

**Mechanismen des vermittelten und nicht-vermittelten Transportes
einer amphiphilen Phosphonat-Sonde (NDP₂)
in der Erythrozytenmembran**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Thorsten Oliver Sieberg
aus
Aachen

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. B. Deuticke

Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. nat. G. Buse

Tag der mündlichen Prüfung: 27.3.2007

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.**

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Deuticke für die interessante Themenstellung sowie für die intensive und geduldige Betreuung. Ich empfand es stets als Privileg, unter seiner Leitung meine Dissertation durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. G. Buse danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herzlich danke ich Herrn Dr. Cees Haest für viele wertvolle Anregungen und interessante Diskussionen sowie die Überlassung experimenteller Daten. Die enge Zusammenarbeit mit ihm hat in erheblichem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei den Institutsangehörigen bedanke ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die praktische Unterstützung. In diesem Zusammenhang gilt mein aufrichtiger Dank Frau Dietrun Kamp, Herrn Dr. Stefan Voswinkel und insbesondere Frau Barbara Poser. Über die fachliche Zusammenarbeit hinaus war das freundschaftliche Miteinander für mich immer Motivation und Hilfe.

Weiterhin danke ich meinem Schwiegervater, Herrn Dr. Alfons Weiß, der durch seine vielseitigen Kenntnisse eine wichtige Kontrollinstanz verkörperte, und meiner Mutter Elfriede Sieberg, die im weitesten Sinne für meine medizinische Laufbahn mitverantwortlich ist.

Der größte und persönlichste Dank jedoch gilt meiner Frau Silvia, ohne deren Liebe und Unterstützung ich weder beruflich noch menschlich dort stehen würde, wo ich heute stehe. Sie und meine beiden Söhne Jona und Luca sind der Mittelpunkt meines Lebens.

Inhaltsverzeichnis

1.	Grundlagen	8
1.1	Biomembranen	8
1.2	Der Aufbau der Erythrozytenmembran	11
1.3	Der Anionentransporter AE1	12
1.4	Fragestellung	14
2.	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Präparation der Erythrozyten.....	17
2.2.2	pH-Einstellung	17
2.2.3	Vorbehandlung der Erythrozyten.....	17
2.2.4	Hemmung AE1-vermittelter Transporte durch Zugabe von 4,4'- Dinitrostilben-2,2'-disulfonsäure (DNDS).....	18
2.2.5	Synthese der Fluoreszenz-Sonde 10-(Naphth-1yl)-1- decanphosphonat (NDP ₂); Dinatriumsalz	18
2.2.6	Messung der Einwärtstranslokation von NDP ₂	20
	<i>Prinzip</i>	20
	<i>Beladung der Erythrozyten mit NDP₂</i>	20
	<i>Inkubation</i>	21
	<i>Fluoreszenzmessung</i>	21
2.2.7	Messung der Translokation von NDP ₂ von der Innen- in die Außenschicht der Membran (Flop).....	23
2.2.8	Hämolysemessungen	23
2.2.9	Veränderung des transmembranären Chlorid-Gradienten	24
2.2.10	Veränderung des transmembranären Kalium-Gradienten	25
2.2.11	Zugabe zweiwertiger Kationen	25
3.	Ergebnisse	26
3.1	Charakterisierung der Fluoreszenz-Sonde NDP₂	26
3.2	Translokation der Sonde von der Außen- in die Innenschicht der Membran (Flip)	27

3.2.1	Hemmung des Flip durch 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (DIDS)	28
3.3	Konzentrationsabhängigkeit des Flip von NDP₂	30
3.4	Temperaturabhängigkeit des Flip von NDP₂	32
3.5	pH-Abhängigkeit des Flip von NDP₂	34
3.6	Hemmung der AE1-vermittelten Komponente des Flip von NDP₂	36
3.6.1	Nicht-kovalent bindende Inhibitoren	36
	4,4'-Dinitrostilben-2,2'-disulfonsäure (DNDS)	36
	Nifluminsäure	37
	Merocyanin 540	37
	Dipyridamol	37
3.7	Translokation der Sonde NDP₂ von der Innen- in die Außenschicht der Membran (Flop)	38
3.8	Einfluss von Modifikationen des Grenzflächenpotential-bedingten Transbilayer-Potentials auf den Flip von NDP₂	39
	Natrium(Sodium)-dodecyl-sulfat (SDS)	41
	Laury-Sulfobetain, Zwittergent-12 (SB 12)	41
	Dodecyl-Maltosid (DM)	42
	Dodecyltrimethylammonium-Bromid (DTAB)	42
	Lyso-Phosphatidyl-Serin (Lyso-PS)	42
	Hexadecansulfonat /Tetradecansulfonat (HDS/TDS)	43
3.9	Einfluss veränderter transmembranärer Ionengradienten und des Membran-(Nernst)-Potentials auf den Flip von NDP₂	46
3.9.1	Einfluss veränderter Chlorid-Gradienten	47
3.9.2	Einfluss veränderter Kalium-Potentiale	53
3.10	Effekte zweiwertiger Kationen auf den Flip von NDP₂	56
3.10.1	Calcium	56
3.10.2	Zink	64
3.10.3	Mangan	68
4.	Diskussion	75
4.1	Ein- und Auswärtstranslokation (Flip/Flop) der Sonde NDP₂	75
4.2	Vergleich der beiden Sonden NDP₁ und NDP₂	76

4.3	Unterschiedliche stationäre Verteilungen der Sonde NDP₂ und anderer Sonden	79
4.4	Einfluß des pH.....	84
4.5	Effekte von Calcium-Ionen auf den Flip von NDP₂.....	87
4.6	Effekte anderer zweiwertiger Metall-Ionen	88
4.6.1	Zink	88
4.6.2	Mangan	89
5.	Zusammenfassung.....	91
6.	Literatur	95

Appendix

Curriculum vitae

Verzeichnis der sachbezogenen Abkürzungen

A23187	Ionophor A23187
AE1	„Anionenaustauscher 1“ (anion exchanger 1)(Bande 3)
BSA	Rinder-Serumalbumin (Bovine Serum Albumin)
D	Diffusionskoeffizient
Da	Dalton
DM	Dodecyl-Maltosid
DENSA	5-(N-Decyl)aminonaphthalin-2-sulfonsäure (C 10)
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-stilben-2,2'-disulfonsäure
DNDS	4,4'-Dinitrostilben-2,2'-disulfonsäure
DTAB	Dodecyltrimethylammonium-Bromid
E _a	Arrhenius-Aktivierungsenergie
EZR	Extrazellulär-Raum
FI	Fluoreszenzintensität
HDS	Hexadecansulfonsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'(3-propansulfonsäure)
Hkt	Hämatokrit
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
IZR	Intrazellulär-Raum
k _{in} ; k _{out}	Geschwindigkeitskonstante der Einwärts- bzw. der Auswärtstranslokation
KNPS	Kaliumchlorid-Natriumchlorid-Phosphat-Saccharose
LPM	Lysophosphatidylmethanol (C 16)
M	Molarität
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NBD-PC	1-Oleoyl-2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminohexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholin
NDP ₁	10-(Naphth-1yl)-1-decylphosphorsäure
NDP ₂	10-(Naphth-1yl)-1-decanphosphonsäure
NEM	N-Ethylmaleimid
NHD ₄	Natriumchlorid-HEPES-Dextran 4000
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-[2-ethansulfonsäure]
PL	Phospholipide
PS	Phosphatidylserin
RT	Raumtemperatur

S _e	Sondengehalt im Außenblatt der Membran
S _i	Sondengehalt im Innenblatt der Membran
SDS	Natriumdodecylsulfat (C 12)
SB-12	Lauryl-Sulfobetain
SM	Sphingomyelin
TAPS	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropansulfonsäure
TDS	Tetradecansulfonat

1. Grundlagen

1.1 Biomembranen

Heutzutage hat die Erforschung von Biomembranen in der Wissenschaft einen bedeutenden Stellenwert: Biologische Membranen sind einerseits die Voraussetzung für Integrität und Individualität einer Zelle, andererseits dienen sie als Mediator zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum, als Übermittler interzellulärer Signale sowie als Transporter von Botenstoffen und Elektrolyten. So ist das Verständnis der Eigenschaften und Funktionen von Biomembranen ein wichtiger Bestandteil der Erforschung biologischer Prozesse.

Das Bild von Biomembranen ist im Grundsatz immer noch geprägt durch das „Fluidmosaic-Model“ von Singer und Nicholson aus dem Jahr 1972¹. Nach diesem Modell ist ein Phospholipid-Bilayer die Grundstruktur einer Biomembran, in die Proteine eingebaut sind, welche entweder die Membran ganz durchspannen (intrinsische Proteine) oder nur angelagert bzw. teil-eingelagert sind (extrinsische Proteine). Die Aufgaben solcher Membran-Proteine reichen von Transportvorgängen über Signal-Erkennung bzw. Signal-Transduktion bis hin zur Zell-Identifikation. Zum Extrazellulärraum hin sind an viele Proteine Kohlenhydrat-Reste gebunden, die einen sogenannten „fuzzy coat“ bilden und die Antigenität einer Zelle mitbestimmen. Zur intrazellulären oder endofacialen Seite hin beteiligen sich die Membran-Proteine am Aufbau einer submembranären, netzartigen Struktur, die auch als Membranskelett bezeichnet wird.

Als Struktur-Elemente der Membran-Matrix dienen vor allem die Phospholipide. Dies sind amphiphile Moleküle, deren Variabilität in der Länge der hydrophoben Fettsäureketten bzw. in dem der Phosphatgruppe angegliederten hydrophilen Rest begründet ist. Aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften haben Phospholipide die Tendenz, sich in einem wässrigen Medium zu Micellen bzw. Doppel-Schichten anzuordnen, bei denen sich die hydrophilen Kopfgruppen zur Wasserphase ausrichten und die hydrophoben Anteile sich zu wasserfreien Zonen zusammenlagern und eine lipophile Mittelschicht bilden. Für eine optimale „Passform“ der Phospholipide ist allerdings ein weiterer Struktur-Baustein notwendig – das Cholesterin. Zwischen den Phospholipiden eingelagert, fungiert das Cholesterin als Stabilisator, indem es sperrige Eigenschaften mancher Phospholipid-Spezies, die zu Packungsdefekten führen könnten, ausgleicht und so unter anderem Einfluss auf die Fluidität der Membran nimmt. Durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Membran-„Bausteine“ ergeben sich naturgemäß unterschiedliche

funktionelle Eigenschaften der Membranen. Die Unterschiede bestehen nicht nur zwischen den Membranen verschiedener Zell-Typen oder den verschiedenen intrazellulären Organellen und der Plasma-Membran, sondern ebenfalls zwischen den beiden Blättern einer Membran. Sogar innerhalb eines Blattes existieren Domänen², deren Funktion z.T. noch nicht geklärt werden konnte.

Die einzelnen Phospholipid-Moleküle eines Membran-Bilayers sind in mehrfacher Weise beweglich: Zum einen sind sie in der Lage, sich wie „Seerosen auf einem Teich“ in ihrer Schicht der Membran zu bewegen (laterale Diffusion), zum anderen können sie von einer Schicht des Lipidlayers in die andere „springen“ (transversale Diffusion oder auch transversale Reorientierung). Geschieht das Springen von außen nach innen, so bezeichnet man es als „Flip“, findet der Wechsel von innen nach außen statt, bezeichnet man es als „Flop“. Diese Vorgänge können nicht-vermittelt, aber auch vermittelt durch Membranproteine ablaufen. Beim Protein-vermittelten Flip/Flop gelangen Phospholipide als struktureller Bestandteil der Membran aus ihrer Position in der Membran zur Bindungsstelle eines Transport-Proteins und werden durch eine Konformationsänderung um die Membranebene geschwenkt. Da die Anordnung der Phospholipide in der Membran nach dem Transport im Vergleich zur Ausgangsposition gegensinnig ist, gleicht der Vorgang einer Spiegelung. Im Gegensatz zu diesem vermittelten Transport findet der gleiche Positionswechsel nicht-vermittelt, d.h. als spontaner Vorgang ohne Beteiligung von Membranproteinen, statt. Diese Form der Translokation ist ebenfalls in beide Richtungen möglich und wird im Folgenden als Flip bzw. Flop über die *Lipidphase* bezeichnet. Der Vollständigkeit halber ist als dritte Bewegungsart der Phospholipide die sehr schnelle rotatorische Bewegung um die eigene Achse zu nennen.

Die Rate der transversalen Reorientierung der Membran-Phospholipide, d.h. ihr Wechsel von der Innen- in die Außenschicht oder umgekehrt, ist ohne vermittelnde Membranproteine sehr gering. So werden in künstlichen Membranen, die nur aus einer Lipid-Spezies bestehen, Halbwertszeiten des Flip-Flop im Bereich von Tagen gemessen.³ Durch Einbau von Proteinen kann jedoch die Flip-Flop-Rate des (nicht eigentlich Protein-vermittelten) Transportes erhöht werden.⁴ Auch eine „Auflockerung“ der Membran, z.B. durch Einlagerung von Alkoholen, führt zu einer Steigerung der Rate des nicht-vermittelten Transportes. Für natürliche Membranen, denen das Modell eines Phospholipid-Bilayers mit eingebauten Proteinen entspricht, werden z.T. Halbwertszeiten für einfache Flip-Prozesse von Stunden gefunden.^{5,6}

Neben diesem intramembranären Austausch finden jedoch auch transmembranäre Transportvorgänge statt. Wasser bzw. wasserlösliche Moleküle können die Lipidphase der Biomembranen auf dem Weg der einfachen Diffusion durchqueren.

Der Permeabilitätskoeffizient, welcher über die Fähigkeit einer Verbindung die Lipidphase einer Membran zu permeieren, Auskunft gibt, hängt u.a. vom Membran-Wasser-Verteilungskoeffizienten ab. Ist dieser – wie bei hydrophilen Verbindungen - niedrig, bedeutet dies, dass die Verbindung sich hauptsächlich in der Wasserphase des Extrazellulärraumes befindet. Ist er hoch, baut sich die Verbindung zu einem Großteil in die Membran ein. Ungeladene lipophile Verbindungen weisen einen hohen Membran-Wasser-Verteilungskoeffizienten auf. Hieraus resultiert ein ebenfalls hoher Permeabilitätskoeffizient. Der Verteilungskoeffizient für kleine Ionen wird zusätzlich durch Faktoren wie Ladungsstärke (z) und Radius (r) der Ionen, sowie von den Dielektrizitätskonstanten der jeweiligen Medien beeinflusst. Für die Verteilung zwischen einer Wasser- bzw. Lipidphase ergeben sich für Ionen in der Regel geringe Verteilungskoeffizienten und folglich geringe Permeabilitätskoeffizienten an Lipid-Membranen.

Amphiphile Moleküle, d.h. Moleküle, die einen hydrophoben und einen hydrophilen bzw. sogar ionischen Anteil besitzen, nehmen eine Zwischenposition ein. Für sie gibt es unterschiedliche Wege, eine Biomembran zu penetrieren. Einerseits können sie die Membran-Barriere ebenfalls durch (transversale) Diffusion über die Lipidphase überwinden. Faktoren, die auf das Ausmaß dieses Transportweges Einfluss nehmen, sind zum einen der oben genannte Verteilungskoeffizient, zum anderen die Energie, die nötig ist, um die polare Gruppe der Verbindung über die hydrophobe Mittelschicht der Membran zu transportieren. Andererseits können Amphiphile mit einem geringen Membran-Wasser-Verteilungskoeffizienten, d.h. geringer Lipidlöslichkeit, auch Transport-Proteine benutzen, die in erster Linie dem Transport von hydrophilen Molekülen dienen.

Es gibt verschiedene Protein-Arten, die am transmembranären Stofftransport beteiligt sind. Einerseits die Kanal-Proteine und Porine, deren Aufbau und Funktion im Prinzip einem wassergefüllten Kanal ähneln. Hier findet der Transportvorgang ohne Konformationsänderung des Proteins statt. Andererseits die Gruppe der Transporter. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass das Substrat durch eine strukturelle Veränderung des Proteins über die Membran transportiert wird. Die Familie der Transport-Proteine kann aufgrund weiterer Merkmale - wie z.B. der Energieabhängigkeit - noch in Untergruppen wie „Pumpen“ (aktiver Transport) und „Carrier“ (passiver Transport) unterteilt werden. Größtenteils werden durch diese beiden Arten der Transport-Proteine kleine wasserlösliche Elektrolyte und Nicht-Elektrolyte transportiert. Andere Vertreter dieser

Gruppe sind aber auch für den Transport von Phospholipiden und anderen langkettigen Amphiphilen zwischen den Membranblättern verantwortlich. Beispiele sind die Flippase^{7,8} und die durch Ca^{++} aktivierbare Scramblase^{9,10}. Unter diesen Transport-Molekülen existieren aber offensichtlich Spezies, die in der Lage sind, beide Substrat-Arten - kleine, wasserlösliche Ionen bzw. Verbindungen, aber auch langkettige Amphiphile - zu transportieren. Erstere gelangen aus der Wasserphase an das Protein, letztere gelangen erst nach Einbau in die Membran an eine „transport-site“ des Proteins. Über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede des jeweiligen Transportvorgänge besteht noch Unklarheit.

1.2 Der Aufbau der Erythrozytenmembran

Der Erythrozyt und seine Zellmembran sind geeignete Objekte für die Membranforschung. Durch die Kernlosigkeit des Erythrozyten und das Fehlen von Zellorganellen wird die Untersuchung von Transportfunktionen seiner Membran und die Interpretation der Ergebnisse erleichtert. Eine weitere vorteilhafte Eigenschaft, besonders für die praktische Durchführung von Experimenten, ist die relativ hohe Toleranz der Zelle gegenüber mechanischer Belastung. Ursache hierfür ist das Membranskelett: Dieses überwiegend aus Spektrin und Actin bestehende Geflecht ist zwar bei allen Zellen vorhanden, bei den roten Blutkörperchen jedoch besonders ausgeprägt. Hinzu kommt, dass ein eigentliches Zytoskelett fehlt. Die Erythrozyten-Membran selbst ist außerdem relativ einfach aufgebaut: Der Anteil der jeweiligen Struktur-Elemente ist, ausgedrückt in Massen-Prozent, folgender: Proteine ca. 51 %, Lipide ca. 42 %, Kohlenhydrate ca. 7 % (Abb. 1).¹¹ Der Lipid-Anteil beträgt ca. 45 % Cholesterol und 55 % Phospholipide (Quotient des molaren Verhältnisses Cholesterol/Phospholipide = 0,8).¹² Die in den PL der Erythrozytenmembran enthaltenen Hauptgruppen sind Phosphatidylcholin (PC) mit ca. 29 %, Sphingomyelin (SM) mit ca. 25 %, Phosphatidylethanolamin (PE) mit ca. 30 % und Phosphatidylserin (PS) mit ca. 13 % Massenanteil.^{13,14} Außerdem ist das mit ca. 3-4 % in den PL vertretene Phosphatidyl-Inositol zu erwähnen, das in vielen Zellen eine wichtige Rolle in der Signal-Transduktion spielt.¹⁵

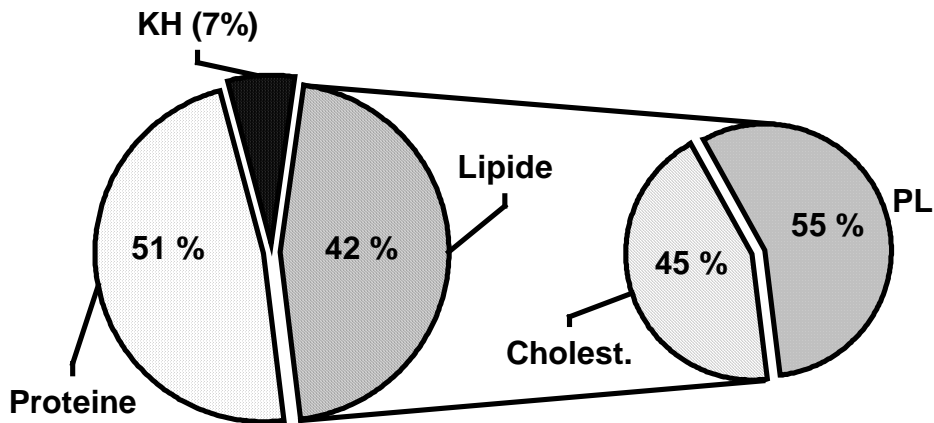


Abb. 1: Prozentuale Massenanteile der verschiedenen Membranbestandteile an Erythrozyten. Proteine, Kohlenhydrate (KH), Cholesterin (Cholest.) und Phospholipide (PL).

Ein besonders wichtiger Punkt ist die Asymmetrie, in der die genannten Phospholipidgruppen auf die beiden Membranblätter der Plasmamembran der Erythrozyten verteilt sind. Die Amino-Phospholipide PE und PS befinden sich im Normalzustand überwiegend bzw. ausschließlich im Innenblatt, PC und SM überwiegend im Außenblatt. Besonders PS steht, sobald es in das Außenblatt der Membran gelangt, im Zusammenhang mit prokoagulatorischen Eigenschaften der Erythrozyten und dem Abbau von alten oder apoptotischen Zellen durch Makrophagen.¹⁶

Wie Abb. 1 zeigt, sind neben den Phospholipiden und Lipiden auch die Proteine ein wichtiger Bestandteil der Erythrozytenmembran. Von besonderem Vorteil für die vorliegenden Untersuchungen ist die - im Vergleich zu anderen Zellen - deutlich höhere Anzahl an AE1-Molekülen.

1.3 Der Anionentransporter AE1

Das intrinsische Glykoprotein AE1 (auch „capnophorin“ oder „Bande-3-Protein“) der Human-Erythrozyten gehört zu einer Superfamilie von Anionen-Transportern und liegt laut früheren Arbeiten in einem Gleichgewicht von Dimeren und Tetrameren in einer Konzentration von 10^6 Monomeren pro Zelle vor.¹⁷ Es besteht aus 911 Aminosäuren und besitzt zwei Domänen: Eine Membran-Domäne mit ca. 55 kDa sorgt zum einen durch ihre Lipophilie für die Verankerung im Bilayer, zum anderen bildet sie einen Transportweg für Anionen. Diese Domäne durchspannt die Membran mehrfach mit 12-14 Helices¹⁸. Eine

zweite, zytoplasmatische Domäne von ca. 45 kDa ist unter anderem zuständig für die Bindung an das Membranskelett durch Interaktion mit den Ankerproteinen Ankyrin und Bande 4.1 und nimmt hierüber ebenfalls Einfluss auf die laterale Mobilität des AE1-Proteins in der Lipidschicht¹⁹. Am Anionentransport ist diese Domäne jedoch nicht beteiligt.²⁰

Seine biologische Hauptaufgabe hat das früher nach seiner Position in der SDS-Gel-Elektrophorese von Membran-Proteinen benannte AE1-Protein (Bande 3) im elektro-neutralen Austausch von Chlorid gegen Bikarbonat. Letzteres ist die überwiegende Transportform für CO₂ im menschlichen Blut-Kreislauf. Zusätzlich transportiert AE1 eine Vielzahl anderer Anionen, bis hin zu Phosphaten und Sulfaten. In geringerem Maße werden ebenfalls anionische Metall-Komplexe und Monocarboxylate wie Lactat transportiert. Die Spezifität des Proteins für sein anionisches Substrat hängt von dessen Wertigkeit, dreidimensionaler Struktur und Größe ab. Sie findet ihren Ausdruck in der maximalen Transportrate²¹. Der durch eine Konformationsänderung katalysierte Transport von Anionen durch AE1 findet im „asynchronen Antiport“ mit anderen Anionen statt und wird auch als Ping-Pong-Mechanismus bezeichnet. Wie bereits beschrieben (s.o.), erfolgt die Annäherung des Substrates bei dieser Art des Transportes aus der Wasserphase des Extrazellulärraumes bzw. des Zytosols. Nach erfolgtem Transport wird das Substrat in die gegenseitige Wasserphase freigesetzt. Wie bei allen Carrier-vermittelten Vorgängen ist die Transport-Kapazität von der Anzahl der Transporter in der Membran und ihrer Umsatzzahl (turnover number) abhängig, weist somit eine Sättigungscharakteristik auf und ist zudem hemmbar. Eine weitere Eigenschaft des Carrier-vermittelten Transportes ist das Phänomen der Konkurrenz verschiedener Substrate um den Bindungsplatz am Protein.

Neben diesem Austausch-Transport besteht die Alternative eines elektrogenen Nettotransportes von Anionen über AE1. Hierbei findet ein Nettotransport von Ladung ohne Konformationsänderung, sondern per Diffusion durch einen Kanal innerhalb des AE1-Moleküls statt. Dieser Nettotransport ist verantwortlich für die hohe Chlorid-Leitfähigkeit der Erythrozytenmembran und trägt damit entscheidend zum nativen Membranpotential der Zelle von ca. 9 mV (innen negativ) bei.

Waren bis vor einiger Zeit hauptsächlich die oben beschriebenen Funktionen von AE1 als transmembranärer Transporter kleiner hydrophiler Anionen bekannt, erkannte man neuerdings die Funktion als Vermittler des intramembranären Transportes langkettiger, amphiphiler Anionen. Vondenhof et al.²² und Ortwein⁶¹ konnten AE1 als Flippase identifizieren und stellten u.a. fest, dass der AE1-vermittelte Flip durch Stoffe partiell hemmbar ist, die auch den Transport kleiner polarer Anionen über AE1 hemmen. Des

weiteren fanden sie heraus, dass dabei in der Regel ein AE1-vermittelter und ein nicht-vermittelter, d.h. ohne Hilfe eines Carriers ablaufender Transportanteil parallel geschaltet sind. Serra et al.²³ konnten diesen zusätzlichen Transportmechanismus von AE1 anhand ihrer Untersuchungen mit NBD-markierten anionischen Phospholipiden bestätigen, zeigten jedoch, dass zwischen mono- und bi-anionischen Verbindungen Unterschiede in Flip-Rate, Hemmbarkeit, pH-Abhängigkeit und stationärem Verteilungsgleichgewicht bestehen. Zusätzlich wurde ein Flip-beschleunigender Effekt von Papain auf AE1, im Gegensatz zu seinem hemmendem Einfluss auf den AE1-vermittelten Transport kleiner hydrophiler Anionen, gefunden. Kleinhorst et al.²⁴ studierten schließlich den Transport einer eigens synthetisierten Phosphat-Sonde (NDP₁, s.u.), deren Vorteil die einfache Struktur und die größere physiologische Bedeutung des Phosphat-Restes im Vergleich zu den von Ortwein et al.³³ verwendeten Sulfonat-Sonden ist. Als weiterer Vorteil stellte sich heraus, dass diese Sonde, im Gegensatz zu den früher benutzten Verbindungen, die z.T. einen hohen Anteil an nicht AE1-vermittelten Transport aufweisen, praktisch ausschließlich (95 %) über AE1 transportiert wird. Als Nachteil der Sonde NDP₁ zeigte sich jedoch, dass sie einer intraerythrozytären Hydrolyse unterliegt, die genaue Messungen und die Auswertung der Daten erschwert.

1.4 Fragestellung

Die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und dem Einsatz der verwendeten Sonde gaben die Resultate der Translokations-Studien von Kleinhorst (1997) mit der Phosphorester-Sonde Phosphorsäure-mono-(10-(naphth-1yl)-decan-1-yl)-ester (NDP₁). Angaben, die sich im folgenden auf NDP₁ beziehen, sind der Dissertation²⁵ bzw. der Publikation²⁴ von Kleinhorst entnommen. Wie dort beschrieben, wird diese anionische Sonde (NDP₁) nach Einbau in das Innenblatt der Erythrozytenmembran hydrolytisch gespalten. Zwar konnte mit Vanadat, einem Proteinphosphatase-Inhibitor, die Hydrolyse von NDP₁ weitgehend unterbunden werden, trotzdem erschwerte dieser Faktor die Untersuchungen. Um diese Störgröße gänzlich zu eliminieren, wurde ein nicht hydrolyse-empfindliches Phosphonat-Analog von NDP₁ (NDP₂) synthetisiert und auf seine Translokations-Charakteristika untersucht (siehe Abb. 5, S.26). Die Synthese (Synthেসevorschrift siehe Kapitel 2.2.5 und Appendix) wurde von Dr. Eva Herman entwickelt. Sie stellte das Produkt freundlicherweise für diese Untersuchungen zur Verfügung.

Im Einzelnen wurde die AE1-vermittelte und die nicht-vermittelte Translokation von NDP₂ analysiert und diese Prozesse mit denen der Phosphat-Sonde NDP₁ verglichen. Neben der Bedeutung des pH-Wertes, der Temperatur, des Oberflächen-Potentials und des Membran-Potentials für die Flip-Kinetik und die stationäre Verteilung der Sonde zwischen Außen- und Innenblatt wurden die Einflüsse von Calcium(Ca⁺⁺)- und Schwermetall-Ionen [Mangan(Mn⁺⁺)- und Zink(Zn⁺⁺)-Ionen] untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob NDP₂ durch ein weiteres Membran-Protein, die sog. Scramblase, transportiert werden kann.

Der Hauptzweck der Studie war die weitere Erforschung der Funktion von AE1 als Flippase. Dabei sollten u.a. die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Transportmechanismen von AE1 für langkettige Amphiphile und kleine hydrophile Anionen charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Aqua bidest wurde aus einer „Millipore“-Vorrichtung entnommen.

Als spezielle Agentien (Hersteller in Klammern) standen zur Verfügung: DIDS* (Calbiochem); NEM (Fluka); EDTA (Merck); BSA V (Paesel und Lorei); SDS, Dextran 4 (Serva); DTAB (Eastman); DNDS (Pfaltz&Bauer); Chloroform (Baker); Ionophor A23187, Valinomycin, Papain, Ortho-Vanadat, Lauryl-Sulfobetain, Dodecylmaltosid (Sigma).

Folgende Puffer-Substanzen wurden von Sigma (München) bzw. Merck (Darmstadt) in der Qualität „pro analysi“ oder - wie auch alle nicht aufgeführten Substanzen - in einem entsprechenden Reinheitsgrad bezogen: HEPES, PIPES, MES, TAPS, BIS-TRIS.

Die verwendeten Erythrozyten stammten aus der Blutbank des Aachener Universitätsklinikums. Die von dort bezogenen Erythrozyten-Konzentrate waren aus mit Citrat antikoaguliertem Blut isoliert und maximal 14 Tage alt. Die Aufbewahrung erfolgte bei ca. 7 °C.

Die verwendeten Medien (eingestellt auf pH 7,4, Konzentrationsangaben in Klammern in mmol/l) waren:

KNPS:

KCl (90), NaCl (45), Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (12,5), Saccharose (44)

NHD₄:

NaCl (45), HEPES (10), Dextran 9 %

KNS + Puffer :

KCl (90), NaCl (45), Saccharose (44) + Puffer (10) für den jeweiligen pH-Bereich:

<u>pH-Bereich</u>	<u>Puffersubstanz</u>
5,6 – 6,4	MES
6,5 – 7,4	MES, BIS-TRIS, HEPES, PIPES
8,4	TAPS

* Abkürzungen siehe S. 4

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der Erythrozyten

Das aus der Erythrozyten-Konserve entnommene Erythrozyten-Konzentrat wurde im ca. dreifachen Volumen Natriumchlorid-Lösung suspendiert, mit einem Rührspatel durchmischt und bei 6.000 U/min für 5 min zentrifugiert (Sigma 3 E). Der Überstand wurde abgesaugt. Diese Abfolge wird im weiteren als „waschen“ bezeichnet. Der Vorgang wiederholte sich noch zweimal. Abschließend wurde bei 12.000 U/min für ca. 8 min zentrifugiert (Sigma 2 MK) und der Überstand abgesaugt.

2.2.2 pH-Einstellung

Die Erythrozyten wurden in KNPS entsprechend einem Hämatokrit von ca. 10 % suspendiert und im Wasserbad auf die jeweilige Versuchstemperatur vorgewärmt bzw. abgekühlt. Dann wurde durch stufenweise Titration mit HCl und NaOH (verschieden konzentrierte Stammlösungen) unter pH-Kontrolle der gewünschte pH-Wert eingestellt, danach im Schüttelwasserbad für 5-10 min inkubiert und erneut gemessen. Die Einstellung des pH-Wertes war abgeschlossen, sobald der einzustellende Wert über einen Kontroll-Zeitraum von ca. 10 min keine signifikante Veränderung mehr zeigte. Abschließend wurde bei 6.000 U/min (Heraeus Labofuge GL) ca. 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

2.2.3 Vorbehandlung der Erythrozyten

Vorbehandlung mit dem kovalenten Inhibitor 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS)

Die Erythrozyten wurden nach dem Waschen zunächst in KNPS auf pH 7,4 eingestellt und danach abzentrifugiert. Im Anschluss wurden sie bei einem Hämatokrit von 10 % (3 ml Zellen zu 27 ml Medium) in KNPS (pH 7,4) und einer DIDS-Konzentration von 50 μ M (150 μ l einer 10 mM Stammlösung in Ethanol auf 30 ml Suspension) bei 37 °C für 45 min im Schüttelbad inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit KNPS gewaschen und die abzentrifugierten Erythrozyten bis zur Weiterverwertung bei 0 °C aufbewahrt.

Bei Versuchen mit pH-Werten, die vom Standard-pH-Wert 7,4 abwichen, wurde zunächst der jeweilige pH-Wert eingestellt, danach folgte eine 60-minütige verlängerte DIDS-Vorbehandlung.

Vorbehandlung mit N-Ethylmaleimid (NEM)

Die Erythrozyten wurden bei 37 °C und einem Hämatokrit von 10 % in KNPS und einer NEM-Konzentration von 0,8 mM für 20 min im Schüttelbad inkubiert. Die benötigte NEM-Stammlösung war jeweils frisch angesetzt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit KNPS gewaschen und bei 0 °C bis zur Weiterverwertung aufbewahrt. Bei Kombination von DIDS- u. NEM-Vorbehandlung erfolgte zunächst die NEM-, danach die DIDS-Vorbehandlung.

Vorbehandlung mit Papain

Um eine vollständige Auflösung zu gewährleisten, erfolgte eine 10-minütige Behandlung der Papain-Suspension im Ultraschallbad. Außerdem wurde zur Aktivierung der Protease Cystein in einer Endkonzentration von 4 mM in die Erythrozyten-Suspension gegeben. Die Erythrozyten wurden dann entsprechend einem Hämatokrit von 50 % in das Papain-/Cystein-haltige Medium aufgenommen und bei pH 7,4 und 37 °C für 1 h inkubiert.

Abschließend wurde bei 0 °C zweimal mit 0,2%iger BSA-Lösung und zweimal mit KNPS pH 7,4 gewaschen. Das verwendete Papain (enzymatische Aktivität: 21 Units /mg) hatte eine Konzentration von 1 mg/ml gepackter Erythrozyten.

2.2.4 Hemmung AE1-vermittelter Transporte durch Zugabe von 4,4'-Dinitrostilben-2,2'-disulfonsäure (DNDS)

Um eine Hemmung des AE1-abhängigen Transportes mit dem nicht-kovalent bindenden Inhibitor DNDS zu erreichen, wurde DNDS in einer Konzentration von 0,5 mM durch Einwiegen zum Flip-Medium (KNPS/NHD₄) gegeben.

2.2.5 Synthese der Fluoreszenz-Sonde 10-(Naphth-1yl)-1-decanphosphonat (NDP₂); Dinatriumsalz^a

Durch Reaktion von kommerziellem Naphthyldecanol mit Phosphortribromid in einer Methylenchloridlösung wird nach Extrahierung und Reinigung 10-(Naphthl-1yl)-1-brom-decan gewonnen (Abb. 2).

^a Synthesevorschrift von Dr. E. Herman ausgearbeitet

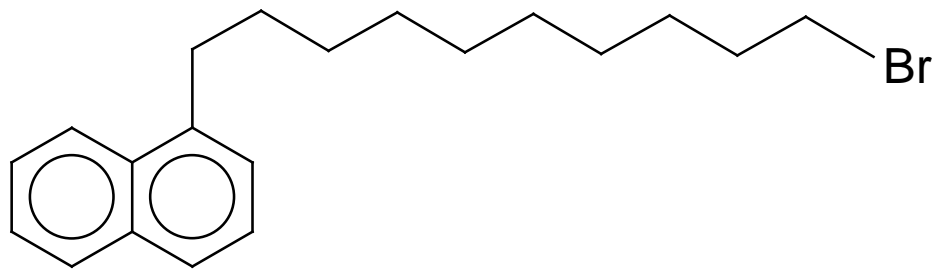


Abb. 2: 10-(Naphth-1yl)-1-brom-decan

Anschließend wird metallisches Natrium in n-Hexan gelöst und dazu erst Dibutylphosphit, später 10-(Naphth-1yl)-1-brom-decan zugegeben. Dabei erhält man durch eine Austauschreaktion über mehrere Zwischenschritte 10-(Naphth-1yl)-1-decanphosphonsäuredibutylester (Abb. 3).

