

Untersuchungen zum Glucose-Auswärtstransport des Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Gudrun Anna Sauer
aus Goldbach

Frankfurt am Main
2002
(DF1)

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

Dekan: Prof. Dr. Joachim Engels

Gutachter: Prof. Dr. Ernst Bamberg, Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 03.06.2002

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGEN	6
1 EINLEITUNG	7
1.1 Der Na ⁺ /Glucose Cotransporter SGLT1	7
1.1.1 Die physiologische Bedeutung des Na ⁺ /Glucose Cotransporters SGLT1	7
1.1.2 Struktur des SGLT1	8
1.1.3 Subtypen des SGLT	9
1.1.4 SGLT1 als sekundär aktiver Transporter	10
1.1.5 Extrazelluläre Eigenschaften des SGLT1	10
1.1.5.1 Substrate	11
1.1.5.2 Inhibitoren	12
1.1.5.3 Cosubstrat Na ⁺	13
1.1.6 Transportmodelle	13
1.1.7 Vergleichgewichtsströme	16
1.2 Die <i>Xenopus laevis</i> Oozyte als heterologes Expressionssystem	18
1.3 Strommessung mit der Patch-Clamp-Technik	19
1.4 Ziel der Arbeit	20
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Liste der Geräte und Materialien	22
2.2 Die Messapparatur	23
2.2.1 Der Patch-Clamp-Vorverstärker	23
2.2.2 Aufbau des Messplatzes	24
2.2.3 Datenerfassung und Datenanalyse	25
2.3 Versuchsvorbereitungen	26
2.3.1 Lösungen	27
2.3.2 Biopsie und Präparation der Oozyten	28
2.3.3 Mikroinjektion von RNA in die Oozyten	29
2.3.4 Herstellung der Patch-Pipetten	30
2.4 Versuchsdurchführung	30
2.4.1 Ausbildung des Gigaseals	30
2.4.2 Verlauf eines Versuchs	31
2.4.2.1 Das Lösungswechsel-Experiment	32
2.4.2.2 Das Spannungssprung-Experiment	34

2.4.2.3	Schnelle Spannungssprung-Experimente zur Bestimmung der Vergleichgewichtsströme	34
2.4.2.4	Bestimmung der Kapazitäten	35
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Verlauf eines Experiments	37
3.1.1	Veränderung des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ während der Messdauer	39
3.2	Substrat-Abhängigkeit des SGLT1	41
3.2.1	Bestimmung der αMDG -Affinität bei verschiedenen Na^+ -Konzentrationen	41
3.2.1.1	αMDG -Affinität bei 110 mM Na^+	41
3.2.1.2	αMDG -Affinität bei 50 mM Na^+	43
3.2.1.3	αMDG -Affinität bei 10 mM Na^+ im Bad/ 0 mM Na^+ in Pipette	44
3.2.1.4	αMDG -Affinität bei 10 mM Na^+ in Bad und Pipette	45
3.2.1.5	αMDG -Affinität bei 400 mM Na^+	46
3.2.1.6	αMDG -Affinität als Funktion der Na^+ -Konzentration	47
3.2.1.7	Untersuchung zum Osmolaritätsgradienten	48
3.2.2	Bestimmung der Na^+ -Affinität des SGLT1 bei verschiedenen αMDG -Konzentrationen	50
3.2.2.1	Na^+ -Affinität bei 250 mM αMDG	50
3.2.2.2	Na^+ -Affinität bei 25 mM αMDG	52
3.2.2.3	Na^+ -Affinität bei 100 mM αMDG	53
3.2.2.4	Na^+ -Affinität als Funktion der αMDG -Konzentration	54
3.3	Spannungsabhängigkeit des SGLT1	55
3.3.1	Beispiel eines Spannungssprung-Experimentes	55
3.3.2	Spannungsabhängigkeit der zuckerinduzierten Ströme als Funktion der αMDG -Konzentration bei fester Na^+ -Konzentration	57
3.3.2.1	Spannungsabhängigkeit für αMDG bei 110 mM Na^+	57
3.3.2.2	Spannungsabhängigkeit für αMDG bei 50 mM Na^+	58
3.3.2.3	Spannungsabhängigkeit für αMDG bei 10 mM Na^+	59
3.3.2.4	Zusammenfassung zur Spannungsabhängigkeit für αMDG bei drei festen Na^+ -Konzentrationen	61
3.3.3	Spannungsabhängigkeit der zuckerinduzierten Ströme als Funktion der Na^+ -Konzentration bei fester αMDG -Konzentration	62
3.3.3.1	Spannungsabhängigkeit für Na^+ bei 250 mM αMDG	62
3.3.3.2	Spannungsabhängigkeit für Na^+ bei 25 mM αMDG	63
3.3.3.3	Zusammenfassung der Spannungsabhängigkeit für Na^+ bei zwei festen αMDG -Konzentrationen	65
3.4	Wirkung von Inhibitoren	66

3.4.1 Die Wirkung von Phlorizin.....	66
3.4.2 Potentielle Inhibitoren	67
3.5 Bindungsreihenfolge.....	67
3.6 Vergleichgewichtsströme	72
3.6.1 Einfluss der Pipettenkapazität auf die Ergebnisse	73
3.6.2 Kapazität des Patches	74
3.6.3 Vergleichgewichtsströme des Auswärtstransports	75
3.6.4 Vergleichgewichtsströme des Einwärtstransports	78
4 DISKUSSION	81
4.1 Intrazelluläre Affinitäten für Substrate und Inhibitoren	82
4.1.1 Affinität für α MDG	82
4.1.1.1 Abhängigkeit der α MDG-Affinität von der Na^+ -Konzentration	82
4.1.1.2 α MDG-Affinität ist asymmetrisch auf Innen- und Aussenseite.....	83
4.1.1.3 Vergleich der Ergebnisse mit indirekten Messungen der intrazellulären α MDG-Affinität.....	85
4.1.1.4 Spannungsabhängigkeit der α MDG-Affinität.....	87
4.1.1.5 Veränderung der Affinität während der Messdauer an einem Patch.....	88
4.1.2 Affinität für Phlorizin	88
4.1.3 Affinität für Na^+	90
4.1.3.1 Na^+ -Affinität ist symmetrisch auf der Innen- und Außenseite.....	91
4.1.3.2 Abhängigkeit der Na^+ -Affinität von der α MDG-Konzentration.....	91
4.1.3.3 Spannungsabhängigkeit von K_M^{Na}	92
4.1.3.4 Vergleich mit indirekten Messungen der intrazellulären Na^+ -Affinität	93
4.1.4 Physiologische Bedeutung der Affinitäten	93
4.1.5 Na^+ -Leckstrom.....	94
4.1.6 Bindungsreihenfolge.....	95
4.2 Vergleichgewichtsströme	96
4.2.1 Vergleichgewichtsströme des Auswärtstransports	97
4.2.2 Vergleichgewichtsströme des Einwärtstransports	99
5 ZUSAMMENFASSUNG	102
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	104
DANKSAGUNG.....	111
LEBENS LAUF	112

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
SGLT1	Na ⁺ /Glucose Cotransporter
rbSGLT1	SGLT1 aus dem Kaninchen
hSGLT1	menschlicher SGLT1
α MDG	α -Methyl-D-glucopyranosid
$K_M^{\alpha\text{MDG}}$	α MDG-Konzentration, bei der 50% des Sättigungsstroms I_{Max} erreicht wird
K_M^{Na}	Na ⁺ -Konzentration, bei der 50% des Sättigungsstroms I_{Max} erreicht wird
K_i	Inhibitiorkonzentration, bei der 50% des Maximalstroms inhibiert sind
HP	Haltepotential
a.u.	willkürliche Einheiten (arbitrary units)
EGTA	Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethansulfonsäure)
NMG	N-Methyl-D-Glucamin
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C

1 Einleitung

1.1 Der Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1

1.1.1 Die physiologische Bedeutung des Na⁺/Glucose Cotransporters SGLT1

Der Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1 (englisch: Sodium/Glucose Cotransporter 1) gehört zur Familie der Transportproteine, die Moleküle wie Zucker, Aminosäuren und anorganische Anionen über die Zellmembran transportieren. SGLT1 wird hauptsächlich in den Bürstensaum-Zellen des Dünndarms und den S3-Segmenten des proximalen Tubulus der Niere exprimiert (Lee et al., 1994). Seine Funktion besteht in der aktiven Resorption und Akkumulation der beiden physiologischen Substrate, D-Glucose und Galactose, in die Bürstensaum-Zellen.

Abb. 1 zeigt schematisch eine Bürstensaum-Zelle. In der apikalen Zellmembran, der Bürstensaum-Membran, befindet sich der Cotransporter SGLT1. Pro Glucose-Molekül werden 2 Na⁺-Ionen über die Membran in das Zellinnere transportiert, so dass der Transport elektrogen ist (Umbach et al., 1990). Glucose kann im Zellinneren bis zu einem Faktor 70 relativ zur extrazellulären Konzentration akkumuliert werden (Kimmich und Randles, 1979). Danach wird sie durch GLUT1 oder GLUT2, zwei Glucose- und Fructose-transportierende Carrier, durch erleichterte Diffusion über die basale Membran in das Blut abgegeben (Hediger et al., 1995). Die durch den Cotransport erhöhte intrazelluläre Na⁺-Konzentration wird durch die Na⁺-K⁺-ATPase in der basolateralen Membran wieder ausgeglichen.

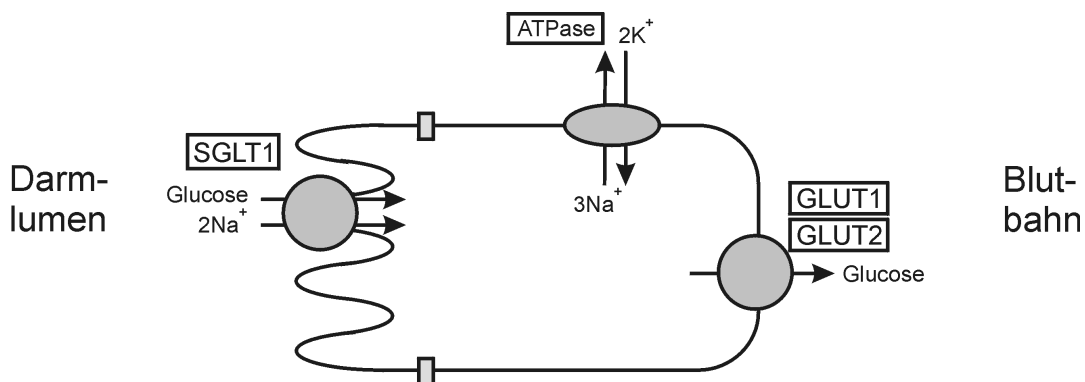


Abbildung 1: schematisches Bild einer Bürstensaum-Zelle mit SGLT1 in der apikalen Membran, GLUT1, GLUT2 und der Na⁺-K⁺-ATPase in der basolateralen Membran

Als weitere Funktion von SGLT1 wird die Resorption von Wasser aus dem Darm diskutiert, wodurch dem Darminhalt Wasser entzogen wird (Loo et al., 1996; Meinild et al., 1998; Loo et al., 1999). Pro Glucose-Molekül sollen dabei 200-400 Wassermoleküle transportiert werden. Damit wäre der humane SGLT1 für die Resorption von täglich ca. 5 l Wasser, d. h. 50% der Gesamtwasserresorption aus dem Darm, verantwortlich.

Im Falle der seltenen Erbkrankheit Glucose-Galactose Malabsorption ist SGLT1 im Darm nicht funktionsfähig (Martin et al., 1996; Wright, 1998; Lam et al., 1999). Die hohe Zuckerkonzentration im Darm führt durch osmotische Prozesse dazu, dass Wasser nicht aus dem Darm resorbiert wird. Der Patient leidet unter wässrigem Durchfall, der innerhalb weniger Wochen tödlich sein kann. Die einzige Therapie ist eine lebenslange Diät, die weder Glucose, Galactose noch Lactose (wird bei der Verdauung in Glucose und Galactose aufgespalten) enthält. Bis jetzt wurden 23 Mutationen des SGLT1-Gens festgestellt, die für diese Krankheit verantwortlich sind. Sie führen entweder zu einem unvollständigen, nichtfunktionsfähigen Protein, oder aber verhindern den Transport zur Plasmamembran und den Einbau des Proteins in die Plasmamembran.

1.1.2 Struktur des SGLT1

SGLT1 besteht aus 662-665 Aminosäuren, abhängig von der jeweiligen Spezies (Turk und Wright, 1997). Die Primärstruktur von SGLT1 ist seit 1994 bekannt (Turk et al., 1994), ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Ratte, Mensch und Kaninchen zeigt

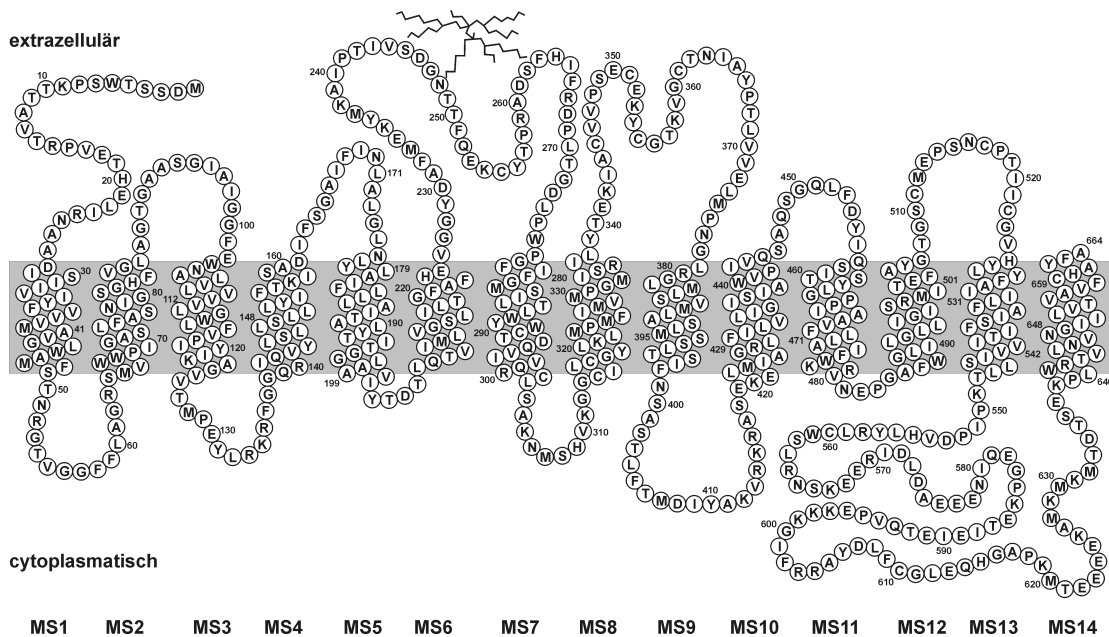


Abbildung 2: Vorgeschlagenes Topologiemodell des SGLT1 (Turk et al., 1994) (MS: Transmembrandomäne)

86-87% Identität und 93-94% Ähnlichkeit (Wright et al., 1994; Panayotova-Heiermann et al., 1995). Das Molekulargewicht ist 73-75 kDa (Hediger et al., 1987; Turk et al., 1994). Abb. 2 zeigt das vorgeschlagene Topologiemodell von SGLT1 (Turk and Wright, 1997). Demnach besteht das Protein aus 14 transmembranären α -Helices, wobei der N-Terminus extrazellulär lokalisiert ist. Es wird noch kontrovers diskutiert, ob die Schleife zwischen der 13. und der 14. Transmembran-Domäne intrazellulär oder extrazellulär ausgebildet ist, wodurch auch die Ausrichtung des C-Terminus noch unklar ist (Lin et al., 1999). Die Zuckerbindung und der Transport des Zuckers finden im Bereich der Transmembran-Domänen 10-13 statt (Panayotova-Heiermann et al., 1995; Panayotova-Heiermann et al., 1997). Für die Na^+ -Bindung und die Spannungsabhängigkeit ist die extrazelluläre Schleife zwischen den Transmembran-Domänen 4 und 5 verantwortlich (Lo und Silverman, 1998).

1.1.3 Subtypen des SGLT

Bisher wurden 3 Subtypen des Na^+ /Glucose Cotransporter kloniert: SGLT1, SGLT2 und SGLT3. SGLT1 ist hochaffin für Glucose und wird hauptsächlich im Darm (Crane und Mandelstam, 1960; Hopfer et al., 1976; Haase et al., 1990; Lee et al., 1994), aber auch in geringerer Zahl in der Niere, in der Lunge und der Leber exprimiert (Lee et al., 1994). SGLT2 ist dagegen niederaffin und ist hauptsächlich in der Niere im S1-Segment des proximalen Tubulus lokalisiert (Hediger et al., 1995). Er ist vermutlich für die anfängliche Zuckerresorption in der Niere bei hoher Zuckerkonzentration verantwortlich, wohingegen der hochaffine SGLT1 im S3-Segment der Niere für die Resorption der verbliebenen Zuckerspuren verantwortlich ist. Sie unterscheiden sich auch in der Primärstruktur: es gibt ca. 60-80% Identität, abhängig von der betrachteten Spezies (Lee et al., 1994; Wright et al., 1994). Weitere Unterschiede bestehen in der Stöchiometrie und in der Substrat-Spezifität. SGLT1 hat eine Stöchiometrie von 2 Na^+ : 1 Glucose (Kimmich und Randles, 1980; Kimmich, 1990; Lee et al., 1994; Chen et al., 1995; Mackenzie et al., 1998), SGLT2 hingegen scheint eine Stöchiometrie von 1:1 zu haben (Kanai et al., 1994; Hediger et al., 1995). Galactose ist kein Substrat für SGLT2 (Hediger und Rhoads, 1994), aber für SGLT1.

Der dritte Subtyp, SGLT3, ist ein weiterer niederaffiner Glucosetransporter (Mackenzie et al., 1994; Hediger et al., 1995; You et al., 1995; Diez-Sampedro et al., 2000). Die Stöchiometrie ist, wie bei SGLT1, 2:1 (Diez-Sampedro et al., 2001), aber Galactose ist, wie bei SGLT2, kein Substrat (Mackenzie et al., 1994; Diez-Sampedro et al., 2000). Im

Gegensatz zu den beiden anderen Subtypen liegt SGLT3 auch in anderen Geweben wie Leber, Milz und Muskel vor (Kong et al., 1993).

1.1.4 SGLT1 als sekundär aktiver Transporter

SGLT1 ist ein sekundär aktiver Transporter. Die Energie für den Transportprozess erhält der Transporter durch den elektrochemischen Potentialgradienten für Na^+ , d.h. er wird angetrieben durch den Konzentrationsgradienten für Na^+ , das extrazellulär in hoher, intrazellulär in niedriger Konzentration vorliegt, und durch das negative Membranpotential der Bürstensaum-Zelle (Crane, 1977; Gerencser und Stevens, 1994). Die am Transport beteiligten Na^+ -Ionen fließen entlang ihres Gradienten in die Zelle, und an diesen Fluss eng gekoppelt ist der Transport des Substrates gegen dessen Konzentrationsgradienten unter Dissipation des Na^+ -Gradienten. Die Abnahme des Na^+ -Gradienten wird durch die Na^+ - K^+ -ATPase, ein weiteres Transportprotein in der basolateralen Membran der Bürstensaum-Zelle (s. Abb. 1), verhindert.

1.1.5 Extrazelluläre Eigenschaften des SGLT1

In den siebziger Jahren begann man mit der Untersuchung der Glucose-Resorption im Darm (Reuss, 2000). Mit Hilfe dieser Ergebnisse formulierte Crane seine Hypothese zum Mechanismus des Na^+ -gekoppelten Cotransports (Crane, 1962; Crane, 1977). Danach blieb der Na^+ -Glucose-Cotransport noch lange als Prototyp des sekundär aktiven Transports das Ziel zahlreicher Untersuchungen mit unterschiedlichsten Untersuchungsmethoden. Die Affinitäten für das Substrat Glucose und das Cosubstrat Na^+ und die Spezifität des SGLT1 wurden mit Flux-Messungen an Bürstensaum-Membran-Vesikeln des Darms (review: (Semenza et al., 1984)). und an an isolierten Darmzellen durchgeführt (review: ((Kimmich, 1990)). Die Untersuchung der Inhibition durch Phlorizin und die Bestimmung der Bindungskonstante erfolgte durch radioaktive Phlorizin-Bindungsexperimente an renalen Mikrovillus-Membran-Vesikeln (Aronson, 1978) und Bürstensaum-Membran-Vesikeln (Toggenburger et al., 1978; Toggenburger et al., 1982).

Die Expressionsklonierung des SGLT1 aus dem Kaninchen (Hediger et al., 1987) eröffnete die Möglichkeit, das Transportprotein in *Xenopus laevis* - Oozyten heterolog zu exprimieren. Dadurch konnten für den Einwärtstransport die substrat- und spannungsabhängigen Eigenschaften des SGLT1 unter wohldefinierten Spannungsbedingungen in Form von Strommessungen mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik untersucht werden. Die elektrophysiologischen Untersuchungen erstreckten sich

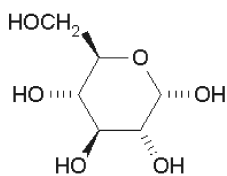
dabei hauptsächlich auf den SGLT1 aus Kaninchen, Mensch und Ratte (Kaninchen: (Ikeda et al., 1989; Umbach et al., 1990; Birnir et al., 1991; Parent et al., 1992b; Parent et al., 1992a; Hirayama et al., 1994; Lostao et al., 1994; Hazama et al., 1997; Hirayama et al., 1997; Mackenzie et al., 1998); Mensch: (Loo et al., 1993; Chen et al., 1995; Chen et al., 1996; Chen et al., 1997; Loo et al., 1998; Diez-Sampedro et al., 2000); Ratte: (Lee et al., 1994; Panayotova-Heiermann et al., 1995; You et al., 1995).

1.1.5.1 Substrate

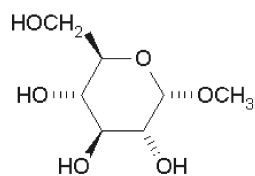
In den meisten Untersuchungen des Einwärtstransports wird nicht Glucose als Substrat verwendet, sondern das Glucose-Analogon α -D-Methyl-glucopyranosid (α MDG) (s. Abb. 3). Dieser Zucker wurde in Flux-Messungen an nativem Gewebe eingesetzt, da er nicht metabolisiert wird (Barry et al., 1964) und außerdem kein Substrat darstellt für die GLUT-Transporter, die in diesen Präparationen zusätzlich vorhanden sind (Kimmich und Randles, 1981). α MDG wurde in allen folgenden Untersuchungen als Substrat für SGLT1 beibehalten. Die extrazelluläre Spezifität für Glucose und α MDG ist annähernd gleich (Ikeda et al., 1989; Hirayama et al., 1997) und resultiert in gleichen Stromamplituden (Birnir et al., 1991; Hirayama et al., 1997). In den hier durchgeführten Patch-Clamp-Experimenten ist der Einsatz eines nicht metabolisierten Zuckers nicht notwendig, aber aus Gründen der Vergleichbarkeit wird α MDG weiterhin als Substrat beibehalten.

Es existieren weitere Zucker, die von SGLT1 mit unterschiedlichen Affinitäten transportiert werden. Die Spezifität bestimmt sich zu D-Glucose \approx D-Glactose \approx α MDG \gg 3-O-Methyl-Glucosid \gg D-Xylose $>$ D-Allose \gg D-Mannose (Brot-Laroche und Alvarado, 1983; Ikeda et al., 1989; Birnir et al., 1991).

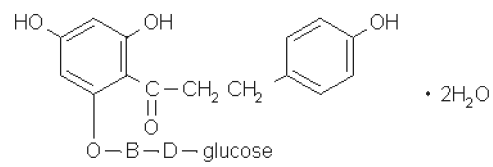
Substrate:



D-Glucose

 α -Methyl-D-Glucopyranosid (α MDG)

Inhibitor:



Phlorizin

Abbildung 3: Substrate und Inhibitor von SGLT1. Statt des physiologischen Substrats D-Glucose wird in den hier vorgestellten Messungen α -Methyl-D-Glucopyranosid (α MDG) als Substrat verwendet. α MDG ist eine Glucose mit einer zusätzlichen Methyl-Gruppe am C1-Atom. Der Inhibitor Phlorizin (Pz) besteht aus einer Glucose, an deren C1-Atom über eine glykosidische Bindung der zweite Teil, das hydrophobe Phloretin, angehängt ist. Das Phloretin bindet vermutlich an eine benachbarte Bindungsstelle an SGLT1.

Tab. 1 zeigt die Affinitäten des einwärtstransportierenden SGLT1 für Substrat, Cosubstrat und Inhibitor von Kaninchen, Mensch und Ratte. Diese wurden mit der Zwei-Elektroden-Voltag-Clamp-Technik unter gleichen Bedingungen bestimmt (Hirayama et al., 1996). Der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ für den SGLT1 aus dem Kaninchen beträgt 0,17 mM αMDG und liegt ungefähr in der gleichen Größenordnung wie der aus Ratte und Mensch (Hirayama et al., 1996).

SGLT1	Kaninchen	Mensch	Ratte
$K_M^{\alpha\text{MDG}}$ (HP: -50 mV, 100 mM Na ⁺)	0,17 mM	0,49 mM	0,31 mM
K_M^{Na} (HP: -30 mV, 5 mM αMDG , bei hSGLT1 10 mM αMDG)	16,5 mM	44 mM	40 mM
$K_i^{\text{phlorizin}}$ (HP: -150 mV)	0,76 μM	0,22 μM	0,012 μM

Tabelle 1: Apparente Affinitäten des Einwärtstransports für αMDG und Na⁺ und die Inhibitionskonstante K_i für Phlorizin. Die Parameter wurden für die Subtypen aus Kaninchen, Mensch und Ratte bei gleichen Potential- und Konzentrationsbedingungen ermittelt (Hirayama et al., 1996). Die Versuchsbedingungen sind bei den jeweiligen Werten angegeben (HP = Haltepotential).

1.1.5.2 Inhibitoren

Phlorizin ist der bekannteste spezifische Inhibitor des Zuckertransports durch SGLT1 (Diedrich, 1966). Phlorizin ist in allen Teilen des Apfelbaums außer in den reifen Äpfeln vorhanden. Der Verzehr von unreifen Äpfeln führt beim Menschen zu Durchfall, was auf die inhibierende Wirkung von Phlorizin auf SGLT1 zurückzuführen ist.

Die extrazelluläre halbmaximale Inhibitionskonstante $K_i \approx 10 \mu\text{M}$ wurde zuerst bestimmt durch Flux- und Bindungsexperimente an Bürstensaum-Membran-Vesikeln (Alvarado, 1962; Diedrich, 1966; Alvarado, 1967; Toggenburger et al., 1978; Gibbs et al., 1982; Brot-Laroche and Alvarado, 1983; Diedrich, 1990). Flux-Messungen an Oozyten zeigten eine K_i von 6 μM (Ikeda et al., 1989). Neuere Experimente mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik ergaben eine K_i von 1,4 μM (Hirayama et al., 1996), 3 μM (Umbach et al., 1990) und 10 μM (Lostao et al., 1994). Tab. 1 zeigt, dass SGLT1 hochaffin für den Inhibitor ist: er besitzt z. B. im Kaninchen eine 120fach höhere Affinität für Phlorizin als für Zucker, in der Ratte sogar 25000fach (Hirayama et al., 1996). Die Inhibition ist reversibel und kompetitiv (z. B. (Alvarado, 1962; Diedrich, 1966; Alvarado, 1967; Toggenburger et al., 1978; Gibbs et al., 1982; Brot-Laroche and Alvarado, 1983), was sich durch die chemische Zusammensetzung von Phlorizin erklären lässt (Abb. 3). Es besteht aus einem Phloretin-Teil und einem β -D-glucopyranosid-Teil, wobei letzteres ein Zucker ist, der von SGLT1 transportiert wird (Koepsell et al., 1990;

Lostao et al., 1994; Diez-Sampedro et al., 2000). Der Zuckerteil konkurriert dabei um die Glucose-Bindungsstelle (Silverman und Black, 1975; Diedrich, 1990; Panayotova-Heiermann et al., 1994), das stark hydrophobe Phloretin bindet vermutlich an eine benachbarte hydrophobe Domäne des Transporters (Diedrich, 1966; Alvarado, 1967; Koepsell et al., 1990).

In der Literatur werden zwei weitere Substanzen beschrieben, die SGLT1 extrazellulär in ähnlich spezifischer Weise inhibieren wie Phlorizin. Octyl- β -D-Glucopyranosid inhibiert die zuckerinduzierten Ströme vollständig mit $K_i \approx 10 \mu\text{M}$, wohingegen mit n-Hexyl- β -D-Glucopyranosid nur ca. 76 % Inhibition erreicht wird (Kipp et al., 1996).

1.1.5.3 Cosubstrat Na^+

Das Cosubstrat Na^+ fungiert als essentieller Aktivator für die Funktion von SGLT1. Die Na^+ -Bindung initiiert eine Konformationsänderung, die die Affinität des Transporters für Zucker erhöht (Peerce und Wright, 1984; Kimmich, 1990; Hediger and Rhoads, 1994; Hirayama et al., 1997; Loo et al., 1998). Tab. 1 zeigt die Affinitäten des SGLT1 für die Spezies Kaninchen, Ratte und Mensch. SGLT1 aus dem Kaninchen zeigt dabei eine signifikant höhere Na^+ -Affinität, wobei die aus Ratte und Mensch annähernd gleich sind. Weitere Cosubstrate sind Lithium und Protonen, die jedoch die Zuckeraffinität um eine Größenordnung verringern (Hirayama et al., 1994; Hirayama et al., 1997).

1.1.6 Transportmodelle

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur extrazellulären Substrat- und Spannungsabhängigkeit und der Phlorizin-Bindung führten zu zwei Transportmodellen (review (Hediger and Rhoads, 1994)), die sich im Wesentlichen nur durch die Bindungsreihenfolge des Substrats und des Cosubstrats unterscheiden. Beiden gemeinsam ist die Zuordnung der spannungsabhängigen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritte.

Modell I (siehe Abb. 4) wurde zuerst von der Arbeitsgruppe von Semenza (Kessler und Semenza, 1983) vorgeschlagen und mit neueren Daten von den Gruppen um Kimmich (Restrepo und Kimmich, 1985) und Lapointe (Chen et al., 1997) untermauert. Es resultiert aus Messungen an verschiedenen Systemen und mit verschiedenen Methoden. Es wurden Flux-Messungen an Bürstensaum-Membran-Vesikeln und isolierten Darmzellen durchgeführt (reviews: (Semenza et al., 1984; Kimmich, 1990). Die Abhängigkeit der Phlorizinbindung vom Membranpotential und von der extrazellulären Na^+ -Konzentration konnte durch radioaktive Bindungsexperimente an verschiedenen

Vesikel-Präparationen und isolierten Darmzellen ermittelt werden (Aronson, 1978; Toggenburger et al., 1978; Toggenburger et al., 1982; Kimmich und Randles, 1988; Kimmich, 1990).

Mit der Patch-Clamp-Technik konnten die Substratabhängigkeiten bei definierten Haltepotentialen ermittelt werden. Dazu wurden LLC-PK₁-Zellen, Zellen einer renalen Zelllinie aus dem Schwein, die den Transporter endogen enthalten (Bennett und Kimmich, 1996), und Oozyten, in denen SGLT1 heterolog exprimiert wurde (Chen et al., 1997), verwendet.

Abb. 4 zeigt Modell II (Parent et al., 1992b), das in der Literatur favorisiert wird. Es resultiert aus den Ergebnissen einer sehr ausführlichen Arbeit an Oozyten, in denen rbSGLT1 exprimiert und mit der Voltage-Clamp-Technik untersucht wurde (Parent et al., 1992a). Dieses Modell wurde kurzzeitig von der Lapointe-Gruppe unterstützt (Chen et al., 1995).

Glucosetransport:

Die Modelle sind in Abb.4 dargestellt (G = Glucose). Modell I zeigt eine geordnete Bindung mit der Reihenfolge Na⁺:G:Na⁺ (Restrepo and Kimmich, 1985; Chen et al., 1997). Die Bindung in Modell II erfolgt auch geordnet, allerdings ist hier die Reihenfolge 2 Na⁺:1G, wobei zur Vereinfachung die Bindung der 2 Na⁺ als gleichzeitig angenommen wird und deshalb als ein Reaktionsschritt behandelt wird (Parent et al., 1992b). Dadurch ergeben sich für Modell I 8 Zustände, für Modell II 6 Zustände.

Der prinzipielle Ablauf des Glucosetransports wird in beiden Modellen gleich beschrieben und soll hier für Modell II detaillierter dargestellt werden. An den leeren Transporter [T]_e, der dem extrazellulären Raum zugewandt ist, binden 2 Na⁺ und bilden den Zustand [TNa₂]_e. Die Bindung von Zucker resultiert im Zustand [TNa₂G]_e. Anstelle von Zucker kann auch der spezifische Inhibitor Phlorizin (Pz) reversibel binden ([TNa₂Pz]_e), der die Translokation verhindert. Der voll beladene Transporter [TNa₂G]_e translokiert durch eine Konformationsänderung die Substrate zur intrazellulären Seite, es entsteht [TNa₂G]_i. Über die intrazelluläre Bindungsreihenfolge ist bis jetzt noch nichts bekannt. Das Modell nimmt eine Spiegelsymmetrie der Bindungsreihenfolge an, so dass die Substrate intrazellulär vermutlich gemäß ihrer extrazellulären Bindungsreihenfolge wieder freigesetzt werden. Danach würde zuerst Glucose dissoziieren ([TNa₂]_i), gefolgt von Na⁺, wodurch Zustand [T]_i entsteht. Eine Konformationsänderung bewirkt die Relokation des leeren Transporters [T]_i von der Innenseite zur Außenseite [T]_e.

Beide Modelle gehen von einer negativen Ladung des leeren Transporters von $z = -2$ aus (Kessler and Semenza, 1983; Semenza et al., 1984). Dadurch ist der elektrogene Schritt im

Transportzyklus die Relokation des leeren Transporters von der Innenseite zur Außenseite. Die Translokation des mit Na⁺ und Glucose beladenen Transporters ist ein elektroneutraler Schritt, da die 2 positiven Na⁺-Ionen die 2 negativen Ladungen des Transporters neutralisieren.

