

Untersuchungen zur stationären und dynamischen H^+ -Pufferkapazität in *Xenopus* Oozyten

vom Fachbereich Biologie
der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Michael Dietrich

Wissenschaftliche Aussprache:
Kaiserslautern, den 05.09.2014

Vorsitz: Prof. Dr. Stefan Kins
Betreuer: Prof. Dr. Joachim W. Deitmer
Korreferent: Prof. Dr. Rolf Diller

Kaiserslautern, 2014

D 386

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Joachim W. Deitmer für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Rolf Diller möchte ich für die Bereitschaft danken die Zweitkorrektur meiner Arbeit zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Stefan Kins danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Frau Dr. Nanette Messemer und Herrn Dr. Michael Klier möchte ich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit danken. Herrn Dr. Michael Klier möchte außerdem für die vielen Diskussionen während unser gemeinsamen Zeit in der Arbeitsgruppe danken.

Dr. Jan Hauth danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft bei der Lösung mathematischer Probleme bei der Definition der dynamischen Pufferung, sowie die Mitarbeit bei der Erstellung des R-Codes für die *in silico* Experimente. Des weiteren möchte ich ihm für die vielen fruchtbaren Diskussionen rund um das Thema Pufferung danken.

Herrn Hans-Peter Schneider, Frau Sandra Bergstein und Frau Renate Feth danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Behebung technischer und organisatorischer Probleme.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen für Allgemeine Zoologie und Zoologie/Membrantransport für das gute Arbeitsklima.

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern und Großeltern bedanken.

Die eingereichte Dissertation „Untersuchungen zur stationären und dynamischen H⁺-Pufferkapazität in *Xenopus* Oozyten“ wurde von mir selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt.

Michael Dietrich

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. pH-beeinflusste zelluläre Prozesse und Funktionen	1
1.2. pH-Homöostase	2
1.2.1. Pufferung	3
1.2.1.1. Intrinsische Pufferung	5
1.2.1.2. Das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem	6
1.2.2. Carboanhydrase	8
1.2.3. Säure/Base Transport	10
1.3. Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Verwendete Lösungen	12
2.2. <i>Xenopus laevis</i> als Labortier	13
2.2.1. Die Oozyten des <i>Xenopus laevis</i>	13
2.2.1.1. Entnahme der Oozyten	14
2.2.1.2. Vereinzelung und Selektion der Oozyten	15
2.3. Heterologe Proteinexpression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	15
2.3.1. Herstellung der cRNS	17
2.3.1.1. Amplifikation der Expressionskonstrukte	17
2.3.1.2. Isolation der Plasmid-DNS	17
2.3.1.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNS	17
2.3.1.4. Linearisierung der Plasmid-DNS	18
2.3.1.5. <i>in vitro</i> Transkription	18
2.3.2. Expression der cRNS	19
2.4. Elektrophysiologische pH Messungen	19
2.4.1. pH-sensitive Mikroelektroden	20
2.4.2. Aufbau des Messplatzes	22

2.4.3.	Elektrophoretische H^+/OH^- -Injektion	23
2.4.4.	Versuchsdurchführung	25
2.5.	Optische pH-Messungen	26
2.5.1.	Beladung mit BCECF-AM	26
2.5.2.	2-Photonen-Mikroskopie	26
2.5.3.	Verwendetes System	28
2.6.	Massenspektrometrie	28
2.7.	Auswertung & Statistik	30
2.7.1.	Auswertung von ΔpH_i und $\Delta pH_i/\Delta t$	30
2.7.2.	Berechnung der Pufferkapazität β	30
2.7.3.	Auswertung der Verzögerung δ	31
2.7.4.	Statistik und graphische Darstellung	32
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Warum pH und nicht $[H^+]$	33
3.1.1.	Messtechnik	33
3.1.1.1.	Normalverteilung und Log-Normalverteilung (arithmetisches und geometrisches Mittel)	34
3.1.2.	Lineares Verhalten	35
3.2.	CO_2 -Sensitivität	37
3.3.	Charakterisierung des intrinsischen Puffersystems der Oozyte	37
3.4.	Globale Ansäuerung über die Zellmembran	40
3.4.1.	In 5% $CO_2/25$ mM HCO_3^-	40
3.4.2.	In 2% $CO_2/10$ mM HCO_3^-	47
3.4.3.	Optische pH-Messung	53
3.4.3.1.	Aktivitätsbestimmung von CAII in Albino-Oozyten	53
3.4.3.2.	2-Photonen-Mikroskopie	54
3.5.	Ansäuerung über eine Punktquelle	58
3.5.1.	In 5% $CO_2/25$ mM HCO_3^-	58
3.5.1.1.	Kleine Distanz zwischen pH- und HCl/NaOH-Elektrode	65
3.5.2.	In 2% $CO_2/10$ mM HCO_3^-	70
3.5.2.1.	Fester Abstand zwischen HCl- und pH-Elektrode	71
3.6.	Dynamische Pufferung	73
3.6.1.	Die Dynamik des Puffersystems	80

3.7. In silico Experimente	80
3.7.1. Dynamische Pufferung	81
4. Diskussion	85
4.1. Warum der pH der $[H^+]$ vorzuziehen ist	85
4.1.1. Bedeutung für die Pufferkapazität	86
4.1.2. Bedeutung für die Darstellung anderer Ionenkonzentrationen	88
4.2. CO_2 -Sensitivität und ihr Einfluss auf die durchgeführten Versuche	89
4.3. H^+ -Pufferung	90
4.3.1. Das intrinsische Puffersystem der Oozyte	90
4.3.2. Das CO_2/HCO_3^- -Puffersystem	91
4.3.3. Apparente H^+ -Mobilität	93
4.3.4. Mikrodomänen	97
4.4. Dynamische Pufferung	99
4.4.1. Experimentelle Motivation	99
4.4.2. Theorie	100
4.4.2.1. Experimentelle Vorteile der neuen Beschreibung	101
4.5. H^+ als physiologisches Signalmolekül	101
4.5.1. Interaktion mit Ca^{2+}	102
4.5.2. G-Proteine	104
4.5.3. Neuronale Aktivität	105
4.5.3.1. Synaptische Transmission	105
4.5.4. Unterscheidung von respiratorischer und metabolischer Azidose	106
4.5.5. Homöostase oder Signal	107
5. Zusammenfassung	108
Literaturverzeichnis	109
A. Anhang	118
A.1. R-Code für die simulative Bestimmung der dynamischen Pufferung	118
A.1.1. quasi-statische und dynamische Pufferung	118
A.1.1.1. buffer.r	118
A.1.1.2. simbuffer.r	120
A.2. Berechnung des Fluxes zur Entstehung einer Mikrodomäne	127

Abbildungsverzeichnis

1.1. Titrationskurve	4
1.2. Intrinsische Pufferkapazität	6
1.3. CO ₂ - und totale Pufferkapazität	7
1.4. Struktur der humanen CAII	9
2.1. Heterologe Proteinexpression in <i>X. laevis</i> Oozyten	16
2.2. pH-sensitive Mikroelektrode	21
2.3. Schematischer Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes	23
2.4. Elektrophoretische Injektion von H ⁺ und OH ⁻	24
2.5. Vereinfachtes Jablonski Diagramm einer 1- und 2-Photonen-Anregung	27
2.6. Messprinzip der massenspektrometrischen Aktivitätsbestimmung	29
2.7. Auswertung von ΔpH_i und $\Delta\text{pH}_i/\Delta t$	30
2.8. Auswertung der Verzögerung δ	31
3.1. Normalverteilung und log-Normalverteilung	34
3.2. Mischen einer HEPES gepufferten Lösung (pH 8,0) und einer MES gepufferten Lösung (pH 6,0).	36
3.3. CO ₂ -Sensitivität der pH-sensitiven Mikroelektrode	38
3.4. Charakterisierung des intrinsischen Puffersystems der Oozyte.	39
3.5. Globale Ansäuerung (pH) durch Butyrat in CO ₂ -freier und in 5%CO ₂ /25 mM HCO ₃ ⁻ Lösung.	41
3.6. Globale Ansäuerung ($[\text{H}^+]_i$) durch Butyrat in CO ₂ -freier und in 5%CO ₂ /25 mM HCO ₃ ⁻ Lösung.	44
3.7. Pufferkapazitäten in 5%CO ₂ /25 mM HCO ₃ ⁻	46
3.8. Globale Ansäuerung (pH) durch Butyrat in CO ₂ -freier und in 2%CO ₂ /10 mM HCO ₃ ⁻ Lösung.	48
3.9. Globale Ansäuerung ($[\text{H}^+]_i$) durch Butyrat in CO ₂ -freier und in 2%CO ₂ /10 mM HCO ₃ ⁻ Lösung.	50
3.10. Pufferkapazitäten in 5%CO ₂ /25 mM HCO ₃ ⁻	52

3.11. Massenspektrometrischer Vergleich der CAII-Aktivität in pigmentierten und Albino-Oozyten	55
3.12. Originalregistrierung der optischen pH-Messung	56
3.13. Statistik der optischen pH-Messungen	57
3.14. Originalregistrierung des pH_i bei Injektion von H^+/OH^- in Ab- und Anwesenheit von 5% $\text{CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$	59
3.15. Änderung des pH_i durch Injektion von H^+/OH^- und Applikation von 5% $\text{CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$	60
3.16. Änderungsrate des pH_i durch Injektion von H^+/OH^- und Applikation von 5% $\text{CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$	62
3.17. Pufferkapazitäten bestimmt durch Injektion von H^+ in 5% $\text{CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$	63
3.18. Verzögerung (δ) zwischen dem Start der H^+/OH^- -Injektion und dem Beginn der Änderung des pH	65
3.19. Originalregistrierung des pH_i einer nativen Oozyte nahe der HCl/NaOH-Elektrode	66
3.20. Amplituden und Änderungsraten nativer Oozyten detektiert nahe der HCl/NaOH-Elektrode	68
3.21. Abklingverhalten der transienten Ansäuerung bzw. Alkalinisierung nativer Oozyten	69
3.22. Originalregistrierung des pH_i bei Injektion von H^+/OH^- in Ab- und Anwesenheit von 2% $\text{CO}_2/10 \text{ mM HCO}_3^-$	70
3.23. Änderungsrate und Verzögerung (δ) des pH_i durch Injektion von H^+/OH^- in Ab- und Anwesenheit von 2% $\text{CO}_2/10 \text{ mM HCO}_3^-$	72
3.24. Verzögerung (δ) zwischen dem Start der H^+ -Injektion und dem Beginn der Änderung des pH in 2% $\text{CO}_2/10 \text{ mM HCO}_3^-$ mit festem Elektrodenabstand	73
3.25. Theorie der dynamischen Pufferung	76
3.26. Offene und geschlossene Puffersysteme	78
3.27. Simulation der dynamischen Pufferung in einer Oozyte	82
3.28. Änderungsrate des simulierten pH_i	83
3.29. Dynamik der durchgeführten Simulation	84
4.1. Signal-Schema	103
4.2. Ca^{2+} -Transport entlang es H^+ -Gradienten	104

Tabellenverzeichnis

2.1. Calcium freie Ringerlösung $\text{OR}2^-$	12
2.2. Calcium freie Ringerlösung $\text{OR}2^+$	12
2.3. LB-Medium für die Anzucht von <i>E. coli</i>	13
3.1. pH-Werte und $[H^+]$ von Oozyten in Ruhe.	35
3.2. Zusammenfassung der Annahmen für das jeweilige Puffersystem	79
3.3. Parameter für die zeitliche Simulation des pH_i	81

Abkürzungsverzeichnis

AD-DA	Analog Digital - Digital Analog
AE	Anionen-Austauscher (<i>anion exchanger</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BCECF	2,7-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(6)-carboxyfluoreszein
BCECF-AM	BCECF-Essigsäuremethylester
bla	β-Laktamase
CA	Carboanhydrase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EZA	6-Ethoxy-2-Benzothiazolsulfonamid
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HEK-Zellen	menschliche embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
K _s	Säurekonstante
MCT	Monokarboxylattransporter
n	Anzahl
NBC	Natrium-Bikarbonat-Kotransporter
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
n.s.	nicht signifikant
OR2 ^{+/-}	Oozytenringer mit / ohne Calcium
pK _s	-log ₁₀ K _s
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (<i>two electrode voltage clamp</i>)
UTR	Untranslatierter Bereich (<i>untranslated region</i>)

1. Einleitung

Eine grundlegende Fähigkeit von Zellen ist die Eigenschaft den Stoffaustausch mit der Umgebung zu steuern. Dies wird durch eine selektiv permeable Membran erreicht, die alle Zellen umgibt – die Zellmembran. Nicht nur der Stoffaustausch mit der Umgebung muss von der Zelle kontrolliert werden, auch innerhalb der (eukaryontischen) Zelle finden sich Membranen zur Abgrenzung verschiedenster Reaktionsräume (Organellen). Jede dieser Organellen ist jeweils durch eine Membran vom Cytoplasma isoliert und kann so spezifische Funktionen übernehmen. Durch die Abgrenzung der verschiedenen Kompartimente herrschen in jedem Kompartiment definierte Bedingungen, so dass eine bestmögliche Umsetzung der jeweiligen Funktion gegeben ist.

Protonen (H^+ -Ionen) spielen bei der Aufrechterhaltung dieser Bedingungen eine Schlüsselrolle, da sie die reaktivsten Ionen sind und somit eine Reihe an Prozessen beeinflussen können. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts war es eine „wohl bekannte Tatsache“, dass die H^+ -Ionenkonzentration ($[H^+]$) einen Einfluss auf die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen hat (Sørensen, 1909). Im Laufe der letzten 100 Jahre wurden eine Vielzahl an zellulären Prozessen identifiziert, die von der $[H^+]$ beeinflusst werden. So sind nahezu alle Proteine in ihrer Struktur und damit auch ihrer Funktion abhängig vom pH-Wert, da der pH-Wert den Protonierungs-/Deprotonierungs-Status der Proteine beeinflusst und damit auch die Ladung der innerhalb Proteine. Darüber hinaus spielt der interkompartimentäre H^+ -Gradient bei der Bildung und Umwandlung von zellulärer Energie eine wichtige Rolle (Casey *et al.*, 2010; Isom *et al.*, 2013; Whitten *et al.*, 2005).

1.1. pH-beeinflusste zelluläre Prozesse und Funktionen

Jedes Protein kann Protonen binden und abgeben, aber nur bei ein paar Proteinen ist die Funktion pH-abhängig (im physiologischen Bereich zwischen 6 und 8). Dafür sind Aminosäure-Seitenketten mit einem pK_s innerhalb des physiologischen pHs notwendig, damit Änderung des pH-Wertes auch einen möglichst großen Effekt auf den

Protonierungs-Status und damit auf die Ladungsverteilung und letztlich auf die Struktur des Proteins haben. So haben Isom *et al.* (2013) in ihrer Studie herausgefunden, dass nur etwa 10% der knapp 12.000 von ihnen mit einem Algorithmus (pHinder) untersuchten Proteinen auf Grund ihrer Struktur auch als pH-Sensor dienen können. So waren z.B. 96% der $G\alpha$ Strukturen von G-Proteinen sensitiv für Änderungen im physiologischen pH-Bereich.

Der wohl bekannteste pH-Sensor ist Hämoglobin, so moduliert der pH die Bindungsaffinität des Hämoglobin zu Sauerstoff (Bohr-Effekt) und macht so erst einen gezielten Gasaustausch in den Lungenbläschen und in O_2 -verbrauchendem Gewebe möglich (Perutz, 1978). Auch der zelluläre Metabolismus ist sensitiv gegenüber Änderungen des pH_i . Durch die Entstehung von H^+ bei der Hydrolyse von ATP ist die Gesamtreaktion pH-abhängig, womit der gesamte zelluläre oxidative Metabolismus pH-abhängig ist (Busa & Nuccitelli, 1984). Zusätzlich sind Enzyme der Glykolyse pH-sensitiv, wie z.B. die Phosphorylase (Stubbs & Blanchaer, 1965; Danforth, 1965). In Muskelzellen führt die erhöhte Aktivität so zu einer Ansäuerung, welche der Hauptgrund für die reduzierte Kontraktionskraft der Muskelzelle ist (Nosek *et al.*, 1987).

Durch Änderung des pH_i können nicht nur Enzyme und Reaktionen beeinflusst werden, auch andere intrazelluläre Ionenkonzentration wie z.B. Calcium oder *second messenger* wie cAMP werden direkt oder indirekt beeinflusst. Dies geschieht zum Beispiel über eine Modulation der Ca^{2+} -Affinität von Calmodulin oder auch über die Freisetzung von Ca^{2+} aus zellulären Speichern. (Brokaw, 1987; Speake & Elliott, 1998; Busa & Nuccitelli, 1984).

Aber nicht nur zelluläre Funktionen benötigen eine Regulation des pH_i , auch Zell-Zell-Kontakte über *gap junctions* sind pH-sensitiv und damit auch die Kommunikation zwischen Zellen (Peracchia & Peracchia, 1978).

Aufgrund der herausragenden Bedeutung für zahlreiche zelluläre Funktionen, muss der intrazelluläre pH-Wert in engen Grenzen reguliert werden. Welche Prozesse daran beteiligt sind, soll im folgenden betrachtet werden.

1.2. pH-Homöostase

Das Konzept des pHs, also die $[H^+]$ als negativen dekadischen Logarithmus anzugeben ($pH = -\log_{10}[H^+]$), wurde zu erst von Søren Peter Lauritz Sørensen 1909 eingeführt (Sørensen, 1909). Für eine Verwendung des pH an Stelle der $[H^+]$ sprach für Sørensen zum Einen der große Bereich der $[H^+]$ von wenigen pM ($1 \text{ pM} \hat{=} \text{pH } 12$) bis zu 1 M (pH 0) und zum Anderen seine Erkenntnis, dass die von ihm gemessenen Enzymaktivi-

täten von den relativen und nicht der absoluten Änderung der $[H^+]$ abhängen (Sørensen, 1909). Das bedeutet, dass z.B. eine Verdopplung der Konzentration immer den gleichen Effekt hat, unabhängig davon bei welcher Ausgangskonzentration sie stattfindet. Eine Verdopplung entspricht immer einer Verringerung des pH-Wertes um 0,3. In Konzentrationen ausgedrückt ist eine Verdopplung jedoch immer abhängig vom Ausgangswert, eine Änderung von 1 auf 2 nM (von pH 9 zu pH 8,7; $\Delta[H^+]=1$ nM) und eine Änderung von 100 auf 200 nM (von pH 7 zu pH 6,7; $\Delta[H^+]=100$ nM) unterscheiden sich um den Faktor 100 bei der Änderung der $[H^+]$. Das bedeutet, dass sich bei geringen Konzentrationen bereits geringe Änderungen (absolute Skala) stark auswirken, während bei hohen Konzentrationen auch große Änderungen nötig sind. Dieser Sachverhalt wird durch die relative pH-Skala berücksichtigt. Alles in allem erscheint es durchaus sinnvoll zu sein, den pH statt der $[H^+]$ als Maßeinheit zu verwenden. Auf diesen Sachverhalt wird in Abschnitt 3.1 noch näher eingegangen.

Bei der zellulären pH-Homöostase muss man zwischen der kurz- und der langfristigen Regulation unterscheiden. Für die pH-Homöostase gibt es zwei unterschiedliche Mechanismen, das physikochemische Binden und damit Inaktivieren von H^+ -Ionen sowie den Transport von Säure/Base-Äquivalenten in die bzw. aus der Zelle. Ersteres wird auch als Pufferung bezeichnet und dient der schnellen Regulation, während der Transport von Säure/Base-Äquivalenten der langfristigen Homöostase des pH dient. Hauptsächlich zwei Gründe machen eine Regulation des pH notwendig. Zum Einen ist das das negative Membranpotential, was zu einem einwärtsgerichteten elektrischen Gradienten für H^+ führt und zum Anderen die stetige Produktion von H^+ bei diversen metabolischen Prozessen, wie z.B. der Hydrolyse von ATP (Casey *et al.*, 2010; Deitmer, 2007).

1.2.1. Pufferung

Bereits Sørensen befürwortete den Einsatz von „Puffern“ bei enzymatischen Reaktionen, um die $[H^+]$ konstant zu halten, in seinem wegweisenden Artikel in der Biochemischen Zeitschrift von 1909. 1900 beobachteten Fernbach und Hubert, dass die Anwesenheit eines Gemisches aus primären und sekundären Phosphaten verhindert, dass sich die Bedingungen für die enzymatische Proteolyse von Malz vom Optimum entfernen (Fernbach & Hubert, 1900). Die erste allgemeine theoretische Beschreibung der Pufferung lieferten dann einige Jahre später unabhängig von einander Koppel & Spiro (1914) und Slyke (1922). Bis dahin gab es zwar aus der Erfahrung der Wissenschaftler heraus „gute“ und auch „schlechte“ Puffer, aber ein quantitatives Maß für die Pufferung fehlte.

Betrachtet man die Titrationskurve eines beliebigen protonier- und deprotonierbaren Stoffes in wässriger Lösung, so fällt einem auf, dass immer gleiche Stoffmengen an Hydroxidionen nicht immer die gleiche Änderung des pH bewirken (Abbildung 1.1). Die hier berechnete Kurve bezieht sich auf einen Stoff mit einem pK von 7. Im Bereich um $\text{pH}=\text{pK}=7$ ist die Änderung des pH am kleinsten, d.h. die Ableitung $\frac{d\text{pH}}{dB}$ hat hier ein Minimum, wobei dB die infinitesimal kleine Änderung der zugegebenen Base B (OH^-) ist. Der pH ändert sich in diesem Bereich demnach in wesentlich geringerem Maß als es durch die Zugabe von OH^- theoretisch passieren sollte.

Diese Dämpfung der pH-Änderung wird als Pufferung bezeichnet. In beiden Veröffentlichungen wurde die Stärke der Pufferung (Pufferkapazität β) als inverse Ableitung (Differentialquotient) der Titrationskurve definiert, $\beta = \left(\frac{d\text{pH}}{dB}\right)^{-1} = \frac{dB}{d\text{pH}} = -\frac{dS}{d\text{pH}}$. Die Pufferkapazität ist somit am größten wenn die Titrationskurve am flachsten ist. Dieses Verhältnis ist größer wenn eine Lösung Puffer enthält im Vergleich zu einer Lösung ohne Puffer.

In vielen Lehrbüchern, aber auch Veröffentlichungen, ist der Differentialquotient achtlos durch den Differenzenquotient ersetzt worden und die Änderung des pH auf eine Einheit gesetzt worden (Goldsmith & Hilton, 1992; Slyke, 1922; Deitmer, 2007; Klinke & Silbernagl, 2003). Das ist aber nur richtig unter der Annahme, dass die Pufferkapazität konstant ist, was allerdings eine rein theoretische Annahme ist und praktisch nicht vorkommt. Insofern ist bereits die IUPAC Definition dahingehend irreführend, dass sie diese Annahme nicht explizit in der Definition nennt:

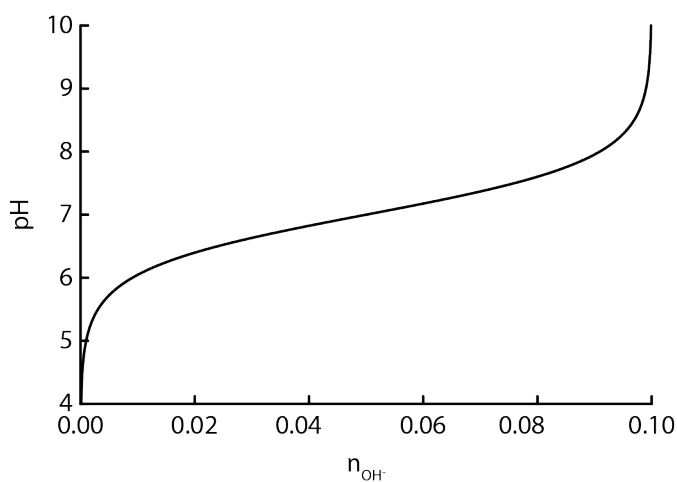


Abbildung 1.1.: Titrationskurve. Die Abbildung zeigt die berechnete Titrationskurve eines Stoffes mit pK 7, einer Konzentration von 0,1 M in einem Volumen von einem Liter. Titriert wurde mit 0,1 M NaOH. Bei $\text{pH}=\text{pK}=7$ weist die Kurve die geringste Steigung auf.

Buffer capacity or buffer index. *The capacity of a solution to resist changes in pH on addition of acid or base, which may be expressed numerically as the number of moles of strong acid or strong base required to change the pH by one unit when added to one litre of the specified buffer solution.*

Auch über einen Bereich von einer pH-Einheit ist die Pufferkapazität nicht konstant, auch nicht in Puffergemischen wie z.B. dem Blut. Der Bezug auf eine ganze pH-Einheit entspricht demzufolge nicht exakt der Definition und kann so zu Missverständnissen und Missinterpretationen führen.

Ein tief gehendes Verständnis der intrazellulären pH-Pufferung ist jedoch die Grundlage zum Verständnis aller weiteren pH-Regulation in der Zelle. Die Pufferkapazität der Zelle setzt sich aus zwei verschiedenen Puffersystemen zusammen, der intrinsischen und der $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ Pufferung.

1.2.1.1. Intrinsische Pufferung

Unter dem Begriff der intrinsischen Puffer werden definitionsgemäß alle Puffer zusammengefasst außer dem $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffer, d.h. alle Moleküle innerhalb einer Zelle, die H^+ binden/freisetzen können. Da die Puffermoleküle die Zelle weder verlassen noch neue in die Zelle kommen können, ist das intrinsische Puffersystem ein geschlossenes System. Die Synthese bzw. der Abbau von Proteinen kann zwar die Konzentration an Puffermolekülen verändern und damit auch die Pufferkapazität, sie sind aber sehr langsame Prozesse im Gegensatz zur Pufferung selbst, so dass die Pufferkonzentration als konstant angenommen werden kann. Für diesen Fall lässt sich folgende chemische Reaktion aufstellen: $\text{HB} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{B}^-$ mit $[\text{HB}] + [\text{B}^-] = \text{B}_{\text{tot}} = \text{const.}$ Die undissoziierte Säure HB dissoziiert zu Protonen und der korrespondierenden Base B^- . Das Dissoziationsgleichgewicht des Säure/Base-Paars lässt sich mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung beschreiben, $K_s = \frac{[\text{H}^+][\text{B}^-]}{[\text{HB}]}$, wobei K_s die Säurekonstante ist. Formt man diese Gleichung nach $[\text{B}^-]$ um und leitet diesen Term nach dem pH ab, erhält man die Pufferkapazität einer monoprotolytischen schwachen Säure: $\beta_i = \frac{\ln 10 \cdot \text{B}_{\text{tot}} \cdot 10^{\text{pH} - \text{pK}_s}}{(1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_s})^2}$. Besteht eine Lösung aus mehreren monoprotolytischen Säuren (mit verschiedenen pK-Werten), so müssen die einzelnen Pufferkapazitäten β_i aufaddiert werden: $\beta_{\text{gesamt}} = \sum_{i=1}^n \beta_i$. Das gilt auch für Puffer mit mehreren Bindungsstellen mit jeweils unterschiedlichen pK-Werten, wie z.B. Aminosäuren mit einer Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$) und einer Aminogruppe ($-\text{NH}_2$).

Der Verlauf der Pufferkapazität eines monoprotolytischen Säure/Base-Paars ist in Abbildung 1.2 exemplarisch dargestellt. So zeigt die Pufferkapazität eines geschlossenen Systems einen glockenförmigen Verlauf mit einem Maximum bei $\text{pH} = \text{pK}$. Die Maximale

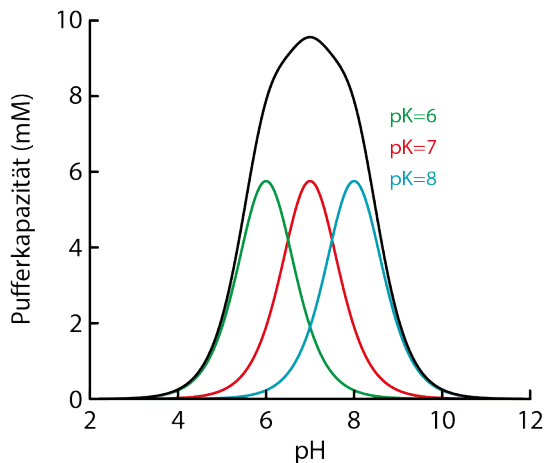


Abbildung 1.2.: Intrinsische Pufferkapazität. Die Abbildung zeigt den Verlauf der Pufferkapazität für drei verschiedene Säure/Base-Paare mit jeweils gleicher Gesamtkonzentration, aber verschiedenen pK-Werten; pK 6 (grün), pK 7 (rot), pK 8 (Cyan). In Schwarz ist die Pufferkapazität einer Lösung mit einem Gemisch der drei Säure/Base-Paare dargestellt.

Pufferkapazität beträgt an diesem Punkt $\frac{\ln 10}{4} \cdot B_{\text{tot}} \approx 0,58 \cdot B_{\text{tot}}$, d.h. bei den Kurven aus Abbildung 1.2 5,8 mM, da die Gesamtkonzentration jeweils 10 mM beträgt. Die Pufferkapazität des Puffergemisches (Abbildung 1.2 schwarze Kurve) wird durch Addition der Pufferkapazitäten der drei verschiedenen Puffer (Rot, Grün und Cyan) gewonnen. Das Puffergemisch kann so in einem breiteren pH-Bereich effektiver puffern, als es die einzelnen Komponenten allein könnten. Auch in der Zelle besteht das intrinsische Puffersystem aus vielen verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen pK_s-Werten und unterschiedlichen Konzentrationen. Eine Übersicht der wichtigsten Puffermoleküle und deren Konzentration sowie deren pK_s ist bei Vaughan-Jones *et al.* (2002) aufgelistet. Hier sind hauptsächlich Phosphatreste (pK_s ≈ 6,9) und Carnosin und seine Derivate (pK_s = 6,7-7,0) zu nennen, da bei ihnen der pK_s-Wert in der Nähe des physiologischen pHs liegt und ihre Konzentration im mM-Bereich liegt und damit einen nennenswerten Beitrag zur Pufferung im physiologischen pH-Bereich liefern können.

1.2.1.2. Das CO₂/HCO₃⁻-Puffersystem

Im Gegensatz zum intrinsischen Puffersystem ist das CO₂/HCO₃⁻-Puffersystem ein offenes System, da das CO₂ frei über die Membranen diffundieren kann. Würde das CO₂/HCO₃⁻-Puffersystem ebenfalls geschlossen sein, d.h. $[\text{CO}_2] + [\text{HCO}_3^-] = \text{const}$ wäre, so hätte das CO₂/HCO₃⁻-Puffersystem nur einen sehr kleinen Beitrag zur Pufferung von ca. 2,2 mM bei pH 7,2. Durch die hohe Permeabilität von CO₂ für die meisten Mem-

branen ist jedoch nur $[\text{CO}_2]$ konstant, so dass sich durch Ableiten der $[\text{HCO}_3^-]$ nach dem pH für die Pufferkapazität folgender Term ergibt: $\beta_{\text{CO}_2} = \ln 10 \cdot [\text{HCO}_3^-] = \ln 10 \cdot 10^{\text{pH} - \text{pK}_s} \cdot [\text{CO}_2]$. Somit ergibt sich bei pH 7,2 und $[\text{CO}_2] = 1,3 \text{ mM}$ eine Pufferkapazität von rund 27 mM, also über das 10-fache gegenüber der Pufferkapazität wenn das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem geschlossen wäre. Wie in Unterabschnitt 1.2.1.1 geschrieben ist bei geschlossenen Systemen die beste Pufferwirkung bei $\text{pH} = \text{pK}$. Mit einem pK von 6,13 liegt der pK des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem weit entfernt vom physiologischen pH von 7,2, so dass die Pufferwirkung nur sehr gering wäre. Bei einem offenem System jedoch ist es sogar von Vorteil, dass der pK weit unter dem pH-Wert liegt, da so eine höhere HCO_3^- -Konzentration erreicht wird als bei alkalischerem pK, und somit auch eine höhere Pufferkapazität.

Der Verlauf der Pufferkapazität des offenen $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystems ist in Abbildung 1.3 A dargestellt. Sie steigt exponentiell mit steigendem pH an und trägt so einen Großteil zu der totalen Pufferkapazität β_t im alkalischen Bereich bei (Abbildung 1.3 B). Für β_i wurde eine Gesamtkonzentration von 100 mM angenommen mit einem pK von 7. Im sauren pH-Bereich besteht β_t hauptsächlich aus β_i , so dass beide zusammen eine gute Ergänzung bilden.

Das Bikarbonat-Ion kann ein weiteres mal deprotoniert werden zu Karbonat (CO_3^{2-}). Der pK für diese Reaktion liegt bei ≈ 10 . Das bedeutet, dass im physiologischen pH-Bereich die Konzentration an Karbonat vernachlässigbar gering ist. Selbst bei einem physiologisch hohen pH von 8 beträgt die $[\text{CO}_3^{2-}]$ nur 1/100 der $[\text{HCO}_3^-]$.

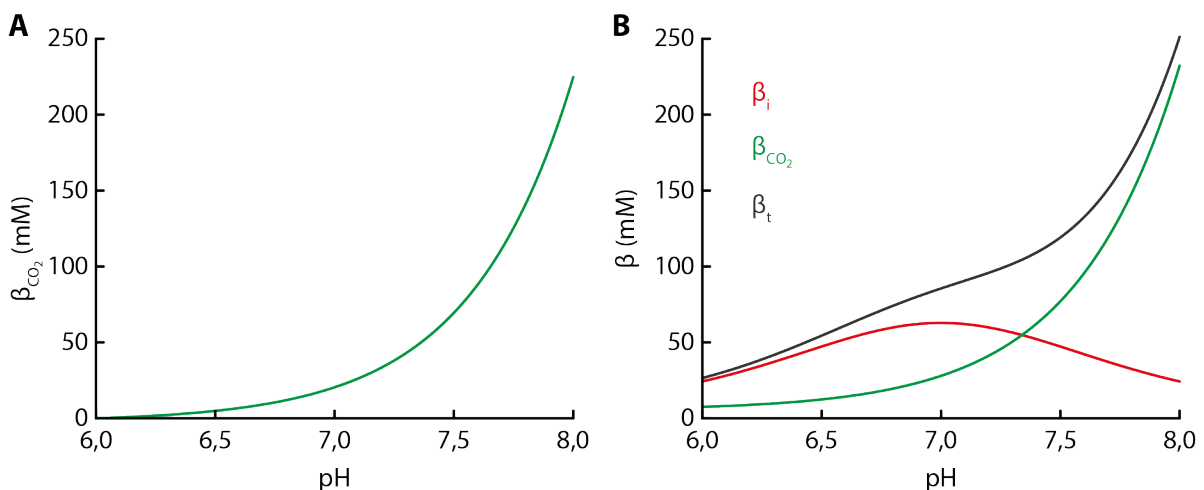


Abbildung 1.3.: CO_2 - und totale Pufferkapazität. (A) zeigt den Verlauf der CO_2 -abhängigen Pufferkapazität β_{CO_2} im pH-Bereich zwischen 6 und 8. Die totale Pufferkapazität β_t (B) ist die Summe aus β_{CO_2} (grün) und der intrinsischer Pufferkapazität β_i (rot). Für β_i wurde hier eine Gesamtkonzentration von 100 mM und ein pK von 7 gewählt.

Die der Pufferwirkung zugrunde liegende Hydratisierung bzw. Dehydratisierung von CO_2 läuft spontan ab, mit 0,14 pro Sekunde jedoch nur sehr langsam (Leem & Vaughan-Jones, 1998). In nahezu allen Zellen finden sich jedoch Carboanhydrasen, welche die Hydratisierung von CO_2 und die Dehydratisierung von HCO_3^- katalysieren.

1.2.2. Carboanhydrase

Die Carboanhydrasen (CAs, EC 4.2.1.1) gehören zur Familie der Metalloenzyme und sind in 5 verschiedene, nicht verwandte Klassen unterteilt ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \zeta$), wobei sich die einzelnen Klassen sowohl in der Primär- als auch in der Tertiärstruktur unterscheiden. Im Tierreich ist die α -Klasse die einzige Klasse an CAs, während die β -CAs in Pflanzen, γ -CAs in Bakterien und δ - und ζ -CAs nur in Kieselalgen vorkommen (McKenna & Frost, 2014). Die α -CAs sind weiterhin in 16 Isoformen unterteilt:

- 8 cytosolische (CA I, II, III, VII, VIII, X, XI, XIII)
- 2 mitochondriale (CA Va, Vb)
- 1 sekretierte (CA VI)
- 5 extrazelluläre (CA IV, IX, XII, XIV, XV)

Drei der cytosolischen CAs (Isoformen VIII, X und XI) fehlt das Zink-Atom in der katalytischen Tasche und diese sind somit katalytisch inaktiv. Sie werden auch als *CA related proteins (CARPs)* bezeichnet.

Ende der 20er und zu Beginn der 30er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die Frage, wie CO_2 im Blut transportiert wird, rege diskutiert. Es gab zwei mögliche Theorien (Meldrum & Roughton, 1933a):

1. das CO_2 wird als Proteinkomplex transportiert
2. CO_2 wird als gelöstes HCO_3^- transportiert

Die Bikarbonat-Theorie setzte sich im Laufe der Zeit mehr und mehr durch. Damit die Theorie mit den gemessenen CO_2 -Konzentrationen in der Ausatemluft in Einklang zu bringen war, musste die Anwesenheit eines Katalysators, der die Umwandlung des HCO_3^- zu CO_2 katalysiert, angenommen werden. 1933 isolierten und charakterisierten Meldrum und Roughton erstmals diesen Katalysator und nannten ihn Carboanhydrase (Meldrum & Roughton, 1933a,b).

Struktur und Mechanismus (der α -CAs) Da die humane CAII die am besten untersuchte ist, bezieht sich die genaue Position der Aminosäuren auf die humane CAII, die Struktur der anderen α -CA Isoformen kann leicht variieren. Das katalytische Zentrum sitzt im inneren des Proteins, zugänglich über eine 15 Å tiefe Spalte. Das für die katalytische Aktivität notwendige Zn^{2+} wird durch drei Histidin-Reste (H94, H96 und H119) in Position gehalten (An *et al.*, 2002; Christianson & Fierke, 1996; Lindskog, 1997) (vgl. Abbildung 1.4).

Die Katalyse der reversible Hydratisierung von CO_2 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) findet in einem zweistufigen Mechanismus statt. Der erste Schritt ist die Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- gefolgt vom Protonentransfer, um deren Zink-Hydroxyl-Komplex zu regenerieren.

In der „Ausgangsstellung“ ist an das Zink-Atom eine Hydroxylgruppe gebunden. Das CO_2 wird durch diese Hydroxylgruppe nukleophil angegriffen, so dass HCO_3^- entsteht, welches zunächst noch an das Zink gebunden ist. Das gebundene HCO_3^- wird durch H_2O ersetzt und so das HCO_3^- vom Zink-Atom gelöst. Um wieder in die „Ausgangsstellung“ zu gelangen, muss ein Proton vom Wasser an die Lösung abgegeben werden. Dies geschieht über einen weiteren Histidin-Rest (H64). Dieser Protonen-Transfer hat sich als ratenlimitierend herausgestellt (Boone *et al.*, 2014; An *et al.*, 2002; Christianson & Fierke, 1996; Steiner *et al.*, 1975). Fehlt das Histidin für den Transfer, verliert das

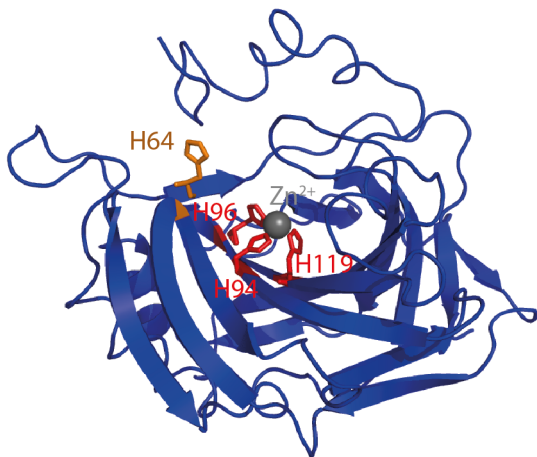


Abbildung 1.4.: Struktur der humanen CAII. Die Abbildung zeigt die Struktur der humanen CAII, mit dem zentralen Zink-Atom (grau). Das Zink-Atom wird von Histidin-Resten (H94, H96, H119; Rot) in Position gehalten. Das Histidin an Position 64 (H64; Orange) dient dem Protonen-Transfer ins bzw. weg vom katalytischen Zentrum.

Enzym einen Großteil seiner katalytische Aktivität. So zeigt die Mutante der CAII bei der das H64 durch ein Lysin ersetzt wurde (H64A), eine verringerte Aktivität, genau wie die CAIII, der das H64 ebenfalls fehlt (Mikulski *et al.*, 2013; Mikulski & Silverman, 2010; Becker *et al.*, 2011). Allerdings kann die Aktivität der CAII wieder hergestellt werden, in dem kleine, mobile Puffermoleküle mit einem Imidazol-Ring in die Lösung gegeben werden (Becker *et al.*, 2011; An *et al.*, 2002). Diese Moleküle können in das aktive Zentrum gelangen und dort den Protonen-Transfer übernehmen und damit auch die Funktion des H64.

Physiologische Funktion Durch die Katalyse der reversiblen CO_2 Hydratisierung zu HCO_3^- und H^+ spielen CAs in vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Eine der wichtigsten Prozesse ist der Gasaustausch in der Lunge, der auch zur Entdeckung der CAs führte (s.o.).

Aber auch für die Säure/Base-Regulation spielen die CAs eine wichtige Rolle. Zum Einen beeinflussen sie die Pufferung durch enzymatische Beschleunigung der $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konversion, zum anderen interagieren sie mit diversen Säure/Base-Transportern. So sind funktionelle Interaktionen mit dem Natrium-Protonen-Austauscher (NHE), dem Natrium-Bicarbonat-Cotransporter (NBC), dem Anionen-Austauscher (AE) und den Monocarboxylat-Transportern (MCT) bekannt (Becker *et al.*, 2014).

1.2.3. Säure/Base Transport

Puffer können mögliche pH-Änderungen nur dämpfen, für eine aktive Regulation werden jedoch Transporter gebraucht.

Sie sorgen mit dem Transport von Säure/Base-Äquivalenten für eine langfristige pH Homöostase. Für den Transport von Säure/Base-Äquivalenten stehen eine Reihe von verschiedenen Transporterfamilien zur Verfügung. Man unterscheidet im allgemeinen zwischen Transportern die eine Ansäuerung und Transportern die eine Alkalinisierung regulieren. Um den pH des Cytosol von einer Ansäuerung wieder zum normalen pH zu regulieren, ist der Export von Säure bzw. gleichbedeutend damit der Import von Base nötig. Da die H^+ gegen ihren elektrochemischen Gradienten exportiert werden müssen, werden sie entweder im Anti- oder Symport mit anderen Ionen exportiert. So nutzt der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) den Natrium-Gradienten zum Export von Protonen. Neben dem NHE ist der Natrium-Bicarbonat-Cotransporter (NBC) an den Natrium-Gradienten gekoppelt. Der NBC transportiert Natrium in einem Cotransport zusammen mit Bicarbonat, wobei der Import von Bicarbonat (Base) gleichbedeutend mit

einem Export von H^+ ist. Der Transport kann je nach Isoform elektroneutral (NBCn1&2) oder auch elektrogen sein (NBCe1&2).

Trotz der andauernden Ansäuerung des Cytosols durch den Metabolismus, sind Zellen auch mit Säure importierenden Transportern ausgestattet. Diese Funktion wird hauptsächlich durch den Anionen-Austauscher (AE, *anion exchanger*) übernommen. Der AE transportiert ein Chlorid-Ion im Austausch gegen ein Bicarbonat-Ion. Da der Chlorid-Gradient stark nach innen gerichtet ist, wird Bicarbonat nach außen und Chlorid nach innen transportiert. Der Export von Base (Bicarbonat) entspricht einem Import von Säure. Durch den Im- und Export von Säure bzw. Base kann der pH_i fein reguliert werden.

Aber auch andere H^+ -gekoppelte Transporter, wie z.B. wie die Monocarboxylat-Transporter (MCT 1-4) oder auch die exzitatorischen Aminosäure-Transporter (*excitatory amino acid transporter*, EAAT) tragen zur pH-Regulation bei, im Gegenzug wird aber auch ihre Aktivität über den intra- und extrazellulären pH moduliert (Deitmer, 2007).

1.3. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll der Fokus auf die Pufferung gelegt werden, sowohl auf die intrinsische als auch die CO_2/HCO_3^- -Pufferung. Die Oozyten des *Xenopus laevis* bieten ideale Voraussetzungen dafür, da sie keine pH regulierende Transporter im verwendeten Ruhezustand exprimieren und so isoliert die Pufferung untersucht werden kann.

Der Einfluss von Carboanhydrasen, sowohl der intrazellulären CAII als auch der extrazellulären CAIV, auf das CO_2/HCO_3^- -Puffersystem soll in dieser Arbeit untersucht werden. Welchen Einfluss das CO_2/HCO_3^- -Puffersystem mit und ohne CA-Aktivität auf die Mobilität der Protonen hat, soll ebenfalls hier untersucht werden. Auch hier ist es von Vorteil, dass die Oozyten keinerlei Säure/Base-Transporter exprimieren, so dass die in Unterabschnitt 1.2.2 erwähnten Interaktion nicht stattfinden können und der Effekt der CAs auf die Pufferung isoliert betrachtet werden kann.

In Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer ITWM in Kaiserslautern soll zu dem die Definition der statischen Pufferkapazität, eingeführt von Koppel & Spiro (1914), so erweitert werden, dass auch dynamische Prozesse beschrieben werden können. Als Grundlage sollen dazu die aus den Experimenten gewonnen Daten dienen.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Lösungen

Es wurden die folgenden Lösungen verwendet:

OR2⁻:

Tabelle 2.1.: Calcium freie Ringerlösung OR2⁻

	MW	mM	g/l
NaCl	58,44	82,5	4,821
KCl	74,55	2,5	0,186
Na ₂ HPO ₄	141,96	1	0,142
HEPES	238,31	5	1,192
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	203,3	1	0,203

OR2⁺:

Tabelle 2.2.: Calcium freie Ringerlösung OR2⁺

	MW	mM	g/l
NaCl	58,44	82,5	4,821
KCl	74,55	2,5	0,186
Na ₂ HPO ₄	141,96	1	0,142
HEPES	238,31	5	1,192
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	203,3	1	0,203
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	147,02	1	0,147

Für die 20 mM Butyrat-Lösung wurde NaCl äquimolar durch Na-Butyrat ersetzt.

Für die 5% CO₂/25 mM HCO₃⁻-Lösung wurde NaCl äquimolar durch Na-HCO₃⁻ ersetzt. Vor Zugabe des Na-HCO₃ wurde die Lösung eine Stunde mit Carbogen (5% CO₂ in 95% O₂) begast, um die Lösung mit CO₂ zu sättigen. Nach Zugabe des Na-HCO₃ wurde die Lösung eine weitere Stunde begast und dann der pH-Wert überprüft und ggf. mit HCl oder NaOH eingestellt.

Für die Anzucht von *E. coli* wurde folgendes LB-Medium verwendet:

Tabelle 2.3.: LB-Medium für die Anzucht von *E. coli*

	Konzentration
Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	1% (w/v)

Der pH wurde auf 7 eingestellt und das fertige Medium autoklaviert. Für das Gießen von LB-Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren 1,5% Agar zum LB-Medium hinzugefügt.

2.2. *Xenopus laevis* als Labortier

Der Südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wird schon lange Zeit als Versuchstier gehalten. Besonders seitdem die Verwendung von europäischen Froscharten durch den Natur- und Artenschutz stark eingeschränkt ist. Dadurch, dass adulte Tiere relativ anspruchslos sind, ist die Haltung und Zucht mit nur geringen Aufwand verbunden und damit sehr kostengünstig (Hilken *et al.*, 1997). Früher fand *X. laevis* hauptsächlich Anwendung in der hormonellen Schwangerschaftsdiagnostik, aber auch in der Kreislauf- und Pharmaforschung (Hilken *et al.*, 1997). Seitdem 1971 bekannt wurde, dass sich die *Xenopus*-Oozyten sehr gut für heterologe Proteinexpression eignen (Gurdon *et al.*, 1971), werden die Oozyten als Modellsystem in der Zellbiologie und Elektrophysiologie verwendet. Die pigmentierten Frösche wurden von Xenopus Express France (Vernassal, Frankreich) und die Albino-Frösche von Centre de Ressources Biologiques Xénopes (Rennes, Frankreich) bezogen und bis zur Verwendung im Tierhaus der Technischen Universität Kaiserslautern gehalten.

Wenn nicht ausdrücklich von albinotischen Fröschen bzw. Oozyten gesprochen wird, sind immer pigmentierte Frösche bzw. Oozyten gemeint. Die im folgenden beschriebene Behandlung der Frösche und Oozyten ist in beiden Fällen die selbe, außer es werden explizit Unterschiede genannt.

2.2.1. Die Oozyten des *Xenopus laevis*

Bei den Oozyten des *X. laevis* handelt es sich mit einem Durchmesser von bis zu 1,5 mm um Riesenzellen. Aufgrund ihrer enormen Größe sind sie leicht zu handhaben und zu manipulieren und damit ideal geeignet für elektrophysiologische Untersuchungen mit Mikroelektroden.

Die Oozyte ist optisch in zwei Hemisphären geteilt, die schwarz-braun pigmentierte animale Hemisphäre und die hellgelbe vegetative Hemisphäre. Die animale Hemisphäre enthält neben dem Zellkern hauptsächlich Mitochondrien und Ribosomen. Die hellgelbe Färbung der vegetativen Hemisphäre kommt durch das, mit dicht gepackten Dotterproteinen, Zytoplasma zustande. Auf Grund des zytoplasmatischen Dichtegradienten kommt es zu einer Ausrichtung der Oozyte, so dass die animale Hemisphäre meist nach oben und die vegetative Hemisphäre nach unten zeigt (Hilken *et al.*, 1997). Albinotische Oozyten sind im Gegensatz zu pigmentierten Oozyten im ganzen grün-gelb gefärbt, was am durchscheinenden Cytoplasma liegt (Hilken *et al.*, 1997).

Im Ovar des Frosches können alle Stadien an Oozyten vorkommen (I bis VI). Verwendet wurden nur die Oozyten in den Entwicklungsstadien V und VI, diese haben einen Durchmesser von ca. 1,3 mm.

2.2.1.1. Entnahme der Oozyten

Eine Woche vor der Operation wurde der Frosch im Tierhaus isoliert und nicht mehr gefüttert. Um die Oozyten entnehmen zu können, wurde zu erst der Frosch betäubt. Dies geschah durch Zugabe von 3 g 3-Aminobenzoesäure Ethylester Methansulfonat (MS 222; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in ein, mit ca. 1 Liter Wasser gefülltes, Wasserbecken. Nach einer halben Stunden wurde die Betäubung überprüft, indem der Frosch auf den Rücken gedreht wurde. Erfolgte keine Reaktion, war die Betäubung ausreichend. Anschließend wurde der Frosch in Rückenlage in eine, mit in Betäubungsmittel getränkten Tüchern bedeckte, Eiswanne gelegt und mit in Betäubungsmittel getränkten Tüchern abgedeckt.

Der etwa 7 mm lange Schnitt entlang der Körperlängsachse erfolgte möglichst lateral, ohne dabei weder das Seitenlinienorgan noch Blut- und Lymphgefäße zu verletzen. Die Stelle wurde vorher mit 70% Ethanol desinfiziert. Nach der Öffnung der Bauchhaut wurde die darunter liegende Muskelschicht mit einer Pinzette von den darunter liegenden Organen abgehoben und mittels Skalpell geöffnet.

Jetzt konnte ein Teil des Ovars mit einer Pinzette durch die operative Öffnung herausgezogen werden. Der benötigte Teil des Ovars wurde mit einer Präparierschere abgetrennt und in ein Gefäß mit OR2⁻ (pH 7,8), die mit 2‰ Gentamycinsulfat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) versetzt war, gegeben. Das restliche Ovar wurde wieder in den Bauchraum zurückgeschoben. Nun konnte zuerst die Muskelschicht mit resorbierbarem Faden (Polysorb Braided Lactomer 9-1, Tyco Healthcare, United States Surgical, USA) vernäht werden. Nach der Kontrolle, dass sich keine Oozyten im Zwischenraum befanden, wurde auch die Bauchhaut vernäht.