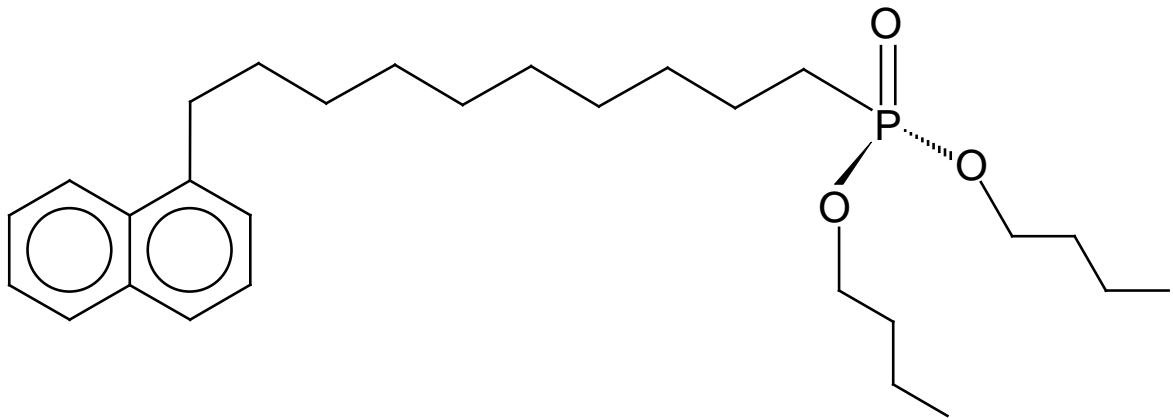


Abb. 3: 10-(Naphth-1yl)-1-decanphosphonsäuredibutylester

Hieraus entsteht durch Hydrolyse mit Hilfe von Natriumjodid und Trimethylsilylchlorid über das Zwischenprodukt Dibutylphosphonat nach Zugabe von Natriumthiosulfat, Ansäuerung mit Salzsäure, Ether-Extraktion und Auskristallisation das Endprodukt 10-(Naphth-1yl)-1-decanphosphonat (NDP₂) Dinatriumsalz (Abb.4) mit einer Reinheit von ≥ 98 %. Weitere Details zur Synthesevorschrift von NDP₂ finden sich in der Appendix.

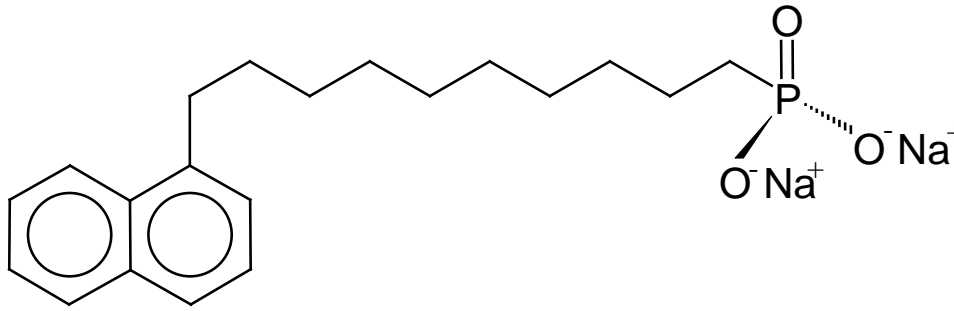


Abb. 4: 10-(Naphth-1yl)-1-decanphosphonat (NDP_2); Dinatriumsalz

2.2.6 Messung der Einwärtstranslokation von NDP_2

Prinzip

Die hier verwandte Messmethode gründet auf den Arbeiten von Mohandas et al.²⁶ und Bergmann et al.²⁷ sowie auf den Erfahrungen von Kleinhorst²⁴.

Das Prinzip beruht auf der selektiven Extrahierbarkeit der Sonde aus dem Außenblatt der Membran mit Hilfe von Serum-Albumin (BSA). Während einer bei tiefer Temperatur (0°C) erfolgenden Beladung mit NDP_2 baut sich die Sonde selektiv in das Außenblatt der Erythrozytenmembran ein, eine Translokation erfolgt aufgrund der niedrigen Temperatur zu diesem Zeitpunkt nicht. Nach Zugabe der Zellen zu dem Flip-Medium findet bei höheren Temperaturen ein Netto-Transport der Sonde in das Innenblatt der Membran statt, bis sich ein Verteilungsgleichgewicht einstellt. Stoppt man zu verschiedenen Zeitpunkten den Flip durch Abkühlen auf 4°C und suspendiert die Zellen in eiskaltem BSA, so wird der Teil der Sonde, der sich im Außenblatt der Membran (S_e) befindet, durch die hohe Affinität zum Serum-Albumin selektiv aus der Membran entfernt, da die Sonde im Innenblatt bei 4°C nicht ins Außenblatt übertritt.

Durch die nun folgende Hämolyse und Isopropanol-Extraktion kann der verbleibende Innenblatt-Anteil der Sonde durch Messung der Fluoreszenz des alkoholischen Extraktes quantifiziert und auf den initialen Gesamtgehalt der Sonde in der Membran bezogen werden.

Beladung der Erythrozyten mit NDP_2

Zu 1 ml eiskalten, gepackten Erythrozyten wurden 3 ml ebenfalls eiskaltes KNPS mit $67 \mu\text{M}$ NDP_2 ($50 \mu\text{l}$ einer $4,1 \text{ mM}$ Stammlösung in Aqua bidest) gegeben, so dass eine Endkonzentration der Sonde von $50 \mu\text{M}$ in der Suspension resultierte. Die Suspension wurde 5 min im Eiswasserbad unter mechanischer Durchmischung durch eine Rüttelmaschine inkubiert und anschließend ebenfalls bei 0°C abzentrifugiert. Der

Überstand wurde abgesaugt. Bis zur Weiterverwertung nach spätestens 10 min erfolgte die Aufbewahrung bei 0 °C.

Inkubation

Die beladenen Erythrozyten wurden durch Einspülung zu dem bereits auf die entsprechende Versuchstemperatur vortemperierten Medium gegeben und bei einem Hämatokrit von ca. 14 % (6 ml Medium, 1 ml Erythrozyten) im Schüttelbad inkubiert. Proben-Entnahmen erfolgten in der Regel nach 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 und 120 min. Die Messproben (300 µl) kamen in 1 ml eisgekühltes Medium (KNPS) in 3-ml-Reaktionsgefäßen. Darin wurden sie gemischt und zentrifugiert. Nach Absaugung des Überstandes wurde das verbleibende Zellsediment zweimal in 1 ml eisgekühlter 1%-iger BSA-Lösung jeweils 3 min inkubiert, jeweils abzentrifugiert und anschließend einmal mit KNPS (0 °C) gewaschen. Gemittelte Messwerte ergaben eine Restmenge von ca. 70 µl (Sediment plus restlicher Überstand), die in den Reaktionsgefäßen verblieb. Diese ließ sich bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur aufbewahren.

Zusätzlich zu diesen Proben wurden aus jedem Versuchsansatz nach ca. 30, 60, 90 und 120 min vier weitere Proben (sog. 100%-Werte) zur Bestimmung der Gesamtfluoreszenz abgenommen. Diese wurden ebenfalls in 1 ml eiskaltes KNPS gegeben, zentrifugiert und gewaschen, jedoch nicht mit BSA extrahiert. In Ansätzen mit Metall-Ionen wurde EDTA (2 mM) als Komplexbildner dem KNPS zugegeben, um artifizielle Veränderungen der 100%-Werte im Vergleich zu Ansätzen ohne Metall-Ionen zu vermeiden.

Fluoreszenzmessung

Das Zellsediment mit dem restlichen Überstand (ca. 70 µl) wurde mit 150 µl destilliertem Wasser versetzt, gemischt und 5 min bis zur vollständigen Hämolyse stehen gelassen. Die weitere Verarbeitung der Messproben erfolgte nicht in Kunststoffbehältern, sondern in Reagenzgefäßen und Küvetten (Hellma) aus Glas, um die von Kleinhorst²⁵ festgestellten Störungen durch Kunststoffmaterialien zu vermeiden.

Von dem Hämolysat der Proben wurden 150 µl in Glasreagenzgefäße überführt und mit 800 µl Isopropanol versetzt, erneut gemischt und 3 min stehen gelassen. Nachfolgend wurden zur Fällung des restliches Proteins 200 µl Chloroform hinzugegeben, durchmischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde in Glasküvetten überführt und die Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzspektrometer (Shimadzu RF-5001 PC) bestimmt.

Die 1-ml-Glasküvetten (Hellma) hatten in Anregungsrichtung eine Schichtdicke von 10 mm und in Emissionsrichtung eine Schichtdicke von 4 mm. Die Wellenlänge der Anregungsstrahlen betrug 281 nm, die Emission wurde bei 336 nm gemessen.

Der zeitabhängige Wert für die Sonden-Fraktion ($X_i(t)$) im Innenblatt der Membran ergab sich aus dem Quotienten der Fluoreszenzintensität der entsprechenden Proben nach Albumin-Extraktion (F_{alb}) und der Fluoreszenzintensität der gemittelten Gesamtwerte der Proben ohne Albuminextraktion (F_{tot}); also $F_{alb}/F_{tot}(t)$.

Um die Eigenfluoreszenz der nativen Erythrozyten-Bestandteile zu eliminieren, mussten die gemessenen Fluoreszenzintensitäten korrigiert werden. Hierzu wurden zwei Leerwerte, d.h. Proben unbeladener, ansonsten aber gleichbehandelter Erythrozyten, mitgeführt, die Messwerte der Fluoreszenzintensität dieser beiden Proben gemittelt und von den übrigen Messwerten subtrahiert.

Die für die Sonden-Innenblatt-Fraktion ermittelten Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen und an eine Reaktion 1. Ordnung, entsprechend einem Stoffaustausch in einem 2-Kompartimenten-System (Außen- und Innenblatt der Membran) angepasst. Aus der sich dabei ergebenden Kurve wurde rechnerisch eine Geschwindigkeitskonstante (k_1) abgeleitet. Für den Flip erfolgte die Berechnung der Kinetik nach folgender Formel (Serra et al.²³):

$$\left(\frac{S_i}{S_{tot}} \right) (t) = q \cdot [1 - \exp(-k_1 \cdot t)]$$

S_i = Sondenmenge im Innenblatt der Membran

S_{tot} = Sondenmenge im Innen- und Außenblatt der Membran

q steht für den Innenblattanteil der Sonde im stationären Zustand und k_1 beschreibt die Geschwindigkeitskonstante für die Einwärtstranslokation der Sonde. Da sich unterschiedliche Verteilungsgleichgewichte einstellten, musste die Konstante (k_1) korrigiert werden, indem man sie auf den jeweiligen Wert des Innenblatt-Anteiles der Sonde, der sich aus der Annäherung des Graphen an einen Maximalwert ermitteln ließ, bezog. Diese auf den Innenblatt-Anteil der Sonde bezogene Konstante $k_{in} = k_1 \cdot q$ charakterisiert die Geschwindigkeit der zeitabhängigen Umverteilung der Sonde NDP₂ vom Außenblatt ins Innenblatt der Membran.

2.2.7 Messung der NDP₂-Translokation von der Innen- in die Außenschicht der Membran (Flop)

Für Versuche zum Flop der Sonde, also zur Reorientierung vom Innen- zum Außenblatt der Membran, wurden die Zellen zunächst auf pH 7,4 eingestellt. Dann wurden sie bei einem Hämatokrit von 20 % und einer Sondenkonzentration von 41 µM 30 min bei 37 °C in KNPS inkubiert, so dass sich die Sonde zwischen beiden Blättern der Membran verteilen konnte. In Experimenten an DIDS-vorbehandelten Zellen wurde die Suspension anschließend auf einen Hämatokrit von 10 % verdünnt, DIDS in einer Konzentration von 50 µM zugeben und 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 0 °C dreimal gewaschen.

Nach der Sondenbeladung und ggf. der Vorbehandlung mit DIDS wurden die Zellen zweimal 3 min bei 0 °C mit BSA inkubiert und einmal bei 0 °C ohne Serum-Albumin gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurde der Flop der nur im Innenblatt verbliebenen Sonde ins Außenblatt der Membran verfolgt, indem nach verschiedenen Zeiten NDP₂ aus dem Außenblatt bei 4 °C mit Albumin extrahiert und die Fluoreszenz der jeweils verbleibenden Sonde im Innenblatt gemessen wurde. Diese Werte dienten, analog zu den Messwerten für den Flip der Sonde NDP₂, zur Berechnung der Flop-Kinetik. Die Auswertung für den Flop erfolgte unter Verwendung folgender Formel (Serra et al.²³):

$$\left(\frac{S_i}{S_{tot}} \right) (t) = 1 - q \cdot [\exp(-k_{-1} \cdot t)] + q$$

S_i = Sondenmenge im Innenblatt der Membran

S_{tot} = Sondenmenge im Innen- und Außenblatt der Membran

k_{-1} stellt die Transportrate für die Umverteilung der Sonde vom Innen- in das Außenblatt dar und q steht für den Innenblattanteil der Sonde im stationären Zustand. Die auf den Außenblattanteil bezogene Transportkonstante für die Umverteilung vom Innen- in das Außenblatt wird analog zu k_{in} (s.o.) als $k_{out} = (1-q)k_{-1}$ bezeichnet.

2.2.8 Hämolysemessungen

Grund für die Durchführung von Hämolyse-Messungen sowie weiterer Versuchs-Staffeln in NHD₄-Medium war die Absicht, die Zellen weitgehend vor Schwellung und nachfolgender Hämolyse zu schützen. Bei Einwirkung von Stoffen auf die Zellen oder Einbau zusätzlicher Moleküle in die Erythrozytenmembran können Membran-Lecks

entstehen. Aufgrund des intraerythrozytären Hämoglobingehaltes ist der kolloidosmotische Druck, d.h. der osmotische Druck, der auf das Vorhandensein von Proteinen in wässriger Lösung zurückzuführen ist, im Intrazellulär-Raum (IZR) deutlich höher als im Extrazellulär-Raum (EZR). Normalerweise wird der kolloidosmotische „Überdruck“ durch Erzeugung von entgegengerichteten Ionengradienten (Auswärtstransport) kompensiert. Diese Gradienten brechen beim Vorliegen von Membran-Lecks zusammen. Folge ist ein Einstrom von Wasser in die Zelle. Die Zelle schwillt an und platzt schließlich (Hämolyse). Um dem intrazellulären kolloidosmotischen Druck einen entsprechenden kolloidosmotischen Druck auf der extrazellulären Seite der Membran entgegenzusetzen und somit dem Einstrom des Wassers nach Leckbildung als Ursache für die Hämolyse vorzubeugen, enthält das NHD₄-Medium Dextran mit Molekül-Ketten eines mittleren Molekulargewichtes (g) von 4.000 Da. Die Größe der Molekülketten verhindert, dass kleinere Lecks in der Membran durchdrungen werden. Auf diese Weise bleibt das Wasser im EZR. Tritt trotz dieses Schutzes Hämolyse ein, so müssen in der Membran Defekte entstanden sein, die groß genug sind, um die Passage der Dextran-Ketten vom EZR in den IZR zu ermöglichen.

Für Versuche zur Hämolyse durch NDP₂ wurden die Zellen standardmäßig mit der Sonde beladen und in NHD₄ (s.u.) bei 32 °C inkubiert. Nach ca. 30, 60, 90 und 120 min wurden von der Suspension 300 µl abgenommen und in einem Reaktionsgefäß zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden zu 2 ml „Transformationslösung“ [Merck, Reaktionslösung - enthält Kaliumhexazyanoferat(III) und Kaliumcyanid zur Umwandlung von Hämoglobin in Hämoglobinzyanid (synonym: Zyano-Methämoglobin)] - gegeben, gemischt und mindestens 5 min stehen gelassen. Zur Bestimmung der Werte für 100 % Hämolyse wurden jeweils 100 µl der Gesamtsuspension in 2 ml Transformationslösung gegeben und ebenfalls mindestens 5 min stehen gelassen. Bei einer Wellenlänge von 545 nm wurde dann im Photometer die Absorption des Hämoglobins bestimmt und auf die Absorption des 100%-Wertes bezogen. Bei Versuchen ohne gesonderte Bestimmung der Hämolyse, bei denen jedoch im Laufe der Inkubationszeit Hämolyse festgestellt wurde, erfolgte die Hämolyse-Messung nach Ablauf der Inkubations-Zeit aus den vorhandenen Ansätzen.

2.2.9 Veränderung des transmembranären Chlorid-Gradienten

Zur Veränderung des Chlorid-Gradienten wurden die Zellen wie gewohnt in KNPS suspendiert, auf den erforderlichen pH-Wert (7,4) eingestellt und mit NDP₂ beladen. Dann

wurden die Zellen abzentrifugiert und in hypotoner (80 mM), isotoner (150 mM) bzw. hypertoner (240 mM) NaCl-Lösung resuspendiert.

Um bei normalem, extrazellulären Chloridgehalt (NaCl 150 mM) Einfluss auf die intrazelluläre Chlorid-Konzentration zu nehmen, gab man dem Medium bei anderen Versuchen Saccharose in einer Konzentration von 180 mM zu. Ziel war es, durch Wasserausstrom die Zellen schrumpfen zu lassen und damit die intrazelluläre Chlorid-Konzentration zu erhöhen.

2.2.10 Veränderung des transmembranären Kalium-Gradienten

Erythrozyten wurden in isotone Medien mit einer Kalium-Konzentration von 150 mM bzw. 0 mM gegeben. Die Isotonie wurde durch NaCl gewährleistet. Um die Leitfähigkeit der Membran für Kalium zu steigern, diente Valinomycin als Ionophor. Dieses wurde für jeden Versuch frisch als 1,2 mM-Stammlösung in Ethanol angesetzt und unmittelbar nach Zugabe der Erythrozyten dem Flip-Medium zugesetzt. Die Konzentration betrug standardmäßig 5 μ M, dies entspricht 29 μ l Stammlösung auf 7 ml Flip-Suspension.

2.2.11 Zugabe zweiwertiger Kationen

Für die benötigten Konzentrationen an zweiwertigen Kationen waren mit Wasser angesetzte Stammlösungen erforderlich (Mangan-Chlorid, Magnesium-Chlorid, etc.). Da Versuche in sehr unterschiedlichen Konzentrationsbereichen durchgeführt wurden (Beispiel Mn^{++} : 0,005 – 2 mM), waren verschieden konzentrierte Stammlösungen erforderlich um Verdünnungseffekte auszuschließen. Die Stammlösungen wurden jeweils frisch angesetzt.

Um den Einfluss intrazellulärer zweiwertiger Kationen auf den NDP_2 -Flip studieren zu können, musste die Zell-Membran durch Zugabe von Ionophor A23187 für das jeweilige Kation durchlässiger gemacht werden. Die benötigte Konzentration von 5 μ M Ionophor A23187 lieferte eine 5 mM Stammlösung in Ethanol, aus der die entsprechende Menge dem Medium zugesetzt wurde (7 μ l auf 7 ml Erythrozyten/Suspension). Das Ionophor A23187 kam unmittelbar nach Zugabe der Erythrozyten zum Flip-Medium, um verfrühte Komplexbildung zu vermeiden.

Bei Experimenten mit Ca^{++} musste beachtet werden, dass durch Steigerung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration eine Erhöhung der Kalium-Leitfähigkeit der Erythrozytenmembran induziert wird (Gardos-Effekt)²⁸. Um einen das Nernst-Potential der Zelle verändernden Kalium-Ausstrom zu vermeiden, fanden diese Versuche in einem 150 mM KNHS-Medium statt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Fluoreszenz-Sonde NDP₂

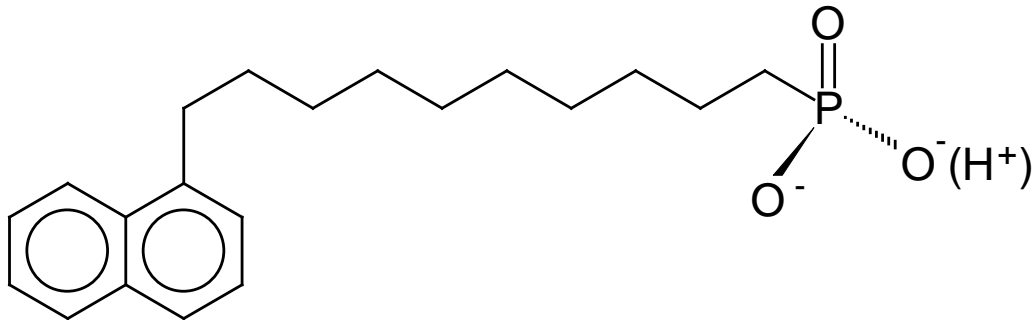


Abb. 5: Darstellung der Sonde 10-(Naphth-1yl)-1-decanphosphonsäure (NDP₂)

Die verwendete Sonde NDP₂ (Abb. 5) ist ein langkettiges, amphiphiles Anion mit einem Molekular-Gewicht von 364 g/mol. Aus funktioneller Sicht lassen sich drei Bereiche charakterisieren:

- Naphthyl-Gruppe
- Alkan-Kette
- Phosphonat-Rest

Der entscheidende Unterschied gegenüber der Sonde NDP₁ besteht in der direkten Bindung des Phosphor-Atoms an das letzte Kohlenstoff-Atom der Alkan-Kette. NDP₁ besitzt an dieser Stelle eine Phosphorsäure-Ester-Bindung mit einem Sauerstoff-Atom zwischen Phosphor-Atom und Alkylrest. Diese Esterbindung ermöglicht eine hydrolytische Spaltung der Verbindung, welche bei NDP₂ nicht möglich ist.

Die Naphthyl-Gruppe ermöglicht aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaft bei Anregung durch Licht geeigneter Wellenlänge (281 nm) den Einsatz des Moleküls als Sonde. Aufgrund dieser Eigenschaft lassen sich die Translokations-Kinetik und die Verteilung der Sonde zwischen den zwei Membranlipidschichten durch zeitabhängige Messungen quantifizieren. Die Alkan-Kette mit 10 Kohlenstoff-Atomen bildet zusammen mit dem aromatischen Naphthyl-Rest den apolaren Anteil des Moleküls, der Phosphonat-Rest mit der negativen Ladung ist die polare, hydrophile Kopfgruppe der Sonde. Analogie-Überlegungen führen zu der Annahme, dass die Dissoziationsstufen dieser Phosphonat-Gruppe bei pK-Werten von ca. 2,0 und 7,4 liegen.²⁹

3.2 Translokation der Sonde NDP₂ von der Außen- in die Innenschicht der Membran (Flip)

Als Bezugs- und Kontroll-Wert für die Untersuchungsserien wurde die zeitabhängige Abnahme der Sondenmenge im Außenblatt und die entsprechende Zunahme der Sondenmenge im Innenblatt unter folgenden Versuchsbedingungen verwendet:

- KNPS-Medium
- pH 7,4
- Temperatur 32 °C
- Frisch gewaschene, nicht vorbehandelte Erythrozyten
- Keine Zusätze zum Flip-Medium
- Hämatokrit 14 %
- Flip-Dauer 120 min

Bei diesen Bedingungen ergab sich für die Einwärtstranslokation von NDP₂ eine mono-exponentiell verlaufende Kinetik mit einer Geschwindigkeits-Konstante (k_{in}) von $0,0303 \pm 0,0046 \text{ min}^{-1}$ ($n = 39$, Abb.6).

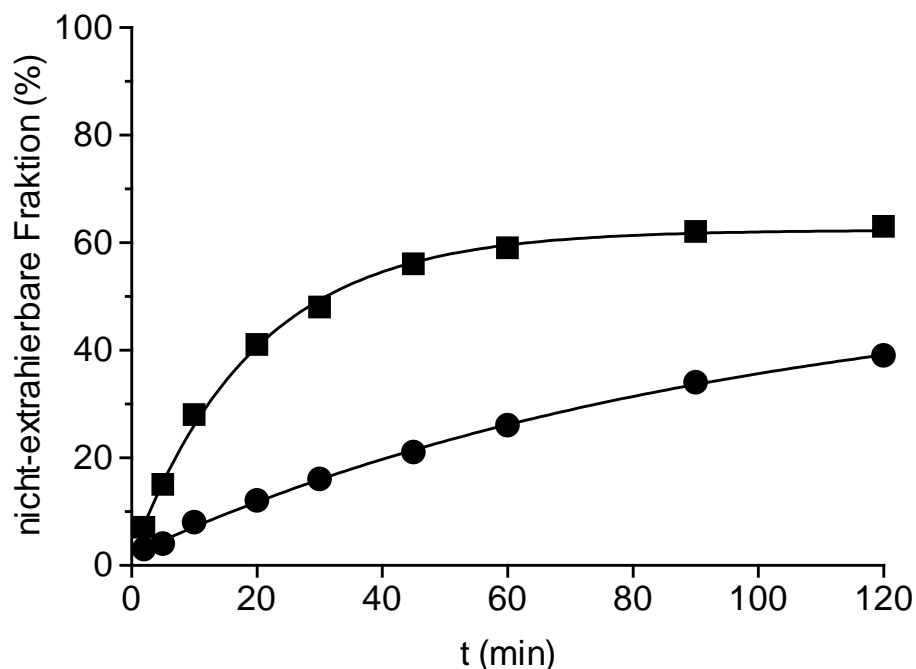


Abb. 6: Einwärtstranslokation von NDP₂ (Flip) ohne und nach DIDS-Vorbehandlung (s.u.) der Erythrozyten. Die zeitabhängige Zunahme der nicht-extrahierbaren NDP₂-Fraktion bei 32 °C wurde nach der in Kapitel 2.2.6 beschriebenen Methode gemessen. Die nicht-DIDS-behandelten (■) bzw. DIDS-behandelten (●) Erythrozyten wurden 5 min bei 0° C und einem Hkt. von 25 % in einer 50 µM NDP₂-Lösung in KNPS (pH 7,4) beladen. Anschließend wurden die mit Sonde beladenen Zellen bei 32 °C in KNPS (pH 7,4, Hkt. 14 %) 120 min inkubiert. Dem Flipansatz wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und die nicht-extrahierbare Sonden-Fraktion im Innenblatt bestimmt.

Im Vergleich hierzu liegt der Wert der Geschwindigkeitskonstante für den Flip von NDP_1 unter gleichen Bedingungen bei $k_{\text{in}} \approx 0,0420 \text{ min}^{-1}$ ^{24,b}. Das bedeutet, dass die beiden Sonden unter den genannten Bedingungen ähnlich schnell einwärts transloziert werden. Um zu klären, in welchem Umfang dieser Flip über den Anionen-Transporter AE1 abläuft, waren Experimente an DIDS-vorbehandelten Zellen erforderlich. Da die blockierende Wirkung von DIDS auf die Transportfunktionen von AE1 ausreichend belegt ist ^{30,31} und die Betrachtung der folgenden Ergebnisse oft für die beiden Transportanteile getrennt erfolgt, werden zunächst die Ergebnisse zum Punkt „Hemmung durch kovalent bindende Stoffe“ aufgezeigt.

3.2.1 Hemmung des Flip durch 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (DIDS)

Um den nicht-vermittelten Anteil des Gesamt-Transportes der amphiphilen Phosphonat-Sonde NDP_2 zu bestimmen, war es notwendig, den AE1-vermittelten Transportanteil selektiv zu eliminieren. 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (DIDS), einer der wirksamsten Hemmstoffe der Transport-Funktionen des AE1-Proteins, wurde hierzu bevorzugt eingesetzt. Für die verwendete DIDS-Konzentration von 50 μM beschrieb Brahm ³² eine Hemmung des unidirektionalen Efflux von $^{36}\text{Cl}^-$ in ein DIDS-freies Medium von mehr als 99,6 % nach einer 45-minütigen Vorbehandlung der Erythrozyten bei 38 °C. Kleinhorst ²⁵ ermittelte eine maximale Hemmung der Einwärtstranslokation von NDP_1 ab einer DIDS-Konzentration von 3-3,5 μM während der Vorbehandlung.

Die maximale Hemmung des Flip von NDP_2 durch DIDS, die durch eine DIDS-Konzentration von 50 μM bei einem Hämatokrit von 10 % (s. „Methoden“) erreicht werden kann, lag für die Kontroll-Bedingungen (32 °C, pH 7,4) bei durchschnittlich $84 \pm 4,7 \%$ (n = 9, Abb. 6). Bei NDP_1 liegt die Hemmung durch DIDS bei durchschnittlich 95 %. Bei den Versuchen mit NDP_2 zeigte sich außerdem, dass DIDS geringe Auswirkungen auf die stationäre Verteilung der Sonde hat (s.u.). Ausgehend von der Annahme, dass $k_{\text{tot}} - k_{\text{DIDS}} = k_{\text{AE1}}$ ist, lassen diese Werte auf einen im Vergleich zu NDP_1 geringeren Transport-Anteil über AE1 schließen.

Zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstante für den AE1-vermittelten Transportanteil wurden nur Ergebnisse aus Versuchen verwendet, in denen ein direkter Vergleich der k_{in} -Werte, d.h. von DIDS-behandelten und nicht-DIDS-behandelten Ansätzen, möglich war.

^bIn der Arbeit von Kleinhorst ²⁴ wurden die Erythrozyten 10 min bei 0 °C und einem Hkt. von 30 % in einer 86 μM NDP_1 -Lösung in KNPS (pH 7,4) beladen. Anschließend wurden die mit Sonde beladenen Zellen bei 32 °C in KNPS (pH 7,4, Hkt. 10 %) 2 h inkubiert.

Unter Standard-Bedingungen (32 °C, pH 7,4) ergab sich an DIDS-vorbehandelten Zellen^c ein Mittelwert für den DIDS-insensitiven Transport von $k_{in} \approx 0,0056 \pm 0,0014 \text{ min}^{-1}$ ($n = 30$, Abb. 6). Für NDP₁ lagen die k_{in} -Werte für den DIDS-insensitiven Transport bei $k_{in} \approx 0,0020 \text{ min}^{-1}$ (32 °C) bzw. $k_{in} \approx 0,0043 \text{ min}^{-1}$ (37 °C).

Die Quotienten der jeweils vermittelten bzw. nicht-vermittelten Anteile verdeutlichen die unterschiedlichen Anteile am Gesamttransport der beiden Sonden NDP₂ und NDP₁

$$\left(\frac{k_{NDP_1}}{k_{NDP_2}} \right) \text{ nicht - vermittelt} = \frac{0,0020}{0,0056} = 0,36$$

$$\left(\frac{k_{NDP_1}}{k_{NDP_2}} \right) \text{ AE1 - vermittelt} = \frac{0,0400}{0,0247} = 1,6$$

Die Natur des nicht-AE1-vermittelten Anteils des Flip ist nicht sicher geklärt. Es gibt aber Hinweise darauf (Kleinhorst), dass es sich dabei um eine einfache Diffusion über die Lipidphase der Membran handelt. Das stationäre Verteilungsgleichgewicht, d.h. der Zustand, in dem die pro Zeiteinheit ein- bzw. auswärtstransportierten Sonden-Mengen gleich sind, stellt sich bei den oben genannten Kontroll-Bedingungen für NDP₂ an den nicht-DIDS-behandelten Zellen erst nach mehr als 60 min (Halbwertszeit ca. 15 min) ein. Der Anteil der Sonde, der sich im Innenblatt der Membran einlagert (S_i), liegt bei $62 \pm 4 \%$ ($n = 39$). An DIDS-behandelten Zellen liegt das Verteilungsgleichgewicht unter den gleichen Bedingungen bei $(55 \pm 10) \%$ ($n = 30$). Wird dieser Wert des stationären Verteilungsgleichgewichtes als Quotient aus Sonden-Menge im Innenblatt dividiert durch Sonden-Menge im Außenblatt (S_i/S_e) ausgedrückt, ergibt sich ein Mittelwert von $1,6 \pm 0,3$ (nicht-DIDS-behandelt) bzw. $1,2 \pm 0,7$ (DIDS-behandelt).

Diese Werte könnten auf eine tatsächliche Verringerung des stationären Innenblatt-Anteiles der Sonde an DIDS-vorbehandelten Zellen hinweisen. Um zu prüfen, ob der Unterschied in der stationären Verteilung statistisch signifikant ist, wurde ein t-Test mit unabhängigen Datengruppen durchgeführt. Die Berechnung ergibt einen Unterschied der Verteilungsgleichgewichte nur auf einem Signifikanzniveau von 0,5, sodass die DIDS-Behandlung vermutlich keinen relevanten Einfluß auf die Verteilung der Sonde hat.

^c Vorbehandlung: Hkt. 10 %, DIDS-Konzentration 50 µM, 37 °C, 45 min; siehe auch „Methoden“

Unterstützt wird diese Annahme durch die Berechnung der Verteilungsgleichgewichte der Sonde an DIDS-vorbehandelten Zellen bei höheren Temperaturen, bei denen auch für die DIDS-behandelten Zellen die stationäre Verteilung während des Flip-Zeitraums erreicht wird. Bei 40 °C entspricht die Verteilung der Sonde an DIDS-vorbehandelten Zellen der an unbehandelten Zellen.

3.3 Konzentrationsabhängigkeit des Flip von NDP_2

Um festzustellen, ob die Geschwindigkeitskonstante durch Einbau größerer Mengen von Sonde in das Außenblatt beeinflussbar ist, wurden die Zellen mit steigenden Sondenkonzentrationen (25, 50, 75 und 100 nmol/ml Erythrozyten) beladen und unter Standard-Bedingungen inkubiert. Bei Auftragung der Geschwindigkeitskonstante k_{in} , multipliziert mit der Sondenmenge pro ml Erythrozyten bei der Beladung, gegen die Sondenmenge pro ml Erythrozyten bei der Beladung, zeigt sich ein überproportionaler Anstieg des Graphen des Gesamt-Transportes sowie des DIDS-insensitiven Transport-Anteiles bei zunehmender Sondenmenge (Abb. 7).

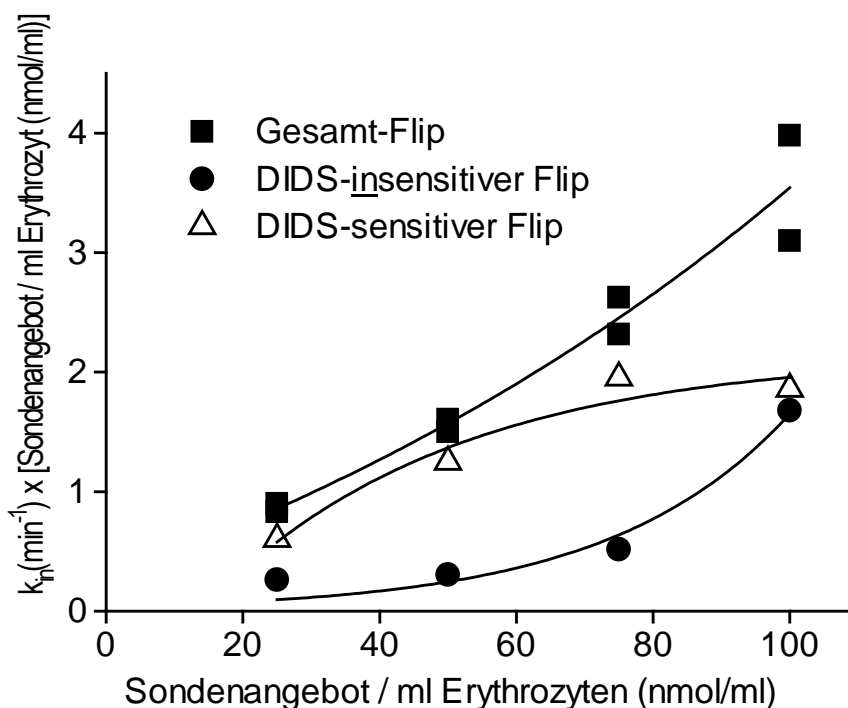


Abb. 7: Abhängigkeit der Transportrate von der Sondenkonzentration während der Beladung. Den Zellen wurden bei der Beladung (siehe Kap. Messung der Einwärtstranslokation von NDP_2) verschiedenen Mengen der Sonde angeboten (25, 50, 75 und 100 nmol/ml Erythrozyten). Anschließend wurde unter Standardbedingungen (32 °C, pH 7,4) inkubiert und die Geschwindigkeitskonstante k_{in} bestimmt. Dann erfolgte die Auftragung der Geschwindigkeitskonstante k_{in} multipliziert mit der Sondenmenge pro ml Erythrozyten bei der Beladung gegen die Sondenmenge pro Milliliter Erythrozyten bei der Beladung. Jeder Datenpunkt entspricht einem Messwert bzw. einem errechnetem Wert.

Dies bedeutet eine Zunahme des k_{in} -Wertes bei höheren Sonden-Konzentrationen in der Membran. Im Gegensatz dazu nimmt die Steigung des Graphen für den DIDS-sensitiven Transport bei ansteigender Sondenmenge während der Beladung ab. Hier liegt also möglicherweise ein Sättigungseffekt oder ein unspezifischer Hemmeffekt der Sonde auf ihren eigenen Transport vor (Abb.7).

Aus den selben Versuchsansätzen wurden Proben zur Ermittlung von 100%-Werten - über die gesamte Inkubationszeit verteilt - abgenommen. Diese Proben wurden nicht mit BSA extrahiert und enthielten somit noch Sonde im Innen- und Außenblatt, deren „Gesamtfluoreszenz“ gemessen wurde. Aus den insgesamt vier Werten für einen Versuchsansatz (30, 60, 90 und 120 min) wurde ein Mittelwert ermittelt und gegen die Sondenmenge pro ml während der Beladung aufgetragen (Abb. 8).

