

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. Thomas Gudermann

**KATIONENPERMEABILITÄT VON ERYTHROZYTEN
BEI NIEDRIGER IONENSTÄRKE IN ABHÄNGIGKEIT
BESTIMMTER ANIONEN UND INHIBITOREN UNTER
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES GLUCOSE-
TRANSPORTERS**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Florian Bruness, geb. Götzky
aus Siegen

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am: 16.10.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. G. F. Fuhrmann

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Daut

für Christina, Jonathan und Maria

1	EINLEITUNG	1
1.1	Osmose und Diffusion als Grundlage der Permeabilität.....	1
1.2	Ionenpermeabilität an künstlichen Membranen.....	3
1.3	Selektive Ionenpermeabilität der Erythrozyten.....	5
1.3.1	Das Festladungskonzept der Membranporen.....	5
1.3.2	Membranleitfähigkeit.....	10
1.4	Anionentransport.....	11
1.5	Ziele der Arbeit.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1	AUFBEREITUNG DES BLUTES	14
2.2	Bestimmung des Kalium- und Natrium-Efflux aus Erythrozyten	14
2.2.1	verwendete Versuchslösungen	14
2.2.2	Durchführung der Versuche	16
2.2.3	Bearbeitung der Proben.....	16
2.2.4	Bestimmung des Kalium-, Natrium und Hämoglobingehaltes der Erythrozyten.....	16
2.3	Statistische Auswertung.....	17
2.4	Bestimmung des Volumens von Erythrozyten mit der Hilfe der Streulichtapparatur.....	20
2.4.1	Prinzip der Streulichtapparatur.....	20
2.4.2	Messung des Glucoseaustritts aus Erythrozyten mit Hilfe der Streulichtapparatur	22
2.5	Verwendete Materialien und Geräte	23
2.5.1	Reagenzien	23
2.5.2	Technische Hilfsmittel	25

3	ERGEBNISSE	26
3.1	Abhängigkeit des Ausstroms der Kalium- und Natriumionen von der Konzentration verschiedener Anionen bei niedriger Ionenstärke unter Anwesenheit von EDTA und pH 7.4	26
3.2	Einfluss der Pufferkonzentration auf den Kationen-Efflux	35
3.3	Glucose anstelle von Sorbitol als Nichtelektrolyt	38
3.4	Sorbitol und Glucose als Versuchsmedium	40
3.5	Beeinflussung des Kationen-Efflux durch Hemmstoffe des Anionentransporters	42
3.5.1	DIDS als Hemmstoff des Bande-3-Proteins.....	42
3.5.2	Phenylglyoxal als Hemmstoff.....	47
3.6	SDS als Aktivator des Kationen-Efflux	50
4	DISKUSSION	54
5	ZUSAMMENFASSUNG	64
6	LITERATURVERZEICHNIS	69
7	ROHDATEN	74
8	ANHANG	91
8.1	Lebenslauf	91
8.2	Akademische Lehrer	93
8.3	Danksagung	94

1 Einleitung

1.1 Osmose und Diffusion als Grundlage der Permeabilität

Sowohl an pflanzlichen als auch an tierischen Membranen wurden schon früh Beobachtungen über Osmose und Diffusion von kleinen Molekülen gemacht. Vor etwa 150 Jahren galt bereits die sich daraus ableitende Membranpermeabilität als besonderes Charakteristikum der Zellmembran. In der systematischen Erforschung der Permeabilität ging man jedoch zunächst von künstlichen Membranen aus. Sie bieten den Vorzug einer homogenen Struktur und unterliegen keinen physiologischen Schwankungen.

M. Traube untersuchte 1864 eine Niederschlagsmembran aus Kupfersulfat und Ferrozyankalium, die zwar wasserdurchlässig ist, aber größere Moleküle nicht passieren lässt [Traube64]. Diese Membran bildete die Grundlage für W. Pfeffers osmotische Untersuchungen [Pfeffer77]. Das herausgestellte Prinzip eines Zweikammersystems, getrennt durch eine semipermeable Membran (Osmometer), führte zu der Annahme, dass die Anzahl der Moleküle einer Lösung eine Arbeit leisten, die durch das Produkt von Druck und Volumen bestimmt wird. Wird das eine Volumen des Zweikammersystems, über das die Arbeit geleistet wird, im Sinne eines Steigrohrs an einem Manometer sehr klein gehalten, so ist die geleistete Arbeit ein direktes Maß für den osmotischen Druck. Auf diese Weise wurde zum einen entdeckt, dass der osmotische Druck von der Konzentration und der Temperatur der Lösungen abhängig ist, und zum anderen, dass stark verdünnte Lösungen sich entsprechend dem Gasgesetz verhalten [van't Hoff87].

Der Ausgleich des osmotischen Druckes erfolgt durch Diffusion. Bei der freien Diffusion verläuft die Bewegung in Richtung des Konzentrationsgefälles. A. Fick kam zu folgender Gesetzmäßigkeit [Fick55]:

$$dm/(dt \cdot q) = (D/dx) \cdot dC = P \cdot C$$

dabei sind:	dm	Anzahl der diffundierenden Moleküle
	dt	Zeitabschnitt [sec]
	q	Membranoberfläche [cm ²]
	D	Diffusionskoeffizient [cm ² /sec]
	dx	diffundierte Strecke der Membran [cm]
	dC	Konzentrationsunterschied
	P	Permeabilitätskonstante [cm/sec]

Der Flux ($dm/(dt \cdot q)$) beschreibt die Anzahl der Moleküle, die in einer bestimmten Zeiteinheit die Membranflächeneinheit durchwandern.

Der Influx (F_i) ist der Einstrom der Moleküle in die Zelle:

$$F_i = P \cdot C_e \quad C_e \quad \text{extrazelluläre Konzentration}$$

Der Efflux (F_e) ist der Ausstrom der Moleküle aus der Zelle:

$$F_e = P \cdot C_i \quad C_i \quad \text{intrazelluläre Konzentration}$$

Die Differenz zwischen Influx und Efflux ist der Nettoflux (F_n), die effektive Konzentrationsveränderung.

$$F_n = P \cdot \Delta C \quad \Delta C \quad \text{Konzentrationsdifferenz}$$

Doch schon bald hat sich gezeigt, dass die Diffusion auch von der elektrischen Ladung der Moleküle, der Molekülgröße selbst und dem Löslichkeitsverhalten beeinflusst wird. Hinzu kommt noch, dass bei natürlichen Zellmembranen die verschiedensten speziellen Transportersysteme die Permeabilität eines Plasmalemmes beeinflussen.

1.2 Ionenpermeabilität an künstlichen Membranen

L. Michaelis, Begründer der Enzymkinetik, hat sich als einer der ersten systematisch mit dem Problem der Ionenpermeabilität durch Membranen beschäftigt. Ausgehend von Permeabilitätsuntersuchungen an physiologischen Objekten, wie z.B. der Apfelschale, fanden er und A. Fujita [Fujita25], in Fortführung der Arbeiten von J. Loeb und R. Beutner [Loeb12], heraus, dass die Apfelschale für Kationen permeabel, für Anionen aber impermeabel ist. Dies galt auch für das fettlösliche Aceton. Dieses Verhalten konnte weder mit der Lipoidtheorie von Ch. E. Overton [Overton26], noch mit der Haftdrucktheorie von I. Traube oder mit der reinen Molekularsiebtheorie von M. Traube in Einklang gebracht werden [Traube26]. Nur A. Nathansons Mosaiktheorie, in dessen Versuchsanordnung die Membran mosaikartig aus lipoiden und aus nichtlipoiden Bezirken zusammengesetzt sein soll, bot eine mögliche Erklärung der Beobachtungen [Nathanson26]. Man musste also bei physiologischen Membranen von komplexen Strukturen ausgehen. Deshalb erschienen die Zellmembranen L. Michaelis noch ungeeignet, um an ihnen die Gesetzmäßigkeiten der Permeabilität zu erforschen [Michaelis26].

Seine Konsequenz daraus war, sich künstlichen Membranen zuzuwenden. Es gelang ihm sehr bald eine künstliche Membran herzustellen, die nach seiner Ansicht ein getreues Abbild der Apfelschale war. Sie zeigte wie diese eine selektive Kationendurchlässigkeit bei vollständiger Anionenimpermeabilität.

Eine solche Membran entsteht, indem man zuerst Nitrozellulose in Äther-Alkohol löst. Durch die Verdunstung des Lösungsmittels bildet sich allmählich eine feine zusammenhängende Membran, die sogenannte Kollodiummembran. Durch Berührung mit Wasser „koaguliert“ sie sofort und zeichnet sich zunächst durch eine hohe Durchlässigkeit aus. L. Michaelis Modifikation bestand darin, dass er die Membran vor der Wässerung bis zur vollständigen Konstanz austrocknete. Diese eingeschrumpfte Kollodiummembran galt vor L. Michaelis als völlig undurchlässig für Wasser und für alle gelösten Stoffe, da selbst nach wochenlanger Beobachtungszeit kein Durchtritt von Ionen einer HCl- oder KCl-Lösung durch die Membran in reines Wasser erfolgte. Wenn man aber eine HCl- und eine KCl-Lösung durch die Membran trennt, so findet sehr wohl eine langsam fortschreitende Diffusion statt. Nach 1 bis 2 Tagen beginnt die KCl-Lösung sauer zu werden und auch K^+ -Ionen sind in der HCl-Lösung nachweisbar. Lässt man KCl gegen

NaCl diffundieren, so penetrieren nach geraumer Zeit K^+ -Ionen in die NaCl-Lösung und umgekehrt Na^+ -Ionen in die KCl-Lösung. Gegenüber reines Wasser erscheinen dagegen sowohl KCl wie NaCl als völlig undurchlässig. Untersucht man das Diffusionsverhalten bei Lösungen mit gleichen Kationen, aber unterschiedlichen Anionen, so ist keine Anionenpermeabilität festzustellen.

Schon diese einfachen Versuche dokumentieren eine selektive Kationendurchlässigkeit bei fehlender Anionenpermeabilität der Kollodiummembran. Diese Eigenschaft wurde noch zusätzlich durch folgende, sehr empfindliche potentiometrische Versuche bestätigt. Wenn man z.B. eine 0.1M und eine 0.01M HCl-Lösung durch eine solche Kollodiummembran trennt, so ist die verdünntere Lösung in der Regel um 50 Millivolt positiver. Das entspricht ungefähr dem Wert von 57 Millivolt, den man nach der Nernst'schen Gleichung erwarten muss, wenn die Membran für H^+ -Ionen durchlässig und für Cl^- -Ionen undurchlässig ist. Auch eine Kette mit 0.1M und 0.01M KCl ergibt praktisch genau dieselbe Potentialdifferenz, nämlich in der Regel 45 bis 52 Millivolt. Dasselbe gilt für alle Konzentrationsketten mit einem Salz, welches aus einem beliebigen einwertigen Kation und einem Anion von beliebiger Wertigkeit besteht.

In gleicher Weise konnte die Impermeabilität für Anionen durch die Kollodiummembran mit Hilfe von potentiometrischen Versuchen belegt werden. Werden zwei Lösungen mit gleicher Konzentration, gleichem Kation, aber unterschiedlichem Anion durch eine Kollodiummembran getrennt, so ist die Potentialdifferenz immer gegen 0 Millivolt.

Den Mechanismus der selektiven Kationenpermeabilität der Kollodiummembran versuchte L. Michaelis zu erklären, indem er sehr enge Poren mit negativen Festladungen innerhalb der Membran annahm. Anionen würden in diesen engen Poren auf Grund der gleichen Ladung abgestoßen, Kationen hingegen würde wegen der entgegengesetzten Ladung die Diffusion ermöglicht (Abbildung 1.2).

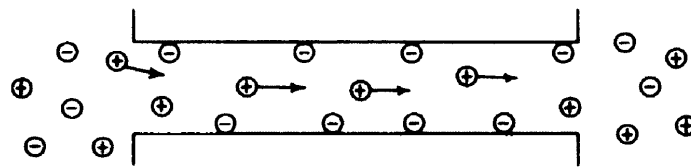


Abb. 1.2 : „fixed charge“ Modell von L. Michaelis 1925.

Wird jedoch die Kollodiummembran mit einem kleinen positiv geladenen Protein, z.B. Protamin, über längere Zeit inkubiert, so ändert sich die Selektivität der Poren für die Ionen. Die positiven Festladungen des Protamin bewirken jetzt einen wirksamen Ausschluss der Kationen, dagegen permeieren nun die Anionen [Mond28].

L. Michaelis fasste das Ergebnis der Permeabilitätsmessungen an künstlichen Membranen so zusammen: „Elektronegative Membranen vermindern die Beweglichkeit von negativen Ionen, elektropositive Membranen die von positiven Ionen“.

1.3 Selektive Ionenpermeabilität des Erythrozyten

1.3.1 Das Festladungskonzept der Membranporen

Das Konzept einer festladungsabhängigen Ionendiffusion durch die Kollodiummembran wurde 1927 von R. Mond auf den Erythrozyten übertragen [Mond27]. Schon seit der Jahrhundertwende war bekannt, dass Erythrozyten nahezu impermeabel für Kationen, aber permeabel für Anionen sind. Sie stellen also auf Grund ihrer selektiven Anionenpermeabilität ein Gegenbeispiel zur Apfelschale und zur Kollodiummembran dar.

An Membranen aus Gelatine hatte L. Michaelis positiv geladene Aminosäuregruppen für die selektive Anionenpermeabilität verantwortlich gemacht. Nach seiner Theorie sollten auch positiv geladene Aminosäuregruppen in den Poren der Erythrozytenmembran die selektive Anionenpermeabilität bedingen. In Anlehnung an diese Theorie versuchte R. Mond durch Alkalisierung der roten Blutkörperchen in einer Saccharose-Lösung die hypothetischen Aminogruppen der Erythrozytenporen zu dissoziieren und somit die positive Festladung zu entfernen, um eventuell durch die verbleibende negative Oberflächenladung der Membran einen Kationenefflux zu erzeugen. Seine Ergebnisse schienen zunächst die Vermutung zu bestätigen, und alles sprach für das Vorhandensein von Poren mit solchen positiven Festladungen. Bis pH 8 in der Außenlösung fanden sich nur Hinweise für eine selektive Anionenpermeabilität und ab pH 9 erfolgte dann ein Kaliumausstrom (Abbildung 1.3 a).

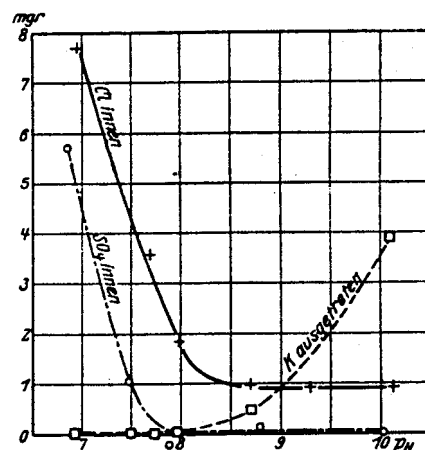


Abb. 1.3 a: Kationen- und Anionenefflux aus humanen Erythrozyten in Abhängigkeit des pH-Wertes (R. Mond, 1927).

1936 versuchten J. F. Danielli und H. Davson erfolglos das Experiment von Mond an Erythrozyten zu reproduzieren. In ihren isotonischen NaCl-Lösungen konnten sie durch alleinige Alkalisierung der Erythrozyten keinen Verlust an Kalium erzeugen. Wie erst später bemerkt wurde, hatten sie in ihren experimentellen Ansätzen den von R. Mond benutzten Zusatz Saccharose als Nichtelektrolyt übersehen.

W. Wilbrandt und H. Passow berücksichtigten dieses und konnten mit dem Zusatz von Saccharose die Ergebnisse von R. Mond (1927) bestätigen [Wilbrandt40 et Passow65]. Besonders W. Wilbrandt und H. J. Schatzmann konnten 1960 in sehr überzeugenden Versuchen mit Saccharose eine Zunahme der Kationenpermeabilität (K^+ und Na^+) bei verschiedenen niedrigen Chloridkonzentrationen nachweisen [Wilbrandt60]. Sie nahmen an, dass der Kationenverlust der Erythrozyten durch ein positives Chlorid-Membranpotential induziert wird. Die Saccharose sollte der Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes dienen und so den Aufbau eines Chloridgradienten von innen (Cl_i) nach außen (Cl_o) ermöglichen.

Dies bewirkt nach der Nernst'schen Gleichung ein positives Membranpotential (E):

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{Cl_i}{Cl_o} \cdot R$$

R die Gaskonstante
 T absolute Temperatur
 F Faraday-Konstante

Die Abbildung 1.3 zeigt deutlich den Verlust von osmotischem Inhalt, nämlich Kalium- und Natrium-Ionen, in Abhängigkeit vom Chloridgehalt der Außenlösung (% NaCl). Zum Beispiel ist bei 0.004% NaCl-Lösung nach einer halben Stunde der Kationenausstrom beendet, bei 0.5% NaCl sind dagegen auch nach zwei Stunden nur wenige Kationen durch die Zellmembran permeiert. Bereits 1933 stellte M. H. Jacobs einen Zusammenhang zwischen Kationenverlust und dem Austausch von Cl^- innen gegen OH^- außen her. Diese beiden unterschiedlichen Ionentransporte, Anionenaustausch und Kationenverlust, drücken sich ebenfalls in einer Veränderung des pH-Werts der Suspensionslösung aus. Ein anfänglich rascher pH-Abfall im Außenmedium ist demnach ein Zeichen des Austausches von Cl^- gegen OH^- . Dagegen ist der spätere pH-Anstieg ein Ausdruck des langsamen Kationenausstroms gefolgt von einem entsprechenden OH^- -Efflux zum Ausgleich der elektrochemischen Gradienten. Damit schien die Theorie eines vom Chloridpotential abhängigen Kationenausstroms aus einem Erythrozyten als gesichert.

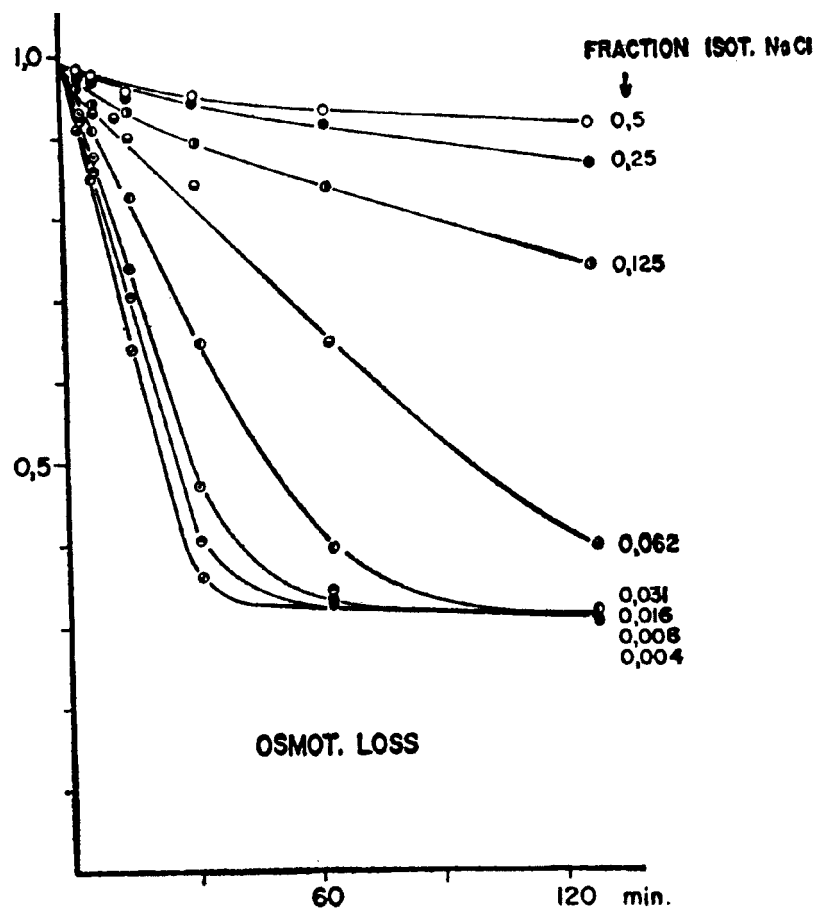


Abb. 1.3 b : Verminderung des osmotischen Druckes von humanen Erythrozyten, inkubiert in isotoner Sucroslösung und isotoner NaCl-Lösung (5% Zellen) bei 37 C°. Ordinate: osmotische Verlust in Prozent. Abszisse: Zeit in Minuten. (W. Wilbrandt and H. J. Schatzmann, 1960)

H. Passow machte nicht nur das Verhältnis zwischen Innen- und Außenkonzentration der Anionen für den Kationenfluß verantwortlich, sondern formulierte drei weitere Grundvoraussetzungen für den selektiven Ionenfluss [Passow64 et Passow80]:

1. Die Ladungsverteilung innerhalb der Membranpore folgt dem Donnan-Gleichgewicht.
2. Sowohl die Zellmembran selbst, als auch die angrenzenden Innen- und Außenlösungen sind elektroneutral. Die Summe der negativen Ladungen der diffusiblen Anionen ist somit gleich der Zahl der positiven Festladungen in der Membran.
3. Für die dissoziierbaren Festladungen gilt das Massenwirkungsgesetz.

Durch die Kombination dieser Bedingungen wollte er in seinen Experimenten mit Erythrozyten die Festladungskonzentration an Aminogruppen in der Membran und die entsprechende Dissoziationskonstante abschätzen.

H. Passow ging davon aus, dass der Ionenfluß durch die Membran von der Konzentration der diffundierenden Ionen in der Membran abhängt. Bei einer großen Anzahl positiver Festladungen in der Membran ist aber auch eine größere Anzahl an diffundierenden Anionen nötig, um die Elektroneutralität der Membran gemäß des Donnan-Gleichgewichts aufrecht zu erhalten. Daraus resultiert ein entsprechend erhöhter Anionenflux. Werden die positiven Festladungen reduziert, z.B. durch Dissoziation von Aminogruppen ($-\text{NH}_3^+$ zu $-\text{NH}_2$), so ist auch der Bedarf an ausgleichenden Anionen vermindert und der Anionenflux verkleinert sich. Daraus ergibt sich eine ausgesprochene pH-Abhängigkeit des Anionenflux.

Bei der Annahme einer Membran in isotonischer NaCl-Lösung (0.166M) mit 3M positiven Festladungen in den Membranporen müssen entsprechend 3M Anionen zur elektrischen Neutralisation vorhanden sein. Es befinden sich nun auf Grund der Ladungsverteilung (3M/0.166M) 18mal mehr Anionen in der Membran als in der umgebenden physiologischen NaCl-Lösung. Die freien Anionen konkurrieren zwar in gleichem Maße um die begrenzten membrangebundenen Festionen, aber das Verteilungsverhältnis aller Ionen bleibt sowohl in der NaCl-Lösung als auch in der Membran das gleiche; d.h. je kleiner die Cl^- -Konzentration oder je höher der pH-Wert ist, um so mehr OH^- -Ionen müssen sich in den Membranporen binden. Mit dieser Annahme erklärte Passow den gemessenen Kaliumverlust in Monds Experimenten. Durch die Kombination von niedriger Ionenstärke (Saccharose-Lösung) und hohem pH-Wert von über 8 kommt es zur Ladungsverschiebung in der Pore und die Kationen können aus der Zelle entweichen.

Während Passow den Kationenausstrom in Saccharose-Lösung hauptsächlich mit der Festladungshypothese zu erklären versuchte, legten J. A. Donlon und A. Rothstein (1969) den Schwerpunkt, wie bereits Wilbrandt und Schatzmann, auf das Membranpotential als Triebkraft. Das aus der Nernst'schen Gleichung berechnete Chloridmembranpotential wurde gegen den Kationenefflux aufgetragen [Donlon69]. Unterhalb von 45 Millivolt fand sich nur ein sehr geringer Kationenefflux. Erreichte das Membranpotential jedoch den Schwellenwert von 45 Millivolt, so öffneten sich

anscheinend Kationenkanäle. Unklar blieb jedoch bei dieser Vorstellung, ob es sich dabei um „normale“ oder „neue“ Kanäle handelte und ob alle Erythrozyten in gleichem Maße und zur gleichen Zeit reagierten. Zwischen 45 und 170 Millivolt ergab sich ein Permeabilitätsplateau. Überschritt das Membranpotential die 170 Millivolt, so zeigte sich noch einmal ein kräftiger Anstieg des Kationenausstroms.

1.3.2 Membranleitfähigkeit

Das Konzept der Membranpore mit Festladungen setzt voraus, dass entsprechend der Ionenpermeabilität auch ein äquivalenter elektrischer Strom durch die Membran fließen muss. Der Stromfluss ließe sich theoretisch mit Hilfe von Mikroelektroden messen. Dies war aber lange Zeit wegen der geringen Größe des Erythrozyten technisch nicht lösbar. Erst mit dem Auffinden der Riesenerythrozyten des Salamanders, die ein ähnliches Permeationsverhalten wie menschliche Erythrozyten zeigen, wurde der Einsatz von Mikroelektroden möglich. Entgegen den Erwartungen war jedoch die Membranleitfähigkeit nur äußerst gering [Lassen73]. Es zeigte sich weiterhin keine Chloridabhängigkeit des gemessenen Elektrodenpotentials. Diese Messungen legten somit den Schluss nahe, dass das Konzept der Festladungshypothese die selektive Anionenpermeabilität nicht erklären kann und dass die Anionenpermeabilität durch einen nahezu elektrisch neutralen Anionenaustausch erfolgen muss.

1.4 Anionentransporter

Ab 1967 konnte auch indirekt der Netto-Anionentransport gemessen werden [Knauf77]. Es stellte sich jetzt heraus, dass die Netto-Chlorid-Permeabilität bei 37°C nur 2.8×10^{-8} cm/sec betrug. Dieser Wert ist im Vergleich zum Chloridionenaustausch mit 4×10^{-4} cm/sec bei gleicher Temperatur um das etwa 10.000-fache geringer. Das Ergebnis stimmt mit den direkten elektrischen Messungen mit Mikroelektroden überein und bedeutet für den Transportmechanismus, dass nur ein verschwindend kleiner Anteil des Netto-Anionentransportes über den Anionenaustauscher verlaufen kann. Im Gegensatz zum Chloridtransport ist der Hydroxyl-Transport sowohl für den Netto-Transport als auch für den Anionenaustausch mit 1.3×10^{-3} gegen 3.8×10^{-3} cm/sec sehr effektiv.