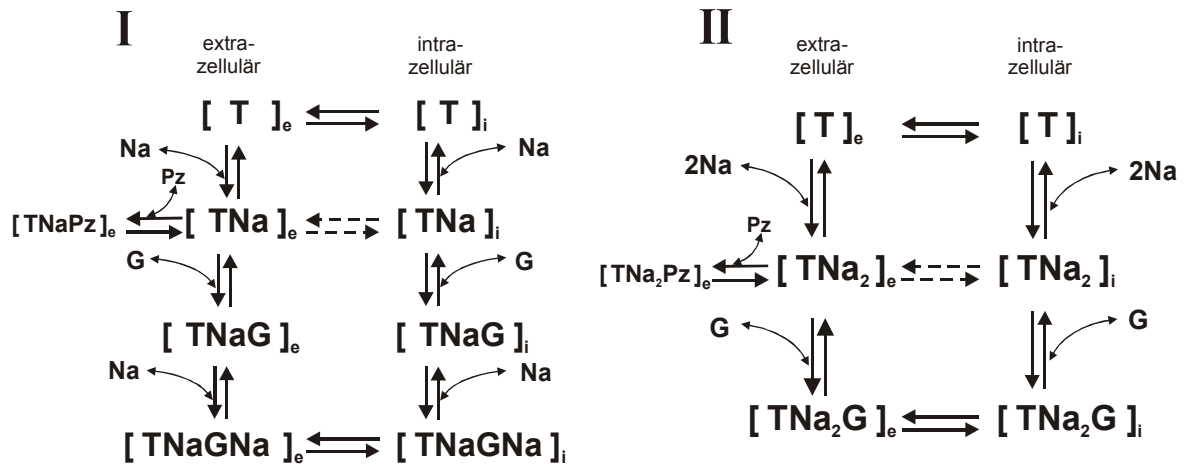


Abbildung 4: vorgeschlagene Transportmodelle I: Transportmodell nach Kimmich (Restrepo and Kimmich, 1985) und Lapointe mit 8 Zuständen (Chen et al., 1997). II: Transportmodell nach Wright mit 6 Zuständen (Parent et al., 1992b). Die gestrichelten Pfeile zeigen den Na⁺-Leckstrom. (e = extrazellulär, i = intrazellulär)

Na⁺-Leckstrom:

Neben dem Glucose-Transport kann ein weiterer Zyklus durchlaufen werden, der sogenannte Na⁺-Leckstrom, der nicht an den Transport von Glucose gekoppelt ist (in Abb. 4 durch die gestrichelten Verbindungen gezeigt). Dabei wird Na⁺ nach der extrazellulären Bindung zur intrazellulären Seite translokiert, ohne dass Zucker transportiert wird. Intrazellulär dissoziiert Na⁺ und es erfolgt die Relokation des leeren Transporters. Der Na⁺-Leckstrom tritt auf, wenn die extrazelluläre Zuckerkonzentration sehr gering ist (Umbach et al., 1990; Parent et al., 1992a; Chen et al., 1995; Chen et al., 1997). Bei zunehmender extrazellulärer Zuckerkonzentration wird der Na⁺-Leckstrom immer geringer, wohingegen der zuckerinduzierte Strom zunimmt. Der Na⁺-Leckstrom und der zuckerinduzierte Strom sind bei ca. 40 μM extrazellulärem αMDG gleich gross. Der Na⁺-Leckstrom ist gegenüber dem zuckerinduzierten Strom gering: er beträgt ca. 2,5 - 6% des unter sättigenden Substratkonzentrationen hervorgerufenen Stroms (Umbach et al., 1990; Chen et al., 1995).

Spannungsabhängigkeit:

In beiden Modellen werden als spannungsabhängige Schritte im Transportzyklus die Na^+ -Bindung bzw. -Dissoziation auf der Außenseite und die Translokation des leeren Transporters beschrieben (Kimmich, 1990; Parent et al., 1992b; Bennett and Kimmich, 1996). Dabei unterstützt ein negatives Membranpotential sowohl die Na^+ -Bindung auf der extrazellulären Seite als auch den Rückschritt des leeren Transporters von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Membran. In Modell II erfährt die extrazelluläre Na^+ -Bindung 25-30% des elektrischen Feldes über die Membran, der Rückschritt des leeren Transporters ca. 60-75% des elektrischen Feldes (Parent et al., 1992b). Die intrazelluläre Na^+ -Bindung-/Dissoziation wird in beiden Modellen als sehr gering spannungsabhängig angenommen.

Geschwindigkeitsbestimmender Schritt:

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist nach beiden Modellen eine Funktion des Membranpotentials, der extrazellulären Zuckerkonzentration und der extrazellulären Na^+ -Konzentration. Bei einem Membranpotential von 0 mV und sättigender extrazellulärer Na^+ - und αMDG -Konzentration ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Translokation des leeren Transporters von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Membran (Parent et al., 1992b; Bennett and Kimmich, 1996). Ein zunehmend negatives Membranpotential beschleunigt diesen Rückschritt, wodurch vermutlich die intrazelluläre Na^+ -Dissoziation geschwindigkeitsbestimmend wird. Außerdem spielt die Cosubstratkonzentration eine Rolle, denn bei Unterschreiten einer bestimmten Cosubstratkonzentration, z. B. 10 mM Na^+ wird die extrazelluläre Na^+ -Bindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Parent et al., 1992b).

1.1.7 Vergleichgewichtsströme

Zeitaufgelöste Messungen mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik führten zur Entdeckung von Vergleichgewichtsströmen für den Einwärtstransport (Parent et al., 1992a), die neue Einblicke in den Mechanismus des Transportprozesses erlaubten und die Bestimmung der Zeitkonstanten der einzelnen Transportschritte für Transportmodell I ermöglichten (Parent et al., 1992b).

Vergleichgewichtströme sind transiente Ströme, die zusätzlich zu den transienten Strömen durch die Umladung der Membrankapazität nach einem Spannungssprung auftreten. Sie zeigen sich in Anwesenheit von extrazellulärem Na^+ bei depolarisierenden Spannungssprüngen (Parent et al., 1992a; Loo et al., 1993; Hazama et al., 1997). Enthält

die extrazelluläre Lösung jedoch zusätzlich Zucker oder Phlorizin, sind sie nicht mehr messbar (Parent et al., 1992a; Loo et al., 1993; Chen et al., 1996; Hazama et al., 1997). In Abwesenheit von Zucker reduziert sich das Transportmodell II auf die 3 Zustände $[TNa_2]_e \leftrightarrow [T]_e \leftrightarrow [T]_i$. Abhängig vom Haltepotential werden einzelne Zustände bevorzugt besetzt, da die Na^+ -Assoziation/-Dissoziation und die Relokation des leeren Transporters spannungsabhängige Schritte sind. Eine Spannungsänderung hat eine Neueinstellung des Gleichgewichts zur Folge, wobei eine Verschiebung von geladenen Substraten und den zwei negativen intrinsischen Ladungen des Transporters stattfindet. In Anwesenheit von Zucker werden bevorzugt zuckergebundene Zustände besetzt, die nicht spannungsabhängig sind. Ein Spannungssprung verursacht daher nur geringe Ladungsverschiebungen zwischen den wenig besetzten, spannungsabhängigen Zuständen, so dass die transienten Ströme vernachlässigbar klein sind (Parent et al., 1992b).

Die Vorgleichgewichtsströme können durch eine Exponentialfunktion mit einer Zeitkonstante von 2-10 ms beschrieben werden (Parent et al., 1992b; Loo et al., 1993; Hazama et al., 1997). Das Modell sagt jedoch zwei Zeitkonstanten voraus: eine langsamere im Bereich von einigen ms, die von der Neuordnung der Zustände $[T]_e \leftrightarrow [T]_i$ herrührt, und eine wesentlich schnellere im Submillisekunden-Bereich, die sich aus der Na^+ -Dissoziation $[TNa_2]_e \leftrightarrow [T]_e$ ergibt. Die zweite Zeitkonstante kann mit der Voltage-Clamp-Technik wegen der relativ geringen Zeitauflösung von ≈ 1 ms (Loo et al., 1993) nicht gemessen werden. Durch den Einsatz der „cut-open oocyte“-Technik kann die Zeitauflösung auf 200 μs verbessert werden (Chen et al., 1996). Bei dieser Technik wird nur ein Membranfleck der Oozyte mit einer Fläche von ca. 8% der Gesamtfläche elektrisch isoliert (Chen et al., 1995), was zusammen mit dem niedrigeren Zugriffswiderstand zu einer schnelleren Spannungsklemme als bei der gesamten Oozyte führt. Außerdem bietet die Technik den Vorteil, dass die Oozyte von innen perfundiert werden kann und somit eine gewisse Kontrolle der intrazellulären Lösungen erreicht werden kann (Chen et al., 1995). Messungen mit dieser Technik zeigten auch eine zweite, schnellere Zeitkonstante im Bereich von 1 ms, die jedoch spannungsunabhängig war und auch nicht von der extrazellulären Na^+ -Konzentration abhing (Chen et al., 1996). Deshalb kann diese Zeitkonstante nicht der Na^+ -Dissoziation zugeordnet werden. Die Autoren interpretierten das Auftreten dieser Zeitkonstante durch einen zusätzlichen intermembranären Zustand des Transporters während der Relokation des leeren Transporters. Die schnelle Zeitkonstante, die sich aus der Na^+ -Dissoziation ergeben soll, konnte auch mit der „cut-open oocyte“-Technik nicht ermittelt werden.

Wechselzahl

Ein weiteres Ergebnis der Messung der Vergleichgewichtsströme ist die Abschätzung der Wechselzahl des Transporters. In Badlösungen mit verschiedenen Zuckerkonzentrationen werden durch schnelle Spannungssprünge die Vergleichgewichtsströme gemessen, aus denen man durch Integration die verschobene Ladung Q erhält. Wenn Q an den de- und hyperpolarisierenden Potentialen sättigt, entspricht die Differenz zwischen den sättigenden Werten $Q_{de} - Q_{hyp} = Q_{Max}$ der maximal verschiebbaren Ladung die sich durch die Umorientierung des leeren SGLT1 ergeben kann. Q_{Max} repräsentiert somit die maximale Anzahl des leeren Transporters in der Membran. Als zweiten Parameter bestimmt man bei hyperpolarisierendem Potential und jeweiliger Zuckerkonzentration den Maximalstrom, der aussagt, wie viele Ladungen pro s verschoben werden. Aus der linearen Beziehung zwischen maximal verschobener Ladung und dem gemessenen Maximalstrom kann nun abgeschätzt werden, wie häufig pro s ein Transport durch SGLT1 stattfindet. Für rbSGLT1 konnte die Wechselzahl zu 19 s^{-1} (Hirsch et al., 1996) bzw. 25 s^{-1} (Panayotova-Heiermann et al., 1994) und für hSGLT1 zu 38 s^{-1} (Hirsch et al., 1996) bzw. 57 s^{-1} (Loo et al., 1993) bestimmt werden (alle bei Raumtemperatur). Die Werte für rbSGLT1 sind in guter Übereinstimmung mit früheren Flux-Messungen an Vesikeln aus Bürstensaum-Membranen, bei denen sich ca. 20 s^{-1} ergab (Toggenburger et al., 1978).

1.2 Die *Xenopus laevis* Oozyte als heterologes Expressionssystem

In dieser Arbeit werden Oozyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* als heterologes Expressionssystem verwendet. Die Überexpression von Fremdproteinen in Xenopus-Oozyten nach Mikroinjektion von cRNA in das Cytoplasma oder von cDNA in den Zellkern wurde erstmals 1971 beschrieben (Gurdon et al., 1971). Hierbei kann die erstaunliche Anzahl von 10^9 bis 10^{11} Fremdproteine pro Oozyte erreicht werden, z.B für Na^+ /Glucose Cotransporter 10^{11} Proteine/Oozyte (Loo et al., 1993), Na^+ - K^+ -ATPase 10^9 Proteine/Oozyte (Rettinger, 1994) und Glutamat-Transporter EAAT2 10^{10} Proteine/Oozyte (Wadiche et al., 1995). Die Xenopus-Oozyte eignet sich gut als heterologes Expressionssystem, weil sie als Eizelle eine sehr hohe Translationsfähigkeit besitzt. Sie enthält alle Systeme, die eine effiziente Proteinbiosynthese ermöglichen, in sehr großer Anzahl (Hilken et al., 1997). Außerdem führt sie an den Fremdproteinen die meisten posttranslationalen Modifikationen wie Glycosylierung, Phosphorylierung und

Zusammensetzung verschiedener Untereinheiten korrekt durch (Coleman, 1984; Sigel, 1990). So gelang es, eine Vielzahl von Proteinen aus unterschiedlichsten Spezies in *Xenopus*-Oozyten funktionell zu exprimieren (reviews z.B. (Sigel, 1990; Miller und Zhou, 2000)).

Zur heterologen Expression werden Oozyten des Reifestadiums V verwendet, in dem sich die Oozyte in einem Ruhezustand vor der Entwicklung zur laichfähigen Oozyte (Stadium VI) befindet (Stadien I-VI nach (Dumont, 1972)). Oozyten der Stadien V und VI haben einen Durchmesser von 1,2 – 1,3 mm und besitzen eine schwarz-braun pigmentierte, animale, und eine helle, vegetative Hemisphäre. Eine typische Zelle des Stadiums V mit einem Durchmesser von 1,3 mm hat ein Volumen von ca 0,9 μl und eine „Kugel“-Oberfläche von ca. 5 mm^2 . Bedingt durch viele in der Membran vorkommende Mikrovilli erhöht sich die tatsächliche Membranoberfläche jedoch auf ca. 22 mm^2 (Hilken et al., 1997).

Natürlich besitzt die Oozyte selbst auch endogene Kanäle und Transporter zur Aufrechterhaltung ihrer Vitalfunktion, die bei der Durchführung und Interpretation der Experimente berücksichtigt werden müssen. Zu den wichtigsten endogenen Kanälen gehören Ca^{2+} -aktivierbare Chloridkanäle und verschiedene Klassen von Kalium- und Natriumkanälen (Weber, 1999). Die endogenen Transporter der Oozyte spielen bei elektrophysiologischen Messungen kaum eine Rolle, da diese Ströme im Vergleich zu überexprimierten Transporterströmen sehr klein sind. Allerdings exprimiert die Oozyte auch einen endogenen Na^+ /Glucose Cotransporter. Isotopen-Aufnahme-Experimente an nichtinjizierten Oozyten zeigen eine sehr schwache Aktivität des Transporters, die maximal 1 nA zuckerinduzierten Strom im Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Experiment erwarten lassen (Weber et al., 1989). Gegenüber dem zu erwartenden Strom von mehreren 100 nA in einer SGLT1-exprimierenden Oozyte ist dieser Strom somit vernachlässigbar.

1.3 Strommessung mit der Patch-Clamp-Technik

Das Prinzip einer Strommessung mit der Patch-Clamp-Technik besteht darin, dass Ladungen, die durch Transportproteine oder Ionenkanäle über die Membran verschoben werden, eine Änderung im Membranpotential hervorrufen. Bei der Patch-Clamp-Technik wird dem Patch ein Haltepotential aufgeprägt und durch den Regelkreis des Vorverstärkers kontrolliert. Erfolgt nun ein Stromfluß durch aktivierte Transportproteine, wird die darauffolgende Änderung des Membranpotentials durch eine Strominjektion in die Pipette kompensiert. Dieser Kompensationsstrom ist dann das Äquivalent für den

Transportstrom, der durch den Transporter hervorgerufen wird. Durch verschiedene Messkonfigurationen können mittels der Patch-Clamp-Technik unterschiedliche Fragestellungen behandelt werden (Hamill et al., 1981). Zur Untersuchung des Auswärtstransports von Glucose wird in dieser Arbeit die zellfreie Makropatch-Technik in der „inside-out“-Konfiguration verwendet (Rettinger, 1994; Hilgemann, 1995). Dabei wird aus der Zellmembran einer ganzen Oozyte ein „Membranfleck“ (*patch*) mit einem Durchmesser von ca. 20 – 40 μm in der Art herausgerissen, dass die Membraninnenseite der Badlösung zugewandt ist, die Außenseite der Pipettenlösung. Somit ist die intrazelluläre Seite frei zugänglich. Die große Membranfläche der Makropatches, die eine entsprechend große Anzahl von Transportproteinen enthält, gleicht die geringen Wechselzahlen der Transporter im Bereich von einigen 10 bis 100 Zyklen / s aus, die ansonsten zu geringen Stromamplituden unterhalb der Nachweisgrenze von ca. 1 pA führen würden.

1.4 Ziel der Arbeit

Der Na^+ /Glucose Cotransporter SGLT1 ist der Prototyp des sekundär aktiven Transporters. Seine Funktionsweise wird seit den siebziger Jahren durch zahlreiche Untersuchungsmethoden erforscht, z. B. durch Fluxmessungen an Vesikeln aus nativem Darm- oder Nierengewebe. Die Expressionsklonierung von SGLT1 in *Xenopus*-Oozyten eröffnete die Möglichkeit, das Transportprotein in Oozyten heterolog überzuexprimieren. Dadurch konnte der Einwärtstransport des SGLT1 durch die Zweielektroden-Voltage-Clamp-Technik unter definierten extrazellulären Lösungsbedingungen und Potentialbedingungen charakterisiert werden. Aus den Ergebnissen konnten zwei detaillierte Transportmodelle erstellt werden. Allerdings war es mit diesen Techniken nicht möglich, die intrazellulären Eigenschaften zu untersuchen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Charakterisierung des Glucose-Auswärtstransports, der durch den Na^+ /Glucose Cotransporter SGLT1 generiert wird. SGLT1 wird dazu in Oozyten überexprimiert und mit der „giant-excised-patch-Clamp“-Technik untersucht. Durch die Verwendung der inside-out-Konfiguration ist die intrazelluläre Membranseite der Badlösung zugewandt. Somit eignet sich die „giant-excised-patch-clamp“-Technik sehr gut dazu, die Eigenschaften der intrazellulären Bindungsstellen unter definierten intra- und extrazellulären Lösungsbedingungen zu untersuchen. Auch die Haltepotentialbedingungen können genau eingestellt und sehr schnell durch die kleinen Kapazitäten des Membranflecks geändert werden. Die Schwerpunkte liegen in der Untersuchung der

intrazellulären apparenten Affinitäten für das Substrat α MDG und das Cosubstrat Na^+ und ihre gegenseitige Beeinflussung bei einem Haltepotential von 0 mV. Diese Ergebnisse erlauben eine Bestimmung der intrazellulären Bindungsreihenfolge von Substrat und Cosubstrat. Durch die Bestimmung der intrazellulären Affinitäten für α MDG und Na^+ bei unterschiedlichen Haltepotentialen kann der Einfluss des Membranpotentials gezeigt werden. Durch zeitaufgelöste Spannungssprung-Experimente sollen Vergleichgewichtsströme für den Auswärtstransport gezeigt werden, die einen Einblick in den Mechanismus des Transportprozesses und die Untersuchung einzelner Transportschritte erlauben.

2 Material und Methoden

2.1 Liste der Geräte und Materialien

Geräte	Hersteller
Axopatch 200 mit CV 201AU Verstärkerkopf	Axon Instruments (Foster City, Kalifornien)
AD/DA-Karte DigiData1200	Axon Instruments (Foster City, Kalifornien)
AD/DA-Karte Labmaster TL-1	Axon Instruments (Foster City, Kalifornien)
Mikroskop Invertoskop-D schwingungsgedämpfter Tisch, Modell 1201-01-00	Zeiss (Göttingen) Vibraplane (Boston, Massachusetts)
xyz- Verschiebetische	Spindler&Hoyer (Göttingen)
hydraulischer Mikromanipulator, Modell MO-103	Narishige (Tokio, Japan)
elektromagnetischen Ventile	General Valve Corporation (Fairchild, New Jersey)
Ventilsteuerung	General Valve Corporation (Fairchild, New Jersey)
Flachbettschreiber BD112	Kipp & Zonen (Delft, Niederlande)
Speicher-Oszilloskop 511A	Tektronix (Beaverton, Oregon)
Vakuum-Erzeuger-Venile	Peter Lüttger (Rodgau)
Pipettenziehgerät 700D	David Kopf Instruments (Tujunga, Kalifornien)
Pipettenziehgerät PP83	Narishige (Tokio, Japan)
Oozyteninjektionspumpe	Drummond Scientific Company (Broomall, Pennsylvania)
Verbrauchsmaterialien	Hersteller/Lieferant
Patch-Pipettenglas N-51A	Drummond Scientific Company (Broomall, Pennsylvania)
Patch-Pipettenglas GC150-7.5	Harvard Apparatus Ltd (Edenbridge, Grossbritannien)
Injektions-Pipettenglas 3-00-203-G/X	Drummond Scientific Company (Broomall, Pennsylvania)
Silica-Kapillarglas (ID = 320 µm, AD = 450 µm)	Composite Metal Services Ltd (Hallow, Grossbritannien)
Silikon- und Teflonschläuche	LS Labor Service (Darmstadt) und Reichelt Chemietechnik (Heidelberg)
Dreiwegehähne	Neolab (Heidelberg)
Lotglas 8472 K3	Schott (Landshut)
Silberdraht, 0,25 mm Durchmesser	Alfa (Karlsruhe)
Platindraht, 0,3 mm Durchmesser	Alfa (Karlsruhe)

Chemikalien

Phlorizin Dihydrat

3-Aminobenzoessäureethylester Methansulfonat (Tricain) Sigma (Deisenhofen)

Collagenase Worthington, Typ 2 CLS 2 (350u/mg) Boehringer Mannheim (Mannheim)

PKA (katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Protein Kinase) Promega (Mannheim)

Vitamin E acetat

Fluka (Deisenhofen)

Octyl- β -D-Glucopyranosid

Fluka (Deisenhofen)

n-Hexyl- β -D-Glucopyranosid

Sigma (Deisenhofen)

Alle anderen Chemikalien in p.A. Qualität wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Fluka (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2.2 Die Messapparatur

2.2.1 Der Patch-Clamp-Vorverstärker

Das wichtigste Bauteil zur Messung des Stroms, der durch den Transporter generiert wird, ist der Patch-Clamp-Vorverstärker, die Headstage. Er erfüllt über einen kapazitiven Rückkopplungsmechanismus die spezielle Aufgabe, gleichzeitig das Haltepotential konstant zu halten und den Kompensationsstrom, der dazu nötig ist, zu messen.

In Abb. 5 ist die elektronische Schaltung der Headstage mit kapazitiver Rückkopplung gezeigt, wie ihn der für diese Experimente benutzte Axopatch 200A anbietet.

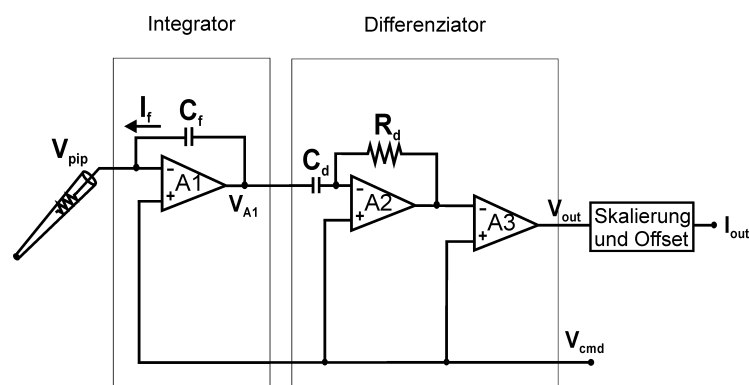


Abbildung 5: Elektronisches Schaltbild des Patch-Clamp-Vorverstärkers mit kapazitiver Rückkopplung (Erklärungen s. Text)

Gegenüber einem Verstärker mit resistiver Rückkopplung bietet dieser eine rauschärmere Messung durch weniger thermisches Rauschen und eine höhere Bandbreite. Die an der Pipette anliegende Spannung V_{pip} erzeugt über den Widerstand der Pipette einen Eingangsstrom I_{pip} , der nicht durch den hochohmigen Eingang des Operationsverstärkers A1 abfließen kann, sondern nur über den Kondensator C_f . Der Operationsverstärker A1 vergleicht die Kommandospannung V_{cmd} , die dem Patch aufgeprägt werden soll, mit der an der Pipette anliegenden Spannung V_{pip} . Die Spannungsdifferenz ist das Ausgangssignal V_{A1} von A1. Bei einer Spannungsdifferenz V_{A1} wird der Kondensator umgeladen und erzeugt einen Strom I_f , der dem Pipettenstrom entgegengesetzt ist. Das Ausgangssignal von A1, V_{A1} , ist dabei dem Integral des Eingangsstromes proportional. Es muss durch die nachfolgende Schaltung mit einer resistiven Rückkopplung, dem Differentiator, in eine dem Strom proportionale Spannung umgesetzt werden. Der nachfolgende Operationsverstärker A3 wird benötigt, um die am invertierenden Eingang von A1 addierte Kommandospannung V_{cmd} wieder abzuziehen. Der Zusammenhang zwischen der Ausgangsspannung des Verstärkers V_{out} und dem Eingangsstrom I_{pip} ist gegeben durch $V_{\text{out}} = I_{\text{pip}} \cdot R_d \cdot (C_d/C_f)$.

Im nachgeschalteten Hauptverstärker wird diese Spannung in den Strom umgerechnet und um das Offsetpotential korrigiert.

2.2.2 Aufbau des Messplatzes

Der Messaufbau ist in Abb. 6 A skizziert. Das inverse Mikroskop ist auf einen schwingungsgedämpften Tisch montiert. Um den Messaufbau herum befindet sich ein Faraday-Käfig aus Metallblech, durch den elektrische Einstreuungen abgehalten werden. Der Vorverstärkerkopf mit dem Pipettenhalter ist an einer schwenkbaren Halterung angebracht. Die räumliche Positionierung der Pipette erfolgt durch einen hydraulischen Mikromanipulator. Der Pipettenhalter besitzt seitlich einen Stutzen, durch den Über- oder Unterdruck in der Pipette angelegt werden kann. Zur Applikation der Lösungen wird Druckluft in die Lösungsbehälter (Kryogefäße, 2 ml) geleitet. Die Lösungszufuhr zum Mess-Schälchen wird durch elektromagnetischen Ventile geregelt. Mit Hilfe einer Ventilsteuerung können die Magnetventile manuell oder computergestützt gesteuert werden. Die Absaugung der Abfall-Lösung aus dem Schälchen erfolgt durch Unterdruck. Die Messung findet im Mess-Schälchen (Deckel einer 35 mm-Petrischale aus Glas) statt, das in den Mikroskoptisch eingelassen ist (Abb. 6 B). In das Schälchen wird eine Quarzglaskapillare ($AD = 450 \mu\text{m}$, $ID = 320 \mu\text{m}$) fest eingeklebt. Die Quarzkapillare ist mit dem Schlauch der Lösungs-Zuleitung verbunden, in den die 8 Zuleitungen von den

Lösungsbehältern ca. 2 cm vor der Messkammer zusammengeführt werden. Der Lösungsaustausch erfolgt innerhalb von 0,8 bis 1 s, was für die stationären Strommessungen ausreichend ist.

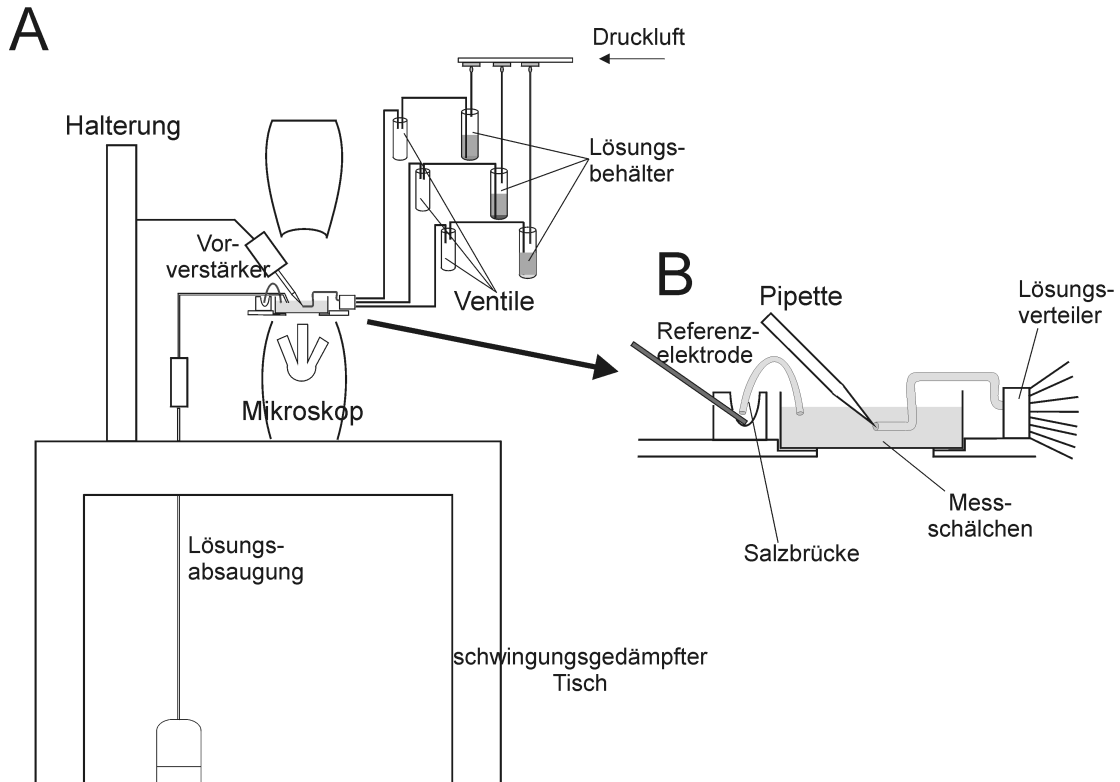


Abbildung 6: Messplatz A) Schematische Darstellung des Messplatzes (es werden nur 3 der 8 Lösungsbehälter und Magnetventile dargestellt); B) schematische Darstellung der Messkammer

Die Ag/AgCl-Referenzelektrode ist über eine Salzbrücke mit der Badlösung in elektrischem Kontakt. Die Pipettenspitze mit dem Patch wird in die Öffnung der Quarzkapillare positioniert und dort mit der Testlösung perfundiert. Dies verhindert eine Kontamination der Testlösung mit der Badlösung direkt am Patch.

2.2.3 Datenerfassung und Datenanalyse

Das Blockschaltbild der Mess- und Steuerelektronik ist in Abb. 7 gezeigt. Die zentrale Steuerung der Messapparatur und die Datenerfassung wird von Computer PC1 durch die Software pClamp 8.0.3 mit der dazugehörigen AD/DA-Wandlerkarte DigiData 1200 ausgeführt. Diese Kombination von Hard- und Software ermöglicht die Digitalisierung von Spannungssignalen zwischen ± 10 mV mit einer maximalen Abtastrate von 333 kHz bei 12 Bit Auflösung. Die Software pClamp 8.03 ermöglicht es, Protokolle zu erstellen, die den Verlauf des Haltepotentials und z. B. das Schalten der Ventile steuern. Über den

analogen Ausgang wird das vorgegebene Haltepotential an den Verstärker übertragen, der digitale Ausgang steuert die Ventilschaltung. Der Verstärker verfügt über die

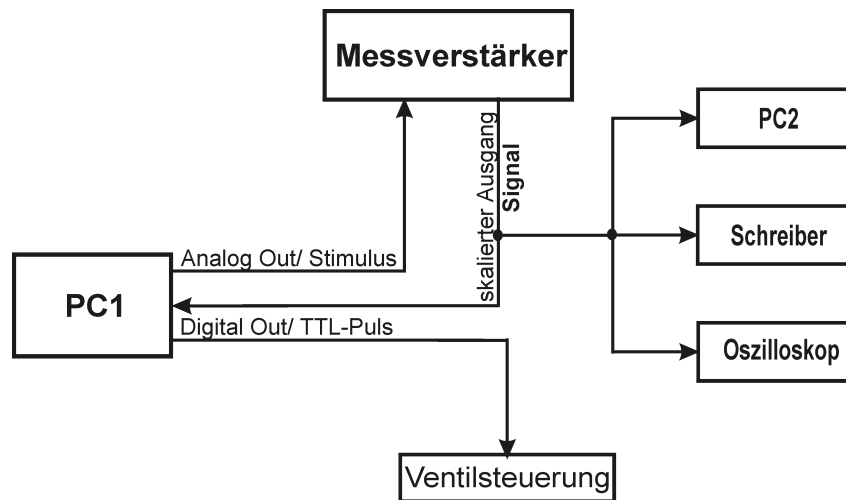


Abbildung 7: Blockschaltbild der Mess- und Steuerelektronik

Möglichkeit, die Verstärkereinstellungen wie Verstärkungsfaktor, Filterfrequenz und Kapazität kontinuierlich an PC1 zu übertragen. Dies ermöglicht eine ständig aktualisierte Skalierung des Verstärkerausgangs. PC2 ist mit der Software Fetchex 6.0.3 und der dazugehörigen AD/DA-Wandlerkarte DMA TL1 ausgestattet, um eine kontinuierliche digitale Aufzeichnung des Versuchsverlaufs zu ermöglichen. Der Flachbettschreiber dient dem gleichen Zweck, hier können jedoch während des Versuchs Notizen direkt an der Signalspur angebracht werden. Das Oszilloskop wird zur Darstellung des Signals während der Kapazitätskompensation benutzt. Die Auswertung der digitalisierten Daten von PC1 und PC2 erfolgt mit der Software Clampfit 8.0.3, die auch eine nachträgliche Filterung der Daten ermöglicht. Die graphische Darstellung und das Fitten der Ergebnisse erfolgt mit dem Programm Origin 5.0.

Die Messungen werden bei Raumtemperatur und an ≥ 3 Makropatches (Anzahl der Makropatche = N) an Oozyten von ≥ 3 verschiedenen Spenderfröschen durchgeführt. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts (SEM).

Ein negativer Strom entspricht gemäß der üblichen Stromkonvention einem Fluss von positiven Ionen von der Außen- zur Innenseite der Membran.

2.3 Versuchsvorbereitungen

Im folgenden Kapitel werden die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, die Herstellung der Patchpipetten und die Gewinnung und Vorbereitung der Oozyten für die Experimente beschrieben.

2.3.1 Lösungen

Die Lösungen werden mit Wasser aus einer Seralpur Reinstwasseranlage mit einer spezifischen Leitfähigkeit von weniger als 0,06 μS hergestellt. Die Lösungen werden anschließend mit einem 0,22 μm -Filter sterilfiltriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Verwendete Lösungen

Alle Konzentrationsangaben sind in mM, soweit nichts anderes vermerkt ist. Der pH-Wert wird bei allen Lösungen auf pH 7,4 mit TRIS eingestellt, wenn nicht anders beschrieben. Die Osmolarität wird bei einer Änderung der αMDG -Konzentration durch Mannitol, einem nichttransportierten Zucker, angeglichen, bei einer Änderung der Na^+ -Konzentration durch NMG.