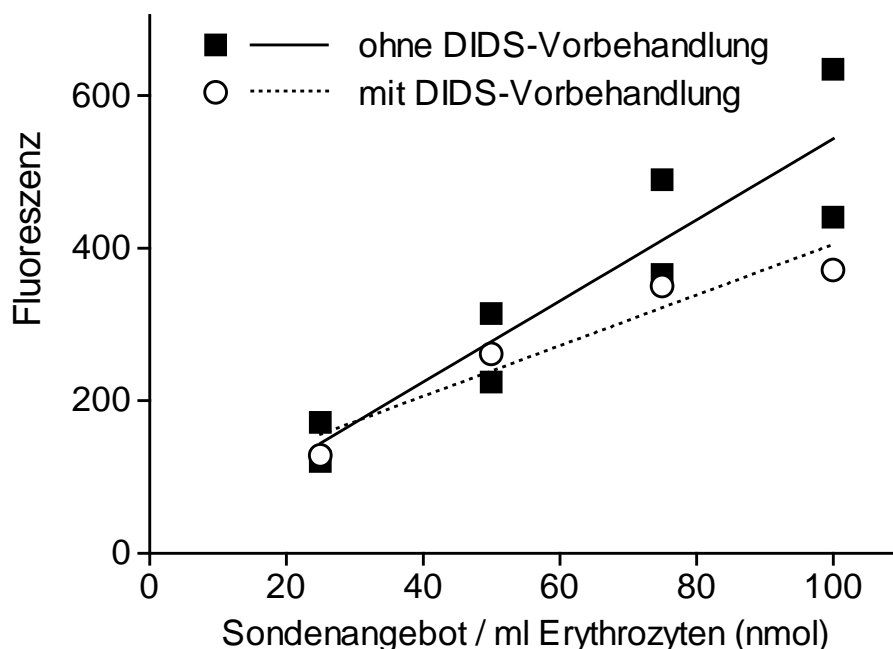


Abb. 8: Abhängigkeit der gemessenen Gesamt-Fluoreszenz (F) vom Sondenangebot pro ml Erythrozyten (nmol/ml Erythrozyten) während der Beladung. Die DIDS-Vorbehandlung der Zellen fand vor der Beladung der Zellen statt. Den Zellen wurden bei der Beladung (siehe Methoden) verschiedenen Mengen der Sonde (25, 50, 75 und 100 nmol/ml Erythrozyten) angeboten. Anschließend folgte Inkubation unter Standard-Bedingungen. Aus jedem Versuchs-Ansatz wurde nach ca. 30, 60, 90 und 120 min jeweils eine Probe (sog. 100%-Wert) zur Bestimmung der Gesamtfluoreszenz abgenommen. Diese wurden in 1 ml eiskaltes KNPS gegeben, zentrifugiert und gewaschen, jedoch nicht mit BSA extrahiert. Die vier Ergebnisse der Fluoreszenz-Messungen eines Versuchsansatzes wurden gemittelt und gegen die zugegebene Sondenmenge pro ml während der Beladung der Erythrozyten aufgetragen. Die Datenpunkte entsprechen Einzelmesswerten, die Graphen stellen errechnete Regressionsgeraden dar.

Die aus den Messwerten resultierenden Geraden deuten auf einen linear mit dem Angebot zunehmenden Einbau der Sonde in die Membran hin. Hierbei ist die Steigung der Geraden

für DIDS-vorbehandelte Zellen und nicht-vorbehandelte Zellen nicht gravierend unterschiedlich.

3.4 Temperaturabhängigkeit des Flip von NDP₂

Wie die meisten biologischen Prozesse ist die Einwärtstranslokation von NDP₂ temperaturabhängig. Die Geschwindigkeitskonstante (k_{in}) beträgt bei 32 °C an nativen Zellen durchschnittlich 0,0303 min⁻¹ und an DIDS-behandelten Zellen 0,0056 min⁻¹. Im Vergleich hierzu beträgt sie bei einer Temperatur von 40 °C durchschnittlich 0,1085 min⁻¹ ($n = 2$) und an DIDS-behandelten Zellen $0,0169 \pm 0,0035$ min⁻¹ ($n = 10$, Abb. 9). Diese Werte entsprechen einem Beschleunigungsfaktor von ca. 3,5 für unbehandelte Zellen und 3,0 für DIDS-behandelte Zellen.

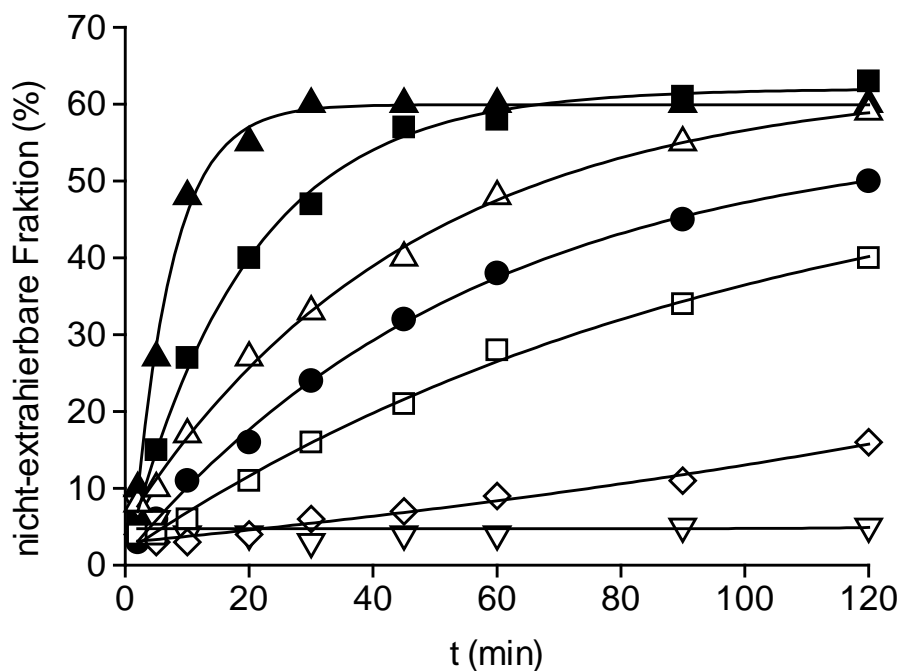


Abb. 9: Temperaturabhängigkeit des NDP₂-Flip. Unbehandelte Zellen (geschlossene Symbole) bzw. DIDS-vorbehandelte Zellen (offene Symbole; Hkt. 10 %, KNPS-Medium, DIDS-Konzentration 50 μM, 37 °C, pH 7,4, 45 min) wurden standardmäßig beladen, dann bei (●) 25 °C, (■) 32 °C und (▲) 40 °C bzw. (▽) 10 °C, (◇) RT, (□) 32 °C und (△) 40 °C inkubiert. Die Graphen stellen jeweils repräsentative Einzelkinetiken dar.

Die Relation zwischen Temperatur und Geschwindigkeitskonstanten lässt sich in einem Arrhenius-Diagramm darstellen (Abb. 10). Die Auftragung des Logarithmus naturalis der Geschwindigkeitskonstanten bei unterschiedlichen Temperaturen gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur zeigt einen linearen Zusammenhang beider Größen. Aus der

negativen Steigung der Geraden lässt sich die Aktivierungsenergie berechnen. Deren Wert ist abhängig von der beim Translokationsprozess zu überwindenden Energiebarriere. Die errechnete Aktivierungsenergie für den Gesamt-Flip von NDP₂ liegt für den Temperatur-Bereich von 21 bis 37 °C bei 121 kJ/mol. Der k_{in} -Wert für den AE1-vermittelten Transport ergibt sich aus der Differenz der Geschwindigkeitskonstante für den Gesamt-Flip und den nicht-vermittelten Flip.

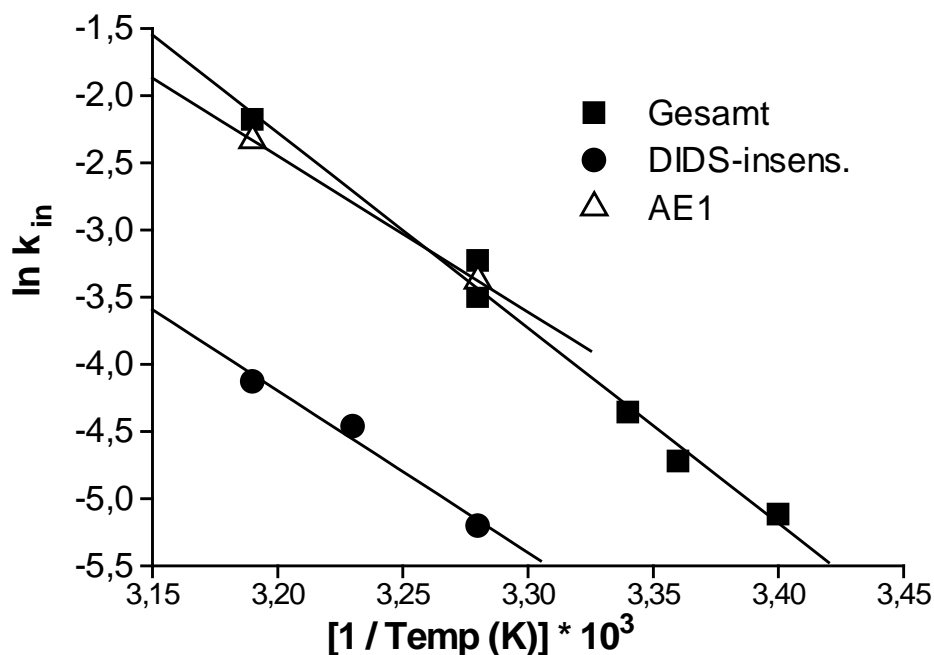


Abb. 10: Arrhenius-Diagramm der Geschwindigkeitskonstanten des Gesamt-Flip, des vermittelten und des nicht-vermittelten Transportes von NDP₂. Auftragung des Logarithmus naturalis der Geschwindigkeitskonstante gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur (K). Die k_{in} -Werte für den AE1-vermittelten Anteil wurden durch Subtraktion des nicht-vermittelten Anteils vom Gesamt-Flip errechnet. Aus der Steigung der Regressionsgeraden lässt sich eine Aktivierungsenergie (E_a) für den Gesamt-Flip von 121 kJ/mol für den Temperaturbereich von 21 - 37 °C berechnen. Weitere Werte siehe Tab. 1.

Wie Tab. 1 zeigt, liegen die Aktivierungsenergien (E_a) für die AE1-vermittelte und die nicht-vermittelte Translokation bei ca. 100 kJ/mol. Sie sind somit vergleichbar mit den Werten anderer amphiphiler Sonden wie DENSA³³ [5-(N-Decyl)aminonaphthalin-2-sulfonsäure] und NDP₁²⁴.

Tab. 1: Aktivierungsenergie (E_a) für den Flip von NDP₂ im Vergleich mit anderen Verbindungen. Die Werte der Aktivierungsenergie wurden jeweils aus Arrhenius-Diagrammen für unterschiedliche Temperaturbereiche ermittelt.

	NDP ₂	NDP ₁	DENSA
E_a (kJ/mol) der unterschiedlichen Transportanteile			
<i>Gesamt</i>	121	-	110
<i>DIDS-insensitiv</i>	100	-	-
<i>AE1-vermittelt</i>	97	116	-
Temp.-Bereich (°C)	21-37	0-30	17-37

3.5 pH-Abhängigkeit des Flip von NDP₂

Bei der folgenden Darstellung des Einflusses des pH-Wertes auf den NDP₂-Flip von sind die pH-Wert-Angaben auf das jeweilige Extrazellulär-Medium (pH_e), nicht auf den intrazellulären pH-Wert (pH_i) bezogen.

Für die pH-Abhängigkeit ergab sich eine Beschleunigung des Flip (k_{in}) von NDP₂ bei pH 5,7 um den Faktor 3 im Vergleich zu dem k_{in} -Wert bei pH 7,4 ([Abb.11](#)). Im stärker alkalischen Bereich (bis pH 8,4) nimmt der Flip allenfalls minimal gegenüber pH 7,4 ab. Betrachtet man die pH-Abhängigkeit für den DIDS-sensitiven und den DIDS-insensitiven Transport getrennt, so ist zunächst die Problematik der DIDS-Behandlung bei erniedrigten pH-Werten zu berücksichtigen. Die bei der Hemmung stattfindende Bildung einer kovalenten Bindung zwischen einer Amino-Gruppe von AE1 und der Isothiocyano-Gruppe des Inhibitors kann nur geschehen, wenn die Amino-Gruppe von AE1 deprotoniert ist. Damit ist eine pH-Abhängigkeit der kovalenten Hemmung zu erwarten. Insbesondere könnte der Verdacht bestehen, dass die hemmende Wirkung von DIDS in einem Medium mit niedrigerem pH-Wert und damit erhöhtem Protonierungsgrad nicht zur vollen Ausbildung kommt. Aufgrund verschiedener Ergebnisse scheint jedoch die Ansicht von Serra et al.²³ gerechtfertigt, dass eine DIDS-Vorbehandlung für 45 min bis zu einem pH von ca. 6 AE1 effektiv blockiert. So brachte in der vorliegenden Arbeit die Kombination einer DIDS-Vorbehandlung mit DIDS-Zugabe zum Medium (Konzentration 50 μ M) bei pH 5,9 keine signifikante Veränderung gegenüber Parallel-Experimenten, bei denen diese Maßnahmen jeweils isoliert durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde durch eine Verlängerung der DIDS-Vorbehandlung von 45 auf 60 min die Vollständigkeit der hemmenden Wirkung auf AE1 sicher gestellt (siehe hierzu auch „Methoden“).

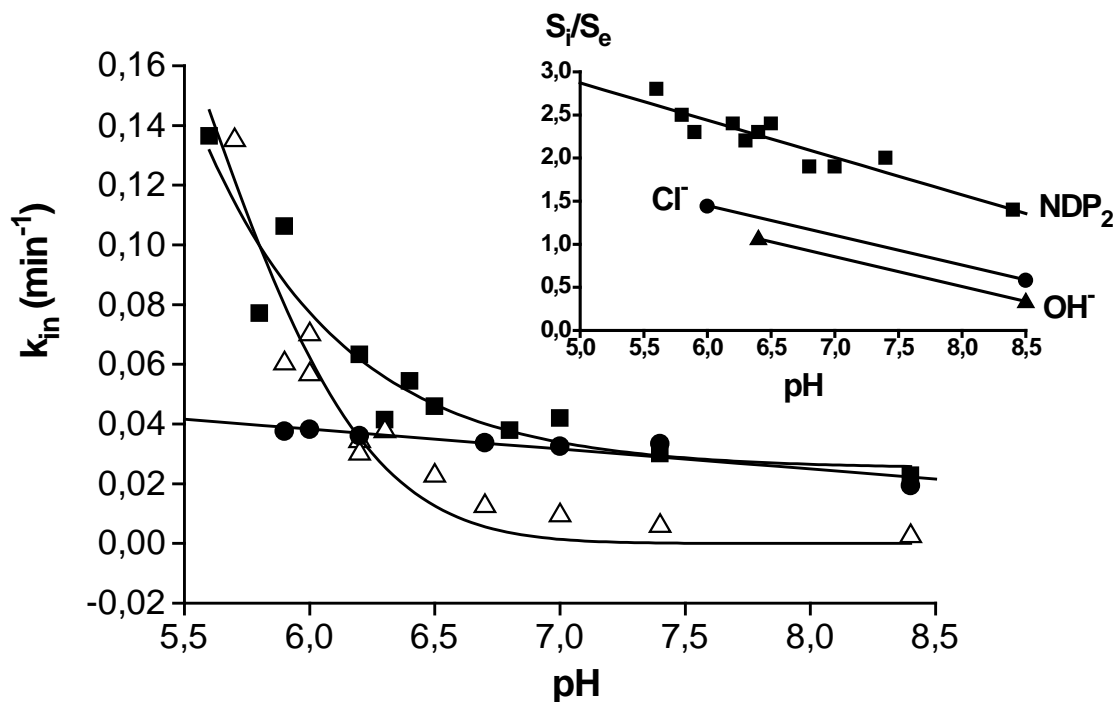


Abb. 11: Einfluss des pH-Wertes auf die Geschwindigkeitskonstante des Flip von NDP₂. Die Erythrozyten wurden zunächst in KNPS-Lösung auf den jeweiligen pH_e eingestellt. Die Ansätze zur Ermittlung des nicht-AE1-vermittelten Anteils wurden für 60 min mit einer Konzentration von 50 μM DIDS (Hkt.10%, 37 °C) vorbehandelt. Anschließend wurde bei den jeweiligen pH-Werten und 32 °C für 120 min inkubiert und der Flip gemessen. Der AE1-vermittelte Anteil (●) wurde rechnerisch durch Subtraktion des Wertes für den nicht-vermittelten Transport (△) vom Gesamtwert (■) berechnet. **Einsatz:** Darstellung der Werte für das stationäre Verteilungsgleichgewicht von NDP₂ (S_i/S_e) in Abhängigkeit vom pH-Wert an nicht DIDS-behandelten Zellen. Zum Vergleich ist die pH-abhängige Verteilung von Cl⁻- bzw. OH⁻-Ionen^{66,34} zwischen IZR und EZR dargestellt.

In Abb.11 fällt auf, dass die Zunahme des Gesamt-Flip bei Erniedrigung des pH-Wertes hauptsächlich auf die Beschleunigung des DIDS-insensitiven Transportes zurückzuführen ist. Eine pH-Verschiebung von 7,4 auf 5,9 bewirkt eine Beschleunigung dieser Komponente um den Faktor 12. Der AE1-Transportanteil hingegen wird von pH-Verschiebungen offenbar kaum beeinflusst. So bewirkt die gleiche pH-Änderung nur eine Beschleunigung um den Faktor 1,1. Aus der starken Beschleunigung des DIDS-insensitiven Transportes resultiert daher die Beschleunigung des Gesamt-Flips um den Faktor 2,4 bei einer pH-Senkung von 7,4 auf 5,9.

Das stationäre Verteilungsgleichgewicht vermindert sich interessanterweise im betrachteten Bereich von einem Quotienten $S_i/S_e = 2,8$ bei pH 5,6 zu einem $S_i/S_e = 1,5$ bei pH 8,4 (Abb.11, Einsatz). Ein Vergleich mit dem pH-abhängigem Verteilungsverhalten kleiner, hydrophiler Anionen (Cl⁻, OH⁻) zwischen zeigt sehr ähnliche Veränderungen des Verteilungsgleichgewichtes wie bei dem langkettigen, anionischen Amphiphil NDP₂. Auf mögliche Ursachen dieser Veränderung wird im Diskussionsteil eingegangen.

3.6 Hemmung der AE1-vermittelten Komponente des Flip von NDP₂

Die Hemmung eines Transport-Proteins wie AE1 ist grundsätzlich auf mehrere Arten möglich: Es kann zu einer reversiblen Hemmung auf der Basis nicht-kovalenter Bindung des Inhibitors, oder zu einer irreversiblen Hemmung, meist auf der Basis kovalenter Bindung kommen. Des Weiteren gibt es Unterschiede in der Wirkungsweise von Hemmstoffen. Konkurriert ein Hemmstoff mit einem Substrat um die Substrat-Bindungsstelle eines Proteins, so spricht man von einer kompetitiven Hemmung. Diese kann durch Erhöhung der Substrat-Konzentration aufgehoben werden, ist also reversibel. Bindet der Hemmstoff an eine von dem eigentlichen funktionellen Zentrum unabhängige Stelle des Proteins und bewirkt eine Konformations-Änderung, so wird dies als nicht-kompetitive, allosterische Hemmung bezeichnet. Ist eine allosterische Hemmung durch eine kovalente Bindung des Hemmstoffes an das Protein gekennzeichnet, gilt der Effekt als irreversibel.

Bezogen auf AE1 (Bande 3) unterscheiden Falke und Chan³⁵ bzw. Krupka²¹ drei Arten von Hemmstoffen: Hemmstoffe, die mit der „transport-site“ interagieren, solche, die einen - hypothetischen - Zugangs-Kanal zur „transport-site“ blockieren, und „Translokations-hemmstoffe“, welche - in der Regel allosterisch - die für den Transport benötigte Konformationsänderung unterdrücken.

Im Folgenden werden die Ergebnisse von Versuchen mit jeweils einem Vertreter dieser Hemmstoffklassen beschrieben. Dabei wurden Hemmstoff-Konzentrationen gewählt, die in Bezug auf den Transport kleiner Anionen, z.B. Chlorid, supramaximal waren, d.h. oberhalb der Konzentrationen mit maximal-hemmender Wirkung lagen.

3.6.1 Nicht-kovalent bindende Inhibitoren

4,4'-Dinitrostilben-2,2'-disulfonsäure (DNDS)

Dieser Hemmstoff lagert sich, ebenso wie DIDS, im Verhältnis 1:1 an das AE1-Molekül an. Die Wirkung wird, obwohl formal kompetitiv, laut Falke und Chan³⁵ durch Konformationsänderungen im Bereich des Zugangskanals oder der Bindungsstelle für das Substrat erreicht und ist reversibel.³⁶ Die Hemmung des Gesamt-Flip von NDP₂ durch DNDS (0,5 mM im Flip-Medium³¹) beträgt ca. 77 % bei 32 °C. Bei Raumtemperatur wird eine Hemmung von 75 % erzielt.¹² Diese Werte entsprechen einer Hemmung der AE1-vermittelten Einwärtstranslokation^d von 92 % bzw. 89 %.

^d Definiert als der durch kovalent gebundenes DIDS hemmbare Anteil des Gesamt-Flip

Ebenso wie im Fall von DIDS liegt die von Kleinhorst²⁵ ermittelte, prozentuale DNDS-Hemmung für die Gesamt-Transportraten von NDP₁ mit 94 % bei Raumtemperatur höher als bei NDP₂. Bezogen auf den AE1-vermittelten Anteil bedeutet dies eine Hemmung von 98 %.

Nifluminsäure

Nifluminsäure gehört zu den von Falke und Chan³⁵ definierten Translokationshemmstoffen. Sie verhindert bzw. hemmt demnach die Konformationsänderung von AE1, die zum Transport des Substrates notwendig ist. Dieser Effekt ist reversibel.

Die Hemmung des NDP₂-Gesamt-Flip durch 20 µM Nifluminsäure betrug 52 % bei 32 °C. Bei Raumtemperatur wird der Flip nur zu 15 % gehemmt.¹² Eine Konzentration von 20 µM ist nach Cousin u. Motais³⁷ mehr als ausreichend, um Transportprozesse über AE1 maximal zu hemmen. Der AE1-vermittelte Anteil der NDP₂-Einwärtstranslokation wurde somit bei 32 °C zu 61 % gehemmt, bei Raumtemperatur nur zu 17 %.

Die entsprechende Hemmung des Flip von NDP₁ bei RT liegt für die gleiche Konzentration des Agens bei 64 %²⁴, entsprechend einer Hemmung des AE1-vermittelten Anteiles zu 67 %, ist also deutlich höher als bei NDP₂.

Merocyanin 540

Für diesen nicht-kovalenten Hemmstoff liegt keine Zuordnung nach Falke und Chan³⁵ vor. Bei 32 °C betrug die Hemmung des Gesamt-Flip durch Zugabe von 20 µM Merocyanin 540 zum Flip-Medium 39 %, bei Raumtemperatur 20 %¹². Für NDP₁ beträgt die Hemmung der Translokation bei Raumtemperatur 34 %. Auch in diesem Fall ist eine Konzentration von 20 µM mehr als ausreichend für eine maximale Hemmung des AE1-vermittelten Anionentransports.⁴² Die Hemmung der AE1-vermittelten Einwärtstranslokation liegt demnach bei 46 % (NDP₂, 32 °C), 24 % (NDP₂, RT) und 36 % (NDP₁, RT). Der NDP₁-Transport wird also etwas stärker gehemmt.

Dipyridamol

Dipyridamol, dessen Hemmwirkung nach Falke und Chan³⁵ auf Modifikation des Zugangskanals für das Substrat beruhen soll, erzielte bei einer maximal wirksamen Konzentration von 25 µM³⁸ und 26 °C eine Hemmung des NDP₂-Flip von 78 %¹². Dieser Wert entspricht einer Hemmung des AE1-vermittelten Transportanteils von 92 %. Die Hemmung des NDP₁-Gesamt-Flip beträgt im Vergleich hierzu 85 %, die Hemmung des AE1-vermittelten NDP₁-Transportanteils 89 %.

3.7 Translokation der Sonde NDP₂ von der Innen- in die Außenschicht der Membran (Flop)

Um die Charakteristika des Auswärtstransportes (Flop) von NDP₂ zu analysieren, wurden die Erythrozyten 30 min bei 37 °C mit einer Sonden-Konzentration von 41 µM beladen. Dann wurde die Fraktion im Außenblatt durch BSA-Extraktion entfernt und die Auswärtstranslokation über die zeitabhängige Abnahme des Innenblatt-Anteils bestimmt. Die Grundeigenschaften des Flip, wie stationäre Verteilung, Temperatur-Abhängigkeit und DIDS-Hemmung unter Standard-Bedingungen, sind auf den Flop übertragbar (Werte für den Flip in Klammern): Für den Flop ergibt sich an unbehandelten Zellen eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{out} = 0,0465 \text{ min}^{-1}$ ($k_{in} = 0,0303 \text{ min}^{-1}$), an DIDS-behandelten Zellen liegt der k_{out} -Wert bei $0,0085 \text{ min}^{-1}$ ($k_{in} = 0,0056 \text{ min}^{-1}$; Abb. 12).

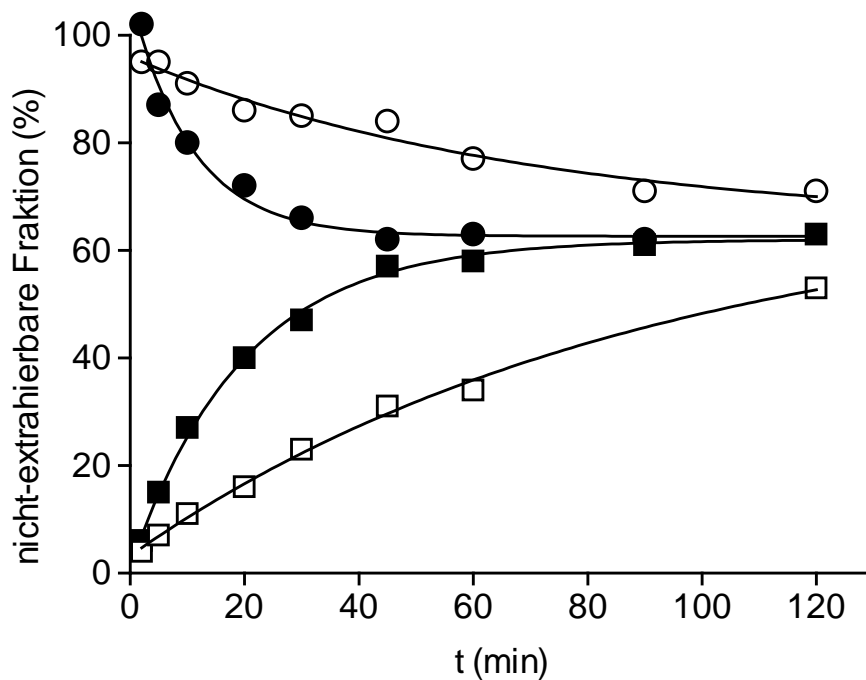


Abb. 12: Einwärtstranslokation (■, □; Flip) und Auswärtstranslokation (○, ●; Flop) von NDP₂ im Vergleich. Offene Symbole: DIDS-behandelte Zellen. Geschlossene Symbole: nicht-DIDS-behandelte Zellen. Der Flip erfolgte unter Standard-Bedingungen. Für den Flop wurden die Zellen bei einer Sondenkonzentration von 41 µM 30 min (Hkt. 20 %, 37 °C) in KNPS inkubiert. Hiernach wurde die Suspension bei erforderlicher DIDS-Vorbehandlung der Zellen auf einen Hämatokrit von 10 % verdünnt und DIDS in einer Konzentration von 50 µM zugeben und 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen. Nach der Sondenbeladung und ggf. erfolgter Vorbehandlung mit DIDS wurden die Zellen zweimal 3 min bei 0 °C in BSA-Medium inkubiert (Sonden-Extraktion aus dem Außenblatt), bei 0 °C gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurde analog zum Flip inkubiert (32 °C, pH 7,4, Hkt. 14 %, 120 min) und die zeitabhängige Abnahme des Innenblatt-Anteils der Sonde gemessen. Die gezeigten Daten sind jeweils beispielhafte Einzelkinetiken.

Die DIDS-Hemmung des Auswärtstransportes beträgt somit 86 % (84 % für den Flip). Das stationäre Verteilungsgleichgewicht liegt bei $S_i/S_e = 1,7$ und entspricht damit dem Wert, der sich aus den Flip-Messungen ergab.

Hier sei darauf hingewiesen, dass theoretisch bei dem Transport und der Verteilung von Stoffen/Molekülen zwischen den beiden Membranblättern eines Erythrozyten die

Beziehung $\frac{k_{in}}{k_{out}} = \frac{S_i}{S_e}$ zutreffen sollte. Dies ist jedoch für die entsprechenden NDP₂-

Versuche nicht zutreffend. Auf diese Problematik wird im Diskussionsteil eingegangen.

3.8 Einfluss von Modifikationen des Grenzflächenpotential-bedingten Transbilayer-Potentials auf den Flip von NDP₂

Neben dem klassischen Membranpotential (Nernst-Potential, s. unten), das auf unterschiedlichen Ionen-Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran und unterschiedlichen Ionen-Leitfähigkeiten beruht, besteht an der inneren Oberfläche der Erythrozyten-Membran ein Grenzflächen-Potential, das mit der asymmetrischen Verteilung der negativ geladenen Phospholipide Phosphatidyl-Serin und Phosphatidyl-Inositolphosphat zusammenhängt. Durch deren überwiegende Lokalisation im Innenblatt der Membran^{14,39} herrscht an der endofacialen Seite der Membran ein negatives Oberflächen-Potential von ca. -40 mV (Abb. 13).

Die zwitterionischen Phospholipide, Sphingomyelin und Phosphatidylcholin bewirken durch ihr überwiegendes Vorkommen im Außenblatt der Membran dort ein neutrales bis leicht positives Oberflächen-Potential. Das resultierende Transbilayer-Potential zwischen den beiden Grenzflächen wirkt auf natürliche, mobile Membran-Phospholipide, aber auch auf langkettige (Sonden-) Amphiphile - soweit sie eine Netto-Ladung besitzen - und beeinflusst ihre stationäre Verteilung. Nach Einbau eines ionischen Amphiphils in ein Blatt der Doppelschicht hängt die angestrebte stationäre Verteilung von der Ladung des Amphiphils und dem herrschenden Transbilayer-Potential ab, das aber seinerseits vom eingebauten Amphiphil und dessen Verteilung beeinflusst wird. Durch Veränderung der Oberflächen-Ladung kommt zu einer veränderten stationären Verteilung. Gleichzeitig ist eine indirekte Einflussnahme auf die Geschwindigkeitskonstante durch eine Triebkraftänderung zu erwarten.

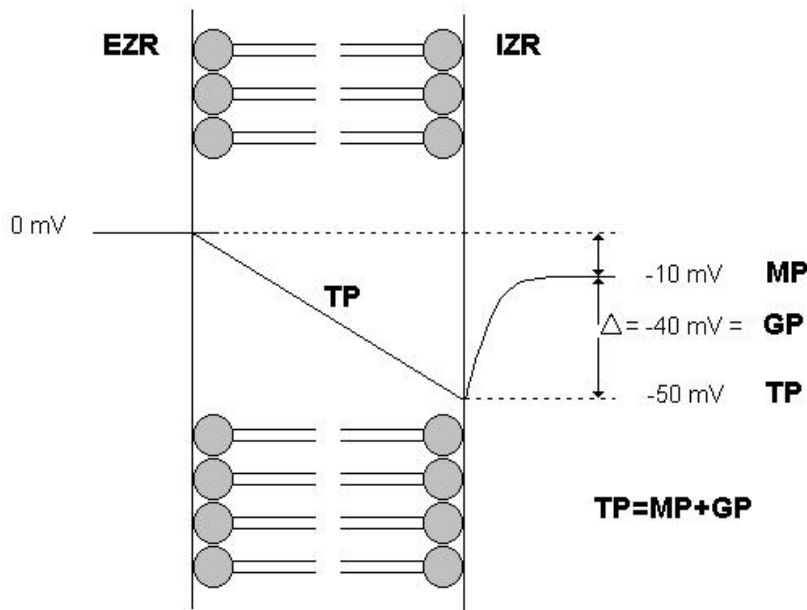


Abb. 13: Schematische Darstellung der Potential-Verhältnisse an der Erythrozyten-Membran. Von der elektrisch neutralen Außenseite der Membran (EZR) erfolgt ein Abfall des Potentials über die Dicke der Membran bis auf -50 mV auf der Innenseite. Mit zunehmender Entfernung von der Membran in den Intrazellulär-Raum (IZR) schwächt sich dieses Potential bis auf -10 mV ab. Abkürzungen: MP Membranpotential, GP Grenzflächenpotential; TP Transbilayer-Potential.

Aufgrund der anzunehmenden Dissoziationsstufen der Sonde NDP_2 (pK-Werte von Phosphonaten in Wasser: 2,0 und 7,4²⁹) liegt diese bei einem pH-Wert von 7,4 in jedem Falle vorwiegend anionisch geladen vor. Bei nativen Erythrozyten würde man daher eine Asymmetrie zugunsten des Außenblattes erwarten ($S_i/S_e < 1$). Diese Erwartung wird allerdings, wie sich oben gezeigt hat, nicht erfüllt ($S_i/S_e = 1,6$; siehe Kap. 3.2.1).

Um den postulierten Einfluss des Oberflächen-Potentials auf die Verteilung und die Flipraten zu untersuchen, wurden den Flip-Medien „Membran-Modifizier“ - langkettige Amphiphile mit einer negativen, einer positiven oder keiner Nettoladung - zugegeben. Diese bauen sich in die Membran ein und verändern die Oberflächenladung. Bei Einbau größerer Mengen perturbieren sie allerdings zusätzlich die Membran und steigern hierdurch den nicht-vermittelten Flip²². Die verwendeten Stoffe und ihre Auswirkungen sind im Folgenden kurz charakterisiert. (s. auch [Tab. 2](#))

Natrium(Sodium)-dodecyl-sulfat (SDS)

Das membrangängige amphiphile Anion SDS mit einem stationären Verteilungsgleichgewicht zugunsten des Außenblattes der Membran ($S_i/S_e = 0,25$)⁴⁰ bewirkt eine Negativierung des dort herrschenden Grenzflächenpotentials. Der Potential-Gradient zwischen innerem und äußerem Membran-Blatt sollte somit vermindert werden und die stationäre Verteilung einer anionischen Sonde zugunsten des Innenblattes zunehmen. Dies ließ sich experimentell bestätigen: Die stationäre Verteilung von NDP₂ (S_i/S_e) nahm von 1,6 auf 3,1 zu (Tab. 2). Damit ging auch eine Beschleunigung des Flip einher. Dieser Effekt ist an DIDS-vorbehandelten Zellen wie an unbehandelten Zellen gut zu verifizieren. Die Frage, in welchem Maße die Beschleunigung auf einem Membran-auflockernden Effekt, aus einer indirekten Beeinflussung durch das veränderte stationäre Verteilungsgleichgewicht und/oder aus einem direkten Einfluss auf den Flip-Vorgang beruht, kann derzeit jedoch nicht beantwortet werden.

Tab. 2: Einfluss von amphiphilen Verbindungen auf den Flip von NDP₂. Die Membran-Modifizierer wurden jeweils in den angegebenen Konzentrationen dem Flip-Medium vor Zugabe der Erythrozyten zugesetzt. Anschließend wurde unter Standard-Bedingungen inkubiert.

Detergenz	Konz. (µM)	$k_{in(x)}/k_{in\text{ Kontrolle}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$						S_i/S_e (n)	
		Gesamt (n)	DIDS-insensitiv (n)		DIDS-sensitiv (n)				
ohne Zusatz	-	1	39	1	30	1	8	1,6	39
SDS	80	2,0	2	2,3	1	1,9	1	3,1	3
SB 12	400	2,2	2	3,3	1	1,7	1	1,5	3
DM	100	1,6	2	2,8	1	1,3	1	1,4	1
DTAB	200	0,5	3	0,6	2	0,4	1	0,9	3
Lyso-PS	40	3,5	1	3,2	1	-	-	4,0	1

Lauryl-Sulfobetain, Zwittergent-12 (SB 12)

Für das zwitterionische SB 12 - das Molekül enthält eine positive und eine negative Ladung - stehen keine spezifischen, quantitativen Daten über das stationäre Verteilungsgleichgewicht zur Verfügung. Eine Arbeit von Isomaa⁴¹ liefert aber Hinweise auf einen fast ausschließlichen Einbau von zwitterionischen Verbindungen in das Außenblatt der Membran. Da bei dieser Verbindung kein elektrostatischer Effekt zu erwarten ist, dürfte die gezeigte Beschleunigung, besonders des DIDS-insensitiven Transportes, auf eine Auflockerung der Membran zurückzuführen sein und nicht auf Auswirkungen eines veränderten Grenzflächenpotentials. Diese Annahme wird durch die unveränderte stationäre Verteilung unterstützt (Tab. 2).

Dodecyl-Maltosid (DM)

Für dieses ungeladene Detergenz mit einem polaren Zucker-Rest ist nach Untersuchungen von Isomaa et al.⁴¹ ebenfalls eine zumindest überwiegende Verteilung zugunsten des Außenblatts der Membran anzunehmen. Ursache ist wahrscheinlich der für eine transmembranäre Permeation zu „sperrige“ Zucker-Rest. Diese Eigenschaften bewirken eine dem SB 12 ähnliche Einflussnahme auf den NDP₂-Flip: Beschleunigung besonders des DIDS-insensitiven Transportes durch Auflockerung der Membran ohne Auswirkung auf die stationäre Verteilung (Tab. 2).

Dodecyltrimethylammonium-Bromid (DTAB)

Morphologische Untersuchungen⁴¹ haben für diesen kationischen Membran-Modifizier gezeigt, dass bei Inkubation mit Erythrozyten innerhalb einer Stunde eine primäre Formveränderung der diskoiden Erythrozyten zu Echinozyten (typisch für vorwiegenden Einbau in das Außenblatt) eintritt, später gefolgt von der Rückbildung zu Diskozyten (Gleichverteilung des Modifiers) und dem Übergang zu Stomatozyten (Anreicherung des Modifiers im Innenblatt). Der S_i/S_e -Wert für DTAB beträgt nach einer Stunde 0,3⁴¹. Dies entspricht einer überwiegenden Verteilung in das Membran-Außenblatt für das betrachtete Messintervall von 120 min. Die positive Ladung des Moleküls erhöht die Differenz der Oberflächen-Potentiale und sollte aus elektrostatischen Gründen die Verteilung der anionischen Sonde NDP₂ ins Außenblatt der Membran begünstigen. Tatsächlich resultiert eine Flip-Verlangsamung und Verringerung des Quotienten S_i/S_e auf 0,9 (Tab. 2).

