

Aus dem Institut für normale und pathologische Physiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. Daut

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen
und Marburg GmbH, Standort Marburg

Titel der Dissertation:

Protonen- und Elektronenströme in humanen Monozyten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Humanbiologie.

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Boris Musset Lich / Hessen

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-
Universität Marburg am:

16.09.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Voigt

1. Korreferent: Prof. Dr. Steiniger

2. Korreferent: PD. Dr. Dietrich

Protonen- und Elektronenströme in humanen Monozyten

1. Einleitung.....	2
2. Material und Methoden.....	15
<i>Wachstumsmedien für Säugerzellen</i>	15
<i>Extrazelluläre Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration</i>	17
<i>Patch-Clamp-Apparatur</i>	18
<i>Optische Komponenten</i>	19
<i>Mechanische Komponenten</i>	20
<i>Elektrische Komponenten</i>	22
<i>Kapillaren</i>	23
<i>Offsetpotenzial und Liquid-Junction-Potenzial</i>	24
<i>Sealbildung</i>	25
<i>Messkonfiguration</i>	25
<i>Amphotericin B</i>	26
<i>Referenzelektrode</i>	27
<i>Membrankapazitäts-Bestimmung</i>	27
<i>Zusammensetzung der Salzlösungen</i>	28
<i>Ammoniumion als Stabilisator des pH Gradienten</i>	29
<i>Messprotokolle in der „voltage-clamp“ Spannungspulse und Spannungsrampen</i>	32
<i>Daten-Analyse der Leitfähigkeiten und der Kinetiken der Protonenströme</i>	33
3. Ergebnisse.....	35
<i>Messungen mit Spannungsrampen</i>	48
<i>Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen</i>	53
4. Diskussion.....	58
<i>Protonen und Elektronenströme, eine On-Off-Beziehung?</i>	58
<i>Elektrisch nicht erregbare Zellen mit spannungsabhängigen Kanälen ?</i>	58
<i>Fluoreszenzmessungen an Monozyten unterschiedlicher Verweildauer in Kultur</i>	60
<i>Andere bekannte Protonen-Extrusionswege von Phagozyten</i>	61
<i>„Whole-cell“ -Konfiguration und „perforated-patch“-Konfiguration</i>	62
<i>Zu erwartender Elektronenstrom von Monozyten</i>	63
<i>„Threshold“ und Einwärtsströme humaner Monozyten</i>	64
<i>Veränderungen des Protonenstroms nach PMA- Stimulation der Monozyten</i>	64
<i>Protonenströme, Kinetiken und Puffer</i>	65
<i>Elektronenstrom und Current-Clamp</i>	67
<i>Zusammenfassung</i>	69
Curriculum vitae.....	70
Akademische Lehrer.....	71
Ehrenwörtliche Erklärung.....	71
Danksagung.....	72
Literaturverzeichnis.....	73

Dissertation zum Erlangen der
Doktorwürde
Dr. rer. physiol.

Protonen- und Elektronenströme in humanen Monozyten

1. Einleitung

Diese Arbeit befasst sich mit den neuen Messmethoden in der Elektrophysiologie, dem spannungsabhängigen Protonenkanal (Hv1), dessen Gen 2006 erstmalig geklont werden konnte, sowie mit dem, durch die Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat-Oxidase (NADPHox) generierten Elektronenstrom durch Translokation eines Elektrons über die Plasmamembran. Noch in keiner Arbeit zuvor konnten diese beiden Ströme an humanen Monozyten anhand der „Patch-Clamp“-Technik gemessen werden. Sauerstoffradikalmessungen unter Einsatz eines fluoreszierenden Markers zeigen deutlich die Abhängigkeit der Sauerstoffradikalproduktion von der Funktion des Protonenkanals. Der Protonenstrom kann von den Schwermetall-Ionen Zink (Zn^{2+}) und Cadmium (Cd^{2+}) blockiert werden. Dieser Block führt zu einer spannungsabhängigen Deaktivierung der NADPHox und damit der Sauerstoffradikalproduktion.

Mit der Entwicklung der Patch-Clamp-Technik durch Neher und Sakmann (1) ist es in der Physiologie mehr und mehr gelungen, einzelne Proteine zu charakterisieren, die für die elektrischen Antworten der Zelle verantwortlich sind. Dabei zeigt sich, dass fast jedes physiologisch wichtige Ion seine Klasse an selektiven Ionenkanälen besitzt. Na^+ , Ca^{2+} und K^+ sind die Kationen mit der höchsten physiologischen Bedeutung für den Organismus. Sie verfügen alle über spannungsabhängige und spannungsunabhängige

Ionenkanäle. Zudem gibt es spezifische Kanäle für Cl^- und andere Anionen, die das Spektrum der Ionenkanalfamilie verbreitern.

Ionenkanäle verfolgen ein grundsätzliches Konzept. Sie sind integrale Membranproteine, die einen wassergefüllten Diffusionsweg durch die Membran bilden. Daraus folgt, dass sie aus lipophilen Anteilen, die im Kontakt mit der Zellmembran stehen, und aus hydrophilen Anteilen, die das intra- und extrazelluläre Medium über eine Pore verbinden, bestehen. Das Protein ist nicht gezwungen seine Konformation zu ändern, um ein Ion von der einen Membranseite zur anderen zu leiten. Ionenkanäle transportieren diese Ionen nicht aktiv über die Membran. Sie sind nur der selektive Filter, der bestimmte Ionen oder Ionenklassen passieren lässt. Die treibende Kraft für diese Translokation

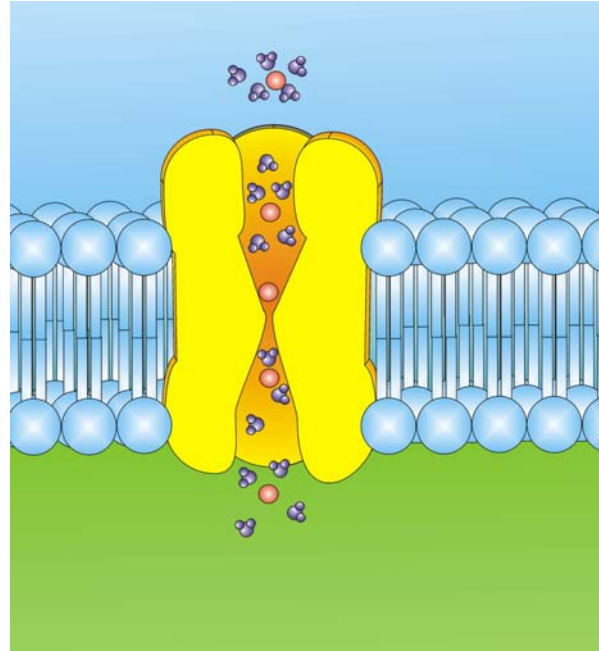


Abbildung. 1. Schema eines Kaliumkanals

Die Zeichnung zeigt den aus vier Untereinheiten zusammengesetzten Ionenkanal (gelb eingefärbt). Die engste Stelle des Ionenkanals bildet den Selektivitätsfilter. Dort werden das Hydrationswasser um das Kaliumion durch die Sauerstoffatome des G-Y-G Motivs ersetzt. (rot = Ion, blau = Wassermolekül, hellblau = Lipiddoppelschicht, Gelb = Protein).

erhalten die Ionen durch den elektrochemischen Gradienten. Dieser baut sich aus dem chemischen Gradienten, der aus der Ungleichverteilung der Ionen resultiert, z.B. hergestellt durch die $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, auf. Dieser primäre Transporter fördert aktiv drei Natriumionen aus dem Zytosol heraus und 2 Kaliumionen ins Zytosol hinein.

Daraus folgt die hohe Kaliumkonzentration (150 mM) und die relativ niedrige intrazelluläre Natriumkonzentration (10 mM) der Zelle.

Außerdem entsteht durch die hohe Negativität der Zelle zusätzlich ein elektrischer Gradient.

Der gesamte elektrische Gradient liegt – unter Ruhebedingung der Zelle - nahe dem Kaliumgleichgewichtspotenzial von -90 mV. Dieses Gleichgewichtspotenzial errechnet sich aus der Nernst Gleichung.

$$1. \quad X_{\text{Rev}} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \log \frac{C_1}{C_2}$$

Formel. 1. Nernst Gleichung

(dabei ist R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur, z die Ladung bzw. die Wertigkeit des Ions und F die Faraday-Konstante, C_1 ist die Konzentration des Ions innerhalb und C_2 die Konzentration außerhalb der Zelle bzw. Membran)

Für ein Natriumion wäre – unter Ruhebedingung - die treibende Kraft, um in die Zelle zu gelangen, 150 mV. Der elektrische Gradient ist -90mV (entspricht dem Ruhepotenzial der meisten Zellen) und der elektrochemische Gradient für Natrium nach Nernst ist = +60 mV. Daraus resultiert eine treibende Kraft von 150 mV (von -90 mV bis +60 mV). Für ein Kaliumion gibt es bei Ruhebedingung keine treibende Kraft, da das Gleichgewichtspotenzial nach Nernst für Kalium -90mV ist, also dem Ruhemembranpotenzial entspricht. Da das Ruhemembranpotenzial der meisten Zellen nahe dem Kaliumgleichgewichtspotenzial liegt, resultiert daraus, dass die höchste Leitfähigkeit in einer ruhenden Zelle durch geöffnete Kaliumkanäle erzeugt wird.

Was ist der Vorteil eines Ionenkanals gegenüber dem eines primären Transports, wie z.B. der $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, die auch Ionen transportiert?

Die Antwort darauf ist relativ einfach: Die Transportleistung. Ein Ionenkanal leitet 10^7 bis 10^8 Ionen pro Sekunde. Der aktive Transport arbeitet mit einer Geschwindigkeit von 10^2 Ionen pro Sekunde. Ionenkanäle verbrauchen keine ATP (den Treibstoff der Zelle), was die aktiven Transportprozesse brauchen, um gegen den Gradienten zu pumpen. Ionenkanäle dienen den schnellen Prozessen der Zelle wie dem Aktionspotenzial. Beim Aktionspotenzial verändert sich die Spannung der Zelle innerhalb einer Millisekunde von -90 mV auf + 40 mV und dann wieder auf -90mV.

Das einzelne Ionenkanalprotein kann sich durch Konformationsänderung öffnen und schließen. Dieses Öffnen ermöglicht den Durchtritt von Ionen durch die Kanalpore. Das Schließen verhindert wieder den Durchtritt der Ionen. Das Verhältnis, in dem Offen-

und Geschlossenereignisse zueinander stehen, ergibt die Offenwahrscheinlichkeit. Zusätzlich verfügt das einzelne Protein über eine Einzelkanalstromamplitude, die verändert werden kann. Die Erhöhung dieser Amplitude bewirkt, dass pro Zeitintervall mehr Ionen durch die Pore hindurch treten können. Diese beiden Stellglieder des Einzelkanals dienen seiner Modellierung, um z.B. auf Phosphorylierung reagieren zu können.

Ionenkanäle funktionieren nach einheitlichem Konzept, weisen aber, abhängig von den verschiedenen Kanalklassen, unterschiedliche Strukturen auf. Es gibt spannungsabhängige und spannungsunabhängige Ionenkanäle. Spannungsabhängige Ionenkanäle werden unmittelbar durch die Membranspannung beeinflusst, öffnen oder schließen sich, auf eine bestimmte Spannungsschwelle hin (Threshold). Spannungsunabhängige Ionenkanäle reagieren nicht mit Öffnen oder Schließen auf Potenzialänderungen.

Im Wesentlichen werde ich hier nur auf die spannungsabhängigen Ionenkanäle eingehen, da in dieser Arbeit hauptsächlich spannungsabhängige Protonenkanäle untersucht worden sind.

Ein einfaches Konstruktionsprinzip kennzeichnet die spannungsabhängigen Kationenkanäle. Sie verfügen pro Proteinuntereinheit über sechs Transmembrandomänen (6TM). Bei Kaliumkanälen bildet eine Zusammenlagerung von vier Untereinheiten einen funktionsfähigen Kanal. Der Kaliumkanal kann dann aus den gleichen vier Untereinheiten bestehen (Homotetramer) oder aus verschiedenen (Heterotetramer). Bei Natrium- und Calciumkanälen besteht der spannungsabhängige Ionenkanal aus vier Untereinheiten, die miteinander über ihre DNA verknüpft sind. In diesem Fall kann es zu keiner Bildung von Heterotetrameren kommen.

Die letzten zwei TM (5+6 TM) einer Untereinheit stellen die Poreneinheiten dar. Sie bilden mit den drei anderen 5+6 TMs die Pore mit dem Selektivitätsfilter. Der Selektivitätsfilter bildet die engste Stelle der Kanalpore. Hier streift im Falle des Kaliumkanals das Kaliumion seine Hydrathülle ab, da die Carbonylsauerstoffe des Tyrosin und inneren Glycinrestes der drei Aminosäuren Glycin-Tyrosin-Glycin (G-Y-G) genau die Hydrathülle eines Kaliumiones (1,33 Å) ersetzen können. Für kleinere Ionen wie Natrium (0,95 Å) oder Lithium (0,6 Å) stimmt der Abstand zu den

Sauerstoffen nicht mehr, was ein Abstreifen der Hydrathülle verhindert und damit den Durchtritt dieser und anderer Ionen verhindert.

Die ersten vier Transmembrandomänen (1-4 TM) enthalten den Spannungssensor der spannungsabhängigen Ionenkanäle. Besonders die vierte TM hat alternierend auf jeder dritten Position eine positiv geladene Aminosäure. Diese Aminosäuren sind Arginin oder Lysin. Bei physiologischem pH-Wert sind diese positiv geladen und geben somit

der gesamten 4 TM eine positive Nettoladung. Die positive Nettoladung ist der Sensor, der die Potenzialänderungen direkt an der Membran registriert und sich darauf hin auch bewegt.

Alle spannungsabhängigen Ionenkanäle verfügen über einen Spannungssensor in der vierten TM, der diesen spezifischen Aufbau hat.

Die

spannungsabhängigen

Anionenkanäle gehören alle dem ClC-Typ an. Sie besitzen keinerlei Strukturverwandtschaft mit den spannungsgesteuerten Kationenkanälen. Die ClC- α Untereinheiten weisen eine komplexe Membrantopologie auf. Sie umfasst die 18 Helices, von denen die meisten nicht die Membran durchspannen (2). Ein Spannungssensor, vergleichbar zu denen der Kationenkanäle, existiert bei den ClC-Kanälen nicht. Auch lagern sich hier zwei Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal zusammen, der dann über zwei Poren verfügt. Heteromultimere sind bei den Chlorid-Kanälen auch durch die Zusammenlagerung von verschiedenen α -Helices möglich.

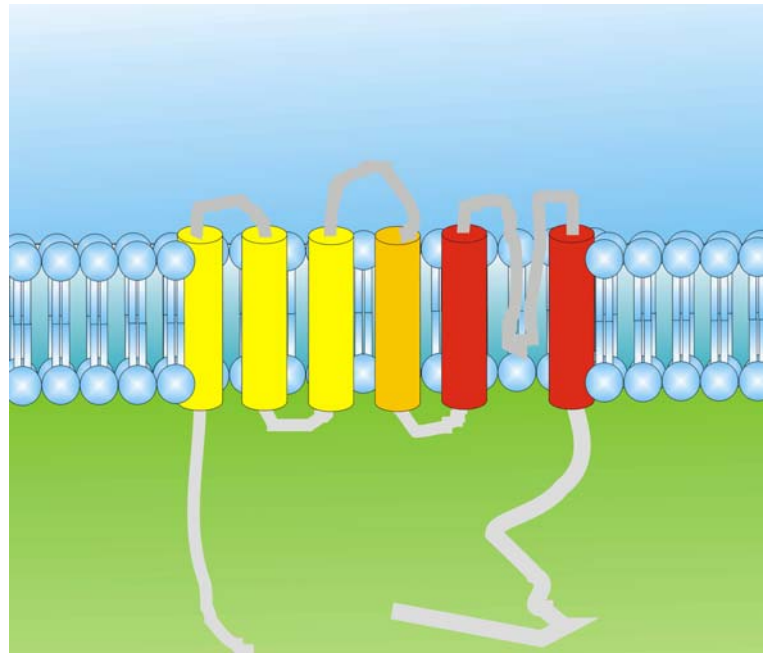


Abbildung.2. Sechs Transmembrandomänen einer spannungsabhängigen Kaliumkanaluntereinheit

Das Zytosol ist als grüner Hintergrund, das externe Milieu als blauer Hintergrund dargestellt. Der Spannungssensor S4 (orange), S5-S6 Segmente der Pore (rot), S1-S3 (gelb) und Linker sowie N- und C-Terminus (grau).

Das Wasserstoffion oder Proton (H^+) ist ein Kation, dessen physiologische Bedeutung für den menschlichen Körper unumstritten ist. Der negative dekadische Logarithmus der Protonenkonzentration (H_3O^+) ergibt den pH-Wert. Der pH-Wert im Körper ist strengstens reguliert, da sein Abweichen aus dem Normbereich, fatale Auswirkungen auf den gesamten Organismus hat: Hyperkalämie, Hypokalämie, Schwäche, Herzrhythmusstörungen, usw.

Zudem ist der Protonengradient wichtig für ein Protein namens F-ATPase. Sie produziert in den Mitochondrien das überlebenswichtige ATP für die Zellen des Körpers. In 2006 konnte durch gezieltes Klonen der spannungsabhängige Protonenkanal (Hv1) das erste Mal als funktionelles Protein exprimiert werden (3,4). Der Protonenkanal besteht, wie seine anderen spannungsabhängigen Kationenkanalverwandten, aus 4 Transmembrandomänen, die als

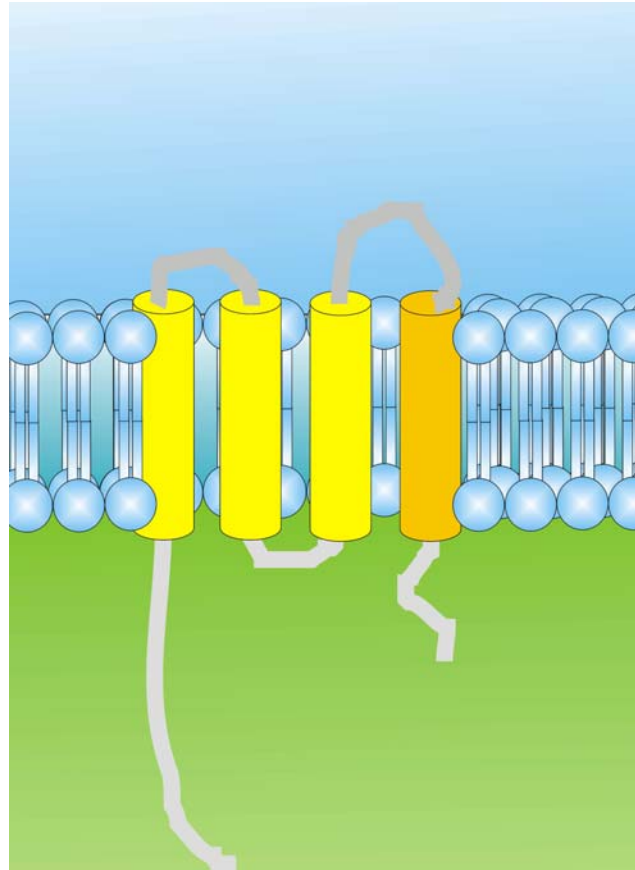


Abbildung.3. Schema des spannungsabhängigen Protonenkanals

Der spannungsabhängige Protonenkanal hat keine Poren. Sein Spannungssensor ist ähnlich dem der Kaliumkanäle.

Spannungssensor das S4-Segment enthalten. Im Gegensatz zu den anderen spannungsabhängigen Ionenkanälen verfügt der Protonenkanal (Hv1) über keine Pore (3). Protonen werden nicht wie Kationen durch das Abstreifen der Hydrathülle durch einen Kanal geleitet sondern durch das Springen über eine Reihe von Molekülen, die einer Wasserkette gleichen. Dieser Wasserketten-Mechanismus wird "Hydrogen Bonded Chain Conduction" (HBC) genannt. Bei der HBC sind die Moleküle vergleichbar, mit dem flüssigen Aggregatzustand des Wassers, mit ihrem Sauerstoff wie Wassermoleküle in einer Kette angeordnet. Das erste Wassermolekül dieser Kette wird

protoniert, d.h.: Ein Proton (H^+) lagert sich an, wonach sofort ein Proton vom ersten Wassermolekül an das nächstfolgende Wassermolekül weitergegeben wird, bis die Kette durchlaufen ist und ein Proton den Kanal passiert hat. Dieser Vorgang bildet einen Protonenstrom aus, so lange Protonen am Kanal Anfang anfallen und die angelegte Spannung aufrecht erhalten bleibt. Anzumerken ist dabei, dass das Proton selbst sich nur bis zum nächsten Wassermolekül bewegt, sein Weg also sehr kurz ist. In der Summe wird aber eine positive Ladung als Proton über eine große Distanz bewegt. Um es anschaulicher zu machen, kann man diesen Mechanismus bildhaft mit dem Durchgang eines Impulses bei elastisch aufgehängten Kugeln vergleichen. Wenn man dort eine Kugel auf die anderen Kugeln stoßen lässt, so wird dieser Stoß erst bei der letzten Kugel wieder in Bewegung umgesetzt. Natürlich kann man bei dem HBC nicht mehrere Kugeln bzw. Protonen so bewegen. Dieser Ladungstransport läuft schneller ab, als die Diffusion

anderer Kationen mit Hydrathülle. Es ist damit wahrscheinlich, dass das Öffnen des Protonenkanals

eine solche HBC entstehen lässt, die strukturell einer einfachen Wassermolekül-

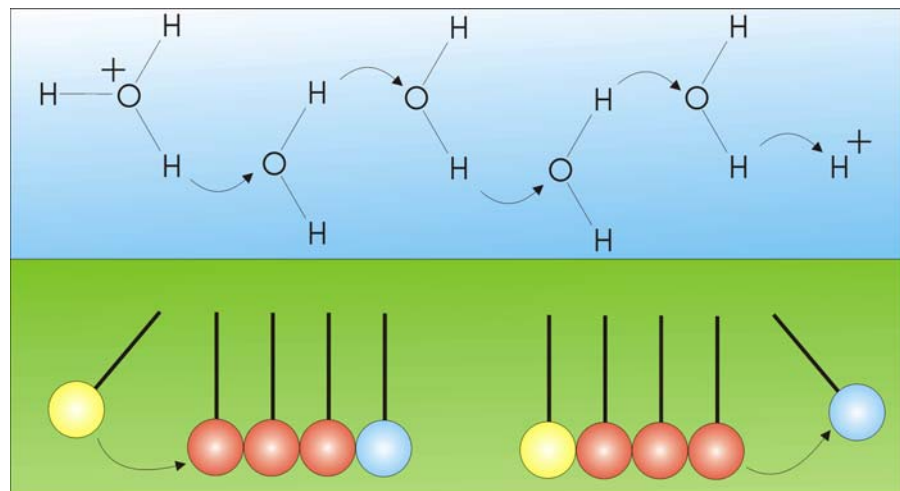


Abbildung.4. Skizze der Hydrogen bonded chain (HBC)

Die obere Graphik (blauer Hintergrund) zeigt den Mechanismus, wie sich Protonen in Wasser bewegen. Das Proton bindet ans erste Wassermolekül, welches dann ein Proton an das nächste Wassermolekül abgibt. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis das letzte Wassermolekül ein Proton abgegeben hat. Als unkorrekter, aber anschaulicher Vergleich ist ein elastischer Stoß im unteren Bild dargestellt (grüner Hintergrund). Die erste Kugel gibt ihre Energie weiter, bis sie von der letzten Kugel als Impuls wieder in Bewegung umgewandelt wird.

Kette gleicht und damit das Springen der Protonen in Richtung der treibenden Kraft ermöglicht (5). Diese neuartige Struktur kann einer der Schlüssel zur Evolution der spannungsabhängigen Ionenkanäle sein.

Zudem zeigt der Hv1 mit seiner hohen Verwandtschaft zu der spannungsabhängigen Phosphatase der Seescheide *Ciona intestinalis*, dass das Prinzip des Messens der transmembranösen Spannung nicht nur für Ionenkanäle entscheidend ist

Der spannungsabhängige Protonenstrom ist das erste Mal 1982 durch Thomas und Meech (6) in Neuronen von Schnecken beschrieben worden. Daraufhin wurde diese Leitfähigkeit von Barish und Baud in Axolotl Oocyten 1984 wiederentdeckt (7) und erst DeCoursey hat 1991 diesen Strom in Alveolar Typ II Zellen in Mammalia messen können (8). DeCoursey und Cherny konnten 1993 als erste den spannungsabhängigen Protonenstrom in humanen Neutrophilen (9) und später in der humanen Zelllinie THP-1 auch für den menschlichen Organismus nachweisen (10). Des Weiteren untersuchte die DeCoursey-Gruppe weitere Zellen des angeborenen Immunsystems und entdeckte, dass in humanen Eosinophilen und in humanen Neutrophilen ein starker Protonenstrom messbar ist. Schon in den ersten Messungen konnte gezeigt werden, dass der spannungsabhängige Protonenstrom hoch selektiv für Protonen ist und kein anderes Kation oder Anion durch diesen Kanal geleitet wird.

Die physiologische Bedeutung vieler Ionenkanäle konnte gezeigt werden.

Spannungsabhängige

Natriumkanäle sind die Träger des Einwärtstroms in

Muskeln und Nerven.

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle steuern Neurotransmitterfreisetzung, Exocytose, Calciueinstrom in Herzmuskelzellen und andere, weitere Aspekte im Körper. Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind verantwortlich für fast alle Arten von Repolarisationen.

Welche physiologische Aufgabe kommt weiteren, neu entdeckten Protonenkanälen zu?

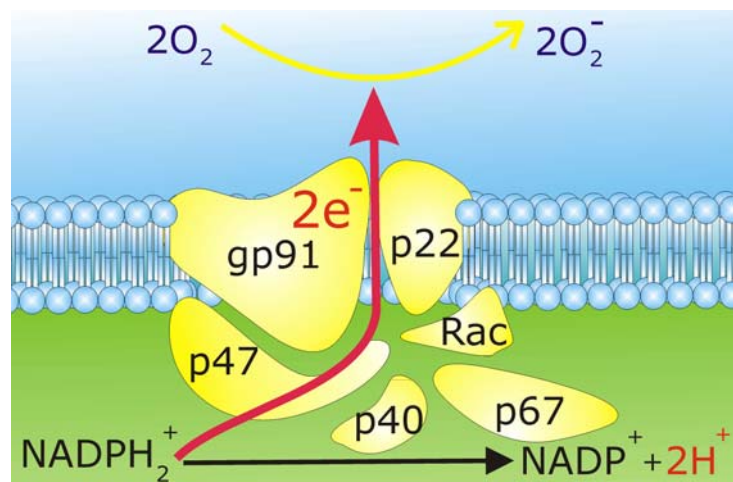


Abbildung. 5. NADPH-Oxidase mit Elektronentransport

Gezeigt ist die von insgesamt sechs Untereinheiten (gp91, p22, p47, p40, p67 und Rac – gelb markiert) gebildete NADPHox. Die Spaltung von NADPH_2^+ zu $\text{NADP}^+ + 2\text{H}^+$ setzt zwei Elektronen frei, die durch gp91 über die Membran transportiert werden. Aus zwei Sauerstoffmolekülen entstehen zwei Sauerstoffradikale ($2 \times \text{O}_2 \rightarrow 2 \times \text{O}_2^-$).

1998 konnte Schrenzel zeigen, dass es möglich ist, die Translokation eines Elektrons durch die NADPHox mit Hilfe der „Patch-Clamp“-Technik messbar zu machen. Henderson postulierte schon 1987 (11) die Elektrogenität der NADPHox, aber erst Schrenzel konnte einen Strom zeigen, der sich außerhalb der Ionengradienten der eingesetzten Lösungen befand, sich durch NADPHox-Aktivatoren anschalten und durch NADPHox-Blocker ausschalten ließ (12). Damit war es möglich, die Funktion der NADPHox in Echtzeit während eines Experimentes an einer einzelnen Zelle zu überwachen.

Die NADPHox ist aus mehreren Proteinen zusammengesetzt. Zwei Proteine (p22^{phox} und gp91^{phox}) sind transmembran ständige Proteine, die zusammen das Zytochrom b₅₅₈ bilden. Weiterhin besteht die NADPHox aus den cytosolischen Faktoren p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} und dem G-Protein Rac. Bei der Reaktion von $2\text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$ wird pro NADPH ein Proton frei. Daraus entsteht eine Depolarisation über die Membran sowie direkt eine Acidifizierung des Zytosols. Weiterhin wird das Zytoplasma durch den Pentosephosphatweg zusätzlich angesäuert (13).

Beim Pentosephosphatweg wird aus Glucose-6-Phosphat nach einigen Zwischenschritten (Abb-6) Ribulose-5-Phosphat gebildet. Dieser Stoffwechselweg dient hauptsächlich dem Auffüllen des NADPH/H-Speichers der Zelle. Weiterhin wird Ribulose-5-Phosphat als Ausgangsprodukt für die Synthese von Nucleotiden benötigt.

