größe der Liposomen und deren dynamisches Verhalten zu charakterisieren. Die Messungen der mit dem Farbstoff Fluoreszin gefüllten Liposomen wurden direkt im Anschluss an die Eichmessung durchgeführt. Dabei kamen drei verschiedene Verdünnungsstufen des aus dem Waschvorgang erhaltenen Eluats, mit dem die Liposomenlösung von freien Fluoreszinmolekülen befreit wurden, zum Einsatz (siehe Kapitel 2.4.4). In Abb. 4.2 sind die aus den Messdaten berechneten Autokorrelationsfunktionen und die angenäherten Funktionen nach Gl. 4.2 in Abhängigkeit von der Zeitverschiebung τ dargestellt.

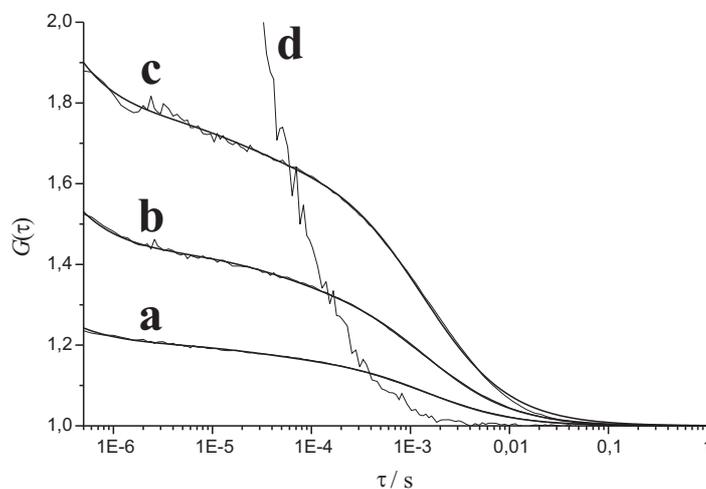


Abbildung 4.2: Fluoreszenzkorrelationspektrogramme für verschieden verdünnte Liposomenlösungen. Als Puffer wurde eine Lösung mit 25 mM HEPES, 25 mM Tris, 100 mM ChCl, pH 7,0/KOH verwendet. Die Liposomen enthielten kein Protein und waren mit dem Farbstoff Fluoreszin gefüllt. Die Kurven wurden mit einer unverdünnten (a), einer 1:2 verdünnten (b) und einer 1:4 verdünnten (c) Liposomenlösung aufgezeichnet. Als Kontrolle erfolgte eine Aufzeichnung, bei der nur der reine Puffer verwendet wurde (d). Die Anregung fand mit einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm statt. Das Fluoreszenzsignal wurde zwischen 530 nm und 600 nm aufgezeichnet.

Die Kurven a bis c in Abb. 4.2 repräsentieren die Ergebnisse, die mit den Liposomenlösun-

gen bei unterschiedlicher Verdünnung erhalten wurden. Dabei wurde eine unverdünnte (a), eine 1:2 verdünnte (b) und eine 1:4 verdünnte (c) Liposomenlösung verwendet. Die Liposomen lagen in einem Puffer aus 25 mM HEPES, 25 mM Tris, 100 mM ChCl, pH 7,0/KOH vor. Der gleiche Puffer wurde für die Verdünnungen benutzt. Zur Kontrolle wurde ein Fluoreszenzkorrelationspektrogramm des reinen Puffers (ohne Liposomen) aufgezeichnet, woraus ein Kurvenverlauf resultierte, der in Abb. 4.2 d gezeigt ist. Im Gegensatz zu dem reinen Puffer wiesen die Korrelationspektrogramme der Liposomenlösungen eine deutliche Komponente bei einer höheren Zeitverschiebung τ auf. Zur Annäherung musste eine Funktion verwendet werden, die sich aus mehreren Diffusionsprozessen zusammensetzt, da die Funktion bei kleinen Zeitverschiebungen eine zusätzliche Komponente enthält und nicht gegen einen Sättigungswert strebt. Die zusätzliche Komponente war in gleicher Form in der Kurve des reinen Puffers enthalten, was für das Vorhandensein einer Autofluoreszenz der verwendeten Pufferzusammensetzung sprechen kann. Da sich die Autokorrelationskomponente, die durch die Liposomen in den Messlösungen hervorgerufen wurde, sehr deutlich von den unerwünschten Komponenten abhob, konnte eine Analyse der aus den Annäherungsfunktionen erhaltenen Parametern durchgeführt werden. Die bestimmten Daten sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. In dem Diagramm (Abb. 4.2) wird sofort ersichtlich, dass die Amplitude der Kurven mit abnehmender Liposomenkonzentration steigt. Dieses Verhalten wird von Gl. 4.2 gefordert, bei der die reziproke Teilchenanzahl $1/N_i$ das Maximum einer Diffusionskomponente bestimmt. Das folgt aus der Tatsache, dass bei einer geringeren Anzahl von diffundierenden Partikeln eine ausgeprägtere Fluktuation hervorgerufen wird. Bei einer zu großen Anzahl von fluoreszierenden Elementen im Fokus würde die Fluoreszenz homogen erscheinen, und die Korrelationsfunktion ginge gegen Eins. Entsprechend der verwendeten Verdünnungen nahm die Liposomenanzahl im Fokus von $N = 6,05$ (unverdünnt) auf 2,86 (Verdünnung 1:2) und 1,56 (Verdünnung 1:4) ab. Mit dem effektiven Volumen des Fokus ($V_{eff} = 0,21$ fL) konnten für diese Werte die Lipidkonzentrationen der Liposomenlösungen zu 2,86, 1,35 und 0,74 mg/mL bestimmt werden. Als Lipidmasse eines Liposoms wurde $m_{lpv} = 10^{-16}$ g (lpv: Lipid pro Vesikel) angesetzt. Das Verhältnis der Lipidkonzentrationen deckt sich mit der durchgeführten Verdünnung. Aus der Größenordnung der Lipidkonzentration folgt, dass die Liposomenlösung bei der Eluation um einen Faktor von ca. Vier verdünnt wurde, da anstelle von den ursprünglich eingesetzten 10 mg/mL (Lipidkonzentration vor dem Eluieren) nur 2,86 mg/mL detektiert werden konnten.

Verdünnung	$\tau_D / \mu s$	d_v / nm	$D / 10^{-12} m^2/s$	N	$c_l / mg/mL$
1:1	1460	94,9	4,71	6,05	2,86
1:2	1400	91,0	4,91	2,86	1,35
1:4	1360	88,4	5,06	1,56	0,74

Tabelle 4.2: Größe und dynamische Parameter der verwendeten Liposomenlösungen bei unterschiedlicher Verdünnung. Die Diffusionszeit τ_D und die Anzahl N der Liposomen im Fokus wurden aus der Annäherung der Kurven aus Abb. 4.2 a bis c mit einer Funktion nach Gl. 4.2 erhalten. Daraus konnten der Liposomendurchmesser d_v , der Diffusionskoeffizient D und die Lipidkonzentration c_l bestimmt werden.

Die mittlere Aufenthaltsdauer bzw. Diffusionszeit der Liposomen ergab sich für die drei Kurven im Mittel zu $\tau_D = (1407 \pm 50) \mu s$. Mit dem transversalen Fokusbereich, der durch die Eichmessung mit Rhodamin bestimmt wurde ($\omega_{xy} = 0,17 \mu m$), konnte der Li-

posomendurchmesser unter Einbeziehung der *Einstein-Stokes-Beziehung* (siehe Gl. 4.4) im Mittel zu $d_v = (91 \pm 3)$ nm bestimmt werden. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit dem theoretisch vorgegebenen Liposomendurchmesser von 100 nm überein, der durch die Porengröße der Extrusionsmembran bei der Herstellung der Liposomen definiert wird. Die Strecke, die ein Liposom im Mittel in der Zeit von $1407 \mu\text{s}$ (τ_D) zurücklegt, beträgt $0,17 \mu\text{m}$ (ω_{xy}), woraus eine mittlere Geschwindigkeit von $0,12 \text{ mm/s}$ resultiert. Der Diffusionskoeffizient ist ebenfalls durch den transversalen Fokusbereich ω_{xy} und die Diffusionszeit τ_D definiert und ergab sich für ein Liposom zu $D = (4,89 \pm 0,17) \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$.

4.2 Theoretisches Anlagerungsmodell

Bevor die Ergebnisse gezeigt werden, die mit dem Membranprotein Bacteriorhodopsin und anderen Methoden zur Detektion von Massezunahme auf Elektrodenoberflächen durchgeführt wurden, erfolgt eine mathematische Bestimmung der zu erwartenden Anlagerungszeit und des zeitlichen Verhaltens der Massenbelegung der verwendeten Sensoren.

4.2.1 Mittlere Anlagerungsdauer

Die mittlere quadrierte Wegstrecke $\langle s^2 \rangle$, die ein Teilchen in einem 3-dimensionalen Volumen, z.B. in einer wässrigen Lösung, in der Zeit t zurücklegt ist nach Einstein [16] gegeben durch:

$$\langle s^2 \rangle = 6 \cdot D \cdot t \quad (4.3)$$

Für den Diffusionskoeffizienten D eines sphärischen Teilchens mit dem Radius r gilt die *Stokes-Einstein-Beziehung*:

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (4.4)$$

Darin sind k die Boltzmannkonstante, T die Temperatur und η die Viskosität. Mit den beiden Gleichungen 4.3 und 4.4 erhält man für die Zeit t , in der ein Teilchen die mittlere quadrierte Strecke $\langle s^2 \rangle$ zurücklegt,

$$t = \frac{\langle s^2 \rangle \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}{k \cdot T} \quad (4.5)$$

Mit dieser Gleichung als Basis kann die Adsorptionsdauer τ_{ad} bestimmt werden. Aus Gleichung 4.5 folgen die Bedingungen, dass die Lösung, von der die Elektrode umgeben ist, eine homogene Konzentration an als kugelförmig zu betrachtenden Vesikeln bzw. Liposomen aufweist und sich in Ruhe befindet. Die Konzentration an Vesikeln in der Lösung wird über deren Lipidgehalt in mg/mL ausgedrückt. Wenn man weiß, wie groß die Lipidmasse ist, die eine vollständig mit Vesikeln bedeckte Elektrodenoberfläche aufweist, kann daraus bestimmt werden, wie groß das Volumen vor der Elektrode sein muss, damit genau der Anteil der darin enthaltenen Teilchen auf die Elektrode auftrifft und adsorbiert, der der Masse einer vollständig belegten Oberfläche entspricht. Dieses Volumen ist über die Elektrodenfläche und die Schichtdicke vor der Elektrode gegeben. Die Schichtdicke ist dann genau die mittlere Wegstrecke, die in der Lösung vorhandene Vesikel zurücklegen müssen, um eine vollständig belegte Elektrodenoberfläche zu erzeugen. Die Adsorptionsdauer kann mit der Schichtdicke über Gleichung 4.5 bestimmt werden.

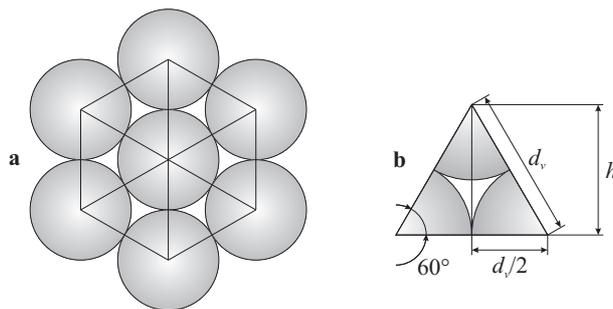


Abbildung 4.3: Darstellung zur Bestimmung des Belegungsgrades.

Zunächst muss die Lipidmasse einer maximal belegten Elektrodenoberfläche bestimmt werden. In Abb. 4.3 a ist die dichtgepackte Anordnung von sphärischen Objekten gezeigt, deren Packungsdichte über das in Abb. 4.3 b gezeigte gleichseitige Dreieck mit der Kantenlänge d_v berechnet werden kann. Die Länge d_v ist gleich dem Durchmesser der gleichgroßen Kugeln. Die Packungsdichte bzw. der Belegungsgrad Θ kann über die auf die Ebene projizierten Flächen der Kugeln bestimmt werden. Die Kugeln stellen Vesikel mit dem Durchmesser d_v und das Dreieck einen Teil der Elektrodenoberfläche dar. Der Belegungsgrad ist dann gleich dem Verhältnis aus den Kreis- bzw. projizierten Vesikelflächen $A_{v,i}$ im Dreieck und der Fläche $A_{e,i}$ des Dreiecks selbst (der Index v steht für Vesikel und e steht für Elektrode).

$$\Theta = \frac{A_{v,i}}{A_{e,i}} = \frac{N_v \cdot A_{v,0}}{A_{e,tot}} \quad (4.6)$$

Der hintere Teil von Gleichung 4.6 gibt das ebenfalls gültige Flächenverhältnis bezogen auf die Gesamtelektrodenfläche $A_{e,tot}$ wieder, auf der sich eine projizierte Vesikelfläche von $N_v \cdot A_{v,0}$ befindet. Dabei sind N_v die Anzahl der Vesikel und $A_{v,0}$ die projizierte Fläche von einem einzelnen Vesikel mit dem Durchmesser d_v . Die einzelnen Flächen sind gegeben durch:

$$A_{v,i} = \frac{\pi}{8} \cdot d_v^2 \quad (4.7)$$

$$A_{e,i} = \frac{\sqrt{3}}{4} \cdot d_v^2 \quad (4.8)$$

$$A_{v,0} = \frac{\pi}{4} \cdot d_v^2 \quad (4.9)$$

$$A_{e,tot} = \frac{\pi}{4} \cdot d_e^2 \quad (4.10)$$

Der maximale Belegungsgrad ergibt sich mit den Gleichungen 4.7 und 4.8 zu:

$$\Theta_{max} = \frac{\frac{\pi}{8}}{\frac{\sqrt{3}}{4}} = \frac{\pi}{\sqrt{12}} \quad (4.11)$$

Für die Anzahl N_v der auf der Oberfläche sitzenden Vesikel folgt aus Gleichung 4.6 zusammen mit den Gleichungen 4.9 und 4.10:

$$N_v = \Theta \cdot \frac{A_{e,tot}}{A_{v,0}} = \Theta \cdot \frac{d_e^2}{d_v^2} \quad (4.12)$$

Da nun die Anzahl der Vesikel, die auf der Oberfläche sitzen, über den Belegungsgrad sowie die Durchmesser der Vesikel und der Elektrodenoberfläche gegeben ist, kann durch das anteilige Lipidvolumen am Vesikel die Lipidmasse bestimmt werden. Das Volumen V_{lpv} (*lpv*: Lipid pro Vesikel) der Lipiddoppelschicht in einem Vesikel oder Liposom beträgt:

$$V_{lpv} = \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot (d_v^3 - (d_v - 2 \cdot d_m)^3) \quad (4.13)$$

Das ist die Differenz aus der äußeren (Durchmesser d_v) und der inneren (Durchmesser $d_v - 2 \cdot d_m$) Sphäre eines kugelförmigen Vesikels, wobei d_m die Membrandicke ist. Mit der Lipiddichte ρ_l und der Gesamtvesikelanzahl N_v kann aus dem Lipidvolumen eines einzelnen Vesikels die Gesamtmasse m_{lpe} (*lpe*: Lipid pro Elektrode) der Lipide auf der Elektrodenoberfläche formuliert werden:

$$m_{lpe} = N_v \cdot \rho_l \cdot V_{lpv} = \frac{1}{6} \cdot N_v \cdot \rho_l \cdot \pi \cdot (d_v^3 - (d_v - 2 \cdot d_m)^3) \quad (4.14)$$

Setzt man Gleichung 4.12 für N_v hier ein, ergibt sich:

$$m_{lpe} = \frac{\Theta \cdot \rho_l \cdot \pi \cdot d_e^2}{6 \cdot d_v^2} \cdot (d_v^3 - (d_v - 2 \cdot d_m)^3) \quad (4.15)$$

Betrachtet man nun ein Volumen oberhalb der Elektrodenoberfläche mit einer Dicke d_s , so kann darin die Bewegung eines Vesikels, die über Gleichung 4.5 gegeben ist, in jede beliebige Richtung stattfinden. Es bildet sich also ein kugelförmiger Bereich um die Stelle, von der das Teilchen gestartet ist und auf deren Oberfläche die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für das Vesikel nach der Zeit $t = \tau_{ad}$ überall gleich groß ist (Abb. 4.4). Die Zeit τ_{ad} soll nun so groß sein, dass in dieser Zeit genau die Strecke d_s zurückgelegt wird. Wichtig ist dabei die Tatsache, dass die Strecke d_s von jedem Vesikel in dem Volumen V_s zurückgelegt wird.

Entlang der z -Achse (siehe Abb. 4.4) ist jeder Punkt ein Startpunkt für die Bewegung eines Vesikels. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Vesikel mit dem Startpunkt $z < d_s$ in der Zeit τ_{ad} auf der Oberfläche adsorbiert, ist durch den Flächenanteil der Kugel mit dem Radius d_s gegeben, der in der Elektrodenoberfläche verschwindet. Für die Flächenanteile innerhalb (A_{ad}) und außerhalb (A_s) der Elektrodenoberfläche gilt:

$$A_{ad} = 2 \cdot \pi \cdot d_s \cdot (d_s - z) \quad (4.16)$$

$$A_s = 2 \cdot \pi \cdot d_s \cdot (d_s + z) \quad (4.17)$$

Da jeder Punkt auf der z -Achse ein Startpunkt der Bewegung sein kann, ist die Wahrscheinlichkeit, dass N_i Teilchen aus der Gesamtanzahl N in dem Volumen V_s auf der Oberfläche ankommen, gegeben durch:

$$p = \frac{N_i}{N} = \frac{\frac{1}{d_s} \cdot \int_0^{d_s} A_{ad} dz}{\frac{1}{d_s} \cdot \int_0^{d_s} A_s dz} = \frac{\int_0^{d_s} (d_s - z) dz}{\int_0^{d_s} (d_s + z) dz} = \frac{\frac{1}{2} \cdot d_s^2}{\frac{3}{2} \cdot d_s^2} = \frac{1}{3} \quad (4.18)$$

Es adsorbieren also genau ein Drittel der Vesikel, die sich in dem Volumen V_s befinden, auf der Elektrodenoberfläche. Das Verhältnis N_i/N ist dabei gleich dem Massenverhältnis von adsorbierter Lipidmasse $m_{l,ad}$ zur Gesamtlipidmasse m_l im Volumen V_s . Für die auf der Oberfläche adsorbierte Lipidmasse gilt also:

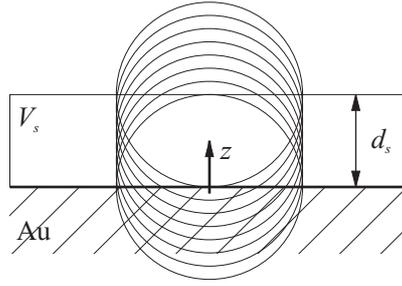


Abbildung 4.4: Darstellung zur Auftreffwahrscheinlichkeit einer Population von Vesikeln in dem Volumen V_s . Entlang der z -Achse ist jeder Punkt von 0 bis d_s Startpunkt einer Bewegung. Wenn ein Vesikel in der Zeit $t = \tau_{ad}$ die mittlere Strecke d_s (nach Gleichung 4.5) zurücklegt, so ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für jedes Vesikel auf der z -Achse nach der Zeit τ_{ad} durch den Umkreis (in dreidimensionaler Darstellung wäre es eine Kugel) seines Startpunkts mit dem Radius d_s gegeben. Alle Flächenanteile, die in der Elektrodenoberfläche verschwinden, bilden die Wahrscheinlichkeit, dass ein Vesikel adsorbiert. Integriert man über diese Flächenanteile und über die Flächenanteile, die außerhalb der Elektrode liegen, so ist deren Verhältnis gleich dem Verhältnis von adsorbierten und freien Vesikeln auf einer Linie parallel zur z -Achse. Da das Ergebnis auf jeder Nachbarlinie aus Symmetriegründen gleich ist, reicht es aus, über eine Linie zu integrieren.

$$m_{l,ad} = p \cdot m_l = p \cdot c_l \cdot V_s, \quad (4.19)$$

wobei die Masse m_l durch die Lipidkonzentration $c_l = m_l/V_s$ ausgedrückt werden kann. Die adsorbierte Lipidmasse $m_{l,ad}$ aus dem Volumen V_s soll nun genau gleich der Masse m_{lpe} (aus Gleichung 4.15) auf der Elektrode sein:

$$p \cdot c_l \cdot V_s = m_{lpe} \quad (4.20)$$

Das Volumen über der Elektrode ist gegeben durch die Elektrodenfläche $A_{e,tot}$ und die Schichtdicke d_s :

$$V_s = A_{e,tot} \cdot d_s = \frac{\pi}{4} \cdot d_e^2 \cdot d_s \quad (4.21)$$

Zusammen mit Gleichung 4.15 folgt daraus für Gleichung 4.20:

$$p \cdot c_l \cdot \frac{\pi}{4} \cdot d_e^2 \cdot d_s = \frac{\Theta \cdot \rho_l \cdot \pi \cdot d_e^2}{6 \cdot d_v^2} \cdot (d_v^3 - (d_v - 2 \cdot d_m)^3) \quad (4.22)$$

Umgeformt ergibt sich für die Schichtdicke:

$$d_s = \frac{2 \cdot \Theta \cdot \rho_l}{3 \cdot p \cdot d_v^2 \cdot c_l} \cdot (d_v^3 - (d_v - 2 \cdot d_m)^3) \quad (4.23)$$

Mit Gleichung 4.5 ergibt sich für die Adsoptionszeit $t = \tau_{ad}$, wenn d_s gleich der mittleren zurückgelegten Wegstrecke $\langle s^2 \rangle^{1/2}$ gesetzt wird, folgender Zusammenhang:

$$\tau_{ad} = \frac{2}{9} \cdot \left(\frac{\Theta \cdot \rho_l}{p \cdot c_l} \cdot \frac{d_v^3 - (d_v - 2 \cdot d_m)^3}{d_v^2} \right)^2 \cdot \frac{\pi \cdot \eta \cdot d_v}{k \cdot T} \quad (4.24)$$

In Abb. 4.5 ist die Adsorptionsdauer in Abhängigkeit von der eingesetzten Vesikelkonzentration, ausgedrückt als Lipidkonzentration c_l in mg/mL, für 4 verschiedene Vesikeldurch-

messer d_v dargestellt. Die eingesetzten Größen sind: Belegungsgrad $\Theta = \Theta_{max} = \pi/\sqrt{12}$ (siehe Gleichung 4.6), Lipiddichte $\rho_l = 1000$ g/L, Adsorptionsanteil $p = 1/3$ (siehe Gleichung 4.22), Membrandicke $d_m = 7$ nm, Viskosität von Wasser $\eta = 10^{-3}$ Ns/m², Boltzmannkonstante $k = 1,38065 \cdot 10^{-23}$ J/K und $T = 298,15$ K (Raumtemperatur 25 °C). Mit diesen Angaben dauert es bei einem Vesikeldurchmesser von $d_v = 100$ nm 44 Minuten, bis die Elektrodenoberfläche mit Vesikeln abgesättigt ist, wenn die Lipidkonzentration der Vesikel 0,25 mg/mL beträgt. In Abb. 4.5 ist eine Kurvenschar gezeigt, die die Adsorptionszeit in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration nach Gl. 4.24 darstellt. Als Parameter der Gleichung wurden die oben aufgeführten Werte verwendet.

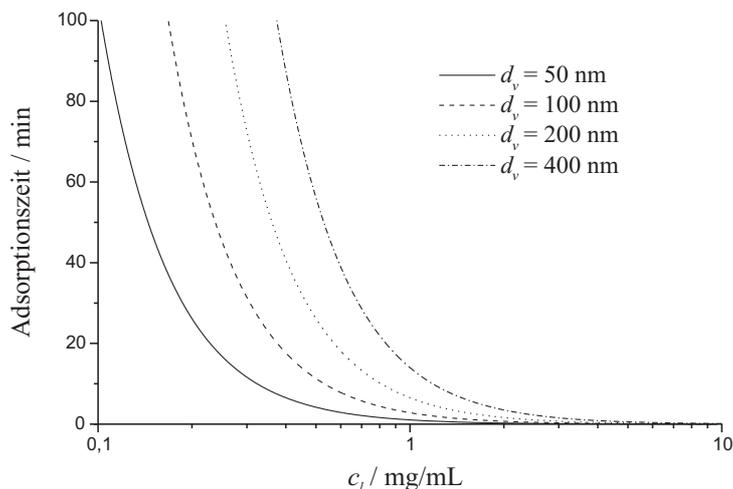


Abbildung 4.5: Anlagerungsdauer (Adsorptionszeit τ_{ad}) in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration c_l . Die Kurven wurden nach Gl. 4.24 für verschiedene Liposomen- bzw. Vesikeldurchmesser bestimmt. Die Durchmesser und die Zuordnung zu den dargestellten Kurven sind im Legendentext angegeben.

4.2.2 Zeitliche Abhängigkeit der Massenbelegung

Mit den im vorigen Abschnitt aufgestellten Gleichungen kann eine zeitliche Anhängigkeit der Massenbelegung der Sensoroberfläche beschrieben werden. Dabei wird die Schichtdicke des lipidhaltigen Volumens variabel gehalten, so dass sich die Lipidmasse $m_{l,ad}$, die auf die Oberfläche trifft, mit der Zeit t ändert.

Aus den Gleichungen 4.19 und 4.21 folgt für die Schichtdicke d_s :

$$d_s = \frac{4 \cdot m_{l,ad}}{p \cdot c_l \cdot \pi \cdot d_e^2} \quad (4.25)$$

Zusammen mit Gl. 4.5 kann damit für die Masse $m_{l,ad}$, die in der Zeit t auf die Elektrodenoberfläche trifft, formuliert werden:

$$m_{l,ad} = \sqrt{\frac{t \cdot k \cdot T}{8 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_v}} \cdot p \cdot c_l \cdot \pi \cdot d_e^2 \quad (4.26)$$

Dies ergibt sich aus dem Ergebnis, das im vorigen Abschnitt hergeleitet wurde. Dabei wurde allerdings nicht berücksichtigt, dass das Fassungsvermögen der Oberfläche mit zu-

nehmender Beladung kleiner wird. Je mehr Vesikel sich bereits auf der Oberfläche befinden, desto weniger freier Platz ist vorhanden, auf dem weitere Vesikel adsorbieren können. Von der Masse $m_{l,ad}$ bleibt also nur der Teil auf der Oberfläche haften, der auf den freien Flächenanteil trifft. Der freie Flächenanteil kann über den Belegungsgrad als $1 - \Theta$ ausgedrückt werden. Für die auf der Oberfläche tatsächlich abgelegte Masse m_{ad} gilt dann in differentieller Form:

$$\frac{dm_{ad}}{dt} = (1 - \Theta) \cdot \frac{dm_{l,ad}}{dt} \quad (4.27)$$

Mit Gl. 4.6 und $N_v = m_{ad}/m_{lpv}$ ergibt sich daraus:

$$\frac{dm_{ad}}{dt} = \left(1 - \frac{m_{ad} \cdot A_{v,0}}{m_{lpv} \cdot A_{e,tot}}\right) \cdot \frac{dm_{l,ad}}{dt}, \quad (4.28)$$

wobei m_{lpv} die Lipidmasse pro Vesikel ist (lpv: Lipid pro Vesikel). Umgestellt ergibt sich die Dgl:

$$\frac{dm_{ad}}{dt} + \frac{A_{v,0}}{m_{lpv} \cdot A_{e,tot}} \cdot \frac{dm_{l,ad}}{dt} \cdot m_{ad} = \frac{dm_{l,ad}}{dt} \quad (4.29)$$

Die allgemeine Lösung dieser Dgl. ist:

$$m_{ad} = e^{-\frac{A_{v,0}}{m_{lpv} \cdot A_{e,tot}} \cdot m_{l,ad}} \cdot \int \frac{dm_{l,ad}}{dt} \cdot e^{\frac{A_{v,0}}{m_{lpv} \cdot A_{e,tot}} \cdot m_{l,ad}} dt \quad (4.30)$$

Mit den Randbedingungen $m_{ad}(t=0) = m_{ad,0}$ und $m_{ad}(t \rightarrow \infty) = m_{ad,\infty}$ ergibt sich:

$$m_{ad} = m_{ad,\infty} + (m_{ad,0} - m_{ad,\infty}) \cdot e^{-K_{ad} \cdot \sqrt{t}} \quad (4.31)$$

Der Faktor K_{ad} , der im Exponenten der Exponentialfunktion angegeben ist, soll im folgenden als Adsorptionskoeffizienten bezeichnet werden. Für ihn gilt mit den Gleichungen 4.9, 4.10, 4.13 und $m_{lpv} = \rho_l \cdot V_{lpv}$:

$$K_{ad} = \frac{6 \cdot d_v^2 \cdot p \cdot c_l}{\rho_l \cdot (d_v^3 - (d_v - 2 \cdot d_m)^3)} \cdot \sqrt{\frac{k \cdot T}{8 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_v}} \quad (4.32)$$

Neben den Größen, die durch die Materialeigenschaften und die Versuchsbedingungen gegeben sind, wird der Adsorptionskoeffizient vorwiegend durch den Durchmesser der adsorbierenden kugelförmigen Vesikel bestimmt. Setzt man einen Vesikeldurchmesser von $d_v = 100$ nm voraus, so ergibt sich ein Adsorptionskoeffizient von $K_{ad} = 0,22 \text{ min}^{-1/2}$. Die festgelegten Größen sind dabei: $p = 1/3$ (siehe Gleichung 4.22), $c_l = 0,4 \text{ mg/mL}$ (25-fache Verdünnung der Ausgangskonzentration von 10 mg/mL), $\rho_l = 1000 \text{ g/L}$, $d_m = 7 \text{ nm}$, $k = 1,38065 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$, $T = 298,15 \text{ K}$ (Raumtemperatur $25 \text{ }^\circ\text{C}$) und $\eta = 10^{-3} \text{ Ns/m}^2$.

4.3 Anlagerungsexperimente mit Bacteriorhodopsin

4.3.1 Charakterisierung des Proteins

Das Membranprotein Bacteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* wurde hinsichtlich seiner Eignung zur Bestimmung von Massenzunahmevergängen an festkörperunterstützten Membranen charakterisiert. Dabei wurden verschiedene Parameter untersucht, die

entscheidend für den Einsatz des Proteins als Detektionssystem waren. In Abb. 4.6 A ist ein typischer Signalverlauf dargestellt, der durch die Lichtaktivierung von BR-haltigen Membranen erhalten wurde. Dabei wurde der Sensor nach einer Sekunde Messaufzeichnung für zwei Sekunden mit grünem Licht beschienen. Nach der Abschaltung des Lichts wurde die Messaufzeichnung für weitere zwei Sekunden fortgesetzt. Zusätzlich sind in Abb. 4.6 B bis D die Ergebnisse der Charakterisierungsmessungen zusammengefasst. Dabei wurden ausschließlich Proteoliposomen mit rekonstituiertem BR verwendet, die auf Sensoren mit festkörperunterstützten Membranen angelagert waren. Als Lichtquelle zur Aktivierung diente eine superhelle Leuchtdiode (LED), die grünes Licht mit einer Wellenlänge von 530 nm emittierte (siehe 2.7.1). Mit dem Einschaltvorgang der LED beginnt das Protein mit dem Transportvorgang und befördert Protonen in das Kompartiment, das von den Liposomen umschlossen wird. Da dabei ein Transport von positiver Ladung in Richtung der Sensoroberfläche stattfindet, ist der Messtrom positiv. Als Messpuffer kam standardmäßig eine Lösung aus 10 mM Na-Citrat und 100 mM NaCl mit pH 6,0 (titriert mit NaOH-Lösung) zum Einsatz. Im Gegensatz zu schnellen Lösungswechseln ruhte die Lösung in der Messkammer, und durch den eingekoppelten Lichtleiter fand eine diskrete Substratfreisetzung in der Form von Photonen statt.

Das Diagramm in Abb. 4.6 B zeigt die pH-Wert-Abhängigkeit der Signalamplitude, die in einem Bereich von pH 5 bis pH 9 aufgezeichnet wurde. Dafür wurde die Messkammer vor einem Experiment mit der jeweiligen Lösung gespült, die zusätzlich 10 mM Tris enthielt und mit NaOH- bzw. HCl-Lösung auf den entsprechenden pH Wert eingestellt wurde. Die pH Werte der Lösungen wurden nach den Messungen mit einem pH Meter kontrolliert. Der Kurvenverlauf der pH-Wert-Abhängigkeit ist glockenförmig und weist ein Maximum bei pH 6,0 auf. Dieses Ergebnis ist konform zu Daten aus der Literatur [31]. Dieses Verhalten wird auf die Protonierungs- und Deprotonierungsschritte im Transportzyklus zurückgeführt. Bei pH 6,0 sind dabei die Bindungsgeschwindigkeit auf der Intrazellulärseite und die Dissoziationsgeschwindigkeit auf der Extrazellulärseite nahezu gleich groß, wohingegen bei höheren und niedrigeren pH-Werten entweder die Bindung ($\text{pH} > 6,0$) oder die Dissoziation ($\text{pH} < 6,0$) mit verringerter Geschwindigkeit stattfindet [31]. Um eine maximale Proteinaktivität zu erhalten, wurden alle hier vorgestellten Experimente mit dem Membranprotein Bacteriorhodopsin bei pH 6,0 durchgeführt. Einen weiteren Einfluss auf die Proteinaktivität wies die Lichtintensität der zur Aktivierung verwendeten Photonen auf. In Abb. 4.6 C ist die Signalamplitude in Abhängigkeit von dem Diodenstrom, der durch die eingesetzte LED fließt, dargestellt. Nach Datenblatt weist der Diodenstrom eine lineare Beziehung zur Intensität der emittierten Photonen der LED auf, und die Spezifikation der LED ließ einen maximalen Diodenstrom von 0,35 A zu. Die Abhängigkeit der Signalamplitude zeigt, dass sie sich bei dem genannten Maximalwert bereits sehr nahe an der Sättigung befindet, wodurch keine weitere Optimierung hinsichtlich der Lichtintensität erforderlich war. Weiterhin wurde getestet, in welchem zeitlichen Abstand die Lichtaktivierung erfolgen muss, um unter gleich bleibenden Bedingungen eine unveränderte Signalform zu erhalten. Bei kurzen Zeitintervallen zwischen zwei Messsequenzen (Erholungszeit) ist die Signalamplitude einer Folgeaktivierung gegenüber der ersten Aktivierung verringert. In Abb. 4.6 D sind die Verhältnisse der Signalamplituden von den Folgeaktivierungen zu den Signalamplituden der vorherigen Aktivierung (Erholung) in Abhängigkeit von der Erholungszeit abgebildet. Mit steigender Erholungszeit erreicht die Signalamplitude der Folgeaktivierung zunehmend die Größenordnung der vorher gemessenen Amplitude. Ab einer Erholungszeit von 120 Sekunden befand sich die Erholung auf

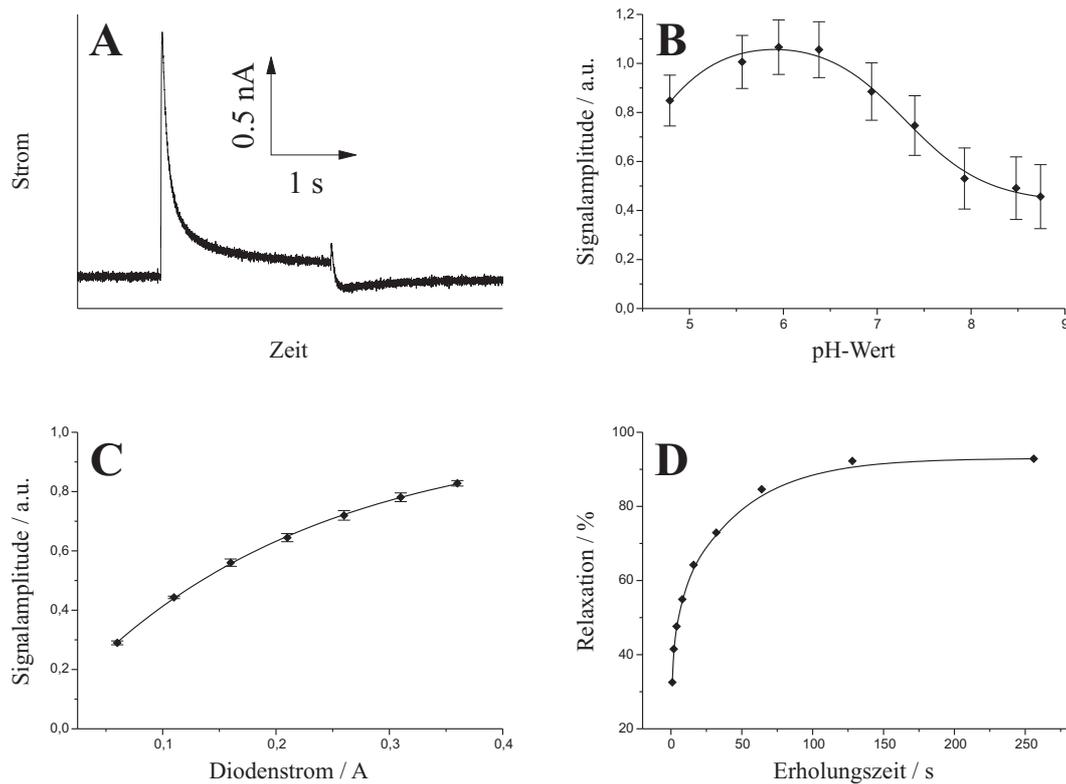


Abbildung 4.6: Charakterisierungsmessungen mit Bacteriorhodopsin. Als Messpuffer kam eine Lösung von 10 mM Na-Citrat und 100 mM NaCl mit pH 6,0/NaOH zum Einsatz. In A ist das transiente Messsignal gezeigt, das man erhält, wenn ein mit BR-Liposomen beladener Sensor für zwei Sekunden mit grünem Licht (superhelle LED mit 530 nm) beschienen wird. Für die dargestellten Datenpunkte in den Diagrammen B bis D wurden Messsignale, die in dieser Form erhalten wurden, ausgewertet. B zeigt die pH-Wert-Abhängigkeit der Signalamplitude, wobei der pH-Wert der Messlösung von pH 5 bis pH 9 variiert wurde. Der Messpuffer enthielt zu den oben angegebenen Zutaten zusätzlich 10 mM Tris. In C wurde die Signalamplitude gegen den Diodenstrom, der die zur Lichtaktivierung verwendete LED speist, aufgetragen. In D ist die Signalerholung dargestellt, die sich für das zwischen zwei Messungen liegende Erholungsintervall (Erholungszeit) ergibt. Als Maß für die Erholung wurde das Verhältnis einer Folgemessung zur vorhergehenden Messung bestimmt.

einem konstanten Niveau, so dass bei den folgenden Anlagerungskinetiken ein Messintervall gewählt wurde, das zwei Minuten betrug.

4.3.2 Anlagerungskinetik

Mit dem Membranprotein Bacteriorhodopsin wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Membranstrukturen hinsichtlich ihres Anlagerungsverhaltens untersucht. Dabei kamen Proteoliposomen, in denen BR in rekonstituierter Form vorlag, und CHO-Membranfragmente, die aus einer Membranpräparation von BR-exprimierenden Zellen hervorgingen, zum Einsatz. Von den CHO-Membranfragmenten wurden die Fraktionen 31/45 und 9/31 untersucht, die sich bei der Aufreinigung an den Dichtestufen des Saccharosegradienten (9 %, 31 % und 45 %) sammeln. Als Messpuffer wurde eine Lösung, bestehend aus 10 mM Na-Citrat und 100 mM NaCl mit pH 6,0, verwendet, und die Lichtaktivierung erfolgte mit der zuvor beschriebenen superhellen LED, die Photonen mit einer mittleren Wellenlänge von 530 nm emittierte. Als Messsequenz wurde das im vorigen Abschnitt

verwendete Lichtaktivierungsprotokoll durchgeführt (Lichtaktivierung für zwei Sekunden nach einer Sekunde Messaufzeichnung und weitere Aufzeichnung für zwei Sekunden nach Lichtabschaltung). Für ein Anlagerungsexperiment wurde der vorbereitete Sensor (festkörperunterstützte Membran) eines 96er Sensorarrays nach Trockenlegung mit einer Lösung von BR-haltigen Membranstrukturen beladen und dieser Zeitpunkt als Nullpunkt der Messung definiert. Die zugegebenen proteinhaltigen Proben waren dabei gegenüber der Ausgangskonzentration in den eingefrorenen Aliquots 25-fach verdünnt. Nachdem die Messkammer durch das Einsetzen des Injektionseinsatzes in die Kammer des 96er Sensorarrays hergestellt worden war, erfolgte die erste Messung der Proteinaktivität durch Lichtaktivierung. Für eine Stunde erfolgten weitere Messungen im Abstand von jeweils zwei Minuten. Die Signalamplitude der generierten Messsignale wurde als Maß der Aktivität gegen die Zeit, bezogen auf den Startpunkt der Messung, aufgetragen. Die Auswertung und Interpretation der so erhaltenen Anlagerungskinetiken basiert auf der Annahme, dass sich die Aktivität des Proteins proportional zur Anzahl der adsorbierten Proteinmoleküle bzw. der proteinhaltigen Membranstrukturen auf der Sensoroberfläche verhält. Die Menge des Adsorbats sollte dabei proportional zur Massenbelegung der Sensoroberfläche sein. Abb. 4.7 zeigt auszugsweise die Ergebnisse, die für die verschiedenen proteinhaltigen Membranstrukturen erhalten wurden. Dargestellt sind die Kinetiken, die hinsichtlich ihrer zeitlichen Abhängigkeit eine gute Übereinstimmung mit der theoretischen Verlaufsform eines diffusionsgesteuerten Anlagerungsprozesses nach Gl. 4.31 aufwiesen. Die Mittelwerte der Adsorptionskoeffizienten und der relative Belegung der Sensoroberfläche nach einer Stunde Anlagerungszeit, die sich für die verschiedenen Membransysteme ergaben, sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Präparation	$K_{ad} / \text{min}^{-1/2}$	$\Theta_{rel} (1 \text{ h})$	Anteil
Liposomen	$0,18 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,05$	45 %
CHO 9/31	$0,13 \pm 0,05$	$0,6 \pm 0,2$	67 %
CHO 31/45	$0,2 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	67 %

Tabelle 4.3: Adsorptionskoeffizienten K_{ad} der verschiedenen Proben. Zusätzlich sind die relative Oberflächenbelegung Θ_{rel} und der Anteil der Messungen, die ein diffusionsgesteuertes Anlagerungsverhalten aufwiesen, angegeben.