Zur Regeneration wurde der Frosch nach der Operation in ein Becken mit flachem Wasserstand gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Nasenlöcher über der Wasserlinie waren. Zum Schutz vor Austrocknung wurde der Frosch mit nassen Tüchern bedeckt, wobei auch hier darauf geachtet wurde, dass die Nasenlöcher frei blieben. Zur Kontrolle der Wundheilung und zum Schutz vor Infektionen wurde der Frosch nach dem Eingriff für eine Woche in einem separaten Becken gehalten.

2.2.1.2. Vereinzlung und Selektion der Oozyten

Zur Vereinzlung der Oozyten wurde eine Collagenasebehandlung durchgeführt. Dazu wurde das entnommene Stück Ovar mit einer Präparierschere in kleine Pakete zerteilt. Anschließend wurden diese in einen 50 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml OR2⁻ (pH 7,8), welche mit 2‰ Gentamycinsulfat (Carl Roth GmbH & Co. KG), 30 mg Collagenase A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und 10 µl des Trypsininhibitors Aprotinin (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) versetzt war, überführt. Die Collagenasebehandlung erfolgte für ca. 2 Stunden in einem Schüttelinkubator (GFL Schüttelinkubator 3031, Burgwedel) bei 28°C und 140 Rpm. Wenn sich Theka und Blutgefäße gelöst hatten, wurden die vereinzten Oozyten in 50 ml Schritten erst mit 500 ml OR2⁻ (pH 7,8) und anschließend mit 500 ml OR2⁺ (pH 7,8), welche ebenfalls mit 2‰ Gentamycinsulfat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) versetzt war, gewaschen. Aus den vereinzten Oozyten wurden die Zellen selektiert, die sich in den Stadien V oder VI befanden. Für die Stadien V und VI ist ein Durchmesser von ca. 1,3 mm und eine klare Aufteilung in animale und vegetative Hemisphäre charakteristisch. Zur Aufbewahrung wurden die selektierten Oozyten in mit OR2⁺ (pH 7,8) gefüllte Polystyren-Petrischalen (Ø 3,5 cm) überführt und in einem Brutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen) bei 18°C gelagert. Das Medium wurde zweimal täglich, jeweils morgens und abends, gewechselt.

2.3. Heterologe Proteinexpression in *Xenopus laevis* Oozyten

Die Oozyten des *X. laevis* besitzen die Fähigkeit fremde RNS effektiv in Proteine zu translatieren. Gegenüber anderen Überexpressionssystemen haben die Oozyten den Vorteil, dass sie nur eine geringe Zahl an Ionenkanälen und Membrantransportern exprimieren (Terhag *et al.*, 2010; Sobczak *et al.*, 2010). Es ist jedoch absolut notwendig, dass zwischen den endogenen und den heterolog exprimierten Proteinen unterschieden wird. Deshalb wurden stets native Oozyten als Kontrolle verwendet.

Aufgrund ihrer Größe ist auch die Injektion der fremden cRNS gut zu handhaben. All das macht sie zu einem optimalen „Werkzeug“ für die Untersuchung verschiedenster Transportproteine (Sobczak *et al.*, 2010).

Der prinzipielle Ablauf der heterologen Proteinexpression in *X. laevis* Oozyten ist in Abbildung 2.1 gezeigt. Die für ein bestimmtes Protein kodierende mRNA muss zuerst isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNS umgeschrieben werden. Um die cDNS zu vervielfältigen, wird sie in einen Oozytenexpressionsvektor kloniert und anschließend in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) transformiert. Über die Anzucht der Vektor enthaltenden Bakterien, wird der Vektor vervielfältigt. Der Vektor wird anschließend aus den Bakterien isoliert und linearisiert. In einer *in vitro* Transkription wurde das linearisierte Plasmid in cRNS transkribiert, welche in die Oozyten injiziert werden kann.

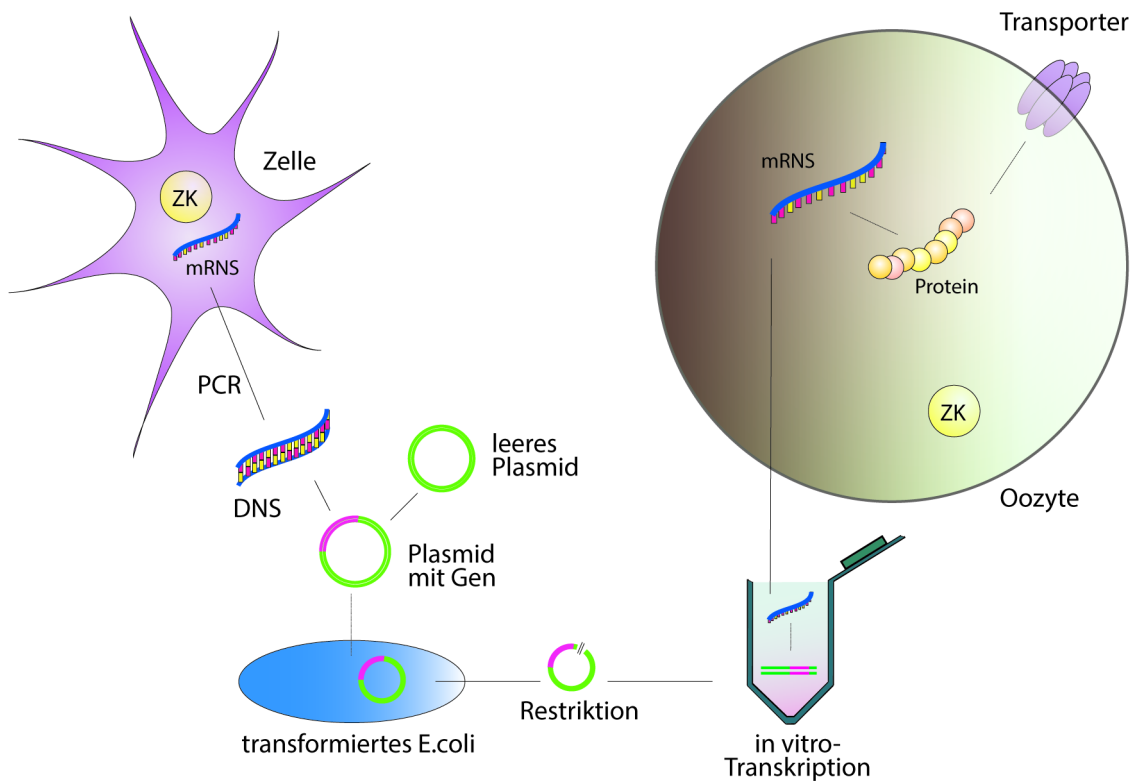


Abbildung 2.1.: Heterologe Proteinexpression in *X. laevis* Oozyten. Die für ein Protein kodierende mRNA wird aus einer Zelle extrahiert und anschließend in cDNS umgeschrieben. Die cDNS wird in einen Expressionsvektor kloniert und dieser dann zur Amplifikation in *E. coli* transformiert. Nach der Amplifikation wird das Plasmid isoliert und linearisiert, so dass es mittels *in vitro* Transkription in cRNS umgeschrieben werden kann. Die cRNS kann dann in die Oozyte injiziert werden, wo sie dann translatiert wird (nach Becker, 2005).

2.3.1. Herstellung der cRNS

In der vorliegenden Arbeit wurde der Oozytenexpressionsvektor pGemHeJuel verwendet, in den die cDNS des zu exprimierenden Proteins kloniert war. Die genutzten Konstrukte waren pGHJCAII und pGHJCAIV. Die cDNS der humanen CAII wurde von Dr. Reinhart Reithmeier, Toronto, bereitgestellt (Vince *et al.*, 2000; Vince & Reithmeier, 2000). Die cDNS der humanen CAIV wurde von Dr. William S. Sly, Saint Louis, bereitgestellt (Okuyama *et al.*, 1992). Die beiden CAs wurden von Dr. Holger Becker (CAII) und Dr. Christina Schüler (CAIV) in den Oozytenexpressionsvektor pGemHeJuel kloniert. Die cDNS wurde so in den Vektor kloniert, dass die kodierende cDNS von nicht-translatierenden Regionen (UTR) des *Xenopus* β -Globulins umgeben waren. Die UTR beeinflussen die Proteinsynthese durch Interaktion mit Translationsfaktoren und Ribosomen und erhöhen so deren Effektivität. Außerdem sind sie für die Stabilität der cRNS von Bedeutung. Zusätzlich erhielt das Konstrukt noch ein Ampicillin-Resistenzgen (bla), welches zur Selektion der Bakterien während der Anzucht diente.

2.3.1.1. Amplifikation der Expressionskonstrukte

Zur Amplifikation der Expressionskonstrukte wurden sie in den *E. coli* Stamm DH5 α transformiert. Es wurden 6 ml LB-Medium, welches zur Selektion mit 100 μ g Ampicillin pro ml versetzt war, mit den transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht (ca. 14 Stunden) bei 37 °C und 180 Rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert (GFL Schüttelinkubator 3031, Burgwedel).

2.3.1.2. Isolation der Plasmid-DNS

Die Isolation des Plasmids erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden). Das Kit basiert auf einer alkalischen Lyse der Zellen und reversibler Bindung der DNS an eine Silikatmembran. Die Isolation erfolgte nach der Anleitung des QIAprep Spin Miniprep Kits. Das aufgereinigte Plasmid wurde in 50 μ l DEPC-H₂O eluiert.

2.3.1.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNS

Mit einem Eppendorf Bio-Photometer (Eppendorf AG, Hamburg) wurde die Konzentration der aufgereinigten Plasmid-DNS bestimmt. Es wurden Absorptionmessungen bei Wellenlängen von 260 und 280 nm durchgeführt. Die Absorption bei 260 nm dient der Konzentrationsberechnung, während das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm eine Abschätzung der Reinheit der Probe zulässt. Das Verhältnis sollte idealerwei-

se zwischen 1,8 und 2 liegen. Für die Messung wurden 2 µl der Plasmid-DNS in 68 µl DEPC-H₂O verdünnt und nach Angaben des Herstellers im Photometer gemessen.

2.3.1.4. Linearisierung der Plasmid-DNS

Bevor die Plasmid-DNS in der *in vitro* Transkription in RNS umgeschrieben werden konnte, musste diese linearisiert werden. Die RNS-Polymerase würde das Plasmid sonst kontinuierlich ablesen und ein extrem langes RNS-Transkript produzieren. So fiel die RNS-Polymerase am Ende des linearisierten Plasmids ab und konnte an ein neues Plasmid binden.

Als Restriktionsenzym wurde die Restriktionsendonuklease SalI (*Fast Digest* SalI, Fermentas GmbH) verwendet. Der Linearisierungsansatz enthielt 5 µg Plasmid-DNS, 1 µl SalI, 4 µl 10x Reaktionspuffer und so viel DEPC-H₂O, dass das Gesamtvolumen des Ansatzes 40 µl betrug. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C im Wärmeblock (ThermoStat plus, Eppendorf AG) inkubiert.

Bevor die linearisierte Plasmid-DNS weiterverwendet werden konnte, wurde sie mit dem MSB Spin PCRapace Kit (STRATEC Molecular GmbH) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die aufgereinigte DNS wurde in 20 µl DEPC-H₂O gelöst.

Zur Kontrolle, dass sich keine zirkuläre DNS mehr im Ansatz befand, wurde der Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurden 0,5 µg DNS auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, welches mit 5 µl RothiSafe (Carl Roth GmbH) versetzt war. Die Auftrennung erfolgte in einem Gelelektrophorese-System (BIORAD Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System, BioRad Laboratories GmbH, München) bei 120 V. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Größenmarker (peqGOLD 1 kb DNS-Leiter (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet. Die optische Auswertung des Gels erfolgte mit einem Geldokumentationssystem (Gel IX Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen). Wenn keine zirkuläre Plasmid-DNS in Probe war, wurde die DNS weiterverwendet.

2.3.1.5. *in vitro* Transkription

Die linearisierte Plasmid-DNS musste anschließend in cRNS umgeschrieben werden. Hierfür wurde das *in vitro* Transkriptionskit mMESSAGE mMACHINE (Ambion Inc., USA) verwendet. Mittels dieses Kits wurde *capped* RNS hergestellt. Durch die *cap*-Struktur am 5' Ende wird die Stabilität der synthetisierten RNS sowie die Ähnlichkeit zur eukaryontischer mRNA erhöht. Pro Ansatz wurde 1 µg DNS verwendet und für 2 Stunden bei 37°C im Wärmeblock (ThermoStat plus, Eppendorf AG) inkubiert.

Nach der *in vitro* Transkription musste die RNS noch aufgereinigt werden. Dazu wurde der Transkriptionsansatz mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen GmbH) aufgereinigt. Die cRNS wurde über eine Silikatgel-Membran reversibel gebunden. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die aufgereinigte cRNS wurde in 14 μl DEPC- H_2O eluiert.

Die synthetisierte cRNS wurde in Aliquots zu je 2 μl aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -80°C in einem Tiefkühlschrank (Revco Scientific Inc., USA) gelagert. Für die photometrische Konzentrationsbestimmung, wie in Unterabschnitt 2.3.1.3 beschrieben, wurde ein μl in 69 μl DEPC- H_2O verdünnt.

2.3.2. Expression der cRNS

Die zur cRNS-Injektion ausgewählten Oozyten wurden in die Bohrungen einer mit $\text{OR}2^+$ (pH 7,8) gefüllten Lochplatte gelegt. Die Injektionsnadeln wurden mit einem vertikalen Elektrodenziehgerät (Einstellungen: Magnet 3,0 Heizwendel 4,2; Type PE-2, Narishige Scientific Instruments Lab, Japan) aus hitzesterilisierten Glaskapillaren ohne Filament mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einer Länge von 7,5 cm (World Precision Instruments Inc., Berlin) gezogen. Der vordere Teil der Injektionsnadel wurde vor der Verwendung abgebrochen, um eine scharfkantige und eine mehrere Mikrometer große Öffnung zu bekommen. Die Injektionsnadel wurde mit Mineralöl (light white oil, Sigma-Aldrich) befüllt und auf einen Injektor (Nanoliter 2000, World Precision Instruments Inc.) montiert. Zum Beladen der Injektionsnadel wurde je nach Bedarf ein bestimmtes Volumen der RNS-Probe auf ein hitzesterilisiertes Deckgläschen pipettiert und anschließend die Probe vom Deckgläschen mit der Injektionsnadel aufgesogen.

Die Injektionsnadel wurde im Bereich des Oozytenäquators eingestochen und ein definiertes Volumen injiziert. Für die Expression der CAII wurden 12 ng und für die Expression von CAIV 2 ng cRNS injiziert, wobei das Injektionsvolumen immer 27,5 nl betrug. Die injizierten Oozyten wurden 3 bis 6 Tage in $\text{OR}2^+$ (pH 7,8) bei 18°C inkubiert.

2.4. Elektrophysiologische pH Messungen

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Messungen des intrazellulären pH (pH_i) über Farbstoffe und pH-sensitive Mikroelektroden. Ionen-sensitive Mikroelektroden erlauben im allgemeinen eine potentiometrische Messung der Ionenaktivität, wobei die Aktivität im Folgenden mit der Konzentration gleichgesetzt wird.

2.4.1. pH-sensitive Mikroelektroden

Es gibt zwei Arten von pH-sensitiven Mikroelektroden, die nach Ihrem Aufbau unterschieden werden. Zum einen Glas-Elektroden und zum anderen die hier verwendeten Flüssig-Membran-Elektroden. In die Spitze der Mikroelektrode wurde der Ionen-sensitive Sensor gefüllt und mit einer Referenzlösung überschichtet. Der Sensor und die Referenzlösung können sich nicht vermischen, so dass an der Grenzfläche eine Flüssig-Membran entsteht. Je nach Ionenkonzentration bildet sich eine Potentialdifferenz, der Nernst-Gleichung folgend, an der Membran aus. In dieser Potentialdifferenz ist auch immer das Membranpotential der Zelle enthalten, was es notwendig macht auch immer das Membranpotential der Zelle zu messen. Subtrahiert man das Membranpotential von der Potentialdifferenz an der Flüssig-Membran so erhält man das reine „Ionenpotential“ (Deitmer & Schild, 2000; Honold & Honold, 1991; Kaila & Ransom, 1998). Da neben dem pH-Signal auch immer das Membranpotential mitgemessen werden muss, wurden Doppelkanal-Mikroelektroden gebaut. Ein Kanal wurde mit dem pH-sensitiven Sensor befüllt und der zweite Kanal wurde mit 3 M KCl befüllt und diente der Messung des Membranpotentials (Abbildung 2.2).

Zur Herstellung der Doppelkanalelektroden wurden zwei Borosilikatglas-Kapillaren mit unterschiedlichem Durchmesser verdreht und ausgezogen. Für den Kanal, der mit dem Sensor gefüllt wurde (Zentralkanal), wurde eine Kapillare mit Filament mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm (Typ GC150F-15, Harvard Apparatus Ltd., UK) verwendet. Für den Kanal, der mit 3 M KCl gefüllt wurde (Referenzkanal), wurde eine Kapillare mit Filament mit kleinerem Außendurchmesser von 1,0 mm (Typ GC100F-15, Harvard Apparatus Ltd.) verwendet. Die Kapillare für den Zentralkanal wurde auf 7,5 cm halbiert, während die Kapillare des Referenzkanals auf 7,25 cm gekürzt wurde. Die beiden Kapillaren wurden mit je einem Streifen Aluminiumfolie an beiden Enden parallel aneinander fixiert. Dieser Rohling wurde zum Verdrehen und Ausziehen in ein vertikales Elektrodenziehgerät (Einstellungen: Magnet 4,6 Heizwendel 4,6; Type PE-2, Narishige Scientific Instruments Lab, Japan) eingespannt. Die Doppelkapillare wurde zunächst für 30 s geschmolzen, danach um 180° verdreht und um 2 mm auseinander gezogen. Nach 30 sekündigem Abkühlen wurde diese rezentriert, indem das obere Bohrfutter geöffnet, die Kapillare 1 mm nach oben geschoben und das Bohrfutter wieder geschlossen wurde. Anschließend wurde die Doppelkapillare zu zwei Zweikanal-Mikroelektroden ausgezogen.

Zur Herstellung von Einkanal-Mikroelektroden wurde eine Kapillare mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einer Länge von 7,5 cm (Typ GC100F-15, Harvard Apparatus Ltd.) in ein vertikales Elektrodenziehgerät (Einstellungen: Magnet 3,7 Heiz-

wendel 3,7; Type PE-2, Narishige Scientific Instruments Lab) eingespannt und zu zwei Mikroelektroden ausgezogen.

Damit der hydrophobe Sensor im stark hydrophilen Borosilikatglas nicht von Wasser verdrängt wird, musste die Innenseite des Zentralkanals ebenfalls hydrophob gemacht werden. Dazu wurde die Spitze des Zentralkanals mit einer Siliziumverbindung beschichtet. Dazu wurde ein Tropfen 5%iges Tributylchlorsilan (Fluka, Sigma-Aldrich, Schweiz) über das hintere Ende in die Spitze gefüllt. Damit sich das Silan richtig in die Spitze ziehen konnte, wurden die befüllten Elektroden für 30 Minuten hängen gelassen. Anschließend wurden sie im Abzug für 4:45 min bei 470 °C auf einer Heizplatte (Hotplate B210, Bibby, UK) gebacken.

Die Doppelkanalelektroden wurden nun mit Dentalwachs verklebt, so dass der Aluminiumstreifen entfernt werden konnte. Der Referenzkanal wurde mit 3 M KCl befüllt und anschließend die Spitze des Zentralkanals mit dem Wasserstoff-Ionophor I Cocktail A (Fluka, Sigma Aldrich) befüllt.

Nach Möglichkeit wurde die so vorbefüllte Doppelkanalelektrode für mindestens eine halbe Stunde in einer dunklen Feuchtekammer hängen lassen, damit sich der Sensor optimal in die Spitze ziehen konnte. Danach konnte der Sensor mit 0,1 M Natriumcitrat (pH 6,0) überschichtet werden. Beide Kanäle wurden mit chlorierten Silberdrähten versehen und an den oberen Öffnungen mit Dentalwachs verschlossen. Im Zentralkanal musste darauf geachtet werden, dass der chlorierte Silberdraht möglichst nah an der Flüssig-Membran, aber nicht im Sensor, positioniert wurde.

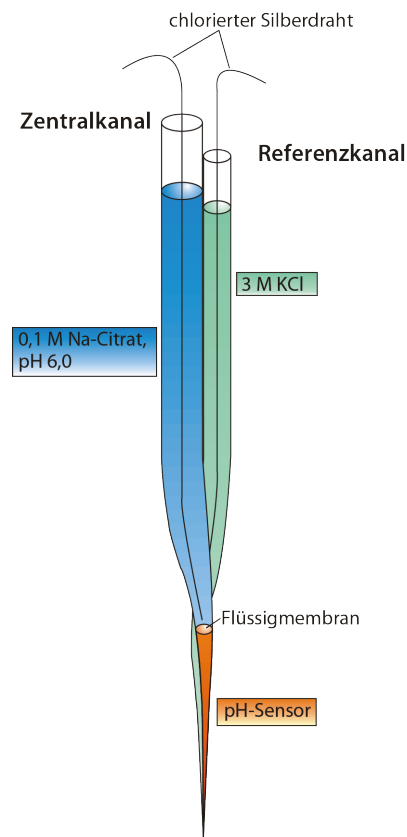


Abbildung 2.2.: pH-sensitive Mikroelektrode (modifiziert nach Becker, 2005).

2.4.2. Aufbau des Messplatzes

Neben der potentiometrischen Messung des pH-Wertes wurde eine Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC, *two electrode voltage clamp*) genutzt, wodurch das Membranpotential der Zelle konstant bei -40 mV gehalten werden konnte und gleichzeitig der dafür notwendige Strom gemessen werden konnte. Der Messplatz bestand aus einer aus Sylgard gegossenen Versuchskammer mit einem Volumen von ca. 100 μ l. Die Versuchskammer wurde mit einem Schwerkraft getriebenem Perfusionssystem kontinuierlich perfundiert. Das Perfusionssystem bestand aus einem Teflonschlauch, mit dem zwischen den verschiedenen Lösungen gewechselt werden kann und die Lösung zur Versuchskammer geleitet wurden. Die Bechergläser mit den Lösungen wurden oberhalb des Messplatzes gelagert. An die Versuchskammer war eine Kolbenpumpe (Hy-Flo, Medcalf Bros Ltd., UK) angeschlossen, damit die Lösung auch wieder aus der Versuchskammer abgesaugt werden konnte.

Mittels zweier Mikromanipulatoren (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) wurden sowohl die doppeläufige Mikroelektrode als auch die Einkanal-Mikroelektrode in die Oozyte eingestochen. Zur optischen Kontrolle wurde eine Stereolupe mit Lampe (Wild Heerbrugg, Schweiz) verwendet.

Zum Schutz vor mechanischen Störungen war der Messplatz auf einem schwingungsgedämpften Tisch untergebracht. Um den Messplatz vor elektrischen Störungen zu schützen, war er von einem Faraday-Käfig umgeben.

Die ionensensitive Mikroelektrode war über einen Vorverstärker (Eigenbau, Technische Universität Kaiserslautern) mit einem Hauptverstärker (Eigenbau, Technische Universität Kaiserslautern) verbunden. Der Referenzkanal war über einen Vorverstärker (HS-2A Headstage Gain x1 LU, Axon Instruments Inc., USA) an den Voltage Clamp Verstärker (AxoClamp 2B, Axon Instruments Inc.) angeschlossen. Der Stromkreis wurde über eine Badelektrode geschlossen, die sich in der Versuchskammer befand und auf Masse gelegt wurde (vgl. Abbildung 2.3).

Die Messsignale wurden über eine AD-DA-Wandler-Karte (NI PCI 6042E, National Instruments Germany GmbH, München) digitalisiert und über eine auf LabView (National Instruments, Schweiz) basierende Software auf einem PC aufgezeichnet. Außerdem wurden die Signale über einen analogen x-t-Schreiber (Linseis L6532, Linseis Messgeräte GmbH, Selb) aufgezeichnet.

Herstellung der Badelektrode Für die Badelektrode wurde ein Silberdraht an einem Ende geschmolzen, so dass sich eine Kugel mit einem Durchmesser von ca. 1 mm ausbildete. Anschließend wurde der Silberdraht chloriert. Der chlorierte Silberdraht wurde in

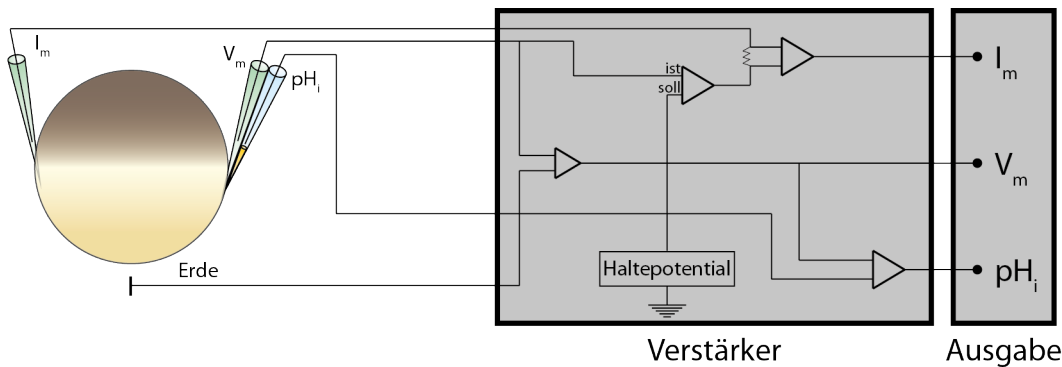


Abbildung 2.3.: Schematischer Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes. Die Oozyte wurde auf das eingestellte Haltepotential geklemmt, indem das gemessene Membranpotential (V_m) mit dem Haltepotential vom Verstärker abgeglichen wurde und bei einer Differenz ein Strom (I_m) in die Zelle injiziert wurde. Der pH_i wurde aus der Differenz der Potentiale der pH-Elektrode und der Membranelektrode vom Verstärker errechnet. Der Strom (I_m), das Membranpotential (V_m) und der intrazelluläre pH (pH_i) wurden vom Verstärker ausgegeben und mittels eines Computers aufgezeichnet.

ein mit flüssigem Agar (1% Agar in OR_2^+) gefüllten Polyethylen-Schlauch (Außendurchmesser: 3 mm; Innendurchmesser: 2 mm) geschoben und der Agar aushärten gelassen. Der Schlauch wurde am Ende mit dem Silberdraht für eine bessere Stabilität mit Dentalwachs verschlossen und bis zur Verwendung in OR_2^+ gelagert.

2.4.3. Elektrophoretische H^+ / OH^- -Injektion

Für die elektrophoretische Injektion von H^+ bzw. OH^- wurde eine Thetaglas-Elektrode (TCC 200-15, Clark Electromedical Instruments, UK) an einem vertikalen Elektrodenziehgerät (Einstellungen: Magnet 3,7 Heizwendel 3,7; Type PE-2, Narishige Scientific Instruments Lab, Japan) ausgezogen und anschließend wurde ein Kanal mit 5 M HCl und der zweite Kanal mit 5 M NaOH befüllt, mit einem Silberdraht versehen und am oberen Ende mit Dentalwachs verschlossen. Die mit HCl/NaOH gefüllte Doppelkanal-Elektrode wurde an einen Verstärker (Intra 767 electrometer, World Precision Instruments Inc., USA) angeschlossen. Die Elektrode wurde mit einem Mikromanipulator (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) möglichst so platziert, dass die Elektrodenspitze sich in der Mitte der Oozyten befand (vgl. Abbildung 2.4).

Für die Injektion von H^+ wurde an den mit HCl gefüllten Kanal ein positiver Strom angelegt, so dass Protonen in die Oozyte injiziert wurden. Die Injektion von OH^- erfolgte durch Anlegen eines negativen Stroms an den mit NaOH gefüllten Kanal. Die Stromstärke betrug jeweils 300 nA. Da die maximale Spannung des Verstärkers 5 V beträgt,

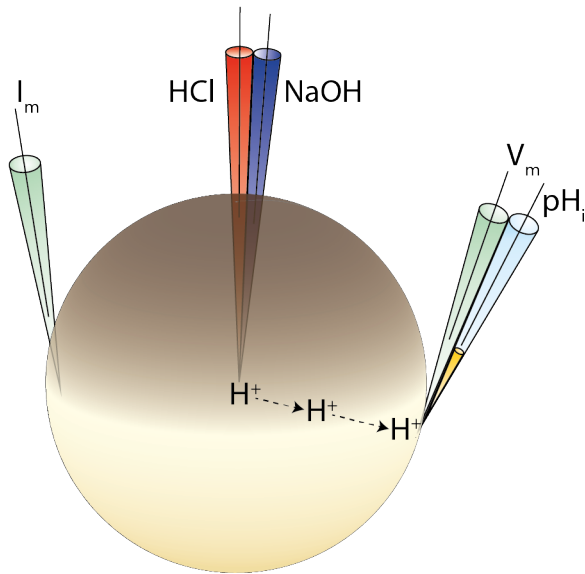


Abbildung 2.4.: Elektrophoretische Injektion von H^+ und OH^- . Die ausgezogene Thetaglas-Elektrode wurde in einem Kanal mit 5 M HCl (Rot) und im anderen Kanal mit 5 M NaOH (Blau) befüllt. Die Spitze der Elektrode wurde mittig in der Oozyte positioniert.

musste die Spitze ggf. leicht abgebrochen werden, so dass der Widerstand $\leq 15 \text{ M}\Omega$ betrug.

Berechnung der injizierten Protonen-/Hydroxidionen-Konzentration c Für die Berechnung der Konzentration c müssen die Stoffmenge an Protonen-/Hydroxidionen und das Volumen der Oozyte bekannt sein.

$$c = \frac{n}{V_{\text{frei}}} \quad (2.1)$$

Ungefähr 37% des Volumens einer Oozyte sind freies Volumen (Zeuthen *et al.*, 2002), d.h. nicht durch Organellen belegt. Das freie Volumen der Oozyte V_{frei} beträgt also nur 37% des Gesamtvolumens einer Oozyte V_{Oocyte} . Für die Berechnung des Volumens einer Oozyte wird diese als kugelförmig angenommen, so dass sich für V_{frei} folgender Ausdruck ergibt: $V_{\text{frei}} = \frac{V_{\text{Oocyte}} \cdot 37}{100}$. Setzt man für V_{Oocyte} das Volumen einer Kugel ein und rechnet es in Liter um, so erhält man für das freie Volumen in Liter:

$$V_{\text{frei}} = \frac{37 \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3}{100} \cdot 1000 \quad (2.2)$$

Die Stoffmenge n ergibt sich aus der Anzahl der Ladungsträger N geteilt durch die Avogadro-Konstante N_A : $n = \frac{N}{N_A}$. Wobei die Anzahl der Ladungsträger N der Menge an Ladung Q geteilt durch die Elementarladung e entspricht: $N = \frac{Q}{e}$, so dass sich Gleichung 2.3 ergibt:

$$n = \frac{Q}{N_A \cdot e} \quad (2.3)$$

Die injizierte Ladung Q kann mit folgender Beziehung zwischen Ladung Q , Strom I und Zeit t berechnet werden: $dQ = I \cdot dt$. Setzt man diese Beziehung in Gleichung 2.3 ein, so ergibt sich Gleichung 2.4:

$$n = \frac{I \cdot t}{N_A \cdot e} \quad (2.4)$$

Setzt man nun die Gleichungen 2.4 und 2.2 in Gleichung 2.1 ein, so erhält man für die Konzentration den Ausdruck:

$$c = \frac{I \cdot t}{N_A \cdot e \cdot 370 \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3} \quad (2.5)$$

Für den Radius der Oozyte wurde $r = 600 \mu\text{m}$ angenommen. Da im Nenner nur Konstanten stehen, lässt sich der Nenner zu 0,0323 zusammenfassen, so dass die Konzentration c allein vom Strom I und der Applikationsdauer t abhängt.

$$c = \frac{I \cdot t}{0,0323} \quad (2.6)$$

Für eine Applikation von $t = 5 \text{ min}$ (300 s) erhält man bei einem Strom von $I = 300 \text{ nA}$ eine Konzentration von 2,79 mM H^+ bzw. OH^- .

2.4.4. Versuchsdurchführung

Die Doppelkanal-Elektrode wurde möglichst nah an der Zellmembran positioniert, dies ist sehr wichtig für die Messung schneller Änderungen des intrazellulären pH. Dazu wurde sie zuerst in die Oozyte eingestochen. Die Elektrodenspitze wurde mit Hilfe des Mikromanipulators kreisförmig gedreht um Dotterreste zu entfernen und anschließend möglichst nahe an die Innenseite der Zellmembran positioniert. Danach wurde die Stromelektrode möglichst weit entfernt von der pH-Elektrode in die Oozyte eingestochen, um mögliche elektrische Wechselwirkungen zu vermeiden. Bei den betreffenden Versuchen wurde die Spitze der HCl/NaOH-Elektrode möglichst mittig in der Oozyte platziert (vgl. Abbildung 2.4).

Um die von der pH-sensitiven Mikroelektrode aufgezeichnete Spannung in den pH umzurechnen, wurde die Elektrode vor jeder Messung kalibriert. Dafür wurde das Elektrodenpotential bei einem pH von 7,4 und 6,4 gemessen. Das Potential bei pH 7,4 wurde auf 0 mV gestellt. Da zwischen pH und Elektrodenpotential ein linearer Zusammenhang besteht, konnte durch die zwei Punkte eine Gerade gefittet und alle gemessenen Spannungen mittels der Geradengleichung in pH-Werte umgerechnet werden, woraus sich dann auch die $[H^+]$ berechnen ließ.

2.5. Optische pH-Messungen

Neben den pH-Messungen mit pH-sensitiven Mikroelektroden wurde der pH auch indirekt mit pH-sensitiven Fluoreszenz-Farbstoffen gemessen.

2.5.1. Beladung mit BCECF-AM

Als pH-sensitiver Fluoreszenz-Farbstoff wurde 2,7-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(6)-carboxyfluoreszein (BCECF; Invitrogen, USA) verwendet. BCECF wurde von Rink *et al.* 1982 eingeführt. Bei BCECF handelt es sich um eine Weiterentwicklung von Fluoreszin, mit 3 zusätzlichen Carboxylat-Gruppen, um die Hydrophobizität zu steigern. Außerdem kann der pK von Fluoreszin so von 6,4 auf 7,0 geändert werden. Der pK von 7,0 passt sehr gut zum pH_i von 7,3 in den Oozyten, was BCECF zu einem sehr gut geeigneten Farbstoff in dem erwarteten pH-Bereich von 7,4 bis 6,9 macht (Tsien, 1989).

Damit das BCECF von der Zelle aufgenommen werden kann, wurde es als Essigsäuremethylester (BCECF-AM) appliziert. Der AM „verdeckt“ die Ladungen der Carboxylatgruppen, so dass der BCECF-AM ungeladen ist und so die Membran passieren und in die Zellen aufgenommen werden kann. Durch Hydrolyse innerhalb der Zelle wird der AM abgespalten und so wird das geladene BCECF in der Zelle „gefangen“ (Tsien, 1981).

Für die Beladung der Oozyten wurden 2 μ l eines 5 mM BCECF-AM-Stocks in 200 μ l in $OR2^+$ (pH 7,4) verdünnt. Es wurden jeweils 5 Oozyten gleichzeitig für 90 min inkubiert und anschließend mit $OR2^+$ (pH 7,4) gewaschen und bis zur Verwendung dunkel gelagert.

2.5.2. 2-Photonen-Mikroskopie

In ihrer Dissertation untersuchte die spätere Nobelpreisträgerin Maria Göppert-Mayer die Wahrscheinlichkeit, dass ein angeregtes Atom seine Anregungsenergie in zwei Lichtquanten abgibt, deren Energiesumme der Anregungsenergie entspricht. Aber auch den

umgekehrten Prozess, die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Lichtquanten, deren Energiesumme der Anregungsenergie des Atoms entspricht, zusammenwirken und das Atom anregen (Göppert-Mayer, 1931; Abbildung 2.5). Die beiden Photonen müssen nicht zwingend die selbe Energie haben, lediglich die Frequenzsumme muss stimmen. Damit der Prozess der Doppelanregung stattfinden kann, müssen die Photonen neben der richtigen Energiesumme auch nahezu gleichzeitig auf das Molekül treffen, d.h. innerhalb von 0,1 fs (10^{-16} s). Die Wahrscheinlichkeit für solch eine Doppelaabsorption ist äußerst gering und quadratisch abhängig von der Photonendichte, so dass sehr hohe Intensitäten erforderlich sind.

Sie lieferte mit ihrer theoretischen Arbeit die Grundlage für die 2-Photonen-Mikroskopie, die durch Denk *et al.* (1990, 1994) entwickelt wurde. Denk *et al.* (1990, 1994) kombinierten die 2-Photonen-Anregung mit einem Laser-Scanning-Mikroskop. Die schon erwähnten sehr hohen Photonendichten, die nötig sind für die Doppelanregung, können nur über einen stark fokussierten gepulsten Laser realisiert werden. Der Durchmesser des Fokus ist beugungslimitiert auf $\leq 1 \mu\text{m}$, so dass die Photonendichte nur bei einem Volumen von ca. $0,1 \mu\text{m}^3$ hoch genug ist für die 2-Photonen-Anregung. Das hat den Vorteil, dass nur Farbstoff innerhalb dieses Volumens angeregt werden kann, im Gegensatz zur 1-Photonen-Anregung, bei der die gesamte Probe angeregt wird, da die Energie

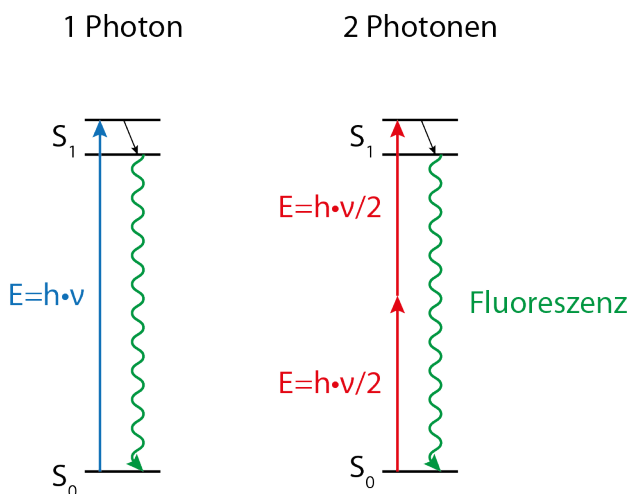


Abbildung 2.5.: Vereinfachtes Jablonski Diagramm einer 1- und 2-Photonen-Anregung. Bei der 1-Photonen-Anregung trifft die Energie eines Photons ($E = h \cdot \nu$) die Anregungsenergie, so dass ein Valenzelektron vom Grundzustand S_0 auf einen angeregten Zustand S_1 gehoben wird. Bei einer Doppelanregung müssen zwei Photonen mit passender Energiesumme innerhalb von 0,1 fs zusammentreffen. Entsprechend gering ist die Wahrscheinlichkeit. Aus dem angeregten Zustand S_1 kann das Valenzelektron unter Emission von Photonen (Fluoreszenz) wieder in den Grundzustand zurückkehren.

im gesamten Strahlengang für die Anregung ausreicht. Dadurch wird beim 2-Photonen-Mikroskop der Farbstoff wesentlich effizienter genutzt und so das Ausbleichen und die Phototoxizität reduziert.

Ein weiterer Vorteil liegt in der kleineren Frequenz der Photonen, da beim Eintreten des Lichts in die Probe hauptsächlich Rayleigh-Streuung auftritt, wird diese durch die kleinere Frequenz reduziert. Der Stoßquerschnitt der Rayleigh-Streuung ist proportional zur vierten Potenz der Frequenz des Lichts ($\sigma \sim \nu^4$). Das bedeutet, dass Licht mit halber Frequenz nur 1/16 der Streuung aufweist. Dadurch werden wesentlich höhere Eindringtiefen ins Gewebe möglich.

2.5.3. Verwendetes System

Das hier verwendete 2-Photonen-sMikroskop wurde von Till Photonics (Gräfelfing, Deutschland) zusammengestellt und aufgebaut. Die Grundlage war ein aufrechtes Mikroskop BW50XI (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), welches mit einem 10x Wasserimmersionsobjektiv (10x/0,3W UMPlan FL, Olympus) ausgestattet war. Für die 2-Photonen-Anregung wurde ein Titan-Saphir-Laser (Mira 900; Coherent, Santa Clara, USA) genutzt. Als Pump laser diente ein Neodym-Vanadat-Feststofflaser (Verdi 5; 532 nm, Coherent), welcher wiederum von einem Lithium-Borat-Laser (LBO, Coherent) gepumpt wurde.

Die Fluoreszenz-Signale wurden über einen Photomultiplier (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Japan) detektiert und an einen Computer mit der Software FluoView V300 4.0a (Olympus) weitergeleitet und aufgezeichnet.

2.6. Massenspektrometrie

Die Aktivität der Carboanhydrasen wurde in einem Gas-Massenspektrometer über die Umwandlung von ^{18}O -markiertem CO_2 bestimmt. Die Methode wurde von Silverman und Kollegen in den 1980er Jahren entwickelt (Silverman, 1982; Tu *et al.*, 1987). Die Aktivität der Carboanhydrase wurde über den Abbau des doppelt mit ^{18}O markiertem CO_2 ($^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$; $m/z=49$) bestimmt. Die zugrunde liegende Hydratisierungs-/Dehydratisierungs-Reaktion findet spontan statt und durch CAs katalysiert, so dass die katalytische Aktivität der CA bestimmt werden konnte. Das doppelt markierte CO_2 wurde aus ^{18}O -markiertem Wasser (H_2^{18}O ; Hyox18, 98,33% Atomanreicherung; Rotem Industries Ltd., Israel) und ^{13}C markiertem $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ (99,1% Atomanreicherung; Chemootrade, Leipzig)

hergestellt. Das Reaktionsschema des Abbaus von $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ ($m/z=47$) zu $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ($m/z=45$) ist in Abbildung 2.6 A dargestellt.

Da das beim Abbau entstehende H_2^{18}O quasi unendlich in H_2^{16}O verdünnt ist, sind die Reaktionen quasi irreversibel. Die Konzentrationen der drei CO_2 -Isotope ($m/z=49$, $m/z=47$, $m/z=45$) wurden mittels eines Quadrupol-Massenspektrometers (OmniStar GSD 320, Pfeiffer Vacuum GmbH, Asslar) aufgezeichnet. Das Massenspektrometer war über eine beheizbare Kapillare mit der Messkammer verbunden. Die Messkammer wurde mit 6 ml $\text{OR}2^+$ (pH 7,3) befüllt und anschließend 6 μl des markierten Bicarbonat hinzugefügt (1:1000 Verdünnung), so dass die Abreicherung des $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ gemessen werden konnte. Aus den Konzentrationen der drei CO_2 -Isotope ([49], [47], [45]) wurde der relative Abbau, das so genannte *log enrichment* (LE), folgendermaßen berechnet: $\text{LE} = \log \frac{[49] \cdot 100}{[49] + [47] + [45]}$. Das durch spontane De-/Hydratisierung LE (LE_S) wurde für 5 min gemessen und anschließend 20 lysierte Oozyte (aufgefüllt auf 100 μl mit $\text{OR}2^+$) und das katalysierte LE (LE_{CA}) für 10 min gemessen (Abbildung 2.6 B). Zur Bestimmung des LE wurde im jeweiligen Bereiche eine Regressionsgerade gelegt und so die Abbaurrate bestimmt. Aus dem spontanen und dem katalysierten LE wurde nach der Definition

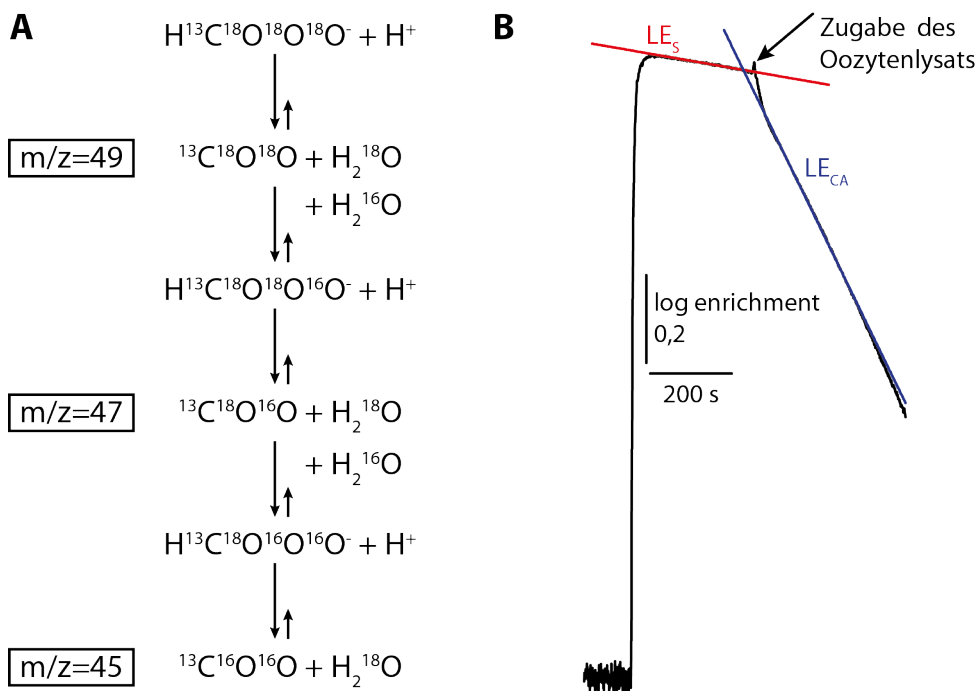


Abbildung 2.6.: Messprinzip der massenspektrometrischen Aktivitätsbestimmung. (A) Reaktionsschema des Abbaus von doppelt markiertem CO_2 ($m/z=49$) zu nicht markiertem CO_2 ($m/z=45$). Ein Verlauf des LE ist in (B) dargestellt. Für die Ermittlung der katalytischen Aktivität wurde LE_{CA} (Blau) durch die spontane Abbaurrate LE_S (Rot) geteilt.

von Badger & Price (1989) die Enzymaktivität in *Units* berechnet: $U = \frac{LE_{CA} - LE_S}{LE_S}$. So entspricht eine *Unit* eine Stimulation von 100% im Vergleich zu nicht katalytischen Anreicherung des ^{18}O .

Damit die gemessene Enzymaktivität in *Units* in die Menge exprimierter CA umgerechnet werden konnte, wurde das System durch Zugabe von aufgereinigtem CA-Protein in die Küvette kalibriert.

2.7. Auswertung & Statistik

2.7.1. Auswertung von ΔpH_i und $\Delta\text{pH}_i/\Delta t$

Nach der Umrechnung der gemessenen Spannungen in pH-Werte (Unterabschnitt 2.4.4), konnten aus der sich ergebenden Kurve die Amplitude (ΔpH_i) und die Rate der Änderung ($\Delta\text{pH}_i/\Delta t$), wie in Abbildung 2.7 gezeigt, ermittelt werden. Die Amplitude ergab sich aus der Differenz zwischen der Basislinie und der Plateaulinie. Zur Bestimmung der Änderungsrate wurde mit dem Programm Origin 8 (OriginLab Corporation, USA) eine Regressionsgerade in den Anstieg gefittet, wobei deren Steigung der Änderungsrate entspricht.

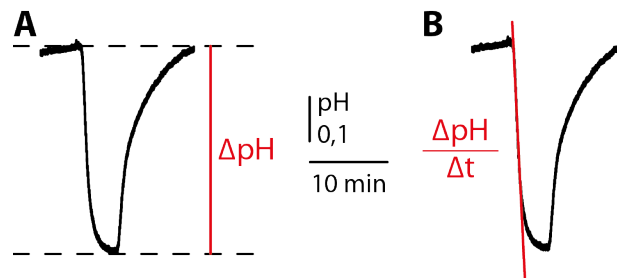


Abbildung 2.7.: Auswertung von ΔpH_i und $\Delta\text{pH}_i/\Delta t$.

2.7.2. Berechnung der Pufferkapazität β

Für die Berechnung der Pufferkapazität wurde die allgemeine Gleichung der Pufferkapazität verwendet: $\beta = \frac{d[\text{A}^-]}{d\text{pH}_i}$. Allerdings kann aus praktischen Gründen keine unendlich kleine Menge an Säure appliziert werden. Die Konzentration an applizierter Säure, also Protonen, entspricht der Menge der Anionen $[\text{A}^-]$, da für jedes entstehende Proton auch ein Anion entsteht. Die Konzentration an Anionen kann über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet werden. Im Endeffekt berechnet sich die Pufferkapazität also aus der Änderung der Anionenkonzentration geteilt durch die gemessene pH-Änderung.

Eine schwache Säure, wie in diesem Fall Buttersäure ($pK_s=4,82$), dissoziiert nicht vollständig, so dass immer ein gewisser Anteil undissoziiert vorliegt. Die undissoziierte Säure (HA) kann über die Membran diffundieren (McLaughlin & Dilger, 1980) und in der Zelle dissoziieren, so dass so Säure bzw. H^+ in die Zelle gebracht werden kann. Bei einer totalen Konzentration ($HA+A^-$) von 20 mM und einem Lösungs pH von 7,4 beträgt die $[HA]$ 0,0525 mM. Da nur die undissoziierte Säure membranpermeabel ist, stellt sich intrazellulär die gleiche $[HA]$ von 0,0525 mM ein. In der Zelle dissoziiert HA dann wieder zu H^+ und A^- . Bei einem intrazellulären pH von 6,9, während der Applikation von 20 mM Butyrat, entstehen so 6,31 mM an A^- .

2.7.3. Auswertung der Verzögerung δ

Die Verzögerung δ ist die Zeit, die zwischen der detektierten Änderung des pH_i an der Zellmembran und dem Start der Injektion von H^+ bzw. OH^- vergangen ist. Um den Anfangspunkt der pH-Antwort genau zu bestimmen, wurde wie in Abbildung 2.8 dargestellt verfahren. Da der Startpunkt der Steigung schwierig zu bestimmen war, wurden die Basislinie und der Anstieg jeweils linear gefittet. Dies geschah mit dem Programm Origin 8 (OriginLab Corporation). Der Schnittpunkt der beiden Geraden wurde als Startpunkt gewählt, so dass die Zeitdifferenz zwischen dem Start der Injektion und dem Start der pH-Änderung zuverlässig ermittelt werden konnte.

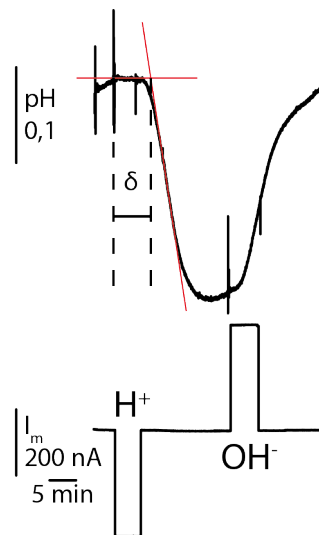


Abbildung 2.8.: Auswertung der Verzögerung δ

2.7.4. Statistik und graphische Darstellung

Die aufgezeichneten Daten wurden mit der Software Origin 8 (OriginLab Corporation) und Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA) ausgewertet. Die Abbildungen wurden mit Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems GmbH, USA) erstellt. Die Werte wurden als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler angegeben. Zur Überprüfung signifikanter Unterschiede zweier Datensätze wurde der Student's t-test durchgeführt. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von höchstens 5% ($p \leq 0,05$) wurde mit *, 1% ($p \leq 0,01$) mit ** und 0,1% ($p \leq 0,001$) mit *** gekennzeichnet. Der Vergleich innerhalb eines Zelltyps zwischen Ab- und Anwesenheit von EZA wurde Analog mit °, °° und °°° gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Warum pH und nicht $[H^+]$

Der pH ist der negative dekadische Logarithmus der Protonenkonzentration, $pH = -\log_{10}[H^+]$. Der Logarithmus der pH-Skala führt zu einer gewissen Unverständlichkeit, da es schwieriger ist logarithmisch als linear zu denken. Daher bietet die $[H^+]$ Skala den Vorteil der Linearität. Des Weiteren ist der pH-Bereich in der Physiologie im Allgemeinen sehr beschränkt, meist liegt er zwischen 6 und 8, d.h. zwischen 1000 und 10 nM. Dieser Bereich kann auch gut ohne eine logarithmische Skala überblickt werden ohne, dass man zu große oder zu kleine Zahlenwerte hätte.