Lyso-Phosphatidyl-Serin (Lyso-PS)

Nach Bergmann et al.²⁷ erreicht in die Erythrozytenmembran eingebautes Lyso-Phosphatidyl-Serin eine innenblattbetonte, stationäre Verteilung bei $S_i/S_e = 4$, wobei dieser Zustand jedoch erst nach ca. 20 h bei einer Temperatur von 37 °C erreicht wird.²⁷ Nach 2 h bei gleicher Temperatur beträgt der Faktor S_i/S_e ca. 0,4.²⁷ Bei der hier verwendeten Temperatur von 32 °C und einer Inkubations-Zeit von 2 h ist eine überwiegende Verteilung der anionischen Verbindung zugunsten des Außenblattes der Membran zu erwarten. Der Effekt auf die Verteilung von NDP₂ ist qualitativ vergleichbar mit dem von SDS. Quantitativ jedoch ist die Auswirkung, unter der Annahme, dass die beiden Sonden zu gleichen fraktionellen Anteilen eingebaut werden, etwas stärker (Tab. 2).

Auch wenn keine gesonderte Bestimmung des Beschleunigungsfaktor für den AE-1-vermittelten Transportanteil erfolgte, so zeigte sich doch, dass die deutliche Zunahme der

Geschwindigkeit des Gesamttransportes um Faktor 3,5 vermutlich auf der Beschleunigung des nicht-vermittelten Anteiles um den Faktor 3,2 beruht.

Hexadecansulfonat /Tetradecansulfonat (HDS/TDS)

Auch Hexadecansulfonat und Tetradecansulfonat steigern nach Einbau in das Membranaußenblatt als negative Amphiphile in erwarteter Weise die stationäre Verteilung und die Flip-Geschwindigkeit ab einer Konzentration von 60 μM . Da Versuche mit HDS/TDS jedoch nur jeweils einmal (mit bzw. ohne DIDS-Vorbehandlung) durchgeführt wurden, ist eine Quantifizierung nicht verlässlich.

Untersucht man alle unterschiedlichen Amphiphile hinsichtlich ihrer Effekte auf die Flip-Kinetik und das Verteilungsgleichgewicht, so ergab sich für die meisten Fälle eine proportionale Konzentrations-Abhängigkeit (Daten nicht gezeigt). Allein die hemmende Wirkung des DTAB nahm mit steigenden Konzentrationen wieder ab (Daten nicht gezeigt). Diese Abnahme könnte auf eine Beschleunigung der DIDS-insensitiven Flip-Komponente aufgrund eines Auflockerungs-Effektes durch die C-12-Kohlenstoff-Kette (durchschnittliche Kettenlänge der natürlichen Phospholipide C 16-18) zurückzuführen sein, der dem hemmenden Ladungseffekt entgegenwirkt. Der selbe Effekt der Membranauflockerung ist wahrscheinlich für die Flip-beschleunigende Wirkung der elektro-neutralen Detergentien SB12 und Dodecyl-Maltosid verantwortlich. Unterstützt wird diese Annahme durch die überwiegende Beschleunigung des nicht-vermittelten Transportes und durch ein, nach Zugabe dieser beiden Stoffe unverändertes stationäres Verteilungsgleichgewicht (Tab. 2). Durch Detergentien mit negativer Ladung wurde der Flip beschleunigt und das Verteilungsgleichgewicht zugunsten des Innenblattes verschoben.

Betrachtet man die Wirkung von Detergentien (Membran-Modifizier) auf den Flip von NDP_2 getrennt für den DIDS-insensitiven und den DIDS-sensitiven Anteil, so fällt auf, dass die beiden Komponenten des Flip im gleichen Sinne, wenn auch nicht im gleichen Maße beeinflusst werden. Diese Zusammenhänge werden in Abb. 14 noch einmal graphisch verdeutlicht. Der nicht-vermittelte Anteil trägt erwartungsgemäß überwiegend zu der Beschleunigung des Gesamt-Flip bei (Abb. 14). Erklärung hierfür können der membranauflockernde Effekt der verwendeten Detergentien und direkte elektro-statische Effekte auf die Sonde NDP_2 sein. Der grundsätzlich flipbeschleunigende Effekt der Auflockerung durch Einbau von „Fremdamphiphilen“ ist ebenfalls für die Abschwächung der hemmenden Wirkung des positiv geladenen Membran-Modifizier DTAB verantwortlich.

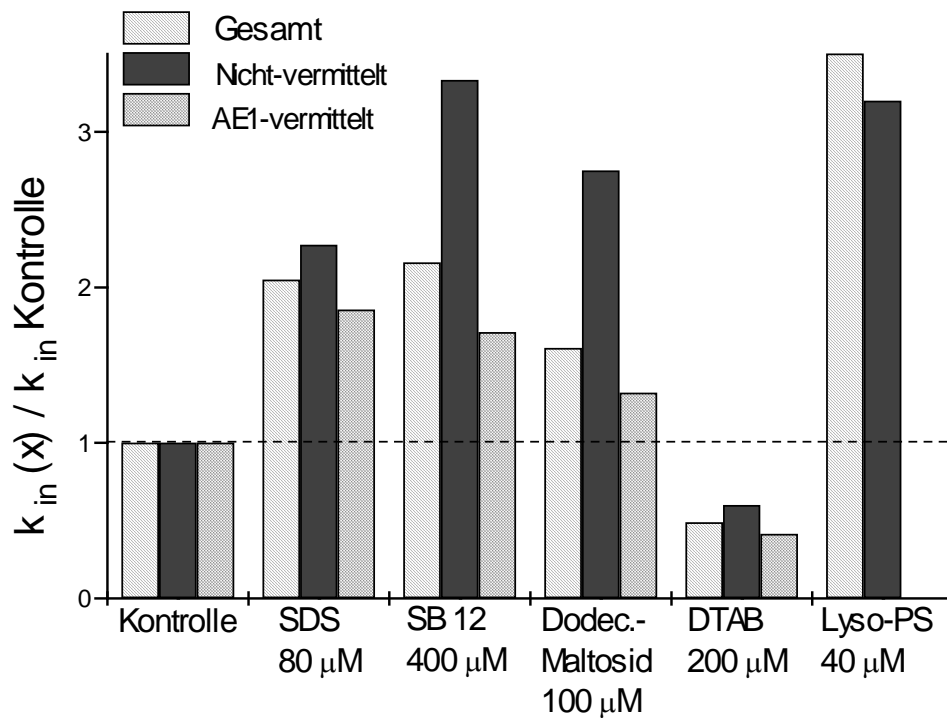


Abb. 14 : Vergleich der Membran-Modifizier-Effekte auf die Flip-Geschwindigkeit. Die Modifier waren in den angegebenen Konzentrationen im Flip-Medium bei 32 °C enthalten. Auffällig ist die stärkere Beschleunigung des DIDS-insensitiven Transportes, besonders durch Zugabe der nicht-ionischen Verbindungen SB 12 und Dodecyl-Maltosid. Ursache ist wahrscheinlich eine Membranauflockerung. Gezeigt werden normierte Werte. Daten siehe auch [Tab. 2](#).

Insgesamt überrascht jedoch die Beeinflussbarkeit des AE1-vermittelten Transportes der Sonde durch elektrostatische Kräfte. Da der AE1-vermittelte Transport ein (Anionen-) Antiport ist, läuft er im Prinzip elektroneutral ab. Die gezeigte Beschleunigung des AE1-Transportanteils ist deshalb vermutlich nicht durch direkte Wirkung elektrostatischer Kräfte zu erklären. Auch eine Membranauflockerung durch Einbau von Detergentien sollte den AE1-vermittelten Flip primär nicht beeinflussen. Eine mögliche Ursache der Flip-Beschleunigung ist die indirekte Wirkung einer veränderten stationären Gleichgewichtslage auf den Flip-Flop im Sinne einer Triebkraftänderung. Die Beschleunigung des NDP₂-Flip unter Einwirkung der Anionen SDS und Lyso-Phosphatidylserin (PS) im Außenblatt und die Verlangsamung bei Einbau des Kation DTAB ins Außenblatt der Membran wären hierdurch erklärbar. Die Beschleunigung des Flip bei Einbau der neutralen Detergentien SB12 und DM, welche erwartungsgemäß das Verteilungsgleichgewicht der Sonde nur minimal verändern, widerlegt aber diese Hypothese.

Letztlich bleibt die Möglichkeit einer direkten stimulierenden Wirkung einzelner Membran-Modifizier auf AE1. Ein solcher (allosterischer?) Effekt wäre bemerkenswert, da doch im Gegensatz ein hemmender Effekt einiger langkettiger Amphiphile auf die Funktion von

AE1 bekannt ist.⁴² Eine abschließende Bewertung ist daher anhand der vorliegenden Informationen nicht möglich.

Bezüglich der stationären Verteilungsgleichgewichte verdeutlicht die graphische Darstellung in Abb. 15 noch einmal die Veränderungen (dargestellt als Quotient S_i/S_e) unter dem Einfluss der Modifier. Es soll dabei nochmals darauf hingewiesen werden, dass sich die Membran-Modifier überwiegend in das Außenblatt der Membran einlagern.

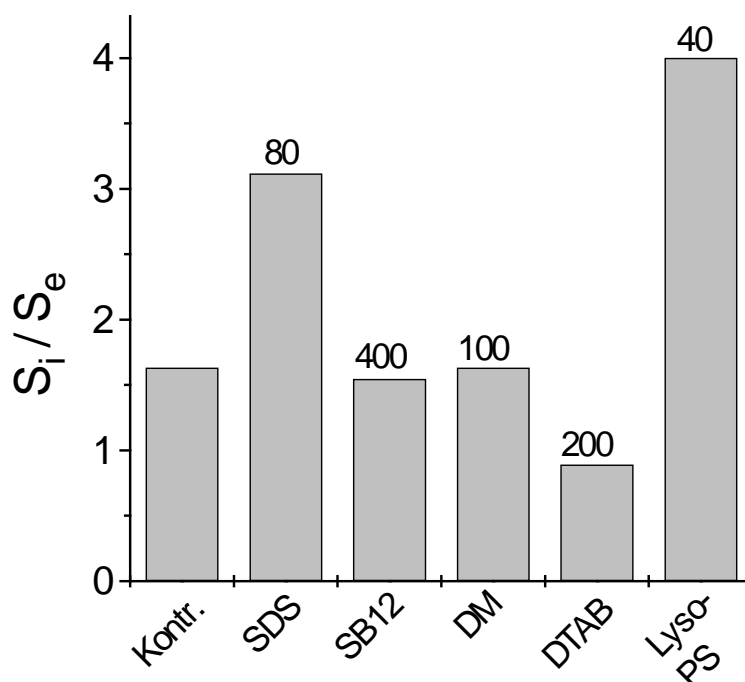


Abb.15: Auswirkung der Membranmodifier auf die stationäre Verteilung von NDP_2 . Darstellung des Quotienten S_i/S_e der stationären Verteilung von NDP_2 nach Zugabe des jeweiligen Detergens zum Flip-Medium. Inkubation bei 32 °C und pH 7,4 in KNPS-Medium. Die Zahlen über den Säulen geben die Konzentration des Modifiers in μM an. Unter dem Einfluss der anionischen Agenzien SDS und Lyso-PS wird das Oberflächen-Potential auf der exofacialen Seite der Membran negativiert und begünstigt so den Einbau der anionischen Sonde in die ebenfalls negativ geladene Innenschicht der Membran. Nicht-ionische bzw. zwitterionische Detergentien, wie SB12 bzw. DM haben erwartungsgemäß keinen Einfluss auf das Verteilungsgleichgewicht. Das positiv geladene DTAB verschiebt dagegen das Verteilungsgleichgewicht von NDP_2 zugunsten des Außenblattes der Membran.

Erwartungsgemäß verändert sich das stationäre Verteilungsgleichgewicht von NDP_2 gemäß den Anziehungs- bzw. Abstoßungskräften zwischen unterschiedlichen bzw. gleichsinnigen elektrischen Ladungen. Der Einbau des kationischen Detergens führt zu einer Verstärkung des bereits bestehenden Gradienten mit negativer Ladung der Membraninnenseite und somit zu einer Abnahme des Verteilungsquotienten (S_i/S_e) durch

den verminderten Einbau der anionischen Sonde NDP₂ im Innenblatt. Der Einbau anionischer Detergentien (SDS u. Lyso-PS) hingegen schwächt den elektrischen Membran-Gradienten ab und begünstigt somit den Einbau der Sonde im Innenblatt der Membran. Es resultiert eine Zunahme des Verteilungsquotienten. Ladungsneutrale Detergentien (SB12 und Dodecylmaltosid) bleiben erwartungsgemäß ohne Einfluss auf das stationäre Verteilungsgleichgewicht.

3.9 Einfluss veränderter transmembranärer Ionengradienten und des Membran-(Nernst)-Potentials auf den Flip von NDP₂

Wie in der Einleitung erwähnt, dienen Membranen unter anderem der Bildung von Kompartimenten. Im Fall der meisten Biomembranen sind diese „Trennwände“ selektiv permeabel. Unterschiede der Permeabilität und der Konzentrationsgradienten verschiedener Ionen können zur Entstehung eines Membran-Potentials führen. Hängt dieses Potential hauptsächlich von den intra- bzw. extrazellulären Konzentrationen eines einzigen selektiv permeablen Ions ab, so kann das Potential mit Hilfe der Nernst-Formel berechnet werden:

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[e]}{[i]}$$

E	= Nernst-Potential
R (J/mol · K)	= Allgemeine Gaskonstante
F(C/mol)	= Faraday-Konstante
T (K)	= absolute Temperatur
z	= Ladungszahl
[i], [e]	= Konzentration des Elektrolyten im Intra- bzw. im Extrazellulär-Raum

Bei menschlichen Erythrozyten beruht das unter physiologischen Bedingungen bestehende Nernst-Potential von -6 bis -10 mV auf der dominierenden Leitfähigkeit der Membran für Chlorid-Ionen. Sie liegt mit $2 \cdot 5,6 \cdot 10^{-8} \text{ cm/s}^{43}$ weit über der für Kalium mit $2,2 \cdot 10^{-11} \text{ cm/s}^{44,45}$

Um den Einfluss des Nernst-Potentials auf den Flip der amphiphilen Phosphonat-Sonde NDP₂ zwischen den beiden Blättern der Doppelschicht zu untersuchen, wurden die Ionen-

Konzentrationen von Chlorid und Kalium im Inkubations-Medium variiert bzw. die Kalium-Leitfähigkeit der Erythrozyten-Membran experimentell gesteigert.

Betrachtet man die Translokation anionischer Verbindungen mit einem hohen Membran-/Wasser-Verteilungskoeffizienten, so darf nicht vergessen werden, dass hier die Differenz der Oberflächen-Potentiale eine wichtige Rolle spielt (s.o.). Das gesamte, über der Membran liegende Potential setzt sich daher zusammen aus Nernst-Potential (MP) und Grenzflächen-Potential (GP) und kann als Transbilayer-Potential bezeichnet werden⁴⁶ (TP in Abb. 13, S. 40). Zusätzlich ist zu beachten, dass bei den folgenden Versuchen mit Veränderung der extrazellulären Chlorid-Konzentration die Beeinflussung des NDP₂-Flip durch ein verändertes Nernst-Potential nur einen Teilaspekt darstellt. Es müssen weitere Effekte wie Konkurrenz oder Rekrutierung für den AE 1-vermittelten Anteil des Flip und osmotische Effekte (s.u.) beachtet werden. Diese sollen in dem nun folgenden Abschnitt erläutert werden.

3.9.1 Einfluss veränderter Chlorid-Gradienten

3.9.1.1. Vorbemerkung

Bei Experimenten zum Einfluss einer Inkubation der Zellen in hypotonem (80 mM) bzw. hypertonem (240 mM) NaCl-Medium auf den NDP₂-Flip sind neben dem Einfluss eines veränderten Nernst-Potentials folgende Effekte zu berücksichtigen: Die Transportvorgänge hydrophiler und amphiphiler Anionen über AE1 laufen wahrscheinlich nicht getrennt nebeneinander, sondern zumindest teilweise über eine „gemeinsame Wegstrecke“. Diese Annahme impliziert eine Konkurrenz der beiden Anionen-Arten um den Bindungsplatz auf AE1, wobei eine verringerte extrazelluläre Chlorid-Konzentration eine verminderte Konkurrenz zwischen der Sonde und Chlorid am Protein zur Folge haben sollte. Infolgedessen wäre eine Steigerung der Flip-Geschwindigkeit zu erwarten. Bei Erhöhung der extrazellulären Chlorid-Konzentration wäre umgekehrt eine gesteigerte Konkurrenz und Verringerung der Flip-Geschwindigkeit die Konsequenz. Um diesen Mechanismus als Störgröße bei der Untersuchung eines Potential-Effekts auf den NDP₂-Flip auszuschalten, wurde in entsprechenden Experimenten der AE1-vermittelte Transportanteil durch DIDS-Vorbehandlung der Zellen gehemmt. Die mit der AE1-Hemmung einhergehende Flip-Verlangsamung führte bei der normalen Versuchstemperatur jedoch zu sehr schwach ausgeprägten Potential-Effekten. Um die Effekte zu verdeutlichen, musste die Versuchstemperatur an DIDS-vorbehandelten Zellen, unter Verzicht auf direkte Vergleichbarkeit der beiden Versuchsreihen, auf 40 °C erhöht werden.

Des Weiteren tritt durch die veränderte osmotische Situation eine Schwellung bzw. Schrumpfung der Zellen ein. Im hypotonen Medium erfolgt Wassereinstrom in die Zelle, wodurch die intrazelluläre Chlorid-Konzentration herabgesetzt wird. Umgekehrt verursacht ein hypertones Medium einen Wasserausstrom mit Erhöhung der intrazellulären Chlorid-Konzentration. Das Membranpotential ändert sich hierbei jedoch wenig.⁴⁷

Durch die Zugabe von Saccharose in einer Konzentration von 180 mM zu einem 150 mM NaCl-Medium wird eine Schrumpfung der Zellen und eine Aufkonzentrierung von Chlorid innerhalb der Erythrozyten induziert, ohne dass die extrazelluläre Chlorid-Konzentration sich ändert. Diese Aufkonzentrierung von normal ca. 100 mM zu höheren Konzentrationen bedeutet eine Annäherung an die Extrazellulär-Konzentration von Chlorid und eine Verringerung des Gradienten, was zu einer Positivierung des intrazellulär-negativen Membran-Potentials führt.⁴⁷ In diesem Zusammenhang muss erneut auf die Elektroneutralität des obligaten Anionenaustausches über AE1 hingewiesen werden. Eine Beeinflussung des AE1-vermittelten Flip ist deshalb allenfalls als Wirkung einer veränderten Triebkraft durch ein verändertes Verteilungsgleichgewicht zu verstehen und nicht als direkte Potentialwirkung auf den Flip.

Ein sensibler Indikator für ein verändertes Membran-Potential ist jedoch das stationäre Verteilungsgleichgewicht ionischer amphiphiler Membransonden. Aufgrund der Verringerung des hemmenden Einflusses eines innen negativen Nernst-Potentials sollte die Verteilung der anionischen Sonde NDP_2 in das Membran-Innenblatt begünstigt werden.

Bei den im Folgenden besprochenen Versuchen läuft nach Anlegen eines veränderten NaCl-Gradienten zunächst ein „Eins-zu-eins“-Austausch von Chlorid-Ionen gegen OH^- -Ionen ab. Diese Umverteilung von OH^- -Ionen lässt pH-Veränderungen im Intrazellulär- und Extrazellulär-Raum erwarten. Bei den hier verwendeten NaCl- bzw. NaCl-/Saccharose-Medien ist allerdings die extrazelluläre Pufferkapazität gegenüber der intrazellulären gering und somit die zu erwartende intrazelluläre pH-Wert-Verschiebung nur klein.⁴⁶

3.9.1.2. *Inkubation in isotonem NaCl-Medium (150 mM NaCl)*

Die Geschwindigkeitskonstante des Flip in 150 mM Natrium-Chlorid-Medium diente in den Versuchen mit veränderten Chlorid-Konzentrationen als Kontroll-Wert. Die Geschwindigkeitskonstante des Flip an unbehandelten Zellen in 150 mM Natrium-Chlorid-Medium bei 32 °C betrug $0,0291 \pm 0,0035 \text{ min}^{-1}$ ($n = 6$) und entsprach damit dem Wert in KNPS-Medium von $0,0303 \text{ min}^{-1}$. An DIDS-behandelten Zellen betrug die Geschwindigkeits-

konstante bei 40 °C $0,0149 \pm 0,0031 \text{ min}^{-1}$ ($n = 6$), lag also auch hier nur wenig unter dem Vergleichswert in KNPS von $0,0169 \pm 0,0037 \text{ min}^{-1}$ ($n = 10$; Abb. 16).

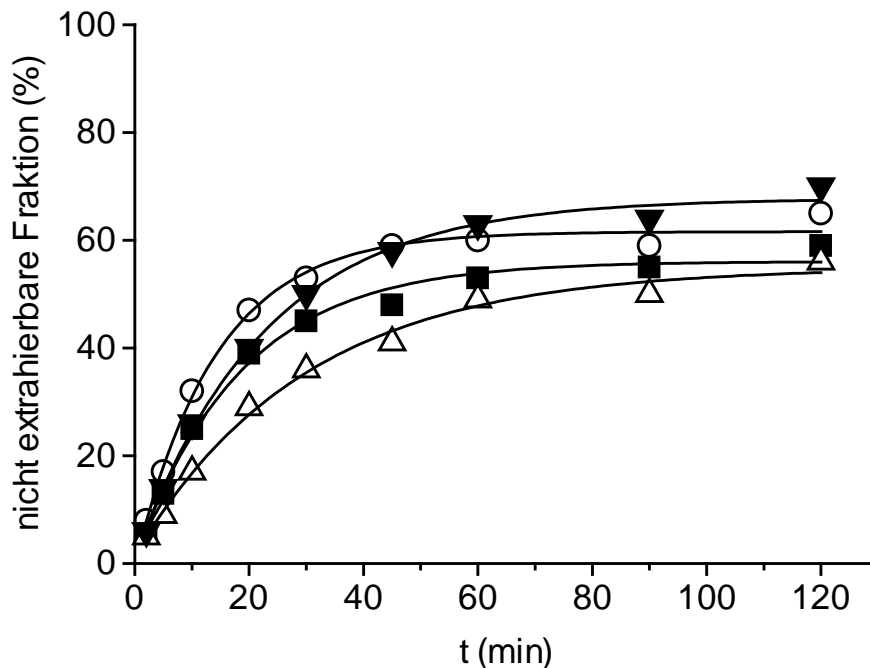


Abb. 16: Auswirkungen einer variierenden extrazellulären NaCl-Konzentration auf den Gesamt-Flip von NDP_2 . Die Beladung erfolgte standardmäßig, nicht-vorbehandelte Zellen wurden bei 32 °C, pH 7,4 inkubiert und der Flip gemessen. Die NaCl-Konzentration des Mediums betrug (○) 80 mM, (■) 150 mM, (△) 240 mM und (▼) 150 mM mit zusätzlich 180 mM Saccharose.

Das stationäre Verteilungsgleichgewicht S_i/S_e lag bei 1,3 für nicht-DIDS-behandelte Zellen (Tab. 3). Der Vergleichswert in KNPS liegt bei 1,6. Dies erklärt sich möglicherweise aus den unterschiedlichen Chlorid-Konzentrationen der beiden Medien: Das KNPS-Medium enthält 135 mM Chlorid. Die im Vergleich zu KNPS höhere Chlorid-Konzentration des 150 mM NaCl-Medium bewirkt einen etwas stärkeren Gradienten von extra- nach intrazellulär (intrazelluläre Chlorid-Konzentration ca. 100 mM). Mit der Nernst-Formel errechnet sich somit für das NaCl-Medium ein etwas stärker negatives Membran-Potential, welches hemmend auf den Einbau von NDP_2 in das Innenblatt der Membran wirkt.

An DIDS-behandelten Zellen stellt sich das stationäre Verteilungsgleichgewicht S_i/S_e bei $1,5 \pm 0,3$ ein (Tab. 3). In Betracht der angegebenen Standardabweichung ist, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($S_i/S_e = 1,3 \pm 0,1$), von einem nicht-signifikanten Unterschied auszugehen.

Tab. 3: Einfluss der extrazellulären NaCl-Konzentration auf den Flip von NDP₂. Die angegebenen NaCl-Konzentrationen beziehen sich auf das verwendete Flip-Medium. Der Ausdruck „ $k_{in(x)}$ “ steht für die Geschwindigkeitskonstante des Einwärtstransportes bei veränderten Bedingungen, hier die extrazelluläre Natrium-Chlorid-Konzentration bzw. die Osmolarität. Der Ausdruck „ $k_{in(Kontr.)}$ “ bezeichnet den k_{in} -Wert des Flip in 150 mM NaCl-Medium bei der entsprechenden Temperatur (siehe Kopfzeile). Sonstige Parameter entsprachen dem Standard-Flip (pH 7,4, 32 °C)

Zusatz	Konz. (mM)	Gesamt 32 °C				DIDS-insensitiv 40 °C			
		$k_{in(x)}/k_{in(Kontr.)}$	(n)	S_i/S_e	(n)	$k_{in(x)}/k_{in(Kontr.)}$	(n)	S_i/S_e	(n)
NaCl	150	1,0	2	1,3±0,1	6	1,0	2	1,5±0,3	6
NaCl	80	1,6	2	1,6	4	1,1	2	1,7	2
NaCl	240	0,6	2	1,2	2	0,8	2	1,2	2
NaCl/ Sacch.	150/180	1,0	2	2,0	2	1,2	2	2,1	2

3.9.1.3. Inkubation in hypotonem NaCl-Medium (80 mM NaCl)

Die Flip-Rate von NDP₂ ist bei Senkung der extrazellulären Chlorid-Konzentration auf 80 mM an nicht-DIDS-behandelten Zellen entsprechend der geäußerten Erwartung (s.o.) beschleunigt. Der mittlere Beschleunigungs-Faktor beträgt 1,6 (siehe [Abb. 16](#); [Tab. 3](#); n = 2). Ursache dürfte die verminderte Konkurrenz mit Chlorid sein.

An DIDS-vorbehandelten Zellen ist die Beschleunigung erwartungsgemäß deutlich geringer (Faktor 1,1), da für den zugrunde liegenden Konkurrenz-Effekt AE1 verantwortlich ist, welches unter DIDS unterdrückt wird ([Tab. 3](#)).

Das stationäre Verteilungsgleichgewicht stellt sich auf einen Quotienten $S_i/S_e = 1,6$ (unbehandelte Zellen) bzw. $S_i/S_e = 1,7$ (DIDS-behandelte Zellen) ein. Im Vergleich zum Kontroll-Wert in einem 150 mM NaCl-Medium ($S_i/S_e \approx 1,3$ bzw. 1,5), liegt also eine allerdings geringfügig erhöhte Verteilung der Sonde zugunsten des Membran-Innenblattes vor. Ursächlich hierfür ist vermutlich der Einstrom von Wasser in die Zelle, woraus eine Erniedrigung der intrazellulären Chlorid-Konzentration durch Verdünnung resultiert. Diese Angleichung der intrazellulären Chlorid-Konzentration von normal 100 mM an die extrazelluläre Chlorid-Konzentration (hier: 80 mM) bewirkt ein geringeres negatives Membranpotential und einen dadurch begünstigten Einbau der anionischen Sonde in das Membran-Innenblatt.

3.9.1.4. *Inkubation in hypertonem NaCl-Medium (240 mM NaCl)*

Aufgrund der erwarteten Kompletions-Effekte tritt bei Erhöhung der extrazellulären Chlorid-Konzentration von 150 auf 240 mM ein, im Vergleich zum hypotonen Medium (80 mM NaCl), entgegengesetzter Effekt ein (Tab. 3). Der Flip von NDP_2 ist an nicht-DIDS-behandelten Zellen um den Faktor 0,6 ($n = 2$) verlangsamt. An DIDS-behandelten Zellen ist, trotz gehemmter AE1-Transportfunktion, die Geschwindigkeitskonstante - für den nicht-vermittelten Flip - ebenfalls leicht reduziert. Dies ist möglicherweise auf eine indirekt-hemmende Wirkung eines etwas stärker negativen Membran-Potentials zurückzuführen (Tab. 3).

Das stationäre Verteilungsgleichgewicht liegt für unbehandelte und DIDS-behandelte Zellen bei $S_i/S_e = 1,2$ und ist damit im Vergleich zum Kontrollwert (150 mM NaCl, $S_i/S_e \approx 1,3$) nur unwesentlich verändert. Die Konstellation der Werte – reduzierte Geschwindigkeitskonstante an DIDS-behandelten und nicht-DIDS behandelten Zellen und Verringerung des Innenblattanteiles im stationären Gleichgewicht – sprechen für einen geringen Potential-Effekt.

3.9.1.5. *Inkubation in hypertonem NaCl-Saccharose-Medium (150 mM NaCl, 180 mM Saccharose)*

An nicht-DIDS-behandelten Zellen bewirkte die Inkubation in hypertonem NaCl-Saccharose-Medium (150 mM NaCl, 180 mM Saccharose) keine Änderung der Geschwindigkeitskonstante des Flip im Vergleich zur Kontrolle in 150 mM NaCl (Tab. 3). Das Verteilungsgleichgewicht wurde jedoch zugunsten des Membran-Innenblattes verschoben. Der Quotient S_i/S_e betrug 2,0 gegenüber 1,6 an Kontrollzellen.

An DIDS-behandelten Zellen ergab sich eine geringe Beschleunigung des Flip um den Faktor 1,2. Das Verteilungsgleichgewicht verschob sich auf einen Quotienten $S_i/S_e = 2,1$ (Tab. 3). Eine unter diesen Bedingungen ausbleibende bzw. sehr geringe Flip-Steigerung bei Zunahme des Verteilungsquotienten S_i/S_e unterstützt die Vorstellung, dass der AE1-vermittelte Prozess des Austausches langkettiger Anionen im obligaten Antiport, d.h. elektroneutral abläuft (s.o.), also auf die unter diesen Bedingungen erfolgende Positivierung des Membranpotentials nicht direkt reagiert, im Gegensatz zur stationären Verteilung, die in jedem Fall potentialabhängig ist. Zusätzlich kann anhand des Vergleiches zwischen den Flipraten für Zellen in 150 mM NaCl-Medium und für Zellen in

150 mM NaCl +180 mM Saccharose eine Aussage zu dem Effekt einer sog. „Rekrutierung“ gemacht werden.^e

Folgen eines Rekrutierungseffektes zeigen sich bei Abnahme der Chlorid-Konzentration im EZR oder Zunahme der Chlorid-Konzentration im IZR. Durch Zunahme des auswärts gerichteten, unidirektionalen Transports von Chlorid-Ionen kommt es zu einem erhöhten Anteil verfügbarer Bindungsstellen von AE1 auf der Außenseite und somit zu einer Erhöhung der momentanen Transport-Kapazität für die Einwärts-Translokation extrazellulärer Anionen wie z.B. NDP₂.

In dem NaCl-/Saccharose-Medium steigt in Folge der Zellschrumpfung die Chlorid-Ionen-Konzentration des IZR an. Damit könnte eine Rekrutierung von Bindungsstellen nach außen erfolgen und zu einer Beschleunigung des Flip führen. Da sich aber bei gleichbleibender Chlorid-Außenkonzentration (Kompetition zwischen NDP₂ und Chlorid unverändert) keine Beschleunigung messen lässt - die initiale Steigung der Kinetik ist in beiden Fällen gleich - ist der Effekt der Rekrutierung hier aufgrund der hohen Chlorid-Konzentrationen im Intra- und Extrazellulärraum vermutlich zu gering.

Bei Betrachtung der stationären Verteilungsgleichgewichte werden die Ergebnisse von Bisognano et al.⁴⁷ bestätigt, die herausfanden, dass ein hypertones NaCl- bzw. KCl-Medium das Membranpotential nur gering beeinflusst, ein hypertones Nicht-Elektrolyt-Medium (Saccharose) das intrazellulär-negative Potential jedoch abschwächt bzw. sogar umkehrt. Hierzu passend verteilt sich die Sonde NDP₂ in einem NaCl/Saccharose-Medium stärker zugunsten des Innenblattes der Membran (Tab. 3).

Der Einfluss veränderter Chlorid-Konzentrationen auf den Flip von NDP₂, zeigt, dass unter diesen Bedingungen neben dem Effekt eines veränderten Nernst-Potentials viele „Nebeneffekte“ berücksichtigt werden müssen und die Interpretation der Ergebnisse

^e Schema zur Darstellung des Prinzips eines „mobilen Carriers“ mit alternierenden ein-bzw. auswärts gerichteten Bindungsstellen

$$\frac{A \cdot C}{AC} = K_{D_A} \quad \frac{B \cdot C}{BC} = K_{D_B}$$

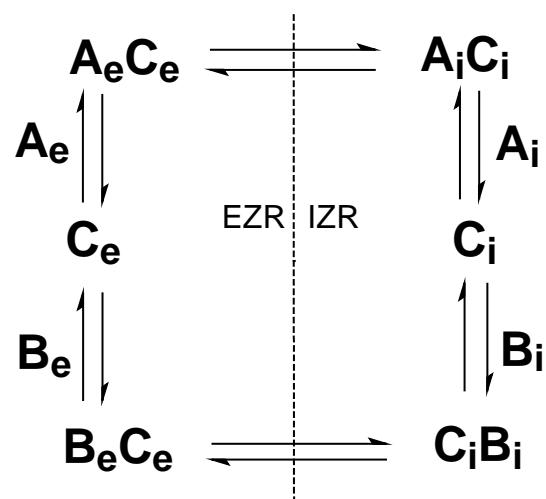
Die Verteilung von C_e und C_i, BC_e und BC_i hängt u.a. vom Verhältnis A_e/A_i, aber auch von A_e/B_e ab.

A_{e/i} = Chlorid extra-/intrazellulär

B_{e/i} = NDP₂ extra-/intrazellulär

C_{e/i} = Konzentration der freien Carrier-Bindungsstellen mit Ausrichtung zum Extra-/Intrazellulärraum

K_D = Dissoziations-Konstante



entsprechend schwer fällt. Folglich wurde versucht, Potential-Effekte anhand von weniger komplexen Sachverhalten zu studieren. Hierzu wurde die Einwärtstranslokation der Sonde NDP₂ in das Innenblatt der Erythrozytenmembran unter Bedingungen eines experimentell induzierten Kalium-Potentials untersucht.

3.9.2 Einfluss veränderter Kalium(K⁺)-Potentiale

Die Leitfähigkeit der Erythrozyten-Membran für Kalium-Ionen ist unter physiologischen Umständen ungefähr um den Faktor 10³ geringer als die Leitfähigkeit der Membran für Chlorid-Ionen. Sie hat somit nur geringen Einfluss auf das Membran-Potential, welches im Grunde ein Chlorid-Potential ist. Durch Zugabe eines geeigneten Ionophors (Valinomycin) lässt sich Leitfähigkeit für Kalium drastisch erhöhen.⁴⁵ Sie dominiert unter diesen Bedingungen so weit, dass das Membranpotential nach der Formel

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_a}{[K^+]_i}$$

berechnet werden kann.

Ziel des folgenden Teils der Untersuchungen war, nach Steigerung der Kalium-Leitfähigkeit durch Valinomycin über Veränderungen der Kalium-Konzentration im Medium [K⁺_a] Einfluss auf das Membran-Potential (MP) zu nehmen und hierdurch hervorgerufene Veränderungen des NDP₂-Flips zu messen. Die intrazelluläre Kalium-Konzentration an den verwendeten Zellen wurde allerdings nicht gesondert bestimmt; vielmehr wurde ein durch viele frühere Untersuchungen gesicherter Wert von ca. 80 mM in den verwendeten Zellen angenommen. Somit ist der Kalium-Konzentrationsunterschied zwischen EZR und IZR und das daraus resultierende Potential nicht exakt definiert und die Ergebnisse sind deshalb nur unter qualitativ-vergleichenden Gesichtspunkten auswertbar.

Aufgrund der niedrigen Leitfähigkeit für Kalium-Ionen sind unter Normalbedingungen keine Potential-Änderungen durch Variation der extrazellulären Kalium-Konzentration zu erwarten. An unbehandelten und DIDS-behandelten Zellen verändern sich ohne Zusatz von Valinomycin bei Variation der extrazellulären Kalium-Konzentration (150 bzw. 0 mM) weder die Geschwindigkeitskonstante noch das Verteilungsgleichgewicht (Daten nicht gezeigt).

Anders liegen die Verhältnisse nach Steigerung der Kalium-Permeabilität durch Valinomycin. Unter diesen Bedingungen sollten Änderungen des Kalium-Gradienten das Membranpotential und dadurch den Flip von NDP₂ beeinflussen. Diese Effekte sollten darüber hinaus durch Verminderung der Chlorid-Leitfähigkeit nach Zusatz von DIDS

verstärkt werden, allerdings mit der Konsequenz, dass an DIDS-behandelten Zellen nur die Potential-Effekte auf den nicht-vermittelten Transport untersucht werden konnten. Außerdem ergaben sich aufgrund der DIDS-Vorbehandlung der Zellen sehr langsame Transportraten. Um Effekte sichtbar zu machen, musste daher zur Reaktionsbeschleunigung die Versuchstemperatur auf 40 °C heraufgesetzt werden.

Zur extremen Variation des Kalium-Gradienten in Gegenwart von Valinomycin wurden Medien mit 150 bzw. 0 mM Kalium-Ionen eingesetzt. Nach der o.g. Formel resultiert aus einer erniedrigten extrazellulären Kalium-Konzentration eine weitere Negativierung des intrazellulär negativen Potentials. Unter der Annahme, dass primär die stationäre Verteilung und nur indirekt die Flip-Geschwindigkeit von NDP_2 durch das Membranpotential beeinflussbar sind, ist bei Negativierung des Membranpotentials eine Verkleinerung des Quotienten S_i/S_e zu erwarten.