Proteoliposomen

In Abb. 4.7 A sind fünf Anlagerungskurven dargestellt, bei denen Proteoliposomen verwendet wurden, in denen BR rekonstituiert vorlag. Diese Anzahl ist die Gesamtheit aus insgesamt elf Experimenten, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Daraus ergibt sich, dass in 45 % der Fälle eine zeitliche Verlaufsform der Anlagerungskinetik stattfand, die mit einer diffusionsgesteuerten Anlagerung beschrieben werden konnte (Gl. 4.31). Die einzelnen Kurven sind auf ihren Sättigungswert für $t \rightarrow \infty$ normiert und wiesen einen Adsorptionskoeffizienten von $0,14 \text{ min}^{-1/2}$ bis $0,21 \text{ min}^{-1/2}$ auf. Der Mittelwert der Adsorptionskoeffizienten aus allen Kurven ergab sich zu $K_{ad} = (0,18 \pm 0,03) \text{ min}^{-1/2}$. Dieser Wert liegt sehr nahe an dem Wert von $0,22 \text{ min}^{-1/2}$, der sich theoretisch ergibt, wenn man von einem Vesikel bzw. Liposomendurchmesser von 100 nm ausgeht. Die Kurven liegen im Vergleich zu den CHO-Membranfragmenten (Abb. 4.7 C und D) sehr dicht beieinander, was für eine homogene Größenverteilung der Liposomen spricht. Nach einer Stunde Anlagerungszeit wurde im Mittel eine relative Oberflächenbe-

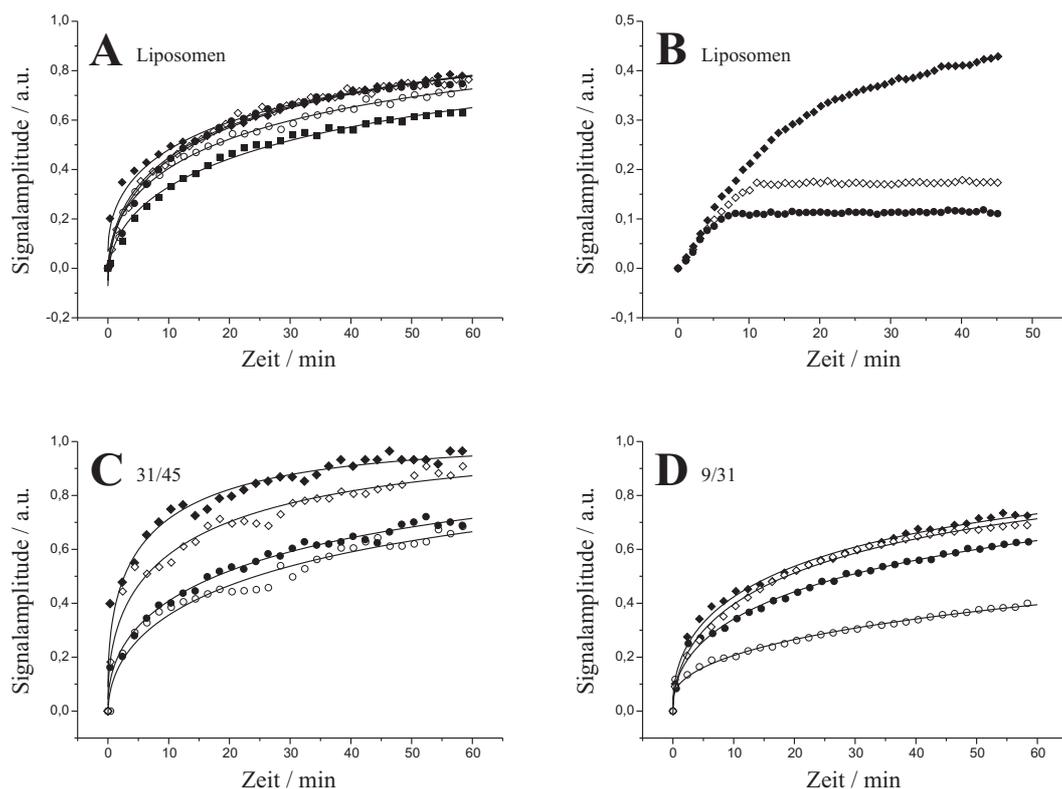


Abbildung 4.7: Anlagerungskinetik mit BR-Liposomen und CHO-Membranfragmenten. Als Messpuffer kam eine Lösung aus 10 mM Na-Citrat und 100 mM NaCl mit pH 6,0/NaOH zum Einsatz. Die Diagramme stellen Anlagerungsexperimente dar, bei denen die Signalamplitude von lichtaktivierten BR-Signalen über eine Stunde lang ausgewertet wurden, die in einem Abstand von zwei Minuten erfolgten. Als Startpunkt einer Messung wurde die Zugabe der BR-haltigen Membranstrukturen in die Messkammer gewählt. Es sind nur die Daten gezeigt, die ein diffusionsgesteuertes Anlagerungsverhalten nach Gl. 4.31 aufwiesen. Die durchgezogenen Linien entsprechen den Annäherungsfunktionen. In A und B sind Anlagerungskinetiken dargestellt, bei denen Proteoliposomen verwendet wurden. A zeigt fünf Kurven, die das diffusionsgesteuerte Anlagerungsverhalten der BR-haltigen Liposomen beschreiben. In B wurde nach verschiedenen Zeitpunkten die Liposomenlösung aus der Messkammer entfernt. Bei drei verschiedenen Experimenten erfolgte ein Spülvorgang der Messkammer nach 5 min (\circ) und nach 10 min (\diamond) Anlagerungszeit. Zum Vergleich ist eine Anlagerungskinetik dargestellt, bei der die Messkammer nicht gespült wurde (\blacklozenge). Die Diagramme C und D enthalten Anlagerungsexperimente, bei denen CHO-Membranfragmente verwendet wurden. C zeigt vier Kurven, die mit der Fraktion 31/45 aufgezeichnet wurden, und in D sind vier Kurven dargestellt, bei denen die Fraktion 9/31 zum Einsatz kam.

legung¹ von $0,74 \pm 0,05$ erreicht. Um zu untersuchen, ob die erhaltenen Anlagerungskinetiken auf eine irreversible Massenbelegung der Sensoroberfläche zurückzuführen sind, wurden Experimente mit BR-haltigen Proteoliposomen durchgeführt, die in Abb. 4.7 B gezeigt sind. Dabei wurde die Messkammer nach verschiedenen Zeiten mit frischem Puffer gespült und dadurch die verfügbaren Proteoliposomen aus der Messkammer entfernt. Der Spülvorgang wurde nach fünf Minuten (offene Raute) und nach zehn Minuten (ge-

¹Die relative Oberflächenbelegung wurde aus dem Verhältnis der Signalamplitude zum Sättigungswert, der sich aus der Annäherung ergab, bestimmt. Die Belegung der Oberfläche wird relativ bezeichnet, da nicht bekannt ist, wie groß der tatsächliche Anteil der gesamten Oberfläche ist, der relevant für die Anlagerung ist.

geschlossene Kreise) eingeleitet. Zum Vergleich ist ein Experiment dargestellt, bei dem kein Spülvorgang erfolgte (geschlossene Rauten). Mit der Wegnahme von freien Proteoliposomen aus dem Volumen der Messkammer ging die Signalamplitude der entsprechenden Anlagerungskinetik in einen konstanten Wert über, der sich bei längerem Warten nicht mehr veränderte und in der Größenordnung dem Wert vor der Durchführung des Spülvorgangs entsprach. Aus diesem Verhalten kann geschlossen werden, dass die Anlagerung allein von dem Vorhandensein von freien Membranstrukturen in der Lösung vor der Sensoroberfläche abhängig ist. Dadurch kann der Einfluss von anderen Phänomenen auf die Signalamplitude, wie z.B. Umstrukturierungen der vesikulären Strukturen auf der Sensoroberfläche, ausgeschlossen werden. Die Signalamplitude als Maß der Proteinaktivität kann demnach qualitativ äquivalent zur Massenbelegung der Sensoroberfläche angesehen werden.

CHO-Membranfragmente

Von den Anlagerungsexperimenten, bei denen BR-haltige CHO-Membranfragmente verwendet wurden, besaßen jeweils vier aus sechs Kurven (67 %) ein diffusionsgesteuertes zeitliches Verhalten. Die Ergebnisse der Fraktion 31/45 sind in Abb. 4.7 C gezeigt, und die Kurven, die mit der Fraktion 9/31 erhalten wurden, sind in Abb. 4.7 D dargestellt. In beiden Fällen wiesen die gezeigten Kurven einen Adsorptionskoeffizienten auf, der in der Größenordnung des theoretisch bestimmten Wertes von $0,22 \text{ min}^{-1/2}$ lag, der sich ergibt, wenn ein Vesikeldurchmesser von 100 nm angenommen wird. Bei der Fraktion 31/45 war der mittlere Adsorptionskoeffizient $K_{ad} = (0,2 \pm 0,1) \text{ min}^{-1/2}$. Für die Fraktion 9/31 ergab sich der Adsorptionskoeffizient zu $K_{ad} = (0,13 \pm 0,05) \text{ min}^{-1/2}$. Aus den Werten lässt sich schließen, dass die ermittelte Größe der Membranfragmente, die aus der Membranpräparation hervorgingen, in der gleichen Größenordnung liegt, wie sie aus den rekonstituierten Proteoliposomen erhalten wurde. Allerdings wiesen beide Fraktionen eine größere Streuung auf, was auf ein breiteres Spektrum verschiedener Größen zurückzuführen ist. Dies wird ebenfalls deutlich, wenn man die Kurvenverläufe der einzelnen Fraktionen untereinander vergleicht, da hier die auf ihren Sättigungswert normierten Kurven nicht so nahe beieinander liegen, wie es bei den Proteoliposomen (Abb. 4.7 A) der Fall ist. Die Fraktion 9/31 scheint dabei eine Tendenz zu etwas kleineren Vesikeldurchmessern aufzuweisen als die Fraktion 31/45, die einen Adsorptionskoeffizienten aufweist, der etwas oberhalb des Wertes angesiedelt ist, der sich für die Proteoliposomen ergab. Hinsichtlich der relativen Oberflächenbelegung unterschieden sich die CHO-Membranfragmente ebenfalls nicht signifikant von dem Anlagerungsverhalten bei der Verwendung von Proteoliposomen. Mit der Fraktion 31/45 wurde eine mittlere relative Oberflächenbelegung von $0,8 \pm 0,1$ erzielt, und bei der Verwendung der Fraktion 9/31 ergab sich ein Wert von $0,6 \pm 0,2$.

4.3.3 Vergleich mit anderen Methoden

Als alternative Methode zur Bestimmung der zeitaufgelösten Massenbelegung von festkörperunterstützten Membranen mit vesikulären Membranstrukturen wurde die Quarzmikrowaage herangezogen. Der Versuchsaufbau dieses Verfahrens wurde in Kapitel 2.4.5 beschrieben. Dabei wurde eine Goldelektrode, die für Messungen mit der Quarzmikrowaage geeignet war, nach den Vorschriften für die Sensorvorbereitung von festkörperunterstützten Membranen präpariert und im Anschluss in das Messsystem integriert. Der Durchmesser der Elektrode betrug 5 mm. Als Messpuffer kam eine Lösung mit 25 mM HEPES, 25 mM Tris, 50 mM KCl und 6 mM MgCl_2 mit pH 8,0 (titriert mit KOH) zum

Einsatz. In dem gleichen Puffer lagen Liposomen vor, die durch Extrudieren hergestellt wurden und kein Protein enthielten. Diese Liposomen wurden in den fluidischen Kreislauf des Messsystems eingebracht und sorgten für eine detektierbare Massenbelegung der eingesetzten Sensoroberfläche. Die Massenbelegung macht sich bei der Quarzmikrowaage durch eine Veränderung der Resonanzfrequenz des Systems bemerkbar, die proportional zur hinzugefügten Masse auf der Sensoroberfläche ist. In Abb. 4.8 ist ein Experiment gezeigt, bei dem die Änderung der Resonanzfrequenz Δf_r gegen die Zeit aufgetragen wurde, wobei zum Zeitpunkt $t = 0$ die Zugabe der Liposomen erfolgte.

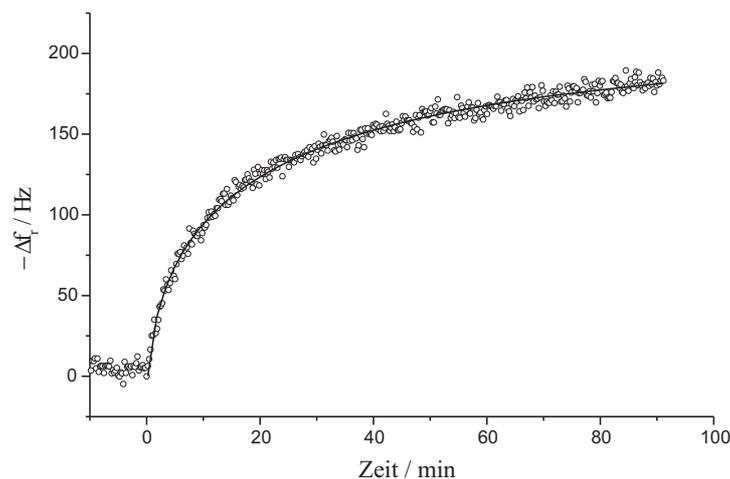


Abbildung 4.8: Adsorptionsmessung mit der Quarzmikrowaage. Die dargestellte Messung wurde mit extrudierten Liposomen durchgeführt, die kein Protein enthielten. Als Messpuffer wurde eine Lösung mit 25 mM HEPES, 25 mM Tris, 50 mM KCl und 6 mM MgCl₂ verwendet. Der pH Wert betrug 8,0 (titriert mit KOH). In dem Diagramm ist die Änderung der Resonanzfrequenz $-\Delta f_r$, die sich proportional zur adsorbierten Masse verhält, gegen die Zeit aufgetragen. Der Nullpunkt der Messung wurde durch die Zugabe der Liposomen definiert. Die durchgezogene Linie ist eine Annäherung an die erhaltenen Datenpunkte nach Gl. 4.31.

Die Messung, die mit der Quarzmikrowaage durchgeführt wurde, ließ sich sehr gut mit einer Funktion annähern, die das diffusionsgesteuerte Anlagerungsverhalten nach Gl. 4.31 beschreibt (durchgezogene Linie in Abb. 4.8). Die Parameter der Gleichung, die sich dabei aus dem Kurvenverlauf ergaben, lagen in sehr guter Übereinstimmung mit den Werten, die mit den Anlagerungsexperimenten unter der Verwendung des lichtaktivierten BR erhalten wurden. Bei der Quarzwaagenmessung ergab sich der Adsorptionskoeffizient zu $K_{ad} = 0,22 \text{ min}^{-1/2}$, und die relative Oberflächenbelegung betrug 0,8. Nimmt man die adsorbierte Masse als starr an, so kann mit Hilfe der sogenannten Sauerbrey-Gleichung (siehe Gl. 4.33) eine quantitative Abschätzung der Masse erfolgen, die der Sensoroberfläche hinzugefügt wurde. Die Beziehung, die sich unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen einstellte, lautete $\Delta m = -3,6 \text{ ng/Hz} \cdot \Delta f_r$. Die maximale Masse einer Monolage Liposomen, die sich bei dichtester Packung auf der Oberfläche anlagern kann, beträgt $\Delta m_{max} = 1112 \text{ ng}$, wenn von einem Liposomendurchmesser von 100 nm ausgegangen wird und der Elektrodendurchmesser 5 mm beträgt. Die maximale Belegung der Sensoroberfläche, die sich aus dem Experiment in Abb. 4.8 ergab, konnte aus dem Sättigungswert der Resonanzverschiebung von 209 Hz zu 68 % bestimmt werden. Dieser Anteil entspricht der für die Adsorption zur Verfügung stehenden Oberfläche, die eine Monolage an Lipid aufweist. Dieser Wert ist konform zu Ergebnissen, die mit ortsaufgelöster Oberflächen-

plasmonenresonanzspektroskopie bestimmt wurden [75]. Dort wurde die Oberfläche von Sensoren mit einer festkörperunterstützten Membran untersucht, und der Anteil von ausgebildeten Lipidmonolagen wurde im Mittel zu 50 %, maximal 80 % bestimmt. Mit den durchgeführten Messungen an der Quarzmikrowaage konnten demnach die Anlagerungsexperimente, die mit dem Membranprotein BR durchgeführt wurden, verifiziert werden. Der relative Belegungsgrad von 0,8 bezieht sich auf die zur Verfügung stehende Adsorptionsfläche, die, wie oben erläutert, durch 68 % der Sensoroberfläche gegeben ist. Der absolute Belegungsgrad, bezogen auf die gesamte Sensoroberfläche, betrug demnach 54 %.

$$\Delta f_r = -\frac{2 \cdot f_0^2}{\rho_q \cdot c_q \cdot A} \cdot \Delta m = -S_f \cdot \Delta m \quad (4.33)$$

Gl. 4.33 stellt die Sauerbrey-Gleichung dar [50]. Die Änderung der Resonanzfrequenz Δf_r ist proportional zur Massenänderung Δm . Der Proportionalitätsfaktor S_f wird als Sauerbreykonstante oder Schichtwäageempfindlichkeit bezeichnet [41]. Er hängt von den Materialeigenschaften des verwendeten Quarzes und der Elektrodenoberfläche A ab. Der hier eingesetzte AT-Schnitt-Quarz besaß eine Dichte von $\rho_q = 2,648 \text{ g/cm}^2$ und wies eine Wellenausbreitungsgeschwindigkeit von $c_q = 3440 \text{ m/s}$ auf. Die Eigenschwingfrequenz f_0 betrug 5 MHz. Bei einem Elektrodendurchmesser von 5 mm ergibt sich die Sauerbreykonstante zu $S_f = 0,28 \text{ Hz/ng}$.

4.3.4 Diskussion des Anlagerungsverhaltens

Bei ca. der Hälfte der durchgeführten Anlagerungsexperimente mit Proteoliposomen und CHO-Membranfragmenten wurde ein diffusionsgesteuertes zeitliches Anlagerungsverhalten beobachtet. Die verschiedenen Membransysteme lieferten dabei vergleichbare Ergebnisse. Die andere Hälfte der Messungen wies ein unspezifisches Verhalten auf, das durch zum Teil sehr unterschiedliche Kurvenformen repräsentiert wurde. Ein Hinweis auf die Gültigkeit der diffusionsgesteuerten Anlagerung ist die Tatsache, dass eine gleichartige Kinetik mit einem alternativen Messverfahren, der Quarzmikrowaage, erhalten wurde. Des Weiteren ist die Größenordnung des Adsorptionskoeffizient K_{ad} für alle verwendeten Membranstrukturen konform zu den, aus den Fluoreszenzkorrelationspektrogrammen (siehe 4.1.4) erhaltenen Liposomendurchmessern, die ca. 100 nm betragen. Der Vergleich mit den Messungen, die mit der Quarzmikrowaage durchgeführt wurden, zeigte zusätzlich, dass das Adsorptionsverhalten unabhängig von dem Elektrodendurchmesser, respektive der Elektrodenoberfläche, ist. Die erhaltene Kurvenform wies ein zeitliches Verhalten auf, das genau dem entsprach, das mit BR-haltigen Membranen auftrat. Dass man bei der Messung mit der Quarzwaage ein diffusionsgesteuertes Anlagerungsverhalten beobachtete, obwohl der Sensor in ein fluidisches Kreislaufsystem integriert war, kann auf die sehr geringe Flussrate zurückgeführt werden, die für eine relativ dicke, ungerührte Diffusionsgrenzschicht vor der Sensoroberfläche sorgt. Unklar bleibt die Frage, warum die Häufigkeit der diffusionsgesteuerten Anlagerung in nur ca. 50 % der beobachteten Fälle auftrat. Zu einem gewissen Grad muss der Einfluss von Störungen auf das Messsystem in Betracht gezogen werden. Bedingt durch den schnellen Zusammenbau des Messsystems, nachdem die Zugabe der Probe in die Messkammer erfolgte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Luftblasen in der Messkammer bildeten oder Undichtigkeiten aufgetreten sind, die ein Verdampfen des Lösungsmittels (Messpuffer) erlaubten. Insgesamt wurden die hergeleiteten Gleichungen, die das diffusionsgesteuerte Anlagerungsverhalten der Liposomen bzw. der CHO-Membranfragmente (Gl. 4.31) und deren Adsorptionskoeffizienten (Gl. 4.32) be-

schreiben, mit den durchgeführten Experimenten bestätigt und können somit als richtig angesehen werden.

4.4 Einfluss des Lösungsmittels

Im lebenden Organismus werden Vesikel- bzw. Membranfusionen durch Proteine vermittelt. In der Literatur ist die Meinung verbreitet, dass gleichartige polare Membranaußenseiten keine Attraktion aufweisen[3, 46, 68]. Es erscheint also widersprüchlich, dass die Anlagerung der Membranstrukturen, die durch Proteoliposomen oder CHO-Membranfragmente repräsentiert werden können, allein durch die polaren (elektrostatischen) Wechselwirkungen der Lipide, die in den Membranstrukturen und in der festkörperunterstützten Membran vorhanden sind, zustande kommt. Bei der Herstellung einer festkörperunterstützten Membran wurde zur Etablierung der abschließenden Lipidmonolage standardmäßig eine Lösung des Lipids Diphytanoylphosphatidylcholin (DiPhyPC) verwendet, das in dem organischen Lösungsmittel n-Dekan gelöst war. Das Lösungsmittel könnte eine entscheidende Rolle bei dem Anlagerungsprozess spielen. Um den Einfluss des verwendeten Lösungsmittels zu untersuchen, wurden Lipidlösungen hergestellt, bei denen das Lipid DiPhyPC in verschiedenen Alkanen gelöst wurde. Zum Einsatz kamen dabei Alkane mit verschiedenen Kettenlängen, die bei Raumtemperatur vorwiegend flüssig vorliegen. Das kleinste Molekül war das n-Pentan (C_5H_{12}), und als größtes Molekül wurde das n-Oktadekan ($C_{18}H_{38}$) verwendet, das für den Gebrauch leicht erhitzt werden musste, um es in einen flüssigen Zustand zu bringen. In Abb. 4.9 sind die Ergebnisse dargestellt, die unter Verwendung der Lösungsmittel n-Pentan, n-Hexan, n-Oktan, n-Dekan, n-Dodekan, n-Hexadekan und n-Oktadekan erhalten wurden. Dabei wurden die elektrischen Eigenschaften der einzelnen Präparationsschritte und die aus einer Anlagerung von proteinhaltigen CHO-Membranfragmenten resultierenden Signalamplituden in Abhängigkeit von dem verwendeten Lösungsmittel zur Auswertung herangezogen.

4.4.1 Versuchsdurchführung

Als Testobjekt wurde das rekombinante Protein EAAC1 verwendet, das in CHO-Membranfragmenten vorlag. Als Messpuffer wurde eine Lösung verwendet, die entweder 120 mM Kaliumphosphatpuffer (KP_i) oder 120 mM Natriumphosphatpuffer (NaP_i) enthielt und einen pH-Wert von 7,4 aufwies. Neben der Proteinaktivität wurden die elektrischen Eigenschaften der Lipidmembranen (festkörperunterstützten Membranen) und der Lipidmembranen mit adsorbierten CHO-Membranfragmenten untersucht. Die Messungen wurden mit KP_i als Messpuffer durchgeführt, und die festkörperunterstützte Membran wurde mit den verschiedenen Lösungsmitteln hergestellt. In Abb. 4.9 A sind die elektrischen Eigenschaften (Kapazität und Leitfähigkeit) der reinen Lipidmembran dargestellt, und in Abb. 4.9 B waren zusätzlich CHO-Membranfragmente auf der Sensoroberfläche angelagert. Zur Charakterisierung der Proteinaktivität wurden auf den Sensoren, die mit verschiedenen Lösungsmitteln hergestellt wurden, doppelte Lösungswechsel durchgeführt, bei denen KP_i als kaliumhaltige Ruhelösung verwendet wurde. Der Natriumphosphatpuffer NaP_i lag in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vor, wobei in der aktivierenden Lösung zusätzlich 1 mM L-Glutamat vorhanden war. Die Aktivierung des EAAC1 erfolgte durch das L-Glutamat und resultierte in transienten Messsignalen (siehe Kapitel 5.1.1). Die Abhängigkeit der erhaltenen Signalamplitude von dem verwendeten Lösungsmittel ist in Abb. 4.9 C dargestellt.

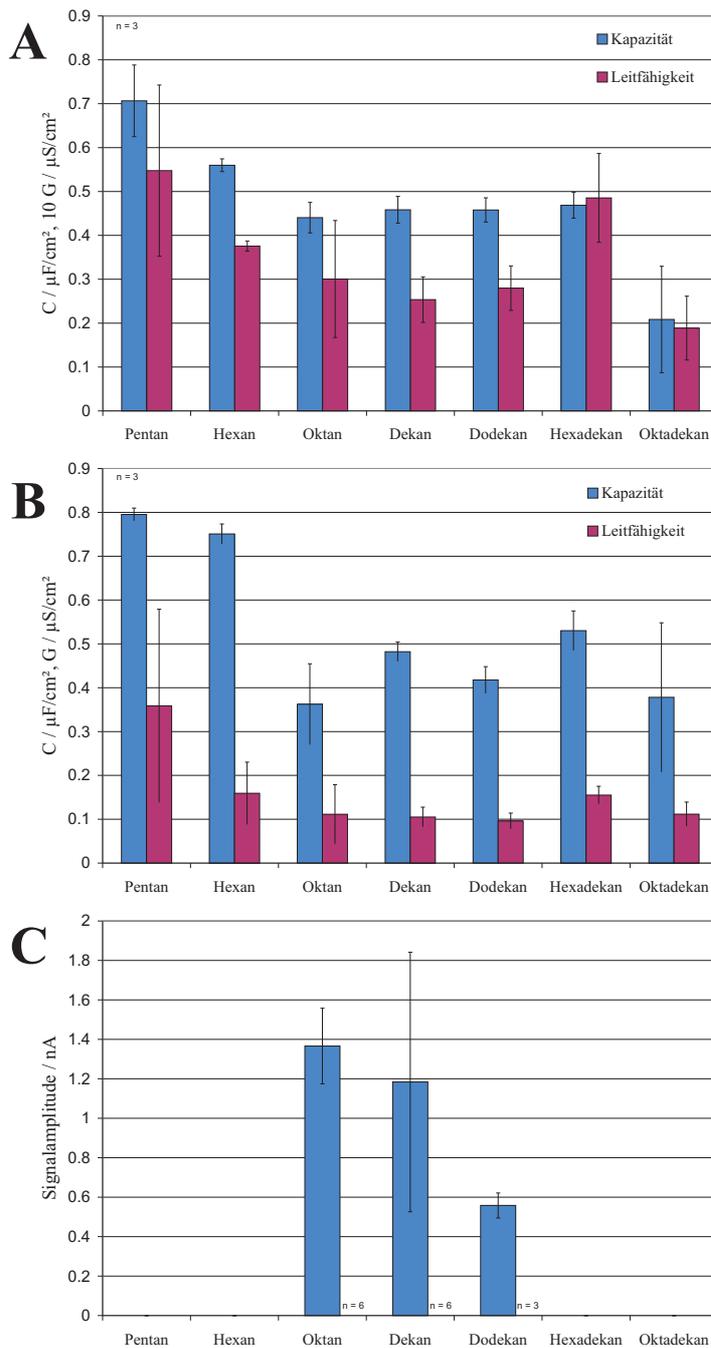


Abbildung 4.9: Einfluss des Lösungsmittels. Die dargestellten Daten wurden unter der Verwendung eines 120 mM Natriumphosphatpuffers ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) bzw. Kaliumphosphatpuffers ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) mit pH 7,4 aufgezeichnet. In A und B sind die Kapazitäten und die Leitfähigkeiten für die Lipidmembranen (A) und die Lipidmembranen mit adsorbierten CHO-Membranfragmenten (B), die den Glutamattransporter EAAC1 exprimierten, dargestellt. Das Lipid, mit dem die festkörperunterstützte Membran etabliert wurde lag in verschiedenen Alkanen (siehe Abzissenbeschriftungen) als organisches Lösungsmittel vor. Die Daten sind nach steigender Kettenlänge des verwendeten Lösungsmittel sortiert. In dem Diagramm C sind die erhaltenen Signalamplituden aufgetragen, die durch doppelte Lösungswechsel erhalten wurden. Dabei lag der Sensor in einer kaliumhaltigen Ruhelösung vor, die durch eine natriumhaltige nicht-aktivierende Lösung ersetzt wurde, bevor das Protein (EAAC1) mit 1 mM L-Glutamat aktiviert wurde. Bei der Verwendung von mehreren Sensoren war nur für die Lösungsmittel n-Oktan, n-Dekan und n-Dodekan ein Signal zu beobachten, das auf die Aktivität des EAAC1 zurückzuführen war.

4.4.2 Elektrische Eigenschaften

Hinsichtlich der elektrischen Eigenschaften konnte bei den reinen Lipidmembranen (Abb. 4.9 A) eine leichte Abhängigkeit von der Kettenlänge des verwendeten Lösungsmittels festgestellt werden. Die Kapazitäten betragen ca. $0,7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für das sehr flüchtige n-Pentan und pendelte sich mit steigender Kettenlänge auf ca. $0,45 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (n-Oktan bis n-Hexadekan) ein. Die Sensoren, die mit oktadekanhaltigen Lipiden behandelt wurden, waren bei Raumtemperatur nicht repräsentativ, da das Lösungsmittel eine wachsartige Schicht auf der Oberfläche bildete. Die Leitfähigkeit wies ein ähnliches Verhalten wie die Kapazität auf und verringerte sich von anfangs $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ (n-Pentan) auf ca. $0,025 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ (n-

Dodekan). Bei den hexadekanhaltigen Membranen war die Leitfähigkeit wieder größer. Nachdem die Sensoren mit einer Lösung von EAAC1-haltigen CHO-Membranfragmenten inkubiert worden war (Abb. 4.9 B), fand durchgängig eine Erhöhung der Leitfähigkeit um einen Faktor von Zehn statt. Die Kapazität veränderte sich nur unwesentlich. Sie erhöhte sich leicht bei den n-Pentan-, n-Hexan-, n-Dekan-, n-Hexadekan- und n-Oktadekan-haltigen Membranen und ging für die n-Oktan- und n-Dodekan-haltigen Membranen leicht zurück. Die Erhöhung der Leitfähigkeit war ein Phänomen, das bei der Verwendung von CHO-Membranfragmenten öfters zu beobachten war.

4.4.3 Proteinaktivität

Als wichtigstes Kriterium einer erfolgreichen Anlagerung ist das Auftreten und die Größenordnung der Proteinaktivität anzusehen. Bei den verwendeten organischen Lösungsmitteln trat eine Proteinaktivität nur mit n-Oktan, n-Dekan und n-Dodekan auf (Abb. 4.9 C). Lipidmembranen, die mit den Lösungsmitteln n-Pentan, n-Hexan, n-Hexadekan und n-Oktadekan hergestellt wurden, führten zu keiner messbaren Proteinaktivität. Hinsichtlich des Mittelwertes wurde für n-Oktan die größte Signalamplitude erhalten. Mit n-Dekan war die mittlere Signalamplitude geringfügig reduziert, wobei hier die größte Amplitude eines Einzelsensors beobachtet wurde. Bei der Verwendung von n-Dodekan ergab sich lediglich ca. die Hälfte der Signalamplitude, die mit n-Oktan bzw. n-Dekan erhalten werden konnte.

4.4.4 Schlussfolgerungen

Aus den durchgeführten Experimenten kann geschlossen werden, dass die Benutzung des Lösungsmittels n-Dekan, das in dieser Arbeit standardmäßig verwendet wurde, gute Ergebnisse hinsichtlich der Anlagerung der CHO-Membranfragmente erwarten lässt. Des Weiteren kann das Lösungsmittel als anlagerungsrelevantes Medium betrachtet werden. Das könnte erklären, dass sich auf der Sensoroberfläche nur eine Monolage von adsorbierten Membranstrukturen ausbildet. Die Stellen, an denen sich bereits Membranstrukturen angelagert haben, wiesen nämlich eine lösungsmittelfreie Außenseite auf, an der keine weitere Adsorption stattfinden könnte. Es ist außerdem vorstellbar, dass die Anwendung eines bestimmten Lösungsmittels an die Art der verwendeten Membranstrukturen angepasst werden kann. Die Cytoplasmamembranen von unterschiedlichen Organismen enthalten verschiedene Zusammensetzungen bestimmter Lipide. Die Löslichkeit der Lipide bzw. die Interaktionen mit dem Lösungsmittel könnten deshalb für Membranfragmente aus Bakterien oder andere eukariotische Zelltypen als CHO-Zellen verschieden sein. Der primäre Einfluss des Lösungsmittels auf den Erfolg der Anlagerung konnte mit den hier vorgestellten Experimenten, unabhängig von der Art der beteiligten interaktiven Mechanismen, gezeigt werden.

Kapitel 5

Kinetische Untersuchungen

Zur kinetischen Untersuchung von elektrogenen Transportvorgängen an biologischen Membranen wurden die Membranproteine EAAC1 und NhaA verwendet. Beide Proteine wurden in Kapitel 1.4 ausführlich vorgestellt und weisen eine Stöchiometrie auf, die mit der Verschiebung von Ladung einher geht. Der Transportvorgang ist demnach elektrogen. Es sollte untersucht werden, ob sich native Zellmembranen (CHO-Membranfragmente) ebenso zur Proteincharakterisierung eignen wie rekonstituierte Systeme (in denen z.B. der NhaA vorlag). Als Untersuchungsmethode kamen ausschließlich Strommessungen mit Sensoren auf der Basis von festkörperunterstützten Membranen zum Einsatz. Die Untersuchung von Membranproteinen mit festkörperunterstützten Membranen hat den Vorteil, dass die zur Proteinaktivierung notwendigen Substrate in der Form von schnellen Lösungswechseln zur Verfügung gestellt werden können. Dabei müssen keine speziellen oder markierten Substrate, wie z.B. fluoreszierende, radioaktive oder photolytisch freisetzbare Stoffe verwendet werden. Aufgrund der mechanischen Stabilität von festkörperunterstützten Membranen kann der Lösungswechsel so schnell erfolgen, dass Ströme hervorgerufen werden, die Anteile der vorstationären Kinetik des Transportzyklusses enthalten. Die verwendeten proteinhaltigen Membranstrukturen (Proteoliposomen oder CHO-Membranfragmente) wurden auf Goldsensoren angelagert, und durch einen schnellen Lösungswechsel aktiviert. Im folgenden sollen für die beiden Proteine EAAC1 und NhaA die Messungen vorgestellt und im Anschluß diskutiert werden. Der Glutamattransporter EAAC1 wird zuerst behandelt, gefolgt von dem bakteriellen Natrium-Protonen-Austauscher NhaA.

5.1 Der neuronale Glutamattransporter EAAC1

Der Glutamattransporter EAAC1 (*Excitatory Amino Acid Carrier 1*) weist eine relativ komplizierte Stöchiometrie auf, an der 3 Kationen (Natrium-, Kaliumion und Proton) und 1 Anion (deprotonierte Aminosäure) beteiligt sind. Zusätzlich vermittelt er eine Leifähigkeit gegenüber bestimmten Anionen (z.B. Chlorid), deren Mechanismus noch weitgehend ungeklärt ist. Insgesamt transportiert der EAAC1 bei physiologischem Verhalten zwei positive Ladungen in das Zellinnere. Der hier untersuchte EAAC1 stammt aus der Maus. Er wurde in kultivierten CHO-Zellen exprimiert und über eine Membranpräparation aufgereinigt. Die daraus entstehenden Membranfragmente wurden auf der mit einer festkörperunterstützten Membran versehenen Sensoroberfläche angelagert. Bei den Messungen wurden standardmäßig Puffer eingesetzt, die entweder 30 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, pH 7,4 (mit N-Methylglukamin (NMG) titriert) und 140 mM KCl bzw. NaCl enthielten (HEPES-Puffer), oder die aus einer Mischung von jeweils 120 mM mono- und dibasischem

Hydrogenphosphat¹ (Phosphatpuffer) mit einem pH-Wert von 7,4 bestanden. Die Hydrogenphosphate weisen in der Salzform entweder Natrium oder Kalium als Kation auf, die bei einem pH-Wert von 7,4 nach der Mischung mit einer Konzentration von ca. 225 mM in dem Phosphatpuffer vorlagen.

5.1.1 Messungen mit dem EAAC1

Als Messsequenzen wurden beim EAAC1 einfache und doppelte Lösungswechsel (siehe Kapitel 1.3.2) verwendet. Dabei kam als Substrat zur Proteinaktivierung meistens das Aminosäureanion L-Glutamat in der aktivierenden Lösung zum Einsatz. Das Natriumkation als Kosubstrat lag in der Regel hochkonzentriert (z.B. 140 mM) in der nicht-aktivierenden und in der aktivierenden Lösung vor. Die Sequenz, die sich daraus ergibt, lautet $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{Na}^+)$. Bei doppelten Lösungswechseln wurde eine dritte Lösung verwendet, die eine der Natriumionenkonzentration äquivalente Menge an Kaliumionen aufwies. Dieser Kaliumruhepuffer wurde verwendet, um einen Gradienten über die Membran aufzubauen. Der Sensor war zwischen den Messungen der Kaliumruhelösung ausgesetzt, und die Membranstrukturen auf der Oberfläche konnten sich damit equilibrieren. Bei der Durchführung der Messsequenz wurde der kaliumhaltige Ruhepuffer erst kurz vor der Aktivierung mit der natriumhaltigen nicht-aktivierenden Lösung ausgetauscht. Dabei wurde angenommen, dass durch den schnellen Austausch der Lösungen eine Situation entsteht, in der die Lösung unterhalb der Membranstrukturen kaliumhaltig ist und an deren Außenseite der Natriumpuffer vorliegt. Es entsteht also ein Gradient für Kaliumionen von innen nach außen und ein umgekehrter Gradient für Natriumionen. Die Messsequenz lautet unter diesen Bedingungen $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{K}^+ \rightarrow \text{Na}^+)$. Die verwendete Bezeichnung der Messsequenz wurde in den dargestellten Messungen den jeweilig beteiligten Komponenten angepasst.