H. Nasse und H. J. Hamburger beschrieben als erste den Austausch von intrazellulärem Bikarbonat und extrazellulärem Chlorid an der Erythrozytenmembran [Nasse78 et Hamburger91]. Als Jacobs-Stewart-Zyklus erweitert [Jacobs42], gelang es die hohe Transportkapazität des Blutes für CO₂ bzw. für Bikarbonat zu erklären. Aber erst 1972 konnte das als Bande 3 bezeichnete Membranprotein identifiziert werden, das den Anionenaustausch zwischen Cl⁻ und HCO₃⁻ regelt [Cabantchik72 et Fairbanks71]. Es werden etwa 1.2×10^6 Transportmoleküle pro Erythrozytenmembran angenommen.

Die Funktionsweise des Transporters wird an Hand eines Pingpong-Modells verdeutlicht [Gunn79, Knauf79 et Passow86]. In der Regel wird ein Anion gegen ein anderes Anion ausgetauscht, sei es als Homoexchange zweier gleicher Anionen oder als Heteroexchange zweier unterschiedlicher Anionen. Die Elektroneutralität bleibt dabei stets gewahrt. Das Bande-3-Protein weist nur eine Substratbindungsstelle auf. Je nach Konformation liegt sie zum Zytoplasma oder zum Außenmedium zugewandt. Kommt es zur Anlagerung eines Anions, verändert sich die Konformation und es erfolgt damit der Transport des Ions durch die Membran, um dann auf der anderen Seite wieder freigegeben zu werden. Ob die Bindungsstelle des Substrates nach außen oder innen weist, ist abhängig von der Anionenkonzentration auf beiden Seiten der Membran.

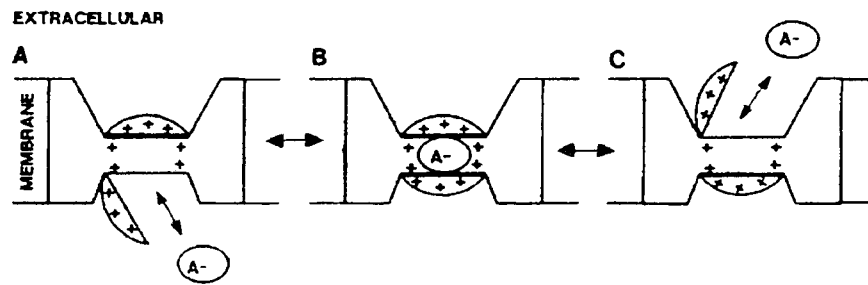


Abb. 1.4 : Pingpong-Modell des Anionentransporters

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

An Hand des Anionentransporters wird deutlich, wie sich die Vorstellung eines Ionentransportes durch eine Membran von einer einfachen Pore ausgehend, über Aspekte von Ladungsverschiebungen und Potentialdifferenzen hin zu einem komplexen elektroneutralen Anionentransporter entwickelt hat. Die Frage ist nun, über welchen Transporter oder welche Permeationsstelle der Verlust an Kationen bei niedriger Ionenstärke erfolgt. Eine Umkehrung der Anionenpermeabilität in eine für Kationen ist heute für ein so selektives Anionentransportprotein wie das der Bande 3 kaum vorstellbar. Des weiteren soll in dieser Arbeit auch die Möglichkeit eines $K^+(Na^+)/H^+$ -Transporters, wie es Bernardt et al. annehmen, diskutiert werden, bzw. untersucht werden, ob es eine Kombination der verschiedenen Vorstellungen, im Sinne eines Transporters mit integrierten Festladungen gibt. Vorversuche von G. F. Fuhrmann haben ergeben, dass bei niedriger Ionenstärke der Glucosetransport etwa in dem Ausmaße abnimmt, wie die Kationenpermeabilität zunimmt. In diesem Zusammenhang wurden Schweineerythrozyten, die keine Glucosetransporter besitzen, untersucht [Krüger99]. Dabei zeigte sich, dass kein Kationenausstrom in den Schweineerythrozyten, wohl aber in den humanen Erythrozyten zu finden war. Es soll deshalb in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen werden, zu prüfen, ob unter bestimmten Versuchsbedingungen ein Kationenausstrom über den Glucosetransporter in den humanen Erythrozyten erfolgen kann. Der Glucosetransporter

wird als eine oszillierende Pore angesehen, die sich in zwei Zuständen, nämlich zwischen außen offen und innen geschlossen und innen geschlossen und außen offen, befinden kann. Dabei bilden die Membrandomänen des Glucosetransporters einen Kanal. An diesem Membrankanale sind dissoziierbare Hydroxylgruppen des Tyrosins beteiligt. Bei niedriger Ionenstärke könnten entsprechend der Festladungshypothese die negativen Ladungen des dissoziierten Tyrosins einen Kationenausstrom über den Glucosetransporter erlauben. Um dieser Theorie näher zu kommen, werden in dieser Arbeit Kationenausstrom und Glucosetransporter in unterschiedlicher Weise beeinflusst, um somit parallele oder entsprechende Verhaltensweisen zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Aufbereitung des Blutes

Für alle Versuche wurde stets frisches, venöses heparinisierendes Blut von gesunden Spendern entnommen. Dieses wurde bei 4000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, bestehend aus Plasma, Leukozyten und Thrombozyten, wurde abgesaugt. Anschließend wurde das Erythrozytenkonzentrat mit eiskaltem Puffer dreimal gewaschen und bei den gleichen Bedingungen wie für die Trennung von Plasma und Zellen abzentrifugiert. Die so entstandene Suspension wurde mittels des verwendeten Waschpuffers auf einen Hämatokrit von 50 % eingestellt.

2.2 Bestimmung des Kalium- und Natrium-Efflux aus Erythrozyten

2.2.1 Lösungen

Je nach Versuch wurden verschiedene Waschpuffer verwendet. Diese waren im einzelnen:

Chlorid-Waschpuffer	Nitrat-Waschpuffer
150 mM NaCl	150 mM NaNO ₃
20 mM HEPES	20 mM HEPES
pH 7.4	pH 7.4

Sulfat-Waschpuffer	Phosphat-Waschpuffer
100 mM NaSO ₄	145 mM NaCl
20 mM HEPES	10 mM Glucose
pH 7.4	5.8 mM NaH ₂ PO ₄
	PH 7.4

Wie aus der Einleitung zu entnehmen ist, wurden als Versuchslösungen verschiedene Zuckerlösungen verwendet :

A	B	C
300 mM Sorbitol	300 mM D-Glucose	290 mM Sorbitol
20 mM HEPES	20 mM HEPES	20 mM HEPES
1 mM EDTA	1 mM EDTA	10 mM D-Glucose
1 mM K-Gluconat	1 mM K-Gluconat	1 mM EDTA
pH 7.4	pH 7.4	1 mM K-Gluconat
		pH 7.4

D	E
250 mM Sucrose	300 mM Sorbitol
20 mM Glucose	5.8 mM NaH₂PO₄
5.8 mM NaH₂PO₄	pH 7.4
pH 7.4	

2.2.2 Durchführung

Ein Efflux-Versuch enthielt 4 Versuchsreihen à 8 Proben. Nach Zugabe von 500 µl Erythrozyten-Suspension zu 50 ml Versuchslösung, die bei 37°C ständig geschwenkt wurde, wurden jeweils 3 ml der Probenlösung nach 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, (120) Minuten entnommen und in eine eiskalte „Stopper-Lösung“ überführt. Die Stopper-Lösung, bestand aus 113 mM MgCl und 5 mM LiCl. Sie hat den Zweck, den Efflux von Kalium und Natrium sofort zu unterbinden.

2.2.3 Bearbeitung der Proben

Um den extrazellulären Teil an Kalium und Natrium der Probe zu entfernen, wurden die Proben dreimal in der Stopper-Lösung gewaschen und bei 4000 U/min(g) für 5 Minuten zentrifugiert, wobei nach jeder Zentrifugation der Überstand abgesaugt wurde. Somit erhielt man eine kalium- und natriumfreie Erythrozyten-Suspension. Um nun den intrazellulären Gehalt an Kalium und Natrium zu messen, wurden die Erythrozyten in eine 5 mM LiCl-Lösung überführt sowie für 10 Minuten im Ultraschallbad hämolysiert. Die Proben waren nun für die Kalium-, Natrium-Bestimmung vorbereitet.

2.2.4 Bestimmung des Kalium-, Natrium- und Hämoglobin-Gehaltes der Erythrozyten

Der Gehalt an intrazellulärem Kalium und Natrium wurde flammenphotometrisch (Carl Zeiss, Jena - Flapho var) mit Lithium als internem Standard bestimmt.

Die Hämoglobin-Konzentration der Proben wurde photometrisch am isobestischen Punkt bei 527 nm ermittelt (Kontron Instruments - Uvikon 930 Spectrophotometer; [Grey80]). Dabei wird die Stärke der Absorption des durch eine Küvette tretenden Lichts gemessen. Die Extinktion ist proportional zur Stoffkonzentration und zur Schichtdicke der Küvette (Lambert-Beersches Gesetz).

2.3 Statistische Auswertung

Die intrazelluläre Konzentration von Kalium und Natrium wurde pro Kilogramm Hämoglobin berechnet.

$$\text{kg Hämoglobin/l Zellen} = (OD \cdot f) / 532$$

<i>OD</i>	ermittelte Extinktion bei 527 nm
532	Extinktionskoeffizient von Hämoglobin
<i>f</i>	Verdünnungsfaktor (hier 201)

$$\text{mmol Na}^+ \text{ bzw. K}^+ / \text{kg Hämoglobin} = \frac{(\mu\text{M Na}^+ \text{ bzw. K}^+) \cdot 201}{(\text{kg Hämoglobin/L Zellen}) \cdot 1000}$$

Die Auswertung der Fluxversuche erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPAD PRISM (Version 2.0). Die experimentell ermittelten mmol Kationen/kg Hämoglobin bei den Zeitwerten 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 bzw. 120 Minuten konnten mit großer Genauigkeit durch eine Exponentialfunktion angenähert werden. Schließt man den 0-Wert mit in die Bestimmung ein, so lassen sich die Werte nur durch zwei Exponentialfunktionen erfassen. Dies liegt wahrscheinlich an dem initialen schnellen Anionenaustausch der Erythrozyten und der dadurch bedingten Alkalisierung. Aus diesem Grunde wurde im Folgenden der Kationenefflux stets ohne den 0-Wert analysiert.

Gleichung für den exponentiellen Abfall:

$$C = (A * e^{-k_1 * t_1} + E) + (B * e^{-k_2 * t_2} + D)$$

Wie eben erläutert, wird in der computergestützten Auswertung der exponentielle Abfall erst ab dem 5-min-Wert berechnet. Da der schnelle Anionenaustausch, für den der Term $B * e^{-k_2 * t_2} + D$ steht, schon nach ca. einer Minute erfolgt ist, kann der Term somit gleich null gesetzt werden und es ergibt sich eine Gleichung mit nur einer Komponente:

$$C = A * e^{-k_1 * t_1} + E$$

C	mmol Kationen pro kg Hb zum Zeitpunkt (5,10,20,30,40,50 und 60 (120) Minuten)
A	mmol Kationen pro kg Hb zum Zeitpunkt 0 des exponentiellen Abfalls (Span)
k_1	Geschwindigkeitskonstante
t_1	Zeit in Minuten
E	Rest in mmol Kation pro kg Hb (Plateau)

Die Parameter A, k und E wurden durch computerunterstützte nichtlineare Regression ermittelt.

Die biologische Halbwertszeit $t_{1/2}$ errechnet sich aus: $t_{1/2} = 0.69 / k$.

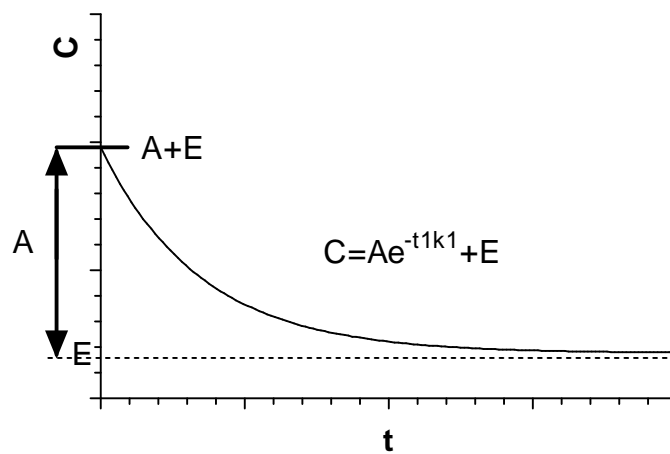


Abb. 2.3: Drstellung des exponentiellen Abfalls

Läuft die Exponentialfunktion in ein Plateau aus (E), so kann diese Tatsache damit erklärt werden, dass ein Anteil der Zellpopulation an Erythrozyten keinen signifikanten Kationenefflux zeigt. Der prozentuale Anteil an permeablen Zellen wurde durch folgende Gleichung berechnet:

$A + E =$ gesamter Anteil an Kationen/kg Hb zum Zeitpunkt 0 von allen Zellen = 100%,

$A / [(A + E) / 100] =$ Prozent des permeablen Anteils (Fraktion der permeablen Zellen)

Ein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen bei verschiedenen Versuchsbedingungen wurde durch das Computerprogramm GraphPAD PRISM analysiert.

2.4 Bestimmung des Volumens von Erythrozyten mit der Hilfe der Streulichtapparatur

2.4.1 Prinzip der Streulichtapparatur

Bei einem Nettotransport von osmotisch wirksamen Bestandteilen, wie z.B. Zucker und Ionen, durch die Erythrozytenmembran, kommt es zu einer entsprechenden ausgleichenden Wasserbewegung, die proportional eine Volumenänderung bewirkt.

Diese Volumenänderung kann mit Hilfe einer Streulichtapparatur registriert werden. Ein Lichtstrahl aus parallelem weißen Licht fällt in eine Messküvette und wird an den suspendierten Erythrozyten gestreut. Dieser gestreute Anteil wird von einem im rechten Winkel zur Lichtquelle angeordneten Photomultiplier aufgefangen und in ein Spannungssignal umgewandelt, das kontinuierlich aufgezeichnet wird [Fuhrmann71 et Fuhrmann89].

Schrumpfen die Zellen, konzentriert sich das Hämoglobin im Erythrozyten. Es kommt zu einer stärkeren Lichtbrechung. Das Spannungssignal ist vergrößert. Umgekehrt bewirkt eine Volumenzunahme eine Konzentrationsverminderung des Hämoglobins und damit eine schwächere Streuung. Das Spannungssignal ist geringer.

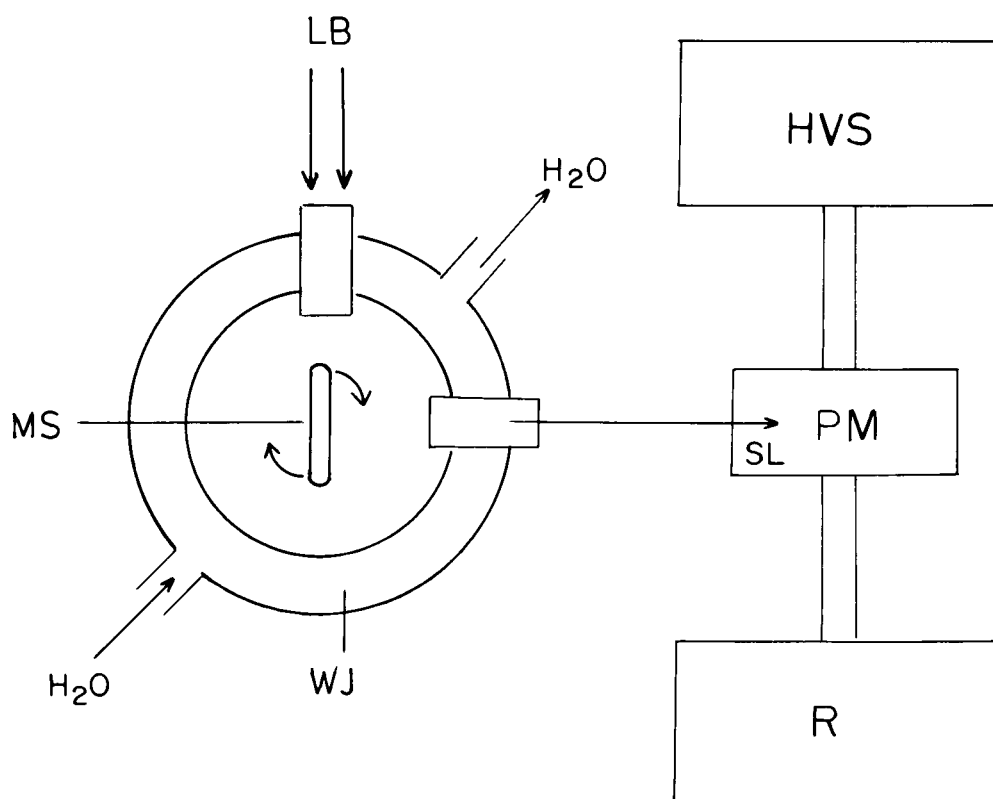


Abb. 2.4 : Darstellung der Streulichtmethode

Legende :

MS	=	Magnetrührer
LB	=	Lichtstrahl
PM	=	Photomultiplier
R	=	Schreiber
SL	=	Streulicht
HVS	=	Spannungsquelle
WJ	=	Wasserbad

2.4.2 Messung des Glucoseaustrittes aus Erythrozyten mit Hilfe der Streulichtapparatur

Nachdem das Blut, wie in der Methode beschrieben, aufbereitet worden war, wurde es mit 300mM Glucose für 30 Minuten äquilibriert. Zum Start des Experiments wurden 100 μ l der Erythrozytensuspension (10%iger Hämatokrit) bei 20°C in 15 ml Austrittspuffer gegeben. Nach der Zugabe der äquilibrierten Erythrozyten in den Austrittspuffer der Streulicht-Küvette, erfolgte gemäß dem Glucose- und Chloridgradienten ein Glucoseaustritt mit einem dazu gehörenden Spannungssignal. Die kinetische Auswertung fand nach Sen-Widdas statt [Sen62]. Aus der Glucoseaustrittszeit bei bekannter Glucoseaußenkonzentration lässt sich die maximale Austrittsgeschwindigkeit (V_{\max}) und die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit (K_m) berechnen.

2.5 Verwendete Materialien und Geräte

2.5.1 Reagentien

4,4 - Diisothiocyanatostilben - 2,2 – disulfonsäure (DIDS)	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Aqua bidestillata	
D(+)-Glucose Monohydrat	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
D-Sorbitol research grade	Serva, Heidelberg, Deutschland
EDTA- Dinatriumsalz Dihydrat Titrierkomplex	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe, Deutschland
HEPES(n-(2-Hydroxyethyl)piperazine- Sulfonic acid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Kalium-D-Gluconat	Fluka Chemika AG, Buch, Schweiz
Kaliumsulfat z. A.	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Lithiumchlorid z. A.	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Magnesium-6-Hydrat z. A.	J.T. Baker
Natriumchlorid z. A.	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland

Natriumnitrat z. A.	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat z.A.	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Natriumsulfat wasserfrei z. A.	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Phenylglyoxal Monohydrate	Fluka Chemika AG, Buch, Schweiz
Sodium-dodecyl-sulfate (SDS)	Fluka Chemika AG, Buch, Schweiz
Sucrose	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe, Deutschland

2.5.2 Technische Hilfsmittel

Analysenwaage AE 200	Mettler
GPKR Centrifuge USA	Beckman Instruments, Palo Alto,
Uvikon 930 Spectrophotometer	Kontron Instruments, Spectrophotometer
PHM64 Research pH Meter Copenhagen, Dänemark	Radiometer Analytical,
Flapho var	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Waage 1264 MP	Sartorius
Streulichtapparatur	Werkstatt der Philipps -Universität Marburg, Deutschland
Thermomix 1441	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus Christ
Minifuge Gl	Heraeus Christ

3 Ergebnisse

3.1 Abhängigkeit des Ausstroms der Kalium- und Natrium-Ionen von der Konzentration verschiedener Anionen bei niedriger Ionenstärke unter Anwesenheit von EDTA bei pH 7.4

3.1.1 Einfluss der Chloridionenkonzentration auf den Kalium-Efflux bei niedriger Ionenstärke

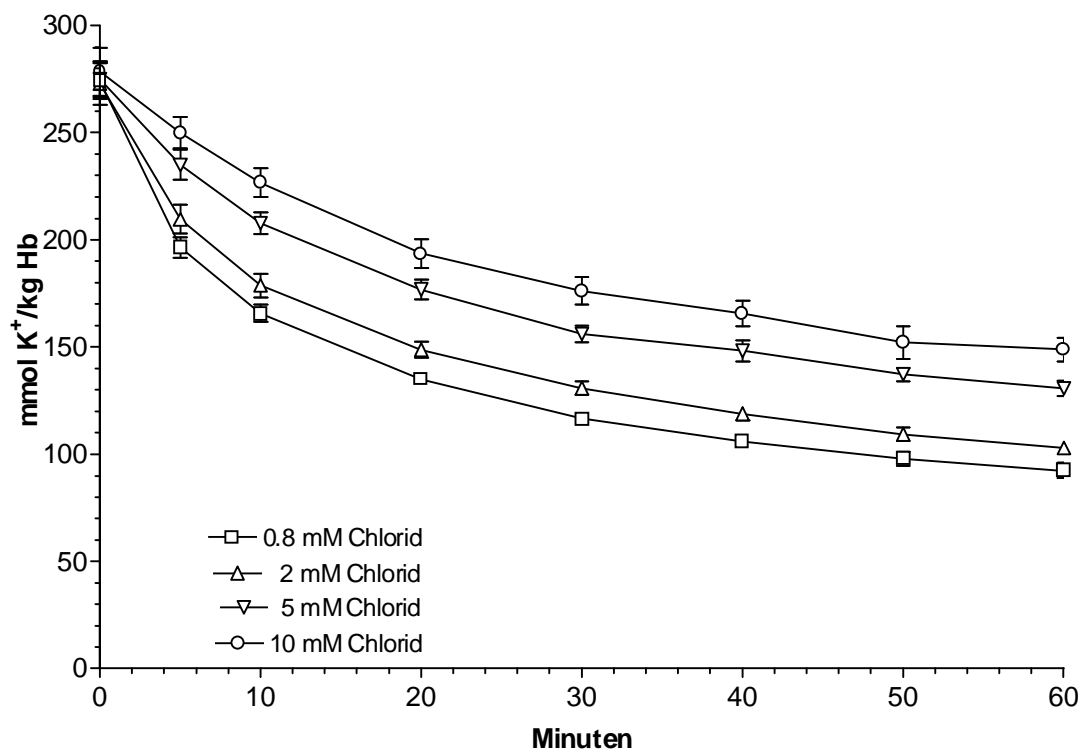


Abb. 3.1 a: Graphische Darstellung des K⁺-Efflux aus humanen in Chloridlösung vorinkubierten Erythrozyten in Abhängigkeit von der Zeit. Das Inkubationsmedium enthielt 300 mM Sorbitol, 20 mM HEPES, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA bei pH 7.4 und 37 °C; Mittelwert ± SE

3.1.2 Einfluss der Nitrationkonzentration auf den Kalium-Efflux bei niedriger Ionenstärke

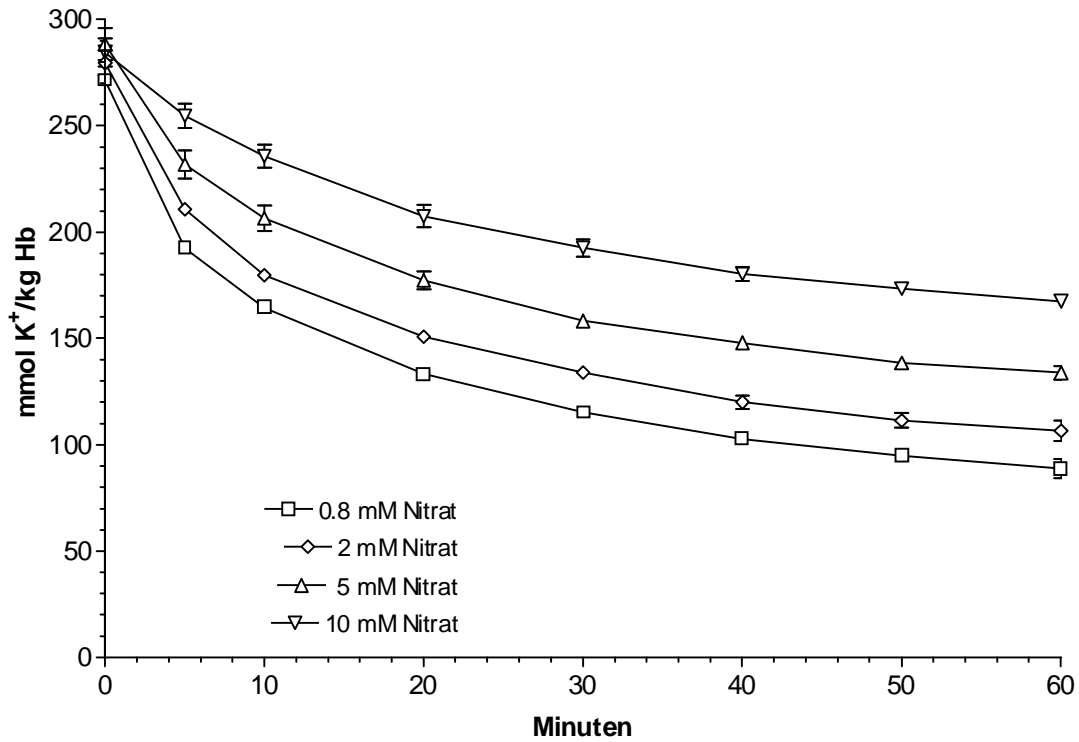


Abb. 3.1 b: Graphische Darstellung des K⁺-Efflux aus humanen in Nitratlösung vorinkubierten Erythrozyten in Abhängigkeit von der Zeit. Das Inkubationsmedium enthielt 300 mM Sorbitol, 20 mM HEPES, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA bei pH 7.4 und 37 °C; Mittelwert ± SE