Gegen die Verwendung der linearen $[H^+]$ Skala sprechen trotz den erwähnten Vorteilen zwei wichtige Punkte, zum einen die Methodik wie der pH bzw. $[H^+]$ gemessen wird und zum anderen darf eine lineare Skala nicht mit einem linearen Verhalten verwechselt werden. Das lineare Verhalten aber ist das, was intuitiv und damit gewünscht ist.

3.1.1. Messtechnik

Um sowohl den intra- als auch den extrazellulären pH von Zellen zu messen, stehen im wesentlichen zwei verschiedene Methoden zur Auswahl; pH-sensitive Mikroelektroden und pH-sensitive Farbstoffe. Beiden Methoden ist gemeinsam, dass die Messparameter proportional zum pH sind. Bei Mikroelektroden ist dies das Potential und bei Farbstoffen die Fluoreszenz. Daraus ergibt sich, dass die Messparameter gegenüber dem pH normalverteilt sind. Durch die Relation $pH = -\log[H^+]$ ergibt sich, dass die Messparameter eine log-Normalverteilung gegenüber der Protonenkonzentration aufweisen, denn es gilt: Ist die Zufallsvariable \mathcal{X} normalverteilt mit $\mathcal{N}(\mu, \sigma^2)$, dann ist die Zufallsvariable $Y = e^{\mathcal{X}}$ log-normalverteilt mit $\mathcal{LN}(\mu, \sigma^2)$.

3.1.1.1. Normalverteilung und Log-Normalverteilung (arithmetisches und geometrisches Mittel)

Der Unterschied zwischen beiden Verteilungen wird am besten deutlich, wenn wir uns folgendes Beispiel betrachten:

Wenn man 100 Messungen des pH-Wertes in der gleichen Lösung macht, und annimmt, dass die Messungen normalverteilt sind mit Erwartungswert $\mu = 7,4$ und Standardabweichung $\sigma = 0,5$, dann ist der Mittelwert $\mu = 7,4$ und Standardabweichung $\sigma = \sqrt{(1/100)} \cdot 0,5 = 0,05$.

Wenn man dagegen die H^+ -Konzentrationen berechnet und der pH normalverteilt ist, dann gilt: $[H^+] = 10^{-pH} = e^{(-pH \cdot \ln 10)}$ und die Konzentration an $[H^+]$ sind log-normalverteilt mit den Parametern $\mu = -7,4 \cdot \ln 10$ und $\sigma = 0,5$ (nach Definition der Log-Normalverteilung). Der Erwartungswert der Log-Normalverteilung ist aber nicht, wie man erwarten könnte, gleich e^μ , sondern $e^{(\mu - \frac{\sigma^2}{2})}$, also nicht $e^\mu = 10^{(-7,4)} = 39,8107 \cdot 10^{-9}$ sondern $e^{(\mu - \frac{\sigma^2}{2})} = 45,1115 \cdot 10^{-9}$ was einem pH-Wert von 7,34571 entsprechen würde. Der Unterschied ist nicht sehr groß, aber vorhanden und nimmt mit steigender Standardabweichung σ zu.

Der Unterschied der hier zu Tage tritt, beruht auf dem Unterschied zwischen arithmetischem und geometrischem Mittel. Während bei der Normalverteilung der Erwartungswert μ mit dem arithmetischen Mittel übereinstimmt, ist der Erwartungswert bei der log-Normalverteilung das geometrische Mittel. Zur Veranschaulichung sind beide Mittel in Abbildung 3.1 dargestellt.

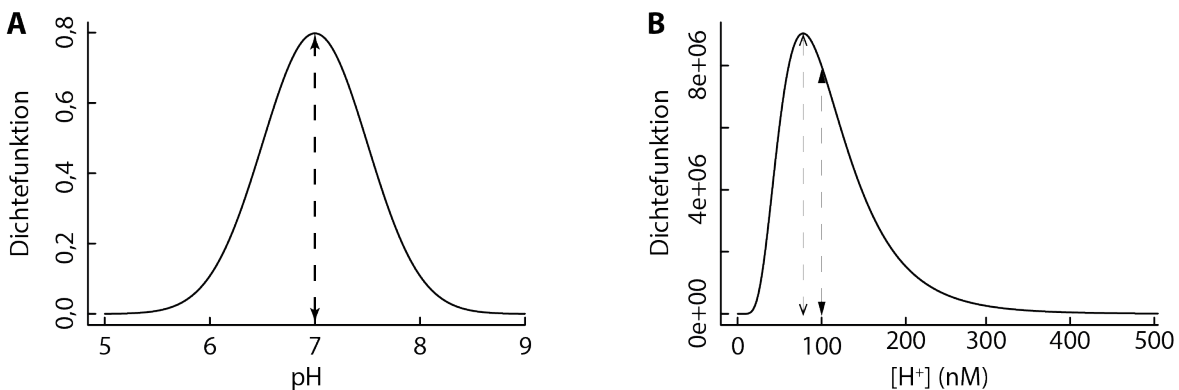


Abbildung 3.1.: Normalverteilung und log-Normalverteilung. Die Abbildung zeigt eine Normalverteilung (A) definiert durch Erwartungswert $\mu = 7,0$ und Standardabweichung $\sigma = 0,5$ und eine log-Normalverteilung (B) mit dem gleichen Erwartungswert und gleicher Standardabweichung wie die Normalverteilung

Diese theoretischen Überlegungen können durch die Messergebnisse gestützt werden, die in Tabelle 3.1 dargestellt sind. So zeigt sich, dass der Mittelwert des pH \overline{pH} nicht über die Relation $\overline{[H^+]} = 10^{-\overline{pH}}$ in den Mittelwert der $[H^+]$ $\overline{[H^+]}$ umgerechnet werden kann. Berechnet man den Mittelwert der $[H^+]$ aus \overline{pH} so erhält man 45,04 nM (das geometrische Mittel), was nicht $\overline{[H^+]} = 46,62$ nM entspricht (Tabelle 3.1).

3.1.2. Lineares Verhalten

Auch hier hilft zur Veranschaulichung ein kurzes Beispiel. Nehmen wir an, dass wir zwei Lösungen haben, welche sich nur im pH (und damit in der $[H^+]$) unterscheiden. Lösung 1 hat einen pH -Wert von 8,0 (Abbildung 3.2) und Lösung 2 einen pH -Wert von 6,0 (Abbildung 3.2).

Gleichbedeutend mit den pH -Werten hat Lösung 1 eine $[H^+]$ von 10 nM und Lösung 2 von 1000 nM. Mischt man nun gleiche Volumina (in diesem Fall jeweils 100 ml) von Lösung 1 und 2, so erhält man eine Lösung mit einem pH von 7. Der Misch- pH von 7 entspricht einer $[H^+]$ von 100 nM. Praktisch wurde pH 6,95 gemessen (Abbildung 3.2), was einer $[H^+]$ von 112,2 nM entspricht. Bildet man jedoch den Durchschnitt, nicht

Tabelle 3.1.: pH -Werte und $[H^+]$ von Oozyten in Ruhe. Da der pH -Wert normalverteilt ist, stimmen hier arithmetisches und geometrisches Mittel überein. Bei der log-normalverteilten Konzentration ist das nicht der Fall.

Zelle #	pH -Wert	konvertierte $[H^+]$
1	7,384636589	41,24425
2	7,320924861	47,76119
3	7,486033156	32,65629
4	7,258331811	55,16558
5	7,276312465	52,92825
6	7,333650809	46,38197
7	7,423753929	37,69173
8	7,656315358	22,06402
9	7,341216913	45,58092
10	7,334738046	46,266
11	7,29025961	51,25549
12	7,235884494	58,09189
13	7,161193271	68,99327
arithmetisches Mittel	7,346403947	46,62160385
geometrisches Mittel	7,345439566	45,03975847
Standardabweichung	0,124599433	11,81677544

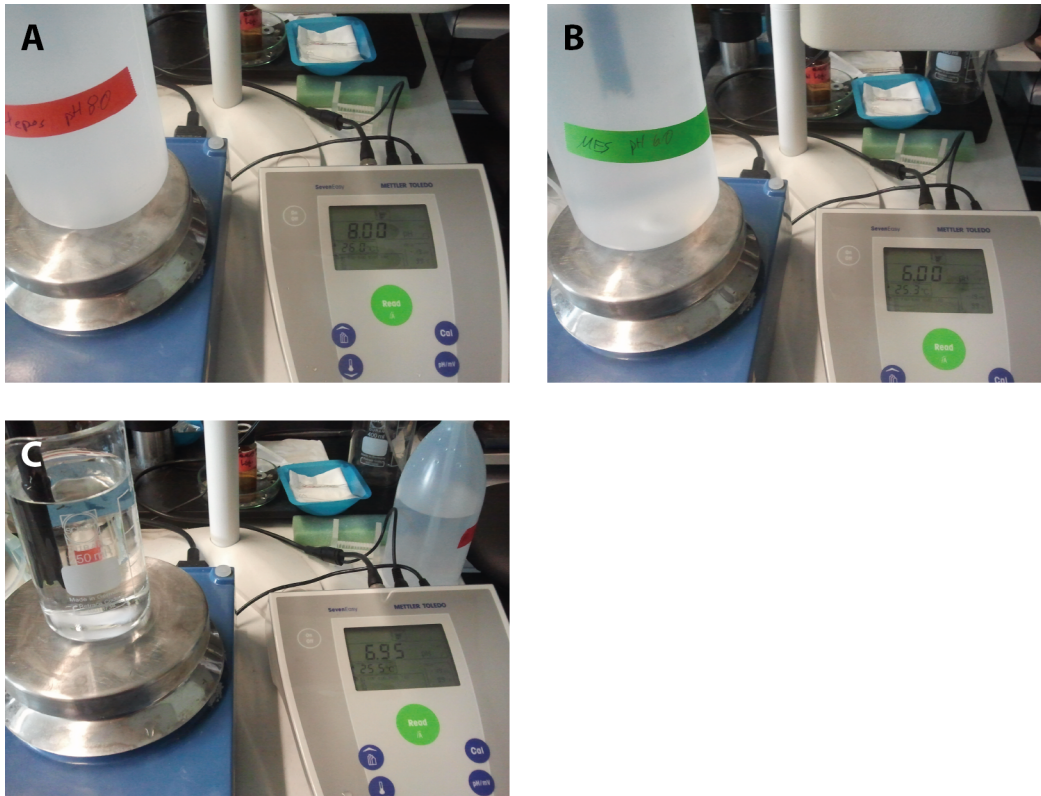


Abbildung 3.2.: Mischen einer HEPES gepufferten Lösung (pH 8,0) und einer MES gepufferten Lösung (pH 6,0). Es wurden jeweils 100 ml der HEPES gepufferten Lösung mit pH 8,0 und der MES gepufferten Lösung mit pH 6,0 gemischt und ein pH von 6,95 gemessen.

im pH sondern in der $[H^+]$, würde sich eine $[H^+]$ von 505 nM ($\frac{10^{+1000}}{2}$) ergeben. Das bedeutet, dass nicht die $[H^+]$ sondern der pH ein lineares Verhalten zeigen.

Der Grund hierfür liegt in der Autoprotolyse des Wasser, $H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$. Das Produkt von Protonen und Hydroxidionen bleibt dabei stets konstant ist, $[H^+] \cdot [OH^-] = K_w$, die Dissoziationskonstante von Wasser. Bei Raumtemperatur beträgt sie 10^{-14} , d.h. bei pH 7 ist $[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}$ der neutrale pH-Wert.

Dadurch, dass die H^+ -Ionen immer in einem Gleichgewicht mit Wasser stehen, ist eine Zugabe bzw. Wegnahme von H^+ -Ionen immer abhängig von dem momentanen Zustand dieses Gleichgewichtes. Deshalb muss jede Änderung immer auf die Ausgangskonzentration normiert werden. Genau das wird getan, wenn man sich Änderungen des pH-Wertes anschaut. Eine infinitesimal kleine pH-Änderung, $dpH = d(-\log[H^+])$, lässt sich über die Kettenregel auch als $dpH = -\frac{dH}{\ln 10 \cdot H_0}$ schreiben. Eine Änderung im pH ist also nichts anderes als eine auf die Ausgangskonzentration (H_0) normierte Änderung der $[H^+]$.

Das macht es notwendig, statt dem arithmetischen das geometrische Mittel zu verwenden. Bildet man das geometrische Mittel aus 1000 nM und 10 nM, so erhält man 100 nM. Aus diesen Gründen werden in der vorliegenden Arbeit alle $[H^+]$ als pH dargestellt und diskutiert.

3.2. CO₂-Sensitivität

Der verwendete pH-sensitive Cocktail (Unterabschnitt 2.4.1) wies neben der pH-Sensitivität auch eine CO₂-Sensitivität auf (Abbildung 3.3 A). Um dies zu quantifizieren, wurde eine pH-Elektrode zu erst kalibriert und danach zu erst mit einer 2% CO₂/10 mM HCO₃⁻ und im Anschluss mit einer 5% CO₂/25 mM HCO₃⁻ haltigen Lösung umspült. Wie auch die HEPES-Lösung hatten auch die CO₂-Lösungen einen pH von $7,40 \pm 0,01$, der ständig überprüft wurde. Damit wurde sichergestellt, dass jegliche Änderungen des Elektrodenpotentials nicht durch eine Änderung des pH hervorgerufen wurden. Für die statistische Auswertung wurde der Versuch mit einer Elektrode fünfmal wiederholt (n=5). Wurde die Lösung von 0% CO₂ (HEPES) zu 2% CO₂ geändert, ergab sich eine Änderung des pH-Signals von $0,094 \pm 0,009$. Eine weitere Erhöhung der [CO₂] führte zu einer weiteren Erhöhung des pH-Signals um $0,130 \pm 0,010$, was eine Gesamtänderung von $0,227 \pm 0,010$ ergibt (Abbildung 3.3 B).

3.3. Charakterisierung des intrinsischen Puffersystems der Oozyte

Da das intrinsische Puffersystem nicht nur aus einem Säure-/Base-Paar besteht, sondern aus einem Gemisch mit verschiedenen pK_s-Werten, musste das intrinsische Puffersystem in seiner Komposition in der Oozyte charakterisiert werden. Dazu wurde über einen breiten (physiologischen) pH-Bereich die Pufferkapazität bestimmt. Um den Ruhe-pH zu verstellen wurden jeweils für 5 Minuten 300 nA H⁺ bzw. OH⁻ über eine Elektrode injiziert. Damit sich der pH äquilibrieren konnte, wurde nach der Injektion 15 Minuten gewartet, und anschließend die Pufferkapazität bestimmt. Die Pufferkapazität wurde bestimmt indem 20 mM Butyrat appliziert wurden.

In Abbildung 3.4 A ist eine Originalregistrierung des pH_i dargestellt. Die aufgenommenen Pufferkapazitäten wurden gegen den jeweiligen pH_i dargestellt (Abbildung 3.4 B) und mit der theoretischen Funktion für die intrinsische Pufferkapazität eines monoprolytischen Puffers, $\beta_i = \frac{\ln 10 \cdot B_{tot} \cdot 10^{pH - pK}}{(1 + 10^{pH - pK})^2}$ gefittet (Abbildung 3.4 C). Die Funktion eines

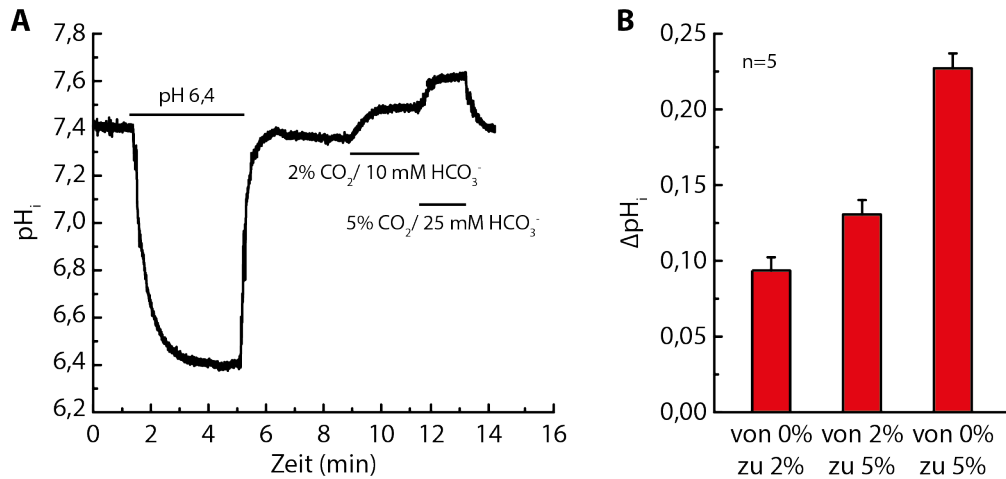


Abbildung 3.3.: CO₂-Sensitivität der pH-sensitiven Mikroelektrode. (A) Ließ man über eine pH-sensitive Elektrode im Bad eine 5% CO₂/25 mM HCO₃⁻-laufen, so änderte sich ihr Potential und damit das pH-Signal. Da der pH aber in allen verwendeten Lösungen konstant $7,40 \pm 0,01$ betrug, ist die Änderung des pH-Signals auf eine CO₂-Sensitivität zurückzuführen. (B) Der Versuch wurde mit einer Elektrode 5 mal wiederholt und die Änderungen des pH-Signals ausgewertet, für einen Wechsel von 0% zu 2% CO₂ und von 2 zu 5% CO₂ sowie die Gesamtänderung von 0% zu 5%.

monoprotolytischen Puffers passt sehr gut zu dem gemessenen Verlauf der Pufferkapazität über den pH, so dass es hinreichend genau ist die intrinsischen Puffer der Oozyte als einen Puffer mit dem pK_s von 6,9 und einer Konzentration von 40,5 mM anzunehmen.

Leitet man die Henderson-Hasselbalch-Gleichung nicht nach dem pH ab, wie man es für die Pufferkapazität tut, sondern nach $[H^+]$, so erhält man die Pufferratio $\rho = \frac{K_s \cdot [H^+]}{(K_s + [H^+])^2}$. Diese wurde ebenfalls durch die Applikation von 20 mM Butyrat bestimmt und gegen $[H^+]_i$ aufgetragen (vgl. Abbildung 3.4 D). Auch hier kann der Verlauf mit der theoretischen Funktion für einen monoprotolytischen Puffer gefittet werden (Abbildung 3.4 E & F). Vergleicht man den Verlauf von Pufferratio und -kapazität, zeigt sich ein komplett unterschiedlicher Verlauf. Während die Pufferkapazität ein Maximum bei $pH = pK_s$ hat und links und rechts von diesem Maximum abfällt, hat die Pufferratio ihr Maximum bei $[H^+] = 0$ und fällt dann exponentiell ab mit steigender Konzentration (sinkendem pH).

Der bestimmte pK_s -Wert des intrinsischen Puffersystems liegt mit 6,9 im Bereich von Carnosinderivaten und Phosphatresten.

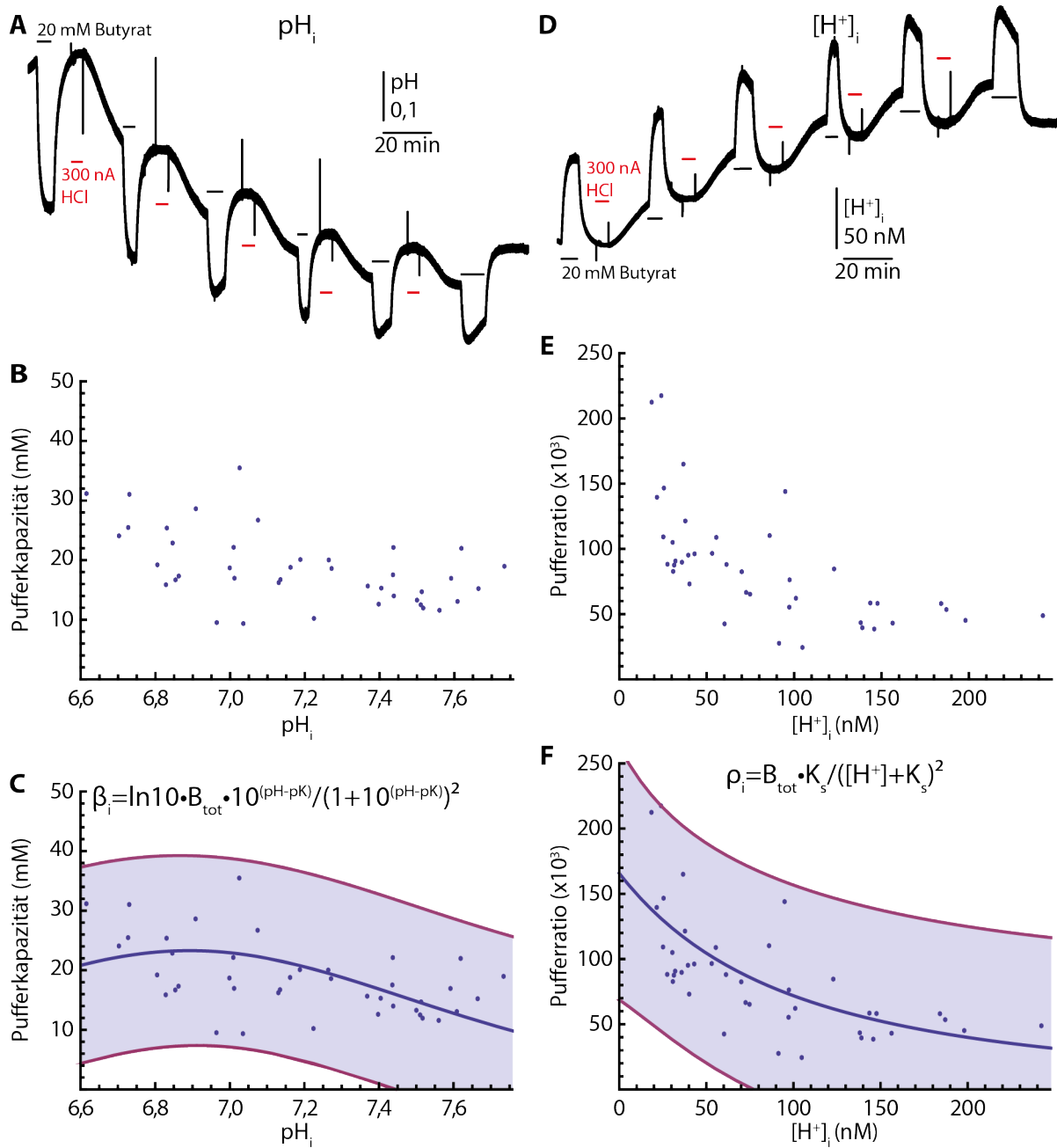


Abbildung 3.4.: Charakterisierung des intrinsischen Puffersystems der Oozyte. Originalregistrierung des pH_i (A) und der $[\text{H}^+]_i$ (D) während der Änderung der Ausgangskonzentration durch elektrophoretische Injektion von H^+ und anschließender Bestimmung der Pufferkapazität durch Applikation von 20 mM Butyrat. Die gemessenen Pufferkapazitäten wurden gegen den pH_i aufgetragen (B) und mit $\beta_i = \frac{\ln 10 \cdot B_{\text{tot}} \cdot 10^{\text{pH} - \text{pK}}}{(1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}})^2}$ gefittet (C). (E) zeigt die gemessene Pufferratio aufgetragen gegen die $[\text{H}^+]_i$. Die in (E) aufgetragenen Datenpunkte wurden ebenfalls mit der theoretischen Funktion für die Pufferratio gefittet, $\rho_i = \frac{B_{\text{tot}} \cdot K_s}{([\text{H}^+] + K_s)^2}$ (F).

3.4. Globale Ansäuerung über die Zellmembran

Nachdem die intrinsische Pufferkapazität in Abschnitt 3.3 charakterisiert worden ist, sollte nun das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem untersucht werden. Hierzu wurde das Cytosol in Ab- und Anwesenheit des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem mit der schwachen Säure Buttersäure angesäuert und die resultierende Änderung des pH_i gemessen. Da Carboanhydrasen die reversible Hydratisierung von CO_2 katalysieren, wurde auch der mögliche Einfluss der intrazellulären CAII und der extrazellulären CAIV auf das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem untersucht. Dafür wurden die Versuche in nativen (keine CA-Aktivität), in CAII- und zum Teil auch in CAIV-exprimierenden Oozyten vorgenommen. Als Kontrolle wurden die Versuche zusätzlich unter Anwesenheit des CA-Inhibitors Ethoxyzolamid (EZA) durchgeführt.

3.4.1. In 5% $\text{CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$

Der CO_2 -Partialdruck (P_{CO_2}) im Blut liegt in der Regel zwischen 4,5 und 6%. Aus diesem Grund wurde hier ein P_{CO_2} von 5% gewählt, mit dem die Extrazellulärlösung konstant begast wurde. Bei einem Lösungs-pH von 7,4 ergibt sich damit eine $[\text{HCO}_3^-]$ von 25 mM.

Um den Einfluss von intra- sowie extrazellulärer CA-Aktivität auf das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem zu untersuchen, wurden 20 mM Butyrat in An- und Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ und jeweils unter 30 μM EZA (da immer die selbe Konzentration verwendet wurde, wird im folgenden die Konzentration weggelassen) auf native, CAII- und CAIV-exprimierende Oozyten appliziert. Die Amplitude und die Rate der Änderung des pH_i wurden bestimmt (Abbildung 3.5 A,B,D). Auch die durch Applikation von 5% $\text{CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$ induzierte Änderung des pH_i wurde so analysiert (Abbildung 3.5 A,C,E).

Bei allen drei Zelltypen zeigte sich, dass die durch Butyrat induzierte Ansäuerung in Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ signifikant reduziert war ($p \leq 0,001$). Die Amplitude betrug bei nativen Oozyten ($n=13$) $-0,45 \pm 0,02$ in HEPES und in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ $-0,12 \pm 0,01$. In CAII-exprimierenden Zellen ($n=14$) ging die Amplitude von $-0,46 \pm 0,02$ auf $-0,08 \pm 0,01$ zurück. Bei CAIV-exprimierenden Oozyten ($n=8$) betragen die Amplituden $-0,49 \pm 0,04$ bzw. $-0,07 \pm 0,01$.

In Anwesenheit von EZA zeigte sich das gleiche Bild. Die Amplituden waren jeweils signifikant reduziert in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ($p \leq 0,001$). Native Oozyten zeigten eine Reduktion von $-0,49 \pm 0,03$ in HEPES auf $-0,13 \pm 0,01$ in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. Bei CAII-exprimierenden Oozyten reduzierte sich die Amplitude von $-0,50 \pm 0,02$ auf $-0,13 \pm 0,01$ und bei CAIV-exprimierenden Oozyten von $-0,53 \pm 0,02$ auf $-0,12 \pm 0,02$.

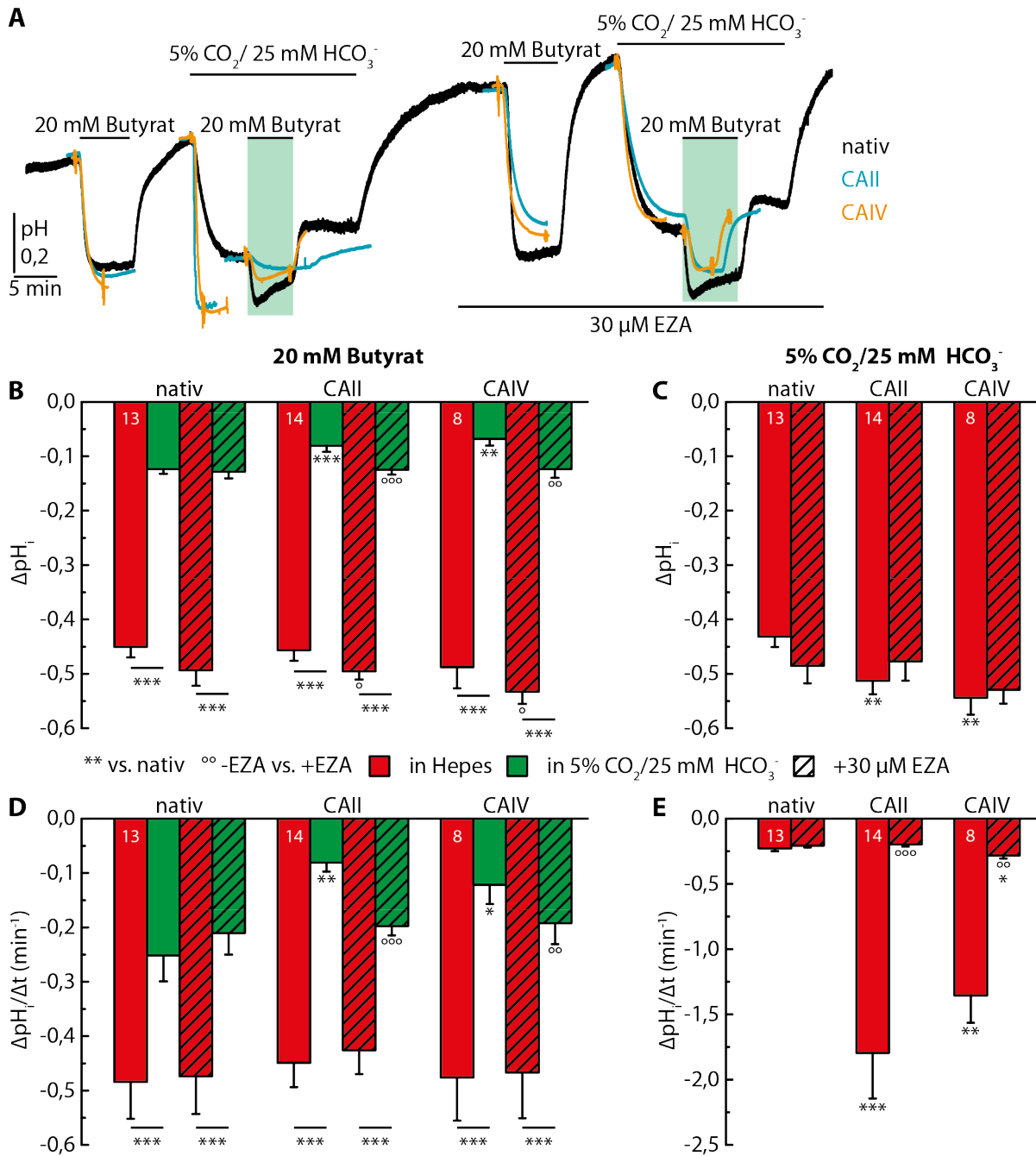


Abbildung 3.5.: Globale Ansäuerung (pH) durch Butyrat in CO₂-freier und in 5%CO₂/25 mM HCO₃⁻ Lösung. (A) zeigt die Originalregistrierungen des pH_i von nativen, CAII-exprimierenden und CAIV-exprimierenden Oozyten während der Applikation von 20 mM Butyrat in CO₂-freier und in 5% CO₂/25 mM HCO₃⁻ Lösung (grün unterlegt, korrespondierend zur Balkenfarbe in B & D), sowie jeweils in Anwesenheit von 30 μM EZA. Die durch die Butyrat Applikation induzierte Änderung des pH_i ist in (B) dargestellt, die Änderungsrate in (D). Die CA-Expression führt zu einer reduzierten Amplitude und Änderungsrate, dieser Effekt kann durch EZA aufgehoben werden. (C & E) zeigen die Amplitude und die Änderungsrate induziert durch die Applikation von 5% CO₂/25 mM HCO₃⁻. Die Asteriske direkt über den Balken beziehen sich auf die korrespondierende Applikation in nativen Oozyten. Die Kreise beziehen sich auf die jeweilige Applikation ohne EZA innerhalb des gleichen Zelltyps.

In HEPES gepufferter Lösungen zeigte sich bei der Amplitude kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelltypen, auch nicht in der Anwesenheit von EZA. Allerdings waren bei CAII- und CAIV-exprimierenden Oozyten die Amplituden in HEPES mit EZA signifikant erhöht im Vergleich zur Amplitude ohne EZA ($p \leq 0,05$). In nativen Oozyten zeigte sich keine signifikante Änderung der Amplitude mit EZA.

Die Amplituden in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ waren bei den CAII- und CAIV-exprimierenden Zellen signifikant kleiner ($p \leq 0,001$ bzw. $p \leq 0,01$) als bei nativen Zellen. Wurde die katalytische Aktivität durch EZA geblockt, unterschieden sich die Amplituden nicht mehr signifikant von den nativen Oozyten. So war auch der Unterschied in der Amplitude in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ mit und ohne EZA bei CAII- und CAIV-exprimierenden Oozyten statistisch signifikant ($p \leq 0,001$ bzw. $p \leq 0,01$).

Die Änderungsrate des pH_i induziert durch Applikation von 20 mM Butyrat (Abbildung 3.5 D) war in allen drei Zelltypen in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ signifikant kleiner als in HEPES gepufferter Lösung ($p \leq 0,001$). In nativen Zellen reduzierte sich die Änderungsrate von $-0,48 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ auf $-0,25 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$. Die CAII-exprimierenden Oozyten zeigten eine Reduktion der Rate von $-0,45 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ auf $-0,08 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$. Bei CAIV-exprimierenden Oozyten reduzierte sich die Rate von $-0,48 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$ auf $-0,12 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$.

Unter EZA waren ebenfalls alle Änderungsraten, induziert durch Applikation von 20 mM Butyrat, in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ signifikant ($p \leq 0,001$) reduziert im Vergleich zur Applikation in HEPES. Bei nativen Oozyten zeigte sich eine Reduktion von $-0,47 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ auf $-0,21 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$. Die Ansäuerungsrate bei CAII-exprimierenden Zellen betrug in HEPES $-0,43 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ und in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ $-0,20 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ und in CAIV-exprimierenden Oozyten $-0,47 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$ bzw. $-0,19 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$.

In allen drei Zelltypen hatte EZA keinen signifikanten Effekt auf die Änderungsrate in HEPES. Auch zeigte der Vergleich der CA-exprimierenden mit den nativen Oozyten in HEPES keinen signifikanten Unterschied. In $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ jedoch war die Änderungsrate der CA-exprimierenden Oozyten signifikant niedriger ($p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,05$) als bei nativen Oozyten. Diese Reduktion der Änderungsrate konnte durch EZA geblockt werden, so dass hier die Änderungsrate sich nicht mehr signifikant von der Änderungsrate nativer Oozyten unterschied.

Zur Kontrolle der CA-Aktivität diente die Applikation von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. Durch die Katalyse der reversiblen CO_2 -Hydratisierung wird die Produktion von H^+ -Ionen beschleunigt und damit auch der Abfall des pH_i . Die Analyse der $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ induzierten Amplitude (Abbildung 3.5 C) zeigt, dass die Amplitude der CA-exprimierenden Oozyten im Vergleich zu den nativen Oozyten signifikant ($p \leq 0,01$) erhöht war. So betrug die

Amplitude bei nativen Oozyten $-0,43 \pm 0,02$, bei CAII-exprimierenden $-0,51 \pm 0,02$ und bei CAIV-exprimierenden Oozyten $-0,54 \pm 0,03$. In Anwesenheit von EZA zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelltypen. Die Amplituden betragen $-0,49 \pm 0,03$ in nativen Oozyten, $-0,48 \pm 0,04$ in CAII-exprimierenden Oozyten und $-0,53 \pm 0,03$ in CAIV-exprimierenden Oozyten.

Die Änderungsrate des pH_i induziert durch Applikation von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ist in Abbildung 3.5 E dargestellt. In nativen Oozyten betrug die Änderungsrate $-0,23 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ und in Anwesenheit von EZA $-0,21 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$, was sich nicht signifikant unterscheidet. Die CAII-Expression führte zu einer signifikanten Steigerung ($p \leq 0,001$) der Ansäuerungsrate im Vergleich zu nativen Zellen, sie betrug $-1,79 \pm 0,35 \text{ min}^{-1}$. Unter EZA war die Ansäuerungsrate signifikant reduziert ($p \leq 0,001$) und lag mit $-0,19 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ auf dem Niveau der nativen Oozyten. Auch die Expression von CAIV führte zu einer signifikanten Steigerung ($p \leq 0,01$) der Ansäuerungsrate ($-1,35 \pm 0,21 \text{ min}^{-1}$). Unter EZA war die Rate signifikant kleiner ($p \leq 0,01$) und betrug $-0,28 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$. Damit war die Rate signifikant höher ($p \leq 0,05$) als bei nativen Oozyten unter EZA. Die CAII und CAIV wurden also exprimiert und waren katalytisch aktiv. Ihre Aktivität konnte durch EZA blockiert werden, bei der CAIV jedoch nicht zu 100%.

Wertet man statt des pH_i die $[\text{H}^+]_i$ aus (Abbildung 3.6), so sind qualitativ die gleichen Ergebnisse zu sehen. Bei der Änderungsrate aber gibt es große Unterschiede zwischen den beiden Auswertungen. Während $\Delta\text{pH}_i/\Delta t$ induziert durch Applikation von 20 mM Butyrat in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ immer geringer war als in HEPES (Abbildung 3.5 D), war das bei $\Delta[\text{H}^+]_i/\Delta t$ nur der Fall wenn CA-Aktivität vorhanden war (Abbildung 3.6 D). In EZA und bei nativen Oozyten zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen der Applikation in HEPES und der in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$.

Aus den Änderungen des pH_i konnten die intrinsische (β_i ; schwache Säure in HEPES) und die totale Pufferkapazität (β_t ; schwache Säure in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$) berechnet werden (Abbildung 3.7). Dazu wurde die Konzentration an Säure durch die resultierende Änderung des pH_i geteilt ($\beta = \frac{[\text{A}^-]_i}{\Delta\text{pH}_i}$). Die Berechnung von $[\text{A}^-]_i$ ist in Unterabschnitt 2.7.2 erklärt.

Die intrinsische Pufferkapazität konnte über zwei verschiedene Wege bestimmt werden. Zum einen durch die Applikation von 20 mM Butyrat in HEPES und zum anderen durch die Applikation von 5% $\text{CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$ (Abbildung 3.7 A). Bei nativen Oozyten betrug die Pufferkapazität $13,00 \pm 1,08 \text{ mM}$ wenn sie mit Butyrat bestimmt wurde und $17,38 \pm 0,73 \text{ mM}$ ($p \leq 0,01$) wenn sie mit CO_2 bestimmt wurde. Weder bei den CAII- noch bei den CAIV-exprimierenden Oozyten zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Bei den CAII-exprimierenden Oozyten betrug die Pufferkapazität mit Butyrat $12,91 \pm 0,99 \text{ mM}$

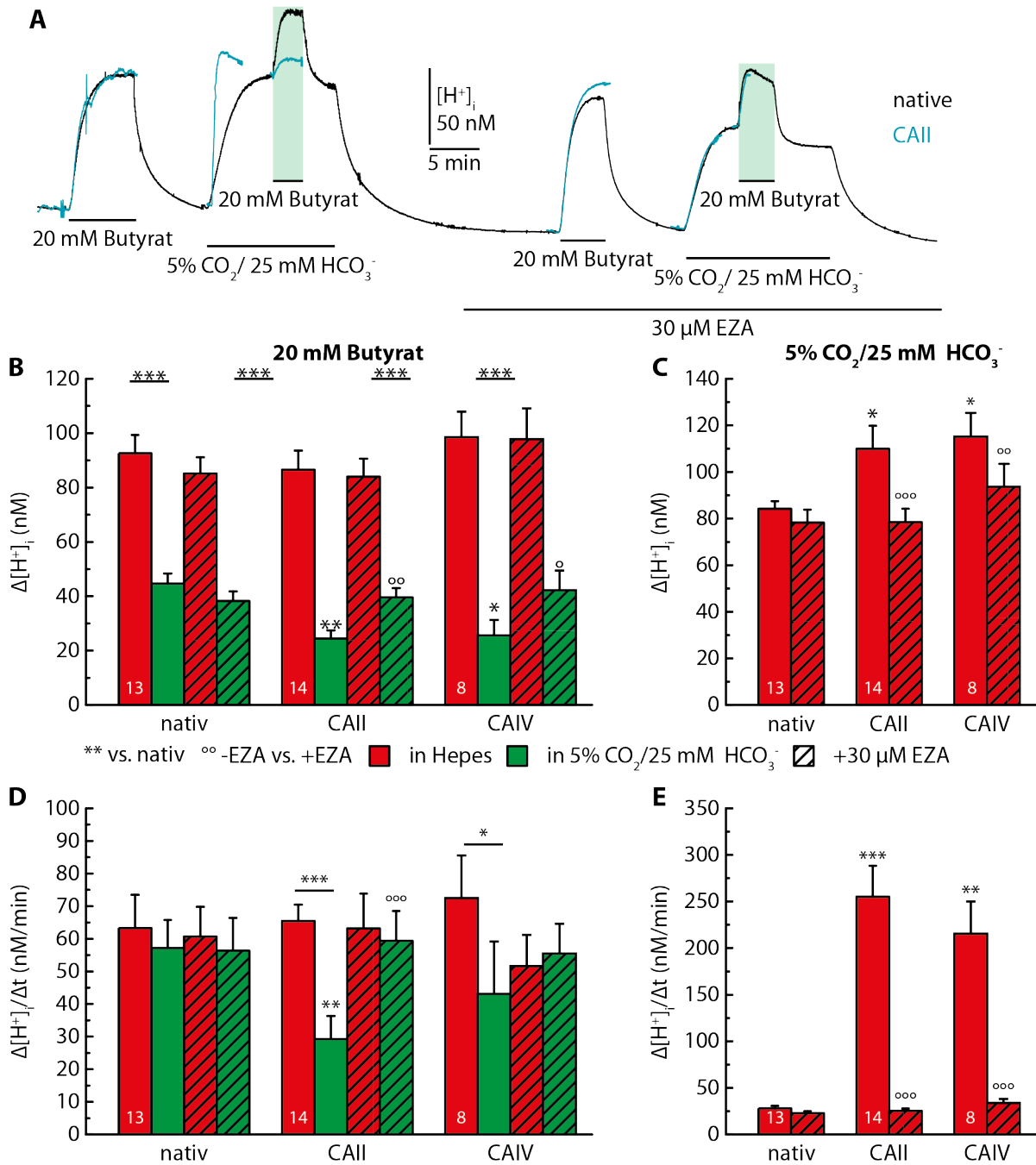


Abbildung 3.6.: Globale Ansäuerung ($[H^+]_i$) durch Butyrat in CO_2 -freier und in 5% $CO_2/25$ mM HCO_3^- Lösung. (A) zeigt die Originalregistrierungen der $[H^+]_i$ von nativen, CAII-exprimierenden und CAIV-exprimierenden Oozyten während der Applikation von 20 mM Butyrat in CO_2 -freier und in 5% $CO_2/25$ mM HCO_3^- Lösung (grün unterlegt, korrespondierend zur Balkenfarbe in B & D), sowie jeweils in Anwesenheit von 30 μ M EZA. Die durch die Butyrat-Applikation induzierte Änderung der $[H^+]_i$ ist in (B) dargestellt, die Änderungsrate in (D). Die CA-Expression führt zu einer reduzierten Amplitude und Änderungsrate, dieser Effekt kann durch EZA aufgehoben werden. (C & E) zeigen die Amplitude und die Änderungsrate induziert durch die Applikation von 5% $CO_2/25$ mM HCO_3^- . Die Asteriske direkt über den Balken beziehen sich auf die korrespondierende Applikation in nativen Oozyten. Die Kreise beziehen sich auf die jeweilige Applikation ohne EZA innerhalb des gleichen Zelltyps.

und mit CO_2 bestimmt $13,32 \pm 1,00$ mM. Bei den CAIV-exprimierenden Oozyten wurde eine intrinsische Pufferkapazität von $12,52 \pm 1,62$ mM bzw. $12,11 \pm 1,21$ mM ermittelt. Dieser Effekt zeigte sich schon bei den Amplituden, denn bei nativen Oozyten war die Amplitude kleiner als die der CA-exprimierenden Oozyten. Unter EZA lagen alle Zellen auf einem Niveau. Die katalytische Aktivität führte also zu einer größeren Amplitude bei der Applikation von 5% $\text{CO}_2/25$ mM HCO_3^- und damit zu einer signifikant geringeren Pufferkapazität im Vergleich zu keiner (nativ) bzw. inhibierter CA-Aktivität (unter EZA). Die bestimmten Pufferkapazitäten mit Butyrat lagen allerdings auf dem Niveau der Pufferkapazität, die mit CO_2 mit CA-Aktivität bestimmt wurde. Aus diesem Grund kann man also eher davon sprechen, dass ohne CA-Aktivität die Pufferkapazität, die mittels CO_2 bestimmt wurde, signifikant zu hoch ist. Wenn im Folgenden von der intrinsischen Pufferkapazität die Rede ist, ist die durch Butyrat bestimmte gemeint.

In Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ setzt sich die totale Pufferkapazität β_t aus der intrinsischen Pufferkapazität β_i und der CO_2 -abhängigen Pufferkapazität β_{CO_2} zusammen. Die CO_2 -abhängige Pufferkapazität liegt auf einem Niveau mit der intrinsischen Pufferkapazität. Bei nativen Oozyten betrug sie $13,91 \pm 0,56$ mM, bei CAII-exprimierenden $13,63 \pm 0,79$ mM und die CAIV-exprimierenden Oozyten hatte eine CO_2 -abhängige Pufferkapazität von $12,89 \pm 0,88$ mM. Sie unterschieden sich jeweils nicht signifikant von einander. Die totale Pufferkapazität wurde durch Applikation von Butyrat in 5% $\text{CO}_2/25$ mM HCO_3^- bestimmt (Abbildung 3.7 B). Bei nativen Oozyten wurde eine totale Pufferkapazität von $38,56 \pm 4,17$ mM gemessen. Signifikant ($p \leq 0,05$) höhere totale Pufferkapazitäten wurden bei den CAII-exprimierenden ($59,17 \pm 5,83$ mM) und den CAIV-exprimierenden Oozyten ($63,52 \pm 12,83$ mM) gemessen. Die totale Pufferkapazität kann auch berechnet werden, in dem man die intrinsische und die CO_2 -abhängigen Pufferkapazität addiert. Vergleicht man die berechnete und die gemessene totale Pufferkapazität, ist die berechnete immer signifikant kleiner als die tatsächlich gemessene Pufferkapazität. Bei nativen Oozyten betrug die berechnete $23,65 \pm 1,81$ mM ($p \leq 0,01$), bei CAII-exprimierenden betrug sie $22,87 \pm 2,84$ mM ($p \leq 0,001$) und bei CAIV-exprimierenden Oozyten $25,42 \pm 2,39$ mM ($p \leq 0,05$).

Blockiert man die CA-Aktivität mit EZA (Abbildung 3.7 C) zeigt sich bei der totalen Pufferkapazität kein signifikanter Unterschied zur totalen Pufferkapazität ohne EZA. Native Oozyten hatten in EZA eine totale Pufferkapazität von $44,11 \pm 4,24$ mM. Bei CAII-exprimierenden Oozyten wurde unter EZA eine totale Pufferkapazität von $44,53 \pm 4,04$ mM gemessen, was signifikant kleiner ($p \leq 0,05$) war als ohne EZA. Auch bei den CAIV-exprimierenden Oozyten wurde mit $44,87 \pm 7,80$ mM in EZA eine signifi-

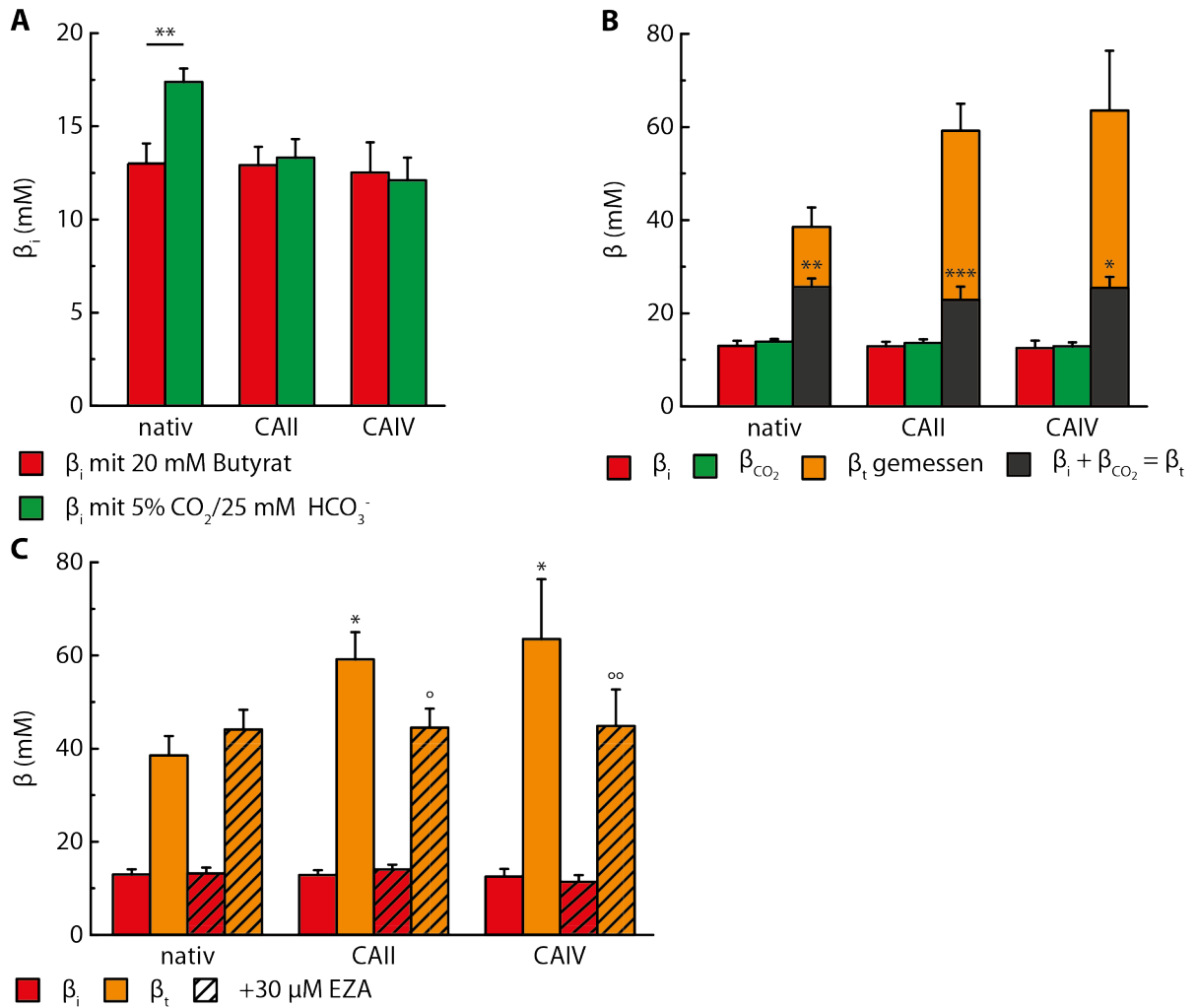


Abbildung 3.7.: Pufferkapazitäten in 5% CO_2 /25 mM HCO_3^- . Die intrinsische Pufferkapazität β_i wurde mittels Applikation von 5% CO_2 und durch Applikation von 20 mM Butyrat für native, CAII- und CAIV-exprimierende Oozyten bestimmt (A). Abbildungsteil B zeigt β_i , β_{CO_2} und β_t . Die totale Pufferkapazität wurde einmal gemessen und einmal rechnerisch ($\beta_i + \beta_{\text{CO}_2}$) bestimmt. Der Vergleich von β_i und β_t in Ab- und Anwesenheit von 30 μM EZA ist in (C) dargestellt. Die Asteriske direkt über den Balken beziehen sich auf die korrespondierende Applikation in nativen Oozyten. Die Kreise beziehen sich auf die jeweilige Applikation ohne EZA innerhalb des gleichen Zelltyps.

kant kleinere ($p \leq 0,01$) totale Pufferkapazität gemessen. Unter EZA gab es zwischen den Zelltypen keinen signifikanten Unterschied mehr.

Zusammenfassung Die CA-Aktivität (sowohl CAII als auch CAIV) konnte über eine signifikant erhöhte Änderungsrate des pH_i bei der Applikation von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ gegenüber nativen Oozyten nachgewiesen werden.