In Abb. 5.1 A ist ein typischer Signalverlauf gezeigt, der mit einem doppelten Lösungswechsel aufgezeichnet wurde. Der Messablauf folgte der zuvor erläuterten Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{KCl} \rightarrow \text{NaCl})$, wobei die Kosubstrate in der Salzform als Chloride zur Verfügung gestellt wurden (HEPES-Puffer, siehe oben). Oberhalb des Signalverlaufs sind jeweils die über den Sensor fließenden Lösungen angegeben. Zuerst fließt die kaliumhaltige Ruhelösung R, die 140 mM KCl enthielt. Danach erfolgte ein Wechsel zur nicht-aktivierenden Lösung NA, in der eine Konzentration von 140 mM NaCl vorhanden war. Ein Umschaltvorgang zu einer anderen Lösung war immer mit einem elektrisches Artefakt verbunden, das durch die elektromagnetischen Ventile hervorgerufen wird. Der Austausch der Kalium- mit Natriumionen verursacht eine Polarisierung der Sensoroberfläche, die als „Salzartefakt“ sichtbar wurde. Im nächsten Schritt erfolgte der Wechsel zur aktivierenden Lösung A. Dieser Lösungswechsel fand am schnellsten statt, da die Umschaltung an dem Ventil direkt vor dem Sensor erfolgte (siehe Kapitel 1.3.2). Das in der aktivierenden Lösung vorhandene Substrat (1 mM L-Glutamat) bewirkte eine Aktivierung des EAAC1, die als positiver transienter Messstrom im Signalverlauf sichtbar wurde. Die Signalamplitude betrug ca. 2,5 nA. Die Substratkonzentration musste nicht durch eine andere Substanz mit gleicher Ionenstärke ausgeglichen werden. Im Anschluss an die Aktivierung wechselte das System zuerst zurück zur nicht-aktivierenden Lösung NA und dann zur Ruhelösung R. Beim Austausch der Natriumionen durch die Kaliumruhelösung trat im letzten Abschnitt

¹Bei einem natriumhaltigen Puffer wurden NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 gemischt. Für den kaliumhaltigen Puffer wurden analog dazu KH_2PO_4 und K_2HPO_4 verwendet. Der pH-Wert stellt sich bei der Mischung dieser Puffersubstanzen nach *Henderson-Hasselbalch* auf $\text{pH} = \text{pK} + \log(c(\text{HPO}_4^{2-})/c(\text{H}_2\text{PO}_4^-))$ ein. Der hier relevante pK beträgt 7,21.

wieder ein Polarisationsartefakt auf. Der Sensor lag dann bis zur nächsten Messung in der kaliumhaltigen Ruhelösung vor, damit der Ausgangszustand für jedes Experiment, das mit dieser Sequenz durchgeführt wurde, gleich war. Die in den Diagrammen B-D (Abb. 5.1) enthaltenen Daten wurden, wenn nicht anders vermerkt, unter den gleichen Bedingungen mit doppelten Lösungswechseln (wie in A gezeigt) bei Verwendung des HEPES-Puffers durchgeführt.

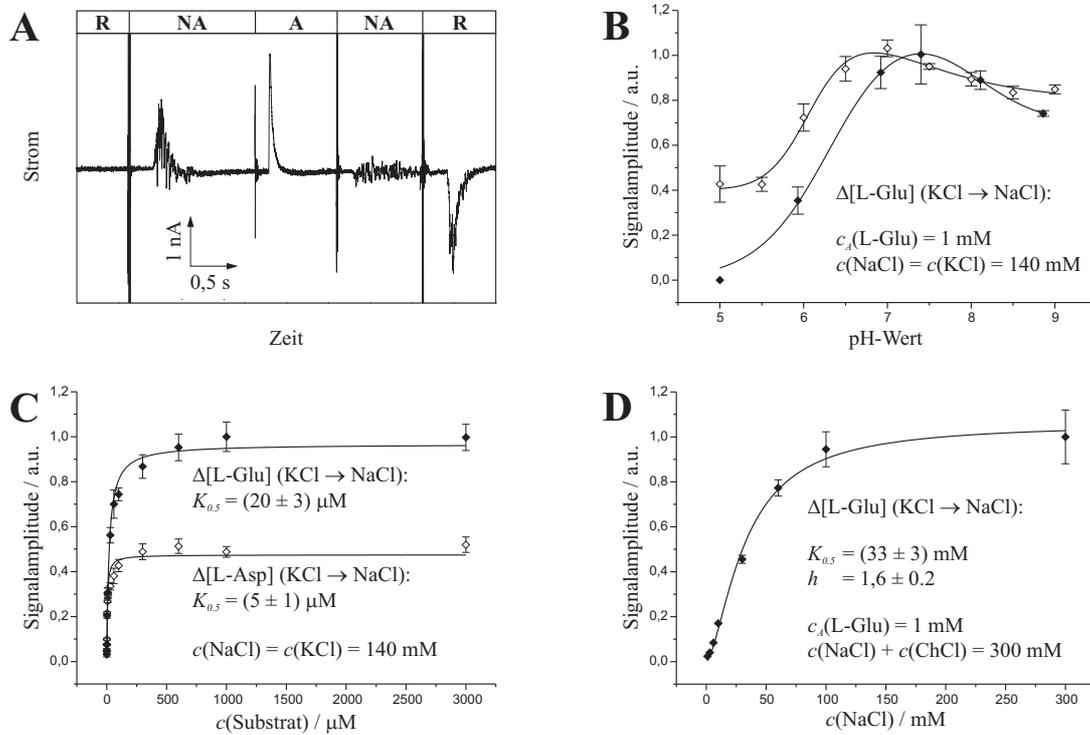


Abbildung 5.1: Charakterisierung des EAAC1. In A ist der typische Signalverlauf einer Messsequenz dargestellt, der mit einem doppelten Lösungswechsel der Form $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{KCl} \rightarrow \text{NaCl})$ hervorgerufen wird. Als Puffer wurde eine Lösung mit 30 mM HEPES, 2 mM MgCl_2 und pH 7,4 verwendet. In der Ruhelösung R waren 140 mM KCl, in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung 140 mM NaCl vorhanden. Die Aktivierung erfolgte durch 1 mM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. Die Auswertung der Abhängigkeiten in B-D erfolgte über die Signalamplitude der erhaltenen transienten Messströme. In B sind zwei pH-Wert-Abhängigkeiten gezeigt, bei denen der pH-Wert entweder in allen drei Lösungen geändert wurde (\blacklozenge) oder nur in der Ruhelösung (\diamond). Die Aktivierung erfolgt nach der Messsequenz in A. Die Pufferzusammensetzung war abweichend davon 10 mM Tris, 10 mM Ch-Citrat (\blacklozenge) bzw. 10 mM Zitronensäure, 10 mM HEPES, 10 mM CHES (\diamond). In C sind die Substratabhängigkeiten für L-Glutamat (\blacklozenge) und L-Aspartat (\diamond) dargestellt. Die Messsequenz entsprach den Bedingungen in A, wobei die Substratkonzentrationen von L-Glutamat bzw. L-Aspartat variiert wurden. In D ist die Substratabhängigkeit für das Kosubstrat Natrium abgebildet. Die Aktivierung erfolgt nach der Messsequenz in A. Die Pufferzusammensetzung wies abweichend davon eine Gesamtsalzkonzentration von 300 mM auf. Es waren 300 mM KCl in der Ruhelösung vorhanden. Die nicht-aktivierenden und die aktivierenden Lösungen wiesen x mM NaCl und $(300 - x)$ mM ChCl auf.

pH-Wert-Abhängigkeit

Abb. 5.1 B zeigt zwei Kurven, die die pH-Wert-Abhängigkeit des EAAC1 repräsentieren. Dabei wurde die Signalamplitude ausgewertet, die sich durch Konzentrations sprünge von 1 mM L-Glutamat ergab. Die geschlossenen Rauten stellen die Abhängigkeit der Signalamplitude des transienten Messstromes von dem pH-Wert dar, der in allen drei verwendeten Lösungen auf den gleichen Wert eingestellt wurde. Anstelle von HEPES wurden als Puffer 10 mM Tris und 10 mM Ch-Citrat verwendet (weitere Substanzen wie in Abb. 5.1 A). Der pH-Wert wurde mit NMG titriert und nach den Messungen nochmals mit einem pH-Meter kontrolliert. Die Kurve, deren Datenpunkte als offene Rauten in dem Diagramm eingetragen sind, wurde aus den Signalamplituden der Messsignale erhalten, bei denen eine Änderung des pH-Wertes nur in der kaliumhaltigen Ruhelösung stattfand. In der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung war der pH-Wert über die gesamte Messung konstant auf 7,5 eingestellt. Der Puffer bestand in allen Messlösungen aus 10 mM Zitronensäure, 10 mM HEPES und 10 mM CHES (weitere Zutaten wie in Abb. 5.1 A). Die kaliumhaltige Ruhelösung wurde mit NMG auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt. Beide Kurven wurden auf ihr Maximum normiert und beschreiben ein glockenförmiges Profil. Der pH-Wert wurde von pH 5,0 bis pH 9,0 variiert. Für den Fall, dass alle Lösungen den gleichen pH-Wert besitzen, liegt das Maximum bei ca. pH 7,5. Wenn sich der pH-Wert nur in der Ruhelösung ändert, befindet es sich unterhalb von pH 7,0. Bei der ersten Messkurve (konstanter pH-Wert in allen drei Lösungen) konnte bei pH 5,0 kein transientes Signal im Messstrom beobachtet werden. Nachdem das Maximum überschritten war, fiel die Signalamplitude bis pH 9,0 auf ca. 70 % des Maximums ab. Die zweite Kurve (pH-Wert-Änderung nur in der Ruhelösung) liefert bei einem pH-Wert von 5,0 ein Signal unterhalb von 50 % des Maximums und flacht nach dessen Überschreitung nur leicht auf ca. 85 % ab. Die Kurven schneiden sich in der Nähe ihrer Maxima bei ca. pH 7,0.

Substratabhängigkeiten

Der Einfluss von verschiedenen Substraten (L-Glutamat und L-Aspartat) und dem Ko-substrat Natrium auf die Signalamplitude des transienten Messstroms ist in den Abb. 5.1 C und D gezeigt. Die Abhängigkeiten von der L-Glutamat- und L-Aspartat-Konzentration sind für einen Bereich von 0,3 μM bis 3 mM zusammen in einem Diagramm dargestellt (5.1 C). Bis auf das Substrat und seine Konzentration in der aktivierenden Lösung wurden sie unter den gleichen Bedingungen aufgenommen wie in Abb. 5.1 A. Die geschlossenen Rauten sind Datenpunkte, die mit L-Glutamat-Konzentrations sprünge der Form $\Delta[\text{L-Glu}]$ ($\text{KCl} \rightarrow \text{NaCl}$) aufgenommen wurden. Die einzelnen Datensätze wurden mit einer Michaelis-Menten-Kinetik angenähert und auf die daraus resultierende Maximalamplitude normiert. Für L-Glutamat ergab sich dabei eine Halbsättigungskonstante von $K_{0,5} = (20 \pm 0,3) \mu\text{M}$. Die Substratabhängigkeit der Signalamplitude von der L-Aspartatkonzentration ist durch die offenen Rauten repräsentiert. Für die Sequenz galt dabei $\Delta[\text{L-Asp}]$ ($\text{KCl} \rightarrow \text{NaCl}$). Die Abhängigkeit wurde ebenfalls mit einer Michaelis-Menten-Kinetik angenähert. Die Maximalamplitude wurde allerdings nicht auf ihren Maximalwert normiert, sondern auf einen Referenzwert bei einer bestimmten L-Glutamatkonzentration, so dass die Kurve das Signalamplitudenverhältnis von L-Aspartat zu L-Glutamat wiedergibt. Das Verhältnis, das sich aus den Maximalwerten der Annäherungsfunktionen ergibt, ist $i_{max}(\text{L-Asp})/i_{max}(\text{L-Glu}) = 0,49 \pm 0,03$. Bestimmt man die Fläche unter den transienten Messsignalen (numerische Integration über die Signalform) bei sättigenden Substratkonzentrationen, so ergibt sich das Verhältnis der Ladungsmengen zu

$q(\text{L-Asp})/q(\text{L-Glu}) = 0,45 \pm 0,02$. Die Halbsättigungskonstante, die sich aus der Kurve für L-Aspartat ergab, war $K_{0,5} = (5 \pm 1) \mu\text{M}$ und betrug somit ein Viertel des Wertes der Halbsättigungskonstante für L-Glutamat.

Der Einfluss von der Konzentration des Kosubstrats Natrium auf die Signalamplitude des Messtroms ist in Abb. 5.1 D abgebildet. Hier wurde die Natriumionenkonzentration in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung im Bereich von 1 bis 300 mM variiert. Die Aktivierung erfolgte mit 1 mM L-Glutamat unter den Bedingungen in Abb. 5.1 A, mit dem Unterschied, dass die Gesamtsalzkonzentration auf 300 mM eingestellt war, um über den gesamten Konzentrationsbereich eine konstante Ionenstärke der Lösungen zu erhalten. Die KCl-Konzentration in der Ruhelösung war 300 mM. In der nicht-aktivierenden Lösung und der aktivierenden Lösung wurde zu der jeweiligen Natriumionenkonzentration x mM eine solche Menge Cholinchlorid ($(300 - x)$ mM ChCl) hinzugefügt, dass sich für die Gesamtkonzentration $c(\text{NaCl}) + c(\text{ChCl}) = 300$ mM ergab. Die Annäherung an die Datenpunkte erfolgte nicht mit einer Michaelis-Menten-Kinetik, sondern mit einer Hillfunktion mit variablem Hillkoeffizient. Die Halbsättigungskonstante ergab sich für die auf ihr Maximum normierten Hilldatenpunkte zu $K_{0,5} = (33 \pm 3)$ mM. Der Hillkoeffizient war $h = 1,6 \pm 0,2$.

Erhaltene Signalformen

Mit dem EAAC1 konnten durch entsprechende Wahl der Puffer und der darin enthaltenen Substanzen eine Vielzahl verschiedener Experimente durchgeführt werden, die unterschiedliche Signalformen hervorriefen. In Abb. 5.2 sind die erhaltenen Mesströme für die unterschiedlichen Messequenzen zusammengefasst. Dabei kamen doppelte Lösungswechsel und einfache Lösungswechsel mit unterschiedlichen Kationen und Anionen zum Einsatz. Die Aktivierung des Proteins erfolgte mit 1 mM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. Als Grundpuffer wurde ein 120 mM Phosphatpuffer mit pH 7,4 verwendet, der entweder Natrium- oder Kaliumionen enthielt.

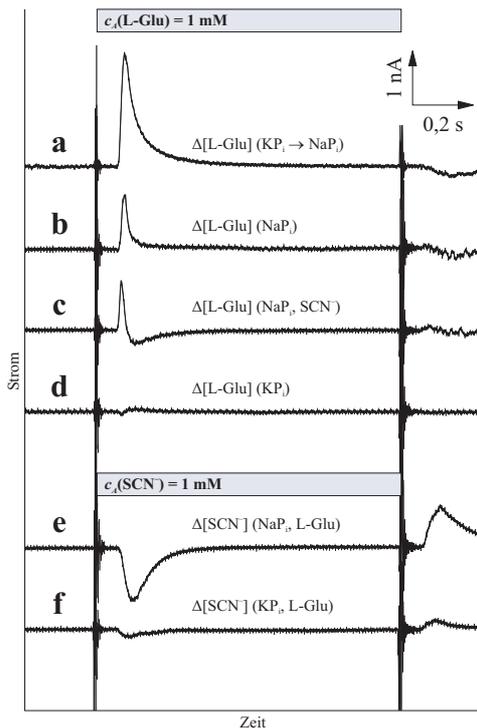


Abbildung 5.2: Änderungen der Signalform durch die Verwendung verschiedener Substanzen, Substrate und Kosubstrate. Alle verwendeten Puffer waren Natrium- oder Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4. Die Aktivierung erfolgte mit 1 mM L-Glutamat (a-d) oder 1 mM NaSCN (e-f). Die Messequenzen sind an den entsprechenden Signalformen dargestellt. In a ist ein doppelter Lösungswechsel gezeigt - mit Kaliumphosphatpuffer als Ruhelösung und Natriumphosphatpuffer in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung. Die restlichen Messequenzen sind einfache Lösungswechsel, bei denen in b Natriumphosphatpuffer, in c Natriumphosphatpuffer und 1 mM NaSCN und in d Kaliumphosphatpuffer in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vorhanden waren. In e und f war 1 mM L-Glutamat konstant im Hintergrund vorhanden, wobei in e Natriumphosphatpuffer und in f Kaliumphosphatpuffer verwendet wurde.

L-Glutamatsprung mit kaliumhaltiger Ruhelösung: Das erste Experiment in Abb. 5.2 a erfolgte mit einem doppelten Lösungswechsel nach der Messsequenz $\Delta[\text{L-Glu}]$ ($\text{KP}_i \rightarrow \text{NaP}_i$). Diese Sequenz entspricht dem Protokoll, das in Abb. 5.1 A gezeigt ist, nur dass hier ein Phosphatpuffer anstelle des HEPES-Puffers verwendet wurde. Der resultierende positive Signalverlauf besitzt die größte Amplitude der dargestellten Messungen und weist ein biphasisches Abklingverhalten auf.

L-Glutamatsprung ohne kaliumhaltige Ruhelösung: Bei dem Experiment in Abb. 5.2 b wurde der kaliumhaltige Ruhepuffer weggelassen, die nicht-aktivierende und die aktivierende Lösung beibehalten. Es erfolgte also ein einfacher Lösungswechsel (Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}]$ (NaP_i)), bei der alle Puffer kaliumfrei waren und kein Kaliumionengradient über die Membran der adsorbierten Fragmente bzw. Vesikel angelegt wurde. Die Amplitude des Signal wurde gegenüber dem Experiment in Abb. 5.2 a um ca. die Hälfte kleiner, und der abfallende Messstrom wies nur noch eine Phase auf.

L-Glutamatsprung in der Anwesenheit von Anionen: Verwendete man einen Puffer, in dem zusätzlich ein Anion vorhanden war, das eine Permeabilität für den EAAC1 aufwies, so ergab sich ein Signalverlauf, wie in Abb. 5.2 c abgebildet. In dem gezeigten Fall war zusätzlich 1 mM Natriumthiocyanat (NaSCN) in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung (also konstant im Hintergrund) vorhanden (Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}]$ ($\text{NaP}_i, \text{SCN}^-$)). Das damit erhaltene Signal wies neben dem positiven Signalanteil eine negative Komponente mit langsamem Abklingverhalten auf, die zeitlich nach dem positiven Transienten in Erscheinung trat. Das gleiche Verhalten konnte beobachtet werden, wenn bei einem Experiment mit HEPES-Puffer einfache Lösungswechsel durchgeführt wurden, bei denen keine kaliumhaltige Ruhelösung verwendet wurde und in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung ausschließlich NaCl vorhanden war (siehe Abb. 5.5 A). Dabei soll angemerkt werden, dass Chlorid ebenfalls ein permeables Anion für den EAAC1 ist.

L-Glutamatsprung ohne Natriumionen: In Abb. 5.2 d ist der Messstrom gezeigt, den man für L-Glutamat-Konzentrations sprünge erhält, wenn keine Natriumionen in den Messlösungen vorhanden sind. Anstelle des Natriumphosphatpuffers wurde Kaliumphosphatpuffer verwendet, so dass die Messsequenz als $\Delta[\text{L-Glu}]$ (KP_i) geschrieben werden kann. Für diese Sequenz wies der Messstrom kein transientes Signal auf, wenn ein Lösungswechsel zur aktivierenden Lösung stattfand. Ebenfalls konnten keine Signale bei L-Glutamat-Aktivierung mit natriumhaltigem Puffer erzeugt werden, wenn CHO-Zellfragmente an der Sensoroberfläche angelagert wurden, die keinen EAAC1 exprimierten (nicht gezeigt).

Anionensprünge in der Anwesenheit von L-Glutamat: Die letzten zwei Experimente in 5.2 e und f stellen einfache Lösungswechsel dar, bei denen das Anion Thiocyanat nur in der aktivierenden Lösung vorhanden war. In der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung war dahingegen eine konstante Konzentration von 1 mM L-Glutamat vorhanden. Bei der Messsequenz in Abb. 5.2 e wurde Natriumphosphatpuffer verwendet. Die Messsequenz lautet daher $\Delta[\text{SCN}^-]$ ($\text{NaP}_i, \text{L-Glu}$). Daraus resultierte ein Messstrom, der einen negativen Signalverlauf mit einer Amplitude von ca. 1 nA und ein relativ langsames monophasisches Abklingverhalten aufwies. In Abb. 5.2 f wurde anstelle des Natriumphosphatpuffers ein Kaliumphosphatpuffer verwendet (Sequenz $\Delta[\text{SCN}^-]$ ($\text{KP}_i, \text{L-Glu}$)).

Glu)), wodurch sich ein Messstrom ergab, in dem kein Signal, sondern ein kleines negatives Polarisationsartefakt vorhanden war. Hierbei soll angemerkt werden, dass der Betrag des Polarisationsartefakts in Abhängigkeit der elektrischen Eigenschaften der Sensoren stark variierte. Bei Experimenten, in denen eine Abhängigkeit der in Abb. 5.2 e gezeigten Signalkomponente untersucht wurde, wurde das Artefakt substrahiert. Ebenfalls trat kein Signal auf, wenn kein L-Glutamat im Hintergrund vorhanden war oder CHO-Zellfragmente auf der Sensoroberfläche angelagert wurden, die keinen EAAC1 exprimierten (nicht gezeigt).

Zeitliches Verhalten bei Ab- und Anwesenheit der kaliumhaltigen Ruhelösung

Um die Auswirkungen des Vorhandenseins der kaliumhaltigen Ruhelösung zu untersuchen, wurde das Verhalten der Signalamplitude in Abhängigkeit von der Zeit herangezogen. Da angenommen wurde, dass mit einem doppelten Lösungswechsel bei den verwendeten Puffern ein Kaliumgradient über die Membran aufgebaut werden kann, sollte diese Untersuchung genauer klären, wie lange der Gradient stabil bleibt und wie schnell er aufgebaut werden kann. Für das Experiment wurde ein HEPES-Puffer wie in Abb. 5.1 verwendet. Die Aktivierung erfolgte mit $100 \mu\text{M}$ L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. In Abb. 5.3 A sind die normierten Beträge der Signalamplituden gegen die Zeit aufgetragen. Die geschlossenen Rauten stellen ein Experiment dar, in dem zum Zeitpunkt $t < 0$ doppelte Lösungswechsel mit der Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}]$ ($\text{KCl} \rightarrow \text{NaCl}$) durchgeführt wurden. Ab dem Zeitpunkt $t = 0$ wurde die kaliumhaltige Ruhelösung weggelassen und es wurden kaliumfreie einfache Lösungswechsel mit der Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}]$ (NaCl) durchgeführt. Der Datenpunkt zum Zeitpunkt $t = 0$ ist dabei die mittlere Signalamplitude, die vor dem Wechsel der Sequenz mit doppelten Lösungswechseln in Anwesenheit von Kaliumionen erhalten wurde. Für Zeiten $t > 0$ wurde die Signalamplitude kleiner und ließ sich als in Abhängigkeit von der Zeit gut mit einer biexponentiellen Funktion annähern. Die schnellere Zeitkonstante liegt mit ca. 2 min unterhalb der Zeitauflösung, weil der erste Wert in kaliumfreier Umgebung erst nach ca. 5 min aufgenommen wurde. Die langsamere Komponente der Exponentialfunktion wies eine Zeitkonstante von 49 min auf. Das Verhältnis der präexponentiellen Faktoren betrug ca. $1/4$.

Im Anschluss an das eben beschriebene Experiment, wurden wieder doppelte Lösungswechsel (Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}]$ ($\text{KCl} \rightarrow \text{NaCl}$)) durchgeführt. Die dadurch erhaltenen Datenpunkte sind als offene Rauten in das Diagramm eingetragen. Der erste Punkt bei $t = 0$ entspricht dabei dem letzten Punkt, der in kaliumfreier Umgebung erhalten wurde (geschlossene Rauten, $t = 65$ min). Die folgenden Messungen unter Verwendung der Kaliumruhelösung ergaben eine Erholung der Signalamplitude, die innerhalb von 85 min auf ca. 80 % des Ausgangswertes (geschlossene Rauten $t = 0$) anwuchs. Das zeitliche Verhalten der Erholungskurve ließ sich ebenfalls mit einer biexponentiellen Funktion annähern. Die daraus erhaltenen Zeitkonstanten waren 1,8 min für die schnelle Komponente und 42 min für die langsame Komponente. Das Verhältnis der präexponentiellen Faktoren betrug ca. $1/4$. Wie bereits im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, wiesen die Messströme in Abhängigkeit von den Pufferzusammensetzungen bzw. dem verwendeten Lösungswechselprotokoll eine unterschiedliche Signalform auf. Das war auch hier der Fall. In Abb. 5.3 B sind Signalverläufe dargestellt, die Datenpunkte in dem Diagramm A (geschlossene Rauten) repräsentieren (Aktivierung mit $100 \mu\text{M}$ L-Glutamat in der aktivierenden Lösung). Aus dem Signalverlauf B.a wurde der erste Datenpunkt bei $t = 0$ erhalten, bei dem noch doppelte Lösungswechsel mit kaliumhaltiger Ruhelösung durchgeführt wurden.

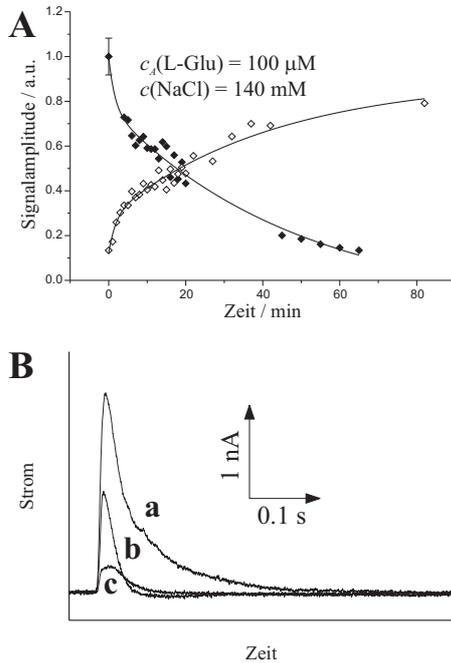


Abbildung 5.3: Zeitliches Verhalten bei Ab- und Anwesenheit der kaliumhaltigen Ruhelösung. Die dargestellten Daten in A und B wurden durch die Anwendung von einfachen und doppelten Lösungswechseln mit den Messsequenzen $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{NaCl})$ und $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{KCl} \rightarrow \text{NaCl})$ erhalten. Als Puffer kam eine Lösung mit 30 mM HEPES, 2 mM MgCl_2 und pH 7,4 zum Einsatz. In der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung waren 140 mM NaCl vorhanden. Die Ruhelösung, die nur bei den doppelten Lösungswechseln verwendet wurde, enthielt 140 mM KCl. In A wurden die Messpunkte der abfallenden Kurve (\blacklozenge), bis auf den ersten Punkt, durch die Anwendung von einfachen Lösungswechseln aufgezeichnet. Bei der ansteigenden Kurve (\blacklozenge) wurden, bis auf den ersten Punkt, doppelte Lösungswechsel durchgeführt. Von den in B dargestellten zeitaufgelösten Messsignalen wurde a mit einem doppelten Lösungswechsel aufgezeichnet (Zeitpunkt $t = 0$ der abfallenden Kurve in A). Die Signale b und c wurden durch den Wechsel zu einfachen Lösungswechseln nach 20 min (b) und 60 min (c) erhalten. Die Aktivierung erfolgte in allen Fällen mit 100 μM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung.

Das Signal wies eine große Amplitude (ca. 2 nA) und ein biphasisches Abklingverhalten auf. In B.b ist die Signalförm zu sehen, die 20 min nach dem Wechsel zu einfachen Lösungswechseln in kaliumfreier Umgebung auftrat. Die Signalamplitude war nur noch halb so groß, und in dem monophasischen Abklingverhalten trat zusätzlich eine kleine negative Komponente auf. Nach 60 min ergab sich ein Signalverlauf, wie er in B.c dargestellt ist. Die Signalamplitude war weiter reduziert (ca. 15 % vom Ausgangswert), und der abfallende Signalverlauf wies nur eine Phase auf. Mit Rücksichtnahme auf die hier dargestellten Ergebnisse wurde vor der Durchführung eines Experiments (z.B. Aufzeichnung einer Substratabhängigkeit) mindestens 1 Stunde lang eine dem Experiment entsprechende Sequenz bei sättigender Substratkonzentration durchgeführt, damit sich die von den angelagerten Membranstrukturen (hier CHO-Membranfragmente) eingeschlossenen Kompartimente mit der Ruhelösung anreichern konnten.

Einfluss der Anwesenheit von Kaliumionen auf die Substratabhängigkeit

In Abb. 5.4 A und B sind die Substratanhängigkeiten für die zwei Fälle dargestellt, in denen entweder doppelte Lösungswechsel mit Kaliumruhelösung (A) oder einfache Lösungswechsel in kaliumfreier Umgebung (B) durchgeführt wurden.

Die zeitaufgelösten transienten Messströme in Abb. 5.4 A.1 und B.1 wurden jeweils bei Konzentrationssprüngen mit variierender L-Glutamatkonzentration in der aktivierenden Lösung aufgezeichnet und übereinandergelegt. Bei beiden Experimenten wurde Phosphatpuffer, pH 7,4, verwendet, wobei der Puffer in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung natriumhaltig war. Die Ruhelösung, die nur in A.1 zum Einsatz kam war kaliumhaltig. Die L-Glutamatkonzentration wurde von 1 μM bis 3 mM variiert. Die Signalförm in A.1 (Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{KP}_i \rightarrow \text{NaP}_i)$) weisen ein biphasisches Abklingverhalten auf (Zeitkonstanten τ_2 und τ_3). Das Abklingverhalten der Signalförm in B.1 (Sequenz

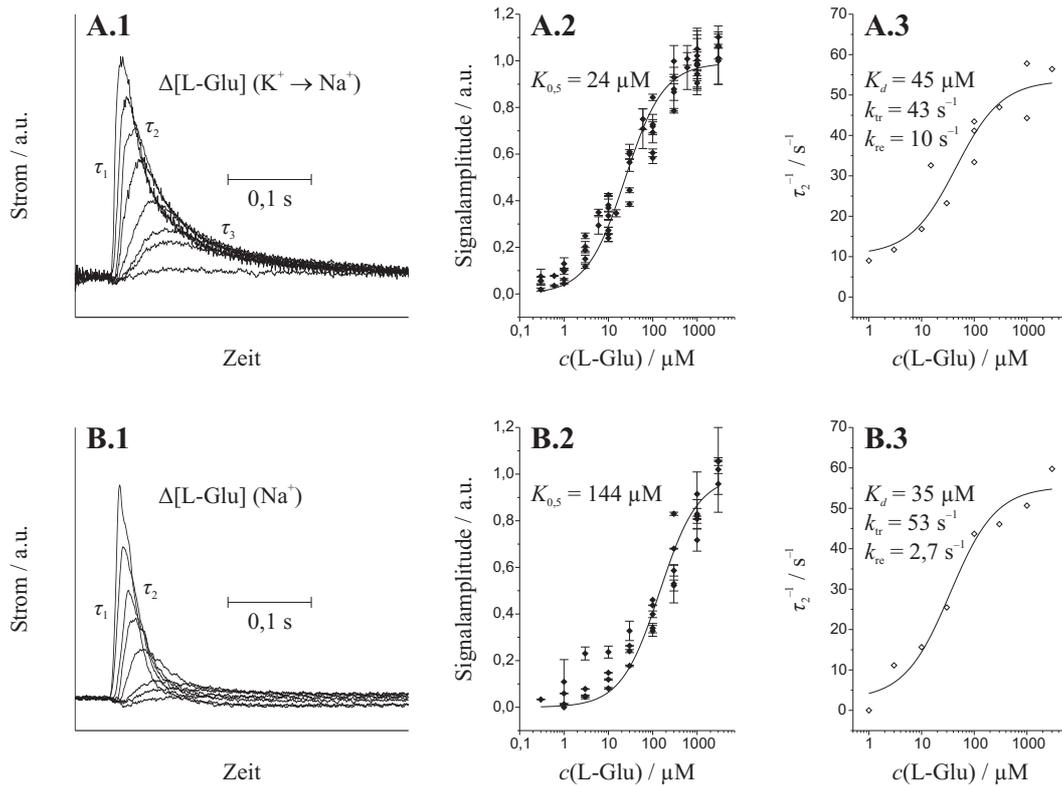


Abbildung 5.4: Einfluss von Kaliumionen auf die L-Glutamat-Substratabhängigkeit des EAAC1. Die dargestellten Daten in A und B wurden durch die Anwendung von doppelten und einfachen Lösungswechseln mit den Messsequenzen $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{K}^+ \rightarrow \text{Na}^+)$ und $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{Na}^+)$ erhalten. Die Daten in A.1 bis A.3 wurden mit doppelten Lösungswechseln aufgezeichnet, wohingegen bei den Daten in B.1 bis B.3 einfache Lösungswechsel angewendet wurden. Als Puffer kam entweder Phosphatpuffer oder HEPES-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 zum Einsatz. Bei den in A.1 und B.1 dargestellten Messströmen für verschiedene L-Glutamatkonzentrationen war in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung 120 mM Natriumphosphatpuffer vorhanden. Die Ruhelösung, die nur bei den doppelten Lösungswechseln in A.1 verwendet wurde, enthielt 120 mM Kaliumphosphatpuffer. In A.2 und B.2 sind jeweils Datenpunkte vorhanden, die mit Phosphatpuffer oder mit HEPES-Puffer aufgenommen wurden. Sie stellen die Signalamplitude in Abhängigkeit von der L-Glutamatkonzentration dar. In A.3 und B.3 sind die Zeitkonstanten τ_2 in Abhängigkeit von der L-Glutamatkonzentration gezeigt, die aus den Messströmen in A.1 und B.1 erhalten wurden. Die Aktivierung erfolgte bei allen dargestellten Daten mit variierenden L-Glutamatkonzentrationen in der aktivierenden Lösung.

$\Delta[\text{L-Glu}] (\text{NaP}_i)$) war monophasisch (Zeitkonstante τ_2). Die Diagramme in Abb. 5.4 A.2 und B.2 stellen jeweils die Signalamplituden der erhaltenen Messsignale für die verschiedenen L-Glutamatkonzentrationen dar. Dabei wurden neben den Signalamplituden aus A.1 und B.1 jeweils die Datenpunkte aus mehreren anderen Experimenten zusammengetragen (z.B. auch die Datenpunkte aus Abb. 5.1 C (geschlossene Rauten)). Jede einzelne Abhängigkeit wurde auf ihr Maximum normiert, bevor die Datenpunkte dem entsprechenden Diagramm hinzugefügt wurden. Die in dem Diagramm vorhandene Kurve kam durch eine Annäherung mit einer Michaelis-Menten-Kinetik an alle vorhandenen Datenpunkte zustande. Das Kriterium, um in das Diagramm aufgenommen zu werden, war die Art der Messsequenz hinsichtlich des Vorhandenseins der Kaliumruhelösung. Das heißt, in Abb. A.2 sind alle L-Glutamatabhängigkeiten dargestellt, die mit einem doppelten

Lösungswechsel bei Verwendung einer Kaliumruhelösung durchgeführt wurden, unabhängig davon, ob Phosphatpuffer oder HEPES-Puffer verwendet wurde. Die Halbsättigungskonstante für L-Glutamat ergab sich dabei zu $K_{0,5} = (24 \pm 3) \mu\text{M}$. In B.2 sind alle L-Glutamat-Abhängigkeiten vorhanden, die mit einfachen Lösungswechsel kaliumfrei durchgeführt wurden. Hier ergab sich eine Halbsättigungskonstante von $K_{0,5} = (144 \pm 24) \mu\text{M}$. Desweiteren wurden die Zeitkonstanten ausgewertet, die sich ergaben, wenn man die transienten Stromsignale aus Abb. 5.4 A.1 und B.1 mit einer Summe aus 2 oder 3 Exponentialfunktionen annäherte. Die in Abb. 5.4 A.3 gezeigten Daten entsprechen der schnelleren Zeitkonstante τ_2 aus dem abfallenden Messstrom der Signale in A.1. Außerdem wurden Datenpunkte aus einer weiteren Abhängigkeit hinzugefügt. Die Punkte in B.3 stammen ausschließlich aus B.1 und stellen Zeitkonstanten des monophasischen Abklingverhaltens τ_2 dar. Die Annäherung an die Datenpunkte erfolgte mit einer Funktion, die der Gleichung für die apparente Zeitkonstante (Gl. 3.35) in einem 3-Zustandsmodell entsprach. Dabei ergaben sich für die doppelten Lösungswechsel mit kaliumhaltiger Ruhelösung folgende Werte: $K_d = (45 \pm 22) \mu\text{M}$, $k_{tr} = (43 \pm 5) \text{s}^{-1}$ und $k_{re} = (10 \pm 4) \text{s}^{-1}$. Für die einfachen Lösungswechsel ohne Kaliumionen kamen folgende Werte heraus: $K_d = (35 \pm 12) \mu\text{M}$, $k_{tr} = (53 \pm 4) \text{s}^{-1}$ und $k_{re} = (2,7 \pm 3,5) \text{s}^{-1}$.

Untersuchung der negativen Komponente

In der Anwesenheit von Anionen, für die der EAAC1 eine Permeabilität aufwies, konnte bei der Durchführung von einfachen Lösungswechseln eine negative Komponente im Signalverlauf beobachtet werden, wenn die Aktivierung mit L-Glutamat in der aktivierenden Lösung nach der Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{Na}^+, \text{An}^-)$ stattfand. Um das zeitliche Verhalten nach dem Hinzufügen eines permierenden Anions in den Messpuffern zu charakterisieren, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem ein Sensor zuerst in einem Natriumphosphatpuffer equilibriert wurde. Dafür wurden über einen längeren Zeitraum mehrere Messsequenzen in der Form $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{NaP}_i)$ (einfache Lösungswechsel, gleiche Bedingungen wie in Abb. 5.2 b) durchgeführt, von denen einer in Abb. 5.5 A.a zu sehen ist. Die Aktivierung erfolgte mit 1 mM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung, und das daraus erhaltene positive Signal wies ein monoexponentielles Abklingverhalten auf. Im Anschluß wurde der Messpuffer (nicht-aktivierende und aktivierende Lösung) gegen einen HEPES-Puffer (30 mM HEPES, 2 mM MgCl_2 , pH 7,0) mit 140 mM NaCl ausgetauscht. Die daraufhin erfolgten Messsequenzen ($\Delta[\text{L-Glu}] (\text{NaCl})$) sind auszugsweise in Abb. 5.5 A.b bis A.d dargestellt. Die erste Messung (A.b) erfolgte ca. 15 s, nachdem die Sensoroberfläche zum ersten Mal Kontakt mit der chloridhaltigen Pufferlösung hatte. Die zwei nachfolgenden Signalformen (A.c und A.d) wurden nach 1 min und nach 16 min aufgezeichnet. Für die Aktivierung wurde dabei ebenfalls 1 mM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung eingesetzt. Bei der ersten Messung mit dem permierenden Anion Chlorid (A.a), trat eine negative Komponente in dem Signalverlauf auf, die eine große Amplitude aufwies und bei der die positive Komponente nur als scharfe Stromspitze vorhanden war. Nach 1 min war die Amplitude der negativen Komponente verringert, und der positive Anteil im Signalverlauf trat deutlicher hervor. Auch 16 min, nachdem die Lösungen gewechselt wurden, war die negative Komponente im Signal deutlich sichtbar und hatte sich, ebenso wie der positive Anteil, stabilisiert.