3.9.2.1. *Effekte an DIDS-behandelten Zellen*

In einem Medium mit einer Kalium-Konzentration von 150 mM, also einem einwärts gerichteten Kalium-Gradienten, bewirkt die Valinomycin-Zugabe im direkten Vergleich (d.h. Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten innerhalb eines Versuches mit und ohne Valinomycin) eine deutliche Beschleunigung des Flip um den Faktor 1,7, dabei steigt der Quotient S_i/S_e nur von 1,6 auf 1,8 ($n = 2$; Abb. 17).

In einem kaliumfreien Medium nimmt die Fliprate der Sonde nach Valinomycin-Zugabe um den Faktor $0,7 \pm 0,2$ ab ($n = 5$; Abb. 17). Das Verteilungsgleichgewicht fällt von $S_i/S_e = 1,5 \pm 0,3$ ($n = 5$) an Zellen in kaliumfreiem Medium ohne Valinomycin-Zugabe auf $S_i/S_e = 1,1 \pm 0,3$ ($n = 5$) an Zellen im gleichen Medium mit Valinomycin-Zugabe (Abb. 17). Im T-Test ergibt sich für diese Werte ein signifikanter Unterschied auf einem Signifikanz-Niveau von 0,05.

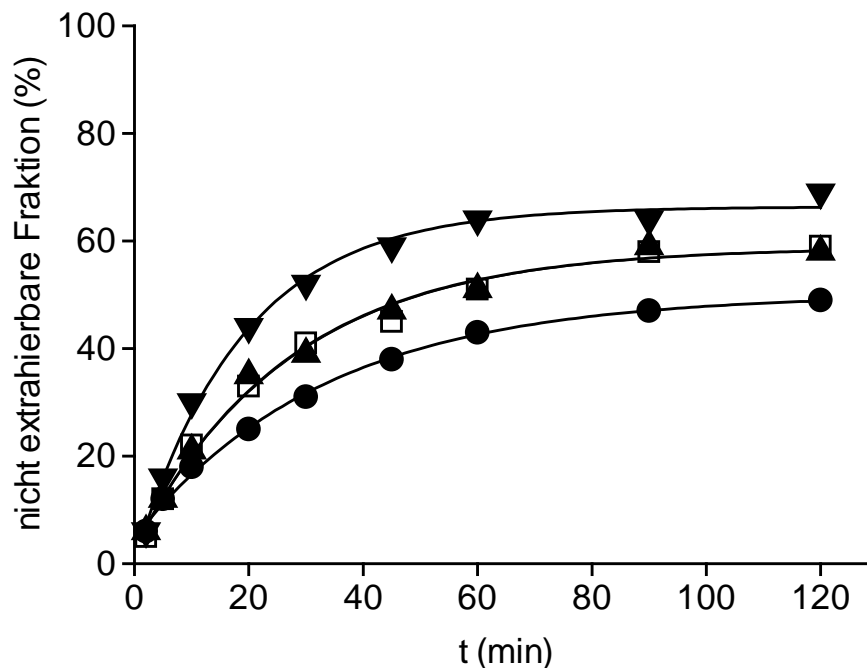


Abb. 17: Auswirkung veränderter extrazellulärer Kalium-Konzentrationen auf die Kinetik des nicht-vermittelten Flip und die stationäre Verteilung von NDP_2 . Flip an DIDS-behandelten Zellen bei 40 °C (pH 7,4, Hkt 14 %). In Abwesenheit bzw. Gegenwart des Kalium-Ionophors Valinomycin (5 μM) wurden die Kalium-Konzentrationen im Medium variiert: (□) 150 mM Kalium-Chlorid ohne Valinomycin, (▼) 150 mM Kalium-Chlorid mit Valinomycin, (▲) 0 mM Kalium-Chlorid ohne Valinomycin, (●) 0 mM Kalium-Chlorid mit Valinomycin. Die osmotische Kompensation in der kaliumfreien Suspension erfolgte durch Natrium-Chlorid (150 mM).

Die Ergebnisse bestätigen die Erwartung, dass bei Erhöhung der Kalium-Permeabilität der Erythrozyten-Membran und gleichzeitiger Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration eine Abschwächung des Membran-Potentials resultiert und es zu einer Zunahme des Verhältnisses S_i/S_e kommt. Eine Erniedrigung der extrazellulären Kalium-Konzentration führt durch Zunahme des negativen Membran-Potentials zu einer Abnahme des Verhältnisses S_i/S_e . Beide Befunde belegen die Richtigkeit der Annahme, dass die Flip-Rate und insbesondere das intramembranäre, stationäre Verteilungsgleichgewicht von NDP_2 durch das Membran-Potential zu beeinflussen sind.

3.10 Effekte zweiwertiger Kationen auf den Flip von NDP_2

3.10.1 Calcium

Ca^{++} ist eines der bedeutendsten Elemente im menschlichen Organismus. Es liegt intraerythrozytär in einer Ionen-Konzentration von weniger als $0,1 \mu\text{M}^{48,49}$ vor. Diese geringe Konzentration wird durch eine ATPase aufrechterhalten⁵⁰, die in einem aktiven Prozess Ca^{++} aus dem Erythrozyten herausschleust. Die Ca^{++} -Aufnahme in die Zelle ist außerdem im Normalzustand sehr gering⁴⁹. Um die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration zu erhöhen, wurde in den folgenden Versuchen das Antibiotikum A23187 verwendet. A23187 kann mit Ca^{++} und anderen zweiwertigen Kationen membranlösliche Komplexe bilden^{51,52}. Aufgrund dieser Eigenschaft wird A23187 als mobiles Ionophor in biologischen Membranen eingesetzt, um die intrazelluläre Konzentration zweiwertiger Kationen zu erhöhen. Steigt der Ca^{++} -Spiegel im Erythrozyten, führt dies u.a. zu einem partiellen Abbau der im „Normalzustand“ vorliegenden Phospholipid-Asymmetrie. Verantwortlich hierfür ist ein intrinsisches Membran-Protein, die sog. „Scramblase“. Dieses Protein, mit einem ungefähren Molekular-Gewicht von 37 kDa, besitzt neben einer transmembranären Domäne eine endofaciale Bindungsstelle für Ca^{++} .⁵³ Wird diese Bindungsstelle infolge eines intrazellulären Ca^{++} -Anstieges besetzt, so baut die Scramblase durch bidirektionale, unspezifische und ATP-unabhängige Ein- und Auswärts-Translokation von Phospholipiden (PL) die bestehende Asymmetrie der Membran- Phospholipide ab.^{54,55} Neben Ca^{++} sind weitere zweiwertige Erdalkali-Kationen in der Lage, die Scramblase zu aktivieren. Hierzu gehört z.B. Strontium.⁶⁹

Weiterhin erhöht eine Zunahme der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration aber auch die Kalium-Leitfähigkeit der Erythrozytenmembran (Gardos-Effekt). Um hiermit einhergehende Veränderungen des Nernst-Potentials zu vermeiden, wurden die folgenden Versuche über den Einfluß von Ca^{++} auf den Flip von NDP_2 in isotonem KNHS-Medium durchgeführt. Die Angleichung der extrazellulären an die intrazelluläre Kalium-Konzentration verhindert den Aufbau eines Kalium-Potentials trotz hoher Kalium-Leitfähigkeit der Membran.

Die im Folgenden dargestellten Experimente sollten die Frage klären, ob amphiphile Anionen wie NDP_2 ähnlich wie die amphiphilen Phospholipide durch die Scramblase transportiert werden können und inwieweit der Scramblase-vermittelte Abbau der Phospholipid-Asymmetrie innerhalb der Membran die Transportkinetik und das Verteilungsgleichgewicht von NDP_2 beeinflussen. Im Diskussionsteil der Arbeit wird erörtert, wie die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Ca^{++} dazu beitragen können, diese Fragen zu beantworten.

Da der Scramblase-vermittelte Transport keine Modifikation eines vorhandenen Transportweges darstellt, sondern als eigenständiger Prozess zu werten ist, werden die Veränderungen der Geschwindigkeitskonstanten (k) durch Ca^{++} nicht als Faktor $k_{in}(x)/k_{in}(\text{Kontrolle})$, sondern als Differenz (Δk) ausgewertet.

3.10.1.1. Effekte von Calcium-Ionen auf den NDP_2 -Flip an Zellen mit ungehemmter AE1-Aktivität

Zunächst konnte gezeigt werden, dass A23187 an Zellen mit ungehemmter AE1-Aktivität bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ ohne Zugabe von Ca^{++} keine Auswirkung auf den Flip von NDP_2 hat (Abb. 18).

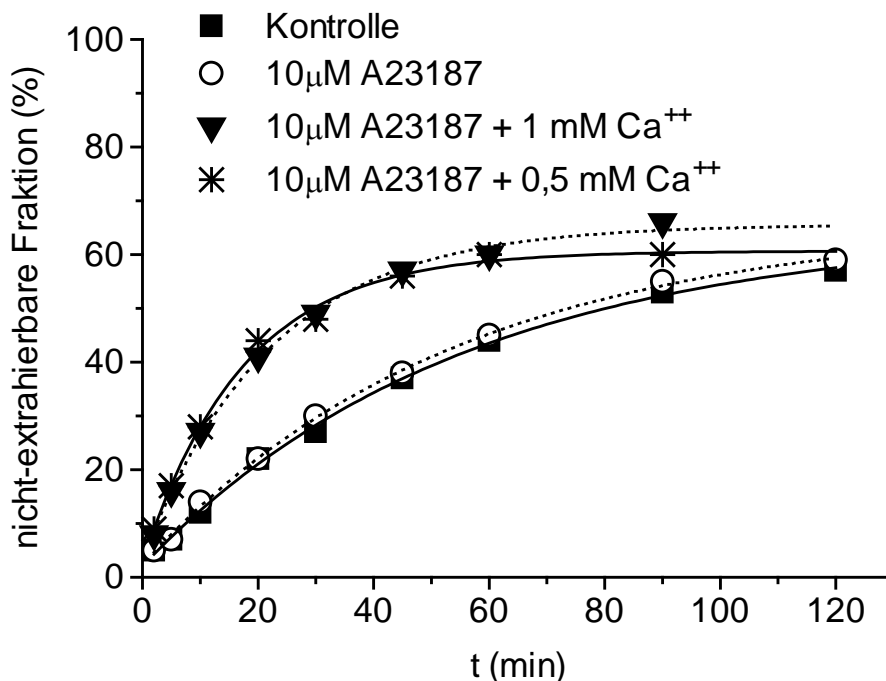


Abb. 18: Ca^{++} -Effekt auf den Flip von NDP_2 an Zellen mit nicht-gehemmter AE1-Aktivität. Flip-Temperatur $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7,4, KNHS-Medium, nicht-DIDS-behandelte Zellen. Keine Beeinflussung der Kinetik durch alleinige Zugabe von Ionophor A23187 ($10 \mu\text{M}$). Steigerung der Flip-Rate durch Zugabe von Calcium-Ionen in verschiedenen Konzentrationen (Legende siehe Graphik).

Durch das Ionophor A23187 in Verbindung mit Ca^{++} wird dagegen eine Flip-Beschleunigung ausgelöst. Diese Beschleunigung (Δk) beträgt bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,5 \text{ mM}$ Ca^{++} und $10 \mu\text{M}$ Ionophor A23187 in einem KNHS-Medium $0,0217$. Das Verteilungsgleichgewicht der Sonde bleibt dabei unverändert (Abb. 18). Dieser Befund legte die Vermutung nahe, dass die durch Ca^{++} aktivierte Scramblase NDP_2 als Substrat akzeptiert. Das unveränderte Verteilungsgleichgewicht zeigt darüber hinaus, dass die Veränderungen

der PL-Asymmetrie nach Scramblase-Aktivierung für die Flip-Steigerung keine Bedeutung haben dürften. Würde eine Symmetrisierung der Membran-Phospholipide über elektrostatische Effekte eine indirekte Flip-Steigerung bedingen („Triebkraftänderung“), wäre eine zumindest geringfügig veränderte NDP_2 -Verteilung zu erwarten. Bei gleichem Verteilungsgleichgewicht ist jedoch nicht von einem solchen Einfluss auszugehen. Auch eine direkte Wirkung auf den AE1-vermittelten Transport ist unwahrscheinlich. Unter den oben genannten Versuchsbedingungen trägt nun allerdings der AE1-Transportanteil zu der Kinetik bei. Für eine differenziertere Betrachtung des Ca^{++} -Effektes auf den AE1-unabhängigen Anteil des NDP_2 -Transports und eine weitere Sicherung der Scramblase-Beteiligung an der Ca^{++} -induzierten Flip-Steigerung wurde folglich der AE1-Anteil durch Vorbehandlung der Zellen mit DIDS eliminiert.

3.10.1.2. Effekte von Calcium-Ionen an DIDS-behandelten Zellen

Die Versuche an DIDS-vorbehandelten Zellen ergaben überraschenderweise nur eine leichte Steigerung des nicht-vermittelten NDP_2 -Flip nach Ca^{++} /A23187-Zugabe. Bei einer Ca^{++} -Konzentration im Flip-Medium von 1 mM kam es bei 32 °C nur zu einer Flip-Beschleunigung von $\Delta k = 0,0031$ ($n = 5$; Abb. 19). Versuche mit anderen Ca^{++} -Konzentrationen (0,2-2 mM) ergaben vergleichbare Δk -Werte.

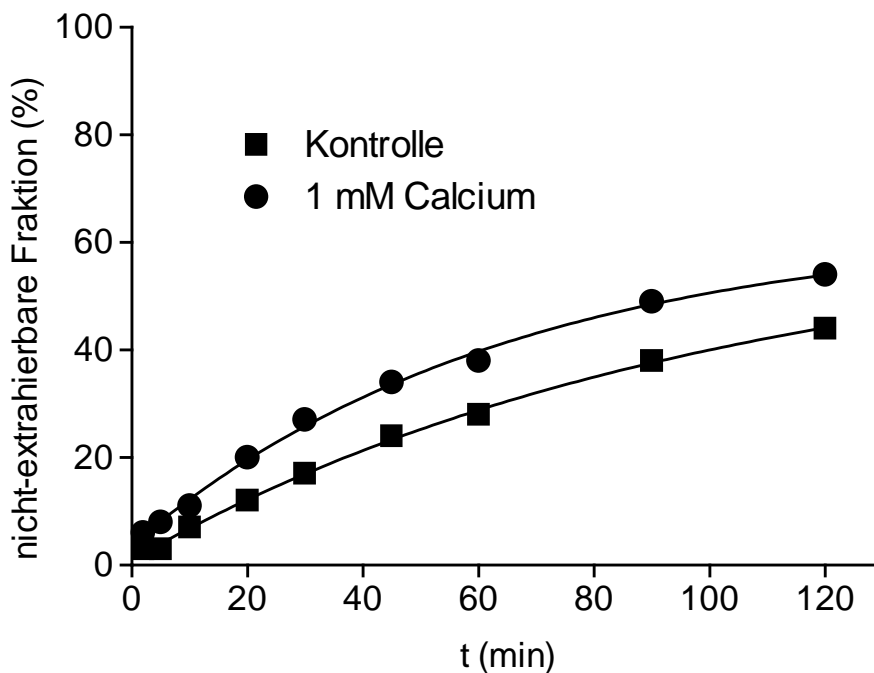


Abb. 19: Ca^{++} -Effekt auf den Flip von NDP_2 an DIDS-vorbehandelten Zellen. Flip-Temperatur 32 °C, pH 7,4. Steigerung der Flip-Kinetik unter Zugabe von 10 μM Ionophor A23187 und 1 mM Ca^{++} zum KNHS-Flip-Medium. Für die k_{in} -Werte der beiden Kinetiken ergibt sich eine Differenz $\Delta k = 0,0031$.

Eine mögliche Erklärung für diesen unerwarteten Befund wäre, dass DIDS die Scramblase-Aktivität hemmt. Folglich wurden Versuche durchgeführt, bei denen die AE1-Aktivität nicht durch eine Vorbehandlung mit DIDS, sondern durch Zugabe des nicht-kovalent bindenden AE1-Inhibitors DNDS gehemmt war.

3.10.1.3. Effekte von Calcium-Ionen unter DNDS-gehemmter AE1-Aktivität

An Zellen mit DNDS-gehemmter AE1-Aktivität (0,5 mM DNDS im Flip-Medium) zeigte die Flip-Kinetik bei einer Temperatur von 25 °C nach Ca^{++} /A23187-Zugabe (0,5 mM Ca^{++} ; 10 μM A23187) eine Beschleunigung von $\Delta k = 0,0116$ ($n = 7$; Abb. 20). Die Tatsache, dass der Ca^{++} -Effekt an Zellen mit DNDS-gehemmter AE1-Aktivität trotz niedrigerer Temperatur deutlicher ausfiel als an DIDS-vorbehandelten Zellen, erhärtete die Vermutung einer bis dahin unbekanntenen Hemmung der Scramblase durch DIDS (s.u.).

Die Ca^{++} -induzierte Flip-Steigerung an Zellen mit DNDS-gehemmter AE1-Transportfunktion ist konzentrationsabhängig (Abb. 20).

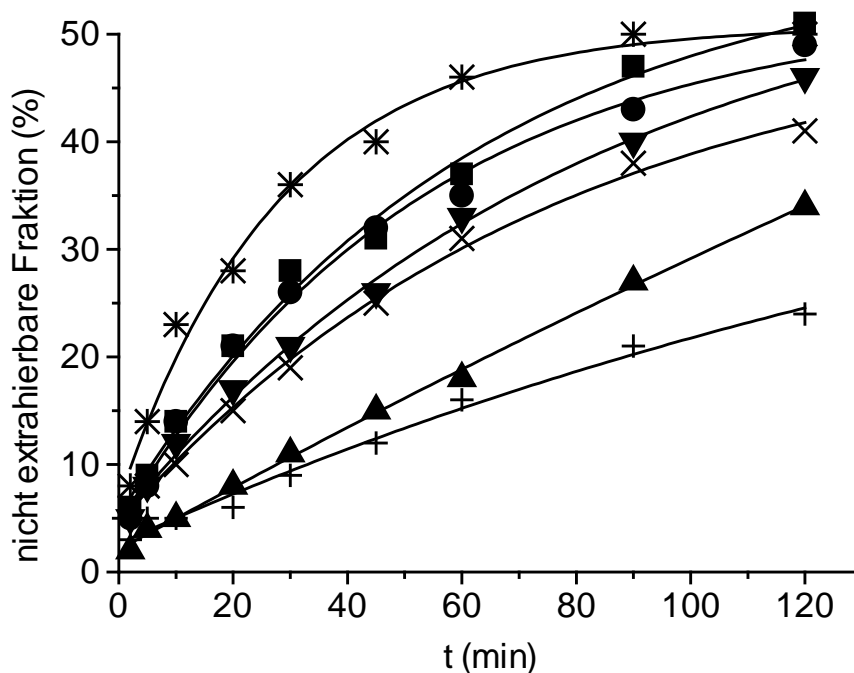


Abb. 20: Ca^{++} -Konzentrationsabhängigkeit der Scramblase-Aktivierung. Unbehandelte Zellen wurden bei einer Temperatur von 25 °C in Gegenwart von DNDS (0,5 mM) und Ionophor A23187 (10 μM , Zugabe kurz nach Zugabe der Erythrozyten zum Flip-Medium) inkubiert. In dem KNHS-Medium waren folgende Ca^{++} -Konzentrationen (mM) enthalten: (+) Kontrolle, kein Ca^{++} ; (▲) 0,05; (×) 0,1; (▼) 0,2; (*) 0,5; (■) 1,0; (●) 2,0.

Sie ist ab einer Ca^{++} -Konzentration von weniger als 0,05 mM im Flip-Medium zu erkennen. Bei einer Ca^{++} -Konzentration von 0,5 mM wird ein Beschleunigungsmaximum ($\Delta k = 0,0116$) erreicht. Bei höheren Konzentrationen nimmt der Effekt wieder ab (Abb. 20). Ein ähnliches Verhalten zeigten auch andere Sonden (Lyso-PS und Palmitoyl-Carnitin; s. Henseleit⁶⁹) Für weitere Versuche erschien somit eine Ca^{++} -Konzentration von 0,5 mM sinnvoll.

Für die stationäre Verteilung (S_i/S_e) von NDP_2 unter Ionophor- und DNDS-Zugabe und Ca^{++} -Konzentrationen von 0,5 - 2 mM im Medium ergab sich ein Mittelwert mit Standardabweichung von $1,3 \pm 0,2$. Auf einen Vergleich dieses Verteilungsgleichgewichtes mit dem an „direkten“ Kontroll-Zellen (d.h. bei gleichen Versuchsbedingungen aber ohne Zugabe von Ca^{++}) musste verzichtet werden. Die Translokation von NDP_2 verläuft an diesen Zellen (bei 25 °C) so langsam, dass eine verlässliche Berechnung des Verteilungsgleichgewichtes nicht möglich war.

Im Vergleich zu der NDP_2 -Verteilung unter Standardbedingungen (32 °C) ohne DNDS, $S_i/S_e = 1,6 \pm 0,3$ ($n = 39$; vgl. Abb. 6, S. 27), zeigen die Verteilungswerte nur eine geringe Abweichung. Der Vergleich des stationären Verteilungsgleichgewichtes unter Zugabe von DNDS, A23187 und Ca^{++} mit dem Verteilungsgleichgewicht unter Standardbedingungen erscheint aus drei Gründen zulässig: Erstens konnte gezeigt werden, dass das zugesetzte Ionophor A23187 keine Eigeneffekte auf Flipgeschwindigkeit oder Verteilungsgleichgewicht hat (Abb. 18, S.57). Zweitens ist eine Beeinflussung des Verteilungsgleichgewichtes von NDP_2 durch DNDS nicht zu erwarten. Dies konnte schon für NDP_1 unter DNDS und anderen Stilbendisulfonaten, wie z.B. DIDS, gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Drittens wurde in Kapitel 3.4 (Temperaturabhängigkeit des Flip von NDP_2) gezeigt, dass das stationäre Verteilungsgleichgewicht von der Temperatur nicht beeinflusst wird. Die aus Gründen der exakteren Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten hier gewählte Temperatur von 25 °C dürfte demnach keine Auswirkung auf die Verteilung der Sonde NDP_2 in den Membranblättern haben.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte angenommen werden, dass die gezeigte Flip-Beschleunigung durch intrazelluläres Ca^{++} auf eine Aktivierung der Scramblase zurückzuführen ist und die Sonde NDP_2 von der Scramblase als Substrat erkannt wird.

Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen ergab sich ein weiterer überraschender Befund: Es zeigte sich, dass durch das SH-Reagenz N-Ethylmaleimid (NEM) die Ca^{++} -induzierte Beschleunigung des nicht-vermittelten Flip von NDP_2 unter DNDS erheblich gesteigert (Abb. 21) wird. Eine Vorbehandlung von Erythrozyten mit NEM (0,8 mM,

20 min, 37 °C) führte zu einer deutlichen Verstärkung der Ca^{++} -abhängigen Beschleunigung (Ca^{++} -Konzentration 0,5 mM; Ionophor A23187 10 μM) des Flip von NDP_2 um den Faktor 2,5. Auch der Verteilungsquotient S_i/S_e wurde durch Vorbehandlung der Erythrozyten mit NEM gesteigert (Tab. 4). Die Versuchsergebnisse liefern für diese Beeinflussung des Verteilungsgleichgewichtes keine schlüssige Erklärung.

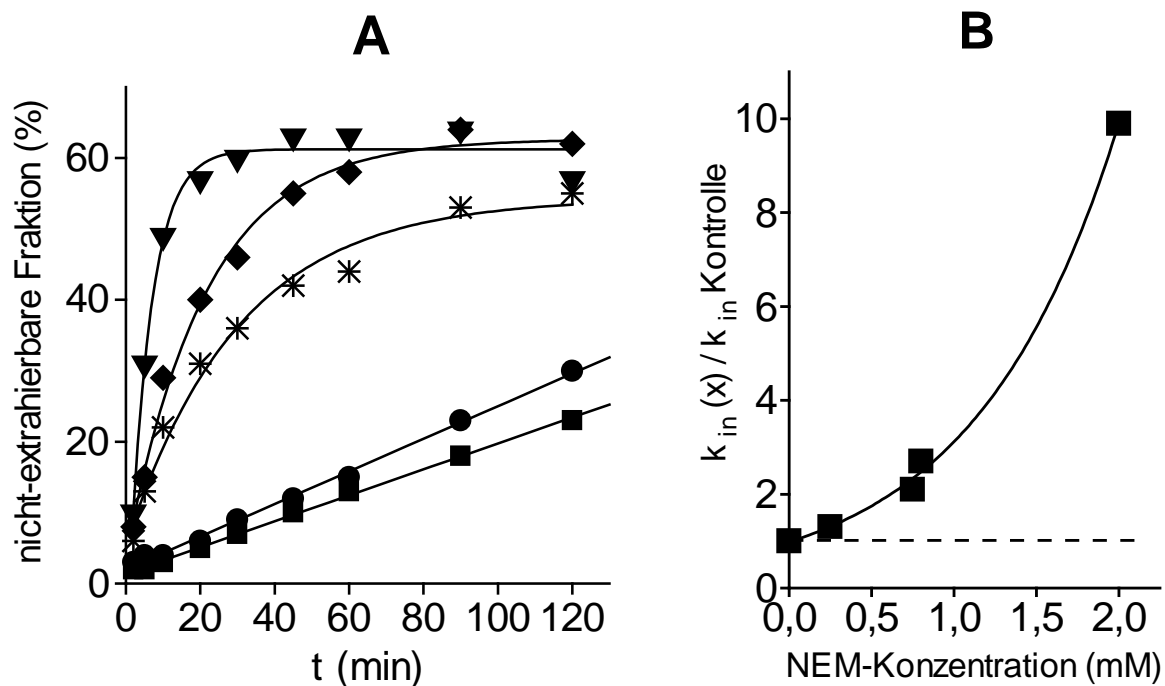


Abb. 21(A): Auswirkung einer Vorbehandlung von Erythrozyten mit NEM auf den Flip von NDP_2 . Zur Vorbehandlung wurden die Zellen bei 37 °C, einem Hkt. von 10 % in KNPS bei der jeweiligen NEM-Konzentration für 20 min inkubiert und anschließend gewaschen. In allen Flip-Ansätzen waren Ionophor A23187 (10 μM) und DNDS (0,5 mM) enthalten. Inkubation unter Standard-Bedingungen in KNHS-Medium (25 °C).

- (■) Kontrolle (keine NEM-Vorbehandlung, kein Ca^{++})
- (*) keine NEM-Vorbehandlung, Ca^{++} (0,5 mM)
- (●) NEM (0,8 mM)
- (◆) NEM (0,75 mM), Ca^{++} (0,5 mM)
- (▼) NEM (2,5 mM), Ca^{++} (0,5 mM)

Abb. 21(B): NEM-Konzentrationsabhängigkeit der Scramblase-induzierten Flip-Steigerung. Darstellung normierter Daten. Durch Vorbehandlung der Erythrozyten (37 °C, Hkt. 10 %, 20 min) mit steigenden NEM-Konzentrationen (s. Abszisse) wurde eine Beschleunigung des Flip erreicht. k_{in} [Kontrolle] bezeichnet den Wert der Geschwindigkeitskonstanten unter Ca^{++} ohne NEM. In allen Flip-Ansätzen waren Ionophor A23187 (10 μM) und DNDS (0,5 mM) enthalten. Inkubation unter Standard-Bedingungen in KNHS-Medium (25 °C).

Tab. 4: Wirkungen einer DIDS- bzw. NEM-Vorbehandlung auf den Scramblase-vermittelten Flip von NDP₂. Die NEM Vorbehandlung (0,8 mM) erfolgte immer vor einer evtl. DIDS-Vorbehandlung (50 µM) Die Zellen wurden bei 25 °C in einem KNHS-Medium mit 0,5 mM DNDS inkubiert. Ca⁺⁺ (0,5 mM) und Ionophor A23187 (10 µM) waren ebenfalls in allen Medien enthalten. Δk bezeichnet die Differenz zwischen Ansätzen ohne Zugabe von Ca⁺⁺ und mit Zugabe von Ca⁺⁺.

Vorbehandlung	Mittelwert Δ k·10 ³		n	Hemmung d. Scramblase durch DIDS-Vorbehandlg. (%)	$\frac{S_i}{S_e}$
keine	11,6	± 3,4	7	-	1,2 ± 0,2
+ DIDS	2,5	± 1,3	4	80	1,4 ± 0,3
+ NEM	32,2	± 6,2	3	-	1,7 ± 0,3
+ DIDS + NEM	5,0	± 2,4	3	86	1,9 ± 1,2

Dass es sich hierbei um einen Effekt auf die Scramblase handelt, ließ sich durch zwei Befunde stützen: Erstens wurde der beschleunigende Effekt einer NEM-Vorbehandlung der Zellen durch eine zusätzliche DIDS-Vorbehandlung gemindert (Tab. 4). Zweitens konnte gezeigt werden, dass auch der Ca⁺⁺-stimulierte, Scramblase-vermittelte Flip des Phospholipids NBD-PC durch NEM gesteigert wird.⁶⁸ Die beschleunigende Wirkung einer NEM-Vorbehandlung ist erwartungsgemäß abhängig von der NEM-Konzentration im Vorbehandlungsmedium (Abb. 21A). Diese Abbildung zeigt auch, dass eine NEM-Vorbehandlung ohne Zusatz von Ca⁺⁺ keine Eigeneffekte auf den Flip von NDP₂ hat. Bei der höchsten untersuchten NEM-Konzentration von 2 mM wurde eine 10fache Steigerung des Ca⁺⁺-Effektes erreicht (Abb. 21B).

Nachdem somit ein beschleunigender Effekt von NEM auf die Ca⁺⁺-aktivierte Scramblase wahrscheinlich war, sollte nun der Vermutung einer hemmenden Wirkung von DIDS auf die Scramblase weiter nachgegangen werden. Durch vergleichende Experimente *mit* bzw. *ohne* DIDS-Behandlung der Zellen konnte dieser Effekt bestätigt werden (Abb. 22). Eine DIDS-Vorbehandlung (37 °C, Hkt. 10 %, 45 min, 50 µM DIDS) verminderte den Scramblase-induzierten NDP₂-Flip (bei DNDS-gehemmter AE1-Aktivität) bei 25 °C durchschnittlich von Δk = 0,0116 auf Δk = 0,0025 entsprechend einem Faktor 0,2. Dies bedeutet eine Hemmung der Scramblase-Aktivität von 80 % (Tab. 4). An Zellen, die zunächst mit NEM vorbehandelt wurden, hatte eine anschließende DIDS-Vorbehandlung einen hemmenden Effekt der gleichen Größenordnung.

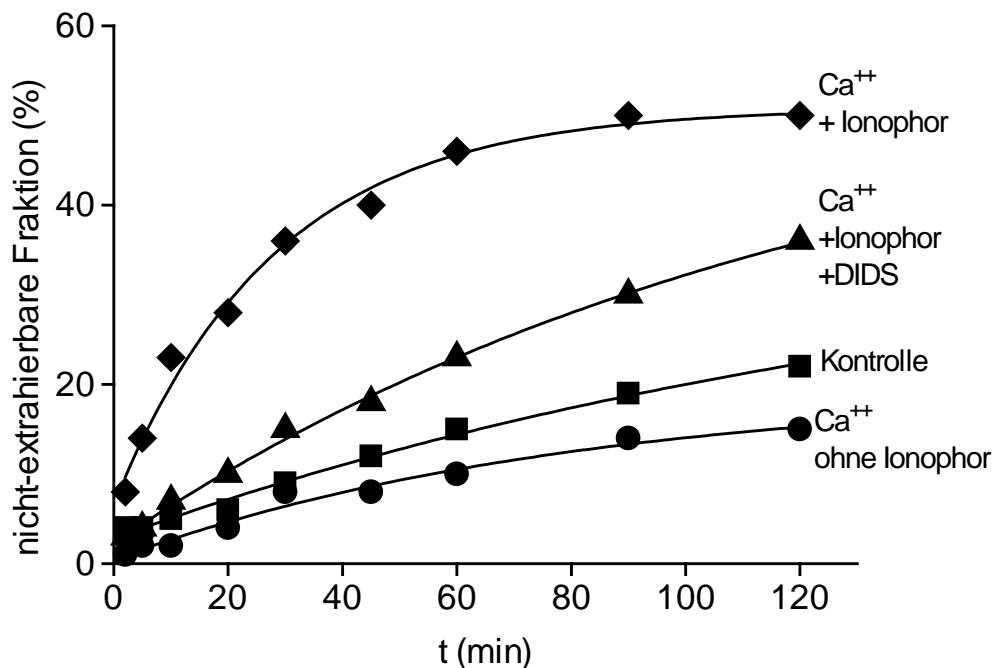


Abb. 22: DIDS-induzierte Veränderungen des Scramblase-vermittelten Flip von NDP₂. Die Flip-Temperatur betrug 25 °C. In allen Flip-Medien war DNDS in einer Konzentration von 0,5 mM enthalten. In den Ansätzen mit Ca⁺⁺ war dieses in einer Konzentration von 0,5 mM enthalten. Die Ionophor-Konzentration betrug in den betreffenden Ansätzen 10 µM. Sämtliche Experimente zum Ca⁺⁺-Effekt wurden in KNHS-Medium durchgeführt, um mögliche Veränderungen des Membran-Potentials durch eine Ca⁺⁺-induzierte Erhöhung der Kalium-Leitfähigkeit der Membran (Gardos-Effekt) zu vermeiden.

Durch Bezug auf den Scramblase-vermittelten Flip in Gegenwart von Ca⁺⁺ (0,5 mM) und A23187 (10 µM), lässt sich dessen Stimulation durch NEM bzw. seine Hemmung durch DIDS auch faktoriell ausdrücken ([Abb. 23](#)).

Abschließend können aus diesen Ergebnissen zur Auswirkung von Ca⁺⁺ (als Aktivator der Scramblase) auf den Flip von NDP₂ folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: 1.) Die Scramblase akzeptiert das anionische Amphiphil NDP₂ als Substrat und ist somit kein spezifischer Transporter von zwitterionischen Amphiphilen wie z.B. Phospholipiden oder Palmitoyl-Carnitin. 2.) Das SH-Reagenz NEM stimuliert die Ca⁺⁺-aktivierte Scramblase. 3.) DIDS hemmt die Scramblase im nativen und im NEM-stimulierten Zustand - und zwar in beiden Fällen ungefähr gleich stark.

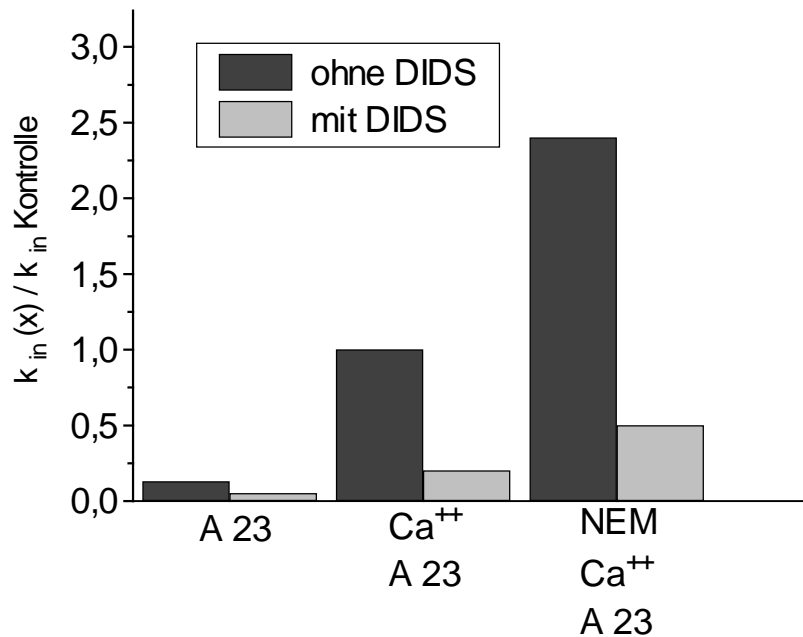


Abb. 23: Hemmung und Stimulation des Scramblase-vermittelten Flip von NDP₂. Darstellung des Beschleunigungsfaktors $k_{in(x)} / k_{in(Kontrolle)}$ (jeweils unter DNDS und bei Zugabe von Ca⁺⁺/Ionophor) bei 25 °C. Normierung auf den Wert der Geschwindigkeitskonstante aus Versuchen mit Ca⁺⁺-aktivierter, nicht modifizierter Scramblase („Kontrolle“, 0,5 mM Ca⁺⁺, 10 μM A23187). Die NEM-Vorbehandlung (0,8 mM) erfolgte vor einer evtl. folgenden DIDS-Vorbehandlung (s. „Material und Methoden“).

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die Effekte weiterer zweiwertiger Kationen auf den NDP₂-Flip untersucht werden. Dabei interessierten in erster Linie Scramblase-unabhängige Wirkungen und nicht die Scramblase-bezogenen Effekte solcher Kationen. Aufgrund des aus den Ca⁺⁺-Versuchen gewonnen Wissens um die hemmende Wirkung von DIDS auf die Scramblase war es möglich, die Scramblase ebenso wie den AE1-vermittelten Flip von NDP₂ in den Folgeversuchen durch DIDS-Vorbehandlung zu hemmen, um Scramblase-unabhängige Effekte zweiwertiger Kationen besser erforschen zu können. Das Interesse galt besonders der Unterscheidung zwischen extrazellulär (Versuche ohne Ionophor A23187) und intrazellulär wirkenden Kationen (Versuche mit Zugabe von Ionophor A23187).

3.10.2 Zink

Zn⁺⁺ liegt physiologischerweise in einer freien Konzentration von $2,4 \times 10^{-11}$ mol/l in Erythrozyten vor, ist aber zusätzlich an Proteine gebunden, so dass eine Gesamtkonzentration von 150 μmol Zn⁺⁺/Liter Zellen resultiert.⁵⁶ Im nativen Zustand hat die Erythrozytenmembran eine nur sehr geringe Permeabilität für dieses Metall-Ion, diese

kann jedoch durch geeignete Ionophore (z.B. A23187) oder Substanzen wie Ethylmaltol erhöht werden.⁵⁷

3.10.2.1. Effekte von Zink-Ionen ohne Zugabe von Ionophor A23187

Es zeigte sich überraschenderweise, dass Zn^{++} ohne Zugabe des Ionophors A23187 Auswirkungen auf den Flip hat (Abb. 24).