Die CAII- und die CAIV-exprimierenden Oozyten zeigten in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ eine signifikante Reduktion der Butyrat-induzierten Amplitude und der Änderungsrate im Vergleich zu nativen Oozyten. Diese Reduktion war durch den CA-Inhibitor EZA blockierbar.

Die intrinsische Pufferkapazität konnte über zwei verschiedene Wege bestimmt werden, mit Butyrat und mit CO_2 . Ohne CA-Aktivität wurde eine signifikant höhere intrinsische Pufferkapazität mit CO_2 gemessen, während mit CA-Aktivität die so bestimmten intrinsischen Pufferkapazitäten auf einem Niveau lagen. Die berechneten totalen Pufferkapazitäten ($\beta_i + \beta_{\text{CO}_2}$) lagen bei allen drei Zelltypen jeweils signifikant unter den gemessenen totalen Pufferkapazitäten.

Die CA-Expression führte auch zu einer signifikant erhöhten totalen Pufferkapazität im Vergleich zu den nativen Oozyten und bei inhibierter CA-Aktivität (in EZA).

3.4.2. In 2% $\text{CO}_2/10 \text{ mM HCO}_3^-$

Um eine Konzentrationsabhängigkeit des beobachteten Effektes bei 5% CO_2 zu überprüfen, wurde der gleiche Versuch wie in Unterabschnitt 3.4.1 mit 2% $\text{CO}_2/10 \text{ mM HCO}_3^-$ vorgenommen. Dazu wurde wieder 20 mM Butyrat in Ab- und Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ appliziert und sowohl die Amplitude als auch die Änderungsrate der resultierenden pH-Änderung analysiert (Abbildung 3.8 A, B, D). Die durch die Applikation von 2% $\text{CO}_2/10 \text{ mM HCO}_3^-$ induzierte Änderung des pH-Wertes wurde ebenfalls durch Amplitude und Änderungsrate charakterisiert (Abbildung 3.8 A, C, E).

Für diesen Versuch wurde nur die intrazelluläre CAII (n=14) exprimiert und als Kontrolle native Oozyten (n=14) verwendet bzw. die CA-Aktivität durch EZA inhibiert. Die Applikation von 20 mM Butyrat in Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ verursachte in beiden Zelltypen eine intrazelluläre Ansäuerung, die sich nicht signifikant unterschieden (Abbildung 3.8). Bei nativen Oozyten betrug sie $-0,42 \pm 0,02$ und bei CAII-exprimierenden Oozyten $-0,43 \pm 0,02$. Auch unter EZA zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen nativen und CAII-exprimierenden Oozyten ($-0,49 \pm 0,02$ bzw. $-0,45 \pm 0,01$). Jedoch war bei den nativen Oozyten die Amplitude in EZA signifikant höher ($p \leq 0,05$) als ohne EZA. Auch bei den CAII-exprimierenden Oozyten war die Amplitude leicht erhöht, jedoch nicht signifikant. In Anwesenheit des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystems waren die Butyrat-induzierten Amplituden immer signifikant kleiner ($p \leq 0,001$) sowohl ohne als auch mit EZA. In $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ betrug die Amplitude bei den nativen Oozyten $-0,25 \pm 0,01$ und bei CAII-exprimierenden Oozyten $-0,19 \pm 0,01$. Der Unterschied zwischen den nativen und den CAII-exprimierenden Oozyten war signifikant ($p \leq 0,001$). Unter EZA lag die Amplitude der nativen Oozyten bei $-0,25 \pm 0,01$, was sich nicht signifikant

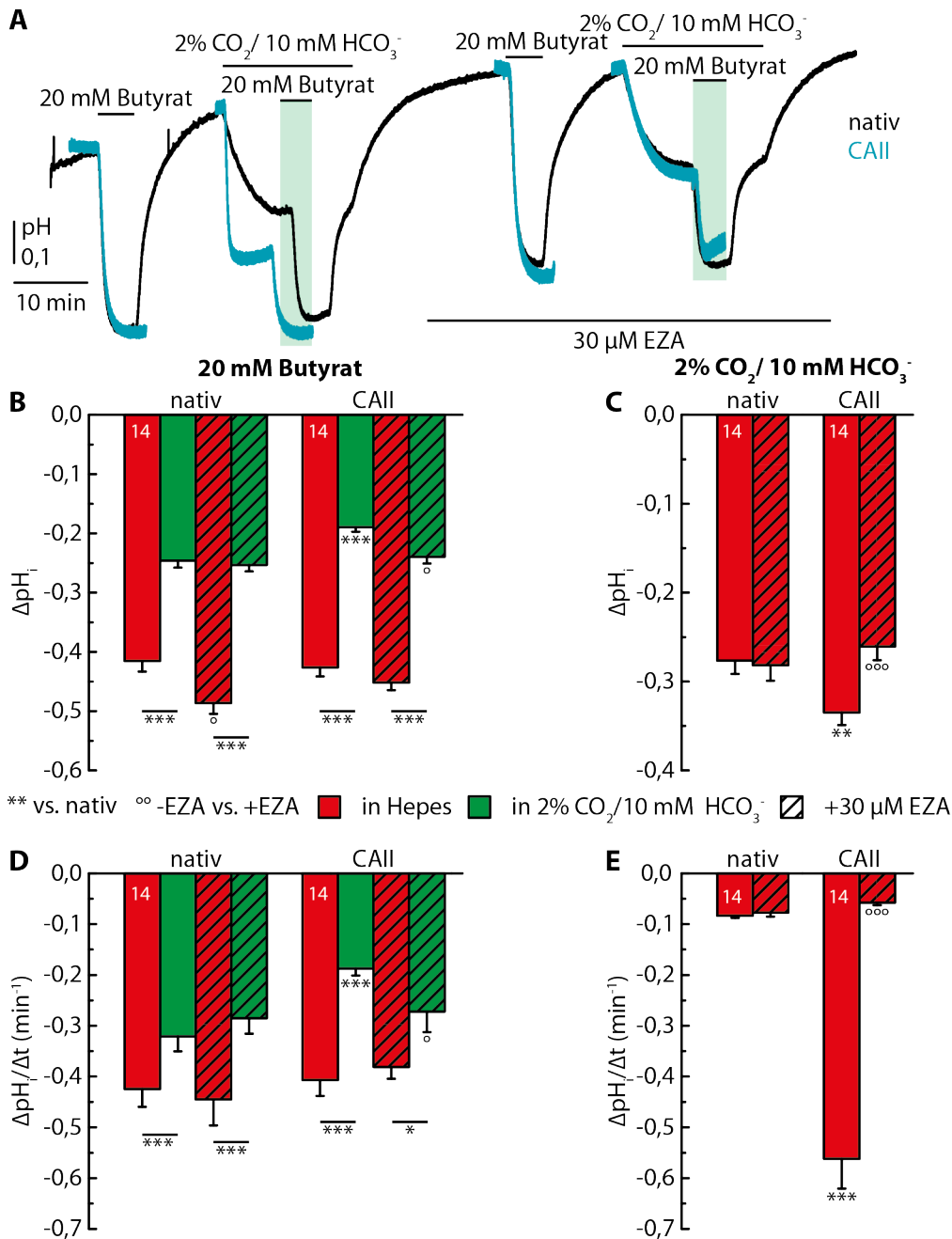


Abbildung 3.8.: Globale Ansäuerung (pH) durch Butyrat in CO₂-freier und in 2%CO₂/10 mM HCO₃⁻ Lösung. (A) zeigt die Originalregistrierungen des pH_i von nativen und CAII-exprimierenden Oozyten während der Applikation von 20 mM Butyrat in CO₂-freier und in 2% CO₂/10 mM HCO₃⁻ Lösung (grün unterlegt, korrespondierend zur Balkenfarbe in B & D), sowie jeweils in Anwesenheit von 30 μM EZA. Die durch die Butyrat-Applikation induzierte Änderung des pH_i ist in (B) dargestellt, die Änderungsrate in (D). Die CA-Expression führt zu einer reduzierten Amplitude und Änderungsrate, dieser Effekt kann durch EZA aufgehoben werden. (C & E) zeigen die Amplitude und die Änderungsrate induziert durch die Applikation von 2% CO₂/10 mM HCO₃⁻. Die Asteriske direkt über den Balken beziehen sich auf die korrespondierende Applikation in nativen Oozyten. Die Kreise beziehen sich auf die jeweilige Applikation ohne EZA innerhalb des gleichen Zelltyps.

von der Amplitude ohne EZA unterschied. Die Amplitude der CAII-exprimierenden Oozyten betrug $-0,24 \pm 0,01$ und war damit signifikant höher ($p \leq 0,05$) als ohne EZA. Sie unterschied sich damit nicht signifikant von der Amplitude der nativen Oozyten unter EZA.

Bei den Änderungsraten (Abbildung 3.8 D) zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den Amplituden. Die durch Butyrat induzierten Änderungsraten waren in Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ immer signifikant größer ($p \leq 0,001$; bei CAII +EZA $p \leq 0,05$) als in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. Bei den nativen Oozyten betrug die Änderungsrate in HEPES ohne EZA $-0,42 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ und mit EZA $-0,45 \pm 0,5 \text{ min}^{-1}$, was sich nicht signifikant unterschied. Bei den CAII-exprimierenden Oozyten zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied, ohne EZA betrug die Änderungsrate $-0,41 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$ und mit EZA $-0,38 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$. In CO_2 betrug die Änderungsrate bei den nativen Oozyten $-0,32 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$. Im Vergleich dazu führte auch hier die Expression von CAII zu einer signifikanten Reduktion ($p \leq 0,001$) (vgl. Abbildung 3.5 B). Die Rate betrug hier $-0,19 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$. Unter EZA war die Rate der CAII-exprimierenden Oozyten signifikant höher ($p \leq 0,05$) als ohne EZA. Sie betrug $-0,27 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$, was sich nicht signifikant von der Rate der nativen Oozyten unter EZA ($-0,29 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$) unterschied.

Auch die Applikation von 2% $\text{CO}_2/10 \text{ mM HCO}_3^-$ führte zu einer Ansäuerung des Cytosols (Abbildung 3.8 A & C). In nativen Oozyten betrug die Amplitude $-0,28 \pm 0,02$ und mit EZA $-0,28 \pm 0,02$, was sich nicht signifikant unterschied. Die Amplitude der CAII-exprimierenden Oozyten ($-0,33 \pm 0,01$) war ohne EZA signifikant höher ($p \leq 0,01$) als bei den nativen Oozyten. Unter EZA war die Amplitude signifikant reduziert ($p \leq 0,001$) und betrug $-0,24 \pm 0,01$.

Die Änderungsrate (Abbildung 3.8 E) betrug bei den nativen Oozyten $-0,08 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$ und, nicht signifikant unterschiedlich, unter EZA $-0,08 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$. Die katalytische Aktivität der CAII führte zu einer signifikant erhöhten ($p \leq 0,001$) Änderungsrate ($-0,56 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$) im Vergleich zu den nativen Oozyten. EZA inhibierte die katalytische Aktivität der CAII, so dass die Änderungsrate signifikant reduziert war im Vergleich zur Rate ohne EZA. Sie betrug $-0,06 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$, was sich nicht von den nativen Oozyten unterschied.

Die Analyse der $[\text{H}^+]_i$ (Abbildung 3.9) zeigte bei der Amplitude qualitativ die gleichen Ergebnisse wie bei der Analyse des pH_i . So waren auch hier die durch Applikation von Butyrat induzierten Amplituden in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ signifikant kleiner ($p \leq 0,001$) als die in HEPES (Abbildung 3.9 B). Auch die CA-Aktivität konnte über eine signifikant gesteigerte ($p \leq 0,001$) Änderungsrate nachgewiesen werden (Abbildung 3.9 E). Bei den Butyrat-induzierten Änderungsraten zeigte sich wie schon in Unterabschnitt 3.4.1 ein Unterschied

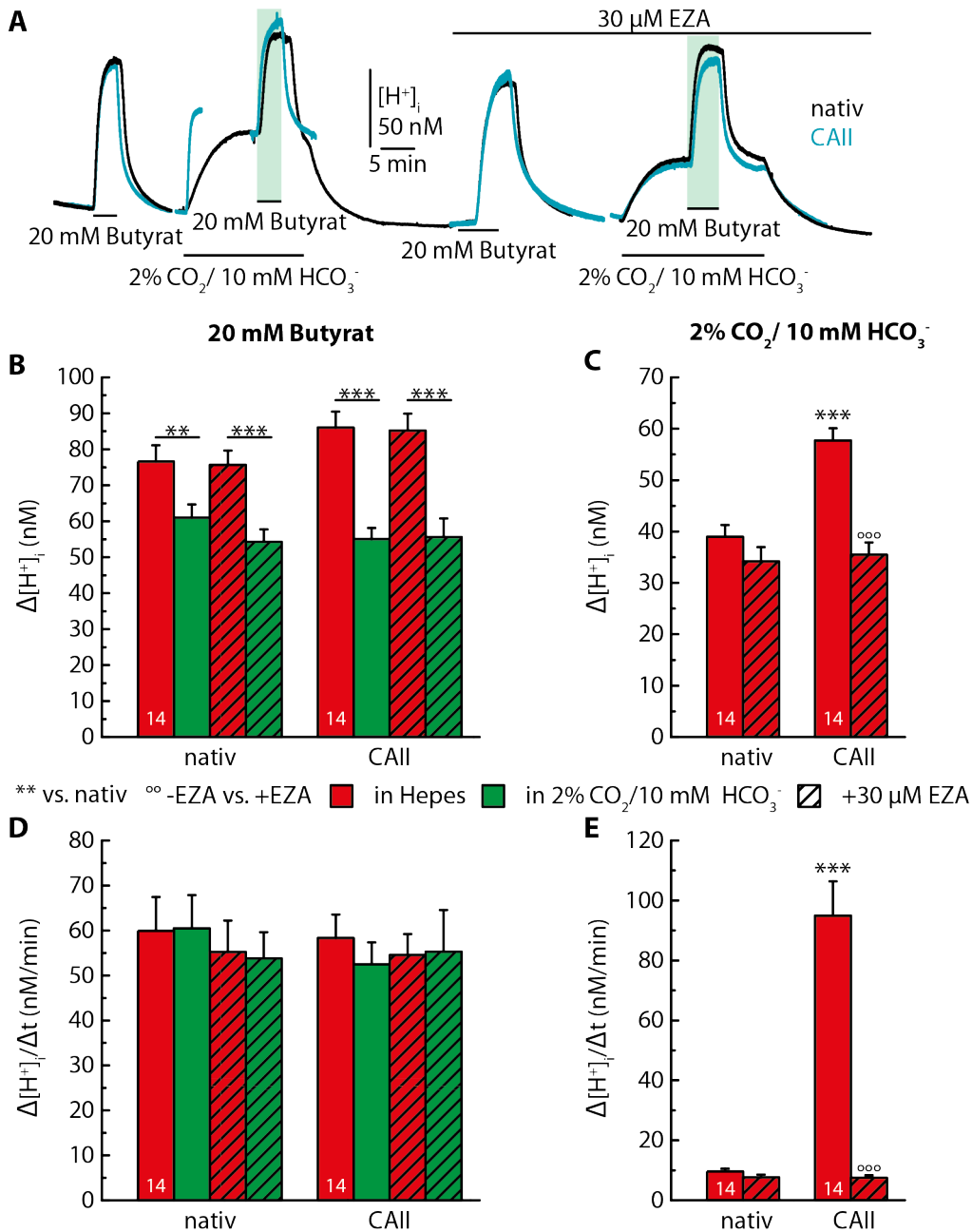


Abbildung 3.9.: Globale Ansäuerung ($[H^+]_i$) durch Butyrat in CO_2 -freier und in $2\%CO_2/10\text{ mM }HCO_3^-$ Lösung. (A) zeigt die Originalregistrierungen der $[H^+]_i$ von nativen und CAII-exprimierenden Oozyten während der Applikation von 20 mM Butyrat in CO_2 -freier und in $2\% CO_2/10\text{ mM }HCO_3^-$ Lösung (grün unterlegt, korrespondierend zur Balkenfarbe in B & D), sowie jeweils in Anwesenheit von 30 μM EZA. Die durch die Butyrat-Applikation induzierte Änderung der $[H^+]_i$ ist in (B) dargestellt, die Änderungsrate in (D). (C & E) zeigen die Amplitude und die Änderungsrate induziert durch die Applikation von $2\% CO_2/10\text{ mM }HCO_3^-$. Die Asteriske direkt über den Balken beziehen sich auf die korrespondierende Applikation in nativen Oozyten. Die Kreise beziehen sich auf die jeweilige Applikation ohne EZA innerhalb des gleichen Zelltyps.

zwischen der Analyse der $[H^+]_i$ und des pH_i . So war ohne CA-Aktivität (native Oozyten und CAII-exprimierende +EZA) keine signifikante Reduktion der $\Delta[H^+]_i/\Delta t$ zu detektieren wenn Butyrat in Anwesenheit von CO_2/HCO_3^- appliziert wurde im Vergleich zur Applikation in HEPES. Bei $\Delta pH_i/\Delta t$ zeigten sich jedoch jeweils signifikante Unterschiede (vgl. Abbildung 3.8 D), welche durch CA-Aktivität nochmals verstärkt wurden. Zusätzlich war bei $\Delta[H^+]_i/\Delta t$ auch bei CAII-exprimierenden Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen der Applikation in HEPES und CO_2/HCO_3^- zu sehen.

Die Pufferkapazität der Zellen wurde, wie in Unterabschnitt 3.4.1 und Unterabschnitt 2.7.2 beschrieben, bestimmt (Abbildung 3.10). Auch hier zeigte sich wieder eine signifikant erhöhte ($p \leq 0,05$) intrinsische Pufferkapazität in nativen Zellen wenn sie durch Applikation von CO_2 bestimmt wurde (Abbildung 3.10 A). So betrug die intrinsische Pufferkapazität bestimmt durch Butyrat bei nativen Oozyten $14,32 \pm 0,62$ mM und bei CAII-exprimierenden Oozyten $13,19 \pm 0,96$ mM, was sich nicht signifikant voneinander unterschied. Wurde die intrinsische Pufferkapazität durch Applikation von CO_2 bestimmt, wurde eine intrinsische Pufferkapazität von $17,56 \pm 1,12$ mM bei nativen Oozyten und von $12,02 \pm 0,63$ mM bei den CAII-exprimierenden Oozyten gemessen. Somit unterschied sich die intrinsische Pufferkapazität bei nativen Oozyten signifikant ($p \leq 0,05$) zwischen den beiden Methoden. Dieses Resultat war auch schon beim Experiment mit 5% $CO_2/25$ mM HCO_3^- zu beobachten (vgl. Abbildung 3.7 A). Deshalb wird auch hier wieder im Folgenden die intrinsische Pufferkapazität durch Butyrat bestimmt.

Im Vergleich zur CO_2 -abhängigen Pufferkapazität in 5% $CO_2/25$ mM HCO_3^- (Abbildung 3.7 B) war die CO_2 -abhängige Pufferkapazität wesentlich kleiner in 2% $CO_2/10$ mM HCO_3^- (Abbildung 3.10 B). So betrug sie mit $6,44 \pm 0,42$ mM bei nativen und $5,44 \pm 0,24$ mM bei CAII-exprimierenden Oozyten weniger als die Hälfte der intrinsischen Pufferkapazität. Die aus intrinsischer und CO_2 -abhängiger Pufferkapazität berechnete totale Pufferkapazität lag bei nativen Oozyten bei $20,76$ mM und bei CAII-exprimierenden Oozyten bei $18,63$ mM. Bei den nativen Oozyten unterschied sich die berechnete Pufferkapazität nicht von der gemessenen totalen Pufferkapazität ($21,69 \pm 1,77$ mM). Bei den CAII-exprimierenden Oozyten war die gemessene totale Pufferkapazität mit $24,39 \pm 1,60$ mM signifikant größer ($p \leq 0,01$) als die berechnete totale Pufferkapazität.

EZA hatte keinen signifikanten Einfluss auf die intrinsische und die totale Pufferkapazität (Abbildung 3.10 C). Die intrinsische Pufferkapazität unter EZA betrug bei nativen Oozyten $14,13 \pm 1,16$ mM und bei den CAII-exprimierenden Oozyten $13,14 \pm 1,17$ mM. Bei den nativen Oozyten wurde eine totale Pufferkapazität unter EZA von $24,58 \pm 2,09$ mM und von $24,55 \pm 2,15$ mM bei CAII-exprimierenden Oozyten gemessen. Im Vergleich

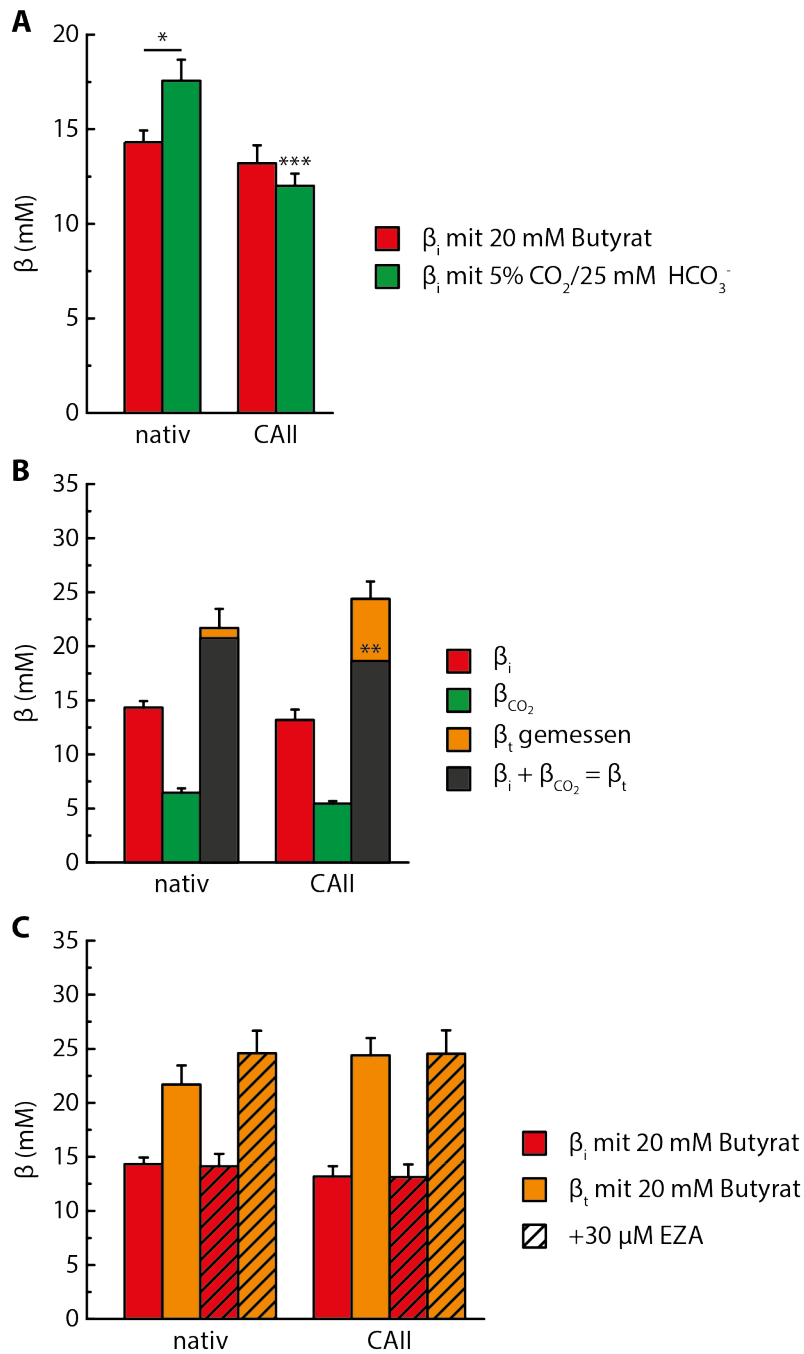


Abbildung 3.10.: Pufferkapazitäten in 2% CO_2 /10 mM HCO_3^- . Die intrinsische Pufferkapazität β_i wurde mittels Applikation von 2% CO_2 und durch Applikation von 20 mM Butyrat für native und CAII-exprimierende Oozyten bestimmt (A). Abbildungsteil B zeigt β_i , β_{CO_2} und β_t . Die totale Pufferkapazität wurde einmal gemessen und einmal rechnerisch ($\beta_i + \beta_{\text{CO}_2}$) bestimmt. Der Vergleich von β_i und β_t in Ab- und Anwesenheit von 30 μM EZA ist in (C) dargestellt.

zum Versuch mit 5% CO₂ war nicht nur die CO₂-abhängige Pufferkapazität geringer, sondern daraus resultierend auch die totale Pufferkapazität.

Zusammenfassung Die CO₂-induzierte Änderungsrate des pH_i bei CAII-exprimierenden Oozyten im Vergleich zu nativen Oozyten war signifikant erhöht. Auch in 2% CO₂/10 mM HCO₃⁻ zeigten sich die bereits in Unterabschnitt 3.4.1 beobachteten Effekte, dass die CA-Expression zu einer Reduktion der Amplitude und der Änderungsrate der Butyrat-induzierten Ansäuerung in Anwesenheit von CO₂/HCO₃⁻ führt. Beide Effekte ließen sich mit EZA blockieren. Die Rate war ungefähr um den selben Faktor wie das CO₂ (von 5 auf 2%) reduziert. Während bei $\Delta\text{pH}_i/\Delta t$ die Anwesenheit von CO₂/HCO₃⁻ für eine reduzierte Rate sorgte und die CA-Aktivität sie weiter reduzierte, war bei $\Delta[\text{H}^+]_i/\Delta t$ weder durch CO₂/HCO₃⁻ noch durch die katalytische CA-Aktivität eine signifikante Reduktion zu erkennen.

Der Unterschied in der intrinsischen Pufferkapazität bestimmt mit Butyrat oder CO₂, wurde in selbem Maß wie in 5%, auch bei 2% CO₂ festgestellt. Die totale Pufferkapazität war im Gegensatz zum Versuch mit 5% CO₂ bei den CAII-exprimierenden Oozyten nicht signifikant erhöht, hier lagen native und CAII-exprimierende Zellen auf einem Niveau.

3.4.3. Optische pH-Messung

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Einfluss der CA-Aktivität auf die CO₂-induzierte Amplitude tatsächlich physiologisch ist oder ob es sich um ein Messartefakt durch eine CO₂-Sensitivität der Elektrode handelt, wurden optische Messungen mit dem pH-sensitiven Farbstoff BCECF vorgenommen.

Für die optischen Messungen des pH wurden Albino-Oozyten verwendet, da sie nicht pigmentiert sind und somit weniger Licht absorbieren. Zuerst musste aber die CAII-Aktivität in den Albino-Oozyten im Vergleich zu den „normalen“ pigmentierten Oozyten bestimmt werden. Dazu wurde die CAII-Aktivität mit einem Massenspektrometer bestimmt.

3.4.3.1. Aktivitätsbestimmung von CAII in Albino-Oozyten

Die Aktivität der CAII in pigmentierten und Albino-Oozyten wurde mittels eines Gas-Massenspektrometers bestimmt (Abbildung 3.11). Dazu wurde die Abbaurate von ¹⁸O-markiertem HCO₃⁻ gemessen. Zu Beginn einer jeden Messung wurde für 5 Minuten die spontane Abbaurate gemessen, danach wurden jeweils 20 lysierte Oozyten in 100 µl Puf-

fer (OR2^+ pH 7,3) aufgenommen und die anschließende Abbaurate bestimmt (Abbildung 3.11 A).

Für die elektrophysiologischen Messungen wurden 12 ng cRNS CAII injiziert. In die Albino-Oozyten wurden zum Vergleich nicht nur 12 ng, sondern auch 8 und 16 ng cRNS injiziert. Als Kontrolle dienten die jeweiligen nativen Oozyten (albino bzw. pigmentiert). Die so gemessenen Abbauraten konnten über eine Kalibriergerade, die mit CAII-Protein angefertigt wurde, in ng CAII pro Oozyte umgewandelt werden (Abbildung 3.11 B). Bei den pigmentierten nativen Oozyten ergab die Abbaurate eine Menge von $1,11 \pm 0,28$ ng CAII/Oozyte. Die CAII-exprimierenden Oozyten (12 ng) enthielten eine Menge von $63,66 \pm 4,79$ ng CAII/Oozyte. Bei den Albino-Oozyten wurde bei den nativen Oozyten eine Menge von $3,93 \pm 0,83$ ng CAII/Oozyte. Mit steigender injizierter cRNS-Menge stieg auch die gemessene CA-Aktivität. So wurden bei 8 ng cRNS eine Proteinmenge von $34,50 \pm 2,56$ ng CAII/Oozyte gemessen. Bei 12 ng cRNS konnte eine signifikant höhere ($p \leq 0,001$) Proteinmenge von $66,62 \pm 2,74$ ng CAII/Oozyte gemessen werden und bei 16 ng cRNS stieg die Proteinmenge nochmals signifikant ($p \leq 0,05$) auf $84,81 \pm 8,07$ ng CAII/Oozyte.

Um die reine Expression an CAII pro Oozyte zu bekommen, wurde die Kontrollwerte der nativen (pigmentiert und albino) Oozyten von den CAII-exprimierenden Oozyten abgezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 C dargestellt. Die gemessenen Aktivitäten der pigmentierten und der Albino-Oozyten und die daraus berechneten exprimierten CAII-Mengen zeigten, dass sich das Expressionsvermögen von Albino-Oozyten nicht signifikant von dem der pigmentierten Oozyten unterschied. So wurde für die folgenden Messungen für die Albino-Oozyten eine cRNS Menge von 12 ng pro Oozyte injiziert.

3.4.3.2. 2-Photonen-Mikroskopie

Die besten Resultate bzgl. der Aufnahme des BCECF-AM Ester, ohne die Oozyte zu schädigen, wurden bei Raumtemperatur, mit einer Konzentration von 5 μM und einer Beladungszeit von 90 min erzielt.

Da am 2-Photonen (2p)-Mikroskop nur eine Anregungswellenlänge zur Verfügung stand, war es nicht möglich die ratiometrischen Eigenschaften des BCECF zu nutzen. So konnten die gemessenen Fluoreszenzen nicht in pH-Werte umgewandelt werden und es wurden die normierten Fluoreszenzen aufgezeichnet (Abbildung 3.12) und anschließend die Amplitude und die Änderungsrate analysiert (Abbildung 3.13).

Bei den optischen Messungen zeigte sich qualitativ der gleich Verlauf wie in den elektrophysiologischen Messungen (vgl. Abbildung 3.5 und Abbildung 3.12). So führten die Applikationen von 20 mM Butyrat und $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ jeweils zu einer Ansäuerung des

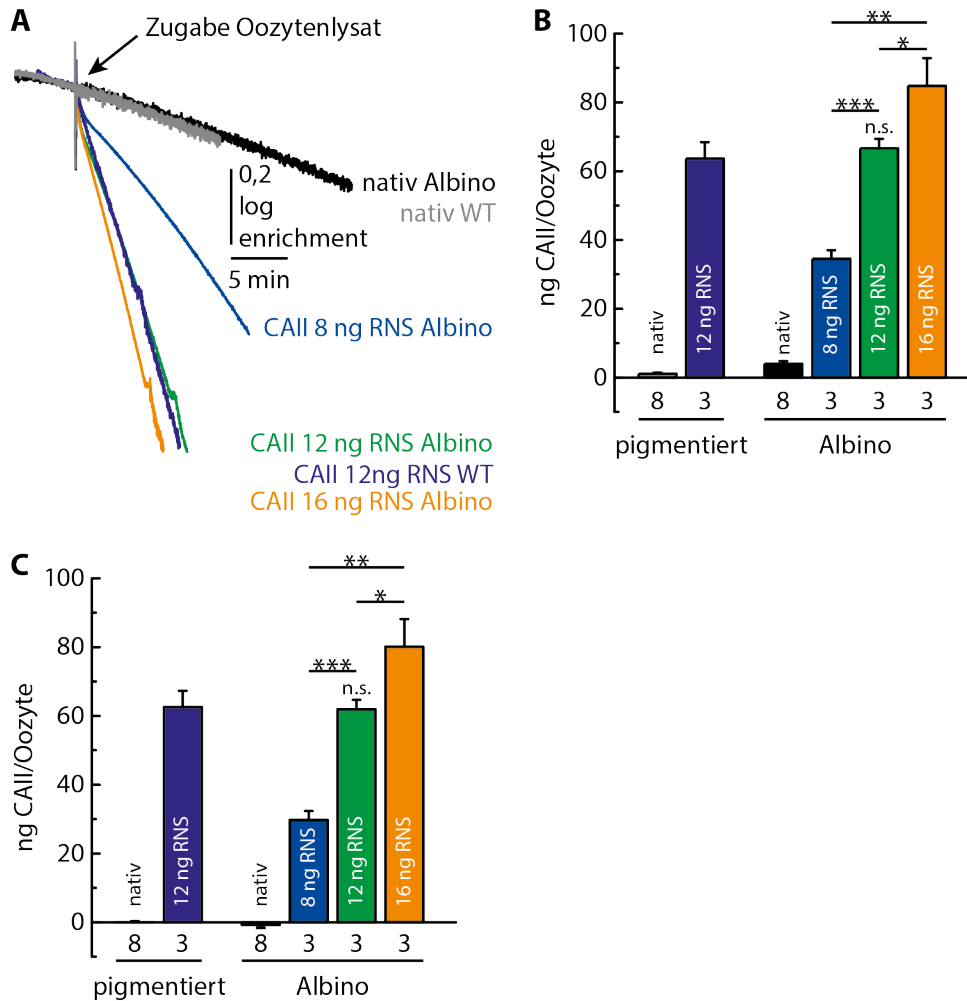


Abbildung 3.11.: Massenspektrometrischer Vergleich der CAII-Aktivität in pigmentierten und Albino-Oozyten. (A) Originalregistrierungen (*log enrichment*) von nativen (pigmentiert und albino) und CAII-exprimierenden Oozyten. Die pigmentierten Oozyten wurde mit 12 ng cRNS injiziert und dienten als Kontrolle. Um die RNS-Menge abschätzen zu können wurden die albino Oozyten mit 8, 12 und 16 ng cRNS injiziert. Die gemessenen Aktivitäten wurden über eine Kalibrierung mit reinem Protein in Proteinmenge/Oozyte umgerechnet (B). (C) zeigt die exprimierte Proteinmenge/Oozyte abzüglich der Proteinmenge nativer Oozyte.

Cytosol und damit zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Die Amplituden der Butyrat-induzierten Ansäuerungen sind in Abbildung 3.13 A dargestellt. Sie waren in Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ in beiden Zelltypen jeweils signifikant reduziert ($p \leq 0,001$). In nativen Oozyten ($n=14$) betrug die Amplitude in HEPES $-0,22 \pm 0,01$ und in CAII-exprimierenden Oozyten ($n=15$) ebenfalls $-0,22 \pm 0,01$. In EZA waren die Amplituden nicht signifikant unterschiedlich. Bei den native Oozyten wurde eine Amplitude von $-0,23 \pm 0,01$ gemessen, was sich auch nicht signifikant von der Amplitude der CAII-

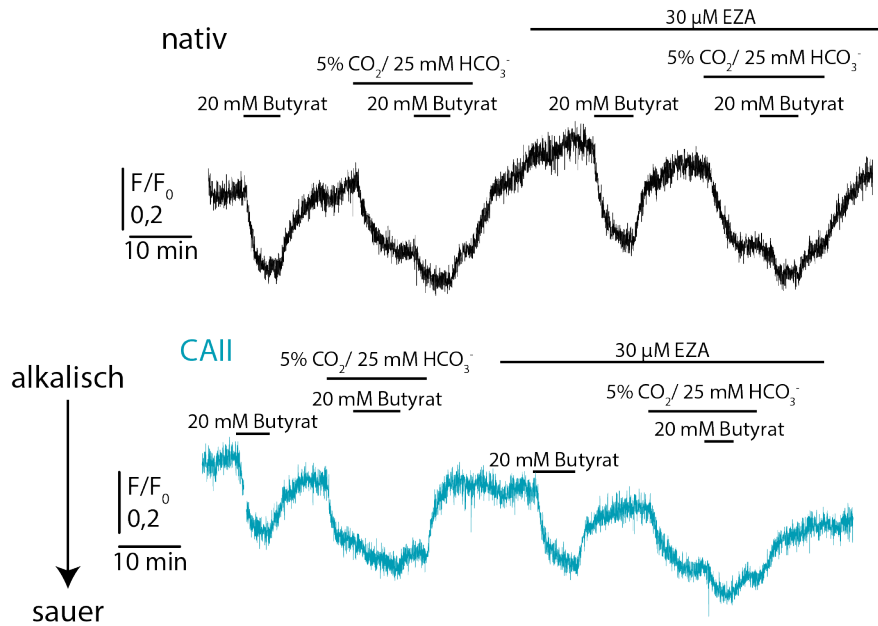


Abbildung 3.12.: Originalregistrierungen der optischen pH-Messung. (A) zeigt die Originalregistrierungen der Fluoreszenz von nativen und CAII-exprimierenden Oozyten während der Applikation von 20 mM Butyrat in CO₂-freier und in 5% CO₂/25 mM HCO₃⁻ Lösung, sowie jeweils in Anwesenheit von 30 µM EZA. Ein Anstieg der Fluoreszenz bedeutet hier einen Abfall der [H⁺]_i also eine Zunahme des pH_i.

exprimierenden Oozyten ($-0,23 \pm 0,01$) unterschied. Auch in CO₂/HCO₃⁻ hatte EZA keinen signifikanten Einfluss auf die Butyrat-induzierte Amplitude. Ohne EZA betrug die Amplitude bei den nativen Zellen $-0,08 \pm 0,004$ und mit EZA $-0,09 \pm 0,004$. Bei den CAII-exprimierenden Zellen betrug die Amplitude ohne EZA $-0,78 \pm 0,003$ und mit EZA $-0,08 \pm 0,003$.

Die Änderungsrate der normierten Fluoreszenz induziert durch Applikation von Butyrat (Abbildung 3.13 C) bestätigten die Ergebnisse aus der Analyse des pH (Abbildung 3.5 D) und nicht die der [H⁺]_i (Abbildung 3.6 E). So waren hier, wie auch bei $\Delta\text{pH}_i/\Delta t$, die Änderungsrate in CO₂/HCO₃⁻ signifikant kleiner (bei nativen jeweils $p \leq 0,05$, bei CAII-exprimierenden $p \leq 0,001$ bzw. $p \leq 0,01$ in EZA). Bei den nativen Oozyten betrug die Änderungsrate in HEPES $-0,13 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ während sie in CAII-exprimierenden Oozyten $-0,13 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ betrug, was sich nicht signifikant unterschied. Unter EZA betrug die Änderungsrate $-0,13 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ bei nativen und $-0,14 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ bei CAII-exprimierenden Oozyten. In CO₂/HCO₃⁻ wurde eine Änderungsrate von $-0,09 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ bei den nativen Oozyten gemessen, die CAII-exprimierenden Oozyten hatten eine signifikant geringere ($p \leq 0,01$) Rate von $-0,04 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$. Unter EZA war diese Rate

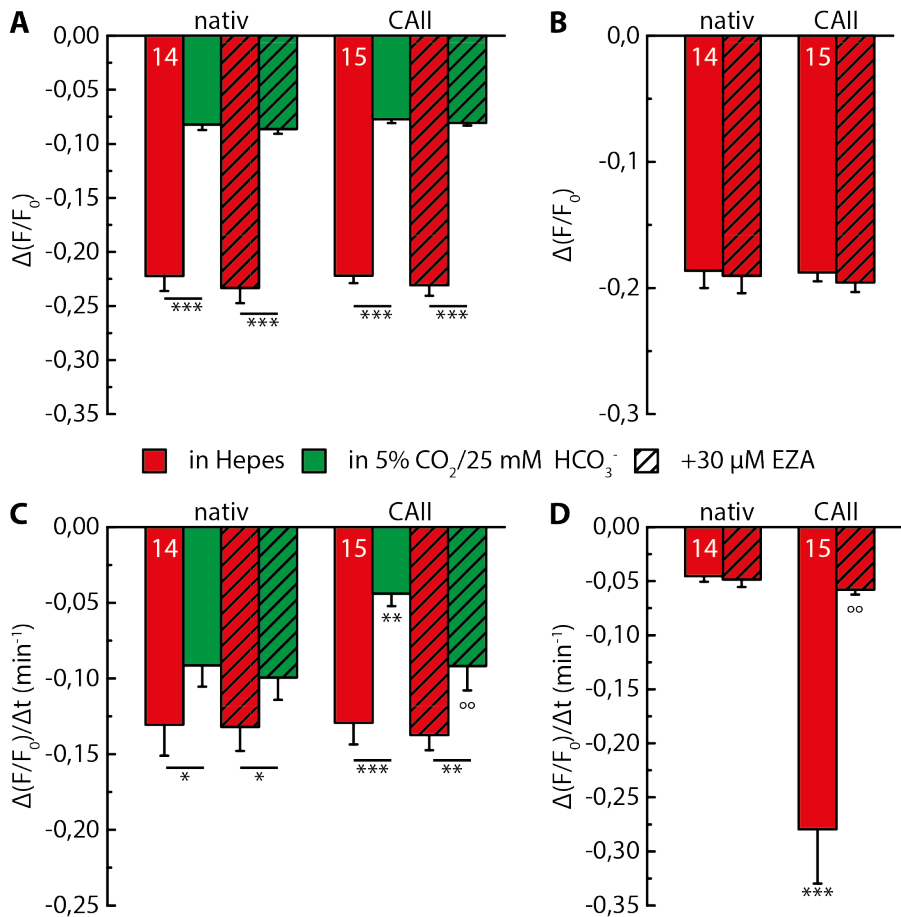


Abbildung 3.13.: Statistik der optischen pH-Messungen. Die durch die Butyrat-Applikation induzierte Änderung der Fluoreszenz ist in (A) dargestellt, die Änderungsrate in (C). (B & D) zeigen die Amplitude und die Änderungsrate induziert durch die Applikation von 5% CO₂/25 mM HCO₃⁻. Die Asteriske direkt über den Balken beziehen sich auf die korrespondierende Applikation in nativen Oozyten. Die Kreise beziehen sich auf die jeweilige Applikation ohne EZA innerhalb des gleichen Zelltyps.

wieder signifikant erhöht ($p \leq 0,05$) auf $-0,09 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$, was sich nicht mehr signifikant von der Rate der nativen Oozyten unter EZA ($-0,10 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$) unterschied.

Die Amplituden der CO₂-induzierten Ansäuerung wurde nicht von der CAII-Aktivität beeinflusst, so dass sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen nativen und CAII-exprimierenden gemessen wurden. Die Amplitude betrug in nativen Oozyten $-0,19 \pm 0,01$ und unter EZA $-0,19 \pm 0,01$. Ohne EZA wurde bei den CAII-exprimierenden Zellen eine Amplitude von $-0,19 \pm 0,01$ und mit EZA $-0,20 \pm 0,01$ gemessen. Die katalytische Aktivität der exprimierten CAII konnte über die Applikation von CO₂/HCO₃⁻ nachgewiesen werden. Die Änderungsrate (Abbildung 3.13 D) der nativen Oozyten betrug -

$0,05 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$, während die katalytische Aktivität der CAII zu einer Änderungsrate von $-0,28 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ führte.

Zusammenfassung Für eine gleiche CA-Aktivität der Albino-Oozyten im Vergleich zu den pigmentierten Oozyten mussten ebenfalls 12 ng cRNS injiziert werden.

Für eine optimale Färbung der Oozyten mussten sie für 90 min in $5 \mu\text{M}$ BCECF-AM inkubiert werden. Bei pH-Messungen mit dem Farbstoff BCECF zeigte sich, im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Messungen mit einer pH-sensitiven Mikroelektrode, bei der Amplitude keine Beeinflussung durch die Expression von CA-Aktivität. Es wurde einzig die Butyrat-induzierte Änderungsrate in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ signifikant beeinflusst. Die Rate in CAII-exprimierenden Zellen war mehr als halbiert im Vergleich zu den nativen Oozyten. Die katalytische Aktivität der CAII wurde durch die signifikant erhöhte Änderungsrate induziert durch Applikation von CO_2 gegenüber den nativen Oozyten nachgewiesen.

3.5. Ansäuerung über eine Punktquelle

Neben schwachen Säuren (in dieser Arbeit Buttersäure), die über Zellmembranen kommen und so vom Rand aus über die Oberfläche das Cytosol ansäuern, können auch Säuren im inneren der Zelle entstehen und das Cytosol von innen ansäuern, so z.B. Mitochondrien. Im Gegensatz zu den globalen Ansäuerungen von außen sind die Ansäuerungen von innen nicht global, sondern eher als lokale Punktquelle zu sehen, z.B. die Säure/Base-Produktion einzelner Organellen. Für die experimentelle Realisierung wurde eine Doppelkanalelektrode mit HCl bzw. NaOH gefüllt. So konnte Säure bzw. Base elektrophoretisch in die Zelle injiziert werden. Die pH-Elektrode wurde nahe der Membran positioniert während die HCl/NaOH-Elektrode in der Mitte der Zelle platziert wurde.

Auch diese Versuche wurden wie auch schon die globale Ansäuerung über die Zellmembran in $5\% \text{ CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$ sowie in $2\% \text{ CO}_2/10 \text{ mM HCO}_3^-$ durchgeführt.

3.5.1. In $5\% \text{ CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$

Die elektrophoretische Injektion von H^+ führte bei allen drei Zelltypen (native, CAII- und CAIV-exprimierende) zu einer Ansäuerung sowohl in HEPES als auch in Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ohne und mit EZA. In den Originalspuren ist zu sehen, dass zwischen der Injektion der Säure/Base zwischen 5 und 10 Minuten vergingen bis eine Änderung des pH_i detektiert werden konnte (Abbildung 3.14).

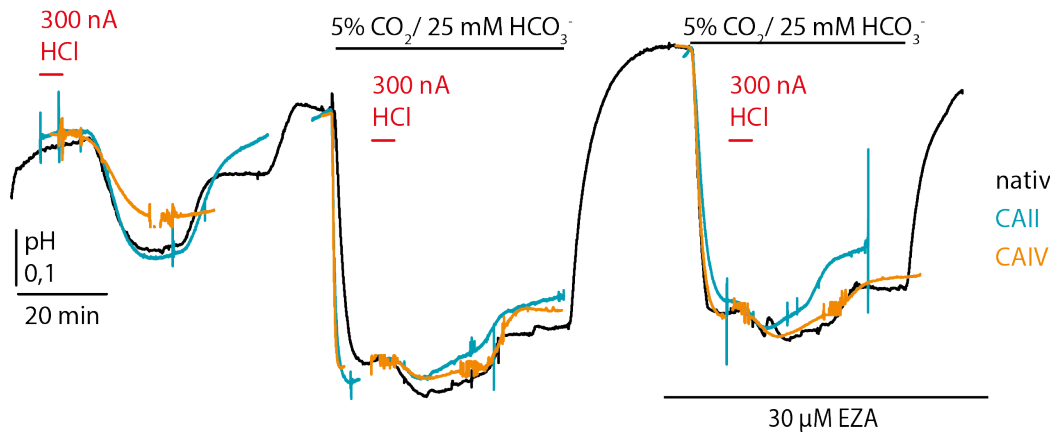


Abbildung 3.14.: Originalregistrierung des pH_i bei Injektion von H^+ / OH^- in Ab- und Anwesenheit von 5% CO_2 /25 mM HCO_3^- . Die Abbildung zeigt den übereinander gelegten Verlauf des pH_i von nativen (schwarz), CAII- (Cyan) und CAIV-exprimierenden Oozyten (Orange) während Injektion von H^+ / OH^- in Ab- und Anwesenheit von CO_2 / HCO_3^- . Zusätzlich wurde Säure auch in Anwesenheit von CO_2 / HCO_3^- +EZA injiziert, um die katalytische Aktivität der CAs zu inhibieren.

Wie in Unterabschnitt 2.4.3 beschrieben, wurde durch die fünf-minütige Injektion mit 300 nA insgesamt eine Konzentration von 2,79 mM Säure/Base in die Zelle injiziert. Diese Konzentration führte zu einer Änderung des pH_i (Abbildung 3.15). Um die aus der Injektion resultierenden Amplituden auszuwerten, wurde nach der fünf-minütigen Injektion von H^+ bzw. OH^- 15 Minuten gewartet bis sich ein Plateau einstellte.

Die Injektion von H^+ führte jeweils zu einem sinkendem pH_i (Abbildung 3.15 A). In HEPES war die Amplitude bei allen drei Zelltypen jeweils signifikant größer als in CO_2 / HCO_3^- ($p \leq 0,001$ bzw. $p \leq 0,01$ bei CAIV-exprimierenden Oozyten). Im Vergleich zwischen den verschiedenen Zelltypen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den jeweiligen Injektionen. Bei nativen Oozyten ($n=10$) betrug die Amplitude in HEPES $-0,21 \pm 0,03$. In Anwesenheit von CO_2 / HCO_3^- betrug die Amplitude $-0,06 \pm 0,01$ und in EZA $-0,06 \pm 0,01$, was sich nicht signifikant unterschied. In HEPES betrug die Amplitude bei den CAII-exprimierenden Oozyten ($n=11$) $-0,19 \pm 0,02$ während sie in CO_2 / HCO_3^- $-0,04 \pm 0,01$ und zusätzlich mit EZA $-0,05 \pm 0,01$ betrug. Die CAIV-exprimierenden Oozyten ($n=11$) zeigten in HEPES eine Amplitude von $-0,14 \pm 0,02$. In CO_2 / HCO_3^- betrug die Amplitude nur noch $-0,06 \pm 0,01$ und mit EZA $-0,06 \pm 0,01$.

Die Injektion von OH^- führte zu einer Erhöhung des pH_i (Abbildung 3.15 B). Im Gegensatz zur Injektion von H^+ war nur bei den nativen Oozyten eine signifikant größere ($p \leq 0,05$) Amplitude zu sehen. In HEPES betrug die Amplitude bei den nativen Oozyten $0,15 \pm 0,02$, bei den CAII-exprimierenden $0,12 \pm 0,02$ und bei den CAIV-exprimierenden

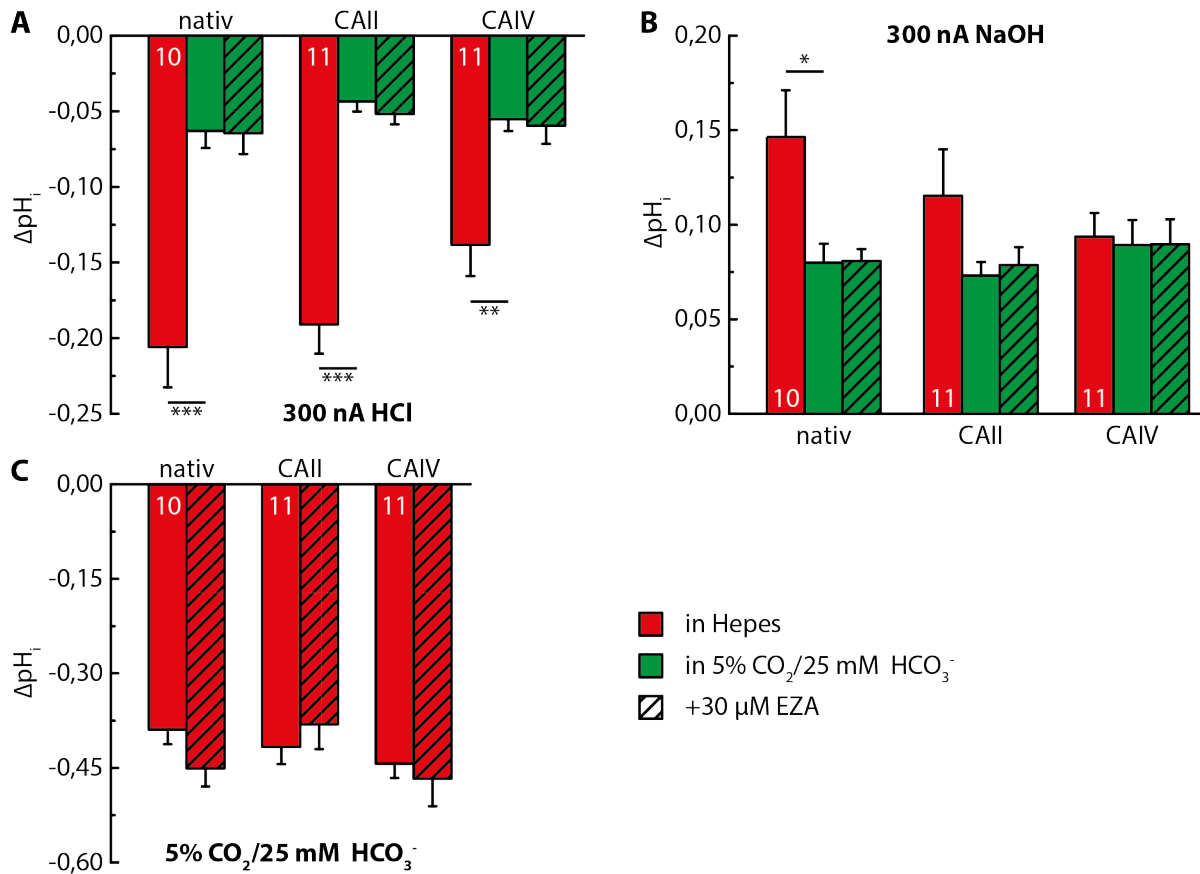


Abbildung 3.15.: Änderung des pH_i durch Injektion von H^+ / OH^- und Applikation von 5% $CO_2/25\text{ mM }HCO_3^-$. Die Änderung des pH_i durch die fünf-minütige Injektion von 300 nA H^+ in HEPES sowie in CO_2/HCO_3^- ohne und mit EZA ist in (A) dargestellt. In (B) sind die jeweiligen Änderungen durch die Gegeninjektion von OH^- gezeigt. Die durch Applikation von 5% $CO_2/25\text{ mM }HCO_3^-$ induzierte Amplitude ist in (C) dargestellt.