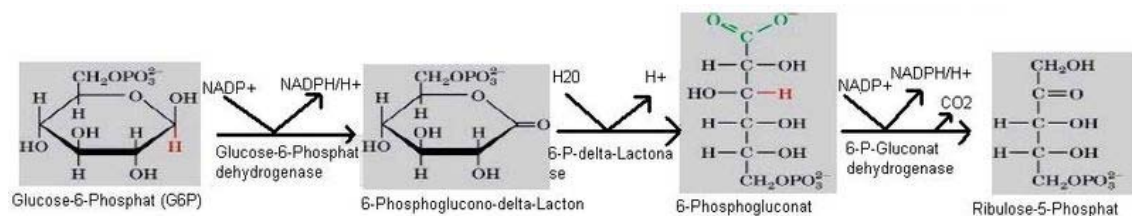


Abbildung. 6. Pentosephosphatweg ist der Hauptlieferant von NADPH_2^+

Glucose-6-Phosphat wird durch drei Zwischenschritte in Ribulose-5-Phosphat umgewandelt. Das Ribulose-5-Phosphat dient als Ausgangsprodukt der Nucleotidsynthese. Durch das Enzym G-P-delta-Lactonase wird ein Proton frei, das zusätzlich zur NADPHox das Zytosol ansäuert.

Die Ansäuerung durch den Pentosephosphatweg erfolgt durch die Reaktion der 6-Phosphoglucono-delta-Lactonase, die 6-Phosphoglucono-delta-Lacton zu 6-Phosphogluconat umsetzt. Hierbei wird ein Proton aus dem eingebundenen Wasser frei und säuert somit das Zytosol an, in dem diese Reaktion stattfindet. Durch den Transaldolase-Transketolaseweg kann Ribulose-5-Phosphat wieder als Fruktose-6-

Phosphat Glyceraldehyd-3-Phosphat in die Glykolyse einfließen.

Damit die Zelle die Depolarisation und die Ansäuerung kompensieren kann, verfügt sie über drei Mechanismen. Einerseits kann sie mit Hilfe des Na^+/H^+ Antiporters Protonen

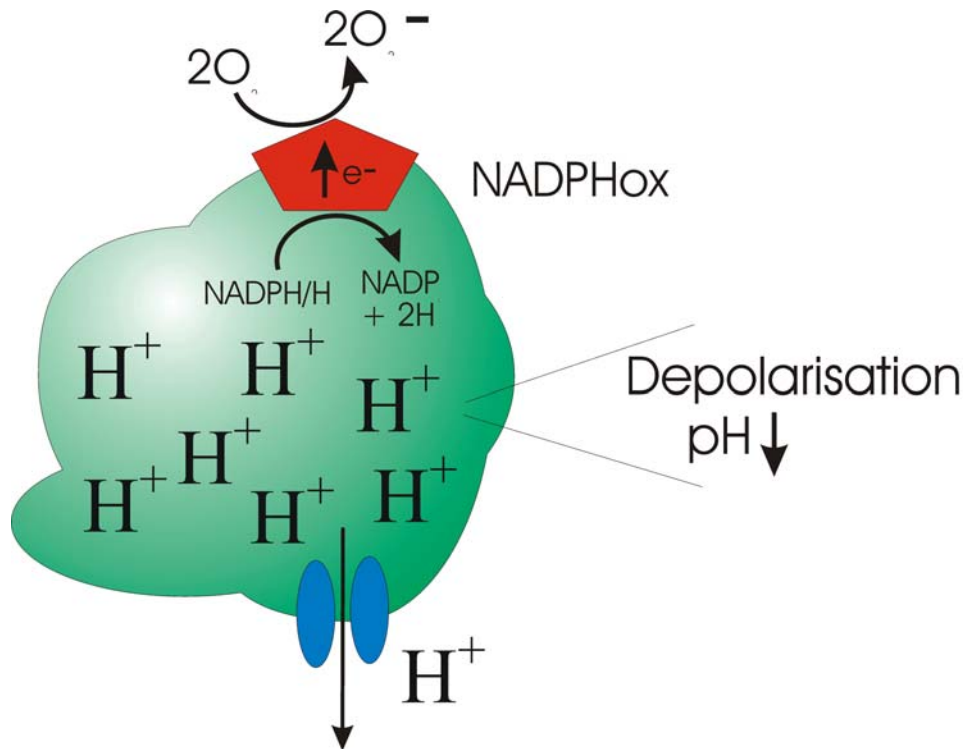


Abbildung.7. Schema des Zusammenspiels zwischen NADPHox und Protonenkanälen

NADPHox (rot eingefärbt), deren Umsatz von NADPH und Elektronen skizziert eingezeichnet ist. Die Anhäufung positiver Ladungen durch die entstehenden Protonen und die leichte Ansäuerung ist durch die (H^+) -Mehrfachung dargestellt. Protonenkanal (blau eingefärbt), der Protonen spannungsabhängig aus der Zelle leitet.

über die Ausnutzung des Natriumgradienten aus der Zelle transportieren, andererseits kann der spannungsabhängige Protonenkanal, der sich bei einer Depolarisation über die treibende Kraft der erhöhten intrazellulären Konzentration von H^+ öffnet, die Protonen aus der Zelle leiten. Der Na^+/H^+ Antiporter ist elektroneutral. Er kann nicht die Depolarisation der Zelle verhindern, aber Protonen durch Natriumionen austauschen. Ein weiterer Vorteil eines Kanals gegenüber dem eines Transporters besteht darin, dass keine zusätzliche Energie in der Zelle verbraucht wird, um die Protonen aus der Zelle zu leiten, während der Na^+/H^+ Antiporter sekundär von der Leistung der Na^+/K^+ -Pumpe abhängt. Der bis jetzt nicht erwähnte dritte Mechanismus ist die H^+ ATPase. Sie kann mit einer 2-3 H^+ pro ATP Stöchiometrie Ladung, in Form von Protonen, aus der Zelle

befördern. Sowohl Antiporter, ATPase als auch Hv1 sind in den Immunzellen vorhanden. Interessanterweise reagierten NADPHox und der Hv1 auf den Phorbol ester 4 α -Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA), also beide mit einer Aktivierung. Der Elektronenstrom der NADPHox erhöht sich und ebenso steigt die Amplitude der Protonenströme in der ganzen Zelle. Weiterhin zeigen sich auffällige

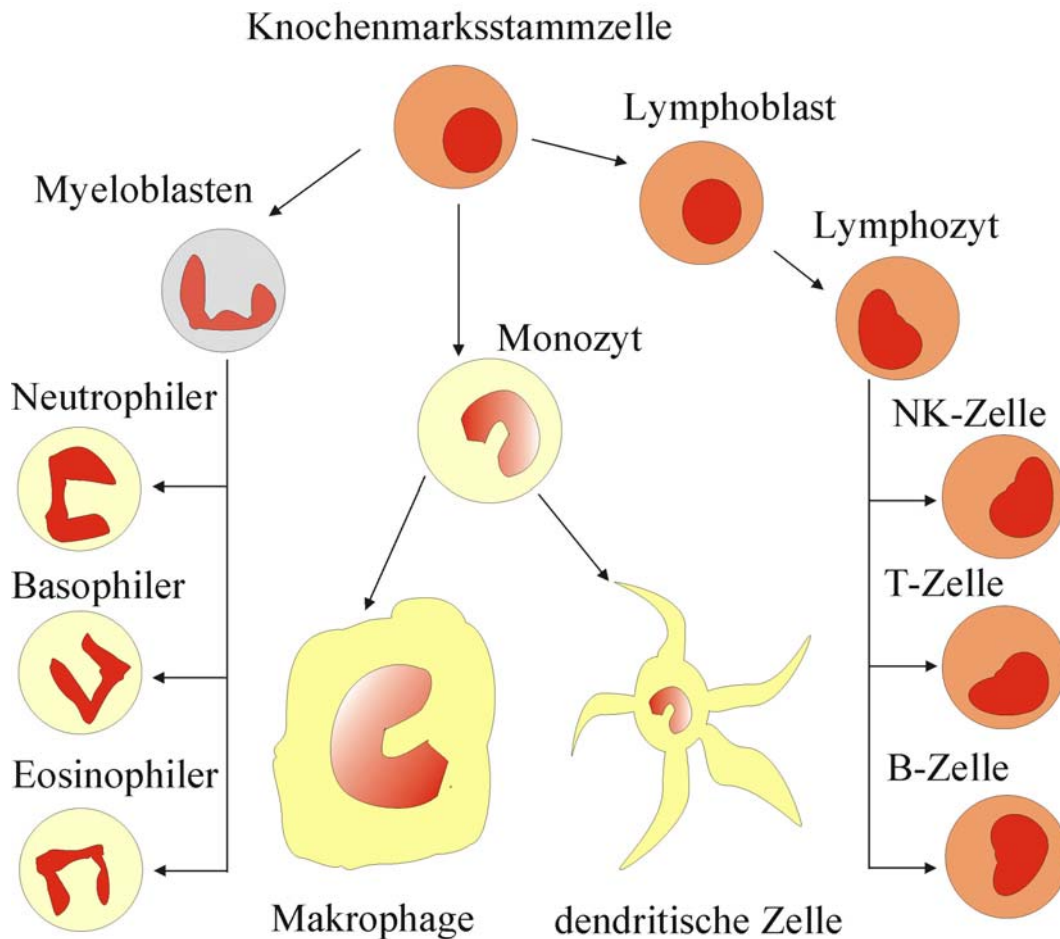


Abbildung 8. Hämatopoetische Linie der Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten

Die Abbildung zeigt die Linien, aus denen die verschiedenen Zellen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems abstammen. Zwischen den Lymphozyten und den Granulozyten zeigt sich eine frühe Trennung auch in der Reifung der Zellen. Monozyten sind pluripotente Zellen, aus denen noch Makrophagen und dendritische Zellen reifen.

Einwärtsprotonenströme, die während des unstimulierten Zustandes nicht auftreten. Die Blockierung der NADPHox durch Diphenyl Iodonium (DPI) unterbindet den Elektronenstrom vollständig und gleichzeitig ist eine Verlangsamung der Deaktivierungsströme des Protonenstroms zu messen.

Es liegt nahe, zu vermuten, dass diese Synchronität der Ereignisse bei Protonen- und Elektronenstrom auf ein und dieselbe physiologische Funktion hindeutet. Abbildung 6 zeigt ein Schema, in dem die Bedeutung der Protonenkanäle für die NADPHox nochmals dargestellt wird.

Bis zu dieser Arbeit sind weder Protonen- noch Elektronenströme simultan in humanen Monozyten gezeigt worden. Granulozyten sind bis auf den Elektronenstrom von Basophilen, der höchst wahrscheinlich nicht existiert, vollständig in diese Richtung erforscht worden. Monozyten scheinen bei dieser wichtigen Entwicklung vergessen worden zu sein.

Monozyten sind die Vorläuferzellen der Makrophagen und der dendritischen Zellen des Immunsystems. Makrophagen und dendritische Zellen sind per Definition die Zellen, die nicht mehr im Blutstrom zirkulieren und ins Gewebe eingewandert sind. Monozyten gehören wie die Eosinophilen und Neutrophilen zu den Phagozyten. Sie verfügen damit über die Fähigkeit, mit Hilfe ihrer Phagosomen und Lysosomen und der Produktion von Sauerstoffradikalen durch die NADPHox Fremdkörper zu zerstören. Im Gegensatz zu den anderen Phagozyten ist der Monozyt aber auch eine antigenpräsentierende Zelle, die somit eine Vermittlerrolle zwischen dem adaptiven und dem angeborenen Immunsystem einnimmt. Der Monozyt zeichnet sich zusätzlich als Zelle dadurch aus, dass er nicht wie Neutrophile nur bis zu 2 Tagen unter Kulturbedingungen wie *in vivo* überlebt, sondern in Kultur wie auch im Körper bei ausreichender Versorgung eine unbestimmte Lebensdauer hat. Die deutlich längere Lebensdauer im Vergleich zu den anderen Phagozyten erlaubt es, mit diesem Zelltyp auch Versuche zu machen, die Veränderungen auf der DNA- oder der RNA-Ebenen hervorrufen. So könnten in Monozyten Gene, die besonders für die Sauerstoffradikalproduktion essentiell sind, durch Transfektionen aus- oder anschalten. Auch ergeben sich mit den Monozyten Möglichkeiten, die konkreten Unterschiede in verschiedenen Spenderpopulationen über einen größeren Zeitraum zu untersuchen. Schlussendlich können die Monozyten bis zu Makrophagen oder dendritische Zellen ausgereift werden, um in diesem Zeitraum weitere Experimente durchzuführen und dadurch ihre Entwicklung besser zu verstehen.

Aus der beträchtlichen Lebensdauer der Monozyten ergibt sich, dass der ausreifende Monozyt, der ins Gewebe eingewandert ist, von Beginn bis zum möglichen Tod des

Organismus am Zielort seiner Diapedese verweilen kann. Monozyten bleiben also am Ort der Entzündung und spielen eine weitere wichtige Rolle beim Abheilen des Gewebes nach einer Entzündung oder Verletzung. Monozyten sind als körpereigene Zellen mit ihrer Immunfunktion bei fast allen Erkrankungen beteiligt, da sie in ihrer Funktion durch Chemokine zum Ort der Erkrankung geleitet werden. Vor dieser Arbeit war nicht bekannt, welche Stärke der Elektronen- sowie der Protonenstrom erreicht und wie sich die Protonenströme in Monozyten unterschiedlichen Alters - Kulturen von einem bis zu drei Tagen - verändern.

2. Material und Methoden

Wachstumsmedien für Säugerzellen

Clicks/RPMI

Das Clicks/RPMI-Trockenpulver wurde gemäß den Angaben des Herstellers in 10 l Aqua dest. (Baxter, Deerfield, IL) gelöst, anschließend mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 23,93 g HEPES und 11,76 g NaHCO₃ versetzt und der pH auf 7,2 eingestellt. Nach Sterilfiltration (0,2 µm) erfolgte die Lagerung bei 4°C. Unmittelbar vor Gebrauch wurde noch β-Mercaptoethanol (50 µM), L-Glutamin (1 mM) und inaktiviertes (56°C, 30 min) FCS hinzugefügt.

PBS

Das PBS-Trockenpulver wurde in 10 l Aqua dest. (Baxter, Deerfield, IL) gelöst und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Anschließend wurde die gesamte Lösung steril filtriert (0,2 µm) und zu je 500 ml bei 4°C gelagert.

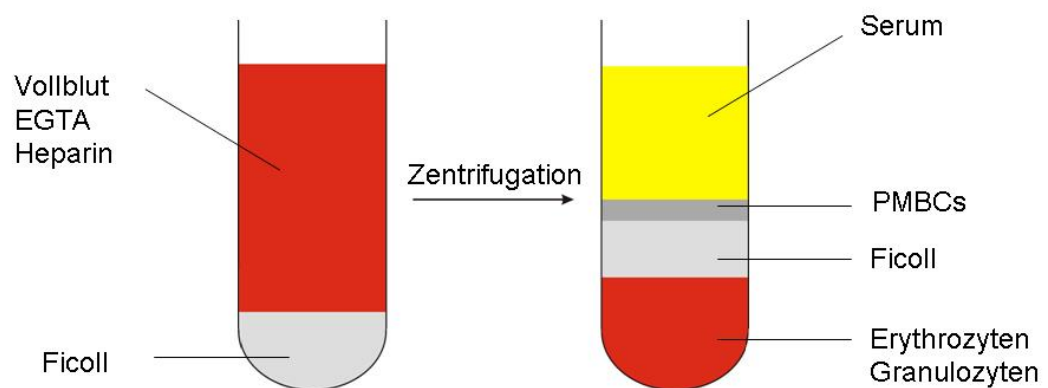


Abbildung. 9. Ficoll-Gradienten vor und nach der Zentrifugation

Dargestellt ist der Zentrifugationszylinder vor und nach der Zentrifugation. Durch die verschiedenen Dichten der sich im Blut befindlichen Zellen wandern während der Zentrifugation Erythrozyten und Granulozyten durch den Ficoll. Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten (PMBCs) passieren den Ficoll nicht.

Periphere mononukleäre Zellen aus Blut (PBMC, bestehend aus B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten), können aufgrund ihrer Dichte, mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten, durch isopyknische Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Aus den PBMC lassen sich mit Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren *in vitro* humane Makrophagen generieren. Die untersuchten humanen Monozyten dieser Arbeit wurden aus 20-50 ml Spenderblut gewonnen. Diese Blutprobe wurde mit dem Gerinnungshemmer EDTA versetzt. 10 ml des Blutes wurden jeweils in ein 50 ml Falcon-Röhrchen abgefüllt, mit 20 ml PBS verdünnt und mit 15 ml Ficoll (1,077 Histopaque, Sigma Lot- 56K2349) unterschichtet. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte (1,077 g/ml) so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen höherer Dichte die Ficollschicht passieren. Granulozyten dringen in die Ficollphase ein, während sich mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) in der Interphase ansammeln. Daraufhin erfolgte eine ungebremste Zentrifugation für 20 min, 660 xg (1800 U/min), 4°C. Die Interphase wurde abgenommen und in neue 50 ml Röhrchen überführt. Zwei weitere Waschschrte erfolgten für 10 min bei 400 xg, -(1300 U/min) 4°C in PBS, wobei alle Röhrchen in eines vereinigt wurden. Der zweite Waschschrte wurde bei gleichen Bedingungen mit PBS / 0,1 mM EDTA durchgeführt. Aus dem Röhrchen wurden dann 10 µl Zellen entnommen und mit 90 µl des 0,4%igen Farbstoffs Trypanblau (Sigma Aldrich) versetzt. Der Farbstoff diffundiert nur durch die Zellmembran der toten Zellen und färbt diese im Zytoplasma blau an. Dadurch können die toten Zellen bei der Zellzahlbestimmung ausgegrenzt werden. Ausgezählt wurden vier mal 16 Felder einer Neubauer-Zählkammer. Um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu ermitteln, wurde der Mittelwert aus 16 Feldern berechnet und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor (10) und mit (10⁴) multipliziert.

Die PBMC wurden dann auf ein mit zersplitternden Glasplättchen ausgelegten 3,5 mm Petrischalen pipettiert. Mittels Lösungwechsels wurden die nicht adherenten Zellen abgewaschen. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Es erfolgte keine Zugabe von Faktoren, die zum Ausreifen der Monozyten führen können.

Die mit Monozyten bedeckten Glasplättchen konnten in der Messapparatur befestigt werden.

Extrazelluläre Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration

Der verwendete Assay (Molecular Probes Kit 12212) basiert auf dem fluorometrischen Nachweis von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mit Hilfe von Amplex Red. Dieses reagiert in Anwesenheit von Meerrettichperoxidase (HRP) in einer (1:1)-Stöchiometrie mit H_2O_2 und bildet das fluoreszente Resorufin (Absorption 563 nm, Emission 587 nm). Die

untere
Auflösungsgrenze dieser
Reaktion liegt bei etwa 50 nM H_2O_2 .
Zur Bestimmung der Menge an H_2O_2 im Medium

wurden die Zellen in der Ringer-Lösung (siehe Tabelle 1.1) mit 64 μM Amplex Red

und 0,2 U/ml HRP bei 37°C inkubiert. Kurz vor der Messung wurden, bis auf die Kontrollen, alle Reaktionsansätze mit 60 nM PMA durch Induzieren eines "Respiratory Bursts" gestartet. Damit beginnt die Amplex Red Reaktion, die bis zu einer Stunde durch Fluoreszenzmessungen (Excitation 540 nm, Emission 590 nm) verfolgt wurde. Zum Aufnehmen der Daten diente das Plattenlesegerät (Viktor³V 1420), das alle zwei Minuten eine Messung der Fluoreszenz durchführte und somit die Darstellung eines Zeitverlaufs ermöglichte. Die Ringer-Lösung ist bewusst ohne Phosphat gehalten



Abbildung 10. Fluoreszenz-96-Well-Platten-Lesegerät Viktor³V 1420

Mit diesem Gerät ist es möglich, vollautomatisch etwa alle 2 oder 1,5 Minuten Fluoreszenzmessungen durchzuführen. In dieser Arbeit wurde es ausschließlich für die Messung der (H_2O_2)-Produktion verwendet. Die Möglichkeit des Lösungsaustausches während der Messung wurde nicht praktiziert, da es dafür keine experimentelle Notwendigkeit gab. Alle Daten wurden von einem Computer (Dell) aufgezeichnet und später mit dem Programm "Origin 7.5 pro" weiterbearbeitet.

worden, da freies Phosphat bevorzugt multivalente Kationen bindet, zu denen auch Zn^{2+} und Cd^{2+} gehören.

Für die Messungen an den Monozyten wurden adhärenente Monozyten eine halbe Stunde vor der Fluoreszenzmessung mit 10 min Trypsin EGTA (Sigma) behandelt, von den Petrischalen abgelöst und dann in einer Neubauerkammer gezählt.

Zum Bestimmen der Menge des gebildeten H_2O_2 wurde zusätzlich bei jedem Versuch eine Eichkurve mit gemessen. Aus einer 3% H_2O_2 Lösung wurde eine 20 mM H_2O_2 Lösung hergestellt. Mit dieser wurden dann über Verdünnungsreihen die Eichlösungen hergestellt.

Aus den Ergebnissen kann man mit Hilfe der nachstehenden beiden Formeln (2,3) den Elektronenstrom pro Zelle berechnen.

$$2. \quad P = \frac{C(\text{H}_2\text{O}_2)[\text{mol}]}{t[\text{s}]} / Z$$

$$3. \quad \text{Elektronenstrom [A]} = P \cdot N_A \cdot e^- \cdot Q_{e^-} \cdot V[\text{l}]$$

Formel. 2., 3. Errechnen des mittleren Elektronenstroms pro Zelle

P = Hydrogenperoxid (mol) pro Zeit pro Zelle, $C(\text{H}_2\text{O}_2)$ = die Konzentration je Mol H_2O_2 ist, t = die Zeit, Z = die Anzahl der Monozyten (Zellen), Q_{Elektron} = die Ladung eines Elektrons ($e = -1,60218 \cdot 10^{-19} \text{ C}$), N_A = Avogadrokonstante ($6,0221415 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), e^- = Anzahl der Elektronen, die je H_2O_2 über die Membran transportiert werden $V(\text{l})$ = Reaktionsvolumen in Liter

Patch-Clamp-Apparatur

Die Makrophagen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (Hamill et al. 1981) auf ihr elektrisches Verhalten untersucht. Alle Messungen wurden bei einer ständig kontrollierten Temperatur von konstant 22°C durchgeführt. Alle Messungen wurden an dem gleichen Messstand gemacht. Der Messstand besteht aus optischen, mechanischen und elektrischen Komponenten.



Abbildung. 11. Optische und mechanische Komponenten des „Patch-Clamp“-Standes

Die wichtigsten Komponenten sind hier bezeichnet. Mit diesem Stand sind alle elektrophysiologischen Messungen dieser Arbeit durchgeführt worden.

Optische Komponenten

Die optischen Bestandteile sind ein inverses Mikroskop (Nikon Eclipse TE200), das über eine Kamera (DAGE-MTI CCD-100) mit dem Monitor (Sony PVM-137) verbunden ist. Der Monitor dient der Darstellung der Zelle und der Patch-Pipette bei geschlossenem Faraday-Käfig. Durch die sehr starke Filterung war es möglich, auf den Faraday-Käfig ganz zu verzichten. Für die Messungen wurden Vergrößerungen von 40x und 400x benutzt; zusätzlich diente der Hoffmannkontrast der besseren räumlichen Orientierung. Die an das Mikroskop angeschlossene UV-Lampe wurde für die Messungen an Monozyten nicht verwendet, da keine Transfektionen mit GFP oder anderen Fluoreszenz-Farbstoffen benutzt wurden.

Mechanische Komponenten

Selbst die geringste Erschütterung kann zu einer Veränderung der Lage der Pipette zur Zelle und damit zu einem Abbruch der Messung durch einen Verlust des Seals führen. Aus diesem Grund ist der Meßstand auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgestellt (Serva Bench MK III).

Unter der Tischplatte befinden sich pneumatische Vibrationsisolatoren, die über ein Ventilsystem mit Druckluft befüllt sind. Durch Einstellen der einzelnen Ventile bleibt der Tisch in der Waagerechten und gleicht

Druckänderungen sofort durch Zupumpen von Druckluft aus.

Direkt auf dem Tisch des Mikroskops ist der Mikromanipulator

(Narishige MHW 103; kleinster Schritt = $1\mu\text{m}$ / Aktionsbereich X-Y-Z = 1cm)

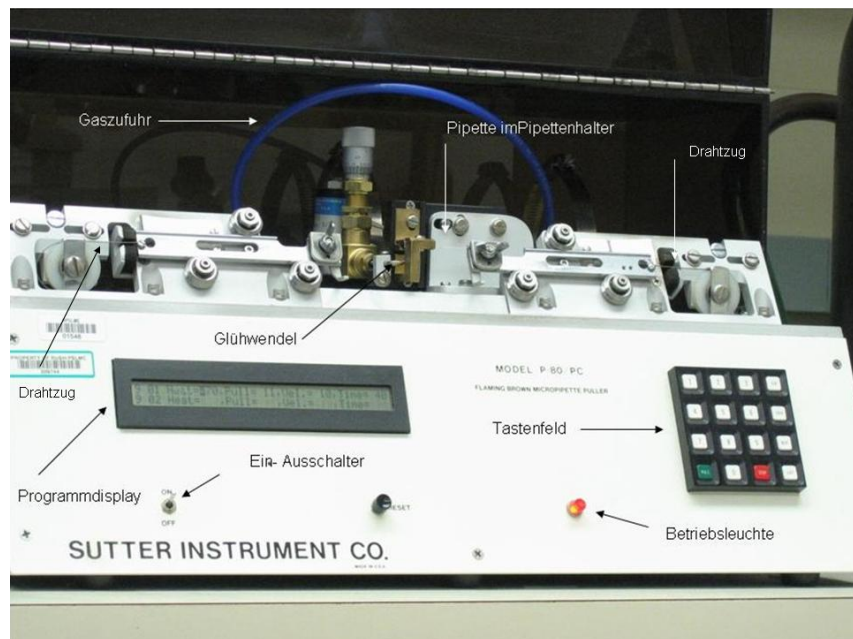


Abbildung. 12. Pipettenziehgerät zum Fertigen der Messkapillare

Die Kapillaren werden in die Pipettenhalter eingespannt und durch mechanische Kraft, die gleichzeitig über die Drahtzüge auf die Kapillaren ausgeübt wird, werden unter der Hitze der Glühwendel die Kapillaren gezogen.

angeschlossen. Mit ihm ist es möglich, die Patch-Pipette ins Bad, bis vor die Zelle zu bewegen. Als Pipettenhalter wurde der von der Firma Axon mitgelieferte Pipettenhalter verwendet. Seine Hauptaufgabe besteht darin, die Patch-Pipette sicher und stabil zu fixieren, die elektrische Verbindung zum Vorverstärker herzustellen und das Anlegen eines Unter- bzw. Überdrucks zu ermöglichen. Der Halter besteht aus Polycarbonat. Sein Rauschen ist durch das Verwenden von Kunststoff minimiert. Kunststoff minimiert die verwendete Masse und sorgt zusätzlich für genügende, mechanische Stabilität. Genauso trägt das lötfreie Andrücken des Silberchloriddrahtes an den Goldstecker

erheblich zur Verminderung des Rauschpegels bei. Die Glas-Kapillare ist durch eine Quetschdichtung fest mit dem Halter verbunden und zeigt keine "freien" Bewegungen. Für Unter- und Überdruckapplikation ist an der Patch-Pipette ein Gerät angeschlossen, mit dem exakt der Druck aufgebaut werden kann, den man über das Messinstrument eingestellt hat. Dieses Gerät ermöglicht äußerst schnell Druckänderungen zu applizieren, was besonders beim Patchen mit Zellen in Suspension wichtig ist.

Das Perfusionssystem des „Patch-Clamp-Setups“ ist bewusst einfach gehalten. Der Zulauf der Lösungen in das Bad wird durch eine Schlauchverbindung bis an die Glaskapillare der Referenzelektrode geführt. Mit Hilfe dieses Zulaufes lassen sich Lösungen direkt in das Bad einbringen. Über der Badkammer, die aus einem

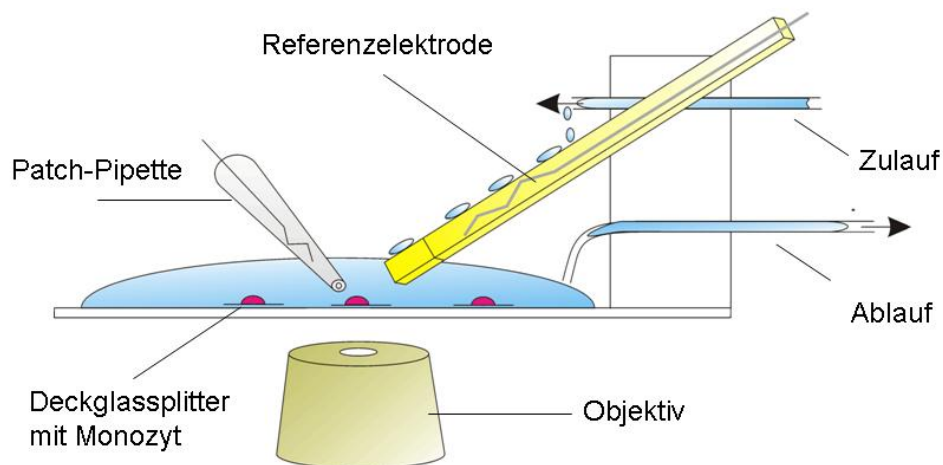


Abbildung. 13. Applikations-und Messschema der „Patch-Clamp“-Apparatur

In dem hier gezeigten System arbeitet man mit Flüssigkeitsvolumen um die 300 μM . Dabei werden die Lösungen mit 3 ml gespült, um einen völligen Austausch zu gewährleisten. Das Deckglas, auf dem die Deckglassplitter aufliegen, erlaubt höchste optische Auflösung.