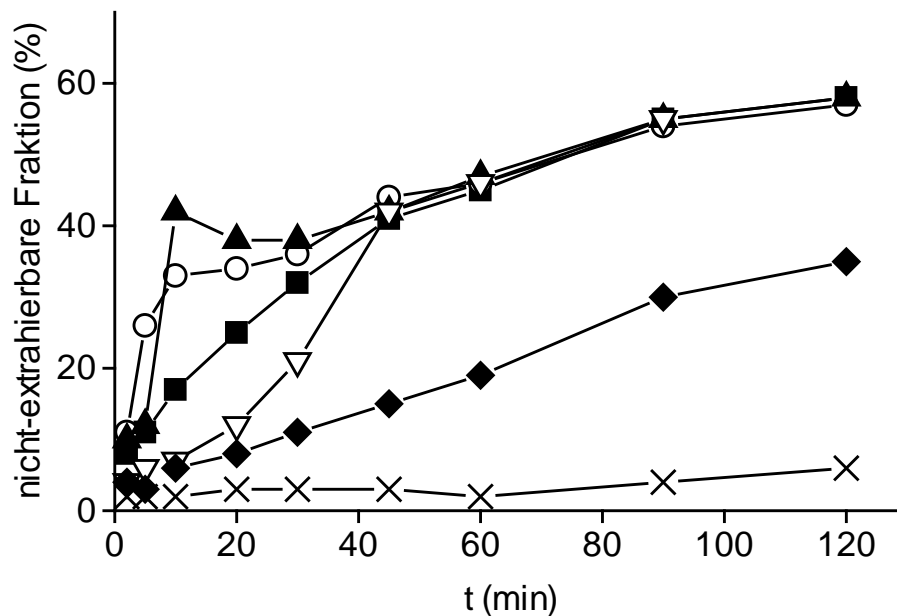


Abb. 24: Einfluss von Zn^{++} auf den nicht-vermittelten Flip von NDP_2 in Abwesenheit von Ionophor A 23187. Der Flip an DIDS-vorbehandelten Zellen wurde bei 37 °C in NHD_4 mit 2 mM EDTA in allen Stop-, Wasch- und Extraktionsmedien gemessen. Zn^{++} war in Konzentrationen von (○) 0,02, (▲) 0,05, (▽) 0,1, (◆) 0,15 und (×) 0,5 mM im Flip-Medium enthalten; (■) Kontrolle.

Bei Konzentrationen von 0,01 mM bis zu 0,05 mM kommt es anfänglich zu einer beschleunigenden Wirkung auf den Flip, die jedoch im Verlauf nachlässt, so dass sich die Steilheit der Kinetik wieder derjenigen der Kontroll-Kinetik angleicht. Konzentrationen, die über 0,05 mM hinausgehen, haben zunehmend initial-hemmende Einflüsse. Ab Konzentrationen über 0,5 mM tritt eine fast vollständige Hemmung des Flip ein. Da die Kinetiken z.T. sigmodal verlaufen, war eine reguläre Auswertung nicht immer möglich. Um untereinander vergleichbare Werte für die unterschiedlichen Initialphasen der Kinetiken zu erhalten, wurden die anfänglichen Steigungen der Graphen bestimmt und auf die initiale Steigung des Kontroll-Ansatzes ohne Zn^{++} -Zugabe normiert (Tab. 5). Hierfür wurden die jeweils ersten drei Messpunkte ($t = 2, 5$ und 10 min) zur Berechnung einer anfänglichen Fliprate (k_{in}) berücksichtigt.

Bei dieser Bewertungsweise ist die später erfolgende Angleichung der Kurven an die Kontroll-Kinetik außer Acht gelassen. Die initialen Steigungsraten ergaben eine deutliche Flip-Steigerung bei Zn^{++} -Konzentrationen von 0,02 und 0,05 mM. Bei Zn^{++} -Konzentrationen von $\geq 0,1$ mM zeigte sich eine zunehmend hemmende Wirkung, so dass der Umschlagpunkt zwischen beschleunigender und hemmender Wirkung bei einer Zn^{++} -Konzentration von ca. 0,07 mM vermutet werden kann. Ab Zn^{++} -Konzentrationen von 0,5 mM kam es zu einer vollständigen Hemmung des NDP₂-Flip.

Tab. 5: Initiale Steigungsraten der Graphen aus Abb. 24. Die Bestimmung erfolgte durch eine aus den ersten drei Messpunkten einer Kinetik (t = 2;5;10 min) errechnete Regressionsgrade. Gezeigt sind absolute Steigungswerte und die Steigung normiert auf die initiale Steigung der Kontroll-Kinetik ohne Zugabe von Zn^{++} (k_{in}).

Zn⁺⁺-Konzentr. (mM)	% min⁻¹	Normierte Steigung $k_{in(x)}/k_{in(Kontrolle)}$
0 (Kontrolle)	1,1	1,0
0,02	2,6	2,4
0,05	4,2	3,8
0,10	0,4	0,4
0,15	0,3	0,3
0,50	0	0,0

Das Überraschende an den gezeigten Zn^{++} -Effekten ist, dass sie auf eine praktisch ausschließlich extrazelluläre Wirkung zurückzuführen sind. Die natürliche Permeabilität der Erythrozytenmembran für Zn^{++} ist, wie oben beschrieben, sehr gering. In den bisher beschriebenen Versuchen wurde ohne ein geeignetes Ionophor gearbeitet, welches in der Lage ist Zn^{++} durch die Membran zu schleusen. Folglich sollte durch Zugabe eines solchen Ionophors (hier Ionophor A23187) versucht werden, die Auswirkung einer zusätzlichen Steigerung der intraerythrozytären Zn^{++} -Konzentration zu untersuchen.

3.10.2.2. Effekte von Zink-Ionen in Gegenwart von Ionophor A23187

Nach Zugabe von Ionophor in einer Konzentration von 10 μ M zum Flip-Medium zeigte sich bei zunehmender Zn^{++} -Konzentration im Medium eine, z.T. verzögert einsetzende, Beschleunigung des Flip (Abb. 25). Bei einer Zn^{++} -Konzentration von 1 mM erreichte diese das 3,4-fache des Kontrollwertes in Abwesenheit von Zn^{++} . Bezogen auf die praktisch vollständige Flip-Hemmung durch 1 mM Zn^{++} in Abwesenheit von A23187 lässt sich rechnerisch ein Beschleunigungsfaktor von über 400 ermitteln. Tab. 6 verdeutlicht noch einmal die kontinuierliche Flip-Steigerung bei Zn^{++} -Konzentrationen bis zu 1 mM.

Tab. 6: Relative Steigerung des nicht-vermittelten Flip von NDP_2 unter Zn^{++} -Zugabe in Gegenwart von Ionophor. Flip bei 37 °C und Zugabe von 10 μM Ionophor A23187 nach Zugabe der Erythrozyten zum Medium.

Zn^{++} -Konzentration im Medium (mM)	$k_{\text{in (x)}/k_{\text{in (Kontrolle)}}$
0,01	1
0,1	1,4
1	3,4

Schon bei Zn^{++} -Konzentrationen oberhalb von 0,1 mM nahmen die Kinetiken allerdings sigmoidale Verlaufsform an, was die Auswertung der Daten z.T. erschwerte. Um trotzdem Vergleiche ziehen zu können, wurde bei sigmoidalen Kurvenverläufen die maximale Steigung des Graphen zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstante herangezogen. Mit einem Quotienten von $S_i/S_e = 1,9$ wurde ein gegenüber der Kontrolle ($S_i/S_e = 1,6$) leicht erhöhtes Verteilungsgleichgewicht ermittelt.

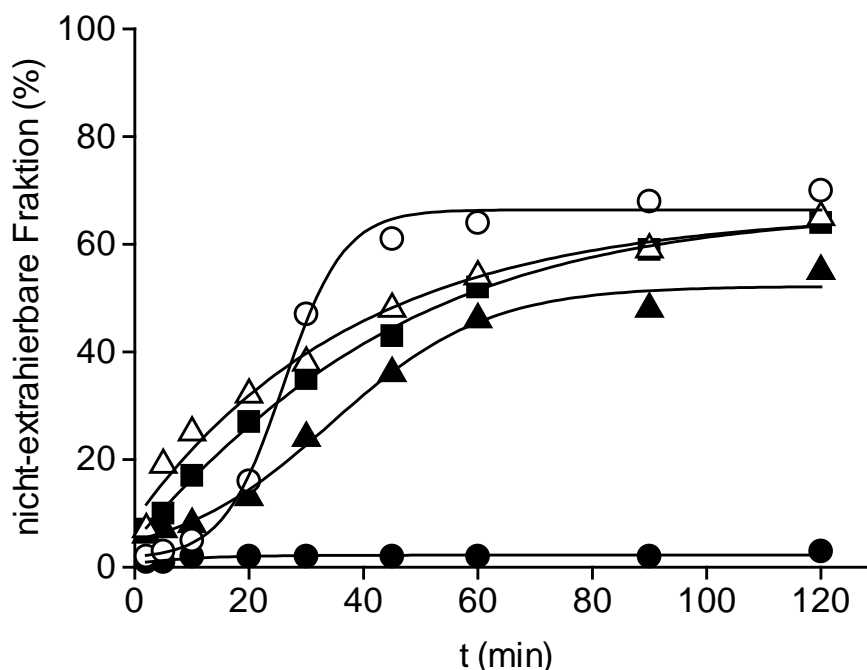


Abb. 25: Veränderungen des nicht-vermittelten Flip von NDP_2 nach Zn^{++} -Zugabe in Abwesenheit (geschlossene Symbole) bzw. Gegenwart (offene Symbole) von Ionophor A23187. DIDS-vorbehandelte Zellen wurden bei 37 °C in NHD_4 inkubiert. Zn^{++} wurde in Konzentrationen von (▲, △) 0,1 mM und (○, ●) 1 mM dem Flip-Medium zugegeben; (■) Kontrolle. Ionophor Konzentration 10 μM .

Es lässt sich also feststellen, dass die Zugabe von Ionophor A23187 bei niedrigen Zn^{++} -Konzentrationen (0,01-0,1 mM) nur sehr geringe Auswirkungen auf den Flip von NDP_2 hat.

Bei hohen Zn^{++} -Konzentrationen geht jedoch die vollständige Hemmung des NDP_2 -Flip nach Ionophor-Zugabe in eine deutliche Beschleunigung über. Zusätzlich ließ sich zeigen, dass die Zn^{++} /Ionophor-induzierte Beschleunigung des Flip von der Ionophor-Konzentration abhängig ist (Abb. 26).

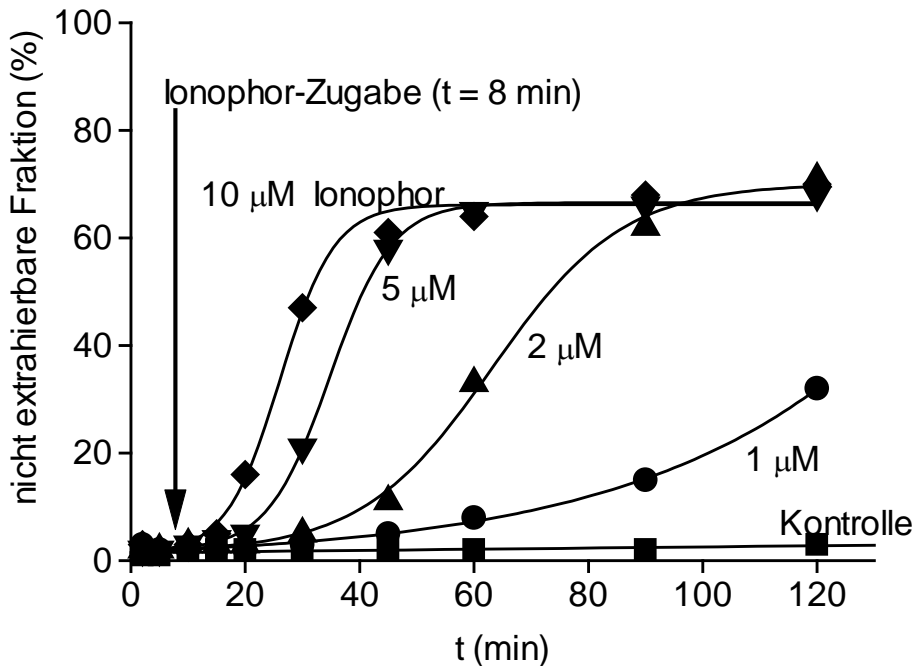


Abb. 26: Ionophor-induzierte Beschleunigung des Flip von NDP_2 durch Zn^{++} in Abhängigkeit von der Ionophor-Konzentration. Die DIDS-vorbehandelten Zellen wurden standardmäßig beladen und mit 1 mM Zn^{++} in allen Ansätzen (auch der Kontrolle), zunächst ohne Zugabe von Ionophor, bei 37 °C inkubiert. Nach 8 min wurde Ionophor durch Einspülung in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Suspension kurz mit der Pipettenspitze durchmischt.

Hier wird der sigmoidale Verlauf der Flip-Kinetik, d.h. der verzögert eintretende Zn^{++} -Effekt, besonders deutlich. Auf die möglichen Ursachen der Zn^{++} -Effekte wird im Diskussionsteil eingegangen.

In Gegenwart von Zn^{++} und Ionophor kam es zur Hämolyse. Diese betrug jedoch nur maximal 11% nach 120 min (1 mM Zn^{++} , 10 μM A23187).

3.10.3 Mangan

Das zweiwertige Mn^{++} wird von menschlichen Erythrozyten einerseits über einfache Diffusion mit dem sehr niedrigen Permeabilitätskoeffizienten von $2,9 \cdot 10^{-11}$ m/s, andererseits über Ca^{++} -Kanäle aufgenommen. Die Aufnahme in die Erythrozyten kann aber durch Ionophor A23187 beschleunigt werden.⁵⁸

Bei ersten Versuchen mit Mn^{++} -Zusatz wurden bei hohen Mn^{++} -Konzentrationen (1 mM) stark erhöhte Gesamtfluoreszenz-Werte für die als Bezugswert dienenden, nicht albumin-extrahierten Zellen (100%-Wert) gemessen. Andererseits kam es bei niedrigeren Mn^{++} -Konzentrationen (0,02-0,05 mM), die eine Beschleunigung des Flip verursachten (s.u.), zu abnorm niedrigen Messwerten für die Gesamtfluoreszenz. Um Störeffekte die auf eine veränderte Fluoreszenzausbeute für NDP_2 infolge von Komplexierung mit Mn^{++} zurückzuführen sein dürften, zu vermeiden, wurde allen Stop-, Wasch- und Extraktions-Medien 2 mM EDTA zugesetzt. Das Ziel dieser Maßnahme war, Mn^{++} zu komplexieren und die oben beschriebenen Störungen zu unterbinden. Tatsächlich normalisierten sich die Fluoreszenzwerte unter Zugabe von EDTA. Berücksichtigt werden deshalb für die folgende Auswertung der Mn^{++} -Effekte nur die Versuche, in denen DIDS-vorbehandelte Zellen und EDTA als Komplexbildner verwendet wurden. Auch in dieser Versuchsreihe wurde, wie in den Versuchen mit anderen zweiwertigen Kationen, versucht, durch die Unterteilung in Versuche ohne bzw. mit dem Ionophor A23187 Unterschiede zwischen der Wirkung von extrazellulärem bzw. intrazellulärem Mn^{++} darzustellen.

3.10.3.1. *Effekte von Mangan-Ionen ohne Zugabe von Ionophor A23187*

In Abwesenheit eines Ionophor hat Mn^{++} innerhalb eines schmalen Konzentrationsbereiches gravierende Auswirkungen auf den Flip (Abb. 27 und Abb. 28). Durch geringe Konzentrationen von 0,004 mM bzw. 0,008 mM Mn^{++} wird eine deutliche Beschleunigung erreicht, während die hohe Konzentration von 2 mM eine deutliche Hemmung verursacht (Abb. 27).

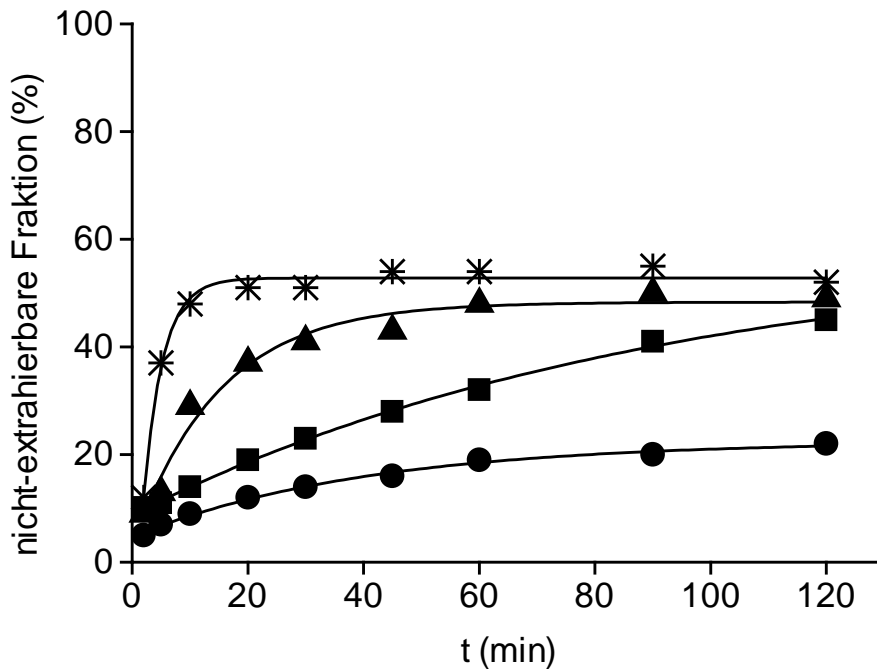


Abb. 27: Effekte von Mn^{++} auf den nicht-vermittelten NDP_2 -Flip in Abwesenheit von Ionophor A23187. DIDS-vorbehandelte Zellen wurden bei 32 °C in NHD_4 -Medium bei pH 7,4 inkubiert. Die Stop- und Extraktions-Medium enthielten 2 mM EDTA. Zusätzlich war Mn^{++} enthalten: (▲) 0,004 mM, (*) 0,008 mM, (●) 2 mM Mn^{++} , (■) kein Mn^{++} (Kontrolle).

Ein Maximum der beschleunigenden Wirkung findet sich bei ca. 0,03 mM (Beschleunigungs-Faktor ca. 150 an DIDS-behandelten Zellen; [Abb. 29B](#)). Oberhalb dieser Konzentration ist eine Wiederabnahme der beschleunigenden Wirkung zu beobachten. Die Konzentrationen mit halbmaximalem Beschleunigungs-Effekt (C_{50}) sind ca. 0,01 und 0,08 mM ([Abb. 29](#)). Bei Mn^{++} -Konzentrationen, die den NDP_2 -Flip beschleunigen, tritt eine geringe Verschiebung der stationären Verteilung zugunsten des Außenblattes auf (S_i/S_e ca. 1). Eine Bestimmung des Verteilungsgleichgewichtes bei hemmenden Mn^{++} -Konzentrationen konnte aufgrund der stark reduzierten Geschwindigkeitskonstanten nicht durchgeführt werden.

3.10.3.2. Effekte von Mangan-Ionen in Gegenwart von Ionophor A23187

In Gegenwart von Ionophor A23187 (Zugabe kurz nach Suspendierung der Erythrozyten im Medium) hatte Mn^{++} ebenfalls einen biphasischen Effekt: Eine Beschleunigung, die bei hohen Konzentrationen wieder abnimmt. ([Abb. 28](#)).

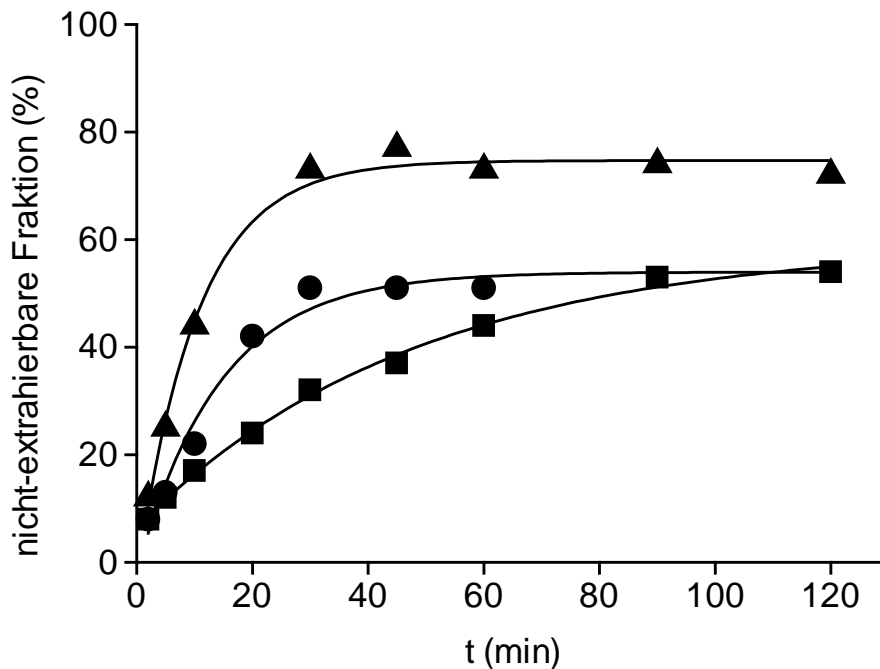


Abb. 28: Effekt von Mn^{2+} auf den nicht vermittelten NDP_2 -Flip in Gegenwart von Ionophor A23187. DIDS-vorbehandelte Zellen wurden bei 37 °C in NHD_4 -Medium (Stop- und Extraktions-Medium mit 2 mM EDTA) bei pH 7,4 inkubiert. Das Ionophor A23187 wurde in den Ansätzen dem Flip-Medium kurz nach Suspendieren der Erythrozyten in einer Konzentration von 10 μM zugefügt. In dem Medium war enthalten: (■) kein Mn^{2+} (Kontrolle), (▲) 0,6 mM Mn^{2+} , (●) 1 mM Mn^{2+} .

Im Gegensatz zu der sigmoidalen Kinetik nach Zn^{2+} /Ionophor-Zugabe zum Flip-Medium (s. [Abb. 25](#)) verläuft die Mn^{2+} /A23187-Kinetik in einer „normalen“ exponentiellen Annäherung an den Wert des stationären Gleichgewichtes. Dieses Gleichgewicht lag jedoch bei 0,6 mM Mn^{2+} mit über 70 % Innenblatt-Anteil ($S_i/S_e = 2,3$) deutlich über dem Kontrollwert unter Standardbedingungen ($S_i/S_e = 1,6$). Worauf diese Veränderung der stationären Verteilung und die Flip-Beschleunigung beruhen, wurde nicht weiter untersucht.

Eine Erschwernis bei der Auswertung der Versuche mit Mn^{2+} schien zunächst eine, im übrigen schon bei den Zn^{2+} -Effekten (s.o.) beobachtete, Hämolyse zu sein ([Abb. 29A](#)). Diese Hämolyse war während des Versuchablaufs in Gegenwart und Abwesenheit von Ionophor A23187 zu beobachten. Genauere, quantifizierende Untersuchungen wurden in der Folge jedoch in Abwesenheit von Ionophor durchgeführt, da der lytische Effekt nach subjektiver Einschätzung hier deutlicher war. Bei 0,005 mM Mn^{2+} im Flip-Medium wurde nach 120 min eine Hämolyse von 2 % gemessen. Bei Konzentrationen von 0,05 mM Mn^{2+} resultierte eine maximale Hämolyse von 36 % ([Abb. 29A](#)). Höhere Mn^{2+} -Konzentrationen von über 1 mM ergaben wiederum nur Hämolyseraten von 1-2 % (Daten nicht gezeigt; letzteres sind Werte die den Kontrollansätzen entsprechen). Auffällig war also, dass der

Grad der Flip-Beschleunigung in Korrelation mit der Hämolyse stand: Je stärker die Beschleunigung, desto deutlicher die Hämolyse (Abb. 29).

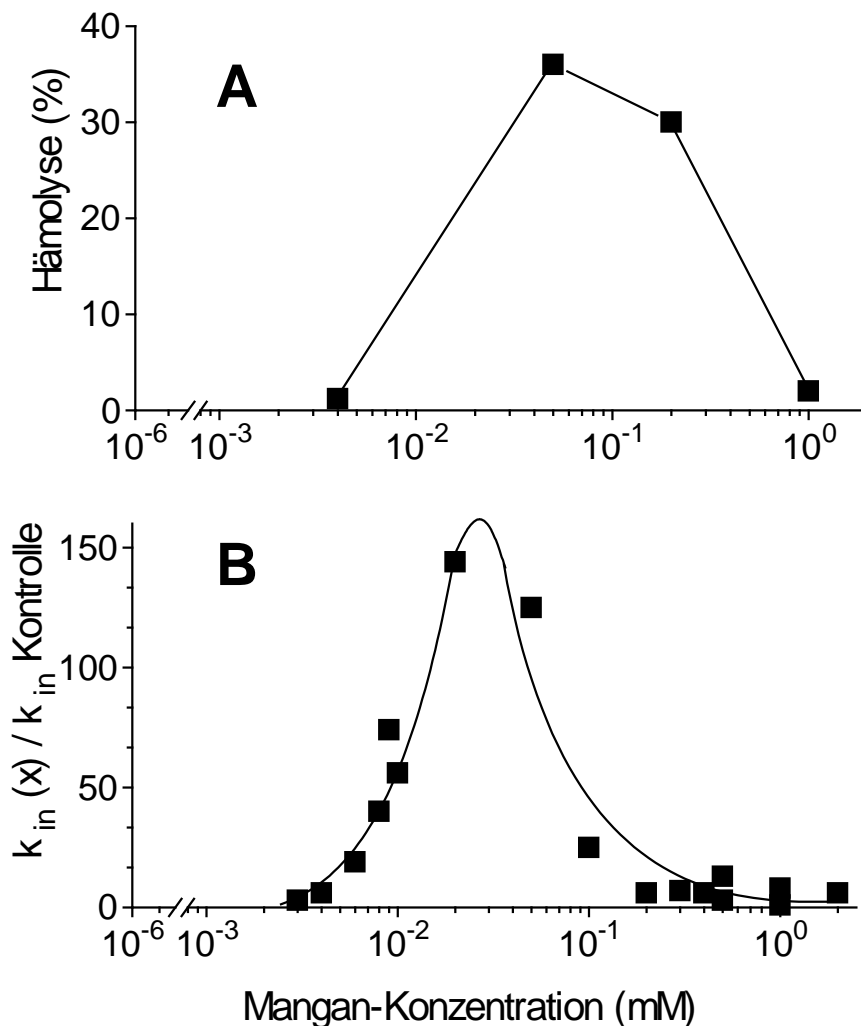


Abb. 29: Beschleunigung des nicht-vermittelten NDP₂-Flip und Hämolyse in Abhängigkeit von der Mn²⁺-Konzentration. A: Hämolyse (%) aufgetragen gegen die Mn²⁺-Konzentration (mM). Hämolyse gemessen nach 120 min. **B:** Geschwindigkeitskonstante unter Mn²⁺ in Abwesenheit von Ionophor normiert auf die Geschwindigkeitskonstante unter Kontroll-Bedingungen an DIDS-behandelten Erythrozyten – d.h. ohne Ionophor A 23187 und ohne Mn²⁺ - aufgetragen auf logarithmierter Abszisse (Mn²⁺-Konzentration in mM). Der Graph entspricht einer ungefähren Mittlungskurve. Die Versuchsbedingungen waren: NHD₄-Medium, 32 °C, pH 7,4, DIDS-vorbehandelte Zellen, 2 mM EDTA in Stop-, Wasch- und Extraktionsmedium.

Weiterhin zeigte sich, dass Mn²⁺-Zugabe (Konzentration 0,05 mM) zu nicht mit der Sonde beladenen Erythrozyten praktisch keine hämolytische Wirkung hat: Die maximale Hämolyse betrug 1,7 % (Daten nicht gezeigt). Versuche mit der NDP₂-ähnlichen Sonde NDP₁ (s.o.) an ebenfalls DIDS-vorbehandelten Zellen belegen auch bei dieser Sonde eine hämolytische Wirkung in Kombination mit Mn²⁺ (0,05 mM) sowie eine Flip-beschleunigende Wirkung (ca. Faktor 11), beides jedoch in abgeschwächtem Ausmaß im

Vergleich zu NDP_2 . Die maximale Hämolyse betrug hier 11 % nach 120 min (Abb. 30). Darüber hinaus wurde eine Zeitabhängigkeit dieser Hämolyse deutlich (Abb. 30). Diese nimmt im Versuchsverlauf allmählich zu und erreicht erst nach ca. 2 h ihr Maximum. Im Gegensatz hierzu treten die Flip-Beschleunigungseffekte durch Mn^{++} zu Versuchsbeginn auf und bewirken je nach Konzentration eine weitgehende Annäherung an das stationäre Verteilungsgleichgewicht innerhalb der ersten 60 min.

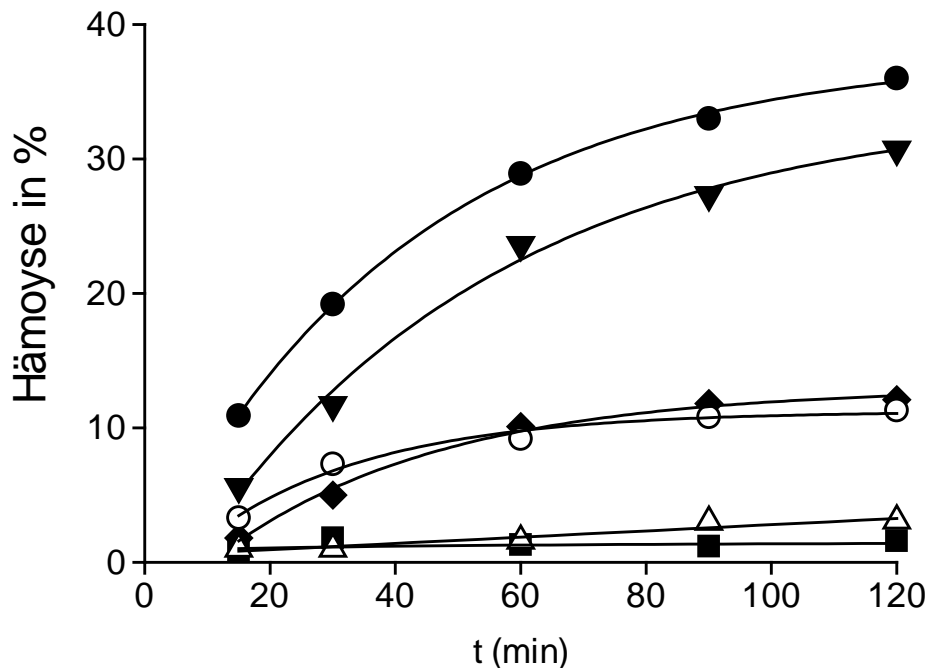


Abb. 30: Hämolyse sondenbeladener Erythrozyten bei Zugabe von Mn^{++} . DIDS-vorbehandelte Zellen wurden bei einem Hämatokrit von 25 %, einer Sondenkonzentration von $50 \mu\text{M}$ (offene Symbole NDP_1 ; geschlossene Symbole NDP_2) in KNPS 5 min beladen und anschließend bei $32 \text{ }^\circ\text{C}$ in NHD_4 -Medium inkubiert. Nach 15, 30, 60, 90 und 120 min wurden Proben entnommen und die Hämolyserate bestimmt (siehe „Methoden“). Mn^{++} -Konzentrationen: (■) Kontrolle (kein Mn^{++}); (◆) 0,02 mM; (●,○) 0,05 mM; (▼) 0,2 mM; (△) 1 mM.

Aufgrund dieser unterschiedlichen zeitlichen Domänen des Flip-Beschleunigungseffektes und der Hämolyse war es möglich, trotz der Hämolyse aussagekräftige Berechnungen der Geschwindigkeitskonstante des Flip und des stationären Verteilungsgleichgewichtes durchzuführen. Hierzu wurden alle 100%-Werte (siehe „Methoden“, Kap. 2.2.6, S. 20) die, vermutlich aufgrund der Hämolyse, gegenüber dem Ausgangswert zeitabhängig abfielen, aus den Berechnungen der Kinetiken ausgeschlossen. Zusätzlich wurde teilweise die Versuchsdauer auf 30 min verkürzt oder es wurden nur die ersten fünf abgenommenen Proben ($t = 2, 5, 10, 20$ und 30 min) berücksichtigt, da die Hämolyse zu diesem Zeitpunkt noch deutlich geringer war (10 % Hämolyse nach 15 min bzw. 19 % nach 30 min; bei 0,05 mM Mn^{++}).

Auf die Entstehung der Hämolyse und die Art des Beschleunigungs- bzw. Hemmeffektes durch Mn^{++} wird im Teil „Diskussion“ eingegangen. Unter Umständen müssen zwei unterschiedliche Mechanismen der Flip-Beschleunigung in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Ionophor A23187 in Betracht gezogen werden. Festzuhalten bleibt vor allem die starke Beschleunigung des Flip bei geringen Mn^{++} -Konzentrationen und eine hemmende Wirkung bei hohen Konzentrationen.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der transversalen Diffusion und der stationären Verteilung der amphiphilen Phosphonat-Sonde NDP₂ zwischen den beiden Blättern der Doppelschichtmembran des Erythrozyten unter verschiedenen Bedingungen. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen ist der Vergleich mit der Vorgängersonde NDP₁. Diese von Kleinhorst synthetisierte Phosphat-Sonde (NDP₁) hatte zwar gegenüber den bis dahin als Sonden-Molekül eingesetzten zwitterionischen bzw. anionischen Phospholipiden wie z.B. NBDPC (1-oleoyl-2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholin) und LPM (Lyso-Phosphatidylmethanol) den Vorteil, hoch-selektiv von AE1 transportiert zu werden, ein Nachteil war jedoch die intrazelluläre Hydrolyse der Verbindung. Die in der vorliegenden Arbeit verwandte Sonde NDP₂ sollte alle Vorteile einer Verbindung zur Untersuchung der Transportfunktion von AE1 für langkettige, amphiphile Anionen miteinander vereinen:

- Einfache Struktur
- Hoher Anteil des Transports über den Anionentransporter AE1
- Keine intrazelluläre Hydrolyse
- Gut messbare, stationäre Verteilung zwischen Innen- und Außenblatt der Membran

4.1 Ein- und Auswärtstranslokation (Flip/Flop) der Sonde NDP₂

Der Einbau der im Extrazellulär-Medium angebotenen Sonde NDP₂ in die Membran erfolgt bei 0 °C spontan und ausschließlich in das Außenblatt. Bei Erhöhung der Temperatur findet ein Transport der Sonde vom Außenblatt in das Innenblatt der Membran statt (Flip). Dieser Transport gleicht einem Schwenken der Sonde um die Membranebene in eine spiegelbildliche Position. Man kann diesen Transport in einen AE1-vermittelten und einen nicht-vermittelten Flip unterteilen. Die weiteren, in dieser Arbeit ermittelten Grundeigenschaften dieses Transportvorgangs seien hier noch einmal zusammengefasst:

- Die Sonde NDP₂ verteilt sich stationär im Verhältnis Innenblattanteil:Außenblattanteil von 6:4, reichert sich also in der Innenschicht der Membran an.
- Für den NDP₂-Flip bei 32 °C wurde eine Geschwindigkeitskonstante von 0,0303 (min⁻¹) gemessen, das entspricht einer Halbwertszeit von ca. 12 min.
- Eine Erhöhung der Sondenkonzentration im Außenblatt durch höhere Beladungskonzentrationen steigerte die Geschwindigkeitskonstante des Gesamt-Flip nicht.

- Der AE1-vermittelte Anteil des Transports der Sonde ließ sich durch Vorbehandlung der Zellen mit DIDS ermitteln. Der nicht durch DIDS hemmbare Anteil betrug 16 % des Gesamttransportes, was einem AE1-vermittelten Anteil von 84 % entspricht.
- Die Flip-Geschwindigkeit ist temperaturabhängig mit vergleichbaren Aktivierungsenergien von ca. 100 kJ/mol für den AE1-vermittelten und den nicht-vermittelten Anteil.
- Die Geschwindigkeitskonstante für die Auswärtstranslokation, den sog. Flop, betrug bei 32 °C 0,0465 (min⁻¹) bei einem DIDS-sensitiven Transportanteil von 86 %. Dabei wurde ebenfalls eine stationäre Verteilung von 6:4 zugunsten des Membraninnenblattes erreicht.

Bereits im Ergebnisteil wurde angesprochen, dass beim Transport und der Verteilung von Amphiphilen zwischen den beiden Membranblättern eines Erythrozyten in der Regel die

Beziehung $\frac{k_{in}}{k_{out}} = \frac{S_i}{S_e}$ gelten sollte, wenn es sich um einen einfach-passiven Austausch

zwischen zwei Kompartimenten handelt.

Die vorliegenden NDP₂-Daten erfüllen diesen Zusammenhang nicht. Hier ergibt sich zwischen dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten ($k_{in}/k_{out} = \text{ca. } 0,7$) und dem der stationären Membranblattanteile ($S_i/S_e = \text{ca. } 1,6$) eine deutliche Differenz. Um die o.g. Gleichung zu erfüllen, müsste der Innenblattanteil ca. 40 % und der Außenblattanteil ca. 60 % einnehmen. Die tatsächliche Verteilung ist jedoch in etwa entgegengesetzt. Warum das Verteilungsverhalten anderer Sonden dieser Relation entspricht, das von NDP₂ aber nicht, ist jedoch derzeit noch unklar.