Neben der gerade beschriebenen zeitlichen Abhängigkeit der negativen Komponente wurde deren Abhängigkeit von der eingesetzten L-Glutamatkonzentration und der Konzentration des verwendeten Anions untersucht. Abb. 5.5 B zeigt eine Matrix von zeitaufgelösten Mes-

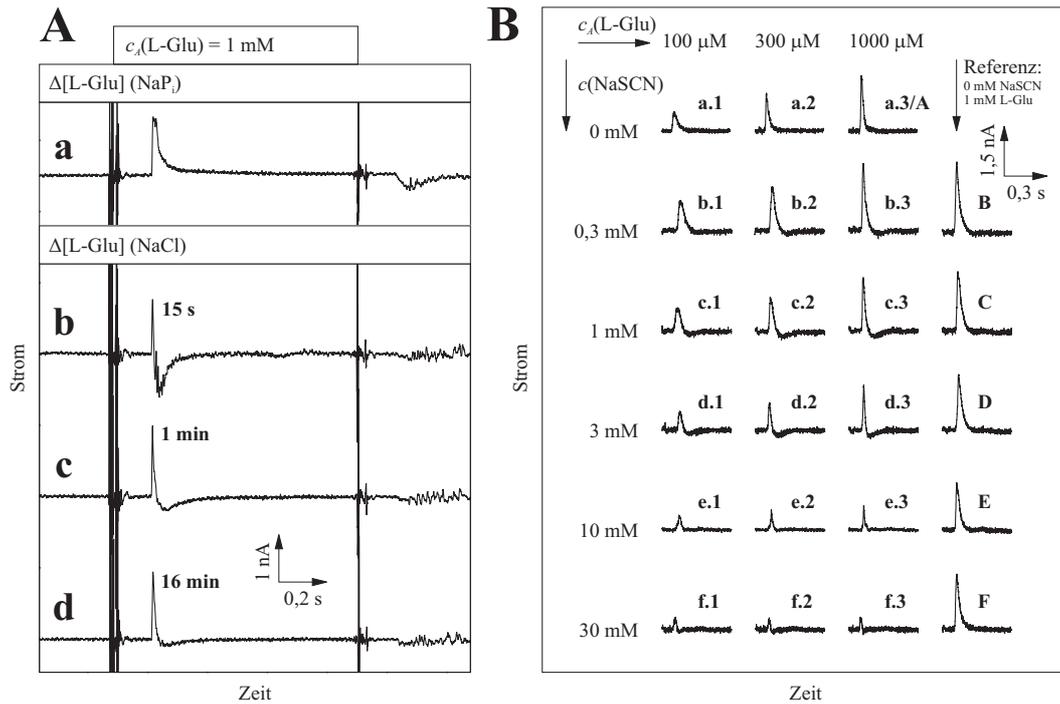


Abbildung 5.5: Untersuchung der negativen Komponente unter der Anwendung von einfachen Lösungswechseln. In A ist die zeitliche Abhängigkeit der negativen Komponente nach dem Wechsel von einem Puffer, der keine permieierenden Anionen enthält (A.a), zu einem Puffer, der das permieierende Anion Chlorid enthält (A.b bis A.d), gezeigt. Der chloridfreie Puffer war ein Natriumphosphatpuffer. Der chloridhaltige Puffer war ein HEPES-Puffer mit 140 mM NaCl und pH 7,0. Gezeigt sind die transienten Messströme, die 15 s, 1 min und 16 min nach dem Wechsel erhalten wurden. In B wurden die einfachen Lösungswechsel ausschließlich mit Natriumphosphatpuffern durchgeführt. Es ist die Abhängigkeit der Signalform von der L-Glutamatkonzentration (1 bis 3) und der Anionenkonzentration (a bis f) in Matrixform dargestellt. 100, 300 und 1000 μM L-Glutamat wurden dabei zur Aktivierung in der aktivierenden Lösung eingesetzt. 0 bis 30 mM des Anions Thiocyanat waren in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vorhanden. Rechts neben jeder Zeile sind Referenzmessungen dargestellt, die ohne Thiocyanat im Hintergrund durchgeführt wurden.

sungen, die mit einfachen Lösungswechseln unter der Verwendung von Natriumphosphatpuffer aufgenommen wurden. Bei den gezeigten Signalverläufen wurde die Konzentration des permieierenden Anions Thiocyanat (in der Salzform NaSCN) in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung von oben nach unten erhöht (a bis f). In jeder Zeile der Matrix wurden drei verschiedene L-Glutamatkonzentrationen zur Aktivierung eingesetzt (1 bis 3). Die Thiocyanatkonzentration wurde von 0 bis 30 mM variiert und als L-Glutamatkonzentrationen waren 100, 300 oder 1000 μM in der aktivierenden Lösung vorhanden. Vor und nach einer L-Glutamatkonzentrations-Abhängigkeit wurden Referenzmessungen ohne permieierendes Anion in den Messpuffern durchgeführt, von denen jeweils eine ganz rechts in jeder Zeile abgebildet ist (A bis F). Von links nach rechts war in allen Zeilen bis auf Zeile f eine Vergrößerung der positiven Signalamplitude mit steigender L-Glutamatkonzentration (1 bis 3) zu beobachten. Von oben nach unten war mit dem Anstieg der Thiocyanatkonzentration zuerst eine Vergrößerung der negativen Komponente im Signalverlauf verbunden (a bis d), die bei weiterer Erhöhung der Thiocyanatkonzentration (e und f) nicht mehr auftrat. Das Verschwinden der negativen Komponenten bei hohen Thiocyanatkonzentrationen ging einher mit der Abnahme der positiven Signalamplitude und

deren Abhängigkeit von der L-Glutamatkonzentration. In Zeile e (10 mM NaSCN) war bei stark reduzierter Signalamplitude und abwesender negativer Komponente noch eine schwache Abhängigkeit von der L-Glutamatkonzentration vorhanden, wohingegen in Zeile f (30 mM NaSCN) weder eine L-Glutamat-Abhängigkeit, noch eine negative Komponente zu beobachten war. Dieses Verhalten war hinsichtlich der positiven Signalamplitude konform zu den Beobachtungen bei doppelten Lösungswechseln mit einem HEPES-Puffer, bei denen anstelle von NaCl und KCl die Thiocyanatsalze NaSCN und KSCN (jeweils 140 mM) in den Messlösungen verwendet wurden (Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}]$ (KSCN \rightarrow NaSCN)). Dort war im Vergleich zu den Messungen mit den Chloriden kein Signal im Messstrom vorhanden, wenn das Protein mit 1 mM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung aktiviert wurde (nicht gezeigt). Um festzustellen, ob die negative Komponente auf die Bindung eines Substrates zurückzuführen ist wurden ebenfalls einfache Lösungswechsel mit Thiocyanat in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung durchgeführt, bei denen entweder das Enantiomer D-Glutamat, oder der kompetitive Inhibitor DL-*threo*- β -benzyloxyaspartat (TBOA) anstelle von L-Glutamat in der aktivierenden Lösung vorhanden waren (nicht gezeigt). Erfolgte die Aktivierung mit D-Glutamat, so waren positive Signale im Messstrom vorhanden, die keine negative Komponente aufwiesen, und sich nicht von Experimenten unterschieden, bei denen kein permeierendes Anion in den Messlösungen vorhanden war. Die Signalamplitude betrug dabei ein Zehntel gegenüber der Signalamplitude, die mit L-Glutamat erhalten wurde. Das Integral über den Signalverlauf war dahingegen halb so groß wie bei einem Signal, dass in Abwesenheit von permeierenden Anionen mit L-Glutamat in der aktivierenden Lösung erhalten wurde. Wenn TBOA in der aktivierenden Lösung vorhanden war, so ergab sich ein sehr kleines positives Signal (Faktor 30 kleiner gegenüber L-Glutamat), dass keine negative Komponente aufwies. Das Integral betrug ein Zehntel gegenüber L-glutamatinduzierten Messströmen in der Abwesenheit von permeierenden Anionen.

Anioneninduzierte Messströme in der Anwesenheit von L-Glutamat

In Abb. 5.2 e wurde bereits ein Experiment vorgestellt, bei dem einfache Lösungswechsel mit einem Natriumphosphatpuffer und 1 mM L-Glutamat in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung durchgeführt wurden. In der aktivierenden Lösung war 1 mM des Anions Thiocyanat (SCN^-) in der Salzform NaSCN vorhanden. Thiocyanat ist ein Anion, für das der EAAC1 eine hohe Permiabilität aufweist. Bei einem schnellen Lösungswechsel zur thiocyanathaltigen Lösung ergab sich ein negatives Signal mit relativ großer Amplitude. In diesem Abschnitt sollen Messungen vorgestellt werden, die durchgeführt wurden, um die thiocyanatinduzierten Mesströme genauer zu charakterisieren. Es wurden ausschließlich einfache Lösungswechsel durchgeführt. Dabei wurde überwiegend mit Phosphatpuffer gearbeitet, weil dadurch vermieden werden konnte, dass Chlorid in der Lösung vorhanden war. Chlorid ist ebenfalls ein Anion, für das der EAAC1 eine Permiabilität aufweist, und es wurde beobachtet, dass Thiocyanatsprünge mit einem HEPES-Puffer und 140 mM NaCl in den Messlösungen eine weniger ausgeprägte Signalform mit etwas geringerer Signalamplitude hervorriefen als wenn ein Phosphatpuffer verwendet wurde. Die Konzentrationssprünge mit Thiocyanat erfolgten in der Regel unkompensiert, also ohne dass ein inertes Anion in der nicht-aktivierenden Lösung vorhanden war. In 5.6 sind die durchgeführten Experimente zusammengefasst.

Die oberen drei Diagramme in 5.6 (A.1 bis A.3) stellen die Abhängigkeit von der eingesetzten Thiocyanatkonzentration in der aktivierenden Lösung dar. In A.1 sind die transienten

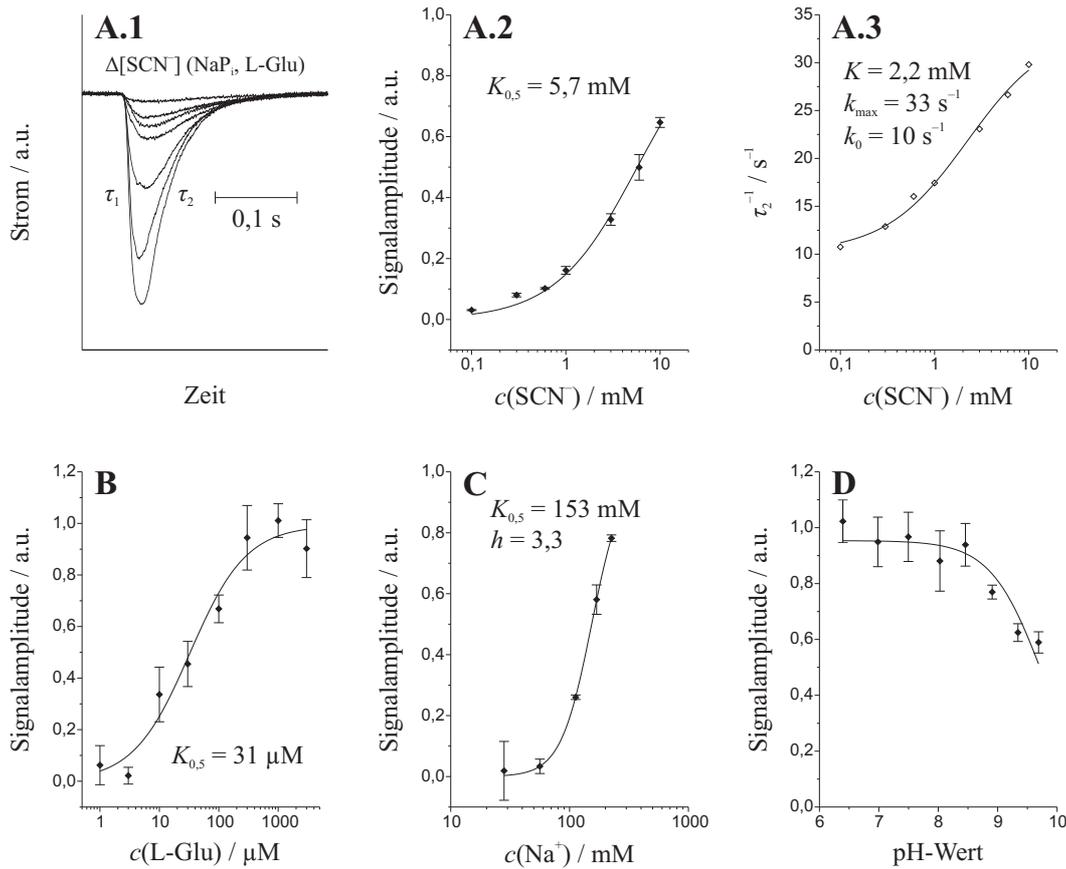


Abbildung 5.6: Anioneninduzierte Messströme in der Anwesenheit von L-Glutamat. Alle Experimente wurden mit einfachen Lösungswechseln und in Anwesenheit von L-Glutamat in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung durchgeführt. In A sind die Anhängigkeiten von der Thiocyanatkonzentration in der aktivierenden Lösung gezeigt. Dabei wurde ein 120 mM Natriumphosphatpuffer verwendet. Die Thiocyanatkonzentration (Salzform NaSCN) variierte von 0,1 bis 10 mM. In A.1 sind die aufgezeichneten transienten Messströme dargestellt. In A.2 ist die Signalamplitude gegen die Thiocyanatkonzentration aufgetragen, und A.3 zeigt die Thiocyanatabhängigkeit des Kehrwerts der Zeitkonstanten τ_2 , die das Abklingverhalten der transienten Messstroms beschreibt. In B wurde die L-Glutamatkonzentration in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung von 1 μM bis 3 mM erhöht. Als Puffer wurde 120 mM Natriumphosphatpuffer verwendet, und in der aktivierenden Lösung war 1 mM NaSCN vorhanden. Die Signalamplitude der erhaltenen Messströme ist gegen die L-Glutamatkonzentration aufgetragen. C zeigt den Einfluss der Natriumionenkonzentration auf die Signalamplitude. 120 mM Natriumphosphatpuffer und 120 mM Kaliumphosphatpuffer wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt, so dass sich unterschiedliche Natriumionenkonzentrationen von 30 bis 225 mM ergaben. In beiden Puffern war 1 mM L-Glutamat vorhanden. In der aktivierenden Lösung wurde 1 mM KSCN für die Signalinduzierung verwendet. Die Signalamplitude der erhaltenen Messströme ist gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen. In D ist die pH-Wert-Abhängigkeit der Signalamplitude im Bereich zwischen pH 6,5 und pH 10 gezeigt. Hier wurde ein Puffer mit 10 mM Zitronensäure, 10 mM HEPES, 10 mM CHES, 5 mM MgCl_2 und 140 mM NaCl verwendet. Die Titration zur pH-Einstellung erfolgte mit KOH-Lösung, und in der aktivierenden Lösung war 1 mM KSCN vorhanden.

Messströme gezeigt, die durch Thiocyanat-Konzentrationssprünge von 0,1 bis 10 mM bei der Verwendung von Natriumphosphatpuffer mit 1 mM L-Glutamat hervorgerufen wurden

(Sequenz $\Delta[\text{SCN}^-]$ (NaP_i , L-Glu)). Die erhaltenen Signalformen wiesen ein monophasisches Abklingverhalten auf und ließen sich gut mit einer Funktion annähern, die aus der Summe von zwei Exponentialfunktionen bestand. Die daraus erhaltenen Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 sind in der Abbildung gekennzeichnet. Der Betrag der Signalamplitude, der in A.2 gegen die Thiocyanatkonzentration aufgetragen ist, befand sich bei der größten verwendeten Thiocyanatkonzentration noch nicht in der Sättigung, da keine Experimente mit höheren Thiocyanatkonzentrationen durchgeführt wurden. Die Beträge der Signalamplituden in dem Diagramm A.2 wurden mit einer Michaelis-Menten-Kinetik angenähert und auf die erhaltene Maximalamplitude der Annäherungsfunktion normiert. Die Annäherung ergab eine Halbsättigungskonstante von $K_{0,5} = (5,7 \pm 0,9) \text{ mM}$. Der Kehrwert der Zeitkonstanten τ_2 (Relaxationsrate τ_2^{-1}), die den abfallenden Messstrom beschreibt, ist in A.3 als Abhängigkeit von der Thiocyanatkonzentration dargestellt. Sie wurde mit einer hyperbolischen Funktion ($\tau^{-1} = (k_{max} - k_0) \cdot c(\text{SCN}^-) / (K + c(\text{SCN}^-)) + k_0$) angenähert, die einen Anfangswert (*Offset*) aufwies. Dabei ergaben sich die Werte: $K = 2,2 \text{ mM}$, $k_{max} = 33 \text{ s}^{-1}$ und $k_0 = 10 \text{ s}^{-1}$. Die untere Reihe in Abb. 5.6 (B bis D) weist weitere Konzentrationsabhängigkeiten der Signalamplitude von anderen, in der Messlösung vorhandenen Substanzen auf. In der aktivierenden Lösung waren dabei immer 1 mM Thiocyanatanionen vorhanden. In B wurde die L-Glutamatkonzentration variiert, die in nicht-aktivierender und aktivierender Lösung vorhanden war. Als Puffer wurde ein Natriumphosphatpuffer verwendet (Sequenz $\Delta[\text{SCN}^-]$ (NaP_i , L-Glu)). Die Datenpunkte wurden mit einer Michaelis-Menten-Kinetik angenähert und auf ihr Maximum normiert. Die Halbsättigungskonstante, die sich dabei für L-Glutamat ergab, betrug $K_{0,5} = (31 \pm 8) \mu\text{M}$. In Abb. 5.6 C ist die Abhängigkeit der Signalamplitude von der Natriumionenkonzentration in einem Phosphatpuffer gezeigt. Die Natriumionenkonzentration wurde dabei durch Mischen des 120 mM Natriumphosphatpuffers mit 120 mM Kaliumphosphatpuffer variiert, so dass die Gesamtkationen- und Gesamtpufferkonzentration konstant blieb ($c(\text{KP}_i) + c(\text{NaP}_i) = 120 \text{ mM}$). Die Messsequenz lautete dementsprechend $\Delta[\text{SCN}^-]$ ($\text{NaP}_i + \text{KP}_i$, L-Glu). Der maximale Wert der Natriumionenkonzentration war durch den reinen Natriumphosphatpuffer gegeben und betrug bei 120 mM Phosphatpuffer 225 mM. Die kleinste eingesetzte Natriumionenkonzentration war 30 mM. Die Signalamplitude beschrieb innerhalb dieser Grenzen eine Funktion, die sich nicht mit einer Michaelis-Menten-Kinetik anpassen ließ. Es mußte eine Hillfunktion verwendet werden, mit der eine Halbsättigungskonstante von $(153 \pm 6) \text{ mM}$ bei einem Hillkoeffizient von $3,3 \pm 0,2$ bestimmt werden konnte. Die Signalamplitude befand sich bei der maximal eingesetzten Natriumionenkonzentration nicht in der Sättigung, da mit den verwendeten Puffern keine höhere Natriumionenkonzentration als 225 mM eingestellt werden konnte. In dem letzten Diagramm in Abb. 5.6 (D) ist eine pH-Wert-Abhängigkeit der Signalamplitude abgebildet. Bei diesem Experiment wurde ein Puffer, bestehend aus 10 mM Zitronensäure, 10 mM HEPES, 10 mM CHES, 5 mM MgCl_2 , 1 mM L-Glutamat und 140 mM NaCl, für die nicht-aktivierende und die aktivierende Lösung verwendet. Der pH-Wert wurde mit KOH-Lösung eingestellt und nach der Messung mit einem pH-Meter kontrolliert. Die Datenpunkte wurden auf einen Referenzmesswert bei pH 7,4 normiert. Die Signalamplitude der Thiocyanatinduzierten Messströme wiesen nahezu über den gesamten pH-Wertbereich von pH 6,5 bis pH 10 einen konstanten Betrag auf. Erst bei alkalischen pH-Werten oberhalb von pH 8,5 war ein Rückgang der Signalamplitude zu beobachten. Der Betrag der Signalamplitude betrug bei ca. pH 10 nur noch die Hälfte von dem Referenzmesswert bei pH 7,4.

Lithiumionen als Kosubstrat

In Abb. 5.7 sind vergleichende Experimente gezeigt, bei denen das Kosubstrat Natriumionen gegen Lithiumionen ausgetauscht wurde. Als Messsequenzen kamen doppelte und einfache Lösungswechsel zur Anwendung. Als Puffer wurde ein HEPES-Puffer verwendet, der entweder 140 mM NaCl oder 140 mM LiCl in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung enthielt. Bei der Durchführung der doppelten Lösungswechsel waren 140 mM KCl in der Ruhelösung vorhanden.

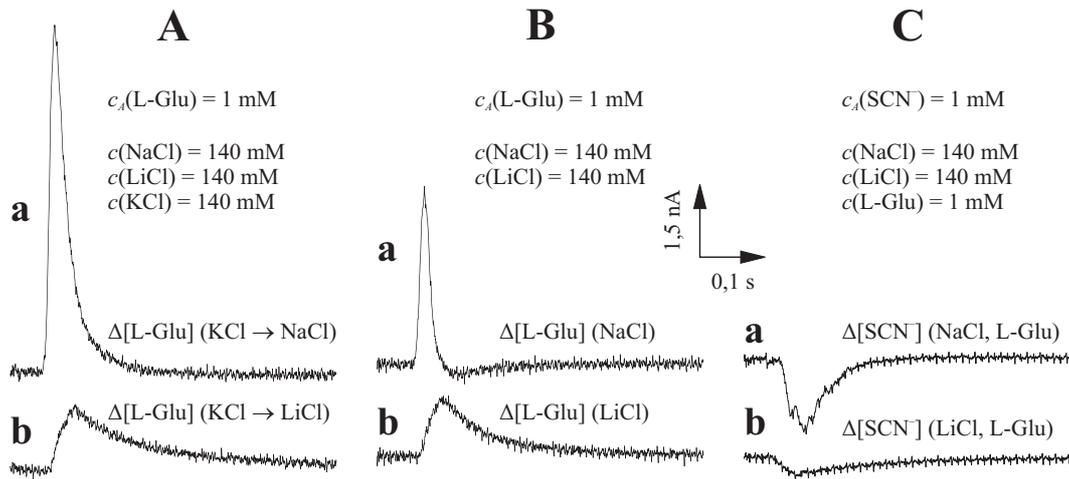


Abbildung 5.7: Lithiumionen als Kosubstrat. Die dargestellten transienten Messströme wurden durch die Anwendung von doppelten und einfachen Lösungswechseln erhalten. Der verwendete Puffer war in allen Fällen ein HEPES-Puffer (30 mM HEPES, 2 mM MgCl_2 , pH 7,4), in dem 140 mM NaCl oder 140 mM LiCl in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vorhanden waren. Bei den in A angewendeten doppelten Lösungswechseln enthielt die Ruhelösung 140 mM KCl. In A.a enthielt der Messpuffer NaCl, wohingegen in A.b LiCl im Messpuffer vorhanden war. Die Aktivierung erfolgte mit 1 mM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. Die Signale in B wurden mit einfachen Lösungswechseln erhalten, die mit NaCl (B.a) oder LiCl (B.b) in den Messpuffern durchgeführt wurden. Die Aktivierung erfolgte ebenfalls mit 1 mM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. In C sind Messströme gezeigt, die durch einfache Lösungswechsel mit NaCl (C.a) oder LiCl (C.b) in den Messpuffern erhalten wurden, wobei 1 mM L-Glutamat in beiden Puffern vorhanden war. Die Signale wurden durch 1 mM NaSCN, das in der aktivierenden Lösung vorhanden war, induziert.

Abb. 5.7 A zeigt doppelte Lösungswechsel, die zuerst (A.a) mit der Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{KCl} \rightarrow \text{NaCl})$ durchgeführt wurden. Die Aktivierung erfolgte mit 1 mM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. Danach wurden die natriumhaltigen Pufferlösungen gegen lithiumhaltige Puffer ausgetauscht. Für die damit erhaltenen Messströme (A.b) lautete die Messsequenz $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{KCl} \rightarrow \text{LiCl})$. Der mit Lithiumionen im Hintergrund aufgezeichnete Messstrom wies bei Aktivierung mit 1 mM L-Glutamat ein transientes Signal in positiver Richtung auf. Gegenüber der Signalform in A.a war die Signalamplitude in der Anwesenheit von Lithiumionen um einen Faktor von Fünf reduziert und besaß ein langsames Abklingverhalten. Das Verhältnis der verschobenen Ladungen (Integration über die Signalformen) ergab sich zu $q(\text{NaCl})/q(\text{LiCl}) = 1,5 \pm 0,5$. In 5.7 B ist die Durchführung von einfachen Lösungswechseln gezeigt, bei denen die Aktivierung ebenfalls mit 1 mM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung erfolgte. In B.a ist der aufgenommene Messstrom

dargestellt, der bei der Verwendung von natriumhaltigen Lösungen hervorgerufen wurde (Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}]$ (NaCl)). Der Messstrom wies neben dem positiven Signalanteil eine negative Komponente auf. Wenn dahingegen Lithiumionen anstelle von Natriumionen in den Messpuffern vorhanden waren (B.b), dann konnte keine negative Komponente im Signalverlauf beobachtet werden (Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}]$ (LiCl)). Die Signalamplitude der glutamatinduzierten Messströme war gegenüber den Messungen mit Natriumionen (B.a) nur ein Drittel so groß. Beim Vergleich der Experimente, die mit doppelten und mit einfachen Lösungswechseln durchgeführt wurden, ergab sich, dass die Signalamplitude in beiden Fällen gleich groß war, wenn sich Lithiumionen in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung befanden (A.b und B.b). Das Abklingverhalten wies bei einfachen Lösungswechseln eine schnellere Kinetik auf. Abb. 5.7 C zeigt ein Experiment, in dem der Einfluss von Lithiumionen auf die thiocyanatinduzierten Messströme in der Anwesenheit von L-Glutamat untersucht wurde. Es erfolgten einfache Lösungswechsel, bei denen 1 mM L-Glutamat und 140 mM NaCl oder 140 mM LiCl in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vorhanden waren. Die aktivierende Lösung enthielt eine Konzentration von 1 mM NaSCN. Bei der Verwendung der natriumhaltigen Lösungen (Sequenz $\Delta[\text{SCN}^-]$ (NaCl, L-Glu)) wurde der in C.a dargestellte negative Signalverlauf erhalten. Wurden dahingegen lithiumhaltige Lösungen verwendet (Sequenz $\Delta[\text{SCN}^-]$ (LiCl, L-Glu)), ergab sich der in C.b gezeigte Messstrom. Im Gegensatz zu der Messung mit Natriumionen war bei der Anwendung von lithiumhaltigen Puffern eine negative Änderung des Messstromes zu beobachten, die in der Größenordnung der Polarisationsartefakte durch das Thiocyanat lagen (siehe Abb. 5.2 f).

Inhibition

Für die Familie der neuronalen Glutamattransporter existieren verschiedene spezifische Inhibitoren. Ein prominentes Beispiel eines Inhibitors des EAAC1 ist die Substanz DL-threo- β -benzyloxyaspartat (TBOA). Sie bindet kompetitiv an den Transporter und wird nicht transportiert. Im Folgenden werden Experimente vorgestellt, bei denen der Inhibitor TBOA und die Substanz 3-Hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]isoxazole-6-carboxylsäure (HIP-B) verwendet wurden, um die L-glutamatinduzierten und die thiocyanatinduzierten Messströme zu inhibieren. Des Weiteren wurde die gegenüber dem EAAC1 unwirksame Substanz Dihydrokainat (DHK) verwendet, die spezifisch für das Familienmitglied GLT-1 bzw. EAAT2 ist. In Abb. 5.8 sind die Ergebnisse der Inhibitionsexperimente zusammengefasst. Als Puffer wurde bei fast allen Experimenten ein Phosphatpuffer (120 mM) mit Natriumionen in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung eingesetzt. Als Messsequenz wurden einfache Lösungswechsel oder doppelte Lösungswechsel, bei denen eine kaliumhaltige Ruhelösung vorhanden war, angewendet. Jeder Messwert einer Inhibitor-Konzentrationsabhängigkeit in den Diagrammen in Abb. 5.8 A bis D beschreibt das Verhältnis der Signalamplitude, die in Anwesenheit eines Inhibitors erhalten wurde, zu der Signalamplitude, die ohne Inhibitor auftrat (Referenzmessung). Die Inhibitionsmessung erfolgte direkt im Anschluss an die Referenzmessung. Die dargestellten Kurven wurden zusätzlich auf die Signalamplitude bei sättigenden Substratkonzentrationen normiert. Der Inhibitor war in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vorhanden, und seine Konzentration wurde von 0,1 bis 30 μM variiert.

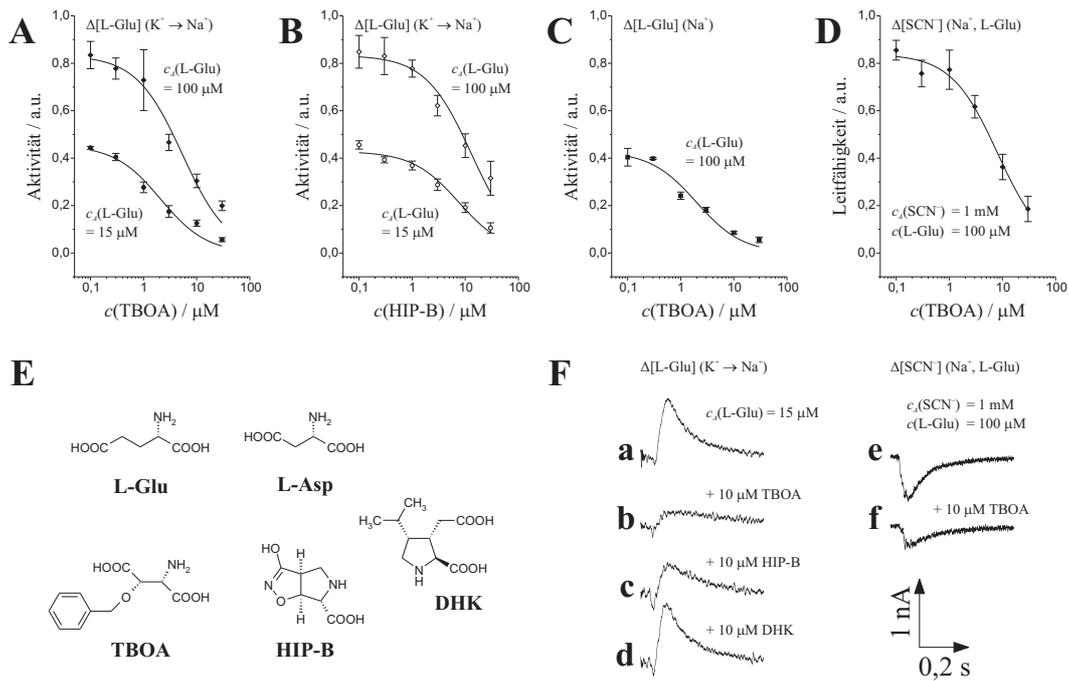


Abbildung 5.8: Inhibitionsexperimente mit dem EAAC1. Die Diagramme A bis D zeigen die Abhängigkeiten der Aktivität und der Leitfähigkeit von der Konzentration des jeweils eingesetzte Inhibitors. Dargestellt ist das Verhältnis der Signalamplituden, die sich ohne und mit Inhibitor ergaben. Der Inhibitor war bei jedem Experiment in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vorhanden, und seine Konzentration wurde von 0,1 bis 30 μM variiert. Als Messsequenzen wurden einfache und doppelte Lösungswechsel mit Phosphatpuffern (120 mM Natriumphosphatpuffer in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung und bei doppelten Lösungswechseln 120 mM Kaliumphosphatpuffer in der Ruhelösung) angewendet. In A wurden doppelte Lösungswechsel durchgeführt und der Inhibitor TBOA eingesetzt. Die Aktivierung erfolgte mit 100 μM (\diamond) oder 15 μM (\circ) L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. Bei der Aktivierung mit 15 μM L-Glutamat (\bullet) wurde ein HEPES-Buffer (Bedingungen siehe Abb. 5.1 A) mit 140 mM NaCl in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung und 140 mM KCl in der Ruhelösung verwendet. In B wurden doppelte Lösungswechsel durchgeführt und der Inhibitor HIP-B eingesetzt. Die Aktivierung erfolgte mit 100 μM (\diamond) oder 15 μM (\circ) L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. In C wurden einfache Lösungswechsel ohne Kaliumruhelösung durchgeführt und der Inhibitor TBOA eingesetzt. Die Aktivierung erfolgte mit 100 μM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. In D wurden Thiocyanatsprünge mit einfachen Lösungswechsel durchgeführt und der Inhibitor TBOA eingesetzt. Es lag zusätzlich 100 μM L-Glutamat in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vor. In der aktivierenden Lösung war 1 mM Thiocyanat vorhanden. In E sind die chemischen Strukturen der Substrate L-Glutamat (L-Glu), L-Aspartat (L-Asp) sowie der Inhibitoren TBOA, HIP-B und DHK (DHK ist nur spezifisch für den glialen Glutamatransporter GLUT-1) dargestellt. F zeigt zeitaufgelöste transiente Messströme, die auszugsweise eine Inhibitionsmessung mit den in E gezeigten Inhibitoren darstellt. Die Messströme wurden durch doppelte Lösungswechsel erhalten. Die Aktivierung erfolgte mit 15 μM L-Glutamat. In F.a ist kein Inhibitor vorhanden. Nachfolgend wurden jeweils 10 μM der Inhibitoren TBOA (F.b), HIP-B (F.c) und DHK (F.d) wie in A und B angewendet. F.e und F.f zeigen einfache Lösungswechsel mit 100 μM L-Glutamat in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung. In F.f war zusätzlich 10 μM TBOA in beiden Lösungen vorhanden. In der aktivierenden Lösung wurde in beiden Fällen 1 mM NaSCN eingesetzt.

Inhibition des Transportstroms mit TBOA und HIP-B: Die in Abb. 5.8 A und B dargestellten Kurven wurden aus Experimenten erhalten, bei denen die Aktivierung mit 15 μM oder 100 μM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung durchgeführt wurde. In Abb. 5.8 A wurde der Inhibitor TBOA eingesetzt. Bei der Aktivierung mit 15 μM L-Glutamat wurde dabei abweichend ein HEPES-Puffer unter den Bedingungen wie in Abb. 5.1 A verwendet. Bei den Experimenten in Abb. 5.8 B kam der Inhibitor HIP-B zum Einsatz. Zur Annäherung an die Datenpunkte wurde eine Funktion verwendet, die ein kompetitives Bindungsmodell beschreibt. Die jeweils verwendete Substratkonzentration von L-Glutamat in der aktivierenden Lösung und die Halbsättigungskonstante $K_{0,5} = 20 \mu\text{M}$ wurden dabei als feste Werte vorgegeben. Die resultierenden Inhibitionskonstanten K_i und die daraus berechnete Halbinhibitionskonstante IC_{50} sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Die Inhibitionskonstanten für TBOA lagen alle nahe an Eins. Für HIP-B konnte aus den zwei Kurven eine Inhibitionskonstante von 4,3 (bei Aktivierung mit 15 μM L-Glutamat) bzw. 2,2 (bei Aktivierung mit 100 μM L-Glutamat) bestimmt werden.

Inhibition des Transportstroms (kaliumfrei) mit TBOA: Die Messpunkte in Abb. 5.8 C wurden durch einfache Lösungswechsel in kaliumfreier Umgebung erhalten. Die Aktivierung erfolgte mit 100 μM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. Zur Annäherung an die Datenpunkte wurde eine Funktion verwendet, die ein kompetitives Bindungsmodell beschreibt. Die verwendete Substratkonzentration von L-Glutamat in der aktivierenden Lösung und die Halbsättigungskonstante $K_{0,5} = 120 \mu\text{M}$ wurden dabei als feste Werte vorgegeben. Die resultierende Inhibitionskonstante betrug $K_i = (1,2 \pm 0,3) \mu\text{M}$ und die daraus berechnete Halbinhibitionskonstante war $\text{IC}_{50} = (2,1 \pm 0,6) \mu\text{M}$ (siehe auch Tabelle 5.1).

Inhibition der Anionenleitfähigkeit mit TBOA: Die Abhängigkeit der Signalamplitudenverhältnisse von der Konzentration des Inhibitors TBOA für Konzentrations-sprünge mit 1 mM Thiocyanat ist in Abb. 5.8 D gezeigt. Dabei wurden einfache Lösungswechsel mit 100 μM L-Glutamat in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung durchgeführt. Die Datenpunkte des Inhibitionsexperiments wurden mit einer Funktion für ein kompetitives Bindungsmodell angenähert. Die verwendete Substratkonzentration von L-Glutamat und die Halbsättigungskonstante $K_{0,5} = 20 \mu\text{M}$ wurden dabei fest vorgegeben. Dadurch ergab sich eine Inhibitionskonstante von $K_i = 1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$, die derjenigen entspricht, die bei Experimenten, die mit L-Glutamatsprüngen durchgeführt wurden, bestimmt werden konnte. Der IC_{50} lag bei $(8 \pm 1) \mu\text{M}$ (siehe auch Tabelle 5.1).

Inhibitor	Abb. 5.8	Modus	Substrat	$K_i / \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} / \mu\text{M}$
TBOA	A (●)	Transport	15 μM L-Glu	$1,1 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,5$
TBOA	A (◆)	Transport	100 μM L-Glu	$0,9 \pm 0,2$	$5,4 \pm 1,2$
HIP-B	B (○)	Transport	15 μM L-Glu	$4,3 \pm 0,3$	$7,5 \pm 1,4$
HIP-B	B (◇)	Transport	100 μM L-Glu	$2,2 \pm 0,3$	$13,2 \pm 2,4$
TBOA	C	Transport ($\emptyset \text{K}^+$)	100 μM L-Glu	$1,2 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,6$
TBOA	D	Leitfähigkeit	1 mM NaSCN	$1,3 \pm 0,2$	8 ± 1

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Annäherung mit einem kompetitiven Bindungsmodell.

In Abb. 5.8 E sind die chemischen Strukturen der Substrate L-Glutamat (L-Glu) und L-

Aspartat (L-Asp) sowie der Inhibitoren TBOA, HIP-B und DHK dargestellt. Der Einfluss dieser Substanzen auf ein Signal, das durch einen doppelten Lösungswechsel mit Phosphatpuffer und $15 \mu\text{M}$ L-Glutamat in der aktivierenden Lösung hervorgerufen wurde, ist in Abb. 5.8 F.a bis F.d gezeigt. In F.a ist der zeitaufgelöste transiente Messstrom dargestellt, der ohne Inhibitor in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung aufgezeichnet wurde (Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{KP}_i \rightarrow \text{NaP}_i)$). Die Messströme in F.b bis F.d wurden mit der Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{KP}_i \rightarrow \text{NaP}_i, \text{I})$ (I: Inhibitor) aufgezeichnet. Es waren jeweils $10 \mu\text{M}$ TBOA (F.b), HIP-B (F.c) oder DHK (F.d) in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vorhanden. Der jeweils beobachtete Signalarückgang entsprach für TBOA und HIP-B den Messdaten, die nach Abb. 5.8 A und B für eine Inhibitorkonzentration von $10 \mu\text{M}$ zu erwarten waren. Die Substanz HIP-B wies im Gegensatz zu TBOA auch einen Inhibitionseffekt auf, wenn die Aktivierung mit sättigenden L-Glutamatkonzentrationen von 1 mM erfolgte (nicht gezeigt). Wurde die Substanz DHK verwendet, war erwartungsgemäß kein Inhibitionseffekt vorhanden. Bei den transienten Messströmen in Abb. 5.8 F.e und F.f handelt es sich um thiocyanatinduzierte Messströme, die durch einfache Lösungswechsel mit Natriumphosphatpuffer und $100 \mu\text{M}$ L-Glutamat in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung hervorgerufen wurden. In der aktivierenden Lösung wurde 1 mM Natriumthiocyanat eingesetzt. In F.e war kein Inhibitor anwesend, wohingegen in F.f $10 \mu\text{M}$ der Substanz TBOA in den Messpuffern vorhanden war (Sequenz $\Delta[\text{SCN}^-] (\text{NaP}_i, \text{I})$). Entsprechend dem Experiment in Abb. 5.8 D wies die, mit dem Inhibitor TBOA erhaltene Messung eine Reduzierung der negativen Signalamplitude um mehr als die Hälfte auf.

Die Inhibitionswirkung war für alle verwendeten Inhibitoren vollständig reversibel, so dass mit einem Sensor eine vollständige Inhibitionskurve aufgenommen werden konnte. Weitere Inhibitionsexperimente (nicht gezeigt) wurden mit dem Chloridkanalblocker Diisothiocyanostilbene Disulphonsäure (DIDS) durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss auf ein Messsignal untersucht, das eine negative Komponente im Signalverlauf aufwies und durch L-Glutamataktivierung mit einfachen Lösungswechseln (HEPES-Puffer und NaCl in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung) erhalten wurde. Die Substanz DIDS wurde zu beiden Messlösungen hinzugefügt, wobei Konzentrationen bis zu $100 \mu\text{M}$ keine Veränderung der Signalform bewirkten. Desweiteren wurde der Inhibitor HIP-B in einer Messsequenz verwendet, bei der durch einfache Lösungswechsel thiocyanatinduzierte Signalformen auftreten (siehe Abb. 5.8 F.e). $30 \mu\text{M}$ HIP-B in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung, in denen zusätzlich 1 mM L-Glutamat vorhanden war, verursachten keine Änderung der Signalform.