ORI (Oozyten-Ringer-Lösung):

110 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7,4 mit NaOH

Shrink-Lösung:

200 Mannitol, 110 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7,4 mit NaOH

Seal-Lösung:

100 NMG, 84 Aspartat, 20 TEA-Cl, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7,4 mit NaOH

αMDG variabel mit 110 mM Na^+ :

Bad: 110 NaCl, 20 TEA-Cl, 2 MgCl₂, 2 EGTA, 5 HEPES, 100 (αMDG +Mannitol)

Pipette: 105 NMG-Cl, 5 NaCl, 5 MgCl₂, 5 HEPES

αMDG variabel mit 50 mM Na^+ :

Bad: 50 NaCl, 60 NMG-Cl, 20 TEA-Cl, 2 MgCl₂, 2 EGTA, 5 HEPES, 100 (αMDG +Mannitol)

Pipette: 105 NMG-Cl, 5 NaCl, 5 MgCl₂, 5 HEPES

αMDG variabel mit 10 mM Na^+ im Bad /0 mM Na^+ in der Pipette:

Bad: 10 NaCl, 100 NMG-Cl, 20 TEA-Cl, 1 MgCl₂, 2 EGTA, 5 HEPES, 100 (αMDG +Mannitol)

Pipette: 110 NMG-Cl, 2 MgCl₂, 5 HEPES

αMDG variabel mit 10 mM Na^+ im Bad /10 mM Na^+ in der Pipette:

Bad: 10 NaCl, 100 NMG-Cl, 20 TEA-Cl, 1 MgCl₂, 2 EGTA, 5 HEPES, 100 (αMDG +Mannitol)

Pipette: 10 NaCl, 100 NMG-Cl, 2 MgCl₂, 5 HEPES

αMDG variabel mit 400 mM Na^+ :

Bad: 400 NaCl, 10 TEA-Cl, 2 MgCl₂, 2 EGTA, 5 HEPES, 100 (αMDG +Mannitol)

Pipette: 400 NMG-Asp, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 100 Mannitol

Na^+ variabel bei 250 mM αMDG :

Bad: 200 (NaCl+NMG-Cl), 250 αMDG oder Mannitol, 10 TEA-Cl, 1 MgCl₂, 2 EGTA, 5 HEPES

Pipette: 206 NMG-Cl, 2 NaCl, 250 Mannitol, 2 MgCl₂, 10 HEPES

Na^+ variabel bei 25 mM αMDG :

Bad: 200 (NaCl+NMG-Cl), 25 α MDG oder Mannitol, 10 TEA-Cl, 1 MgCl₂, 2 EGTA, 5 HEPES

Pipette: 206 NMG-Cl, 2 NaCl, 25 Mannitol, 2 MgCl₂, 10 HEPES

Na⁺ variabel bei 100 mM α MDG:

Bad: 110 (NaCl+NMG-Cl) oder 130 NaCl, 100 α MDG oder Mannitol, 20 TEA-Cl, 2 MgCl₂, 2EGTA, 10 HEPES

Pipette: 110 NMG-Cl, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 5 HEPES

Phlorizin-Abhängigkeit:

Bad: 110 NaCl, 10 α MDG oder Mannitol, 20 TEA-Cl, 2 MgCl₂, 2EGTA, 10 HEPES, 0-2 Phlorizin

Pipette: 110 NMG-Cl, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 5 HEPES

Wirkung von n-Hexyl- β -D-Glucopyranosid und Octyl- β -D-Glucopyranosid:

Bad: 200 NaCl, 200 Mannitol oder 40 α MDG+160 Mannitol, 0, 2 oder 10 mM n-Hexyl- β -D-Glucopyranosid oder Octyl- β -D-Glucopyranosid, 10 TEA-Cl, 1 MgCl₂, 2 EGTA, 5 HEPES

Pipette: 206 NMG-Cl, 200 Mannitol, 1 MgCl₂, 10 HEPES

Osmolarität:

Bad: 110 NaCl, 100 oder 300 α MDG+Mannitol, 20 TEA-Cl, 1 MgCl₂, 2 EGTA, 5 HEPES

Pipette: 110 NMG-Cl, 100 Mannitol, 2 MgCl₂, 5 HEPES

Vergleichgewichtsströme im Auswärtstransport:

Bad: 200 NaCl, 100 Mannitol oder α MDG, 10 TEA-Cl, 2 EGTA, 2 MgCl₂, 5 HEPES

Pipette: 200 NMG-Cl, 1 NaCl, 100 Mannitol, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 5 HEPES

Vergleichgewichtsströme im Einwärtstransport:

Bad: 110 NMG-Cl, 2 NaCl, 4 MgCl₂, 2 EGTA, 5 HEPES

Pipette: 110 NaCl, 0 oder 2 α MDG, 2 MgCl₂, 10 HEPES

Badlösung zur Expressionsüberprüfung: 200 NaCl, 100 Mannitol oder 100 α MDG, 10 TEA-Cl, 2 MgCl₂, 2 EGTA, 5 HEPES

2.3.2 Biopsie und Präparation der Oozyten

Die Biopsie der Oozyten ist in (Weinreich, 1999) ausführlich beschrieben und wird hier nur kurz erklärt. Die Narkose wird durch das Baden des Frosches in einer 2 % wässrigen Tricainlösung erreicht. Bei ausreichender Narkosetiefe wird der Frosch auf zerstoßenem Eis gelagert. Der Bauch wird durch einen ca. 1 cm langen Schitt oberhalb des Beinansatzes seitlich der Medianlinie geöffnet und das darunterliegende Muskelgewebe durchtrennt. Das direkt unterhalb des Muskels liegende Ovargewebe wird mit einer stumpfen Pinzette herausgezogen und abgetrennt. Nach der Entfernung einer ausreichenden Menge Ovargewebe wird die Wunde mit 2 Stichen durch Haut und Muskel genäht. Der Frosch wird während der etwa einstündigen Aufwachphase zwischen feuchte Tücher gelegt. Er wird für 3 Tage in einem Quarantänebecken gehalten, um

eventuell auftretende Komplikationen wie Entzündungen der Wunde beobachten zu können. Danach kann er in das normale Becken zurückgesetzt werden.

Um die Oozyten zu vereinzeln, wird das Ovargewebe mit spitzen Pinzetten etwas auseinandergerissen und für ca. 3 Stunden in 10 ml calciumfreie ORI + 2 mg/ml Collagenase Worthington Typ 2 auf einem Schüttler eingelegt. Die Collagenase sorgt für einen enzymatischen Abverdau des umliegenden Follikelgewebes, in das die einzelnen Oozyten im Ovargewebe eingebettet sind. Unter dem Binokular werden für die Injektion der cRNA geeignete Oozyten ausgesucht. Diese sollten Oozyten des Reifestadiums V sein, mit einer gleichmässigen Färbung und mit deutlicher Abgrenzung des animalen, pigmentierten Pols vom vegetativen Pol der Oozyte.

2.3.3 Mikroinjektion von RNA in die Oozyten

Die cDNA zur Expression des SGLT1 in Oozyten wurde uns freundlicherweise von Prof. Koepsell, Würzburg, zur Verfügung gestellt. In unserem Labor erfolgt die Herstellung der cRNA.

Die cRNA wird mit einer Oozyteninjektionspumpe in die Oozyten injiziert. Die Injektionspipetten werden aus den zugehörigen Glaskapillaren auf einen kleinen Spitzendurchmesser mit sehr langer Spitze ausgezogen. Durch die geringe Zunahme des Steigungswinkels wird die Schädigung der Membran beim Einstechen in die Oozyten möglichst gering gehalten. Die Spitzen der Pipetten werden unter dem Mikroskop auf einen Durchmesser von 16-20 μm abgeschnitten. Dabei soll eine angeschrägte Spitze entstehen, die das Einstechen in die Oozyte erleichtert. Nach dem Einsetzen der Pipette in die Pumpe wird ein Tropfen mit 0,8 μl RNA in die Pipette aufgezogen. In einen Teil der Oozyten wird 9,2 ng RNA, in den anderen Teil die doppelte Menge, 18,4 ng RNA, injiziert. Die Konzentration der RNA beträgt 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die injizierten Oozyten werden in ORI, dem 9,5 mg/l Penicillin und 10 mg/l Streptomycin zugesetzt wird, bei 16-18°C inkubiert. Doppelt injizierte Oozyten werden am 2. und 3. Expressionstag für die elektrophysiologischen Messungen benutzt, einfach injizierte am 3. bis 5. Expressionstag. Als Kontrolloozyten werden nichtinjizierte Oozyten verwendet, die in der gleichen Weise inkubiert werden.

Die zwei verschiedenen Injektionsmengen und Inkubationszeiten werden eingesetzt, um die mögliche Experimentierzeit zu verlängern. Außerdem kann dadurch das Problem aufgefangen werden, dass SGLT1 zeitweise zu stark exprimiert wird. Eine zu starke Expression kann optisch festgestellt werden, denn die Membran erscheint wegen der großen Anzahl Proteine, die in die Membran eingelagert sind, unter dem Mikroskop rauh.

Diese Oozyten können zwar noch im Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp gemessen und damit die hohe Aktivität des Transporters nachgewiesen werden, die Ausbildung eines Gigaseals für Patch-Clamp-Messungen ist jedoch nicht mehr möglich. Somit kann bei sehr hoher Expression auf die mit geringer RNA-Menge injizierten Oozyten ausgewichen werden. Bei niedriger Expression dagegen werden die mit höherer RNA-Menge injizierten Oozyten verwendet.

2.3.4 Herstellung der Patch-Pipetten

Die Patch-Pipetten werden kurz vor dem Experiment zuerst mit einem Puller gezogen, dann auf den gewünschten Durchmesser abgebrochen und anschließend feuerpoliert.

Zur Herstellung der Patch-Pipetten wird das Borosilikatglas N-51A verwendet (AD = 2,13 mm, ID = 1,63 mm, Länge = 76,2 mm). Die Kapillare wird mit einem Pipettenziehgerät in zwei Stufen auf einen Durchmesser von ca. 10 μm ausgezogen. Danach erfolgt das Abbrechen der Pipettenspitze auf der Mikroschmiede auf einen Durchmesser von 20-30 μm (Rettinger, 1994; Hilgemann, 1995). Die Mikroschmiede besteht aus einem Heizdraht aus Platin, auf den ein Tropfen Blei-Borat-Glas (Lotglas) aufgebracht ist, das bereits bei einer Temperatur von 500° C flüssig wird. Im ersten Schritt wird das Lotglas bis zur Verflüssigung erhitzt. Die Pipette wird in den flüssigen Glastropfen bewegt. Das flüssige Glas wird durch die Kapillarkräfte in die Pipette gesaugt und steigt in der Pipette auf. Wenn der gewünschte Durchmesser erreicht ist, wird die Hitze weggenommen und der Tropfen zieht sich zusammen. Dadurch bricht die Pipette am Meniskus des aufgestiegenen Glases ab. Die Bruchstelle wird anschließend am erhitzten Glastropfen feuerpoliert.

2.4 Versuchsdurchführung

2.4.1 Ausbildung des Gigaseals

Voraussetzung für eine korrekte Messung des Stroms über die Zellmembran, der durch den aktivierten Transporter hervorgerufen wird, ist ein hoher Abdichtwiderstand zwischen Glas und Zellmembran im Bereich von 1-100 $\text{G}\Omega$, das sogenannte *Gigaseal*.

Der genaue Mechanismus der Sealbildung ist noch nicht bekannt. Widerstandsberechnungen ergeben, dass ein Gigaseal von 10 $\text{G}\Omega$ nur erreicht werden kann, wenn der Abstand zwischen Lipid und Glas im gesamten Kontaktbereich nur einige Angström beträgt (Hamill et al., 1981), was im Bereich der chemischen Bindungen liegt.

Hierfür verantwortlich können die Ausbildung von Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, oder Van-der-Waals-Kräfte zwischen Lipid und Glas sein (Corey und Stevens, 1983).

Das experimentelle Vorgehen zur Ausbildung des *Gigaseals* nennt man *Sealen* und soll im Folgenden kurz beschrieben werden. Kurz vor der Messung muss die durchsichtige Vitellinschicht, das Exoskelett der Oozyte, entfernt werden, um die Pipette direkt mit der Membran in Berührung bringen zu können. Dazu wird die Oozyte in ein Petrischälchen mit hyperosmolarer „Shrink-Lösung“ gegeben. Die hohe extrazelluläre Osmolarität bewirkt ein Schrumpfen der Oozyte, wohingegen die starre Vitellinschicht ihre ursprüngliche Grösse beibehält und sich von der Membran ablöst. Nach ca. 1-5 min wird die Vitellinschicht mit 2 spitz zugeschliffenen Uhrmacherpinzetten abgelöst. Die Oozyte wird in das mit der Seallösung gefüllte Mess-Schälchen umgesetzt. Die Pipettenspitze wird kurz in hydrophobes Vitamin E-acetat getaucht, da dieses die Ausbildung eines *Gigaseals* fördern soll (Hilgemann, 1995). Die Pipette wird mit Pipettenlösung befüllt und in den Pipettenhalter eingespannt. Beim Annähern der Pipette an die Oozyte liegt ein leichter Überdruck an. Dadurch strömt Lösung aus und verhindert die Verschmutzung der Pipettenöffnung. Die Potentialdifferenz zwischen Bad und Pipette wird auf 0 mV abgeglichen. Zur Messung des Pipettenwiderstands besitzt Clampex die „*Sealtest*“-Funktion, die repetitive, rechteckige Spannungspulse appliziert und aus der Stromantwort den Widerstand berechnet. Dieser liegt, abhängig von der Lösungszusammensetzung und der Grösse der Pipettenöffnung, im Bereich von 150-500 k Ω . Die Pipette wird an die Oozytenmembran herangefahren und der Überdruck weggenommen. Dies führt zu einer Erhöhung des Sealwiderstandes. Die Applikation von Unterdruck (ca. 0,5 bis 3 cm Wassersäule) führt meist in ca. 2-10 min zur Ausbildung des *Gigaseals* von 1-10 G Ω . Die Pipette wird langsam zurückgezogen, wodurch der Patch ausreißt. Die Pipette wird in die Glaskapillare des Perfusionssystems positioniert und das Experiment kann gestartet werden.

2.4.2 Verlauf eines Versuchs

Elektrophysiologische Untersuchungen beinhalten auch immer die Messung der passiven elektrischen Eigenschaften der Membran und müssen bei der Versuchsplanung berücksichtigt werden, um systematische Fehler auszuschliessen. Die Zellmembran besteht aus einer Doppelschicht nichtleitfähigen Phospholipiden, in die integrale Membranproteine wie Ionenkanäle und Transporter eingelagert sind. Hauptsächlich durch die Ionenkanäle ergibt sich eine elektrische Leitfähigkeit der Zellmembran. Diese beiden Eigenschaften, das Kondensatorverhalten der Phospholipidmembran bei einem

anliegenden Membranpotential, und den Widerstand der Ionenkanäle, kann man durch ein elektrisches Schaltbild beschreiben. Hierbei stellt die Zellmembran eine Parallelschaltung von einem Kondensator und einem Widerstand dar, ein sogenanntes RC-Glied. Das Membranpotential entspricht dabei einer Batterie, die seriell zum RC-Glied geschaltet ist. Eine Oozyte besitzt typischerweise eine Kapazität von 250 nF, bedingt durch die grosse Membranoberfläche, und einen Widerstand von ca. 1-3 M Ω . Das Membranpotential variiert zwischen -30 und -70 mV, wobei grosse Schwankungen zwischen den Oozyten verschiedener Frösche auftreten. Innerhalb einer Oozytencharge ist das Membranpotential meist sehr ähnlich. Eine Änderung des Membranpotentials führt z. B. zuerst zu einer Umladung der Membran und dann zu einer Änderung des Gleichgewichtsstroms.

Die elektrischen Eigenschaften verursachen membranspezifische Ströme, die abhängig sind von den jeweiligen Messbedingungen wie Ionenkonzentrationen und Membranpotential. Um nur den Anteil des zuckerinduzierten Stroms durch SGLT1 zu bestimmen, werden die Messungen als Differenzmessung zwischen nichtaktiviertem und aktiviertem Transporter durchgeführt. Die Aktivierung erfolgt durch die Applikation von α MDG.

Die Messungen beinhalten je nach Fragestellung meist 3 Lösungswechsel-Experimente, wobei während des 2. Lösungswechsel-Experiments die Spannungssprung-Experimente durchgeführt werden.

2.4.2.1 Das Lösungswechsel-Experiment

Bei einem Lösungswechsel-Experiment erfolgt die Differenz-Strommessung zwischen der Referenzlösung ohne Substrat und der Testlösung mit Substrat. Die Änderung der Stromamplitude stellt den zuckerinduzierten Strom dar. Die repetitive Messung der Referenzlösung verhindert, dass bei einer etwaigen Drift der Basislinie zusätzlich zum zuckerinduzierten Strom der Driftanteil ausgemessen wird.

In den Experimenten, die die Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit untersuchen, zeigt sich eine Verringerung der Stromamplitude alleine durch die Änderung der intrazellulären Na⁺-Konzentration. Dies lässt sich auf die in der Oozytenmembran enthaltenen Na⁺-Kanäle zurückführen, da deren Permeabilität eine Funktion der intra- und extrazellulären Na⁺-Konzentration ist (Dascal et al., 1984; Umbach et al., 1990). Bei einer gleichzeitigen Änderung der Na⁺- und der α MDG-Konzentration erfolgt somit gleichzeitig eine Änderung der Stromamplitude durch den Strom durch die Na⁺-Kanäle und durch die Aktivierung von SGLT1. Um nur den Anteil des zuckerinduzierten Stroms zu

bestimmen, erfolgt zuerst ein Wechsel zur neuen Na^+ -Konzentration und erst dann zur αMDG -haltigen Lösung mit gleicher Na^+ -Konzentration.

Aus den Lösungswechsel-Experimenten lässt sich die apparente Affinität von SGLT1 für das Substrat und Cosubstrat ermitteln. Die Affinität αMDG wird durch den $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ -Wert beschrieben, der Konzentration, bei der 50% des Sättigungsstroms, I_{Max} , erreicht werden. Zur Ermittlung des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ werden die zuckerinduzierten Ströme in Abhängigkeit von der αMDG -Konzentration $I(\alpha\text{MDG})$ mit der Michaelis-Menten-Gleichung angefitet:

$$I(\alpha\text{MDG}) = I_{\text{Max}} \cdot \frac{[\alpha\text{MDG}]}{K_M^{\alpha\text{MDG}} + [\alpha\text{MDG}]} \quad \text{Gleichung [1]}$$

mit I_{Max} = Sättigungsstrom bei der jeweiligen Na^+ -Konzentration;
 $[\alpha\text{MDG}]$ = αMDG -Konzentration

Zur Ermittlung der halbmaximalen Sättigungskonzentration für Na^+ , K_M^{Na} , werden die zuckerinduzierten Ströme in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration $I(\text{Na})$ mit der Hill-Gleichung angefitet:

$$I(\text{Na}) = I_{\text{Max}} \cdot \frac{[\text{Na}]^n}{(K_M^{\text{Na}})^n + [\text{Na}]^n} \quad \text{Gleichung [2]}$$

mit I_{Max} = Sättigungsstrom bei der jeweiligen αMDG -Konzentration, $[\text{Na}]$ = Na^+ -Konzentration, n = Hill-Koeffizient.

Es muss deutlich unterschieden werden zwischen den hier bestimmten apparenten K_M -Werten und den Bindungskonstanten für Substrat und Cosubstrat. Die Bindungskonstante beschreibt den isolierten Bindungsvorgang, wohingegen die K_M -Werte den gesamten Transportzyklus erfassen. Somit zeigen sich Änderungen in der Konzentration des Cosubstrats auch in einer Änderung des apparenten K_M -Werts (Turner, 1981). Ist die Bindung an sich der langsamste Schritt, bedeutet dies, dass man sehr wahrscheinlich beim Messen des K_M die Bindungskonstante bestimmt. Ist jedoch ein nachfolgender Schritt geschwindigkeitsbestimmend und der Bindung gegenüber sehr langsam, so zeigt sich dies in einer Erhöhung des apparenten K_M .

2.4.2.2 Das Spannungssprung-Experiment

Bei einem Spannungssprung-Experiment werden nacheinander, ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV, rechteckige Spannungssprünge auf ein anderes Haltepotential und wieder zurück ausgeführt. Der Verlauf des Haltepotentials wird durch ein Protokoll vorgegeben, das bei den jeweiligen Experimenten beschrieben wird. Die Serie von Spannungssprüngen erfolgt zuerst in der Referenzlösung, dann in der Testlösung und danach wieder in der Referenzlösung. Der Vergleich der zwei Referenzmessungen gestattet eine fortwährende Kontrolle des Abdichtwiderstands. Die Referenzmessung ohne aktivierten Transporter zeigt das elektrische Verhalten der Oozytenmembran bei einer Spannungsänderung, wohingegen bei einer Messung mit Substrat die Summe aus membranabhängigem Strom und Transporter-Strom gemessen wird. Der Differenzstrom ergibt den zuckerinduzierten Strom. Ausgewertet wird dabei der stationäre Strom, der sich nach dem Abklingen der kapazitiven Transienten einstellt. Bei ca. 10 % der Messungen können die Spannungssprünge auf positive Haltepotentiale nicht ausgewertet werden, da zusätzliche Stöme durch einen Na⁺-Kanal auftreten, der durch eine längere Depolarisation über +20 mV langsam aktiviert wird und auch sehr langsam deaktiviert (Kado und Baud, 1981; Baud et al., 1982).

2.4.2.3 Schnelle Spannungssprung-Experimente zur Bestimmung der Vergleichgewichtsströme

Da die transienten Ströme der Vergleichgewichtsströme nach einem Spannungssprung sehr schnell (im sub-ms-Bereich) abklingen, erfolgt die Aufnahme der Datenpunkte mit einer Abtastrate von 200 kHz und 50 kHz Filterfrequenz. Die Transienten werden durch 2

Exponentialfunktionen der Form $I(t) = I_1 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_1}} + I_2 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_2}} + C$ mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus des Programms Clampfit 8.1 angefitet.

Für die Untersuchung der Vergleichgewichtsströme im Auswärtstransport erfolgen die Spannungssprünge in einer α MDG-haltigen und in einer Mannitol-haltigen Badlösung bei hoher Na⁺-Konzentration. Der Wechsel zur aktivierenden Badlösung dient gleichzeitig auch als Überprüfung der Expression. Das Protokoll der Spannungssprünge wird bei der jeweiligen Messung erläutert.

Der Einwärtstransport des SGLT1 kann auch an einem Patch in der inside-out-Konfiguration induziert werden, wenn die Pipettenlösung das Substrat Zucker zusammen mit einer hohen Na⁺-Konzentration enthält. Zur Untersuchung der transienten Ströme des

Einwärtstransports ist es deshalb notwendig, die Messungen mit Substrat in der Pipettenlösung an einem Patch und ohne Substrat an einem zweiten Patch derselben Oozyte durchzuführen. Dadurch kann kein Differenzstrom gebildet werden, was die direkte Vergleichbarkeit der Messungen erschwert. Allerdings kann das Ermitteln der Zeitkonstanten der transienten Ströme Aufschluss darüber geben, ob am Patch überhaupt Vergleichgewichtsströme durch SGLT1 mit Zeitkonstanten im Bereich von ms nachgewiesen werden können, wie sie in Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Experimenten gefunden wurden.

Die Expressionsüberprüfung erfolgt über den Strom des Auswärtstransports. Gegenüber den Messbedingungen vorher wird durch die Badlösung zur Expressionsüberprüfung, die nun eine höhere Na^+ -Konzentration als die Pipettenlösung enthält, der Na^+ -Gradient umgekehrt. Enthält die Pipettenlösung αMDG , wird der Einwärtstrom inhibiert. Die Applikation von αMDG in der Badlösung führt zu einem Auswärtstrom. Da jedoch auch die Pipettenlösung αMDG und Na^+ enthält, kann der Transporter im sogenannten *Homo-Exchange-Modus* nach der Abgabe der Substrate auf der Membranaussenseite wiederum 2 Na^+ und ein Zuckermolekül binden und zur Membraninnenseite translokieren. Dieser Austausch ist elektroneutral und vermindert den Auswärtstrom, so dass keine quantitativen Aussagen über die Expressionshöhe gemacht werden können, aber durch das Auftreten eines Auswärtstrom nachgeprüft werden kann, ob überhaupt Expression vorhanden ist.

2.4.2.4 Bestimmung der Kapazitäten

Zur Bestimmung der Pipettenkapazität wird die offene Pipette mit einem Pfropfen aus einer Lipidlösung (1,5% Phosphatidylcholin in Decan) verschlossen (Hilgemann, 1995). Der Pfropfen besitzt gegenüber einem Makropatch durch seine deutlich höhere Dicke eine geringere Kapazität, die gegenüber der Pipettenkapazität vernachlässigbar ist. Die Lipidlösung wird in das mit Seallösung gefüllte Mess-Schälchen auf einem Deckglas eingebracht. Die offene Pipette wird in den Lipidtropfen bewegt, und es bildet sich zumeist instantan ein Abdichtwiderstand in der Größenordnung von einigen $\text{G}\Omega$ aus. Die Messungen werden mit und ohne Kompensation der Pipettenkapazität durchgeführt. Es werden Spannungssprünge von einem Haltepotential von 0 mV auf -100 mV bis $+60$ mV bzw. $+100$ mV in 20 mV-Schritten ausgeführt. Die verschobene Ladung Q wird aus dem Integral des transienten Stroms I zwischen Beginn und Ende des Spannungssprungs ermittelt, da $I = \frac{dQ}{dt} \Leftrightarrow Q = \int I \cdot dt$. Aus dem linearen Anstieg der verschobenen

Ladung Q gegen die Differenz im Haltepotential ΔU kann die Kapazität C gemäß

$C = \frac{Q}{\Delta U}$ durch lineare Regression aus dem Steigungsfaktor ermittelt werden. Zur

Bestimmung der Gesamtkapazität von Patch und Pipette Kapazität(Patch+Pip) werden die Spannungssprünge zuerst am intakten Patch durchgeführt. Nach der Zerstörung des Patches erfolgen die Spannungssprünge an der mit einem Lipidpfropf verschlossenen Pipette. Die Kapazität eines Patches berechnet sich aus der Differenz.

3 Ergebnisse

Zur Untersuchung seiner intrazellulären Eigenschaften wird SGLT1 in *Xenopus*-Oozyten heterolog exprimiert. An Makropatchen in der inside-out-Konfiguration erfolgt mit der Patch-Clamp-Technik zuerst die Bestimmung der reinen Konzentrationsabhängigkeit der Affinitäten für α MDG und Na^+ ohne Potentialgradienten bei $\text{HP} = 0 \text{ mV}$. Dazu werden verschiedene Konzentrationen des einen Substrats bei festen Konzentrationen des jeweiligen anderen Substrats appliziert. Die Konzentrationen des anderen Substrats werden dabei so ausgewählt, dass sie den sättigenden Bereich, den Bereich des K_M und den nicht-sättigenden Bereich abdecken. Man erhält so Informationen über die apparenten Affinitäten von SGLT1 unter den jeweiligen Messbedingungen und kann die gegenseitigen Einflüsse der Substrate auf den Transportprozess untersuchen, z. B. die Bindungsreihenfolge der Substrate bestimmen.

Die zweite Fragestellung untersucht die Spannungsabhängigkeit des Auswärtstransports. Dazu werden Spannungssprünge unter den gleichen Konzentrationsbedingungen wie oben durchgeführt. Aus den Strom-Spannungs-Kennlinien werden die Affinitäten bei dem jeweiligen Haltepotential bestimmt.

Die Anzahl der exprimierten Transporter pro Oozyte ist ausreichend, um an einem Patch typischerweise Ströme im Bereich von 20-40 pA messen zu können. Dies entspricht ungefähr $2,5 - 5 \cdot 10^6$ Transportern pro Patch bei einer Wechselzahl von 25 s^{-1} .

3.1 Verlauf eines Experiments

Abb. 8 A zeigt den Verlauf eines typischen Experiments, das aus 3 Lösungswechsel-Experimenten besteht, wobei beim 2. Lösungswechsel-Experiment zusätzlich Spannungssprünge durchgeführt werden. Die Stromspuren werden kontinuierlich mit einer Abtastrate von 488 Hz und einer Filterfrequenz von 1 kHz aufgezeichnet und zur Auswertung mit 20 Hz nachgefiltert. Die Referenzlösung ohne α MDG wird jeweils zwischen den Testlösungen mit unterschiedlichen α MDG-Konzentrationen im Bereich von 5 - 100 mM α MDG appliziert. Die Applikation von 100 mM α MDG (Lösung 1) während des 1. Lösungswechsels führt zu einem positiven Strom von 21 pA. Die Stromrichtung ergibt sich aus dem Transport der 2 positiv geladenen Na^+ -Ionen von der intrazellulären zur extrazellulären Membranseite. Der Strom kehrt bei der Wegnahme der α MDG-haltigen Lösung zum Ausgangswert zurück. Die restlichen Lösungen werden anschließend protokollgesteuert mit einer Applikationsdauer von 8,5 s appliziert, wobei dazwischen immer wieder zur Referenzlösung ohne α MDG geschaltet wird.

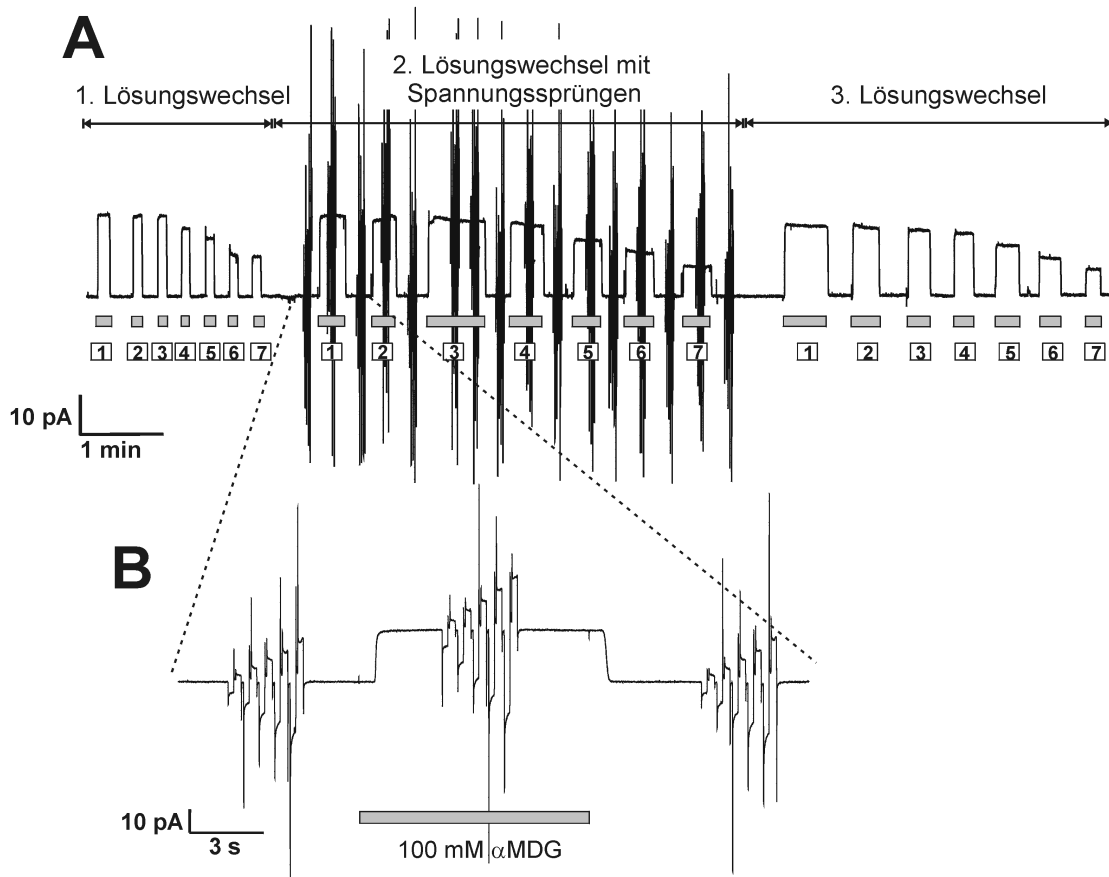


Abbildung 8: A) Originalaufzeichnung eines typischen Experiments mit 3 Lösungswechsel-Experimenten bei $HP = 0$ mV, wobei im 2. Lösungswechsel-Experiment zusätzlich Spannungssprung-Experimente durchgeführt werden. Die Badlösung enthält konstant 110 mM Na^+ , die α MDG-Konzentration von 0 - 100 mM α MDG wird in absteigender Konzentration gewechselt. Die Applikation der α MDG-haltigen Lösung wird durch die grauen Balken dargestellt. Die Lösungen werden der Übersichtlichkeit halber mit Nummern bezeichnet, wobei Lsg 1 = 100; Lsg 2 = 80; Lsg 3 = 60; Lsg 4 = 40; Lsg 5 = 20; Lsg 6 = 10 und Lsg 7 = 5 mM α MDG entsprechen. B) Vergrößerte Ansicht der Stromspuren bei Spannungssprüngen in der Referenzlösung vor und nach den Spannungssprüngen in der Badlösung mit 100 mM α MDG, aus denen dann die Strom-Spannungs-Kennlinien bestimmt werden.

Der 2. Lösungswechsel erfolgt analog, wobei zusätzlich Spannungssprünge protokollgesteuert durchgeführt werden. Die Stromantwort auf die Spannungssprünge bei der Applikation von 100 mM α MDG und der Referenzlösung ohne α MDG sind vergrößert in Abb. 8 B dargestellt (die Stromantwort auf einen Spannungssprung wird in Kap. 3.3.1 ausführlicher beschrieben). In dieser Messung wird das Haltepotential in 5 Durchgängen von 0 mV auf -100 mV bis +50 mV geändert. Dabei erfolgt zuerst ein Sprung zum negativen Potential mit 20 mV Schrittweite und 450 ms Dauer, gefolgt von einer Rückkehr zu 0 mV für 150 ms und anschließendem Sprung zum positiven Haltepotential mit 10 mV Schrittweite und 450 ms Dauer. Anschließend wird das

Haltepotential bis zum Ende des 1. Durchgangs auf 0 mV geklemmt, bevor der 2. Durchgang erfolgt. Diese Messungen werden für jede α MDG-Konzentration ausgeführt. Daran anschließend erfolgt ein 3. Lösungswechsel-Experiment analog dem ersten, da sich während der Dauer des Experiments zum Teil die Stromamplituden noch verändern (s. 3.1.1).

Die Lösungswechsel-Experimente werden zur Bestimmung der K_M -Werte für α MDG und Na^+ bei $HP = 0$ mV herangezogen, die Stromamplituden der Spannungssprünge werden zur Erstellung der Strom-Spannungskurven benutzt, mit deren Hilfe die Spannungsabhängigkeit des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bestimmt wird.

3.1.1 Veränderung des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ während der Messdauer

Die Messung in Abb. 8 A ist auch ein Beispiel für das vorher angesprochene Problem, dass sich innerhalb der Dauer des Experiments die Stromamplituden verändern, so dass sich bei der Auswertung unterschiedliche $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ -Werte ergeben.

Der 1. Lösungswechsel wird sofort nach dem Abziehen des Patches und dem Positionieren der Pipette innerhalb der Lösungszufuhr durchgeführt. Dieser Vorgang dauert etwa 30 s. Das komplette 1. Lösungswechsel-Experiment dauert etwa 3 min. Die Stromamplituden sind in Abb. 9 dargestellt. Daraus wird der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bestimmt, der für das 1. Lösungswechsel-Experiment $5,6 \pm 0,5$ mM beträgt. Das 2. Lösungswechsel-Experiment mit zusätzlich durchgeführten Spannungssprüngen dauert ca. 6 min, der daraus berechnete $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ beträgt $10,1 \pm 0,7$ mM und ist damit um ungefähr einen Faktor 2 höher als der des 1. Experiments. Das 3. Lösungswechsel-Experiment dauert ca. 5 min, der hier bestimmte $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ beträgt $10,9 \pm 0,6$ mM, stimmt also mit $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ des 2. Lösungswechsel-Experiments überein und ist damit auch um einen Faktor 2 höher als der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ aus Lösungswechsel 1. Die interessante Beobachtung, dass sich der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ während der Messdauer verändert, kann nicht durch die leichte Abnahme der Stromamplitude mit der Zeit, dem sogenannten „Rundown“ erklärt werden, die in dieser Messung zwischen dem 2. und 3. Lösungswechsel auftritt. Die Stromamplituden nehmen für jede applizierte α MDG-Konzentration um ca. 10 % ab zwischen dem 2. und dem 3. Lösungswechsel-Experiment. Im Falle eines „Rundowns“ verringern sich die Stromamplituden bei allen α MDG-Konzentrationen gleichmäßig durch die insgesamt Verringerung der Transporteraktivität, so dass der berechnete $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bei verringertem I_{Max} konstant bleibt. Auch eine Veränderung der Anzahl der Transporter ist auszuschließen, da in diesem Fall der apparente $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ gleichbleibt, aber eine

Änderung in I_{Max} sichtbar wäre. Die hier beobachtete Änderung des apparenten K_M bei konstantem I_{Max} hingegen bedeutet, dass sich nur die Stromamplituden einiger Konzentrationen ändern.

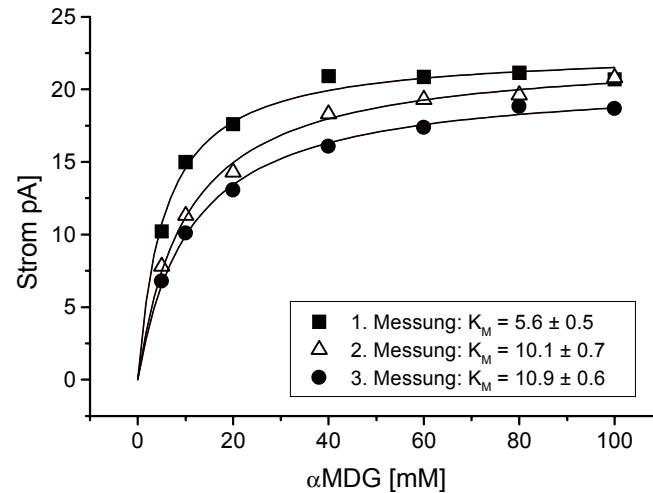


Abbildung 9: Beispiel für die Veränderung des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ während der Messdauer. Die Stromamplituden bei 3 aufeinanderfolgenden Messungen an einem Patch in Abhängigkeit von der αMDG -Konzentration ergeben unterschiedliche $K_M^{\alpha\text{MDG}}$: für die erste Messung $5,6 \pm 0,5$ mM ($I_{\text{Max}} = 22,7$ pA) und für die zweite und dritte Messung $10,1 \pm 0,7$ mM ($I_{\text{Max}} = 22,5$ pA) bzw. $10,9 \pm 0,6$ mM ($I_{\text{Max}} = 20,8$ pA), die annähernd zweimal grösser sind. Die Messungen werden bei 110 mM Na^+ und einem Haltepotential von 0 mV durchgeführt.