$0,09 \pm 0,01$. In CO_2/HCO_3^- waren die Amplituden zwar jeweils kleiner aber nicht signifikant. So betrug sie in nativen Zellen $0,08 \pm 0,01$ und mit EZA $0,08 \pm 0,01$. In CAII-exprimierenden Oozyten wurde in CO_2/HCO_3^- eine Amplitude von $0,07 \pm 0,01$ bzw. mit EZA $0,08 \pm 0,01$ und bei den CAIV-exprimierenden $0,09 \pm 0,01$ bzw. $0,09 \pm 0,01$ mit EZA gemessen.

Auch hier führte die Applikation von CO_2/HCO_3^- zu einer Ansäuerung der Oozyten (Abbildung 3.15 C). Im Vergleich zu den nativen Oozyten zeigten weder die CAII- noch die CAIV-exprimierenden Oozyten in der Amplitude einen signifikanten Unterschied. Auch EZA führte innerhalb eines Zelltyps zu keiner signifikanten Änderung der Amplitude. Bei den nativen Oozyten wurde eine Amplitude von $-0,39 \pm 0,02$ und mit EZA von $-0,45 \pm 0,03$ gemessen. Die CAII-exprimierenden Oozyten hatten eine Amplitude von -

$0,42 \pm 0,03$ ohne EZA und mit EZA von $-0,38 \pm 0,04$, $-0,44 \pm 0,02$ bzw. mit EZA $-0,47 \pm 0,04$ waren die Amplituden der CAIV-exprimierenden Zellen.

Die Injektionen von H^+/OH^- führten mit einigen Minuten Verzögerung zu intrazellulären Ansäuerungen/Alkalinisierungen, deren Raten in Abbildung 3.16 dargestellt sind. Durch die Distanz zwischen HCl/NaOH-Elektrode und pH-Elektrode waren die Raten sehr gering, weshalb sie nicht in min^{-1} sondern in 10^{-3} min^{-1} dargestellt wurden. Insgesamt waren die Varianzen der gemessenen Raten relativ groß, was dazu führte, dass viele Unterschiede, auch recht große, nicht signifikant waren.

Die Injektion von H^+ führte in HEPES zu einer Änderungsrate in nativen Oozyten von $-19,5 \pm 3,2 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, in CAII-exprimierenden betrug sie $-20,0 \pm 3,4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ und in CAIV-exprimierenden Oozyten $-14,3 \pm 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. In $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ waren die Raten bei allen drei Zelltypen geringer als in HEPES, wobei nur bei den CAII- und CAIV-exprimierenden Zellen signifikant ($p \leq 0,001$), da die Raten der Zellen mit CA-Aktivität stärker reduziert waren als bei nativen Oozyten, allerdings nicht signifikant. In nativen Oozyten betrug die Rate in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ $-12,9 \pm 4,1 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, während sie in CAII-exprimierenden Oozyten $-6,8 \pm 1,6 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ und in CAIV-exprimierenden Oozyten $6,5 \pm 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ betrug. In nativen Oozyten zeigte EZA keine Effekt auf die Rate, sie betrug $-13,3 \pm 2,9 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Nicht unterschiedlich dazu waren die Raten in EZA der CAII- und der CAIV-exprimierenden Oozyten mit $-11,3 \pm 2,9 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ bzw. $-11,1 \pm 4,2 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$.

Die Injektion von OH^- führte zu einem Anstieg des pH, dessen Raten in Abbildung 3.16 B dargestellt sind. In HEPES war die Rate jeweils wieder am größten, wenn auch nicht signifikant unterschiedlich durch die großen Varianzen. In nativen Oozyten betrug sie $20,8 \pm 3,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, während diese in CAII-exprimierenden Oozyten $22,9 \pm 7,1 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ und bei CAIV-exprimierenden $24,1 \pm 13,3 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ betrug. In $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ war die Rate der nativen auf $13,1 \pm 3,0 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ reduziert. CA-Aktivität reduzierte die Rate noch stärker, bei CAII-exprimierenden Oozyte auf $9,1 \pm 1,6 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ und bei CAIV-exprimierenden Oozyten auf $8,8 \pm 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Unter EZA waren die Raten in nativen Oozyten $-13,1 \pm 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. In CAII-exprimierenden Oozyten war die Rate mit $15,0 \pm 2,9 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ signifikant höher ($p \leq 0,05$) als ohne EZA. In CAIV-exprimierenden Oozyten war sie mit $12,7 \pm 2,1 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ zwar ebenfalls kleiner als ohne EZA, aber nicht signifikant.

Die katalytische Aktivität der CA wurde über die Änderungsrate induziert durch Applikation von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ gemessen (Abbildung 3.16 C). Die CA-exprimierenden Zellen zeigten eine jeweils signifikant höhere ($p \leq 0,001$) Änderungsrate als die nativen Oozyten ($-0,21 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$). Sie betrug bei den CAII-exprimierenden Oozyten $-0,57 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$

und bei den CAIV-exprimierenden $-0,64 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$. Unter EZA unterschieden sich die Zelltypen nicht mehr signifikant von einander. Die Rate bei den nativen Oozyten betrug $-0,17 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$. Bei den CAII-exprimierenden Oozyten war die Rate signifikant ($p \leq 0,001$) auf $-0,15 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ reduziert. Ebenfalls signifikant reduziert ($p \leq 0,001$) war die Rate unter EZA bei den CAIV-exprimierenden Oozyten mit $-0,19 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$.

Aus der berechneten Konzentration an injizierten H^+ (vgl. Unterabschnitt 2.4.3) und der daraus resultierenden Änderung des pH_i konnte die intrinsische (in HEPES) und die totale Pufferkapazität (in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$) bestimmt werden. Als Vergleich wurde die intrinsische Pufferkapazität ebenfalls über die Applikation von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ bestimmt (Abbildung 3.17 A). In nativen Zellen wurde durch H^+ -Injektion eine intrinsische Pufferkapazität von $15,1 \pm 2,2 \text{ mM}$ gemessen. Die durch CO_2 bestimmte intrinsische Puf-

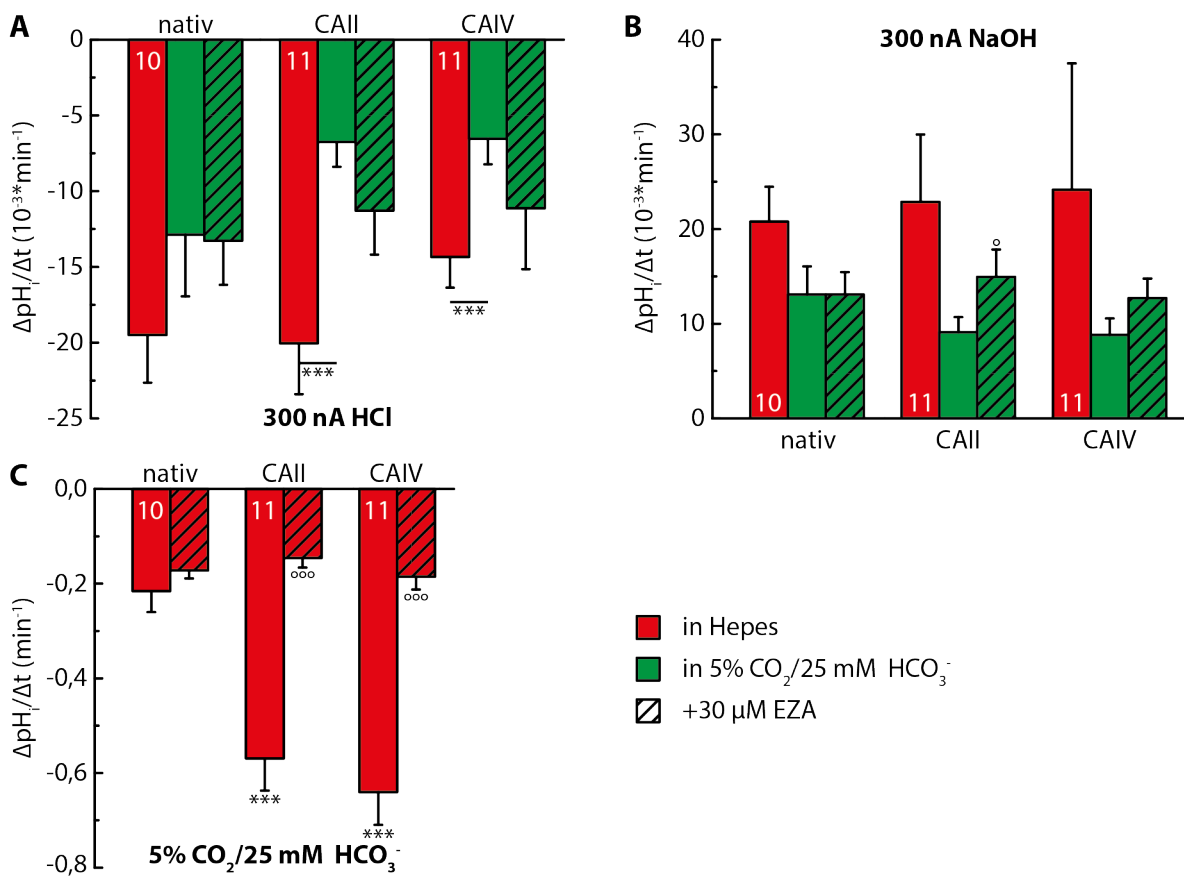


Abbildung 3.16.: Änderungsrate des pH_i durch Injektion von H^+/OH^- und Applikation von 5% $\text{CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$. Die Änderungsrate des pH_i durch die fünf-minütige Injektion von 300 nA H^+ in HEPES sowie in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ohne und mit EZA ist in (A) dargestellt. In (B) sind die jeweiligen Änderungsraten durch die Gegeninjektion von OH^- gezeigt. Die durch Applikation von 5% $\text{CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$ induzierte Änderungsrate ist in (C) dargestellt.

ferkapazität lag im Vergleich dazu bei $17,6 \pm 2,4$ mM, was sich nicht signifikant unterschied. Die totale Pufferkapazität betrug bei den nativen Oozyten $72,1 \pm 16,9$ mM. Bei den CAII-exprimierenden Oozyten wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Methoden zur Bestimmung der intrinsischen Pufferkapazität gemessen. Mit der H^+ -Injektion wurde eine intrinsische Pufferkapazität von $16,1 \pm 1,8$ mM und durch CO_2 von $17,3 \pm 2,1$ mM gemessen. Die totale Pufferkapazität betrug $77,8 \pm 12,8$ mM. Damit zeigte sich keine signifikante Differenz zu den nativen Oozyten. Bei den CAIV-exprimierenden Oozyten war die über H^+ -Injektion bestimmte Pufferkapazität mit $21,1 \pm 2,2$ mM signifikant größer ($p \leq 0,05$) als bei den nativen Oozyten. Mit CO_2 wurde eine Pufferkapazität von $14,67 \pm 1,1$ mM gemessen. Die totale Pufferkapazität betrug bei den CAIV-exprimierenden Oozyten $61,2 \pm 9,3$ mM.

Aus der intrinsischen und der CO_2 -abhängigen Pufferkapazität kann die totale Pufferkapazität berechnet werden (Abbildung 3.17 B). Die CO_2 -abhängigen Pufferkapazitäten der drei Zelltypen unterschieden sich nicht signifikant von einander. Bei den nativen Oozyten wurde eine β_{CO_2} von $15,5 \pm 1,7$ mM berechnet. $16,82 \pm 1,4$ mM und $16,31 \pm 1,2$ mM waren die CO_2 -abhängigen Pufferkapazitäten der CAII- bzw. CAIV-exprimierenden Oozyten. Die daraus berechneten totalen Pufferkapazitäten waren jeweils geringer als die gemessenen totalen Pufferkapazitäten. Berechnet wurde eine totale Pufferkapazität

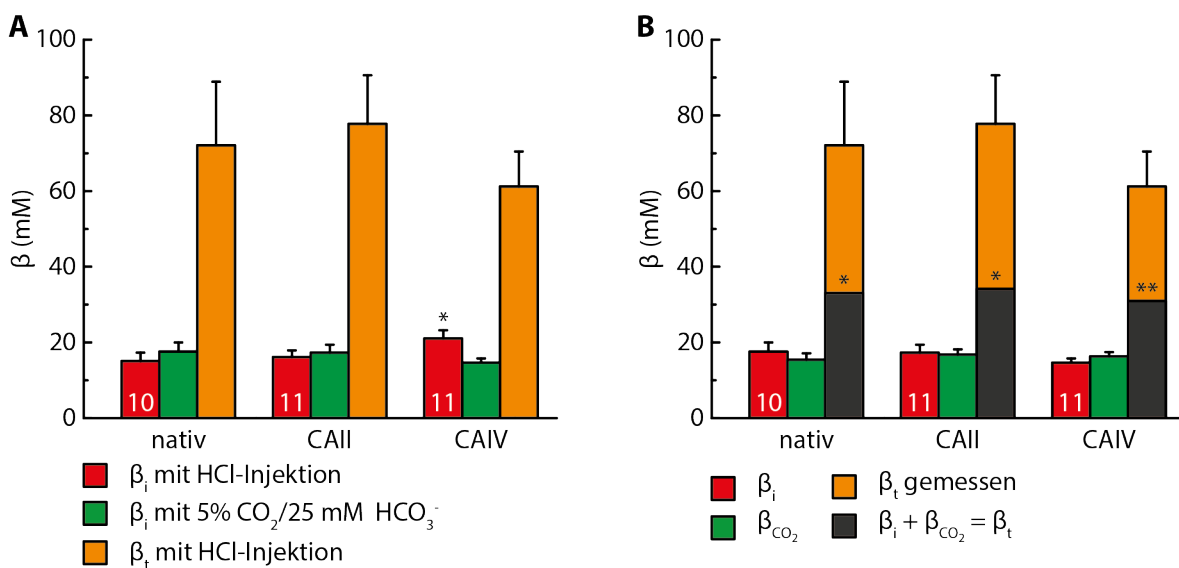


Abbildung 3.17.: Pufferkapazitäten bestimmt durch Injektion von H^+ in 5% CO_2 /25 mM HCO_3^- . Durch in Injektion von H^+ konnte in HEPES die intrinsische (β_i) und in CO_2/HCO_3^- die totale Pufferkapazität (β_t) bestimmt werden (A). Zur Kontrolle wurde β_i mit CO_2 bestimmt. (B) zeigt den Vergleich der berechneten totalen Pufferkapazität ($\beta_i + \beta_{CO_2}$) mit der über H^+ -Injektion gemessenen totalen Pufferkapazität.

von 33,1 mM ($p \leq 0,05$) für die nativen Oozyten. Bei den CAII-exprimierenden Oozyten wurde eine totale Pufferkapazität von 34,1 mM berechnet ($p \leq 0,05$) und bei den CAIV-exprimierenden betrug sie 31,0 mM ($p \leq 0,01$; Abbildung 3.17 B).

Neben den üblichen Parametern (Amplitude und Änderungsrate) konnte bei diesen Versuchen ein weiterer Parameter analysiert werden: die Verzögerung zwischen dem Start der Injektion und dem Beginn der Änderung des pH_i (δ ; Abbildung 3.18). Die Verzögerung wurde bei der Injektion von H^+ und auch bei der Injektion von OH^- bestimmt. Bei den nativen Oozyten (Abbildung 3.18 A) war die Verzögerung in HEPES jeweils am größten und in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ leicht reduziert, jedoch nicht signifikant. Bei der H^+ -Injektion gab es in HEPES eine Verzögerung von $5,28 \pm 0,58$ min, in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ von $4,39 \pm 0,87$ min und in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^- + \text{EZA}$ von $4,94 \pm 0,49$ min. Bei der OH^- -Injektion ergaben sich Verzögerungen von $5,41 \pm 0,66$ min in HEPES, $4,75 \pm 0,69$ min in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ und $4,82 \pm 0,68$ min in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^- + \text{EZA}$.

Bei den CAII-exprimierenden Oozyten war die Verzögerung in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ mit $4,16 \pm 0,43$ min signifikant reduziert ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Verzögerung in HEPES mit $5,25 \pm 0,61$ min. Mit EZA war die Verzögerung mit $4,93 \pm 0,59$ min wieder größer als ohne EZA, jedoch nicht signifikant. Bei der OH^- -Injektion lag die Verzögerung in HEPES bei $5,59 \pm 0,85$ min und mit $2,63 \pm 0,34$ min war diese signifikant reduziert ($p \leq 0,05$) in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. Auch bei OH^- -Injektion war die Verzögerung mit EZA wieder größer als ohne EZA ($3,88 \pm 0,51$ min), was aber nicht signifikant war. Bei den CAIV-exprimierenden Zellen (Abbildung 3.18 C) zeigte sich qualitativ das gleiche Bild wie bei den CAII-exprimierenden. Im Vergleich zur Verzögerung in HEPES ($5,14 \pm 0,60$ min) war sie in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ($3,37 \pm 0,60$) signifikant reduziert ($p \leq 0,01$) und wieder erhöht unter EZA ($4,94 \pm 0,57$ min). Bei der Injektion von OH^- wurde in HEPES eine Verzögerung von $4,69 \pm 0,47$ min gemessen. In $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ betrug sie $3,89 \pm 0,51$ min und mit EZA $3,89 \pm 0,44$ min, was sich jeweils nicht signifikant unterschied.

Aus den Verzögerungszeiten konnten über die von Einstein aufgestellte Beziehung ($\lambda^2 = 6 \cdot D \cdot t$; Einstein, 1905) die apparenten Diffusionskoeffizienten der H^+ ($D_{\text{H}}^{\text{app}}$) berechnet werden (Abbildung 3.18 D). Dafür wurde eine Distanz zwischen HCl/NaOH-Elektrode und pH-Elektrode von 600 μm angenommen. Für die Berechnung der Diffusionskoeffizienten wurden nur die Verzögerungen aus den H^+ -Injektionen verwendet. Native Oozyten hatten in HEPES einen Diffusionskoeffizienten von $189,5 \pm 20,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$, welcher sich in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ nicht signifikant auf $227,6 \pm 44,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ erhöhte und mit EZA $202,3 \pm 19,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ betrug. Bei den CAII-exprimierenden Zellen betrug die Diffusionskoeffizienten $190,5 \pm 22,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in HEPES, $240,3 \pm 25,0 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ und $202,8 \pm 274,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^- + \text{EZA}$. In $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ war der Diffusionskoeffizi-

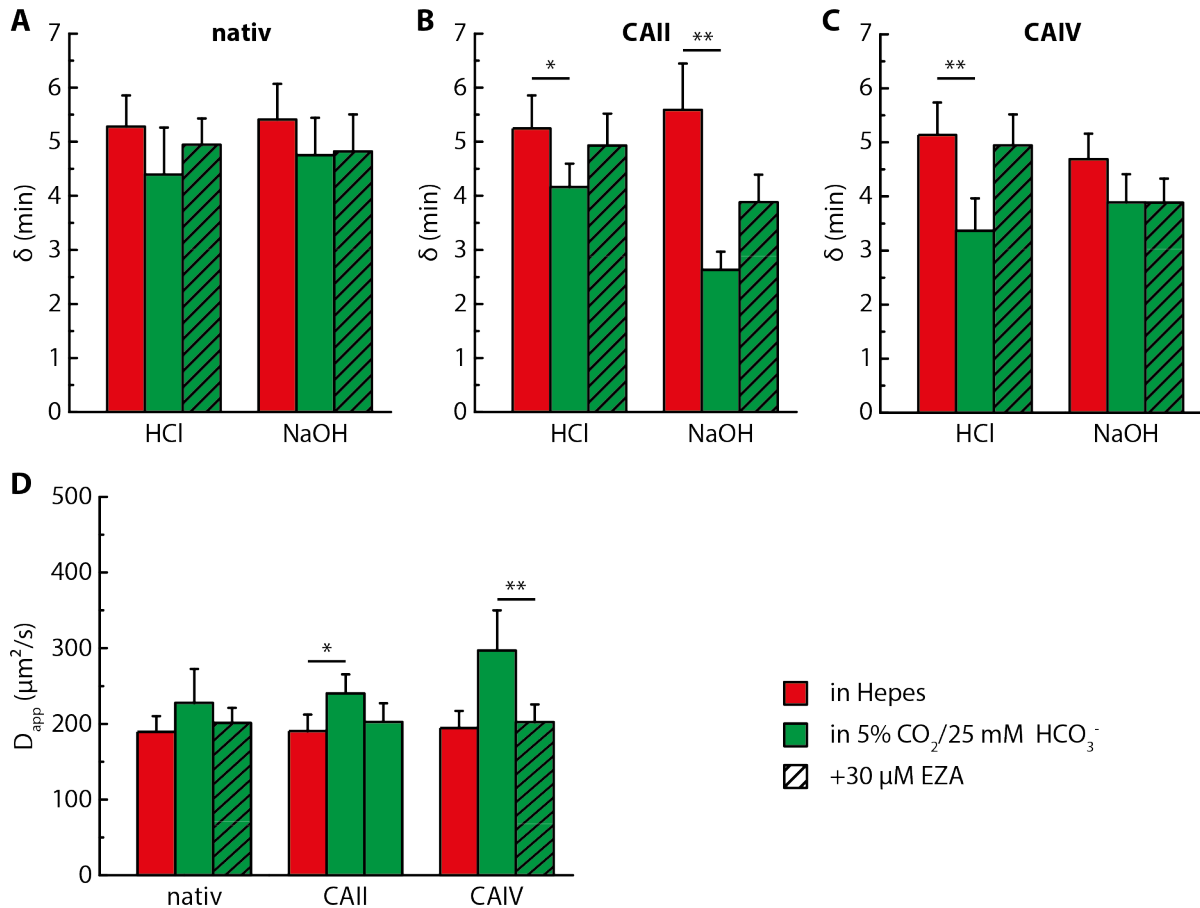


Abbildung 3.18.: Verzögerung (δ) zwischen dem Start der H^+/OH^- -Injektion und dem Beginn der Änderung des pH. Die Verzögerung wurde bei Injektion von H^+ sowie bei der Injektion von OH^- bei nativen (A), CAII-exprimierenden (B) und den CAIV-exprimierenden Oozyten (C) bestimmt. Aus den Verzögerungen konnte die apparente Diffusionskonstante ($D_{\text{H}}^{\text{app}}$) berechnet werden (D).

ent signifikant größer ($p \leq 0,05$) als in HEPES. Bei den CAIV-exprimierenden Oozyten konnte in HEPES ein Diffusionskoeffizient von $194,6 \pm 22,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ berechnet werden. Dieser war signifikant kleiner ($p \leq 0,01$) als der Wert in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ($297,6 \pm 52,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$). In $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^- + \text{EZA}$ lag der Diffusionskoeffizient wieder auf dem Niveau von HEPES ($202,3 \pm 23,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$).

3.5.1.1. Kleine Distanz zwischen pH- und HCl/NaOH-Elektrode

Im Gegensatz zum letzten Versuchsaufbau wurde in diesem Versuch die pH-Elektrode möglichst nah an der HCl/NaOH-Elektrode platziert, und die aus der elektrophoretischen Injektion von H^+/OH^- resultierende Änderung des pH gemessen (Abbildung 3.19). So konnte zusätzlich auch die Entwicklung des pH nahe der Säure/Base-Quelle

untersucht werden. Es wurden zwei verschiedene Injektionsdauern gewählt, eine und fünf Minuten (jeweils $n=5$).

Der Injektion folgte eine Pause bis die transiente Ansäuerung bzw. Alkalinisierung abgeklungen war und sich wieder ein Gleichgewicht eingestellt hat. Die ausgewertete

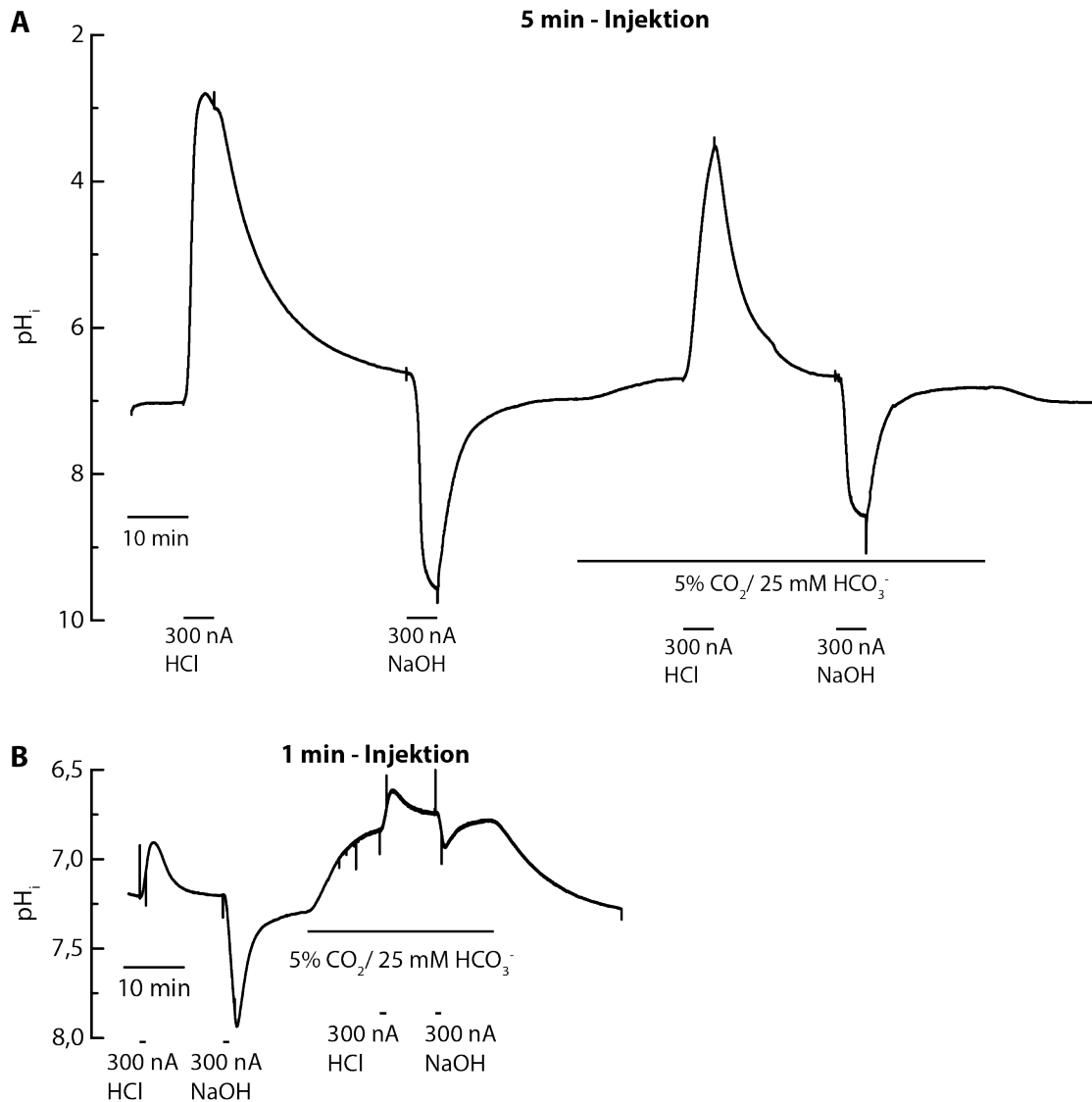


Abbildung 3.19.: Originalregistrierung des pH_i einer nativen Oozyte nahe der HCl/NaOH-Elektrode. (A) zeigt die Originalregistrierung des pH_i für eine Injektionsdauer von fünf Minuten. Eine Originalregistrierung für eine Injektionsdauer von einer Minute ist in (B) dargestellt. Beide Injektionsdauern wurden in HEPES und in CO₂/HCO₃⁻ durchgeführt. Durch die großen Transienten bei fünf-minütiger Injektion und die dadurch verbundene pH-Skala von 2 bis 10 in (A), erscheint die pH-Änderung durch Applikation von CO₂/HCO₃⁻ sehr klein, fällt aber in ihrer Amplitude aber wie in den anderen Versuchen aus.

Amplitude ist hier die maximale Auslenkung, die durch die Injektion zustande kam (Abbildung 3.20 A & B). Durch die ein-minütige Injektion von H^+ wurde einer Erniedrigung des pH von $-0,32 \pm 0,08$ in HEPES gemessen, in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ betrug sie $-0,23 \pm 0,07$, was sich nicht signifikant unterschied. Wurde über fünf Minuten H^+ injiziert betrug die Amplitude in HEPES $-3,20 \pm 0,59$ und war in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ mit $-2,40 \pm 0,63$ signifikant kleiner ($p \leq 0,01$). Wurde Base, also OH^- , für eine Minute injiziert betrug die Änderung des pH in HEPES $0,56 \pm 0,19$ und $0,44 \pm 0,22$ in CO_2 . Nach fünf-minütiger Injektion von OH^- betrug die Änderung $2,36 \pm 0,23$ und war signifikant größer ($p \leq 0,01$) als in CO_2 ($1,56 \pm 0,22$).

Betrachtet man die Änderungsraten induziert durch Injektion von HCl (Abbildung 3.20 C) so zeigte sich bei ein-minütiger Injektion kein signifikanter Unterschied zwischen der Injektion in HEPES ($-0,24 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$) und in CO_2 ($-0,22 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$). Bei der fünf-minütigen Injektion von H^+ war die Änderungsrate in HEPES mit $-1,73 \pm 0,52 \text{ min}^{-1}$ signifikant größer ($p \leq 0,05$) als in CO_2 mit $-0,79 \pm 0,29 \text{ min}^{-1}$. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Injektion von OH^- (Abbildung 3.20 D). Auch hier war die Änderungsrate bei der Injektionsdauer von einer Minute nicht signifikant unterschiedlich. Sie betrug in HEPES $0,60 \pm 0,24 \text{ min}^{-1}$ und $0,51 \pm 0,26 \text{ min}^{-1}$ in CO_2 . Die Änderungsrate bei fünf-minütiger Injektion betrug in HEPES $1,73 \pm 0,45 \text{ min}^{-1}$. In CO_2 war sie mit $1,04 \pm 0,34 \text{ min}^{-1}$ signifikant kleiner ($p \leq 0,01$) als in HEPES.

Zusätzlich zu der Amplitude und der Änderungsrate induziert durch die Injektion wurde bei diesem Versuch auch das Abklingen der transienten Ansäuerung bzw. Alkalinisierung untersucht. Es wurde sowohl linear als auch durch die Zeitkonstante einer monoexponentiellen Funktion charakterisiert (Abbildung 3.21). Die Ansäuerung nach der ein-minütigen Injektion nahm mit einer Rate von $0,08 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ in HEPES und mit $0,06 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$ in CO_2 ab (kein signifikanter Unterschied). Auch bei der Abklingrate nach fünf-minütiger Injektion von H^+ zeigte sich kein Unterschied zwischen HEPES ($0,43 \pm 0,12 \text{ min}^{-1}$) und CO_2 ($0,45 \pm 0,15 \text{ min}^{-1}$). Beim Abklingen der Alkalinisierung betrug die Steigung $-0,34 \pm 0,11 \text{ min}^{-1}$ in HEPES und $-0,31 \pm 0,17 \text{ min}^{-1}$ in CO_2 nach ein-minütiger Injektion von OH^- . Bei der fünf-minütigen Injektion war die Abklingrate in HEPES ($-0,68 \pm 0,11 \text{ min}^{-1}$) signifikant höher ($p \leq 0,05$) als in CO_2 ($-0,49 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$).

Die Zeitkonstante für das Abklingen der Ansäuerung betrug nach ein-minütiger Injektion $2,88 \pm 1,11 \text{ min}$ in HEPES und $2,75 \pm 0,60 \text{ min}$ in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, was sich nicht signifikant unterscheidet. Nach fünf-minütiger Injektion zeigte sich eine signifikant größere ($p \leq 0,01$) Zeitkonstante in HEPES ($6,63 \pm 0,57 \text{ min}$) als in CO_2 ($4,74 \pm 0,30 \text{ min}$). Bei der Zeitkonstante des Abklingvorgangs der Alkalinisierung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Abklingen in HEPES und CO_2 , weder nach ein- noch nach

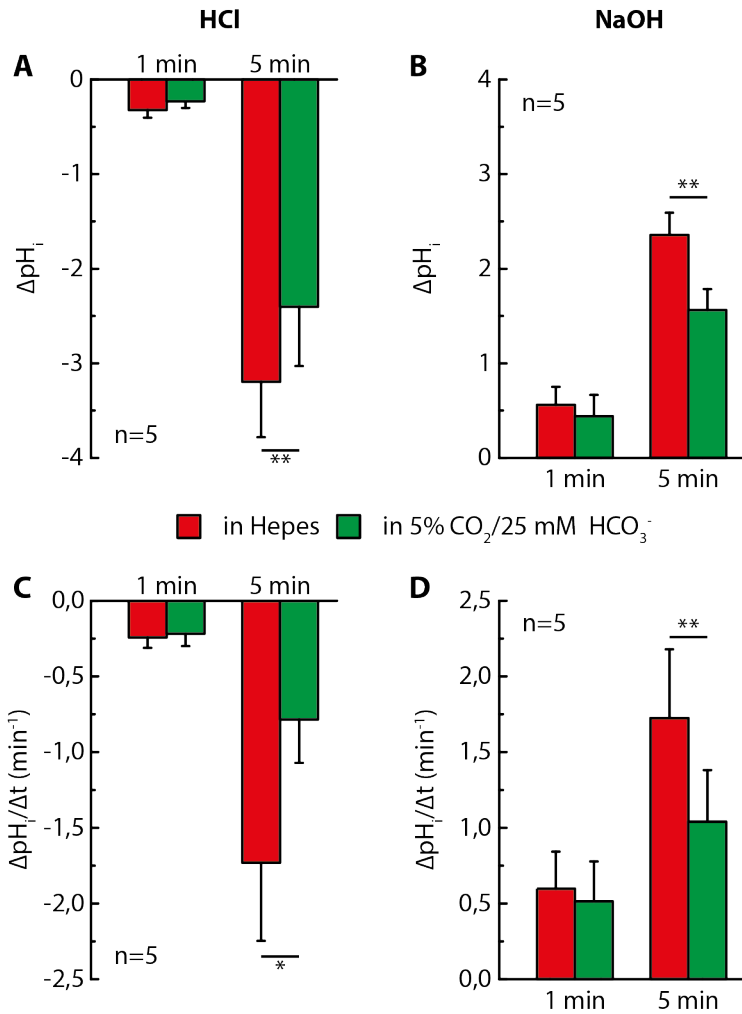


Abbildung 3.20.: Amplituden und Änderungsraten nativer Oozyten detektiert nahe der HCl/NaOH-Elektrode. Die maximale Amplitude resultierend aus einer Injektion von H^+ ist in (A) und die maximale Amplitude resultierend aus einer Injektion von OH^- ist in (B) dargestellt. Die jeweiligen Änderungsraten sind in C (HCl) bzw. D (NaOH) gezeigt.

fünfminütiger Injektion. Die Zeitkonstante betrug bei ein-minütiger Injektion $1,86 \pm 0,63$ min in HEPES und $1,75 \pm 0,55$ min in CO₂. Nach fünf-minütiger Injektion wurde in HEPES eine Zeitkonstante von $2,63 \pm 0,44$ min und in CO₂ $2,67 \pm 0,22$ min gemessen.

Zusammenfassung Die katalytische Aktivität der CA-exprimierenden Zellen konnte über die signifikant erhöhte Änderungsrate bei Applikation von CO₂/HCO₃⁻ nachgewiesen werden (3.16 C).

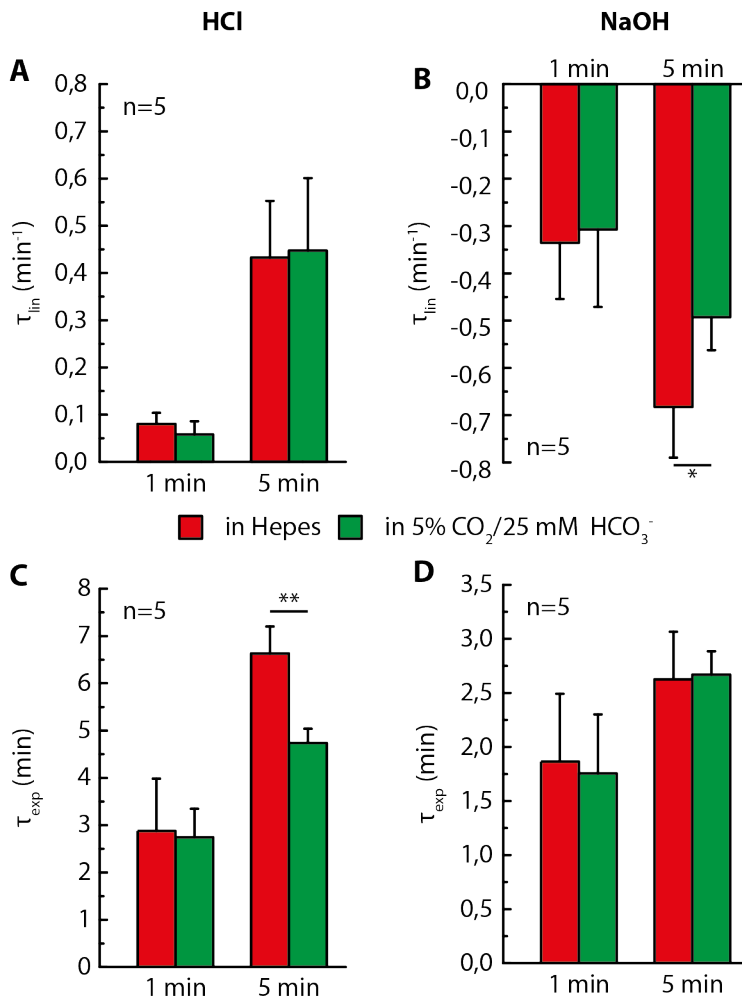


Abbildung 3.21.: Abklingverhalten der transienten Ansäuerung bzw. Alkalinisierung nativer Oozyten. Das Abklingen der Transienten Ansäuerung bzw. Alkalinisierung wurde auf zwei unterschiedliche Arten analysiert. Zum einen wurde der erste Teil des Abklingens linear gefittet und die Steigung (τ_{lin}) ausgewertet (A & B) und zum anderen wurde das gesamte Abklingen mit einer monoexponentiellen Funktion gefittet und Zeitkonstante (τ_{exp}) ausgewertet (C & D).

Die H⁺-Injektion führte zu vergleichbaren intrinsischen Pufferkapazitäten wie bei Applikation von CO₂. Die berechneten totalen Pufferkapazitäten lagen signifikant unter den tatsächlich gemessenen Pufferkapazitäten.

Aus dem Zeitunterschied zwischen Injektion von Säure/Base und dem Beginn der Änderung des pH_i konnten Rückschlüsse über die Mobilität der H⁺-Ionen gezogen werden. Zwischen der Injektion von H⁺ und der Injektion von OH⁻ zeigten sich keine quantitativen Unterschiede. In Anwesenheit von CO₂/HCO₃⁻ erhöhte die CA-Aktivität signifikant die apparente Mobilität der Protonen.

Um eine punktförmige Säure/Base-Quelle herum können sich große pH-Gradienten ausbilden, die sowohl in HEPES als auch in CO_2 mehrere Minuten zum abklingen brauchen.

3.5.2. In 2% CO_2 /10 mM HCO_3^-

Wie auch schon die globale Ansäuerung über die Membran wurde auch dieser Versuchstyp sowohl in 5% als auch in 2% CO_2 durchgeführt, um eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit der in Unterabschnitt 3.5.1 gemessenen Effekte zu überprüfen. Auch hier führte die elektrophoretische Injektion von H^+ bzw. OH^- bei beiden Zelltypen (native $n=6$, CAII-exprimierende $n=10$) zu einer Ansäuerung sowohl in HEPES als auch in Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ohne und mit EZA. In den Originalspuren ist zu sehen, dass zwischen der Injektion der Säure/Base zwischen 5 und 10 Minuten vergingen bis eine Änderung des pH_i detektiert werden konnte (Abbildung 3.22).

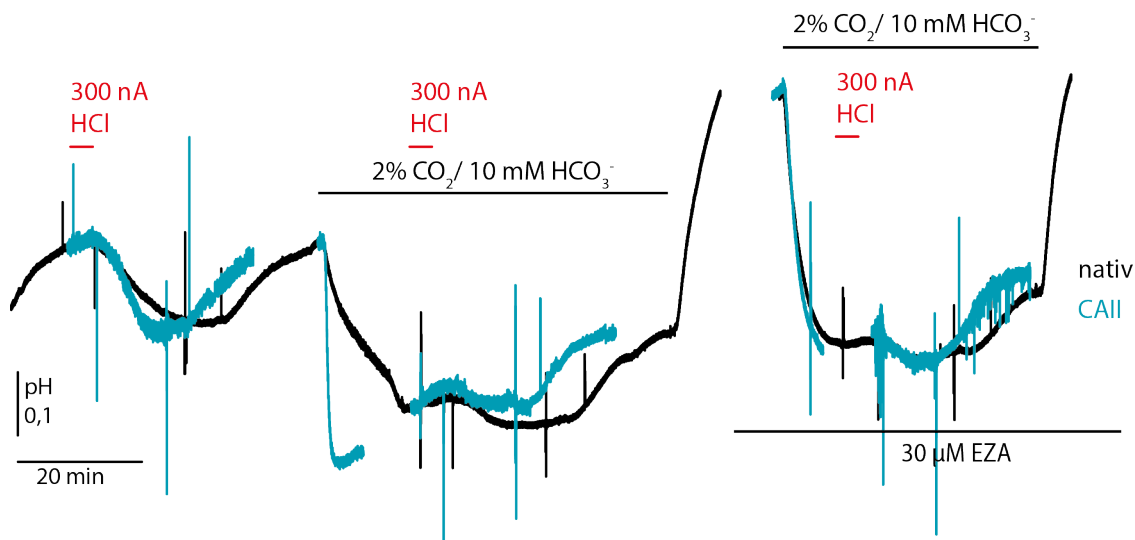


Abbildung 3.22.: Originalregistrierung des pH_i bei Injektion von H^+/OH^- in Ab- und Anwesenheit von 2% $\text{CO}_2/10 \text{ mM HCO}_3^-$. Die Abbildung zeigt den Verlauf des pH_i von nativen (schwarz) und CAII-exprimierenden (Cyan) Oozyten während Injektion von H^+/OH^- in Ab- und Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. Zusätzlich wurde Säure auch in Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^- + \text{EZA}$ injiziert, um die katalytische Aktivität der CAs zu inhibieren.

Die Änderungsrate induziert durch Injektion von H^+ (Abbildung 3.23 A) betrug in nativen Oozyten in HEPES $-16,50 \pm 5,00 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. In CO_2 war sie mit $-9,52 \pm 1,42 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ wesentlich kleiner als in HEPES jedoch nicht signifikant, was durch den großen Fehler des Wertes in HEPES bedingt sein kann. In $\text{CO}_2 + \text{EZA}$ war sie mit -

$8,53 \pm 1,50 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ signifikant kleiner ($p \leq 0,05$) als in HEPES. Bei den CAII-exprimierenden Oozyten betrug die Änderungsrate in HEPES $-15,62 \pm 2,02 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. In CO_2 war die Rate mit $-6,22 \pm 0,72 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ signifikant reduziert ($p \leq 0,001$) im Vergleich zur Rate in HEPES. Auch im Vergleich zur Änderungsrate nativer Oozyten in CO_2 war sie signifikant reduziert ($p \leq 0,05$). Unter EZA war die Änderungsrate $-8,79 \pm 1,78 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ was sich nicht von dem entsprechenden Wert in nativen Oozyten unterschied. Im Vergleich zu HEPES war die Änderungsrate signifikant reduziert ($p \leq 0,001$).

Bei den Änderungsraten induziert durch Injektion von OH^- (Abbildung 3.23 B) zeigte sich weder bei den nativen noch bei den CAII-exprimierenden Zellen ein signifikanter Unterschied zwischen den Raten in HEPES und $\text{CO}_2 \pm \text{EZA}$. Bei nativen Oozyten betrug die Änderungsrate in HEPES $14,67 \pm 3,78 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, in CO_2 $12,87 \pm 1,78 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ und in CO_2 mit EZA $15,76 \pm 3,30 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Die Änderungsrate in CAII-exprimierenden Zellen betrug in HEPES $13,34 \pm 1,51 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, während sie in CO_2 $12,98 \pm 1,23 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ und in $\text{CO}_2 + \text{EZA}$ $12,96 \pm 1,58 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ betrug.

Bei der Verzögerung (Abbildung 3.23 C & D) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen nativen und CAII-exprimierenden Oozyten, weder in HEPES noch in CO_2 . Bei Injektion von H^+ betrug sie in nativen Oozyten in HEPES $6,64 \pm 1,20 \text{ min}$, in CO_2 $5,60 \pm 1,10 \text{ min}$ und in $\text{CO}_2 + \text{EZA}$ $5,72 \pm 0,78 \text{ min}$. In CAII-exprimierenden Oozyten zeigte sich ein ähnliches Bild. In HEPES betrug die Verzögerung $7,21 \pm 0,54 \text{ min}$, was signifikant länger ($p \leq 0,01$) war als CO_2 ($5,77 \pm 0,28 \text{ min}$). Auch in $\text{CO}_2 + \text{EZA}$ war die Verzögerung im Vergleich zu HEPES mit $5,65 \pm 0,49 \text{ min}$ signifikant kürzer ($p \leq 0,05$). Qualitativ zeigte sich ein ähnliches Verhalten bei der Injektion von OH^- . Auch hier reduziert CO_2 die Verzögerung in nativen Zellen, durch die recht großen Variationen aber nicht signifikant. So betrug die Verzögerung in HEPES $5,03 \pm 0,511 \text{ min}$, in CO_2 $4,34 \pm 0,77 \text{ min}$ und in $\text{CO}_2 + \text{EZA}$ $4,42 \pm 0,79 \text{ min}$. In CAII-exprimierenden Oozyten reduzierte sich die Verzögerung in HEPES ($5,61 \pm 0,44 \text{ min}$) signifikant ($p \leq 0,01$) auf $4,26 \pm 0,42 \text{ min}$ in CO_2 und in $\text{CO}_2 + \text{EZA}$ ($4,14 \pm 0,42 \text{ min}$; $p \leq 0,05$).

3.5.2.1. Fester Abstand zwischen HCl- und pH-Elektrode

Damit die Varianz der Verzögerung bedingt durch die Variation des Abstandes zwischen den beiden Elektroden verringert werden konnte, wurden beide Elektroden mit Dentalwachs so fixiert, dass die Spitzen einen Abstand von ca. $500 \mu\text{m}$ hatten. Die gemessenen Verzögerungen sind in Abbildung 3.24 dargestellt. Bei Injektion von H^+ betrug sie in nativen Zellen in HEPES $9,00 \pm 1,25 \text{ min}$. Die Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ führte zu einer signifikant kürzeren ($p \leq 0,05$) Verzögerung ($6,15 \pm 0,38 \text{ min}$) als in HEPES. Auch in $\text{CO}_2 + \text{EZA}$ war die Verzögerung mit $6,32 \pm 0,64 \text{ min}$ signifikant kürzer ($p \leq 0,05$) als in

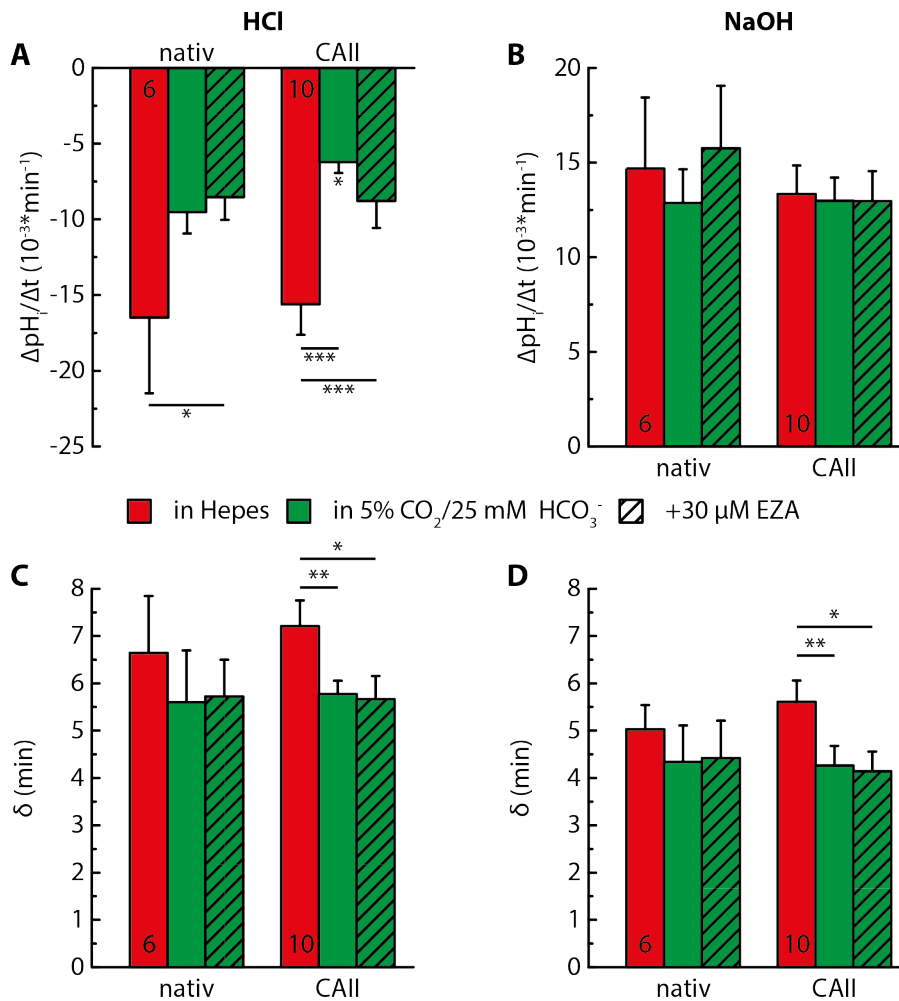


Abbildung 3.23.: Änderungsrate und Verzögerung (δ) des pH_i durch Injektion von H^+/OH^- in Ab- und Anwesenheit von 2% $\text{CO}_2/10 \text{ mM HCO}_3^-$. Die Änderungsrate des pH_i durch die fünf-minütige Injektion von 300 nA H^+ in HEPES sowie in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ohne und mit EZA ist in (A) dargestellt. In (B) sind die jeweiligen Änderungsraten durch die Injektion von OH^- gezeigt. Die Verzögerung wurde bei Injektion von H^+ (C) sowie bei der Injektion von OH^- (D) bei nativen und CAII-exprimierenden Oozyten analysiert.