5.1.2 Diskussion der Ergebnisse mit dem EAAC1

Der rekombinant exprimierte EAAC1 lag in Membranfragmenten vor, die aus einer kultivierten CHO-Zelllinie präpariert wurden. Diese Membranfragmente wurden auf Sensoren mit festkörperunterstützter Membran angelagert. Bei der Durchführung von schnellen Lösungswechseln mit L-Glutamat in der aktivierenden Lösung wurden Messströme beobachtet, die eine positive Richtung aufwiesen. Dieses Phänomen entspricht dem Transport von positiver Ladung in Richtung der Sensoroberfläche. Die Messströme wurden nur in der Anwesenheit von Natriumionen in den Messlösungen erhalten, wodurch auf die Anwesenheit eines natriumgekoppelten Transportvorgangs geschlossen werden konnte. Die Inhibierbarkeit mit spezifischen Inhibitoren und die Durchführung von Kontrollmessungen

gen mit Membranfragmenten, die keinen EAAC1 enthielten, erbrachten den Beweis, dass es sich bei den Messströmen um Signale handelt, die durch den EAAC1 in den Membranfragmenten hervorgerufen werden, und dass keine Querempfindlichkeit hinsichtlich der Aktivierung von endogenen Membranproteinen in den CHO-Zytoplasmamembranen vorliegt. Es folgt ebenfalls, dass der EAAC1 aus der rekombinanten Expression und der anschließenden Membranpräparation in funktionaler Form hervorging und in der vorliegenden Aufreinigungsstufe für die Charakterisierung an festkörperunterstützten Membranen eingesetzt werden konnte. Die Stromrichtung ist konform mit der Stöchiometrie des EAAC1, dessen Transportzyklus vollständig reversibel ist. Das Substrat kann deshalb in beide Richtungen transportieren werden [92] Dadurch sollte unabhängig von der Orientierung der CHO-Membranfragmente an der Sensoroberfläche ein positiver Transportstrom auftreten. Dabei werden zwei positive Ladungen über die Membran verschoben. Da die Zufuhr des Substrats L-Glutamat durch einen schnellen Lösungswechsel an der Außenseite der adsorbierten Membranfragmente erfolgt, findet der Transport zur Sensoroberfläche hin statt. Mit der Definition aus Kapitel 1.2.4 sollte dieser Vorgang einen positiven Messstrom erzeugen. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus dem vorigen Abschnitt in Hinblick auf die molekularkinetischen Eigenschaften des EAAC1 und die vorliegende Situation an der festkörperunterstützten Membran diskutiert.

Etablierung des Kaliumgradienten

In Abb. 5.3 wurde der Einfluss von Kaliumionen auf die Signalamplitude bei Aktivierung mit $100 \mu\text{M}$ L-Glutamat vorgestellt. Dabei erfolgte ein Wechsel von einer Situation, in der der Sensor zwischen den Messungen in einer Kaliumruhelösung vorlag (doppelte Lösungswechsel), zu einer Situation, in der die Lösungen kaliumfrei waren und der Sensor zwischen den Messungen in der natriumhaltigen nicht-aktivierenden Lösung ruhte (einfache Lösungswechsel). Die Signale, die in verschiedenen Abständen nach dem beschriebenen Wechsel durchgeführt wurden, wiesen eine kleiner werdende Signalamplitude auf. Das zeitliche Verhalten des Signalarückgangs zeigte ein biphasisches Verhalten (Summe von zwei Exponentialfunktionen), was im ersten Ansatz als das Auftreten zweier Phänomene oder Ereignisse interpretiert werden kann, die ein unterschiedliches Zeitverhalten aufweisen. Im Anschluss an dieses Experiment wurde der Wechsel zur kaliumfreien Umgebung rückgängig gemacht und eine zweite Kurve in der Anwesenheit von Kaliumionen aufgezeichnet, wodurch eine Erholung der Signalamplitude erzielt (auf ca. 80 % der Ausgangsamplitude) wurde. Das Verhalten dieser Kurve war ebenfalls biphasisch und wies nahezu die gleichen Zeitkonstanten auf, die sich bei dem Experiment ohne Kaliumionen ergaben. Daraus kann geschlossen werden, dass die hier beobachteten Mechanismen reversibel sein müssen. Die Abnahme der Amplitude in der Abwesenheit der Kaliumruhelösung könnte durch den kaliumgekoppelten Transportvorgang des EAAC1 erklärt werden. Der EAAC1 transportiert dabei die verbliebenen Kaliumionen aus dem Kompartiment, das durch die Membranfragmente eingeschlossen wird, wenn er mit L-Glutamat aktiviert wird. Dieses Modell erklärt allerdings nicht die Erholung der Signalamplitude, die auftritt, wenn wieder externe Kaliumionen zur Verfügung gestellt werden. Da dem EAAC1 bei der Aktivierung das L-Glutamat an der Membranaußenseite in kaliumfreier Lösung² zur Verfügung gestellt wird, kann er unter diesen Bedingungen keine Kaliumionen in das Kompartiment transportieren. Des Weiteren ist es unklar, ob die Wechselzahl bzw. die Menge des vorhandenen EAAC1 in den CHO-Membranfragmenten ausreichend ist, um in

²Die nicht-aktivierende und die aktivierende Lösung enthielten keine Kaliumionen.

der vorliegenden Gesamtaktivierungszeit von ca. 30 s pro Kurve den vorliegenden Signalarückgang zu verursachen. Wegen des symmetrischen Verhaltens der abfallenden und der ansteigenden Kurve erscheint es wahrscheinlicher, dass die gleichen Prozesse für die Verlaufsformen verantwortlich sind. Das könnten z.B. passive Transportsysteme in den CHO-Plasmamembranen sein. Da das physiologische Membranpotential durch die Inaktivität der primär aktiven Transportsysteme (es ist kein ATP vorhanden) nicht aufrecht erhalten werden kann, könnten passive Transportsysteme einen Aus- bzw. Einstrom der Kaliumionen zulassen. Da die genaue Topologie an der Sensoroberfläche unbekannt ist, kann es zudem nicht ausgeschlossen werden, dass einige Membranfragmente nur partielle Kompartimente umschließen und an anderer Stelle einen direkten Zugang zur Außenlösung aufweisen. In diesem Fall könnten die Kaliumionen durch freie Diffusion aus dem Kompartiment entweichen. Das Vorhandensein von passiven Transportsystemen zusammen mit unvollständig adsorbierten Membranfragmenten liefert eine hypothetische Erklärung für das Vorhandensein von zwei unabhängigen Prozessen bzw. Populationen und für die Symmetrie der Zeitkonstanten. Andererseits kann unabhängig von dem verantwortlichen Mechanismen geschlussfolgert werden, dass die Inkubation in einem kaliumhaltigen Puffer zu einer Aufladung der Kompartimente mit Kaliumionen führt. Der Gradient, der sich beim Austausch der kaliumhaltigen Lösung mit einer kaliumfreien Lösung bildet, kann für einen Zeitraum von ca. einer Minute als stabil angesehen werden. Bei doppelten Lösungswechseln erfolgte die Aktivierung mit L-Glutamat ca. 1 s nachdem die Kaliumruhelösung durch eine natriumhaltige Lösung verdrängt wurde. In dieser Zeitspanne kann demnach ein Signal erhalten werden, das durch den vorhandenen Kaliumgradienten bestimmt wird. Diese Tatsache wird durch das Auftreten einer veränderten Signalform bei der Durchführung von einfachen Lösungswechseln, nach längerer Abwesenheit der Kaliumruhelösung bestätigt. An festkörperunterstützten Membranen sind demnach komplexe Lösungsaustauschprotokolle mit asymmetrischen Substratkonzentrationen möglich.

Vergleich mit Literaturwerten

Die grundlegende Charakterisierung der erhaltenen Messströme erfolgte mit doppelten Lösungswechseln in Anwesenheit eines Kaliumgradienten. Es wurden Konzentrationsabhängigkeiten der Signalamplitude für die Substrate L-Glutamat, L-Aspartat und das Kosubstrat Natrium bestimmt. Dabei ergaben sich Halbsättigungskonstanten von 20 μM für L-Glutamat, 5 μM für L-Aspartat und 33 mM für Natriumionen (Abb. 5.1). Diese Werte befinden sich in guter Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur. In Patch-Clamp-Experimenten mit EAAC1-transfizierten HEK-Zellen (HEK: *Human embryonic kidney*) wurde die Halbsättigungskonstante der vorstationären Signalamplituden (Photolyseexperimente mit caged-L-Glutamat) für L-Glutamat zu 20 μM bestimmt [28, 92]. Die stationären Halbsättigungskonstanten für L-Glutamat waren in Einklang mit radioaktiven Aufnahmemessungen vier mal kleiner (5,1 μM) [28, 92], und für D-Aspartat wurde ein Wert von 1,2 μM angegeben [27, 92]. Bei Messungen von EAAC1 in Froschoozyten wurden Halbsättigungswerte der stationären Stromanteile von 15-24 μM für L-Glutamat [15] und 10 μM für L-Aspartat [5] angegeben. Für Natriumionen wurden Halbsättigungskonstanten von 13-18 mM [5] bzw. 35-50 mM bestimmt [15]. Die Natriumbindung verhielt sich dabei kooperativ (Hillkoeffizient zwischen 1 und 2). Bei einigen der Werte fließen Abhängigkeiten vom eingestellten Membranpotential ein. In besonders guter Übereinstimmung befinden sich die hier durchgeführten Messungen mit den Werten, die aus den vorstationären Signalamplituden bei Photolyseexperimenten erhalten wurden. Das dort beobachtete Verhältnis von der L-Glutamataffinität zu der Aspartataffinität von 4 konnte

ebenfalls bestätigt werden. Bei den Messungen mit Natriumionen ergaben sich ebenfalls Werte, die in der Größenordnung der Literaturangaben lagen, und es lag ein kooperatives Bindungsverhalten (Hillkoeffizient von 1,6) vor. Insgesamt bestätigt der Vergleich mit den Literaturwerten, dass es sich in den CHO-Membranfragmenten um den funktionalen EAAC1 handelt, der für die Erzeugung der transienten Messströme verantwortlich ist. Aus den hier erhaltenen Messdaten kann zusätzlich geschlussfolgert werden, dass bei der Anlagerung der Membranfragmente primär eine RSO-Situation (RSO: *Right-side out*) an der Sensoroberfläche entsteht, weil die hier erhaltenen Werte mit den Literaturdaten für die Extrazellulärseite des EAAC1 übereinstimmen. Die apparente Bindungskonstante für L-Glutamat an der Intrazellulärseite des Proteins ist für den Transport in umgekehrter Richtung um einen Faktor 50 größer als auf der Extrazellulärseite [92]. Solch hohe Halbsättigungskonstanten wurden an festkörperunterstützten Membranen nicht erhalten. Es gab ebenfalls kein Anzeichen für das Vorhandensein von zwei verschiedenen Populationen, die sich durch das Vorhandensein der Summe aus zwei Abhängigkeiten mit unterschiedlichen apparenten Bindungskonstanten in einer Substratabhängigkeit auswirken würde.

Einfluss des Kaliumgradienten

Mit angelegtem Kaliumgradient (Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{KP}_i \rightarrow \text{NaP}_i)$) war die Halbsättigungskonstante für L-Glutamat $K_{0,5} = 24 \mu\text{M}$. Dieser Wert änderte sich, wenn der Kaliumgradient nicht mehr angelegt wurde (Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{NaP}_i)$), und vergrößerte sich um einen Faktor von 6 auf ca. $144 \mu\text{M}$. Neben dieser Tatsache konnte eine Veränderung der Signalform beobachtet werden. Ohne Kaliumgradient wurde die Signalamplitude kleiner, und der sonst biphasische Abklingstrom wies nur noch eine Phase auf. Die Signalform in Anwesenheit eines Kaliumgradienten besaß eine schnelle und eine langsame Phase, von denen die langsamere nicht mehr vorhanden war, wenn keine Kaliumionen zu Verfügung gestellt wurden. Aus den Abhängigkeiten der Zeitkonstanten von der Glutamatkonzentration, die für beide Fälle vorliegen, wird ersichtlich, dass die schnelle Zeitkonstante konserviert ist. Sie weist allerdings eine Modifikation hinsichtlich der apparenten Geschwindigkeitskonstanten auf, die man erhält, wenn die Abhängigkeiten mit einem entsprechenden kinetischen Modell angenähert werden.

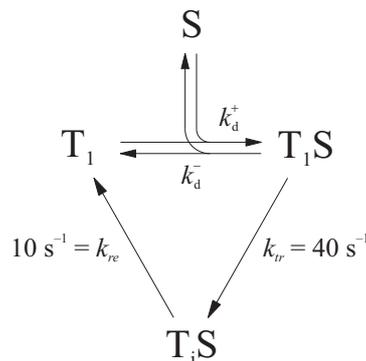


Abbildung 5.9: Einfaches Transportmodell für den EAAC1

Verwendet man ein Modell, das eine schnelle Bindung sämtlicher Substrate voraussetzt, so erhält man in monoexponentieller Form die apparente Geschwindigkeitskonstante als Exponent, die sich aus der Summe der Konstanten für die Hin- und die Rückreaktion

zusammensetzt (siehe Kapitel 3.2.1). Hinsichtlich der Abhängigkeiten der Zeitkonstanten ergaben sich in beiden Fällen (mit und ohne Kaliumgradient) ähnliche Kurven, die sich in einem Punkt unterschieden. Die Kurve für die Zeitkonstanten, die aus der Abhängigkeit ohne Kaliumgradient erhalten wurde, ergab eine um den Faktor 4 kleinere Geschwindigkeitskonstante für die Relokation, wohingegen die anderen Parameter nahezu konstant blieben. Da die Relokation die kleinste Geschwindigkeit aufweist, ist sie der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Transportzyklus. Eine Verringerung dieser Geschwindigkeitskonstanten ist somit direkt mit der Verkleinerung der Wechselzahl des Proteins verbunden. Des Weiteren kann aus der Abwesenheit der zweiten, langsameren Phase in dem Signal, das ohne Kaliumgradient aufgenommen wurde, geschlossen werden, dass in dieser Situation keine oder zumindest eine verminderte stationäre Komponente in dem Proteinstrom vorhanden ist. Durch die kapazitive Kopplung mit der festkörperunterstützten Membran werden die stationären Anteile im Proteinstrom in Form von langsamen Phasen im Messstrom sichtbar. Wenn diese Phase fehlt, ist der stationäre Anteil entweder sehr klein oder gar nicht vorhanden, so wie es z.B. in einer *Single-Turnover*-Situation der Fall ist. Die Abwesenheit der langsamen Phase ist konform mit der vorher diskutierten verkleinerten Geschwindigkeitskonstanten für die geschwindigkeitsbestimmende Relokation. Der EAAC1 weist also, einhergehend mit einer geringeren Affinität für das Substrat L-Glutamat, eine geringere Wechselzahl auf, wenn keine Kaliumionen für die Relokation vorhanden sind. Die Möglichkeit, dass der EAAC1 nur einen einzelnen Transportzyklus durchführt und danach stehen bleibt (*Single-Turnover*), ist dabei nicht ausgeschlossen, weil der Fehler der Geschwindigkeitskonstanten für die Relokation in der Größenordnung des Wertes selbst liegt. D.h., die Annäherung der Kurve mit einer Relokationskonstanten, die Null beträgt, liefert eine Anpassung der Funktion an die Datenpunkte, die genauso gut ist. Dass bei der Verringerung der Relokationsrate keine negative Komponente in dem Signalverlauf auftritt, wie es bei anderen aktiven Transportproteinen beobachtet werden konnte [64, 65], kann dadurch erklärt werden, dass die Systemzeitkonstante des Ersatzschaltbildes relativ hoch ist und dass die elektrogenen Schritte im Transportzyklus eine Potentialabhängigkeit aufweisen. Eine genauere Erläuterung dazu wird in den nächsten Abschnitten erfolgen.

Einfluss von Anionen auf den Transportstrom

Die Anwesenheit von Anionen bewirkt bei der Durchführung von einfachen Lösungswechseln das Auftreten einer zusätzlichen negativen Komponente im Signalverlauf. Dieses Phänomen kann durch zwei verschiedene Ansätze mit der gleichen Grundlage erklärt werden. Liegen keine permeablen Anionen in den Messlösungen vor, so ist das Signal durch die kapazitive Kopplung an die festkörperunterstützte Membran und über die Selbstbeeinflussung durch den Aufbau des Membranpotentials bestimmt. Der durch die L-Glutamatbindung auftretende anionenleitfähige Zustand kann in diesem Fall vernachlässigt werden, weil kein Anion vorhanden ist, das durch die Membran wandert. Kommt nun ein permeierendes Anion hinzu, erhöht sich mit der Bindung des L-Glutamats an den Transporter die Leitfähigkeit der Membran für das Anion, und es kommt zu einem Fluss entlang des elektrochemischen Gradienten (siehe Kapitel 1.2.2). Dieser Gradient wird entweder durch das Konzentrationsgefälle bestimmt, wenn sich das Anion zuerst nur an der Außenseite der Membranfragmente befindet (siehe Abb. 5.5 A), oder er wird durch das elektrische Feld dominiert, wenn das Innere des Kompartiments bereits Anionen aufweist, aber durch den Transportvorgang des EAAC1 mit positiver Ladung angereichert wird. Das heißt, dass sich der elektrochemische Gradient als treibende Kraft des Anionenflusses

auch bei symmetrischen Anionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran ausgebildet. Unabhängig vom Ursprung des elektrochemischen Gradienten findet ein Einstrom von Anionen in das Kompartiment statt, der sich als negativer Messstrom auswirkt, weil negative Ladung in Richtung der festkörperunterstützten Membran befördert wird. Die Summe aus dem positiven Transportstrom und dem negativen Anionenstrom ergibt dann das beobachtete Signal. Andererseits kann die Erhöhung der Leitfähigkeit der Membran als Änderung der entsprechenden Komponenten im Ersatzschaltbild des Systems aufgefasst werden (siehe Kapitel 1.3.3). Betroffen ist dabei der Widerstand R_v , der einen direkten Einfluss auf die Systemzeitkonstante τ_{sys} aufweist. Die mit der Verringerung des Widerstands R_v einhergehende Verringerung der Systemzeitkonstanten erzeugte bei simulierten Proteinströmen das Auftreten einer negativen Signalkomponente (siehe Abb. 3.10 C). Die simulierte Abhängigkeit des Signals von dem Membranwiderstand R_v ergab bei stetiger Verringerung eine Reduzierung der Signalamplitude, die für kleine Werte gegen Null ging. Die negative Signalkomponente durchlief dabei ein Maximum und ging danach ebenfalls gegen Null. Ein sehr ähnliches Verhalten konnte bei L-glutamatinduzierten Messströmen mit variierenden Konzentrationen des permeierenden Anions Thiocyanat im Hintergrund beobachtet werden (siehe Abb. 5.5 B). Die negative Komponente wurde zuerst mit zunehmender Thiocyanatkonzentration größer und nahm ab einer bestimmten Konzentration zusammen mit der Signalamplitude ab, bis nahezu kein Signal mehr im Messstrom vorhanden war. Beide Interpretationen erklären die Beobachtung, dass bei hohen Anionenkonzentrationen eine Kompensation des Transportstromes durch den Einstrom der Anionen bzw. die Erhöhung der Membranleitfähigkeit eintrat, die jeweils einen Kurzschluss des Messstromes darstellen. Der anionenleitfähige Zustand des EAAC1 ist wie der Transportvorgang an die Anwesenheit von Natriumionen gekoppelt. Allerdings weist der EAAC1 keine Anionenleitfähigkeit auf, wenn Natrium- durch Lithiumionen ersetzt werden, wohingegen der L-Glutamattransport unter dieser Bedingung stattfindet [5]. Analog dazu konnte bei einem einfachen Lösungswechsel, bei dem Lithiumchlorid in den Messlösungen vorhanden war, ein positives Signal beobachtet werden, das keine negative Komponente enthielt. War anstelle von Lithiumchlorid die gleiche Menge Natriumchlorid vorhanden, trat die negative Komponente im Signalverlauf auf. Auch die im folgenden Abschnitt diskutierten anioneninduzierten Messströme traten nicht auf, wenn anstelle von Natrium- Lithiumionen verwendet wurden. Es kann also zusammengefasst gesagt werden, dass die negative Komponente auf die Anwesenheit von permeierenden Anionen und die Anionenleitfähigkeit des EAAC1 zurückzuführen ist. Die negative Komponente im Signalverlauf wird demnach nicht durch eine Modifikation des Transportzyklus hervorgerufen, sondern durch die Änderung der Membranleitfähigkeit, die eine direkte Auswirkung auf die Systemzeitkonstante des Messsystems aufweist. Dabei ist es wahrscheinlich, dass kein Potential über die Membran aufgebaut wird und der resultierende Messstrom dadurch frei von der Potentialabhängigkeit der elektrogenen Schritte im Transportzyklus ist.

Anioneninduzierte Messströme

Zur Beschreibung der Anionenleitfähigkeit des EAAC1 wurde ein Modell vorgeschlagen, das auf dem in Kapitel 3.2.1 vorgestellten 3-Zustandsmodell (siehe Kapitel 3.2.1) basiert [92]. Als Modifikation finden zwei weitere schnelle Übergänge von den Transporterzuständen T_1 und T_1S zu den jeweilig anionenleitfähigen Zuständen T_c und T_cS statt [91, 28, 27, 6] (siehe Abb. 5.10). Der Zustand T_c stellt dabei die substratunabhängige Leitfähigkeit dar, wohingegen der Zustand T_cS nur dann auftritt, wenn das Substrat an den Transporter gebunden hat (substratinduzierte Leitfähigkeit). Weil die Anionenleitfähigkeit nur in An-

wesenheit von Natriumionen und der Transport auch in Anwesenheit von Lithiumionen durchgeführt wird, konnte ausgeschlossen werden, dass der anionenleitfähige Zustand T_cS und der substratgebundene Zustand T_1S identisch sind [5]. Da die Übergänge als schnell angenommen wurden, stellt sich ein Vorgleichgewicht zwischen allen Zuständen ein, bei der der leitfähige Zustand T_cS , die gleiche Abhängigkeit von der Substratkonzentration aufweist wie der Zustand T_1S , der das Substrat zur anderen Membranseite transloziert. Wenn dies der Fall ist, dann sollten die Messströme, die bei der substratinduzierten Anionenleitfähigkeit auftreten, die gleiche Abhängigkeit von der L-Glutamatkonzentration aufweisen wie der Transportstrom. Tatsächlich lag der Wert der Halbsättigungskonstanten für L-Glutamat bei der Anwendung von Thiocyanatsprüngen, mit einem Wert von $31 \mu\text{M}$ (siehe Abb. 5.6 B) sehr nahe an der Halbsättigungskonstanten von $24 \mu\text{M}$, die für den L-Glutamattransport aus der Signalamplitude erhalten wurde. Die Substratabhängigkeit mit dem permeierenden Anion Thiocyanat ergab eine Halbsättigungskonstante von ca. 6 mM , wenn die Datenpunkte mit einer Michaelis-Menten-Kinetik angenähert wurden.

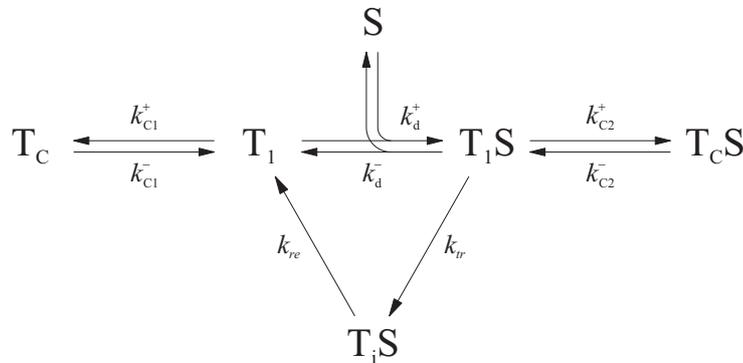


Abbildung 5.10: Modell zur Anionenleitfähigkeit des EAAC1

Eine Besonderheit bei den erhaltenen Messsignalen war die Tatsache, dass die transienten Ströme bei unterschiedlichen Thiocyanatkonzentrationen keine Überschneidungspunkte aufwiesen. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei dem Anioneneinstrom um ein sehr schnelles Ereignis handelt. Geht man von einem Modell aus, das eine schnelle Bindung und einen schnellen Übergang zurück in den Ausgangszustand beschreibt ($An^- + T_cS \rightleftharpoons T_cSAn^- \rightarrow T_cS$), dann ergibt sich ein Proteinstrom, der keine vorstationären Zustände aufweist und direkt dem Lösungswechsel folgt. In dieser Situation ergibt sich für den Proteinstrom eine Funktion, die durch Gl. 5.1 gegeben ist, wenn der Konzentrationsanstieg nach Gl. 3.19 erfolgt. Dabei sind α die Dielektrizitätskonstante des schnellen Übergangs $T_cSAn^- \rightarrow T_cS$ mit der Geschwindigkeitskonstanten k , und K ist die Dissoziationskonstante der Anionenbindung. Eine Simulation des Messstromes, bei der Gl. 5.1 mit dem vereinfachten Ersatzschaltbild (Gln. 3.59 bis 3.61) gefaltet wurde, ist in Abb. 5.11 dargestellt. Die Signalamplitude geht nach einer Michaelis-Menten-Kinetik in die Sättigung. Die Abhängigkeit der Zeitkonstanten von der Thiocyanatkonzentration ist mit einem solchen Modell nur schwer zu beschreiben, weil der Proteinstrom selbst keine abklingende Komponente aufweist und durch die Faltung mit dem Ersatzschaltbild und dem zeitlich abhängigen Konzentrationsanstieg eine analytisch nicht lösbare Funktion entsteht. Grenzwertig kann jedoch bestimmt werden, dass die abfallende Signalkomponente für Konzentrationen, die groß gegenüber der Halbsättigungskonstanten sind, mit der Systemzeitkonstanten des Ersatzschaltbildes (siehe Kapitel 3.58) abfällt. Für die re-

ziproken Zeitkonstanten, die aus den transienten Messströmen bestimmt wurden, ergab die Annäherung mit einer hyperbolischen Funktion, dass sie bei ca. 33 s^{-1} in die Sättigung geht, wodurch sich eine Zeitkonstante von 30 ms ergibt. Dies ist ein Wert, der durchaus in der Größenordnung der Systemzeitkonstanten liegen kann. Bei Kapazitätswerten von $C_v = C_m = 10 \text{ nF}$ würde der Membranwiderstand R_v dann einen Wert von $1,5 \text{ M}\Omega$ aufweisen. Die aus der hyperbolischen Fitfunktion erhaltene Halbwertskonstante und der Grenzwert für kleine Thiocyanatkonzentrationen können nicht interpretiert werden. Die Geschwindigkeitskonstante des schnellen Übergangs, der auf die Bindung folgt ($\text{T}_c\text{SAn}^- \rightarrow \text{T}_c\text{S}$), kann ebenfalls nicht bestimmt werden, weil sie zusammen mit der Gesamtzahl der Transporter als Proportionalitätsfaktor in die Gleichung eingeht. Da die genaue Anzahl der Transportmoleküle auf der Sensoroberfläche unbekannt ist, ist die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten aus dem Messstrom nicht möglich. Wegen der Schnelligkeit des Anionentransports kann der Messstrom als Aufladung der Kompartimente betrachtet werden, die von den CHO-Membranfragmenten abgetrennt werden. Dieses Verhalten spricht durchaus für die Eigenschaften eines Kanals, bei dem die Bindung einer schnellen, selektiven Aufnahme der Anionen entspricht und der schnelle Übergang in den Ausgangszustand auf die Abgabe der Anionen auf der Innenseite der Membranfragmente zurückzuführen ist.

$$i_p = e \cdot N_T \cdot \alpha \cdot k \cdot \frac{c(\text{S})}{K + c(\text{S})} \cdot \frac{t^n}{t^n + \frac{K}{K+c(\text{S})} \cdot \tau^n} \quad (5.1)$$

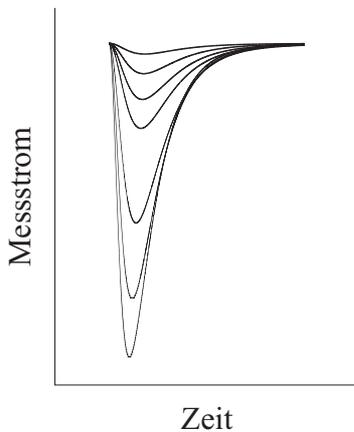


Abbildung 5.11: Simulation der substratinduzierten Leitfähigkeit. Die dargestellten transienten Messströme wurden durch Faltung des Proteinstroms nach Gl. 5.1 mit dem vereinfachten Ersatzschaltbild (Gln. 3.59 bis 3.61) erhalten und beschreiben eine Konzentrationsabhängigkeit. Als Parameter wurden $K = 2,2 \text{ mM}$, $\tau = 50 \text{ ms}$ und $n = 2$ eingesetzt. Der Term $e \cdot N_T \cdot \alpha \cdot k$ wurde arbiträr angegeben, und als Substratkonzentrationen $c(\text{S})$ wurden Werte von 0,3, 0,6, 1, 3, 6 und 10 mM eingesetzt.

Für die Abhängigkeit der anioneninduzierten Messströme von der Natriumionenkonzentration ergab sich eine Halbsättigungskonstante von 153 mM. Der Vorgang der Natriumbindung ging dabei mit einer hohen Kooperativität (Hillkoeffizient $h = 3,4$) einher. Dieses Phänomen steht im Kontrast zu den aus der Natriumabhängigkeit des Transportvorgangs gewonnenen Daten von $K_{0,5} = 33 \text{ mM}$ und $h = 1,6$ (siehe Abb. 5.1). Allerdings führt eine Annäherung der vorliegenden Natriumkonzentrationsabhängigkeit mit einer Hillfunktion, bei der der Hillkoeffizient fest auf 1,6 eingestellt wird, zu einer sehr ähnlichen Kurve. Der Halbsättigungswert $K_{0,5}$ liegt dann bei ca. 500 mM. Wenn die Übergänge von Natriumbindung, Glutamatbindung und der Übergang in den anionenleitfähigen Zustand schnell sind, dann sollte sich für die Natriumabhängigkeit der Anionenleitfähigkeit ein ähnlicher Wert ergeben wie für den Transport. Das sollte auch der Fall sein, wenn die Ausgangssituation unterschiedlich ist, denn im Gegensatz zu den Experimenten im Transportmodus, bei denen der Transporter nach der Bindung von L-Glutamat noch zwei Natriumionen binden muss bevor er transloziert, liegt der Transporter bei den Experimenten im anio-

nenleitfähigen Zustand vollständig mit L-Glutamat und drei Natriumionen beladen vor. Andererseits weist die Anionenleitfähigkeit eine striktere Abhängigkeit von Natriumionen auf, als es beim Transport der Fall ist, der auch durchgeführt wird, wenn Lithiumionen anwesend ist. Das spricht für die Existenz eines unabhängigen Mechanismus, der in den anionenleitfähigen Zustand führt und eine andere Abhängigkeit von der Natriumionenkonzentration aufweist, als der Übergang in den substratbeladenen Transporter T₁S.

Andere Substrate des EAAC1

Wie bereits erwähnt, wurden Messungen mit dem EAAC1 durchgeführt, bei denen Lithium- anstelle von Natriumionen in den Messlösungen verwendet wurden. Bei der Aktivierung mit 1 mM L-Glutamat ergab sich eine fünffach reduzierte Signalamplitude, wenn die nicht-aktivierende und die aktivierende Lösung 140 mM LiCl anstatt NaCl aufwies (doppelte Lösungswechsel mit kaliumhaltiger Ruhelösung). Die verschobene Ladung war dabei geringfügiger reduziert. In Anwesenheit von Lithiumionen betrug die Ladung 67 % der Ladung, die bei der Anwesenheit von Natriumionen als Fläche unter dem Signalverlauf auftrat. Bei der Verwendung von Anionen, die permeabel für den EAAC1 sind wurde keine negative Komponente bei der Aktivierung mit L-Glutamat beobachtet, wenn das Anion in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vorlag. Ebenso konnten keine thiocyanatinduzierten Messströme hervorgerufen werden, wenn anstelle von Lithium- Natriumionen in den Messpuffern vorhanden waren. Dieses Verhalten ist auf eine striktere Abhängigkeit der Anionenleitfähigkeit von Natriumionen zurückzuführen, wobei ein alternativer Bindungsmechanismus in Betracht gezogen werden muss (siehe voriger Abschnitt). Lag anstelle von L-Glutamat das Enantiomer D-Glutamat in der aktivierenden Lösung vor, so führte die Messsequenz $\Delta[\text{D-Glu}]$ (Na^+ , SCN^-) zwar zu positiven Transportströmen (mit verringerter Signalamplitude im Vergleich zu L-Glutamat), es trat allerdings keine negative Komponente in dem Signalverlauf auf. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Substratbindung mit dem Auftreten der substratinduzierten Anionenleitfähigkeit gekoppelt ist. Diese Tatsache konnte durch die Verwendung der gleichen Messsequenz mit dem Inhibitor TBOA in der aktivierenden Lösung bestätigt werden. Dabei trat mit wenigen pA nur ein sehr kleines positives Signal im Messstrom auf. Da TBOA nur an den EAAC1 bindet (kompetitive Inhibition) und nicht transportiert wird, hätte bei einer bindingsinduzierten Anionenleitfähigkeit ein Anioneneinstrom stattfinden müssen. Der Übergang in den anionenleitfähigen Zustand ist also von der auf die Substratbindung folgenden Bindung weiterer Natriumionen abhängig, die nicht durch Lithiumionen ersetzt werden können. Des Weiteren zeigt das Experiment mit TBOA, dass die Bindung von TBOA die Aufnahme weiterer Natriumionen verhindert, da sonst ein Übergang in den anionenleitfähigen Zustand möglich sein müsste.

Für das ebenfalls transportierte Aminosäureanion L-Aspartat ergab sich bei sättigenden Konzentrationen eine um die Hälfte verringerte Amplitude gegenüber Messungen, die mit L-Glutamat durchgeführt wurden. Dabei kamen doppelte Lösungswechsel zur Anwendung, bei denen ein Kaliumgradient angelegt wurde, und keine permeierenden Anionen in den Messlösungen vorhanden waren. Das Integral über die Signalform war ebenfalls um die Hälfte reduziert. Die Analyse der Signalform ergab, dass neben der Amplitude auch die langsamere Phase des biphasischen Abklingverhaltens gegenüber Messungen mit L-Glutamat reduziert war. Diese zwei Faktoren können als Reduktion der vorstationären Signalamplitude und des erreichten stationären Anteils interpretiert werden. Die einzige Größe, die einen Einfluss auf beide Größen aufweist, ist die Geschwindigkeitskonstante der

Translokation (k_{tr}). Nach Gleichung 3.41 ergibt sich aus der Halbierung der Wechselzahl eine erhebliche Verkleinerung der Translokationsrate. Daraus folgt rechnerisch eine, um den gleichen Faktor kleinere Signalamplitude. Im Fall von L-Aspartat ist die Amplitude der langsamen Abklingkomponente um ca. zwei Drittel reduziert, wenn man sie mit L-glutamatinduzierten Messströmen vergleicht. Die Tatsache, dass das Integral gegenüber dem Glutamattransport geringer ist, resultiert ebenfalls den dargestellten Gegebenheiten, obwohl hinsichtlich der Stöchiometrie des EAAC1 bei dem Transport von L-Aspartat die gleiche Nettoladung über die Membran transportiert wird.

Einfluss des pH-Wertes

Der pH-Wert wies bei doppelten Lösungswechseln in der Form $\Delta[\text{L-Glu}]$ ($\text{KCl} \rightarrow \text{NaCl}$) sowohl im sauren als auch im basischen Bereich eine inhibierende Wirkung auf die Transportströme auf (siehe Abb. 5.1 B). Wenn der pH-Wert in allen drei Lösungen gleich war, lag das pH-Optimum bei pH 7,5, und bei pH 5 war keine Aktivität des EAAC1 zu beobachten. Wurde dahingegen der pH-Wert nur in der Ruhelösung geändert, dann wies die pH-Wert-Abhängigkeit zwar eine ähnliche Form auf, aber es war über den gesamten pH-Wertebereich eine Proteinaktivität vorhanden. In diesem Fall entstand durch den Wechsel von der Ruhelösung zur nicht-aktivierenden Lösung ein Protonengradient über die Membran. Für die beobachteten Transportströme kann nur der pH-Wert an der Außenseite der CHO-Membranfragmente verantwortlich sein, weil dort der pH-Wert zum Zeitpunkt der Aktivierung mit L-Glutamat konstant bei pH 7,5 lag. Das Aktivitätsmaximum trat auf, wenn sich der pH-Wert der Ruhelösung im neutralen Bereich befand und der resultierende Protonengradient nahezu Null bzw. sehr klein war. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass sich ebenso wie bei der Etablierung des Kaliumgradienten ein Protonengradient über die Membran aufbauen lässt, wenn doppelte Lösungswechsel angewendet werden. Hinsichtlich der Optimierung der Messbedingungen wirkte sich mit dem verwendeten Messsystem ein Protonengradient nicht positiv auf die erhaltene Messströme aus, sondern ging mit der Reduzierung der Signalamplitude einher. Die optimale Situation lag vor, wenn Messungen ohne Protonengradient im neutralen pH-Bereich durchgeführt wurden. Zur molekularkinetischen Interpretation des Einflusses des pH-Wertes muss zusätzlich die Abhängigkeit der substratinduzierten Anionenleitfähigkeit betrachtet werden (siehe Abb. 5.6 D). Die thiocyanatinduzierten Messströme in der Anwesenheit von Natriumionen und L-Glutamat wiesen im Bereich zwischen pH 6,5 und pH 8,5 keine Abhängigkeit vom pH-Wert auf. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der glutamatinduzierte Übergang in den anionenleitfähigen Zustand über den gesamten pH-Wertebereich unverändert stattfindet, was die Bindung von L-Glutamat- und Natriumionen voraussetzt. Die beobachtete Aktivität des Transportvorgangs war im sauren Bereich stark verringert gegenüber dem Maximum bei pH 7,4. Das war in verringertem Ausmaß auch der Fall, wenn die Extrazellulärseite des EAAC1 (Bei RSO-Orientierung die Außenseite der Membranfragmente) einem konstanten pH-Wert ausgesetzt wurde und der pH-Wert nur auf der Intrazellulärseite (bei RSO-Orientierung die Innenseite der Membranfragmente) geändert wurde. Wenn die Bindung des L-Glutamat unbeeinflusst bleibt, kann diese Tatsache nur auf eine Änderung der Translokationsrate zurückgeführt werden. Ein solcher Einfluss wurde bislang nicht untersucht. Watzke et. al. beobachteten bei der Änderung des extrazellulären pH-Wertes eine pH-Unabhängigkeit des Transportstroms, wenn sättigende L-Glutamatkonzentrationen eingesetzt wurden [93, 92]. Die Intrazellulärseite wurde dabei auf einen konstanten pH-Wert eingestellt. Aus der vorstationären Kinetik des EAAC1, die mit Photolyseexperimenten untersucht wurde, konnte die Un-

abhängigkeit der Signalanstiegszeit (Transportstrom) vom pH-Wert gezeigt werden, die durch die schnellen vorstationären Bindungen gegeben ist. Die hier durchgeführten Messungen zeigen deutlich einen Einfluss des internen pH-Wertes auf den Transportvorgang auf, wobei die extrazellulären Substratbindungen ebenfalls unbeeinträchtigt bleiben. Der Protonentransportschritt im Transportzyklus des EAAC1 kann bei neutralem pH nicht ratenlimitierend sein.

Inhibition

Zum Nachweis, dass die vorliegenden Messströme auf den EAAC1 zurückzuführen waren, erfolgten Inhibitionsmessungen mit dem Inhibitor TBOA, der als Substratanalogen an den Transporter bindet und nicht transportiert wird. Die Inhibitionswirkung war erfolgreich. In verschiedenen Experimenten, bei denen die Aktivierung des EAAC1 mit einer konstanten L-Glutamatkonzentration von 15 μM oder 100 μM durchgeführt wurde, konnte die Inhibitionskonstante K_i der kompetitiven Inhibition zu ca. 1 μM bestimmt werden. Dieser Wert liegt in guter Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur [92]. Ein Wert in der gleichen Größenordnung ergab sich bei der Inhibition der L-glutamatinduzierten Anionenleitfähigkeit. Da der leitfähige Zustand des EAAC1 davon abhängt, dass L-Glutamat sowie die nachfolgenden Natriumionen an den Transporter gebunden sind, kann davon ausgegangen werden, dass mit der Bindung von TBOA auch die Bindung von weiteren Natriumionen verhindert wird. Des Weiteren erfolgen Inhibitionsversuche mit Dihydrokainat (DHK) und DIDS, die beide nicht spezifisch für den EAAC1 sind. Der Inhibitor DHK ist ein Inhibitor des glialen Glutamattransporters GLT-1 und wurde analog zu TBOA angewendet. Er verursachte keinerlei Inhibition der beobachteten Messströme, was zur Erhärtung der Tatsache beitrug, dass hier der neuronale Glutamattransporter EAAC1 vorlag. Der Chloridkanalblocker DIDS wurde angewendet, um die negative Komponente, die bei Glutamatinduzierung mit einfachen Lösungswechseln auftrat, auf Inhibierbarkeit zu testen. Da die negative Komponente im Signalverlauf auch in Anwesenheit von DIDS vorhanden war, konnte eine Beteiligung von endogenen, passiven Chloridtransportsystemen in den CHO-Membranfragmenten ausgeschlossen werden. Weitere Inhibitionsmessungen wurden mit der Substanz HIP-B durchgeführt. HIP-B wurde bislang nur an Synaptomen getestet, die aus dem Kortex von Rattenhirnen präpariert wurden [24]. Dabei konnte durch radioaktive Aufnahmemessungen eine nicht-kompetitive Inhibitionswirkung festgestellt werden. In Synaptosomen sind normalerweise alle Glutamattransportersubtypen (gliale und neuronale) enthalten. Hier konnte gezeigt werden, dass diese Substanz eine spezifische Inhibition des EAAC1 hervorruft. Gegenüber dem Inhibitor TBOA konnte bei der Verwendung von HIP-B eine Inhibitionswirkung festgestellt werden, die nicht durch ein kompetitives Bindungsmodell beschrieben werden kann. HIP-B wies auch bei niedrigen Konzentrationen eine Inhibitionswirkung auf, wenn die Aktivierung mit sättigenden L-Glutamatkonzentrationen von 1 mM erfolgte. Des Weiteren ergab die Annäherung der Inhibitionskurven (siehe 5.8 A) mit einer Gleichung für die kompetitive Inhibition unterschiedliche Inhibitionskonstanten, wenn die L-Glutamatkonzentration geändert wurde (15 μM und 100 μM). Der Wert der Halbinhibitionskonzentration IC_{50} ergab in beiden Fällen ebenfalls unterschiedliche Werte, die sich um einen Faktor von zwei unterschieden. Im Gegensatz zu der Substanz TBOA, die in der Lage ist, den anionenleitfähigen Zustand zu blockieren, bewirkte HIP-B keine Verminderung der thiocyanatinduzierten Ströme, wenn L-Glutamat in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vorlag. Diese Punkte sprechen dafür, dass HIP-B nicht alternativ zu L-Glutamat an die gleiche Bindungsstelle bindet, sondern dass die Inhibitionswirkung

einem anderen Mechanismus zugeschrieben werden muss. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die L-glutamatinduzierte Anionenleitfähigkeit mit HIP-B nicht inhibierbar war. Wie zuvor erläutert wurde, setzt der Übergang in den leitfähigen Zustand die L-Glutamat- und die Natriumbindung voraus und könnte nicht auftreten, wenn HIP-B alternativ zu L-Glutamat an den Transporter bindet und wie TBOA eine weitere Aufnahme von Natriumionen verhindert.