Die Veränderung des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ mit der Zeit könnte damit erklärt werden, dass die Aktivität des SGLT1 durch Substanzen im Cytoplasma reguliert wird. Der 1. Lösungswechsel erfolgt immer sofort nach dem Abziehen des Patches, so dass sich hier noch cytoplasmatische Substanzen am Patch befinden können, die dann durch das Perfundieren des Patches langsam herausgewaschen werden. Im 2. und 3. Lösungswechsel-Experiment scheint das Fehlen dieser Substanzen zu einem höheren $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ zu führen. Um alle Experimenten unter gleichen Versuchsbedingungen durchzuführen, wird der Patch nach dem Abziehen zuerst einige Minuten mit der Referenzlösung ohne αMDG perfundiert. Außerdem werden an jedem Patch immer mindestens 3 Messungen der αMDG -Abhängigkeit durchgeführt, um die Übereinstimmung der drei $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ -Werte zu überprüfen.

Um den Einfluss von potentiellen regulatorischen Substanzen zu testen, werden weitere Messungen mit ATP und Proteinkinase A (PKA) durchgeführt. Für die Messung mit ATP werden Lösungen mit 3 αMDG -Konzentrationen verwendet: 0 , 10 und 60 mM bei 110 mM Na^+ mit und ohne Zugabe von 2 mM ATP. Die Zugabe von ATP zeigt keinen Effekt auf die gemessenen Stromamplituden und somit auch nicht auf den $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ ($n=1$).

In der gleichen Weise wird die Wirkung der PKA untersucht. Dazu werden den Testlösungen 100 U/ml der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen PKA und 200 μ M ATP zugefügt. Auch hier erhält man bei 4 Wiederholungen jeweils die gleichen Stromamplituden wie in der Messung ohne PKA und ATP und somit zeigt sich keine Veränderung des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ ($n=2$).

3.2 Substrat-Abhängigkeit des SGLT1

Im Folgenden werden die Untersuchungen der intrazellulären Affinitäten des Na^+ -Glucose-Cotransporters SGLT1 für das Substrat αMDG und das Cosubstrat Na^+ bei $\text{HP} = 0$ mV ausführlich dargestellt. Dazu werden in Lösungswechsel-Experimenten die Stromänderungen nach Applikation verschiedener Konzentrationen des einen Substrates bei fester Konzentration des zweiten Substrates gemessen und daraus die Konzentration, bei der der Strom 50 % des Maximalstroms beträgt, der K_M -Wert, bestimmt.

3.2.1 Bestimmung der αMDG -Affinität bei verschiedenen Na^+ -Konzentrationen

Zur Bestimmung der intrazellulären Affinität für das Glucose-Analogon αMDG werden Lösungswechsel-Experimente mit sieben αMDG -Konzentrationen bei den festen Na^+ -Konzentrationen von 400 mM, 110 mM, 50 mM und 10 mM Na^+ in der Badlösung durchgeführt. 400 mM Na^+ entsprechen sättigenden Cosubstratbedingungen für alle getesteten αMDG -Konzentrationen, 110 mM und 50 mM Na^+ liegen im Bereich der Halbsättigungskonzentration, und 10 mM Na^+ sind nicht sättigend. Durch die Änderung des chemischen Potentials für Na^+ wird die treibende Kraft für den Glucose-Transport verändert.

Die Stromamplituden werden zur Vergleichbarkeit der Ströme bei verschiedenen Patchen auf den Strom bei 100 mM αMDG normiert, die gemessenen Mittelwerte dieses Stroms werden jeweils in der Bildunterschrift angegeben.

3.2.1.1 αMDG -Affinität bei 110 mM Na^+

Die folgenden Messungen werden mit der festen Na^+ -Konzentration von 110 mM in der Badlösung und 5 mM Na^+ in der Pipettenlösung durchgeführt. Abb. 10 A zeigt ein typisches Lösungswechsel-Experiment bei einem Haltepotential von 0 mV. Die Aufzeichnung erfolgt kontinuierlich mit einer Abtastrate von 488 Hz.

Ein Wechsel von der Referenzlösung ohne α MDG auf die erste Testlösung mit 100 mM α MDG führt zu einem schnellen Ansteigen des Stroms auf 18,7 pA. Sobald der Strom konstant verläuft, wird zur Referenzlösung umgeschaltet und α MDG ausgewaschen. Der zuckerinduzierte Strom fällt schnell wieder auf 0 pA ab, wodurch eine Drift auszuschließen ist. Bei einem Wechsel zu niedrigeren α MDG-Konzentrationen werden kleinere zuckerinduzierte Ströme beobachtet, es zeigt sich also eine Abhängigkeit des Stroms von der α MDG-Konzentration.

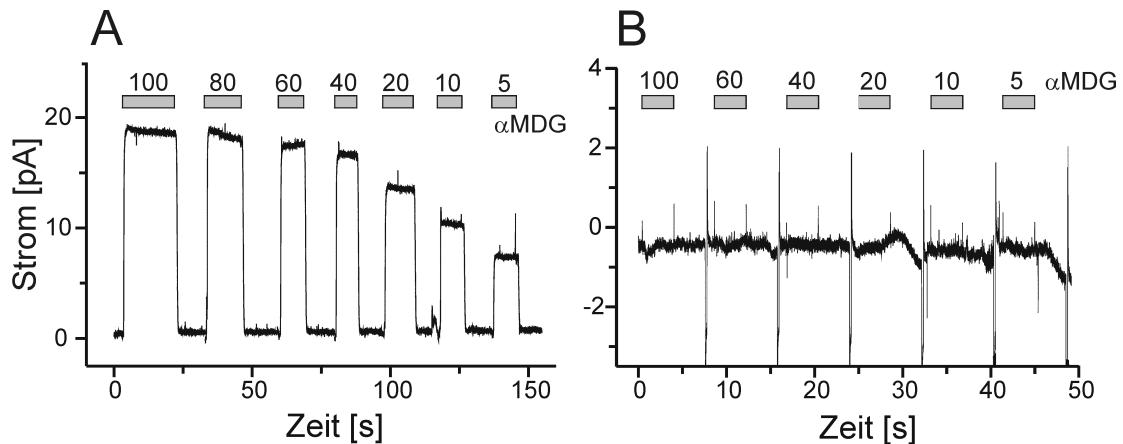


Abbildung 10: Original-Aufzeichnungen zur α MDG-Abhängigkeit der zuckerinduzierten Ströme in einer SGLT1-injizierten und einer Kontroll-Oozyte. Die Applikation der α MDG-haltigen Testlösungen wird durch die Balken dargestellt, die mit der jeweiligen Konzentrationsangabe (in mM) versehen sind. A) Die Applikation von Testlösungen mit verschiedenen α MDG-Konzentrationen führt bei einer SGLT1-injizierten Oozyte zu zuckerinduzierten, konzentrationsabhängigen Strömen. B) Bei einer Kontroll-Oozyte kommt es durch die Zugabe der α MDG-haltigen Lösungen zu keiner Stromänderung. Nach jeder α MDG-Applikation wird durch einen Spannungssprung auf +10 mV die Qualität des Abdichtwiderstands überprüft. In beiden Experimenten beträgt das Haltepotential 0 mV.

In einem Kontrollexperiment an einer nichtinjizierten Oozyte (Abb. 10 B) zeigt die Applikation der α MDG-haltigen Lösungen keine Stromänderung. Die Pipettenlösung enthielt hier 10 mM Na^+ . Dieses Experiment verläuft protokollgesteuert, wobei am Ende jedes Lösungswechsels ein Spannungspuls zur Kontrolle des Sealwiderstandes appliziert wird. In dem Signal ist dies an den kapazitiven Transienten und einer Stromänderung zu erkennen, aus der der Sealwiderstand berechnet werden kann. Die Abtastrate beträgt 1,35 kHz. Die kleineren Artefakte am Beginn und Ende jedes Lösungswechsels werden durch das Schalten der Ventile verursacht. Sie werden nur in manchen Experimenten beobachtet. Die gemessenen Ströme werden gemittelt und gegen die α MDG-Konzentration aufgetragen (Abb 11). Der Strom zeigt eine deutliche Zunahme mit ansteigender α MDG-Konzentration und sättigt bei hohen Konzentrationen.

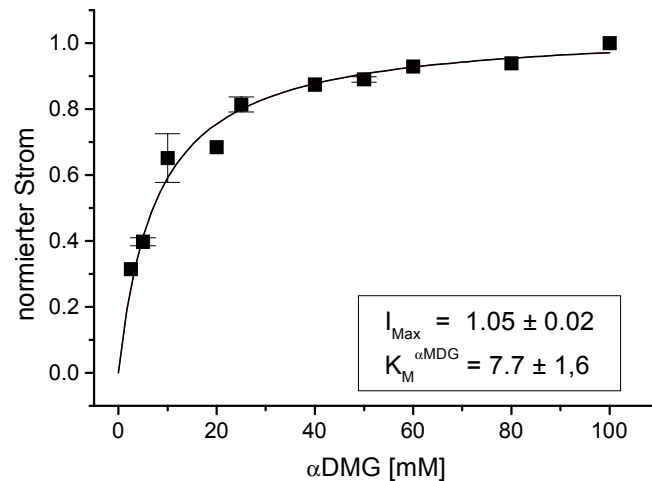


Abbildung 11: Gemittelte zuckerinduzierte Ströme als Funktion der α MDG-Konzentration bei 110 mM Na^+ (N = 3). Die Normierung erfolgt auf den Maximalstrom bei 100 mM α MDG, wobei der Mittelwert der Maximalströme $27,0 \pm 10,8$ pA beträgt. Die Abhängigkeit des Stromes von der α MDG-Konzentration wird durch die Michaelis-Menten-Gleichung angepasst. Der Fit wird als durchgehende Kurve dargestellt. Der $K_M^{\alpha MDG}$ beträgt $7,7 \pm 1,5$ mM α MDG bei einem berechneten I_{Max} von 1,05 a.u.. Das Haltepotential beträgt 0 mV.

Zur Bestimmung des $K_M^{\alpha MDG}$ -Wertes wird für jede Messung der Strom bei unterschiedlichen Zuckerkonzentrationen $I(\alpha MDG)$ mit der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung [1]) angepasst und danach gemittelt. Der $K_M^{\alpha MDG}$ -Wert wird an 3 Patches bestimmt. In Tab. 2 sind die Ergebnisse der Einzelmessungen und der daraus gebildete Mittelwert dargestellt. Der angepasste Sättigungsstrom $I_{Max} = 1,05$ zeigt, dass α MDG-Konzentrationen ≥ 100 mM α MDG eine Sättigung der Transporteraktivität herbeiführen.

	Patch 1	Patch 2	Patch 3	Mittelwert \pm SEM
$K_M^{\alpha MDG}$ [mM]	10,7	6,9	5,4	7,7 \pm 1,6

Tabelle 2: $K_M^{\alpha MDG}$ der Einzelmessungen und daraus berechneter Mittelwert bei 110 mM Na^+ (N=3)

3.2.1.2 α MDG-Affinität bei 50 mM Na^+

Die Lösungswechsel-Experimente zur Ermittlung der Zuckeraffinität des SGLT1 werden analog zu oben bei 50 mM Na^+ in der Badlösung und 5 mM Na^+ in der Pipettenlösung durchgeführt (Abb. 12).

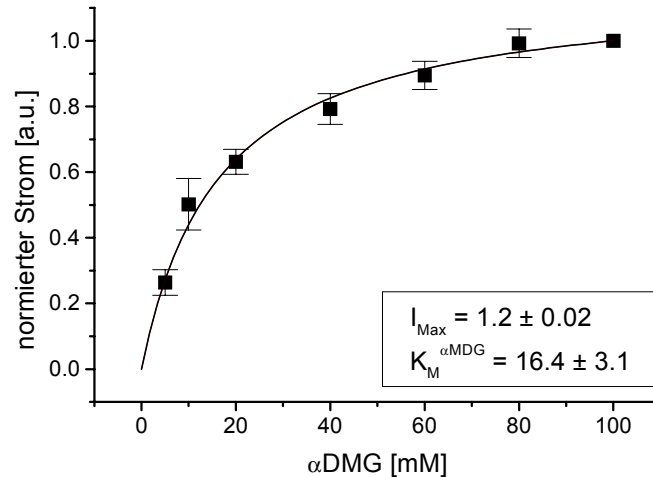


Abbildung 12: Gemittelte zuckerinduzierte Ströme als Funktion der α MDG-Konzentration bei 50 mM Na^+ (N=3). Die durchgezogene Kurve stellt einen Michaelis-Menten-Fit mit $K_M^{\alpha\text{MDG}} = 16,4$ mM und $I_{\text{Max}} = 1,2$ a.u. dar. Der Mittelwert der Ströme bei 100 mM α MDG, auf die normiert wird, beträgt $5,8 \pm 0,4$ pA. Das Haltepotential beträgt 0mV.

Die Ströme erreichen, verglichen mit 110 mM Na^+ , erst bei höheren α MDG-Konzentrationen 50 % des Sättigungsstroms. Damit verschiebt sich der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ auf $16,4 \pm 3,1$ mM (Tab. 3). Der angepasste $I_{\text{Max}} = 1,2$ a.u. wird im betrachteten Konzentrationsbereich nicht erreicht.

	Patch 1	Patch 2	Patch 3	Mittelwert \pm SEM
$K_M^{\alpha\text{MDG}}$ [mM]	20,7	18,3	10,3	16,4 \pm 3,1

Tabelle 3: $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ der Einzelmessungen und daraus berechneter Mittelwert bei 50 mM Na^+ (N=3)

3.2.1.3 α MDG-Affinität bei 10 mM Na^+ im Bad/ 0 mM Na^+ in Pipette

Eine weitere Reduktion der Na^+ -Konzentration resultiert in einer weiteren Erhöhung des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$. Die Experimente werden mit einer festen Na^+ -Konzentration von 10 mM Na^+ in der Badlösung und 0 mM Na^+ in der Pipette durchgeführt (Abb. 13). Der gemittelte $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ beträgt $30,4 \pm 4,2$ mM α MDG. Der angepasste $I_{\text{Max}} = 1,3$ a.u. wird im betrachteten Konzentrationsbereich nicht erreicht.

	Patch 1	Patch 2	Patch 3	Patch 4	Mittelwert \pm SEM
$K_M^{\alpha\text{MDG}}$ [mM]	42,7	26,2	28,1	24,6	30,4 \pm 4,2

Tabelle 4: $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ der Einzelmessungen und daraus berechneter Mittelwert bei 10 mM Na^+ (N=4)

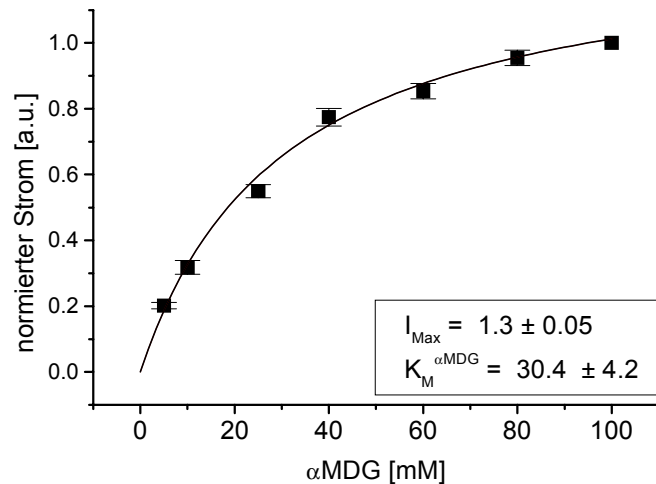


Abbildung 13: Gemittelte zuckerinduzierte Ströme als Funktion der α MDG-Konzentration bei 10 mM Na^+ im Bad/ 0 mM Na^+ in Pipette (N=4). Die durchgezogene Kurve zeigt den Michaelis-Menten-Fit mit $K_M^{\alpha\text{MDG}} = 30,4 \pm 4,2$ mM α MDG und $I_{\text{Max}} = 1,3 \pm 0,1$ a.u.. Der Mittelwert der Ströme bei 100 mM α MDG, auf die normiert wird, ist $12,0 \pm 3,8$ pA. Das Haltepotential beträgt 0 mV.

3.2.1.4 α MDG-Affinität bei 10 mM Na^+ in Bad und Pipette

Die nächsten Messungen untersuchen das Verhalten des SGLT1 bei symmetrischen Na^+ -Konzentrationen in Bad- und Pipettenlösung von jeweils 10 mM Na^+ . Bei $\text{HP} = 0$ mV ist somit der elektrochemische Gradient für Na^+ gleich 0.

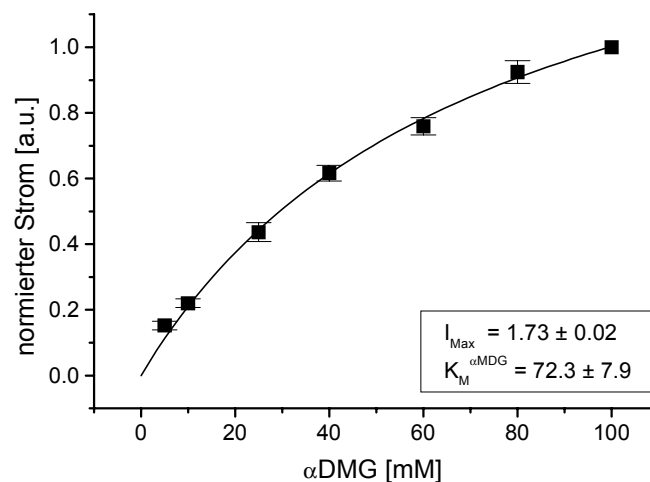


Abbildung 14: Gemittelte zuckerinduzierte Ströme als Funktion der α MDG-Konzentration bei 10 mM Na^+ in Bad- und Pipettenlösung (N=4). Die durchgezogene Linie zeigt den Michaelis-Menten-Fit mit $K_M^{\alpha\text{MDG}} = 72,2 \pm 7,9$ mM α MDG und $I_{\text{Max}} = 1,7 \pm 0,02$ a.u.. Der Mittelwert der Ströme bei 100 mM α MDG, auf den normiert wird, beträgt $2,9 \pm 0,8$ pA. Das Haltepotential beträgt 0 mV.

Bei der Applikation von α MDG zeigen sich vergleichsweise niedrige, auswärtsgerichtete zuckerinduzierte Ströme, deren treibende Kraft nur der Zuckergradient ist. In Abb. 14 sind die Mittelwerte der gemessenen Ströme dargestellt, wobei der Mittelwert der Ströme

bei 100 mM α MDG $2,9 \pm 0,8$ pA beträgt. Sie gehorchen auch einer Michaelis-Menten-Kinetik, wobei der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ mit $72,3 \pm 7,9$ mM (Tab. 5) sehr hoch liegt. Der Strom sättigt in dem betrachteten Konzentrationsbereich nicht, der Sättigungsstrom beträgt 1,7mal dem Strom bei 100 mM α MDG und wird erst bei deutlich höheren Konzentrationen erreicht. Somit kann aber gezeigt werden, dass der Transporter auch ohne Na^+ -Gradient Zucker transportieren kann, wenn auch mit einer sehr geringen Affinität.

	Patch 1	Patch 2	Patch 3	Patch 4	Mittelwert \pm SEM
$K_M^{\alpha\text{MDG}}$ [mM]	85,0	82,4	71,6	50,1	72,3 \pm 7,9

Tabelle 5: $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ der Einzelmessungen und daraus berechneter Mittelwert bei 10 mM Na^+ in Pipette und Bad (N=4)

3.2.1.5 α MDG-Affinität bei 400 mM Na^+

Weitere Lösungswechsel-Experimente werden zur Bestimmung des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bei 400 mM Na^+ in der Badlösung und 0 mM Na^+ in der Pipettenlösung durchgeführt. 400 mM Na^+ ist 7mal größer als der $K_M^{\text{Na}} = 57,0$ mM Na^+ , der bei 25 mM α MDG, der kleinsten getesteten α MDG-Konzentration, bestimmt wurde (s. 3.2.2.2). Somit sind 400 mM Na^+ für alle verwendeten α MDG-Konzentrationen annähernd sättigend. Eine weitere Erhöhung der Na^+ -Konzentration auf sättigende Werte, d. h. auf den 10fachen K_M -Wert, erscheint wegen der damit verbundenen Erhöhung der Osmolarität der Lösung unzweckmässig. Bei sättigender Na^+ -Konzentration ist die Na^+ -Bindung sehr wahrscheinlich nicht geschwindigkeitsbestimmend und hat kaum Einfluss auf die apparente Zucker-Affinität. Es besteht somit die Möglichkeit, nur die Abhängigkeit des SGLT1 von α MDG zu untersuchen.

Die Osmolarität der Lösungen ist durch die hohe Na^+ -Konzentration mit 933 mOsm in der Bad- bzw. 916 mOsm in der Pipettenlösung sehr hoch, was die Erfolgsquote bei der Ausbildung des Gigaseals reduziert. Außerdem beeinflusst auch das Haupt-Anion in der Pipettenlösung die Häufigkeit der Sealbildung, denn mit 400 mM NMG-Cl in der Pipettenlösung gelingt das Sealen kaum, der Wechsel zu 400 mM NMG-Aspartat erhöht die Reproduzierbarkeit erheblich. Die hohe Osmolarität wirkt sich auch auf die Qualität des Gigaseals aus. Direkt nach dem Abziehen des Patches beträgt der Widerstand $\approx 1\text{G}\Omega$, fällt dann aber sehr schnell auf ca. 600 - 800 $\text{M}\Omega$ ab. Zur Durchführung eines Lösungswechsel-Experiments reicht dieser Sealwiderstand aus, allerdings können damit keine Spannungssprung-Experimente durchgeführt werden.

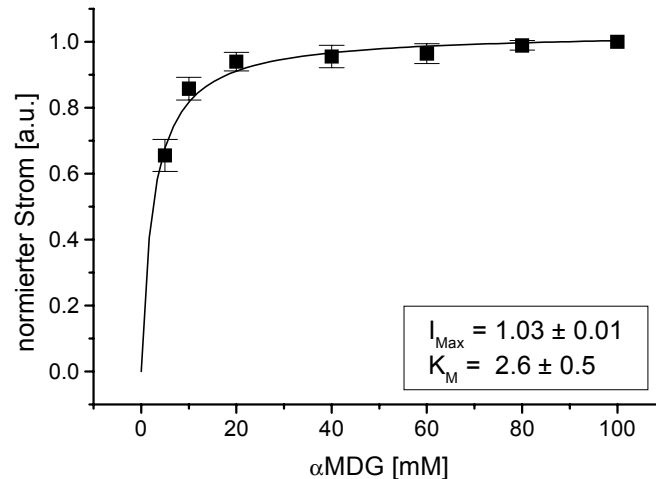


Abbildung 15: Gemittelte zuckerinduzierte Ströme als Funktion der α MDG-Konzentration bei 400 mM Na^+ ($N = 4$). Der Michaelis-Menten-Fit mit $K_M^{\alpha\text{MDG}} = 2,6 \pm 0,5$ mM ergibt $I_{\text{Max}} = 1,03$. Er ist durch die durchgezogene Linie dargestellt. Der Mittelwert der Ströme bei 100 mM α MDG, auf die normiert wird, beträgt $22,8 \pm 4,7$ pA. Das Haltepotential beträgt 0 mV.

In Abb. 15 sind die Mittelwerte der Ströme in Abhängigkeit von der α MDG-Konzentration mit dem Michaelis-Menten-Fit dargestellt. Der Anstieg des zuckerinduzierten Stroms auf den Sättigungswert erfolgt sehr schnell. Der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ beträgt $2,6 \pm 0,5$ mM (Tab. 6) und ist gegenüber den Messungen mit nichtsättigenden Na^+ -Konzentrationen deutlich kleiner. Die Sättigung wird schon bei ungefähr 60 mM α MDG erreicht.

	Patch 1	Patch 2	Patch 3	Patch 4	Mittelwert \pm SEM
$K_M^{\alpha\text{MDG}}$ [mM]	2,9	1,6	3,9	1,8	2,6 \pm 0,5

Tabelle 6: $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ der Einzelmessungen und daraus berechneter Mittelwert bei 400 mM Na^+ ($N=4$)

3.2.1.6 α MDG-Affinität als Funktion der Na^+ -Konzentration

Abb. 16 zeigt in einer Zusammenfassung die gemessenen $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ als Funktion der Na^+ -Konzentration bei $\text{HP} = 0$ mV. Der Vergleich der Zuckeraffinitäten bei 10 mM intrazellulärem Na^+ mit (gefülltes Quadrat) und ohne anliegendem Konzentrationsgradienten für Na^+ (offener Kreis) zeigt deutlich, dass die Anwesenheit eines Na^+ -Gradienten die apparente Affinität deutlich um den Faktor 2 erhöht.

Eine Erhöhung der Na^+ -Konzentration bei den Messungen mit Na^+ -Gradient führt zu einer Erniedrigung des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$. Im Bereich der nichtsättigenden Na^+ -Konzentrationen von 10 mM bis ca. 110 mM Na^+ verläuft der Abfall eher exponentiell, wobei der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ um das 4fache abfällt. Im Bereich der annähernd sättigenden Na^+ -Konzentrationen von

110 bis 400 mM Na⁺ verläuft der Abfall linear mit einem Faktor 3. Diese Abhängigkeit wird zur Bestimmung der intrazellulären Bindungsreihenfolge verwendet (s. Kap. 3.5).

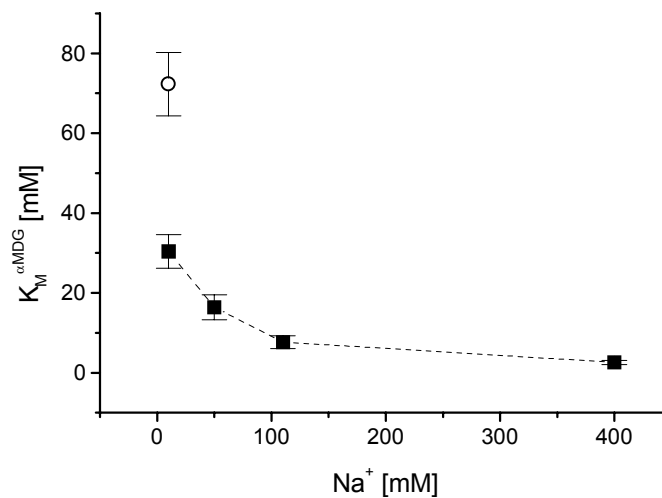


Abbildung 16: Abhängigkeit der α MDG-Affinität von der intrazellulären Na⁺-Konzentration. Der offene Kreis zeigt den $K_M^{\alpha MDG}$ ohne Na⁺-Gradienten bei jeweils 10 mM Na⁺ in Bad- und Pipettenlösung, die gefüllten Quadrate die $K_M^{\alpha MDG}$ mit anliegendem Na⁺-Gradienten. Zur besseren graphischen Darstellung der Na⁺-Abhängigkeit werden die gemessenen Werte durch die gestrichelte Linie verbunden.

3.2.1.7 Untersuchung zum Osmolaritätsgradienten

Einige der Messungen erfolgen mit Osmolaritätsgradienten zwischen Bad- und Pipettenlösung. So enthält die Pipettenlösung zur Bestimmung des α MDG-Konzentrationsabhängigkeit bei 110 mM Na⁺ kein Mannitol, wohingegen die Osmolarität der Badlösung durch die Zuckerzugabe um 100 mOsm erhöht ist (Kap. α MDG-Affinität bei 110Na⁺). Bei anderen Messungen hingegen, z.B. bei 400 mM Na⁺, lag kein Osmolaritätsgradient vor. Um zu prüfen, ob ein Osmolaritätsgradient den gemessenen Strom beeinflusst und somit Messungen mit und ohne Gradient vergleichbar sind, werden zu dieser Frage Kontroll-Messungen durchgeführt. Dazu werden die Stromamplituden, die durch 100 mM α MDG hervorgerufen werden, bei unterschiedlichen Osmolaritätsgradienten zwischen Bad- und Pipettenlösung verglichen. Die unterschiedlichen Osmolaritätsgradienten werden durch zusätzliches Mannitol in der Badlösung erreicht, die Pipettenlösung enthält dabei immer 100 mM Mannitol. Die Badlösung enthält entweder 100 mM Mannitol oder 100 α MDG, wodurch sich zwischen Pipetten- und Badlösung kein Unterschied in der Osmolarität ergibt. Oder aber die Badlösung enthält 300 mM Mannitol oder (100 mM α MDG + 200 mM Mannitol), wodurch sie eine um 200 mOsm höhere Osmolarität gegenüber der Pipettenlösung besitzt.

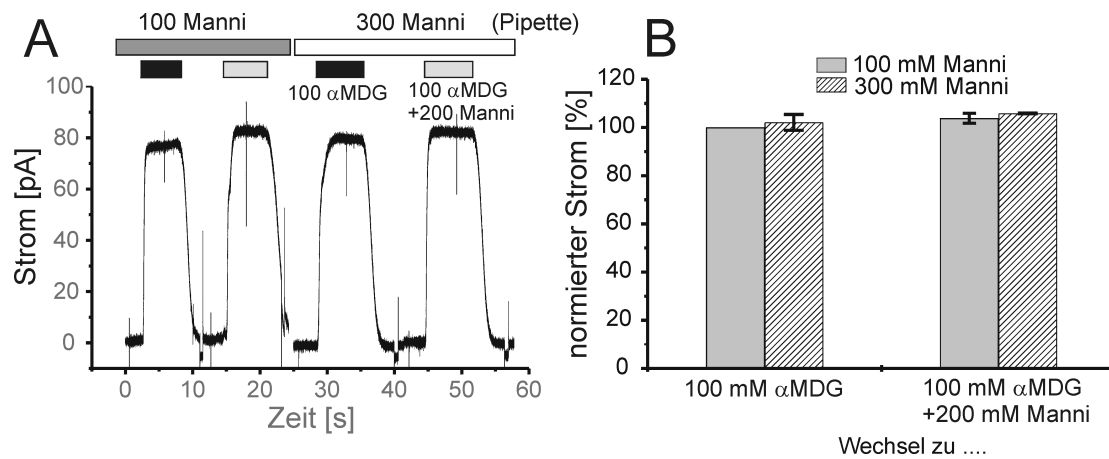


Abbildung 17: Messungen zum Osmolaritätsgradienten. A) Originalmessung der zuckerinduzierten Ströme bei einem Wechsel auf 100 mM α MDG unter verschiedenen osmolaren Bedingungen. Die Pipette enthält 100 mM Mannitol, die Referenzlösungen entweder 100 mM Mannitol (dunkelgrauer Balken) oder 300 mM Mannitol (weisser Balken). Die Testlösungen enthalten 100 mM α MDG (schwarzer Balken) oder (100 mM α MDG + 200 mM Mannitol) (hellgrauer Balken). B) Vergleich der zuckerinduzierten Stromamplituden beim Sprung auf 100 mM α MDG unter verschiedenen osmolaren Bedingungen. (graue Histogramme: Sprung erfolgt von der Referenzlösung mit 100 mM Mannitol aus; schraffierte Histogramme: Sprung erfolgt von der Referenzlösung mit 300 mM Mannitol aus). Die Testlösungen sind auf der x-Achse angegeben. Die Experimente erfolgen mit 110 mM Na^+ und $\text{HP} = 0$ mV.

In Abb. 17 A soll die Fragestellung am Beispiel einer typischen Messung verdeutlicht werden. Zuerst wird untersucht, in welchem Maß ein Wechsel der Bedingungen von (kein Gradient) auf (200mOsm höhere Osmolarität im Bad) die Stromamplitude beeinflusst. Dazu erfolgt von der Referenzlösung mit 100 mM Mannitol aus (dunkelgrauer Balken) ein Wechsel auf die Testlösungen mit 100 mM α MDG (kein Gradient) und (100 mM α MDG+200 mM Mannitol) (200 mOsm höhere Osmolarität in der Badlösung). Es zeigt sich ein leichter Stromzuwachs von 76,5 pA auf 81 pA um 5,9 %. Im zweiten Teil werden die Stromamplituden unter der Bedingung untersucht, dass durch die hochosmolare Referenzlösung ein Osmolaritätsgradient vorgegeben ist. Dieser wird durch den Wechsel zur niederosmolaren Testlösung weggenommen. Von der Referenzlösung mit 300 mM Mannitol aus (weisser Balken) erfolgt ein Wechsel auf die Testlösungen mit 100 mM α MDG (Osmolaritätsgradient wird reduziert) und (100 mM α MDG+200 mM Mannitol) (Osmolaritätsgradient ist wieder hergestellt). Es zeigt sich Ströme von 81,3 pA bzw. 82,4 pA, wobei der Strom bei der hochosmolaren Testlösung um 1,3 % höher ist als bei der niederosmolaren.

Die Ergebnisse von drei Messungen sind in Abb. 17 B dargestellt. Die grauen Histogramme zeigen den Wechsel von der Referenzlösung mit 100 mM Mannitol auf die Testlösungen, die auf der x-Achse aufgetragen sind. Die schraffierten Balken stellen den

Wechsel von der Referenzlösung mit 300 mM Mannitol auf die Testlösungen dar. Die Normierung der gemessenen Ströme erfolgt auf die Stromamplitude bei dem Wechsel von 100 mM Mannitol auf 100 mM α MDG (graues linkes Histogramm). Insgesamt ergibt sich ein leichter Stromanstieg in Anwesenheit eines Osmolaritätsgradienten, z.B. unterscheidet sich der Strom bei einem Sprung von 100 mM Mannitol auf 100 mM α MDG und auf (100 mM α MDG + 200 mM Mannitol) um $+3,8 \pm 2,1$ %. Von 300 mM Mannitol aus zeigt sich für die Ströme beim Sprung auf 100 mM α MDG und auf (100 mM α MDG + 200 mM Mannitol) der Unterschied von 5,8 %. Diese Fehler liegen im Bereich der normalen Messungenauigkeit. Berücksichtigt man, dass der in den hier durchgeführten Messungen zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeiten mit einem halb so großen Osmolaritätsunterschied durchgeführt werden (100mOsm höhere Osmolarität in der Badlösung gegenüber der Pipettenlösung), sollten die eventuell auftretenden Abweichungen noch kleiner und damit vernachlässigbar sein. Deshalb können Messungen mit und ohne Osmolaritätsgradienten verglichen werden.

3.2.2 Bestimmung der Na^+ -Affinität des SGLT1 bei verschiedenen α MDG-Konzentrationen

Zur Bestimmung der Na^+ -Affinität des SGLT1 werden Lösungswechsel-Experimente mit 7 Na^+ -Konzentrationen bei den festen intrazellulären Zuckerkonzentrationen von 250 mM, 100 mM und 25 mM α MDG durchgeführt. Dies ermöglicht die Bestimmung der Abhängigkeit der apparenten Na^+ -Affinität vom Substrat α MDG.

Die Stromamplituden werden zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Patches auf den Strom bei 100 mM Na^+ normiert, die gemessenen Mittelwerte dieses Stroms werden jeweils in der Bildunterschrift angegeben.