4.2 Vergleich der beiden Sonden NDP₁ und NDP₂

Da die vorliegende Arbeit auf Ergebnissen von Kleinhorst²⁴ (Mechanismen der AE1-vermittelten Translokation langkettiger anionischer Amphiphile in der Erythrozyten-Membran) aufbaut und der Vergleich der Sonden NDP₁ und NDP₂ ein wichtiger Teilaspekt der vorliegenden Arbeit ist, sollen hier Unterschiede und Gemeinsamkeiten diskutiert werden. Die strukturellen Unterschiede demonstriert Abb. 31. Die Anregung zu strukturellen Veränderungen von NDP₂ gegenüber NDP₁ wurde durch die Probleme gegeben, die sich bei Studien zu NDP₁ aufgrund einer Tyrosinphosphatase-katalysierten intrazellulären Hydrolyse dieser Sonde ergaben.²⁴ Für NDP₁ konnten daher nur in Gegenwart von Hemmstoffen der Tyrosinphosphatase (z.B. Vanadat) einigermaßen

verlässliche Versuchsergebnisse gewonnen werden. Diese Schwierigkeit wurde bei Verwendung von NDP₂, das keinen hydrolytischen Vorgängen unterliegt, behoben.

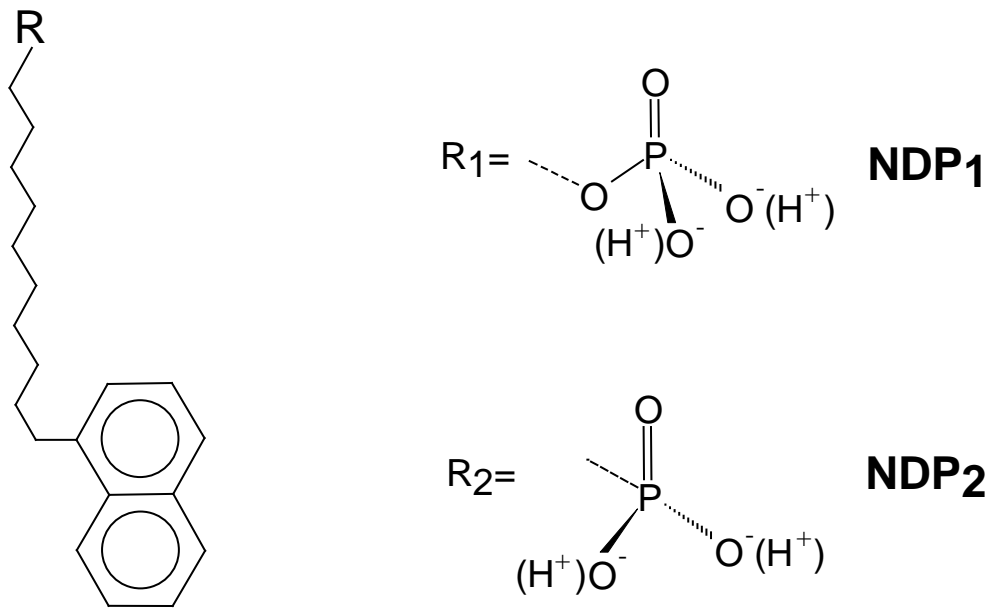


Abb. 31: Vergleich der Strukturformeln von NDP₁ und NDP₂. Durch die direkte Bindung des Phosphor-Atoms an das letzte Kohlenstoff-Atom der Kohlenwasserstoff-Kette ist NDP₂ der hydrolytischen Spaltung durch Tyrosinphosphatasen nicht zugänglich.

Die große strukturelle Ähnlichkeit zwischen NDP₂ und der Vorgängersonde NDP₁ lässt nahezu identische Werte für den Einbau der Sonde aus der Wasserphase in die Membran erwarten. Der für NDP₁ ermittelte Wert des Membran-/Wasser-Verteilungskoeffizienten beträgt $1,5 \cdot 10^5$ (in KNPS-Medium, pH 7,4).²⁴ Dieser Wert stimmt in seiner Größenordnung überein mit den Angaben für andere amphiphile Anionen, z.B. die Sulfonat-Sonde 5-(N-Decyl)aminonaphthalin-2-sulfonsäure (DENSA), deren Verteilungskoeffizient bei $3,2 \cdot 10^5$ liegt.⁶¹ Gestützt wird die Annahme eines mengenmäßig zu den oben genannten Werten vergleichbaren Einbaus von NDP₂ in die Membran durch die im Fluoreszenzspektrometer ermittelten Fluoreszenzwerte: Für die beiden Sonden NDP₁ und NDP₂ wurden als „Gesamtfluoreszenz“ bei gleichem Angebot vergleichbare Messwerte ermittelt.

Für den in Tab. 7 dargestellten Vergleich der Translokations-Charakteristika der beiden Sonden NDP₁ und NDP₂ wurden neben den Resultaten der vorliegenden Arbeit auch weitere Ergebnisse der Arbeitsgruppe verwendet.⁵⁹ Für NDP₁ wurden nur Daten verwendet, die in Gegenwart des Tyrosinphosphatase-Hemmstoffes Vanadat ermittelt wurden.

Tab. 7: Translokations-Parameter der Sonden NDP₁ und NDP₂. Die NDP₁-Daten wurden unter dem Einfluss von Vanadat ermittelt.

	NDP ₂	NDP ₁ ²⁵
Geschwindigkeitskonstante (min⁻¹)		
k _{in} (21 °C)	0,0059	0,0086
k _{in} (32 °C)	0,0303	0,0420
k _{out} (32 °C)	0,0465	-
k _{in} (DIDS-insens.; 32 °C)	0,0056	0,0040
Transmembranäre Verteilung (S_i/S_e)		
	1,6	1,2
Hemmung des Gesamttransportes in %. <i>In Klammern: Hemmung des AE1-vermittelten Transportes in %</i>		
DIDS	84 (100)	95 (100)
DNDS [0,5 mM (bei NDP ₂); 2 mM (bei NDP ₁)]	77 (92)	94 (99)
Dipyridamol [20 µM (NDP ₂) 25 µM (NDP ₁)]	78 (92)	85 (89)
Nifluminsäure [20µM]	52 (61)	64 (67)
Merocyanin [20 µM]	39 (46)	34 (36)
Beschleunigungs-Faktor (k_{in(x)}/k_{in} (Kontrolle)) nach Papain-Behandlung^{*,12}		
	7	4
Aktivierungsenergie (kJ/mol)**		
	121	116

* Papain-Behandlung: 1h, 42 U/ml Zellen, 37 °C, Hkt. 50 % ,pH 7,4

** Ermittelt für den Temperaturbereich von: 21-37 °C für NDP₂, 0-30 °C für NDP₁

Wie Tab. 7 zeigt, liegen die Werte für Transportgeschwindigkeit, Anteil des AE1-vermittelten Transports, Hemmbarkeit des AE1-Transportanteiles und Aktivierungsenergie in vergleichbaren Größen. Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass jeweils Hemmstoff-Konzentrationen gewählt wurden, die den AE1-vermittelten Transport von Chlorid-Ionen zu 100 % hemmen. Hierauf begründet sich die Annahme, dass auch der Flip durch die entsprechende Hemmstoffkonzentration maximal, obwohl nicht zu 100 % gehemmt wird. Hinsichtlich des nicht-AE1-vermittelten Flip ist für NDP₂, wie auch für andere anionisch-amphiphile Sonden, ein Transportvorgang der Sonde über die Lipidphase der Membran anzunehmen.

Die in Tab. 7 beschriebene Wirkung einer Papain-Vorbehandlung beruht auf einer von exofacial erfolgenden proteolytischen Spaltung von AE1 (Bande 3) in vier Fragmente¹⁷.

Diese führt zu einer abnehmenden Transportfähigkeit für hydrophile Anionen (Chlorid, Sulfat)⁶⁰ und zu einer Beschleunigung des Flip von längerkettigen, anionisch-amphiphilen Verbindungen wie DENSA, NDP₁¹² und, wie hier gezeigt, von NDP₂. Auch im Beschleunigungsfaktor - die Papain-Vorbehandlung der Zellen betreffend - zeigen sich mit den Faktoren 4 und 7 zumindest ähnliche Werte für NDP₁ und NDP₂ (siehe auch Voswinkel et al.¹⁸).

Zusammenfassend kann also von einer weitgehenden Übereinstimmung der Transport- und Verteilungseigenschaften der beiden Sonden gesprochen werden.

4.3 Unterschiedliche stationäre Verteilungen der Sonde NDP₂ und anderer Sonden

Ein Charakteristikum in dem sich die Sonde NDP₂ von anderen amphiphilen Anionen unterscheidet, betrifft die stationäre Verteilung im neutralem pH-Bereich (7,4): Der Innenblatt-Anteil von NDP₂ beträgt dabei ca. 60 % ($S_i/S_e = 1,6$). Im Vergleich zur Verteilung anderer Sonden liegt NDP₂ hiermit an der Spitze vor weiteren Phospho-Sonden wie NDP₁ und NBDPA (N-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-phosphatidsäure) die einen Verteilungsquotienten S_i/S_e von 1,2 aufweisen (Tab. 8).

Andere Sonden, insbesondere Sulfatsonden wie z.B. DENSA und SDS verteilen sich dagegen bevorzugt ins Außenblatt, was sich in Verteilungsquotienten S_i/S_e von $\leq 0,5$ widerspiegelt (Tab. 8).

Tab. 8: Vergleich der Verteilungskoeffizienten (S_i/S_e) verschieden-ionischer amphiphiler Verbindungen. Abkürzungen: SDS: Natriumdodecylsulfat; DENSA: 5-(N-Decyl)aminonaphthalin-2-sulfonsäure; PM: Phosphatidylmethanol; LPM: Lyso-Phosphatidylmethanol; PA: Phosphatidsäure; NDSU: 10-(α -Naphthyl)-1-decyl-sulfat; NBD: N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-Fluoreszenzlabel. Werte für NBDPM, NBDPA bei gehemmter Floppase.²³

Sonde	(S_i/S_e)	
NDSU ¹⁸	0,2	} 1 dissoziabler Rest
SDS ⁴⁰	0,3	
LPM ²⁵	0,3	
DENSA ⁶¹	0,4	
NBDPM ²³	0,5	
NBDPA ²³	1,2	} 2 dissoziabile Reste
NDP ₁ ²⁵	1,2	
NDP ₂	1,6	

Eine Ursache für die unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten S_i/S_e (<1 bzw. >1) ist aus den Strukturen der Sonden nicht ohne weiteres offensichtlich. Es fällt lediglich auf, dass die anionischen Sonden mit einem $S_i/S_e < 1$ nur einen dissoziablen OH-Rest aufweisen, während die Sonden mit einem $S_i/S_e > 1$ deren zwei besitzen. Bevor auf die mögliche Bedeutung dieses Unterschiedes eingegangen wird, sei kurz dargestellt, welche Faktoren der stationären Verteilung permeabler Sonden zwischen den Blättern der Membran zugrunde liegen dürften:

Es ist bei allen Sonden zunächst die Grundaffinität der Sonde zu den beiden Blättern der Doppelschicht. Sie beruht auf geometrischen Eigenschaften und Polaritäten der Sonden, die ihnen eine mehr oder weniger gute Einpassung in die Monolayer der Lipid-Doppelschicht ermöglichen. Vereinfachend wäre diese Grundaffinität mit einer Löslichkeit vergleichbar. In einer symmetrischen Doppelschichtmembran sollte die Grundaffinität zu beiden Blättern gleich, die Verteilung also 1:1 sein. In einer stark asymmetrischen Membran wie der des Erythrozyten muss dies aber nicht der Fall sein. Als zusätzlicher Faktor spielt bei der Verteilung ionischer Sonden das über der Membran liegende elektrische Transbilayer-Potential, entsprechend der Summe von Grenzflächenpotential-Differenz und Membran-Potential (z.B. Nernst-Potential) eine Rolle. Dieses elektrische Potential tritt in Wechselwirkung mit den Ladungen der Sonde und beeinflusst so deren Verteilung zwischen den beiden Blättern der Membran. Der Ladungszustand der Sonde hängt bei dissoziablen amphiphilen Anionen wie NDP_2 vom Protonierungszustand der ionischen Gruppe ab. Auf der Basis der in Abb. 13 (S. 40) dargestellten Annahme zu den Potentialverhältnissen an der Erythrozytenmembran ergibt sich nach Ortwein⁶¹ bei gleicher Grundaffinität einer anionischen Sonde zu den beiden Blättern eine potentialbedingte Verteilung S_i/S_e von ca. 0,15 für eine einwertige und 0,07 für eine zweiwertige Sonde. Die gemessenen S_i/S_e -Werte für die in Tab. 8 zusammengestellten Sonden sind allesamt größer als diese theoretischen Werte, insbesondere für die Phospho-Anionen wie NDP_1 und NDP_2 , aber auch für DENSA.

Offensichtlich genügt die Annahme symmetrischer Grundaffinitäten und „einfacher“ zusätzlicher Potentialeffekte nicht, um die beobachtete Verteilung insbesondere der Phospho-anionischen Amphiphile zu erklären. Um das Ausmaß der Abweichung einzuschätzen, benötigt man Informationen über den Ladungszustand der Phospho-Anionen. Da lt. Literaturdaten⁶² der pK_1 -Wert für derartige Phosphat- bzw. Phosphonat-Verbindungen vermutlich zwischen pH 2 und pH 3 liegt, ist ein nicht-ionisches Vorliegen der Sonde NDP_2 mit zwei protonierten Oxy-Resten bei pH 7,4 praktisch ausgeschlossen - einer der beiden ist sicher deprotoniert. Eine Deprotonierung des zweiten Hydroxyl-Restes

von NDP_2 bei pH 7,4 ist allerdings fraglich, da der pK_2 -Wert für Phosphonate (NDP_2) nach Labotka und Omachi²⁹ bei diesem pH-Wert liegt. Vermutlich liegt die Sonde bei diesem pH-Wert also anteilig einwertig- und zweiwertig negativ vor. Es muss jedoch bedacht werden, dass die pK -Werte einer Verbindung vom umgebenden Medium abhängig sind. So könnte der Einbau der Sonde in die Membran die o.g. pK -Werte verändern.

Auch konkretere Gründe sprechen aber für ein nur einwertig-negatives Vorliegen des anionischen Teils von NDP_2 . Die Dielektrizitätskonstante (ϵ) eines Mediums beeinflusst die pK -Werte ionisierbarer Gruppen derart, dass eine Verringerung dieser Konstante eine Erhöhung des pK -wertes mit sich bringt. Nach Tocanne und Teissie⁶², die sich mit der Ionisation von Phospholipiden beschäftigt haben, beträgt ϵ für Wasser ca. 80 und für die Mittelschicht der Membran ca. 2. Dieser Gradient liegt über einer Strecke von 5 nm. Für die Grenzfläche zwischen dem Bereich der Phospholipid-Kopfgruppen und Wasser wird ein Wert von $\epsilon \approx 20-30$ angenommen, was bei dissoziablen Gruppen der PL zu einer pK -Wert-Erhöhung um ca. 1-2 pH-Einheiten führt. Die hydrophilen Phosphat- bzw. Phosphonat-Gruppen der Sonden NDP_1 bzw. NDP_2 sind vermutlich in dieser Grenzschicht lokalisiert. Eine analoge Verschiebung der pK -Werte würde den pK_1 -Wert der Sonde ggf. zu pH-Werten von 4-5 verlagern - immer noch deutlich unterhalb von pH 7,4. Der pK_2 -Wert würde durch eine solche Verschiebung aber noch weiter vom Neutral-pH entfernt und das Vorliegen des anionischen Teils der Sonde in teilweise zweiwertig-negativer Form zunehmend unwahrscheinlicher machen. Somit ist ein Vorliegen der beiden Phospho-Sonden NDP_1 und NDP_2 mit einer einfach-negativen Ladung wahrscheinlich. Auch NBD-PA, welches sich als dritte Verbindung mit Bevorzugung des Innenblattes in die Erythrozytenmembran einbaut, liegt überwiegend einwertig-negativ vor: Seine pK -Werte liegen bei ungefähr 2 - 3 und 7,5 - 9, abhängig vom umgebenden Medium.⁶²

Die Verteilung S_i/S_e dieser Anionen sollte damit bei gleichen Grundaffinitäten zu beiden Blättern ca. 0,15 betragen, also das Außenblatt bevorzugen und nicht, wie beobachtet, das Innenblatt. Im übrigen würden die obigen Überlegungen erwarten lassen, dass sich das einwertige NDP_2 , aber auch NDP_1 und NBDPA genauso verteilen, wie die einwertigen Sulfo-Amphiphile, sowie LPM und NBDPM. Dies ist aber, wie Tab. 8 zeigt, nicht der Fall. Diese letzteren Anionen verteilen sich zwar, wie theoretisch zu erwarten, bevorzugt ins Außenblatt ($S_i/S_e < 1$), allerdings nicht in dem zu erwartenden Ausmaß. Es müssen daher andere Konzepte zur Erklärung der Verteilungskoeffizienten entwickelt werden.

Eine Frage wäre z.B., ob tatsächlich das Grenzflächenpotential die Verteilung der amphiphilen Sonden beeinflusst. Anschaulich ausgedrückt könnte es nämlich sein, dass

die Sonden das negative Oberflächen-Potential der endofacialen Seite der Erythrozytenmembran nicht so gut „sehen“, d.h. ihre Verteilung hierdurch weniger beeinflusst wird als theoretisch erwartet. Die Tatsache, dass die mono-anionisch vorliegende Sonde NDP_2 bevorzugt in das Innenblatt der Membran mit überwiegend anionisch geladenen Phospholipiden eingebaut wird ($S_i/S_e = 1,6$), könnte ein Hinweis hierauf sein, dass NDP_2 in geringerem Ausmaß einer „abstoßenden“ Wirkung des Grenzflächen-potentials unterliegt als z.B. Sulfatsonden.

Um dieses unterschiedliche Verhalten von Verbindungen besser zu verstehen und den Bezug des Verteilungskoeffizienten S_i/S_e zur Grenzflächenpotential-Differenz der Membran zu klären, können Versuche hilfreich sein, bei denen diese Differenz verändert wird. Hierzu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene langkettige ionische Amphiphile (im Folgenden auch als „Membranmodifier“ bezeichnet) mit unterschiedlichen Ladungsgruppen in die Membran (sehr wahrscheinlich überwiegend in das äußere Blatt) eingebaut. Die hier erzielten Resultate können mit Ergebnissen von Ortwein⁶¹ verglichen werden, die die Beeinflussbarkeit der Verteilung der Sulfat-Sonde DENSA innerhalb der Membran durch solche Amphiphile untersuchte. In Ab.. 32 werden die unterschiedlichen stationären Verteilungen verglichen.

Die negativ geladenen Gruppen der Modifier SDS, HDS und Merocyanin negativieren vermutlich das Grenzflächenpotential des Außenblattes, verringern so das transmembranäre Potential, also den Potential-Gradienten, und erleichtern den beiden anionischen Sonden den Einbau in das ebenfalls ein anionisches Grenzflächenpotential tragende Innenblatt. Es kommt zu einem vermehrten Einbau der beiden Sonden NDP_2 und DENSA ins das Innenblatt der Membran. Der kationisch geladene Modifier HTAB erhöht durch überwiegenden Einbau in das Außenblatt die transmembranäre Potential-Differenz und wirkt dem Flip der Sonden ins Innenblatt entgegen. Folge hiervon ist die Abnahme des relativen Innenblattanteils der Sonden (Abb. 32).

Vergleicht man das Ausmaß dieser Effekte für NDP_2 und DENSA, so stellt man fest, dass sie regelmäßig für DENSA stärker sind als für NDP_2 . Diese unterschiedlichen Veränderungen der stationären Verteilungsgleichgewichte sprechen für eine relativ geringere Einflussnahme des Grenzflächen-Potentials auf die Sonde NDP_2 . Unveröffentlichte Daten für Flip und Verteilung von SDS (Natriumdodecyl-Sulfat) als Sonde haben ebenfalls einen stärkeren Einfluss der genannten Modifier ergeben als für NDP_2 .⁶³

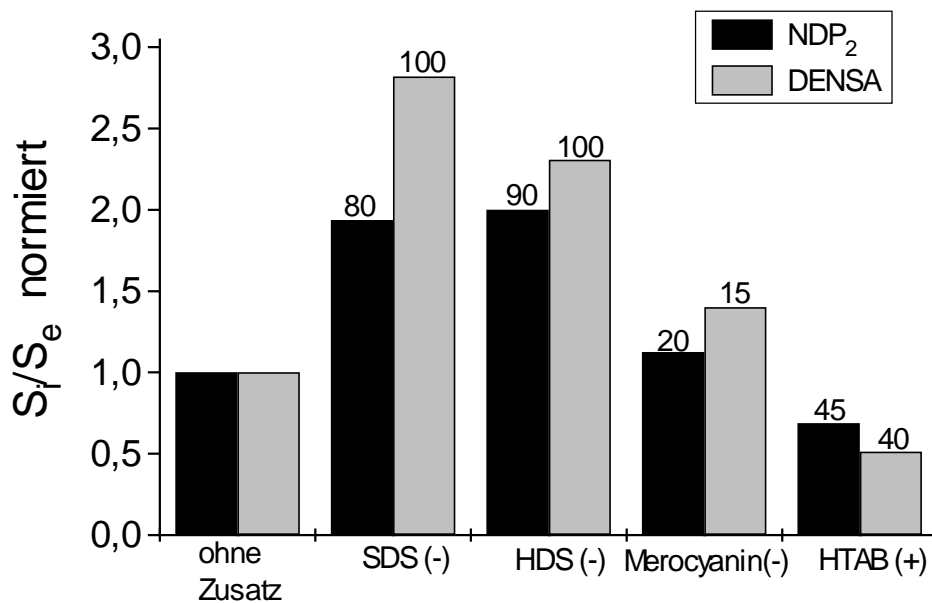


Abb. 32: Stationäre Verteilungen (normiert auf das Verteilungsgleichgewicht unter Standardbedingungen) der beiden anionischen Verbindungen NDP₂ und DENSA⁶¹ unter dem Einfluß von Membran-Modifiern. NDP₂-beladene Erythrozyten wurden bei 32 °C in KNPS-Medien inkubiert (pH 7,4, 120 min). Bedingungen bei DENSA-Experimenten: Beladung bei 0 °C und einem Hkt. von 25 %, Sondenkonzentration 40-60 µmol/l, 15 min; Inkubation in KNPS-Medium bei 37 °C, pH 7,4, Hkt. 10 %, 30 min. Die Modifier waren in den angegebenen Konzentrationen im Medium enthalten (µmol/l). Die Werte des Verteilungsgleichgewichtes wurden auf die stationäre Verteilung unter Standardbedingungen normiert (S_i/S_e: 1,6 NDP₂; 0,4 DENSA). Abkürzungen: SDS: Natriumdodecylsulfat; HDS: Hexadecansulfonsäure, Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB), 5-(N-Decyl)aminonaphthalin-2-sulfonsäure (DENSA). In Klammern ist angegeben, ob es sich um eine anionische- oder kationische Verbindung handelt.

Worin könnte eine geringere Beeinflussbarkeit von NDP₂ im Vergleich mit Sulfonat-Sonden bzw. Sonden mit nur einer dissoziablen Gruppe durch elektrische Ladungen an der Membran/Zytosol bzw. Membran/Medium-Grenze begründet sein?

Eine Möglichkeit wäre eine Ionenpaarbildung oder Wasserstoffbrücken zwischen den jeweiligen ladungstragenden bzw. polaren Molekülabschnitten der Sonde(n) und den Phospholipid-Kopfgruppen der Erythrozytenmembran. Durch unterschiedliche Elektronenverteilung in den Sulfonat-/Sulfat- und Phosphonat-/Phosphat-Gruppen der Sonden sind Unterschiede in der Ausbildung solcher Bindungen denkbar, die für die ungleiche Beeinflussbarkeit durch elektrische Kräfte verantwortlich sein könnten. Daten, die genaueren Aufschluss hierüber geben liegen jedoch nicht vor.

Im Zusammenhang mit Interaktionen zwischen Sonden und Membran, u.a. durch die oben genannten Ionenpaarbindungen, ist es weiterhin wahrscheinlich, dass sich die jeweiligen

Sonden unterschiedlich gut in die Membran einpassen. Folge davon könnten z.B. unterschiedliche „Eintauchtiefen“ (insbesondere der geladenen Kopfgruppe) von NDP₂ und den Sulfo-Sonden sein, die möglicherweise eine unterschiedliche Beeinflussbarkeit durch elektrische Kräfte zur Folge haben könnten. Leider liegen auch hierüber zu wenige Informationen vor, um diese Hypothese zu verfolgen.

Eine ganz andere Ursache für die Unterschiede im Verteilungsverhalten zwischen Sonden mit geringem und hohem Verteilungskoeffizienten ($S_i/S_e < 1$ bzw. > 1) könnte ein „trapping“-Mechanismus sein. Hiermit ist ein Vorgang gemeint, der die Sonde nach erfolgter Translokation in das innere Blatt der Membran verändert oder sie bindet und somit einen Rücktransport unmöglich macht. In diesem Zusammenhang wäre eine Beteiligung des Membranskeletts, dem submembranären Protein-Gerüst, welches u.a. für Zellstabilität verantwortlich ist, denkbar. Gegen dieses Argument spricht jedoch das Flop-Verhalten der Sonden. Bei Vorliegen eines Trapping-Mechanismus würde sich bei Sonden mit hohem Verteilungskoeffizienten die Kinetik des Flop vermutlich deutlich von der des Flip unterscheiden.

Da alle beobachteten Verteilungskoeffizienten (S_i/S_e , Tab. 8) größer als der aufgrund des transmembranären Potentials zu erwartende Wert von $0,15^{61}$ sind, müssen unterschiedliche Grundaffinitäten der beiden Einzelblätter der Membran zur jeweiligen Sonde einen wesentlichen Beitrag zu den Verteilungskoeffizienten leisten. Hinzu kommen wahrscheinlich unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Potentialen an oder über der Membran, letztere bedingt durch die unterschiedliche Position in der Tiefe des Bilayers bzw. die Ladungsabschirmung durch Ionenpaarbildung. Es muss also offen bleiben, ob oder warum die Zahl dissoziabler Gruppen hierbei eine Rolle spielt.

4.4 Einfluß des pH

Der AE1-vermittelte Transport kleiner hydrophiler mono- bzw. divalenter Anionen weist charakteristische pH-Abhängigkeiten auf. Für einwertige Anionen wie z. B. Halogenide sinkt die Transportrate unterhalb von pH 7 stark ab. Sie hat bei pH 7 ein Maximum und geht mit steigendem pH wieder langsam zurück.⁶⁴ Für zweiwertige Sulfat- bzw. Phosphat-Ionen liegt ein entsprechendes pH-Optimum dagegen ungefähr im Bereich von pH 6,5.²⁹ Um die Frage zu klären, ob für den AE1-vermittelten oder auch den nicht-vermittelten NDP₂-Transport ähnliche pH-Effekte vorliegen, wurden Versuche bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Einwärtstranslokation

von NDP₂ bot zudem eine Möglichkeit, den AE1-vermittelten Austausch kleiner Anionen mit dem AE1-vermittelten Flip amphiphiler Anionen zu vergleichen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse (s. Abb. 11, S.35) fällt auf, dass der Gesamtflip von NDP₂ bei einer Senkung des pH von 7,4 auf 5,7 um den Faktor 3 zunimmt. Diese Beschleunigung resultiert im Wesentlichen aus einer Steigerung des DIDS-insensitiven, also des nicht AE1-vermittelten Flip um den Faktor 12, während der AE1-Transportanteil nur um den Faktor 1,1 zunimmt. Ein in den basischen Bereich verschobener Extrazellulär-pH (8,4) brachte hingegen für keine der beiden Komponenten signifikante Veränderungen gegenüber dem Kontroll-pH von 7,4 mit sich. Das stationäre Verteilungsgleichgewicht zeigte mit einer Abnahme des Quotienten S_i/S_e von 2,8 bei pH 5,6 zu 1,5 bei pH 8,4 über den untersuchten pH-Bereich eine deutliche Veränderung.

Ursache für die Veränderungen des AE1-vermittelten Transportes kleiner hydrophiler mono- bzw. divalenter Anionen ist möglicherweise die Protonierung verschiedener Reste des Transport-Proteins, insbesondere eines Glutamat-Restes in der Transportdomäne. Die Protonierung dieser Gruppe soll eine Destabilisierung des Übergangskomplexes für einwertige Anionen und eine Stabilisierung des Übergangskomplexes zweiwertiger Anionen bewirken.²¹ Für den AE1-vermittelten NDP₂-Flip, also den intramembranären Transport langkettiger Amphiphile, scheint sich jedoch mit den vorliegenden Ergebnissen die bereits früher geäußerte Vermutung^{61,25} zu bestätigen, dass dieser Protonierungsvorgang keine nennenswerten Auswirkungen hierauf hat.

Für den DIDS-insensitiven Transport der Sonde ergibt sich andererseits eine deutliche Abhängigkeit vom pH(e) (pH im EZR). Während im alkalischen Bereich oberhalb von pH(e) 7,4 keine Veränderung erfolgt, lässt sich im Bereich unterhalb von ca. pH 7,0 eine zunehmende Flip-Steigerung beobachten. Um die Hypothese zu stützen, dass es sich hierbei um eine „echte“ Beschleunigung des nicht durch AE1 vermittelten Transportes handelt, müssen jedoch einige mögliche Einwände diskutiert werden.

a) Einerseits könnte diese Beschleunigung zumindest teilweise durch eine abgeschwächte Hemmwirkung von DIDS auf AE1 verursacht sein. Das Resultat wäre die fälschliche Interpretation eines noch vorhandenen AE1-vermittelten Transportes als nicht-vermittelter Anteil.

Es liegen allerdings Ergebnisse von Serra et al.²³ vor, die besagen, dass die hemmende Wirkung von DIDS auf den Transport von Phospholipiden (NBD-PA) über einen pH-Bereich von 6 bis ca. 8,3 weitgehend konstant bleibt. Demnach ist von einer effektiven Hemmung in dem betrachteten, die o.g. Grenzen nur geringfügig

überschreitenden Bereich auszugehen. Hierfür spricht auch, dass eine Verlängerung der Behandlungsdauer mit DIDS die DIDS-insensitive Komponente des Flip nicht weiter verringerte.

- b) Es muss außerdem die Frage gestellt werden, ob der beobachtete pH-Effekt nicht eigentlich ein Membran-Potential-Effekt ist, denn bei Veränderung des extrazellulären pH-Wertes kommt es am Erythrozyten ebenfalls zu einer Veränderung des Membran-Potentials das auf der Donnan-Verteilung des Chlorids beruht.⁶⁵ Da der beobachtete Beschleunigungs-Effekt jedoch nur im sauren und nicht gegenläufig im alkalischen Bereich auftritt, ist ein derartiger Zusammenhang unwahrscheinlich.
- c) Eine weitere denkbare Hypothese zur Beschleunigung des DIDS-insensitiven Flip von NDP₂ bei pH-Absenkung könnte sich aus dem folgenden Zusammenhang ergeben: Bei Senkung des extrazellulären pH-Wertes steigt auch die intrazelluläre H⁺-Ionenkonzentration⁶⁶; anionische Kopfgruppen natürlicher Phospholipide könnten folglich protoniert und damit das negative Oberflächenpotential der endofacialen Membranseite abgeschwächt werden. Läge die Flip-Steigerung von NDP₂ aber diesem Phänomen zugrunde, würde man auch bei den anderen (anionischen) Sonden-Verbindungen eine Flip-Steigerung erwarten. Eine solche Steigerung findet sich jedoch bei einem Vergleich nur bedingt (s.u., Tab. 9). Hinzu kommt, dass der pk-Wert der Carboxyl-Gruppe des Phosphatidylserin, des dominierenden anionischen Kopfgruppenbestandteils des Membran-Innenblattes, zu niedrig liegt, um im hier untersuchten pH-Bereich ein wesentliche Rolle zu spielen.
- d) Des Weiteren könnte eine pH-induzierte Aktivierung der Scramblase (bei pH-Werten ab 6.5 und niedriger) in Betracht gezogen werden. Aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse über die Hemmung der Scramblase durch DIDS-Behandlung dürfte ein solcher Effekt aber nicht ins Gewicht fallen.

Tab. 9: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante k_{in} (min⁻¹) für den Gesamt-Transport vom pH-Wert des Flip-Mediums.

Sonde	pH 6	pH 7,4	pH 8
NDP ₂ (32 °C)	0,056	0,030	0,022
NBDPA (37 °C) ²³	0,021	0,002	0,002
DENSA (32 °C) ⁶¹	0,025	0,026	0,024
NDP ₁ (21 °C) ²⁵	0,005	0,008	0,008
LPM (37 °C) ⁶⁷	0,018	0,015	0,010

Es scheint sich somit bei den beobachteten pH-Effekten tatsächlich um eine Beschleunigung des nicht-vermittelten Flip von NDP_2 zu handeln, deren Ursache allerdings derzeit nicht klar ist.

Ein Vergleich mit den pH-Abhängigkeiten des Transportes verschiedener anderer Sonden zeigt nun aber, dass sich bei diesen Sonden trotz der vermutlich gleichen Ladungsverhältnisse wie bei NDP_2 (einwertig anionisch) nicht zwangsläufig vergleichbare pH-Effekte ergeben (Tab. 9). Während bei Sonden wie NDP_1 , DENSA und LPM kaum Änderungen der Transportrate bei unterschiedlichen pH-Werten auftreten, ist bei NBD-markiertem PA eine ähnliche pH-Abhängigkeit wie bei NDP_2 zu erkennen.

Im Gegensatz zu den wenig klaren Verhältnissen hinsichtlich der pH-Abhängigkeit der Flipraten von NDP_2 entspricht die pH-Abhängigkeit der stationären Verteilung der Sonde der Erwartung für ein einwertiges Anion nach den Gesetzmäßigkeiten einer Donnan-Verteilung (Abb. 11; S. 35) Ähnliche lineare Beziehungen gelten, wie dort gezeigt, für die pH-Abhängigkeit der Verteilung von Cl^- - bzw. OH^- -Ionen zwischen Intra- und Extrazellulär-Raum am Erythrozyten. Die (Donnan-)Verteilung der letztgenannten Ionen hängt ab von der Konzentration intraerythrozytärer Proteine (v.a. Hämoglobin) und impermeabler Ionen (v.a. organische Phosphate) sowie deren Protonierungszustand bei unterschiedlichen pH-Werten. Möglicherweise beeinflusst die pH_i/pH_e -Verteilung nach Donnan die Verteilung von NDP_2 zwischen Innen- und Außenblatt der Membran indirekt über die Ionisierung der Kopfgruppen der Sonde an der Grenzfläche Membran/Wasser.

4.5 Effekte von Calcium-Ionen auf den Flip von NDP_2

Besonders interessante neue Ergebnisse ergaben sich bei der Untersuchung der Effekte von Ca^{++} auf den Flip von NDP_2 .

Wie bereits seit längerem bekannt, kommt es unter Ca^{++} in Gegenwart des Ionophor A23187 zu einem Abbau der natürlichen Asymmetrie der Membranphospholipide des Erythrozyten, beruhend auf der Aktivität der Scramblase, eines Transport-Proteins, das nach Aktivierung durch intrazelluläres Ca^{++} den Flip membranständiger Phospholipide steigert. Darüber hinaus steigert Ca^{++} -Aktivierung der Scramblase, wie sich bei den vorliegenden Untersuchungen nun ergab, auch den Flip von NDP_2 sehr erheblich. Dieses Transportprotein akzeptiert also außer Phospholipiden auch andere langkettige Amphiphile. Die offenbar wenig spezifische Scramblase lässt sich außerdem überraschenderweise durch das als Hemmstoff des Anionentransporter AE1 eingesetzte DIDS bei dessen covalenter Bindung an die Membran bis zu 80 % hemmen. Verantwortlich hierfür dürfte die Reaktion des an Aminogruppen bindenden Reagenz mit

entsprechenden oberflächlichen Gruppen des Scramblase-Moleküls sein. Das nicht-kovalent bindende DIDS-Analog DNDS hatte keinen hemmenden Effekt auf die Scramblase.

Weiterhin stellte sich heraus, dass das v.a. an SH-Gruppen bindende Reagenz NEM den Ca^{++} -induzierten, Scramblase-vermittelten Flip von NDP_2 erheblich steigert und dass dieser gesteigerte Flip durch anschließende DIDS-Behandlung ebenso unterdrückt wird wie der nicht durch NEM-stimulierte Flip. Entsprechend unterdrückte eine DIDS-Vorbehandlung den Effekt einer nachfolgenden NEM-Exposition.

Neuere Untersuchungen nach Abschluss der Experimente zur vorliegenden Arbeit durch Kamp, Sieberg und Haest⁶⁸ haben inzwischen gezeigt, dass die Scramblase-Aktivität auch durch Vorbehandlung der Erythrozyten mit TNBS (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonat), einem weiteren Amino-Reagenz, oder auch durch das Disulfid-reduzierende Reagens DTE (Dithioerythritol) gehemmt wird. Dieser hemmende Effekt ist bei Reoxidierung der SH-Bindungen (z.B. mit Diamid) reversibel.

Diese Befunde, welche die Bedeutung von NH_2 - und SH-Gruppen für die Funktion der Scramblase unterstreichen, eröffnen unter Umständen neue Wege zum Studium molekularer Details des Scramblase-Prozesses.

4.6 Effekte anderer zweiwertiger Metall-Ionen

Interessante Ergebnisse zeigten sich auch bei der Zugabe anderer zweiwertiger Metall-Ionen zum Flip-Medium.