3.1.3 Einfluss der Sulfationenkonzentration auf den Kalium-Efflux bei niedriger Ionenstärke

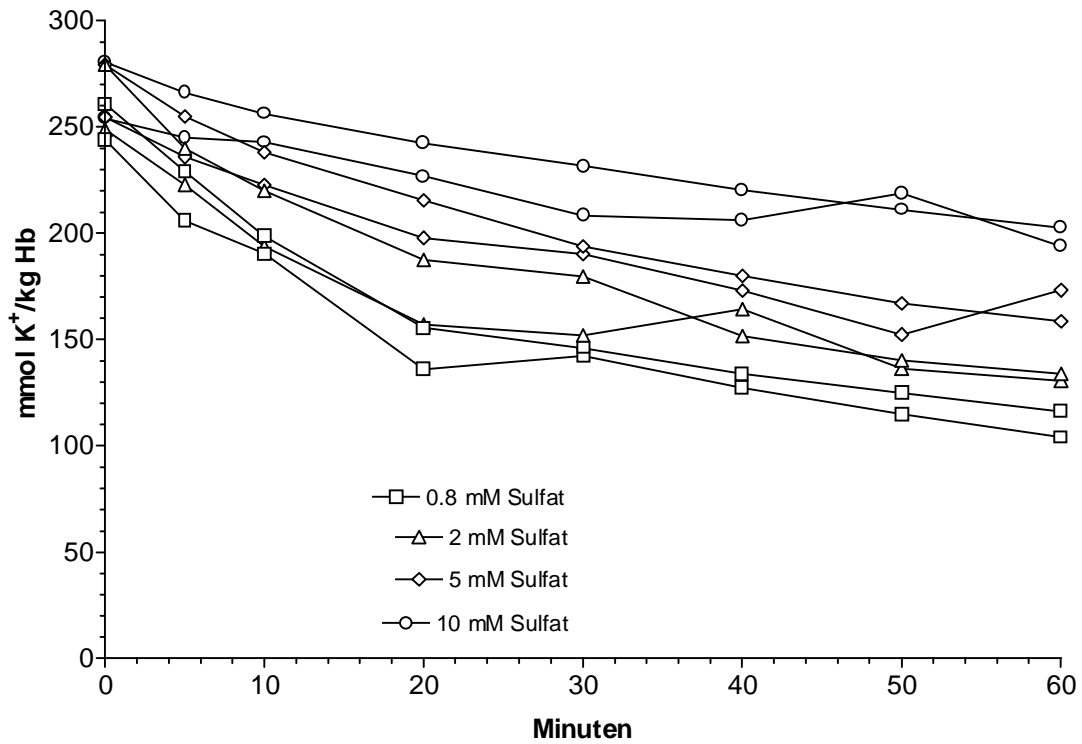


Abb. 3.1 c: Graphische Darstellung des K^+ -Efflux aus humanen in Sulfatlösung vorinkubierten Erythrozyten in Abhängigkeit von der Zeit. Das Inkubationsmedium enthielt 300 mM Sorbitol, 20 mM HEPES, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA bei pH 7.4 und 37 °C; Darstellung von jeweils zwei Einzelversuchen

3.1.4 Einfluss einer Phosphationenkonzentration von 5.8 mM NaH_2PO_4 auf den Efflux bei niedriger Ionenstärke mit 0.8 mM oder 7.5 mM Chlorid in der Außenlösung

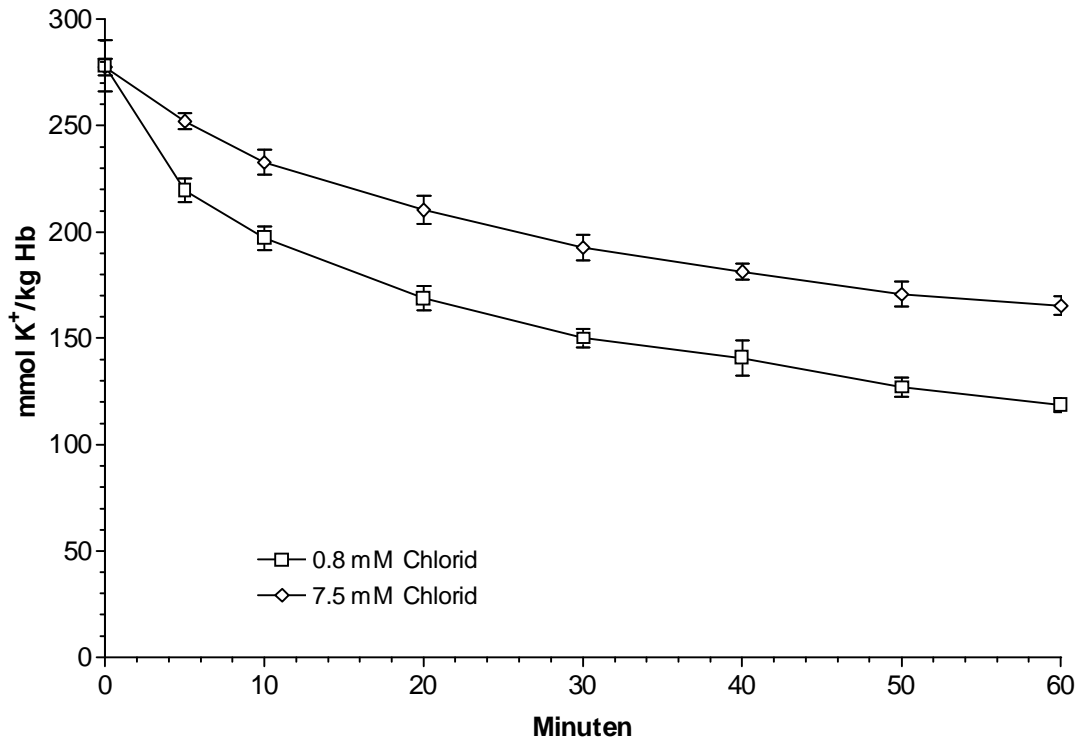


Abb. 3.1 d: Graphische Darstellung des K^+ -Efflux aus humanen in Phosphatlösung und 145 mM NaCl vorinkubierten Erythrozyten in Abhängigkeit von der Zeit. Das Inkubationsmedium enthielt 250 mM Sucrose, 10 mM Glucose, 5.8 mM NaH_2PO_4 , bei pH 7.4 und 37 °C; Mittelwert \pm SE

Tab. 3.1a: Kinetische Auswertung und Zusammenfassung der Messdaten für die Versuche mit 0.8 mM Anionenkonzentration, 300 mM Sorbitol, 20 mM HEPES (außer Phosphat), 1 mM Kaliumgluconat (außer Phosphat), pH 7.4 und 37°C, in der Phosphatlösung 5.8 mM NaH₂PO₄. Mittelwert aus verschiedenen Einzelversuchen (Chlorid: 7 Versuche, Nitrat: 5 Versuche, Phosphat : 4 Versuche; Sulfat: 2 Versuche) mit dem jeweiligen Standardfehler.

Kalium-Efflux

Anion Konzentration: 0.8 mM	A = Span mmol K ⁺ pro Kg Hb/Minute	k _K = mmol K ⁺ pro Kg Hb	E = Plateau mmol K ⁺ pro Kg Hb	t ^{1/2} Minuten	% permeabler Zellen
Chlorid	139.7 ± 5.8	0.056 ± 0.003	88.6 ± 4.0	12.6 ± 0.6	61.1 ± 1.6
Nitrat	139.6 ± 3.0	0.051 ± 0.005	82.5 ± 5.6	14.0 ± 1.7	63.0 ± 2.0
Sulfat	145.2	0.062	111.8	11.2	56.5
Chlorid+ Phosphat	136.1 ± 2.2	0.039 ± 0.00	106.1±0.9	18.0 ± 0.2	56.2 ± 0.3

Natrium-Efflux

Anion Konzentration: 0.8 mM	A = Span mmol K ⁺ pro Kg Hb/Minute	k _{Na} = mmol K ⁺ pro Kg Hb	E = Plateau mmol K ⁺ pro Kg Hb	t ^{1/2} Minuten	% permeabler Zellen
Chlorid	14.9 ± 0.3	0.053 ± 0.018	10.6 ± 1.4	13.8 ± 1.4	59.8 ± 3.8
Nitrat	14.7 ± 1.4	0.064 ± 0.015	10.7 ± 1.3	13.4 ± 3.0	57.9 ± 2.7
Sulfat	24.5	0.036	15.0	28.5	65.3
Chlorid+ Phosphat	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

k.A. = keine Auswertung möglich!

Tab. 3.1b: Kinetische Auswertung und Zusammenfassung der Messdaten für die Versuche mit 2 mM Anionenkonzentration, 300 mM Sorbitol, 20 mM HEPES, 1 mM Kaliumgluconat, pH 7.4 und 37°C. Mittelwert aus verschiedenen Einzelversuchen (Chlorid: 6 Versuche; Nitrat: 4 Versuche; Sulfat: 2 Versuche) mit dem jeweiligen Standardfehler.

Kalium-Efflux

Anion Konzentration: 2 mM	A = Span mmol K ⁺ pro Kg Hb/Minute	k _K = mmol K ⁺ pro Kg Hb	E = Plateau mmol K ⁺ pro Kg Hb	t _{1/2} Minuten	% permeabler Zellen
Chlorid	140.3 ± 7.3	0.051 ± 0.002	98.1 ± 3.6 ^{**}	13.7 ± 1.1	58.7 ± 1.6 ^{**}
Nitrat	138.0 ± 7.9	0.051 ± 0.002	101.4 ± 4.6 ^{**}	13.5 ± 0.4	57.6 ± 2.5 [*]
Sulfat	139.2	0.056	124.9	14.0	52.7

Signifikanz gegenüber 0,8 mM Konzentration:

* P < 0,05

** P < 0,01

*** P < 0,001

Natrium-Efflux

Anion Konzentration: 2 mM	A = Span mmol K ⁺ pro Kg Hb/Minute	k _{Na} = mmol K ⁺ pro Kg Hb	E = Plateau mmol K ⁺ pro Kg Hb	t _{1/2} Minuten	% permeabler Zellen
Chlorid	15.4 ± 0.5	0.052 ± 0.012	11.5 ± 1.6	15.9 ± 2.2	58.5 ± 3.6
Nitrat	14.4 ± 0.3	0.040 ± 0.007	13.1 ± 1.5	20.2 ± 4.3	53.4 ± 2.9
Sulfat	19.0	0.034	16.8	20.2	53.1

Tab. 3.1c: Kinetische Auswertung und Zusammenfassung der Messdaten für die Versuche mit 5 mM Anionenkonzentration, 300 mM Sorbitol, 20 mM HEPES, 1 mM Kaliumgluconat, pH 7.4 und 37°C. Mittelwert aus verschiedenen Einzelversuchen (Chlorid: 7 Versuche; Nitrat: 4 Versuche; Sulfat 2 Versuche) mit dem jeweiligen Standardfehler.

Kalium-Efflux

Anion Konzentration: 5 mM	A = Span mmol K ⁺ pro Kg Hb/Minute	k _K = mmol K ⁺ pro Kg Hb	E = Plateau mmol K ⁺ pro Kg Hb	t _{1/2} Minuten	% permeabler Zellen
Chlorid	138.6 ± 5.1	0.050 ± 0.002	125.5 ± 3.8 ^{***}	14.1 ± 0.5	52.5 ± 0.7 ^{***}
Nitrat	131.9 ± 7.3	0.049 ± 0.002	127.4 ± 3.5 ^{**}	14.3 ± 0.6	50.8 ± 1.4 ^{**}
Sulfat	145.7	0.025	125.7	27.8	53.7

Signifikanz gegenüber 0,8 mM Konzentration:

* P < 0,05

** P < 0,01

*** P < 0,001

Natrium-Efflux

Anion Konzentration: 5 mM	A = Span mmol K ⁺ pro Kg Hb/Minute	k _{Na} = mmol K ⁺ pro Kg Hb	E = Plateau mmol K ⁺ pro Kg Hb	t _{1/2} Minuten	% permeabler Zellen
Chlorid	15.1 ± 0.5	0.039 ± 0.007	12.9 ± 1.6	21.6 ± 5.7	54.2 ± 4.4
Nitrat	15.2 ± 1.0	0.038 ± 0.004	13.4 ± 1.7	18.8 ± 2.1	53.8 ± 4.0
Sulfat	31.2	0.010	15.8	68.3	66.3

Tab. 3.1d: Kinetische Auswertung und Zusammenfassung der Messdaten für die Versuche mit 10 mM Anionenkonzentration, 300 mM Sorbitol, 20 mM HEPES, 1 mM Kaliumgluconat, pH 7.4 und 37°C. Mittelwert aus verschiedenen Einzelversuchen (Chlorid: 6 Versuche; Nitrat 5 Versuche; Sulfat: 2 Versuche) mit dem jeweiligen Standardfehler.

Kalium-Efflux

Anion Konzentration: 10 mM	A = Span mmol K ⁺ pro Kg Hb/Minute	k _K = mmol K ⁺ pro Kg Hb	E = Plateau mmol K ⁺ pro Kg Hb	t ^{1/2} Minuten	% permeabler Zellen
Chlorid	137.5 ± 9.7	0.045 ± 0.005	140.9 ± 4.2 ^{***}	15.6 ± 1.3	49.1 ± 1.9 ^{***}
Nitrat	118.6 ± 6.0	0.045 ± 0.003	159.2 ± 1.2 ^{***}	15.9 ± 1.2	42.6 ± 1.3 ^{***}
Sulfat	102.3	0.020	163.5	37.5	38.3

Signifikanz gegenüber 0,8 mM Konzentration:

- * P < 0,05
- ** P < 0,01
- *** P < 0,001

Natrium-Efflux

Anion Konzentration: 10 mM	A = Span mmol K ⁺ pro Kg Hb/Minute	k _{Na} = mmol K ⁺ pro Kg Hb	E = Plateau mmol K ⁺ pro Kg Hb	t ^{1/2} Minuten	% permeabler Zellen
Chlorid	11.8 ± 2.0	0.027 ± 0.005	17.4 ± 1.0	27.5 ± 5.3	40.2 ± 5.4
Nitrat	10.7 ± 2.7	0.044 ± 0.005	18.5 ± 4.0	16.1 ± 1.8	37.6 ± 10.2
Sulfat	7.5	0.034	27.1	20.3	21.7

Die Abbildungen 3.7 a-d zeigen den Kalium-Efflux aus Erythrozyten bei verschiedenen Anionenkonzentrationen über einen Beobachtungszeitraum von 60 Minuten. Bei allen Anionen deutet der Kurvenverlauf des Kationenausstroms eine Plateaubildung an. Die Geschwindigkeit des Kalium-Efflux verlangsamt sich mit steigender Anionenaußenkonzentration. Das Plateau liegt um so höher, je größer die Anionenaußenkonzentration ist, was daraufhin weist, dass weniger Erythrozyten am Efflux beteiligt sind. Die Erklärung ist ein Alles- oder Nichtseffekt auf die Permeabilität der Zellen, so dass somit nur eine bestimmte Population an Erythrozyten die Kationenpermeabilität zeigt. Der Natrium-Efflux zeigt das gleiche Fluxverhalten. Da der Gradient jedoch viel kleiner ist, sind die gemessenen Daten mit einer größeren Fehlerbreite behaftet.

Wie bereits aus den Kurvenverläufen in den Abbildungen 3.7 a-d angenommen, bestätigt die mathematische Analyse eindeutig eine Plateaubildung sowie die Tatsache, dass mit steigender Konzentration aller verwendeten Anionen die Geschwindigkeitskonstante k kleiner wird.

Entsprechend der Annahme eines Alles- oder Nichtseffektes wurde der prozentuale Anteil an permeablen Zellen durch die Gleichung $A/(A + E)/100$ = Prozent des permeablen Anteils (Fraktion der permeablen Zellen) berechnet. Mit steigender Anionenaußenkonzentration nimmt dieser Anteil entsprechend der höheren Plateaubildung ab.

3.2 Einfluss der Pufferkonzentration auf den Kationen-Efflux

Der pK_a -Wert (negativ dekadischer Logarithmus der Aziditätskonstante) von HEPES liegt bei 7.3 (37°C). Der pK_a -Wert von TRIS beträgt 7.7 (37°C). Dies bedeutet, dass bei einem pH-Wert von 7.4 eine effektive Pufferkapazität vorhanden ist. Um zu erfahren, wie wichtig die Pufferkapazität für das Permeabilitätsverhalten der Erythrozyten ist, wurde der Kaliumefflux bei 2, 5, 20, 50 und 100 mM HEPES untersucht. Außerdem wurden zum näheren Vergleich zwei verschiedene Anionen benutzt. Ansonsten blieb die Zusammensetzung unverändert: 300 mM Sorbitol, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA,

0.8 mM Cl^- bzw. NO_3^- bei pH 7.4.

Die Abbildungen 3.9a und 3.9b bzw. Tabellen 3.3.a und 3.3b zeigen, wie sich die Kaliumpermeabilität unter verschiedenen Pufferbedingungen verhält.

Tab. 3.2a : Kinetische Auswertung und Zusammenfassung der Messdaten des Kalium-Efflux für die Versuche mit 300 mM Sorbitol, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA, 0,8 mM Cl⁻, pH 7.4 mit unterschiedlicher HEPES-Konzentration. Mittelwert aus 4 Einzelversuchen(20 mM : 7 Einzelversuche). A ist der Span, k die Geschwindigkeitskonstante, E das Plateau, t_{1/2} die Halbwertszeit, % ist der Anteil permeabler Erythrozyten.

Kalium-Efflux der chloridgeladenen Zellen

HEPES	A	\pm SE	k _K	\pm SE	E	\pm S	t _{1/2}	\pm SE	%	\pm S
		\pm		\pm		\pm		\pm		\pm
						E				E
2mM	150.2	2.0	0.049	0.005	53.4	1.2	14.5	1.5	73.9	0.3
5mM	147.2	3.5	0.057	0.006	67.9 ^{**}	2.5	12.7	1.2	68.4 ^{**}	1.1
20mM	139.6	3.0	0.051	0.005	82.5 ^{**}	5.6	14.0	1.2	63.0 ^{**}	2.0
50mM	146.3	8.7	0.048	0.002	83.5 ^{**}	5.3	14.4	0.5	63.6 [*]	2.7
100mM	149.3	8.6	0.044	0.002	88.1 ^{**}	3.2	15.9	0.7	62.7 [*]	2.3

Tab. 3.2b: Kinetische Auswertung und Zusammenfassung Der Messdaten des Kalium-Efflux für die Versuche mit 300 mM Sorbitol, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA, 0.8 mM NO₃⁻, pH 7.4 mit unterschiedlicher HEPES-Konzentration. Mittelwert aus 4 Einzelversuchen (20 mM: 7 Einzelversuche).

Kalium-Efflux der nitratgeladenen Zellen

HEPES	A	\pm SE	k _K	\pm SE	E	\pm SE	t _{1/2}	\pm SE	%	\pm SE
		\pm		\pm		\pm		\pm		\pm
2mM	154.5	7.5	0.058	0.002	58.0	3.1	12.1	0.5	72.6	2.0
5mM	158.6	5.0	0.056	0.003	60.9	2.1	12.4	0.6	72.3	0.6
20mM	139.7	5.8	0.056	0.003	88.6 ^{***}	4.0	12.6	0.6	61.1 ^{**}	1.6
50mM	146.7	6.1	0.050 [*]	0.002	87.7 ^{**}	2.6	14.1	0.7	62.5 ^{**}	1.3
100mM	142.2	5.4	0.047	0.002	99.2 ^{**}	3.1	14.8	0.7	58.9 ^{**}	0.6

Signifikanz gegenüber 2 mM Konzentration:

* P < 0,05

** P < 0,01

*** P < 0,001

Graphische Darstellung:

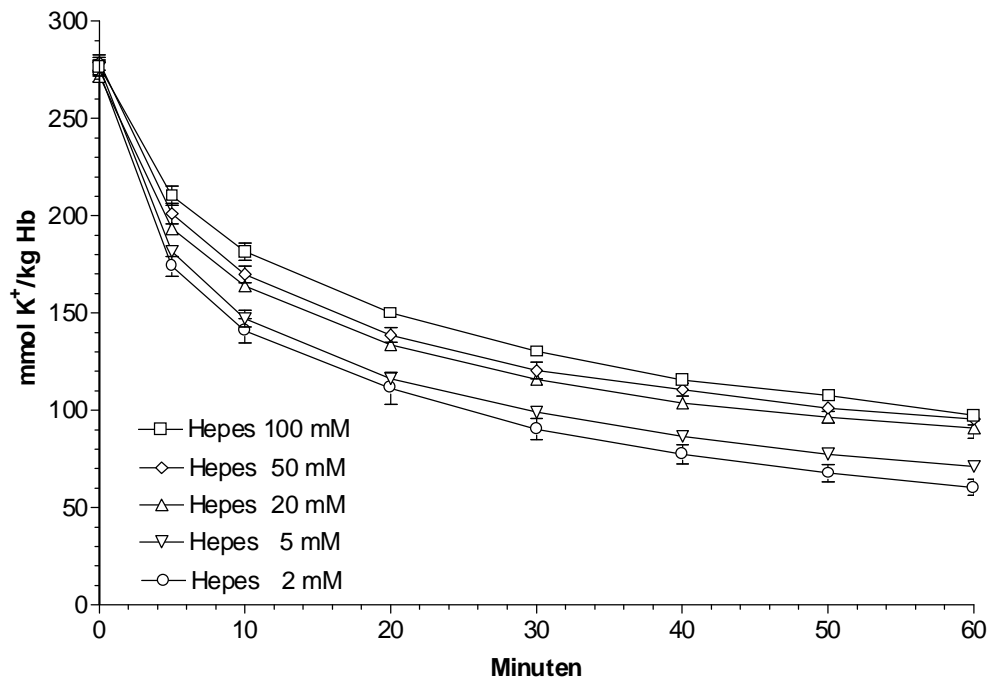


Abb. 3.2 a: Graphische Darstellung des K^+ -Efflux aus humanen, in Nitratlösung inkubierten Erythrozyten in Anwesenheit von verschiedenen Pufferkonzentrationen. Das Versuchsmedium enthielt 300 mM Sorbitol, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA bei pH 7.4 und 37 °C; Mittelwert \pm SE

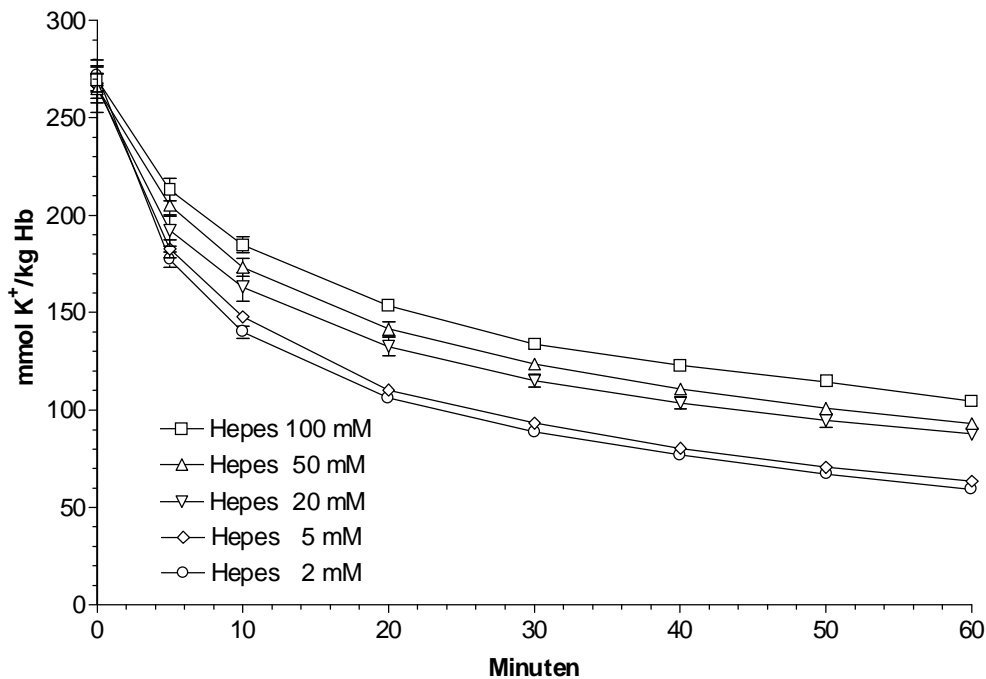


Abb. 3.2 b: Graphische Darstellung des K^+ -Efflux aus humanen, in Chloridlösung inkubierten Erythrozyten in Anwesenheit von verschiedenen Pufferkonzentrationen. Das Versuchsmedium enthielt 300 mM Sorbitol, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA bei pH 7.4 und 37 °C; Mittelwert \pm SE

3.3 Glucose anstelle von Sorbitol als Nichtelektrolyt

Da in dieser Arbeit der Glucosetransporter im Vordergrund steht, wird nun Glucose in den Versuchsmedien benutzt und die Reaktion des Systems auf die Kationenpermeabilität bei niedriger Ionenstärke untersucht.

Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse der Efflux-Messungen mit 300 mM Glucose in der Versuchslösung. Sowohl an der Halbwertszeit, als auch am Anteil permeabler Zellen erkennt man eine Hemmung des Kaliumausstroms. Bei höherer Anionenkonzentration erfolgt Hämolyse, so dass die Werte mit einer Außenkonzentration von 10 mM Cl⁻ beim Kalium-Efflux bzw. 10 mM und 2 mM beim Natrium-Efflux nicht ausgewertet werden können.