3.2.2.1 Na^+ -Affinität bei 250 mM α MDG

In Abb. 18 ist eine Originalmessung zur Bestimmung der Na^+ -Affinität bei HP = 0 mV dargestellt. Die Na^+ -Konzentration im Bad wird zwischen 10 - 200 mM Na^+ variiert, die Pipettenlösung enthält 2 mM Na^+ . Der Transporter wird aktiviert durch die Applikation von 250 mM α MDG, wobei diese Konzentration für alle Na^+ -Konzentrationen sättigend ist. Der Wechsel von 200 mM Na^+ zu (200 mM Na^+ + 250 mM α MDG) führt zu einem zuckerinduzierten Strom von 40 pA, der beim Wechsel zur α MDG-freien Na^+ -haltigen Lösung wieder auf 0 pA zurückkehrt. Beim nachfolgenden Wechsel von 200 mM Na^+ auf 100 mM Na^+ fällt der Strom um 2,3 pA ab, was zum Teil vermutlich auf den Na^+ -

Leckstrom des SGLT1, andererseits aber auch auf Ionenkanäle in der Membran zurückzuführen ist (siehe 2.4.2.1). Die Amplitude der Stromänderung ist von Patch zu Patch verschieden und tritt auch bei einem Wechsel der Na^+ -Konzentration an nichtinjizierten Oozyten auf. Im Zeitraum von 290 – 590 s werden die Badlösungen in den Lösungsbehältern getauscht, da durch die zusätzliche Applikation der reinen Na^+ -Lösungen die benötigte Anzahl der Lösungen von 8 auf 14 steigt. Im 1. Durchgang werden 200, 100, 40 und 10 mM Na^+ getestet, im 2. Durchgang 200, 150, 60 und 20 mM Na^+ . Die Lösung mit 200 mM Na^+ wird dabei als Referenzlösung in beiden Durchgängen gemessen, um etwaige kleinere Stromänderungen durch einen „Rundown-Effekt“ berücksichtigen zu können, der in einigen wenigen Experimenten auftrat.

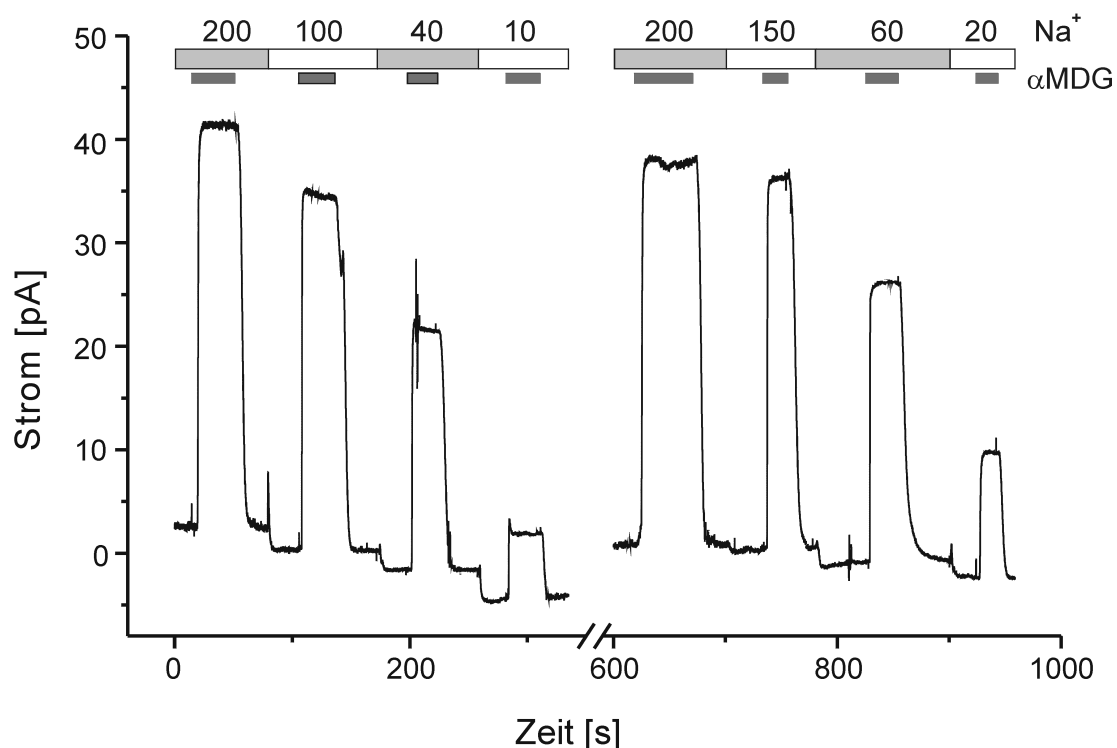


Abbildung 18: Originalmessung der zuckerinduzierten Ströme in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration. Die weißen und hellgrauen Balken zeigen die jeweils benutzte Na^+ -Konzentration, die dunkelgrauen Balken die Applikation der entsprechenden Na^+ -Konzentration plus 250 mM αMDG . Das Haltepotential beträgt 0 mV.

Zur Bestimmung der Affinität für Na^+ werden die zuckerinduzierten Ströme gegen die Na^+ -Konzentration aufgetragen. Abb. 19 zeigt die Mittelwerte der Ströme aus 5 Einzelmessungen. Der sigmoidale Anstieg des Stroms mit zunehmender Na^+ -Konzentration lässt auf einen Hillkoeffizienten >1 schließen und somit auf eine Beteiligung von mehr als einem Na^+ -Ion an dem Transportprozess. Der Sättigungsstrom $I_{\text{Max}} = 1.2 \pm 0,02$ a.u. wird im gemessenen Konzentrationsbereich noch nicht vollständig

erreicht. Die gemessenen Ströme werden zur Bestimmung der halbmaximalen Na^+ -Konzentration K_M^{Na} und des Hill-Koeffizienten n mit der Hill-Gleichung gefittet.

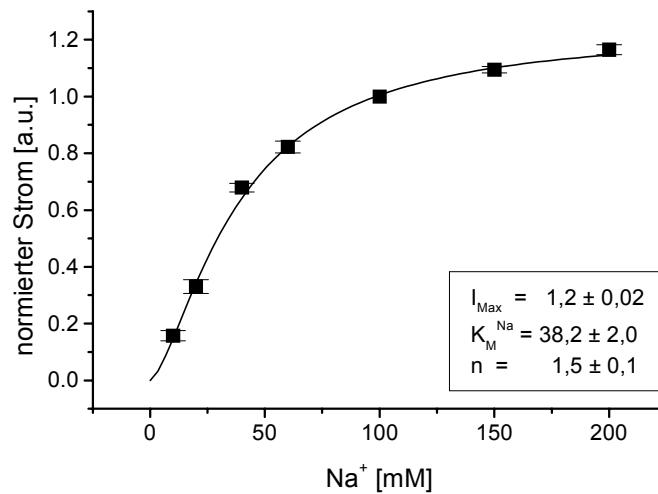


Abbildung 19: Gemittelte zuckerinduzierte Ströme als Funktion der Na^+ -Konzentration bei 250 mM αMDG ($N = 5$). Die durchgezogene Linie zeigt den Fit der Hill-Gleichung mit $K_M^{\text{Na}} = 38,2 \text{ mM Na}^+$, $n = 1,5$ und $I_{\text{Max}} = 1,2 \text{ a.u.}$. Der Mittelwert der Ströme bei 100 mM Na^+ , auf die normiert wird, beträgt $29,4 \pm 4,3 \text{ pA}$. Das Haltepotetial beträgt 0 mV.

Tab. 7 zeigt die Ergebnisse der Messungen an 5 Patchen für K_M^{Na} und n . Aus diesen wird der Mittelwert bestimmt. Die Affinität für Na^+ liegt damit bei $38,2 \pm 2,0 \text{ mM Na}^+$, der Hill-Koeffizienten n beträgt $1,5 \pm 0,1$.

	Patch 1	Patch2	Patch3	Patch4	Patch5	Mittelwert \pm SEM
K_M^{Na} [mM]	37.5	32.5	35.6	43.4	41.8	$38,2 \pm 2,0$
n	2,0	1.6	1.4	1.3	1.4	$1,5 \pm 0,1$

Tabelle 7: K_M^{Na} und Hillkoeffizient n der Einzelmessungen und daraus berechnete Mittelwerte bei 250 mM αMDG ($N=5$)

3.2.2.2 Na^+ -Affinität bei 25 mM αMDG

Eine weitere Na^+ -Affinitätsbestimmung wird bei einer festen αMDG -Konzentration von 25 mM αMDG durchgeführt. Auch hier werden die Messungen mit 7 Na^+ -Konzentrationen in 2 Durchgängen erstellt. 25 mM αMDG entspricht ungefähr der halbmaximalen Zuckerkonzentration bei einer Na^+ -Konzentration von 20 mM und ist für den gesamten Na^+ -Konzentrationsbereich nicht sättigend.

Abb. 20 stellt die Mittelwerte der zuckerinduzierten Ströme in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration dar. Auch hier zeigt sich wieder das sigmoidale Verhalten, das auf einen Hill-Koeffizienten von >1 schließen lässt. Die Ströme der Einzelmessungen werden mit der Hill-Gleichung gefittet, und der Mittelwert für K_M^{Na} und den Hill-Koeffizient n

berechnet. Es ergibt sich $K_M^{\text{Na}} = 57,0 \pm 3,0$ mM und $n = 1,6 \pm 0,1$ (Tab. 8). Mit diesen Mittelwerten wird ein Hill-Fit erstellt, der in Abb. 20 als durchgezogene Linie zu sehen ist.

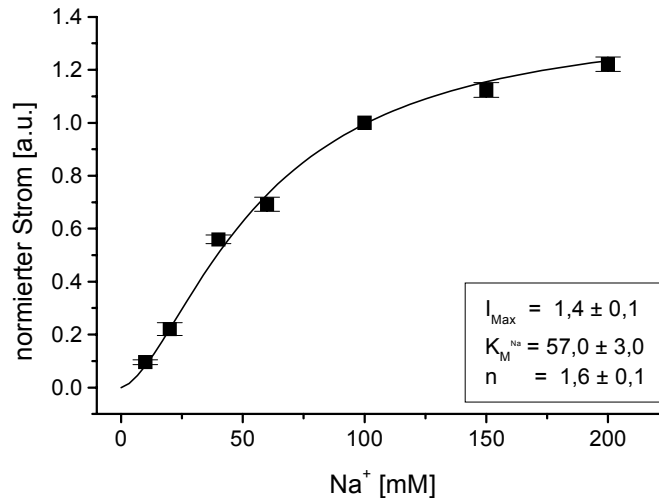


Abbildung 20: Gemittelte zuckerinduzierte Ströme als Funktion der Na^+ -Konzentration bei 25 mM α MDG (N=9). Die durchgezogene Linie zeigt den Fit der Hill-Gleichung mit $K_M^{\text{Na}} = 57,0$ mM Na^+ , $n = 1,6$ und $I_{\text{Max}} = 1,4$ a.u.. Der Mittelwert der Ströme bei 100 mM Na^+ , auf die normiert wird, beträgt $33,1 \pm 0,7$ pA. Das Haltepotetial beträgt 0 mV.

	Patch 1	Patch2	Patch3	Patch4	Patch5
K_M^{Na} [mM]	56.2	59.2	70.9	48.3	51,0
n	1.8	1.3	1.4	1.7	1.6

	Patch 6	Patch7	Patch8	Patch9	Mittelwert \pm SEM
K_M^{Na} [mM]	65.1	53.9	65.1	43.4	57,0 \pm 3,0
n	1.6	1.9	1.3	1.5	1.6 \pm 0.1

Tabelle 8: K_M^{Na} und Hillkoeffizient n der Einzelmessungen und daraus berechnete Mittelwerte bei 25 mM α MDG (N=9)

3.2.2.3 Na^+ -Affinität bei 100 mM α MDG

Die Durchführung der Experimente zur Bestimmung der Na^+ -Affinität in der vorher beschriebenen Weise erfordert ein qualitativ gutes, lange haltbares Gigaseal. Eine weitere Möglichkeit der Versuchsdurchführung besteht darin, an einem Patch nur jeweils 4 Na^+ -Konzentrationen von 7 Na^+ -Konzentrationen zu messen. Die Daten werden auf die gemeinsame Referenzlösung normiert und zusammen ausgewertet. Dieses Verfahren wird bei einer festen α MDG-Konzentration von 100 mM durchgeführt. Für jeden Durchgang werden 3 Einzelmessungen gemacht, die Na^+ -Konzentrationen betragen 130,

110, 50, und 20 mM Na⁺ bzw. 110, 80, 40 und 10 mM Na⁺. Die auf 110 mM Na⁺ normierten, gepoolten Daten sind in Abb. 21 dargestellt. Die gemittelten Ströme zeigen größere Fehler als die gemittelten Ströme der Messungen von 7 Konzentrationen an einem Patch. Der aus den gemittelten Daten gefittete K_M^{Na} zeigt eine sehr grosse Standardabweichung von 37%, genauso wie der Hill-Koeffizient mit einem Fehler von 25%. Bei diesem Verfahren ist der Fehler des Fits angegeben, wohingegen im anderen Verfahren eine mehrfache Bestimmung des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ erfolgt und hier die Abweichung vom Mittelwert angegeben wird. Die unterschiedlichen Verfahren können somit nicht direkt verglichen werden.

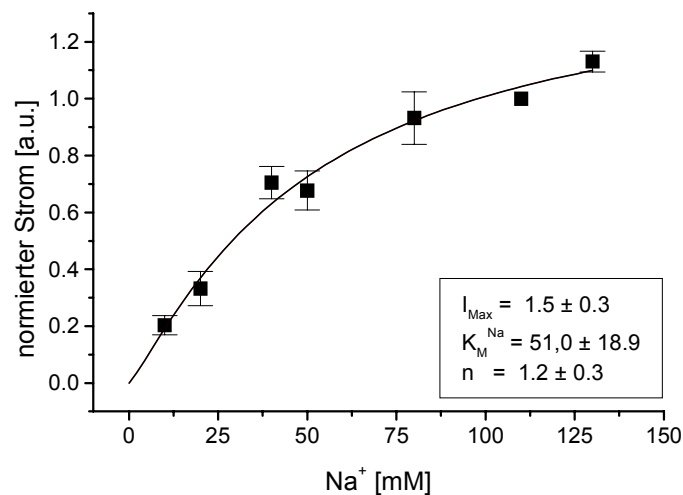


Abbildung 21: Gemittelte zuckerinduzierte Ströme als Funktion der Na⁺-Konzentration aus bei 100 mM α MDG (N = 6). Die durchgezogene Linie zeigt den Fit der Hill-Gleichung mit $K_M^{\text{Na}} = 51,0$ mM Na⁺, $n = 1,2$ und $I_{\text{Max}} = 1,5$ a.u.. Der Mittelwert der Ströme bei 110 mM Na⁺ ist $33,4 \pm 7,4$ pA. Das Haltepotential beträgt 0 mV.

3.2.2.4 Na⁺-Affinität als Funktion der α MDG-Konzentration

In Abb. 22 sind die Fit-Parameter aus den Messungen für die Bestimmung der Na⁺-Affinität für die 3 verschiedenen festen α MDG-Konzentrationen zusammengefasst.

Die apparente Na⁺-Affinität des SGLT1 ist kaum abhängig von der applizierten α MDG-Konzentration, denn eine zehnfache Erhöhung des intrazellulären α MDG führt zu einer leichten Erniedrigung des K_M^{Na} um einen Faktor 1,5 von 57,0 mM auf 38,2 mM (Abb. 22 A). Der Hill-Koeffizient n (Abb. 22 B) zeigt keine Abhängigkeit von der α MDG-Konzentration.

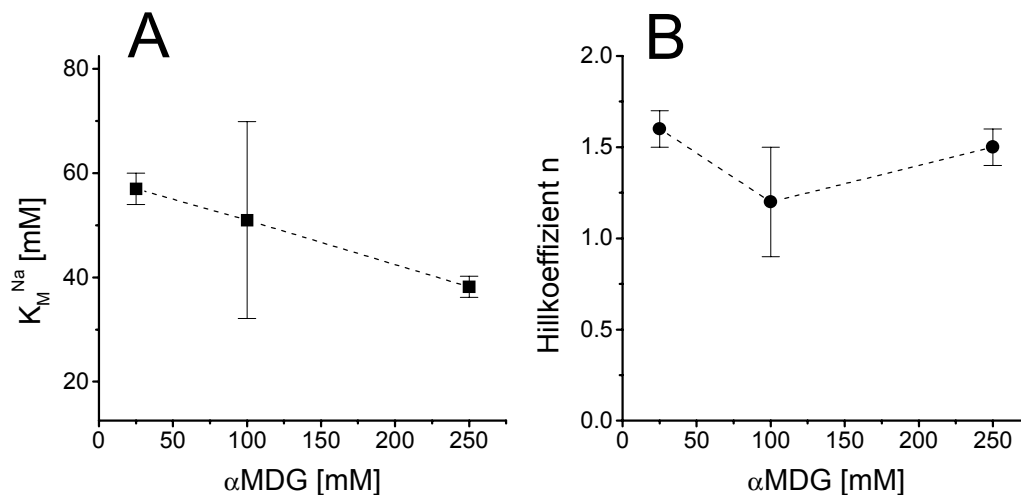


Abbildung 22: Abhängigkeit der Hill-Parameter von der α MDG-Konzentration. A) Abhängigkeit des K_M^{Na} von der intrazellulären Zuckerkonzentration; B) Abhängigkeit des Hill-Koeffizienten n von der α MDG-Konzentration. Die Messwerte werden zur besseren Übersichtlichkeit durch die gestrichelte Linie verbunden.

3.3 Spannungsabhängigkeit des SGLT1

Das von der Arbeitsgruppe Wright vorgeschlagene Transportmodell (Parent et al., 1992b) beinhaltet als spannungsabhängige Schritte die Na^+ -Bindung/-Dissoziation auf der Membran-Außenseite und die Relokation des leeren Transporters in der Membran. Im nächsten Teil der Experimente wird mittels Spannungssprüngen untersucht, wie sich eine Änderung des Haltepotentials auf die Aktivität des Transporters und damit auf die Stromamplituden auswirkt. Die Messungen werden bei verschiedenen Konzentrationen des einen Substrats bei fester Konzentration des anderen Substrats durchgeführt.

Aus dem Verlauf der Strom-Spannungs-Kennlinien können auch für das Transportmodell Rückschlüsse darauf gezogen werden, inwieweit spannungsabhängige Schritte ratenlimitierend sind.

3.3.1 Beispiel eines Spannungssprung-Experimentes

Abb. 23 A - E zeigt ein typisches Spannungssprung-Experiment. Die Messung wird unter sättigenden Substratbedingungen (200 mM Na^+ , 250 mM α MDG) durchgeführt. In Abb. 23 A ist das Protokoll, das die Spannungssprünge steuert, dargestellt. Ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV werden repetitiv Spannungssprünge von 100 ms Dauer ausgeführt. Die Serie der Testpotentiale erfolgt in 20 mV-Schritten in einem Potentialbereich von -100 bis $+60$ mV. Nach jedem Spannungssprung kehrt das

Haltepotential für 100 ms auf 0 mV zurück. Die Aufnahme der Daten mit PC1 erfolgt mit einer Abtastrate von 10 kHz bei einer Filterfrequenz von 1 kHz.

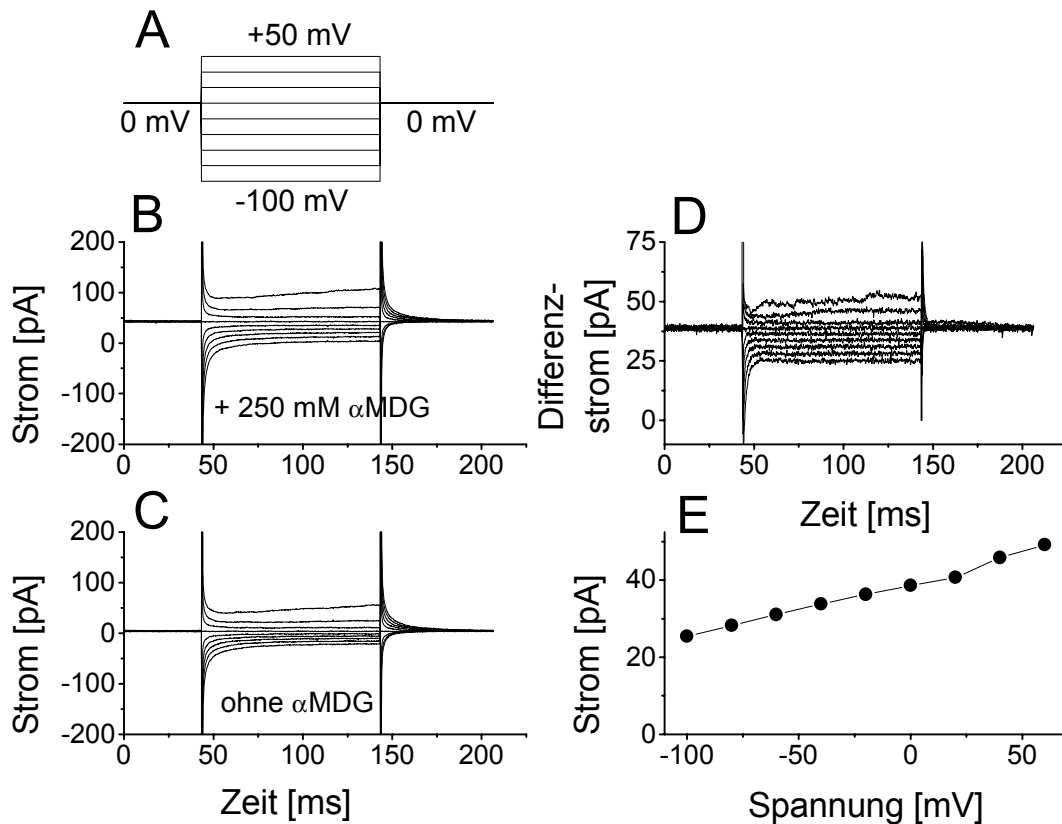


Abbildung 23: Akquisition und Auswertung der Ströme bei einem typischen Spannungssprung-Experiment. A) Spannungssprotokoll. B) Mit dem Spannungssprotokoll gemessene Ströme in der Badlösung mit 250 mM α MDG. C) Referenzmessung in Badlösung ohne α MDG. D) Differenzströme von B-C. E) Aus den Differenzströmen erhaltene Strom-Spannungs-Kennlinie.

Abb. 23 C zeigt die durch das Spannungssprotokoll hervorgerufenen Ströme in einer Badlösung ohne Zucker. Abb. 23 D zeigt die Differenz der Ströme in α MDG-haltiger Badlösung und der Badlösung ohne α MDG. Der Differenzstrom entspricht dem spannungsabhängigen Verhalten des Transporter-Stroms. Die Auswertung der stationären Differenzströme erfolgt nach Filterung mit 40 Hz durch die Mittelung der Stromamplituden in einem Zeitraum von 20 ms zwischen 105 und 125 ms. Mit diesen Werten erhält man die Strom-Spannungs-Kennlinie der zuckerinduzierten Ströme (Abb. 23 E). Um zu gewährleisten, dass sich die elektrischen Eigenschaften des Membranpatches in der Messzeit nicht geändert haben, wird die Referenzmessung vor und nach jeder Messung in zuckerhaltiger Lösung durchgeführt und die Differenz zwischen beiden gebildet. Wenn die Abweichungen weniger als 2 pA betragen, wird der

Mittelwert der beiden Referenzmessungen gebildet und dieser von der Messung mit Zucker abgezogen. Bei größeren Abweichungen wird die Messung verworfen.

Dieses Verfahren wird bei den angegebenen α MDG-Konzentrationen wiederholt.

3.3.2 Spannungsabhängigkeit der zuckerinduzierten Ströme als Funktion der α MDG-Konzentration bei fester Na^+ -Konzentration

Das Ziel der Experimente war die Untersuchung des spannungsabhängigen Verhaltens der zuckerinduzierten Ströme bei verschiedenen Konzentrationen des Substrats α MDG bei festen Na^+ -Konzentrationen. Die Experimente erfolgen an den gleichen Patches und in den gleichen Lösungen wie in Kap. 3.2.1.

3.3.2.1 Spannungsabhängigkeit für α MDG bei 110 mM Na^+

Zur Bestimmung des spannungsabhängigen Verhaltens des SGLT1 werden Spannungssprung-Experimente bei einer festen Na^+ -Konzentration von 110 mM in einer Reihe von α MDG-Konzentrationen (2,5, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 60, 80 und 100 mM α MDG) ausgeführt. Die Testpotentiale werden im Bereich der negativen Spannungen von -100 mV bis -20 mV in 20 mV-Schritten, im positiven Spannungsbereich von 0 mV bis $+50$ mV in 10 mV-Schritten erhöht. Die Ströme der Messungen an einem Patch werden auf den Strom bei 100 mM α MDG und 0 mV normiert.

Die Differenzströme ergeben die in Abb. 24 A gezeigten Mittelwerte der Strom-Spannungs-Kennlinien bei der jeweiligen α MDG-Konzentration, wobei der besseren Übersichtlichkeit wegen nur 7 der 10 Strom-Spannungs-Kennlinien dargestellt sind. Die auswärtsgerichteten, positiven Ströme zeigen eine lineare Abhängigkeit vom Potential, und steigen mit zunehmendem positiven Potential an. Im betrachteten Spannungsbereich wird keine Sättigung erreicht, so dass unter den hier vorliegenden Messbedingungen die ratenlimitierenden Schritte vermutlich spannungsabhängig sind. Bei stark negativen Potentialen und kleinen α MDG-Konzentrationen zeigen sich negative Differenzströme. Diese sind nicht auf einen einwärtsgerichteten Transportstrom zurückzuführen, sondern eher auf die Problematik, dass unter diesen Bedingungen die zuckerinduzierten Ströme sehr klein sind. Das Subtraktionsverfahren führt dabei zu unzuverlässigen Ergebnissen. Die α MDG-Konzentration hat auf den Anstieg der Strom-Spannungs-Kennlinien keinen Einfluss: zwischen -40 mV und $+40$ mV verdoppelt sich der Strom mit ähnlichen Steigungen von 0,7 a.u. pro 100 mV (100 mM α MDG) und 0,6 a.u. pro 100 mV (5 mM

α MDG). Die Strom-Spannungs-Kennlinien scheinen durch die höhere Transportrate bei höherer α MDG-Konzentration nur parallelverschoben.

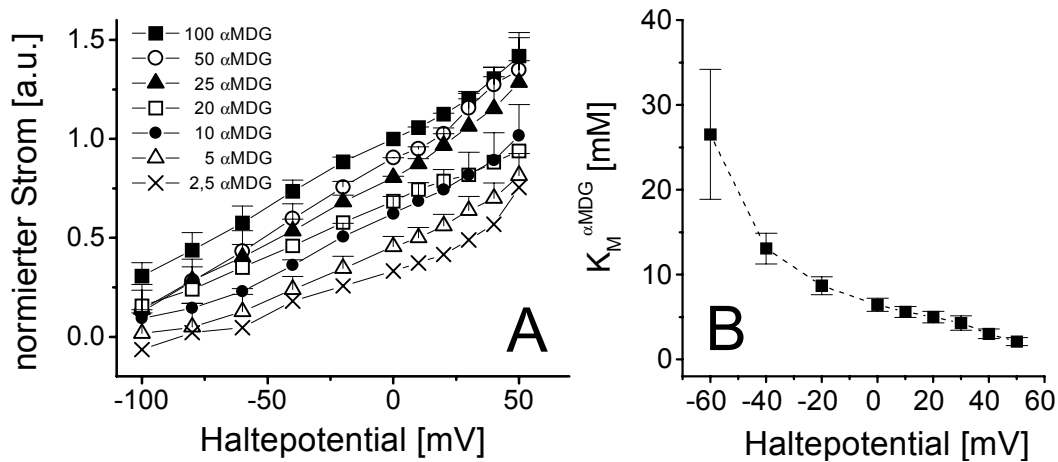


Abbildung 24: Spannungsabhängigkeit der Ströme bei 110 mM Na^+ . A) Gemittelte Strom-Spannungs-Kennlinien (N=3). Der Mittelwert des Stroms, auf den normiert wird, beträgt $26,7 \pm 9,8$ pA. Die Konzentrationsangaben sind in mM. B) Aus den Strom-Spannungs-Kennlinien berechnete $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ in Abhängigkeit vom Haltepotential. Die Fehlerbalken in B zeigen den Fehler des Fits.

Aus den gemittelten Strom-Spannungs-Kennlinien kann die apparente Affinität für α MDG bei den verschiedenen Potentialen bestimmt werden. Dazu werden die gemessenen Ströme für jedes Haltepotential als Funktion der α MDG-Konzentration aufgetragen. Der so ermittelte Stromverlauf wird mit der Michaelis-Menten-Gleichung angepasst. Die dadurch bestimmten $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ sind in Abb. 24 B dargestellt. Der Spannungsbereich wird von -100 mV auf -60 mV eingeschränkt, da bei kleineren Spannungen eine verlässliche Auswertung durch die geringen Stromamplituden nicht möglich ist. Der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom Haltepotential: zwischen -40 und $+40$ mV nimmt $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von $13,1 \pm 1,8$ mM auf $3,0 \pm 0,6$ mM um einen Faktor 4,4 ab. Dies bedeutet, dass die Affinität für α MDG zu positiveren Potentialen hin zunimmt, wobei gleichzeitig auch die Ströme ansteigen.

3.3.2.2 Spannungsabhängigkeit für α MDG bei 50 mM Na^+

Die Spannungssprung-Experimente werden auch bei einer festen Na^+ -Konzentration von 50 mM Na^+ , die in der Nähe des K_M^{Na} liegt, durchgeführt. Die untersuchten α MDG-Konzentrationen betragen 100, 60, 80, 40, 20, 10 und 5 mM α MDG. Das Spannungssprung-Protokoll entspricht dem bei 110 mM Na^+ . Die Normierung erfolgt auf den Stromwert bei 100 mM α MDG und 0 mV Haltepotential.

Die in diesen Experimenten erhaltenen Mittelwerte der Strom-Spannungs-Kennlinien sind in Abb. 25 A dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber wird die IV-Kennlinie von 80 mM α MDG nicht gezeigt. Die Zunahme der Stromamplituden mit positiveren Potentialen verläuft in diesem Fall eher exponentiell für alle Strom-Spannungskurven, die durch eine Änderung der α MDG-Konzentration nur parallelverschoben werden. Für Konzentrationen ≥ 40 mM α MDG steigt der Strom e-fach bei einer Potentialänderung von ca. 50-57 mV. Die unteren Konzentrationsbereiche lassen sich trotz der großen Anzahl der durchgeführten Experimente ($N = 6$) nicht verlässlich anfitten, da auch hier wieder durch die Differenz der geringen Stromamplituden negative Ströme auftreten.

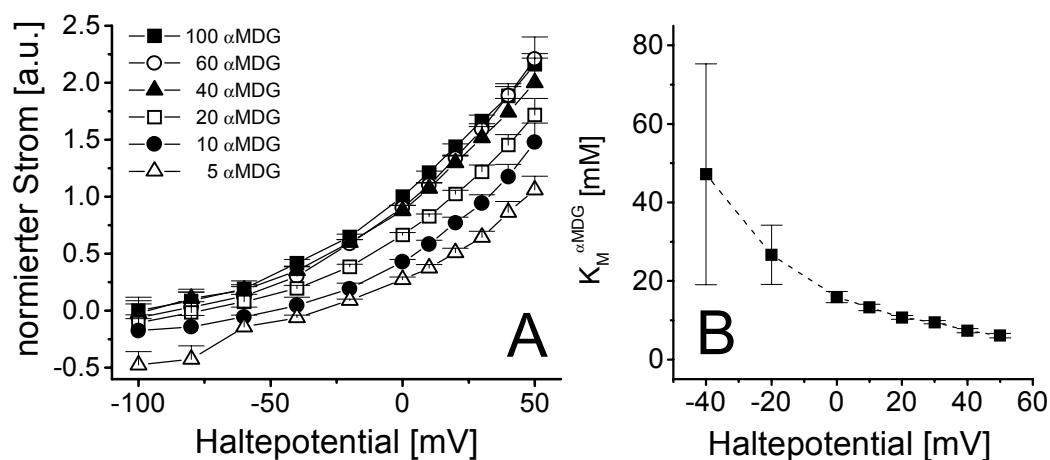


Abbildung 25: Spannungsabhängigkeit der Ströme bei 50 mM Na^+ A) Gemittelte Strom-Spannungs-Kennlinien ($N=6$). Die Konzentrationsangaben in der Legende sind in mM. Der Mittelwert des Stroms, auf den normiert wird, beträgt $6,1 \pm 0,4$ pA. B) Aus den Strom-Spannungs-Kennlinien berechnete $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ in Abhängigkeit vom Haltepotential. Die Fehlerbalken in B zeigen den Fehler des Fits.

Abb. 25 B zeigt die aus den Strom-Spannungs-Kennlinien berechneten $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ in Abhängigkeit von der angelegten Spannung. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ mit zunehmend positiveren Spannungen: im Bereich von -40 mV bis $+40$ mV fällt der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von $47,2 \pm 28,1$ mM um einen Faktor 6,4 auf $7,4 \pm 0,5$ mM.

3.3.2.3 Spannungsabhängigkeit für α MDG bei 10 mM Na^+

Das folgende Ergebnis beschreibt die Spannungsabhängigkeit der zuckerinduzierten Ströme bei einer Na^+ -Konzentration von 10 mM in der Badlösung, einer Konzentration also, die weit unter dem K_M^{Na} im nichtsättigenden Bereich liegt. Die Na^+ -Konzentration in der Pipette beträgt 0 mM Na^+ . Leider bleibt nur ein korrekt auswertbarer Versuch aus den 4 Versuchen zur Bestimmung der α MDG-Affinität aus den Lösungswechsel-Experimenten bei 0 mV übrig. Alle anderen zeigen bei der Überprüfung der

Referenzmessungen vor und nach der Messung mit Zucker größere Abweichungen als 2 pA in den Differenzströmen der Referenzmessungen und müssen deshalb verworfen werden. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den anderen Ergebnissen werden die Ströme auch auf den Strom bei HP = 0 mV und 100 mM α MDG normiert.

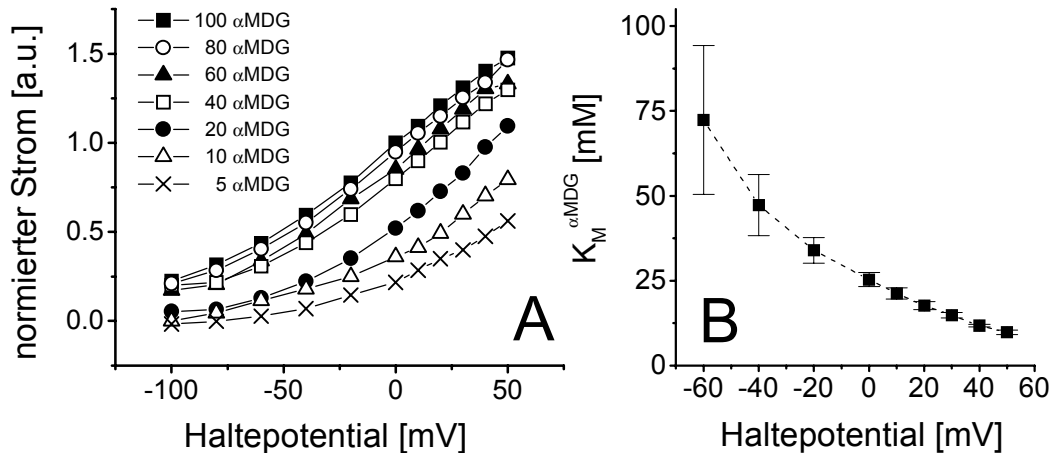


Abbildung 26: Spannungsabhängigkeit der Ströme bei 10 mM Na^+ im Bad und 0 mM Na^+ in der Pipette. A) Strom-Spannungs-Kennlinien (Einzelmessung). Der Mittelwert des Stroms, auf den normiert wird, beträgt 13,5 pA. Die Konzentrationsangaben in der Legende sind mM. B) Aus den Strom-Spannungs-Kennlinien berechnete $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ in Abhängigkeit vom Haltepotential. Die Fehlerbalken in B zeigen den Fehler des Fits.

Die Mittelwerte der zuckerinduzierten Ströme sind in Abb. 26 A dargestellt. Im Konzentrationsbereich ≤ 20 mM α MDG verläuft der Anstieg der Ströme mit zunehmend positiven Potential eher exponentiell. Eine e-fache Zunahme des Stroms erfolgt bei einer Änderung des Membranpotentials um ungefähr 40-50 mV, wobei die Zunahme bei 5 mM α MDG flacher verläuft als bei 20 mM α MDG. Bei Konzentrationen ≥ 40 mM α MDG verläuft der Anstieg zwischen -40 und $+50$ mV linear mit gleichen Steigungen, wobei der Strom um 1 a.u. pro 100 mV zunimmt. Die Strom-Spannungs-Kennlinien sind mit wachsender α MDG-Konzentration zu höheren Stromamplituden parallelverschoben.