Berücksichtigung der physiologischen Situation an der Synapse

Nach der neurogenen Stimulation von glutamatergen Synapsen liegt eine hohe Konzentration von Glutamatmolekülen im synaptischen Spalt vor, die ca. 1 bis 3 mM beträgt. Die Aufgabe der Glutamattransporter ist es, inneralb kurzer Zeit nahezu die gesamte Menge an Glutamat aus dem Spalt zu entfernen. Durch den Glutamattransport in die Neuronen und angrenzende Gliazellen muss ein Konzentrationswert erreichen werden, der unterhalb der Aktivitätsgrenze der postneuronalen Glutamatrezeptoren liegt (kleiner als 3 μM [55]). Die Expressionsdichte der Transportproteine ist in den betreffenden Bereichen wegen der im Vergleich zu Kanälen relativ geringen Transportrate sehr hoch, damit die Glutamataufnahme entsprechend schnell erfolgen kann. Da der Transport von L-Glutamat in die Zellen mit einer Ladungsverschiebung verbunden ist, kommt es zu einer signifikanten Änderung des Membranpotentials. Die Existenz der L-glutamatinduzierten Anionenleitfähigkeit erscheint dahingehend sinnvoll, weil der glutamatinduzierte Anionenfluss dem Potential entgegenwirkt. Im Extrazellulärraum ist die Chloridkonzentration normalerweise 20 mal größer als im Zytoplasma, so dass eine Situation vorliegt, in der bei der Glutamataufnahme der Anionenfluß in Richtung des Glutamattransports stattfinden kann.

Für die Bilanz der freien Enthalpie nach Gl. 1.16 lässt sich mit der Stöchiometrie des Glutamattransports schreiben:

$$\frac{c(\text{L-Glu}_{int}^-)}{c(\text{L-Glu}_{ext}^-)} < \left(\frac{c(\text{Na}_{ext}^+)}{c(\text{Na}_{int}^+)} \right)^3 \cdot \frac{c(\text{K}_{int}^+)}{c(\text{K}_{ext}^+)} \cdot 10^{\text{pH}_{int} - \text{pH}_{ext}} \cdot e^{-\frac{2 \cdot F \cdot \Delta\phi}{R \cdot T}} \quad (5.2)$$

Mit den in Kapitel 1.2.2 angegebenen Werten ergibt sich daraus, dass durch die thermodynamischen Potentiale der vorhandenen Gradienten von Natrium- und Kaliumionen eine intrazelluläre L-Glutamatkonzentration, die maximal um einen Faktor $3 \cdot 10^6$ größer ist als die extrazelluläre Konzentration, aufrecht erhalten werden kann. Diese Aussage gilt allerdings nur unter Gleichgewichtsbedingungen. Findet ein spontaner Transport von Ladungsträgern in das Zellinnere statt, so wird das System zuerst aus dem Gleichgewicht gebracht, bevor es sich durch zelleigene Regelmechanismen wieder einstellt. Das Ungleichgewicht wird dabei durch eine Erhöhung des Membranpotentials bestimmt. Innerhalb kurzer Zeit könnte somit die notwendige Aufnahme von L-Glutamat zum Erliegen kommen, oder das Potential könnte die Größe eines Aktionspotentials erreichen und für eine weitere Ausschüttung von L-Glutamat in den synaptischen Spalt sorgen.

5.2 Der Natrium-Protonen-Austauscher NhaA

Der Natrium-Protonen-Austauscher transportiert pro Zyklus ein Natriumion gegen zwei Protonen. Der resultierende Ladungsfluss von einer Nettoladung über die Membran stellt die Grundlage der Elektrogenizität des Transportvorgangs dar. Die hier vorgestellten Daten mit dem NhaA erfolgten durch Messungen von Natrium-Konzentrationsprüngen mit schnellen Lösungswechseln an festkörperunterstützten Membranen. Der NhaA lag rekonstituiert in Liposomen vor, die vor der Messung an der festkörperunterstützten Membran angelagert wurden. Als Messsequenzen kamen ausschließlich einfache Lösungswechsel (z.B. $\Delta[\text{Na}^+]$ (pH 8,5)) zur Anwendung. Der Messpuffer bestand, soweit nicht anders angegeben, aus 25 mM HEPES, 25 mM Tris, 50 mM KCl und 6 mM MgCl_2 . Ein Natriumionensprung wurde mit der gleichen Konzentration eines inerten Kations (Kalium oder Cholin in der Salzform KCl oder ChCl) in der nicht-aktivierenden Lösung ausgeglichen. Die in den nächsten Abschnitten vorgestellten Daten wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIK in Frankfurt erstellt und interpretiert. Sie wurden auszugsweise zusammen mit weiteren Daten in [105] veröffentlicht.

5.2.1 Messungen mit dem NhaA

Eine zusammenfassende Übersicht der durchgeführten Messungen, die das Verhalten des NhaA bei verschiedenen Bedingungen charakterisieren, zeigt Abb. 5.12. In A ist der zeitaufgelöste Messstrom dargestellt, der mit dem Messsystem (SURFE²R) unter Anwendung eines einfachen Lösungswechsels (3 mM Natriumchloridsprung) aufgezeichnet wurde. Die zwei Kurven (A.a und A.b) unterscheiden sich nur durch den pH-Wert der Messlösungen. Die Messung A.a wurde bei einem pH-Wert von 7,0 aufgenommen, und für Messung A.b. wurde eine Messlösung mit pH 8,5 eingesetzt. Es war ein deutlicher Aktivitätsanstieg gegenüber einer neutralen Messlösung (pH 7,0 oder niedriger) zu beobachten, wenn der NhaA einer alkalischen Umgebung ausgesetzt wurde.

pH-Wertabhängigkeit

Das Aktivitätsprofil in Abhängigkeit vom pH-Wert ist in Abb. 5.12 B dargestellt. Als Grundpuffer wurde eine Lösung mit 10 mM Zitronensäure, 10 mM HEPES, 10 mM CHES und 5 mM MgCl_2 verwendet, um eine ausreichende Pufferwirkung über den gesamten untersuchten pH-Wertbereich (pH 6,5 bis pH 11,0) zu erzielen. Die zur Aktivierung eingesetzte Natriumchloridkonzentration betrug dabei 100 mM. Um einen solch großen Salzsprung auszugleichen, ohne dass ein großes Polarisationsartefakt an der Sensoroberfläche auftritt, wurde eine insgesamt sehr hohe Hintergrundkonzentration an KCl eingesetzt. In der nicht-aktivierenden Lösung war die KCl-Konzentration 300 mM. In der aktivierenden Lösung wurde zu den bereits vorhandenen 100 mM NaCl soviel KCl hinzugefügt, dass sich eine Konzentration von 200 mM KCl einstellte. Die resultierende pH-Kurve stellt für verschiedene pH-Werte die erhaltenen Signalamplituden dar und weist eine Glockenform auf. Die pH-Werte der Messlösungen wurden direkt im Anschluss an ein Experiment mit einem pH-Meter überprüft. Das Maximum der Kurve liegt zwischen pH 8,0 und pH 9,0. Durch die Aktivierung mit der hohen Natriumionenkonzentration konnten auch bei neutralen bzw. leicht sauren pH-Werten Signale aufgezeichnet werden, die eindeutig der Aktivität des NhaA zuzuordnen waren, da sie sich deutlich gegenüber dem erhaltenen (kleinen) Polarisationsartefakt hervorhoben.

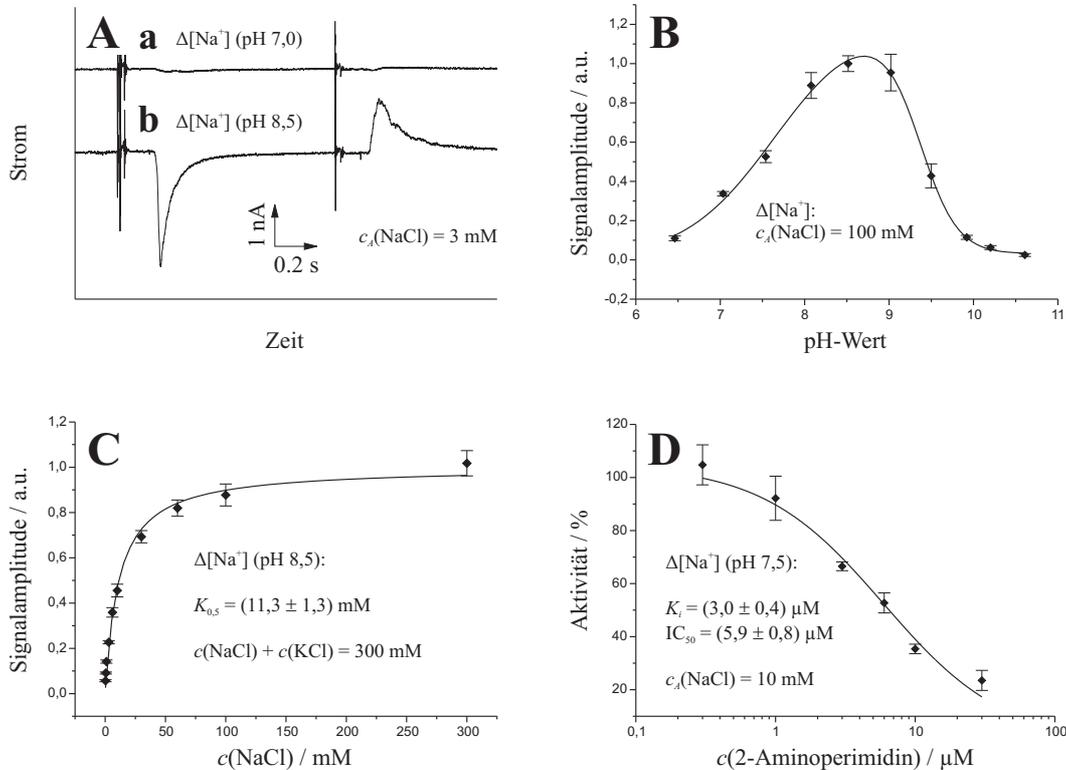


Abbildung 5.12: Messungen mit dem Natrium-Protonen-Austauscher NhaA. In A sind die zeitaufgelösten Messströme für einen Konzentrationsprung (schneller Lösungswechsel) mit 3 mM NaCl gezeigt. Bei A.a wurde der pH-Wert der Messpuffer auf pH 7,0 eingestellt, wohingegen bei A.b ein alkalischer pH-Wert von 8,5 vorlag. Die Pufferzusammensetzung war 25 mM HEPES, 25 mM Tris, 6 mM MgCl₂, 50 mM KCl. Die in der aktivierenden Lösung vorhandene NaCl-Konzentration wurde durch eine gleich große Konzentration KCl in der nicht-aktivierenden Lösung ausgeglichen. Der pH wurde mit KOH-Lösung titriert. B zeigt die pH-Wert-Abhängigkeit, die mit sättigenden Natrium-Konzentrationsprüngen von 100 mM aufgenommen wurde. Der Puffer enthielt 10 mM Zitronensäure, 10 mM HEPES, 10 mM CHES und 5 mM MgCl₂. In der nicht-aktivierenden Lösung waren 300 mM KCl, in der aktivierenden Lösung 200 mM KCl und 100 mM NaCl vorhanden. In C ist die Substratabhängigkeit für Natriumionen dargestellt. Der Puffer entspricht den Konditionen in A (pH 8,5) mit dem Unterschied, dass 300 mM KCl in der nicht-aktivierenden und (300 – x) mM KCl in der aktivierenden Lösung vorhanden waren (x ist die variierende Konzentration von NaCl in der aktivierenden Lösung). C zeigt die Inhibition der Transportaktivität mit variierenden Konzentrationen von 2-Aminoperimidin. Es lagen die gleichen Bedingungen wie in A vor mit dem Unterschied, dass 10 mM NaCl zur Aktivierung verwendet wurden (ausgeglichen mit zusätzlichen 10 mM KCl in der nicht-aktivierenden Lösung). Der Inhibitor lag sowohl in aktivierender als auch in nicht-aktivierender Lösung vor.

Substratabhängigkeit

Wenn ein Konzentrationsprung mit einem inerten Kation (z.B. Kalium oder Cholin) durchgeführt wurde, das sich anstelle von Natriumionen in der aktivierenden Lösung befand, trat kein transienter Messstrom auf. Mit steigender Natriumionenkonzentration erhöhte sich die Aktivität des Transportproteins und näherte sich, einer Michaelis-Menten-Kinetik folgend, einem Sättigungswert bei hohen Natriumionenkonzentrationen. Die Substratabhängigkeit der Signalamplitude von der Natriumionenkonzentration bei einem pH-Wert von 8,5 ist in dem Diagramm in Abb. 5.12 C aufgetragen. Das Substrat (Na^+) wurde von 0 bis 300 mM variiert. Die aus der Kinetik folgende Halbsättigungskonstante konnte zu $K_{0,5} = (11,3 \pm 1,3)$ mM bestimmt werden. Die Gesamtsalzkonzentration wurde bei den Experimenten zur Bestimmung der Substratabhängigkeit konstant auf 300 mM eingestellt. Zu den variierenden NaCl-Konzentrationen in der aktivierenden Lösung wurde dabei eine entsprechende Menge KCl hinzugefügt, so dass für jede Substratkonzentration die Bedingung $c(\text{NaCl}) + c(\text{KCl}) = 300$ mM erfüllt war. In der nicht-aktivierenden Lösung waren 300 mM KCl vorhanden.

Inhibition

Für die eukariotischen Natrium-Protonen-Austauscher existieren Inhibitoren in der Form von Guanidinderivaten. Ein bekanntes Beispiel dafür ist Amilorid, das z.B. als Zusatz in Diuretika (harntreibenden Wirkstoffen) verwendet wird, um durch Verringerung des Membranpotentials der Kaliumausscheidung entgegenzuwirken [23]. Der Hemmungsmechanismus wird auf die Ähnlichkeit der Guanidiningruppe zu einem hydrierten Natriumion zurückgeführt, wodurch es mit dem Natriumion um die Bindungsstelle konkurriert [59, 45]. Für den NhaA aus *E. coli* zeigen Amiloride allerdings keine Spezifität. Dibrov et. al. stellten 2005 die erste amiloridähnliche Substanz vor, die eine hemmende Wirkung auf die Aktivität des NhaA aufwies [14]. Es handelte sich dabei um die Substanz 2-Aminoperimidin, die ebenfalls eine Guanidiningruppe im Molekül trägt. In Abb. 5.12 ist eine Aktivitätsabhängigkeit von der Konzentration des 2-Aminoperimidin gezeigt. Als Maß für die Aktivität wurden die Signalamplituden der transienten Messströme herangezogen, die bei einem pH-Wert von 7,5 für eine variierende Konzentration von 2-Aminoperimidin auftraten. Der Bezugswert war die Signalamplitude vor der Inhibierung, die bei einem Lösungswechselexperiment ohne Inhibitor aufgezeichnet wurde. Die Aktivierung erfolgte für alle Messungen mit 10 mM NaCl in der aktivierenden Lösung. Die inhibierende Substanz war bei der Durchführung eines Experiments in der nicht-aktivierenden und in der aktivierenden Lösung vorhanden und wurde von 0 bis 30 μM variiert. Der Halbinhibitions-koeffizient IC_{50} betrug bei den gewählten Bedingungen $(5,9 \pm 0,8)$ μM . Wenn man bei der Substanz 2-Aminoperimidin von einem kompetitiven Inhibitor ausgeht, kann durch ein entsprechendes Modell eine Inhibitionskonstante $K_i = (3,0 \pm 0,4)$ μM berechnet werden. Das gezeigte Inhibitionsexperiment konnte nicht bei höheren pH-Werten durchgeführt werden, da bereits bei einem pH-Wert von 8,0 keine Inhibitionswirkung zu beobachten war. Die Inhibition bei pH 7,5 war vollständig reversibel, so dass mit einem Sensor eine vollständige Inhibitionskurve aufgezeichnet werden konnte.

Verhalten bei neutralem pH

Die bei neutralen pH-Werten für hohe Natriumkonzentrationen (Sequenz $\Delta[\text{Na}^+]$ (pH 7,0)) aufgetretenen Signale (siehe Abb. 5.12) waren Anlass für genauere Untersuchungen. Die

Grundlage dafür geht auf die Arbeit von Dirk Zuber vom MAX-PLANK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIK in Frankfurt zurück. Für die Charakterisierung bei neutralem pH und den späteren Vergleich mit den Ergebnissen, die bei einem alkalischen pH-Wert auftraten, wurden Proteoliposomen hergestellt, die den NhaA in verschiedenen Lipid zu Protein-Verhältnissen (LPR) beinhalteten. Die Lipidkonzentration der Liposomensuspension wurde dabei auf 10 mg/mL festgelegt. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen betragen 1 mg/mL und 0,02 mg/mL, so dass sich die zwei Verhältnisse LPR 10 (hoher Proteingehalt) und LPR 500 (niedriger Proteingehalt) bildeten. Die erzielten Proteindichten in der Membran wurden mit elektronenmikroskopischen Messungen nach der Gefrierbruchmethode bestätigt (siehe Kapitel 4.1.3). Mit beiden Präparationen wurden bei pH 7,0 Substratabhängigkeiten mit Natriumionen aufgenommen, die in Abb. 5.13 zusammengefasst sind. Die Messprozedur entsprach dabei hinsichtlich Pufferzusammensetzungen und Vorgehensweise der oben beschriebenen Substratabhängigkeit (siehe Abb. 5.12 C und 5.2.1).

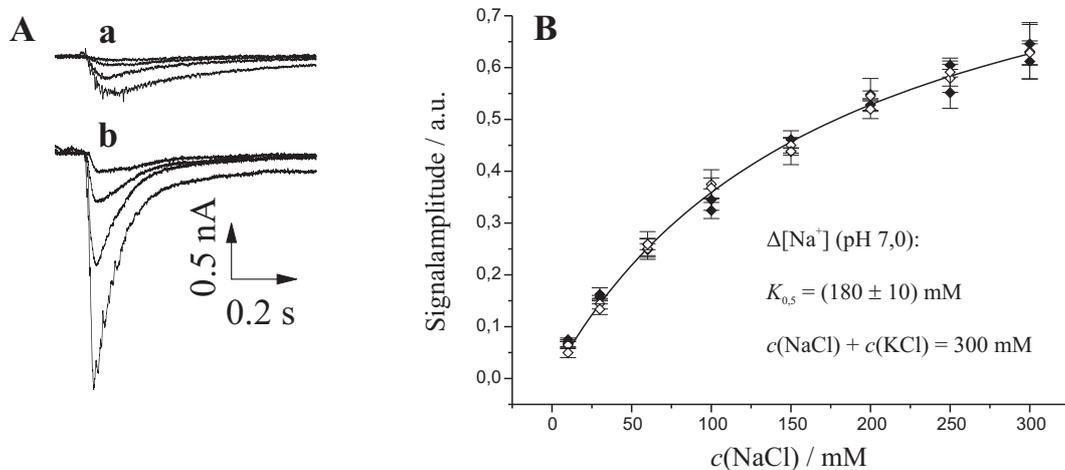


Abbildung 5.13: Verhalten des NhaA bei pH 7,0. A zeigt die zeitaufgelösten Messsignale, die durch Natriumkonzentrations sprünge (schnelle Lösungswechsel) mit 10, 30, 100 und 300 mM NaCl in der aktivierenden Lösung erhalten wurden. In A.a wurden Proteoliposomen mit einem LPR 500 verwendet, und in A.b entsprach die Proteinkonzentration einem LPR 10. Die Pufferzusammensetzung war für alle dargestellten Daten 25 mM HEPES, 25 mM Tris und 6 mM MgCl_2 . Der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 7,0 eingestellt. In der nicht-aktivierenden Lösung waren $(300 - x)$ mM KCl vorhanden (x ist die variierende Konzentration von NaCl in der aktivierenden Lösung). B zeigt die Abhängigkeit der Signalamplituden von der eingesetzten Natriumkonzentration $c(\text{NaCl}) = x$ mM. In dem Diagramm sind die Datenpunkte, die mit dem LPR 10 (\blacklozenge) und dem LPR 500 (\diamond) erhalten wurden gemeinsam dargestellt.

Auf der rechten Seite in Abb. 5.13 A sind die zeitaufgelösten transienten Messströme für die zwei verschiedenen Liposomenpräparationen abgebildet. Die obere Kurvenschar (a) stellt die Signale dar, die mit einem LPR 500 erzielt wurden. Die untere Kurvenschar (b) wurde mit dem LPR 10 aufgenommen. Hervorgerufen wurden die dargestellten Messströme durch einfache Lösungswechseln mit den Natriumionenkonzentrationen 10, 30, 100 und 300 mM in der aktivierenden Lösung. Aus dem direkten Vergleich der Signalamplituden der Kurven in A.a und A.b folgt, dass hier mit dem LPR 10 eine ca. 7-fach größere Amplitude erreicht wurde als mit dem LPR 500, wobei angemerkt werden muss, dass ein Vergleich von zwei verschiedenen Sensoren mit einem großen Fehler behaftet ist, weil die Menge der adsorbierten Liposomen variieren kann. Aus dem zeitlichen Verhalten des

abklingenden Transienten wird beim Vergleich der beiden LPR deutlich, dass die Signale bei Liposomen mit geringerem Proteingehalt (LPR 500) eine deutlich langsamere Kinetik im abfallenden Signalverlauf aufwiesen als diejenigen, die mit einem hohen Proteinanteil (LPR 10) erhalten wurden. Trotz dieser eindeutigen Unterschiede ist die aus den Signalamplituden erhaltene Abhängigkeit von der Substratkonzentration gleich. In Abb. 5.13 B sind die auf ihr Maximum normierten Signalamplituden aus mehreren Experimenten mit LPR 500- und LPR 10-Liposomen gezeigt. Die Daten, die mit dem LPR 10 erhalten wurden, werden darin durch geschlossene Rauten repräsentiert. Die offenen Rauten stellen die Messwerte dar, die mit dem LPR 500 erhalten wurden. Mit einer durch alle Datenpunkte gelegten Michaelis-Menten-Kinetik konnte die Halbsättigungskonstante $K_{0,5}$ für Natriumionen zu (180 ± 10) mM bestimmt werden.

Verhalten bei alkalischem pH

Die im vorigen Abschnitt erläuterten Messungen zur Natriumabhängigkeit des NhaA bei einem konstanten pH-Wert wurden mit den LPR 10- und LPR 500-Proteoliposomen für den alkalischen pH-Wert 8,5 in der gleichen Vorgehensweise durchgeführt. Analog zu der Zusammenfassung der Daten bei neutralem pH-Wert ist in Abb. 5.14 die Situation für pH 8,5 dargestellt.

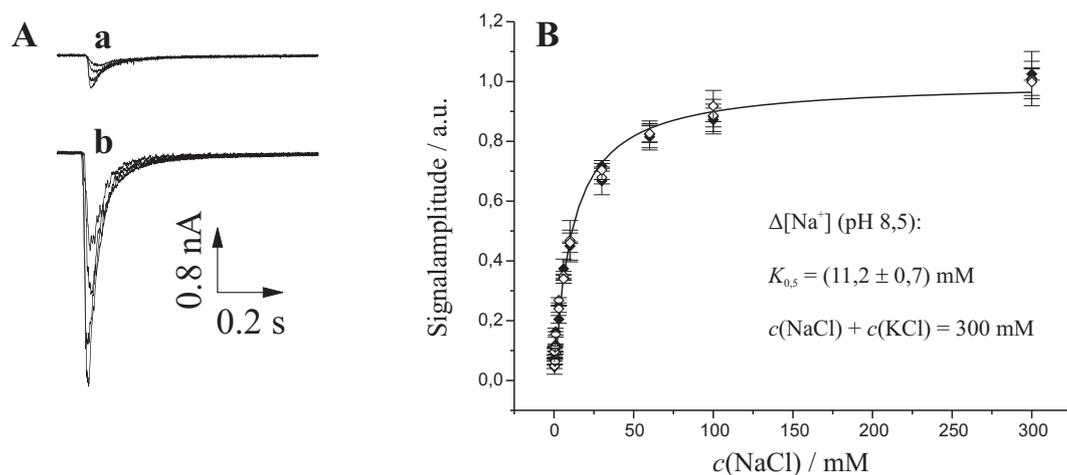


Abbildung 5.14: Verhalten des NhaA bei pH 8,5. A zeigt die zeitaufgelösten Messsignale, die durch Natriumkonzentrations sprünge (schnelle Lösungswechsel) mit 3, 10, 30 und 100 mM NaCl in der aktivierenden Lösung erhalten wurden. In A.a wurden Proteoliposomen mit einem LPR 500 verwendet, und in A.b entspricht die Proteinkonzentration einem LPR 10. Die Pufferzusammensetzung war für alle dargestellten Daten 25 mM HEPES, 25 mM Tris und 6 mM MgCl_2 . Der pH-Wert wurde mit KOH-Lösung auf pH 8,5 eingestellt. In der nicht-aktivierenden Lösung waren $(300 - x)$ mM KCl vorhanden (x ist die variierende Konzentration von NaCl in der aktivierenden Lösung). B zeigt die Abhängigkeit der Signalamplituden von der eingesetzten Natriumionenkonzentration $c(\text{NaCl}) = x$ mM. In dem Diagramm sind die Datenpunkte, die mit dem LPR 10 (\blacklozenge) und dem LPR 500 (\diamond) erhalten wurden gemeinsam dargestellt.

In Abb. 5.14 ist auf der linken Seite (A) der Signalverlauf der transienten Messströme für einfache Lösungswechsel zu sehen, die mit Konzentrationen von 3, 10, 30 und 100 mM Natriumionen in der aktivierenden Lösung durchgeführt wurden. In A.a ist analog zu Abb. 5.13 das Resultat für die Proteoliposomen mit einem LPR 500 gezeigt. Darunter (A.b)

sind die erhaltenen Messströme mit dem LPR 10 dargestellt. Ebenso wie bei einem neutralem pH-Wert ist das Verhältnis der Signalamplituden von LPR 10 zu LPR 500 ca. 7. Für die erhaltenen Signale bei einem pH-Wert von 8,5 wurde mit 16 Sensoren eine Statistik erhoben, bei der für jeweils 8 Sensoren, die entweder mit LPR 10- oder mit LPR 500-Liposomen beladen wurden, die Signalamplitude ausgewertet wurde. Die LPR 10-Sensoren wiesen dabei bei 10 mM Natriumionensprüngen eine mittlere Signalamplitude von $(3,2 \pm 2)$ nA auf. Für die LPR 500-Sensoren ergab sich ein Wert von $(0,2 \pm 0,1)$ nA. Das Verhältnis der Mittelwerte ergibt einen Wert von 17, um den die Signalamplitude der LPR 10-Sensoren größer war als die der Sensoren, auf denen LPR 500-Liposomen adsorbiert waren. Unter Berücksichtigung der großen Standardabweichung passt der aus Abb. 5.14 abgelesene Wert zu dem Ergebnis aus der erhobenen Statistik. Mit dem kinetischen Verhalten des abklingenden Transienten verhielt es sich ähnlich wie bei den Daten, die im vorigen Abschnitt gezeigt wurden. Der abfallende Messstrom nach Überschreitung des Maximums war bei einem LPR 500 langsamer als bei einem LPR 10. Die Abhängigkeit der Signalamplituden von der Natriumionenkonzentration, die in Abb. 5.14 B gezeigt ist, ist für beide LPR wiederum gleich. Die aus mehreren Experimenten erhaltenen Abhängigkeiten der Signalamplituden wurden auf ihr Maximum bei sättigenden Natriumionenkonzentrationen normiert und in das gezeigte Diagramm aufgenommen. Geschlossene Rauten stellen Messdaten von LPR 10-Proteoliposomen dar, und offene Rauten sind Datenpunkte, die mit dem LPR 500 erhalten wurden. Die Anpassung mit einer Michaelis-Menten-Kinetik durch alle Datenpunkte ergab eine Halbsättigungskonstante für Natriumionen von $(11,2 \pm 0,7)$ mM.

5.2.2 Diskussion der Ergebnisse mit dem NhaA

Der Natrium-Protonen-Austauscher liegt in nahezu vollständiger RSO-Orientierung (RSO: *Right-side out*) vor, wenn er in Liposomen rekonstituiert wird [105]. Daraus folgt, dass bei der Anwendung von Konzentrationssprüngen durch schnelle Lösungswechsel die Extrazellulärseite des Proteins verfügbar ist, wenn sich die RSO-Proteoliposomen an der festkörperunterstützten Membran angelagert haben. Unter physiologischen Bedingungen transportiert der NhaA Natriumionen ins Zelläußere, um externe Protonen zu akkumulieren. Bei den Experimenten an festkörperunterstützten Membranen wurden dem NhaA Natriumionen als Substrat angeboten ($\Delta[\text{Na}^+]$), wobei vor und nach der Aktivierung alle Puffer natriumfrei waren. Der aus dem Proteinstrom resultierende transiente Messstrom war negativ, was entsprechend der Definition (siehe 1.2.4) für einen Nettotransport einer positiven Ladungsmenge von der Sensoroberfläche weg³, also zur Außenseite der Liposomen, spricht. Zusammen mit der Stöchiometrie des NhaA folgt, dass die Ladungsbewegung entgegen der natürlichen Transportrichtung erfolgte und demnach durch das nach innen gerichtete elektrochemische Potential getrieben wurde, das durch die Konzentrationsdifferenz der Natriumionen über die Membran zustande kommt. Die Kinetik des NhaA muss also reversibel sein, da unter diesen Bedingungen elektrogene Ströme messbar waren. Die Untersuchungen des NhaA an festkörperunterstützten Membranen ermöglichten zum ersten Mal direkten experimentellen Zugang zur elektrogenen Aktivität des Proteins [64, 105]. Mit NhaA-spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAb) und der in Abschnitt 5.2.1 vorgestellten Substanz 2-Aminoperimidin konnten die erhaltenen Messströme an

³Eine analoges Ergebnis erhält man für den Transport von negativer Ladung zur Sensoroberfläche hin. Da die Substrate (Natriumionen und Protonen) des NhaA aber als Kationen vorliegen, muss die verschobene Nettoladung positiv sein.

festkörperunterstützten Membranen erfolgreich inhibiert werden [105]. Die spezifische Inhibition lieferte den Nachweis, dass die gemessenen transienten Messströme allein auf die Aktivität des NhaA zurückzuführen waren. Eine Querempfindlichkeit hinsichtlich der Spezifität gegenüber anderen Proteinen konnte ausgeschlossen werden, weil der NhaA als einziges Protein in dem rekonstituierten System (Proteoliposom) vorlag.

Eigenschaften des Transportvorgangs

Der NhaA weist bei alkalischem pH eine extrem hohe Wechszahl von ca. 1500 1/s ($9 \cdot 10^4$ 1/min) auf [87] und erzeugt an festkörperunterstützten Membranen einen relativ großen Messstrom. Diese Eigenschaften des Transporters legen es nahe, dass die vorstationäre Kinetik sehr schnell in einen stationären Zustand übergeht. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Transportzyklus weist im Regelfall eine Geschwindigkeitskonstante auf, die nahe an der Wechszahl liegt (siehe Kapitel 3.2.1). Da alle anderen Übergänge schneller sind als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sorgen sie für eine schnelle Relaxation in den stationären Zustand. Man kann deshalb davon ausgehen, dass sich der NhaA, bedingt durch die Substratzugabe, die bei einem schnellen Lösungswechsel gegenüber der Wechszahl relativ langsam ist, zu jedem Zeitpunkt im stationären Zustand befindet. Diese Behauptung wird von der Beobachtung gestützt, dass die abfallende Signalkomponente des Messstroms eine Abhängigkeit von der Proteindichte in der Liposomenmembran aufweist. Beginnt eine Population an Proteinmolekülen mit dem Transportvorgang, so findet ein Abbau der chemischen Potentialdifferenz über die Membran statt, die durch den Natriumgradienten zustande kommt. Das Innere der Liposomen wird dadurch mit Natriumionen angereichert, was bei einer großen Anzahl von Proteinen in der Liposomenmembran (LPR 10) zu einer schnellen Zeitkonstante des Ladevorganges der Membrankapazitäten (siehe Ersatzschaltbild in Kapitel 1.3.3 und 3.3) führt. Die Ladung der Membrankapazitäten entspricht aufgrund der hohen Wechszahl des Proteins dem Ladungszustand der Liposomen. Bei geringerer Proteindichte in der Liposomenmembran (LPR 500) ist der Ladestrom geringer, wodurch sich die Liposomen nur langsam aufladen. Aus den Abb. 5.13 A und 5.14 A geht direkt hervor, dass sich der abklingende Signalverlauf für die zwei verschiedenen Proteindichten (LPR 10 und LPR 500) deutlich unterscheidet. Bei einem Protein mit langsamerer vorstationärer Kinetik wäre hingegen zu erwarten, dass mit der Verringerung der Proteindichte keine Änderung der Signalform, sondern lediglich ein Rückgang der Signalamplitude einhergeht (siehe Kapitel 3.3.2). Bei dem NhaA mit einem LPR 10 (geringe Proteindichte) war die Zeitkonstante schneller als bei dem LPR 500 (niedrige Proteindichte). Das war sowohl bei einem pH-Wert von 7,0 als auch bei pH 8,5 der Fall. Daraus kann geschlossen werden, dass der NhaA sich ebenfalls bei neutralen pH-Werten sehr schnell im stationären Zustand befindet, obwohl die Wechszahl hier erheblich reduziert ist [87]. Daraus ergibt sich eine kinetische Situation, die schon bei der Diskussion der anioneninduzierten Messströme des EAAC1 betrachtet wurde. Der Messstrom wurde dabei durch den Aufladevorgang der Kompartimente (hier Liposomen) bestimmt, und es fanden keine Überschneidungen der transienten Messströme statt. Diese Tatsache wurde auch beim NhaA beobachtet.

Substratabhängigkeit

Der hier untersuchte Transport von Natriumionen und Protonen entspricht dem passiven Aufnahmemodus des NhaA. Da bislang keine Untersuchungen dieses Transportmodus vorliegen, kann kein direkter Vergleich mit Literaturdaten erfolgen. Die erhaltenen

Halbsättigungskonstanten bei verschiedenen pH-Werten stellen ein Maß für die Natriumbindung (Affinität) an die Extrazellulärseite des Transporters dar. Mit einem $K_{0,5}$ für Natriumionen von 11 mM bei pH 8,5 ist die apparente Affinität für Natriumionen an der Extrazellulärseite des Transporters um den Faktor 100 kleiner als an der Intrazellulärseite. Dort ergab sich für die protonengetriebene Natriumaufnahme bei pH 8,6 eine Halbsättigungskonstante von $K_{0,5} = 0,11$ mM [87]. Die Bindung von Natriumionen bei einem neutralen pH (pH 7,0) wurde bislang nicht untersucht, wodurch der hier an der Extrazellulärseite erhaltene Wert von $K_{0,5} = 178$ mM nicht mit der Intrazellulärseite verglichen werden kann. Beide Werte (bei pH 7,0 und pH 8,5) waren unabhängig von der Proteindichte in den Liposomenmembranen. Bei physiologischer Betrachtung macht eine niedrige Natriumionenaffinität auf der Extrazellulärseite Sinn, weil der NhaA unter natürlichen Bedingungen die Natriumionenkonzentration im Zytoplasma gering hält, um den inneren pH-Wert zu regulieren. Die niedrige Affinität spiegelt dabei eine große Dissoziationskonstante der extrazellulären Natriumbindungsreaktion wieder, wodurch das Gleichgewicht auf der Seite des freien Natriumions liegt. Die Natriumionen werden somit nach erfolgter Translokation schnell in das Periplasma abgegeben.

Einfluss des pH-Werts

Die Signalamplitude der Messströme bei variierendem pH-Wert und sättigenden Natriumionenkonzentrationen wies eine signifikante Abhängigkeit vom pH-Wert auf, die ihr Maximum bei einem basischen pH-Wert von pH 8,5 besaß. Die gemessenen Ströme waren 10 mal größer als bei einem sauren pH-Wert von 6,5. Dieses Verhalten ist auf der intrazellulären Seite wesentlich stärker ausgeprägt. Die Wechselzahl erhöht sich in der nativen Transportrichtung um den Faktor 1000, wenn der pH-Wert von 6,5 auf pH 8,5 erhöht wird [87]. Dabei trat ausschließlich eine Änderung der Wechselzahl auf. Der hier beobachtete Einfluss des pH-Wertes an der Extrazellulärseite des Proteins ging zusätzlich mit einer deutlichen Änderung der apparenten Affinität einher. Bei einem pH-Wert von 7,0 wurde für die Halbsättigungskonstante $K_{0,5}$ ein Wert von 178 mM erhalten. Dieser Wert wurde bei einem pH-Wert von 8,5 fast um einen Faktor 20 kleiner und betrug nur noch 11 mM. Diese große Diskrepanz konnte auf die transportkinetischen Eigenschaften des NhaA zurückgeführt werden, weil die bestimmten Halbsättigungskonstanten unabhängig von der Anzahl der vorhandenen Proteinen in der Membran waren (Messungen mit LPR 10 und LPR 500). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die Signalamplitude, bedingt durch die schnelle Aufladung der Liposomen mit Natriumionen bei pH 8,5 (hohe Wechselzahl), eher in die Sättigung geht und nur durch den Abbau des Membranpotentials bestimmt wird. Durch den Vergleich der Signalamplituden bei sättigenden Natriumionenkonzentrationen kann auf eine relative Änderung der Wechselzahl geschlossen werden, die sich von pH 7,0 bis pH 8,5 um den Faktor $2,4 \pm 0,2$ erhöht. Im passiven Aufnahmemodus des NhaA findet also in Abhängigkeit vom pH-Wertes eine Änderung der apparenten Affinität und der Wechselzahl statt. Mit steigendem pH nimmt die Halbsättigungskonstante $K_{0,5}$ ab, und die Wechselzahl erhöht sich. Dieses Phänomen kann nicht durch ein einfaches kinetisches Modell erklärt werden. Realistisch erscheint die Vermutung, dass der NhaA in Abhängigkeit vom pH-Wert eine Konformationsänderung durchführt, an der das pH-sensorische System beteiligt ist und die eine Änderung der Wechselzahl und der apparenten Affinität hervorruft. Ein solcher Vorgang wurde kürzlich in verschiedenen Veröffentlichungen diskutiert [25, 105, 39].