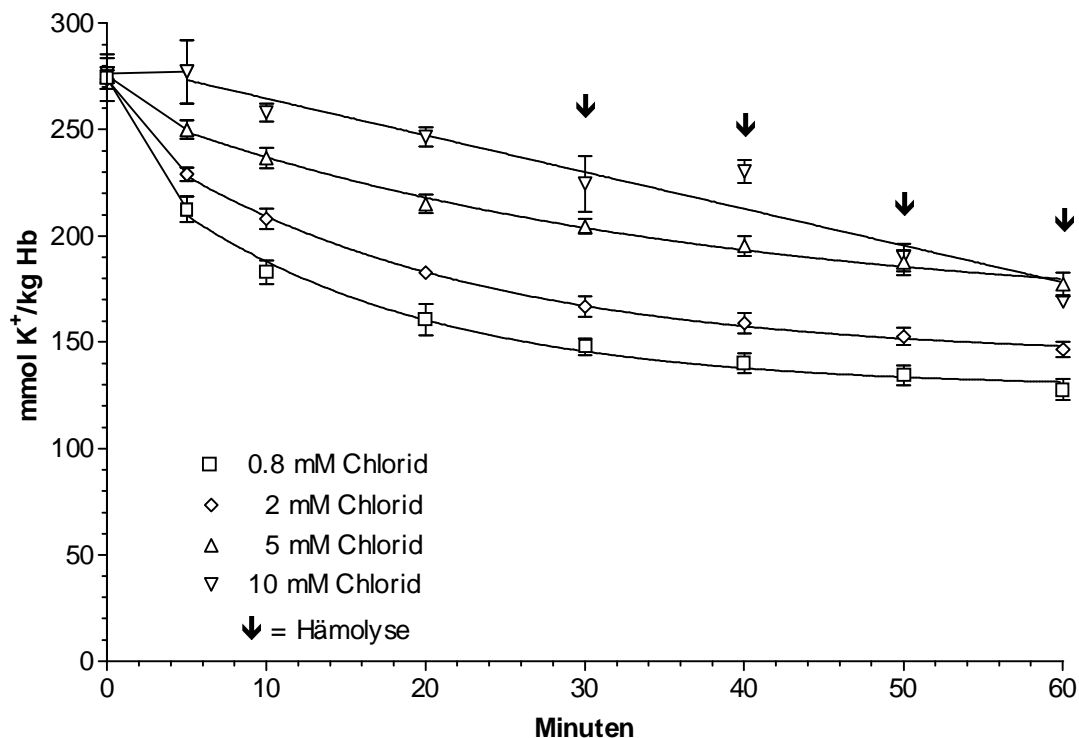


Abb. 3.3 : Graphische Darstellung des K⁺-Efflux aus humanen in Chloridlösung inkubierten Erythrozyten mit Glucose als Nichtelektrolyt. Das Versuchsmedium enthielt 300 mM Glucose, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA bei pH 7.4 und 37 °C; Mittelwert ± SE

Tab.3.3 : Kinetische Auswertung und Zusammenfassung der Messdaten für die Versuche mit 300 mM Glucose, 1 mM EDTA, 1 mM Kaliumgluconat, 20 mM HEPES mit TRIS auf pH 7.4 titriert. Mittelwert aus 4 Einzelversuchen und Chlorid als Anion. A ist der Span, k die Geschwindigkeitskonstante, E das Plateau, $t_{1/2}$ die Halbwertszeit, % ist der Anteil permeabler Erythrozyten.

Kalium-Efflux

Cl ⁻	A	\pm SE	k _K	\pm SE	E	\pm S E	t _{1/2}	\pm SE	%	\pm SE
0.8mM	111.6	3.6	0.064	0.005	128.7	4.3	11.0	0.9	46.5	1.3
2.0mM	110.0	2.8	0.050	0.003	142.8*	3.9	13.8	0.7	43.5	1.1
5.0mM	101.1	7.8	0.030**	0.002	161.8**	9.5	23.6	2.7	38.5*	3.1
10 mM	0 ^h	n.a.	0 ^h	n.a.	0 ^h	n.a.	0 ^h	n.a.	0 ^h	n.a.

^h = Hämolyse

Signifikanz gegenüber 0,8 mM Konzentration:

* P < 0,05

** P < 0,01

*** P < 0,001

Natrium-Efflux

Cl ⁻	A	\pm SE	k _{Na}	\pm SE	E	\pm SE	t _{1/2}	\pm SE	%	\pm SE
0.8mM	15.8	2.3	0.037	0.021	12.5	1.1	7.6	1.4	39.2	13.2
2.0mM	12.0	0.5	0.047	0.024	19.0	3.5	7.6	2.5	25.6	13.2
5.0mM	12.4	0.5	0.023	0.019	15.3	5.5	35.9	26.5	24.8	14.4
10 mM	0 ^h	n.a.	0 ^h	n.a.	0 ^h	n.a.	0 ^h	n.a.	0 ^h	n.a.

^h = Hämolyse

3.4 Sorbitol und Glucose als Versuchsmedium

Bei diesen Versuchsbedingungen wurde nur ein kleiner Anteil des Sorbitols durch Glucose ersetzt. Es soll dabei die Reaktion des Systems bzw. Efflux von Kalium und Natrium untersucht werden, wenn Glucose in nur 10 mM Konzentration vorliegt. Abbildung 3.4 zeigt nun das Fluxverhalten von Kalium bei unterschiedlicher Chloridionenkonzentration. Die Halbwertszeit verringert sich bei steigender Chloridionenkonzentration, wobei der Anteil an permeabler Zellen abnimmt. Dies zeigt eine Hemmung des Systems, statistisch zeigt sich dabei keine Veränderung gegenüber der Kontrolle mit 300 mM Sorbitol. Wie bei allen anderen Versuchen ergab der Natrium-Efflux ähnliche Ergebnisse mit einer breiteren Streuung.

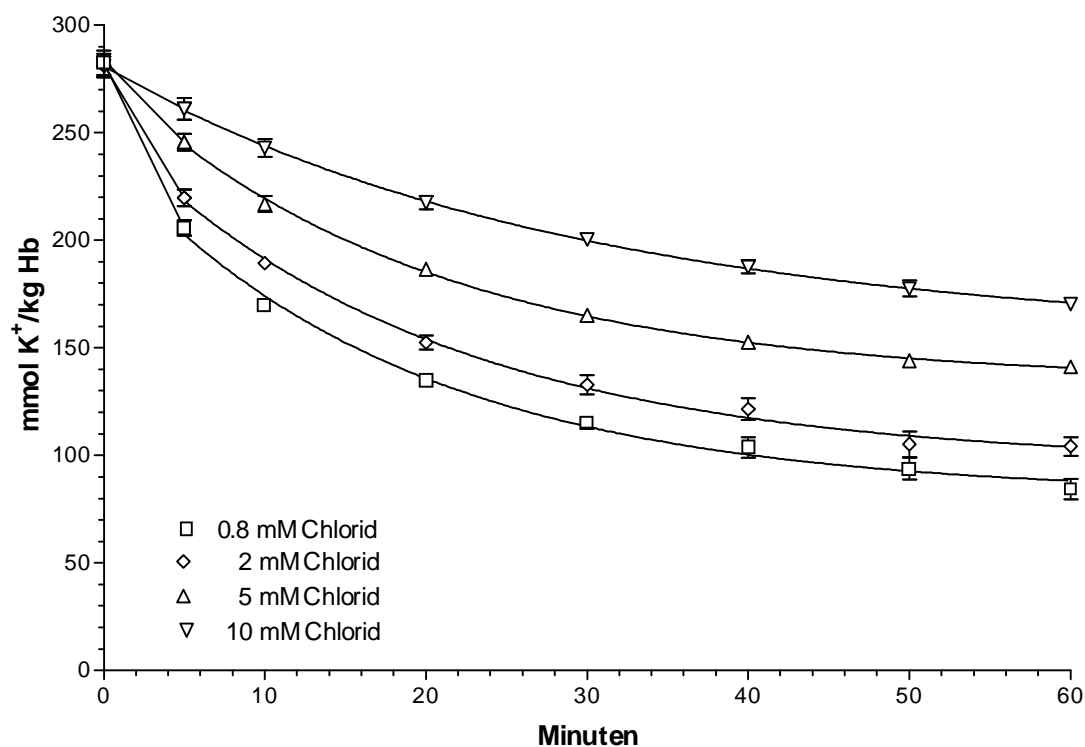


Abb. 3.4 : Graphische Darstellung des K^+ -Efflux aus humanen, in Chloridlösung inkubierten Erythrozyten. Das Versuchsmedium enthielt 290 mM Sorbitol, 10 mM Glucose, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA bei pH 7.4 und 37 °C; Mittelwert \pm SE

Tab. 3.4: Kinetische Auswertung und Zusammenfassung der Messdaten für die Versuche mit 290 mM Sorbitol, 10 mM Glucose, 1 mM EDTA, 1 mM, Kaliumgluconat, 20 mM HEPES mit TRIS auf pH 7.4 titriert. Mittelwert aus 4 Einzelversuchen und Chlorid als Anion. A ist der Span, k die Geschwindigkeitskonstante, E das Plateau, $t_{1/2}$ die Halbwertszeit, % ist der Anteil permeabler Erythrozyten und SE jeweils der Standardfehler.

Kalium-Efflux

Cl ⁻	A	$\frac{\pm SE}{\pm}$	k _k	$\frac{\pm SE}{\pm}$	E	$\frac{\pm SE}{\pm}$	t _{1/2}	$\frac{\pm S}{\pm}$ E	%	$\frac{\pm SE}{\pm}$
0.8mM	159.2	4.0	0.054	0.004	81.4	6.6	13.0	1.1	66.3	2.1
2.0mM	154.5	4.0	0.053	0.002	99.6 ^{***}	5.4	13.2	0.4	60.8 ^{**}	1.8
5.0mM	142.8	3.9	0.052	0.002	134.0 ^{**}	1.7	13.5	0.6	52.6 [*]	1.6
10 mM	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

k.A. = keine Auswertung möglich!

Signifikanz gegenüber 0,8 mM Konzentration:

* P < 0,05

** P < 0,01

*** P < 0,001

3.5 Beeinflussung des Kationen-Efflux durch Hemmstoffe des Anionentransporters

Die vorangegangenen Untersuchungen mit unterschiedlichen Anionen und Anionenaußenkonzentrationen weisen darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Kationenausstrom und dem Anionentransport gibt. Der Cl^-/OH^- -Austausch über das Bande-3-Protein stellt mit einer Exchangerate von $4 \times 10^{-4} \text{ cm/sec}$ bei 37°C ein besonders effektives Transportsystem dar, welches zudem auch noch den pH-Wert beeinflussen kann. Im folgenden soll nun untersucht werden, welche Bedeutung dem Bande-3-Protein bei dem Kationenausstrom zukommt. Der Nachweis gelingt am einfachsten, indem man das Carriermolekül spezifisch hemmt. Dabei sind generell die kompetitiven Hemmstoffe, die mit dem Substrat um eine Bindungsstelle konkurrieren und die nicht kompetitiven Inhibitoren zu unterscheiden. Sie verändern entweder die Affinität der Substratbindungsstelle oder verhindern die Konformationsänderung ohne direkt mit dem Substrat zu konkurrieren.

3.5.1 DIDS als Hemmstoff des Bande-3-Proteins

4,4-Diisothiocyano-1,2-diphenylethan-2,2-disulfonat (DIDS) gehört zu der Stoffgruppe der Stilbendisulfonate. Es inhibiert den Anionentransport des Bande-3-Proteins nahezu spezifisch, indem es von außen mit dem Protein eine Bindung eingeht. In diesen Versuchen wird DIDS erst nach einer Minute zugesetzt im Gegensatz zu den Versuchen von Knauf et al. und Krüger [Knauf79 et Krüger99]. Durch die Zugabe von DIDS nach einer Minute hat der schnelle Anionenexchange von hauptsächlich OH^- -Ionen (außen) gegen Chlorid-Ionen (innen) bereits stattgefunden. Damit sollten die Bedingungen für das Eintreten des Kaliumefflux zunächst nicht betroffen sein.

Abbildungen 3.5 a und b zeigen nun, wie sich der Kationenausstrom verändert, wenn man nach 1 Minute, d.h. nachdem der Anionenexchange erfolgt ist, verschiedene Konzentrationen DIDS zu dem Puffer aus 300 mM Sorbitol, 20 mM HEPES, 1 mM Kalium

gluconat und 1 mM EDTA mit TRIS auf pH 7.4 eingestellt bei 37°C gibt. Die Fraktion der permeablen Zellen nimmt im Vergleich zum Kontrollversuch drastisch ab und die Halbwertszeit verlängert sich signifikant.

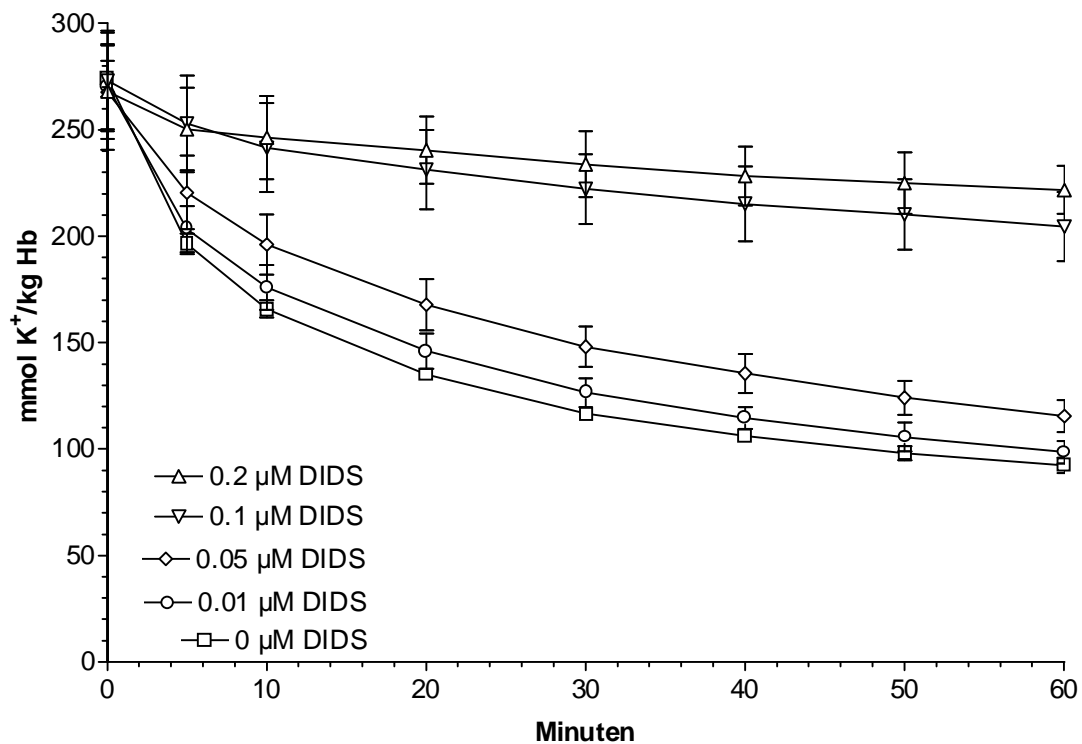


Abb. 3.5 a: Graphische Darstellung des K^+ -Efflux aus humanen, in Chloridlösung inkubierten Erythrozyten. DIDS wurde nach einer Minute dem System zugeführt. Das Versuchsmedium enthielt 300 mM Sorbitol, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA bei pH 7.4 und 37 °C; Mittelwert \pm SE

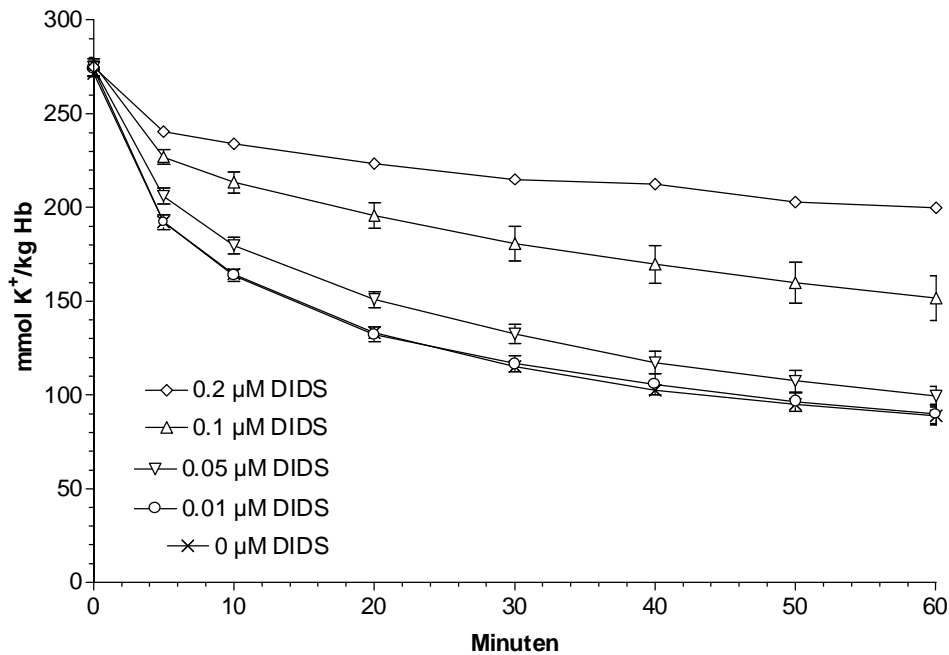


Abb. 3.5 b: Graphische Darstellung des K^+ -Efflux aus humanen, in Nitratlösung inkubierten Erythrozyten. DIDS wurde nach einer Minute dem System zugeführt. Das Versuchsmedium enthielt 300 mM Sorbitol, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA, bei pH 7.4 und 37 °C; Mittelwert \pm SE

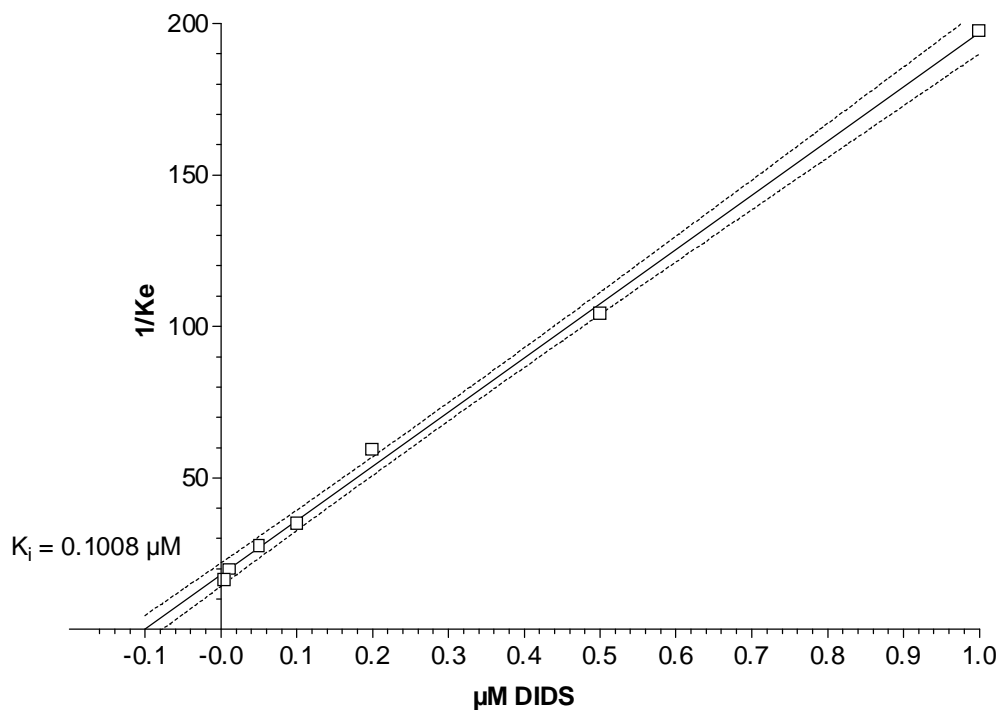


Abb. 3.5 c: Dixon Plot: humane, in Chloridlösung inkubierte Zellen; das Versuchsmedium enthielt 0.8 mM Chlorid bei pH 7.4 und 37°C; DIDS wurde dem System nach einer Minute zugesetzt.

Tab.3.5 a: Kinetische Auswertung und Zusammenfassung der Messdaten des Kalium-Efflux für die Versuche mit 300 mM Sorbitol, 1 mM Kaliumgluconat, 0.8 mM Cl⁻, pH 7.4 mit unterschiedlicher DIDS-Konzentration.
Mittelwert aus 5 Einzelversuchen (0,1 mM: 4 Einzelversuche; Kontrolle: 7 Einzelversuche) .
A ist der Span, k die Geschwindigkeitskonstante, E das Plateau, t_{1/2} die Halbwertszeit, % ist der Anteil permeabler Erythrozyten.

Kalium-Efflux der chloridgeladenen Zellen

DIDS	A	\pm SE	k _K	\pm SE	E	\pm SE	t _{1/2}	\pm SE	%	\pm SE
Kontrolle	139.7	5.8	0.056	0.003	88.6	4.0	12.6	0.6	61.1	1.6
0.01mM	139.2	6.9	0.048	0.003	91.6	3.4	14.7	0.8	60.2	1.8
0.05mM	140.8	8.8	0.038	0.002	102.1	3.9	18.4	0.9	57.8	1.9
0.1mM	67.2	12.2	0.031	0.003	193.2	9.8	23.5	2.2	25.5	4.1
0.2mM	52.4	7.5	0.020	0.004	205.7	3.2	38.8	5.9	20.0	2.1

Kinetische Auswertung und Zusammenfassung der Messdaten des Kalium-Efflux für die Versuche mit 300mM Sorbitol, 1mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA, 0.8mM NO₃⁻, pH 7.4 mit unterschiedlicher DIDS-Konzentration.
Mittelwert aus 4 Einzelversuchen (Kontrolle: 5 Einzelversuche) .

Kalium-Efflux der nitratgeladenen Zellen

DIDS	A	\pm SE	k _K	\pm SE	E	\pm SE	t _{1/2}	\pm SE	%	\pm SE
Kontrolle	139.6	3.0	0.051	0.005	82.5	5.6	14.0	1.2	63.0	2.0
0.01mM	134.8	3.4	0.052	0.001	86.0	5.7	13.4	0.3	61.1	2.2
0.05mM	142.0	3.6	0.040	0.001	87.8	6.0	17.4	0.6	61.9	2.2
0.1mM	117.0	12.7	0.024	0.003	121.9	15.4	30.9	4.3	49.2	5.9
0.2mM	86.6	18.3	0.023	0.010	160.8	21.0	51.4	19.0	35.2	7.7

Zwischen Kalium und Natrium gab es statistisch keine Unterschiede, die Werte bei Natrium unterlagen jedoch einer höheren Streuung.

Die Wirkung von DIDS auf die Glucoseaustrittszeit bei hoher und niedriger Ionenstärke :

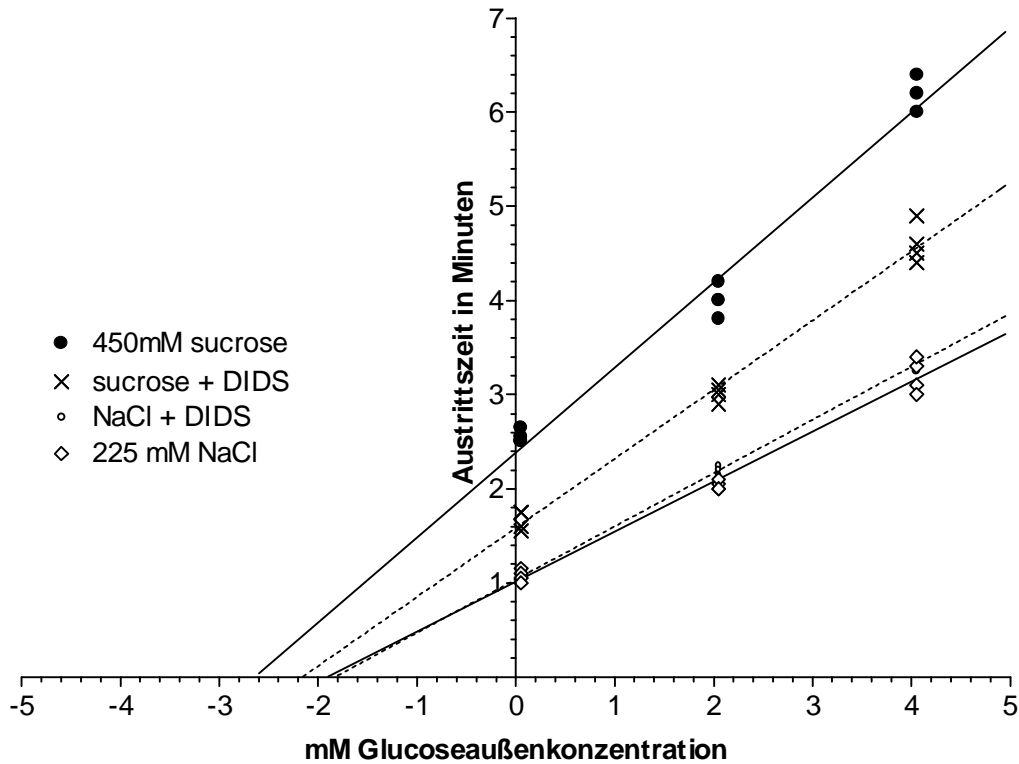


Abb. 3.5 d: Sen-Widdas-plot: Die Erythrozyten waren zu Beginn des Experiments in 150 mM Glucose aufgefüllt. Der Glucoseaustritt erfolgte in einer Austrittslösung mit 225 mM NaCl oder 450 mM Sucrose mit oder ohne 180 μ M DIDS. Die Austrittslösung enthielt 20 mM HEPES bei pH 7.4 und 20°C. Die Glucoseaußenkonzentration betrug 0.05, 2.05 und 4.05 mM. Anzahl der Versuche: 4

3.5.1 Phenylglyoxal als Hemmstoff

Auch Phenylglyoxal ist als Inhibitor des Bande 3 Proteins bekannt. Es handelt sich um ein Arginin-spezifisches Reagenz. Bei den folgenden Versuchen wurden unterschiedliche Mengen an Phenylglyoxal der Versuchslösung nach einer Minute zugegeben, wobei Chlorid als Anion diente. Je höher die Konzentration an Phenylglyoxal wurde, desto mehr Hämolyse trat bei den Proben auf. Somit können die Werte bei einer Konzentration von 20 mM Phenylglyoxal nicht ausgewertet werden.