Der aus den Strom-Spannungs-Kennlinien berechnete $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ (Abb. 26 B) zeigt das gleiche Verhalten in Abhängigkeit von der Spannung wie in den Messungen bei den anderen festen Na^+ -Konzentrationen: zwischen -40 mV und $+40$ mV zeigt sich mit positiveren Potentialen eine Abnahme des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von $47,3 \pm 9,0$ pA auf $11,8 \pm 0,4$ pA um einen Faktor 4,0.

3.3.2.4 Zusammenfassung zur Spannungsabhängigkeit für α MDG bei drei festen Na^+ -Konzentrationen

In den Spannungssprung-Experimenten zeigen die Strom-Spannungs-Kennlinien bei allen drei Na^+ -Konzentrationen das gleiche Verhalten: mit zunehmend positiveren Potentialen stieg die Amplitude des zuckerinduzierten Stroms an. In diesem Konzentrationsbereich ist somit ein spannungsabhängiger Schritt geschwindigkeitsbestimmend.

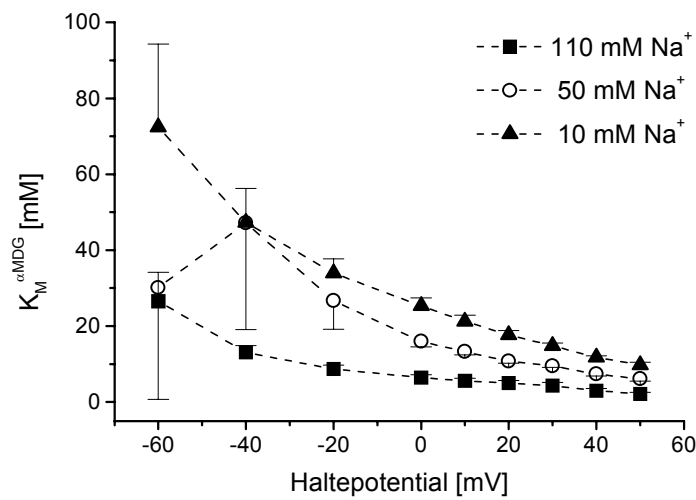


Abbildung 27: Vergleich der ermittelten $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ in Abhängigkeit vom Haltepotential bei drei Na^+ -Konzentrationen. Die Fehlerbalken werden der Übersichtlichkeit halber nur in eine Richtung dargestellt und die Messpunkte durch die gestrichelten Linien verbunden.

Unterschiede zeigen sich jedoch im Anstieg: im Bereich der nichtsättigenden Na^+ -Konzentration von 10 mM Na^+ verläuft der Anstieg bei αMDG -Konzentrationen ≤ 20 mM αMDG , was ungefähr dem apparenten $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bei 10 mM Na^+ entspricht, exponentiell. Bei höheren Konzentrationen verläuft er linear. Beträgt die Na^+ -Konzentration 50 mM Na^+ , was ungefähr dem apparenten K_M^{Na} entspricht, ist der Anstieg im gesamten αMDG -Konzentrationsbereich exponentiell. Die Na^+ -Konzentration von 110 mM Na^+ liegt oberhalb des apparenten K_M^{Na} . In diesem Fall verlaufen die Strom-Spannungs-Kennlinien über den gesamten Potentialbereich für alle αMDG -Konzentrationen linear. Eine Interpretation der unterschiedlichen Anstiege ist nicht möglich.

Die apparente αMDG -Affinität des Transporters zeigt das gleiche Verhalten bei allen drei Na^+ -Konzentrationen: mit zunehmend positiveren Potentialen nimmt der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ ab. Abb. 27 zeigt einen Vergleich der vorherigen Auswertungen. Eine Verringerung der

Konzentration des Cosubstrats Na^+ erhöht den $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bei gleichem Haltepotential und resultiert in einer niedrigeren Affinität des Transporters für Zucker.

Das Membranpotential hat auf $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bei der niedrigen Na^+ -Konzentration einen deutlich höheren Einfluss als bei 110 mM Na^+ . Bei 110 mM Na^+ strebt der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ schon bei einem negativen Haltepotential ab ungefähr -20 mV einem konstanten Wert zu, wohingegen bei 10 mM Na^+ der konstante Wert erst bei Potentialen größer als $+50$ mV angenähert wird.

3.3.3 Spannungsabhängigkeit der zuckerinduzierten Ströme als Funktion der Na^+ -Konzentration bei fester αMDG -Konzentration

In weiteren Versuchen soll die Spannungsabhängigkeit der zuckerinduzierten Ströme bei verschiedenen Konzentrationen des Cosubstrats Na^+ mit den festen αMDG -Konzentrationen von 250 mM und 25 mM αMDG untersucht werden.

Auch hier erfolgen die Experimente an den gleichen Patches und in den gleichen Lösungen wie in Kap. 3.2.2.

3.3.3.1 Spannungsabhängigkeit für Na^+ bei 250 mM αMDG

Die Spannungssprung-Experimente werden bei 250 mM αMDG durchgeführt, die für alle getesteten Na^+ -Konzentrationen sättigt. Das Spannungsprotokoll wird leicht verändert; die Sprünge auf die Testpotentiale vom Haltepotential 0 mV aus erfolgen in 20 mV-Schritten im Spannungsbereich -100 mV bis $+60$ mV.

Die gemittelten Strom-Spannungs-Kennlinien aus 3 Messungen sind in Abb. 28 A dargestellt. Die zuckerinduzierten Ströme nehmen mit zunehmend positiven Potential zu. Bei Na^+ -Konzentrationen ≥ 40 mM ist der Anstieg im gesamten Spannungsbereich mit gleichen Steigungen von ca. 0,3 bis 0,4 a.u. pro 100 mV. Für $\text{Na}^+ \leq 20$ mM αMDG ist der Anstieg etwas flacher. Im Potentialbereich zwischen -20 mV bis $+60$ mV beträgt er 0,2 – 0,3 a.u. pro 100 mV. Aus den gemittelten Strom-Spannungs-Kennlinien wird die Affinität des SGLT1 für Na^+ für die verschiedenen Potentiale bestimmt. Aus der Darstellung der gemessenen Ströme als Funktion der αMDG -Konzentration für jedes Haltepotential wird der Stromverlauf mit der Hill-Gleichung angefitet. Die dadurch bestimmten K_M^{Na} sind in Abb. 28 B dargestellt.

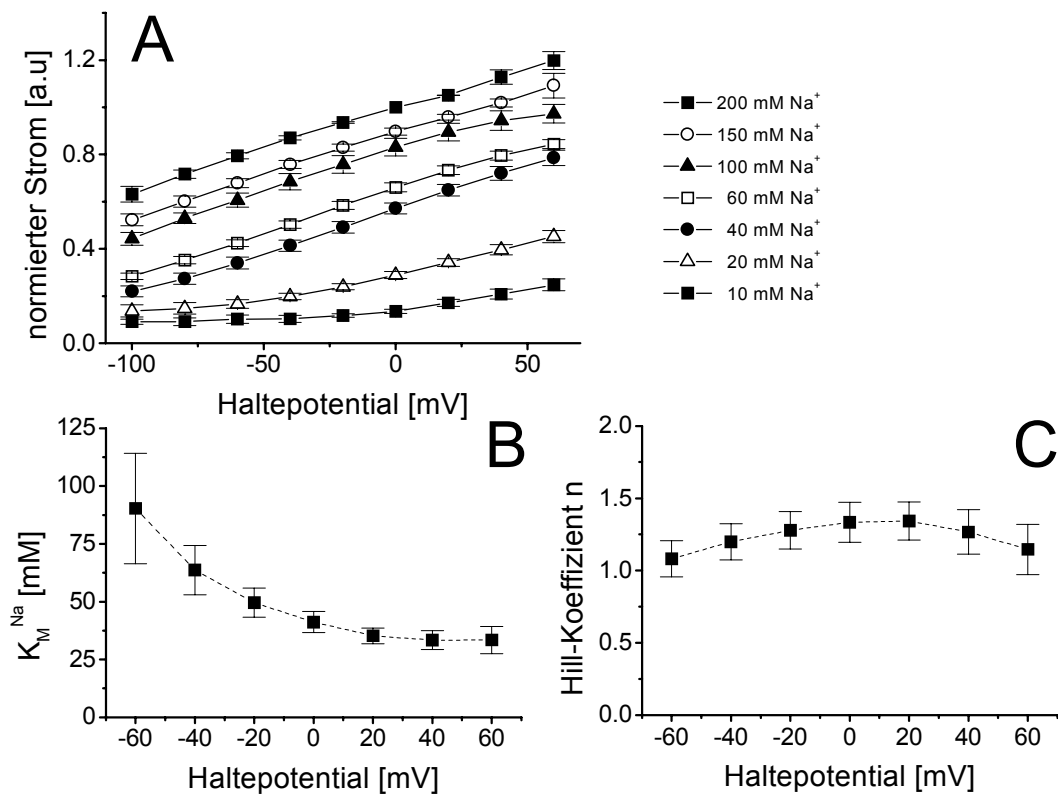


Abbildung 28: Spannungsabhängigkeit der Ströme bei 250 mM α MDG. A) Gemittelte Strom-Spannungs-Kennlinien (N=3). Der Mittelwert des Stroms, auf den normiert wird, beträgt $48,7 \pm 15,2$ pA. Die Konzentrationsangaben sind in mM. B) Aus den Strom-Spannungs-Kennlinien berechnete $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ in Abhängigkeit vom Haltepotential. C) Aus den IV Kennlinien berechnete Hill-Koeffizienten in Abhängigkeit vom Haltepotential. Die Fehlerbalken in B und C zeigen den Fehler des Fits.

Der K_M^{Na} zeigt auch hier wieder eine leichte Abhängigkeit vom Potential: bei -40 mV beträgt er $63,7 \pm 10,7$ mM und verringert sich um einen Faktor 1,9 auf $33,4 \pm 4,1$ mM bei $+40$ mV. Der zweite Parameter der Hill-Gleichung, der Hill-Koeffizient, liegt im gesamten Spannungsbereich -60 mV bis $+60$ mV deutlich über 1 (Abb. 28 C). Er zeigt kaum eine Abhängigkeit von der Spannung und kann innerhalb der Fehlergrenzen als konstant betrachtet werden.

3.3.3.2 Spannungsabhängigkeit für Na^+ bei 25 mM α MDG

Weitere Spannungssprung-Experimente werden bei 25 mM α MDG durchgeführt. Diese Zucker-Konzentration ist bei den hier verwendeten Na^+ -Konzentrationen nicht sättigend. Die Strom-Spannungs-Kennlinien in Abb. 29 A zeigen wiederum für Na^+ -Konzentrationen ≥ 40 mM Na^+ ein über den gesamten Spannungsbereich linearen

Anstieg zu positiven Potentialen hin, wobei die Steigungen sehr ähnlich sind.

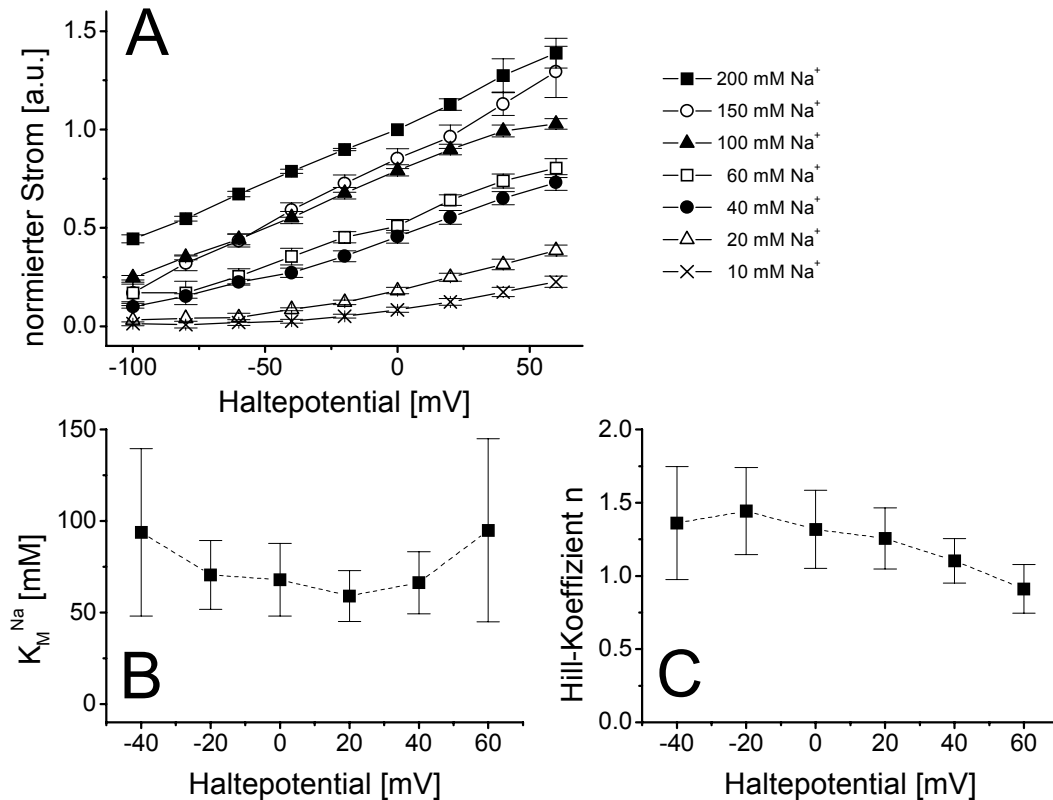


Abbildung 29: Spannungsabhängigkeit der Ströme bei 25 mM Na⁺. A) Gemittelte Strom-Spannungskennlinien (N=7). Der Mittelwert des Stroms bei 200 mM Na⁺ und 0 mV, auf den normiert wird, beträgt $48,7 \pm 15,2$ pA. Die Konzentrationsangaben sind in mM. B) Aus den Strom-Spannungskennlinien berechnete K_M^{Na} in Abhängigkeit vom Haltepotential. C) Aus den IV Kennlinien berechnete Hill-Koeffizienten in Abhängigkeit vom Haltepotential. Die Fehlerbalken in B und C zeigen den Fehler des Fits.

Zwischen -60 mV und +60 mV beträgt die Steigung ca. 0,5 – 0,7 a.u. pro 100 mV. Die Strom-Spannungskennlinien bei 20 mM Na⁺ und 10 mM Na⁺ verlaufen zwischen -20 mV und +50 mV linear mit einer flacheren Steigung gegenüber den höheren Na⁺-Konzentrationen. Bei 20 mM Na⁺ beträgt die Steigung 0,3 a.u. pro 100 mV, bei 10 mM Na⁺ 0,2 a.u. pro 100 mV.

Der aus den Strom-Spannungskennlinien mit Hilfe der Hill-Gleichung gefittete K_M^{Na} als Funktion des Haltepotentials ist in Abb. 29 B dargestellt. Der K_M^{Na} ist leicht spannungsabhängig und fällt zwischen -40 mV und +40 mV von $93,6 \pm 45,8$ mM um einen Faktor 1,4 auf $66,3 \pm 16,9$ mM. Allerdings sind bei diesen Messungen trotz ausreichender Anzahl von Versuchen (N=7) und relativ grossen Strömen die Fehler des Fits sehr gross. Besonders unerwartet ist das apparente Ansteigen des K_M^{Na} bei +60 mV.

Dies trifft auch für die gefitteten Hill-Koeffizienten zu (Abb. 29 C). Hier scheint eine leichte Spannungsabhängigkeit vorhanden zu sein, denn mit positiveren Potentialen fällt n von $1,36 \pm 0,39$ bei -40 mV auf $0,9 \pm 0,17$ bei -60 mV.

3.3.3.3 Zusammenfassung der Spannungsabhängigkeit für Na^+ bei zwei festen αMDG -Konzentrationen

Zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der zuckerinduzierten Ströme bei verschiedenen Na^+ -Konzentrationen werden zwei feste Konzentrationen des Substrats αMDG eingesetzt.

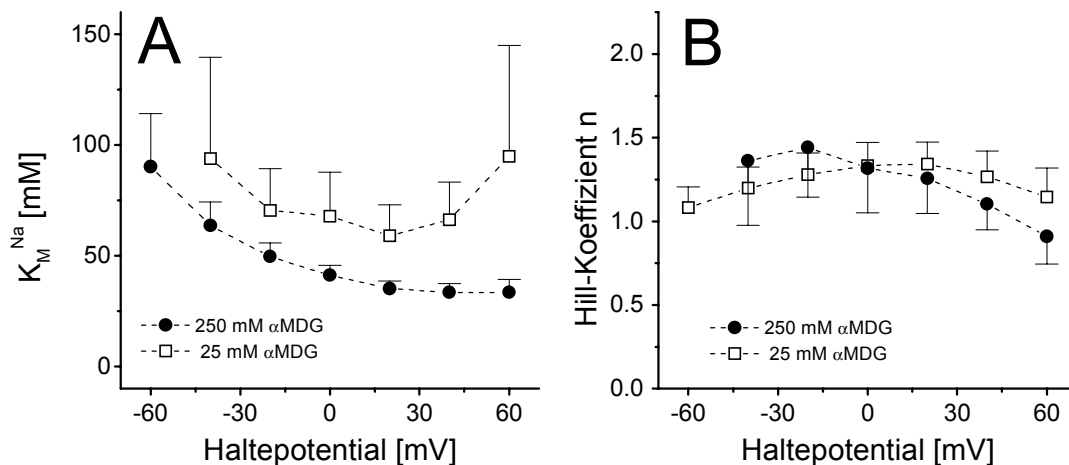


Abbildung 30: Vergleich der ermittelten Fitparameter der Hill-Gleichung bei zwei festen αMDG -Konzentrationen. A) Ermittelte K_M^{Na} bei zwei festen αMDG -Konzentrationen in Abhängigkeit vom Haltepotential. B) Hill-Koeffizient n bei zwei festen αMDG -Konzentrationen in Abhängigkeit vom Haltepotential. Die Fehlerbalken werden der Übersichtlichkeit wegen nur in eine Richtung dargestellt.

Die Strom-Spannungs-Kennlinien zeigen bei beiden αMDG -Konzentrationen das gleiche Verhalten: zwischen 40 mM Na^+ und 200 mM Na^+ verlaufen sie über den gesamten Spannungsbereich von -100 mV bis $+60$ mV linear mit einer ähnlichen Steigung.: der Mittelwert der Steigung beträgt bei 250 mM αMDG $0,4 \pm 4,8 \cdot 10^{-3}$ a.u. pro 100 mV und $0,54 \pm 4,7 \cdot 10^{-2}$ a.u. pro 100 mV bei 25 mM αMDG , d.h. bei kleinerer αMDG -Konzentration scheint die Steigung zuzunehmen. Die Strom-Spannungs-Kennlinien bei 20 und 10 mM Na^+ zeigen zwischen -20 mV und $+60$ mV einen linearen Anstieg, wobei die Steigung geringer ist als bei den höheren Na^+ -Konzentrationen.

Abb. 30 A zeigt einen Vergleich der K_M^{Na} bei den zwei αMDG -Konzentrationen, die für das jeweilige Haltepotential aus den Strom-Spannungs-Kennlinien durch einen Fit der Hill-Gleichung resultieren. Der K_M^{Na} zeigt bei allen Zuckerkonzentrationen eine

Abhängigkeit vom Haltepotential und nimmt mit positiven Potentialen ab. Im Potentialbereich zwischen -40 mV und $+20$ mV scheint der Verlauf durch die unterschiedliche α MDG-Konzentration nur parallelverschoben.

Der Hill-Koeffizient n (Abb. 30 B) ist bei beiden Zuckerkonzentrationen über den gesamten Spannungsbereich grösser als 1 innerhalb des Fehlerbereichs. Dies deutet auf mehr als eine Bindungsstelle mit positiver Kooperativität für das Cosubstrat Na^+ hin. Eine deutliche Abhängigkeit vom Potential kann nicht festgestellt werden.

3.4 Wirkung von Inhibitoren

3.4.1 Die Wirkung von Phlorizin

Phlorizin wirkt extrazellulär als spezifischer Inhibitor mit einem K_i von ≈ 10 μM . Die folgenden Experimente untersuchen, ob Phlorizin auch von der intrazellulären Membranseite als spezifischer Inhibitor arbeitet.

In ersten Experimenten mit 100 mM α MDG und 110 mM Na^+ in der Badlösung zeigt die Applikation von 1 mM Phlorizin keinen Effekt. Deshalb muss Phlorizin in höheren Konzentrationen mit weniger kompetitierendem α MDG eingesetzt werden, um eine inhibierende Wirkung zu zeigen. Die nachfolgenden Experimente werden mit $0 - 2$ mM Phlorizin und 10 mM α MDG mit 110 mM Na^+ in der Badlösung und 5 mM Na^+ in der Pipettenlösung durchgeführt. Abb. 31 A zeigt die Original-Aufzeichnung eines Inhibitions-Experiments. Als Referenzlösung dient eine Lösung ohne α MDG und Phlorizin. Der Wechsel zur Testlösung mit 0 mM Phlorizin und 10 mM α MDG führt zu einem Auswärtsstrom durch SGLT1 von $23,5$ pA und wird durch die Applikation von Testlösungen mit $0,2$, $0,5$, 1 und 2 mM Phlorizin auf $20,4$, $19,2$, $17,1$, und $13,7$ pA verringert. Eine vollständige Inhibition des Stroms unter diesen Substrat- bzw. Inhibitorbedingungen wird nicht erreicht, die maximale Inhibition bei 2 mM Phlorizin beträgt in diesem Experiment $41,8\%$. Abb. 31 B zeigt die Mittelwerte der Inhibition von 3 Experimenten. Es zeigt sich deutlich, dass durch die eingesetzten Phlorizinkonzentrationen keine vollständige Inhibition des SGLT1-induzierten Stroms erreicht wird. Der Mittelwert der maximalen Inhibition bei 2 mM Phlorizin beträgt $27,2 \pm 9,8 \%$. Die Inhibition scheint bei Phlorizinkonzentrationen grösser als 2 mM zu sättigen. Die Zunahme der Inhibition mit zunehmender Phlorizinkonzentration kann durch eine Sättigungsfunktion wie die Michaelis-Menten (Gleichung [1]) befriedigend beschrieben werden. Demnach würde der Sättigungswert der Inhibition 34% betragen. Es zeigt sich, dass Phlorizin intrazellulär nicht als spezifischer Inhibitor arbeitet.

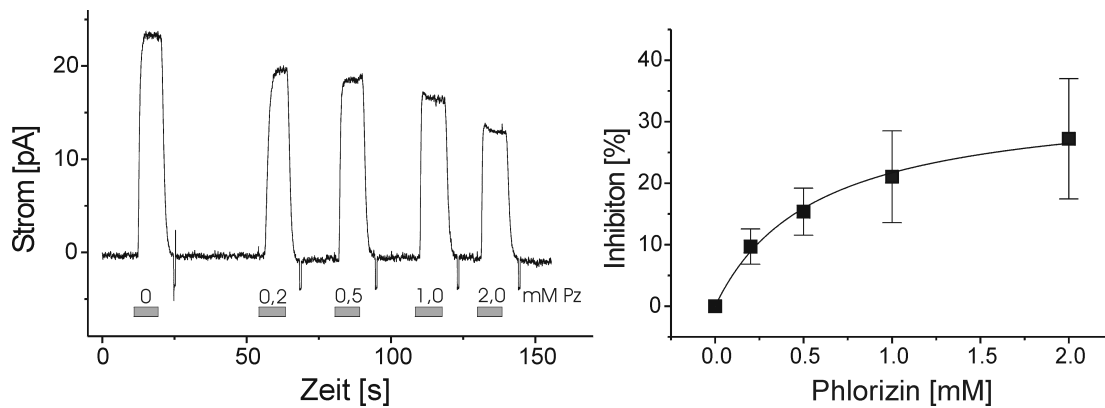


Abbildung. 31: Inhibierende Wirkung von 0 - 2 mM Phlorizin bei 10 mM α MDG in der Badlösung
 A) Original-Aufzeichnung eines Inhibitions-Experiments. Die Testlösungen enthalten verschiedene Phlorizinkonzentrationen und 10 mM α MDG, die Referenzlösung enthält kein α MDG und kein Phlorizin (Pz). Die Balken zeigen die Applikation der Testlösungen und geben die jeweiligen Phlorizinkonzentration an. B) Mittelwerte der Inhibition. Die Anwendung von 0 - 2 mM α MDG führt zu keiner vollständigen Inhibition, die erreichte Maximal-Inhibition bei 2 mM α MDG beträgt $27,2 \pm 9,7$ % (N=3). Die durchgezogene Kurve zeigt den Fit mit der Michaelis-Menten-Gleichung. Die Ströme werden auf 0 mM Phlorizin und 10 mM α MDG normiert, der Mittelwert beträgt $11,7 \pm 5,9$ pA.

3.4.2 Potentielle Inhibitoren

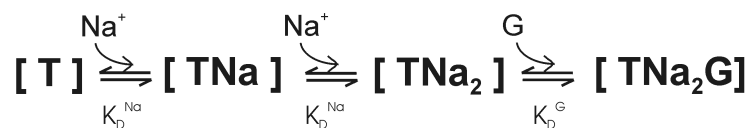
In der Literatur werden zwei weitere Substanzen beschrieben, die SGLT1 extrazellulär in ähnlich spezifischer Weise inhibieren wie Phlorizin: n-Hexyl- β -D-Glucopyranosid und Octyl- β -D-Glucopyranosid ($K_i \approx 10 \mu\text{M}$) (Kipp et al., 1996). Diese werden in den folgenden Experimenten auf ihre potentiell inhibitorische Wirkung auf die intrazelluläre Seite des SGLT1 untersucht. Dabei werden jeweils 2 mM bzw. 10 mM der Substanzen eingesetzt, mit 40 mM α MDG und 200 mM Na^+ im Bad und 0 mM Na^+ in der Pipette. Auch hier wird untersucht, ob die Zugabe von „potentiellem Inhibitor“ zu einer Testlösung mit aktivierendem α MDG in einer Inhibition des Stroms resultierte. Die beiden Substanzen zeigen weder in 2 mM noch in 10 mM Konzentration eine inhibierende Wirkung auf den Strom. Während ihrer Applikation zeigt sich jedoch eine Wirkung auf den Abdichtwiderstand: das Rauschen der Messungen nimmt bei beiden Substanzen erheblich zu, und bei längerer Einwirkung verringert sich die Höhe des Abdichtwiderstands. Da beides milde Detergenzien sind, können diese Wirkungen durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran erklärt werden.

3.5 Bindungsreihenfolge

Aus den gemessenen Abhängigkeiten der K_M -Werte für α MDG und Na^+ von der Konzentration des jeweilig anderen Substrats kann auf die intrazellulären Bindungsreihenfolge geschlossen werden (Turner, 1981). Die möglichen

Bindungsreihenfolgen sind: **1)** zuerst binden 2 Na⁺, gefolgt von der Bindung von Glucose (G) (2Na⁺:G), oder **2)** es bindet 1 Na⁺, danach Glucose und dann erst das zweite Na⁺ (Na⁺:G:Na), oder **3)** die Glucose-Bindung erfolgt vor der Bindung der 2 Na⁺-Ionen (G:2Na) (Abb. 32). Im Folgenden werden die unterschiedlichen Abhängigkeiten des $K_M^{\alpha MDG}$ und des Maximalstroms I_{Max} von der anwesenden Konzentration des Cosubstrats Na⁺ betrachtet. I_{Max} stellt den Strom dar, bei dem gewährleistet ist, dass αMDG für alle applizierten Na⁺-Konzentrationen sättigend ist, mit denen die Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit ausgeführt wird. Die theoretischen Verläufe der Abhängigkeiten des $K_M^{\alpha MDG}$ und I_{Max} von der Na⁺-Konzentration werden simuliert und mit den tatsächlich gemessenen Werten verglichen. Die beste Übereinstimmung gibt die wahrscheinliche Bindungsreihenfolge an.

1) Bindungsordnung 2Na⁺:G



2) Bindungsordnung Na⁺:G:Na⁺



3) Bindungsordnung G:2Na⁺



Abbildung 32: Mögliche intrazelluläre Bindungsreihenfolgen für Glucose (G) und Na⁺. Im ersten Fall binden zuerst 2 Na⁺-Ionen an den Transporter und zuletzt Glucose (2Na⁺:G). Im zweiten Fall bindet zuerst ein Na⁺-Ion, gefolgt von einem Glucose-Molekül und dann erst das zweite Na⁺-Ion (Na⁺:G:Na⁺). Im dritten Fall erfolgt die Bindung von Glucose vor der Bindung der 2 Na⁺-Ionen (G:2Na⁺). (K_D^G = Bindungsgleichgewichtskonstante für Glucose, K_D^{Na} = Bindungsgleichgewicht für Na⁺, [T]=leerer Transporter, [T...]= Transporter mit ... beladen.)

Die Herleitung der theoretischen Verläufe erfolgt unter der Annahme, dass die Bindungsschritte von Na⁺ und Zucker gegenüber der Translokation des vollbeladenen Transporters sehr schnell sind und sich diese Schritte deshalb im schnellen Vorgleichgewicht befinden (Segel, 1975; Turner, 1981). Deshalb können die am schnellen Vorgleichgewicht beteiligten Zustände isoliert betrachtet werden. Die einzelnen Zustände

können in Termen des leeren Transporters [T] mit Hilfe der Bindungsgleichgewichtskonstanten K_D ausgedrückt werden (s. Gleichungen [3]–[5]) (Turner, 1981)[Segel, 1975 #90. Man erhält einen Ausdruck, der der Michaelis-Menten-Gleichung entspricht, wobei dieser Ausdruck in Vorfaktoren die Abhängigkeit des K_M^{MDG} und I_{Max} von der Na^+ -Konzentration enthält.

Die Vorgehensweise soll für die Bindungsreihenfolge ($2\text{Na}^+:\text{G}$) gezeigt werden. Zuerst werden die einzelnen Zustände als Funktion des leeren Transporters [T], der Bindungsgleichgewichte K_D^{G} und K_D^{Na} und der Na^+ - und Glucose-Konzentration (Na und G) ausgedrückt (Segel, 1975; Turner, 1981). Für die Bindungsreihenfolge ($2\text{Na}^+:\text{G}$) ergibt sich für die einzelnen Zustände in der Reihenfolge ihrer Bindung:

$$K_D^{\text{Na}} = \frac{\text{Na} \cdot 2 \cdot [\text{T}]}{[\text{TNa}]} \Leftrightarrow [\text{TNa}] = \frac{\text{Na} \cdot 2 \cdot [\text{T}]}{K_D^{\text{Na}}} \quad \text{Gleichung [3]}$$

$$K_D^{\text{Na}} = \frac{\text{Na} \cdot [\text{TNa}]}{2 \cdot [\text{TNa}_2]} \Leftrightarrow [\text{TNa}_2] = \frac{\text{Na} \cdot [\text{TNa}]}{2 \cdot K_D^{\text{Na}}} \quad \text{Gleichung [4]}$$

$$K_D^{\text{G}} = \frac{\text{G} \cdot [\text{TNa}_2]}{[\text{TNa}_2\text{G}]} \Leftrightarrow [\text{TNa}_2\text{G}] = \frac{\text{G} \cdot [\text{TNa}_2]}{K_D^{\text{G}}} \quad \text{Gleichung [5]}$$

Der statistische Faktor 2 in Gleichung [3] berücksichtigt, dass es für das erste Na^+ zwei mögliche Bindungsstellen gibt. Bei der Bindung des 2. Na^+ ist nur noch eine mögliche Bindungsstelle vorhanden, was in Gleichung [4] durch den weiteren statistischen Faktor $\frac{1}{2}$ wieder ausgeglichen wird. Das Einsetzen von [3] in [4] und dieses Ergebnis in [5] ermöglicht es, alle 3 Transporterzustände [TNa], [TNa₂] und [TNa₂G] durch [T] auszudrücken.

Die folgende Gleichung gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der sich die Transporter in Zustand [TNa₂G] bezogen auf die Gesamtzahl der Transporter [T]_t befinden. Die Wahrscheinlichkeit kann maximal 1 betragen. Da der Strom von der Anzahl der Transporter im Zustand [TNa₂G] abhängt, entspricht $p([\text{TNa}_2\text{G}])$ dem Verhältnis zuckerinduzierter Strom zum Maximalstrom $I(\text{G})/I_{\text{Max}}$, das maximal 1 betragen kann:

$$p([\text{TNa}_2\text{G}]) = \frac{[\text{TNa}_2\text{G}]}{[\text{T}]_t} = \frac{[\text{TNa}_2\text{G}]}{[\text{T}] + [\text{TNa}] + [\text{TNa}_2] + [\text{TNa}_2\text{G}]} \quad \text{Gleichung [6]}$$

Durch das Einsetzen der Gleichungen für die anderen Transporterzustände in Gleichung [6], Umformen und Auflösen nach G erhält man eine Gleichung, die der Form der

Michaelis-Menten-Gleichung $\frac{I(G)}{I_{Max}} = \frac{G}{K_M^G + G}$ entspricht (Turner, 1981):

$$p([TNa_2G]) = \frac{G}{\left(\frac{K_D^{Na}}{Na} + 1\right)^2 \cdot K_D^G + G} \quad \text{Gleichung [7]}$$

Der apparente $K_M^{\alpha MDG}$ der Michaelis-Menten-Gleichung entspricht in Gleichung [7] der Bindungsgleichgewichtskonstanten K_D^G multipliziert mit dem Vorfaktor $\left(\frac{K_D^{Na}}{Na} + 1\right)^2$, der die Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration enthält.

In diesem Fall tritt für I_{Max} kein Vorfaktor auf, d. h. der Maximalstrom zeigt keine Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration für den Fall, dass die Glucose-Konzentration sättigend ist.

Die anderen Bindungsreihenfolgen werden analog berechnet. In Tab. 9 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Bindungsreihenfolge	2Na:G	Na:G:Na	G:2Na
I(G)	$(1) \cdot I_{Max}$	$\left(\frac{1}{\frac{K_D^{Na}}{2 \cdot Na} + 1}\right) \cdot I_{Max}$	$\left(\frac{1}{\left(\frac{K_D^{Na}}{Na} + 1\right)^2}\right) \cdot I_{Max}$
K_M^G	$\left(\frac{K_D^{Na}}{Na} + 1\right)^2 \cdot K_D^G$	$\left(\frac{K_D^{Na} + 2 \cdot K_D^{Na} \cdot Na}{2 \cdot K_D^{Na} \cdot Na + Na^2}\right) \cdot K_D^G$	$\frac{(K_D^{Na})^2}{(K_D^{Na} + Na)^2} \cdot K_D^G$

Tabelle 9: Vorfaktoren für den Strom I(G) und die apparente Affinität K_M^G bei verschiedenen Bindungsreihenfolgen der Substrate.

Die Simulation der theoretischen Verläufe erfolgt mit den Gleichungen aus Tab. 9, was die Kenntnis der Bindungskonstanten K_D^{Na} und K_D^G voraussetzt. Da für K_D^{Na} und K_D^G keine Messungen existieren, werden stattdessen die K_M^{Na} und $K_M^{\alpha MDG}$ eingesetzt, die bei der Messung mit sättigender αMDG - bzw. Na^+ -Konzentration erhalten werden. In diesem Fall hat die Konzentration des einen Substrats den geringsten Einfluss auf die apparente

Affinität des anderen Substrats. K_D^{Na} wird durch $K_M^{\text{Na}} = 38,2 \text{ mM Na}^+$ (bei $250 \text{ mM } \alpha\text{MDG}$) und K_D^{G} durch $K_M^{\text{G}} = 2,5 \text{ mM } \alpha\text{MDG}$ (bei 400 mM Na^+) ersetzt. Die Konstante I_{Max} wird gleich 1 gesetzt werden, da der Strom normiert wird.