Deckgläschen mit Kunststoffaufsatz besteht, befindet sich ein Absaugschlauch. An dem Absaugschlauch ist ständig ein Unterdruck angelegt. Dieser saugt sofort Flüssigkeit ab, die über die vorbestimmte Füllhöhe der Badkammer hinaussteigt. Dadurch kann man sehr kleine Volumina in kürzester Zeit austauschen.

Die Referenzelektrode besteht aus einer einfachen Glaskapillare, die einen Silberchloriddraht enthält. Ein Abschluss zu den Lösungen des Bades wird über eine Agarbrücke (3 % Agar-Agar) hergestellt.

Elektrische Komponenten

Die elektrischen Komponenten sind ein „Patch-Clamp“-Verstärker (Axopatch 200B Axon Instruments, Foster City, USA), das Herzstück der Elektronik, der mit seinem Vorverstärker direkt kleinste Spannungs- und Stromänderungen ausliest. Ein großer Vorteil gegenüber anderen Verstärkern ist seine kapazitive Kopplung des Vorverstärkers. Sie erlaubt eine weitere Reduktion des Rauschens und ermöglicht damit hochauflösende Einzelkanalmessungen. An den Verstärker ist ein Oszilloskop und ein AD/DA-Wandler (National Instruments) angeschlossen. Das Oszilloskop (BK Precision 2125) dient der Überprüfungen der Software und der Bestimmung von Rausch- und Brummquellen ohne Computer. Der Computer ist über eine Analog-/Digitalkarte (PCI-MIO-16XE-10, National Instruments, München) an den AD/DA-Wandler angeschlossen und dient der Aufzeichnung und Steuerung der elektrophysiologischen

Messungen. Die Sampling-Rate bei Einzelkanalmessungen war 16000 Datenpunkte pro Sekunde und die Filterfrequenz lag bei 5000 Hz. Bei Ganzzell-

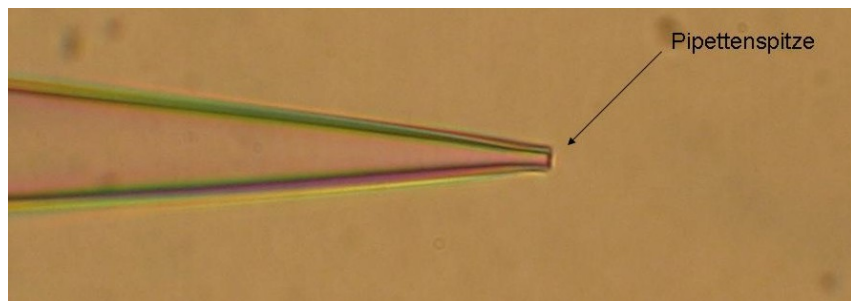


Abbildung. 14. Pipettenspitze (unter optischer Kontrolle) während des Poliervorgangs

Die Größe der Öffnung der Pipette an der Spitze ist gut zu erkennen. Daraus lässt sich der Pipettenwiderstand optisch ungefähr abschätzen.

Ableitungen waren es 500 Datenpunkte / s bei einem Filter von 20 Hz. Die Software wurde von Allen Bassaly geschrieben und ist in drei Programme eingeteilt. Das erste Programm (Oszi) dient nur der Aufzeichnung von Daten und dem Applizieren von Messprotokollen. Das zweite Programm ermöglicht die Analyse von „Whole-Cell“-Daten und das dritte die Analyse von Einzelkanal-Daten.

Kapillaren

Sowohl für die „Whole-Cell“-Ableitungen als auch für die „Cell-Attached“-Messungen wurde dünnwandiges Borosilikatglas ohne Filament (Garner Glass Company 8250 ID-1,15 mm, Länge 70 mm) benutzt, das einen Außendurchmesser von 1,6 mm hatte. Die Glaskapillaren wurden mit dem horizontalen Elektrodenziehgerät (Sutter Instruments P 80 / PC) gezogen. Das Pull-Programm hat unterschiedlich lange Züge. Es wurden folgende Parameter benutzt: Heat = 570, Pull = 11, Velocity = 10, Time = 40. Nach dem Ziehen ergab sich für die Patch-Pipetten ein konstanter Widerstand von 2-4 M Ω .

Nach dem Ziehen der Pipetten wurden diese mit einem Selbstbau unter Kontrolle eines Mikroskops poliert (Abbildung 15). Die hohe Vergrößerung lässt bei diesem Selbstbau optisch sehr gut den Widerstand der Pipette abschätzen (Abbildung 14). Der Querschnitt der Pipettenöffnung ist dabei von Bedeutung und spiegelt den Widerstand in umgekehrter Richtung wieder. Je größer der

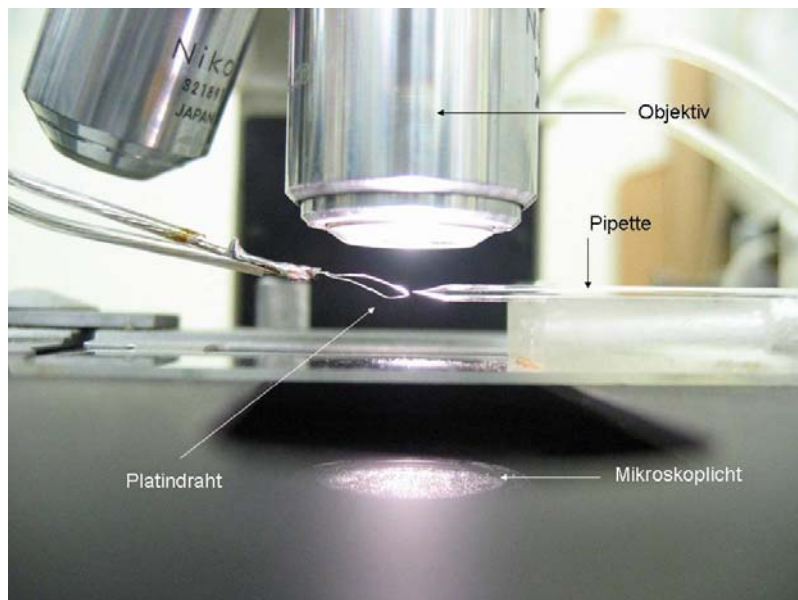


Abbildung. 15. Mikroschmiede zum Polieren der Messkapillaren

Die Spitze der Pipette wird mit einem glühenden Platindraht verändert. An der Pipettenspitze werden scharfe Kanten abgerundet, wodurch sich der Widerstand der Pipette - durch die Verengung des Querschnitts an der Spitze - während des Polierens verringert.

Querschnitt, desto kleiner der Widerstand, je kleiner der Querschnitt, desto größer der Widerstand.

Das Glas wurde für beide Ableitungskonfigurationen mit Sylgard (Sigma) beschichtet. Das Beschichten erfolgte unter dem Stereoskop und wurde dann im Luftstrom einer Hitze-Pistole (Milwaukee Heat tools 500X) ausgehärtet. Das Polymer dient der Verringerung der Kapazität der Pipette. Dadurch verringert sich zusätzlich das

Rauschen. Da das Polymer den Abstand der beiden “Kondensatorplatten“ vergrößert, nämlich der Pipettenlösung und der Badlösung, wird damit die Kapazität der Pipette deutlich herabgesetzt (Pipette 2-3 pF).

Offsetpotenzial und Liquid-Junction-Potenzial

Das Offsetpotenzial ist ein Potenzial, das sich an den Übergängen innerhalb der Messkette, also in der Silberchloridraht - Pipettenlösung - Salzlösung und an der Bad-Referenzelektrode bildet. Das Offsetpotenzial kann die Messung um bis zu mehrere Millivolt verfälschen. Dies führt zu falschen Spannungsschwellen und Umkehrpotenzialen bei den Messungen. Der Abgleich erfolgt über das Offsetpotentiometer des Verstärkers. Es wird über die Software mit dem Testpulsprogramm der Software und dem Offsetpotentiometer des Verstärkers so eingestellt, dass bei 0 mV Spannung 0 pA Strom fließt. Dadurch wird aber auch das Liquid-Junction-Potenzial, das ein Übergangspotenzial ist, welches bei Whole-Cell-

Messungen sowohl an den Grenzflächen Pipettenlösung-Zellinhalt als auch am Übergang intrazelluläres Milieu – extrazelluläre Lösung entsteht (14), korrigiert und beeinflusst. Die Membranpotenziale



Abbildung. 16. Patch-Clamp-Rack

Dargestellt sind die Komponenten des Patch-Clamp-Standes, die nicht unmittelbar am Mikroskop stehen. Die genaue Druckkontrolle erlaubt wiederholbares Einstellen von Über- und Unterdrücken an der Pipette. Die Temperaturkontrolle hilft, die physikalischen Bedingungen der Messung zu kontrollieren. Der Patch-Clamp-Verstärker ist über einen Analog-Digital-Wandler mit dem Computer verbunden.

und Klemmpotenziale sind in dieser Arbeit nicht um das Liquid-Junction-Potenzial korrigiert worden.

Um das Liquid-Junction-Potenzial zu messen benutzt man eine Referenzelektrode mit 3 M KCl und einer Agarbrücke. Die Patch-Pipette wird in eine 3 M KCl Lösung getaucht. Dabei wird das Offsetpotenzial wie gewohnt abgeglichen. Danach wird die Badlösung durch eine physiologische Salzlösung (5 mM K⁺) ausgetauscht. Damit kann man nun im Current-Clamp-Modus die Potenzialverschiebung messen. Die bisher genaueste Anleitung für die Bestimmung des Liquid-Junction-Potenzials ist von Erwin Neher verfaßt (15). Zudem kann man das Liquid-Junction-Potenzial mit der Henderson Gleichung (14) bei bekannten Mobilitäten der Ionen errechnen.

Sealbildung

Vor dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung wird ein Überdruck von 30 cm Wassersäule auf die Pipette gegeben. Damit wird verhindert, dass sich Verschmutzungen an die vordere Öffnung der Pipette anlagern können, was eine Verschlechterung der Sealwahrscheinlichkeit zur Folge haben könnte. Die Pipette wird daraufhin kurz vor die Zelle positioniert, damit es beim Verringern des Überdrucks und beim Anlegen des Unterdrucks zu einer Sealbildung kommt. Bei der Sealbildung wird die Zellmembran in die Pipette gezogen. Die Membran bildet dann einen hochohmigen Abschluss mit dem Glas der Pipette. Dieser Abschluss wird als "Seal" bezeichnet. Bei Abschlusswiderständen, deren Wert unter 5 GΩ lag, wurde die Messung sofort abgebrochen. Diese Vorgehensweise war zwingend notwendig, da der Eingangswiderstand der elektrisch sehr dichten Monozyten bei ungefähr 1-2 GΩ liegt. Falls der Seal nicht die 5 GΩ erreicht, die Messungen aber doch fortgesetzt wird, kann es durch den Strom, der nicht durch die Zelle sondern an der Zelle vorbeifließt (Leck), zu falschen Messergebnissen kommen.

Messkonfiguration

In dieser Arbeit wird ausschließlich in der "perforated-patch"-Konfiguration gemessen. Der "perforated-patch" ist eine spezielle Messung einer ganzen Zelle, bei der das Austauschen des Zytoplasmas durch die Pipettenlösung fast vollständig verhindert wird.

Damit ist es möglich elektrische Messungen direkt an einer einzelnen, lebenden Zelle in Echtzeit aufzunehmen.

Auch beim "perforated-patch" ist der hohe "Seal" eine Grundbedingung. Nach Erreichen dieses Abschlusswiderstandes, baut sich ein Protein, in dieser Arbeit Amphotericin B, in die Membran innerhalb der Pipette ein. Dieser Einbau ermöglicht einen elektrischen Zugriff auf die Zelle.

Amphotericin B

Amphotericin B wird aus dem Streptomyceten *Streptomyces nodosus* gewonnen. Es lagert sich besonders in ergosterolhaltigen Zellmembranen von Pilzen ein und erzeugt dort einen für monovalente Anionen und Kationen durchlässigen Kanal. Amphotericin B kann sich in hohen Dosen auch in humane Zellmembranen einbauen. Es ist ein weit verbreitetes

Antimycotikum. Seine elektrischen Eigenschaften sind von Ermishkin beschrieben worden (16).

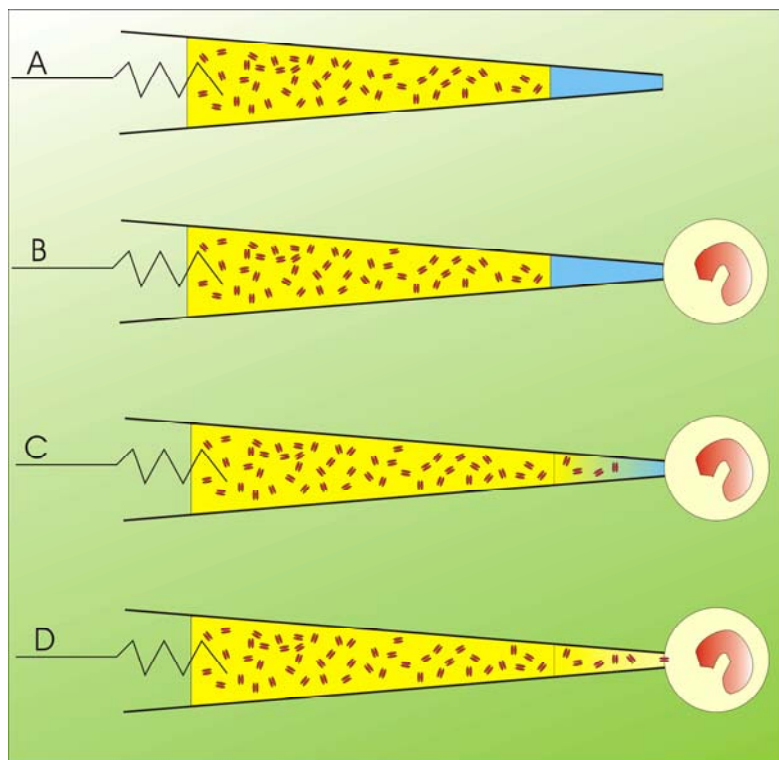


Abbildung .17. Perforated-Patch-Konfiguration

Dargestellt ist die Patch-Pipette mit chloritem Silberdraht.

In A ist das Tipfilling mit Amphotericin-freier Lösung abgebildet, die Amphotericinlösung selbst ist gelb mit rot gezeigten Amphotericinporen. B zeigt die Sealbildung, während der die Amphotericinlösung keinen Kontakt zur Zellmembran hat. Durch Diffusion gelangt die Amphotericinlösung an die Spitze der Pipette (C) und die Amphotericinporen bauen sich in die Zellmembran ein (D). Durch den Einbau der Pore ist ein elektrischer Zugriff zur Monozyte geschaffen.

Amphotericin wurde in Konzentrationen von 0,2 mg bis 1 mg pro ml Pipettenlösung zugesetzt. Die Patch-Pipetten wurden zuerst vorne (Tipfilling) mit Pipettenlösung ohne Amphotericin B, dann von hinten mit einer Amphotericin-B-Lösung befüllt. Damit wird

erreicht, dass bei der Sealbildung Amphotericin B noch nicht die Zellmembranen erreicht und sich erst nach dem Einstellen des hochohmigen Abschlusswiderstandes das Antimycotikum einbaut.

Der Einbau von Amphotericin B wurde über ständige Kapazitätsmessungen verfolgt. Bei eindeutigen elektrischen Zugriffen wurde mit der Messung begonnen.

Referenzelektrode

Als Referenzelektrode wurden selbst hergestellte Silber-Silberchlorid-Elektroden verwendet. Ein, an die Anode einer Gleichstromquelle angeschlossener, 4 cm langer Silberdraht ($\varnothing = 300 \mu\text{m}$) wurde in 150 mM Kaliumchlorid-Lösung getaucht, die an die Kathode der Gleichstromquelle angeschlossen war. Die Chlorierung ist zwischen 100 und 150 μA bei ca. 1.5 V für eine Stunde vorgenommen worden. Der Silberchloriddraht wurde dann mit einem 5 cm langen Glaskapillare ($\varnothing_i 1,45 \text{ mm}$, $\varnothing_a 1,8 \text{ mm}$) umgeben. Das hintere, nicht chlorierte Ende des Silberdrahtes wurde mit einem Goldstecker lötfrei verbunden. Das vordere Ende der Glaskapillare wurde mit einer 3%igen Agarbrücke abgedichtet, um Verunreinigungen des Präparats durch Silberionen zu verhindern und um eine mögliche weitere Potenzialbildung an der Referenzelektrode zu verhindern. Die Referenzelektrodenbefüllung ist eine 150 mM KCl Lösung. In gleicher Lösung wurden die Referenzelektroden gegen das Austrocknen aufbewahrt.

Membrankapazitäts-Bestimmung

Die Membrankapazität ist eine elektrische Eigenschaft der Membran. Die Membran kann man sich vereinfacht als das Dielektrikum bei einem Kondensator vorstellen. Die beiden Platten des Kondensators sind dann Badlösung und Zytosol der Zelle. Je größer das Dielektrikum ist, desto größer ist auch die Kapazität. Anhand der Kapazität lässt sich die Membranfläche der Zelle, welche Kontakt zur Badlösung hat, bestimmen ($1 \mu\text{F} = 1 \text{ cm}^2$).

Kapazitätsmessungen gewinnen in dieser Arbeit noch eine große Bedeutung. Da sie als ein Kriterium für die Qualität der "perforated patch"-Konfiguration herangezogen werden. Ein Messen einer Kapazität in der "perforated patch"-Konfiguration gibt an,

dass durch die Pipette ein Zugang zur Zelle geschaffen worden ist, da man die Membran von "Innen" aufladen kann.

Die Methode zur Kapazitätsbestimmung der Membran leitet sich aus nachfolgendem Ansatz ab:

Allgemein gilt: Die Kapazität C lässt sich als Quotient aus Ladung Q und Spannung U ausdrücken. Das an der Membran abfallende Potenzial ist in der Regel nicht exakt bekannt, da die Membran auch ohne ein extern angelegtes Potenzial aufgeladen sein kann und zusätzlich ein Diffusionspotenzial an der Spitze der Pipette auftreten kann. Aus diesem Grund betrachten man die Kapazität $C = \frac{dQ}{dU}$. Für die Spannungsrampe gilt:

$\frac{dU}{dt} = \frac{dQ}{dt} / C$. Der Quotient $\frac{dU}{dt}$ ergibt die Stromstärke I . Es gilt $C = I / \frac{dU}{dt}$. Beim

Wechsel einer Aufwärtsrampe von +1000 mV/s zu einer Abwärtsrampe von -1000mV/s kommt es zu einem Spannungswechsel $\frac{dU}{dt}$ von 2V/s. Folglich bedeutet ein

resultierender Stromsprung von 100pA eine Kapazität von 50 pF. Das betrachtete $\frac{dU}{dt}$ ist

hierbei die Änderung des Spannungsabfalls, verursacht durch die Zellmembran. Wenn der Zugriffswiderstand R_z nicht wesentlich kleiner ist als der Membranwiderstand R_m der abgeleiteten Zelle, muss der Spannungsabfall an der Membran U_m nach der Formel

$\frac{dU_m}{dt} = \frac{dU}{dt} \cdot \frac{R_m}{R_m + R_z}$ korrigiert werden. Nähere Erklärungen zu Kapazitätsmessungen

sind ausführlich von Schmitt und Wittmann (17) beschrieben worden. Da bei den Makrophagen und Monozyten der Membranwiderstand mindestens 100-fach höher ist als der Zugriffswiderstand, kann R_z vernachlässigt werden.

Zusammensetzung der Salzlösungen

Für die verschiedenen Messungen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Bad-Pipettenlösungen verwendet. Diese Lösungen werden übersichtlich in den nächsten Tabellen aufgeführt. Die dort verwendeten Lösungsbezeichnungen finden im weiteren Text Verwendung.

Tabelle 1.1. Badlösung der Makrophagen-Messungen (alle Angaben in mM)

Name	KCl	NaCl	TMA- MeSO ₃	Na- Pyruvat	Ca Cl ₂	Mg Cl ₂	HEPES	NH ₄ SO ₄	EGTA	NMDG	Glc	pH
Ringer	4,5	160		0	2	1	5	0	0	0	5	7,4
TMA	0	0	100	0	1,5	2	Bis pH=7 titriert	25	1	0	5	7

Tabelle 1.2. Pipettenlösungen der Makrophagen-Messungen (alle Angaben in mM)

Name	KCl	KH ₂ P O ₄	K- Glutamat	K ₂ - ATP	Na ₂ - GTP	Ca CL ₂	Mg Cl ₂	HEPES	NH ₄ SO ₄	EDTA	EGTA	pH	TMA- MeSO ₃
TMA						2	1	Bis pH=7 titriert	25		1	7	100
B1	50	10	65	1,9	0,2		2	10		0,1		7,3	

Ammoniumion als Stabilisator des pH Gradienten

Der Protonengradient über der Zellmembran ist für die Protonenstrommessung von höchster Bedeutung. Bei langen, depolarisierenden Pulsen kann aber der pH-Wert sich in der Zelle drastisch erhöhen, da die Protonenkonzentration innerhalb der Zelle sinkt. Dies hängt mit der Konzentration von H⁺-pH-Wert von 7- zusammen, die sich auf 100 nM H⁺ beläuft. Verglichen mit den Konzentrationen anderer Ionen wie Natrium (10 mM intrazellular) und Kalium (150 mM intrazellular) ist diese Konzentration vergleichsweise klein.

Um den pH-Gradienten in den Messungen aufrecht zu erhalten, bedarf es eines besonderen biochemischen Mechanismus. Wie oben erwähnt, sind in dieser Arbeit ausschließlich Messungen in der "perforated-patch"-Konfiguration durchgeführt worden. Der sich üblicherweise in der Pipette befindliche pH-Buffer zum Stabilisieren

des pH-Wertes (HEPES, BES, TRIS) ist als Molekül zu groß, um durch die Amphotericin-Poren zu diffundieren. Damit ist es unmöglich, den pH-Wert in der Zelle innerhalb einer "perforated-patch"-Messung zu kontrollieren. Diese Kontrolle ist jedoch wichtig, da Umkehrpotenzial und Schwellenpotenzial (Threshold) der Protonenströme äußerst abhängig von dem Protonengradienten über der Membran sind. Ammoniumion als Molekül kann also durch die Amphotericin-Pore in die Zelle diffundieren und damit einen zusätzlichen Puffer für Protonen in der Zelle bilden. Das Ammoniumion gleicht sowohl von der Ladung als auch von der Ionengröße sehr dem Kalium. Deshalb kann – während einer "perforated-patch"-Messung - das Ammoniumion die Amphotericin-Pore passieren - wie oben beschrieben. Genauso können monovalente Kationen passieren und in das Zellinnere gelangen.

Das Ammoniumion (NH_4^+) ist eine leichte Säure, die nur schwer die Lipiddoppelschicht der Membran passieren kann. Ammoniak (NH_3) ist die ungeladene, deprotonierte Form des Ammoniumions und um Größenordnungen besser membrangängig als NH_4^+ . In einer

Lösung bildet sich ein Gleichgewicht zwischen NH_4^+ , NH_3 und H^+ . Sind die Ammoniumionen-

Konzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle über Badlösung und Pipettenlösung gleich, deprotonieren auf beiden Seiten der Membran NH_4^+ zu $\text{NH}_3 + \text{H}^+$, was zu einem Übertreten von NH_3 durch die Zellmembran in gleicher Quantität von innen und außen

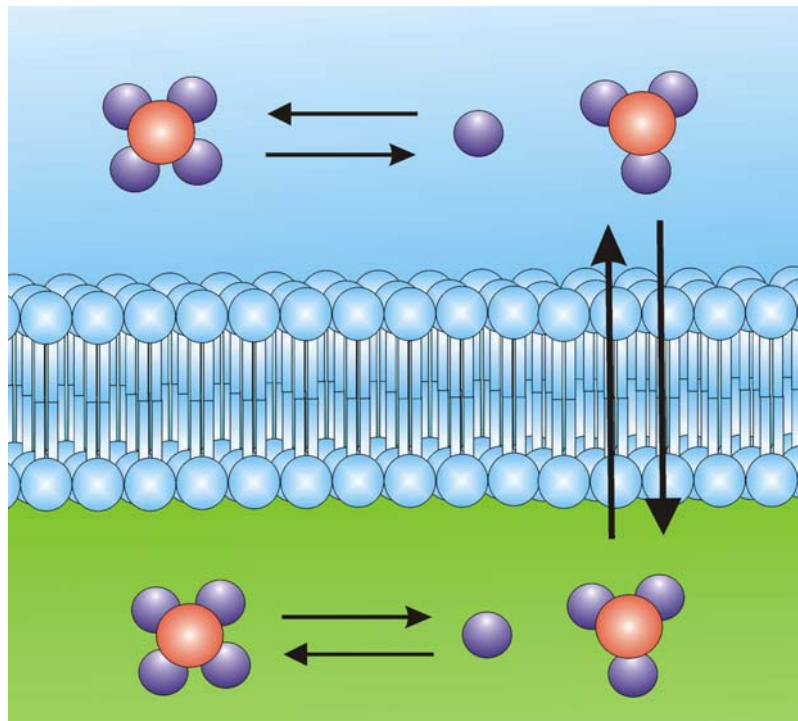


Abbildung. 18. Ammoniumion als pH-Puffer

NH_4^+ (N = rot) (H = lila) kann die Zellmembran nur schlecht passieren. Das ungeladene NH_3 ist um Größenordnungen besser permeable. Zurückgelassene Protonen säuern ihre Seite der Membran an, bis ein Gleichgewicht gefunden ist, das dem NH_4^+ -Gradienten entspricht.

führt. Das durch die Membran getretene NH_3 protoniert auf der "neuen" Seite mit dem von einem anderen NH_3 zurückgelassenen H^+ wieder zu NH_4^+ und der pH-Wert bleibt konstant. Innerhalb einer Messung kann durch diesen Mechanismus bei längeren, depolarisierenden Pulsen, durch die in der Zelle Protonen entfernt werden, der pH-Wert erhalten bleiben. Die Zellen selbst verfügen über einen eigenen inneren pH-Puffer von bis zu 100 mM, der zusätzlich den Vorgang unterstützt.

Eine weitere Möglichkeit, den Protonengradienten in "perforated-patch"-Messungen zu manipulieren besteht darin, mit der schwachen Säure NH_4^+ einen Protonen-Gradienten über der Zellmembran aufzubauen. Unterschiedliche Konzentrationen von NH_4^+ in Pipette und Bad führen zu einem solchen Gradienten. Dabei resultiert aus einem Unterschied von einer Potenz in der Konzentration von NH_4^+ (außen zu innen, innen zu außen), ein pH-Gradienten von 1. Beispiel: Eine Konzentration von 50 mM NH_4^+ in der Pipette (also Zelle) zu 5 mM im Bad erniedrigt den pH-Wert in der Zelle um eine Einheit (z.B. pH = 7 außen pH = 6 innen).

In dieser Arbeit sind keine unterschiedlichen NH_4^+ Konzentrationen verwendet worden. Unter physiologischen Bedingungen ist jedoch TMA mit 50 mM NH_4^+ während einer Messung bei einer Kalium-Pipettenlösung (B1) eingewaschen worden. Die B1-Lösung enthält kein NH_4^+ . NH_4^+ deprotoniert außerhalb der Zelle und NH_3 diffundiert in die Zelle. Dabei säuern die zurückgelassenen H^+ das Bad an, was zu einer kontinuierlichen Verringerung des pH-Werts im Bad (pH_0) führt. Als Formel lässt sich dieses Verhältnis folgendermaßen ausdrücken:

$$4. \quad \text{pH}_i = \text{pH}_0 - \log \frac{\text{NH}_4^+ \text{ innen}}{\text{NH}_4^+ \text{ außen}}$$

Formel.4. Änderung des pH-Wertes durch den NH_4^+ -Gradienten

Die Formel bestimmt den NH_4^+ -Gradienten, um genaue pH-Werte in der Zelle einzustellen.