HEPES. Die Verzögerungen, die bei den CAII-exprimierenden Oozyten gemessen wurden waren jeweils nicht signifikant unterschiedlich zu den Verzögerungen in nativen Oozyten. In HEPES betrug sie $9,50 \pm 0,19 \text{ min}$, in CO_2 $6,47 \pm 0,51 \text{ min}$ und in CO_2+EZA $6,98 \pm 0,67 \text{ min}$. Die Verzögerung in CO_2 war damit signifikant niedriger ($p \leq 0,001$) als in HEPES. Auch die Verzögerung in CO_2+EZA war signifikant reduziert ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Verzögerung in HEPES. Die Verzögerung bei Injektion von OH^- betrug in nativen Oozyten in HEPES $10,02 \pm 1,50 \text{ min}$. In CO_2 war sie mit $6,72 \pm 1,14 \text{ min}$

signifikant kleiner ($p \leq 0,05$) als in HEPES. Auch die Verzögerung in $\text{CO}_2 + \text{EZA}$ war mit $6,21 \pm 0,60$ min signifikant kleiner ($p \leq 0,05$) als in HEPES. Bei den CAII-exprimierenden Zellen zeigte sich das selbe Bild. Hier betrug die Verzögerung in HEPES $9,46 \pm 1,15$ min. Signifikant kleiner ($p \leq 0,05$) war sie in Anwesenheit von CO_2 ($5,71 \pm 0,70$ min). Auch unter $\text{CO}_2 + \text{EZA}$ war die Verzögerung signifikant kleiner ($p \leq 0,05$), sie betrug $6,11 \pm 0,65$ min.

Zwischen den Zelltypen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

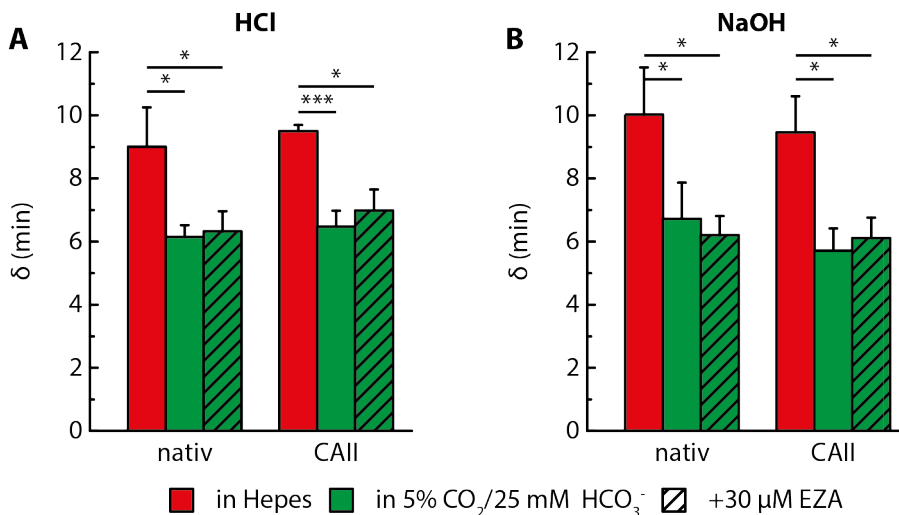


Abbildung 3.24.: Verzögerung (δ) zwischen dem Start der H^+ -Injektion und dem Beginn der Änderung des pH in 2% $\text{CO}_2/10$ mM HCO_3^- mit festem Elektrodenabstand. Die Verzögerung wurde bei Injektion von H^+ (A) sowie bei der Injektion von OH^- (B) bei nativen und CAII-exprimierenden Oozyten analysiert. Die Elektroden waren so mit Dentalwachs fixiert, dass die Spitzen einen Abstand von ca. 500 μm hatten.

Zusammenfassung In 2% $\text{CO}_2/10$ mM HCO_3^- zeigte sich keine Verringerung der Verzögerung durch die katalytische Aktivität der CAII. Auch bei einem festen Abstand zwischen den Spitzen der Elektroden zeigte sich kein Effekt der CA-Aktivität auf die Verzögerung und damit auf die Mobilität der H^+ in Anwesenheit von $\text{CO}_2/10$ mM HCO_3^- .

3.6. Dynamische Pufferung

Die Stärke der Pufferung wird über die Pufferkapazität β gemessen. Dabei wird die Änderung des pH, und damit der $[\text{H}^+]$, im Äquilibrium gemessen und in Bezug zur Änderung der totalen H^+ -Konzentration gesetzt (Unterabschnitt 2.7.2). Die $[\text{H}^+]$ be-

findet sich jedoch nicht immer sofort im Äquilibrium, so dass auch Zwischenzustände zwischen den Äquilibria eine Bedeutung zukommt, weshalb hier eine Beschreibung dieser Zwischenzustände entwickelt wird. Aus Gründen der Einfachheit (Vermeidung des Logarithmus) wird im folgenden von der $[H^+]$ und nicht vom pH gesprochen und damit gerechnet und am Ende alles in pH bzw. als β ausgedrückt.

Wie in Unterabschnitt 3.4.1 und Unterabschnitt 3.4.2 gezeigt wurde, kann die Amplitude bzw. die Pufferkapazität unbeeinflusst bleiben, während sich der Verlauf des pH_i durchaus ändern kann. So beschleunigt die CA-Aktivität die Ansäuerungsrate, induziert durch eine Änderung der $[CO_2]_e$, während es die Ansäuerungsrate induziert durch Butyrat in Anwesenheit von CO_2/HCO_3^- verlangsamt.

Die der Pufferung zugrunde liegende chemische Reaktion ist die Verschiebung des Gleichgewichtes eines Säure/Base-Paars. Dieses wird im Gleichgewicht durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung beschrieben: $K_s = \frac{c_{H^+} \cdot c_b}{c_a}$. Das Gleichgewicht wird also nur von der Säurekonstante K_s bzw. pK_s definiert. Bei den intrinsischen Puffern kann man zu jeder Zeit von einem Quasi-Gleichgewicht ausgehen, da die Reaktionskonstanten sehr groß sind (ca. 10^{10} s^{-1}) und damit weit unter dem hier beobachtbaren Zeitintervall liegen. Liegen die Reaktionskonstanten aber im Sekundenbereich ($\leq 10 \text{ s}^{-1}$), so kann nicht mehr angenommen werden, dass sich der Puffer zu jeder Zeit im Gleichgewicht befindet. Das ist beim CO_2/HCO_3^- -Puffersystem der Fall, hier beträgt die Hydratisierungskonstante von CO_2 nur $0,14 \text{ s}^{-1}$. Wenn nicht mehr von einem Gleichgewicht ausgegangen werden kann, gilt jedoch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung, die das Säure/Base-Gleichgewicht beschreibt, nicht mehr. Der Übergangszustand wird durch diese Gleichung deshalb nicht beschrieben, so dass auch die zeitliche Entwicklung der Pufferkapazität über diese Gleichung nicht beschrieben werden kann. Für eine zeitlich dynamische Beschreibung der Pufferkapazität muss auch die der Pufferung zugrunde liegende Bindung von Protonen zeitlich dynamisch beschrieben werden. Für die Entwicklung der dynamischen Pufferkapazität müssen zuerst einmal einige generelle Überlegungen zur „normalen“ Pufferkapazität angestellt werden:

- Die totale Protonenkonzentration C_{H^+} setzt sich auf der Konzentration der freien c_{H^+} und der gebundenen Protonen c_a zusammen: $C_{H^+} = c_{H^+} + c_a$.
- Eine Änderung der totalen Konzentration \dot{C}_{H^+} teilt sich in eine Änderung der freien \dot{c}_{H^+} und der gebundenen Protonen \dot{c}_a auf: $\dot{C}_{H^+} = \dot{c}_{H^+} + \dot{c}_a$.
- Eine Änderung von C_{H^+} (ein Input) kann nur von außen kommen, d.h. $\dot{C}_{H^+} = \dot{c}_{H^+} + \dot{c}_a = \dot{c}_{H^+}^{in} + \dot{c}_a^{in}$

- Die totale Pufferkonzentration C_a setzt sich aus der undissoziierten Säure c_a und dem entsprechenden Anion c_b zusammen: $C_a = c_a + c_b$.
- Die Änderung der totalen Pufferkonzentration \dot{C}_a setzt sich aus der Änderung der undissoziierten Säure \dot{c}_a und der Änderung des Anion \dot{c}_b zusammen: $\dot{C}_a = \dot{c}_a + \dot{c}_b$.
- Auch eine Änderung von C_a (Input) kann nur von außen kommen, d.h. $\dot{C}_a = \dot{c}_a + \dot{c}_b = \dot{c}_a^{in} + \dot{c}_b^{in}$.

Im Gleichgewichtssystem wird eine Änderung der totalen Konzentration instantan auf die freien und die gepufferten Protonen aufgeteilt. Im Gegensatz dazu muss im dynamischen System noch weiter unterschieden werden. Dadurch, dass die Pufferung nicht instantan ist, d.h. die Bindung und damit Pufferung der Protonen eine gewisse (messbare) Zeit dauert, wird die Änderung der totalen Protonenkonzentration zu einem größeren Teil zur freien Konzentration addiert als dies im Gleichgewicht (quasi-statisch) der Fall ist und zu einem entsprechend kleineren Teil zu der gepufferten Konzentration. Dieser Unterschied wird über die Zeit abgebaut bis sich das System wieder im Gleichgewicht befindet (Abbildung 3.25A). Wie schnell die Rückkehr ins Gleichgewicht geschieht, hängt von den Reaktionsgeschwindigkeiten r_{buff} und r_{free} des Puffersystems ab, wobei r die Netto-Reaktionsgeschwindigkeit ist ($r = r_{buff} - r_{free}$).

Das bedeutet, dass im dynamischen Fall die Änderung der freien Konzentration dc_{H^+} sich noch mal aufspaltet in eine instantane Änderung $dc_{H^+}^{inst}$, die größer als die Gleichgewichtsänderung dc_{H^+} ist und sich über die Reaktion mit dem Puffer mit der Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes abbaut ($-r \cdot dt$):

$$dc_{H^+} = dc_{H^+}^{inst} - r \cdot dt$$

Für die Änderung der gepufferten Konzentration gilt die Aufteilung in einen instantanen Teil und einen Reaktionsterm ebenfalls. Nur verläuft sie genau entgegengesetzt. Während die instantane Änderung (dc_a^{inst}) kleiner ist als die Änderung im Gleichgewicht, wird sie über die selbe Reaktion aufgebaut ($+r \cdot dt$; Abbildung 3.25 B):

$$dc_a = dc_a^{inst} + r \cdot dt$$

Die Netto-Reaktionsgeschwindigkeit r bzw. die einzelnen Reaktionsgeschwindigkeiten r_{buff} und r_{free} , die die einzelnen Reaktionskonstanten enthalten ($r_{free} = k_{free} \cdot c_a$) und nicht mehr nur die Gleichgewichtskonstante K ($K = \frac{k_{free}}{k_{buff}}$), ermöglichen es nun nicht mehr nur Gleichgewichte sondern auch dynamische Prozesse zu beschreiben.

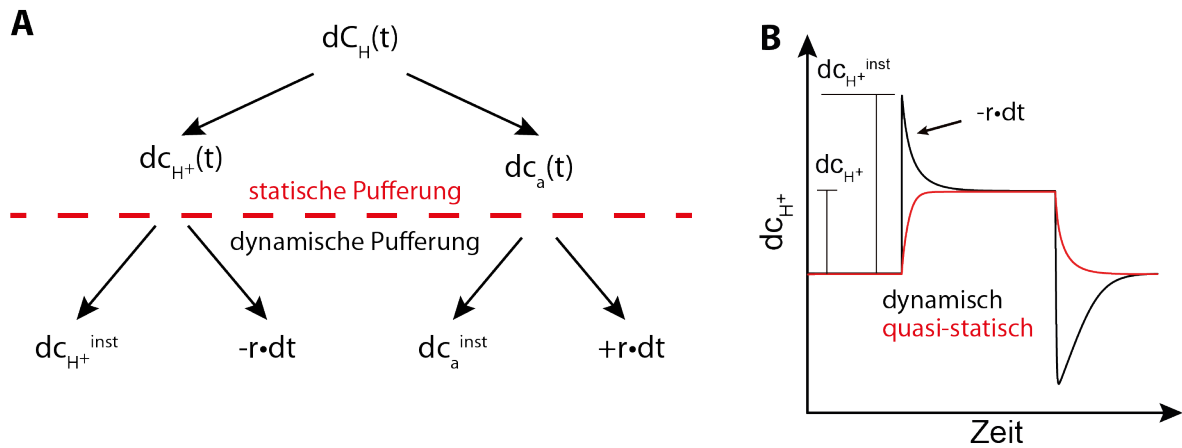


Abbildung 3.25.: Theorie der dynamischen Pufferung. (A) Eine Änderung der totalen Konzentration (dC_{H^+}) wird in eine Änderung der freien Konzentration (dc_{H^+}) und in eine Änderung der gepufferten Konzentration (dc_a) aufgeteilt. Im quasi-statischen Fall geschieht das instantan bzw. viel schneller als der Prozess beobachtet wird. Geschieht diese Aufteilung nicht mehr instantan, muss die dynamische Komponente beachtet werden. So müssen beide Änderungen der Konzentration, der freien und der gepufferten, noch einmal aufgeteilt werden in eine Änderung die instantan geschieht ($dc_{H^+}^{inst}$ und dc_a^{inst}) und in einen zeitlich dynamischen Teil ($\pm r \cdot dt$). (B) zeigt den Verlauf von dc_{H^+} im dynamischen (schwarz) und im quasi-statischen Fall (rot). Durch die nicht instantane Pufferung kommt es zu einem Überschießen von dc_{H^+} über das Gleichgewicht hinweg auf $dc_{H^+}^{inst}$. Dieser Überschuss wird über den Reaktionsterm $-r \cdot dt$ wieder abgebaut bis auf die Änderung im Gleichgewicht dc_{H^+} . Das quasi-statische System geht direkt, ohne Überschießen, zu $dc_{H^+}^{inst}$ über.

Dynamisches gegen quasi-statisches Puffersystem Im chemischen Gleichgewicht gilt für die Dissoziation eines konjugierten Säure/Base-Paares immer die Henderson-Hasselbalch-Gleichung:

$$K_s = \frac{c_{H^+} \cdot c_b}{c_a}$$

$$0 = c_{H^+} \cdot c_b - K_s \cdot c_a$$

Leitet man diesen Ausdruck nach der Zeit ab, erhält man die Änderungen:

$$0 = \dot{c}_b \cdot c_{H^+} + c_b \cdot \dot{c}_{H^+} - K_s \cdot \dot{c}_a$$

Da $\dot{C}_a = \dot{c}_a + \dot{c}_b$ gilt, kann man $\dot{c}_b = \dot{C}_a - \dot{c}_a$ einsetzen, so dass sich

$$0 = c_{H^+} \cdot (\dot{C}_a - \dot{c}_a) + c_b \cdot \dot{c}_{H^+} - K_s \cdot \dot{c}_a$$

ergibt. Änderungen der totalen Pufferkonzentration C_a können nur von außen kommen, so dass $\dot{C}_a = \dot{c}_a^{in} + \dot{c}_b^{in}$ gelten muss. Setzt man diesen Zusammenhang in die Formel ein, erhält man:

$$0 = c_{H^+} \cdot (\dot{c}_a^{in} + \dot{c}_b^{in} - \dot{c}_a) + c_b \cdot \dot{c}_{H^+} - K_s \cdot \dot{c}_a$$

Damit ergibt sich folgendes Gleichungssystem:

$$\begin{aligned} \dot{c}_{H^+} &= \frac{\dot{c}_a^{in} + \dot{c}_{H^+}^{in} - p_a \cdot (\dot{c}_a^{in} + \dot{c}_b^{in})}{1 + q_a} \\ \dot{c}_a &= q_a \cdot \dot{c}_{H^+} + p_a \cdot (\dot{c}_a^{in} + \dot{c}_b^{in}) \end{aligned}$$

Mit $p_a = \frac{c_{H^+}}{K_s + c_{H^+}}$ und $q_a = \frac{C_a K_s}{(K_s + c_{H^+})^2}$. Weitere Vereinfachungen können gemacht werden, wenn bekannt ist, ob das Puffersystem offen oder geschlossen ist.

In einem dynamischen System muss sich das Säure/Base-Paar aber nicht immer im Gleichgewicht befinden, so dass die Henderson-Hasselbalch-Gleichung nicht mehr gelten muss. Der Ausdruck $c_{H^+} \cdot c_b - K_s \cdot c_a$ zeigt aber wie weit das System aus dem Gleichgewicht, d.h. von Null entfernt, ist.

Die Änderungen im dynamischen System hängen nicht nur von den Inputs von außen ($\dot{c}_{H^+}^{in}$, \dot{c}_a^{in} , \dot{c}_b^{in}) ab, sondern auch von der Netto-Reaktionsgeschwindigkeit r :

$$\begin{aligned} \dot{c}_{H^+} &= -r + \dot{c}_{H^+}^{in} \\ \dot{c}_a &= r + \dot{c}_a^{in} \\ \dot{c}_b &= -r + \dot{c}_b^{in} \end{aligned}$$

Offene und geschlossene Puffer Wie bereits in Unterabschnitt 1.2.1.1 und 1.2.1.2 beschrieben, unterscheidet man die Puffersysteme in geschlossene und offene. Das intrinsische Puffersystem ist „geschlossen“, während das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem „offen“ ist. Prinzipiell kann das System für jede bzw. auch für mehrere Komponente(n) des Puffersystems offen sein, hier wird sich aber nur auf den physiologischen Fall beschränkt, dass das System für die undissoziierte Säure (c_a) offen ist.

Beim intrinsischen Puffer verbleiben alle Komponenten (c_b , c_a , c_{H^+}) in Zelle, im Gegensatz dazu kann im offenen System die undissoziierte Säure c_a die Zelle in ein zweites Kompartiment, das Reservoir, verlassen (Abbildung 3.26). Da weder c_a noch c_b die Zelle verlassen können, können sie nur in einander umgewandelt werden, so dass gelten muss: $\dot{c}_a = -\dot{c}_b$.

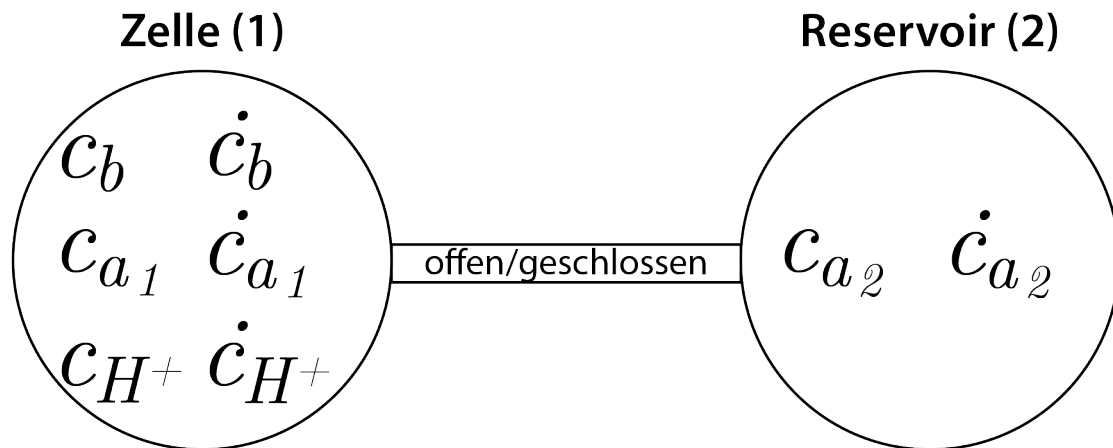


Abbildung 3.26.: Offene und geschlossene Puffersysteme. Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau eines offen sowie eines geschlossenen Puffersystems. Während in einem geschlossenen Puffersystem alle Komponenten (c_b, c_{a_1}, c_{H^+}) im Kompartiment 1 (Zelle) verbleiben, kann in einem offenen System die undissoziierte Säure (c_a) von Kompartiment 1 (Zelle) in ein zweites Kompartiment (Reservoir) überführt und so gespeichert werden. Für beide Systeme können jeweils unterschiedliche Zusammenhänge zwischen den einzelnen Größen hergestellt werden. So ist in einem geschlossenen System $\dot{c}_{a_2} = 0$ da kein Austausch mit dem Reservoir stattfinden kann.

In einem offenen System setzt sich die Konzentration der undissoziierten Säure zusammen aus der Konzentration in der Zelle (1) und der im Reservoir (2): $c_a = c_{a_1} + c_{a_2}$, so dass sich auch die Änderung aus den zwei Komponenten zusammensetzt: $\dot{c}_a = \dot{c}_{a_1} + \dot{c}_{a_2}$. Für den Fall, dass die Konzentration geklemmt ist, d.h. $[\text{CO}_2]$ durch die Begasung konstant gehalten wird, gilt: $\dot{c}_{a_1} = 0$. Wenn durch die Pufferreaktion c_a in der Zelle gebildet wird, gelangt diese Änderung direkt ins Reservoir und führt dort zu einer Änderung von c_{a_2} .

Eine Zusammenfassung aller Annahmen und möglichen Vereinfachungen bedingt durch die Eigenschaften (offen oder geschlossen und dynamisch oder quasi-statisch) eines Puffersystems ist in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Bekannte Lösungen Für die intrinsische und die $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Pufferkapazität sind im quasi-statischen Fall bereits Lösungen bekannt, so dass diese bekannten Lösungen als Kontrolle für das hier aufgestellte Modell dienen sollen. Wie oben bereits erwähnt ist die Pufferkapazität definiert durch die Änderung der totalen geteilt durch die Änderung der freien Protonen (messbar als c_{H^+} oder pH): $\beta = \ln 10 \cdot c_{H^+} \cdot \frac{\dot{c}_{H^+}}{c_{H^+}} \left(\text{pH} = \frac{\dot{c}_{H^+}}{\ln 10 \cdot c_{H^+}} \right)$.

Für die intrinsische Pufferkapazität β_1 lassen sich folgende Annahmen aufstellen:

Tabelle 3.2.: Zusammenfassung der Annahmen für das jeweilige Puffersystem. Die Tabelle fasst alle Annahmen und Vereinfachungen der jeweiligen Puffersysteme zusammen.

	geschlossen	offen
quasi-statisch	$0 = c_{H^+} \cdot c_b - K_s \cdot c_a$ $\dot{C}_a = 0; \dot{c}_a = -\dot{c}_b$	$c_a = c_{a1} + c_{a2}$ $\dot{c}_a = \dot{c}_{a1} + \dot{c}_{a2}$ $\dot{c}_{a1} = 0$
dynamisch	$r = c_{H^+} \cdot c_b - K_s \cdot c_a$ $\dot{C}_a = 0; \dot{c}_a = -\dot{c}_b$	$r = c_{H^+} \cdot c_b - K_s \cdot c_a$ $\dot{c}_a = \dot{c}_{a1} + \dot{c}_{a2}$ $\dot{c}_{a1} = 0$

- geschlossen ($\dot{c}_a = -\dot{c}_b$)
- quasi-statisch ($K_s = \frac{c_{H^+} \cdot c_b}{c_a}$)

Setzt man diese Annahmen ein, so erhält man:

$$\begin{aligned} \beta_i &= \\ &= \ln 10 \cdot c_{H^+} + \frac{\ln 10 \cdot c_{H^+} \cdot C_a \cdot K_s}{(c_{H^+} + K_s)^2} \end{aligned}$$

Für die CO₂-abhängige Pufferkapazität β_{CO_2} muss gelten:

- $[CO_2]_i = const.$ ($\dot{c}_{a1} = 0$)
- es gibt ein Reservoir für CO₂ außerhalb der Zelle ($c_a = c_{a1} + c_{a2}$)
- Inputs können nur in die Zelle gemacht werden ($\dot{c}_{a1} = \dot{c}_a^{in}$)
- quasi-statisch ($K_s = \frac{c_{H^+} \cdot c_b}{c_a}$)

Setzt man die Annahmen für β_{CO_2} in die allgemeine Formel die Pufferkapazität ein, erhält man:

$$\beta_{CO_2} = \ln 10 \cdot c_{H^+} + \ln 10 \cdot c_b$$

Setzt man Wasser ebenfalls als offenes System an, so erhält man auch hier die bekannte Lösung analog zum CO₂:

$$\beta_{H_2O} = \ln 10 \cdot c_{H^+} + \ln 10 \cdot c_{OH^-}$$

3.6.1. Die Dynamik des Puffersystems

Im folgenden soll ein Maß für die Dynamik der Pufferung hergeleitet werden, der nicht nur das Gleichgewicht, sondern auch die Dynamik der Pufferung einbezieht. In quasi-statischen Systemen spielen Geschwindigkeiten keine Rolle, da sich Änderungen viel schneller ereignen, als sie gemessen werden können – quasi instantan. Werden die Geschwindigkeiten in diesem Fall noch größer, kann kein qualitativer Unterschied erkannt werden. In einem dynamischen System werden durch die langsamen Reaktionsraten jedoch deutliche Unterschiede sichtbar (vgl. Abschnitt 3.6). Um die dynamische Pufferung zu quantifizieren, ist es nicht genug einzig die klassische Pufferkapazität zu betrachten, da sie nur das Gleichgewicht beschreibt. Wir brauchen statt dessen eine Größe, die direkt oder indirekt von der Zeit und den beteiligten Geschwindigkeitskonstanten abhängig ist. Dazu ist zuerst eine vollständige Beschreibung des gesamten (Puffer-) Systems nötig.

Das chemische System wird über einen Satz gekoppelter gewöhnlicher Differentialgleichungen erster Ordnung $F(c, \dot{c}, t) = 0$ beschrieben, mit dem Konzentrationsvektor $c = (c_1, \dots, c_n)$, dessen zeitlicher Ableitung $\dot{c} = (\dot{c}_1, \dots, \dot{c}_n)$ und der Zeit t . Durch das Lösen des Gleichungssystems können die Konzentrationen $c(t)$ und deren zeitliche Ableitungen (Änderungsraten) $\dot{c}(t) = \frac{d}{dt}c(t)$ berechnet werden. Alle zur Beschreibung des Puffersystems notwendigen Gleichungen wurden in Abschnitt 3.6 aufgestellt. Sie bilden die Grundlage für die weiteren Betrachtungen über die Dynamik des Puffersystems. Wie oben erwähnt ist $r = c_{\text{H}^+} \cdot c_{\text{b}} - K_{\text{s}} \cdot c_{\text{a}} \neq 0$ wenn sich das System nicht mehr im Gleichgewicht befindet, während im quasi-statischen Fall immer gelten muss, dass $r = 0$ ist. Die jeweiligen r_j eines Säure/Base-Paares summieren sich für das Gesamtsystem zu $r = \sum r_j$ auf. Mit der Netto-Reaktionsgeschwindigkeit r des Gesamtsystems, die sich aus den einzelnen Netto-Reaktionsgeschwindigkeiten r_j der einzelnen Säure/Base-Paare zusammensetzt, kann somit die Dynamik des Gesamtsystems quantifiziert werden. Für die Berechnung von r musste das aufgestellte Gleichungssystem numerisch gelöst werden, was im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

3.7. *In silico* Experimente

Für die *in silico* Experimente wurde das *open source* Programm R genutzt. Die Lösung des aufgestellten Modells wurde mit dem in Abschnitt A.1 dargestellten Code gelöst.

3.7.1. Dynamische Pufferung

Die Lösungen $c(t)$ und $\dot{c}(t)$ der aufgestellten Gleichungssysteme (Abschnitt 3.6) im statischen und im dynamischen Fall ließen sich nur numerisch ermitteln, da mit $[\text{H}^+]$ bzw. $\frac{d[\text{H}^+]}{dt}$ jeweils nur eine Komponente der Lösungen messbar ist. Für die Aufstellung des Reaktionsschemas $F(c, \dot{c}, t)$ wurden folgende Stoffe und Reaktionen berücksichtigt (Abbildung 3.27 A):

- Die Pufferung der $[\text{H}^+]_i$ durch einen intrinsischen Puffer (HB/B⁻) mit einem $\text{pK}_s=6,9$ und einer Gesamtkonzentration ($[\text{HB}]+[\text{B}^-]$) von 40 mM (Abschnitt 3.3)
- Das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem mit einem pK_s von 6,13 und 5% CO_2 und 25 mM HCO_3^-
- Das Cytosol wurde über eine schwache Säure (HA) über das Außenmedium appliziert, die über die Membran diffundieren kann und im Cytosol zu A^- und $[\text{H}^+]$ dissoziiert.
- Als schwache Säure wurde Buttersäure ($\text{pK}_s=4,82$) in einer Gesamtkonzentration ($[\text{HA}]+[\text{A}^-]$) von 20 mM verwendet.

Da verschiedene Parameter für die Oozyte und deren Membran nicht vorhanden waren, wie zum Beispiel die Membranpermeabilität, wurden die Parameter so gewählt, dass der simulierte Verlauf des pH_i gut mit den Messungen übereinstimmte. So ergaben sich folgende Parameter für die Simulation (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3.: Parameter für die zeitliche Simulation des pH_i .

Parameter	Wert	Einheit	Referenz
P_{CO_2}	0,057	cm/s	Swietach <i>et al.</i> 2005
P_{HA}	$0,72 \cdot 10^{-2}$	cm/s	Li <i>et al.</i> 2011
k_{hydr}	0,14	s^{-1}	Swietach <i>et al.</i> 2005
$\text{p}K_{\text{CO}_2}$	6,13		Deitmer & Schild 2000
$\text{p}K_{\text{HA}}$	4,82		Atkins & de Paula 2006

Das Ergebnis der Simulation für den Verlauf des pH_i ist in Abbildung 3.27 B dargestellt. Der quasi-statische Fall spiegelt die Expression von CAII (Rot) wider, während der dynamische Fall den nativen Oozyten entspricht (Schwarz). In HEPES zeigt sich kein Unterschied bei der Butyrat induzierten Ansäuerung zwischen dem dynamischen und dem quasi-statischen Fall. In Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ zeigt scheinbar wie in den Messungen ein Unterschied in der Ansäuerungsrate bei Applikation von Butyrat. Die

Rate ist im dynamischen Fall größer als im quasi-statischen Fall, bei dem die Pufferung instantan geschieht (Abbildung 3.28).

Die Korrektheit der numerischen Lösung konnte anhand des gemessenen Verlaufs des pH_i (Abbildung 3.27 B) und dessen Änderungsrate (Abbildung 3.28) überprüft werden. Die Ergebnisse der Simulation zeigten eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten (Abbildung 3.5). Das Modell berücksichtigt also alle wesentlichen Abläufe bzw. Reaktionen innerhalb der Oozyte.

Die errechneten Lösungen für $F(c, \dot{c}, t)$ im dynamischen und im statischen Fall konnten nun genutzt werden, um den dynamischen Parameter r zu berechnen und graphisch darzustellen. Im quasi-statischen Fall ist r immer Null, da sich das System zu jedem Zeitpunkt im Gleichgewicht befindet. Im dynamischen Fall ist r ein Maß für die Dynamik des Systems. Der Verlauf von r für das gesamte Puffersystem (intrinsische Puffer, schwache Säure und $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffer) ist in Abbildung 3.29 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass das dynamische System nicht nur bei der Applikation von CO_2 aus dem Gleichgewicht gerät ($r \neq 0$), sondern auch wenn eine schwache Säure in Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ appliziert wird. Am größten sind die Auslenkungen aus dem Gleichgewicht bei der Applikation bzw. Wegnahme von CO_2 . Durch die langsamen Reaktionsraten läuft

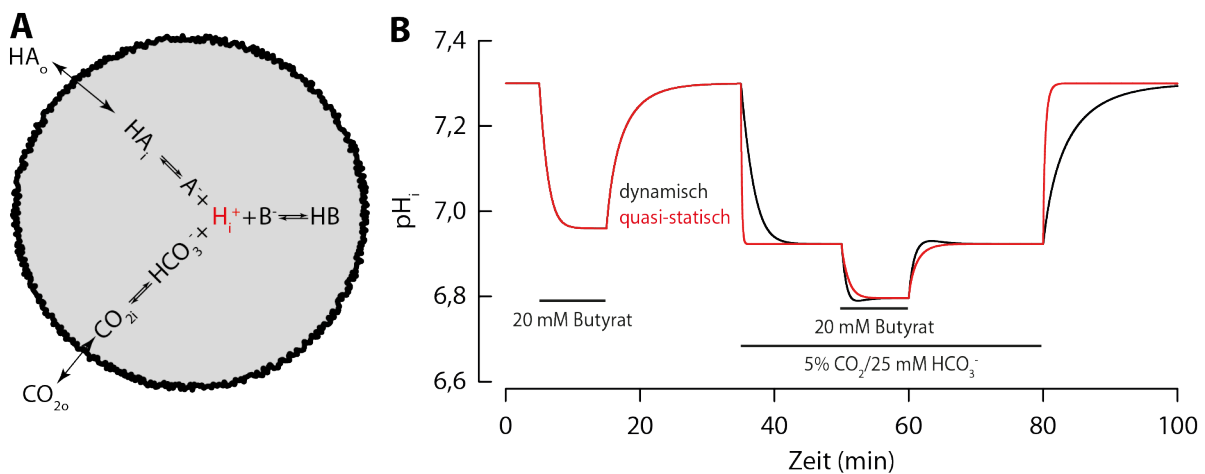


Abbildung 3.27.: Simulation der dynamischen Pufferung in einer Oozyte.

(A) zeigt die für das Modell berücksichtigten intra- und extrazellulären Prozesse. So wird $[\text{H}^+]_i$ durch drei Reaktionen beeinflusst: das intrinsische Puffersystem (HB), das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem und die Applikation von schwacher Säure (HA). Der sich daraus ergebende Verlauf des pH_i (B) stimmt gut mit den gemessenen Verläufen (vgl. Abbildung 3.5) überein. In Anwesenheit von CO_2 ist die Butyrat induzierte Änderungsrate im dynamischen Fall (native Oozyte) steiler als im Gleichgewichtsfall (CA-exprimierende Oozyte).

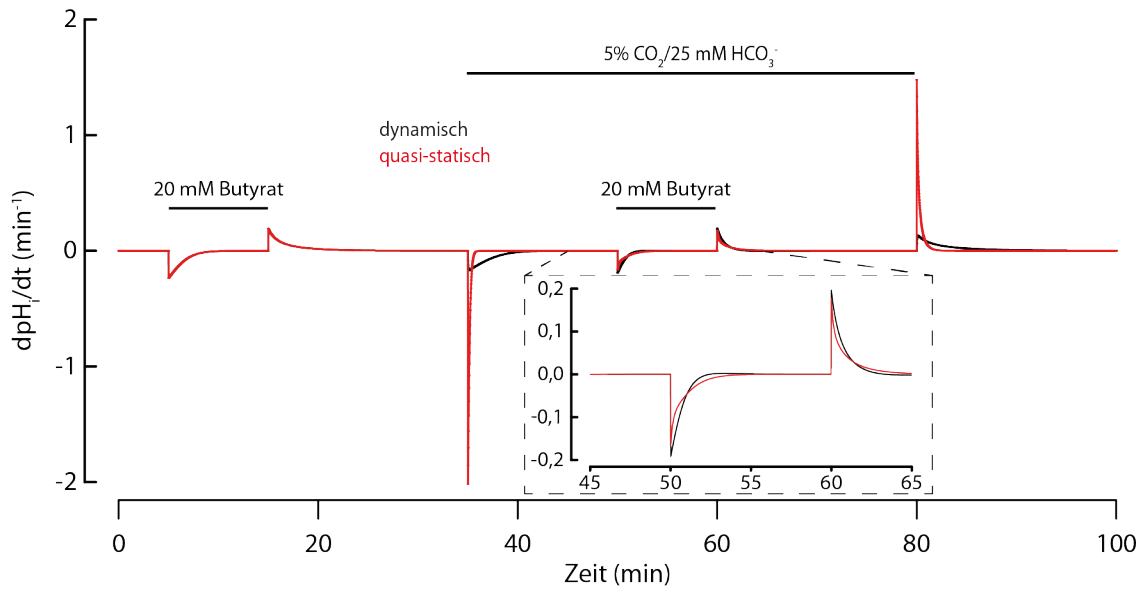


Abbildung 3.28.: Änderungsrate des simulierten pH_i . Die Abbildung zeigt die Änderungsrate, d.h. die Ableitung des pH_i basierend auf der Simulation von Abbildung 3.27. Der quasi-statische Fall, der der Expression von CAII entspricht, ist in Rot dargestellt und der dynamische Fall (native Oozyte) in Schwarz. Die gestrichelte Box zeigt den Bereich der Applikation von Butyrat in Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (Minute 45 bis 65) noch mal vergrößert.

das System nur langsam wieder zurück ins Gleichgewicht, so dass $r = 0$ nach einigen Minuten wieder erreicht ist.

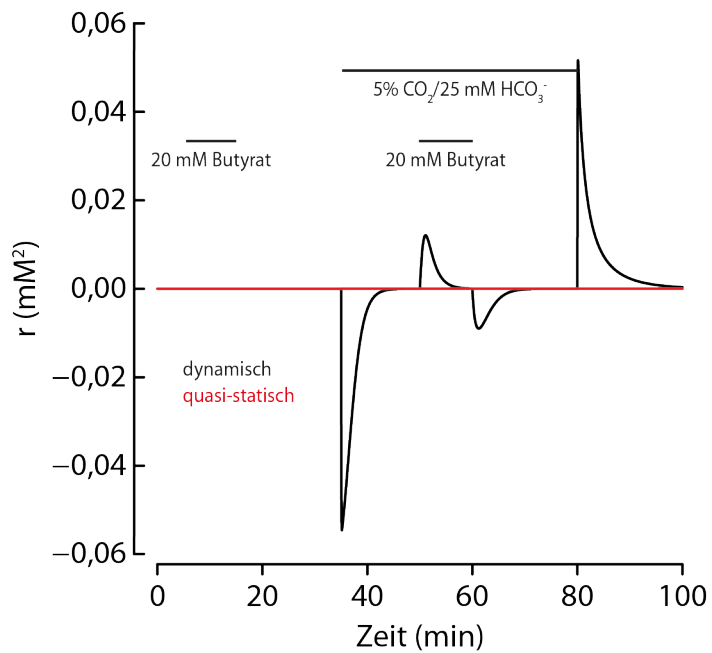


Abbildung 3.29.: Dynamik der durchgeführten Simulation. Die Abbildung zeigt den Verlauf von r des Gesamtsystems. Im quasi statischen Fall ist r immer Null, da es sich immer im Gleichgewicht befindet, während im dynamischen Fall die $r \neq 0$ sein kann, wenn sich das System nicht mehr im Gleichgewicht befindet. Das ist hier bei der Applikation bzw. der Wegnahme von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ und von Butyrat in Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ der Fall.

4. Diskussion

4.1. Warum der pH der $[H^+]$ vorzuziehen ist

Die Konzentration der H^+ -Ionen wird seit der Einführung durch Sørensen 1909 meistens als dessen negativer, dekadischer Logarithmus, dem pH ausgedrückt. Bei den in dieser Arbeit vorgenommenen potentiometrischen Messungen der H^+ -Aktivität ist wie in Abschnitt 3.1 gezeigt der pH und nicht die $[H^+]$ normalverteilt (die $[H^+]$ ist log-normalverteilt). Das ist mit weitreichenden Folgen für die Statistik verbunden. Zum einem müsste beachtet werden, dass die Berechnung des Mittelwertes nicht mehr identisch erfolgen kann. Während der pH, da normalverteilt, mit dem arithmetischen Mittel gemittelt werden kann, muss die $[H^+]$ über das geometrische Mittel gemittelt werden, damit die Relation $pH = -\log_{10} H^+$ weiterhin gilt (vgl. Tabelle 3.1 und Abbildung 3.1). Das folgt unmittelbar aus den beiden Verteilungsfunktionen und deren Erwartungswerten (vgl. Abschnitt 3.1). Die Notwendigkeit der Verwendung des geometrischen Mittelwertes für die H^+ wird besonders deutlich mit folgendem Beispiel: Der Mischungs-pH zweier Lösungen (gleichen Volumens) ist das arithmetische Mittel der pH-Werte der zwei Lösungen, z.B. pH 6 und pH 8 ergeben gemischt pH 7. Bei der $[H^+]$ würde das arithmetische Mittel einen falschen Wert liefern (1000 nM und 10 nM würden 505 nM ergeben), so dass das geometrische Mittel verwendet werden muss ($\sqrt{1000 \text{ nM} \cdot 10 \text{ nM}} = 100 \text{ nM}$ was pH 7 entspricht).

Dieses Beispiel illustriert sehr schön einen weiteren Grund für die Verwendung des pH-Wertes anstatt der $[H^+]$. Änderungen der $[H^+]$ müssen immer relativ und nicht absolut betrachtet werden, da die H^+ -Ionen liegen nicht unabhängig in einer wässrigen Lösung vor, sondern stehen in einem Gleichgewicht mit Wasser und Hydroxylionen. Das führt dazu, dass eine Änderung der Konzentration, durch jeweils gleiche Zugabe von Protonen, vom Zustand dieses Gleichgewichtes und damit von der Ausgangskonzentration der Protonen selbst abhängt.

Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in den Resultaten dieser Arbeit wieder. Während die Butyrat-induzierte Ansäuerungsrate ($\Delta pH_i / \Delta t$) in CO_2 (5% und 2%) signifikant reduziert war, war bei $\Delta [H^+]_i / \Delta t$ keine signifikante Änderung gegenüber der Rate in

HEPES zu sehen (Abbildung 3.5 & 3.6; 3.8 & 3.9). Das liegt daran, dass in Anwesenheit von CO_2 die Ausgangskonzentration bzw. der Ausgangs-pH erhöht ist, so sind gleiche Änderungen des pH mit größeren Änderungen in der $[H^+]$ verbunden. Das führt dazu, dass auch $\Delta[H^+]_i/\Delta t$ überschätzt wird bei saurerem pH.

Aber nicht nur für die Mittelwertbildung sondern auch für die statistischen Tests für Signifikanzniveaus spielt es eine Rolle, ob die Daten normal- oder log-normalverteilt sind. In dieser Arbeit wurde als Signifikanztest der Studentsche t-test verwendet. Dieser gehört zur Klasse der parametrischen Tests und geht von einer Normalverteilung der Daten aus. Die Normalverteilung liegt aber wie bereits gesagt nur beim pH vor. Wird der t-test für die log-normalverteilten Konzentrationen verwendet, so nimmt die Aussagekraft des Tests ab, so dass er damit weniger aussagekräftig bzw. zuverlässig ist.

Wenn statt des pH die $[H^+]$ verwendet werden möchte, so muss also auf die richtige Mittelwertbildung und die Verwendung von Signifikanztests geachtet werden, da es sonst zu einer Missinterpretation der Daten kommen kann. Außerdem müssten Änderungen und Änderungsraten in $[H^+]$ auf die Konzentration normiert werden, um die relativen Änderungen bzw. Änderungsraten zu bekommen, was aber genau ΔpH_i und $\Delta pH_i/\Delta t$ entspricht. Abschließend kann man sagen, dass es zwar nicht falsch ist $\Delta[H^+]_i$ zu verwenden, aber keinen Vorteil bietet und auf zusätzliche Dinge geachtet werden muss. Das macht die Verwendung des pH wesentlich einfacher. Wie die experimentellen Daten der Änderungsrate zeigen, ist all dies nicht nur von theoretischer Natur, sondern für die Analyse der experimentellen Daten von großer Relevanz.

4.1.1. Bedeutung für die Pufferkapazität

Wenn man, wie in dieser Arbeit befürwortet, den pH und vor allem ΔpH als das bessere Maß im Vergleich zu $[H^+]$ und $\Delta[H^+]$ betrachtet, so muss auch die Stärke der Pufferung auf der Änderung des pH basieren statt auf der Änderung der $[H^+]$.

Welche Art der Darstellung der Azidität vorzuziehen ist und damit die Basis für die Messung der Stärke der Pufferung bildet, wurde auch schon im letzten Jahrhundert diskutiert. Als erstes beschäftigte sich damit van Slyke in seinem Artikel von 1922 (Slyke, 1922). Für ihn sprachen die großen Zahlen, die man erhalten würde, wenn als Basis $d[H^+]$ zugrunde legen würde, gegen die Verwendung. So liegt das Maximum der Pufferkapazität, basierend auf einer Änderung der $[H^+]$, bei $\frac{1}{K_s}$ (bei $[H^+]=0$). Das bedeutet, dass bei einem physiologischen Puffer mit $pK_s=7$ bzw. $K_s=10^{-7}$ das Maximum 10^7 betragen würde. Auch, dass die bis dahin bekannten physiologischen Effekte proportional zu den

Änderungen des pH und nicht zu der Änderung der $[H^+]$ sind, ist ein weiterer Punkt der für van Slyke für eine Verwendung des pH anstatt der $[H^+]$ sprach (Slyke, 1922).

In den 1990er Jahren wurde diese Diskussion weniger theoretisch und mehr anhand von experimentellen Daten geführt (Goldsmith & Hilton, 1992; Saleh *et al.*, 1991). Saleh *et al.* plädierten in ihrem Artikel für einen Bezug der Pufferstärke auf $\Delta[H^+]$ statt wie üblich auf ΔpH . Als Hauptargument führten sie an, dass eine Änderung des pH von einer Einheit unter physiologischen Gesichtspunkten viel zu groß ist. Statt dem Bezug auf $\Delta\text{pH}=1$ wird ein Bezug auf $\Delta[H^+]=1$ mM vorgeschlagen (Saleh *et al.*, 1991). Dazu muss gesagt werden, dass bei einer $[H^+]_i$ von ca. 60 nM ($\text{pH}\approx 7,2$), wie sie in den meisten Zellen vorliegt, eine Änderung von 1 mM weit mehr als eine Änderung um nur eine pH-Einheit wäre. Eine $[H^+]$ von 1 mM entspricht einem pH von 3, d.h. der pH hätte sich um über 4 Einheiten geändert. Es kann also nicht erkannt werden, in wie fern so das „Delta“ kleiner werden soll bzw. die Änderung physiologischer sein soll! Ein weiteres Problem ist die Gleichsetzung des Differential- und des Differenzenquotienten (dpH und ΔpH). Es ist richtig, dass $\Delta\text{pH}=1$ physiologisch „zu groß“ ist, jedoch ist die Pufferkapazität so auch nicht definiert, sondern über die Ableitung nach dem pH (dpH), d.h. für infinitesimal kleine Änderungen des pH und die können niemals zu groß sein. Die Trennung von Differential- und Differenzenquotient ist äußerst wichtig, weil es sonst wie in diesem Fall zu großen Missverständnissen und falschen Schlussfolgerungen kommen kann.

Saleh *et al.* führen weiterhin den, ihrer Meinung, falschen Verlauf der Pufferkapazität als Argument ein, dass sie besser auf eine Änderung der $[H^+]$ basieren sollte. Laut Saleh *et al.* steigt die intrinsische Pufferkapazität immer mit sinkendem pH. Wenn man sich den Verlauf der Pufferkapazität in Abbildung 1.2 betrachtet, so sieht man direkt, dass diese Aussage nicht stimmt. Nur wenn $\text{pH} > \text{pK}$ ist, steigt die Pufferkapazität mit sinkendem pH, danach allerdings sinkt die Pufferkapazität wieder, so dass dieses Argument keinerlei Berechtigung hat.

Auch Goldsmith & Hilton sprachen sich in ihrer Antwort auf diesen Artikel gegen diesen Vorschlag aus. Sie nutzten beide Definitionen, um die Beziehung zwischen Pufferstärke und der $[H^+]_i$ in einem Bereich von pH_i von 6,0 bis 7,5 zu untersuchen. Sie fanden wie auch Saleh *et al.* (1991), dass die Pufferkapazität mit sinkendem pH steigt, die Pufferratio (oder der -koeffizient) jedoch einen entgegengesetzten Verlauf zeigt, sie sinkt mit sinkendem pH. Dieser Verlauf wurde sowohl in dieser Arbeit aber auch schon von Slyke (1922) gemessen. Goldsmith & Hilton sprechen sich für die Pufferkapazität aus, da der Verlauf ihrer Meinung nach besser zu der Fähigkeit der Zelle passt Azidosen zu verhindern. Außerdem würde der Anstieg der Pufferkapazität mit sinkendem pH besser zu den bekannten Eigenschaften des NHE passen. Das darf hier natürlich kein

Argument sein, da Pufferung explizit keine Transportprozesse einbezieht, sondern nur das Binden und Freisetzen von H^+ (Thomas *et al.*, 1991).

Letztendlich können beide Varianten jedoch leicht in einander umgerechnet werden, so dass weder die eine noch die andere falsch ist. Die Beziehung zwischen der Änderung in $[H^+]$ und der Änderung des pH kann, wie in Unterabschnitt 3.6.1 gezeigt, leicht in einander umgerechnet werden. Da aber die Änderung der $[H^+]$ besser als ΔpH dargestellt werden sollte, wie in Abschnitt 4.1 dargelegt, scheint es auch sinnvoller zu sein die Pufferstärke über dpH darzustellen, also als Pufferkapazität β .

4.1.2. Bedeutung für die Darstellung anderer Ionenkonzentrationen

Die logarithmische Betrachtung der Ionenkonzentration statt der linearen Ionenkonzentration selbst hat nur unter bestimmten Voraussetzungen einen Sinn. So muss, wie bei den Protonen, das betrachtete Ion ein einer Reaktion mit anderen Stoffen sein, d.h. es darf nicht unabhängig in der Lösung vorliegen.

In physiologischen Systemen ist das neben den Protonen noch für Calcium der Fall. Calcium wird in Zellen ebenfalls stark gepuffert (Clapham, 2007), so dass Calcium wie auch Protonen nicht unabhängig vorliegen. Diese Ähnlichkeit lässt eine Verwendung von $pCa = -\log[Ca^{2+}]$ sinnvoll erscheinen. Zu Beginn der 1970er Jahre, als erstmals Messungen der intrazellulären Calcium-Konzentration gemacht werden konnten (Thomas, 1979), wurde die $[Ca^{2+}]$ analog zum pH als pCa dargestellt. Ende der 1980er bzw. zu Beginn der 1990er Jahre setzte sich jedoch die von Erwin Neher befürwortete lineare Darstellung der $[Ca^{2+}]$ durch und damit auch der Bezug der Calcium-Pufferstärke auf $\Delta[Ca^{2+}]_i$ (Neher, 1995).

Wie auch für die Darstellung der Änderung der Protonen, ist eine Darstellung als pCa zu bevorzugen, da die Calcium-Ionen nicht unabhängig im Cytosol vorliegen. In wässrigen Lösungen ohne Calcium-Puffer ist dies nicht notwendig, weil in diesem Fall die Calcium-Ionen unabhängig in der Lösung vorliegen und deshalb eine relative Darstellung über pCa nicht notwendig ist.

Aber auch wenn die Messung der Ionenkonzentration so erfolgt, dass das Messsignal proportional zum log der Ionenkonzentration ist, müssen die in Abschnitt 4.1 erwähnten Änderungen in der statistischen Analyse beachtet werden, wenn man die lineare Ionenkonzentration und deren Änderung betrachten möchte. Das gilt für jede Art von ionen-sensitiven Mikroelektrode (Buck & Lindner, 2009) wie auch für die Messung mit Farbstoffen (Deitmer & Schild, 2000).

4.2. CO₂-Sensitivität und ihr Einfluss auf die durchgeführten Versuche

Es zeigte sich in den elektrophysiologischen Messungen bei der Applikation von CO₂ jeweils eine kleinere Änderung des pH in nativen Oozyten im Vergleich zu den CA-exprimierenden Oozyten (ohne EZA), was eine höhere intrinsische Pufferkapazität bedeuten würde. Eine höhere intrinsische Pufferkapazität kann jedoch ausgeschlossen werden, da sich keine Unterschiede zwischen den Zelltypen zeigten, wenn sie mit Butyrat bestimmt wurde. Auch im Vergleich der Pufferkapazität bestimmt mit Butyrat und mit CO₂ zeigten sich Unterschiede bei nativen Oozyten bzw. bei inhibierter CA-Aktivität. So entsprach die CO₂-bestimmte Pufferkapazität nur in CA-exprimierenden Zellen der Pufferkapazität bestimmt mit Butyrat. Ohne CA-Aktivität (native Oozyten bzw. mit EZA) zeigte sich eine höhere Pufferkapazität mit CO₂ als mit Butyrat (Abbildung 3.7 A). Der Grund dafür liegt in der „langsamen“ CO₂-Sensitivität der pH-Elektroden (Unterabschnitt 3.2). Appliziert man CO₂ in Oozyten ohne CA-Aktivität so ist die Ansäuerungsrate relativ langsam und entspricht im Zeitverlauf ungefähr der CO₂-Sensitivität der pH-Elektrode, so dass sich beide Antworten überlagern. Ist die pH-Änderung jedoch schnell, wenn CA exprimiert wird, so haben die pH-Änderung und die CO₂-Sensitivität nicht mehr den selben Zeitverlauf, so dass beide Signale getrennt sind. Erst kommt das eigentliche pH-Signal und danach dann die CO₂-Sensitivität, die zu einer vermeintlichen Alkalinisierung führt. Das bedeutet, dass bei der Analyse der Amplituden die CO₂-Sensitivität einmal inbegriffen war (native Oozyten bzw. CA-exprimierende unter EZA), während sie bei den Zellen mit CA-Aktivität kein Teil der Amplitude war, bzw. zu einem sehr viel kleineren Teil. Das erklärt die jeweils signifikant kleinere Amplitude bei der Applikation von CO₂/HCO₃⁻ in Zellen mit keiner bzw. inhibierter CA-Aktivität (Abbildung 3.5; Abbildung 3.8).