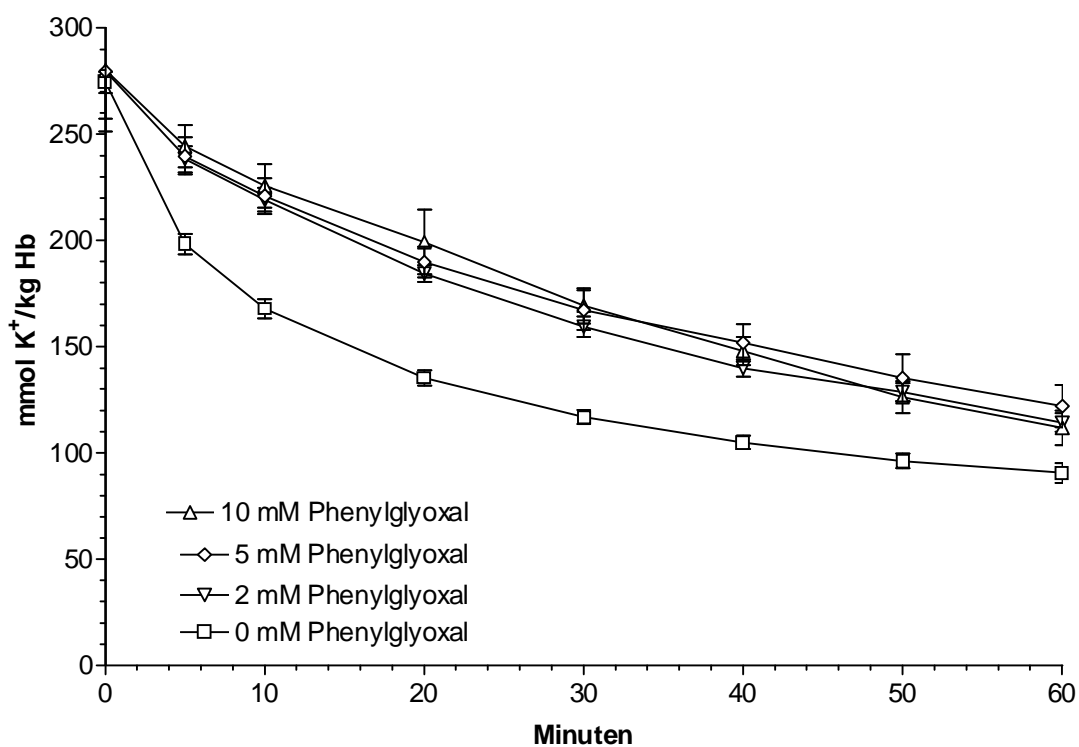


Abb. 3.5 e: Graphische Darstellung des K^+ -Efflux aus humanen, in Chloridlösung inkubierten Erythrozyten in Abhängigkeit verschiedener Phenylglyoxal-Konzentrationen. Das Versuchsmedium enthielt 300 mM Sorbitol, 20 mM HEPES, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA bei pH 7.4 und 37 °C; Mittelwert \pm SE

Tab.3.5 b: Kinetische Auswertung und Zusammenfassung der Messdaten des Kalium-Efflux für die Versuche mit 300 mM Sorbitol, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA, 0.8 mM Cl⁻, pH 7.4 mit unterschiedlicher Phenylglyoxal-Konzentration.

Mittelwert aus Einzelversuchen (Kontrolle: 7 Einzelversuche; 2 mM 4 Einzelversuche; 5 mM 8 Einzelversuche; 10 mM: 6 Einzelversuche).

A ist der Span, k die Geschwindigkeitskonstante, E das Plateau, $t_{1/2}$ die Halbwertszeit, % ist der Anteil permeabler Erythrozyten.

Kalium-Efflux

Phenylgl.	A	\pm SE	k_K	\pm SE	E	\pm SE	$t_{1/2}$	\pm SE	%	\pm SE
Kontrolle	139.7	5.8	0.056	0.003	88.6	4.0	12.6	0.6	61.1	1.6
2mM	181.3	2.2	0.028***	0.002	81.0	6.4	25.1	1.5	69.3**	1.5
5mM	183.6	7.0	0.024***	0.002	75.8	10.1	30.6	2.8	71.1*	3.5
10mM	235.8	11.1	0.019***	0.001	31.4***	9.4	39.3	1.9	88.2***	3.5

Signifikanz gegenüber 0 mM Konzentration Phenylglyoxal:

* P < 0,05

** P < 0,01

*** P < 0,001

Natrium-Efflux

Phenylgl.	A	\pm SE	k_{Na}	\pm SE	E	\pm SE	$t_{1/2}$	\pm SE	%	\pm SE
Kontrolle	14.9	0.3	0.053	0.006	10.6	1.7	13.8	1.4	59.8	3.8
2mM	17.9	0.4	0.032	0.005	8.6	1.3	23.2	2.9	67.9	3.7
5mM	19.7	2.2	0.026	0.005	7.5	1.5	34.5	7.0	74.5	6.9
10mM	20.8	1.9	0.018	0.002	6.0	1.5	43.2	6.2	77.3	5.9

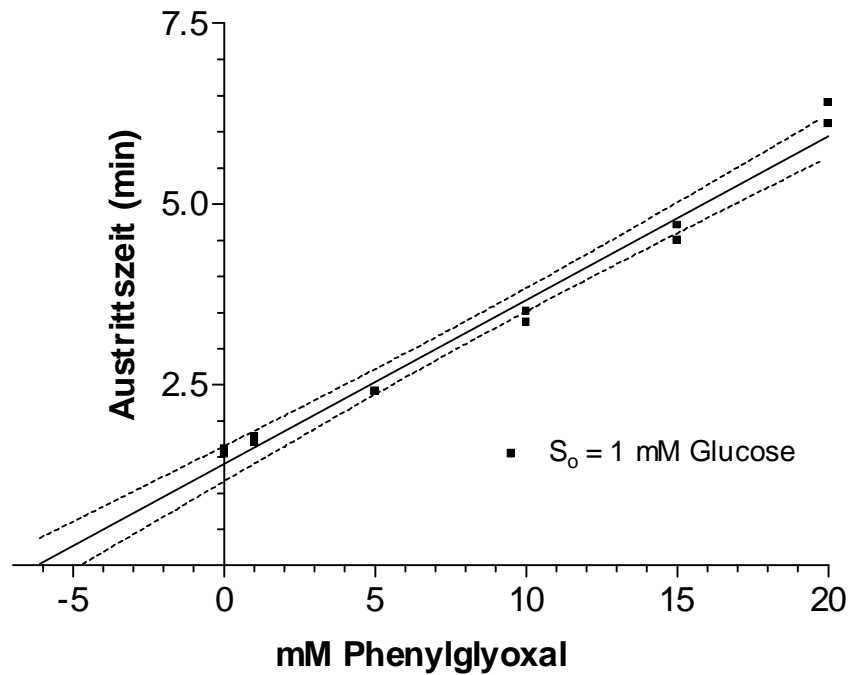
Effekt von Phenylglyoxal auf die Glucoseaustrittszeit von Erythrozyten:

Abb. 3.5 f: Dixon plot: Austrittszeit von Glucose aus Erythrozyten, die mit 150 mM Glucose. Das Austrittsmedium enthielt 1 mM Glucose (S_0), 225 mM NaCl, 20 mM HEPES bei pH 7.4 und 20°C; Phenylglyoxal wurde dem Austrittsmedium zugesetzt. Zwei Versuche pro Konzentration.

3.5 SDS als Aktivator des Kationen-Efflux

Die Abbildungen 3.6 a-d geben eindrucksvoll wieder, wie der Efflux durch ansteigende Mengen an SDS aktiviert werden kann. Dabei steigt der Anteil an permeablen Zellen auf über 90% an, wobei die Geschwindigkeitskonstante für den Kaliumausstrom erst bei SDS-Konzentrationen über 20 mM beeinflusst wird.

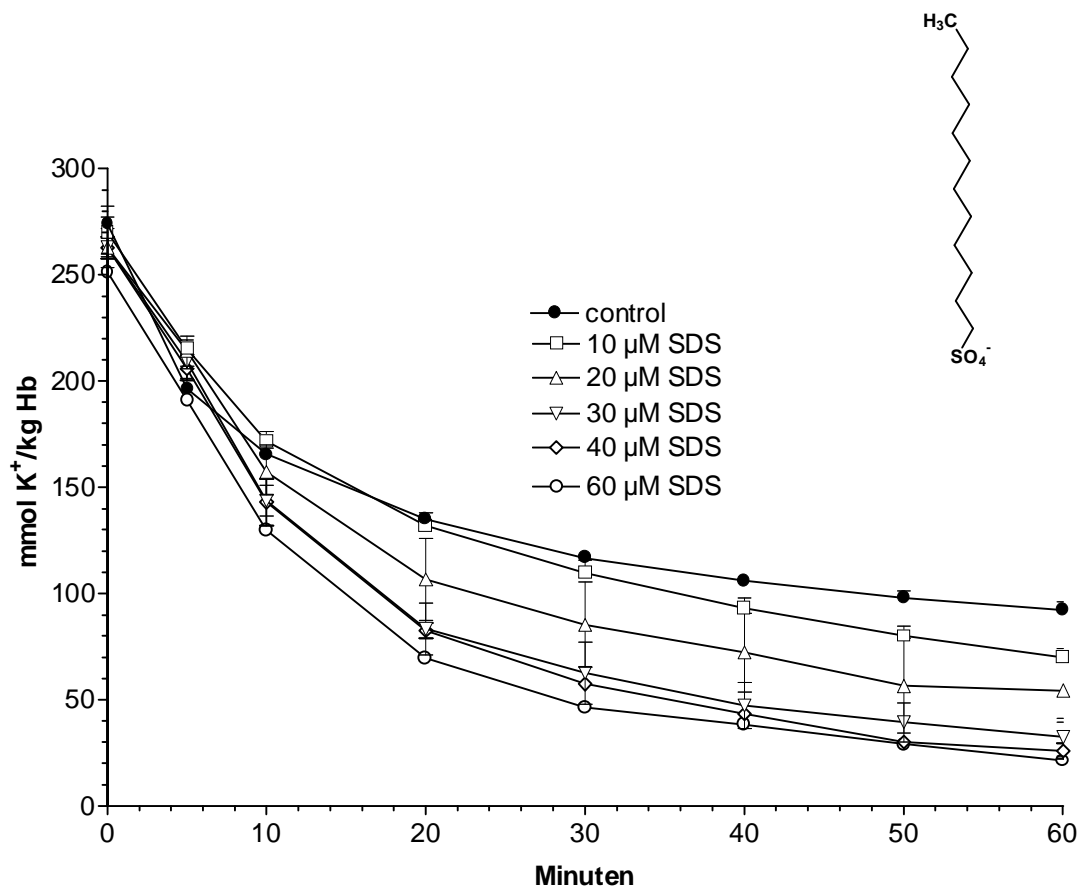


Abb. 3.6 a: Graphische Darstellung des K^+ -Efflux aus humanen, in Chloridlösung inkubierten Erythrozyten. SDS wurde nach einer Minute dem System zugeführt. Das Versuchsmedium enthielt 300 mM Sorbitol, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA bei pH 7.4 und 37 °C; Mittelwert \pm SE

Tab.3.6: Kinetische Auswertung und Zusammenfassung der Messdaten des Kalium-Efflux für die Versuche mit 300 mM Sorbitol, 1 mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA, 0.8 mM Cl⁻, pH 7.4 mit unterschiedlicher SDS-Konzentration.
Mittelwert aus Einzelversuchen (Kontrolle: 7 Versuche; 5 – 40 μ M 4 Versuche; 60 μ M 1 Versuch).
A ist der Span, k die Geschwindigkeitskonstante, E das Plateau, $t_{1/2}$ die Halbwertszeit, % ist der Anteil permeabler Erythrozyten.

Kalium-Efflux

SDS	A	\pm SE	k_K	\pm SE	E	\pm SE	$t_{1/2}$	\pm SE	%	\pm SE
Kontrolle	139.7	5.8	0.056	0.003	88.6	4.0	12.6	0.6	61.1	1.6
5 μ M	167.6	1.7	0.043*	0.000	80.2	3.9	16.1	0.2	67.7*	1.3
10 μ M	193.1	6.8	0.051	0.008	61.7**	5.3	14.7	2.5	75.9***	1.5
20 μ M	237.1	39.4	0.072	0.017	50.6**	10.5	11.7	2.9	80.8**	5.4
30 μ M	254.8	15.9	0.077**	0.006	32.1***	8.8	9.2	0.7	88.6***	3.4
40 μ M	262.1	11.1	0.079*	0.001	26.0***	5.0	9.1	0.9	90.9***	1.9
60 μ M	252.6	0.0	0.086	0.000	25.1	0.0	8.1	0.0	91.0	0.0

Signifikanz gegenüber 0 mM Konzentration SDS:

* P < 0,05

** P < 0,01

*** P < 0,001

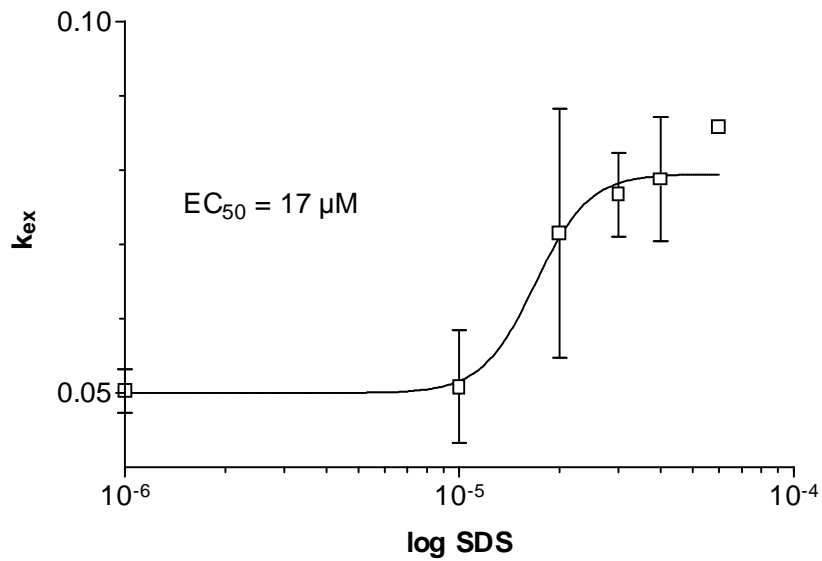


Abb. 3.6 b : Graphische Darstellung der Geschwindigkeitskonstante (k_{ex}) in Abhängigkeit der SDS-Konzentration von Erythrozyten - in Chloridlösung vorinkubiert; Das Versuchsmedium enthielt 300 mM Sorbitol, 20 mM HEPES, 1mM Kaliumgluconat, 1 mM EDTA, bei pH 7.4 und 37°C; SDS wurde nach einer Minute dem System zugeführt.

Effekt von SDS auf die Glucosepermeabilität bei chloridbeladenen Erythrozyten:

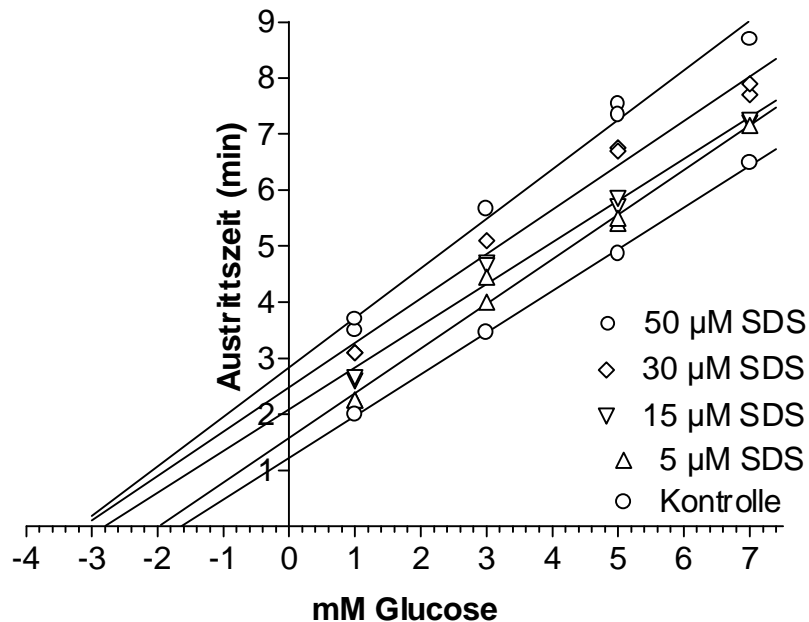


Abb. 3.6 c: Sen-Widdas-plot: Austrittszeit von Erythrozyten, die mit 150 mM Glucose im Chloridmedium beladen wurden. Das Austrittsmedium enthielt 150 mM Glucose, 20 mM HEPES bei pH 7.4 und 20°C; SDS wurde dem Austrittsmedium zugesetzt.

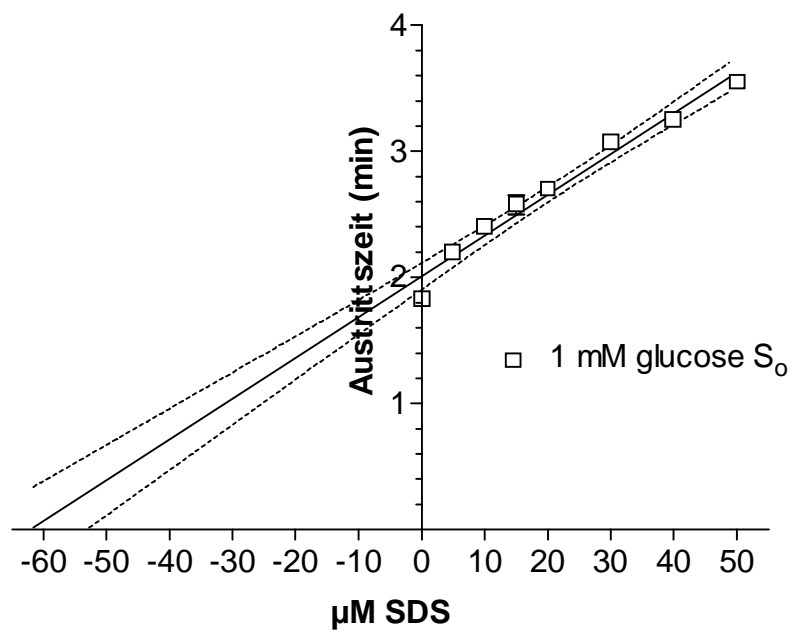


Abb. 3.6 d : Dixon plot: Glucoseaustrittszeit bei 1mM Glucose in der Außenlösung und verschiedenen SDS-Konzentrationen. Das Austrittsmedium enthielt 150 mM NaCl, 20 mM HEPES bei pH 7.4 und 20°C; SDS wurde dem Austrittsmedium zugesetzt.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob der Glucosetransporter Glut 1 in der menschlichen Erythrozytenmembran auch als ein Kationenkanal genutzt werden kann.

Diese von Fuhrmann aufgestellte Hypothese erscheint nach einer kürzlich publizierten Arbeit an Hefezellen als sehr wahrscheinlich [Liang98]. Schaltet man an Hefezellen die Gene für die Kaliumtransporter TRK 1 und TRK 2 aus, so lassen sich nach einiger Zeit Mutanten isolieren, die wieder Kationen aufnehmen können. Dies geschieht offenbar durch mutierte Glucosetransporter Hxt 1, Hxt 3 und dem Galactose/Glucose-Transporter Gal 2. Bei diesen Transportern kommt es bei der Mutation zum Austausch von Aminosäuren, die unmittelbar an oder in den membranspannenden Domänen liegen. Die Zuckertransporter verlieren dabei die Eigenschaft, Zucker zu transportieren und lassen dafür Kalium- sowie Natriumionen in die Zelle eintreten. Diese Eigenschaft, Kationen zu transportieren, gilt aller Wahrscheinlichkeit nach auch für divalente Kationen wie Calcium.

Die an den mutierten Hefeglucosetransportern beschriebene Permeation von Kationen durch Glucosetransporter entspricht den experimentellen Befunden an menschlichen Erythrozyten bei niedriger Ionenstärke. Mit abnehmender Ionenstärke nehmen V_{\max} und Affinität des Glucosetransporters ab und parallel dazu der Kationentransport für Kalium- und Natriumionen zu [Karen Krüger,1999]. Außerdem haben kürzlich Kaestner et al. [Kaestner00] darüber berichtet, dass der sogenannte „non-selective voltage activated cation channel“ bei niedriger Ionenstärke auch für divalente Kationen wie Calcium, Magnesium oder Barium durchgängig ist. Nach deren Theorie handelt es sich jedoch um einen $K^+(Na^+)/H^+$ -Austauscher in der Erythrozytenmembran, der bei niedriger Ionenstärke stimuliert wird. Diese Theorie wird in einer 2002 erschienen Arbeit [Kaestner02] wieder in Frage gestellt und dafür ein Protonen- oder Hydroxyl-Ionen-Kanal diskutiert.

Die hier beschriebenen Experimente sollten dazu beitragen, den Mechanismus des Kationentransportes bei niedriger Ionenstärke in menschlichen Erythrozyten sowohl mit verschiedenen permeablen Anionen und möglichen Inhibitoren zu klären. Untersuchungen mit den Inhibitoren wurden ebenfalls am Glucose-Efflux durchgeführt.

Zum Verständnis des Effektes bei niedriger Ionenstärke ist es notwendig, die ablaufenden Vorgänge zu beschreiben. Beim Einbringen der Erythrozyten von normaler Ionenstärke in niedrige Ionenstärke wird über den Anionenaustauscher sofort ein neues Anionengleichgewicht hergestellt, das heißt Chlorid-Ionen laufen aus den Erythrozyten heraus und dafür treten hauptsächlich Hydroxyl-Ionen mit sehr hoher Affinität zum Anionentransporter in die Zellen ein. Ohne einen vorhandenen Außenpuffer hat Wilbrandt [Wilbrandt40] in der Suspensionsflüssigkeit eine Ansäuerung im Sekundenbereich gemessen. Demnach muss es entsprechend in der Zelle alkalisch werden. Dies lässt sich auch mit der Streulichtapparatur nachweisen. Der Brechungsindex des Hämoglobins nimmt im Sekundenbereich durch das Alkalischeswerden der Zellen stark zu, es werden im Zellinneren schätzungsweise Werte von $\text{pH} > 9$ erreicht ($\text{OH}^- \text{-innen} = \text{Cl}^- \text{-innen} * \text{OH}^- \text{-außen} / \text{Cl}^- \text{-außen}$).

Unsere Theorie geht davon aus, dass sich dabei auch der pH-Wert im wassergefüllten Glucosekanal ändert und durch Dissoziation von Aminosäuren wie Glutamin, Cystein und Tyrosin mehr negative Festladungen im Kanal erzeugt werden. Damit wird der eher neutrale Glucosekanal in einen negativ geladenen Festionen-Kanal verwandelt, der entsprechend der Theorie von Leonor Michaelis nun als Kationenkanal fungiert [Michaelis26]. Somit ist der Anionenaustausch bei niedriger Ionenstärke die Vorbedingung für den eintretenden Kationenausstrom.

Im ersten Teil der Arbeit wird versucht, über den Anionenaustausch den Kationenausstrom zu beeinflussen. Insbesondere ein Austausch der Chloridionen gegen Sulfationen soll den theoretischen Austausch von Sulfat gegen Hydroxyl wesentlich effektiver gestalten als mit Chlorid und eine Verringerung des Kationenausstroms erwarten lassen [Knauf79]. Weiter wird der Chlorid-Hydroxyl-Austausch durch die Anwesenheit von Phosphationen behindert, was ebenfalls zu einem entsprechend geringeren Kationenfluß führen müsste. Dagegen stehen sich in der Permeabilität Chlorid- und Nitrationen sehr nahe, demnach sollte der Kationenausstrom im Nitrat-Medium mit dem im Chlorid-Medium vergleichbar sein.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.1 a-d und Tabellen 3.1 a-d zusammengefasst. Der Kaliumausstrom chloridbeladener Erythrozyten (Abb. 3.1a und Tabellen 3.1a bis 3.1d) nimmt mit Zunahme der Chloridaußenkonzentration ab. Dies ist auf eine tendenzielle Abnahme der Geschwindigkeitskonstante für den Kaliumausstrom von 0.056 bei 0.8 mM Chlorid, 0.051 bei 2 mM Chlorid, 0.05 bei 5 mM Chlorid und auf 0.045 mmol K⁺/kg Hämoglobin pro Minute bei 10 mM Chlorid zurückzuführen. Deutlicher nimmt dagegen mit ansteigender Chloridaußenkonzentration die Höhe des Plateau zu und damit der Prozentsatz an permeablen Erythrozyten ab. Bei 0.8 mM Chlorid beträgt der Anteil permeabler Erythrozyten 61.1 %, bei 2 mM Chlorid 58.7%, bei 5 mM Chlorid 52.5% und bei 10 mM Chlorid nur noch 49.1%. Diese Änderungen sind gegenüber 0.8 mM Chlorid im t-Test mit $P < 0.01$, $P < 0.001$ und $P < 0.001$ signifikant. Eine Erklärung für die Abnahme permeabler Zellen mit ansteigender Außenchloridkonzentration ist in der geringeren Alkalisierung der Zellen durch den entsprechend geringeren OH⁻ - Cl⁻-Austausch zu suchen. Für den Natriumausstrom gilt im Prinzip das gleiche wie für den Kaliumausstrom, die Statistik ist jedoch aufgrund des geringeren Natriums von etwa 10 mM in der Zelle nicht ausreichend.

Für nitratbeladene Zellen (Abb. 3.7 b und Tabellen 3.1a bis 3.1d) ist der Kalium- und Natriumausstrom vergleichbar mit den chloridbeladenen Zellen. Die gilt für die Geschwindigkeitskonstanten des Kaliumausstroms von 0.051 bei 0.8 mM Nitrat, 0.051 bei 2 mM Nitrat, 0.05 bei 5 mM Nitrat und auf 0.045 mmol K⁺/kg Hämoglobin bei 10 mM Nitrat und für den Prozentsatz permeabler Zellen bei 0.8, 2 und 5 mM Nitrat. Nur bei 10 mM Nitrat ist der Prozentsatz mit 42.6 gegen 49.1 % bei 10 mM Chlorid signifikant geringer ($P > 0.05$).

Dies Ergebnis spricht für ähnliche Effekte von Chlorid und Nitrat auf den Kationenausstrom bei niedriger Ionenstärke [Knauf 79]. .