Messprotokolle in der „voltage-clamp“ Spannungspulse und Spannungsrampen

In dieser Arbeit ist ausschließlich in der Spannungsklemme „voltage-clamp“ gemessen worden. Vereinfacht dargestellt dient die Spannungsklemme dem Konstanthalten der Spannung (Klemmspannung) und der darauf sich entwickelnde Strom wird gemessen. Dieses einfache Prinzip folgt streng der Ohmschen Gleichung $U = R \cdot I$. Wenn U (Spannung) konstant gehalten wird, dann ändert sich I (Strom) reziprok zu R (Widerstand). Daraus folgt: Vergrößert sich die Amplitude eines Stroms bei einer angelegten Spannung bewirkt dies gleichzeitig eine Abnahme des Widerstandes der Membran. Im Idealfall bewirkt die Widerstandsabnahme das Öffnen eines Ionenkanals, der in der Membran einen selektiven Tunnel für Ionen entstehen lässt.

Spannungspulse sind Spannungssprünge von einem Haltepotenzial zu verschiedenen anderen, höheren oder tieferen Potenzialen. Meist haben diese neuen Potenziale eine bestimmte Dauer und vergrößern bzw. verkleinern sich um einen bestimmten Wert. Dieser Wert wird auch Delta (Δ) genannt. Ein $\Delta = 10$ mV bedeutet, dass sich vom Haltepotenzial die Spannung jeweils um +10 mV geändert hat. In dieser Arbeit wird hauptsächlich mit „Spannungsfamilien“ gearbeitet. Hierbei wird ein Haltepotenzial angelegt (z.B. -40 mV) und der erste Puls springt für eine bestimmte Zeit auf -30 mV. Danach springt das Potenzial zurück aufs Haltepotenzial (-40 mV). Der nächste Puls springt nach einer Intervallzeit vom Haltepotenzial (-40 mV) auf -20 mV, d.h.: Er verändert sich zum vorigen Puls um +10 mV. So wiederholt sich dieses Protokoll bis eine endgültige, festgelegte, Sprunghöhe erreicht worden ist. Da alle Sprünge einschließlich der Intervallzeit gleich lang dauern, kann man sie - wie in Abbildung 19 dargestellt - übereinander stapeln. Diese Graphik wird „Stapelplot“ genannt. In Abbildung 19 kann man die Spannungspulse und ihre Dauer (time) als kleineren Graph rechts oben erkennen. Sie gehen von einem Haltepotenzial von -40 mV bis zu einem endgültigen Potenzial von +60 mV. Die große Graphik in Abbildung 19 zeigt die Stromantwort. Diese Methode wird während der Messreihe beibehalten.

Der Vorteil einer „Stromfamilie“ besteht darin, dass die Ströme auf ihre Kinetiken hin untersucht werden können, falls sie, wie in diesem Falle, spannungsabhängig sind. Der langsame Anstieg des Stroms in Abbildung 19 gibt die Zeitkonstante der Aktivierung wieder. Der nach unten gerichtete Einwärtsstrom zeigt die spannungsabhängige Deaktivierung des Stroms und wird als „Tailcurrent“ bezeichnet. Der „Tailcurrent“ ist

der Teil des Stroms, der, nachdem ein großer Auswärtsstrom aktiviert wurde, bestehen bleibt. Da der Kanal eine gewisse Zeit zum Schließen braucht. Solang dieser Prozess noch läuft, lässt sich aus seinem Verlauf eine Inaktivierungskinetik errechnen.

Ein spannungsabhängiger Protonenkanal verfügt also über eine Spannungsschwelle (Threshold), ab der er öffnet. Wird diese durch das Zurückspringen aufs Haltepotenzial unterschritten, schließt der Kanal. Der Verlauf dieser Inaktivierung lässt sich durch eine Zeitkonstante beschreiben.

Spannungsrampen sind Spannungsprotokolle, bei denen die Spannung kontinuierlich mit gleich bleibender Geschwindigkeit ändert. Diese Rampen bestehen meist aus zwei Komponenten: Einer Aufwärtsrampe und einer Abwärtsrampe. Abbildung 26 zeigt eine solche Rampe. Der Vorteil solcher Rampen ist, dass sich aus ihnen relativ einfach das Umkehrpotenzial („Reversalpotential“) ermitteln lässt. In einer Lösung wie TMA, in der als einzige mobile Ionen nur Protonen vorhanden sind, ergibt sich das Reverspotenzial als Kreuzungspunkt des Stroms der Aufwärtsrampe mit der Abwärtsrampe. Zudem entspricht die Spannungsänderung der Rampe eher der physiologischen Spannungsänderung, wie sie bei einer Aktivierung der NADPHox vorausberechnet wird. Aus diesem Grund wird sie bei den physiologischen Messungen dieser Arbeit verwendet.

Daten-Analyse der Leitfähigkeiten und der Kinetiken der Protonenströme

Leitfähigkeitsanalysen (Chord-Conductance) werden in dieser Arbeit bei den Protonenkanälen verwendet. Sie werden Grundsätzlich mit zwei Methoden bestimmt. Entweder wird die maximale Stromamplitude linear mit dem Umkehrpotenzial der gleichen Messung linear extrapoliert, oder in den Stromfamilien wird die maximale Stromamplitude der „Tailcurrents“ gemessen und dann proportional zu der zuerst bestimmten Leitfähigkeit eines der Pulse berechnet. Aufgrund der Tatsache, dass die Amplituden der „Tailcurrents“ in einer Stromfamilie alle mit der Selben Spannung gemessen werden, ist die Veränderung ihrer Amplitude direkt proportional zur Änderung der Leitfähigkeit. Diese Methode erlaubt pro Spannungssprung eine schnelle und verlässliche Begutachtung der einzelnen Leitfähigkeiten.

Die Kinetiken der Protonenströme werden einzeln pro Puls aus den Spannungsfamilien berechnet. Dabei wird mit Hilfe der Software (Origin 7) nach einer kurzen

Verzögerung, die den Protonenströmen zu Eigen ist, ein einfach exponentieller Fit verwendet (expDec1). Dieser war ausreichend, um alle Kinetiken der hier analysierten Daten zu erfassen. Die bestimmte Zeitkonstante τ ist als Einheit pro Sekunde (s) angegeben. Zur Bestimmung der „Tailcurrents“ wurde das gleiche Protokoll verwendet. Als einziger Unterschied zu den Kinetiken der Auswärtsströme ist anzumerken, dass hier keine Verzögerung der Aktivierung zu erkennen ist.

Pharmaka und Salze

Alle verwendeten Salze und Pharmaka sind Produkte der Firma Sigma (Steinheim, Deutschland). Wurden andere Produkte verwendet, ist das besonders vermerkt.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Elektronen- und Protonenströme sowie die Sauerstoffradikalproduktion humaner Monozyten mittels „Patch-Clamp“- und Fluoreszenzmessungen ermittelt.

Einer der Grundgedanken war zu zeigen, dass Monozyten über Elektronen- und Protonenströme verfügen und diese sich zeitabhängig in der unstimulierten Kultur verändern.

Zuerst sollen hier die Ergebnisse der „Patch-Clamp“-Messungen gezeigt werden. Sie zeigen den Ausstrom an Protonen und den Einstrom an Elektronen an der Einzelzelle.

Die Monozyten

wurden in jeder

morphologi-

sehen Form

gepatched. Es

gab weder in

der Sealbildung,

noch bei den

aufgenommen

Strömen

signifikante

Unterschiede,

die mit der

Form der

Monozyten in

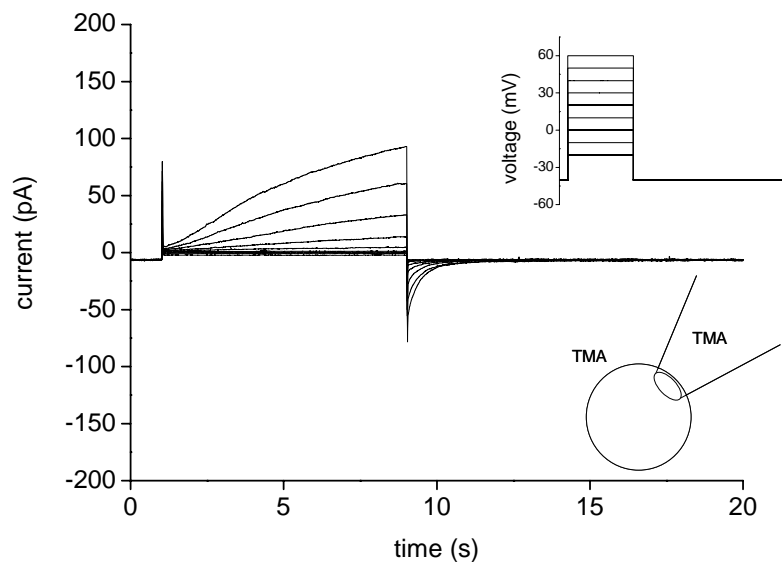


Abbildung.19. Stromfamilie eines drei Tage alten Monozyten in TMA

Protonenströme eines Monozyten per „perforated patch“ gemessen. Höhere Spannungspulse erzeugen höhere Ströme. Es sind keine Protoneneinwärtsströme oder Elektronenströme erkennbar.

Verbindung gebracht werden konnten. Das Heranführen der Pipette sowie die Sealbildung wurden in Ringer (Tab.:1.1) als Badlösung durchgeführt. Nach dem Erreichen eines über 5 Gigaohm hohen Abschlusswiderstandes wurde, zum besseren Einbau des Amphotericin B, das lichtempfindlich ist, die Intensität der Mikroskopbeleuchtung gedimmt. Nach dem Einbau konnte man die ersten Protonenströme in Ringer-Lösung erkennen. Der Protonenstrom gewinnt nochmals an Amplitude bei einem Wechsel der Badlösung auf TMA. In der TMA-Lösung befinden sich keine divalenten Kationen und sie enthält zusätzlich 1 mM EGTA, was divalente Kationen - zu denen auch die Schwermetalle gehören - bindet und so aus der Lösung

entfernt. Schon kleinste Metallverunreinigungen führen zu einer Blockade des spannungsabhängigen Protonenstroms. Das sich in der Pipette und im Bad befindliche Ammoniumion (NH_4^+) dient der Stabilisierung des Protonengradienten über der Membran. Die Messungen von Cherny haben gezeigt, dass der Protonengradient für das Öffnungsverhalten des Protonenstroms von entscheidender Bedeutung ist (18). Mit dem ausgeglichenen Protonengradienten, der im Idealfall $0 = \Delta\text{pH}$ beträgt, ist es möglich, die Veränderungen der Kanaleigenschaften zu messen, ohne die Einwirkung von Protonengradienten oder ein Erschöpfen der zytoplasmatischen Protonenkonzentration befürchten zu müssen (19).

Zuerst sind einzelne Monozyten aus einer drei Tage alten Kultur gemessen worden. Spannungsfamilien mit 9 Spannungspulsen von -20 mV bis +60 mV mit einem $\Delta = 10$ mV wurden nach stabilem Zugang zum Monozyten aufgezeichnet (Abb.19).

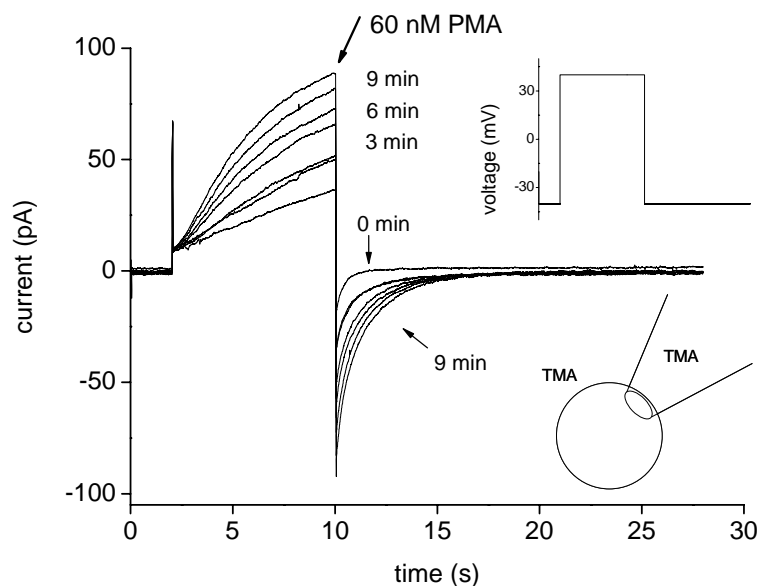


Abbildung.20. Zeitverlauf der Protonenströme bei gleichbleibendem Spannungspuls nach PMA-Aktivierung

Ein Spannungspuls von -40 mV auf +40 mV wurde kontinuierlich wiederholt. Die jeweils gemessenen Protonenströme sind zeitabhängig. Die „Tailcurrents“ werden länger und langsamer, die Auswärtströme aktivieren schneller und mit höherer Amplitude.

Die Stromantwort

zeigt deutlich, dass bis zu einem Potenzial von +20 mV keine messbaren spannungsabhängigen Protonenströme aufzuzeichnen sind. Bei +20 mV ist deutlich der entstehende Auswärtstrom zu erkennen, der bei einer Pulslänge von acht Sekunden sein Maximum noch nicht erreicht. Weiterhin sind die Deaktivierungsströme („Tailcurrents“) zu erkennen. Sie entstehen bei der Deaktivierung der Protonenkanäle durch den Hyperpolarisationssprung von -40 mV zurück zum Haltepotenzial. Diese „Tailcurrents“ entstehen nur, wenn vorher eine Aktivierung des spannungsabhängigen Protonenstroms ausgelöst wurde. Die „Tailcurrents“ sind die Population der Protonenkanäle, die zeitlich verzögert langsam schließen und damit als ein sich langsam

reduzierender Protoneneinstrom nach dem Spannungspuls zu sehen sind. Im nicht aktivierten Zustand einer Immunzelle zeigt ihr Protonenstrom keinen aktivierbaren Einwärtsstrom. Dieser würde bei einem negativen Spannungssprung, unter(0 mV) auftreten. Grund dafür ist der spannungsabhängige Kanal, der ein Schwellenpotenzial

von + 20 mV benötigt, bevor er öffnet. Einwärtsströme sind in den „Tailcurrents“ zu sehen, da hier noch nicht alle Kanäle der Protonenkanalpopulation wieder geschlossen sind und das Gleichgewichtspotenzial für Protonen aufgrund der Pufferung durch NH_4^+ bei 0 mV liegt. In Abbildung 19 zeigt der Protonenstrom eine Amplitude von

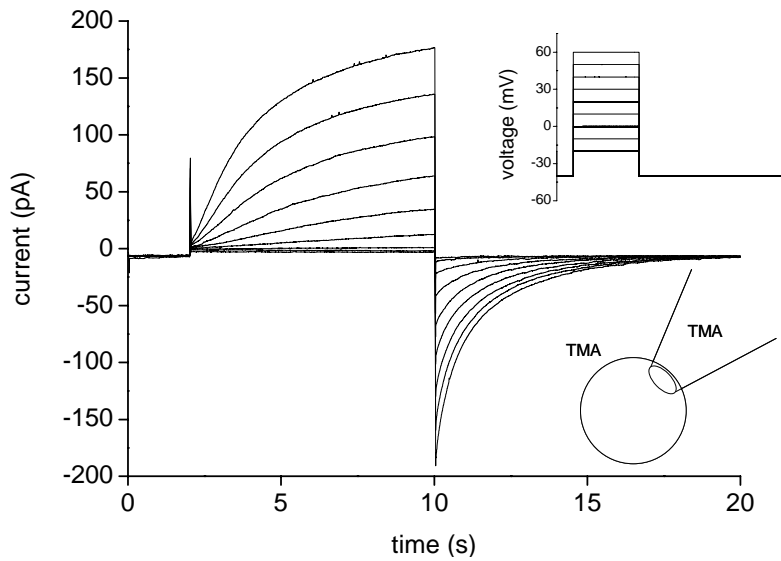


Abbildung.21. Protonenstromfamilie 9 Minuten nach der PMA-Aktivierung

Auswärtsströme sind größer und aktivieren schneller nach PMA. Die „Tailcurrents“ sind langsamer und größer. Um den Unterschied darzustellen ist die Skalierung identisch mit jener in Abbildungen 18

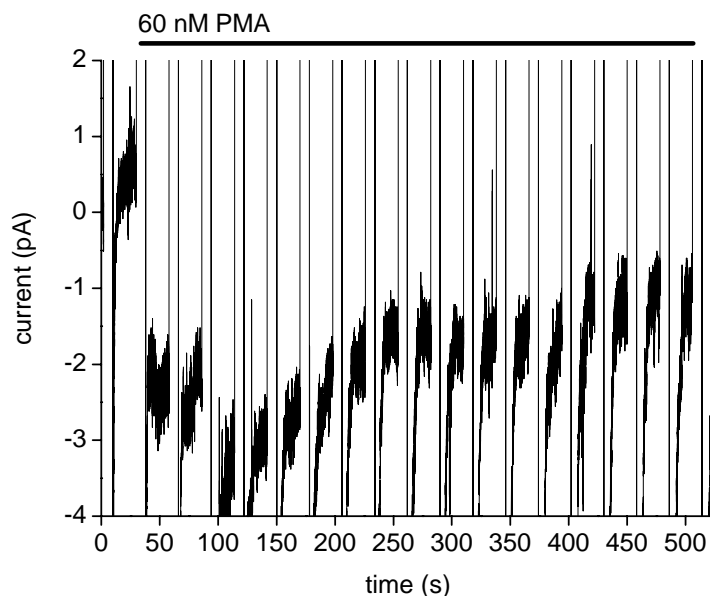


Abbildung. 22. Elektronenstrom aktiviert durch PMA

Die stark gedruckte Linie zeigt die Entwicklung des Elektronenstroms durch die Aktivierung mit PMA. Der Elektronenstrom ist nicht immer konstant, hält sich aber nach einiger Zeit auf gleich bleibendem Niveau.

ca. 92 pA bei einer Spannung von 60 mV. Mit der Applikation von 60 nM PMA ergibt sich eine deutliche Veränderung bei den Protonenströmen (Abb.20). Ca. neun Minuten nach PMA-Applikation zeigt sich eine Veränderung der Spannungsabhängigkeit der spannungsabhängigen Protonenströme.

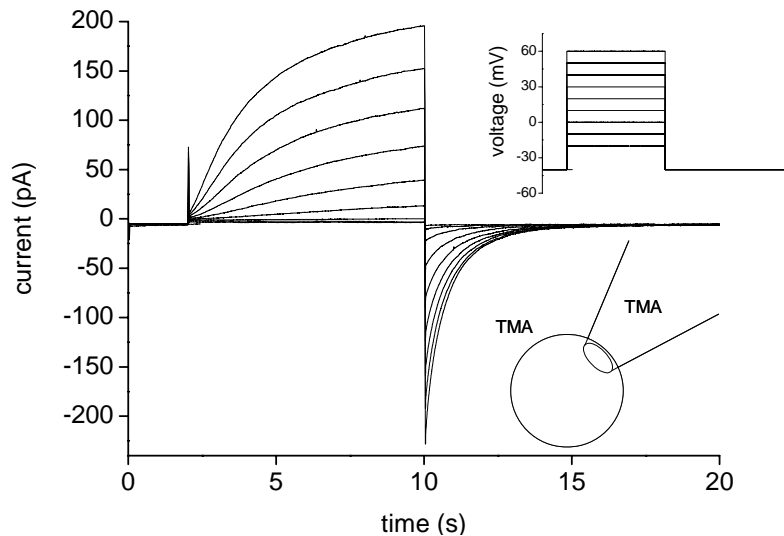


Abbildung. 23. Protonenstrom nach DPI-Inhibierung des Elektronenstroms
Deutlich ist zu sehen, dass der Protonenstrom durch die Inhibierung des Elektronenstroms kaum verändert ist. Der Auswärtsstrom ist größer als der Protonenstrom direkt nach PMA Aktivierung. Die „Tailcurrents“ zeigen sich aber klar verkürzt. Hier hat der Oxidaseinhibitor DPI seinen einzigen Einfluss auf den Protonenstromstrom.

Im Vergleich mit Abbildung 19 zeigt sich in Abbildung 21 bei -10 mV ein Protoneneinwärtsstrom, dessen „Tailcurrent“ nach dem Puls zusätzlich deutlich wird.

Die weiteren Spannungssprünge bis 60 mV zeigen wieder Auswärtsströme. Die Auswärtsströme sind bei gleichen Spannungsamplituden größer als bei Abbildung 19. Bei 60 mV ist die Stromamplitude nach PMA 175 pA. Damit haben sich die Ströme beinahe

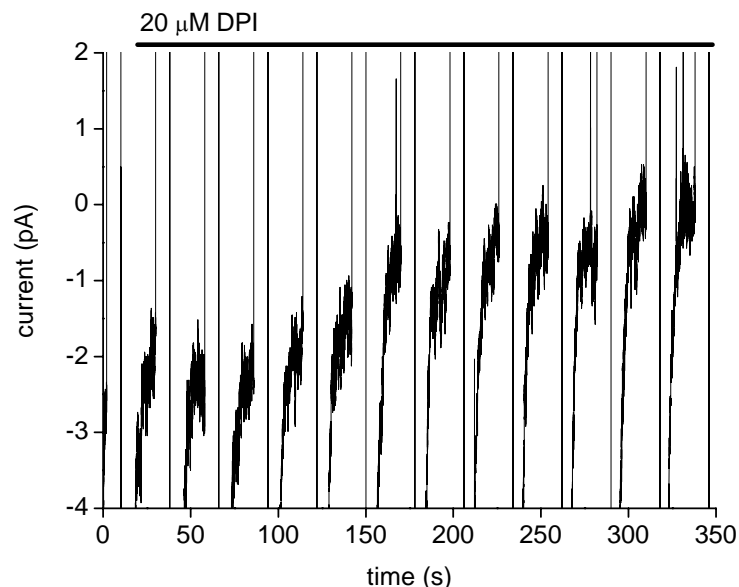


Abbildung. 24. Blockierung des Elektronenstroms durch 20 µM DPI

Die negativ unterbrochene Linie bildet den Elektronenstrom ab. Sie zeigt, dass mit dem Einspülen von DPI der Elektronenstrom langsam verschwindet. Da DPI ein spezifischer Blocker für die NADPHox ist, handelt es sich hier um einen klar von diesem Molekül erzeugten Strom.

verdoppelt. Eine weitere Eigenschaft des Protonenstroms hat sich zusätzlich geändert. Die „Tailcurrents“ wurden durch die Applikation von 60 nM PMA länger. Um diesen Effekt noch deutlicher darzustellen, zeigt Abbildung 20 die Änderung der Ströme bei gleich bleibendem Spannungspuls von -40 mV nach +40 mV, bei 8 Sekunden Pulsdauer, mit einer 20 Sekunden andauernden Pause. Aus den Messpunkten lässt sich mittels eines exponentiellen Fits eine Funktion mit der Zeitkonstante (τ) berechnen. Die errechnete Aktivierungszeitkonstante vor der PMA-Applikation war $\tau = 18,71$ s. Die „Tailcurrents“ vor PMA hatten eine Zeitkonstante von 0,55 s. Nach neun Minuten unter PMA war die Zeitkonstante für die Auswärtsströme $\tau = 1,5$ s und für die „Tailcurrents“ $\tau = 4,6$ s. Daraus ergibt sich eine 2,7-fache Verlangsamung der „Tailcurrents“, während die Auswärtsströme um das 4,06-fache beschleunigt wurden.

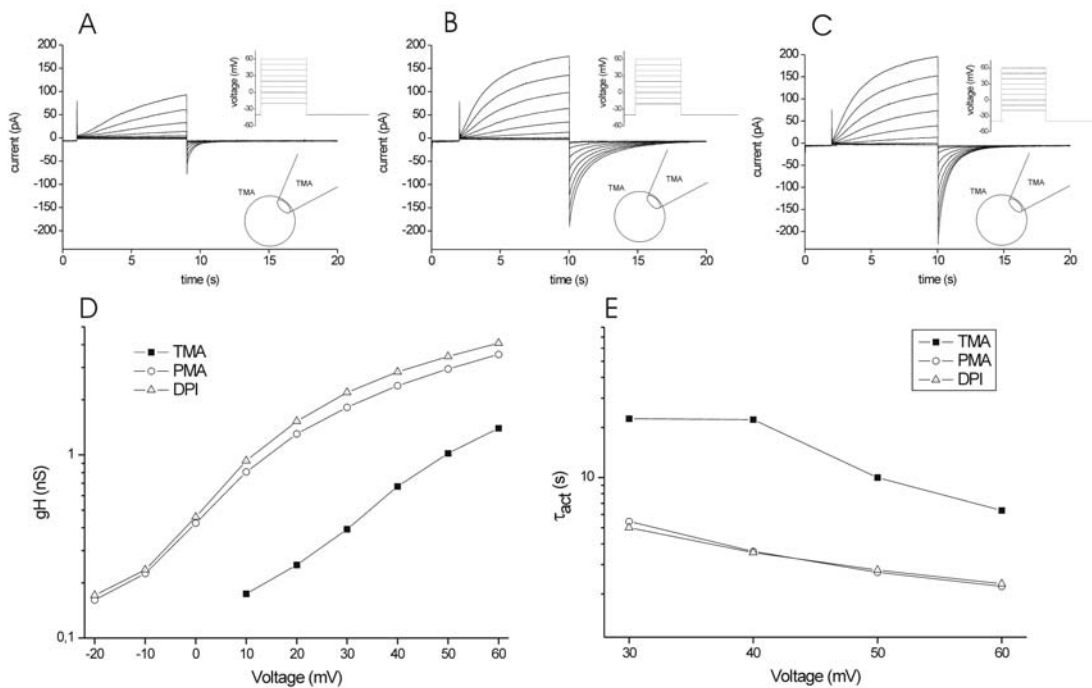


Abbildung.25. Zusammenfassung der Wirkung von PMA und DPI auf den Protonenstrom eines 3 Tage alten Monozyten

Die Abbildung zeigt mit A, B und C die Zusammenfassung der Stromfamilien aus den vorherigen Abbildungen. D zeigt das Spannungs-Leitfähigkeitsverhältnis (voltage-conductance-relationship) von A, B und C (Die Ströme wurden nicht Leck korrigiert). Deutlich ist die Verschiebung des Schwellenpotenzials um ca. 30 mV zu erkennen. E zeigt die Aktivierungszeitkonstanten aus A, B und C. PMA erniedrigt deutlich die Zeitkonstante. DPI hebt diese Beschleunigung nicht auf.

Die Veränderung der Protonenströme durch DPI wird in Abbildung 23 gezeigt. Hier fällt auf, dass sich weder die Amplitude des Protonenstroms noch sein Schwellenpotenzial verändert. Die maximale Amplitude bei 60 mV beträgt 203 pA. Das Schwellenpotenzial bleibt bei -10 mV. Erkennen lässt sich die Veränderung in der

Kinetik der „Tailcurrents“. Die Amplitude der „Tailcurrents“ ist sogar größer als nach der PMA-Applikation, sie ist, durch die Zeitkonstante deutlich erkennbar verkürzt ($\tau = 1,05$ s). Die Zeitkonstante der Auswärtsströme ändert sich unerheblich ($\tau = 1,45$ s). Abbildung 25 fasst die Veränderungen des Protonenstroms mit seinen Kinetiken, ausgelöst durch die Aktivierung des Elektronenstroms, nochmals zusammen.

Um die Verschiebung des Schwellenpotenzials des Protonenkanals besser zu visualisieren, ist in Abbildung 25 D eine Spannungsleitfähigkeitsbeziehung gezeigt. Unter Kontrollbedingungen kann man die erste Leitfähigkeit bei +10 mV genau bestimmen. Von dort aus steigt die Leitfähigkeit mit erhöhter Spannung an. Sie findet ihre maximale Anstiegsgeschwindigkeit zwischen 30 - 40 mV und fällt dann wieder ab. Dieser Effekt ist auf das Öffnen der Kanäle zurückzuführen. Die Anzahl der Kanäle, die sich ab +30 mV bis +40 mV noch auf den Spannungspuls hin öffnen können, ist geringer, je höher die Spannung ab diesen Wert steigt, da die meisten Kanäle sich schon geöffnet haben. Bei der PMA- und der DPI-Kurve ist ein ähnlicher Effekt zu beobachten. Dazu ist auffällig, dass sich bereits ab -20 mV eine Leitfähigkeit bestimmen lässt. Damit ist eindeutig die Verschiebung des Schwellenpotenzials um 30 mV gezeigt. Auch hier ist der Effekt der Öffnungswahrscheinlichkeiten der Kanäle makroskopisch zu erkennen. Einzelne Protonenkanäle wurden in dieser Arbeit nicht gemessen.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasst sich mit den gemessenen Elektronenströmen, erzeugt durch die NADPHox. Der Elektronenstrom entwickelt sich nach der Applikation von PMA. In der Abbildung 22 ist der Elektronenstrom vor der Wirkung des Phorbol-Esters auf Null gesetzt worden. Nach dem Lösungswechsel von TMA auf TMA + PMA zeigt sich ein Sprung auf -2 pA, der bis auf -3 pA weiter ansteigt. Der Elektronenstrom ist ein Ausstrom negativer Ladungen, der per Definition, als ein Einstrom dargestellt wird. Die Abbildung 22 zeigt den Elektronenstrom, der sich auf -1,7 pA einpendelt. Mit der Applikation auf 20 μ M DPI wird allmählich der Elektronenstrom blockiert.