4.6.1 Zink

Zn^{++} beschleunigte, in Abwesenheit von Ionophor A23187, in Konzentrationen von 0,01 bis 0,05 mM im Medium den nicht-AE1-vermittelten Flip von NDP_2 , in höheren Konzentrationen wirkte es jedoch inhibitorisch, bis hin zu kompletter Hemmung bei Konzentrationen oberhalb 0,5 mM. In Gegenwart von 10 μM Ionophor beschleunigte Zn^{++} dagegen in Konzentrationen von 0,1 mM bis hin zu 1 mM den Flip. Höhere Konzentrationen von Zn^{++} (> 1 mM) gingen unabhängig vom Ionophorzusatz mit geringen Hämolyseraten (bis zu 11 %) einher. Die beschleunigende Wirkung von Zn^{++} war abhängig von der Ionophor-Konzentration (Abb. 26, S. 68). Je mehr Ionophor zugegeben wurde, desto deutlicher zeigte sich der beschleunigende Effekt.

An diesen Zn^{++} -Effekten können weder die Scramblase noch AE1 beteiligt sein, da die Messungen in Gegenwart von DIDS erfolgten, welches beide Transporter hemmt. Im

Übrigen hat Henseleit⁶⁹ gezeigt, dass die Scramblase durch Zn^{++} nicht beeinflusst wird, obwohl das Ionophor A 23187 Zn^{++} in das Zellinnere transportiert.

Zn^{++} verändert also den Flip auf andere Weise und in Abhängigkeit davon, ob es in Abwesenheit von Ionophor A23187 von der extrazellulären Seite der Membran her oder unter Ionophor-Zugabe auf beiden Seiten der Membran wirksam wird. Hinzu kommt die komplizierte Abhängigkeit von der Zn^{++} -Konzentration und der Expositionszeit.

In *Abwesenheit* von Ionophor könnte die Bildung von NDP_2 - Zn^{++} -Komplexen unterschiedlicher Stöchiometrie (2:1 bei niedriger Zn^{++} -Konzentration, 1:1 bei höheren Zn^{++} -Konzentrationen) den nativen nicht-vermittelten Flip entweder beschleunigen – ein 2:1-Komplex wäre elektrisch neutral – oder hemmen – ein 1:1-Komplex wäre einwertig positiv und damit schlechter diffusibel als das anionische NDP_2 . Alternativ könnte Zn^{++} durch Brückenbildung zwischen NDP_2 und Membranphospholipiden die Permeation der Sonde hemmen.

In *Gegenwart* des anionischen Ionophor A23187 wird Zn^{++} auf die Membraninnenseite verschoben. Dort könnten Zn^{++} -haltige Komplexe mit NDP_2 , Ionophor und/oder Phospholipiden auf einstweilen nicht bekannte Weise den Flip beschleunigen, wobei die beobachtete Latenz Folge einer nur langsamen Aufnahme von Zn^{++} wäre. Die Daten in Abb. 26 (S. 68) stützen diese Annahme.

Alternativ könnte man postulieren, dass NDP_2 in Form von Zn^{++} -Ionophor- NDP_2 -Komplexen (1:1:1) schneller über die Membran transportiert wird als NDP_2 alleine oder als NDP_2 - Zn^{++} -Komplex (2:1).

4.6.2 Mangan

Mn^{++} , ebenfalls kein Aktivator der Scramblase⁶⁹, hatte in der vorliegenden Arbeit in Abwesenheit von Ionophor A23187 in einem Konzentrations-Bereich von ca. 0,02-0,05 mM stark beschleunigende Effekte auf den nicht-vermittelten Flip, in höheren Konzentrationen aber - vergleichbar mit Zn^{++} - eine hemmende Wirkung.

Die Ähnlichkeit der Effekte und der Konzentrationsbereiche legen nahe, dass hier gleiche oder ähnliche Mechanismen wie bei Zn^{++} eine Rolle spielen, nämlich Komplexbildungen unterschiedlicher Stöchiometrie zwischen Metall-Ion und NDP_2 (1:1 bzw. 2:1). Unterstützung findet diese Annahme in dem ebenfalls beschleunigenden Effekt, den Mn^{++} in Gegenwart von Ionophor A23187 ausübt (Mn^{++} :Ionophor: NDP_2 1:1:1).

Hinsichtlich der beobachteten Hemmeffekte ist es denkbar, dass diese Wirkung von Mn^{++} mit der Affinität des Kations (wie auch anderer, zweiwertiger Kationen) zu negativ geladenen Phospholipiden⁷⁰ in Zusammenhang stehen. Die Bindung von intrazellulärem

Mn⁺⁺ an Phospholipide der endofacialen Seite der Membran (z.B. PS) wäre eine naheliegende Ursache für eine Hemmung der transversalen Mobilität anderer Phospholipide oder amphiphiler Verbindungen.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der transversalen (Re-)Orientierung des langkettigen, anionischen Amphiphils NDP₂ [10-(Naphth-1yl)-1-decanphosphonsäure] als Sonde innerhalb der beiden Blätter der Erythrozytenmembran. Der überwiegende -vermittelte - Anteil dieser Translokation findet über das Membranprotein AE1 (Bande 3) statt, welches ursprünglich als Transportprotein für kleine hydrophile Anionen (z.B. Chlorid-Ionen) bekannt war und dessen Eigenschaften als Transporter für langkettige Amphiphile im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen.

Ausgangspunkt waren Probleme, die im Rahmen von Studien mit der Vorgänger-Sonde NDP₁ [10-(Naphth-1yl)-1-decylphosphorsäure] aufgetreten waren. Diese unterliegt aufgrund ihrer Phosphat-Ester-Gruppe einer intrazellulären Hydrolyse. Die hierdurch entstandenen Schwierigkeiten bei der Messung der Ein- und Auswärtstranslokation (Flip und Flop) innerhalb der Erythrozytenmembran wurden durch die Verwendung der von Dr. E. Herman neu synthetisierten Phosphonat-Sonde NDP₂ umgangen, da diese keiner Hydrolyse unterliegt. Zusätzlich galt das Interesse dem Vergleich der beiden unterschiedlichen Phospho-Sonden NDP₁ und NDP₂, um weitere Informationen über die Gesetzmäßigkeiten der Translokation langkettiger Amphiphile in der Erythrozytenmembran zu erhalten.

Um die Kinetik des Einwärtstransportes und die stationäre Verteilung der Sonde unter verschiedenen Bedingungen messen zu können, wurde zunächst bei 0° C selektiv das Außenblatt der Membran mit NDP₂ „beladen“, ohne dass eine Translokation zwischen den beiden Membranblättern stattfand (kinetisches Trapping). Im Folgenden wurde der einwärts gerichtete, intramembranäre Sonden-transport (Flip) durch Temperaturerhöhung gestartet und zeitabhängig verfolgt. Dazu wurde der Transportvorgang durch Abkühlen erneut gestoppt, der Außenblattanteil der Sonde selektiv mit Rinder-Serumalbumin extrahiert und die Zellen anschließend hämolysiert. Der Sonden-Innenblattanteil konnte nun in Isopropanol-Chloroformextrakten des Lysates fluorometrisch bestimmt werden. Sollte die NDP₂-Translokation vom Innen- in das Außenblatt der Membran untersucht werden, wurden durch NDP₂-Beladung der Erythrozyten bei hohen Temperaturen in beide Membranblätter Sondenmoleküle eingebaut, der Außenblattanteil bei 0° C mit Albumin extrahiert und nachfolgend zeitabhängig die Abnahme des Innenblattanteils gemessen.

Die Ergebnisse der Studien lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Einwärtstranslokation von NDP_2 (Flip) erfolgt bei 32 °C mit einer Geschwindigkeitskonstante (k_{in}) von 0,0303 (min^{-1}). Für die Auswärtstranslokation (Flop) beträgt die Geschwindigkeitskonstante (k_{out}) bei 32 °C 0,0465 (min^{-1}).
2. Der Flip von NDP_2 wird durch Substanzen gehemmt, die als Hemmstoffe des AE1-vermittelten Transports kleiner Anionen bekannt sind und deren hemmende Wirkung auf den Flip anderer langkettiger Amphiphile über AE1 für andere Sonden (u.a. NDP_1) bereits nachgewiesen ist. Für den wichtigsten dieser Hemmstoffe, die kovalent bindende 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS), beträgt die Hemmung des Flip von NDP_2 84 %. Geringere Hemmwirkung auf den NDP_2 -Transport zeigten (maximale Hemmung des Gesamttransportes in Klammern) 4,4'-Dinitrostilben-2,2'-disulfonsäure (DNDS; 77 %), Nifluminsäure (52 %), Merocyanin 540 (39 %) und Dipyridamol (78 %). Damit konnte NDP_2 erwartungsgemäß als Substrat des Transportproteins AE1 identifiziert werden. Der DIDS-insensitive, also nicht AE1-vermittelte Anteil der Translokation erfolgt vermutlich über die Lipidphase der Membran.
3. Die Sonde NDP_2 verteilt sich stationär im Verhältnis von 6:4 zwischen Innenblatt und Außenblatt der Membran (Verteilungskoeffizient S_i/S_e ca. 1,6), reichert sich also in der Innenschicht der Membran an. Dieses Verteilungsmuster weicht deutlich von einem aufgrund des (innen negativen) Membranpotentials zu erwartenden S_i/S_e von 0,15 (für einwertig-anionische Amphiphile) bzw. 0,07 (für zweiwertig-anionische Amphiphile) ab. Ein Vergleich mit den Verteilungskoeffizienten anderer langkettiger Amphiphile lässt vermuten, dass eine durch verschiedene Faktoren (Ladung, Größe, Anzahl dissoziabler Gruppen) bedingte Grundaffinität einer Sonde zu den jeweiligen Membranblättern hierfür verantwortlich ist.
4. Die stationäre Verteilung und die Kinetik der Einwärtstranslokation von NDP_2 können durch Einbau anderer Substanzen in das Außenblatt der Membran – sog. Membranmodifizier – die durch ihren elektrischen Ladungszustand die Grenzflächenpotentialdifferenz der Erythrozytenmembran (außen neutral, innen negativ) beeinflussen, verändert werden. Die anionischen Verbindungen Natriumdodecylsulfat (SDS) und Lyso-Phosphatidyl-Serin (Lyso-PS) beschleunigen die NDP_2 -Einwärtstranslokation, durch Abschwächung des (Grenzflächen)-Potentialgradienten, um den Faktor 2 bzw. 3,5 und erhöhen den Sondenanteil im Innenblatt bei stationärer Verteilung deutlich. Kationische Membranmodifizier wie Dodecyltrimethylammonium-Bromid (DTAB) hemmen den NDP_2 -Einwärtstransport und vermindern den Innenblatt-

anteil durch eine entgegengesetzte Wirkung auf die Potentialdifferenz. Die Tatsache, dass auch neutrale bzw. zwitterionische Substanzen wie Dodecyl-Maltosid (DM) bzw. Lauryl-Sulfobetain (SB-12) nach Einbau in die Membran eine Flip-Beschleunigung bewirken, ist vermutlich auf den Membran-auflockernden Effekt aller Modifier, welcher u.a. durch die Länge der Kohlenstoffkette der Moleküle bedingt ist, zurückzuführen.

5. Neben dem Grenzflächenpotential spielt auch das über der Membran anliegende Membran-(Nernst)-Potential für die Translokationseigenschaften von NDP_2 eine Rolle. Dieses Potential beruht auf unterschiedlichen Ionen-Konzentrationen im Intra- und Extrazellulärraum und unterschiedlichen Leitfähigkeiten der Membran für verschiedene Ionen. Physiologischerweise liegt am Erythrozyten ein innen negatives Chlorid-Potential vor. Während die Interpretation der Ergebnisse bei veränderten Chlorid-Konzentrationen des Medium durch Nebeneffekte z.T. erschwert wird, zeigen Versuche mit einem experimentell induzierten Kalium-Potential bei artifiziell durch Valinomycin erhöhter Kalium-Leitfähigkeit der Membran klarere Resultate: Eine Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration und resultierende Abschwächung bzw. Umkehr des Membranpotentials führen zu einer beschleunigten Einwärtstranslokation des anionischen Amphiphils NDP_2 und einer zunehmenden stationären Verteilung in das Membraninnenblatt. Ein kaliumfreies Medium bewirkt dementsprechend eine Potentialverstärkung, eine Abnahme der Translokationsgeschwindigkeit und eine Verringerung des Innenblattanteils im Verteilungsgleichgewicht.
6. Der Vergleich der Translokationsraten und Verteilungskoeffizienten der Sonden NDP_1 und NDP_2 zeigt eine weitgehende Übereinstimmung.
7. Der AE1-vermittelte Flip von NDP_2 zeigt im Gegensatz zum Transport kleiner hydrophiler Anionen nur eine geringe pH-Abhängigkeit, während der nicht-vermittelte Flip bei Verschiebung des pH-Wertes von pH 7,4 zu sauren Werten (pH 5,9) um den Faktor 12 beschleunigt wird. Bei Veränderung des pH zu alkalischen Werten (pH 8,4) bleibt die Geschwindigkeitskonstante dieser Komponente annähernd unverändert. Bei pH-Wert Verschiebungen (pH 5,9 - 8,4) verändert sich die Verteilung von NDP_2 analog zu der Verteilungsveränderung (intrazellulär/extrazellulär) kleiner Anionen wie z.B. OH^- und Cl^- . Der Verteilungskoeffizient nimmt bei erniedrigten pH-Werten zu ($S_i/S_e = 2,3$ bei pH 5,9) und bei erhöhten pH-Werten ab ($S_i/S_e = 1,4$ bei pH 8,4). Auch die Verteilung membrangebundener mobiler Anionen scheint daher von den Gesetzen einer Donnan-Verteilung, wie sie für Anionen in der Wasserphase gilt, beeinflusst zu werden.

8. Die Zugabe von Ca^{++} bewirkt - in Gegenwart eines Ionophors welches die Ca^{++} -Ionen über die Membran nach intrazellulär befördert (A23187) - eine deutliche Beschleunigung des NDP_2 -Flip. Da Ca^{++} in Gegenwart von Ionophor an Erythrozyten zu einer Aktivierung der Scramblase, einem Membranphospholipid-Transporter, führt, lässt dieser Befund den Schluss zu, dass die Scramblase neben Phospholipiden auch Phospho-Anionen transportiert. Der Scramblase-vermittelte Flip von NDP_2 wird durch Vorbehandlung der Erythrozyten mit dem SH-Reagenz N-Ethylmaleimid (NEM) nochmals gesteigert.

DIDS blockiert überraschenderweise nicht nur, wie bekannt, die Transportfunktionen von AE1, sondern hemmt auch die Scramblase zu 80%.

9. Zweiwertige Metall-Ionen (Zn^{++} , Mn^{++}) haben, in Abhängigkeit von der Konzentration und dem Ort ihrer Applikation (Außenseite oder Außen- und Innenseite der Membran), z.T. gegensätzliche Auswirkungen auf den DIDS-insensitiven, d.h. den nicht durch AE1 oder Scramblase vermittelten Flip von NDP_2 . Besonders deutlich fallen die Effekte für Konzentrationen dieser Ionen in der Größenordnung von 1 mM aus, wobei zwischen Ergebnissen in Gegenwart von Ionophor A23187 oder in Abwesenheit des Ionophor zu unterscheiden ist. In Abwesenheit von Ionophor A23187 ist von einer überwiegend extrazellulären Wirkung der jeweiligen Metall-Ionen auszugehen, in Gegenwart von Ionophor von einer intra- und extrazellulären Wirkung des jeweiligen Metalls.

An der Membranaußenseite bewirkt 1 mM Zn^{++} eine starke Hemmung des NDP_2 -Flip. Niedrigere Konzentrationen (0,005 mM) haben dagegen einen beschleunigenden Effekt, der sich mit steigender Konzentration abschwächt und in die Hemmwirkung der höheren Konzentrationen übergeht, wobei eine geringe Abnahme des Verteilungskoeffizienten festzustellen ist. In Gegenwart von Ionophor, d.h. auf beiden Seiten der Membran wirkend, hat Zn^{++} im niedrigen Konzentrationsbereich praktisch keine Auswirkungen auf den Flip. Im 1 mM-Bereich kommt es jedoch zu einer – wenn auch verzögert einsetzenden – starken Flip-Beschleunigung.

Mn^{++} bewirkt an der Membranaußenseite in niedrigen Konzentrationen eine massive Beschleunigung des NDP_2 -Flip. Diese erreicht bei 0,03 mM ein Maximum und schwächt sich bei noch höheren Konzentrationen wieder ab, um bei sehr hohen Konzentrationen (zwischen 1 und 2 mM) in eine zunehmende Hemmung überzugehen. In Gegenwart von Ionophor bewirkt Mn^{++} eine Beschleunigung, die allerdings bei hohen Konzentrationen wieder geringer wird.

Als Ursache der Effekte unter Zn^{++} und Mn^{++} sind Komplexbildungen unterschiedlicher Stöchiometrie des Metalls mit dem Ionophor und der Sonde NDP_2 zu diskutieren.

6. Literatur

- ¹ Singer, S.J., Nicholson, G.L., 1972
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science 175:720-731
- ² Rodgers, W., Glaser, J., 1993
Distributions of proteins and lipids in the erythrocyte membrane.
Biochemistry 32:12591-12598
- ³ Rothman, J.E., Lenard, J., 1977
Membrane asymmetry: The nature of membrane asymmetry provides clues to the puzzle of how membranes are assembled.
Science 195:743-753
- ⁴ De Kruijff, B., Van Zoelen, E.J., Van Deenen, L.L.M., 1978
Glycophorin facilitates the transbilayer movement of phosphatidylcholine in vesicles.
Biochim. Biophys. Acta 509:537-542
- ⁵ Haest, C.W.M., Kunze, I., Claßen, J., Schneider, E., Deuticke, B., 1986
Flip-flop-rates and origin of phospholipid asymmetry in the native and modified red cell membrane can be studied by phospholipid analogues.
Topics in Lipid Research. Eds. Klein, R.A., Schmitz, B., Burlington House, London
- ⁶ Middelkopp, E., Lubin, B.H., Op den Kamp, J.A.F., Roelofsen, B., 1986
Flip-flop rates of individual molecular species of phosphatidylcholine in the human red cell membrane.
Biochim. Biophys. Acta 486:318-325
- ⁷ Devaux, P.F., 1992
Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry.
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 21:417-439
- ⁸ Tang, X., Hallech, M.S., Schlegel, R.A., Williamson, P., 1996
A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity.
Science 272:1459-1497
- ⁹ Quinn, P.J., 2002
Plasma membrane phospholipid asymmetry.
Subcell Biochem. 36:39-60
- ¹⁰ Dekkers, D.W., Comfurius, P., Bevers, E.M., Zwaal, R.F., 2002
Comparison between Ca^{2+} -induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells.
Biochem. J. 362:741-747
- ¹¹ Sweeley, C.C., Dawson, G., 1969
Lipids of the erythrocyte.
Jamieson, G.A. & Greenwalt, T.J. (eds.), *Red cell membrane structure and function* 172-228
- ¹² Haest, C.W.M., 2003
Persönliche Mitteilung
- ¹³ Lubin, B., Kuypers, F., Chiu, D., 1998
Red cell membrane lipid dynamics.
Prog. Clin. Biol. Res. 319:507-522; discussion 523-524
- ¹⁴ Verkleij, A.J., Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., van Deenen, L. L.M., 1973
The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane.
Biochim. Biophys. Acta 323:178-193

- ¹⁵ Bütikofer, P., Lin, Z.W., Chiu, D., Lubin, B., Kuypers, F.A., 1990
Transbilayer distribution and mobility of phosphatidylinositol in human red blood cells.
J. Biol. Chem. 265:16035-16038
- ¹⁶ Hägerstrand, H., Homström, T.H., Bobrowska-Hägerstrand, M., Eriksson, J.E., Isomaa, B., 1998
Amphiphile-induced phosphatidylserine exposure in human erythrocytes.
Mol. Membr. Biol. 15:89-95
- ¹⁷ Passow, H., 1986
Molecular aspects of band 3 protein-mediated anion transport across the red blood cell membrane.
Rev. Physiol. Biochem Pharmacol. 103:61-203
- ¹⁸ Vosswinkel, S., Haest, C.W.M., Deuticke, B., 2001
Complex effects of papain on function and inhibitor sensitivity of the red cell anion exchanger AE1 suggest the presence of different transport subsites.
J. Membr. Biol. 179:205-221
- ¹⁹ Corbett, J.D., Agre, P., Palek, J., Golan, D.E., 1994
Differential control of band 3 lateral and rotational mobility in intact red cells.
J. Clin. Invest. 94:683-688
- ²⁰ Tang, X., Fujinaga, J., Kopito, R., Casey, J.R., 1988
Topology of the region surrounding Glu⁶⁸¹ of human AE1 protein, the erythrocyte anion exchanger.
J. Biol. Chem. 273:22545-22553
- ²¹ Krupka, R.M., 1989
Role of substrate binding forces in exchange-only transport systems: II. Implications for the mechanism of the anion exchanger of red cells.
J. Membr. Biol. 109:159-171
- ²² Vondenhof, A., Oslender, A., Deuticke, B., Haest, C.W.M., 1994
Band 3, an accidental flippase for anionic phospholipids?
Biochemistry 33:4517-4520
- ²³ Serra, M.V., Kamp, D., Haest, C.W.M., 1996
Pathways for flip-flop of mono- and di-anionic phospholipids in the erythrocyte membrane.
Biochim. Biophys. Acta 1282:263-273
- ²⁴ Kleinhorst, A., Oslender, A., Haest, C.W.M., Deuticke, B., 1998
Band 3-mediated flip-flop and phosphatase-catalyzed cleavage of a long-chain alkyl phosphate anion in the human erythrocyte membrane.
J. Membrane Biol. 165:111-124
- ²⁵ Kleinhorst, A. 1997
Mechanismen der Bande 3-vermittelten Translokation langkettiger anionischer Amphiphile in der Erythrozytenmembran.
Dissertation RWTH Aachen
- ²⁶ Mohandas, N., Wyatt, J., Mel, S.F., Rossi, M.E., Shohet, S.B., 1982
Lipid translocation across the human erythrocyte membrane - regulatory factors.
J. Biol. Chem. 257:6537-6543
- ²⁷ Bergmann, W.L., Dressler, V., Haest, C.W.M., Deuticke, B., 1984
Reorientation rates and asymmetry of distribution of lysophospholipids between the inner and outer leaflet of the erythrocyte membrane.
Biochim. Biophys. Acta, 772 :328-336
- ²⁸ Lew, V.L., Ferreira, H.G., 1978
Calcium transport and the properties of a calcium-activated potassium channel in red cell membranes
Curr. Top. Membr. Transp. 10:217-277

- ²⁹ Labotka, R.F., Omachi, A., 1988
The pH dependence of red cell membrane transport of titratable anions studied by NMR spectroscopy.
J. Biol. Chem. 263:1166-1173
- ³⁰ Lepke, S., Fasold, H., Pring, M., Passow, H., 1976
A study of the relationship between inhibition of anion exchange and binding to the red blood cell membrane of 4,4-diisothiocyanostilbene-2,2-disulfonic acid (DIDS) and its dihydroderivative (H₂DIDS).
J. Membr. Biol. 29:147-177
- ³¹ Cabantchik, Z.I., Greger, R., 1992
Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes.
Am. J. Physiol. 262:C803-22
- ³² Brahm, J., 1977
Temperature-dependent changes of chloride transport kinetics in human red cells.
J. Gen. Physiol. 70:283-306
- ³³ Ortwein, R., Oslender-Kohnen, A., Deuticke, B., 1994
Band 3 the anion exchanger of the erythrocyte membrane, is also a flippase.
Biochim. Biophys. Acta 1191(2):317-23
- ³⁴ Dalmark, M., 1975
Chloride and water distribution in human red cells.
J. Physiol. 250: 65-84
- ³⁵ Falke, J.J., Chan, S.I., 1986
Molecular mechanisms of band 3 inhibitors.
Biochemistry 25:7899-7906
- ³⁶ Tang, X., Casey, J.R., 1999
Trapping of inhibitor-induced conformational changes in the erythrocyte membrane anion exchanger AE1.
Biochemistry 38:14565-14572
- ³⁷ Cousin, J.L., Motais, R., 1979
Inhibition of anion permeability by amphiphilic compounds in human red cell: evidence for an interaction of niflumic acid with the band 3 protein.
J. Membr. Biol. 46:125-153
- ³⁸ Renner, M., Dietl, M., Schnell, K.F., 1988
Chloride mediated inhibition of the phosphate and the sulfate transport by dipyrindamole in human erythrocyte ghosts.
FEBS Lett. 238:77-81
- ³⁹ De Jong, K., Ott, P., 1993
Membrane phospholipid asymmetry in DMPC-induced human red cell vesicles.
FEBS Lett. 334:183-188
- ⁴⁰ Poser, B., Deuticke, B., 1999
Transbilayer flip-flop and steady-state distribution of dodecylsulfate (SDS) in the erythrocyte membrane: flip vs. flux.
Biol. Chem. 380:565
- ⁴¹ Isomaa, B., Hägerstrand, H., Paatero, G., 1987
Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 899:93-103
- ⁴² Deuticke, B., 2003
Persönliche Mitteilung

- ⁴³ Hoffman, J.F., Laris, P.C., 1992
Estimates of the electrical conductance of the red cell membrane.
Progress in cell research 2:173-178
- ⁴⁴ Donlon, J.A., Rothstein, A., 1969
The cation permeability of erythrocytes in low ionic strength media of various tonicities.
J. Membr. Biol. 1:37-52
- ⁴⁵ Bennekou, P., 1984
K⁺-valinomycin and chloride conductance of the human red cell membrane.
Biochim. Biophys. Acta 776:1-9
- ⁴⁶ Haest, C.W.M., Oslender, A., Kamp, D., 1997
Nonmediated flip-flop of anionic phospholipids and long-chain amphiphiles in the erythrocyte membrane depends on membrane potential.
Biochemistry 36:10885-10891
- ⁴⁷ Bisognano, J.D., Dix, J.A., Pratap, P.R., Novak, T.S., Freedman, J.C., 1993
Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic response of human red blood cells.
J. Gen. Physiol. 102:99-123
- ⁴⁸ Lew, V.L., Garcia-Sancho, J., 1989
Measurement and control of intracellular calcium in intact red cells.
Methods in enzymology 173:100-112
- ⁴⁹ Lew, V.L., Tsien, R.Y., Miner, C., Bookchin, R.M., 1982
Physiological [Ca²⁺]_i level and pump-leak turnover in intact red cells measured using an incorporated Ca²⁺ chelator.
Nature 298:478-81
- ⁵⁰ Schatzmann, H.J., 1966
ATP-dependent Ca⁺⁺-extrusion from human red cells.
Experientia 22:364-365
- ⁵¹ Reed, P.W., Lardy, H.A., 1972
A23187: A divalent cation ionophore.
J. Biol. Chem. 247:6970-6977
- ⁵² Erdahl, W.L., Chapman, C.J., Wang, E., Taylor, R.W., Pfeiffer, D.R., 1996
Ionophore 4-BrA23187 transports Zn²⁺ and Mn²⁺ with high selectivity over Ca²⁺.
Biochemistry 35:13817-13825
- ⁵³ Zhou, Q., Zhao, J., Stout, G., Luhm, R., Wiedmer, T., Sims, P., 1997
Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase.
J. Biol. Chem. 272:18240-18244
- ⁵⁴ Williamson, P., Kulick, A., Zachowski, A., Schlegel, R.A., Devaux, P.F., 1992
Ca²⁺ induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes.
Biochemistry 31: 6355-6360
- ⁵⁵ Bassé, F., Stout, J., Sims, P., Wiedmer, T., 1996
Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺-dependent transbilayer movement of phospholipid.
J. Biol. Chem. 271:17205-17210
- ⁵⁶ Simons, T.J., 1991
Calcium dependent zinc efflux in human red blood cells.
J. Membr. Biol. 123:73-82
- ⁵⁷ Simons, T.J., 1991
Intracellular free zinc and zinc buffering in human blood cells.
J. Membr. Biol. 123:63-71

- ⁵⁸ Lucaciu, C.M., Dragu, C., Copaescu, I., Marariu, V.V., 1997
Manganese transport through human erythrocyte membranes.
Biochim. Biophys. Acta 1328:90-98
- ⁵⁹ Kamp, D., Oslender, A., Haest, C.W.M., 2001
Nicht veröffentlichte Daten
- ⁶⁰ Jennings, M.L., Adams, M.F., 1981
Modification by papain of the structure and function of band 3, the erythrocyte anion transport protein.
Biochemistry 20:7118-7123
- ⁶¹ Ortwein, R., 1995
Mechanismen der Translokation langkettiger amphiphiler Anionen in biologischen Membranen.
Dissertation RWTH Aachen
- ⁶² Tocanne, J.F., Teissié, J., 1990
Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems.
Biochim. Biophys. Acta 1031:111-142
- ⁶³ Deuticke, B., 2003
Persönliche Mitteilung
- ⁶⁴ Eidelman, O., Cabantchik, Z.I., 1983
The mechanism of anion transport across human red blood cell membranes as revealed with a fluorescent substrate: Kinetic properties of NBD-taurine transfer in asymmetric conditions.
J. Membr. Biol. 71:141-148
- ⁶⁵ Gedde, M.M., Huestis, W., 1997
Membrane potential and human erythrocyte shape.
Biophys. J. 72:1220-1233
- ⁶⁶ Duhm, J., 1971
The effect of 2,3-DPG and other organic phosphates on the donnan equilibrium and the oxygen affinity of human blood
in: Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid base status, pp. 583-593
Alfred Benzon Symposium IV, Munksgaard, Copenhagen
- ⁶⁷ Vondenhoff, A., 1993
Mechanismen der Phospholipid-Translokation in der Erythrozytenmembran.
Dissertation RWTH Aachen
- ⁶⁸ Kamp, D., Sieberg, T., Haest, C.W.M., 2001
Inhibition and stimulation of phospholipid scrambling activity. Consequences for lipid asymmetry, echinocytosis, and microvesiculation of erythrocytes
Biochemistry 40:9438-9446
- ⁶⁹ Henseleit, U., 1993
Effekte von Calcium und anderer zweiwertiger Kationen auf die transversale Beweglichkeit von Lipiden in der menschlichen Erythrozytenmembran.
Dissertation RWTH Aachen
- ⁷⁰ Puskin, J., Martin, T., 1979
Divalent cation binding to phospholipid vesicles. Dependence on temperature and lipid fluidity.
Biochim. Biophys. Acta 552:53-65

Appendix

Synthese der Fluoreszenz-Sonde 10-(Naphth-1-yl)-1-decanphosphonat (NDP₂); Dinatriumsalz*

500 mg Naphthyldecanol werden unter Argon in einem ausgeheizten Schlenkkolben mit Innenthermometer vorgelegt, anschließend in 20 ml wasserfreiem Methylenchlorid gelöst und mittels eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. Danach werden innerhalb 20 min 2 ml einer 0,967 M Phosphortribromidlösung, die durch Lösen von 1 ml Phosphortribromid in 10 ml wasserfreiem Methylenchlorid hergestellt wurde, zugetropft. Nach langsamen Erwärmen der Reaktionslösung im Eisbad auf RT und weiteren 15 h Rühren bei RT wird diese vorsichtig in einem Scheidetrichter auf Eiswasser gegossen. Die organische Phase wird mit Ether verdünnt. Anschließend wird Natriumchloridlösung zur besseren Phasentrennung zugegeben und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird dreimal im Ether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Membranpumpenvakuum eingeengt. Da ein DC neben einem neuen, unpolaren Produkt auch noch unumgesetzten Alkohol anzeigt, wird der ölige Rückstand erst mit n-Hexan 1:20 zur Abtrennung des Bromids und anschließend zur Isolierung des Eduktes mit n-Hexan 1:1 an Kieselgel chromatographiert. Es werden 361 mg Bromid, das nach Gaschromatographie (GC) eine Reinheit von 94,9 % aufweist, und 67 mg 10-(naphth-1-yl)-1-decanol mit einer Reinheit von 85,6% nach GC isoliert. Das Bromid wird ein weiteres mal an Kieselgel mit n-Hexan chromatographiert, wobei 333 mg 10-(Naphth-1-yl)-1-brom-decan mit einer Ausbeute von 54,5% und einer Reinheit von 96,2% nach GC in Form eines kristallisierenden Öles gewonnen werden.

In einem ausgeheizten Schlenkkolben werden unter Argon 49 mg Natrium in kleinen Stücken vorgelegt und anschließend 5 ml wasserfreies n-Hexan zugegeben. Unter vorsichtigem Erwärmen werden innerhalb 15 min 0,42 ml Dibutylphosphit zugetropft, wobei sofort heftige H₂-Entwicklung eintritt. Danach wird die Reaktionslösung solange unter Rückfluß erhitzt bis das Natrium vollständig abreagiert hat, was in der Regel ca. 1 bis 1,5 h dauert. Nach Entfernen des Ölbad werden zu der noch warmen Reaktionslösung 740 mg 10-(Naphth-1-yl)-1-brom-decan gelöst in 20 ml wasserfreiem n-Hexan, innerhalb 30 min getropft.

* Synthesevorschrift von Dr. E. Bremen ausgearbeitet

Anschließend wird die Lösung wieder unter Rückfluß erhitzt, wobei diese bereits nach 10 min durch ausfallendes Natriumbromid, welches bei der Reaktion des Natriumdibutylphosphits mit dem Bromid entsteht, leicht trüb wird. Nach 24 h unter Rückfluß und anschließendem Abkühlen auf RT wird die milchige Reaktionslösung mit 30 ml Wasser hydrolysiert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird dreimal mit Ether unter Zugabe von Natriumchloridlösung zur besseren Phasentrennung extrahiert. Ein DC zeigt neben einem neuen Produkt auch noch nicht umgesetztes Bromid und Dibutylphosphit. Die vereinigten organischen Phasen werden daher zweimal intensiv mit konzentrierter Natronlauge zur Abtrennung des nicht umgesetzten Dibutylphosphits extrahiert und dann einmal mit Wasser gewaschen. Eine GC-Kontrolle zeigt, dass das gesamte Dibutylphosphit so entfernt werden konnte. Nach Trocknen der organischen Phase mit Magnesiumsulfat und Einengen im Membranpumpenvakuum wird eine Säulenchromatographie an Kieselgel mit n-Pentan 1:20 zur Abtrennung des Bromids und anschließend mit n-Pentan 1:1 zur Isolierung des Phosphonats durchgeführt. Dabei werden 140 mg Bromid, das sind 19 % der eingesetzten Menge, in einer GC-Reinheit von 100 % zurückgewonnen, sowie 781 mg des öligen 10-(Napht-1-yl)-1-decanphosphonsäuredibutylesters mit einer Ausbeute von 80% und einer GC-Reinheit von 98% isoliert.

647mg (1.40 mmol) 10-(Napht-1-yl)-1-decanphosphonsäuredibutylester werden zusammen mit 421 mg (2.81 mmol) wasserfreiem Natriumjodid in einem ausgeheizten Schlenkkolben unter Argon vorgelegt und in 5 ml Acetonitril gelöst. Zu der gelben Lösung werden bei RT innerhalb 5 min 0.36 ml (2.81 mmol) Trimethylsilylchlorid getropft, wobei sofort entstehendes Natriumchlorid ausfällt. Anschließend wird die Reaktionslösung 1.5 h im Ölbad auf ca. 35 bis 40 °C erwärmt. Zur Abtrennung des Natriumchlorids wird nach Abkühlen auf RT die Mischung filtriert und der NaCl-Niederschlag mehrmals mit wasserfreiem Ether gewaschen. Ein DC (n-Pentan 1:1) zeigt den vollständigen Umsatz des Dibutylphosphonats. Nach Einengen des gelben Filtrats wird das verbleibende Öl kurz (ca. 10 min.) im Membranpumpenvakuum getrocknet und danach in 20 ml Wasser aufgeschlämmt, wobei sich sofort ein feiner weißer Niederschlag bildet. Die wässrige Suspension wird 45 min. bei RT gerührt (Schaumbildung!) und anschließend mit 2 ml verdünnter Natriumthiosulfatlösung zur Zerstörung von elementarem Jod versetzt. Danach wird mit verdünnter (ca. 0.1 m) HCl solange angesäuert, bis ungefähr ein pH-Wert von 2 bis 3 erreicht ist. Die so erhaltene wässrige milchige Phase wird fünfmal mit Ether

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Magnesiumsulfat getrocknet, im Rotationsverdampfer eingedunstet und der verbleibende Rückstand in eine Methanol/Ether-Gemisch umkristallisiert. Es werden 362 mg (1.03 mmol) Phosphonsäure, die nach ¹H-NMR eine Reinheit von ≥ 98 % aufweist, entsprechend einer 74 %igen Ausbeute, erhalten (Smp. 105 °C).

Curriculum vitae

Name, Vorname	Sieberg, Thorsten Oliver
Wohnort	Am Römerhof 34, 52066 Aachen
Telefon	0049-241-44845
Geburtsdatum	26.10.1971
Geburtsort	Aachen
Familienstand	verheiratet, 2 Söhne
Nationalität	deutsch
Ausbildung und Abschlüsse	
1982 - 1991	Couven-Gymnasium, Abitur, Allgemeine Hochschulreife
1991 - 1992	Wehrdienst, Mayen / Koblenz
1993 - 1994	Staatl. anerkannte Massageschule Landesbad Aachen
1994 – 1996	Staatl. anerkannte Lehranstalt für Krankengymnastik an der medizinischen Fakultät der RWTH Aachen
1996 - 2003	Studium der Human-Medizin an der RWTH Aachen
	<u>Praktisches Jahr :</u>
	Internistisches Tertial: Marienhospital Aachen
	Chirurgisches Tertial: Centre hospitalier universitaire vaudois, Lausanne (Erasmus)
	Wahl-Tertial (Radiologie): Marienhospital Aachen
2003-2004	AiP, Marienhospital Aachen , Medizinische Klinik
10/2004	Approbation
2004-2007	Assistenzarzt in der Klinik für diagnostische Radiologie und Nuklearmedizin am Medizinischen Zentrum Kreis Aachen

Aachen, 25.02.2007