Inhibition

Die Inhibition des NhaA erfolgte mit der Substanz 2-Aminoperimidin, die eine Ähnlichkeit mit dem Wirkstoff Amilorid aufweist, der spezifisch für humane Natrium-Protonen-Austauscher ist. Bei einer Substratkonzentration von 10 mM Natriumionen wurde bei einem pH-Wert von 7,5 eine halbmaximale Inhibitionskonstante IC_{50} von ca. 6 μM erhalten. Da der untersuchte Transport im passiven Aufnahmemodus erfolgte, ist dieser Wert spezifisch für die Zugänglichkeit der Natriumbindungsstelle an der Extrazellulärseite des NhaA. Sie liegt dabei in relativ guter Übereinstimmung mit dem Wert, der an invertierten (ISO: Inside-Out) Membranvesikeln aus *E. coli* zu 1 μM bestimmt wurde [14]. Interessanterweise wies die Inhibitionswirkung bei den an festkörperunterstützten Membranen durchgeführten Messungen eine pH-Wert-Abhängigkeit auf. Bei pH-Werten oberhalb von 7,5 war mit Konzentrationen von 10 μM 2-Aminoperimidin keine Inhibitionswirkung zu beobachten (getestet wurde bei pH 8,0 und pH 8,5). Dieses Phänomen kann mit der im vorigen Abschnitt eingeführten Konformationsänderung erklärt werden, die mit einer Änderung der apparenten Bindungskonstanten einhergeht. Wenn diese Konformationsänderung die Zugänglichkeit des 2-Aminoperimidin bei alkalischen pH-Werten verringert bzw. das kompetitive Gleichgewicht zugunsten des Natriumions erhöht, würde eine verringerte Inhibitionswirkung für die gleiche Konzentration vorherrschen. Der pK von 2-Aminoperimidin liegt bei 9,5. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es bei den untersuchten pH-Werten vorwiegend als Kation vorliegt und keine strukturellen Änderungen durchführt. Mit den vorliegenden Daten könnte der Schwellenwert des pH-Wertes, der die Auslösung der Konformationsänderung bewirkt, auf den Bereich zwischen pH 7,5 und pH 8,0 eingegrenzt werden.

Kapitel 6

Anwendung als Hochdurchsatzsystem

In Kapitel 1.3.5 erfolgte bereits eine Einführung in die Grundlagen der Hochdurchsatztechnik. Ein wesentlicher Bestandteil ist die Verwendung von standardisierten Mikrotiterplatten, da sie ein hohes Maß an Kompatibilität zu anderen System aufweisen. Aus diesem Grund wurden die in dieser Arbeit benutzten Sensoren auf der Basis von festkörperunterstützten Membranen als Sensorarray ausgelegt, das dem Standard einer 96er Mikrotiterplatte entspricht. Damit sollte es bei Bedarf ermöglicht werden die breite vorhandene Infrastruktur (Zentrifugen, Waschstationen, Pipettierroboter, etc.) zu verwenden, die den Umgang mit Mikrotiterplatten beherrscht. Dadurch könnten auch Schritte, die der Vorbereitung eines Experiments dienen (z.B. Lipidauftragung und/oder Zugabe der proteinhaltigen Membranstrukturen) automatisiert werden. In diesem Kapitel sollen die Entwicklungsstufen eines automatisierten Messsystems mit erhöhtem Durchsatz bis zum Zeitpunkt der Niederschrift dargestellt und erläutert werden. Es werden Messungen mit den behandelten Proteinen NhaA und EAAC1 gezeigt, und es wird ein Ausblick auf realisierbare Anwendungsmöglichkeiten gegeben.

6.1 Entwicklung der Messapparatur

Zu einem frühen Zeitpunkt der Doktorarbeit ergab sich eine Diskussion, ob es möglich wäre, mit einem pipettenbasierenden System einen schnellen Lösungswechsel in der Kammer eines 96er Sensorarrays durchzuführen. Die Antwort darauf konnte schneller als gedacht gegeben werden. Ein einfacher Versuch mit einer gewöhnlichen 100 μL Pipette, die eine mit 50 μL aktivierender Lösung beladene Pipettenspitze aufwies, ergab ein erfolversprechendes Ergebnis. Die Pipette diente dabei zur manuellen Injektion der aktivierenden Lösung in die offene Kammer des 96er Sensorarrays, die mit nicht-aktivierender Lösung gefüllt war. Auf dem provisorisch unter die Mikrotiterplatte geklebten Sensor war der Natrium-Protonen-Austauscher NhaA in den immobilisierten Proteoliposomen vorhanden. Als Referenzelektrode diente ein dünner chlorierter Silberdraht, der in die Kammer eintauchte. Der Sensor und die Referenzelektrode wurden an das SURFE²R-Messsystem angeschlossen, und die manuellen Pipettiervorgänge wurden mit der dazugehörigen Software aufgezeichnet. Mehrere Personen pipettierten verschiedene Lösungen in die Messkammer, die zwischendurch mit nicht-aktivierender Lösung gespült wurde. Dabei wurden als aktivierende Substanz 3 mM NaCl und als Negativkontrollen 3 mM ChCl oder 3 mM NaCl bei pH 6,3 verwendet. Trotz der erhaltenen unreproduzierbaren Signalformen, die auf die manuelle Injektion zurückgeführt werden konnten, war das qualitative Ergebnis erstaunlich homogen: Nur die Aktivierung mit 3 mM NaCl bei pH 8,0 verursachte Mesströme mit

Signalformen. Die Negativkontrollen ergaben bis auf kleine Artefakte keinen Signalverlauf im Messstrom. Das hier beschriebene Experiment war der Anstoß zur Entwicklung eines automatisierten Messsystems auf der Basis von festkörperunterstützten Membranen, das mit einem Pipettierroboter realisiert werden sollte.

Als Versuchsaufbauten kamen zwei verschiedene Pipettierroboter zu Einsatz, die von der Fa. HAMILTON COMPANY (Reno, USA) und von der Fa. TECAN AG (Männedorf, Schweiz) hergestellt wurden. Die verwendeten Modelle waren der Tecan MiniPrep 60 und der Hamilton MicroLab Duo. Bei der Entwicklung der Messapparatur ergaben sich verschiedene Problemstellungen, die im Nachfolgenden angesprochen werden sollen. Die Lösung der auftretenden Schwierigkeiten konnte nur durch die Eigenentwicklung einer Injektionseinheit realisiert werden. Die Entwicklungsarbeit wurde dabei unter Einbeziehung der Entwicklungsabteilung (*Screening Technology Development*) der Fa. IONGATE BIOSCIENCES GMBH, Frankfurt, geleistet. In der letzten Entwicklungsstufe wurde ausschließlich mit dem Tecan-Pipettierer gearbeitet, da das Gerät hinsichtlich der hohen Verfahrensgeschwindigkeiten sehr gut für den potentiellen Einsatz als Hochdurchsatzsystem geeignet war. Zum Zeitpunkt der Niederschrift lag damit ein funktionierendes Pipettiersystem vor, das als Einkanalvariante in der Lage war, vollautomatisierte Messreihen aufzunehmen.

6.1.1 Lösungshantierung und Proteinaktivierung

Zuerst arbeiteten die Pipettierroboter mit einer automatisierten Kolbenhubpipette und Standardpipettenspitzen, die nach der Messung verworfen wurden. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Toleranzen, mit denen die Pipettenspitzen gefertigt wurden, den Ansprüchen an ein Messsystem, das reproduzierbare Daten liefern soll, nicht gerecht wurden. Besonders die Ausgangsöffnungen wiesen Toleranzen auf, die ein definiertes Anströmen des Sensors unmöglich machten, da die Vorzugsrichtung der ausströmenden Lösung von Mal zu Mal variierte. Die erhaltenen Messdaten wiesen dadurch eine große Streuung auf. Daher wurde auf ein Nadelsystem zurückgegriffen, das von den jeweiligen Herstellern bezogen werden konnte. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Vorroraussetzung für jede Messung möglichst konstant gehalten wurde. Ein Vorteil dieser Methode war, dass eine Spritzenpumpe eingesetzt werden konnte, die über ein Ventil entweder mit einem Schlauchsystem, das eine Verbindung zur Nadel herstellte, oder einem angeschlossenes Reservoir, in dem die sogenannte Systemflüssigkeit bevorratet war, verbunden wurde. Dadurch konnten oft eingesetzte Lösungen (z.B. die nicht-aktivierende Lösung oder eine Ruhelösung) als Systemflüssigkeit verwendet werden. Um die Systemflüssigkeit von anderen Lösungen (z.B. der aktivierenden Lösung) zu trennen, wurden Luftblasen zur Separation verwendet. Die anderen Messlösungen wurden aus bereitgestellten Vorratsgefäßen (entweder Bechergläser oder 96er Mikrotiterplatten) entnommen. Um einen problemlosen Austausch von Lösungen in der Messkammer zu ermöglichen, wurde ein zusätzliches Absaugsystem in der Injektionseinheit etabliert.

Ein großes Problem stellte die Beobachtung dar, dass von den Transportproteinen, die mit dem SURFE²R-Messsystem aktivierbar waren, einige gut mit dem Pipettiersystem funktionierten und andere keine messbare Aktivität aufwiesen. Dieses Phänomen wurde hypothetisch auf die Möglichkeit zurückgeführt, dass einige Proteine eventuell schon vor der eigentlichen Injektion durch aktivierende Lösung, die aus der Ausgangsöffnung der Nadel oder der Pipettenspitze diffundiert, aktiviert wurden. Dieses Problem konnte nur dadurch behoben werden, dass in der entwickelten Injektionseinheit vor der Aktivierung

eine Übersichtung von nicht-aktivierender und aktivierender Lösung realisiert wurde.

6.1.2 Messkreis und Referenzelektrode

Als Messeinrichtung kam die gleiche Architektur zum Einsatz, die in das SURFE²R-Messsystem integriert war. Jedoch stellte sich trotz der bequemen Messbedingungen auch die komfortable Anwendung der Nadel als Pipettiersystem als unzureichend heraus. Diese Tatsache war vorwiegend durch die negativen Einflüsse auf den Messstromkreis begründet. Die kommerziell beziehbaren Pipettiernadeln sind überwiegend aus Metall, das, sobald es in die Lösung taucht, die Wirkung einer Antenne aufweist und externe Störgrößen (z.B. 50 Hz Netzbrummen) in den Messkreis einleitet. Auch die mit leitfähigen Salzlösungen gefüllten Schlauchsysteme stellten dabei ein Problem dar. Die Isolation durch Luftblasen war unzureichend, weil anscheinend der Flüssigkeitsfilm der benetzten Schlauchwände ausreichte, um elektrische Störgrößen aufzunehmen, die eine Messung teilweise unmöglich machten. Die elektrischen Störgrößen konnten durch die Abschirmung und gezielte Masseführung eingedämmt werden.

Des Weiteren stellten die Art und die Platzierung der Referenzelektrode ein Problem dar. Zu Beginn wurde ein chlorierter Silberdraht verwendet, der notdürftig befestigt in die jeweilige Messkammer eintauchte. Später wurden Einsätze verwendet, die in der Nachbarkammer platziert werden konnten und ebenfalls einen chlorierten Silberdraht aufwiesen, der mit der Messkammer in Verbindung stand. Durch die direkte Verwendung von Referenzelektroden in der Messkammer, ohne dass eine Salzbrücke vorhanden war, ergaben sich teilweise Artefakte, die durch die Zufuhr der aktivierenden Lösung hervorgerufen wurden. Unabhängig von den störenden Einflüssen war die Verwendung von Referenzelektroden, die für jede Messung umplatziert werden mussten, nicht geeignet, ein automatisiertes Hochdurchsatzsystem zu betreiben. Die Referenzelektrode musste deshalb in die Injektionseinheit integriert werden. Der Kontakt zu dem Messstromkreis wurde über einen ausgeklügelten Mechanismus hergestellt, wenn sich die Injektionseinheit in der Messkammer befand.

6.1.3 Programmierung und Datenerfassung

Die Programmierung der durchzuführenden Sequenzen erfolgte zunächst mit der den Pipettierern beigelegten Software, wobei jeweils eine Makrosprache angewendet wurde. Die Aufzeichnung der Messungen erfolgten dabei zuerst manuell und wurde später über eine Schnittstelle der Pipettierersoftware getriggert. Dabei kam dieselbe Massdatenerfassungssoftware zum Einsatz, die auch für die SURFE²R-Messungen verwendet wurde. Die Messdatenerfassungssoftware wurde im Rahmen der Entwicklung der Messapparatur soweit angepasst, dass damit sowohl die Bedienung bzw. Programmierung des Pipettierroboters als auch die Datenaufnahme erfolgen konnte.

6.1.4 Injektionseinheit

Nach mehreren Entwicklungsstufen entstand eine Injektionseinheit, die vorwiegend aus Kunststoff aufgebaut war. Im Messsystem existierten zwei Schlauchsysteme, die mit Spritzenpumpen befüllt werden konnten. In der Injektionseinheit waren die Schlauchsysteme über ein Y-Verbindungsstück mit einem Injektionskanal verbunden, durch den die Aktivierung in der Messkammer eines 96er Sensorarrays stattfand. Die damit entwickelten

Messprotokolle ließen es zu, eine Lösungsfront zwischen nicht-aktivierender und aktivierender Lösung innerhalb der Injektionseinheit kurz vor der Aktivierung zu etablieren, so dass keine Gefahr durch Diffusionsaktivierung mehr bestand und auch die Transportproteine erfolgreich aktiviert werden konnten, die zuvor keine messbare Aktivität aufwiesen. Ein etabliertes Protokoll zur Proteinaktivierung mit dem Pipettiersystem soll im nächsten Abschnitt näher erläutert werden.

6.2 Messprotokoll

Das Messprotokoll, das mit der etablierten Injektionseinheit zum Zeitpunkt der Niederschrift als gut geeignet galt, soll im folgenden erläutert werden. In Abb. 6.1 ist das Schema des Messprotokolls dargestellt. In den Schritten a bis e wird ein vollständiger Messzyklus durchgeführt, wobei davon ausgegangen wird, dass der Sensor in einer Ruhelösung vorliegt. Die Injektionseinheit wird durch ein liegendes T-Stück repräsentiert, wobei unten die Ausgangsöffnung vorhanden ist, durch die der Sensor angeströmt wird (Injektionskanal). Die Zweige nach oben und nach links sind mit den zwei Spritzenpumpen verbunden. Zur besseren Darstellung sind die verwendeten Lösungen farblich gekennzeichnet (Systemflüssigkeit = grau, nicht-aktivierende Puffer-Lösung = blau und aktivierende Lösung = rot). Luftblasen, die zur Separation der Lösungen eingesetzt wurden, sind weiß gekennzeichnet. Die nicht-aktivierende und die aktivierende Lösung standen dabei in Vorratsbehältern zur Verfügung (Puffer A, Puffer NA). Die Aufnahme der Luftblasen erfolgte in der *Home*-Position der Injektionseinheit. Der erste Zustand in Abb. 6.1 a stellt die Situation dar, in der zuerst eine Luftblase, dann die aktivierende Lösung und im Anschluss eine weitere Luftblase in den oberen Zweig aufgenommen wurden. Die zweite Luftblase wurde dabei soweit aufgezogen, dass keine flüssige Verbindung zum rechten Zweig besteht. Im nächsten Schritt (b) nimmt die Injektionseinheit nicht-aktivierende Lösung aus dem Vorratsbehälter „Puffer NA“ auf, die durch eine Luftblase von der Systemflüssigkeit getrennt wird. So beladen, fährt die Injektionseinheit in die Messkammer des 96er Sensorarrays (Sensor) und gibt nicht-aktivierende Lösung in die Messkammer ab. Dadurch erfolgt der Austausch von Ruhelösung mit nicht-aktivierender Lösung. Die Menge der nicht-aktivierenden Lösung wird dabei so groß gewählt, dass die Luftblase nicht über die Verbindungsstelle der oberen Zweige wandert, sondern im linken Zweig verbleibt. Nun wird die Luftblase aus dem oberen Zweig in den Injektionskanal bewegt (c) und direkt darauf in den linken Zweig aufgenommen (d). Dadurch entsteht die Lösungsfront zwischen aktivierender und nicht-aktivierender Lösung, die nun nicht mehr durch eine Luftblase voneinander getrennt sind. Im letzten Schritt werden die überschichteten Lösungen durch den Injektionskanal in die Messkammer injiziert (e). Kurz bevor die Injektion erfolgt, wird die Messdatenaufzeichnung gestartet.

Das erläuterte Messprotokoll entspricht in der Abfolge der verwendeten Lösungen einem doppelten Lösungswechsel, der mit dem SURFE²R Messsystem realisiert werden konnte. Durch die angepasste Software konnte die Anwendbarkeit von verschiedenen Protokollen sehr flexibel gehalten werden. Das beschriebene Messprotokoll ließ sich durch kleine Änderungen schnell an neue Bedingungen anpassen. Ebenso einfach können andere Sequenzen bei Bedarf neu programmiert werden.

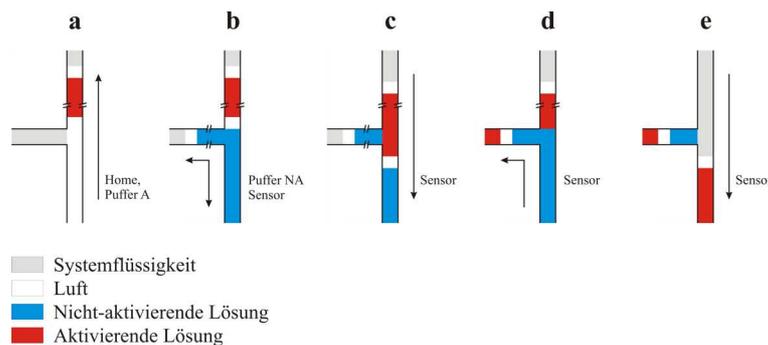


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung eines Messprotokolls mit dem Pipettiersystem. Dargestellt ist die Injektionseinheit, die durch ein liegendes T-Stück repräsentiert wird. Die verschiedenen Lösungen und Luftblasen sind mit verschiedenen Farben gekennzeichnet. In a hat die Injektionseinheit die aktivierende Lösung (rot) getrennt von Luftblasen in den oberen Zweig aufgenommen. In b erfolgt die Aufnahme von nicht-aktivierender Lösung (blau) in den linken Zweig und der Spülvorgang des Sensors (Austausch von Ruhelösung mit nicht-aktivierender Lösung). In c und d wird die Luftblase, die aktivierende und nicht-aktivierende Lösung trennt, zuerst in den Injektionskanal (unterer Zweig) und dann in den linken Zweig verschoben. Da nun die Lösungsfront zwischen aktivierender und nicht-aktivierender Lösung hergestellt ist, kann der in e dargestellte Injektions- bzw. Aktivierungsvorgang erfolgen.

6.3 Beispielmessungen

In diesem Abschnitt sollen einige der durchgeführten Messungen mit den bereits in dieser Arbeit behandelten Proteinen NhaA und EAAC1 vorgestellt werden. Die Sensorvorbereitung erfolgte nach den gleichen Protokollen wie bei den vorgestellten Daten in Kapitel 5. Der in Liposomen rekonstituierte NhaA wird hier zuerst behandelt, weil mit ihm das erste erfolgreiche Experiment durchgeführt werden konnte. Zusätzlich wurde der NhaA primär für die Charakterisierung des Systems eingesetzt, bevor systematische Experimente mit anderen Proteinen realisiert werden konnten. Darauf folgend werden Daten gezeigt, die mit dem Glutamattransporter EAAC1 erhalten wurden. Der in CHO-Membranfragmenten vorliegende EAAC1 wurde in der aktuellsten Entwicklungsstufe des Pipettiersystems unter Verwendung des beispielhaft erläuterten Messprotokolls (voriger Abschnitt) untersucht.

6.3.1 Messungen mit dem NhaA

Die Messdaten, die mit dem NhaA (Proteoliposomen) aufgenommen wurden, reflektieren das frühe Versuchsstadium der Entwicklung des Hochdurchsatzsystems. Die Messungen wurden daher unter variierenden Bedingungen mit dem Hamilton-Pipettierroboter aufgenommen. Für die Aktivierung des NhaA mit Natriumionen in der aktivierenden Lösung wurden noch Einwegpipettenspitzen verwendet. Dennoch sollen die Daten hier nicht vor-enthalten werden, da darin einige interessante kinetische Merkmale wiederzufinden sind. Abb. 6.2 A.c zeigt das erste proteininduzierte Messsignal, das unter der Verwendung von festkörperunterstützten Membranen mit einem automatisierten Pipettiersystem aufgezeichnet wurde. Es handelt sich dabei um den NhaA, der bei einem pH-Wert von 8,0 mit 3 mM NaCl in der aktivierenden Lösung, die sich in der Pipettenspitze befand, aktiviert wurde. Die Injektionszeitpunkte sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Grundpuffer, der die Basis für die nicht-aktivierende und die aktivierende Lösung war, bestand aus

25 mM HEPES, 25 mM Tris, 6 mM MgCl_2 und 50 mM KCl. In der nicht-aktivierenden Lösung waren 3 mM ChCl vorhanden. Zwischen zwei Messungen wurde die Messkammer durch mehrmaliges Austauschen mit Frischpuffer (nicht-aktivierende Lösung) gespült. Aus Kontrollmessungen wurden die in A.a und A.b gezeigten Messströme erhalten, die keine Signalformen im Messstrom aufwiesen. Dabei kam einerseits eine aktivierende Lösung zum Einsatz, die Kaliumionen (3 mM KCl) anstelle von Natriumionen aufwies (A.b), und andererseits wurde bei Natriumaktivierung ein Messpuffer mit pH 6,3 verwendet (A.a). Nachdem die Kontrollmessungen durchgeführt waren, trat das Signal wieder auf, wenn die gleichen Messlösungen wie zuvor verwendet wurden (pH 8,0 und Natriumaktivierung). Das Signal in A.c wies eine sehr hohe Amplitude auf, die fast 4 nA beträgt und damit deutlich größer war als die Signalamplitude, die der NhaA hervorrief, wenn Messungen unter Verwendung des SURFE²R-Messsystems durchgeführt wurden. Die Signalform lag in guter Übereinstimmung mit den Referenzdaten des SURFE²R-Messsystems. Hier muss zusätzlich angegeben werden, dass die in 6.2 A gezeigten Signalformen unter Bedingungen aufgenommen wurden, bei denen die Pipettenspitze nicht konzentrisch über dem Sensor, sondern um 2 mm versetzt (nahe am Rand der Messkammer) platziert wurde. Die Kolbenhubgeschwindigkeit betrug 4000 steps/s (Nach Herstellerangaben ist 1 step gleich $0,125 \mu\text{L}$, wodurch sich hier eine Flußgeschwindigkeit von $500 \mu\text{L/s}$ ergibt).

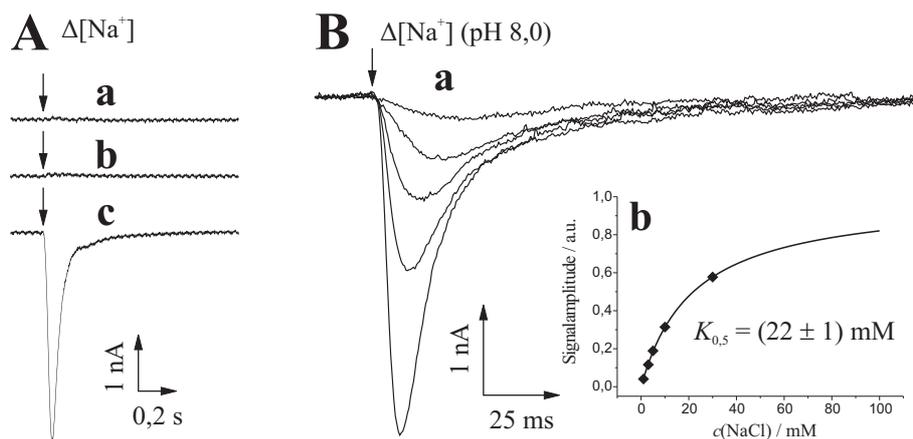


Abbildung 6.2: Messungen mit dem Pipettiersystem und dem NhaA. Die durchgeführten Messsequenzen waren analog zu einfachen Lösungswechseln mit der Sequenz $\Delta[\text{Na}^+]$. Als Messpuffer kam eine Lösung von 25 mM HEPES, 25 mM Tris, 6 mM MgCl_2 und 50 mM KCl zum Einsatz. In A sind die Messströme für Injektionen von aktivierender Lösung dargestellt, bei denen 3 mM NaCl (a und c) oder 3 mM KCl (b) in der aktivierenden Lösung vorhanden waren. Die nicht-aktivierende Lösung enthielt 3 mM ChCl. Der pH-Wert war in a auf pH 6,3 eingestellt. In b und c betrug der pH-Wert 8,0. In B erfolgte die Aktivierung mit variierenden NaCl-Konzentrationen (1, 3, 5, 10 und 30 mM) bei pH 8,0. Die ChCl-Konzentration in der nicht-aktivierenden Lösung war $c(\text{ChCl}) = 30 \text{ mM} - c(\text{NaCl})$ vorhanden. B.a zeigt die transienten Messsignale. In B.b ist die Abhängigkeit der Signalamplitude von der NaCl-Konzentration dargestellt.

Die in Abb. 6.2 B gezeigten Daten wurden unter den gleichen Bedingungen wie in 6.2 A aufgezeichnet. Der Sensor wurde abweichend davon konzentrisch mit einer Kolbenhubgeschwindigkeit von 1500 steps/s (ergibt ca. $190 \mu\text{L/s}$) angeströmt, und die Natriumionenkonzentration in der aktivierenden Lösung wurde variiert. Die ChCl-Konzentration in der

nicht-aktivierenden Lösung war 30 mM. In der aktivierenden Lösung war die Summe aus NaCl-Konzentration und ChCl-Konzentration gleich 30 mM. Dabei kamen die NaCl-Konzentrationen 1 bis 30 mM zum Einsatz. Die Halbsättigungskonstante $K_{0,5}$, die sich aus den dargestellten transienten Messströmen (B.a) ergab, wurde zu (22 ± 1) mM bestimmt (B.b). Allerdings befand sich die Signalamplitude bei 30 mM noch nicht in der Sättigung, und es wurde keine Mittelung über mehrere Messwerte durchgeführt, so dass der angegebene Halbsättigungswert statistisch nicht belegt wurde. Dennoch beträgt er nur das doppelte des Wertes, der durch Messungen mit dem SURFE²R-Messsystem bestimmt wurde (siehe Kapitel 5.2.1). Besonders interessant ist hier der Vergleich der Signalformen, die für verschiedene Natriumionenkonzentrationen erhalten wurden. Die transienten Messströme sind gegenüber den Messungen in Abb. 6.2 A sehr schnell, und die abfallenden Messströme wiesen keinen Überschneidungspunkt auf. Des Weiteren wurde der Scheitelpunkt der Signalamplitude mit steigenden Konzentrationen immer schneller erreicht. Das Verhalten kann mit dem Modell eines spannungsabhängigen Transportmechanismus erklärt werden, bei dem die Kinetik so schnell ist, dass sie dem Lösungswechsel folgt. Dieses Ergebnis ist konform mit den in Kapitel 5.2.2 diskutierten Eigenschaften des NhaA. Das Experiment bestätigt demnach die kinetischen Eigenschaften des NhaA. Daraus kann gefolgert werden, dass das Pipettiersystem auch für kinetische Untersuchungen an Transportproteinen einsetzbar ist, wenn die Reproduzierbarkeit der Messströme gewährleistet werden kann.

6.3.2 Messungen mit dem EAAC1

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Messungen mit dem Glutamattransporter EAAC1 (CHO-Membranfragmente) wurden durch die Anwendung der oben beschriebenen Injektionseinheit durchgeführt. Als Messprotokoll kam die erläuterte Sequenz zum Einsatz, die einen doppelten Lösungswechsel repräsentiert. Die verwendeten Messpuffer waren jeweils 120 mM Natrium- und Kaliumphosphatpuffer, die durch Mischen der monobasischen und der dibasischen Form (H_2PO_4^- und HPO_4^{2-}) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurden. Der Kaliumphosphatpuffer (kaliumhaltige Ruhelösung) konnte als Systemflüssigkeit verwendet werden, um damit nach einer Messung die Messkammer zu befüllen. Dadurch wurde der Ausgangszustand für jede Messung konstant gehalten. Als nicht-aktivierende und als aktivierende Lösung wurde der Natriumphosphatpuffer verwendet, wobei in der aktivierenden Lösung zusätzlich das Substrat L-Glutamat vorhanden war. Der Austausch der Ruhelösung mit der nicht-aktivierenden Lösung und die Aktivierung mit L-Glutamat erfolgte exakt nach dem in Abschnitt 6.2 beschriebenen Messprotokoll. Die Signalformen im Messstrom, die dadurch hervorgerufen wurden, sind in Abb. 6.3 A.1 und A.2 gezeigt. Dabei erfolgte die Aktivierung in A.1.a mit 1 mM und in A.2.a mit 100 μM L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. Die Flussgeschwindigkeit, die durch Programmierung der Spritzenpumpe vorgegeben wurde, betrug 200 $\mu\text{L/s}$. Nach den mit Pfeilen gekennzeichneten Injektionszeitpunkten erfolgte mit kurzer zeitlicher Verzögerung die Aktivierung des EAAC1. Die zeitliche Verzögerung ist auf die Übersichtung von nicht-aktivierender und aktivierender Lösung in der Injektionseinheit zurückzuführen, wodurch die Lösungsfront der aktivierenden Lösung erst auf den Sensor trifft, wenn die nicht-aktivierende Lösung verdrängt wurde. Für beide L-Glutamatkonzentrationen ergaben sich Signalformen, die denen mit dem SURFE²R-Messsystem erhaltenen sehr ähnlich sind. Mit sättigenden L-Glutamatkonzentrationen wurden Amplituden von 1 bis 3 nA hervorgerufen. Die Zeitkonstanten sind größer als bei den SURFE²R-Messungen, was auf die reduzierte Flussgeschwindigkeit zurückgeführt werden kann. In 6.3 A.1 ist zusätzlich eine Kontrollmessung

(A.1.b) dargestellt, bei der die aktivierende Lösung kein L-Glutamat enthielt, woraufhin keine Signalform im Messstrom zu beobachten war. Ein entsprechendes Experiment ist in A.2.c gezeigt, in der die aktivierende Lösung ebenfalls kein L-Glutamat enthielt und dadurch kein Messsignal induzierte. Desweiteren lag in A.2.b der Inhibitor HIP-B mit einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vor. In Anwesenheit von HIP-B wies die Signalform einen Aktivitätsrückgang von 40 % auf, was konform zu dem IC_{50} von ca. $13 \mu\text{M}$ ist, der in Kapitel 5.1.1 bestimmt wurde.

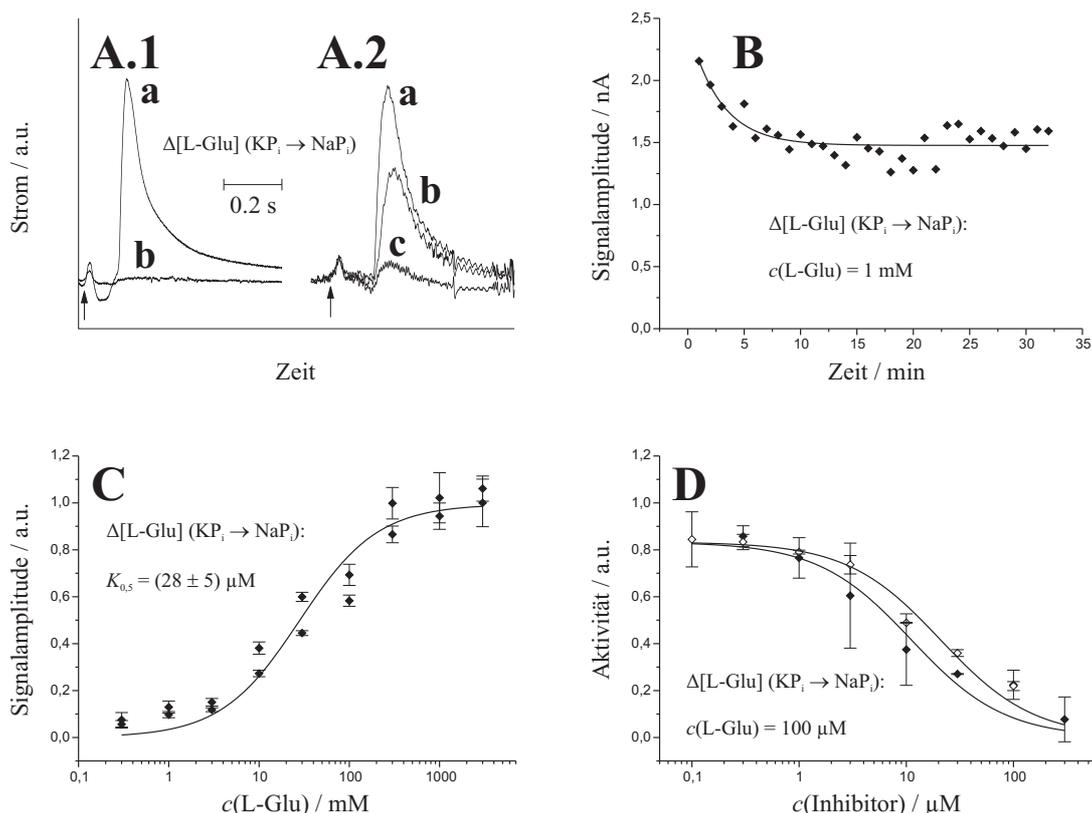


Abbildung 6.3: Messungen mit dem Pipettiersystem und dem EAAC1. Die Messsequenzen waren analog zu doppelten Lösungswechseln mit der Sequenz $\Delta[\text{L-Glu}] (\text{KP}_i \rightarrow \text{NaP}_i)$. Als Messpuffer wurden Kaliumphosphatpuffer als Ruhelösung und Natriumphosphatpuffer als nicht-aktivierende und aktivierende Lösung verwendet. Der pH-Wert betrug 7,4, und die Aktivierung erfolgte mit L-Glutamat in der aktivierenden Lösung. In A.1 sind Messsignale gezeigt, die mit 1 mM L-Glutamat (A.1.a) und mit 0 mM L-Glutamat (A.1.b) erhalten wurden. A.2 stellt Messströme dar, bei denen die Aktivierung mit $100 \mu\text{M}$ L-Glutamat (A.2.a und A.2.b) oder mit 0 mM L-Glutamat (A.2.c) erfolgte. In A.2.b waren zusätzlich $10 \mu\text{M}$ des Inhibitors HIP-B in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vorhanden. B zeigt eine zeitliche Abhängigkeit der Signalamplitude, bei der in Minutenabständen eine Aktivierung mit 1 mM L-Glutamat erfolgte. In C wurde die L-Glutamatkonzentration in der aktivierenden Lösung von $0,3 \mu\text{M}$ bis 3 mM variiert. In dem Diagramm ist die Signalamplitude als Abhängigkeit von der L-Glutamatkonzentration dargestellt. In D sind Inhibitionsexperimente mit den Inhibitoren TBOA (\blacklozenge) und HIP-B (\blacklozenge) zu sehen, bei denen die Aktivität aus dem Verhältnis der Signalamplituden mit und ohne Inhibitor bestimmt wurde. Die Inhibitoren waren in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vorhanden und die eingesetzten Konzentrationen wurden variiert (TBOA: $0,1$ bis $100 \mu\text{M}$, HIP-B: $0,3$ bis $300 \mu\text{M}$). Die Aktivität ist in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration aufgetragen.

In Abb. 6.3 B ist eine Stabilitätsmessung der Signalamplitude eines Sensors über 30 min gezeigt, bei der einmal in der Minute eine Aktivierung mit 1 mM L-Glutamat erfolgte. Die Signalamplitude stabilisierte sich nach ca. 5 bis 10 min und streute danach mit einer relativen Standardabweichung von knapp 10 %. Zusätzlich stellt die hier erreichte Durchsatz-Geschwindigkeit von einem Datenpunkt pro Minute zum Zeitpunkt der Niederschrift das kürzeste Zeitintervall zwischen zwei Messungen dar, das erzielt werden konnte. Die Diagramme in Abb. 6.3 C und D enthalten automatisiert aufgenommene Konzentrationsabhängigkeiten der Signalamplituden, die im Messstrom durch Aktivierung mit L-Glutamat ausgelöst wurden. Lösungen die unterschiedliche Konzentrationen an L-Glutamat oder der Inhibitoren TBOA bzw. HIP-B enthielten, wurden dafür in 24er oder 48er Mikrotiterplatten bereitgestellt. Mit der angepassten Pipettierersoftware wurde ein Makro erstellt, das eine vollständige Konzentrationsabhängigkeit unter Verwendung des oben genannten Messprotokolls pipettierte und aufzeichnete. Abb. 6.3 C stellt zwei L-Glutamat-Konzentrationsabhängigkeiten dar, die auf ihr Maximum normiert und gemeinsam durch eine Michaelis-Menten-Kinetik angenähert wurden. Die Konzentrationsabhängigkeiten wurden jeweils vollständig auf einem Sensor aufgezeichnet. Es ergab sich eine Halbsättigungskonstante für L-Glutamat von $K_{0,5} = (28 \pm 5) \mu\text{M}$, die sehr nahe an derjenigen liegt, die in Kapitel 5.1.1 mit dem SURFE²R-Messsystem bestimmt werden konnte ($24 \mu\text{M}$), wenn doppelte Lösungswechsel angewendet wurden. Die Inhibitionskurven in Abb. 6.3 D wurden ebenfalls automatisiert aufgezeichnet, und der Inhibitor lag in verschiedenen Konzentrationen ($0,3$ bis $300 \mu\text{M}$ bei TBOA und $0,1$ bis $100 \mu\text{M}$ bei HIP-B) jeweils in der nicht-aktivierenden und der aktivierenden Lösung vor. Die als Systemflüssigkeit verwendete Kaliumruhelösung war inhibitorfrei. Die Datenpunkte wurden mit einer Gleichung für die kompetitive Inhibition angenähert. Dabei ergaben sich für TBOA die Werte $K_i = (1,8 \pm 0,6) \mu\text{M}$ und $IC_{50} = (11 \pm 4) \mu\text{M}$. Analog dazu ergaben sich für HIP-B die Werte $K_i = (3,5 \pm 0,7) \mu\text{M}$ und $IC_{50} = (21 \pm 4) \mu\text{M}$. Die Werte fallen für beide Inhibitoren (TBOA und HIP-B) etwas höher aus als bei den Inhibitionsmessungen, die mit dem SURFE²R-Messsystem aufgenommen wurden (siehe Kapitel 5.1.1).

Zusammen mit den Kontrollmessungen der L-Glutamat-Konzentrationsabhängigkeit und den Inhibitionen kann als Ursprung der beobachteten Signalformen eindeutig die Aktivität des EAAC1 festgelegt werden. Mit dem hier verwendeten Messprotokoll in Anwesenheit einer kaliumhaltigen Ruhelösung lag die gleiche Halbsättigungskonstante vor wie bei doppelten Lösungswechseln mit dem SURFE²R-Messsystem. Diese Tatsache lässt die Schlussfolgerung zu, dass mit dem Pipettiersystem ein gleichwertiger Kaliumgradient über die proteinhaltigen Membranen der CHO-Membranfragmente angelegt werden kann. Die erhaltenen Messdaten waren insgesamt reproduzierbarer und stabiler, als es bei dem Systemstatus der Fall war, in dem die zuvor gezeigten NhaA-Messungen aufgezeichnet wurden.

6.4 Ausblick und Anwendungsmöglichkeiten

Es wurde gezeigt, dass die Hochdurchsatztechnik, basierend auf festkörperunterstützten Membranen, äquivalent zu der herkömmlichen Methode eingesetzt werden kann. Durch Automatisierung und Programmierbarkeit besitzt die Hochdurchsatzvariante ein hohes Potential für die Aufnahme einer großen Datenmenge innerhalb einer kurzen Zeit. Das hier vorliegende Pipettiersystem war als Einkanalvariante ausgelegt. Eine weitere Erhöhung der Durchsatzgeschwindigkeit könnte durch die Realisierung von Parallelmessungen

erreicht werden, bei denen mit der entsprechenden Infrastruktur bis zu 96 Sensoren gleichzeitig mit aktivierenden Lösungen aktiviert und die jeweiligen Messsignale aufgezeichnet würden.