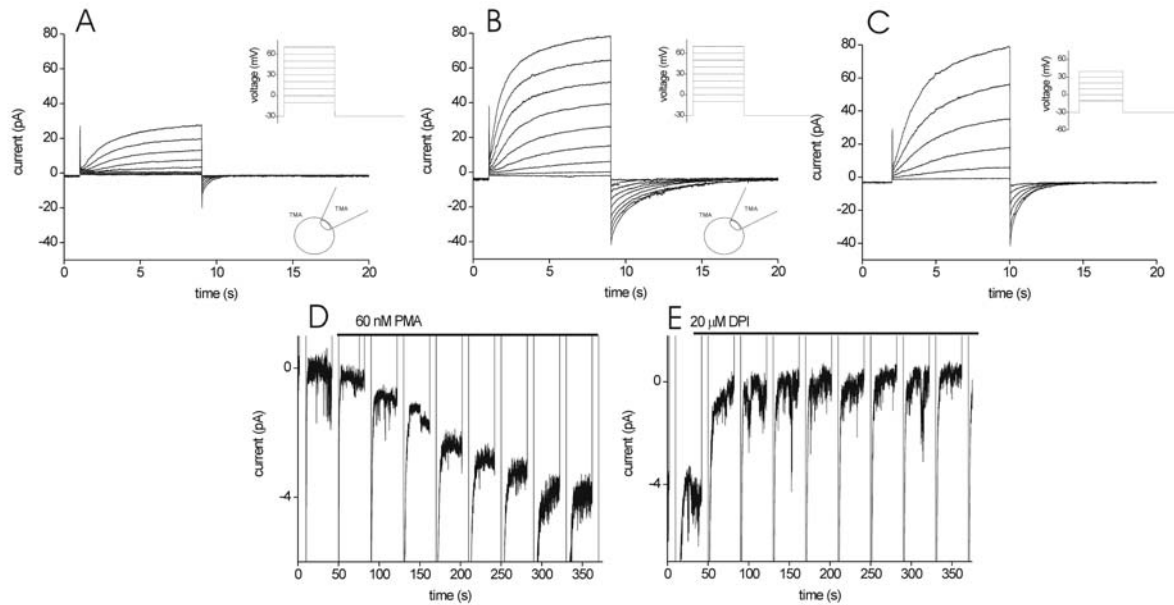


Abbildung.26. A - E Aktivierung und Blockierung eines 1 Tag alten Monozyten

A: Protonenstromfamilie unaktiviert.

B: aktivierte Protonenstromfamilie mit Einwärtsstrom und Verlängerung der „Tailcurrents“ sowie schnellerer Aktivierung.

C: H⁺-Strom nach DPI Block. Deutlich ist die Veränderung an den „Tailcurrents“ zu erkennen.

D: Elektronenstrom durch PMA aktiviert.

E: DPI blockt den Elektronenstrom.

Dies ist ein direkter Beweis dafür, dass es sich bei dem durch PMA induzierbaren Strom um einen Elektronenstrom handelt, da DPI ein spezifischer Blocker für Enzyme, die FAD (Flavinadenindinucleotid) enthalten, wie die NADPHox, ist. DPI selbst inhibiert keine anderen Ströme und ist damit ein potentieller, spezifischer Blocker des Elektronenstroms. DPI wirkt sich interessanterweise auch auf den Protonenstrom aus. Der Protonenstrom beschleunigt seine verlängerten „Tailcurrents“. Die Auswärtsströme zeigen weder eine Reduktion in ihrer Amplitude noch eine klare Änderung der Aktivierungs-Zeitkonstante.

Diese Eigenschaften des Protonenstroms konnten bei ein und zwei Tage alten Monozyten gemessen werden. Abbildung 26 zeigt ein Beispiel für einen 1 Tag alten Monozyten.

Abbildung 27 zeigt ein Beispiel eines zwei Tage alten Monozyten. Abbildung 28 zeigt die Unterschiede zwischen den einzelnen Zellaltern in Kultur sowie deren Unterschiede bei den Eigenschaften der Protonen- und Elektronenströme.

In dieser Arbeit wurden humane Monozyten aus ein, zwei und drei Tage alten, primären Kulturen untersucht. Dabei zeigte sich, dass PMA eine deutliche Zunahme der Leitfähigkeit pro Membraneinheit, ausgedrückt in Kapazität (pF), auslöst. Bei eintägigen Monozyten war der Anstieg von $88,8 \pm 42,7$ pS / pF (n = 7) auf $185,8 \pm 48$

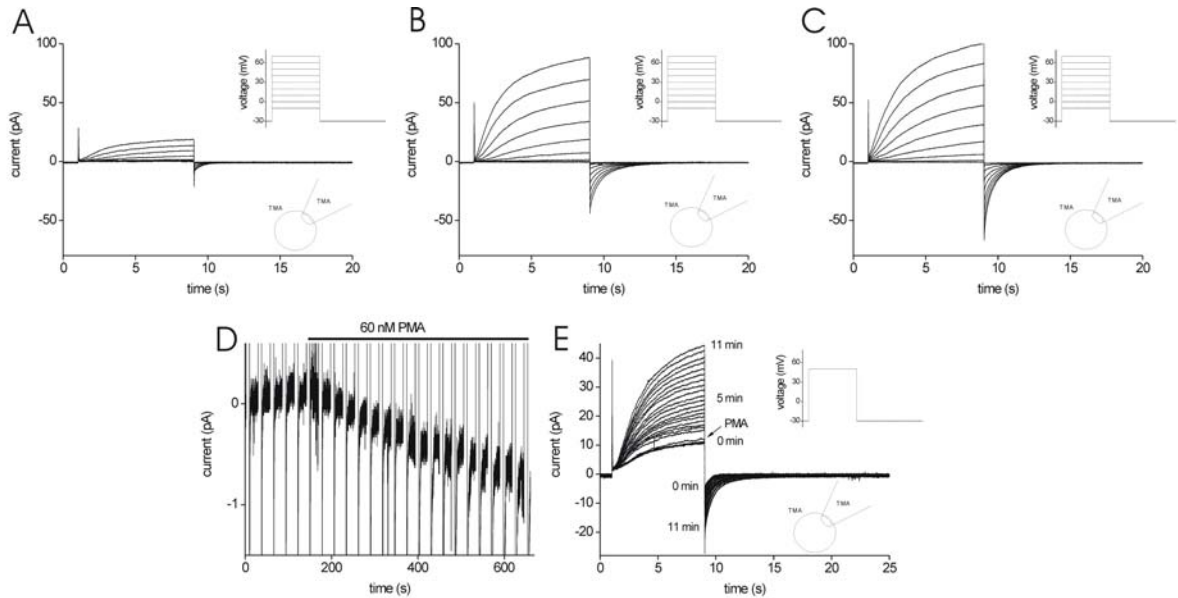


Abbildung. 27. A – E. Aktivierung und Blockierung bei einem zwei Tage alten Monozyten

A zeigt die nicht aktivierte Protonenstromfamilie.

B zeigt die aktivierte Protonenstromfamilie mit Einwärtsstrom und Verlängerung der „Tailcurrents“ bei schnellerer Aktivierung.

C zeigt den Protonenstrom sofort nach DPI-Block. Eine beginnende Veränderung an den „Tailcurrents“ ist zu erkennen.

D zeigt den durch PMA aktivierten Elektronenstrom.

E zeigt den durch PMA aktivierten Protonenstrom.

pS / pF ($n = 6$) zu messen. Bei zwei Tage alten Monozyten veränderte sich die Leitfähigkeit von $59,6 \pm 11,9$ pS / pF ($n = 9$) auf $105,3 \pm 15,5$ pS / pF ($n = 8$). Bei drei Tage alten Monozyten bewegten sich die Veränderungen von $60 \pm 13,2$ pS / pF ($n = 8$) zu $141,7 \pm 28$ pS / pF ($n = 8$). Aus den Daten der einen Tag alten Monozyten lässt sich eine leichte, nicht signifikante Abnahme bei der Leitfähigkeit pro Kapazität erkennen, die bei zwei und drei Tage alten Monozytenkulturen konstant zu bleiben scheint. Die durch PMA ausgelöste Differenz der Leitfähigkeit vor und nach PMA-Aktivierung bewegt sich im Mittel zwischen den drei Kulturen (ein, zwei und drei Tage alt) um das $2,08 \pm 0,19$ fache ($n=22$) der Anfangsleitfähigkeit. Diese Werte hängen stark vom Zeitfenster des Versuchs ab. Die Amplitude der Protonenströme nimmt nach PMA-Stimulation auch noch nach einer Stunde weiter zu.

Auch die Elektronenströme korrelieren mit dem Alter der Monozyten. Je älter die Monozyte, desto stärker ist der von ihr produzierte Elektronenstrom. Um möglichst genaue Werte über den Elektronenstrom zu erhalten, wurde der durch PMA aktivierte Elektronenstrom mit dem durch DPI geblockten Elektronenstrom verglichen. Da DPI ein selektiver Blocker für die NADPHox ist, ist anzunehmen, dass der durch DPI geblockte Strom ein „reiner“ Elektronenstrom ist. Allerdings sieht man in Abbildung

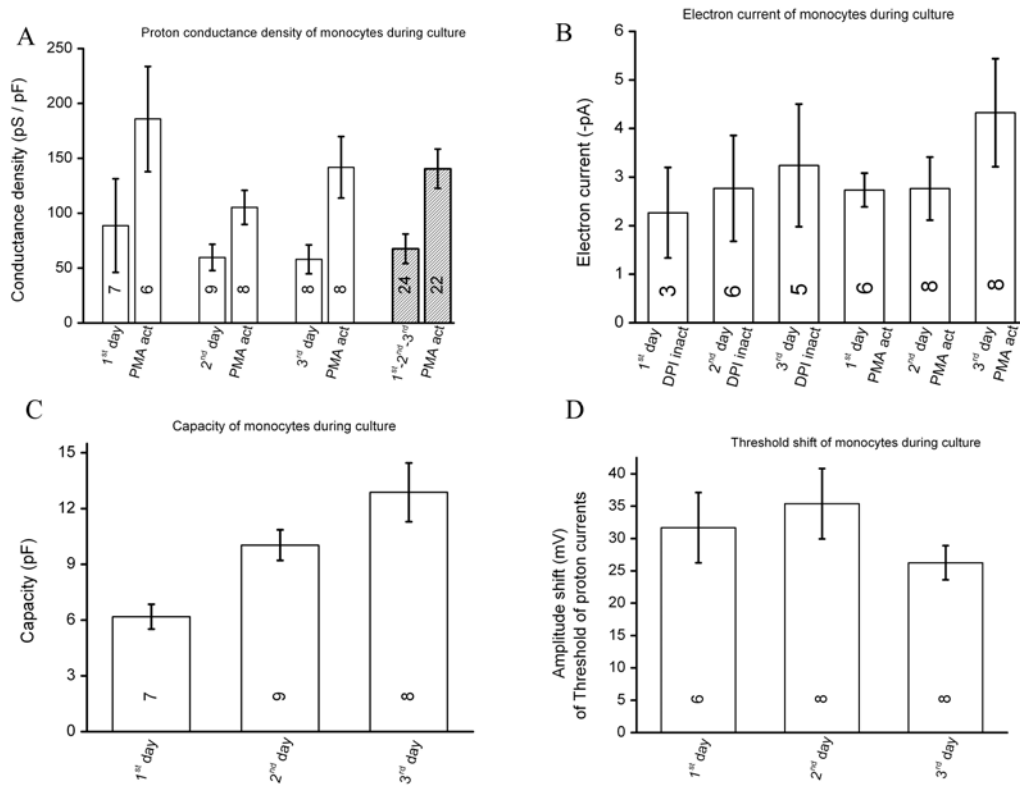


Abbildung 28. A – D. Auswertung der Grundcharakteristika des Protonenstroms in Relation zum Alter der Monozyten in Kultur

A zeigt die Leitfähigkeit des Protonenstroms pro Kapazität der Zelle. Die Leitfähigkeit des Protonenstroms wurde bei Umkehrpotenzial und bei +60 mV vor Aktivierung mit PMA und genau sechs Minuten nach Aktivierung mit PMA ermittelt

B zeigt den Vergleich der gemittelten Werte des Elektronenstroms, abhängig vom unterschiedlichen Alter der Kulturen, gemessen nach Aktivierung mit PMA und nach Blockierung durch DPI

C zeigt die an den Kulturen gemessenen und dann gemittelten Kapazitäten, die mit zunehmendem Alter der Kultur ansteigen.

D zeigt die Verschiebung der Spannungsschwelle. Die Veränderung des „Thresholds“ nimmt mit zunehmendem Alter bei Monozyten in Kultur ab.

22, dass sich im Verlauf der PMA-Applikation erst ein stärkerer Einstrom ergibt, der dann nach etwa 8,5 Minuten keinen andauernd konstanten Wert mehr zeigt. Für die PMA- Applikation ist jeweils der Höchstwert (Peak) des Elektronenstroms verwendet worden. Sowohl bei der DPI-Inaktivierung als auch bei der PMA-Aktivierung ist eine Steigerung des Elektronenstroms, abhängig vom Alter der Monozyten, zu erkennen. Die DPI-Inaktivierung zeigt die in Abbildung 28 dargestellten Werte (einen Tag alte Monozyten = $-2,27 \pm 0,9$ pA; zwei Tage alte Monozyten = $-2,77 \pm 1,1$ pA und 3 Tage alte Monozyten = $-3,24 \pm 1,3$ pA). Bei der PMA-Aktivierung zeigen sich folgende Werte: einen Tage alte Monozyten: $-2,7 \pm 0,3$ pA, zwei Tage alte Monozyten: $-2,8 \pm 0,6$ pA und bei drei Tage alten Monozyten: $-4,3 \pm 1,1$ pA. Die einzelne Monozyte produziert bei längerer Verweildauer in der Kultur mehr Sauerstoffradikale. Zum Vergleich wurden die Elektronenströme auf die Kapazität normiert. Hier ergeben sich für die Monozyten neue Werte. Bei einem einen Tag alten Monozyten unter DPI-

Inaktivierung ergibt sich ein Elektronenstrom von $-0,35 \text{ pA/pF}$. Für einen zwei Tage alten Monozyten $-0,28 \text{ pA/pF}$ und für einen drei Tage alten Monozyt $-0,25 \text{ pA/pF}$. Damit zeigt sich ein Absinken der Elektronenstromdichte pro Zellalter. Vergleicht man die Daten mit den PMA-Aktivierungsdaten von eintägigen, zweitägigen und dreitägigen Monozyten ($-0,44 \text{ pA/pF}$ zu $-0,28 \text{ pA/pF}$ zu $0,34 \text{ pA/pF}$), dann ergibt sich auch hier eine abfallende Tendenz. Die Kapazität der Monozyten wurde vor jedem Versuch mittels schneller Spannungsrampen aufgezeichnet. Die Kapazität ist ein Beweis, dass es sich bei den Zellen um lebende, humane Monozyten, die in Kultur weiter wachsen, also leben, handelt. Die ansteigende Kapazität deutet auf eine Vergrößerung der Membran hin.

Als weiterer Aspekt der Protonenströme sind in dieser Arbeit die Veränderungen der Aktivierungskinetiken der Protonenströme ausgewertet worden. Dabei konnte bei den Monozyten kein Unterschied in den Aktivierungskinetiken, abhängig von der Verweildauer in Kultur, ermittelt werden. Abbildung 29 zeigt die durch PMA hervorgerufenen

Veränderungen in der Zeitkonstante. Es lässt sich deutlich die Beschleunigung der Aktivierung durch den Phorbol-Ester erkennen. Bei den 22 Zellen ist der Grad der Beschleunigung der Aktivierungskinetiken abhängig von der Spannung. Bei 40 mV lässt sich grob eine

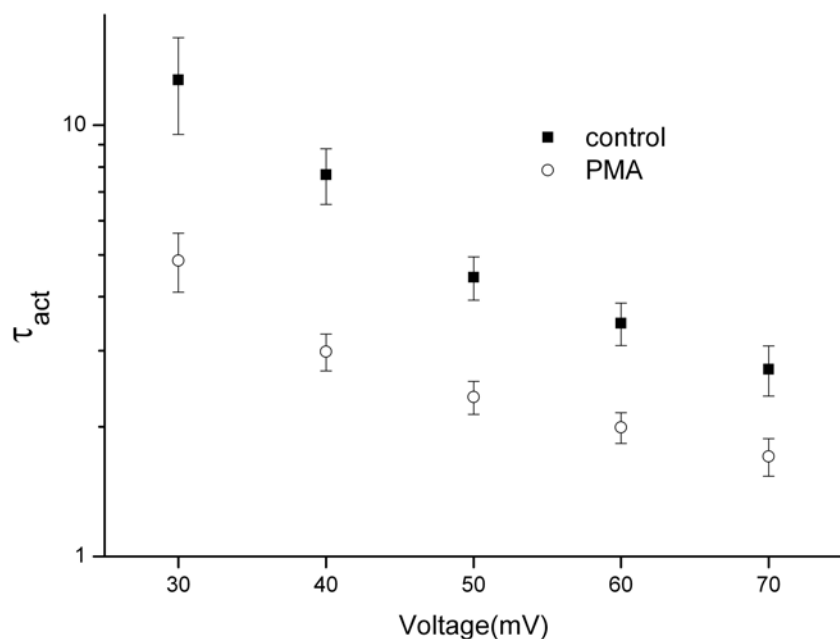


Abbildung.29. Aktivierungskinetiken des Protonenstroms unter Kontrollbedingungen und nach der PMA-Aktivierung

Die einzelnen Zeitkonstanten sind von 5-22 Zellen ausgewertet worden. Deutlich erkennbar ist die Erniedrigung der Zeitkonstante nach der Applikation von PMA.

Verdreifachung bis Vervierfachung auswerten. Bei 70 mV ist diese Beschleunigung nur noch eine Verdoppelung. Die höchste Beschleunigung, die theoretisch von den Protonenkanälen erreicht werden kann, ist unabhängig von der Konzentration des

verwendeten Puffers. Unter experimentellen Gegebenheiten mit TMA-Puffer wird auch bei niedrigen Konzentrationen der Selbe Aktivierungswert (-20 %) erreicht. Dies zeigt, dass der Kanal selbst die Aktivierungskonstante widerspiegelt, nicht etwa die durch die Deprotonierungskonstante beeinflusste Aktivierungskonstante des Puffers.

Diese Arbeit wertet hauptsächlich vier Parameter aus. Diese vier Parameter werden als

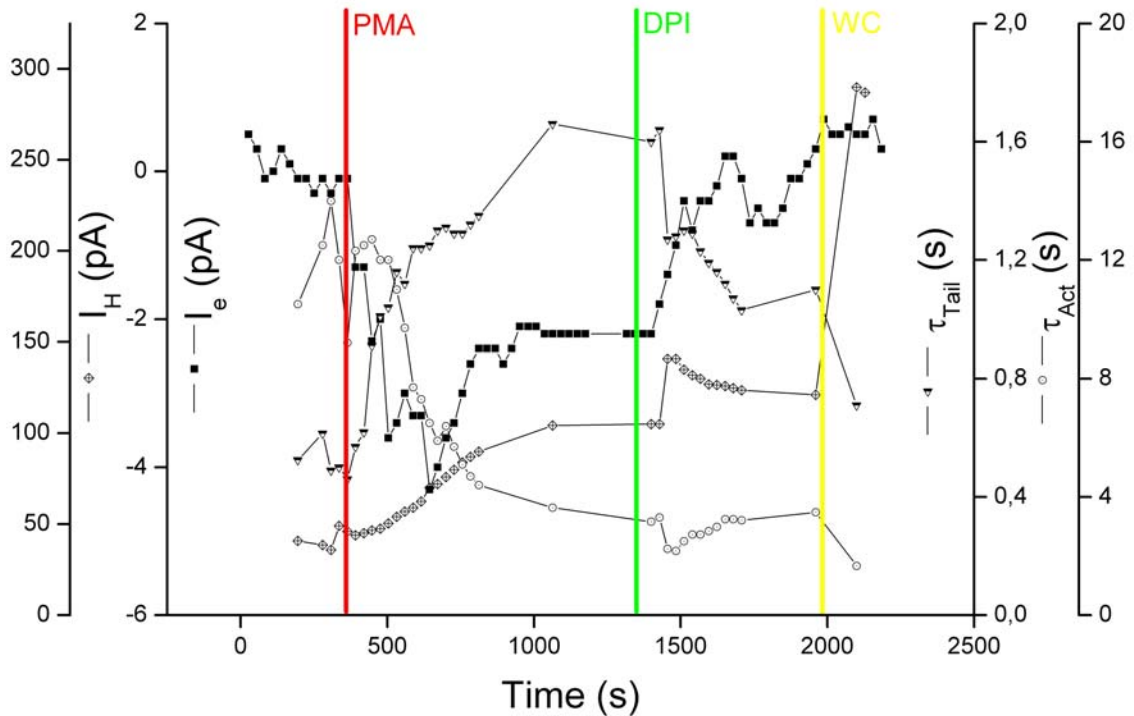


Abbildung 30. Synoptische Darstellung der vier wichtigsten Parameter der Monozytenaktivierung (Aktivierungskonstante, „Tailcurrents“-Zeitkonstante, Protonen- und Elektronenstrom-Amplitude)

Die Abzisse zeigt die Zeit in Sekunden. Die gesamte Messung der Monozyte dauerte ca. 35 Minuten. Die vier abgebildeten Ordinaten sind den jeweiligen, zu messenden Parametern zuzuordnen und sind deshalb unterschiedlich skaliert.

- Der rote, durchgehende, vertikale Strich markiert den Zeitpunkt der PMA-Applikation (PMA). Deutlich ist die Aktivierung der Amplitude des Protonenstroms (+40 mV) [Rauten] durch PMA zu sehen. Ebenso entsteht der Elektronenstrom (-40 mV) [gefüllte Quadrate] der sich einpendelt, die Aktivierungskonstante (+40 mV) [Kreise] wird schneller die „Tailcurrents“ (-40 mV) [halbgefüllte Dreiecke] werden langsamer.
- Das grüne Lot markiert die Applikation von DPI. DPI inhibiert den Elektronenstrom, beschleunigt die Kinetik der „Tailcurrents“, hat aber weder Einfluss auf die Aktivierungskonstante noch auf die Amplitude des Protonenstroms.
- Bei WC bricht die „perforated-patch“ Messung ein und verändert sich zur „Whole-cell“-Konfiguration. Sie ist als Verbesserung des Zugriffs zur Zelle zu erkennen. Die Beschleunigung der Aktivierungskonstante und die Erhöhung der Protonenstromamplitude zeigen dies an.

Standard benutzt, um die Veränderungen durch die Aktivierung der Monozyten zu zeigen. Um die wichtigsten Parameter der elektrophysiologischen Untersuchungen an Monozyten zum gleichen Zeitpunkt darzustellen, zeigt Abbildung 30 eine synoptische Darstellung dieser vier Parameter: Aktivierungskonstante bei +40 mV, Zeitkonstante des

„Tailcurrents“ bei -40 mV, Amplitude des Protonenstroms bei +40 mV und Amplitude des Elektronenstroms bei -40 mV.

Die Aktivierungskonstante für die Auswärtströme ist vor der Stimulation mit PMA relativ langsam. Erst durch die Stimulation zeigt sich eine langsame Verkürzung der Aktivierungskonstante, die mit dem Größerwerden des Protonenstroms zusammenfällt. Es ist zu erkennen, wie die Aktivierungskonstante von einem Wert um 12 Sekunden ($\tau = 12$ s) auf einen Wert von ungefähr 3,8 Sekunden ($\tau = 3,8$ s) fällt. In dem Moment, in dem die Aktivierungskonstante sich verkürzt, verlängert sich die Zeitkonstante der „Tailcurrents“. Nach PMA-Stimulation verändert sich der Wert der „Tailcurrents“ von 0,5 Sekunden ($\tau = 0,5$ s) auf 1,6 Sekunden ($\tau = 1,6$ s), deutlich als halbgefüllte Dreiecke in Abbildung 27 zu erkennen. Der Protonenstrom verändert seine Amplitude bei den Spannungspulsen zu +40 mV von 40 pA auf 90 pA, was mehr als einer Verdoppelung entspricht. Der Elektronenstrom entsteht aus der Stimulation mit PMA, wird erst stark negativ, dann etwas schwächer negativ und erreicht bei -2 pA sein Plateau. Die PMA-Stimulation erhöht alle gemessenen Werte mit Ausnahme der Zeitkonstante der Aktivierungszeit, die sich verkürzt. Ein Zusammenhang zwischen Protonenstrom und Elektronenstrom wird durch die gemeinsamen Veränderungen nahe gelegt.

Beginnend mit der Aktivierungskonstante der Protonenströme bei +40 mV zeigt die Inhibierung mit DPI nun erstaunliche Ergebnisse. Abbildung 30 zeigt, dass DPI keine Auswirkung auf die Aktivierungskonstante der Protonenströme hat. Die Protonenströme werden eher geringfügig beschleunigt. Auch die Protonenauswärtsströme zeigen keine Auswirkung durch DPI. Sie werden eher noch größer nach der Applikation von DPI.

Die Effekte von DPI auf die „Tailcurrents“ sind dagegen aber mehr als deutlich. Mit der Applikation von DPI werden diese Ströme, die vorher durch PMA langsamer geworden sind, wieder schneller. Die „Tailcurrents“ beschleunigen etwa bis zum Doppelten ihrer ehemaligen Zeitkonstante (von $\tau = 0,5$ s auf $\tau = 1,6$ s zu $\tau = 1$ s). Der Elektronenstrom verschwindet vollständig, da DPI ein Blocker des Elektronentransfers ist.

Hiermit sind die wichtigsten Punkte der Aktivierung durch PMA und der Deaktivierung durch DPI zusammengefasst. Es zeigt sich in dieser Messung aber noch zusätzlich etwas besonderes: der Unterschied zwischen „Wholecell“- und „perforated-patch“-Messung. Bei dieser Messung bricht der Seal durch zur „Wholecell“-Konfiguration. Mit diesem Vorgang wird der Serienwiderstand in der Messung etwas reduziert, so dass ein geringerer Zugriffswiderstand die Messung anders aussehen lässt. Diesen Zustand erkennt man am Größerwerden der Protonenströme, am Schnellerwerden der

Aktivierungskonstante. Aber durch diesen Vorgang gelangt nun auch Amphotericin in die Zelle und perforiert die Zellmembran. Dadurch werden Poren in der Zellmembran gebildet (Amphotericin) und es entsteht ein hoher Leckstrom. Insgesamt zerstört das die Messung, sodass nach der „Whole-cell“ mit Amphotericin, die Messung beendet werden muss.