Im Gegensatz zu den monovalenten Anionen Chlorid und Nitrat zeigen mit Sulfat beladene Erythrozyten mit 5 mM und 10 mM Sulfat in der Außenlösung deutlich geringere Geschwindigkeitskonstanten für den Kaliumausstrom mit 0.025 und 0.020 (Mittelwert aus 2 Versuchen) gegen 0.050 ± 0.002 und 0.045 ± 0.005 mmol K⁺/kg Hämoglobin pro Minute bei den entsprechenden Versuchen mit Chlorid (Tabelle 3.1a bis 3.1d). Außerdem ist besonders bei 10 mM Sulfat in der Außenlösung der Prozentsatz an permeablen Zellen mit 38.3 % deutlich geringer als im entsprechenden Chloridversuch

($49.1 \pm 1.9\%$). Dies hängt mit dem ineffektiveren Austausch des Anionentransporters von Hydroxyl-Anion gegen das divalente Sulfat-Anion zusammen [Knauf 79].

Schließlich sollte im Versuch die Frage geprüft werden, ob Phosphat-Anionen, wie in den Versuchen von S. Richter et al. [Richter97] den Kaliumausstrom beeinflussen (siehe Abb. 3.7d). Dies konnte aus dem publizierten niedrigem K^+ Einstrom von 0.674 ± 0.089 pro mmol/L Erythrozyten pro Stunde in 5.8 mM Phosphatpuffer bei 7.5 mM Chlorid gegen unseren um Größenordnungen stärkeren K^+ Ausstrom bei vergleichbarer 10 mM Chloridaußenkonzentration von etwa 126 mmol/L Erythrozyten pro Stunde angenommen werden. Aus diesem Grunde wurden vergleichende Versuche mit Phosphatpuffer bei 0.8 und 7.5 mM Chlorid in chloridbeladenen Zellen durchgeführt. In der Abbildung 3.7 d sind die resultierenden Kurven dargestellt und in Tabelle 3.1 a werden in chloridbeladenen Zellen bei 0.8 mM Chlorid in der Außenlösung mit 5.8 mM Phosphat-Puffer bei pH 7.4 die Parameter aus dem Kaliumausstrom berechnet. Es ergab sich gegenüber der Kontrolle mit HEPES-Puffer eine signifikant verminderte Geschwindigkeitskonstante für den Kaliumausstrom ($P < 0.01$) mit 0.039 ± 0.000 gegen 0.056 ± 0.003 mmol/kg Hämoglobin pro Minute und der Prozentsatz permeabler Zellen nahm auf 56.2 ± 0.3 gegen 61.1 ± 1.6 signifikant ($P < 0.05$) ab. Dabei resultierte mit Phosphat und 0.8 mM Chlorid ein Kaliumausstrom von 117 mmol K^+ /L Erythrozyten pro Stunde. Demnach bewirkt das Phosphat-Anion aufgrund seiner Hemmwirkung am Anionentransporter, wie bereits vermutet, einen um etwa 30 Prozent geringeren Kaliumausstrom. Die große Differenz zum KaliumEinstrom, wie von Richter et al. gemessen, kann aber mit diesem Ergebnis nicht erklärt werden. Möglicherweise handelt es sich nicht um das gleiche Transport-System.

Frau Krüger hatte in ihrer Arbeit [Krüger99] den Einfluss der Pufferkonzentration bei niederer Ionenstärke auf den Kationenausstrom außer bei 20 mM HEPES auch noch bei 1 mM HEPES geprüft. In dieser Arbeit sollte der Effekt systematisch bei 2, 5, 20, 50 und

100 mM HEPES sowohl mit chlorid- und nitratbeladenen Zellen untersucht werden. Wie die Abbildungen 3.9 a und b zeigen, steigt das Plateau mit zunehmender Pufferkonzentration systematisch sowohl bei den chlorid- als auch bei den nitratbeladenen Zellen an und dabei nimmt der Prozentsatz permeabler Erythrozyten ab.

Die Geschwindigkeitskonstanten des Kaliumausstromes nahmen bei 2, 5, 20, 50 und 100 mM HEPES in der Tendenz für Chlorid und Nitrat ab von 0.049 und 0.058, 0.057 und 0.056, 0.051 und 0.056, 0.048 und 0.050 sowie auf 0.044 und 0.047 mmol/kg Hämoglobin pro Minute (siehe Tabellen 3.3a und b). Die Abnahme der permeablen Zellen ist gegenüber dem Kontrollwert von 2 mM HEPES bei den chlorid- und nitratbeladenen Zellen signifikant, wie die folgende Abbildung verdeutlicht.

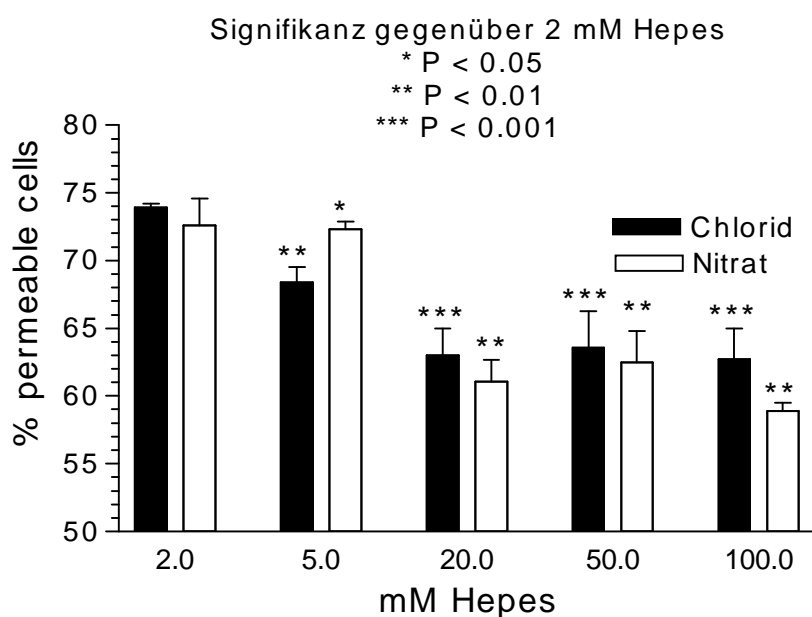


Abb. 4.1: Anteil an permeablen Zellen bei verschiedenen Pufferkonzentrationen
 Signifikanz gegenüber 2 mM HEPES

Aus der Abbildung geht weiter hervor, dass bei HEPES-Konzentrationen über 20 mM praktisch keine Abnahme des Prozentsatzes permeabler Zellen mehr erfolgt, d.h. der Effekt ist gesättigt. Die stärksten Veränderungen erfolgen bereits bei sehr kleinen Pufferkonzentrationen. Der Gedanke liegt nahe, dass ein Außenpuffer in Konkurrenz zum Hämoglobinpuffer in der Zelle den Innen-pH-Wert beeinflusst und damit einen negativen

Effekt auf den Kaliumausstrom bewirkt. Dies wird besonders deutlich, wenn man den Kaliumausstrom ohne Außenpuffer untersucht wie in den Versuchen von Schatzmann und Wilbrandt [Wilbrandt60], die bei einer niedrigen Außenkonzentration von bis zu 5 mM Chlorid nahezu 100% permeable Erythrozyten-Populationen beobachteten. Frau Krüger hat in ihrer Arbeit [Krüger99] ohne irgendeinen Pufferzusatz - und experimentell

vergleichbar - mit unseren Ansätzen eine hohe Geschwindigkeits-konstante für den Kaliumausstrom von 0.079 gegen den bei 2 mM HEPES (Tabelle 3.3a) von 0.049 mmol/Kg Hämoglobin pro Minute gemessen. Diese Versuche unterstreichen die Bedeutung eines Puffers bei dem Kationenausstrom in niedriger Ionenstärke.

Schließlich sollte die Anwesenheit von Glucose als Nichtelektrolyt im Suspensionsmedium anstelle von Sorbit möglicherweise den Kationenausstrom durch den Glucosekanal behindern. Tatsächlich wird der Prozentsatz der permeablen Zellen hierdurch deutlich vermindert. Im Vergleich Sorbit zu Glucose war bei 0.8 mM Chlorid in der Außenlösung der Prozentsatz permeabler Zellen von 61.1 ± 1.6 auf 46.5 ± 1.3 , bei 2 mM Chlorid von 58.7 ± 1.6 auf 43.5 ± 1.1 auf und bei 5 mM Chlorid von 52.5 ± 0.7 auf 38.5 ± 3.1 vermindert. Bei 10 mM Chlorid in der Außenlösung und 300 mM Glucose konnte der Versuch wegen der eintretenden Hämolyse nicht ausgewertet werden. Dies Ergebnis ist möglicherweise so zu werten, dass Glucose-Moleküle mit Kalium-Ionen um den Glucosetransporter konkurrieren. Jedoch waren in den folgenden Versuchen mit nur 10 mM Glucose im Suspensionsmedium keine signifikanten Effekte nachzuweisen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Inhibitoren benutzt, die direkt oder indirekt den Kationenausstrom hemmen und den Glucosetransport beeinträchtigen sollen. In den Experimenten mit niedriger Ionenstärke zur Messung des Kationenausstrom wurden die Inhibitoren erst nach 1 Minute, also nach erfolgtem schnellen Anionenaustausch zugesetzt. Neben DIDS, dem effektivsten Anionentransporthemmer, wurde SDS (Natrium-Dodecylsulfat) und das Argininreagenz Phenylglyoxal zugesetzt.

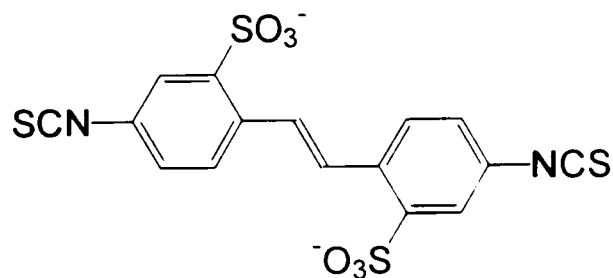


Bild 4.2: DIDS (4,4'-Diisothiocyanato-stilben-2,2'-disulfonat)

DIDS reagiert an der Zelloberfläche mit dem Anionenaustauscher (Bande III, 95 000 KD Transmembranprotein) und hemmt effektiv den Transport von Anionen. Dabei hängt die Hemmkonzentration von DIDS von der Orientierung des Anionenaustauschers ab. Bei einem nach außen gerichteten Chloridgradienten, wie bei den Experimenten in niedriger Ionenstärke mit Chlorid als Anion, wird der Transporter in die nach außen weisende Konformation gebracht (E_o) und DIDS reagiert nur mit dieser nach außen weisenden E_o -Form [Furuya84]. Demnach wurde bei einem fünffachen Chloridgradienten ($Cl_i > Cl_o$) der K_i -Wert für DIDS um mehr als die Hälfte gesenkt und stieg bei umgekehrten Chloridgradienten ($Cl_i < Cl_o$) weiter an. Bei physiologischen NaCl-Konzentrationen liegt der K_i -Wert von DIDS bei 0.3 μ M. In den hier durchgeführten Versuchen mit DIDS am Kationenausstrom bei niedriger Ionenstärke wurde DIDS erst nach Einstellung des Anionengradienten (nach 1 Minute) zugesetzt. Das interessante Ergebnis dieses Versuches mit Chloridgradient ($Cl_i > Cl_o$) zeigt einen sehr niedrigen K_i -Wert von 100 nM. DIDS reagiert demnach mit der nach außen weisenden Konformation des Anionentransporters. Der Transporter wurde also erst durch die Bedingungen der niedrigen Ionenstärke, dem bestehenden Anionengradienten, in diese Konformation gebracht. Mit ansteigender DIDS-Konzentration nehmen die Geschwindigkeit des Kationenausstroms und der Prozentsatz permeabler Zellen kontinuierlich ab.

Dies Ergebnis findet eine Parallele bei Glucoseaustrittsversuchen mit DIDS (Abb. 3.12d). Bei hoher Ionenstärke hat DIDS keinen Effekt auf den Glucosetransport. Dagegen wirkt DIDS bei niedriger Ionenstärke, es hebt einen großen Teil der hemmenden Wirkung auf den Glucosetransport auf, indem es die V_{\max} und die Affinität wieder ansteigen lassen. Dies Ergebnis weist darauf hin, dass DIDS den Glucosetransport nicht selbst beeinträchtigt, sondern nur indirekt über den Anionenaustausch den Hemm-Effekt bei niedriger Ionenstärke bewirkt.

Jones und Knauf [Jones85] haben die hemmende Wirkung von DIDS auf den Kationenausstrom bei niedriger Ionenstärke ebenfalls auf den Anionenaustauscher bezogen. Im Gegensatz zu unseren Vorstellungen, soll jedoch der Anionenaustauscher bei niedriger Ionenstärke auch Kationen transportieren können. DIDS sollte unter diesen Bedingungen nicht nur den Anionenaustausch, sondern auch direkt einen sogenannten „very low conductivity channel“ für Kationen im Anionenaustauscher selbst blockieren. DIDS hemmt sogar diesen Effekt, wenn I^- für Cl^- als Anion ersetzt wird und DIDS selbst den I^- -Austausch nicht hemmt.

Anstelle von I^- -Anionen haben wir NO_3^- -Anionen benutzt und mit DIDS einen vergleichbaren Hemmeffekt wie mit Chlorid und DIDS gemessen, obwohl DIDS den NO_3^- -Austausch deutlich geringer hemmt als den Cl^- -Austausch [Fuhrmann84]. Diese Resultate sind also im Prinzip in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Jones und Knauf, nicht aber die Hypothese über die Hemmwirkung. In unseren Versuchen bewirken steigende DIDS-Konzentrationen eine deutliche Abnahme der Fraktion der reagierenden Zellen (Abb. 3.5 a und b, Tabelle 3.5 a). Nach unserer Meinung blockiert DIDS den Anion - OH-Austausch in die Zelle. Ist dieser gehemmt, so kommt es über den Jacobs-Stewart-Cyclus zu einem Absinken des alkalischen pH-Wertes in der Zelle durch CO_2 -Einstrom und Bicarbonat Bildung ($CO_{2\text{außen}} \leftrightarrow CO_{2\text{innen}} + H_2O = H_2CO_3 = H^+ + HCO_3^-$). Dieser indirekte Effekt über den pH-Wert in der Zelle bewirkt, dass die Glucosetransporter wieder wie ursprünglich in die selektive Glucosetransportform übergehen.

Eine mehr direkte Wirkung auf den Glucostransporter, der als putativer Kationenkanal fungieren kann, haben wir durch Natrium-Dodecylsulfat (SDS) erhalten. Es beschleunigt den Kationenausstrom bei niedriger Ionenstärke, wobei die Geschwindigkeitskonstanten des Kaliumausstromes und der Prozentsatz permeabler Zellen signifikant zunehmen (Abb. 3.6 a und Tabelle 3.6). SDS hemmt bei vergleichbaren Konzentrationen den Glucostransport wie aus dem Sen-Widdas-Darstellung der Abbildung 3.6 c hervorgeht. Dabei nimmt sowohl die V_{\max} als auch die Affinität des Glucostransportes mit steigender SDS-Konzentration ab. Im Dixon-plot der Abbildung 3.6 d ergibt sich ein K_i -Wert von 62 μM in größenordnungsmäßiger Übereinstimmung mit einem EC_{50} -Wert für die Aktivierung des Kationenausstroms (Abb. 3.6 b). Es ist vorstellbar, dass sich SDS-Moleküle mit negativer Ladung in den Glucosekanal einlagern und aufgrund der negativen Festladung den Kationenausstrom beschleunigen und andererseits den Mechanismus des Glucostransports hemmen.

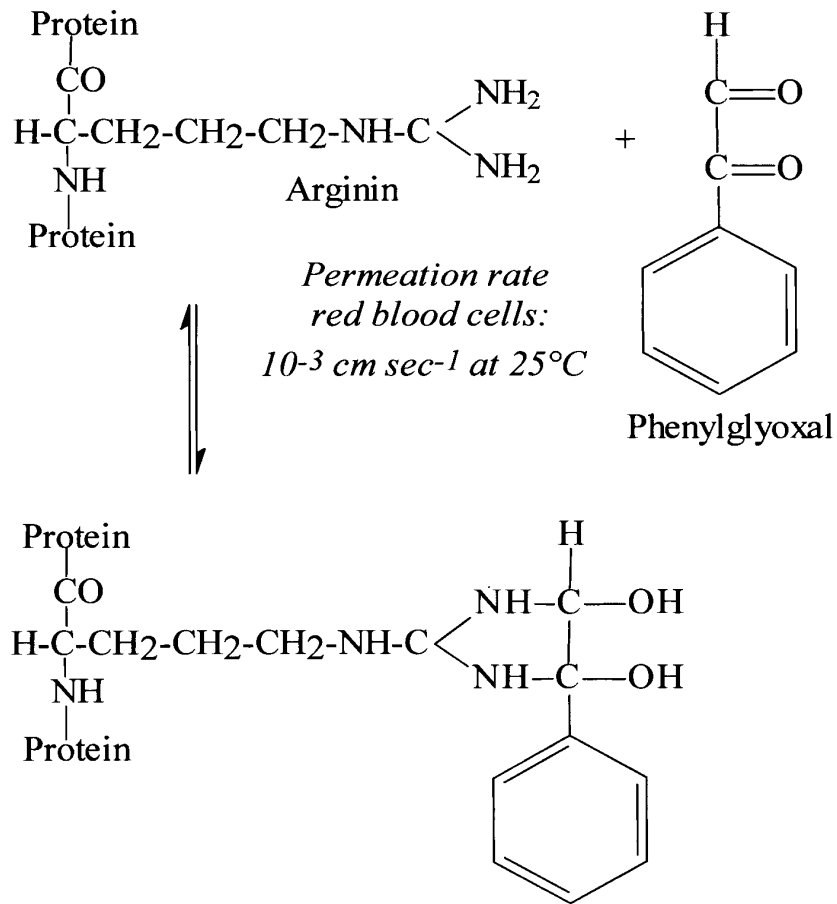


Abb. 4.3 : Reaktionsschema von Phenylglyoxal mit Argininingruppen

Weiterhin besitzt der Glucosetransporter auf der Innenseite der Membran 10 Arginin- und eine Lysin-Aminosäure. Es gibt Vorstellungen darüber, dass diese positiv geladenen Aminosäuren den Glucosekanal vor einem Durchtritt von Kationen schützen sollen [Widdas91]. Deshalb wurde Phenylglyoxal als ein permeables Argininreagenz sowohl auf den Glucosetransport als auch auf den Kationenausstrom bei niedriger

Ionenstärke getestet. Die Wichtigkeit der Arginin-Aminosäuren für den Glucosetransporter konnte insofern bestätigt werden, als Phenylglyoxal den Glucosetransport deutlich hemmt mit einem K_i -Wert von 6 mM (Abb. 3.5 f). Damit ist eindeutig bestätigt, dass die Aminosäuren Arginin an der Innenseite der Membran für den Glucosetransport sehr wichtig sind. Dagegen ist die Hemmwirkung auf den Kationenausstrom bei niedriger Ionenstärke (Abb. 3.5 e) nicht so einfach zu erklären, da Phenylglyoxal wie DIDS auch den Anionenaustauscher in der Erythrozytenmembran hemmt [Zaki84].

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Kationenefflux aus Erythrozyten bei niedriger Ionenstärke. Nach einer Hypothese von Fuhrmann sollte der Kationenausstrom durch veränderte Glucosetransporter erfolgen. Vorausbedingungen für diese Veränderungen des Fluxverhaltens der Glucosetransporter ist eine Alkalisierung des Zellinneren.

Im ersten Teil der Arbeit wurde darum die Effektivität des Kationenefflux in Anwesenheit verschiedener monovalenter oder divalenter Anionen untersucht. Der Austausch von Chlorid- gegen Nitrationen verursachte beim Kationenefflux bei niedriger Ionenstärke einen in der Fehlerbreite der Methode vergleichbaren Effekt. Bei Chlorid nimmt mit Abnahme des Chlorid-Gradienten, d. h. mit Zunahme der Chloridaußenkonzentration, die Effektivität des Kaliumausstroms ab. Dies führt zu einer signifikanten Abnahme des Prozentsatzes der permeablen Erythrozyten von $61.1\% \pm 1.6$ auf $58.7\% \pm 1.6$, $52.5\% \pm 0.7$ und $49.1\% \pm 1.9$ bei 0.8, 2, 5 und 10 mM Chlorid in der Außenlösung. Dieser Effekt ist vergleichbar mit Nitrat-Anionen. Der Prozentsatz permeabler Zellen fiel hierbei von $63.0\% \pm 2.0$ auf $57.6\% \pm 2.5$, $50.8\% \pm 1.4$ und $42.6\% \pm 1.3$ bei 0.8, 2, 5 und 10 mM Nitrat in der Außenlösung ab. Das Ergebnis entspricht den experimentellen Erwartungen einer vergleichbaren Effektivität von Nitrat und Chlorid auf den Hydroxyl-Exchange des Anionenaustauschers Bande III. Bei beiden Anionen vermindert sich der Kationenefflux mit abnehmendem Anionen-Gradienten Innen- gegen Außenkonzentration.

Sulfatbeladene Erythrozyten ließen eine geringere Effektivität erwarten, da der Hydroxyl-SO₄-Exchange über den Anionenaustauscher eine geringere Austauschgeschwindigkeit als z.B. der Hydroxyl-Chlorid-Exchange besitzt. Der Prozentsatz der permeablen Zellen im Sulfatmedium fiel von 56.5% auf 52.7%, 53.7% und 38.3% bei 0.8, 2, 5 und 10 mM Sulfat auf deutlich geringere Werte als bei den monovalenten Anionen ab. Entsprechend waren auch die Geschwindigkeitskonstanten für den Kalium-Efflux bei 5 und 10 mM Sulfat in der Außenlösung mit 0.025 und 0.020 gegen 0.0050 ± 0.002 und 0.045 ± 0.005 mmol K⁺/kg Hämoglobin pro Minute im Vergleich zu Chlorid vermindert.

Ähnlich wie Sulfat-Ionen hemmen auch Phosphat-Anionen den Anionen-Exchange. Wie bei Richter et al. wurden die Versuche in 5.8 mM NaH_2PO_4 , Puffer pH 7.4 mit 0.8 mM und 7.5 mM Chlorid in der Außenlösung durchgeführt und ein um 30% geringerer Kaliumefflux als in den entsprechenden Versuchen mit HEPES als Puffer gemessen. Der aus diesen Versuchen berechnete Wert ist 187 mal höher als der von Richter et al. Es besteht somit kein Anhalt für das Vorhandensein eines $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Transports, der im allgemeinen wesentlich ineffektiver ist.

Die Wirkung der monovalenten und divalenten Anionen auf den Kationenefflux ist im Einklang mit einer Modulation der Effektivität des Anionenaustauschers. Eine Verminderung des Anionengradienten als auch Sulfat- oder Phosphat-Ionen im System führen zu einem verminderten Hydroxyl-Anion-Exchange und dementsprechend zu einer geringeren Alkalisierung in den Erythrozyten.

Komplexer gestaltet sich die Frage eines Einflusses der Pufferkapazität auf den Kaliumefflux bei niedriger Ionenstärke. In den Erythrozyten selbst ist das Polyanion Hämoglobin mit 7.3 mM der wichtigste Puffer. Der Zusatz eines Außenpuffers wie HEPES muss über den Hetero-Anionen-Exchange (Gleichgewicht zwischen Hydroxyl-, Hydrogencarbonat- und weitere vorhandene Anionen) auch die Pufferkapazität des Hämoglobins beeinflussen. Wird die HEPES-Konzentration von 2 auf 5, 20, 50 und 100 mM erhöht, so nimmt der Prozentsatz permeabler Zellen bei 0.8 mM Chlorid von $79.9\% \pm 0.3$, $68.4\% \pm 1.1$, $63.0\% \pm 2.0$, $63.6\% \pm 2.7$ und $62.7\% \pm 2.3$ signifikant gegenüber dem ersten Wert ab. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch mit Nitrat als Anion erhoben. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des pH-Wertes im Inneren der Erythrozyten auf den Kationenefflux bei niedriger Ionenstärke.

Ersetzt man den impermeablen Nichtelektrolyt Sorbit durch Glucose, so ließe sich durch Interferenz der Glucose mit dem Glucosetransporter eine mögliche Beeinflussung der Kaliumpermeabilität bei niedriger Ionenstärke erwarten. Dies ist auch tatsächlich der Fall. Der Prozentsatz permeabler Zellen war auf $46.5\% \pm 1.3$, $43.5\% \pm 1.1$ und $38.5\% \pm 3.1$ bei 0.8, 2, und 5 mM Chlorid signifikant gegenüber der Kontrolle in Sorbitlösung abgesunken. Bei 10 mM Chlorid in der Außenlösung erfolgte eine Hämolyse der Zellen, so

dass keine Auswertung möglich war. Dies Ergebnis lässt eine Konkurrenz Glucose – Kationen am Glucosetransporter als möglich erscheinen, obwohl mit 10 mM Glucose und 290 mM Sorbit als Nichtelektrolyt keine signifikanten Änderungen zu verzeichnen waren.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit Hemmstoffen, bzw. Modulatoren des Kationenefflux bei niedriger Ionenstärke. Die Substanzen wurden in diesen Experimenten erst nach 1 Minute zugesetzt zu einer Zeit als der schnelle Hydroxyl-Chlorid bzw. Hydroxyl-Nitrat-Exchange in der Zelle bereits abgelaufen war. Den stärksten Effekt bewirkte dabei DIDS, ein effektiver Inhibitor des Anionentransportes. Sowohl die Geschwindigkeitskonstanten als auch der Prozentsatz der permeablen Zellen nahmen mit zunehmender DIDS-Konzentration signifikant ab. Der außerordentlich niedrige K_i -Wert von nur 100 nM spricht für eine Hemmwirkung von DIDS am orientierten Anionentransporter [Furuya84], da der K_i -Wert bei physiologischer Ionenstärke am nichtorientierten Transporter mit 0.3 μ M wesentlich höher ist. DIDS selbst hat keinen Einfluss auf den Glucosetransporter bei hoher Ionenstärke, es beeinflusst aber den Glucosetransport bei niedriger Ionenstärke und hebt einen Teil der Hemmwirkung am Glucosetransport auf. Dies Ergebnis spricht für eine indirekte Beteiligung des Anionentransporters am Kationenefflux bei niedriger Ionenstärke.