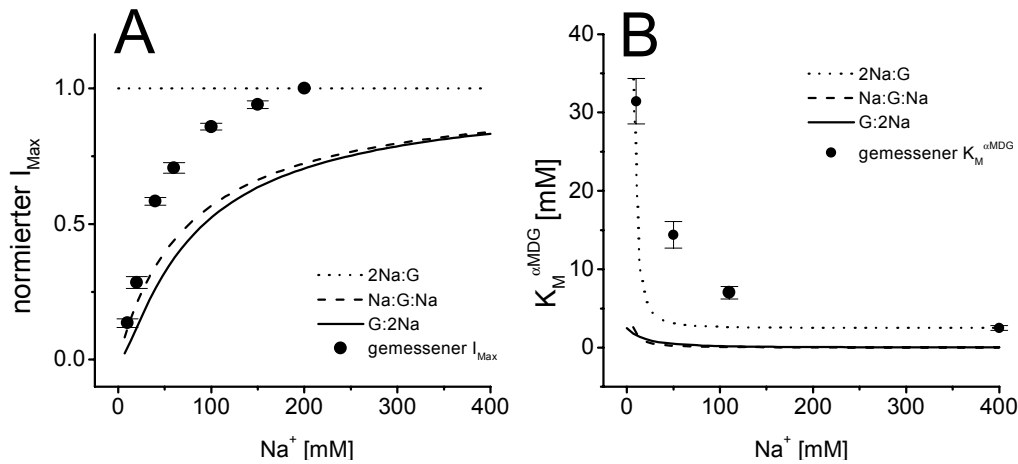


Abbildung 33: Vergleich der gemessenen und simulierten Ergebnisse für verschiedenen Bindungsreihenfolgen. A) Simulation des I_{Max} in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration für die jeweilige Bindungsreihenfolge und Darstellung des tatsächlich gemessenen I_{Max} mit $250 \text{ mM } \alpha\text{MDG}$ bei verschiedenen Na^+ -Konzentrationen. B) Simulationen des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration für die jeweilige Bindungsreihenfolge und Darstellung der tatsächlich gemessenen $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bei verschiedenen Na^+ -Konzentrationen.

Abb. 33 A) zeigt die simulierten und den tatsächlich gemessenen Verläufe von I_{Max} . Der Stromverlauf I_{Max} stammt aus der Messung der Na^+ -Abhängigkeit der zuckerinduzierten Ströme bei $250 \text{ mM } \alpha\text{MDG}$. Die Zuckerkonzentration ist bei allen applizierten Na^+ -Konzentrationen sättigend, denn in dieser Arbeit wird gezeigt, dass bei der niedrigsten getesteten Na^+ -Konzentration von 10 mM Na^+ der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ $30,4 \text{ mM } \alpha\text{MDG}$ beträgt. Die Simulationen für (Na:G:Na) und (G:2Na) zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf, der sich deutlich vom Verlauf für (2Na:G) unterscheidet. Die ersten beiden zeigen zwischen 400 und 0 mM Na^+ einen deutlichen Abfall des I_{Max} , wobei auffällt, dass der Maximalstrom $I_{\text{Max}} = 1$ im betrachteten Konzentrationsbereich gar nicht erreicht wird, sondern nur bei deutlich höheren Na^+ -Konzentrationen als 400 mM gegen 1 geht. Die Simulation für (2Na:G) ist konstant gleich 1, da die Gleichung in Tab. 9 keinen Vorfaktor für I_{Max} besitzt. Bei gegen 0 mM gehenden Na^+ -Konzentrationen muss dies natürlich auch Auswirkungen auf den Maximalstrom haben, indem durch die nicht erfolgte Na^+ -Bindung der Turnover verringert wird und damit I_{Max} abnehmen und auch gegen 0 gehen muss. Die Simulation für (2Na:G) nähert die gemessenen Werte am besten an: $I_{\text{Max}} = 1$

wird im betrachteten Konzentrationsbereich gemessen, und der Abfall erfolgt erst bei relativ kleinen Na^+ -Konzentrationen.

Abb. 33 B) zeigt die simulierten Verläufe des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ und die tatsächlich gemessenen Werte in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration. Auch hier verlaufen die Kurven für (Na:G:Na) und (G:2Na) sehr ähnlich, zwischen 0 und ca 20 mM Na^+ fallen sie von 2,5 mM auf annähernd 0 mM, und verlaufen zwischen 20-400 mM annähernd konstant bei 0 mM. Im Gegensatz dazu zeigt die Simulation für (2Na:G) zwischen 0 und 20 mM Na^+ einen steilen Abfall von 34,2 mM auf 3,0 mM zwischen 0-60 mM Na^+ , und verläuft zwischen 60-400 mM Na^+ annähernd konstant bei einem $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von 2,5 mM αMDG . Die gemessenen $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ zeigen auch hier wieder eine deutlich bessere Übereinstimmung mit der Simulation für (2Na:G). Die Messwerte bei 400 mM Na^+ (2,5 mM) und 10 mM Na^+ (30,4 mM) stimmen mit der Simulation überein, die beiden anderen Messwerte nähern den Verlauf gut an.

3.6 Vergleichgewichtsströme

In Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Experimenten konnten durch schnelle Spannungssprünge Vergleichgewichtsströme des SGLT1 hervorgerufen werden (Parent et al., 1992a; Loo et al., 1993; Chen et al., 1996; Hazama et al., 1997). Diese erlauben einen Einblick in den Mechanismus des Transporters und ermöglichen eine Abschätzung der Geschwindigkeitskonstanten für einzelne Transportschritte. Danach beeinflusst das Membranpotential die spannungsabhängige extrazelluläre Na^+ -Bindung, z. B. durch eine Veränderung der Na^+ -Konzentration an der Na^+ -Bindungsstelle. Durch einen Spannungssprung wird das vorliegende Gleichgewicht gestört. Die Neuorientierung der Transporterzustände kann durch zeitaufgelöste Messungen als transiente Vergleichgewichtsströme mit Zeitkonstanten von einigen Millisekunden und vermutlich im sub-Millisekunden-Bereich detektiert werden (Parent et al., 1992a; Loo et al., 1993; Chen et al., 1996; Hazama et al., 1997). Die Zeitauflösung ist bei der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik wegen der hohen Kapazität der Ozytenmembran auf ca. 1 ms limitiert. Durch die ca. 25000mal kleinere Membranfläche an Makropatchen, verbunden mit einem niedrigeren Zugriffswiderstand, kann eine deutlich höhere Zeitauflösung erreicht werden.

Die nächsten Abschnitte zeigen die Resultate von Messungen am auswärts- und am einwärts transportierenden SGLT1. Dabei wird auch auf die Problematik der Pipettenkapazität eingegangen, die bei einer Patchmessung im Gegensatz zu einer Zwei-

Elektroden-Voltage-Clamp-Messung nicht vernachlässigbar ist, da sie in der gleichen Größenordnung liegt wie die Patchkapazität.

3.6.1 Einfluss der Pipettenkapazität auf die Ergebnisse

Zu Beginn eines Spannungssprungs werden nicht nur die Kapazität der Zellmembran und der darin enthaltenen Transporter umgeladen, sondern es erfolgt auch eine Umladung der systembedingten Kapazitäten, z. B. der Pipettenkapazität. Dies zeigt sich in zusätzlichen Transienten, die die Auswertung der Ergebnisse erschweren, wie die ersten Versuche am auswärtstransportierenden SGLT1 zeigen. Die Badlösung enthält dabei eine hohe Na^+ -Konzentration und kein αMDG , die Pipettenlösung 2 mM Na^+ , so dass unter diesen Umständen maximale Vorgleichgewichtsströme auftreten sollten. Es wird dabei das relativ dünnwandige Pipettenglas N51A mit einer Wandstärke von $0,25 \text{ mm}$ benutzt, mit dem die vorherigen Messungen zur Konzentrations- und Spannungsabhängigkeit durchgeführt werden. Die Filterfrequenz beträgt 5 kHz , die Abtastrate 10 kHz . Die transienten Ströme in diesen Experimenten zeigen 3 Zeitkonstanten, z.B. τ_1 im Bereich zwischen $2,9 - 7,5 \text{ ms}$, τ_2 zwischen $0,4 - 1,2 \text{ ms}$ und τ_3 zwischen $0,03 - 0,2 \text{ ms}$. τ_3 entspricht dabei der Beschränkung der Zeitauflösung auf ca. $120 \mu\text{s}$ durch den verwendeten Filter von 5 kHz . τ_1 und τ_2 liegen in dem Zeitbereich der in der Literatur gefundenen Werte (Parent et al., 1992a; Loo et al., 1993; Chen et al., 1996; Hazama et al., 1997).

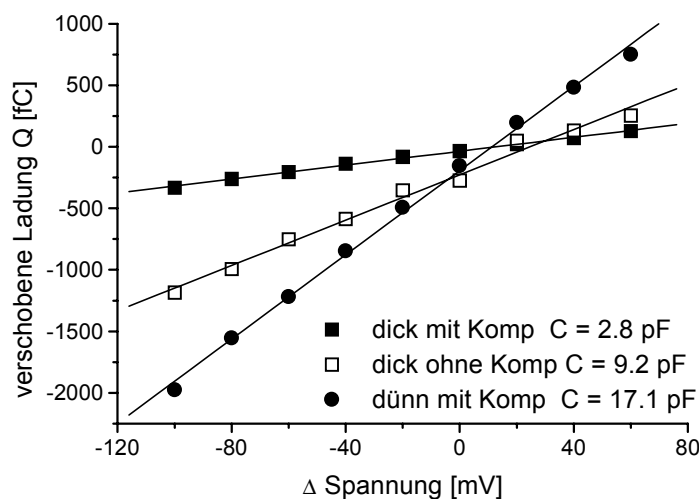


Abbildung 34: Bestimmung der Pipettenkapazität für dünnwandiges und dickwandiges Glas. Der lineare Anstieg der verschobenen Ladung Q bei einem Spannungssprung $\Delta\text{Spannung}$ ergibt die Pipettenkapazität, wobei sich deutliche Unterschiede zwischen dick- und dünnwandigem Pipettenglas ergeben.

Allerdings finden sich diese Zeitkonstanten auch bei Messungen in zuckerhaltiger Badlösung und auch überraschenderweise in Kontroll-Messungen an nichtinjizierten Oozyten. Dies deutet auf eine sehr große Kapazität im Bereich der Pipette oder der Membran hin, deren Zeitkonstante die Zeitkonstante von möglichen Vorgleichgewichtströmen überlagert. Deshalb wird durch Verwendung eines dickwandigeren Pipettenglases untersucht, ob die Pipettenkapazität die langsame Zeitkonstante verursacht. Das Pipettenglas GC150-7.5 besitzt eine Wandstärke von 0,32 mm. Dazu wird die reine Pipettenkapazität mit und ohne Pipettenkapazitäts-Kompensation bestimmt. Die Pipettenöffnung wird mit einer Lipidlösung „verstopft“ (s. 2.4.2.4), wodurch eine hochohmige Lipidschicht entsteht, die eine deutlich geringere Kapazität verglichen mit der Patch-Kapazität aufweist. Mit dieser Pipette werden Spannungssprünge von 0 mV auf -100 mV bis +100 mV in 20 mV-Schritten ausgeführt mit einer Filterfrequenz von 10 kHz und einer Aufnahme Frequenz von 200 kHz. Die verschobene Ladung Q wird durch das Integral über den transienten Strom berechnet und gegen die Potentialdifferenz aufgetragen. Die Steigung ergibt die Kapazität ($C = \frac{Q}{\Delta U}$).

Der Vergleich der Kapazitäten einer dünnwandigen und einer dickwandigen Pipette ist in Abb. 34 dargestellt. Bei der dickwandigen Pipette wird die Kapazitätsbestimmung mit und ohne Pipettenkapazitätskompensation durchgeführt. Diese Bestimmung war für die dünnwandige Pipette nur mit Kompensation möglich, da die kapazitiven Transienten mit Amplituden > 20 nA den Verstärker auch bei dem kleinsten Verstärkungsfaktor von 0,5 mV/pA übersteuerten. Die Kompensation verringert die messbare Pipettenkapazität der dickwandigen Pipette um den Faktor 3,3 von 9,2 pF auf 2,8 pF. Die Kapazität der dünnwandigen Pipette dagegen ist trotz Kompensation mit 17,1 pF immer noch sechs mal größer als die der dickwandigen. Somit ist die Benutzung der dickwandigen Pipetten wegen ihrer deutlich kleineren Kapazität angebracht für die Messung der Vorgleichgewichtsströme. Die Zeitkonstanten der Transienten aufgrund der Pipettenkapazität von ca. 5 pF mit einem geschätzten Zugangswiderstand $R_A = 1$ M Ω werden mit $\tau = R_A \cdot C \approx 1$ M $\Omega \cdot 5$ pF ≈ 5 μ s abgeschätzt, wobei die Filterfrequenz von 50 kHz eine maximale Zeitauflösung von ca. 7 μ s erlaubt, die Transienten der Pipettenkapazität also durch die Bandbreite limitiert werden.

3.6.2 Kapazität des Patches

In zwei Messungen wird die Kapazität des Patches bestimmt. Zuerst erfolgt eine dreimalige Bestimmung der Kapazität von Pipette mit intaktem Patch, danach wird der

Patch zerstört und nur die Pipettenkapazität wie oben bestimmt. Die Differenz ergibt die Kapazität des Patches. Die Kapazität(Patch+Pip) beträgt $19,1 \pm 0,03$ pF, die Kapazität(nur Pip) beträgt $12,6 \pm 0,7$ pF. Für die Kapazität des Patches ergibt sich somit $6,5 \pm 0,7$ pF.

3.6.3 Vergleichgewichtsströme des Auswärtstransports

In diesen Experimenten wird der SGLT1 im Glucose-Auswärtstransport-Modus betrachtet. Die Messbedingungen sind in Abb. 35 A zusammengefasst. Die Spannungssprünge erfolgen von einem Haltepotential von 0 mV zunächst auf ein Haltepotential von +50 mV, danach auf -100 mV bis +60 mV in 20 mV-Schritten, gefolgt vom Rücksprung auf 0 mV. Der Vorpuls auf +50 mV verursacht dabei eine Reorientierung des leeren, negativ geladenen Transporters auf die intrazelluläre Membranseite. In der Badlösung befindet sich eine hohe Konzentration von 200 mM Na^+ , in der Pipette eine geringe Konzentration von 1 mM Na^+ . Es wird zwischen einer aktivierenden Badlösung mit 100 mM α MDG und einer nichtaktivierenden Badlösung mit 100 mM Mannitol gewechselt. Die Beobachtungen der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Messungen lassen erwarten, dass Vergleichgewichtsströme nur bei der nichtaktivierenden Badlösung auftreten.

Messungen der transienten Ströme nach Spannungssprüngen an einer SGLT1-injizierten Oozyte sind in Abb. 35 B (100 mM α MDG) und Abb. 35 C (100 mM Mannitol) dargestellt. Der zuckerinduzierte stationäre Strom dieses Patches wird durch den Wechsel von Mannitol-haltiger auf α MDG-haltige Badlösung zu 11,2 pA bestimmt. In Anwesenheit von α MDG (Abb. 35 B) ergibt sich für den größten Spannungssprung von +50 mV auf -100 mV ein Maximalstrom von 6,1 nA. Der Anstieg des Stroms nach dem Beginn des Spannungssprungs ist zu schnell, um bei der verwendeten Filterfrequenz aufgelöst werden zu können. Der Abfall des transienten Stroms kann durch die Summe zweier Exponentialfunktionen angefitet werden, wobei die langsamere Zeitkonstante $\tau_{1 \alpha\text{MDG}}$ im Bereich von 42 - 60 μs liegt und keine Spannungsabhängigkeit zeigt (Abb. 35 E). $\tau_{2 \alpha\text{MDG}}$ liegt relativ konstant bei 3 μs und ist durch die Filterbandbreite bedingt. In der α MDG-freien Badlösung (Abb. 35 C) erreicht der Maximalstrom eine höhere Amplitude von 9,0 nA bei demselben Spannungssprung. Auch hier kann der Anstieg des transienten Stroms nicht aufgelöst werden. Der Abfall des Stroms kann mit 2 Exponentialfunktionen angefitet werden, wobei $\tau_{2 \text{Manni}}$ mit ca. 3 μs durch die Filterbandbreite bestimmt ist. $\tau_{1 \text{Manni}}$ liegt im Bereich zwischen 30 und 55 μs und zeigt

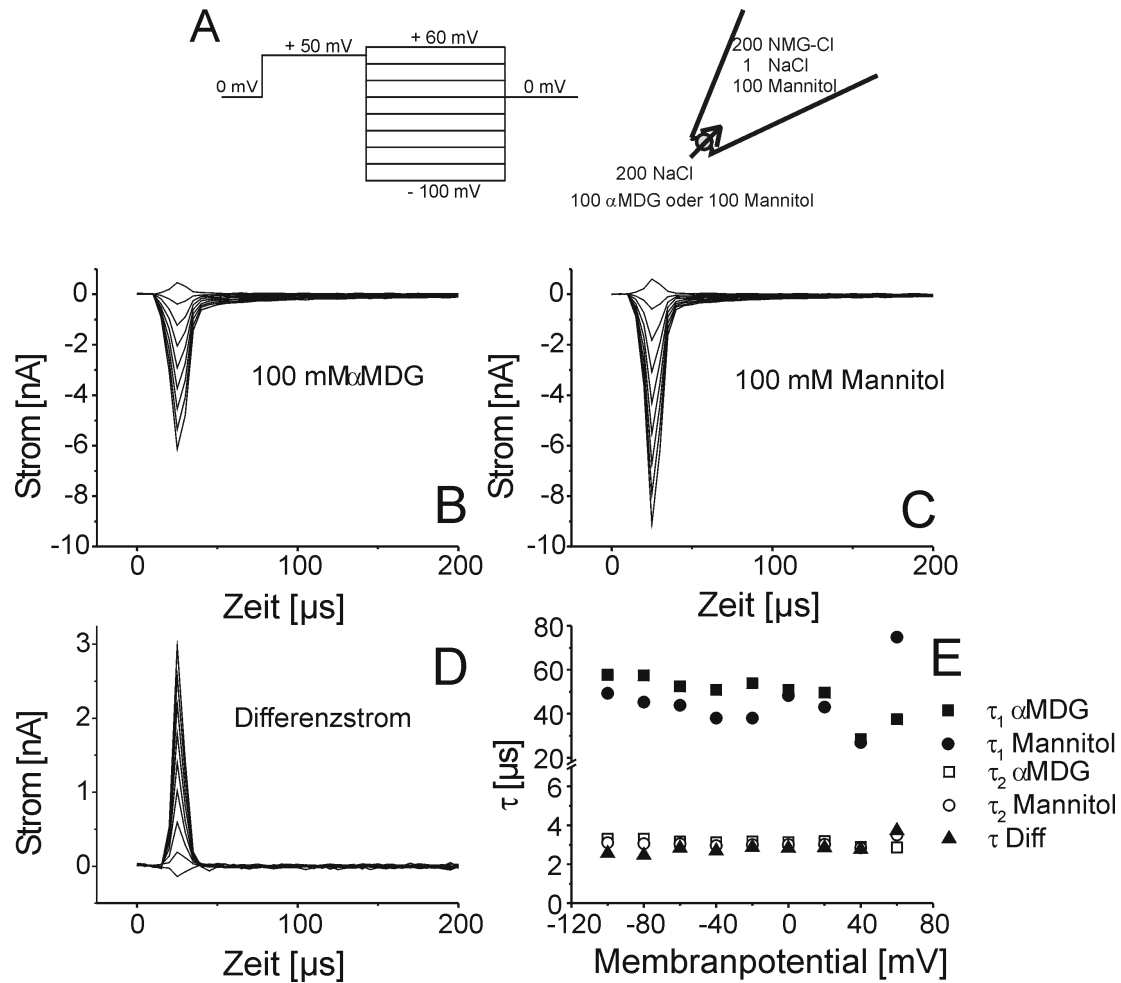


Abbildung 35: Vergleichgewichtsströme nach Spannungssprüngen für den Auswärtstransport an einer SGLT1-injizierten Oozyte. A) Spannungsprotokoll und Zusammensetzung von Bad- und Pipettenlösung. Der Pfeil zeigt die Richtung des Auswärtstransports an. B) Vergleichgewichtsströme bei 100 mM α MDG in der Badlösung. C) Vergleichgewichtsströme bei 100 mM Mannitol in der Badlösung. D) Differenz der Ströme aus den Abb. B-C. E) Zeitkonstanten der Exponential-Fits der Vergleichgewichtsströme aus den Abb. B – D.

keine Spannungsabhängigkeit (Abb. 35 E). Die Differenz der transienten Ströme in der α MDG- und Mannitol-haltigen Badlösung ist in Abb. 35 D dargestellt. Die Maximalamplitude des Differenzstroms beträgt 3,0 nA. Zur Anpassung des Stromabfalls wird nun nur eine Exponentialfunktion mit der Zeitkonstanten τ_{Diff} von 2,5 bis 3,7 μ s benötigt, wobei τ_{Diff} wieder durch die Filterbandbreite bestimmt ist.

In den zwei durchgeführten Versuchen zeigt sich bei der Applikation von 100 mM Mannitol immer ein höherer Maximalstrom als bei 100 mM α MDG, der auch mit einer um 4-8 % höheren verschobenen Ladung einhergeht. Allerdings kann dieser Effekt auch bei Kontroll-Experimenten an nichtinjizierten Oozyten beobachtet werden (siehe unten). $\tau_{2 \alpha\text{MDG}}$ und $\tau_{2 \text{Manni}}$ sind in der gleichen Größenordnung, es zeigen sich also keine

zusätzlichen spannungsabhängigen Vergleichgewichtsströme bei 100 mM Mannitol, die auf eine Umorientierung des SGLT1 schliessen lassen.

Abb. 36 zeigt die analogen Messungen an einer Kontroll-Oozyte, die nicht mit RNA für SGLT1 injiziert wird. Die Spannungssprünge erfolgen von +50 mV auf -100 mV bis +100 mV. Abb. 36 A stellt die gemessenen Vergleichgewichtsströme in der Badlösung mit 100 mM α MDG dar, Abb. 36 B die Vergleichgewichtsströme in der Badlösung mit 100 mM Mannitol. Die Maximalamplitude des Spannungssprungs von +50 mV auf -100 mV beträgt in Anwesenheit von 100 mM α MDG 15,0 nA, bei 100 mM Mannitol 20,2 nA. Der Abfall der Vergleichgewichtsströme läßt sich für beide Bedingungen mit 2 Exponentialfunktionen befriedigend anfitten. Die schnellen Zeitkonstanten $\tau_{2 \alpha\text{MDG}}$ und $\tau_{2 \text{Manni}}$ (Abb. 36 D) sind durch die Filterbandbreite bestimmt und liegen zumeist im Bereich von 5 μ s (100 mM Mannitol) und 4 μ s (100 mM α MDG). Die langsamere Zeitkonstante in Anwesenheit von α MDG, $\tau_{1 \alpha\text{MDG}}$ zeigt über den betrachteten Spannungsbereich keine Spannungsabhängigkeit. Sie beträgt ca. 70-80 μ s und ist etwa halb so groß wie die Zeitkonstante $\tau_{1 \text{Manni}}$ in Anwesenheit von 100 mM Mannitol. $\tau_{1 \text{Manni}}$ beträgt ca. 150-160 μ s und ist spannungsunabhängig. Überraschenderweise zeigt auch der Differenzstrom bei der Kontroll-Oozyte noch transiente Ströme (Abb. 36 C), wobei die Maximalamplitude immerhin 9,7 nA beträgt. Die Differenzströme lassen sich im Gegensatz zu den Originalmessungen durch eine Exponentialfunktion mit der Zeitkonstanten τ_{Diff} anfitten. τ_{Diff} liegt relativ konstant bei ca. 3 μ s und ist durch die Filterbandbreite bestimmt. Dies gilt auch für die schnellen Zeitkonstanten $\tau_{2 \alpha\text{MDG}}$ und $\tau_{2 \text{Manni}}$.

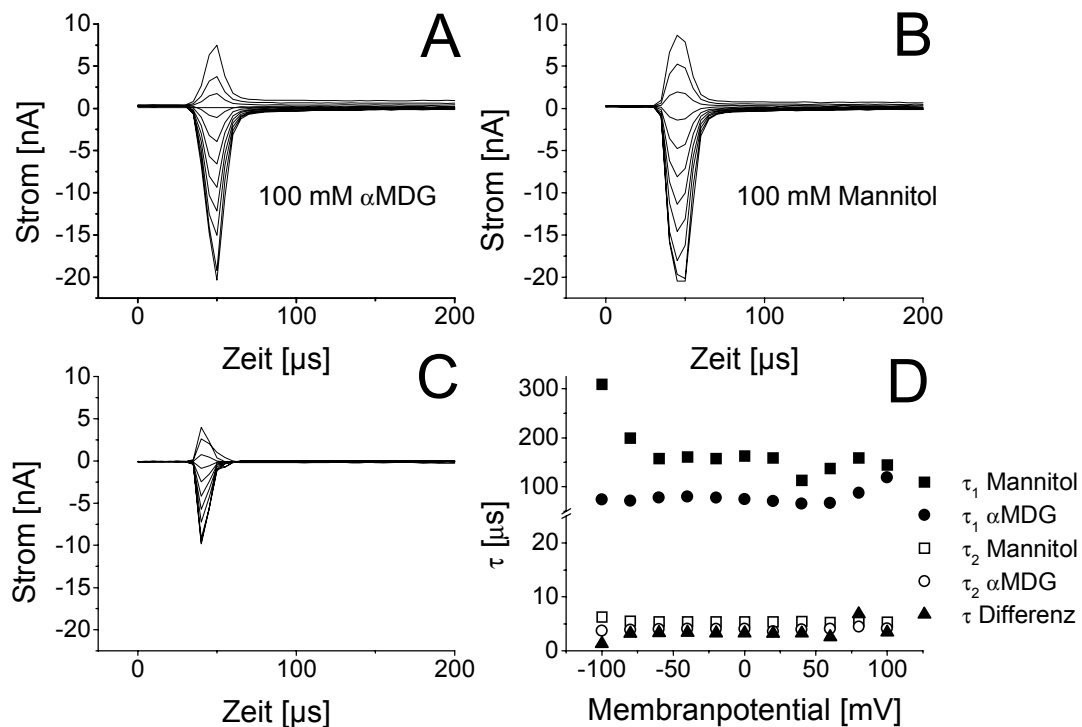


Abbildung 36: Vergleichgewichtsströme nach Spannungssprüngen für den Auswärtstransport an einer Kontroll-Oozyte. A) Vergleichgewichtsströme bei 100 mM α MDG in der Badlösung. B) Vergleichgewichtsströme bei 100 mM Mannitol in der Badlösung. C) Differenz der Ströme aus den Abb. A - B. D) Zeitkonstanten der Exponential-Fits der Vergleichgewichtsströme aus den Abb. A - C.

3.6.4 Vergleichgewichtsströme des Einwärtstransports

Für den Glucose-Auwärtstransport können also keine Vergleichgewichtsströme gemessen werden, die auf eine Neuorientierung des SGLT1 zurückzuführen sind. Die nächsten Experimente sollen überprüfen, ob sich mit der Makropatch-Technik im Einwärtstransport Vergleichgewichtsströme mit ähnlichen Zeitkonstanten nachweisen lassen, wie sie an der ganzen Oozyte mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik gefunden werden (Parent et al., 1992a; Loo et al., 1993; Chen et al., 1996; Hazama et al., 1997).

Um einen Einwärtstrom an einem Patch in der inside-out-Konfiguration zu messen, werden die sättigenden Konzentrationen von 2 mM α MDG und 110 mM Na^+ in der Pipettenlösung angeboten, so dass sich ein Einwärtstransport ergibt (Abb. 37 A). Die Badlösung enthält 1 mM Na^+ , 110 mM NMG-Cl, aber keinen Zucker. Die Referenzmessung ohne aktivierten Transporter erfolgt an einem 2. Patch derselben Oozyte, wobei die Pipettenlösung kein α MDG bei 110 mM Na^+ enthält. Das Spannungsprotokoll gibt einen Vorpuls von 0 mV auf -70 mV vor, durch den die leeren

Transporter zur Membran-Außenseite hin ausgerichtet werden. Anschließend erfolgen die Spannungssprünge auf -100 mV bis +100 mV in 20 mV-Schritten, danach auf -70 mV und wieder auf 0 mV zurück (Abb. 37 A).

Die Überprüfung, dass SGLT1 in der Oozyte sicher exprimiert ist, muss über den Auswärtstransport erfolgen (siehe 2.4.2.3). Dafür werden Badlösungen mit höherer Na⁺-Konzentration (200 mM Na⁺) verwendet, wodurch bei Applikation von 100 mM α MDG ein Auswärtsstrom generiert wird. In der nachfolgenden Messung beträgt der stationäre Auswärtsstrom am ersten Patch bei der Messung mit 2 mM α MDG in der Pipette 6,0 pA, am zweiten Patch ohne Zucker in der Pipette 9,1 pA.

Abb. 37 B zeigt die Messung der Vergleichgewichtsströme an einem Patch ohne Aktivierung des Einwärtstransports, d. h. ohne α MDG in der Pipette. Die Vergleichgewichtsströme mit aktiviertem Einwärtstransport (2 mM α MDG in der Pipette) an einem anderen Patch derselben Oozyte sind in (Abb. 37 C) dargestellt. Ohne α MDG in der Pipettenlösung ergibt sich ein Maximalstrom von ca. 20 nA beim größten Sprung von 70 mV auf +100 mV. Die Vergleichgewichtsströme lassen sich am besten mit 2 Exponentialfunktionen anfitten (Abb. 38 D). $\tau_{1\text{ ohne}}$ zeigt keine Spannungsabhängigkeit und liegt bei ca. 72 μ s. $\tau_{2\text{ ohne}}$ beträgt ca. 5 μ s und ist durch die Filterbandbreite bestimmt. Bei Anwesenheit von 2 mM α MDG in der Pipettenlösung ergibt sich ein Maximalstrom von 15 nA beim größten Sprung von -70 mV auf +100 mV. Zum Anfitten der Vergleichgewichtsströme ist eine Exponentialfunktion ausreichend, wobei die Zeitkonstante $\tau_{\alpha\text{MDG}}$ im Bereich von 6 μ s liegt und durch die Filterbandbreite bestimmt ist.

Ein direkter Vergleich der Zeitkonstanten, die an verschiedenen Patches derselben Oozyte mit und ohne α MDG in der Pipette bestimmt werden, ist nicht möglich, da bei jedem Patch leicht verschiedene Messbedingungen vorliegen. Betrachtet man jedoch die Größenordnungen der Zeitkonstanten eines Experiments, so zeigen die Messungen am Patch eine deutliche Diskrepanz zu den Voltage-Clamp-Experimenten an ganzen Oozyten. An der ganzen Oozyte wurde eine Zeitkonstante im ms-Bereich bestimmt, die auf einen langsamen Umorientierungsschritt des SGLT1 zurückzuführen ist. Am Patch wird eine solche Zeitkonstante im ms-Bereich nicht beobachtet, obwohl die gleichen Messbedingungen wie in den Voltage-Clamp-Experimenten vorlagen.

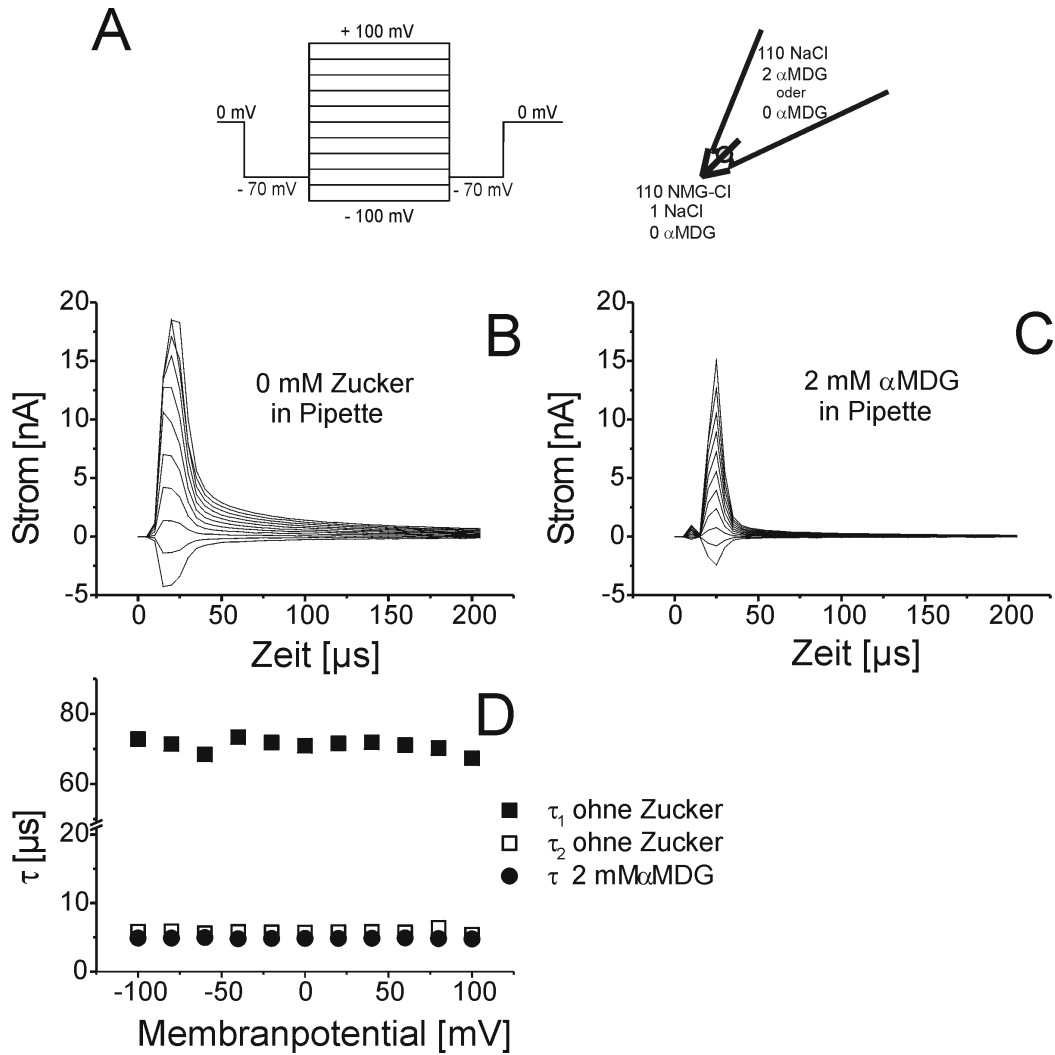


Abbildung 37: Vergleichgewichtsströme nach Spannungssprüngen für den Einwärtstransport an einer SGLT1-injizierten Oozyte. A) Spannungsprotokoll und Konzentrationsbedingungen des Substrats und des Cosubstrats in Pipette und Bad. Der Pfeil stellt die Richtung des Einwärtstransports dar. B) Vergleichgewichtsströme ohne α MDG in der Pipettenlösung am ersten Patch der Oozyte. C) Vergleichgewichtsströme mit 2 mM α MDG in der Pipettenlösung an einem zweiten Patch derselben Oozyte. D) Zeitkonstanten der Exponential-Fits der Vergleichgewichtsströme aus den Abb. B und C.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Charakterisierung des Glucose-Auswärtstransports, der durch den Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1 generiert wird. SGLT1 wird dazu in Oozyten überexprimiert und mit der „giant-excised-patch-Clamp“-Technik untersucht. Durch die Verwendung der inside-out-Konfiguration ist die intrazelluläre Membranseite der Badlösung zugewandt, und somit eignet sich die „giant-excised-patch-clamp“-Technik sehr gut dazu, die Eigenschaften der intrazellulären Bindungsstellen zu untersuchen. Auch die Haltepotentialbedingungen können genau und sehr schnell durch die geringe Kapazität des Membranflecks geändert werden. Da bisher wenig bekannt ist über die intrazellulären Eigenschaften des SGLT1, liegen die Schwerpunkte dieser Arbeit in der Untersuchung der intrazellulären apparenten Affinitäten für das Substrat αMDG und das Cosubstrat Na⁺ und ihre gegenseitige Beeinflussung bei einem Haltepotential von 0 mV. Diese Ergebnisse erlauben eine Bestimmung der intrazellulären Bindungsreihenfolge von Substrat und Cosubstrat. Durch die Bestimmung der intrazellulären Affinitäten für αMDG und Na⁺ bei unterschiedlichen Haltepotentialen kann der Einfluss des Membranpotentials gezeigt werden. Zeitaufgelöste Spannungssprung-Experimente zeigen weder für den Glucose-Einwärtstransport noch für den –Auswärtstransport Vergleichsgleichgewichtsströme durch eine spannungsabhängige Neuorientierung der Transporterzustände des SGLT1.