Durch die schnelle pH-Antwort der Elektrode in CA-exprimierenden Zellen kam es anschließend zu der, durch die CO₂-Sensitivität bedingte, vermeintlichen Alkalinisierung, so dass es zu einer Überlagerung mit der, der CO₂/HCO₃⁻ folgenden, Applikation von Butyrat gekommen sein kann. So kann die signifikante Änderung der Amplitude bei der Applikation von Butyrat in CO₂/HCO₃⁻ erklärt werden, da sich die CO₂-Sensitivität bedingte Alkalinisierung mit der Amplitude der Butyrat-induzierten Ansäuerung zum Teil überlagert, so dass die Amplitude zu niedrig ausfällt. Dafür sprechen auch die optischen Messungen des pH (Unterabschnitt 3.4.3.2) bei denen sich keine Änderung der Amplitude zeigte, so dass man annehmen kann, dass es sich bei der signifikant kleine-

ren Amplitude der Ansäuerung durch Butyrat in CO₂/HCO₃⁻ um ein Artefakt bedingt durch die CO₂-Sensitivität der pH-Elektrode handelt.

4.3. H⁺-Pufferung

4.3.1. Das intrinsische Puffersystem der Oozyte

Durch die schrittweise Injektion von H⁺/OH⁻ in das Cytosol der Oozyte konnte der Ausgangs-pH_i des Cytosols gezielt verändert werden, so dass eine Messung der Pufferkapazität bei verschiedenen pH_i möglich wurde und damit eine Charakterisierung des intrinsischen Puffersystems. Die Pufferkapazität konnte so in einem pH-Bereich von 6,6 bis 7,8 bestimmt werden. Die Pufferkapazität wurde jeweils durch Applikation von 20 mM Butyrat und nicht mit CO₂/HCO₃⁻ bestimmt, um einen Einfluss der CO₂-Sensitivität auf die gemessenen Pufferkapazitäten zu vermeiden.

Analysiert wurde sowohl die auf einer Änderung des pH beruhende Pufferkapazität wie auch die auf einer Änderung der [H⁺]_i beruhende Pufferratio. Wie in Unterabschnitt 4.1.1 dargelegt ist keine der beiden Varianten falsch, sondern beide beruhen lediglich auf verschiedenen Darstellungen der Azidität, so dass die aufgenommenen Daten sowohl mit der Pufferkapazität als auch mit der Pufferratio in Einklang gebracht werden konnten. Beide Analysewege lieferten die gleichen Parameter für das intrinsische Puffersystem, einen pK von 6,9 und eine totale Pufferkonzentration von 40 mM.

Wie in Unterabschnitt 1.2.1.1 beschrieben, folgt die Pufferkapazität eines einzelnen Säure/Base-Paares einem glockenförmigen Verlauf ($\beta_i = \frac{\ln 10 \cdot B_{\text{tot}} \cdot 10^{(\text{pH} - \text{pK}_s)}}{(1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_s})^2}$). Die Pufferkapazität eines Gemisches setzt sich als Summe der einzelnen Pufferkapazitäten zusammen ($\beta = \sum \beta_i$). Der aufgenommene Verlauf der Pufferkapazität gegen den pH_i konnte mit guter Übereinstimmung mit einem einzelnen Säure/Base-Paar gefittet werden. Ein Fit mit zwei oder mehr Säure/Base-Paaren brachte keine bessere Übereinstimmung des theoretischen Verlaufs mit den gemessenen Pufferkapazitäten.

Im betrachteten pH-Bereich von 6,6 bis 7,8 wurde die intrinsische Pufferkapazität der Oozyte also durch einen Puffer mit einem pK_s von 6,9 dominiert. In diesem pK-Bereich liegen Histidin-haltige Peptide wie z.B. Carnosin und Homocarnosin, mit einem pK_s von 6,76 bzw. 6,92 (Vaughan-Jones *et al.*, 2002). Im Prinzip kommt jede Histidin-haltige Verbindung bis hin zu großen Molekülen wie Proteinen als passender Puffer in Frage. Mit 6,90 hätte auch anorganischer Phosphor einen passenden pK_s (Jacobus *et al.*, 1981). Eine weitere Unterscheidung der Puffermoleküle ist nicht möglich, da der pK_s der einzige Parameter ist, der der Unterscheidung dient, so dass eine Auftrennung, welches Molekül

welchen Beitrag leistet bzw. überhaupt in der Oozyte vorhanden ist, nicht möglich ist. Die totalen Konzentrationen all dieser möglichen Puffermoleküle summiert sich aus den einzelnen totalen Konzentrationen zusammen auf 40 mM.

Der gemessene Verlauf der Pufferkapazität im untersuchten pH-Bereich konnte zwar mit einem einzigen pK_s gut beschrieben werden, was jedoch nicht bedeutet, dass keine weiteren Puffer mit einem anderen pK_s in der Oozyte vorliegen können, sie liefern nur keinen nennenswerten (<10%) Beitrag zur Pufferkapazität im Bereich zwischen pH 6,6 und 7,8. Das bedeutet, dass weitere Puffer einen pK_s mit einem Abstand von ±1,6 vom ermittelten pK_s haben müssen, d.h. von höchstens 5,3 bzw. mindestens 8,5.

Der pK_s des intrinsischen Puffersystems wurde auch schon in anderen Zelltypen untersucht. So fanden Leem *et al.* (1999) in Kardiomyozyten des Meerschweinchens bei ihrer Untersuchung im Bereich von pH 6,2 bis 7,7 Puffer mit zwei verschiedenen pK_s-Werten, 6 und 7,6. Die Konzentration des Puffers mit pK_s=6 lag knapp dreimal so hoch (84,22±5,37 mM).

4.3.2. Das CO₂/HCO₃⁻-Puffersystem

Nach der Charakterisierung des intrinsischen Puffersystem in der nominellen Abwesenheit von CO₂/HCO₃⁻, wurde auch die Pufferung in Anwesenheit von CO₂/HCO₃⁻ untersucht.

Die CO₂-abhängige Pufferkapazität kann über zwei Arten berechnet werden. Zum einen kann von der gemessenen totalen die intrinsische Pufferkapazität abgezogen werden ($\beta_{\text{CO}_2} = \beta_t - \beta_i$) und zum anderen lässt sie sich theoretisch über die [HCO₃⁻] mit $\beta_{\text{CO}_2} = \log_{10} \cdot [\text{HCO}_3^-]$ berechnen. Vergleicht man die beiden Wege so fällt auf, dass sie einen großen Unterschied aufwiesen (Abbildung 3.7 & Abbildung 3.10).

Der Grund hierfür kann zum einen in der intrinsischen Pufferkapazität liegen. Ihr Wert wurde bei einem pH von 7,3 bestimmt, während die totale Pufferkapazität bei 6,9 bestimmt wurde. Das führt dazu, dass die intrinsische Pufferkapazität einen größeren Beitrag leistet. Mit den in Abschnitt 3.3 bestimmten Parametern, ergibt sich bei pH=6,9 eine intrinsische Pufferkapazität von 23 mM, damit liegt sie um ca. 10 mM höher als bei einem pH von 7,3. Der Unterschied in nativen Oozyten betrug jedoch mehr als diese 10 mM, so dass noch ein weiterer Grund vorhanden sein muss. Dieser könnte in der CO₂-Sensitivität der pH-Elektrode begründet liegen. Sie führt zu einem höheren pH als er tatsächlich in der Oozyte vorliegt, was zur Folge hat, dass die Konzentration an Säure nicht korrekt berechnet wird, da sie proportional zu $10^{\text{pH} - \text{pK}_s}$ ist. Der vermeintlich höhere pH führt zu einem größeren Exponenten und damit insgesamt zu einem höheren

Faktor und so zu einer überschätzten Säurekonzentration. Eine Erhöhung von pH 6,8 auf 6,9 hätte eine zusätzliche Säurekonzentration von 1,3 mM zur Folge, wird der pH von 6,7 auf 6,9 verändert, ist die Säurekonzentration schon 2,3 mM höher. Diese Änderung hat so natürlich eine Änderung der Pufferkapazität zur Folge. Bei der gemessenen Änderung des pH von 0,12 (Unterabschnitt 3.4.1) hat das eine Änderung der Pufferkapazität von 10,8 mM bzw. 19,6 mM zur Folge. Summiert man beide Effekte auf, kann der Unterschied zwischen der gemessenen und der theoretisch bestimmten totalen Pufferkapazität erklärt werden.

Die Expression von CAs vergrößerte den Unterschied zwischen theoretisch erwarteter und experimentell bestimmter totaler Pufferkapazität noch weiter (Abbildung 3.7 B). Durch die CO_2 -Sensitivität bedingte „Alkalinisierung“ wird die totale Pufferkapazität noch zusätzlich überschätzt, da zusätzlich noch die Amplitude des pH_i beeinflusst wird. Ist die durch die CO_2 -Sensitivität bedingte Alkalinisierung noch nicht vollständig abgeklungen, interferiert die Amplitude der Ansäuerung durch Butyrat mit der Alkalinisierung. Das kann die Änderung der Amplitude von 0,12 in nativen auf 0,08 in CA-exprimierenden Oozyten erklären, was dann auch direkten Einfluss auf die totale Pufferkapazität hat.

Unter EZA war diese zusätzliche Steigerung der totalen Pufferkapazität nicht mehr vorhanden und die totale Pufferkapazität lag auf dem Niveau der nativen Oozyten, da hier diese Alkalinisierung schon in der pH-Antwort integriert ist (Abschnitt 4.2) und somit die Alkalinisierung nicht mehr mit der Ansäuerung durch Butyrat interferiert.

Bezieht man die Fehler, die durch die CO_2 -Sensitivität der Elektrode bedingt sind, und die höhere intrinsische Pufferkapazität bei einem pH von 6,9 mit ein, so stimmen die gemessenen totalen Pufferkapazitäten mit denen, die man theoretisch erwarten würde gut überein.

Die Anwesenheit des CO_2/HCO_3^- -Puffersystems führt konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der totalen Pufferkapazität. So fällt bei gleicher intrinsischer Pufferkapazität die totale Pufferkapazität in 5% $CO_2/25$ mM HCO_3^- höher aus als bei 2% $CO_2/10$ mM HCO_3^- , da die intrazelluläre $[HCO_3^-]$ 2,5 mal so hoch ist (vgl. Abbildung 3.7 und Abbildung 3.10). Berücksichtigt man die oben genannten Probleme bei der Messung der totalen Pufferkapazität in CO_2/HCO_3^- , zeigt sich kein Effekt der CA auf die Höhe der CO_2 -abhängigen Pufferkapazität und damit der totalen Pufferkapazität. Da die CA bzw. Enzyme generell nur die Einstellung des Gleichgewichtes beschleunigen, aber es nicht verändern, wäre ein Einfluss auch nicht zu erwarten gewesen. Auf die Einstellung des Gleichgewichtes also dessen Dynamik, hat sie durch die Katalyse der Reaktion aber sehr wohl einen Einfluss. Dies konnte für extrazelluläre Pufferung für die extrazellulä-

ren CA-Isoformen CAIV und CAXIV in Arbeiten von Huang *et al.* (1995) und Shah *et al.* (2005) gezeigt werden. So wurden größere Transienten in CA-KO-Tieren bzw. bei inhibierter CA-Aktivität gemessen. Durch zusätzliche Applikation von CA in die Perfusionslösung konnten die Transienten noch weiter reduziert werden. Das führte zu der Annahme, dass die Transienten entstehen, weil das CO₂/HCO₃⁻-Puffersystem ohne die zusätzliche CA nicht im Gleichgewicht ist.

Auf den Einfluss der CAs auf die Dynamik der Pufferkapazität bzw. deren Effektivität wird in Abschnitt 4.4 genauer eingegangen.

Da CO₂ und auch HCO₃⁻ kleine Moleküle mit hoher Mobilität sind, dient das CO₂/HCO₃⁻-Puffersystem nicht nur der Pufferung von Protonen, sondern auch deren Transport.

4.3.3. Apparente H⁺-Mobilität

Der Ruhe-pH der Oozyten, wie auch viele der bereits gemessenen anderen Zellen, beträgt zwischen 7,2 und 7,3. Das entspricht einer [H⁺] von 63 bzw. 50 nM, die frei vorliegen. Nehmen wir die in Abschnitt 3.3 bestimmte Gesamtpufferkonzentration von 40 mM und den pK_s von 6,9, dann kann die Konzentration an gebundenen Protonen berechnet werden. Über die umgeformte Henderson-Hasselbalch-Gleichung ($[\text{HB}] = \frac{[\text{H}^+]\cdot\text{B}_{\text{tot}}}{K_s + [\text{H}^+]}$ mit $\text{B}_{\text{tot}} = [\text{HB}] + [\text{A}^-]$) ergibt sich eine gebundene Konzentration von 25 mM. Damit ist die gebundene Konzentration um den Faktor 5·10⁵ höher als die freien Protonen. Durch dieses hohe Verhältnis von gebundenen zu freien Protonen wird die Bewegung der H⁺ beeinflusst, da die Diffusion von H⁺ nur zu einem sehr geringen Anteil über die freien Ionen selbst erfolgt, statt dessen erfolgt sie über die Puffermoleküle, die die Protonen gebunden haben (Junge & McLaughlin, 1987). Daher muss bei der Diffusion von H⁺ zwischen der Diffusionskonstante in Wasser (D_H) und in einer gepufferten Lösung unterschieden werden. Die H⁺-Diffusionskonstante in einer gepufferten Lösung wird als apparente Diffusionskonstante (D_H^{app}) bezeichnet. Nach Crank (1980) gilt folgender Zusammenhang zwischen D_H und D_H^{app}: $D_{\text{H}}^{\text{app}} = \frac{D_{\text{H}}}{(1+R)}$, wobei R das Verhältnis zwischen gebundenen und freien Protonen ist.

Die Puffermoleküle lassen sich je nach Größe, Molekülmasse und Ladungsverteilung in zwei Kategorien einteilen:

- große und damit immobile Puffermoleküle mit einem Diffusionskoeffizienten von näherungsweise 0
- kleinere bewegliche Puffermoleküle mit einem Diffusionskoeffizienten über 0

Die mobilen Puffer bestehen in (Herz-)Muskelzellen hauptsächlich aus Histidin-haltigen Dipeptiden wie Carnosin oder Homocarnosin (Vaughan-Jones *et al.*, 2002; Swietach *et al.*, 2010; Godt & Maughan, 1988). Der pK von 6,8 bis 6,9 passt zu dem gemessenen pK_s des intrinsischen Puffersystems. Die gebundenen Protonen werden über den Puffer entlang des Gradienten transportiert. Der Puffer entlässt das H⁺ und diffundiert anschließend wieder zurück. Somit wird die Mobilität der H⁺ weitgehend durch die Mobilität der Puffer bestimmt.

Die Mobilität der Protonen konnte über die gemessene Verzögerung zwischen dem Start der Injektion von H⁺/OH⁻ und dem Start der pH-Antwort bestimmt werden. Die über eine Punktquelle induzierte Änderung des pH_i verteilte sich nur sehr langsam über die gesamte Zelle, ca. 5,3 Minuten brauchte es bis die Änderung an der Membran detektiert wurde (Unterabschnitt 3.5.1). Mit der von Einstein aufgestellten Beziehung $\lambda^2 = 6 \cdot D \cdot t$ (Einstein, 1905) und der gemessenen Verzögerung $\delta = t$ lässt sich die apparente Diffusionskonstante berechnen (Abbildung 3.18 D). Die in HEPES gemessene Verzögerung betrug bei allen drei Zelltypen jeweils ca. 5,3 min, so dass sie eine $D_{\text{H}}^{\text{app}}$ von $188 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ergibt.

In Muskelzellen des Froschs konnten Irving *et al.* (1990) eine $D_{\text{H}}^{\text{app}}$ von $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ bestimmen. In ventrikulären Myocyten verschiedener Nager wurden ebenfalls sehr geringe $D_{\text{H}}^{\text{app}}$ von $82\text{-}121 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ gemessen (Zaniboni *et al.*, 2003; Vaughan-Jones *et al.*, 2002). Auch das Cytoplasma von Neuronen von marinen Invertebraten wies mit $140 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ eine vergleichbare $D_{\text{H}}^{\text{app}}$ auf (al Baldawi & Abercrombie, 1992).

Die Mobilität von Carnosin ist mit $6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ jedoch wesentlich höher (Longworth, 1953), so dass nicht alle Puffer mobil sein können, sondern nur zu einem gewissen Anteil. Bezieht man die höhere Viskosität des Cytosols im Vergleich zu Wasser mit ein, halbiert sich zwar die Diffusionskonstante (Kushmerick & Podolsky, 1969), aber sie bleibt immer noch über eine Größenordnung größer.

Über die von Junge & McLaughlin (1987) aufgestellte Beziehung kann das Verhältnis von mobilen und fixen Puffern bestimmt werden. Unter den Annahmen, dass die pK_s der beiden Puffer gleich sind, die totale Konzentration des fixen Puffers (F) größer als der K_s ist und die Konzentration des fixen Puffers höher als die des mobilen Puffers (M) ist, konnte mit der Beziehung $\frac{D_{\text{H}}^{\text{app}}}{D_{\text{HM}}} = \frac{M}{F}$ das Verhältnis von mobilen zu fixen Puffern begerechnet werden, wobei D_{HM} die Diffusionskonstante des mobilen Puffer (HM) ist, in diesem Fall Carnosin. Die ersten beiden Annahmen konnten durch die gewonnenen Daten aus der Charakterisierung des intrinsischen Puffersystems bestätigt werden. Die letzte Annahme konnte durch das berechnete Verhältnis bestätigt werden.

Mittels der von Junge & McLaughlin (1987) aufgestellten Formel konnte ein Verhältnis von 3 zu 5 von mobilen zu fixen Puffern berechnet werden. Mobile Puffer machen demnach 37,5% des intrinsischen Puffers aus, was bei einer totalen Konzentration von 40 mM eine totale Konzentration des mobilen Puffers (M) von 15 mM ergibt. Somit beträgt die totale Konzentration des fixen Puffers (F) 25 mM. Ein sehr ähnliches Verhältnis von 1/2 konnte auch in Muskelzellen des Froschs bestimmt werden (Irving *et al.*, 1990; Godt & Maughan, 1988). Im Cytoplasma von Neuronen von marinen Invertebraten haben al Baldawi & Abercrombie (1992) einen mobilen Anteil von 15% gemessen.

Im Vergleich zu anderen Systemen haben Oozyten eine ähnliche Verteilung von mobilen und fixen Puffern. Das intrinsische Puffersystem ist somit in seiner Zusammensetzung an mobilen und fixen Puffern sowie deren Konzentration vergleichbar mit anderen Zelltypen, was die Oozyte zu einem geeigneten Modell für die Untersuchung der H^+ macht. Die geringe H^+ -Mobilität scheint daher eine generelle Eigenschaft von Zellen zu sein.

Über das CO_2/HCO_3^- -Puffersystem wird nicht nur die totale Pufferkapazität erhöht, sondern es werden mit CO_2 und HCO_3^- auch weitere mobile Puffer in die Zelle gebracht. Dies zeigt sich in den Experimenten in einer verminderten Verzögerung im Vergleich zur Verzögerung in HEPES. Bei 5% CO_2 und einem pH_i von 6,9 liegt eine intrazelluläre $[HCO_3^-]$ von 7,8 mM vor. In nativen Oozyten nahm die gemessene Verzögerung jedoch nur leicht ab (nicht signifikant) auf 4,4 bzw. 4,9 Minuten in EZA. Trotz der Erhöhung der Konzentration an mobilen Puffern um über 50% durch das HCO_3^- sank die Verzögerung nur leicht, was nur eine leichte Steigerung der Mobilität bedeutet. Die Expression von CA jedoch erhöht in Anwesenheit von CO_2/HCO_3^- weiter die Mobilität der H^+ , was in einer signifikant geringeren Verzögerung im Vergleich zur Verzögerung in HEPES resultiert. In 2% CO_2 ist zwar auch die Reduktion der Verzögerung im Vergleich zu HEPES zu beobachten, jedoch führt die CA zu keiner weiteren Reduktion der Verzögerung. Die Erhöhung der Mobilität durch CAs scheint also abhängig zu sein von der Konzentration des intrazellulären CO_2 bzw. HCO_3^- , so dass bei 2% CO_2 (0,532 mM) und $[HCO_3^-] = 3,9$ mM kein Effekt durch die CA mehr messbar war, was zum Teil auch durch die recht großen Varianzen bedingt sein kann. Waren die beiden Elektroden fixiert, um Schwankungen des Abstandes zu verhindern, konnte jedoch auch keine weitere Steigerung der Mobilität durch Expression von CA detektiert werden (Abbildung 3.24), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Konzentration an CO_2 und HCO_3^- zu gering war.

Warum die extrazelluläre CA-Isoform, die CAIV, den gleichen Effekt zeigt wie die intrazelluläre Isoform, kann nur damit erklärt werden, dass die Expression der CAIV auch zu einer intrazellulären katalytischen Aktivität führt. Dieses Phänomen wurde von

Schneider *et al.* (2013) sowohl in Oozyten als auch in Hirnschnitten beobachtet. So wurde in dieser Studie die intrazelluläre Existenz der CAIV über Immunhistochemie und deren Aktivität über Massenspektrometrie nachgewiesen. Über die Massenspektrometrie wurde das Verhältnis zwischen intra- und extrazellulärer CAIV auf 24% bestimmt, womit mit 76% 3/4 der exprimierten CAIV intrazellulär lokalisiert war, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die CAIV nicht nur extrazellulär vorliegt, sondern zum überwiegenden Teil intrazellulär in einer katalytisch aktiven Vorstufe. Damit erklärt sich auch die Ähnlichkeit der Ergebnisse von CAII- und CAIV-exprimierenden Oozyten, weil auch bei der eigentlich extrazellulären CAIV der überwiegende Teil intrazellulär katalytisch aktiv war.

Durch die schnellere Umsetzung von H^+ und HCO_3^- zu CO_2 bei Expression von CA können die entstehenden Protonen schnell zu CO_2 umgewandelt werden und als CO_2 diffundieren. Während bei langsamer Umsetzung die entstehenden Protonen zu einem höheren Grad an die intrinsischen Puffer binden, da hier die Bindung um Größenordnungen schneller geht. In ventrikulären Myocyten konnten Spitzer *et al.* (2002) eine Steigerung der D_H^{app} um den Faktor 6 messen, wenn CA katalytisch aktiv. Wurde die CA-Aktivität inhibiert, kam es immerhin noch zu einer Verdopplung der D_H^{app} . In den hier durchgeführten Messungen wurden wesentlich kleinere Effekte durch CO_2/HCO_3^- gemessen. Zum einen führte das CO_2/HCO_3^- ohne CA bzw. mit inhibierter CA nur zu einer Erhöhung von weniger als 10%, aber auch mit CA-Aktivität konnte nur eine Steigerung zwischen 15 (CAII) und 50% (CAIV) gemessen werden, was weit weg ist von den von Spitzer *et al.* (2002) gemessenen Steigerungen der D_H^{app} . Ein Grund könnte zum einen in der Größe der Zelle liegen. Durch die enorme Größe der Oozyte könnte es zu Inhomogenitäten der $[CO_2]$ kommen, da auch das CO_2 nicht unendlich schnell diffundieren kann. Dadurch könnte die Konzentration an CO_2 und HCO_3^- in der Mitte, wo der Abstand zum Außenmedium am größten ist, geringer sein. Da diese Parameter nicht direkt messbar sind, könnte man sie über eine Simulation der Zelle berechnen lassen und so Anhaltspunkte bekommen, ob es zu solchen Abnahmen der Konzentration mit größer werdendem Abstand zur Membran kommt. Ein anderer Punkt könnte auch die intrazelluläre Verteilung der CA sein. Ob sich die intrazelluläre CAII eher an der Membran anlagert oder homogen im Cytosol verteilt ist, ist umstritten. In meiner Diplomarbeit (Dietrich, 2010) konnte elektrophysiologisch keine CA-Aktivität in der Zellmitte gemessen werden.

Bei der CAIV, eigentlich eine extrazelluläre Isoform, konnte gezeigt werden, dass sie auch intrazelluläre Aktivität aufweist (Schneider *et al.*, 2013). Während des Transports in sekretorischen Vesikeln zur Zellmembran befindet sich die funktionell aktive CAIV im

Cytosol und ist somit auch intrazellulär aktiv. Nimmt man an, dass die CAII vorwiegend an der Zellmembran assoziiert ist, während der intrazelluläre Teil der CAIV homogen verteilt ist, kann das auch erklären, warum die Expression von CAIV zu einer wesentlich höheren Steigerung der D_H^{app} führt als die Expression von CAII.

Die Mobilität konnte auch über das Abklingen der Ansäuerung in unmittelbarer Nähe der HCl/NaOH bestimmt werden. Die bestimmte Zeitkonstante die das Abklingen der Ansäuerung bzw. Alkalinisierung beschreibt ist direkt abhängig von der apparenten Mobilität der H⁺. Über diesen Versuch konnte nicht nur die apparente Mobilität bestimmt werden, es wurde auch deutlich, dass sich in unmittelbarer Umgebung einer Säurequelle große pH-Transienten bilden können.

4.3.4. Mikrodomänen

Die Mobilität eines Ions bestimmt wie schnell sich eine Änderung der Konzentration in der Zelle ausbreitet und damit wie schnell Gradienten, d.h. lokale Erhöhungen (oder Erniedrigungen) abgebaut werden. Die hohe Pufferung mit einem hohen Anteil an fixen Puffern (in der Oozyte 72,5%) und die daraus resultierende geringe Mobilität der H⁺ machen es möglich, dass lokal und zeitlich begrenzte Domänen mit einem veränderten pH existieren können. Diese Domänen sollen im folgenden als Mikrodomänen bezeichnet werden.

Die ersten experimentellen Daten zu Mikrodomänen wurden Ende der 1960er Jahre an immobilisiertem Papain gewonnen (Goldman *et al.*, 1968) und einige Jahre später theoretisch durch Engasser & Horvath (1974) beschrieben. Sie stellten fest, dass sich um ein H⁺-verbrauchendes oder -produzierendes Enzym eine Verringerung bzw. Akkumulation von H⁺ bildete, die je nach Mobilität und Konzentration der Puffer ausfällt.

In Oligodendrocyten wiesen Ro & Carson (2004) pH-Mikrodomänen nach. Vor allem in den stark verästelten Ausläufern fanden sie saure Regionen, während im Zellkörper alkalische Domänen auftraten, mit einem Durchmesser von ca. 1 µm Durchmesser und einer pH-Differenz von $\geq |0,1|$ zur Umgebung. Die Verteilung von verschiedenen Säure/Base-Transportern bestimmt wo saure und wo alkalische Mikrodomänen in der Zelle auftreten. So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der NHE hauptsächlich am Zellkörper und der NBC an den Dendriten lokalisiert waren. Damit der durch NHE bzw. NBC vermittelte Säure/Base-Flux für die Entstehung von Mikrodomänen ausreichte, war CAII nötig. Wurde die katalytische Aktivität der CAII pharmakologisch inhibiert, konnten keine Mikrodomänen mehr beobachtet werden.

Auch der Flux über den Anionen-Austauscher Isoform 1 (AE1) war groß genug, um eine pH-Mikrodomäne zu formieren (Johnson & Casey, 2011). Wie auch schon bei NHE und NBC ist auch für den AE die katalytische Aktivität intrazellulärer CA notwendig, damit der Flux hoch genug ist. Johnson & Casey schätzten den Durchmesser der Mikrodomänen um einen Transporter mittels eines fluoreszierendes Fusionsproteins auf ca. 0,3 μm .

Dass die in dieser Arbeit gemessene Mobilität bzw. $D_{\text{H}}^{\text{app}}$ gering genug ist, damit sich solche pH-Mikrodomänen ausbilden können, konnte in Unterabschnitt 3.5.1.1 gezeigt werden. So führte die fünf-minütige Injektion von 300 nA H⁺ (entspricht $18,7 \cdot 10^{11}$ H⁺/s bzw. 9,3 $\mu\text{M/s}$) zu einem transienten Abfall des pH auf unter 3 in HEPES und auf ungefähr 4 in 5% CO₂/HCO₃⁻. Auch die Injektion einer Base (OH⁻) führte zur Ausbildung einer Mikrodomäne, in diesem Fall einer alkalischen. Im Vergleich dazu können durch einen Kanal bis zu 10⁶ Ionen/s fließen, während ein Transporter bis 10⁴ Ionen/s über die Membran transportieren kann. Wie beschrieben können NHE, NBC und AE Mikrodomänen formieren. Jedoch ist nicht davon auszugehen, dass jeder Säure/Base-Transporter eine Mikrodomäne formieren kann. So hat der MCT1 nur eine Rate von 12 s⁻¹ (Ovens *et al.*, 2010) und ist so wohl nicht in der Lage eine Mikrodomäne zu formieren. Denn dazu muss die Anreicherung schneller passieren als der Abtransport der H⁺, d.h. der Säure/Base Flux muss die Mobilität der H⁺ übersteigen. Der Radius und die Amplitude einer Domäne können über eine von Martinez *et al.* (2010); Barros & Martinez (2007) aufgestellte Formel berechnet werden. Mit dieser Formel kann also abgeschätzt werden, wie groß eine Mikrodomäne ausfällt. Stellt man die Formel nach dem Flux um, so kann für einen gegebenen Radius und gegebene Amplitude der benötigte Flux berechnet werden. Nimmt man einen Radius von 1 μm und als Amplitude eine Verdopplung der Ruhekonzentration (50 nM=pH 7,3) an, so erhält man einen benötigten Flux von $7,8 \cdot 10^5$ s⁻¹ (für die Herleitung der Formel und der verwendeten Parameter siehe Abschnitt A.2). Dieser Flux kann sowohl durch einen einzelnen Kanal als auch durch ein Cluster von 10-100 schnellen Transportern ($\approx 10^4$ Moleküle/s) erbracht werden. Das bedeutet auch, dass Säure/Base-Transporter, die eine niedrige Transportrate haben, nicht in der Lage sind Mikrodomänen zu formieren.

Mikrodomänen können aber nicht nur intrazellulär auftreten, sondern auch extrazellulär, da H⁺ auch extrazellulär gepuffert werden. Außerdem ist der Extrazellulärraum sehr klein und „verwinkelt“, was die Diffusion erschwert und somit die Mobilität senkt (Syková & Nicholson, 2008; Nicholson & Syková, 1998) und so das Auftreten von Mikrodomänen weiter begünstigt.

Das Auftreten von pH-Mikrodomänen stellt möglicherweise einen wichtigen Mechanismus zur Regulation zellulärer Prozesse bereit. Ob und wie der pH bzw. die $[H^+]$ als Signal wirken kann, soll in Abschnitt 4.5 diskutiert werden.

4.4. Dynamische Pufferung

4.4.1. Experimentelle Motivation

Da die CA mit vielen pH-regulierenden Transportern kooperiert, ist eine Charakterisierung der Bedeutung der CA für das CO_2/HCO_3^- -Puffersystem in Systemen mit Transportern sehr schwer. Im Gegensatz zu den meisten Überexpressionssystemen exprimieren Oozyten der Stadien V und VI keine Säure/Base-Transporter (Sobczak *et al.*, 2010; Terhag *et al.*, 2010), so dass in diesem System der reine Einfluss der CA-Aktivität auf das CO_2/HCO_3^- -Puffersystem untersucht werden konnte. So zeigte sich eine Modulation der Ansäuerungsrate in Anwesenheit von CO_2/HCO_3^- durch CA-Aktivität, sowohl in 2% als auch in 5% CO_2 (Abbildung 3.5, Abbildung 3.8 sowie Unterabschnitt 3.4.3.2). Während bei den elektrophysiologischen Messungen sowohl die Ansäuerungsrate als auch die Amplitude von der CA-Expression beeinflusst waren, zeigte sich in den optischen Messungen nur eine Änderung der Rate bei gleichbleibender Amplitude. Dies kann mit der CO_2 -Sensitivität der pH-Elektrode erklärt werden (Unterabschnitt 3.2; Abschnitt 4.2; Abschnitt 4.2).

Der Grad der Modulation war abhängig von der $[CO_2]$. So betrug er in 5% CO_2 ca. 50% und in 2% CO_2 nur noch 75% der Rate in nativen Oozyten. Das bedeutet, dass die CA durch ihre katalytische Aktivität die Effektivität des CO_2/HCO_3^- -Puffersystem abhängig von der CO_2/HCO_3^- -Konzentration erhöht. Die CO_2 -abhängige Pufferkapazität war aber nicht beeinflusst, so dass nur die Geschwindigkeit des Pufferprozesses erhöht wurde.

Dass die extrazelluläre CAIV einen ähnlichen Effekt wie intrazelluläre CAII hat, liegt auch hier wieder in der zum großen Teil intrazellulären Expression der CAIV, wie schon in Unterabschnitt 4.3.3 diskutiert wurde.

Nichtgleichgewichtszustände bei Ansäuerungen in Anwesenheit von 5% $CO_2/25$ mM HCO_3^- wurden experimentell auch von Leem & Vaughan-Jones (1998) in ventrikulären Myocyten nachgewiesen. Jedoch wurde in dieser Studie keine Theorie zur Beschreibung der Nichtgleichgewichts-Pufferung geliefert. Dies wird im folgenden Unterkapitel getan.

4.4.2. Theorie

Pufferung wird immer als instantan bzw. als quasi-instantan angenommen, d.h. die Pufferung läuft viel schneller ab, als es mit den jeweiligen experimentellen Möglichkeiten beobachtet werden kann. Im Fall des intrinsischen Puffersystems ist diese Annahme auch richtig, da die Protonierung bzw. Deprotonierung innerhalb von wenigen Nano- bis Femtosekunden abläuft. Für das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem stimmt diese Annahme im unkatalysierten Fall jedoch nicht, da die Hydratisierungsrate von CO_2 nur 0,14 pro Sekunde beträgt (Leem & Vaughan-Jones, 1998) und damit in der selben Zeitskala stattfindet, mit der auch die Messungen aufgelöst sind. Je nach Isoform beschleunigen CAs die Hydratisierung und Dehydratisierung um das bis zu 10^7 -fache. Im Gegensatz zur unkatalysierten Hydratisierung von CO_2 ist die durch CAs katalysierte Hydratisierung wieder so schnell, dass sie nicht mehr zeitlich aufgelöst werden kann und somit wieder als quasi-instantan betrachtet werden kann. Die herkömmliche Pufferkapazität kann zwar die Höhe der Pufferung beschreiben und damit wie gut oder schlecht ein Puffer in einem bestimmten pH-Bereich puffert, aber der dynamische Effekt, der aus den Reaktionskinetiken herrührt, kann mit ihr nicht quantifiziert werden. Der Grund hierfür liegt darin begründet, dass mit der Pufferkapazität nur die Gleichgewichtskonstante, der pK_s -Wert bzw. dessen Abstand zum pH, betrachtet wird. So kann natürlich auch nur das Gleichgewicht, jedoch aber nicht die Nicht-Gleichgewichtszustände, beschrieben und analysiert werden.

Damit der Effekt der höheren „Puffergeschwindigkeit“ und der damit verbundenen Erhöhung der Effektivität des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem beschrieben werden kann, wurde hier die Nettoreaktionsgeschwindigkeit r (Abschnitt 3.6 & Unterabschnitt 3.6.1) beschrieben und durch das aufgestellte Modell simuliert werden (Unterabschnitt 3.7.1), so dass die Dynamik des Puffersystems bestimmt werden konnte.

Die Nettoreaktionsgeschwindigkeit r bietet nun ein Maß, um die Auslenkung aus dem Gleichgewichtszustand zu messen und somit auch die Geschwindigkeit der Pufferung zu quantifizieren und ergänzt somit die konventionelle Pufferkapazität β . In der Theorie wurden zwei unterschiedliche Fälle hergeleitet, der quasi-statische und der dynamische Fall. Beides sind Grenzfälle. Der quasi-statische Fall für die instantane Pufferung, bei der sich die Pufferreaktion zu jedem Zeitpunkt im Gleichgewicht befindet, und der dynamische Fall für eine langsame (nicht instantane Pufferung), bei der zum Zeitpunkt der Änderung der totalen Konzentration (Säure/Base-Zugabe) die Änderung der totalen Änderung der freien Konzentration entspricht ($dc_{\text{H}^+}^{\text{inst}} = dc_{\text{H}^+}^{\text{inst}}$). Je höher die Reaktionsraten und damit die Reaktionsgeschwindigkeit werden, um so mehr nähert sich der dynami-

sche Fall dem quasi-statischen Fall mit instantaner Pufferung an, d.h. die Auslenkung aus dem Gleichgewicht ($r = 0$) wird kleiner und nähert sich Null an.

Durch die Applikation von CO_2 kam das dynamische System (ohne CA) aus dem Gleichgewicht ($r \neq 0$) und wurde durch die geringen spontanen Reaktionsraten erst langsam wieder in einen Gleichgewichtszustand überführt. Im quasi-statischen Fall (mit CA) verlässt das System durch die hohen enzymatisch katalysierten Reaktionsraten nie das Gleichgewicht, so dass r immer Null ist. Auch bei der Applikation von Butyrat in Anwesenheit von CO_2/HCO_3^- gerät das dynamische System (ohne CA) aus dem Gleichgewicht, was bedeutet, dass die Pufferung im Vergleich zum quasi-statischen System (mit CA) an Effektivität verliert und somit die Ansäuerungsrate $\Delta pH_i/\Delta t$ erhöht ist.

4.4.2.1. Experimentelle Vorteile der neuen Beschreibung

Die Bestimmung der intrinsischen Pufferkapazität bildet die Grundlage für das Verständnis der pH regulierenden Prozesse der Zelle. Die intrinsische Pufferkapazität wird jedoch häufig durch den Transport von Säure/Base-Äquivalenten überlagert. Oft werden deshalb Inhibitoren der Transporter benutzt oder die Substrate substituiert, was jedoch teilweise unerwünschte Effekte hat.

Die in Unterabschnitt 3.6.1 aufgestellte allgemeine Beschreibung von HB und B⁻ macht es, neben der Beschreibung von offenen & geschlossenen und statischen & dynamischen Systemen, auch möglich, dass auch der Einfluss von Transportprozessen beschrieben und deren Anteil an der gesamten Pufferkapazität berechnet werden kann. Somit wird es möglich die intrinsische Pufferkapazität ohne die Inhibition des Transportes zu bestimmen. Dazu kann nebenbei auch die durch einen Säure/Base-Transporter verursachte Pufferkapazität quantifiziert werden.

4.5. H^+ als physiologisches Signalmolekül

In den vorherigen Abschnitten wurden die Pufferung von H^+ und die daraus folgenden Konsequenzen für ihre Diffusion und Mobilität diskutiert. Die hohe Pufferung und die damit verbundene geringe Mobilität haben H^+ nur mit Ca^{2+} gemeinsam. Für Ca^{2+} ist seit langem bekannt, dass es als physiologisches Signalmolekül dient. Die Gemeinsamkeiten zwischen H^+ und Ca^{2+} lassen eine ähnliche Funktion auch für H^+ vermuten.

Die allgemeinen Voraussetzungen für ein Ion, damit es physiologisch als Signal fungieren kann, sind in Abbildung 4.1 gezeigt. Als erstes muss ein Stimulus stehen, der zu einer räumlich und zeitlich begrenzten Mobilisierung der H^+ führt. Ob es sich dabei um

eine Erniedrigung oder Erhöhung der $[H^+]_i$ handelt, spielt dabei keine Rolle. Wie Ro & Carson (2004) gezeigt haben, können sowohl saure als auch alkalische Mikrodomänen in der Zelle entstehen, je nach Netto-Flux von Säure oder Base über die Membran. Die Mobilisierung führt dazu, dass die Ruhekonzentration in eine aktive Konzentration übergeht, die dann einen pH-sensitiven Prozess in seiner Aktivität moduliert. Bereits eine Änderung des pH von 0,05 kann zu einer messbaren Änderung der Aktivität führen (Sinning & Hübner, 2013).

Damit die Modulation nicht „zu lang“ andauert, muss es auch einen „Aus“-Schalter geben. Dazu muss die aktive Konzentration wieder in die Ruhekonzentration gebracht werden. Zum einen geschieht dies durch das Auseinanderlaufen der Mikrodomäne durch die Diffusion, sowie auch durch die Regulation über Säure/Base-Transporter.

Die Pufferung der H^+ -Ionen hat zur Folge, dass sie einerseits nur in einer geringen Konzentration vorliegen bzw. der Anteil gebundener (inaktiver) Protonen um Größenordnungen höher ist und zum anderen die Diffusion der H^+ nicht über die Diffusion der freien Ionen geschieht, sondern über die um Größenordnungen langsamere Diffusion der mobilen Puffer. Durch diese geringe Mobilität können lokale Mikrodomänen bei entsprechend hohem Flux entstehen (Unterabschnitt 4.3.4 & Abschnitt A.2). Man sieht, dass der benötigte Flux direkt abhängig ist von der Diffusionskonstante, d.h. nur bei hinreichend niedriger Mobilität des Ions kann es unter physiologischen Bedingungen zur Entstehung einer Mikrodomäne und damit zu einer lokalen Modulation zellulärer Prozesse kommen.

H^+ erfüllen also alle physikalisch/chemischen Voraussetzungen, um als Signalmolekül wirken zu können. Aber gibt es auch Empfänger, die diese Änderung der Konzentration bzw. des pH_i in eine Änderung zellulärer Prozesse umsetzen? Diese Frage soll in den folgenden Abschnitten betrachtet werden.

4.5.1. Interaktion mit Ca^{2+}

Dass die $[Ca^{2+}]$ durch die $[H^+]$ beeinflusst wird, ist seit langem bekannt. Beide Ionen sind hoch gepuffert in der Zelle und teilen sich viele Puffer und deren Bindungsstellen (Carvalho *et al.*, 1963). Aber auch Ca^{2+} -regulierende Transporter wie die Ca^{2+} - H^+ -ATPase sind abhängig von der $[H^+]$. In dieser Arbeit wurden Moleküle mit einem pK_s von 6,9, wie z.B. kleine Histidin-haltige Moleküle, als mobile Puffer in der Zelle identifiziert. Moleküle wie Carnosin binden neben H^+ auch Ca^{2+} (Swietach *et al.*, 2014, 2013). Die Affinität für Ca^{2+} ist mit ≈ 1 mM jedoch wesentlich geringer als für H^+ . Zum einen werden dadurch Ca^{2+} durch H^+ von den Puffern verdrängt und zum anderen

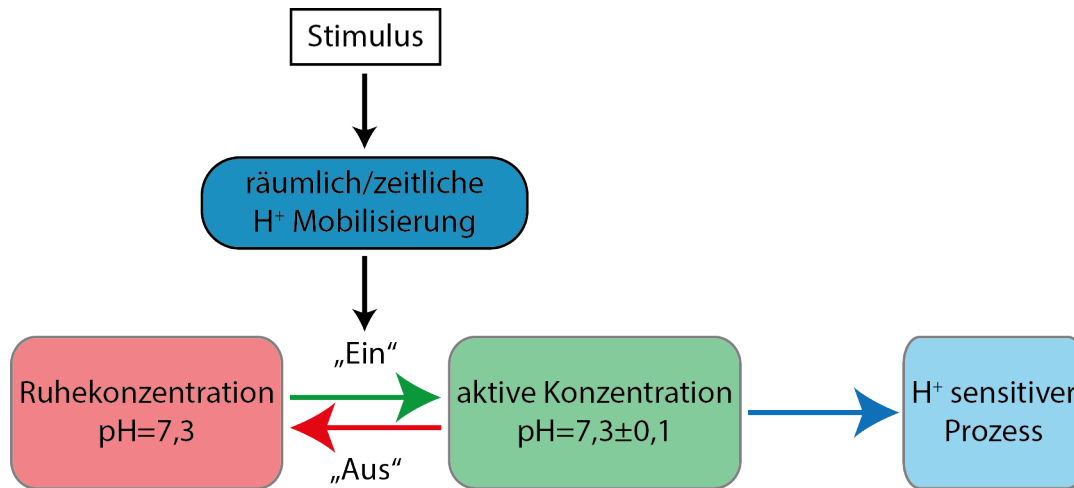


Abbildung 4.1.: Signal-Schema. Die Abbildung zeigt schematisch wie H^+ als Modulator zellulärer Prozesse und damit als Signalmolekül wirken kann. Die Grundlage ist ein Stimulus, der eine sowohl räumlich als auch zeitlich begrenzte Mobilisierung der $[H^+]$ auslöst, welche als ein „Ein“-Schalter fungiert. Der erhöhte oder erniedrigte pH wirkt sich auf die Funktion eines $[H^+]$ -sensitiven Prozesses aus. Der Prozess wird so lange beeinflusst, bis der „Aus“-Schalter den pH wieder in den Ruhezustand bringt. (modifiziert nach Berridge *et al.*, 2000)

spielt dieser Affinitätsunterschied eine wichtige Rolle beim Transport von Ca^{2+} über die mobilen Puffer. Wie der Transport von Ca^{2+} entlang eines H^+ -Gradienten abläuft ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Entsteht eine lokale Erhöhung der $[H^+]$ werden auch mehr H^+ an Puffer gebunden, wobei die mobilen Puffer entlang ihres Gradienten in die alkalische Region diffundieren und sich dort wieder von H^+ trennen und ein Ca^{2+} binden können. Der deprotonierte Puffer diffundiert nun mit dem gebundenen Ca^{2+} wieder in die saure Region, wo das Ca^{2+} von einem H^+ auf Grund der höheren Affinität des Puffers zu H^+ wieder verdrängt wird. Netto ist so für ein H^+ ein Ca^{2+} transportiert worden.

Gradienten in der $[H^+]$ können so als sekundäre Energiequelle für einen Transport von Ca^{2+} gegen den Ca^{2+} -Gradienten genutzt werden. Über diesen Transportmechanismus werden in saure Regionen auch immer Ca^{2+} -Ionen transportiert, so dass es zu einer Erhöhung der $[H^+]$ kommt (Swietach *et al.*, 2014, 2013). Lokale H^+ -Mikrodomänen führen so zur Formierung einer Ca^{2+} -Mikrodomäne. Ein pH-Gradient von 0,1 führt nach Berechnungen von Swietach *et al.* (2013) zu einem Ca^{2+} -Gradienten von 30 nM, was ein Transportverhältnis von ungefähr 2 Ca^{2+} für 1 H^+ bedeutet.

Der umgekehrte Fall, d.h. dass H^+ entlang eines Ca^{2+} -Gradienten sekundär aktiv transportiert werden, ist dagegen weniger wahrscheinlich. Zwar binden mit den Histidin-

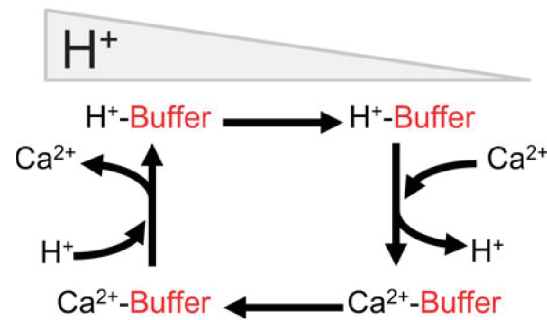


Abbildung 4.2.: Ca^{2+} -Transport entlang des H^+ -Gradienten (Swietach *et al.*, 2014).

haltigen Peptiden (HDP) ein Großteil aller pH-Puffer auch Ca^{2+} , jedoch binden nur wenige der mobilen Ca^{2+} -Puffer auch H^+ , so dass ein wesentlich größerer Ca^{2+} -Gradient nötig wäre, um H^+ entgegen ihres Gradienten zu transportieren.

Prinzipiell ist dieser Prozess nicht nur in den von Swietach *et al.* (2014) verwendeten Myocyten möglich, sondern in allen Zellen mit einer hinreichend hohen Konzentration an HDPs, so dass es sich bei dieser Art von Transport um eine generelle Eigenschaft von Zellen handelt.

Ca^{2+} ist Bestandteil einer ganzen Reihe zelluläre Signalkaskaden (Clapham, 2007), so dass die hier beschriebene Modulation der $[Ca^{2+}]$ durch die $[H^+]$ den Schluss zulässt, dass die $[H^+]$ einen modulierenden Effekt auf die Ca^{2+} Signalkaskade ausüben kann und damit die Ca^{2+} -sensitiven Prozesse beeinflussen kann.

4.5.2. G-Proteine

Signal-Proteine, die eine Änderung des pH detektieren können, sind ein notwendiges Kriterium, damit H^+ als ein Signal wirken können. Eine Analyse von möglichen pH-sensitiven Netzwerken in Proteinen von Isom *et al.* (2013) ergab, dass die α -Untereinheit ($G\alpha$) von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) pH-sensitiv ist. Innerhalb des Signalwegs des GPCR hat die $G\alpha$ die Funktion eines Schalters. Die Bindung von GTP führt zu einer Abspaltung der $G\alpha$ vom Rezeptor, während die Hydrolyse des GTP zu GDP wieder für eine Bindung der $G\alpha$ an den Rezeptor sorgt. Das Binden von GTP bzw. dessen Hydrolyse wurde von Isom *et al.* (2013) als pH-sensitiv identifiziert. Während eine Änderung der Hydrolyse von GTP bei verschiedenen pH-Werten vernachlässigt werden kann, zeigten sich Unterschiede in der Thermostabilität und der Konformationsänderung zwischen $G\alpha$ -GDP und $G\alpha$ -GTP (Isom *et al.*, 2013). Durch die generelle Modulation von

G-Protein-gekoppelten Signalkaskaden scheint eine Vielzahl von Prozessen möglich, die so in ihrer Aktivität vom pH abhängig sind.

4.5.3. Neuronale Aktivität

Der Einfluss von H^+ -Ionen auf die neuronale Signalverarbeitung wurde im Gegensatz zu Ca^{2+} bisher wenig beachtet. H^+ spielen eine grundlegende Rolle bei der neuronalen Entwicklung, Plastizität und der Signalübertragung. Allgemein gilt der Zusammenhang, dass die neuronale Aktivität durch eine Alkalose gesteigert und durch eine Azidose gehemmt wird. Eine Ausnahme bilden die chemosensitiven Neurone im Atmungszentrum (Ruusuvuori & Kaila, 2014). Die heterogene Verteilung von Transportern und Kanälen macht es wahrscheinlich, dass sich pH-Mikrodomänen ausbilden (Casey *et al.*, 2010) und so lokal als Signal fungieren können.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, haben CAs einen großen Einfluss auf die Dynamik der zellulären Pufferung, aber auch im Extrazellulärraum spielen sie eine große Rolle für die Dynamik des pH (Shah *et al.*, 2005; Chesler & Chan, 1988; Huang *et al.*, 1995). Extrazellulär wirkt der pH als Signal für die synaptische Transmission. Dabei zeigen $GABA_A$ - und NMDA-Kanäle eine starke funktionelle Abhängigkeit vom pH_e (Ruusuvuori & Kaila, 2014; Sinning & Hübner, 2013). Die CAs, intra- wie auch extrazelluläre, scheinen somit in der neuronalen Signalverarbeitung eine wichtige Rolle zu spielen, in dem sie Änderungen der $[CO_2]$ oder der $[HCO_3^-]$ in transiente pH-Änderungen umsetzen (vgl. Unterabschnitt 4.3.4).