Messungen mit Spannungsrampen

Bisher wurden im Wesentlichen Pulsprotokolle erhoben und ausgewertet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist, den Nachweis von Protonenströmen auf der Grundlage anderer Messprotokolle zu erbringen. Aus diesem Grund wurden langsame Spannungsrampen als Spannungsprotokolle erhoben. Langsame Spannungsrampen

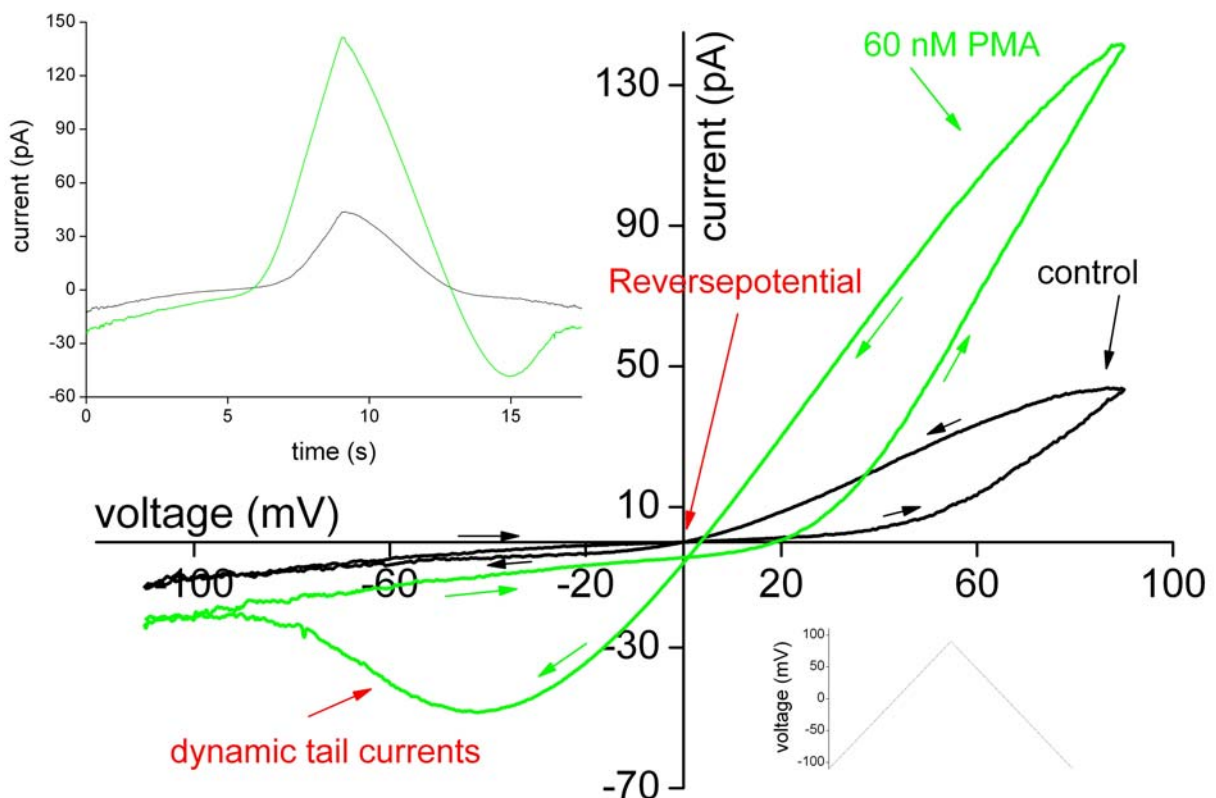


Abbildung.31. Vergleich der mittels Spannungsrampen gemessenen Protonen- und Elektronenströme vor (in Schwarz) und nach (in Grün) PMA-Aktivierung. Die gesamte Rampe, also Aufwärts- und Abwärtsrampe ist abgebildet

Die Abbildung zeigt in Schwarz den Verlauf der Strom-Spannungskurve eines nicht aktivierten Monozyten. Die Pfeile zeigen die Aufwärtsrampe wie auch die Abwärtsrampe an. Deutlich ist die langsamere Deaktivierung und die schnellere Aktivierung des Protonenstroms zu erkennen. In Grün ist die Stromspannungskurve sechs Minuten nach PMA-Aktivierung dargestellt. Die grüne Kurve zeigt langsamere und damit verlängerte „Tailcurrents“ sowie die Erhöhung der Amplitude des Protonenstroms. Deutlich ist der Elektronenstrom als Verschiebung der gesamten grünen Kurve in negative Strombereiche zu sehen. Das links oben eingefügte Diagramm zeigt die Entwicklung der Stromamplitude auf der Zeitachse. Das rechts unten eingebrachte Diagramm zeigt die verwendete Spannungsrampe zwischen -100 mV und +100 mV als Spannungsprotokoll.

dienen hauptsächlich der Untersuchung von spannungsunabhängigen Strömen. Die langsame Rampe aktiviert keine spannungsabhängigen Ströme, da spannungsabhängig Ströme, die auch zeitabhängig deaktivieren, durch den langsamen Spannungsanstieg

sofort deaktiviert werden. Die Spannungsrampen haben eine Geschwindigkeit von 22 mV / s. Bei der „perforated-patch“ -Messung werden mit der TMA-Lösung sowohl in der Zelle als auch im Medium nur Protonen und Elektronen als bewegliche Teilchen zugelassen, so dass nur deren Ströme gemessen werden. Zuerst wurden die Spannungsrampen-Messungen mit den Puls-Messungen verglichen.

Abbildung 31 zeigt eine Monozyte, die mit repetitiven Spannungsrampen gemessen worden ist. Es ist klar zu erkennen, dass der spannungsabhängige Protonenstrom sich auch in der langsamen Spannungsrampe darstellen lässt. Der Protonenstrom ist sogar so „langsam“, dass er mit seiner Aktivierung beim Abfallen der Spannung seine absolute Maximalamplitude erreicht. In Abbildung 31 ist die Richtung des Stromflusses in der Aufwärts- und in der Abwärtsrampe mit Pfeilen angezeigt. Es ist gut zu erkennen, dass der Protonenstrom erst nach +20 mV aktiviert, wie dies auch beim Spannungspuls zu sehen ist. In der Abwärtsbewegung der Rampe kann man deutlich das sehr langsame Schließverhalten der Protonenströme erkennen, das sich als „dynamic Tailcurrents“ abbildet. Der Strom der Abwärtsrampe bleibt in seiner Amplitude höher als der der Aufwärtsrampe und schneidet die Stromlinie der Aufwärtsrampe im Umkehrpotenzial (lösungsbedingt liegt es bei 0 mV) für Protonen. Auch mit dem Spannungsrampe-Protokoll lässt sich die Wirkung von 60 nM PMA auf die Protonenströme erkennen. Als Erstes ist eine Erhöhung der Maximalamplitude gemessen worden. Genau wie bei den Pulsen ist auch die Verlängerung der „Tailcurrents“ zu erkennen. Hier sind diese „Tailcurrents“ als großer Einwärtsstrom zu erkennen. Das Umkehrpotenzial für Protonen ist durch die Aktivierung der NADPHox nicht bei 0 mV / 0 pA sondern liegt etwas negativer bei 0 mV / -2,5 pA. Diese Verschiebung von -2,5 pA ist die beinahe horizontale Verschiebung des Elektronenstrom der NADPHox. Zusätzlich lassen sich gut die Veränderungen der Spannungsschwelle des Protonenstroms darstellen. Die Verschiebung der Spannungsschwelle lässt sich auf ungefähr -30 mV abschätzen. Die gesamte Elektronenstrom-Kurve verschiebt sich punktgenau in den negativen Strombereich, verursacht durch die Aktivität der NADPHox. Der Verschiebungsstrom verfügt über ein Umkehrpotenzial, das um die 200 mV beträgt (entspricht dem Redoxpotenzial der Flavingruppen bei Gleichgewicht zwischen O_2 und O_2^-) (20). Es ist also möglich, in der Aufwärtsrampe Ströme von -120 bis -60 mV zu verlängern und so zu versuchen, den Schnittpunkt des Elektronenstroms zu zeigen. Der Bereich zwischen -120 mV und -60 mV ist aus dem Grund gewählt worden, da dort keine Protonenströme messbar sind. In diesem Bereich ist also größtenteils Elektronenstrom und Leckstrom

abgebildet. Der Leckstrom sollte sich zwischen der unstimulierten und der aktivierten Messung nicht verändert haben. Der Schnittpunkt liegt deutlich höher als 200 mV und ist nicht genau zu bestimmen, da die graphische Methode durch die Wertung der Ströme fehlerbehaftet sein kann. Dass es sich um einen Elektronenstrom handeln muss, ergibt sich aus dem höheren Umkehrpotenzial und da in den Lösungen keine Ionen vorliegen, deren Umkehrpotenzial höher als +200 mV ist. Zudem rektifiziert der Elektronenstrom deutlich ab höheren, positiven Potenzialen. Der Elektronenstrom hat keine lineare Steigung, sondern einen spannungsunabhängigen Anteil unterhalb von 60 mV. Ab 60 mV wird die Spannungsabhängigkeit des Elektronenstroms messbar und zeigt seine

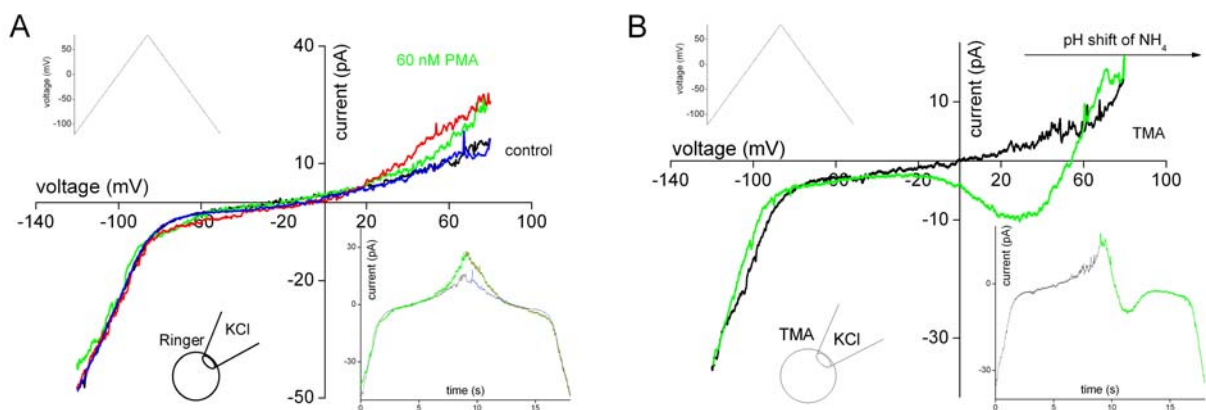


Abbildung.32. Veränderung des Protonenstroms in der Spannungsrampe unter physiologischen Bedingungen in der „perforated patch“-Konfiguration

A zeigt die Stromänderungen in der repetitiven Spannungsrampe bei einem humanen Monozyten. PMA verursacht einen Anstieg des Auswärtsstroms, der die typischen Charakteristika eines Protonenstroms in der Spannungsrampe abbildet.

B zeigt den Stromverlauf nach dem Wechsel der extrazellulären Lösung Ringer, die durch TMA ersetzt wird. Die Ansäuerung (NH_4^+) der extrazellulären Badlösung verursacht eine Verschiebung des Umkehrpotenzials (Kreuzung der grünen mit der schwarzen Linie). Damit wird auch bestätigt, dass es sich bei dem gemessenen Strom um einen Protonenstrom handelt. Zudem ist der deutliche „dynamic tailcurrent“ zu erkennen, der so auch in Abbildung 24 zu sehen war.

Inhibition mit höheren Depolarisationen. Der Verlauf des Elektronenstroms im Stromspannungsdiagramm ist sigmoidal.

Mit Hilfe der Spannungsrampen wurde daraufhin ermittelt, ob sich die Protonenströme in physiologischer Lösung darstellen lassen. Zu diesem Zweck wurde Pipetten-Lösung B1 verwendet. Sie entspricht im hohen Maße der ionalen Zusammensetzung des Zytoplasmas. Mit Ringer als Badlösung wurden die Ströme mit kontinuierlichen Spannungsrampen gemessen. Abbildung 32 zeigt eine solche Messung. Im Gegensatz zu den Messungen mit TMA-Lösung ist der pH-Wert bei diesen Messungen nur durch den internen Puffer gepuffert oder durch Amonium kontrolliert. Deshalb kann es leicht zu Veränderungen des Umkehrpotenzials für Protonen kommen. Abbildung 32 A zeigt

die Ströme einer Rampe ohne Stimulation durch einen Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Deutlich sind die starken Einwärtsströme negativ des Umkehrpotenzials für Kalium (E_K) zu erkennen. Sie lassen sich eindeutig dem Einwärtsgleichrichter Kir 2.x zuordnen (21). Die Auswärtsströme sind kaum zu erkennen. Nur eine Leckleitfähigkeit zeigt sich als linearer Strom bis in die höheren Potentiale der Spannungsklemme. Durch die Applikation von PMA verändert sich der Auswärtsstrom. Er zeigt eine höhere Leitfähigkeit, die sich nur schwach beim Einwärtsstrom aufnehmen lässt. Ein anderer Verlauf der Ströme in Aufwärts- und Abwärtsrampe ist ebenfalls zu sehen. Nach dem Überspülen mit PMA zeigt sich in der Aufwärtsrampe ein kleinerer Strom als in der Abwärtsrampe. Dieses Phänomen konnte bereits in den Spannungsrampen bei den Experimenten mit TMA beobachtet werden. Abbildung 32 A zeigt, dass der Strom der Abwärtsrampe (in Rot dargestellt) oberhalb desjenigen der Aufwärtsrampe (in Grün dargestellt) liegt. Dieses Phänomen ist nur durch die ständige Aktivierung von Protonenströmen durch Depolarisation zu erklären. Verglichen mit anderen spannungsaktivierten Strömen (z.B. delayed rectifiers) aktivieren sich Protonenströme

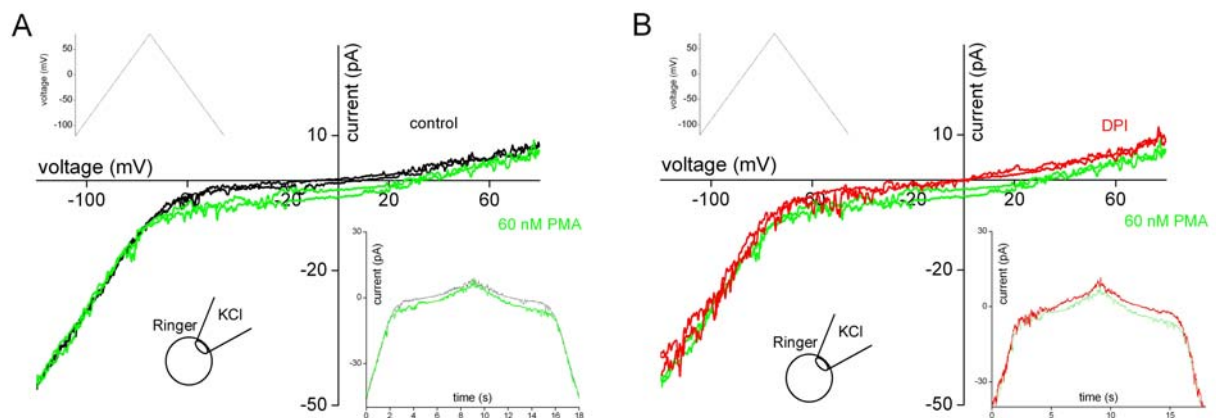


Abbildung.33. Aktivierter Elektronenstrom unter physiologischen Bedingungen in “perforated patch“-Konfiguration

A zeigt die Verschiebung des gesamten Stroms in den negativen Strombereich durch PMA- Aktivierung. Es ist kein aktivierter Protonenstrom zu sehen.

B zeigt die durch DPI wieder auf Kontrolle zurückgeführte Verschiebung dieses Stroms. Der Unterschied zwischen den Strömen kann durch jeweils eine extrapolierte Gerade auf einen Schnittpunkt gegen 200 mV geführt werden. Dieses Umkehrpotenzial entspricht dem für Elektronen.

bei gleich bleibender Spannung weiter und zeigen in der Abwärtsrampe noch einen höheren Strom als in der Aufwärtsrampe. Bei allen anderen, beschriebenen, spannungsabhängigen Strömen erreichen diese ihre maximale Stromamplitude direkt nach dem Spannungspuls und haben im weiteren Verlauf eine niedrigere Amplitude. Als Beweis, dass dieser Verlauf auf die spannungsabhängigen Protonenströme hindeutet, kann die Änderung des Umkehrpotenzials für Protonen (E_H) gewertet

werden, das sich beim Wechsel der Badlösung Ringer auf TMA-Lösung zeigt. Beim Lösungswechsel verändert sich der gemessene Strom in der Spannungsrampe. Die als Phänomen beschriebene Hysterese im Verlauf der Spannungsrampe ist auch hier dargestellt. Da aber die Pipettenlösung in diesen Versuchen kein Ammoniumion enthält, verändert sich der pH-Wert über die Membran zu den saureren Bereichen in der Badlösung. Allgemein kann man hier von einer Ansäuerung des Mediums sprechen. Dadurch verschiebt sich E_H in Richtung der positiven Potentiale in der Spannungsrampe. Auch hier zeigt sich die Hysterese in der Abwärtsrampe. Anzumerken bleibt, dass das Einwaschen der TMA-Lösung die Abnahme der Kaliumkonzentration bewirkt und dass der Strom durch die Einwärtsgleichrichter ($K_{ir2.x}$) die Verschiebung des Stromknicks in der Abwärtsrampe – bei etwa -90 mV liegend – nach links – zu etwa -100 mV liegend - verursacht.

Bei dem in Abbildung 33 dokumentierten Versuch ergibt sich durch PMA-Stimulation eine Verschiebung der Strom-Spannungskurve nach unten, also auf der Stromstärkeskala in den negativen Bereich. Diese Verschiebung ist wahrscheinlich durch die Aktivierung des Elektronenstroms zustande gekommen. Diese Folgerung ergibt sich daraus, dass sich die Ströme nach der Aktivierung durch den Phorbol-Ester nicht mit den Strömen der unstimulierten Zelle kreuzen. Als Beweis für den Elektronenstrom lässt sich die Messung nach DPI-Inhibition heranziehen, wonach der Strom wieder Kontrollniveau erreicht. Interessanterweise ist hier kein Protonenstrom zu erkennen.

Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen

Um die Wirkung von Hv1-Blockern auf die Produktion von Sauerstoffradikalen bei humanen Monozyten zu überprüfen, wurde die Produktion von Hydrogenperoxid über die Zeit in Monozyten gemessen. Monozyten verfügen, im Gegensatz zu Neutrophilen und Eosinophilen, über spannungsabhängige und kalziumabhängige Kaliumkanäle. Das bedeutet, sie haben ein breiteres Spektrum an verschiedenen Ionenkanälen als Neutrophile und Eosinophile. Neutrophile und Eosinophile zeigen - mit Ausnahme des spannungsabhängigen Protonenkanals - unter den Messbedingungen im Labor DeCoursey, keine Auswärtströme (persönliche Mitteilung Vladimir Cherny & Tom DeCoursey), die unter physiologischen Bedingungen die Zellen hyperpolarisieren könnten. Es existiert seit langer Zeit eine wissenschaftlich hitzig geführte Diskussion, ob andere Kanaltypen, wie z.B. Kaliumkanäle, die kaum durch Zink und Cadmium inhibierbar sind, einen Ausgleichstrom zur NADPHox leiten können. Zink (Zn^{2+}) und Cadmium (Cd^{2+}) sind typische Hv1

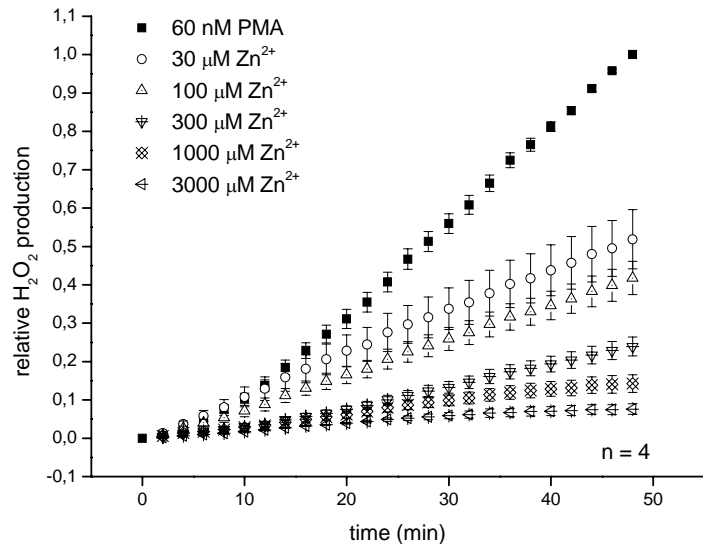


Abbildung 34. Relative Hydrogenperoxidproduktion durch 60 nM PMA aktiviert bei einem einen Tag alten Monozyten

Die Kurven zeigen die Inhibition durch Zink. Daten sind Mittelwerte mit STF. Die Daten wurden durch vier unabhängige Messungen gewonnen.

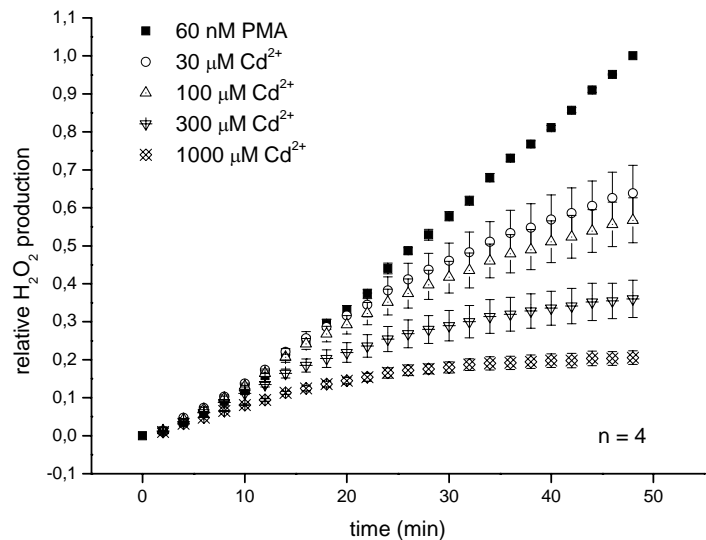


Abbildung 35. Hydrogenperoxidproduktion bei einem Tag alten Monozyten

Verschiedene Cd^{2+} Konzentrationen inhibieren die H_2O_2 -Produktion bei mit 60 nM PMA stimulierten Monozyten.

NADPHox leiten können. Zink (Zn^{2+}) und Cadmium (Cd^{2+}) sind typische Hv1

Inhibitoren. In Neutrophilen und Eosinophilen haben sie konzentrationsabhängig eine stark inhibierende Wirkung

auf die

Sauerstoffradikalproduktion,

da sie - wie in Abbildung 7

gezeigt - den Ausgleichstrom zur Elektronentranslokation

bilden. Es ist daher naheliegend, Monozyten mit

Eosinophilen und Neutrophilen unter den gleichen Messbedingungen zu

vergleichen. Monozyten

verfügen, wie Eosinophilen und Neutrophilen über beide

Ströme - Elektronen- und Protonenströme - wie oben gezeigt. Sie sollten daher mit ihrer

Sauerstoffradikalproduktion unter den Inhibitoren Zn^{2+} oder Cd^{2+} unter den gleichen Bedingungen wie bei

Eosinophilen und Neutrophilen gleich reagieren.

Monozyten mit verschiedenen Verweildauern in Kultur,

unter nicht stimulierenden Bedingungen, wurden in einer Neubauerkammer gezählt und

daraufhin mit dem Amplexred®-Hydrogen-

Peroxid-Kit auf ihre Sauerstoffradikal-Produktion

hin überprüft. Abbildung 34 zeigt die relative Produktion

von H_2O_2 durch Monozyten, die einen Tag in Kultur waren. Die Inhibition der

Produktion der Sauerstoffradikale durch Zn^{2+} ist deutlich zu erkennen. Das

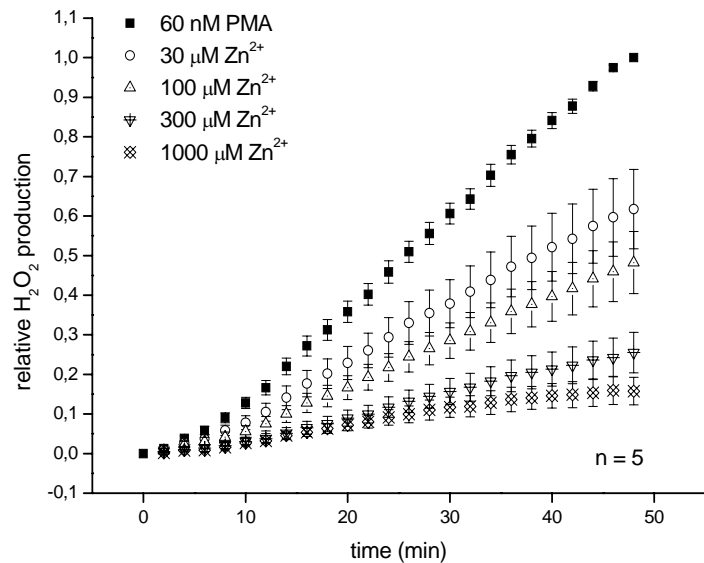


Abbildung. 36. Hydrogenperoxidproduktion bei 2 Tage alten Monozyten

Verschiedene Zn^{2+} Konzentrationen inhibieren die H_2O_2 -Produktion bei mit 60 nM PMA stimulierten Monozyten.

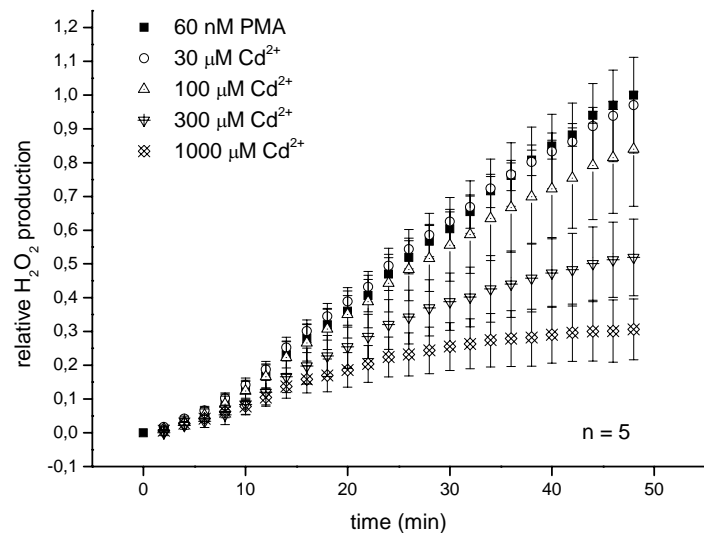


Abbildung. 37. Hydrogenperoxidproduktion bei 2 Tage alten Monozyten

Verschiedene Cd^{2+} Konzentrationen inhibieren die H_2O_2 -Produktion bei mit 60 nM PMA stimulierten Monozyten.

Schwermetall wurde gleichzeitig mit der Stimulation durch PMA zu den Zellen pipettiert.

Höhere Konzentrationen des Schwermetalls Zink führen zu geringerer Fluoreszenz gegenüber der Kontrollstimulation mit 60 nM PMA, womit eine Reduktion der Sauerstoffperoxidproduktion angezeigt wird. Auffällig ist die linear zunehmende Radikalproduktion durch Monozyten. Bei Neutrophilen gleicht die graphische Darstellung der Messreihe zur Sauerstoffradikalproduktion eher einer Sättigungskurve. Im Gegensatz zu den Monozyten erreichen die Neutrophilen nach einer halben Stunde schon den maximalen Wert der H_2O_2 -Produktion (22). Danach gibt es keine erkennbare Steigerung mehr. Die

Monozyten produzieren mit fast gleich bleibender Geschwindigkeit H_2O_2 , zeigen aber nach 50 Minuten noch keine Sättigung.

Die Inhibition durch Zink zeigt sich etwas stärker als die Inhibition durch Cadmium bei Monozyten, die einen Tag in Kultur waren. Als Unterschied zwischen Cadmium und Zink lässt sich zudem der Kurvenverlauf der Inhibition beschreiben.

Cadmium inhibiert nicht von Anfang an die Sauerstoffradikalproduktion, während Zink dies tut. Zudem ist Zink besonders bei höheren Konzentrationen potenter als Cadmium. Die durch Zink-Inhibition hervorgerufene relative H_2O_2 Konzentration, nach 48 Minuten (Zeitpunkt), ist bei einem Tag alten Monozyten, bei $30 \mu\text{M Zn}^{2+} = 52 \pm 8 \%$, bei $100 \mu\text{M Zn}^{2+} = 42 \pm 4 \%$, bei $300 \mu\text{M Zn}^{2+} = 24 \pm 2 \%$, bei $1000 \mu\text{M Zn}^{2+} = 14 \pm 2 \%$ und bei $3000 \mu\text{M Zn}^{2+} = 8 \pm 1,3 \%$. Bei der Cadmium-Inhibition nach 48 Minuten sind bei einem Tag alten Monozyten folgende Werte ermittelt worden bei $30 \mu\text{M Cd}^{2+} = 64 \pm 7 \%$, bei $100 \mu\text{M Cd}^{2+} = 57 \pm 6 \%$, bei $300 \mu\text{M Cd}^{2+} = 36 \pm 5 \%$ und bei $1000 \mu\text{M Cd}^{2+} = 21 \pm 2 \%$ (Abb.30).

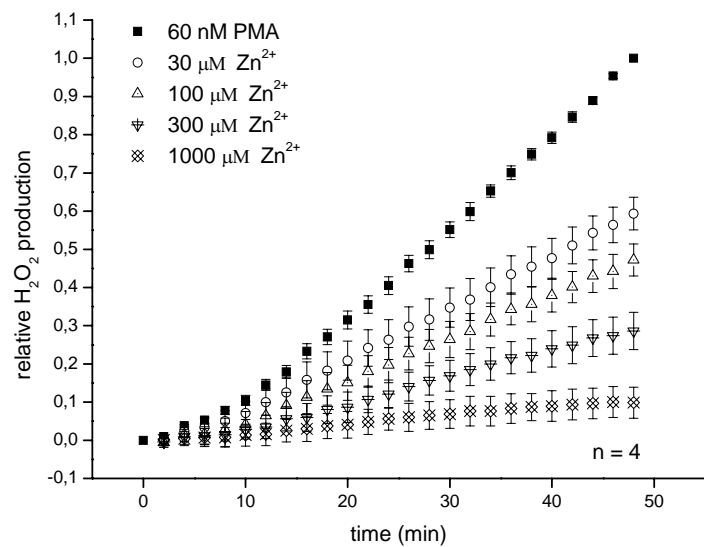


Abbildung 38. Hydrogenperoxidproduktion bei Monozyten einer 3 Tage alten Kultur

H_2O_2 -Produktion bei einer mit 60 nM stimulierten, drei Tage alten Monozyten Kultur mit Inhibition durch $30 \mu\text{M}$ bis $1000 \mu\text{M Zn}^{2+}$.

Eine 10-fach stärkere Wirkung von Zink im Vergleich zu Cadmium auf Protonenströme, wie von Decoursey beschrieben (8), konnte bei der Inhibition auf die Hydrogenperoxidproduktion

bei einem 1 Tag alten Monozyten nicht gemessen werden.