Im Gegensatz zum DIDS hat das Arginin-spezifische Reagenz Phenylglyoxal eine in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesene direkte Wirkung auf den Glucosetransport bei hoher Ionenstärke. Der K_i -Wert beträgt hierbei 6 mM. Dies Ergebnis kann mit dem Vorhandensein von Arginin an der Innenseite des Glucosetransporters in Zusammenhang gebracht werden, die den Glucosekanal durch ihre positive Ladung vor Kationen abschirmen sollen. Auf den Kationenefflux bei niedriger Ionenstärke mit 0.8 mM Chlorid bewirkt Phenylglyoxal im Gegensatz zu DIDS eine Zunahme des Prozentsatzes permeabler Zellen von $61.1\% \pm 1.6$ bei der Kontrolle auf $69.3\% \pm 1.5$, $71.1\% \pm 3.5$ und $88.2\% \pm 3.5$ bei 2, 5 und 10 mM Phenylglyoxal im Experiment. Dagegen wurden die Geschwindigkeitskonstanten von 0.056 ± 0.003 in der Kontrolle auf 0.028 ± 0.002 , 0.024 ± 0.002 und 0.019 ± 0.001 mmol K⁺/kg Hämoglobin pro Minute bei 2, 5 und 10 mM Phenylglyoxal signifikant vermindert. Das letztere Ergebnis entspricht den Versuchen mit DIDS, das wie auch Phenylglyoxal ein Inhibitor des Anionentransportes ist.

SDS bewirkt eine Hemmung des Glucostransportes bei hoher Ionenstärke. K_i -Wert liegt bei 60 μM . Der hemmende Effekt kann durch Einlagerung von negativ geladenen SDS-Molekülen erklärt werden. Die Wirkung ist ähnlich wie bei niedriger Ionenstärke, bei der im Kanal negative Ladungsträger auftreten. Auch hierbei nimmt die Affinität für Glucose und die V_{max} signifikant ab. Auf den Kationenefflux bei niedriger Ionenstärke hat SDS einen stimulierenden Effekt. Sowohl die Geschwindigkeitskonstante als auch der Prozentsatz permeabler Zellen nehmen mit steigender Konzentration signifikant zu. Außerdem liegt der EC_{50} -Wert mit 17 μM in der gleichen Größenordnung wie der K_i -Wert des Glucostransportes.

Besonders das letzte Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit der Theorie von Michaelis, dass Festladungen in Membrankanälen deren Permeabilität bestimmen. Die vorliegenden Ergebnisse stützen die Vorstellung, dass unter bestimmten Bedingungen die Glucostransporter in der Erythrozytenmembran auch Kanäle für Kationen sein können.

6 Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

[Cabantchik72]

Cabantchik, Z.I., Rothstein, A.: „The nature of the membrane sites controlling anion permeability of human red blood cells as determined by studies with disulfonic stilbene derivatives.“

J. Membrane. Biol. (10); 311-330; (1972)

[Donlon69]

Donlon, J., Rothstein, A.: „The Cation Permeability of Erythrocytes in Low Ionic Strength Media of Various Tonicities“

J. Membrane Biol. (1), 37-52; (1969)

[Fairbanks71]

Fairbanks, G., Steck, T. L., Wallach, D. F. H.: „Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane.“

Biochemistry (10); 2606-2617; (1971)

[Fick55]

Fick, A.: 1855; zitiert aus R. Höber (1926)

[Fuhrmann71]

Fuhrmann, G. F. , Liggenstorfer, P., Wilbrandt, W.:

Experientia (27); 1428; (1971)

[Fuhrmann84]

Fuhrmann, G.F., Hüttermann, J., Knauf, P.A. .: „The mechanism of vanadium action on selective K⁺-permeability in human erythrocytes.“

Biochimica et biophysica acta (769); 1; 130-140; (1984)

[Fuhrmann89]

Fuhrmann, G. F.: „Transport studies in red blood cells by measuring light scattering.“

Methods in Enzymolgy (173); 263-280; (1989)

- [Fujita25] **Fujita, A.:** „Untersuchungen über elektrische Erscheinungen und die Ionen-durchlässigkeit von Membranen.“
Biochem. Z. (159); 370-378; (1925)
- [Furuya84] **Furuya, W., Tarshis, T., Law, F.Y. and Knauf, P.A.:**
„Transmembrane Effects of Intracellular Chloride on the Inhibitory Potency of Extracellular H₂DIDS“
Gen. Physiol. (83), 657-682; (1984)
- [Gunn79] **Gunn, R. B., Fröhlich, O.:** „Asymmetry in the mechanism for anion exchange in human red cell membranes: Evidence for reciprocating sites which react with one transported anion at time.“
J. Gen. Physiol. (74); 351-374; (1979)
- [Hamburger91] **Hamburger, H. J.:** „Über den Einfluß der Atmung auf die Permeabilität der Blutkörperchen.“
Z. Biol. (27); 405-416; (1891)
- [van't Hoff87] **van't Hoff:** 1887; zitiert aus R. Höber (1926).
- [Jacobs42] **Jacobs, M. H., Stewart, D. R. :** „The role of carbonic anhydrase in ceratin ionic exchanges involving the erythrocyte.“
J. Gen. Physiol. (25); 539-552; (1942)
- [Jones85] **Jones, G. S., Knauf, P. A.:** „Mechanism of the increase in cation permeability of human erythrocytes in low-chloride media. Involvement of the anion transport protein capnophorin.“
J. Gen. Physiol.(1985); 721-738; (1985)

- [Kaestner00] **Kaestner, L., Christophersen, P., Bernhardt, I., Bennekou, P. :** „The non-selective voltage-activated cation channel in the human red cell membrane: reconciliation between two conflicting reports and further characterisation.“
Bioelectrochemistry (52); 2; 117-125; (2000)
- [Kaestner02] **Kaestner, L., Bernhardt, I. :** „Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance.“
Bioelectrochemistry (55); 1-2; 71-74; (2002)
- [Knauf77] **Knauf, P. A., Fuhrmann, G. F., Rothstein, S., Rothstein, A.:** „The relationship between anion exchange and net anion flow across the human red blood cell Membrane.“
J. Gen. Physiol. (69); 363-386; (1977)
- [Knauf79] **Knauf, P. A. :** „Erythrocyte anion exchange and the band 3 protein: Transport kinetics and molecular structure.“
Curr. Top. Membr. Transp. (12); 249-363; (1979)
- [Krüger99] **Krüger, K.:** „Kationenpermeabilität von Erythrozyten bei niedriger Ionenstärke unter besonderer Berücksichtigung des Glucosetransporters“
Dissertation, 1999
- [Lassen73] **Lassen, U. V., Pape, L., Vestergaard-Bogind:** „Membrane potential of amphiuma red cells: effect of calcium.“
Erythrocytes, thrombocytes, leukocytes recent advances in membrane and metabolic research, Thieme-Verlag; 33-36; (1973)
- [Liang98] **Liang, H., Ko, C.H., Herman, T., Gaber, R.F. :** „Trinucleotide insertions, deletions and point mutations in glucose transporters confer K⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*.“
Molecular and cellular biology (18); 2; 926-935; (1998)

- [Loeb12] **Loeb, J., Beutner, R.:**
Biochem. Z, 1912.
- [Michaelis26] **Michaelis, L.:** „Die Permeabilität von Membranen.“
Die Naturwissenschaften (Jg.14); 3; 33-42; (1926)
- [Mond27] **Mond, R.:** „Umkehr der Anionenpermeabilität der roten
Blutkörperchen in eine selektive Durchlässigkeit für Kationen.
Ein Beitrag zur Analyse der Zellmembranen.“

Pflüg. Arch. ges. Physiol. (217); 618-630; (1927)
- [Mond28] **Mond, R., Hoffmann, F.:**

Arch. Ges. Physiol. (220); 194; (1928)
- [Nasse78] **Nasse, H.:** „Untersuchungen über den Austritt und Eintritt von
Stoffen (Transsudation und Diffusion) durch die Wand der
Haargefäße.“

Pflüg. Arch. Gesamte Physiologie Menschen, Tiere (16); 604;
(1878)
- [Nathanson26] **Nathanson, A.:** zitiert aus L. Michaelis (1926).
- [Overton26] **Overton, Ch. E.:** zitiert aus L. Michaelis (1926).
- [Pfeffer77] **Pfeffer, W.:** 1877; zitiert aus R. Höber (1926).
- [Passow64] **Passow, H.:** „Ion and water permeability of the red blood cell.
The red blood cell a comprehensive treatise.“

Academie Press; 71-145; (1964)

- [Passow65] **Passow, H.:** „Passiv ion permeability and the concept of fixed charges.“
Excerpta Medica International Congress Series No. 87; 555-566; (1965)
- [Passow86] **Passow, H.:** „Molecular aspects of band 3 protein mediated anion transport across the red blood cell membrane.“
Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Springer-Verlag (103); 66-223; (1986)
- [Richter97] **S. Richter, J. Hamann, D. Kummerow and I. Bernhardt:**
„The Monovalent Cation „Leak“ Transport in Human Erythrocytes: An Electroneutral Exchange Process.“
Biophysical Journal 73, 733-745 (1997)
- [Sen62] **Sen, A. K., Widdas, W. F.:** „Determination of the temperature and pH dependence of glucose transfer across the human erythrocyte membrane measured by glucose exit.“
J.Physiol. (160); 392-403; (1962)
- [Traube26] **Traube, I.:** zitiert aus L. Michaelis (1926).
- [Traube64] **Traube, M.:** 1864; zitiert aus R. Höber (1926) und L. Michaelis (1926) .
- [Widdas91] **Widdas, W.F., Baker, G.F. :** „The polyguanidinium complex of the glucose transporter: a possible basis for bistable cationic gates and anionic channels in biology.“
Cytobios (68); 274-275; 131-52; (1991)
- [Wilbrandt40] **Wilbrandt, W.:** „Die Abhängigkeit der Ionenpermeabilität der Erythrozyten vom glykolytischen Stoffwechsel.“
Pflügers Arch. (243); 519-536; (1940)

- [Wilbrandt60] **Wilbrandt, W., Schatzmann, H. J.:** „Changes in the passive permeability of erythrocytes in low electrolyte media.“
Ciba Found. Study Group (5); 34-40; (1960)
- [Zaki84] **Zaki, L. :** „Anion transport in red blood cells and arginine-specific reagents. The location of [¹⁴C]phenylglyoxal binding sites in the anion transport protein in the membrane of human red cells.“
FEBS letters (169); 2; 234-240; (1984)

7 Rohdaten

Rohdaten für Abbildung 3.1 a:

Kalium-Efflux

0.8 mM

2 mM

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	261.0	277.6	285.2	273.1	261.8	280.9	273.1	282.5
5.0	184.7	201.8	199.4	206.6	201.3	217.0	208.9	220.8
10.0	156.8	168.8	166.3	179.0	171.4	185.6	179.9	187.3
20.0	126.3	137.7	134.1	142.9	142.3	152.7	147.7	156.6
30.0	110.1	120.9	112.6	123.8	123.7	134.5	124.9	138.7
40.0	98.7	108.3	100.7	111.9	114.0	122.4	112.3	127.6
50.0	91.0	100.8	89.2	103.7	103.5	113.2	101.0	117.3
60.0	82.3	102.1	83.6	94.3	98.3	106.9	93.2	112.1

5 mM

10 mM

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	266.7	278.0	289.4	274.8	264.2	279.5	305.6	276.9
5.0	226.0	237.5	241.8	240.3	242.6	256.0	262.1	259.0
10.0	199.0	211.0	209.8	212.5	227.8	238.5	218.3	237.7
20.0	167.2	178.6	176.0	185.5	195.8	209.6	182.2	210.3
30.0	142.5	161.2	156.8	162.8	177.9	190.1	162.9	194.3
40.0	137.7	150.6	145.2	150.6	165.2	176.5	150.4	184.8
50.0	128.8	142.8	134.1	142.5	155.7	166.9	122.9	173.2
60.0	122.1	133.8	126.0	136.9	149.7	160.2	138.30	165.2

Natrium-Efflux(graphisch nicht dargestellt!)

0.8 mM

2 mM

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	28.15	28.87	32.62	27.93	27.63	31.30	31.89	28.16
5.0	22.01	23.58	27.69	22.81	23.21	26.44	29.02	24.26
10.0	19.84	19.92	24.65	19.94	19.89	23.65	25.59	20.77
20.0	16.76	16.99	21.38	16.19	18.01	20.39	22.72	17.79
30.0	17.07	15.01	19.59	14.38	16.68	18.52	20.77	15.52
40.0	12.00	14.35	19.23	13.31	14.01	17.11	20.63	16.10
50.0	11.08	13.52	17.59	11.61	13.11	15.37	18.02	13.26
60.0	10.61	13.72	16.03	10.98	12.89	14.35	16.40	11.74

5 mM

10 mM

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	26.54	31.29	30.66	28.53	30.95	31.62	30.20	28.49
5.0	24.48	28.25	29.90	26.22	27.70	30.31	29.96	27.24
10.0	23.64	25.89	28.39	23.16	23.47	28.57	28.67	25.51
20.0	19.85	22.72	25.72	20.46	22.60	26.31	26.81	22.97
30.0	17.32	21.92	38.80	18.82	23.21	24.99	26.03	22.44
40.0	15.89	20.35	21.92	17.82	21.69	23.86	24.45	23.92
50.0	14.73	20.07	20.11	16.83	22.12	22.01	22.87	20.25
60.0	14.77	17.76	18.78	15.90	18.76	21.06	21.30	18.56

Rohdaten für Abbildung 3.1 b:

Kalium-Efflux**0.8 mM****2 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	271.3	275.1	266.9	273.3	269.6	277.7	274.4	296.3
5.0	195.6	191.6	191.5	195.0	203.8	210.1	212.9	216.3
10.0	164.0	165.4	160.3	165.6	177.7	178.3	175.4	187.0
20.0	135.9	133.3	128.5	136.9	153.6	149.8	144.3	155.0
30.0	119.0	117.7	109.1	117.7	138.8	133.8	127.5	135.7
40.0	105.1	108.0	95.4	106.3	127.0	117.6	112.3	122.8
50.0	103.2	95.6	88.8	98.3	119.7	107.5	104.1	114.6
60.0	104.8	88.7	78.4	91.5	119.4	104.1	95.8	107.0

5 mM**10 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	279.5	289.2	275.6	309.0	281.4	288.3	270.0	308.0
5.0	225.2	229.9	221.3	251.1	247.6	253.4	245.1	276.8
10.0	198.5	205.2	198.6	223.7	230.1	233.0	226.9	257.1
20.0	172.9	176.1	170.4	189.7	202.8	203.9	197.1	228.3
30.0	158.0	158.3	151.6	165.0	187.8	189.9	186.6	208.5
40.0	150.2	144.4	143.3	153.8	177.1	178.1	174.0	192.7
50.0	138.5	135.7	134.7	145.1	169.6	173.2	168.5	182.3
60.0	137.8	130.4	126.8	140.4	170.1	164.5	161.6	175.1

Natrium-Efflux(graphisch nicht dargestellt)**0.8 mM****2 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	30.08	25.30	27.54	29.10	29.77	25.43	28.74	33.41
5.0	26.24	18.61	20.73	22.14	24.98	20.94	22.14	26.13
10.0	20.35	16.48	18.99	19.36	23.02	17.90	19.67	23.06
20.0	17.22	14.24	14.78	15.86	19.70	15.01	16.91	19.95
30.0	15.55	12.00	12.26	14.59	17.85	13.98	14.59	17.47
40.0	14.57	11.30	11.13	14.39	16.61	11.89	13.09	16.42
50.0	13.99	10.33	11.06	14.03	15.56	10.77	12.23	16.11
60.0	37.01	10.15	9.582	13.57	33.42	10.53	10.99	15.51

5 mM**10 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	30.38	26.03	29.61	33.57	29.57	25.69	31.09	33.44
5.0	26.29	22.69	25.34	28.96	27.46	23.95	26.77	32.04
10.0	23.38	20.30	23.16	27.67	29.05	22.21	26.00	31.03
20.0	21.33	17.14	18.48	22.62	23.87	19.39	21.43	29.12
30.0	20.24	16.29	16.56	20.77	22.09	17.52	19.97	26.14
40.0	18.50	14.14	15.19	18.79	20.74	16.42	18.04	24.48
50.0	17.21	12.99	14.14	18.30	19.92	15.87	17.03	22.30
60.0	51.27	11.64	13.10	17.30	82.08	14.41	17.73	21.03

Rohdaten für Abbildung 3.1 c:

Kalium-Efflux**0.8 mM****2 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	260.8	244.2			279.3	248.7		
5.0	229.0	205.7			239.8	222.8		
10.0	198.6	190.4			219.9	193.9		
20.0	155.4	136.1			187.5	157.0		
30.0	146.0	142.2			179.7	151.9		
40.0	133.8	127.3			151.8	164.1		
50.0	124.7	114.9			140.3	136.3		
60.0	116.2	104.0			133.8	130.6		

5 mM**10 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	279.3	254.8			280.4	254.1		
5.0	254.9	235.7			266.0	245.0		
10.0	238.0	222.7			256.3	242.7		
20.0	215.5	197.8			242.3	226.8		
30.0	193.8	190.1			231.6	208.2		
40.0	180.1	173.1			220.5	206.0		
50.0	167.1	152.3			211.1	218.7		
60.0	158.6	173.2			202.5	193.7		

Natrium-Efflux(graphisch nicht dargestellt)**0.8 mM****2 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	44.10	35.63			47.13	35.63		
5.0	41.51	29.96			43.10	32.78		
10.0	37.63	28.79			42.22	30.50		
20.0	30.01	21.25			37.31	23.71		
30.0	29.18	22.43			36.34	23.46		
40.0	28.54	19.47			32.09	25.65		
50.0	28.20	17.57			29.61	20.50		
60.0	22.71	16.15			26.80	19.13		

5 mM**10 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	46.78	34.37			46.13	33.78		
5.0	45.53	32.53			46.83	33.24		
10.0	44.24	33.35			45.62	32.54		
20.0	40.55	27.71			45.56	31.34		
30.0	38.49	28.47			45.55	28.75		
40.0	37.59	25.41			44.98	29.58		
50.0	34.45	21.65			43.49	32.07		
60.0	32.54	26.12			40.94	27.97		

Rohdaten für Abbildung 3.1 d:

Kalium-Efflux**0.8 mM****7.5 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	272.1	274.5	295.9	269.7	274.3	274.8	278.6	282.8
5.0	218.9	214.3	227.2	217.8	249.8	248.3	253.3	256.7
10.0	196.3	191.2	204.5	196.1	229.7	226.8	234.6	240.2
20.0	168.4	162.0	175.7	169.4	204.6	204.5	215.3	216.9
30.0	148.8	147.1	156.4	147.8	186.5	189.8	193.7	200.5
40.0	136.4	153.1	137.9	135.4	178.3	178.3	185.9	182.8
50.0	123.8	122.8	131.2	130.7	167.2	165.4	171.4	178.7
60.0	119.5	114.7	122.8	117.3	161.1	162.2	168.7	169.5

Natrium-Efflux**0.8 mM****7.5 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	25.00	27.88	27.19	26.72	25.64	26.88	25.90	27.16
5.0	26.49	28.25	28.46	26.99	26.96	26.53	27.87	30.23
10.0	25.18	25.74	29.18	26.37	26.50	26.94	30.84	29.61
20.0	24.01	26.75	27.50	28.31	26.43	26.69	28.74	29.49
30.0	24.47	25.22	26.65	25.87	26.07	26.32	27.85	30.24
40.0	22.85	25.36	24.11	25.55	25.99	27.79	28.46	28.85
50.0	21.79	24.48	26.32	25.96	25.29	27.07	28.33	30.11
60.0	21.87	23.33	23.91	24.13	24.94	26.77	28.38	29.52

Rohdaten für Abbildung 3.2 a:

Kalium-Efflux**2 mM****5 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	276.5	279.0	283.1	248.7	271.1	274.5	272.8	247.4
5.0	178.2	185.8	178.2	166.6	184.6	187.7	189.2	169.0
10.0	142.3	139.0	146.5	131.5	145.7	151.6	147.1	146.7
20.0	108.9	108.0	103.7	103.8	110.3	112.4	111.8	106.3
30.0	90.9	89.8	85.2	89.6	90.5	97.1	93.9	91.3
40.0	80.1	76.6	73.0	77.8	78.9	82.9	80.2	79.2
50.0	68.8	66.1	61.9	72.0	67.0	72.7	72.8	69.6
60.0	59.4	56.6	55.0	66.2	59.9	66.8	64.3	62.5

20 mM**50 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	263.5	275.6	287.9	231.7	273.3		272.0	249.9
5.0	186.4	208.6	201.3	172.3	211.6	212.0	208.5	188.4
10.0	158.3	180.7	167.9	145.6	178.1	178.4	176.9	159.5
20.0	127.5	144.3	135.3	123.0	148.0	143.5	143.5	131.5
30.0	111.1	125.0	113.7	110.3	126.8	126.8	125.1	115.5
40.0	99.6	113.0	101.7	100.0	113.4	113.0	111.0	105.1
50.0	91.9	104.7	90.1	91.4	103.6	104.2	98.5	96.8
60.0	83.1	95.2	84.4	87.8	94.7	97.1	89.6	90.6

100 mM

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	272.8	278.9	276.1	250.8
5.0	218.7	216.1	221.6	196.0
10.0	188.6	189.0	189.3	172.8
20.0	155.5	154.8	156.4	146.8
30.0	134.4	136.1	135.5	129.5
40.0	126.1	125.2	124.9	115.6
50.0	116.1	119.1	113.0	110.0
60.0	105.6	107.6	105.1	99.3

Rohdaten für Abbildung 3.2 b:

Natrium-Efflux**2 mM****5 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	273.8	284.3	260.5	276.0	280.5	279.4	264.8	280.3
5.0	185.6	178.8	167.9	163.3	182.5	179.6	181.0	183.8
10.0	154.5	147.7	132.4	128.9	152.7	150.4	134.5	150.6
20.0	133.4	113.9	100.8	97.0	121.3	118.6	108.3	116.4
30.0	103.6	93.9	84.7	78.8	103.6	102.5	93.3	95.9
40.0	89.2	81.3	71.1	67.9	92.1	88.0	83.0	83.3
50.0	79.0	69.8	63.2	58.5	82.3	78.0	75.5	73.9
60.0	71.2	62.1	55.9	52.2	76.1	71.8	69.4	67.1

20 mM**50 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	273.3	271.3	266.9	275.1	284.6	282.5	266.8	280.9
5.0	195.0	195.6	191.5	191.6	212.2	205.1	187.9	198.7
10.0	165.6	164.0	160.3	165.4	180.2	173.4	160.9	165.0
20.0	136.9	135.9	128.5	133.3	148.5	141.4	133.5	131.4
30.0	117.7	119.0	109.1	117.7	130.3	121.7	120.3	109.1
40.0	106.3	105.1	95.4	108.0	116.9	106.1	108.8	94.3
50.0	98.3	103.2	88.8	95.6	105.2	96.4	102.0	82.6
60.0	91.5	104.8	78.4	88.7	98.4	87.0	95.1	101.3

100 mM

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	283.5	280.5	262.7	279.8
5.0	217.7	216.4	196.1	210.7
10.0	190.0	186.4	169.2	180.5
20.0	156.0	153.6	142.7	147.9
30.0	132.9	133.3	127.9	127.2
40.0	116.7	118.9	113.7	112.3
50.0	105.0	107.6	110.0	75.1
60.0	97.8	97.9	101.0	93.0

Rohdaten für Abbildung 3.3:

Kalium-Efflux**0.8 mM****2 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	248.9	268.7	277.9	301.5	262.8	280.4	281.0	267.0
5.0	195.1	214.9	221.2	218.8	219.8	232.4	233.1	230.2
10.0	166.4	186.4	191.0	187.7	196.7	208.3	207.1	219.9
20.0	139.3	161.7	172.4	169.3	177.5	180.6	184.5	188.1
30.0	139.0	143.1	155.1	154.1	154.2	164.6	173.0	175.7
40.0	129.6	135.0	146.9	149.0	145.7	158.4	166.3	165.2
50.0	123.7	130.0	141.1	142.9	143.6	149.5	155.3	162.2
60.0	115.8	123.6	133.1	138.2	136.8	144.7	151.4	153.2

5 mM**10 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	266.3	273.9	284.4	277.5	261.3	270.1	295.8	278.2
5.0	240.0	247.7	260.5	251.4	257.5	263.5	266.0	321.7
10.0	225.4	234.1	248.4	238.9	249.1	252.7	265.7	264.2
20.0	202.6	215.6	221.2	220.3	237.8	241.1	250.4	256.7
30.0	194.9	203.9	208.0	211.1	225.8	239.2	187.2	245.8
40.0	183.8	191.4	202.1	203.9	221.0	224.0	231.0	245.3
50.0	174.5	180.1	196.4	198.3	179.0	201.6	188.6	276.7
60.0	165.2	173.5	178.4	191.7	168.5	169.9	154.1	381.7

Natrium-Efflux(graphisch nicht dargestellt!)**0.8 mM****2 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	30.23	24.26	25.81	31.58	30.23	24.26	25.81	31.58
5.0	22.62	18.82	21.93	22.58	22.62	18.82	21.93	22.58
10.0	19.05	17.28	19.03	17.66	19.05	17.28	19.03	17.66
20.0	16.51	15.11	19.77	15.96	16.51	15.11	19.77	15.96
30.0	14.97	15.51	15.01	14.47	14.97	15.51	15.01	14.47
40.0	15.10	12.90	15.46	12.95	15.10	12.90	15.46	12.95
50.0	14.74	11.50	13.35	21.26	14.74	11.50	13.35	21.26
60.0	12.67	10.67	13.43	19.43	12.67	10.67	13.43	19.43

5 mM**10 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	29.79	25.12	26.26	26.30	30.47	25.11	117.44	27.63
5.0	28.01	22.51	26.09	23.70	29.28	23.46	28.00	31.47
10.0	26.08	22.00	74.32	27.95	28.50	23.17	26.41	25.28
20.0	24.18	20.22	22.05	21.52	28.48	22.42	25.45	25.10
30.0	22.71	19.46	21.11	20.40	27.02	22.61	19.86	22.55
40.0	21.03	18.57	20.30	17.85	31.99	22.15	31.36	19.62
50.0	22.11	16.55	20.47	19.22	33.70	24.30	43.58	29.12
60.0	21.42	16.37	20.91	12.49	49.60	26.32	68.16	