Besonders interessant ist das Pipettiersystem für den industriellen Einsatz in der pharmakologischen Wirkstoffsuche. Dort kommt es besonders auf Schnelligkeit und Zuverlässigkeit an. Messungen mit dem SURFE²R-Messsystem haben gezeigt, dass die Verwendung von rekombinanten Proteinen in CHO-Membranfragmenten eine stabile Anlagerung auf festkörperunterstützten Membranen aufweisen. Bei einer entsprechenden Anpassung der Messprotokolle lassen sich die Sensoren auf das Pipettiersystem übertragen und liefern äquivalente Ergebnisse. Die relativ einfache Aufreinigungsmethode ist eine kostengünstige und zeitsparende Variante gegenüber Proteinen, die bis zur Homogenität aufgereinigt und dann rekonstituiert (z.B. in Liposomen) werden müssen. Eine zusätzliche Kostenersparnis ist mit den geringen Volumina verbunden, die bei der Verwendung des Pipettiersystems gegenüber dem SURFE²R-Messsystem anfallen. Eine Aktivierung oder Inhibierung mit wertvollen Substanzen ist dabei auf das Volumen der Kammer einer 96er Mikrotiterplatte begrenzt (maximal 400 μ L), wohingegen das SURFE²R-Messsystem ein systembedingtes Mindestvolumen in der Größenordnung von 10 mL voraussetzt, um eine Messesequenz aufzuzeichnen. Im Anwendungsfall mit dem Pipettiersystem sollte eine übergeordnete Messesequenz folgendermaßen aufgebaut sein: Zuerst erfolgt eine Referenzmessung, auf die die nachfolgenden Messungen bezogen werden können. Danach finden zwei weitere Messungen statt, wobei eine als Substanzmessung und die andere als Positivkontrolle bezeichnet werden. Die Reihenfolge, in der die Substanzmessung und die Positivkontrolle durchgeführt werden, ist dabei zunächst nebensächlich. Die Positivkontrolle stellt eine Messung dar, bei der ein Standardaktivierungsprotokoll zum Einsatz kommt, das die unbeeinflusste Aktivität des untersuchten Proteins wiedergibt (z.B. ein 1 mM L-Glutamatsprung beim EAAC1 mit Natriumionen im Hintergrund und Kaliumionen in der Ruhelösung). Als Substanzmessung wird eine Messung unter den gleichen Bedingungen, aber in der Anwesenheit einer bestimmten Substanz oder bei der Verwendung eines anderen Substrates verstanden (z.B. ein 1 mM L-Glutamatsprung beim EAAC1 mit HIP-B im Hintergrund oder ein 1 mM L-Aspartatsprung beim EAAC1). Um die Varianz des Systems einzubeziehen, werden beide Werte auf den Referenzwert normiert, wobei der Referenzwert durchaus unter den gleichen Bedingungen wie die Positivkontrolle aufgezeichnet werden kann. Die Differenz zwischen normierter Positivkontrolle und normierter Substanzmessung ist dann das Messergebnis. Diese Rahmenbedingungen liefern die Möglichkeit, den Bewertungsfaktor z' auszurechnen (siehe 1.3.5). Dabei muss anstelle der Substanzmessung eine Negativkontrolle definiert werden. Für die Negativkontrolle sollten Bedingungen gewählt werden, bei der kein proteininduziertes Signal zu erwarten ist (z.B. ein 1 mM L-Glutamatsprung beim EAAC1 mit Kaliumionen im Hintergrund). Wenn das Pipettiersystem einen z' -Faktor größer als 0,5 erzeugt, ist die Grundlage für den industriellen Einsatz geschaffen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für den EAAC1 ein z' von 0,63 (7 Sensoren) und für den NhaA ein z' von 0,86 (16 Sensoren) bestimmt werden.

Die Anwendungsmöglichkeiten des Pipettiersystems sind breit angelegt, da auf dem Markt bislang kein vergleichbares System existiert. Im Bereich der pharmakologischen Wirkstoffsuche ist es vorstellbar, das System zur Identifikation neuer Substanzen einzusetzen, die einen Einfluss auf ein definiertes Untersuchungsobjekt (Target) aufweisen, wenn das Untersuchungsobjekt ein Membranprotein ist. Mit einer auf das zu untersuchende protein

abgestimmten Messequenz könnten beliebig viele Substanzen ausprobiert werden. Ein anderes Szenario ist die Aufklärung von Querempfindlichkeiten bestimmter Substanzen gegen andere Proteine, die als Nebenwirkungen eines Medikaments klassifiziert werden können. Mit einer Palette von Membranproteinen könnte immer der gleiche Wirkstoff daraufhin getestet werden, ob eine Reaktion auf eines der Proteine stattfindet. Diese Variante könnte in präklinischen Studien eine teilweise Ersatzfunktion für Tierversuche bieten, wenn zuverlässige Daten produziert werden und eine entsprechende Zulassung erfolgt. Eine mehr wissenschaftliche Anwendungsmöglichkeit ist die Untersuchung von Punktmutationen in Proteinen. Oftmals werden zur Charakterisierung von Proteineigenschaften Mutanten hergestellt, bei denen bestimmte Aminosäuren oder Aminosäuresequenzen gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden. Wenn eine große Anzahl von Mutanten eines elektrogenen Transportproteins vorliegt, könnte mit dem Pipettiersystem auf der Basis von festkörperunterstützten Membranen in relativ kurzer Zeit getestet werden welchen Einfluss eine Mutation auf die Aktivität bzw. die Empfindlichkeit des Proteins gegenüber verschiedenen Reagenzien aufweist. Die Möglichkeiten der Anwendung des Pipettiersystems können unter Berücksichtigung verschiedener industrieller Bereiche, Fach- und Forschungsgebiete wahrscheinlich beliebig erweitert werden. Die hier vorgestellte Technologie hat das Potential einen Beitrag zu vielen neuen Erkenntnissen und Anwendungen zu leisten.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden festkörperunterstützte Membranen in Verbindung mit schnellen Lösungswechseln als Methode zur Messung von elektrogenen Transportvorgängen in biologischen Membranen untersucht und charakterisiert. Es erfolgte eine Analyse des schnellen Lösungswechsels zur Proteinaktivierung und des Anlagerungsverhaltes von proteinhaltigen Membranstrukturen auf festkörperunterstützten Membranen. Mit dem Modell eines idealen Mischvorgangs wurde die Konzentrationsänderung an der Sensoroberfläche simuliert und mit experimentellen Daten verglichen (Zeitkonstante τ). Bei einer Flussrate von 1 mL/s ergab sich eine Zeitkonstante von $\tau = 60\text{ms}$. Das Anlagerungsverhalten von Membranstrukturen (Proteoliposomen oder Membranfragmente) an der festkörperunterstützten Membran wurde mit Bacteriorhodopsin (BR), das in Proteoliposomen sowie in Membranfragmenten aus CHO-Zellen vorlag, untersucht. Es ergaben sich Kinetiken, bei denen die Signalamplitude zunächst schnell anwuchs und schließlich gegen einen Sättigungswert strebte. Der Anstieg kam zum Erliegen, wenn die membranhaltige Lösung frühzeitig aus dem Raum vor dem Sensor entfernt wurde. Die Immobilisierung der Membranstrukturen auf der festkörperunterstützten Membran ist somit irreversibel. Ein theoretisches Modell stand mit den experimentellen Kurvenverläufen in sehr gutem Einklang und konnte mit Messungen an der Quarzmikrowaage bestätigt werden. Weitere Experimente, bei denen die festkörperunterstützte Membran mit Lipiden, gelöst in verschiedenen organischen Lösungsmitteln (Alkane), hergestellt wurde, zeigten, dass für eine erfolgreiche Anlagerung nur bestimmte Lösungsmittel in Frage kommen (n-Oktan, n-Dekan und n-Dodekan). Daraus folgt, dass eine erfolgreiche Anlagerung an die Existenz eines Lösungsmittels gekoppelt ist.

Aus kultivierten CHO-Zellen, die den neuronalen Glutamattransporter EAAC1 rekombinant exprimierten, wurden EAAC1-haltigen Cytoplasmamembranen in einem Aufreinigungsschritt (Membranpräparation) gewonnen. Die derart vorliegenden Membranfragmente konnten erfolgreich auf der festkörperunterstützten Membran angelagert werden. Der EAAC1 lag in den Membranfragmenten in funktioneller Form vor. Durch die Bestimmung von Konzentrationsabhängigkeiten konnten bekannte Daten aus der Literatur bestätigt werden (Halbsättigungskonzentrationen von $K_{0,5} = 24\ \mu\text{M}$ für L-Glutamat, $K_{0,5} = 5\ \mu\text{M}$ für L-Aspartat und $K_{0,5} = 33\ \text{mM}$ für Na^+). In der Abwesenheit von Natriumionen war der EAAC1 nicht aktiv, und er konnte durch den spezifischen kompetitiven Inhibitor TBOA inhibiert werden (Inhibitionskonstante $K_i = 1\ \mu\text{M}$). Es wurde beobachtet, dass die Transportströme des EAAC1 in der Abwesenheit von Kaliumionen eine andere Kinetik aufwiesen als in der Anwesenheit von Kaliumionen, und die Affinität für L-Glutamat war in der Abwesenheit von Kaliumionen verringert ($K_{0,5} = 144\ \mu\text{M}$). Analysen der Signalformen ergaben eine reduzierte Relokationsrate, wobei es wahrscheinlich ist, dass der EAAC1 ohne Kaliumionen einen *Single-Turnover* durchführt. Eine weitere Eigenschaft des EAAC1 ist die Fähigkeit, bestimmte Anionen zu leiten. Diese Anionenleitfähigkeit ist

strikt Natriumabhängig und wird durch die Bindung von L-Glutamat getriggert. Wenn bei einem Experiment zusätzlich bestimmte Anionen (z.B. Chlorid oder Thiocyanat) anwesend waren, wies der Transportstrom des EAAC1 in der Abwesenheit von Kaliumionen eine negative Komponente auf. Diese Komponente konnte auf den Einstrom der Anionen entlang des durch den Glutamattransport aufgebauten elektrischen Gradienten zurückgeführt werden. Des Weiteren konnte die Anionenleitfähigkeit mit Anionensprüngen in der Anwesenheit von L-Glutamat und Natriumionen direkt induziert werden. Damit wurden erstmals kanalartige Ionenströme an der festkörperunterstützten Membran nachgewiesen. Der Anionenstrom wies dabei die gleiche Abhängigkeit von der L-Glutamatkonzentration auf ($K_{0,5} = 31 \mu\text{M}$) wie der Transportstrom. Der Übergang in den leitfähigen Zustand und der Transport hängt demnach von dem gleichen L-glutamatgebundenen Zustand des EAAC1 ab. Dies konnte auch unter Verwendung des Inhibitors HIP-B gezeigt werden. HIP-B wurde erstmals an EAAC1 getestet und wies eine Inhibitionswirkung auf den Transportstrom auf, die nicht auf eine kompetitive Bindung zurückzuführen war. Die Anionenleitfähigkeit ließ sich mit HIP-B hingegen nicht inhibieren.

Der bakterielle Natrium-Protonen-Austauscher NhaA lag rekonstituiert in Liposomen vor, die auf der festkörperunterstützten Membran angelagert wurden. Bedingt durch die RSO-Orientierung des NhaA, konnte der Natriumtransport entgegen der natürlichen Transportrichtung (extrazelluläre Natriumbindung) untersucht werden. Der Transportstrom wies eine ausgeprägte Abhängigkeit vom pH-Wert auf. Bei neutralen bzw. sauren pH-Werten ($\text{pH} \leq 7$) war die Aktivität des NhaA gegenüber dem alkalischen Bereich ($7 < \text{pH} < 9$) erheblich reduziert. Dieses Verhalten entspricht Literaturangaben für die Intrazellulärseite des NhaA. Dennoch war der NhaA bei einem neutralen pH-Wert nicht vollständig inaktiv. Die Affinität für Natriumionen konnte bei einem pH-Wert von 8,5 zu $K_{0,5} = 11 \text{ mM}$ und bei pH 7,0 zu $K_{0,5} = 180 \text{ mM}$ bestimmt werden. Neben einer Verringerung der Wechselzahl sinkt im neutralen/sauren Bereich also auch die Affinität für Natriumionen. Durch die Verwendung von Liposomen, in denen der NhaA mit verschiedenen Lipid- zu Protein-Verhältnissen rekonstituiert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Messströme auf die Aufladung der Liposomen zurückführbar sind. Die abklingende Signalkomponente wies dabei eine schnellere Kinetik auf, wenn die Proteindichte größer war. Die Natriumabhängigkeit bei verschiedenen pH-Werten war hingegen unabhängig von der Proteindichte in den Liposomen. Der Transportstrom konnte mit der amiloridähnlichen Substanz 2-Aminoperimidin inhibiert werden ($K_i = 3 \mu\text{M}$). Eine Inhibitionswirkung war nur zu beobachten, wenn der pH-Wert kleiner als pH 8 war. Zusammen mit der ausgeprägten pH-Wertabhängigkeit kann dieses Phänomen auf eine pH-induzierte Konformationsänderung des NhaA zurückgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Technologie auf der Basis eines Pipettierroboters mitentwickelt und charakterisiert, die es erlaubt, automatisierte Messungen mit erhöhtem Durchsatz durchzuführen. Die Sensoren wurden als Sensorarray auf der Basis einer standardisierten 96er Mikrotiterplatte realisiert. Zur Lösungshantierung kam ein Pipettierroboter zum Einsatz, der mit einer selbstentwickelten Injektionseinheit bestückt wurde. In dieser Injektionseinheit ließen sich die verwendeten Lösungen überschichten, wodurch ein Lösungswechsel von einer substratfreien zu einer substrathaltigen Lösung durchgeführt werden konnte. Mit dem beschriebenen System konnten die in dieser Arbeit behandelten Proteine EAAC1 und NhaA erfolgreich aktiviert und charakterisiert werden. Hinsichtlich der Transportaktivität wurden mit beiden Proteinen vergleichbare Ergebnisse erzielt wie mit dem manuellen Messsystem.

Literaturverzeichnis

- [1] P. W. ATKINS. *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH, 2002.
- [2] H.-J. BARTSCH. *Taschenbuch mathematischer Formeln*. Fachbuchverlag Leipzig, 1997.
- [3] GERD BENDAS, JAN VOGEL, UDO BAKOWSKI, ANNETT KRAUSE, JANA MÜLLER, UND ULRICH ROTHE. *A liposome-based model system for the simulation of lectine-induced cell adhesion*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1325:297–308, 1997.
- [4] DWIGHT E. BERGLES. *Neurotransmitter Transporters*. Encyclopedia of Life Sciences, 2001.
- [5] LARS BORRE UND BARUCH I. KANNER. *Coupled, but Not Uncoupled, Fluxes in a Neuronal Glutamate Transporter Can Be Activated by Lithium Ions*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44):40396–40401, November 2001.
- [6] LARS BORRE, MICHAEL P. KAVANAUGH, UND BARUCH I. KANNER. *Dynamic Equilibrium between Coupled and Uncoupled Modes of a Neuronal Glutamate Transporter*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:13501–13507, apr 2002.
- [7] CHRISTOPHER L. BRETT, MARK DONOWITZ, UND RAJINI RAO. *Evolutionary origins of eucaryotic sodium/proton exchangers*. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 288:223–239, February 2005.
- [8] GERHARD BURCKHARDT, FRANCESCA DI SOLE, UND CORINNA HELMLE-KOLB. *The Na⁺/H⁺ exchanger family*. *Journal of Nephrology*, 15(suppl. 5):3–21, 2002.
- [9] CHRISTIANE BURZIK, GEORG KAIM, PETER DIMROTH, ERNST BAMBERG, UND KLAUS FENDLER. *Charge Displacement during ATP-Hydrolysis and Synthesis of the Na⁺-Transporting F₀F₁-ATPase of *Ilyobacter tartaricus**. *Biophysical Journal*, 85:2044–2054, September 2003.
- [10] FIORENZO CONTI, SILVIA DEBIASI, ANDREA MINELLI, JEFFREY D. ROTHSTEIN, UND MARCELLO MELONE. *EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex*. *Cerebral cortex*, 8(2):108–116, March 1998.
- [11] NIELS C. DANBOLT. *Glutamate uptake*. *Progress in Neurobiology*, 65:1–105, 2001.
- [12] J. R. DEL CASTILLO UND J. W. ROBINSON. *The simultaneous preparation of basolateral and brush-border membrane vesicles from guinea-pig intestinal epithelium, and the determination of the orientation of the basolateral vesicles*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 688(1):45–56, May 1982.
- [13] A. DÉR UND L. KESZTHELYI. *Charge Motion during the Photocycle of Bacteriorhodopsin*. *Biochemistry (Moscow)*, 66(11):1234–1248, 2001.
- [14] PAVEL DIBROV, RIMON ABRAHAM, JUDITH DZIOBA, ARTHUR WINOGRODZKI, YECHIEL SHALITIN, UND ETANA PADAN. *2-Aminoperimidine, a specific inhibitor of bacterial NhaA Na⁺/H⁺ antiporters*. *FEBS Letters*, 579:373–378, 2005.
- [15] L. A. DOWD, A. J. COYLE, J. D. ROTHSTEIN, D. B. PRITCHETT, UND ROBINSON M. B. *Comparison of Na⁺-dependent glutamate transport activity in synaptosomes, C6 glioma, and *Xenopus* oocytes expressing excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1)*. *Molecular Pharmacology*, 49(3):465–473, 1996.
- [16] ALBERT EINSTEIN. *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen*. *Annalen der Physik*, 17:549–560, 1905.

- [17] G. ENGELN-MÜLLGES UND F. REUTTER. *Formelsammlung zur Numerischen Mathematik mit QuickBASIC-Programmen*. B.I. Wissenschaftsverlag, 1991.
- [18] SEPEHR ESKANDARI, MICHAEL KREMAN, MICHAEL P. KAVANAUGH, ERNEST M. WRIGHT, UND GUIDO A. ZAMPIGHI. *Pentameric assembly of a neuronal glutamate transporter*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(15):8641–8646, July 2000.
- [19] W. A. FAIRMAN, R. J. VANDENBERG, J. L. ARRIZA, M. P. KAVANAUGH, UND S. G. AMARA. *An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel*. Nature, 375:599–603, June 1995.
- [20] K. FENDLER, S. JARUSCHEWSKI, A. HOBBS, W. ALBERS, UND J. P. FROEHLICH. *Pre-steady-state charge translocation in NaK-ATPase from eel electric organ*. The Journal of General Physiology, 102(4):631–666, 1993.
- [21] CYRUS H. FISKE UND YELLAPRAGADA SUBBAROW. *The colorimetric determination of phosphorus*. The Journal of Biological Chemistry, 66:375–400, 1925.
- [22] L. FLIEGEL, Editor. *The Na⁺/H⁺ Exchanger*. Springer/R.G. Landes Company, Austin, 1996.
- [23] UNIVERSITÄT ZÜRICH INSTITUT FÜR VETERINÄRPHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE. *cl-nipharm — wirkstoffdatenbank - amilorid*, 2006. [Online; Stand 27. Februar 2006].
- [24] MARCELLA FUNICELLO, PAOLA CONTI, MARCO DE AMICI, CARLO DE MICHELI, TIZIANA MENNINI, UND MARCO GOBBI. *Dissociation of β H/L-Glutamate Uptake from L-Glutamate-Induced β H/D-Aspartate release by 3-Hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]isoxazole-4-carboxylic Acid and 3-Hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]isoxazole-6-carboxylic Acid, Two Conformationally Constrained Aspartate and Glutamate Analogs*. Molecular Pharmacology, 66(3):522–529, 2004.
- [25] YORAM GERCHMAN, RIMON ABRAHAM, UND ETANA PADAN. *A pH-dependent Conformational Change of NhaA Na⁺/H⁺ Antiporter of Escherichia coli Involves Loop VIII-IX, Plays a Role in the pH Response of the Protein, and Is Maintained by the Pure Protein in Dodecyl Maltoside*. The Journal of Biological Chemistry, 274(35):24617–24624, August 1999.
- [26] YORAM GERCHMAN, YAEL OLAMI, ABRAHAM RIMON, DANIEL TAGLICHT, SHIMON SCHULDINER, UND ETANA PADAN. *Histidine-226 is part of the pH sensor of NhaA, a Na⁺/H⁺ antiporter in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1212–1216, February 1993.
- [27] CHRISTOF GREWER, SAYED ABDOLLAH MADANI MOBAREKEH, NATALIE WATZKE, THOMAS RAUEN, UND KLAUS SCHAPER. *Substrate Translocation Kinetics of Excitatory Amino Acid Carrier 1 Probed with Laser-Pulse Photolysis of a New Photolabile Precursor of D-Aspartic Acid*. Biochemistry, 40(1):232–240, 2001.
- [28] CHRISTOF GREWER, NATALIE WATZKE, MICHAEL WIESSNER, UND THOMAS RAUEN. *Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(17):9706–9711, August 2000.
- [29] T. GROPP, N. BRUSTOVETSKY, M. KLINGENBERG, V. MULLER, K. FENDLER, UND E. BAMBERG. *Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier*. Biophysical Journal, 77(2):714–726, 1999.
- [30] MYRIAM GRUNEWALD UND BARUCH I. KANNER. *The Accessibility of a Novel Reentrant Loop of the Glutamate Transporter GLT-1 Is Restricted by Its Substrate*. The Journal of Biological Chemistry, 275(13):9684–9689, March 2000.
- [31] ROLANDO GUIDELLI, GIOVANNI ALOISI, LUCIA BECUCCI, ANDREA DOLFI, MARIA ROSA MONCELLI, UND FRANCESCO TADINI BUONINSEGNI. *Bioelectrochemistry at metal/water interfaces*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 504:1–28, 2001.
- [32] C. H. HAMANN UND W. VIELSTICH. *Elektrochemie*. Wiley-VCH, 1998.
- [33] Y. HE, P. R. HOF, W. G. JANSSEN, J. D. ROTHSTEIN, UND J. D. MORRISON. *Differential synaptic localization of GluR2 and EAAC1 in the macaque monkey entorhinal cortex: a postembedding immunogold study*. Neuroscience Letters, 311(3):161–164, October 2001.

- [34] Y. HE, W. G. JANSSEN, J. D. ROTHSTEIN, UND J. D. MORRISON. *Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus*. The Journal of Comparative Neurology, 418(3):255–269, March 2000.
- [35] M. A. HEDIGER UND T.C. WELBOURNE. *Introduction: Glutamate transport, metabolism, and physiological responses*. American Journal of Physiology, 277(Renal Physiology 46):F477–F480, 1999.
- [36] MATTHIAS A. HEDIGER. *Glutamate transporters in kidney and brain*. American Journal of Physiology, 277(Renal Physiology 46):F487–F492, 1999.
- [37] KATRIN G. HEINZE. *Floureszenz-Korrelations-Spektroskopie und Zweiphotonenanregung in der biomolekularen Analytik*. Dissertation, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, 2002.
- [38] R. HOLZE. *Leitfaden der Elektrochemie*. Teubner, 1998.
- [39] CAROLA HUNTE, EMANUELA SCREPANTI, MIRO VENTURI, ABRAHAM RIMON, ETANA PADAN, UND HARTMUT MICHEL. *Structure of a Na^+/H^+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH*. Nature, 435(30):1197–1202, June 2005.
- [40] HIROKI INOUE, TAKATO NOUMI, TOMOFUSA TSUCHIYA, UND HIROSHI KANAZAWA. *Essential aspartic acid residues, Asp-133, Asp-163 and Asp-164, in the transmembran helices of a Na^+/H^+ antiporter (NhaA) from Escherichia coli*. FEBS Letters, 363:264–268, 1995.
- [41] ANDREAS JANSHOFF, HANS-JOACHIM GALLA, UND CLAUDIA STEINEM. *Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik - eine Alternative zu optischen Biosensoren?* Angewandte Chemie, 112:4164–4195, 2000.
- [42] YOSHIKATSU KANAI UND MATTHIAS A. HEDIGER. *The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications*. European Journal of Pharmacology, 479:237–247, 2003.
- [43] YOSHIKATSU KANAI UND MATTHIAS A. HEDIGER. *The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects*. Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol., 447:469–479, 2004.
- [44] CHRISTIAN KANDT. *Zheoretische Untersuchungen integraler photosynthetischer Membranproteine*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, 2003.
- [45] M. KARMAZIN, N. AVKIRAN, UND L. FLIEGEL, Editoren. *The Sodium-Hydrogen Exchange, from Molecule to its Role in Disease*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 2003.
- [46] C. A. KELLER UND B. KASEMO. *Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quarz Crystal Microbalance*. Biophysical Journal, 75:1397–1402, September 1998.
- [47] LAJOS KESZTHELYI UND PÁL ORMOS. *Protein electric response signals from dielectric polarized systems*. Journal of Membrane Biology, 109(3):193–200, August 1989.
- [48] PETER LÄUGER. *Electrogenic Ion Pumps*. Sinauer Associates, Inc., 1991.
- [49] BARBARA H. LEIGHTON, REBECCA P. SEAL, KEIKO SHIMAMOTO, UND SUSAN G. AMARA. *A Hydrophobic Domain in Glutamate Transporters Forms an Extracellular Helix Associated with the Permeation Pathway for Substrates*. The Journal of Biological Chemistry, 277(38):29847–29855, August 2002.
- [50] MAIK LIEBAU. *Resonante Quarzsensoren zum Nachweis von Wechselwirkungen supramolekularer Systeme*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1998.
- [51] PETER H. LIN, RICHARD SELINFREUND, ERIC WAKSHULL, UND WALKER WHARTON. *Rapid and Efficient Purification of Plasma Membrane from Cultured Cells: Characterization of Epidermal Growth Factor Binding*. Biochemistry, 26:731–736, 1987.
- [52] D. MAGDE, E. L. ELSON, UND W. W. WEBB. *Fluorescence correlation spectroscopy. 1. Conceptual basis and theory*. Biopolymers, 13:1–27, 1974.
- [53] D. MAGDE, E. L. ELSON, UND W. W. WEBB. *Fluorescence correlation spectroscopy. 2. Experimental realization*. Biopolymers, 13:29–61, 1974.

- [54] PAÏKAN MARCAGGI UND DAVID ATWELL. *Role of Glial Amino Acid Transporters in Synaptic Transmission and Brain Energetics*. GLIA, 47:217–225, 2004.
- [55] BRIAN S. MELDRUM. *Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology*. The Journal of Nutrition, 130(4S Suppl):1007S–1015S, April 2000.
- [56] ULRICH MESETH, THORSTEN WOHLAND, RUDOLF RIGLER, UND HORST VOGEL. *Resolution of Fluorescence Correlation Measurements*. Biophysical Journal, 76:1619–1631, March 1999.
- [57] K. MEYER-LIPP, C. GANEA, T. POURCHER, G. LEBLANC, UND K. FENDLER. *Sugar binding induced charge translocation in the melibiose permease from Escherichia coli*. Biochemistry, 43(39):12606–12613, October 2004.
- [58] G. NAGEL, B; KELETY, B. MÖCKEL, G. BÜLDT, UND E. BAMBERG. *Voltage Dependence of Proton Pumping by Bacteriorhodopsin Is Regulated by the Voltage-Sensitive Ratio of M_1 to M_2* . Biophysical Journal, 74:403–412, January 1998.
- [59] Y. V. NATOCHIN. *Mechanisms of drugs action on ion and water transport in renal tubular cells*. Progress in Drug Research, 26:87–142, 1982.
- [60] DIETER OESTERHELT UND WALTHER STOECKENIUS. *Functions of a New Photoreceptor Membrane*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70(10):2853–2857, October 1973.
- [61] YAEL OLAMI, ABRAHAM RIMON, YORAM GERCHMAN, ANDREA ROTHMAN, UND ETANA PADAN. *Histidine 225, a Residue of the NhaA- Na^+ / H^+ Antiporter of Escherichia coli Is Exposed and Faces the Cell Exterior*. The Journal of Biological Chemistry, 272(3):1761–1768, January 1997.
- [62] MANUEL PALACÍN, RAÚL ESTÉVEZ, JOAN BERTRAN, UND ANTONIO ZORZANO. *Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters*. Physiological Reviews, 78(4):969–1054, October 1998.
- [63] MONICA PALMADA UND JOSEP JOAN CENTELLES. *Excitatory Amino Acid Neurotransmission. Pathways for Metabolism, Storage and Reuptake of Glutamate in Brain*. Frontiers in Bioscience, pages 701–718, July 1998.
- [64] JÜRGEN PINTSCHOVIVUS. *Entwicklung und Charakterisierung einer neuen Fließinjektionstechnik sowie deren Anwendung zum Studium der Funktion der Na^+ / K^+ -ATPase*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 1997.
- [65] JÜRGEN PINTSCHOVIVUS UND KLAUS FENDLER. *Charge Translocation by the Na^+ / K^+ -ATPase Investigated on Solid Supported Membranes: Rapid Solution Exchange with a New Technique*. Biophysical Journal, 76:814–826, February 1999.
- [66] ANNE L. PLANT, MANANA GUEGUETCHKERI, UND WILLIAM YAP. *Supported Phospholipid/Alkanethiol Biomimetic Membranes: Insulating Properties*. Biophysical Journal, 67:1126–1133, September 1994.
- [67] MICHAEL W. QUICK, Editor. *Transmembrane Transporters*. Wiley-Liss, Inc., 2002.
- [68] ULF RÄDLER, JÜRGEN MACK, NORBERT PERSIKE, GÜNTHER JUNG, UND ROBERT TAMPÉ. *Design of Supported Membranes Tethered via Metal-Affinity Ligand-Receptor Pairs*. Biophysical Journal, 79:3144–3152, December 2000.
- [69] W. R. REDWOOD, F. R. PFEIFFER, J.A. WEISBACH, UND T. E. THOMPSON. *Physical properties of bilayer membranes formed from a synthetic saturated phospholipid in n-decane*. Biochimica et Biophysica Acta, 233:1–6, 1971.
- [70] ABRAHAM RIMON, YORAM GERCHMAN, ZEHAVIT KARIV, UND ETANA PADAN. *A point mutation (G338S) and its suppressor mutations affect both the pH response of the NhaA- Na^+ / H^+ antiporter as well as the growth phenotype of Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, 273:26470–26476, 1998.
- [71] ABRAHAM RIMON, YORAM GERCHMAN, YAEL OLAMI, SHIMON SCHULDINER, UND ETANA PADAN. *Replacements of Histidine 226 of NhaA- Na^+ / H^+ Antiporter of Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, 270(45):26813–26817, November 1995.

- [72] ANDREA ROTHMAN, YORAM GERCHMAN, ETANA PADAN, UND SHIMON SCHULDINER. *Probing the Conformation of NhaA, a Na^+/H^+ Antiporter from Escherichia coli, with Trypsin*. Biochemistry, 36:14672–14576, 1997.
- [73] ANDREA ROTHMAN, ETANA PADAN, UND SHIMON SCHULDINER. *Topological Analysis of NhaA, a Na^+/H^+ Antiporter from Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, 271(50):32288–32292, December 1996.
- [74] PETRA SCHWILLE UND ELKE HAUSSTEIN. Fluorescence correlation spectroscopy - an introduction to its concepts and applications. Technical report, Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, 2001.
- [75] KARSTEN SEIFERT. *Herstellung, Charakterisierung und Anwendung festkörperunterstützter Lipidmembranen*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 1994.
- [76] KARSTEN SEIFERT, KLAUS FENDLER, UND ERNST BAMBERG. *Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes*. Biophysical Journal, 64:384–391, February 1993.
- [77] JEHUDA P. SEPKUTY, AKIVA S. COHEN, CHRISTINE ECCLES, AZHAR RAFIQ, KEVIN BEHAR, RAQUELI GANEL, DOUGLAS A. COULTER, UND JEFFREY D. ROTHSTEIN. *A Neuronal Glutamate Transporter Contributes to Neorotransmitter GABA Synthesis and Epilepsy*. The Journal of Neuroscience, 22(15):6372–6379, August 2002.
- [78] DIRK JAN SLOTBOOM, WIL N. KONINGS, UND JUKE S. LOKEMA. *Structural Features of the Glutamate Transporter Family*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63(2):293–307, June 1999.
- [79] DIRK JAN SLOTBOOM, WIL N. KONINGS, UND JUKE S. LOKEMA. *The structure of glutamate transporters shows channel-like features*. FEBS Letters, 492:183–186, 2001.
- [80] THOMAS W. SOUTHWORTH, ARTHUR A. GUFFANTI, ANNE MOIR, UND TERRY A. KRULWICH. *GerN, an Endospore Germination Protein of Bacillus cereus, Is an $\text{Na}^+/\text{H}^+-\text{K}^+$ Antiporter*. Journal of Bacteriology, 183(20):5896–5903, October 2001.
- [81] MICHAEL E. STARZAK. *The Physical Chemistry of Membranes*. Academic Press, Inc., 1984.
- [82] CLAUDIA STEINEM, ANDREAS JANSHOFF, HANS-JOACHIM GALLA, UND MANFRED SIEBER. *Impedance analysis of ion transport through gramicidin channels incorporated in solid supported lipid bilayers*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 42:213–220, 1997.
- [83] CLAUDIA STEINEM, ANDREAS JANSHOFF, WOLF-PETER ULRICH, MANFRED SIEBER, UND HANS-JOACHIM GALLA. *Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: a scrutiny of different preparation techniques*. Biochimica et Biophysica Acta, 1279:169–180, 1996.
- [84] M. STENGELIN, K. FENDLER, UND E. BAMBERG. *Kinetics of transient pump currents generated by the (H,K)-ATPase after an ATP concentration jump*. The Journal of Membrane Biology, 132(3):211–217, 1993.
- [85] LUBERT STRYER. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin New York, 1991.
- [86] DANIEL TAGLICHT, ETANA PADAN, UND SHIMON SCHULDIGER. *Proton-Sodium Stoichiometry of NhaA, an Electrogenic Antiporter from Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, 268(8):5382–5387, March 1993.
- [87] DANIEL TAGLICHT, ETANA PADAN, UND SHIMON SCHULDINER. *Overproduction and Purification of a Functional Na^+/H^+ Antiporter Coded by nhaA (ant) from Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, 266(17):11289–11294, June 1991.
- [88] PAUL A. TIPLER. *Physik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford, 1995.
- [89] TZVI TZUBERY, ABRAHAM RIMON, UND ETANA PADAN. *Mutation E252C Increases Drastically the K_m Value for Na^+ and Causes an Alkaline Shift of the pH Dependence of NhaA Na^+/H^+ Antiporter of Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, 279(5):3265–3272, January 2004.
- [90] HELMUT VOGEL. *Gerthsen Physik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1995.

- [91] JACQUES I. WADICHE UND MICHAEL P. KAVANAUGH. *Macroscopic and Microscopic Properties of a Glutamate Transporter/Chloride Channel*. The Journal of Neuroscience, 18(19):7650–7661, October 1998.
- [92] NATALIE WATZKE. *Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des neuronalen Glutamatransporters EAAC1*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 2001.
- [93] NATALIE WATZKE, THOMAS RAUEN, ERNST BAMBERG, UND CHRISTOF GREWER. *On the Mechanism of Proton Transport by the Neuronal Excitatory Amino Acid Carrier 1*. The Journal of general physiology, 116:609–621, November 2000.
- [94] CHRISTINE A. WIEBE, EMILY R. DiBATTISTA, UND LARRY FLIEGEL. *Functional role of polar amino acid residues in Na^+/H^+ exchangers*. Biochemical Journal, 357:1–10, 2001.
- [95] WIKIPEDIA. Arzneimittel — wikipedia, die freie enzyklopädie, 2006. [Online; Stand 14. März 2006].
- [96] WIKIPEDIA. Bacteriorhodopsin — wikipedia, die freie enzyklopädie, 2006. [Online; Stand 11. März 2006].
- [97] WIKIPEDIA. Eulersches polygonzugverfahren — wikipedia, die freie enzyklopädie, 2006. [Online; Stand 2. Februar 2006].
- [98] KAREN A. WILLIAMS. *Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA*. Nature, 403:112–115, January 2000.
- [99] KAREN A. WILLIAMS, ULRIKE GELDMACHER-KAUFER, ETANA PADAN, SHIMON SCHULDINER, UND WERNER KÜHLBRANDT. *Projection structure of NhaA, a secondary transporter from Escherichia coli, at 4.0 Å resolution*. The EMBO Journal, 18(13):3558–3563, 1999.
- [100] I. WILLNER UND E. KATZ. *Redoxproteinschichten auf leitenden Trägern - Systeme für biochemische Anwendungen*. Angewandte Chemie, 112:1230–1269, 2000.
- [101] ATSUKO YAMASHITA, SATINDER K. SINGH, TOSHIMITSU KAWATE, YAN JIN, UND ERIC GOUAUX. *Crystal structure of a bacterial homologue of Na^+/Cl^- -dependent neurotransmitter transporters*. Nature, 437:215–223, September 2005.
- [102] DINESH YERNOOL, OLGA BOUDKER, JAN JIN, UND ERIC GOUAUX. *Structure of a glutamate transporter homologue from Pyrococcus horikoshii*. Nature, 431:811–818, October 2004.
- [103] JI-HU ZHANG, THOMAS D. Y. CHUNG, UND KEVIN R. OLDENBURG. *A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assay*. Journal of Biomolecular Screening, 4(2):67–73, 1999.
- [104] A. ZHOU, A. WOZNIAK, K. MEYER-LIPP, M. NIETSCHKE, H. JUNG, UND K. FENDLER. *Charge translocation during cosubstrate binding in the $\text{Na}^+/\text{proline}$ transporter of E.coli*. Journal of Molecular Biology, 343(4):931–942, October 2004.
- [105] DIRK ZUBER, ROBIN KRAUSE, MIRO VENTURI, ETANA PADAN, ERNST BAMBERG, UND KLAUS FENDLER. *Kinetics of charge translocation in the passive downhill uptake mode of the Na^+/H^+ antiporter NhaA of Escherichia coli*. Biochimica et Biophysica Acta, 1709:240–250, 2005.

Danksagungen

Mein Dank gilt allen denjenigen, die mich bei der Durchführung dieser Doktorarbeit wissenschaftlich und moralisch unterstützt haben. Insbesondere danke ich...

... Prof. Dr. Ernst Bamberg für die Möglichkeit die Doktorarbeit in Kooperation mit dem MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIK in Frankfurt durchzuführen.

... Prof. Dr. Klaus Fendler für die wissenschaftliche Betreuung der Doktorarbeit, den Kuchen bei den Besprechungen und die stetige Diskussionsbereitschaft.

... Dr. Thiemo Gropp und Dr. Béla Kelety für die Möglichkeit die Doktorarbeit bei der IONGATE BIOSCIENCES GMBH in Frankfurt durchzuführen.

... den Mitarbeitern der IONGATE BIOSCIENCES GMBH in Frankfurt, insbesondere Dr. Wolfgang Dörner dafür, dass er mich beim „googeln“ im Internet gefunden hat, Dipl.-Ing. Frank Czepan für die innovativen Kaffeepausen, Dr. Kerstin Diekert für die unkomplizierte Einweisung in biochemische Methoden, sowie Dr. Natalie Watzke, Dr. Andreas Haase, Joanna Tobien, Dipl.-Ing. Nicolas Minary und Dr. Petr Obrdlik.

... der Betriebssportgruppe der IONGATE BIOSCIENCES GMBH in Frankfurt, an der sich neben anderen bereits erwähnten Personen auch Wolf Berger, Guido Schlitzer, Dr. Maarten Ruitenbergh, Dipl.-Ing. Anja Knecht, Joachim Englert, Dr. Ulrich Pehl und Dr. Stefan Schork beteiligten.

... dem SSM-Team der Abteilung Biophysikalische Chemie des MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIK in Frankfurt, insbesondere Lina Hatahet für die Zusammenarbeit bei den leider nicht erfolgreichen Messungen an der „Black-Lipid-Membrane“ sowie Prof. Dr. Constanta Ganea, Dr. Kerstin Meyer-Lipp, Dr. Aihua Zhou, Dr. Christian Bamann, Olga Gaiko, Dr. Ingo Janusch und Dirk Zuber.

... Dr. Winfried Haase vom MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIK in Frankfurt für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder der Membranfragmente und Liposomen.

... Dipl.-Ing. Andreas Best vom MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR POLYMERFORSCHUNG in Mainz für die Zusammenarbeit und die Einweisung in das konfokale Mikroskop.

... Dr. Eike Lüthgens von der GUTHENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ für die Zusammenarbeit und die Einweisung in die Quarzmikrowaage.

... Prof. Dr. Bernd Ludwig von der JOHANN WOLFGANG GOETHE UNIVERSITÄT FRANKFURT für die Bereitschaft, als Zweitgutachter zur Verfügung zu stehen.

... meinen Schwiegereltern Dr. Barbara Block und Dr. Hans-Dieter Block für die Unterstützung während der Doktorarbeit und die grammatikalische Korrektur des vorliegenden Manuskripts.

... meinen Eltern Dipl.-Ing. Friedrich Hans Krause und Dipl.-Soz. Barbara Krause für die Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit sowie für die Möglichkeit meinen Werdegang selbstständig zu gestalten.

... meiner Frau Dipl.-Ing. Kirstin Block und meinem Sohn Ron Robinson Block für die Unterstützung, die Entbehrungen und das Verständnis während der Phase des Zusammenschreibens.

Lebenslauf

Name: Robin Krause
Geboren: 05.01.1975 in Bochum
Wohnort: Untere Rützelstr. 1a, 65933 Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1981-1985 Grundschule in Bochum
1985-1993 Erich Kästner-Gesamtschule in Bochum
1993-1996 dreijährige höhere Berufsfachschule in Dortmund
Abschluss elektrotechnischer Assistent/Fachhochschulreife

Zivildienst

1996-1997 medizinisch-technische Abteilung St. Josef-Hospital
Bochum

Hochschulbildung

1997-2002 Studium Physikalische Technik, Schwerpunkt
Biomedizinische Technik an der Fachhochschule
Aachen, Abt. Jülich
Abschluss Dipl.-Ing. (FH)
seit 2002 Promotion am Max-Planck-Institut für Biophysik in
Frankfurt unter Betreuung von Prof. Dr. Klaus Fendler
in Kooperation mit der IonGate Biosciences GmbH