Bei zwei Tage alten Monozyten veränderte sich das Verhältnis zugunsten des starken Unterschieds zwischen Cadmium und Zink. Für die Inhibition der Hydrogenperoxidproduktion

durch Zink ergaben fünf (n = 5) Versuche folgende Ergebnisse: bei 30 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ = $61 \pm 10 \%$, bei 100 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ = $48 \pm 8 \%$, bei 300 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ = $26 \pm 5 \%$ und bei 1000 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ = $16 \pm 3 \%$.

Für die Cadmium Versuchsgruppe sind bei zwei Tage alten Monozyten folgende Werte gemessen worden: Bei 30 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ = $97 \pm 14 \%$, bei 100 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ = $84 \pm 17 \%$, bei 300 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ = $52 \pm 11 \%$ und bei 1000 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ = $31 \pm 11 \%$ (Abb.32). Alle hier aufgeführten Werte wurden nach 48 Minuten bestimmt. Der Unterschied zwischen Cadmium und Zink bei jeweils höchster, gemessener Konzentration von 1 mM Cd^{2+} oder 1 mM Zn^{2+} liegt bei ungefähr dem Zweifachen von Zink zu Cadmium. Bei einem Tag alten Monozyten zeigt Cadmium in der Maximalkonzentration von 1 mM im Vergleich zu Zink einen Unterschied um das Eineinhalbfache der Hydrogenperoxidproduktion, was größenordnungsgemäß dem Werte der zwei Tage alten Monozyten entspricht.

Für Monozyten, die drei Tage in Kultur waren, ergaben sich folgende Daten nach 48 Minuten: Bei 30 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ = $59 \pm 4 \%$, bei 100 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ = $47 \pm 4 \%$, bei 300 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ = $29 \pm 5 \%$ und bei 1000 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ = $10 \pm 4 \%$. Die Werte für Cadmium sind bei 30 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ = $103 \pm 4 \%$, bei 100 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ = $101 \pm 1 \%$, bei 300 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ = $64 \pm 3 \%$ und bei 1000 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ = $39 \pm 5 \%$ (Abb.34). Bei den ältesten Monozyten mit drei Tagen liegt der Unterschied bei Höchstkonzentration bei ungefähr dem Vierfachen zwischen Zink

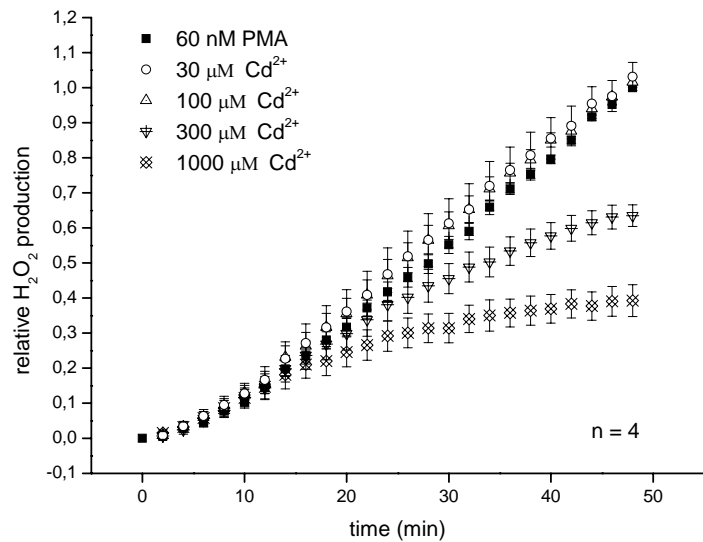


Abbildung. 39. Cadmium-Inhibition von 3 Tage alten Monozyten

Verschiedene Cd^{2+} -Konzentrationen inhibieren die Hydrogenperoxidproduktion von drei Tage alten Monozyten.

und Cadmium.

Abbildung 40 fasst alle Datenpunkte, 48 Minuten nach der Stimulation zusammen und zeigt, ohne Fehlerbalken, im gleichen Graph die relative

Hydrogenperoxidproduktion. Die Datenpunkte wurden mit einem sigmoidalen Fit extrapoliert. Aus der Extrapolation ergaben sich folgende Werte für

die halbmaximale H_2O_2 Produktion (IC 50): Bei einem Tag alten Monozyten für Zink $41 \pm 6 \mu M$, zwei Tage alten Monozyten $69 \pm 8 \mu M$ Zink, bei drei Tage alten Monozyten $65 \pm 11 \mu M$ Zink. Für den IC 50 Wert von Cadmium ergaben sich folgende Werte: Bei einem Tag alten Monozyten für Cadmium $113 \pm 18 \mu M$, zwei Tage alten Monozyten $398 \pm 48 \mu M$ Cadmium, bei drei Tage Alten Monozyten $590 \pm 109 \mu M$ Cadmium. Die Inhibition durch Zink wirkt sich relativ gleich für alle Zellalter aus. Bei Cadmium ist ein Unterschied zwischen 1, 2 und 3 Tagen alten Zellen zu erkennen. Bei einem Tag alten Monozyten ist die Sensitivität für stärkere Konzentrationen von Zink und Cadmium stark erhöht. Insgesamt waren diese Zellen auch schwieriger in den „Patch-Clamp,-Experimenten zu untersuchen. Ob dies mit der Fragilität nach der Blutentnahme und Aufreinigung im Zusammenhang steht, ist spekulativ.

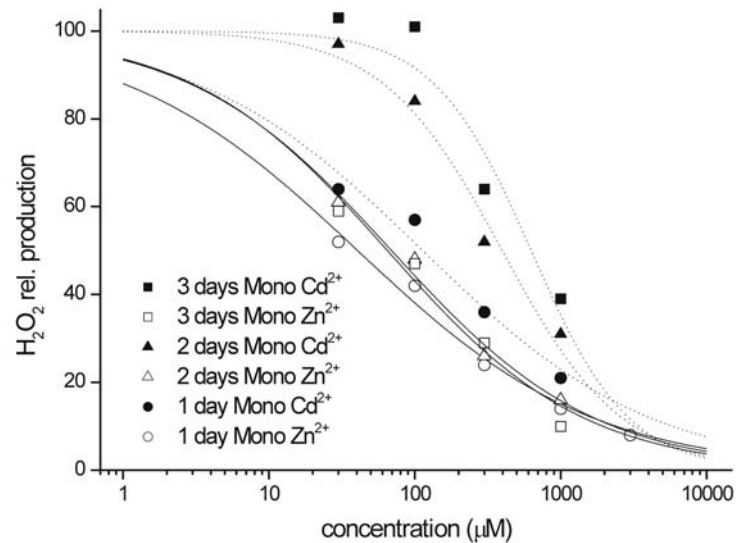


Abbildung. 40. Sigmoidale Extrapolation der H_2O_2 -Produktion nach 48 Minuten, bei den drei Zellaltern, für die Inhibitoren Zink und Cadmium

Die Extrapolation zeigt deutlich die Unterschiede zwischen Cadmium und Zinkinhibition. Die Daten für die einen Tag alten Monozyten korrelieren nicht mehr mit den anderen Zellaltern bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen.

4. Diskussion

Protonen und Elektronenströme, eine On-Off-Beziehung?

Mit dieser Arbeit ist es gelungen, Protonen- und Elektronenströme in humanen Monozyten simultan nachzuweisen. Durch eine Anzahl von Arbeiten ist bekannt, dass insbesondere Phagozyten überwiegend Protonenströme ausprägen. Decoursey & Cherny und Kapus (9,23) haben erstmals Protonenströme in Immunzellen nachgewiesen. In Makrophagen der Maus und in humanen Neutrophilen konnte eine Leitfähigkeit nachgewiesen werden, die heute eindeutig dem Protonenkanal zugeordnet werden kann. Seit dieser Zeit konnten mehr und mehr Eigenschaften dieses Stroms nachgewiesen werden, bis mit der Entdeckung des Elektronenstroms durch Schrenzel (12) ein Strom gefunden worden ist, der in der Aktivierung viele Gemeinsamkeiten mit dem Protonenstrom aufweist. PMA steigert sowohl den Protonen- als auch den Elektronenstrom. Die durch die Aktivierung des Elektronenstroms in der Zelle freigesetzten Protonen und die Leitfähigkeit des Elektronentransports aus der Zelle, führen zur Depolarisation der Zelle, die nur durch den Protonenstrom in voller Größe kompensiert werden kann (24). Zudem unterstützt der Protonenstrom die NADPHox in ihrer Funktion, da sie spannungsabhängig Elektronen transloziert. Dies bedeutet, dass mit zunehmender Depolarisation der Zelle die NADPHox an Aktivität verliert (20).

Da Monozyten über einen klar identifizierbaren Elektronenstrom verfügen, bilden sie auch einen Protonenstrom aus. Alle Zellen, die endogen eine NADPHox exprimieren, bilden auch einen Protonenstrom aus. Es ist trotzdem irreführend, dass auch Zellen über Protonenströme verfügen, die nicht über einen identifizierbaren Elektronenstrom verfügen. Darunter fallen die Alveolar Typ II Zellen und natürlich auch Basophile. Noch irreführender ist, dass Zellen, die über eine NADPHox verfügen (durch genetische Modulation), nicht über Protonenströme verfügen müssen, wie z.B. COS-Phox-Zellen, die ohne identifizierbaren Protonenstrom, klar mit der NADPHox O^- produzieren können.

Elektrisch nicht erregbare Zellen mit spannungsabhängigen Kanälen ?

Blockiert man die Protonenströme in einem Phagozyten, so ist folgerichtig, dass dadurch auch die O^- Produktion inhibiert wird. Phagozyten können durch Zinkblockade

der Protonenströme an der Sauerstoffradikalproduktion gehindert werden. Wird der Protonenstrom durch Zink in einem Phagozyten blockiert, so kann er sich durch das Einfügen eines protonendurchlässigen Proteins (Ionophore) wieder teilweise erholen. In Phagozyten ist damit eindeutig eine Verknüpfung zwischen Protonenleitfähigkeit der Zelle und Sauerstoffradikalproduktion hergestellt worden. Interessanterweise verändert diese elektrische Sichtweise auf die aktivierten Phagozyten, die zu den elektrisch nicht erregbaren Zellen gehören, sich so, dass es theoretisch in diesen Zellen möglich sein müsste, starke Depolarisationen auszulösen. Die Phagozyten sind damit auch ohne spannungsabhängige Kalzium- und Natriumkanäle fähig, zu depolarisieren.

Elektrisch nicht erregbar heißt, dass es sich um Zellen handelt, die nicht die Fähigkeit haben, ein Aktionspotenzial zu generieren. Sie verfügen weder über spannungsabhängige Natrium- noch Kalziumkanäle.

Warum hat eine Zelle Kanäle, die spannungsabhängig bei Depolarisation öffnen, wenn sie nicht durch Kanäle depolarisieren kann? Zur Erläuterung der Frage sei angemerkt, dass die Protonenströme in Phagozyten im nicht aktivierten Zustand ab +20 mV (Schwellenpotenzial), im aktivierten Zustand aber zwischen -10 mV bis -20 mV einsetzen. Einmal öffnen sie erst nach dem Gleichgewichtspotenzial (ca. 0 mV), das andere Mal davor. Darüber hinaus hat die Physiologie schon klar gezeigt, dass die Transportrate eines Kanals ($10^7/s$) höher ist, als die eines aktiven oder passiven Transporters ($10^2/s$). Dies stimmt nur bedingt für den spannungsabhängigen Protonenkanal, da die Transportrate hier $10^4/s$ beträgt. Diese niedrigere Transportrate ist auf die geringe Einzelkanalleitfähigkeit des spannungsabhängigen Protonenstroms zurückzuführen. Die Antwort auf die Frage nach der Funktion der spannungsabhängigen Protonenströmen ist wahrscheinlich die NADPHox. Sie kann in ihrer Gesamtheit die Zelle eines Eosinophilen in weniger als 91 ms bei bis zu 100 mV depolarisieren. Damit die Funktion der NADPHox erhalten bleibt, müssen Protonen als kompensatorische Ladung aus der Zelle geschleust werden, was durch den Protonenkanal am effektivsten passiert, da er ohne Energieaufwand Protonen bis zum Umkehrpotenzial aus der Zelle leitet. Der Phagozyt ist also „quasi“, im nicht klassischen Sinne, elektrisch erregbar.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen nun Aussagen über den „Oxidativen Burst“ von Monozyten zu. „Oxidative Burst“ ist der englische Begriff für die Sauerstoffradikalproduktion eines Phagozyten. Die durchschnittlichen Werte für Elektronenstrom pro 1 pF Kapazität zeigen einen Trend: Je größer die Monozyten

werden, desto weniger hoch ist die Dichte der NADPHox in der Membran. Interessanterweise steigt aber die Dichte der Protonenströme pro 1 pF Kapazität in der Zelle mit zunehmendem Zellalter an. Diese Messungen lassen vermuten, dass bei Monozyten verschiedenen Alters verschiedene Antworten in der Membranspannung auf die PMA-Stimulation hin zu erwarten sind. Es kann aber auch sein, dass sich eine hohe Anzahl von NADPHox innerhalb der Zelle in Phagosomen befindet. Das Phagosom ist ein durch Membran umschlossener Hohlraum im Phagozyten, in dem das Zerstören von Mikroorganismen stattfindet. Diese Produktion von Sauerstoffradikalen im Phagosom ist mit der AmplexRed®-Methode nicht zu detektieren. Hochrechnend ergibt sich, dass die Protonenströme in der Stromamplitude nach der Stimulation bei zunehmender Zeitdauer noch weiter ansteigen, während die Elektronenströme einen konstanten Wert annehmen. Auf Grund der verschiedenen Stromdichten von Elektronenstrom und Protonenstrom ist postulierbar, dass ein 1 Tag alter Monozyt durch PMA noch depolarisiert werden kann, bei einem 3 Tage alten Monozyt diese Erhöhung des Membranpotenzials (Depolarisation) aber geringer ausfallen sollte.

Da andere, bis jetzt untersuchte Phagozyten eine sehr geringe Lebensdauer haben - insbesondere Eosinophile und Neutrophile -, sind solche Untersuchungen, über einen längeren Zeitraum, nur an Monozyten durchführbar. Leider erlaubte der sehr knappe Zeitrahmen von einem halben Jahr nicht, mit zusätzlichem Ausbau der Messapparatur die weiterführende, systematische Messung der Membranspannung an Monozyten durchzuführen. In einer Versuchsgruppe konnten jedoch Einzelmessungen an verschieden alten Monozyten durchgeführt werden, deren Anzahl aber zu gering ist, um als wissenschaftlich aussagekräftig gewertet zu werden. Weitere Messungen würden einen Zeitraum von mindestens einem nochmaligen halben Jahr in Anspruch nehmen.

Fluoreszenzmessungen an Monozyten unterschiedlicher Verweildauer in Kultur

Deutlich ist in den Fluoreszenzmessungen die verschiedene Wirkung von Zn^{2+} und Cd^{2+} auf die Sauerstoffradikalproduktion abzulesen. Das erstaunliche ist, dass sich diese Daten genau mit den Daten zur Blockierung des Protonenkanals decken. In der Veröffentlichung von Cherny (18) sind die Wirkungen von Zink und Cadmium auf den Protonenstrom beschrieben. Beide Metalle haben Auswirkungen auf die Aktivierung des Protonenstroms und verändern den „Threshold“ zu stärker positiven Spannungen. Während Zink aber eine sehr starke, verlangsamende Wirkung auf die Aktivierungskinetik des Protonenstroms hat, ist diese Wirkung bei Cadmium sehr

gering. Zink verlangsamt unter allen Membranspannungen die Aktivierung. Bei Cadmium lässt diese Wirkung bei starken Depolarisationen nach. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass Zink ungefähr 30-fach potenter die Protonenströme blockiert als Cadmium.

Bei den Fluoreszenzmessungen konnte auch ein Unterschied zwischen Cadmium und Zink festgestellt werden. Allerdings ist dieser nicht so stark wie der, aus der Elektrophysiologie bekannte Faktor für Protonenstrominhibition. Hier wurde der Faktor 1,5 für einen 1 Tag alten Monozyten, der Faktor 2 bei 2 Tage alten Monozyten und der Faktor 4 bei 3 Tage alten Monozyten ermittelt. Auch die IC 50 Werte zeigen eine ähnliche Tendenz der H₂O₂-Produktion: Faktor 3 bei einem Tag alten Monozyten, Faktor 6 bei zwei Tage alten Monozyten und Faktor 10 bei drei Tage alten Monozyten. Diese Daten stimmen nicht mit der reinen Inhibition der Protonenströme durch Zink und Cadmium überein. Vielleicht gibt es in Monozyten Unterschiede zu Eosinophilen und Neutrophilen, die bis jetzt unbekannt sind. Möglich ist, dass die Monozyten auch über andere, nicht bekannte Wege Protonen aus der Zelle schleusen können, ohne dabei den spannungsabhängigen Protonenkanal zu benötigen.

Andere bekannte Protonen-Extrusionswege von Phagozyten

Natürlich spielt der Protonen-Natrium-Antiporter hier eine große Rolle. Dieses Protein fördert pro Natriumion, das in die Zelle gelangt, ein H⁺ aus der Zelle hinaus. Der Protonen-Natrium-Antiporter ist damit elektroneutral und nur über Umwege in elektrischen Messungen nachzuweisen. Decoursey und Cherny konnten mit Hilfe des Protonenkanals dieses Protein in Zellen nachweisen und zeigen, dass ein Teil der Protonen aus der Zelle sekundär über diesen Antiporter transportiert wird (25). Interessanterweise ist dieser Transporter nicht durch Spannungsänderungen umkehrbar, wie z.B. der Natrium-Kalzium-Antiporter im Herzen (26). Daraus, dass die hohen Depolarisationen, die durch das Blockieren von Protonenkanälen in einem aktivierten Phagozyten theoretisch erreicht werden können, nicht zu einem Ausstrom von Natrium aus der Zelle und einem Einstrom von Protonen führen, kann geschlossen werden, dass ein Ansäuern des Zytosols durch den Antiporter, also in jeder elektrischen Konfiguration auszuschließen ist. Dies bedeutet weiterführend, dass bei hohen Depolarisationen nur noch der Protonenkanal die Aufgabe des Leitens von Protonen aus der Zelle leisten kann.

Ein weiteres, zu betrachtendes Protein ist die V-ATPase (H-ATPase). Sie kann beim aktiven Transport, unter Verbrauch von ATP-Protonen, auch gegen das Konzentrationsgefälle und den elektrochemischen Gradienten Protonen aus der Zelle transportieren. Die bekannte Stöchiometrie geht von 2-3 H⁺ pro ATP aus. Die ATPase befindet sich vor allem in den Vakuolen der Phagozyten, aber auch in der Plasmamembran. Die von der H-ATPase erreichte Stromdichte beträgt ungefähr 0,1 pA / pF in Osteoklasten (27). Damit ist ihre Stromdichte pro Membranfläche mindestens 1000-fach kleiner als die von Protonenkanälen in anderen Phagozyten, wie zum Beispiel den Monozyten. Bei einem Elektronenstrom von 0,3 pA / pF würde diese Stromdichte der V-ATPase nicht genügen, um ausreichend Protonen aktiv aus der Zelle zu transportieren und somit der Aktivität der NADPHox entgegen zu wirken. Hinzu kommt der Energieverbrauch, der zusätzlich durch die Arbeit der H-ATPase entsteht. Diese Energie wird von Protonenkanälen nicht benötigt, da Protonenkanäle an dem elektrochemischen Gradienten entlang leiten, ohne zusätzliche Energie zu verbrauchen. Für Phagozyten sind Protonenkanäle eine physiologische „conditio sine qua non“, eine physiologische Notwendigkeit.

„Whole-cell“-Konfiguration und „perforated-patch“-Konfiguration

Um den Elektronenstrom messen zu können, war es unabdinglich, die „perforated-patch“-Konfiguration zu verwenden. Dabei wurde als porenbildendes Protein Amphotericin B benutzt. Dieses ist selektiv für monovalente Kationen und Anionen und erlaubt, die ionale Zusammensetzung des Zytosols während des Versuchs auszutauschen. Die Konzentration aller anderen löslichen Komponenten des Zytosols - Proteine und größere Moleküle – wird nicht verändert und das Zytosol selbst wird nur geringfügig verändert. Bricht man aus der „perforated-patch“-Konfiguration in die „Whole-cell“-Konfiguration ein, so versiegt der Elektronenstrom fast augenblicklich. Ein ständiges Assemblieren und Dissoziieren der sechs Komponenten der NADPHox könnte dafür verantwortlich sein. Dieses Zusammensetzen der löslichen und membranständigen Komponenten der NADPHox wird wahrscheinlich auch durch die Dynamik des Zytoskeletts gefördert. Das Zytoskelett verliert aber alle Dynamik in der „Whole-cell“-Konfiguration, das heißt, ein Dissoziieren ist möglich, ein weiteres Assemblieren nicht. Interessanterweise wurden die ersten Elektronenströme in der „Whole-cell“-Konfiguration gemessen (12). Die dort von Schrenzel et al. veröffentlichten Ergebnisse konnten bei den humanen Monozyten weder reproduziert

noch bestätigt werden. Es ist mit hochohmigen Pipetten möglich, in einer kurzen Zeitspanne - bis zu 10 Minuten - Elektronenstrom zu messen. Dies ist möglicherweise auf die geringere Dialyse der Pipettenlösung in die Zelle - bei Pipetten geringen Öffnungsquerschnitts - zurück zu führen. Längere Messungen bis zu 1½ Stunden Dauer, wie sie zum simultanen Messen von Elektronen- und Protonenströmen nötig sind, können mit der „Whole-cell“-Messmethode nicht durchgeführt werden. Auch ist der Zugriff auf die Zelle mittels niedrigohmiger Pipetten, die durch Amphotericin B den elektrischen Zugang zur Zelle herstellen, besser gegeben, als mit Pipetten, die einen sehr kleinen Öffnungsdurchmesser haben, weil nach dem Einbau des Amphotericins B der Serienwiderstand geringer ist. Es gibt daher für physiologisch relevante Messungen des tatsächlichen Zustands der Zelle keine andere Möglichkeit der Spannungsklemme, als die Messung mit der „perforated-patch“-Konfiguration.

Zu erwartender Elektronenstrom von Monozyten

Besonders aus der Arbeit von Kapus (23) lassen sich einige Parallelen zu dieser Arbeit ziehen. In der Arbeit von Kapus (23), sind Makrophagen der Maus untersucht worden. Sie zeigen in vielen Parametern hohe Ähnlichkeiten zu humanen Monozyten. Schon damals wurde spekuliert, dass der Protonenstrom zum Ausgleichen der NADPHox-Aktivität benötigt würde. Die von Kapus untersuchten Zellen hatten eine Kapazität von 2-16 pF, was sehr gut mit der Kapazität der Monozyten übereinstimmt. Auch die Werte für die Leitfähigkeit des Protonenstroms pro pF Kapazität ist fast identisch mit den Messungen in dieser Arbeit. Kapus errechnete für den möglichen Elektronenstrom einen Wert von 0,2 pA / pF, was einer mittleren Stromstärke von 3,2 pA pro Maus-Makrophage entspräche. Verglichen mit dieser Arbeit sind das genau die Werte, die hier experimentell gewonnen werden konnten. Es ist also mehr als wahrscheinlich, dass der gemessene Elektronenstrom genau dem realen Elektronenstrom in humanen Monozyten entspricht. Das Ergebnis zeigt, dass ein einzelner Monozyt durchaus - ab einer bestimmten Zellgröße - die gleiche Sauerstoffradikalproduktion erreichen kann, die auch ein Neutrophiler erreicht (-2 bis -3 pA). Sicherlich ist dieser Strom immer noch nur halb oder ein Drittel so groß, wie der Elektronenstrom, der von den viel kleineren Eosinophilen erzeugt wird.

„Threshold“ und Einwärtsströme humaner Monozyten

Eine der aktuellen Forschungsfragen zum Protonenkanal lautet: Was macht es in Phagozyten möglich, dass man Protoneneinwärtsströme messen kann? Protoneneinwärtsströme sind weder in irgendeiner anderen Zelle, die über spannungsabhängige Protonenströme verfügt, gemessen worden, noch sind sie erkennbar, außer in aktiviertem Zustand. Zuerst ist notwendig, zu verstehen, dass unter physiologischen Bedingungen ($pH_i = 7,3$ bzw. $pH_o = 7,4$) mit einem Umkehrpotenzial von -6 mV, der spannungsabhängige Protonenstrom bei $+20$ mV aktiviert und damit immer einen Auswärtsstrom generiert. In einem aktivierten Phagozyten, etwa einem Monozyten (wie in dieser Arbeit), verändert sich das Schwellenpotenzial, das zum Öffnen des Kanals benötigt wird, um ungefähr 30 mV. Die in der Literatur in Eosinophilen und Neutrophilen beschriebene Veränderung ist ungefähr 40 mV (5). Durch diese Veränderung öffnet der Kanal nach Aktivierung des Phagozyten bei -10 mV - bei einem Umkehrpotenzial von -6 mV - und es fließt ein Protoneneinwärtsstrom. Wie weiter oben dargestellt, konnte diese Veränderung auch in dieser Arbeit an Monozyten gemessen werden. Welche physiologische Bedeutung diesem Phänomen zukommt, kann diese Arbeit nicht beantworten. Gezeigt werden konnte, dass die Veränderung des „Thresholds“ (Schwellenpotenzial) durchaus mit der NADPHox zusammenhängen kann. Diese Zusammenhänge exakt aufzuklären ist Thema aktueller Forschung zum geklonten Protonenkanal und nicht Teil dieser Arbeit.

Veränderungen des Protonenstroms nach PMA- Stimulation der Monozyten

Ein weiteres, interessantes Merkmal des spannungsabhängigen Protonenstroms ist die, durch die Aktivierung mit PMA sich mehr als verdoppelnde Amplitude des Protonenstroms, die bei Fortsetzung der Messung weiter ansteigen kann. Darüber hinaus wird die Kinetik verändert. In Monozyten aktiviert der Protonenstrom bei PMA-Stimulation um das Vierfache schneller, durch DPI kaum oder nicht langsamer. Die Veränderungen der „Tailcurrents“ werden durch DPI, den Inhibitor der NADPHox, wieder zurückgeführt, nicht aber die Aktivierungskinetik und die Amplitude. Bei Monozyten, die drei bzw. zwei Tage in Kultur waren, zeigen die Protonenströme nach DPI-Inhibition kaum einen Anstieg der Amplitude, lassen aber deutlich eine Beschleunigung der „Tailcurrents“ erkennen (siehe Abbildungen 25-27). Dieser unveränderte Auswärtstrom könnte auf die weitere Phosphorylierung des Kanals durch PMA zurückzuführen sein. DPI verhindert ausschließlich den Transport von Elektronen,

nicht aber die Phosphorylierung der Oxidase oder des Kanals. DPI verhindert zusätzlich nicht das weitere Aktivieren von Komponenten in der Zelle, die zur Erhöhung der Auswärtstromamplitude von Protonenströmen in Monozyten führen könnten.

Das Ansteigen der Amplitude könnte auch mit der Zellkapazität zusammenhängen. PMA wird in Experimenten auch benutzt, um Exozytoseprozesse in Zellen zu stimulieren. Bei einer Exozytose wird die Membran, die Vesikel im Zytoplasma bildet, beim Öffnen dieser Vesikel zum umgebenden Medium in die Zellmembran mit eingebaut. Enthielten diese Vesikel Protonenkanäle, würde sich die gesamte Amplitude mit dem Einbau der Vesikel in die Zellmembran erhöhen. Da die Erhöhung des Stroms eine Verdoppelung oder mehr beträgt, müsste sich die Kapazität dazu proportional ändern, was noch zu beweisen wäre.

Die Änderungen in den „Tailcurrents“ sind eindeutig auf die DPI-Inhibition zurückzuführen. Zur genauen Klärung der komplexen Beziehung zwischen der NADPHox und dem spannungsabhängigen Protonenstrom sind weitere Experimente erforderlich.

Gibt es eine Kopplung zwischen NADPHox und Kanal? Ist diese Kopplung mechanisch, mediiert, signaltransduziert oder durch lokal begrenzte pH-Veränderungen hervorgerufen? Diese Fragen sind zum weiteren Verständnis der spannungsabhängigen Protonenströme noch durch Forschung zu klären.

Protonenströme, Kinetiken und Puffer

Das wohl größte Problem beim Messen von Protonenströmen ist die physiologisch vorkommende geringe Konzentration der Protonen. Ein pH-Wert von 7 entspricht einer Konzentration von 100 nM Protonen. Im Vergleich mit Kalium ist die Konzentration von Protonen um das Eineinhalbmillionenfache (1.500.000) kleiner. Wird ein Protonenstrom von 100 pA gemessen, verlassen in einer Sekunde ungefähr 625 Millionen Protonen die Zelle. Die Anzahl der freien Protonen in einer Zelle mit dem Volumen von 524 fl (was einem Durchmesser von 10 μM entsprechen würde) bei pH 7, beträgt 30833. Rechnerisch wäre dieser Vorrat an freien Protonen, bei einem Strom von 100 pA, nach ca. 50 μs aufgebraucht. Unter gleichen Bedingungen dauert das Depletieren durch einen Kaliumionenstrom von 100 pA 75 Sekunden. Die Länge der Spannungspulse in dieser Arbeit beträgt durchschnittlich 8 s. Bei einem Strom von 100 pA bedeutet das, dass fast alle Protonen, die die Zelle verlassen, durch Puffer bereitgestellt werden müssen. Mit den in dieser Arbeit verwendeten hohen Pufferkonzentrationen von 100 mM wird eine Protonen Reserve von $1,6 \times 10^{10}$

bereitgestellt. Hiermit wird gewährleistet, dass längere Pulse genau untersucht werden können.