Rohdaten für Abbildung 3.4:

Kalium-Efflux**0.8 mM****2 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	267.0	294.5	289.8	276.3	267.6	294.9	280.6	282.3
5.0	200.6	213.7	209.7	198.7	209.7	228.8	221.1	219.7
10.0	161.9	173.5	171.6	171.3	181.8	193.7	191.5	190.7
20.0	128.2	138.8	137.7	135.1	142.9	156.8	154.9	155.2
30.0	106.6	115.8	120.7	117.7	120.6	140.1	139.1	131.2
40.0	90.9	107.8	112.7	102.8	109.5	123.2	133.7	119.4
50.0	79.9	100.8	101.6	93.10	101.0	92.1	120.2	107.5
60.0	72.1	87.3	94.4	83.3	92.4	109.6	111.6	103.2

5 mM**10 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	279.9	290.9	286.0	278.2	268.5	291.5	284.8	278.7
5.0	235.2	250.8	251.8	244.9	248.6	273.0	264.7	258.5
10.0	208.9	223.4	222.8	212.7	231.8	251.0	247.4	242.1
20.0	179.7	193.1	189.3	184.2	208.7	222.4	221.6	217.2
30.0	160.5	170.2	167.6	162.3	196.5	205.9	202.9	196.1
40.0	149.8	155.1	155.7	149.7	179.6	192.7	192.7	185.6
50.0	140.4	146.6	146.0	143.0	170.2	182.3	185.4	172.2
60.0	140.7	142.2	145.7	135.9	165.0	172.3	170.3	174.3

Natrium-Efflux(graphisch nicht dargestellt!)**0.8 mM****2 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	36.77	24.05	23.27	20.00	37.73	18.55	23.75	21.10
5.0	27.54	19.46	17.42	14.35	32.14	14.13	23.05	16.46
10.0	24.19	15.04	14.44	10.00	27.93	11.86	16.34	15.74
20.0	20.11	20.31	11.74	6.54	20.96	8.31	12.81	8.51
30.0	18.34	18.08	10.81	4.10	18.11	6.86	11.75	5.77
40.0	16.48	3.501	8.94	1.64	17.14	6.09	12.89	4.46
50.0	13.85	3.959	9.36	0.77	18.16		10.60	2.93
60.0	12.69	2.716	8.52	1.58	15.20	4.24	9.58	2.62

5 mM**10 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	41.28	24.95	24.09	18.09	39.70	24.32	23.94	18.30
5.0	32.77	21.91	22.78	16.87	36.32	24.60	23.24	16.60
10.0	30.34	20.31	24.75	14.03	34.15	22.51	23.52	15.64
20.0	25.65	19.45	17.24	10.61	31.33	19.14	20.75	12.76
30.0	22.62	15.88	15.74	7.933	28.16	18.57	18.40	11.43
40.0	21.15	14.08	13.90	11.01	25.71	17.45	18.50	9.96
50.0	20.14	12.55	13.11	5.22	24.25	14.96	42.99	7.81
60.0	22.86	12.39	71.70	3.94	23.40	13.98	29.27	6.46

Rohdaten für Abbildung 3.5 a:

Kalium-Efflux**0 μ M****0.01 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	285.2	273.1	229.5	261.0	299.4	252.8	263.2	281.7
5.0	199.4	206.6	170.7	184.7	218.9	194.6	199.4	209.5
10.0	166.3	179.0	144.3	156.8	188.7	171.2	177.2	181.1
20.0	134.1	142.9	121.9	126.3	155.1	143.2	148.3	149.9
30.0	112.6	123.8	109.2	110.1	128.2	121.0	129.3	135.1
40.0	100.7	111.9	99.02	98.7	113.1	110.1	117.6	121.7
50.0	89.2	103.7	90.6	91.0	103.9	99.8	109.1	115.7
60.0	83.6	94.3	87.0	82.3	94.9	94.4	104.9	103.7

0.05 μ M**0.1 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	300.6	248.2	254.1	279.9	302.5	251.6	256.5	280.7
5.0	247.4	208.5	214.2	227.1	284.2	234.6	237.4	254.9
10.0	217.0	188.3	194.1	201.1	271.1	224.2	229.6	241.1
20.0	182.7	162.8	167.9	174.7	257.7	214.3	223.1	229.9
30.0	157.5	141.4	149.8	156.1	245.0	205.5	219.2	218.7
40.0	144.0	128.9	139.4	142.3	238.6	197.6	217.5	206.6
50.0	126.0	117.1	130.6	132.0	230.2	191.1	214.9	204.8
60.0	118.0	109.2	121.8	122.3	224.7	188.3	210.3	194.8

0.2 μ M**20 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	319.1	256.4	257.8	278.5	271.2	269.5	273.2	267.4
5.0	280.2	238.9	240.9	269.3	249.9	251.5	251.4	251.5
10.0	280.9	234.0	235.5	258.6	249.4	249.3	254.7	249.5
20.0	265.3	231.9	236.5	253.9	245.4	243.8	242.2	246.5
30.0	260.2	226.7	227.6	244.5	241.7	241.1	245.4	241.5
40.0	251.5	218.9	224.3	238.6	235.1	239.1	240.7	241.3
50.0	249.2	216.9	221.9	234.5	233.5	236.2	235.6	233.7
60.0	240.6	216.1	219.9	229.5	228.7	233.2	234.7	234.2

Natrium-Efflux(graphisch nicht dargestellt)**0 μ M****0.01 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	26.84	30.65	27.93	28.15	32.56	36.84	32.56	38.46
5.0	21.16	21.59	22.81	22.01	26.13	30.95	26.98	29.76
10.0	18.39	19.96	19.94	19.84	23.94	27.96	24.82	26.20
20.0	14.88	15.75	16.19	16.76	20.89	24.91	22.61	21.60
30.0	13.76	12.06	14.38	17.07	18.28	21.61	18.87	18.92
40.0	11.85	12.39	13.31	12.00	16.97	20.19	17.42	16.98
50.0	11.94	12.39	11.61	11.08	16.14	18.29	16.56	17.49
60.0	10.93	12.56	10.98	10.61	15.99	17.48	16.61	15.17

0.05 μ M**0.1 μ M**

Min								
0.0	32.44	37.52	30.61	35.88	32.80	34.41	31.37	36.68
5.0	29.19	32.50	27.22	29.76	32.78	35.00	28.87	34.17
10.0	26.90	30.33	24.92	25.94	31.28	35.00	27.80	32.70
20.0	23.38	26.18	22.49	22.60	29.96	32.02	27.24	30.32
30.0	20.79	23.08	19.70	19.62	29.52	30.88	26.51	28.36
40.0	19.81	22.49	19.67	17.78	29.10	29.63	26.60	27.21
50.0	17.89	20.02	18.09	16.68	28.43	28.56	25.80	27.56
60.0	17.01	18.82	16.65	15.56	28.12	31.10	25.15	24.77

0.2 μ M**20 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	33.30	37.15	30.13	35.44	21.65	22.86	22.20	21.88
5.0	30.45	38.09	28.78	34.81	21.14	21.33	19.85	21.58
10.0	29.92	34.33	28.16	34.82	21.51	20.87	20.80	21.47
20.0	29.16	33.90	30.58	32.70	19.79	21.01	20.26	21.07
30.0	28.73	33.28	26.70	31.27	20.63	21.24	20.50	21.20
40.0	28.32	32.21	26.17	31.44	19.85	20.63	20.36	21.08
50.0	28.60	31.52	26.82	31.04	20.27	21.17	19.71	20.11
60.0	27.91	30.96	26.39	30.19	19.77	20.90	18.78	18.06

Rohdaten für Abbildung 3.5 b:

Kalium-Efflux**0 μ M****0.01 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	273.3	271.3	266.9	275.1	273.8	266.0	271.5	284.6
5.0	195.0	195.6	191.5	191.6	193.7	181.5	193.0	200.0
10.0	165.6	164.0	160.3	165.4	168.6	154.5	163.2	168.2
20.0	136.9	135.9	128.5	133.3	135.6	121.0	133.7	138.9
30.0	117.7	119.0	109.1	117.7	122.7	104.0	117.8	122.0
40.0	106.3	105.1	95.4	108.0	112.3	89.2	111.6	109.6
50.0	98.3	103.2	88.8	95.6	102.6	81.5	99.5	101.2
60.0	91.5	104.8	78.4	88.7	99.4	75.8	91.6	92.3

0.05 μ M**0.1 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	277.7	261.6	275.7	283.5	272.7	271.2	281.0	279.6
5.0	205.9	194.7	208.8	215.0	224.9	216.6	231.9	234.4
10.0	178.0	168.1	185.3	187.7	203.6	203.3	223.2	223.1
20.0	153.2	138.3	156.0	156.0	183.0	184.6	206.4	208.5
30.0	134.0	117.9	139.5	138.7	164.5	164.3	196.0	197.7
40.0	120.6	99.9	122.4	126.0	154.7	150.1	185.8	187.8
50.0	113.4	90.0	112.2	113.8	142.1	139.8	174.2	182.9
60.0	103.9	84.3	104.5	104.9	132.5	130.1	167.6	176.2

0.2 μ M**20 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	276.4	265.8	270.30	286.6	269.5	244.7		
5.0	239.3	236.7	239.7	246.0	226.6	216.2		
10.0	233.3	230.6	235.0	236.7	217.1	208.7		
20.0	219.3	224.8	226.7	222.8	211.1	200.5		
30.0	213.1	214.5	216.0	216.2	192.0	194.9		
40.0	209.2	208.70	213.9	218.0	195.4	189.3		
50.0	197.9	200.3	203.9	208.8	191.0	183.9		
60.0	198.3	196.6	197.5	206.5	186.6	182.9		

Natrium-Efflux(graphisch nicht dargestellt)**0 μ M****0.01 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	29.10	30.08	27.54	25.30	24.91	25.81	32.38	26.02
5.0	22.14	26.24	20.73	18.61	19.30	19.42	23.36	20.01
10.0	19.36	20.35	18.99	16.48	15.70	17.06	21.16	17.49
20.0	15.86	17.22	14.78	14.24	14.15	14.15	16.00	14.45
30.0	14.59	15.55	12.26	12.00	12.01	12.52	13.79	13.31
40.0	14.39	14.57	11.13	11.30	11.39	12.16	11.89	11.75
50.0	14.03	13.99	11.06	10.33	10.74	11.90	11.05	10.65
60.0	13.57	37.01	9.58	10.15	9.40	10.72	11.89	10.74

0.05 μ M**0.1 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	25.15	25.16	33.18	25.83	23.29	25.60	31.48	25.92
5.0	20.01	20.55	24.37	20.33	20.07	21.28	25.73	21.52
10.0	16.91	19.27	21.11	31.03	19.71	21.39	25.39	18.97
20.0	14.34	16.35	17.49	15.67	18.78	19.25	23.76	18.18
30.0	13.86	14.81	15.64	14.09	17.38	18.62	20.41	15.76
40.0	12.25	13.19	13.03	12.88	16.10	17.81	18.66	14.67
50.0	11.31	11.89	12.14	12.26	15.80	16.21	17.37	13.68
60.0	10.44	10.40	11.91	11.24	14.80	15.09	15.86	12.54

0.2 μ M**20 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	24.78	23.88	30.82	24.37	25.53	21.04		
5.0	20.42	20.97	31.04	21.30	23.08	20.21		
10.0	19.57	21.42	27.63	22.13	22.22	20.32		
20.0	20.39	21.39	25.90	20.02	23.13	19.70		
30.0	19.27	19.19	25.41	19.09	18.21	19.05		
40.0	19.63	18.90	24.40	18.85	18.14	16.11		
50.0	17.54	17.88	23.83	18.03	15.48	15.84		
60.0	17.48	17.81	23.98	17.21	15.18	12.71		

Rohdaten für Abbildung 3.5 c und Abbildung 3.5 d:

$1/k_e$

$\mu\text{M DIDS}$	V_1	
1.0	197.71	
0.5	104.21	
0.2	59.312	
0.1	35.014	
0.05	27.548	
0.01	19.849	
0.005	16.521	

Austrittszeit(min)

0.05 mM

2.05 mM

	V_1	V_2	V_3	V_4	V_1	V_2	V_3	V_4
225 mM Cl	1.15	1.10	1.05	1.00	2.00	2.05	2.10	2.00
Cl+DIDS	1.00	1.00	1.10	1.10	2.30	2.20	2.20	2.10
450 mM suc	2.65	2.50	2.50	2.55	4.20	3.80	4.00	4.00
suc.+DIDS	1.75	1.75	1.60	1.55	3.10	3.00	3.05	2.90

4.05 mM

	V_1	V_2	V_3	V_4				
225 mM Cl	3.10	3.30	3.40	3.00				
Cl+DIDS	3.30	3.30	3.40	3.40				
450 mM suc	6.20	6.40		6.00				
suc.+DIDS	4.90	4.60	4.50	4.40				

Rohdaten für Abbildung 3.5 e:

Kalium-Efflux**0 mM****2 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	261.0	277.6	285.2	273.1	268.0	358.1	437.4	382.2
5.0	184.7	201.8	199.4	206.6	232.8	235.9	228.0	256.2
10.0	156.8	168.8	166.3	179.0	212.2	218.0	210.8	235.1
20.0	126.3	137.7	134.1	142.9	180.9	184.0	176.9	195.5
30.0	110.1	120.9	112.6	123.8	151.9	166.6	150.7	168.3
40.0	98.7	108.3	100.7	111.9	134.8	144.4	131.7	148.6
50.0	91.0	100.8	89.2	103.7	120.0	136.0	122.6	135.6
60.0	82.3	102.1	83.6	94.3	109.3	117.5	105.0	125.3

5 mM**10 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	248.6	296.7	271.5	323.6	267.5	266.9	268.2	350.9
5.0	233.2	241.5	231.3	257.0	242.5	241.3	230.7	264.3
10.0	211.5	225.0	217.0	239.2	224.8	221.7	207.6	243.1
20.0	184.2	193.3	185.7	205.8	189.8	202.8	189.0	231.5
30.0	160.8	173.1	165.6	186.7	158.7	168.9	160.1	185.0
40.0	152.3	160.9	148.5	169.0	144.0	154.3	139.2	158.0
50.0	122.7	147.5	129.5	156.8	116.1	125.0	115.0	132.3
60.0	111.7	134.9	116.4	139.9	100.7	107.5	101.5	120.2

Natrium-Efflux(graphisch nicht dargestellt!)**0 mM****2 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	28.15	28.87	32.62	27.93	29.37	26.39	30.73	26.60
5.0	22.01	23.58	27.69	22.81	26.30	21.77	23.38	24.78
10.0	19.84	19.92	24.65	19.94	24.20	19.93	21.81	20.81
20.0	16.76	16.99	21.38	16.19	20.98	16.03	17.55	18.20
30.0	17.07	15.01	19.59	14.38	18.72	14.81	14.49	15.50
40.0	12.00	14.35	19.23	13.31	16.54	12.49	13.09	13.73
50.0	11.08	13.52	17.59	11.61	15.48	11.74	15.42	12.80
60.0	10.61	13.72	16.03	10.98	14.01	9.32	10.43	11.97

5 mM**10 mM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	28.42	27.29	37.26	26.98	29.17	25.97	28.15	27.47
5.0	26.10	23.03	26.73	24.34	28.17	23.49	25.41	24.74
10.0	24.76	22.55	23.16	22.45	27.29	21.58	22.19	23.47
20.0	22.40	18.57	19.71	20.69	24.05	19.34	21.59	23.76
30.0	20.23	15.81	17.85	19.52	21.43	16.31	18.97	18.79
40.0	20.76	14.89	16.00	17.23	21.81	16.62	17.41	17.45
50.0	16.81	14.62	14.31	16.41	17.85	14.47	15.17	15.07
60.0	15.23	14.50	13.64	14.65	15.70	12.26	13.98	14.47

Rohdaten für Abbildung 3.5 f:

Austrittszeit(min)

$\mu\text{M Phen.}$	V ₁	V ₂
0.0	1.55	1.60
1.0	1.80	1.70
5.0	2.40	2.40
10.0	3.50	3.35
15.0	4.70	4.50
20.0	6.10	6.40

Rohdaten für Abbildung 3.6.a:

Kalium-Efflux**0 μM** **10 μM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	248.3	252.4			250.8	285.6	267.1	265.9
5.0	182.3	190.6			202.2	212.0	220.2	218.4
10.0	154.5	161.8			171.1	156.9	179.0	173.0
20.0	126.9	136.0			140.9	114.4	137.5	130.2
30.0	111.9	117.3			117.7	90.9	116.0	109.6
40.0	103.4	101.7			100.9	78.8	98.5	90.0
50.0	97.0	93.2			84.5	67.4	88.8	76.1
60.0	92.7	87.0			72.9	59.3	78.5	66.5

20 μM **30 μM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	243.1	273.8	263.3		248.8	269.3	267.2	260.2
5.0	192.3	218.9	213.7	223.5	201.7	212.1	205.2	201.0
10.0	158.1	184.9	132.2	148.3	136.6	163.6	144.9	136.9
20.0	119.2	152.4	65.8	85.3	68.1	117.4	75.8	78.8
30.0	102.4	130.5	41.7	63.5	42.7	103.5	50.8	59.9
40.0	85.9	115.8	33.2	51.3	32.4	78.8	33.9	42.8
50.0	94.2	99.3	27.1	41.5	25.2	65.3	23.7	38.1
60.0	66.1	88.6	23.3	37.0	21.4	58.1	17.6	25.2

40 μM **60 μM**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	245.8	267.7	266.2	261.2	249.0			
5.0	192.7	210.7	216.2	196.1	189.3			
10.0	117.8	151.2	166.8	130.7	128.5			
20.0	72.4	79.9	87.1	87.6	68.9			
30.0	51.6	57.4	56.4	62.1	46.0			
40.0	40.5	44.4	38.0	48.2	37.8			
50.0	34.5	30.6	24.3	30.0	28.8			
60.0	28.1	23.4	16.8	34.1	21.1			

Natrium-Efflux(graphisch nicht dargestellt)**0 μ M****10 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	28.15	28.87	32.62	27.93	21.02	101.65	25.08	21.42
5.0	22.01	23.58	27.69	22.81	20.45	22.35	24.83	23.16
10.0	19.84	19.92	24.65	19.94	17.85	21.83	26.52	30.57
20.0	16.76	16.99	21.38	16.19	15.90	20.89	22.87	19.63
30.0	17.07	15.01	19.59	14.38	13.60	17.28	20.55	17.32
40.0	12.00	14.35	19.23	13.31	13.17	15.82	17.32	14.34
50.0	11.08	13.52	17.59	11.61	11.85	14.20	16.36	12.46
60.0	10.61	13.72	16.03	10.98	10.69	12.44	14.69	11.84

20 μ M**30 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	25.74	20.60	24.06		20.13	19.95	24.00	23.81
5.0	27.30	21.87	26.04	26.72	23.18	22.15	26.29	25.21
10.0	27.91	20.03	28.51	26.45	25.00	24.78	32.76	25.29
20.0	25.56	16.62	24.89	22.70	22.57	22.17	23.38	23.40
30.0	23.90	14.11	20.96	23.07	19.53	20.24	12.38	20.60
40.0	20.97	12.81	19.54	18.83	17.09	17.73	10.60	17.06
50.0	168.22	10.46	16.72	16.13	15.44	14.84	9.78	14.14
60.0	23.34	10.20	15.18	14.56	13.01	12.69	13.38	13.72

40 μ M**60 μ M**

Min	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
0.0	26.15	19.58	25.48	23.00	21.84			
5.0	30.57	20.46	25.06	24.51	22.85			
10.0	28.95	20.41	32.13	23.20	23.56			
20.0	27.56	15.04	14.72	22.76	19.76			
30.0	25.55	5.08	7.85	14.45	16.64			
40.0	23.36	8.74	4.55	11.19	15.22			
50.0	22.32	0.75	5.64	14.02	12.18			
60.0	19.52	0.72	6.17	44.31	10.73			

Rohdaten für Abbildung 3.6 b:

Austrittszeit(min)

	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	V ₈	V ₉
10e ⁻⁶	0.0614	0.0431	0.0532	0.0640	0.0460	0.0450	0.0365	0.0520	0.0514
10e ⁻⁵	0.0318	0.0687	0.0528	0.0502					
20e ⁻⁵	0.0489	0.0375	0.1061	0.0937					
30e ⁻⁵	0.0890	0.0623	0.0742	0.0812					
40e ⁻⁵	0.1022	0.0756	0.0625	0.0748					
60e ⁻⁵	0.0858								

Rohdaten für Abbildung 3.6 c:

Austrittszeit(min)

	1 mM Glucose		3 mM Glucose		5 mM Glucose		7 mM Glucose	
μM SDS	V ₁	V ₂	V ₁	V ₂	V ₁	V ₂	V ₁	V ₂
0.0	2.00		3.45		4.85		6.50	
5.0	2.25	2.25	4.00	4.45	5.40	5.50	7.15	6.40
15.0	2.60	2.65	4.70	4.65	5.70	5.85	7.20	7.25
30.0	3.10	3.10	5.50	5.10	6.75	6.70	7.70	7.90
50.0	3.50	3.70	5.10	5.65	7.55	7.35	8.05	8.70

Rohdaten für Abbildung 3.6 d:

Austrittszeit(min)

μM SDS	V ₁	V ₂
0.0	1.8	1.85
5.0		2.20
10.0	2.35	2.45
15.0	2.65	2.50
20.0	2.70	2.70
30.0	3.05	3.10
40.0	3.30	3.20
50.0	3.60	3.50

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Bruness, geb. Götzky
Vornamen: Florian Paul
Geburtsdatum: 23.02.1974
Geburtsort: Siegen
Eltern: Vater: Rolf Götzky, Oberstudienrat
Mutter: Elisabeth Götzky, geb. Voigtmann,
Realschullehrerin
Geschwister: Anja Götzky, Grundschullehrerin
Cornelia Götzky, Studentin

Schulische Ausbildung:

1980 - 1984 Grundschule Krombach
1984 - 1993 Friedrich-Flick-Gymnasium, Kreuztal
24.06.1993 Allgemeine Hochschulreife

07/93-10/94 Zivildienst im Krankenhaus Kredenbach (Bernhard-Weiss-Klinik)

Hochschulausbildung

10/94	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
08/96	Ärztliche Vorprüfung
03/98	1. Staatsexamen Humanmedizin
04/00	2. Staatsexamen Humanmedizin
10/02	3. Staatsexamen Humanmedizin

Promotion

05/97	Beginn der Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, der Philipps-Universität Marburg
-------	---

Berufliche Tätigkeit

Ab 10/94	
bis 05/00	Pflegetätigkeit auf der Intensivstation in der Bernhard-Weiss-Klinik/Kreuztal
02/97	Famulatur im St.-Johannes Hospital/Varel, Abteilung Chirurgie
07/98-09/98	Famulatur im R.C. Andara Hospital/Namibia und Windhoek State Hospital/Namibia
seit 10/98	Ausbildung in traditioneller chinesischer Medizin in Hamburg bei der Societas Medicinae Sinensis (SMS)
03/99	Famulatur in der Bernhard-Weiss-Klinik, Kredenbach, Abteilung Innere Medizin
07/99	Kurs in traditioneller chinesischer Medizin in Beijing/China
01/02	Arzt im Praktikum im Krankenhaus „Links der Weser“ Bremen in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
12/02	Arzt im Praktikum im Krankenhaus „St.-Johannes Hospital“ in Varel, Innere Medizin
seit 07/03	Assistenzarzt im Krankenhaus „St.-Johannes Hospital“ in Varel

8.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Prof. Dr. R. Arnold, Prof. Dr. G. Aumüller, Prof. Dr. Dr. H.-D. Basler, Prof. Dr. E. Baum, Prof. Dr. M. Beato, Prof. Dr. Dr. Daut; Prof. Dr. R. E. Eckhorn, Prof. Dr. P. Engel, Prof. Dr. C. Eschenbach, Prof. Dr. G. F. Fuhrmann, Prof. Dr. H. Ganz, Prof. Dr. A. Geus, Prof. Dr. L. Gotzen, Prof. Dr. A. M. Gressner, Prof. Dr. P. Griss, Prof. Dr. A. Habermehl, Prof. Dr. R. Happle, Prof. Dr. G. Huffmann, Prof. Dr. H. F. Kern, Prof. Dr. O. Kleinsasser, Prof. Dr. H.-D. Klenk, Prof. Dr. K. J. Klose, Prof. Dr. J.-C. Krieg, Prof. Dr. P. Kroll, Prof. Dr. R. E. Lang, Prof. Dr. H. Lennartz, Prof. Dr. E. Meyer-Breiting, Prof. Dr. R. Moosdorf, Prof. Dr. H. Netter, Prof. Dr. W. H. Oertel, Prof. Dr. M. Pohlen, Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt, Prof. Dr. H. Riedmiller, Prof. Dr. M. Rothmund, Prof. Dr. D.-O. Schachtschabel, Prof. Dr. H. Schäfer, Prof. Dr. K.-D. Schulz, Prof. Dr. Dr. G.-H. Schumacher, PD Dr. Schweigerer, Prof. Dr. Dr. K.-H. Seifart, Prof. Dr. J. Seitz, Prof. Dr. Siegrist, Prof. Dr. B. Steiniger, Prof. Dr. C. Thomas, PD Dr. H.-W. Vohland, Prof. Dr. P. v. Wichert.

Meine akademischen Lehrer an der Georg-August-Universität Göttingen waren die Herren:

Prof. Dr. H. Bachmann, Prof. Dr. K. Caesar, Prof. Dr. M. Dürig, Prof. Dr. E. Gurr.

8.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. G. F. Fuhrmann für die Überlassung des Themas danken. Darüber hinaus bin ich ihm für seine hervorragende Betreuung und sein persönliches Engagement sehr verbunden.

Mein Dank gilt auch Bernhard Völker und Dr. Hans-Jörg Martin, die mir stets bei Unklarheiten während meiner Versuche behilflich waren.

Mein Dank gilt auch den freiwilligen Blutspendern, ohne die diese Arbeit nicht möglich wäre.

Natürlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie für die freundliche Aufnahme und das gute Klima bedanken, insbesondere Herrn Dr. Andreas Meier, der mir als Oberdotorand immer in guter Erinnerung bleibt.