4.5.3.1. Synaptische Transmission

Die Weiterleitung von elektrischen Signalen von Neuron zu Neuron, die synaptische Transmission ist durch verschiedene pH-sensitive Prozesse, wie z.B. Glutamat-Rezeptoren, ebenfalls stark vom pH abhängig (Sinning & Hübner, 2013). Die vesikuläre Transmitterausschüttung führt durch die hohe $[H^+]$ der Vesikel zu einer kurzen aber starken Ansäuerung des synaptischen Spalts gefolgt von einer länger anhaltenden Alkalinisierung (Krishtal *et al.*, 1987).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnten Wang *et al.* (2014) in Zebrafischen zeigen, dass die laterale Inhibition von den Horizontalzellen zu den Zapfen über transiente Ansäuerungen im synaptischen Spalt zustande kommt und so den für die Schärfung des Kontrast notwendigen negativen Feedback-Mechanismus liefern. Die lokale extrazelluläre Ansäuerung führt zu einer Inhibierung des Ca^{2+} -Einstroms und damit letztendlich zur lateralen Inhibition.

Acid-sensing ion channels (ASICs) sind ein weiteres Beispiel für einen pH-induzierten Feedback-Mechanismus (Waldmann *et al.*, 1997; Wemmie *et al.*, 2013). ASICs sind Kationen-Kanäle, die extrazellulär den pH erfassen können und bei saurem pH öffnen. Die $[H^+]$, die für ein Öffnen benötigt wird, variiert innerhalb der Isoformen von pH 6,8 bis 4,9 (Wemmie *et al.*, 2013). ASICs haben eine Leitfähigkeit für Na^+ -Ionen, wobei die Isoform ASIC 1A auch eine geringe Ca^{2+} -Leitfähigkeit aufweist. Die Aktivierung führt somit zum Einen zu einer Depolarisation der Zelle, zum Anderen werden aber auch Ca^{2+} -gesteuerte Signalkaskaden durch den Einstrom von Ca^{2+} beeinflusst.

In ASIC 1A-KO-Mäusen zeigte sich im Hippocampus eine gestörte Langzeitpotenzierung sowie eine gestörte *facilitation* während hochfrequenter Stimulation, was auf eine Rolle der ASICs in neuronalen Funktionen, Langzeitpotenzierung und Gedächtnisformierung vermuten lässt (Wemmie *et al.*, 2002; Zha *et al.*, 2006).

Wie hier gezeigt wurde ist der pH, sowohl der intra- als auch der extrazelluläre, ein wichtiger Modulator vieler neuronaler, vor allem synaptischer, Prozesse. Das macht eine funktionierende Homöostase unerlässlich, aber bietet auch die Möglichkeit für Zellen den pH als Signal zu nutzen.

4.5.4. Unterscheidung von respiratorischer und metabolischer Azidose

Die $[CO_2]$ im Blut und damit im extrazellulären Medium wird hauptsächlich über die Atmung also über die Lungen gesteuert. Wird die $[CO_2]$ erhöht oder erniedrigt, so spricht man von einer respiratorischen Azidose bzw. Alkalose. Im Gegensatz dazu wird eine Ansäuerung bedingt durch Säureproduktion aufgrund metabolischer Aktivität als metabolische Azidose bezeichnet. Die Applikation von CO_2 repräsentiert also eine respiratorische Azidose, da eine Erhöhung der $[CO_2]$ im Außenmedium stattfindet. Die Applikation von Butyrat repräsentiert eine metabolische Ansäuerung der Zelle. Wie in Unterabschnitt 3.4.1; 3.4.2 und 3.4.3.2 gezeigt wurde, erhöht die CA die Ansäuerungsrate bei Applikation von CO_2 , die Ansäuerungsrate von Butyrat hingegen wurde verlangsamt. Die CA-Aktivität unterdrückt also die metabolische Ansäuerung, während es die respiratorische Ansäuerung schneller macht. Das macht es für die Zelle möglich, zwischen beiden Arten der Ansäuerung zu unterscheiden. Bei der respiratorischen Ansäuerung könnte es so zu lokalen und transienten pH-Änderungen kommen, die so als Signal fungieren könnten. Bei der metabolischen Ansäuerung kann dies nicht der Fall sein, da die Änderungsrate hier gedämpft wird und es so auch wesentlich wahrscheinlicher ist, dass die regulierenden Säure/Base-Transporter aktiv werden.

4.5.5. Homöostase oder Signal

Störungen, die die zelluläre pH-Regulation betreffen, haben vielseitige und schwerwiegende Folgen für die Zelle und so auch für den gesamten Organismus. Eine Azidose der Zelle führt zu einem Anstieg der NHE-Aktivität, was wiederum zu einem Anstieg der Na^+ -Konzentration in der Zelle führt. Dieser Anstieg der Na^+ -Konzentration kann die Aktivität des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers senken bzw. dessen Transportrichtung umkehren, was zu einer Akkumulation von Ca^{2+} führt (Casey *et al.*, 2010). Die intrazelluläre Akkumulation von Ca^{2+} kann im Herzen zu Arrhythmien bzw. zum gänzlichen Herzversagen führen (Vaughan-Jones *et al.*, 2009). Im Gehirn kann ein Schlaganfall die Folge sein (Obara *et al.*, 2008).

Während globale Änderungen des zellulären pH eine Gefahr für die Zelle sind, können lokale und transiente Änderungen des pH auch als Signal wirken. Die hier beschriebenen Beispiele sollen aufzeigen, dass der pH z.B. Signalsysteme wie die G-Proteine, in ihrer Aktivität modulieren kann, womit eine sehr große Wirkungsvielfalt von H^+ auf zellulärer Ebene denkbar wird. Der pH spielt nicht nur intrazellulär eine wichtige Rolle, er kann auch extrazellulär als Modulator wirken, z.B. über die ASICs und so auch die neuronale Signalverarbeitung modulieren. Die Grundlage ist jedoch eine funktionierende H^+ -Homöostase, die die Grundkonzentration konstant auf einem niedrigen Niveau hält und auftretende Transienten zeitlich begrenzt. Sie fungiert als „Aus“-Schalter, um das Signal-Schema (Abbildung 4.1) aufzugreifen. Ohne diesen „Aus“-Mechanismus könnten lokale und transiente pH-Änderungen nicht als „An“-Schalter für die Modulation zellulärer Prozesse dienen.

5. Zusammenfassung

Es wurde zuerst das intrinsische Puffersystem der Oozyte charakterisiert, als Grundlage für eine weitere Untersuchung des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem. Der pK_s des intrinsischen Puffersystem betrug 6,9 bei einer totalen Konzentration von 40 mM. Auf Basis des bestimmten pK_s von 6,9 wurden Carnosin und dessen Derivate als mobile Puffer identifiziert, die die Mobilität der H^+ bestimmen. Aus der apparenten Diffusionskonstanten der H^+ konnte der Anteil an mobilen Puffern am gesamten intrinsischen Puffersystem bestimmt werden, er betrug 37,5% bzw. 15 mM.

Intrazelluläre CA erhöhte die Effektivität (Geschwindigkeit) des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystems, aber nicht die Pufferkapazität im Gleichgewicht. Damit dieser Effekt quantifiziert werden kann, musste die bestehende Definition der Pufferkapazität von Koppel & Spiro aus dem Jahre 1914 um eine zeitliche Komponente erweitert werden. Dafür wurde die Nettoreaktionsgeschwindigkeit r als Maß für die Dynamik eines Puffer oder einer Mischung aus verschiedenen Puffern hergeleitet und durch die numerische Lösung eines Systems an ODEs ausgerechnet. Ohne CA befand sich das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ bei der Applikation von Butyrat nicht mehr zu jeder Zeit im Gleichgewicht ($r \neq 0$), was zu einer erhöhten $\Delta\text{pH}_i/\Delta t$ führte. Nicht nur die Effektivität der Pufferung wurde durch die CA erhöht, auch die apparente Mobilität der Protonen wurde in Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ erhöht.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass H^+ alle theoretisch nötigen Voraussetzungen erfüllt, die es braucht, um als Signalmolekül, ähnlich dem Calcium, fungieren zu können. So wird über die hohe Pufferung und den geringen Anteil an mobilen Puffern (37,5 % in der Oozyte) die Mobilität der H^+ gesenkt, so dass sich Mikrodomänen mit aktiven Konzentrationen ausbilden können. Damit sich unter diesen Umständen eine Mikrodomäne ausbilden kann, ist ein Flux von $0,8 \cdot 10^6 \text{ H}^+/\text{s}$ nötig. Die Ausbildung von solchen Mikrodomänen kann physiologisch zur lokalen Modulation zellulärer Prozesse führen, da wichtige Bestandteile von Signalkaskaden, wie G-Proteine, pH-sensitiv sind.

Die CA spielt für die Signalwirkung der H^+ eine wichtige Rolle, so konnte gezeigt werden, dass CA-Aktivität zu einer Unterscheidbarkeit von metabolischer und respiratorischer Ansäuerung führt, die ohne CA-Aktivität nicht möglich wäre.

Literaturverzeichnis

- al Baldawi, NF; Abercrombie, RF (1992). Cytoplasmic hydrogen ion diffusion coefficient. *Biophys J*, vol. 61 (6):pp. 1470–1479
- An, H; Tu, C; Duda, D; Montanez-Clemente, I; Math, K; Laipis, PJ; McKenna, R; Silverman, DN (2002). Chemical rescue in catalysis by human carbonic anhydrases II and III. *Biochemistry*, vol. 41 (9):pp. 3235–3242
- Atkins, PW; de Paula, J (2006). *Physikalische Chemie: Auflage v. 4 (German Edition)*. Wiley-VCH Verlag GmbH
- Badger, MR; Price, GD (1989). Carbonic Anhydrase Activity Associated with the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiol*, vol. 89 (1):pp. 51–60
- Barros, LF; Martinez, C (2007). An Enquiry into Metabolite Domains. *Biophysical Journal*, vol. 92 (11):pp. 3878–3884
- Becker, HM (2005). *Funktionelle Interaktion heterolog exprimierter Säure-/Base-Transporter in den Oozyten von Xenopus laevis*. Ph.D. thesis
- Becker, HM; Klier, M; Deitmer, JW (2014). Carbonic anhydrases and their interplay with acid/base-coupled membrane transporters. *Subcell Biochem*, vol. 75:pp. 105–134
- Becker, HM; Klier, M; Schüler, C; McKenna, R; Deitmer, JW (2011). Intramolecular proton shuttle supports not only catalytic but also noncatalytic function of carbonic anhydrase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108 (7):pp. 3071–3076
- Berridge, MJ; Lipp, P; Bootman, MD (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 1 (1):pp. 11–21
- Boone, CD; Pinard, M; McKenna, R; Silverman, D (2014). Catalytic Mechanism of α -Class Carbonic Anhydrases: CO₂ Hydration and Proton Transfer. *Subcell Biochem*, vol. 75:pp. 31–52

- Brokaw, CJ (1987). Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP-dependent phosphorylation. *J Cell Biochem*, vol. 35 (3):pp. 175–184
- Buck, RP; Lindner, E (2009). Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry*, vol. 66 (12):pp. 2527–2536
- Busa, WB; Nuccitelli, R (1984). Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol*, vol. 246 (4 Pt 2):pp. R409–R438
- Carvalho, AP; Sanui, H; Pace, N (1963). CALCIUM AND MAGNESIUM BINDING PROPERTIES OF CELL MEMBRANE MATERIALS. *J Cell Physiol*, vol. 62:pp. 311–317
- Casey, JR; Grinstein, S; Orłowski, J (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 11 (1):pp. 50–61
- Chesler, M; Chan, CY (1988). Stimulus-induced extracellular pH transients in the in vitro turtle cerebellum. *Neuroscience*, vol. 27 (3):pp. 941–948
- Christianson, DW; Fierke, CA (1996). Carbonic Anhydrase: Evolution of the Zinc Binding Site by Nature and by Design. *Accounts of Chemical Research*, vol. 29 (7):pp. 331–339
- Clapham, DE (2007). Calcium signaling. *Cell*, vol. 131 (6):pp. 1047–1058
- Crank, J (1980). *The Mathematics of Diffusion*. Oxford University Press, USA
- Danforth, WH (1965). GLYCOGEN SYNTHETASE ACTIVITY IN SKELETAL MUSCLE. INTERCONVERSION OF TWO FORMS AND CONTROL OF GLYCOGEN SYNTHESIS. *J Biol Chem*, vol. 240:pp. 588–593
- Deitmer, J (2007). 5.1 Acid-Base Transport and pH Regulation. pp. 469–486
- Deitmer, JW; Schild, D (2000). *Ca²⁺ und pH*. Labor im Fokus, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg
- Denk, W; Delaney, KR; Gelperin, A; Kleinfeld, D; Strowbridge, BW; Tank, DW; Yuste, R (1994). Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy. *J Neurosci Methods*, vol. 54 (2):pp. 151–162

- Denk, W; Strickler, JH; Webb, WW (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, vol. 248 (4951):pp. 73–76
- Dietrich, M (2010). *Räumlich-zeitliche Dynamik zytosolischer Proton-Pufferung und ihre Abhängigkeit von Karboanhydrasen*. Master's thesis, Technische Universität Kaiserslautern
- Einstein, A (1905). Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, vol. 322 (8):pp. 549–560
- Engasser, JM; Horvath, C (1974). Buffer-facilitated proton transport. pH profile of bound enzymes. *Biochim Biophys Acta*, vol. 358 (1):pp. 178–192
- Fernbach, A; Hubert, L (1900). De l'influence des phosphates et de quelques autres matières sur la diastase protéolytique du malt. *Compt rend*, vol. 131:pp. 293–295
- Godt, RE; Maughan, DW (1988). On the composition of the cytosol of relaxed skeletal muscle of the frog. *Am J Physiol*, vol. 254 (5 Pt 1):pp. C591–C604
- Goldman, R; Kedem, O; Silman, IH; Caplan, SR; Katchalski, E (1968). Papain-collodion membranes. I. Preparation and properties. *Biochemistry*, vol. 7 (2):pp. 486–500
- Goldsmith, DJ; Hilton, PJ (1992). Relationship between intracellular proton buffering capacity and intracellular pH. *Kidney Int*, vol. 41 (1):pp. 43–49
- Gurdon, JB; Lane, CD; Woodland, HR; Marbaix, G (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, vol. 233 (5316):pp. 177–182
- Göppert-Mayer, M (1931). Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*, vol. 401 (3):pp. 273–294
- Hilken, G; Iglauer, F; Richter, HP (1997). *Der Krallenfrosch Xenopus laevis als Labortier: Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung*. Ferdinand Enke Verlag
- Honold, F; Honold, B (1991). *Ionenselektive Elektroden*. Birkhäuser Verlag
- Huang, W; Smith, SE; Chesler, M (1995). Addition of carbonic anhydrase augments extracellular pH buffering in rat cerebral cortex. *J Neurophysiol*, vol. 74 (4):pp. 1806–1809

- Irving, M; Maylie, J; Sizto, NL; Chandler, WK (1990). Intracellular diffusion in the presence of mobile buffers. Application to proton movement in muscle. *Biophys J*, vol. 57 (4):pp. 717–721
- Isom, DG; Sridharan, V; Baker, R; Clement, ST; Smalley, DM; Dohlman, HG (2013). Protons as second messenger regulators of G protein signaling. *Mol Cell*, vol. 51 (4):pp. 531–538
- Jacobus, WE; Pores, IH; Lucas, SK; Kallman, CH; Weisfeldt, ML; Flaherty, JT (1981). The role of intracellular pH in the control of normal and ischemic myocardial contractility: a ³¹P nuclear magnetic resonance and mass spectrometry study. *Kroc Found Ser*, vol. 15:pp. 537–565
- Johnson, DE; Casey, JR (2011). Cytosolic H⁺ microdomain developed around AE1 during AE1-mediated Cl⁻/HCO₃⁻ exchange. *The Journal of Physiology*, vol. 589 (7):pp. 1551–1569
- Junge, W; McLaughlin, S (1987). The role of fixed and mobile buffers in the kinetics of proton movement. *Biochim Biophys Acta*, vol. 890 (1):pp. 1–5
- Kaila, K; Ransom, BR, editors (1998). *pH and Brain Function*. Wiley-Liss, 1 ed.
- Klinke, R; Silbernagl, S (2003). *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme, Stuttgart
- Koppel, M; Spiro, K (1914). Über die Wirkung von Moderatoren (Puffern) bei der Verschiebung des Säure-Basengleichgewichtes in biologischen Flüssigkeiten. *Biochem. Ztschr.*, vol. 65:pp. 409–439
- Krishtal, OA; Osipchuk, YV; Shelest, TN; Smirnoff, SV (1987). Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res*, vol. 436 (2):pp. 352–356
- Kushmerick, MJ; Podolsky, RJ (1969). Ionic mobility in muscle cells. *Science*, vol. 166 (910):pp. 1297–1298
- Leem, CH; Lagadic-Gossmann, D; Vaughan-Jones, RD (1999). Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol*, vol. 517 (Pt 1):pp. 159–180
- Leem, CH; Vaughan-Jones, RD (1998). Out-of-equilibrium pH transients in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol*, vol. 509 (Pt 2):pp. 471–485

- Li, S; Hu, PC; Malmstadt, N (2011). Imaging molecular transport across lipid bilayers. *Biophys J*, vol. 101 (3):pp. 700–708
- Lindskog, S (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther*, vol. 74 (1):pp. 1–20
- Longworth, LG (1953). Diffusion Measurements, at 25°, of Aqueous Solutions of Amino Acids, Peptides and Sugars. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 75 (22):pp. 5705–5709
- Martinez, C; Kalise, D; Barros, LF (2010). General requirement for harvesting antennae at Ca²⁺ and H⁺ channels and transporters. *Front. Neuroenerg.*, vol. 2
- McKenna, R; Frost, SC (2014). Overview of the carbonic anhydrase family. *Subcell Biochem*, vol. 75:pp. 3–5
- McLaughlin, SG; Dilger, JP (1980). Transport of protons across membranes by weak acids. *Physiol Rev*, vol. 60 (3):pp. 825–863
- Meldrum, NU; Roughton, FJ (1933a). Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J Physiol*, vol. 80 (2):pp. 113–142
- Meldrum, NU; Roughton, FJ (1933b). The state of carbon dioxide in blood. *J Physiol*, vol. 80 (2):pp. 143–170
- Mikulski, R; West, D; Sippel, KH; Avvaru, BS; Aggarwal, M; Tu, C; McKenna, R; Silverman, DN (2013). Water networks in fast proton transfer during catalysis by human carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, vol. 52 (1):pp. 125–131
- Mikulski, RL; Silverman, DN (2010). Proton transfer in catalysis and the role of proton shuttles in carbonic anhydrase. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1804 (2):pp. 422–426
- Neher, E (1995). The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. *Neuropharmacology*, vol. 34 (11):pp. 1423–1442
- Nicholson, C; Syková, E (1998). Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci*, vol. 21 (5):pp. 207–215
- Nosek, TM; Fender, KY; Godt, RE (1987). It is diprotonated inorganic phosphate that depresses force in skinned skeletal muscle fibers. *Science*, vol. 236 (4798):pp. 191–193

- Obara, M; Szeliga, M; Albrecht, J (2008). Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses. *Neurochem Int*, vol. 52 (6):pp. 905–919
- Okuyama, T; Sato, S; Zhu, XL; Waheed, A; Sly, WS (1992). Human carbonic anhydrase IV: cDNA cloning, sequence comparison, and expression in COS cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89 (4):pp. 1315–1319
- Ovens, MJ; Davies, AJ; Wilson, MC; Murray, CM; Halestrap, AP (2010). AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7-10. *Biochem J*, vol. 425 (3):pp. 523–530
- Peracchia, C; Peracchia, L (1978). Orthogonal and rhombic arrays in gap junctions exposed to low pH. vol. 79 (2):pp. A217–A217
- Perutz, MF (1978). Electrostatic effects in proteins. *Science*, vol. 201 (4362):pp. 1187–1191
- Rink, TJ; Tsien, RY; Pozzan, T (1982). Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes. *J Cell Biol*, vol. 95 (1):pp. 189–196
- Ro, Ha; Carson, JH (2004). pH microdomains in oligodendrocytes. *J Biol Chem*, vol. 279 (35):pp. 37115–37123
- Ruusuvuori, E; Kaila, K (2014). Carbonic Anhydrases and Brain pH in the Control of Neuronal Excitability. *Subcell Biochem*, vol. 75:pp. 271–290
- Saleh, AM; Rombola, G; Battle, DC (1991). Intracellular H⁺ buffering power and its dependency on intracellular pH. *Kidney Int*, vol. 39 (2):pp. 282–288
- Schneider, HP; Alt, MD; Klier, M; Spiess, A; Andes, FT; Waheed, A; Sly, WS; Becker, HM; Deitmer, JW (2013). GPI-anchored carbonic anhydrase IV displays both intra- and extracellular activity in cRNA-injected oocytes and in mouse neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110 (4):pp. 1494–1499
- Shah, GN; Ulmasov, B; Waheed, A; Becker, T; Makani, S; Svichar, N; Chesler, M; Sly, WS (2005). Carbonic anhydrase IV and XIV knockout mice: roles of the respective carbonic anhydrases in buffering the extracellular space in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102 (46):pp. 16771–16776

- Silverman, DN (1982). Carbonic anhydrase: oxygen-18 exchange catalyzed by an enzyme with rate-contributing proton-transfer steps. *Methods Enzymol*, vol. 87:pp. 732–752
- Sinning, A; Hübner, CA (2013). Minireview: pH and synaptic transmission. *FEBS Lett*, vol. 587 (13):pp. 1923–1928
- Slyke, DDV (1922). ON THE MEASUREMENT OF BUFFER VALUES AND ON THE RELATIONSHIP OF BUFFER VALUE TO THE DISSOCIATION CONSTANT OF THE BUFFER AND THE CONCENTRATION AND REACTION OF THE BUFFER SOLUTION. *J Biol Chem*, vol. 52:pp. 525–570
- Sobczak, K; Bangel-Ruland, N; Leier, G; Weber, WM (2010). Endogenous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Methods*, vol. 51 (1):pp. 183–189
- Speake, T; Elliott, AC (1998). Modulation of calcium signals by intracellular pH in isolated rat pancreatic acinar cells. *J Physiol*, vol. 506 (Pt 2):pp. 415–430
- Spitzer, KW; Skolnick, RL; Percy, BE; Keener, JP; Vaughan-Jones, RD (2002). Facilitation of intracellular H⁺ ion mobility by CO₂/HCO₃⁻ in rabbit ventricular myocytes is regulated by carbonic anhydrase. *J Physiol*, vol. 541 (Pt 1):pp. 159–167
- Steiner, H; Jonsson, BH; Lindskog, S (1975). The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase. *European Journal of Biochemistry*, vol. 59 (1):pp. 253–259
- Stubbs, SS; Blanchaer, MC (1965). GLYCOGEN PHOSPHORYLASE AND GLYCOGEN SYNTHETASE ACTIVITY IN RED AND WHITE SKELETAL MUSCLE OF THE GUINEA PIG. *Can J Biochem*, vol. 43:pp. 463–468
- Swietach, P; Camelliti, P; Hulikova, A; Kohl, P; Vaughan-Jones, RD (2010). Spatial regulation of intracellular pH in multicellular strands of neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, vol. 85 (4):pp. 729–738
- Swietach, P; Leem, CH; Spitzer, KW; Vaughan-Jones, RD (2005). Experimental generation and computational modeling of intracellular pH gradients in cardiac myocytes. *Biophys J*, vol. 88 (4):pp. 3018–3037
- Swietach, P; Leem, CH; Spitzer, KW; Vaughan-Jones, RD (2014). Pumping Ca²⁺ ions up H⁺ gradients: a cytoplasmic Ca²⁺/H⁺ exchanger without a membrane. *J Physiol*

- Swietach, P; Youm, JB; Saegusa, N; Leem, CH; Spitzer, KW; Vaughan-Jones, RD (2013). Coupled $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ transport by cytoplasmic buffers regulates local Ca^{2+} and H^{+} ion signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110 (22):pp. E2064–E2073
- Syková, E; Nicholson, C (2008). Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev*, vol. 88 (4):pp. 1277–1340
- Sørensen, SPL (1909). Über die Messungen und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. *Biochemische Zeitschrift*, vol. 21:pp. 131–304
- Terhag, J; Cavara, NA; Hollmann, M (2010). Cave Canalem: how endogenous ion channels may interfere with heterologous expression in *Xenopus* oocytes. *Methods*, vol. 51 (1):pp. 66–74
- Thomas, RC (1979). *Ion-Sensitive Intracellular Microelectrodes: How to Make and Use Them (Biological techniques series)*. Academic Pr
- Thomas, RC; Coles, JA; Deitmer, JW (1991). Homeostatic muffling. *Nature*, vol. 350 (6319):p. 564
- Tsien, RY (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, vol. 290 (5806):pp. 527–528
- Tsien, RY (1989). Fluorescent probes of cell signaling. *Annu Rev Neurosci*, vol. 12:pp. 227–253
- Tu, C; Spiller, H; Wynns, GC; Silverman, DN (1987). Carbonic Anhydrase and the Uptake of Inorganic Carbon by *Synechococcus* sp. (UTEX-2380). *Plant Physiol*, vol. 85 (1):pp. 72–77
- Vaughan-Jones, RD; Peercy, BE; Keener, JP; Spitzer, KW (2002). Intrinsic H^{+} ion mobility in the rabbit ventricular myocyte. *J Physiol*, vol. 541 (Pt 1):pp. 139–158
- Vaughan-Jones, RD; Spitzer, KW; Swietach, P (2009). Intracellular pH regulation in heart. *J Mol Cell Cardiol*, vol. 46 (3):pp. 318–331
- Vince, JW; Carlsson, U; Reithmeier, RA (2000). Localization of the $\text{Cl}^{-}/\text{HCO}_3^{-}$ anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, vol. 39 (44):pp. 13344–13349
- Vince, JW; Reithmeier, RA (2000). Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the $\text{Cl}^{-}/\text{HCO}_3^{-}$ anion exchanger AE1. *Biochemistry*, vol. 39 (18):pp. 5527–5533

- Waldmann, R; Champigny, G; Bassilana, F; Heurteaux, C; Lazdunski, M (1997). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*, vol. 386 (6621):pp. 173–177
- Wang, TM; Holzhausen, LC; Kramer, RH (2014). Imaging an optogenetic pH sensor reveals that protons mediate lateral inhibition in the retina. *Nat Neurosci*, vol. 17 (2):pp. 262–268
- Wemmie, JA; Chen, J; Askwith, CC; Hruska-Hageman, AM; Price, MP; Nolan, BC; Yoder, PG; Lamani, E; Hoshi, T; Freeman, JH, Jr; Welsh, MJ (2002). The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron*, vol. 34 (3):pp. 463–477
- Wemmie, JA; Taugher, RJ; Kreple, CJ (2013). Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat Rev Neurosci*, vol. 14 (7):pp. 461–471
- Whitten, ST; García-Moreno E, B; Hilser, VJ (2005). Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102 (12):pp. 4282–4287
- Zaniboni, M; Swietach, P; Rossini, A; Yamamoto, T; Spitzer, KW; Vaughan-Jones, RD (2003). Intracellular proton mobility and buffering power in cardiac ventricular myocytes from rat, rabbit, and guinea pig. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 285 (3):pp. H1236–H1246
- Zeuthen, T; Zeuthen, E; Klaerke, DA (2002). Mobility of ions, sugar, and water in the cytoplasm of *Xenopus* oocytes expressing Na(+)-coupled sugar transporters (SGLT1). *J Physiol*, vol. 542 (Pt 1):pp. 71–87
- Zha, Xm; Wemmie, JA; Green, SH; Welsh, MJ (2006). Acid-sensing ion channel 1a is a postsynaptic proton receptor that affects the density of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103 (44):pp. 16556–16561

A. Anhang

A.1. R-Code für die simulative Bestimmung der dynamischen Pufferung

A.1.1. quasi-statische und dynamische Pufferung

A.1.1.1. buffer.r

```
equi.buffer <- function(buffer, Cfree) {  
  buffer$Bbuff <- Cfree * buffer$CB / (buffer$K + Cfree) buffer$Bfree <- buffer$CB -  
buffer$Bbuff  
  buffer }  
test.equi.buffer <- function(buffer, Cfree) { buffer$Bfree * Cfree / (buffer$Bbuff *  
buffer$K) - 1 }  
##### TODO: is dCB necessary???  
ini.buffer <- function(K, k=NULL, Cfree=NULL, CB=NULL, Bfree=NULL, Bbuff=NULL,  
dCB=0, a=1, parent=globalenv()) {  
  ## Cfree: free concentration ## Bfree: free buffer ## Bbuff: non-free buffer ##  
CB: total concentration of buffer: CB = Bfree + Bbuff  
  ## K dissociation constant: K = Cfree * Bfree / Bbuff ## k buffering velocity; if  
not NULL: (purely dynamic case) ## ## dBbuff = k * ( Cfree * Bfree - K * Bbuff )  
dt + a * dCB  
  ## dBfree = -k * ( Cfree * Bfree - K * Bbuff ) dt + (1-a) * dCB ##  
  ## Bfree and Bbuff must be given ## ## otherwise: (quasi-static case) ##  
  ## K = Bfree * Cfree / Bbuff ## ## Cfree must be given!  
  ## Additionally: (Bfree and Bbuff) or CB must be given (last has priority) ##  
  ## always: ## ## dCB = dBbuff + dBfree ## ## in closed buffer: dCB = 0  
  buffer <- new.env(parent=parent)  
  buffer$K <- K buffer$k <- k  
  buffer$dCB <- dCB buffer$a <- a
```

```

if (is.null(k)) { ## quasi-static case: compute equilibrium if (is.null(Cfree))
{ print("ERROR: Cfree must be given!") stop() }
if (is.null(CB) && (is.null(Bfree) || is.null(Bbuff)))
{ print("ERROR: Either CB must be given or Bfree and Bbuff!") stop() } if (is.null(CB))
CB <- Bfree + Bbuff
buffer$CB <- CB
equi.buffer(buffer, Cfree)
} else
{ ## purely dynamic case if (is.null(Bfree) || is.null(Bbuff))
{ print("ERROR: Bfree and Bbuff must be given!") stop() }
buffer$CB <- Bfree + Bbuff buffer$Bfree <- Bfree buffer$Bbuff <- Bbuff }
buffer }
get.dbuffer.pre <- function(buffer, Cfree, dt, dCH=0, dCB=0, a=1)
{ ## dBbuff = a * dCB buffer$dCB <- dCB
if (is.null(buffer$k))
{ ## quasi-static case: compute equilibrium buffer$dBbuff <- NULL buffer$dBfree
<- NULL
nom <- (buffer$K + Cfree)
buffer$p <- Cfree * dCB / nom
buffer$q <- buffer$K * buffer$CB / nom^2 }
else { ## purely dynamic case
rdt <- buffer$k * (Cfree * buffer$Bfree - buffer$K * buffer$Bbuff) * dt
buffer$dBbuff <- rdt + a * dCB buffer$dBfree <- -rdt + (1-a) * dCB
buffer$p <- buffer$dBbuff buffer$q <- 0 }
buffer }
get.dCfree <- function(buffer.list, Cfree, dCH=0)
{ p <- 0 q <- 0 for (buffer in buffer.list) { p <- p + buffer$p q <- q + buffer$q }
dCfree <- (dCH - p) / (1 + q)
dCfree }
get.dbuffer.post <- function(buffer, dCfree) { if (is.null(buffer$k))
{ ## quasi-static case: compute equilibrium
buffer$dBbuff <- dCfree * buffer$q + buffer$p buffer$dBfree <- buffer$dCB - buf-
fer$dBbuff }
buffer }
get.dbuffer.list <- function(buffer.list, Cfree, dt, dCH=0) {

```

```

for (buffer in buffer.list) get.dbuffer.pre(buffer, Cfree, dt, dCH=dCH, dCB=buffer$dCB,
a=buffer$a)
dCfree <- get.dCfree(buffer.list, Cfree, dCH=dCH)
for (buffer in buffer.list) get.dbuffer.post(buffer, dCfree)
dCfree }
advance.buffer <- function(buffer) { for (name in c("CB", "Bfree", "Bbuff")) { dname
<- paste("d",name,sep="")
buffer[[name]] <- buffer[[name]] + buffer[[dname]]
if (FALSE) { i0 <- buffer[[name]][i0]==0 if (length(buffer[[dname]]) > 1)
{ buffer[[name]][i0] <- buffer[[name]][i0] * exp(buffer[[dname]][i0]/buffer[[name]][i0])
buffer[[name]][i0] <- buffer[[name]][i0] + buffer[[dname]][i0] }
else { buffer[[name]][i0] <- buffer[[name]][i0] * exp(buffer[[dname]]/buffer[[name]][i0])
buffer[[name]][i0] <- buffer[[name]][i0] + buffer[[dname]] } }
}
buffer }

```

A.1.1.2. simbuffer.r

```

library(deSolve)
source("buffer.r")
## Units
sec <- 1 min <- 60*sec M <- 1 mM <- M/1000 nM <- M/1000000000 m <- 1 cm <-
m/100
equi.cell.buffer.system <- function(cell.buffer.system) {
if (is.null(cell.buffer.system$buffer.list.inner$butyrate$k))
equi.buffer(cell.buffer.system$buffer.list.inner$butyrate, cell.buffer.system$Hfree.inner)
if (is.null(cell.buffer.system$buffer.list.inner$intrinsic$k))
equi.buffer(cell.buffer.system$buffer.list.inner$intrinsic, cell.buffer.system$Hfree.inner)
if (is.null(cell.buffer.system$buffer.list.inner$carbonic$k))
equi.buffer(cell.buffer.system$buffer.list.inner$carbonic, cell.buffer.system$Hfree.inner)
if (is.null(cell.buffer.system$buffer.list.outer$butyrate$k))
equi.buffer(cell.buffer.system$buffer.list.outer$butyrate, cell.buffer.system$Hfree.outer)
}
ini.cell.buffer.system <- function(Hfree.inner, Hfree.outer,
CO2.outer=0, carboAnhydrase=FALSE, parent=globalenv()) {
KA <- 10^(-4.82)*M CA <- 0*M
KB <- 10^(-6.9)*M CB <- 40*mM

```

```

kprot <- 1e7/mM/sec
KCO2 <- 10^(-6.13)*M # 10^(-6.13)*M
khyd <- 0.14/3 /sec ##in der Diss /3 einbauen ###0.14
CO2i <- 0*M HCO3mi <- 0*M CC <- CO2i + HCO3mi
buffer.system <- new.env(parent=parent)
buffer.system$KA <- KA buffer.system$CA <- CA
buffer.system$KB <- KB buffer.system$CB <- CB
buffer.system$kprot <- kprot
buffer.system$KCO2 <- KCO2
buffer.system$khyd <- khyd buffer.system$CO2i <- CO2i
buffer.system$HCO3mi <- HCO3mi buffer.system$CC <- CC
buffer.system$carboAnhydrase <- carboAnhydrase
buffer.system$Hfree.inner <- Hfree.inner
buffer.system$Hfree.outer <- Hfree.outer
buffer.system$buffer.list.inner <- list(
  ## Butyrate buffer (KA): quasi-static, open (HA diffuses over membrane) butyrate
= ini.buffer(KA, Cfree=Hfree.inner, CB=CA),
  ## Intrinsic buffer (KB, CB):
quasi-static, closed intrinsic = ini.buffer(KB, Cfree=Hfree.inner, CB=CB),
  ## CO2 diffuses over membrane carbonic = if (!carboAnhydrase) { ## no CAII
present
  ## CO2/bicarbonate buffer (KCO2, CC, khyd/KCO2(!) protonation velocity):
dynamic, open ini.buffer(KCO2, k=khyd/KCO2,
Cfree=Hfree.inner, Bfree=HCO3mi, Bbuff=CO2i, a=1)
} else { ## CAII present -> catalyses CO2/bicarbonate reaction
  ## CO2/bicarbonate buffer (KCO2, CC): quasi-static,
open ini.buffer(KCO2, k=NULL, Cfree=Hfree.inner, CB=CC)
}
)
buffer.system$buffer.list.outer <- list(
  ## Butyrate buffer (KA): quasi-static, open (HA diffuses over membrane)
butyrate = ini.buffer(KA, Cfree=Hfree.outer, CB=CA)
)
buffer.system$CO2.outer <- CO2.outer
buffer.system }
get.d_tbuffer <- function(buffer.list, Cfree, d_tCtotal) {

```

```

## Given in each buffer: ## K, k, a ## Bfree, Bbuff ## d_tCB
## Computes for each buffer: ## p,q ## d_tBfree, d_tBbuff
for (buffer in buffer.list) {
buffer$CB <- buffer$Bfree + buffer$Bbuff
if (is.null(buffer$k)) { ## quasi-static case: compute equilibrium
nom <- (buffer$K + Cfree)
buffer$p <- Cfree * buffer$d_tCB / nom
buffer$q <- buffer$K * buffer$CB / nom^2 }
else { ## purely dynamic case
r <- buffer$k * (Cfree * (buffer$CB-buffer$Bbuff) - buffer$K * buffer$Bbuff)
buffer$d_tBbuff <- r + buffer$a * buffer$d_tCB
buffer$d_tBfree <- -r + (1-buffer$a) * buffer$d_tCB
buffer$p <- buffer$d_tBbuff buffer$q <- 0 } }
## Compute d_tCfree p <- 0 q <- 0 for (buffer in buffer.list)
{ p <- p + buffer$p q <- q + buffer$q }
d_tCfree <- (d_tCtotal - p) / (1 + q)
for (buffer in buffer.list) { if (is.null(buffer$k))
{ ## quasi-static case: compute equilibrium
buffer$d_tBbuff <- d_tCfree * buffer$q + buffer$p
buffer$d_tBfree <- buffer$d_tCB - buffer$d_tBbuff } }
d_tCfree }
get.d2_tbuffer <- function(buffer.list, Cfree, d_tCtotal, d_tCfree) {
## Given in each buffer: ## d2_tCB ## + values from get.d_tbuffer
## Computes in each buffer ## d_tp, d_tq
## Derivatives of p and q needed for buffer velocity for (buffer in buffer.list) {
if (is.null(buffer$k)) { ## quasi-static case: compute equilibrium
nom <- (buffer$K + Cfree) d_tnom <- d_tCfree
buffer$d_tp <- (d_tCfree * buffer$d_tCB + Cfree * buffer$d2_tCB) / nom - Cfree
* buffer$d_tCB * d_tnom / nom^2
buffer$d_tq <- buffer$K * buffer$d_tCB / nom^2 - 2*buffer$K * buffer$CB * d_tnom
/ nom^3 }
else { ## purely dynamic case
d_tr <- buffer$k * (d_tCfree * buffer$Bfree + Cfree * buffer$d_tBfree - buffer$K *
buffer$d_tBbuff)
buffer$d_tp <- d_tr + buffer$a * buffer$d2_tCB ## buffer$d_tp <- buffer$d_tBbuff
buffer$d_tq <- 0 } }

```



```

}
# Use only PARAMETERS and OUTER.states of cell.buffer.system
# cell buffer states of inner buffers must be given in argument "states"
d_t.cell.buffer.system <- function(t, states, cell.buffer.system, get.buffer.capacities =
FALSE) {
  states <- as.list(states)
  ## Permeability of HA over membrane
  PmHA <- 0.72*(1e-2)*cm/sec / 10 ##in der Diss /10 ### 5
  ## Permeability of CO2 over membrane
  PmCO2 <- 5.7*(1e-2)*cm/sec / 200 ##in der Diss /200 ### 250
  DM <- 500*10e-9*m ## Membrane thickness
  # ## Time # t <- cell.buffer.system$t
  ## Inputs CAo <- cell.buffer.system$getCAo(t) CO2o <- cell.buffer.system$getCO2o(t)
  ## OUTER buffer systems
  cell.buffer.system$buffer.list.outer$butyrate$CB<-CAo
  equi.buffer(cell.buffer.system$buffer.list.outer$butyrate, cell.buffer.system$Hfree.outer)
  cell.buffer.system$CO2.outer <- CO2o
  HAo <- cell.buffer.system$buffer.list.outer$butyrate$Bbuff
  ## HAI <- cell.buffer.system$buffer.list.inner$butyrate$Bbuff HAI <- states$HAI
  ## Flux of HA over membrane JHAI <- PmHA / DM *(HAo - HAI)
  ## == dCAi / dt
  ## Change of total concentration of inner butyrate via flux over membrane of HA
  ## dCAi <- JHAI*dt
  CO2o <- cell.buffer.system$CO2.outer
  ## CO2i <- cell.buffer.system$buffer.list.inner$carbonic$Bbuff CO2i <- states$CO2i
  ## Flux of CO2 over membrane JCCI <- PmCO2 / DM *(CO2o - CO2i) ## ==
dCCI / dt
  ## Change of total concentration of inner CO2 via flux over membrane of CO2
  ## dCCI <- JCCI*dt
  ## Change of total concentration of protons ## dCHi <- dCAi + dCCI d_tCHi <-
JHAI + JCCI
  ## Changes of buffers; NOTE: a = 1 in both cases -> dCAi = dHA and dCCI =
dCO2
  ## cell.buffer.system$buffer.list.inner$butyrate$dCB <- dCAi
  ## cell.buffer.system$buffer.list.inner$carbonic$dCB <- dCCI
  ## dHfree.inner <- get.dbuffer.list(cell.buffer.system$buffer.list.inner,

```

```

cell.buffer.system$Hfree.inner, dt, dCH=dCHi)
bi <- cell.buffer.system$buffer.list.inner
bi$butyrate$Bbuff <- states$HAi bi$butyrate$Bfree <- states$Ami bi$butyrate$d_tCB
<- JHAi
bi$intrinsic$Bbuff <- states$HBi bi$intrinsic$Bfree <- states$Bmi bi$intrinsic$d_tCB
<- 0
bi$carbonic$Bbuff <- states$CO2i bi$carbonic$Bfree <- states$HCO3mi bi$carbonic$d_tCB
<- JCCi
Cfree <- states$Hpi d_tCtotal <- d_tCHi
d_tCfree <- get.d_tbuffer(bi, Cfree, d_tCtotal)
if (get.buffer.capacities) {
KA <- cell.buffer.system$KA CA <- cell.buffer.system$CA
KB <- cell.buffer.system$KB CB <- cell.buffer.system$CB
kprot <- cell.buffer.system$kprot
KCO2 <- cell.buffer.system$KCO2
khyd <- cell.buffer.system$khyd
CO2i <- cell.buffer.system$CO2i
HCO3mi <- cell.buffer.system$HCO3mi
CC <- cell.buffer.system$CC
##### rho <- d_tCtotal / d_tCfree
# Butyrate: open quasi-static with influx
Q_A <- states$Ami / Cfree P_A <- JHAi + (KA / Cfree) * JHAi
# Intrinsic: closed quasi-static with no buffer influx Q_B <- states$Bmi / Cfree P_B
<- 0
# = Cfree / ( KB + Cfree ) * 0
# CO2 / Bicarbonate
if (!cell.buffer.system$carboAnhydrase) { # if no CAII present: dynamic with influx
Q_C <- 0 P_C <- khyd/KCO2 * Cfree * states$HCO3mi - khyd * states$CO2i +
JCCi }
else { # if CAII present: open quasi-static with influx
Q_C <- states$HCO3mi / Cfree P_C <- JCCi + (KCO2 / Cfree) * JCCi }
r <- khyd/KCO2 * Cfree * states$HCO3mi - khyd * states$CO2i
Q <- Q_A + Q_B + Q_C P <- P_A + P_B + P_C
if (abs(d_tCHi - P) == 0) { # if (abs(P - d_tCHi) < .00001*mM
|| abs(1 + Q) < .00001*mM) { rho <- NA } else if (d_tCHi == 0) { rho <- 0 }
else {

```

```

rho <- (1 + Q) / (1 - P / d_tCHi) }
beta <- log(10)*Cfree * rho ##cat(beta / mM, "mM\n")
d_tHAI <- bi$butyrate$d_tBbuff d_tCO2i <- bi$carbonic$d_tBbuff
bi$butyrate$d2_tCB <- - PmHA / DM * d_tHAI
bi$intrinsic$d2_tCB <- 0 bi$carbonic$d2_tCB <- - PmCO2 / DM * d_tCO2i
d2_tCtotal <- bi$butyrate$d2_tCB + bi$carbonic$d2_tCB
get.d2_tbuffer(bi, Cfree, d_tCtotal, d_tCfree)
p <- 0
q <- 0 d_tp <- 0 d_tq <- 0 for (buffer in bi)
{ p <- p + buffer$p q <- q + buffer$q d_tp <- d_tp + buffer$d_tp d_tq <- d_tq
+ buffer$d_tq }
d_trho <- ( d_tq + rho * ( d_tp / d_tCtotal - p * d2_tCtotal / d_tCtotal^2 ) ) /
( 1 - p / d_tCtotal)
d_tbeta <- log(10)*(Cfree*d_trho + d_tCfree*rho)
##d_tbeta <- log(10)*Cfree*d_trho ##cat(d_tbeta / mM * sec, "mM/sec\n")
d2_tCfree <- ( d2_tCtotal - d_tp ) / (1+q) - (d_tCtotal - p) * d_tq / (1+q)^2
rhoDyn <- d_trho + d_tCtotal * d2_tCfree / d_tCfree^2
list(res=c(d_tCfree, bi$butyrate$d_tBbuff, bi$butyrate$d_tBfree,
bi$intrinsic$d_tBbuff, bi$intrinsic$d_tBfree, bi$carbonic$d_tBbuff, bi$carbonic$d_tBfree),
rho=rho, beta=beta, d_trho=d_trho, d_tbeta=d_tbeta, d_tCtotal=d_tCtotal,
d2_tCtotal=d2_tCtotal, Cfree=Cfree, d_tCfree=d_tCfree, d2_tCfree=d2_tCfree,
rhoDyn=rhoDyn, p=p, q=q, d_tp=d_tp, d_tq=d_tq, r=r )
} else {
list(c(d_tCfree, bi$butyrate$d_tBbuff, bi$butyrate$d_tBfree,
bi$intrinsic$d_tBbuff, bi$intrinsic$d_tBfree, bi$carbonic$d_tBbuff, bi$carbonic$d_tBfree))
}
## cell.buffer.system$dHfree.inner <- dHfree.inner
## cell.buffer.system$t <- cell.buffer.system$t + dt
## cell.buffer.system$Hfree.inner <- cell.buffer.system$Hfree.inner + dHfree.inner
# cell.buffer.system$Hfree.inner <- cell.buffer.system$Hfree.inner *
# exp(dHfree.inner/cell.buffer.system$Hfree.inner)
## for (buffer in cell.buffer.system$buffer.list.inner) advance.buffer(buffer)
## cell.buffer.system }
for (carboAnhydrase in c(FALSE, TRUE)) {
print("A")
## times <- seq(25*min,(35*min), by=.1*sec) times <- seq(0*min, 100*min, by=1*sec)

```

```

Hpo <- 10^(-7.4)*M Hpi <- 10^(-7.3)*M
cell.buffer.system <- ini.cell.buffer.system(Hpi, Hpo, carboAnhydrase=carboAnhydrase)
## Inputs: CA aussen und CO2 aussen
if (FALSE)
{ cell.buffer.system$getCAo <- function(t) { if ( (t > 10*min && t < 18*min)
|| (t > 36*min && t < 44*min) ) 20*mM else 0 }
cell.buffer.system$getCO2o <- function(t)
{ if ( t > 26*min && t < 52*min ) 1.3*mM else 0 } }
cell.buffer.system$getCAo <- function(t)
{ if ( (t > 5*min && t < 15*min) || (t > 50*min && t < 60*min) ) 20*mM else 0 }
cell.buffer.system$getCO2o <- function(t) { if ( t > 35*min && t < 80*min ) 1.3*mM
else 0 }
cell.buffer.system$t <- times[[1]]
## pH.store <- numeric(length(times)) ## CO2i.store <- numeric(length(times))
## HAI.store <- numeric(length(times))
## pH.store[[1]] <- -log(cell.buffer.system$Hfree.inner)/log(10)
## CO2i.store[[1]] <- cell.buffer.system$buffer.list.inner$carbonic$Bbuff
## HAI.store[[1]] <- cell.buffer.system$buffer.list.inner$butyrate$Bbuff
# s <- new.env(parent=globalenv()) #
# s$t <- times[[1]]
# s$pH <- -log(cell.buffer.system$Hfree.inner)/log(10)
# s$CO2i <- cell.buffer.system$buffer.list.inner$carbonic$Bbuff
# s$HAI <- cell.buffer.system$buffer.list.inner$butyrate$Bbuff
## for (i in seq(1:(length(times)-1))) {
## dt <- times[[i+1]] - times[[i]] ## advance.cell.buffer.system(cell.buffer.system,
dt)
## equi.cell.buffer.system(cell.buffer.system)
## pH.store[[i+1]] <- -log(cell.buffer.system$Hfree.inner)/log(10)
## CO2i.store[[i+1]] <- cell.buffer.system$buffer.list.inner$carbonic$Bbuff
## HAI.store[[i+1]] <- cell.buffer.system$buffer.list.inner$butyrate$Bbuff
## }
states <- c(Hpi = cell.buffer.system$Hfree.inner,
HAI = cell.buffer.system$buffer.list.inner$butyrate$Bbuff,
Ami = cell.buffer.system$buffer.list.inner$butyrate$Bfree,
HBI = cell.buffer.system$buffer.list.inner$intrinsic$Bbuff,
Bmi = cell.buffer.system$buffer.list.inner$intrinsic$Bfree,

```

```

CO2i = cell.buffer.system$buffer.list.inner$carbonic$Bbuff,
HCO3mi = cell.buffer.system$buffer.list.inner$carbonic$Bfree)
out <- ode(y=states, times=times,func=d_t.cell.buffer.system,parms=cell.buffer.system,
method='bdf')
print("B")
df.out <- data.frame(out)
## Buffer capacities ##df.out <- cbind(df.out, rho=NA, beta=NA, d_trho=NA,
d_tbeta=NA,
## d_tCtotal=NA, d2_tCtotal=NA, d_tCfree=NA )
##for (i in seq_len(nrow(df.out))) {
bc.out <- sapply(seq_len(nrow(df.out)), function(i) d_t.cell.buffer.system( t=df.out$time[[i]],
states=df.out[i,2:8], cell.buffer.system, get.buffer.capacities = TRUE)
[ c("rho", "beta", "d_trho", "d_tbeta", "d_tCtotal", "d2_tCtotal",
"Cfree", "d_tCfree", "d2_tCfree", "rhoDyn", "p", "q", "d_tp", "d_tq", "r") ] )
df.bc <- data.frame(matrix(unlist(bc.out), byrow=T, nrow=nrow(df.out)) ) ##}
names(df.bc) <- c("rho", "beta", "d_trho", "d_tbeta", "d_tCtotal",
"d2_tCtotal", "Cfree", "d_tCfree", "d2_tCfree", "rhoDyn", "p", "q", "d_tp", "d_tq",
"r")
df.out <- cbind(df.out, df.bc)
print("C")
if (!carboAnhydrase) { outNoCarbAn <- df.out
## pH.storeNoCarbAn <- pH.store ## CO2i.storeNoCarbAn <- CO2i.store
## HAI.storeNoCarbAn <- HAI.store } else { outCarbAn <- df.out
## pH.storeCarbAn <- pH.store ## CO2i.storeCarbAn <- CO2i.store
## HAI.storeCarbAn <- HAI.store }
}

```

A.2. Berechnung des Fluxes zur Entstehung einer Mikrodomäne

Formel für Radius der Mikrodomäne aus Barros & Martinez, 2007. Diese wurde nach dem Flux q umgeformt.

$$q = \frac{8 \cdot \pi \cdot b \cdot D_{\text{H}}^{\text{app}} \cdot \bar{u} \cdot (a+r)}{3a+3r+2} .$$

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name, Vorname: Dietrich, Michael

Geburtsort: Berlin

Schulische Ausbildung

Aug 1999 - Mai 2005 Barnim Gymnasium, Berlin

Allgemeine Hochschulreife: 30. Mai 2005

Hochschulausbildung

Okt 2005 - Aug 2010 Studium der Biophysik mit Studienziel Diplom
an der Technischen Universität Kaiserslautern

12. Aug 2010 Diplomhauptprüfung

Abschlussarbeit: Räumlich-zeitliche Dynamik zytosolischer Protonen-Pufferung
und ihre Abhängigkeit von Karboanhydrasen

Sep 2010 - Sep 2014 Studium der Biologie mit dem Studienziel Promotion
an der Technischen Universität Kaiserslautern