Ist es unter physiologischen Bedingungen möglich den Protonenstrom in Spannungsrampen zu messen, wenn kein Amoniumionpuffer verwendet wird?

Bei den physiologischen Messungen, d.h. Messungen in der „perforated-patch“-Konfiguration mit Lösungen, deren ionale Zusammensetzung, der des Zytosols (Pipettenlösung) oder des Blutes (Badlösung) entsprechen, unterstützt der zelleigene Protonenpuffer das Analysieren der Protonenströme. Die Konzentration dieses zelleigenen Puffer innerhalb der Zelle beträgt ungefähr 100 mM. Errechnet ist diese Konzentration aus der intrazellulären Pufferkraft die zwischen 18 und 77 mmol \cdot pH⁻¹ \cdot liter⁻¹ betragen kann (28). Die Badlösung ist mit Hepes (Puffer) auf pH 7,3 gepuffert. Da in der „perforated-patch“-Konfiguration weder Puffermoleküle durch die Pipette in die Zelle eindringen, noch die Zelle verlassen können, ist diese Art der Ableitung relativ stabil. Bei geringen Strömen, wie sie in der Spannungsrampe gemessen worden sind, sollte der zelleigene Puffer ausreichen, weiterhin Protonen zur Verfügung zu

stellen. Eine Berechnung dazu zeigt Abbildung 41. Zudem werden durch die PMA-Aktivierung der NADPHox pro Sekunde ca. 19 Millionen freie Protonen in der Zelle erzeugt. Daraus ergibt sich, dass in diesem Monozyten 62484

Oxidasen aktiv sind. Ein weiterer Beweis für die Messbarkeit von Protonenströmen in der physiologischen

Messkonfiguration ist

nicht zuletzt die Verschiebung des Umkehrpotenzials in Abbildung 32. Sie zeigt, dass es sich bei dem gemessenen Strom um einen Protonenstrom handelt.

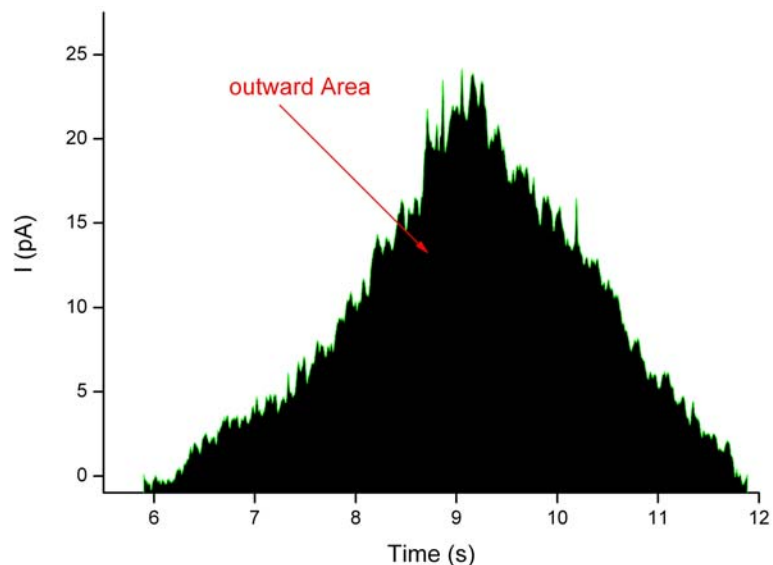


Abbildung.41. Berechnung der Protonendepletion in der physiologischen „perforated patch“-Messung

Dargestellt ist der Teil der Rampe aus Abbildung 27, der den Auswärtsstrom trägt. Vorausgesetzt, dieser Auswärtsstrom ist ein reiner Protonenstrom, so verlassen $354,956 \cdot 10^6$ Protonen die Monozyte (errechnet aus der Fläche unter der Stromkurve (schwarze Füllung)). Dies entspricht bei einem internen Puffer von ungefähr 100 mM einem Anteil von 2,22% des Protonendepots.

In Abbildung 33 ist die Aktivierung eines Elektronenstroms gezeigt, ohne gleichzeitige Aktivierung des Protonenstroms. Kann PMA dort selektiv den Elektronenstrom aktiviert haben?

Die Abbildung 33 ist ein einzelnes Ergebnis einer Versuchsreihe, Elektronenstrom und Protonenstrom unter physiologischen Bedingungen zu messen. Dass hier kein Protonenstrom zu messen war, kann an einer nicht kontrollierten Kontamination der Badlösung durch Schwermetalle (z.B. Zink) liegen. Zink blockiert die Amplitude

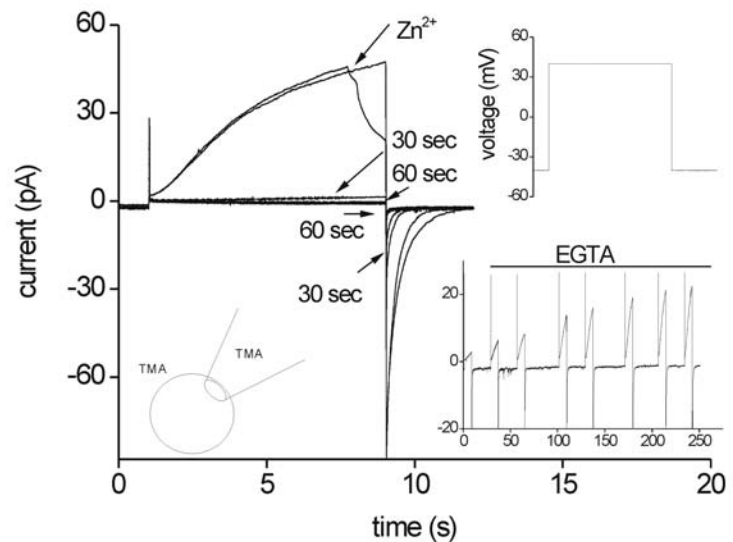


Abbildung. 42. Zinkblock des Protonenstroms in einer Monozyte

Der Graph zeigt sich wiederholende Spannungspulse zu +40 mV der zweite Puls wird inhibiert und die Protonenströme verschwinden vollständig 60 Sekunden nach der Zink-Applikation Das kleinere Bild zeigt das EGTA Zink bindet und die Protonenströme wieder an Amplitude gewinnen.

des Protonenstroms und hemmt zusätzlich dessen Aktivierung (Abbildung 42). Da die Spannungsrampe bei sehr langsamen Geschwindigkeiten ein dynamischer Prozess ist, wäre eine, durch Kontamination zu langsame Aktivierung des Protonenstroms, nicht messbar. Der Blocker DPI (Abbildung 33 B) inhibiert den durch PMA-Stimulation (Abbildung 33 A) aktivierten Elektronenstrom. Möglicherweise wird tatsächlich ein Elektronenstrom gemessen. Sicherlich hat sich aus den physiologischen Experimenten ergeben, dass eine Kontrolle der Schwermetallkontamination zwingend notwendig ist. In der TMA-Lösung ist diese Kontrolle durch den Chelator EGTA gewährleistet.

Elektronenstrom und „Current-Clamp“

Die Betrachtungen von Monozyten unter physiologischen Bedingungen zeigen vielleicht, dass sowohl Protonenstrom als auch Elektronenstrom in Monozyten messbar sind. In artifiziellen Lösungen (TMA) ist dies schon gezeigt worden. Der Elektronenstrom ist geringer in Monozyten als in Granulozyten. Offen bleibt die Frage, ob der Elektronenstrom in Monozyten elektrisch eine Rolle spielt?

Geht man davon aus, dass es in Monozyten zur Ladungskompensation der entstehenden Protonen außer der H-ATPase und dem Protonenkanal keine weiteren Möglichkeiten gibt, Ladung zu kompensieren, dann kann bei der Blockierung des Protonenstroms und der H-ATPase, allein der Elektronenstrom die Zelle in etwa 1 Sekunde auf +250 mV depolarisieren. Der Elektronenstrom ist also ausreichend, um sehr hohe Spannungsänderungen zu induzieren. Die kleineren, neutrophilen Zellen depolarisieren mit einer Geschwindigkeit von 1.1 Volt pro Sekunde. Die Depolarisation der Monozyten ist vierfach kleiner, aber immer noch stark genug, um Spannungsänderungen zu generieren. Die „Current-Clamp“-Messung ermöglicht, den Strom auf einem gewählten Niveau zu halten und so die Spannungsänderungen in der Zelle zu messen. Dies wäre eine weitere Möglichkeit zu zeigen, dass Monozyten und Granulozyten starke Spannungsänderungen durchlaufen können.

Alle Messungen dieser Arbeit wurden in der „Voltage-Clamp“-Methode durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Spannung konstant gehalten und der Strom gemessen. Das größte Problem in einer „Current-Clamp“-Methode sollte nicht der interne Puffer der Monozyten sein und auch nicht die Größe des Elektronenstroms, sondern das Leck der Ableitung.

Das Leck ist der Strom, der nicht durch die Zelle fließt, sondern durch die Pipette an der Zelle vorbei. Dieser Strom kann bis zu einigen pA betragen. Da dies genau die gleiche Amplitude ist, wie die Amplitude des zu erwartenden Elektronenstroms, ist es unbedingt notwendig, das Leck zu minimieren. Nur dann ist eine Ableitung der Spannung ohne größere Fehler möglich. Um das Leck in einer Messung größtmöglich zu minimieren, bedarf es einem sehr hohen „Gigaseals“. Dieser kann durch optimierte Pipettenform und möglicherweise durch spezifische Lösungen erreicht werden. Ist dieser sehr hohe Abschluss erreicht, dann sollte die Messung einer stark depolarisierenden Monozyte, nach der PMA-Aktivierung, kein Problem darstellen. Eine weitere Möglichkeit zur Spannungsmessung könnte in der „Cell-Attached“-Konfiguration versucht werden. Dafür bedarf es eines sehr hohen Abschlusswiderstandes. Zusätzlich aber sollten Ionenkanäle im Bereich des Patches vorhanden sein. Für die Einwärtsgerichteter des KIR-Typs ist in der Veröffentlichung von Mason (29) gezeigt worden, dass eine „Current-Clamp“-Messung so möglich ist. Diese Ionenkanäle dienen als natürliche Poren, durch die hindurch - wie durch Amphotericin - Spannung gemessen werden kann. Abbildung 27 und 28 zeigen beide, dass solche KIR-Kanäle in Monozyten vorkommen. Eine Messung der

Spannungsänderung ist bis zum Erreichen der Spannungsschwelle der KIRs möglich. KIR-Kanäle sind Kaliumkanäle, die bei Depolarisation der Zelle schließen. Dieser Schwellenwert liegt zwischen +10 bis +20 mV. Schließen die KIR-Kanäle, dann ergibt sich dadurch ein Verlust der Pore. Die Pore dient dem Zugriff auf die Zelle. Verliert man diesen Zugriff, dann ist es unmöglich die Spannungsänderung zu messen. Folgerichtig können Spannungen, die höher als +20 mV sind, mit dieser Methode nicht genau gemessen werden.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sind Protonen- und Elektronenströme in humanen Monozyten simultan mit Hilfe der „Patch-Clamp“-Technik gemessen worden. Sie untersucht den durch die NADPHox generierten Elektronenstrom in anderen Zellen als Eosinophilen, Neutrophilen und Osteoklasten. Die Produktion von Sauerstoffradikalen durch humane Monozyten konnte schon mit anderen Methoden, als der in dieser Arbeit genutzten Fluoreszenzmessung, gezeigt werden. In Echtzeit konnte dies jedoch in der einzelnen Monozyte bis heute nicht wissenschaftlich untersucht werden. Protonenströme sind in Neuronen, Oozyten, Alveolar Typ II Zellen und Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und Osteoklasten gezeigt worden. Die speziellen Eigenschaften der Protonenströme in Phagozyten zeigten sich auch in Monozyten. In Monozyten ändern sich, je nach Zellalter, die Elektronen- und Protonenströme. Monozyten sind die einzigen Phagozyten, die eine unbestimmt lange Lebensdauer haben. Fluoreszenzmessungen an Monozyten haben die Erkenntnisse der Elektrophysiologie bestätigen können. Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum Verstehen der elektrischen Eigenschaften der Phagozyten, ihrer Funktion und der intrazellulären Mechanismen

Curriculum vitae

Person

- Family status: engaged
- Citizenship: German
- Age: 34 (born, 02.08.1973)
- Birthplace: Lich (Hessen)
- Parents: Manfred Weinmann-Musset / Karin Musset
- Religious confession: evangelic, Protestant

Study

1. 10/1994-10/2000 Diploma of Biology, Universität Osnabrück
2. 04/2001-02/2005 Dr. rer. nat. Philipps-Universität Marburg
3. 01/2007- Postdoc-Position Rush University Chicago

Work experience

Diploma Biologist

4. 1,5 years experience in science, Universität Osnabrück (Genetics and Electrophysiology)
5. 3 years experience in science, Universität Marburg (Cell culture and Electrophysiology)
6. 3 years experience in teaching physiology for medical students-, dentistry students and human biology students
7. 1 year experience in teaching cognitive science and biology students
8. supervision of a medical doctor and 3 trainees in electrophysiology

Military service

1993 ABC-Abwehr Emden
1994 ABC-Abwehr Prenzlau

Grants

2003 Stipendium der Medizinstiftung
2005 Stipendium Adolf-Schmidtman-Stiftung

Talks

2004 DPG-Tagung in Leipzig
2004 Department for molecular Biophysics and Physiology Rush medical center Chicago

Publications

Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. 2002 J Physiol

Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. 2004 PNAS

Modulation of the conductance of the K⁺ channel TASK-3 by extracellular divalent or polyvalent cations 2006 J Physiol

“Host tissue damage“ signal ATP promotes chemokinesis and negatively regulates Toll-like receptor signalling in human monocytes 2005 JBC

Subunit-Dependent Modulation of the 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptor Open-Close Equilibrium by n-Alcohols 2007 J Pharmacol Exp Ther

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

- Prof. Daut in Marburg
- Prof DeCoursey in Chicago
- HD. Krüppel in Osnabrück
- Prof. Stengl in Marburg
- Prof. Voigt in Marburg

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Protonen- und Elektronenströme in humanen Monozyten“ im Institut für normale und pathologische Physiologie und im Patch-Clamp-Center Chicago unter Leitung von Prof. Voigt ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen, als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wird in folgenden Publikationsorganen eingereicht:

„Journal of Leucocyte Biology“

Ort und Datum

Boris Musset

Danksagung

Bei der Prof. Adolf Schmidtmann-Stiftung möchte ich mich ausdrücklich bedanken, sie hat es mir möglich gemacht, diese Arbeit durchzuführen.

Herrn Prof. Voigt danke ich besonders für sein Vertrauen in meine Arbeit und seine Unterstützung.

Prof. DeCoursey für die Möglichkeit die Untersuchungen durchzuführen.

Unterstützung aus der DeCoursey-Arbeitsgruppe.

Meinem Vater für hilfreiche Korrekturen.

Andrea Hetzel für die Geduld und die Unterstützung während dieser Arbeit.

Meinen Eltern, dass sie sich um ihren Enkel Noel kümmern.

Literaturverzeichnis

1. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981) *Pflugers Arch* **391**(2), 85-100
2. Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., and Zdebik, A. A. (2002) *Physiol Rev* **82**(2), 503-568
3. Ramsey, I. S., Moran, M. M., Chong, J. A., and Clapham, D. E. (2006) *Nature* **440**(7088), 1213-1216
4. Sasaki, M., Takagi, M., and Okamura, Y. (2006) *Science* **312**(5773), 589-592
5. Decoursey, T. E. (2003) *Physiol Rev* **83**(2), 475-579
6. Thomas, R. C., and Meech, R. W. (1982) *Nature* **299**(5886), 826-828
7. Barish, M. E., and Baud, C. (1984) *J Physiol* **352**, 243-263
8. DeCoursey, T. E. (1991) *Biophys J* **60**(5), 1243-1253
9. DeCoursey, T. E., and Cherny, V. V. (1993) *Biophys J* **65**(4), 1590-1598
10. DeCoursey, T. E., and Cherny, V. V. (1996) *J Membr Biol* **152**(2), 131-140
11. Henderson, L. M., Chappell, J. B., and Jones, O. T. (1987) *Biochem J* **246**(2), 325-329
12. Schrenzel, J., Serrander, L., Banfi, B., Nusse, O., Fouyouzi, R., Lew, D. P., Demaurex, N., and Krause, K. H. (1998) *Nature* **392**(6677), 734-737
13. Borregaard, N., Schwartz, J. H., and Tauber, A. I. (1984) *J Clin Invest* **74**(2), 455-459
14. Barry, P. H., and Lynch, J. W. (1991) *J Membr Biol* **121**(2), 101-117
15. Neher, E. (1992) *Methods Enzymol* **207**, 123-131
16. Ermishkin, L. N., Kasumov, K. M., and Potseluyev, V. M. (1977) *Biochim Biophys Acta* **470**(3), 357-367
17. Schmitt, B. M., and Koepsell, H. (2002) *Biophys J* **82**(3), 1345-1357
18. Cherny, V. V., Markin, V. S., and DeCoursey, T. E. (1995) *J Gen Physiol* **105**(6), 861-896
19. DeCoursey, T. E., Cherny, V. V., Zhou, W., and Thomas, L. L. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12), 6885-6889
20. DeCoursey, T. E. (2003) *FEBS Lett* **555**(1), 57-61
21. Gallin, E. K. (1991) *Physiol Rev* **71**(3), 775-811
22. Femling, J. K., Cherny, V. V., Morgan, D., Rada, B., Davis, A. P., Czirjak, G., Enyedi, P., England, S. K., Moreland, J. G., Ligeti, E., Nauseef, W. M., and DeCoursey, T. E. (2006) *J Gen Physiol* **127**(6), 659-672
23. Kapus, A., Romanek, R., Qu, A. Y., Rotstein, O. D., and Grinstein, S. (1993) *J Gen Physiol* **102**(4), 729-760
24. DeCoursey, T. E., Morgan, D., and Cherny, V. V. (2003) *Nature* **422**(6931), 531-534
25. DeCoursey, T. E., and Cherny, V. V. (1994) *J Gen Physiol* **103**(5), 755-785
26. Demaurex, N., Orłowski, J., Brisseau, G., Woodside, M., and Grinstein, S. (1995) *J Gen Physiol* **106**(1), 85-111
27. Sakai, H., Kawawaki, J., Moriura, Y., Mori, H., Morihata, H., and Kuno, M. (2006) *J Physiol* **576**(Pt 2), 417-425
28. DeCoursey, T. E., and Cherny, V. V. (1996) *Biophys J* **71**(1), 182-193
29. Mason, M. J., Simpson, A. K., Mahaut-Smith, M. P., and Robinson, H. P. (2005) *Biophys J* **88**(1), 739-750

Erratum

Protonen- und Elektronenströme in humanen Monozyten

Folgende Ergänzungen sind notwendig, um die Daten und Textpassagen der vorliegenden Doktorarbeit in einen korrekten Kontext zu stellen.

Berichtigungen im Text und Abbildungen

1. Seite 2
"Der Protonenstrom kann von dem Schwermetall blockiert Der Block....."
Der Protonenkanal kann aber nicht - im Sinne eines Verschließens der Pore - blockiert werden, da keine Pore im eigentlichen Sinne vorhanden ist. Die Blockadewirkung entsteht durch Inhibieren mit den genannten Schwermetallionen. Siehe Seite 7
2. Seite 7
"Ein Proton (H⁺) lagert sich an,..."
--- Hier ist anzumerken, dass sich die Wassermoleküle bzw. Ausrichtung der protonierbaren Gruppen nochmals ändern muss, nachdem ein Proton über die Kette geleitet worden ist. Die HBC hat zwei Stufen: eine "Hob"-Stufe und eine "Turn"-Stufe. Erst nach vollständiger Reorientierung kann ein weiteres Proton durch die HBC geleitet werden.
3. Seite 10 Abbildung 6.
Diese Abbildung wurde aus Wikipedia entnommen: Internetadresse:
<http://de.wikipedia.org/wiki/Pentosephosphatzyklus>
4. Seite 11 Abbildung 7
Bei der Abbildung sind die tiefer gestellten Zahlen (jeweils eine 2) nur halb dargestellt.
5. Seite 18
"Alle Messungen wurden bei einer ständig kontrollierten Temperatur von 22°C ..."
--- Die Temperaturkontrolle arbeitet nicht immer optimal. Daher ist von einer Raumtemperatur zwischen 19-25 °C auszugehen.
6. Seite 29 Tabelle 1.1
Die Glucose-Angaben für beide Lösungen - TMA und Ringer - sind inkorrekt. Die Messungen wurde mit und ohne Glucose durchgeführt.
7. Seite 37 Abbildung 22
Der Elektronenstrom beginnt nach der Applikation von PMA nicht graduell seine Amplitude zu erhöhen, sondern mit einem Sprung. Dieser ist wahrscheinlich ein Messartefakt. Die DPI-Inhibition gibt aber ungefähr den gleichen Wert für die Amplitude des Elektronenstroms, es ist also anzunehmen, dass der Elektronenstrom diese Amplitude erreicht.
8. Seite 45
"TMA-Puffer" besser wäre TMA-Lösung

9. Seite 49
"Der Leckstrom sollte sich"
Das ist nicht vollständig korrekt. Der Leckstrom kann sich verändern. Veränderungen des Leckstroms bei gleichzeitiger Entwicklung des Elektronenstroms wird im zweiten Bericht für die Adolf Schmidmann Stiftung (Boris Musset) in aller Ausführlichkeit diskutiert.
Damit ist die Berechnung des Umkehrpotentials als nur äußerst grobe Abschätzung zu verstehen. Das Leck in dieser Messung allerdings verändert sich nur minimal. Die Verschiebung durch den Elektronenstrom sollte im angegebenen Spannungsbereich fast perfekt parallel sein. Damit würde es zu keinem ermittelbaren Umkehrpotenzial kommen. Zusätzlich ist darauf zu achten, dass die NADPHox über eine Spannungsabhängigkeit verfügt.
10. Seite 52
"Bei dem in Abbildung 33 ..."
Anmerkung: Höchstwahrscheinlich handelt es sich nicht um eine Aktivierung des Elektronenstroms. Die Verschiebungen können auf Messartefakte zurück zu führen sein. Es sollte angemerkt werden, dass der Autor, wie in der Diskussion ausgeführt, nicht glaubt, dass es sich um einen Elektronenstrom handelt.
11. Seite 58
"Zinkblockade" ersetzen durch Zinkinhibition
12. Seite 65
"Pufferkonzentration von 100 mM...."
Diese bezieht sich auf die Ammoniumkonzentration und sollte 50 mM sein. Damit beträgt die Protonenreserve des protonierten Puffers nur $0,8 \cdot 10^{10}$.
13. Seite 66
"Die Konzentration des zelleigenen Puffers beträgt etwa 100 mM...."
Dies ist nur eine Abschätzung! Sie ist definitiv sehr hoch gewählt. Die genaue Pufferkonzentration in einer Monozyte ist nicht genau bestimmt. Es ist anzunehmen, dass man bei solchen hohen Pufferkonzentrationen keine Depletion der Ströme sehen würde. Allerdings ist Depletion erkennbar, wenn man Spannungspulse in physiologischen Lösungen auswertet. Deshalb wird hier kurz dieses Problem diskutiert.
Von den $355 \cdot 10^6$ Protonen die durch die Rampe verbraucht werden, sind $19 \cdot 10^6$ von der NADPHox neu erzeugt. Der Rest der Protonen müsste durch den Puffer bereitgestellt werden.
Nun ist die Frage, welche Form von Puffer sich in der Zelle befindet. Handelt es sich um mobilen oder statischen Puffer. Beide Puffertypen kommen in der Zelle vor. Beide puffern Protonen. Doch haben sie verschiedene Auswirkungen auf die Diffusionskoeffizienten der Protonen. Statische Puffer setzen den Diffusionskoeffizienten herab. Mobile Puffer haben einen höheren Diffusionskoeffizienten (1). Das bedeutet, dass die Geschwindigkeit, mit der die Protonen während eines Pulses zur Verfügung gestellt werden können, hauptsächlich vom Verhältnis des mobilen Puffers gegenüber dem statischen Puffer abhängt. Ist das Verhältnis zu Gunsten des statischen Puffers verschoben, ist während eines depolarisierenden Pulses mit Depletion zu rechnen, da nicht schnell genug Protonen

aus dem statischen Puffer nachgeführt werden können. Es käme trotz ausreichender, hoher Pufferkonzentration zu einer messbaren Depletion des Protonenstroms.

Hier gibt es vieles zu beachten. Der Diffusionskoeffizient von Protonen wird durch Puffer - egal welchen Typs - augenblicklich herabgesetzt. Will man aber Protonenströme messen, so kann man aus der oberen Rechnung erkennen, dass ohne Puffer solche Messungen unmöglich wären. Zudem verfügt eine Zelle über endogene Puffer. Die Frage, ob man im "perforated Patch" ohne Ammonium als mobilen Puffer physiologische Protonenströme messen kann, ist abhängig vom Messprotokoll und somit weder zu bejahen noch zu verneinen.

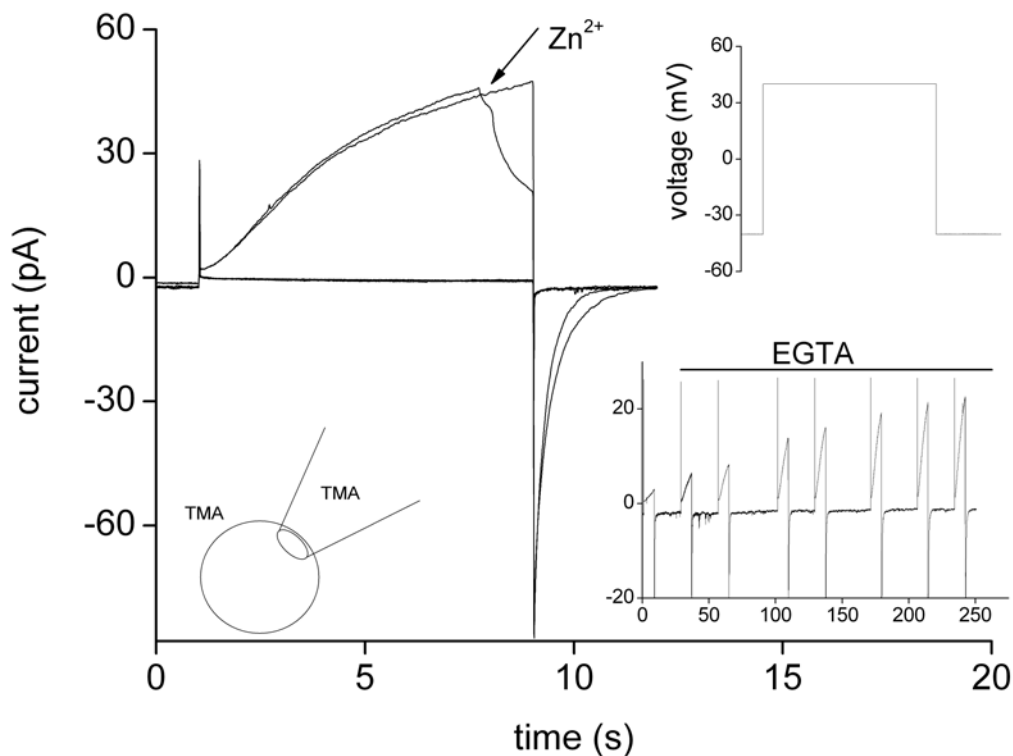
Diese Textpassage in der Diskussion soll dem Leser eine Vorstellung vermitteln über die Abhängigkeit der Messungen vom Verhältnis Protonenkonzentration zu Pufferkonzentration. Sie geht aber nicht auf die verschiedenen Puffertypen in der Zelle ein.

Rechnet man mit 25 mM endogenem, mobilem Puffer, dann wären nach der Rampe 8,88% des Puffers deprotoniert.

Aus den Puffertypen lässt sich zudem ableiten, dass es intrazellulär zu verschiedenen lokalen Protonengradienten kommen kann.

14. Seite 67 Abbildung 42

Die Wirkung von Zinkionen ist instantan. Die Zinkionen sollten sofort alle Protonenströme inhibieren. Sowohl Tail- als auch Auswärtsströme sollten inhibiert werden. Bei der Erzeugung der Abbildung ist die Datenzuordnung verwechselt worden. Die berichtigte Abbildung ist nachfolgend wiedergegeben.



Literatur

1. Junge, W., and McLaughlin, S. (1987) *Biochim Biophys Acta* **890**(1), 1-5