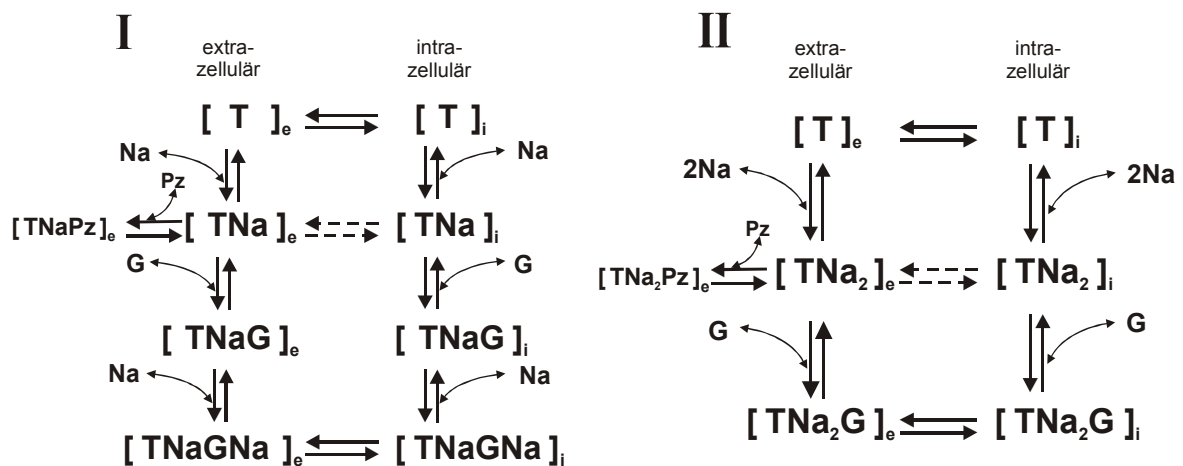


Abbildung 38: Vorgeschlagene Transportmodelle (s. Kap. 1.1.6)

Im Folgenden werden die Ergebnisse interpretiert und auf ihre Übereinstimmung mit den beiden vorgeschlagenen Transportmodellen (Abb. 38) überprüft. Beide Transportmodellen beinhalten dabei die Vorstellung, dass es eine Bindungsstelle für Zucker und

zwei für Na^+ gibt, die durch Konformationsänderungen während der Translokationsschritten entweder von der Aussenseite oder von der Innenseite zugänglich sind (Kessler and Semenza, 1983; Wright et al., 1998).

4.1 Intrazelluläre Affinitäten für Substrate und Inhibitoren

Die hier ermittelten Affinitäten sind apparente Affinitäten, die von den jeweiligen Messbedingungen abhängen, d. h. vom anliegenden Membranpotential, vom Na^+ -Gradienten, der die treibende Kraft für den Transport darstellt und von den jeweiligen Konzentrationen des Substrats Zucker und des Cosubstrats Na^+ .

4.1.1 Affinität für αMDG

Die apparente intrazelluläre Affinität des SGLT1 für αMDG wird in der vorliegenden Arbeit durch die Messung der zuckerinduzierten stationären Ströme bei verschiedenen festen Na^+ -Konzentrationen (siehe 3.2.1) ermittelt. Der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ zeigt eine starke Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration: eine Erhöhung ausgehend von 10 mM Na^+ auf 50, 110 und 400 mM Na^+ verursacht eine Erniedrigung des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von $30,4 \pm 4,2$ mM αMDG auf $16,4 \pm 3,1$ mM, $7,7 \pm 1,6$ mM und $2,6 \pm 0,5$ mM αMDG bei $\text{HP} = 0$ mV. Aus der Abhängigkeit des apparenten $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von der Na^+ -Konzentration können Rückschlüsse auf die Bindungsreihenfolge des Substrats und des Cosubstrats gezogen werden (siehe 3.5). Die αMDG -Affinität zeigt zusätzlich eine Abhängigkeit vom Membranpotential. Das spannungsabhängige Verhalten ist in 3.3.2 gezeigt und wird in 4.1.1.4 diskutiert.

4.1.1.1 Abhängigkeit der αMDG -Affinität von der Na^+ -Konzentration

Die apparente αMDG -Affinität wurde bei verschiedenen intrazellulären Na^+ -Konzentrationen bei $\text{HP} = 0$ mV bestimmt. Es zeigt sich deutlich, dass mit zunehmender Na^+ -Konzentration der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ kleiner wird. Bei hohen Na^+ -Konzentrationen strebt $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ einem konstanten Wert zu (siehe 3.2.1.6). Die hohe Na^+ -Konzentration scheint hier alle Na^+ -Bindungsstellen zu sättigen, wodurch der größte Teil der Transporter im Na^+ -gebundenen Zustand $[\text{TNa}_2]_i$ vorliegt (Abb. 38 Modell II). Eine geringe Zucker-Konzentration ist dann ausreichend, um das Gleichgewicht in Richtung Substrat-Translokation $[\text{TNa}_2\text{G}]_i \leftrightarrow [\text{TNa}_2\text{G}]_e$ zu verschieben und damit die maximale Transportrate I_{Max} zu erreichen. Liegt Na^+ in einer niedrigeren, nichtsättigenden

Konzentration vor, so existiert eine kleinere Anzahl von Na^+ -gebundenen Transportern $[\text{TNa}_2]_i$, an die im nächsten Schritt die Zuckerbindung erfolgen kann. Um alle Na^+ -gebundenen Transporter mit Zucker zu beladen, wird eine höhere Zuckerkonzentration benötigt, um das Gleichgewicht in der gleichen Weise in die Richtung des Translokationsschritts zu ziehen. Dies zeigt sich an einem höheren $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ -Wert.

Dass ein Glucose-Auswärtstransport auch ohne einen anliegenden Na^+ -Gradienten stattfinden kann, zeigen die Messungen mit 10 mM Na^+ in der Badlösung und in der Pipette (siehe 3.2.1.4). Allerdings ist die apparente Affinität bei einem $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von 72,3 mM αMDG sehr gering. Führt man die gleichen Versuche mit einem Na^+ -Gradienten durch, wobei die Pipettenlösung 0 mM Na^+ enthält, ist die apparente Affinität mehr als doppelt so groß bei einem $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von 30 mM αMDG (siehe 3.2.1.3). Dies zeigt, dass auch der αMDG -Gradient alleine als treibende Kraft für den Transport fungieren kann. Allerdings führt dies zu einem eingeschränkten Transport der Substrate und es zeigen sich nur sehr kleine Ströme, z. B. ist der Mittelwert der zuckerinduzierten Ströme bei der maximalen αMDG -Konzentration nur 2,9 pA. Der Grund dafür liegt vermutlich darin, dass die Na^+ -Bindung durch den Gradient gefördert wird und mehr Transporter im Zustand $[\text{TNa}_2]_i$ vorliegen als ohne Gradient.

Aus der Art der Abhängigkeit der K_M für Substrat und Cosubstrat kann mit weiteren Informationen über den Maximalstrom bei jeweils sättigender Konzentration des anderen Substrats die Bindungsreihenfolge der Substrate bestimmt werden (siehe 3.5) und die Fragestellung untersucht werden, ob Na^+ auch auf der Innenseite als „essentieller Aktivator“ fungiert.

4.1.1.2 αMDG -Affinität ist asymmetrisch auf Innen- und Aussenseite

In diesem Kapitel werden die apparenten intrazellulären Affinitäten für Zucker und Na^+ , die in dieser Arbeit für den Glucose-Auswärtstransport gefunden werden, mit Literaturwerten der extrazellulären apparenten Affinitäten verglichen. Zum Vergleich werden die hier durchgeführten Messungen bei 110 mM intrazellulärem Na^+ und 5 mM extrazellulärem Na^+ herangezogen. Der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ beträgt unter diesen Bedingungen bei $\text{HP} = 0 \text{ mV}$ 7,7 mM αMDG (siehe 3.2.1.1) und bei $\text{HP} = +50 \text{ mV}$ 2,1 mM αMDG (siehe 3.3.2.1). Der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bei $\text{HP} = +50 \text{ mV}$ bei diesen Verhältnissen entspricht den umgekehrten ionalen und Spannungs-Gradienten, wie sie bei Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Messungen zur Bestimmung der extrazellulären Affinität eingesetzt werden. Hier lagen meist ca. 100 mM extrazelluläres Na^+ vor bei einer durchschnittlichen intrazellulären Na^+ -Konzentration von 7-22 mM Na^+ (Lafaire und Schwarz, 1986;

Dascal, 1987). Der extrazelluläre $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ des rbSGLT1 wurde in mehreren Arbeiten mit Voltage-Clamp-Technik bestimmt, wobei die Messungen insgesamt trotz ähnlicher Messbedingungen eine sehr große Streuung aufweisen. Für den $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ ergaben sich Werte zwischen 14 μM und 200 μM αMDG bei ähnlichen Potential- und Na^+ -Bedingungen, die physiologischen Bedingungen entsprechen (14 μM αMDG (100 mM Na^+ , HP = -50 mV) (Umbach et al., 1990), 33 μM αMDG (110 mM Na^+ , HP = -60 mV) (Birnie et al., 1991), 200 μM αMDG (100 mM Na^+ , HP = -70 mV) (Parent et al., 1992a), 170 μM αMDG (100 mM Na^+ , HP = -50 mV) (Hirayama et al., 1996)). In radioaktiven Fluxexperimenten an Oozyten, die SGLT1 überexprimierten, zeigte sich ein $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von 110 μM (100 mM Na^+) (Ikeda et al., 1989).

Somit ist der intrazelluläre $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von 2,1 mM αMDG gegenüber dem extrazellulären $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von ca. 14 - 200 μM um annähernd 10 – 150mal größer. Es zeigt sich also eine starke Asymmetrie in der Zuckeraffinität.

Das asymmetrische Verhalten der Zuckeraffinität wird vermutlich durch eine Veränderung der räumlichen Struktur der Zucker-Bindungstasche verursacht, die durch die Konformationsänderung des SGLT1 bei der Translokation der Bindungstasche von der Außen- zur Innenseite erfolgt. Die räumliche Veränderung der Bindungstasche hat zur Folge, dass Zucker, die extrazellulär ein Substrat sind, auf der intrazellulären Seite mit einer deutlich geringeren Affinität binden.

Ein Zucker, der von SGLT1 auf der extrazellulären Membranseite als Substrat erkannt und auch transportiert wird, muß bestimmte enge Kriterien in seiner chemischen Struktur erfüllen. Der Zucker muß eine Hexose in der Pyranosering-Form sein, wobei die stereochemische Ausrichtung der OH-Gruppe am C2-Atom entscheidend dafür ist, ob der Zucker transportiert wird (Caspary, 1975; Silverman, 1980; Kimmich and Randles, 1981; Ikeda et al., 1989; Lostao et al., 1994). So wird z. B. D-Glucose transportiert, nicht aber Mannose, bei der die Richtung der OH-Gruppe entgegengesetzt ist. Das Hinzufügen längerer Seitenketten an das C1-Atom, wie z. B. die Methyl-Gruppe im Fall des αMDG , verschlechtert die Bindungsaffinität nicht (Caspary, 1975; Lostao et al., 1994).

Diese Vermutung wird durch neuere Untersuchungen zu den intrazellulären Eigenschaften des SGLT1 gestützt, bei denen SGLT1 in einem speziellen Hefestamm exprimiert wurde (Firnges et al., 2001). In diesen Hefezellen kann unter bestimmten Temperaturbedingungen das neu synthetisierte SGLT1-Protein in den sekretorischen Vesikeln festgehalten und der Einbau in die Membran verhindert werden. Die Besonderheit der sekretorischen Vesikeln aus Hefe liegt darin, dass die darin eingelagerten Membranproteine mit der Innenseite nach aussen orientiert sind (Rebber

et al., 1998; Firnges et al., 2001), somit also die intrazelluläre Seite des SGLT1 Untersuchungen zugänglich ist. Durch Flux-Experimente an den isolierten Vesikeln wurden der Ein- und Auswärtstransport des SGLT1 untersucht. Zusätzlich zur Bestimmung der Affinität für Zucker (siehe 4.1.1.2) führten die Autoren auch eine Bestimmung der intrazellulären Zuckerspezifität durch. Es ergibt sich die Reihenfolge Glucose > Galactose > α MDG > 6-deoxy-Glucose >> Mannose, L-Glucose. Extrazellulär dagegen bindet α MDG besser als Galactose, wobei die Reihenfolge D-Glucose > α MDG > D-Galactose > 3-O-Methyl-Glucose >> Mannose, Mannitol, L-Glucose ist (Ikeda et al., 1989). Die Veränderung in der Spezifität deutet schon an, dass sich durch die Konformationsänderung die räumlichen Strukturen der Bindungstasche verändern. Dies scheint sich besonders auf chemische Gruppen auszuwirken, die zusätzlich an das C1-Atom gebunden werden. Das Anfügen einer Methyl-Gruppe an C1 erniedrigt intrazellulär die Affinität verglichen mit der für Glucose, wohingegen der Effekt extrazellulär nicht sehr ausgeprägt ist (Ikeda et al., 1989; Birnir et al., 1991). Stärkere Auswirkungen auf die intrazelluläre Affinität zeigen größere Gruppen, wie z. B. für das Phlorizin, bei dem an das C1-Atom das hochmolekulare Phloretin angelagert ist. Dies wird in Kap. 4.1.2 genauer erläutert.

4.1.1.3 Vergleich der Ergebnisse mit indirekten Messungen der intrazellulären α MDG-Affinität

Die starke Asymmetrie des SGLT1 deutete sich schon in früher unternommenen Versuchen an, in denen die intrazelluläre Affinität für Zucker durch indirekte Messmethoden bestimmt wurden. Die ersten Versuche erfolgten durch radioaktive Efflux-Messungen an Bürstensaum-Membran-Vesikeln aus dem Kaninchendarm (Kessler and Semenza, 1983) bei gleicher intra- und extrazellulären Na^+ -Konzentration von 100 mM bei ca. 0 mV Membranpotential. Der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ wurde grob abgeschätzt zu 1 - 5 mM. Eine genaue Bestimmung war nicht möglich, da, wie die Autoren selbst erläutern, die Messbedingungen eigentlich nicht ausreichend optimal sind, um verlässliche kinetische Parameter aus den Anfangs-Efflux-Raten zu berechnen. In der vorliegenden Arbeit wird der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ nicht unter den Bedingungen einer symmetrischen Na^+ -Konzentration von 100 mM Na^+ bestimmt, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Allerdings kann festgestellt werden, dass der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ der Flux-Messungen zu niedrig abgeschätzt wurde, da die hier durchgeführten Messungen in Anwesenheit eines Na^+ -Gradienten (intrazellulär 110 mM Na^+ , extrazellulär 5 mM Na^+) bei $\text{HP} = 0$ mV schon einen höheren $K_M^{\alpha\text{MDG}} = 7,7$ mM α MDG zeigen. Ohne Na^+ -Gradient

sollte $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ mindestens zweimal höher sein, wie die Messungen bei 10 mM Na^+ zeigen (siehe 3.2.1.4).

Ein direkter Nachweis des Glucoseauswärtstransports konnte durch Ganzzell-Patch-Clamp-Messungen an einer renalen Zelllinie des Schweins, den LLC-PK₁-Zellen erbracht werden (Smith-Maxwell et al., 1990). Die intrazellulären Bedingungen wurden durch die Pipettenlösung bestimmt, die sowohl αMDG als auch Na^+ in hoher Konzentration enthielt. Es konnte ein deutlicher Auswärtstrom bestimmt werden, der durch extrazellulär appliziertes Phlorizin gehemmt werden konnte. Die Methode der Ganzzell-Ableitung eignet sich aber nicht zur Charakterisierung der intrazellulären Eigenschaften eines Membrantransporters, da die Zusammensetzung der Pipettenlösung und damit die intrazellulären Bedingungen während der Messung nicht verändert werden können.

Spätere Versuche benutzen die „cut-open-oocyte“-Technik (Chen et al., 1995), bei der nur ein Teil der SGLT1-exprimierenden Oozytenmembran elektrisch isoliert wird. Die Messanordnung erlaubt, mit einer größeren Glaspipette das Innere der Oocyte mit einer Lösung, deren genaue Zusammensetzung bekannt ist, zu perfundieren. Durch die intrazelluläre Perfusion mit 37,5 bzw. 75 mM αMDG bei gleicher intra- und extrazellulärer Na^+ -Konzentration von 50 mM und -20 mV Haltepotential konnten auswärtsgerichtete Ströme beobachtet werden, die allerdings auch bei 75 mM αMDG noch keine Sättigung erreichten. Aus diesen Ergebnissen schätzten die Autoren ab, dass der intrazelluläre $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ zwischen 25-50 mM αMDG liegen wird. Diese Abschätzung liegt in der gleichen Größenordnung wie die der direkten Messungen am Patch in der inside-out-Konfiguration. Am Makropatch werden keine Messungen mit symmetrischer Na^+ -Konzentration durchgeführt. Doch ausgehend von einem mindestens doppelt so großen $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bei symmetrischer Na^+ -Verteilung gegenüber einem Na^+ -Gradienten (siehe oben) kann aus dem $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ -Wert = 16,4 mM αMDG bei 50 mM intrazellulärem Na^+ , 5 mM extrazellulärem Na^+ und $\text{HP} = 0$ mV (siehe 3.2.1.2) abgeschätzt werden, dass sich unter symmetrischen Bedingungen ein $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von ca. 30-35 mM αMDG ergeben würde, der gut mit dem $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ aus den „cut-open-oocytes“-Experimenten übereinstimmt.

In Kap. 4.1.1.2 ist schon kurz eine weitere Technik angesprochen worden, mit der die intrazellulären Eigenschaften des SGLT1 untersucht wurden (Firnges et al., 2001). Mit sekretorischen Vesikeln aus Hefezellen wurden radioaktive Flux-Messungen zum Glucose-Einwärtstransport durchgeführt, wobei in diesem Fall durch die umgekehrte Orientierung der Membranproteine in den Vesikeln der Einwärtstransport dem Auswärtstransport des normal ausgerichteten SGLT1 entspricht. Aus diesen Ergebnissen

konnte die Affinität für α MDG bestimmt werden, es zeigte sich der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von 10,9 mM α MDG bei 100 mM Na^+ , was gut mit den am Patch gemessenen 7,7 mM α MDG übereinstimmt.

Erste Ergebnisse zur Charakterisierung der intrazellulären Eigenschaften des humanen SGLT1 mit der Makropatch-Technik (Eskandari et al., 1999) zeigen, dass auch am humanen SGLT1 die intrazelluläre Affinität mit dem $K_M^{\alpha\text{MDG}} = 10 - 30$ mM α MDG bei 500 mM Na^+ in der Badlösung um ein bis zwei Größenordnungen kleiner ist als extrazellulär, wo der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ 0,17 mM α MDG beträgt.

4.1.1.4 Spannungsabhängigkeit der α MDG-Affinität

Die intrazelluläre α MDG-Affinität bei verschiedenen Haltepotentialen wird aus den Strom-Spannungs-Kennlinien bei verschiedenen α MDG-Konzentrationen gewonnen. Dies erfolgt bei 250 mM Na^+ und 25 mM Na^+ .

Die apparente α MDG-Affinität zeigt bei allen 3 Na^+ -Konzentrationen eine leichte Abhängigkeit vom Haltepotential, wobei ein zunehmend positives Potential die Affinität erhöht (siehe 3.2.1.6). Dies scheint auf den ersten Blick überraschend, da die Bindung eines ungeladenen Moleküls untersucht wird und deshalb keine Spannungsabhängigkeit erwartet wird. Allerdings wird bei den hier durchgeführten Messungen der apparente $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ über den gesamten Transportzyklus bestimmt und nicht nur die Bindungskonstante des isolierten Bindungsvorgangs. Die Spannungsabhängigkeit des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ wird so interpretiert, dass unter den Messbedingungen ein spannungsabhängiger Schritt im Transportzyklus geschwindigkeitsbestimmend ist. Die spannungsabhängigen Schritte des Transportzyklus sind die Translokation des leeren Transporters und die Na^+ -Bindung (Restrepo and Kimmich, 1985; Parent et al., 1992b). Vermutlich verursacht die spannungsabhängige Na^+ -Bindung das spannungsabhängige Verhalten des apparenten $K_M^{\alpha\text{MDG}}$, denn eine Erhöhung der Na^+ -Konzentration führt zu einer geringeren Spannungsabhängigkeit des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ zu positiven Potentialen hin. Weiterhin strebt der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bei der hohen Na^+ -Konzentration von 110 mM Na^+ , was ungefähr 2-3mal dem K_M^{Na} entspricht, schon bei negativen Potentialen gegen einen konstanten Wert. Ein konstanter $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ lässt darauf schliessen, dass hier der größte Teil der Na^+ -Bindungsstellen gesättigt ist, so dass die relativ kleinen Änderungen im Membranpotential kaum Auswirkungen auf die Na^+ -Bindung zeigen. Bei 10 mM Na^+ , einer Na^+ -Konzentration weit unterhalb des K_M^{Na} , strebt $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ erst bei höheren positiven Potentialen gegen einen konstanten Wert, da das positive Potential die Anzahl

der Na⁺-gebundenen Zustände erhöht und somit die Na⁺-Bindung nicht mehr den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Parent et al., 1992b).

4.1.1.5 Veränderung der Affinität während der Messdauer an einem Patch

Bei der Bestimmung der α MDG-Affinität des SGLT1 ergibt sich das überraschende Ergebnis, dass sich an demselben Patch während des Versuchs der gemessenen $K_M^{\alpha MDG}$ verändert. Bei der Messung der α MDG-Abhängigkeit sofort nach Abziehen des Patches ist der $K_M^{\alpha MDG}$ um einen Faktor 2-3 niedriger als derjenige, der in nachfolgenden Experimenten am gleichen Patch bestimmt wird. Der Effekt tritt nur bei einigen Messungen auf und zeigt sich nicht, wenn der Patch nach dem Abziehen einige Minuten mit der Referenzlösung perfundiert wird, ist also nicht mit der α MDG-Aktivierung korreliert. Dies lässt vermuten, dass die Funktion von SGLT1 wahrscheinlich direkt durch Substanzen aus dem Cytosol beeinflusst wird, die durch Perfusion des Patches an der Membranoberfläche ausgewaschen werden. Mögliche cytosolische Substanzen könnten dabei Protein Kinase A (PKA) und Protein Kinase C (PKC) sein, denn SGLT1 aus dem Kaninchen besitzt 4 Phosphorylierungsstellen für PKC und eine für PKA (Wright et al., 1997). Die Literatur beschreibt die regulierende Wirkung von Protein Kinase A (PKA) und Protein Kinase C (PKC) auf SGLT1 in Oozyten (Hirsch et al., 1996; Wright et al., 1997) und in COS-7 Zellen (Vayro und Silverman, 1999). Allerdings sind die dort beobachteten Effekte auf eine indirekte Regulierung der Transporterdichte durch Endo- oder Exocytose zurückzuführen, d. h. der Transport des in Vesikeln gespeicherten SGLT zur Membran und die Insertion in die Membran werden reguliert. Am Protein selbst findet dabei keine Regulation statt. Es änderte sich in beiden Expressionssystemen nur die maximale Gesamt-Transportrate, nicht aber, wie in dieser Arbeit, die Zuckeraffinität. Die Änderung der Zuckeraffinität scheint eher Hinweise auf einen Effekt zu geben, der direkt am Protein angreift.

4.1.2 Affinität für Phlorizin

Eine weitere Bestätigung des asymmetrischen Verhaltens des Transporters zeigen die Inhibitionsexperimente mit Phlorizin. Phlorizin bindet extrazellulär als kompetitiver und reversibler spezifischer Inhibitor mit einer sehr hohen Affinität im Bereich von einigen μ M. (Alvarado, 1962; Diedrich, 1966; Alvarado, 1967; Toggenburger et al., 1978; Gibbs et

al., 1982; Brot-Laroche and Alvarado, 1983; Ikeda et al., 1989; Diedrich, 1990) (Umbach et al., 1990; Lostao et al., 1994; Hirayama et al., 1996).

Dass die Affinität für Phlorizin gegenüber der für α MDG um den Faktor 120 größer ist (Hirayama et al., 1996), läßt sich durch die chemische Zusammensetzung des Phenylglucosids Phlorizin aus einem β -D-Glucose-Teil und dem stark hydrophoben Phloretin-Teil erklären. Die Struktur ermöglicht eine zweifache Bindung und damit eine stärkere Bindung an SGLT1. Dabei konkurriert der Glucose-Teil des Phlorizins um die Glucose-Bindungsstelle (Silverman and Black, 1975; Diedrich, 1990; Panayotova-Heiermann et al., 1994) und der Phloretin-Teil bindet an einer benachbarten hydrophoben Domäne des Transporters (Diedrich, 1966; Alvarado, 1967; Diedrich, 1990; Koepsell et al., 1990). Dies zeigen Bindungs-Experimente mit Phlorizin, wobei die Applikation von Phloretin und Glucose die Bindung von Phlorizin inhibiert (Frasch et al., 1970; Koepsell et al., 1990).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Inhibitionsexperimente zeigen, dass Phlorizin intrazellulär nicht als spezifischer Inhibitor wirkt. Die Lösungen enthalten dabei 0-2 mM Phlorizin, wobei 2 mM Phlorizin ca. 200mal höher als der extrazelluläre K_i ist. Die Substratkonzentration liegt mit 10 mM α MDG im Bereich des $K_M^{\alpha MDG}$ und ist damit nicht sättigend. Durch 2 mM α MDG kann keine vollständige, sondern nur ca. 27 % Inhibition erreicht werden. Durch einen Fit der Daten mit der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung [1]) wird eine maximale Inhibition von 34% berechnet. Dieses Ergebnis ist überraschend, da bei einer kompetitiven Hemmung die Erhöhung der Inhibitor-Konzentration bei einer festen Substratkonzentration zu einer vollständigen Inhibition führen sollte. Dass Phlorizin intrazellulär nicht als spezifischer Inhibitor wirkt, wird durch Experimente anderer Arbeitsgruppen gestützt. Bei Flux-Experimenten an Bürstensaum-Membran-Vesikeln wurde keine Inhibition der Substrat-Aufnahme durch intrazelluläres Phlorizin beobachtet, wohingegen die extrazelluläre Applikation von Phlorizin zu einer vollständigen Inhibition führte (Koepsell und Madrala, 1987). Auch in Flux-Messungen an sekretorischen Vesikeln aus der Hefe, in denen SGLT1 mit seiner intrazellulären Seite nach außen eingelagert wird, zeigt Phlorizin keine inhibitorische Wirkung (Firnges et al., 2001). Es scheint eine Folge der räumlichen Veränderung der Zucker-Bindungstasche durch die Konformationsänderung des Proteins bei der Translokation von der Außenseite zur Innenseite zu sein, die auch die veränderte Substratspezifität erklärt. Die Autoren zeigen hier, dass die Gruppen am C1-Atom eine Rolle für die Affinität spielen. Befindet sich statt einer freien OH-Gruppe eine größere Gruppe am C1-Atom, wie z. B. im Fall des Phlorizins, bei dem Phloretin am C1-Atom

angehängt ist, so wird die Affinität für diese Moleküle stark erniedrigt (Firnges et al., 2001).

Dies zeigen auch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit den „potentiellen“ Inhibitoren β -n-Hexylglucosid und β -n-Octylglucosid. Intrazellulär kann keine inhibitorische Wirkung festgestellt werden, obwohl sie sich extrazellulär als spezifische Inhibitoren erwiesen haben. β -n-Hexylglucosid erreichte 76% Inhibition der Zuckeraufnahme, und durch β -n-Octylglucosid konnte eine komplette, kompetitive Inhibition mit einem $K_i = 10 \mu\text{M}$ erreicht werden, die mit der K_i von Phlorizin übereinstimmt (Kipp et al., 1996). Die beiden Substanzen besitzen am C1-Atom der Glucose lange, hydrophobe Seitenketten, die die extrazelluläre Bindung begünstigen, aber intrazellulär die Bindung erschweren.

Auch stellt man bei einer Abschätzung von extra- zu intrazellulärer Zuckeraffinität fest, dass diese intrazellulär ca. 25mal kleiner ist, was auf die veränderte räumliche Struktur der Zucker-Bindungstasche nach der Translokation des Transporters zurückzuführen ist. Dagegen ist die Affinität für Phlorizin intrazellulär ca. 200mal kleiner, was zum Teil durch die veränderte räumliche Struktur der Zucker-Bindungstasche verursacht wird, zum anderen Teil aber auch dadurch, dass die zweite Bindungsstelle, an die der Phloretinteil des Phlorizin bindet, nach der Konformationsänderung bei der Translokation nicht von der intrazellulären Seite zugänglich ist (Koepsell and Madrala, 1987; Koepsell et al., 1990). Somit wird Phlorizin schwächer gebunden, da nur die eine Bindung an der Zucker-Bindungsstelle erfolgt.

4.1.3 Affinität für Na^+

Die intrazelluläre apparente Affinität des SGLT1 für das Cosubstrat Na^+ wird in der vorliegenden Arbeit durch die Messung der zuckerinduzierten stationären Ströme bei Na^+ -Konzentrationen zwischen 10-200 mM Na^+ untersucht. Zur Bestimmung des Einflusses der αMDG -Konzentration auf die Na^+ -Affinität erfolgen die Messungen bei 3 festen αMDG -Konzentrationen (siehe 3.2.2). Der K_M^{Na} bei $\text{HP} = 0 \text{ mV}$ steigt bei der Verringerung der αMDG -Konzentration nur leicht von 38,2 mM Na^+ (250 mM αMDG) auf 57,0 mM Na^+ (25 mM αMDG) an, mit ähnlichen Hill-Koeffizienten von $n = 1,5$ bzw. 1,6. Die Abhängigkeit vom Haltepotential dagegen ist stark ausgeprägt, wobei sich der K_M^{Na} zu depolarisierenden Potentialen hin erniedrigt (siehe 3.3.3).

4.1.3.1 Na⁺-Affinität ist symmetrisch auf der Innen- und Außenseite

Ein Vergleich mit Bestimmungen der extrazellulären Affinität für das Cosubstrat Na⁺ zeigt, dass sich die intra- und extrazelluläre Affinität in ihrer Höhe nicht unterscheiden, und somit der Transporter bezüglich der Na⁺-Affinität ein symmetrisches Verhalten zeigt. Für den Vergleich werden nur Ergebnisse aus Zweielektroden-Voltage-Clamp-Messungen herangezogen, da bei diesen Messungen der K_M^{Na} unter kontrollierten Potentialbedingungen bestimmt wurde, wobei die intrazelluläre Na⁺-Konzentration nicht genau bekannt ist. Die gemessenen K_M^{Na} für den Einwärtstransport liegen im Bereich von 17-37 mM Na⁺, wobei der Hill-Koeffizient zwischen 1 und 2,1 liegt (Umbach et al., 1990; Birnir et al., 1991; Parent et al., 1992a; Chen et al., 1997). Das Substrat wird in Konzentrationen von 50 μ M (nichtsättigend) bis 5 mM α MDG (sättigend) angeboten, das Haltepotential liegt im Bereich des physiologischen Ruhepotentials einer Oozyte von -30 bis -77 mV. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den für den Auswärtstransport bestimmten K_M^{Na} nicht. Unter vergleichbaren Bedingungen, d. h. bei einem Haltepotential von +60 mV, das dem umgekehrten Potentialgradienten entspricht, und 250 mM α MDG ergibt sich der intrazelluläre K_M^{Na} von 33,4 mM mit einem Hill-Koeffizienten von 1,14. Somit können die intra- und extrazelluläre Affinität des SGLT1 für Na⁺ als gleich angesehen werden und es zeigt sich ein symmetrisches Bindungsverhalten für Na⁺.

4.1.3.2 Abhängigkeit der Na⁺-Affinität von der α MDG-Konzentration

Der gemessenen apparente K_M^{Na} wird durch die α MDG-Konzentration nur wenig beeinflusst: wird die α MDG-Konzentration von 25 mM auf 250 mM erhöht, so resultiert dies in einem leichten Abfall des K_M^{Na} um einen Faktor von ca. 1,5 von 57,0 mM auf 38,2 mM bei HP = 0 mV. Bei einer Bindungsreihenfolge jedoch, bei der Na⁺ als essentieller Aktivator als Erstes bindet und die Affinität für Zucker erhöht, wird keine starke Abhängigkeit des ersten Substrats von der Konzentration des als zweites bindenden Substrats erwartet. Die leichte Erniedrigung des apparenten K_M^{Na} mit zunehmender α MDG-Konzentration ist jedoch zu erwarten, da eine höhere α MDG-Konzentration das Gleichgewicht von Zustand [TNa₂]_i in Richtung [TNa₂G]_i zieht und somit einen höheren stationären Strom zulässt.

4.1.3.3 Spannungsabhängigkeit von K_M^{Na}

Die intrazelluläre Na^+ -Affinität bei verschiedenen Haltepotentialen wird aus den Strom-Spannungs-Kennlinien bei verschiedenen Na^+ -Konzentrationen gewonnen. Dies geschieht in Anwesenheit von 2 festen α MDG-Konzentrationen. Bei beiden Zuckerkonzentrationen zeigt sich eine ähnliche Abhängigkeit des K_M^{Na} vom Haltepotential: zu positiven Potentialen hin fällt der K_M^{Na} leicht ab. So ergibt sich ein Abfall des K_M^{Na} von 90,3 mM α MDG bei -60 mV um einen Faktor 2,7 auf 33,4 mM bei $+60$ mV bei der sättigenden Konzentration von 250 mM α MDG. Dabei verläuft der Abfall für positivere Potentiale immer schwächer, bis er gegen einen konstanten Wert strebt. Die α MDG-Konzentration scheint dabei kaum Einfluss auf den Verlauf des Abfalls zu haben, denn ein ähnlicher Abnahmefaktor ergibt sich auch für die kleinere α MDG-Konzentration. Messungen mit kleineren α MDG-Konzentrationen als 25 mM α MDG, die dem Konzentrationsbereich um den oder unterhalb des $K_M^{\alpha MDG}$ entsprechen, können leider nicht durchgeführt werden. Die zuckerinduzierten Ströme liegen bei geringen Zucker- und Na^+ -Konzentrationen besonders bei stark negativen Potentialen im Bereich von nur einigen pA, so dass durch die Differenzmessung unzuverlässige Resultate entstehen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die intrazelluläre Na^+ -Bindung vom Membranpotential abhängig ist. Dies steht im Widerspruch zu dem vorgeschlagenen Transportmodell, wonach die intrazelluläre Na^+ -Bindung nur in vernachlässigbar kleinem Maße spannungsabhängig sein soll. Im folgenden soll durch ein Vergleich der intra- und extrazellulären Potentialabhängigkeit des K_M^{Na} abgeschätzt werden, ob die intrazelluläre Potentialabhängigkeit gegenüber der extrazellulären vernachlässigbar klein ist. Umbach et al. (Umbach et al., 1990) fanden für den Einwärtstranport einen Abfall des K_M^{Na} um einen Faktor 8 zwischen -30 mV und -150 mV. Spätere Messungen zeigten einen Abfall um einen Faktor von ca. 4 zwischen -40 mV und -120 mV (Birnir et al., 1991) oder um einen Faktor 10 zwischen 0 mV und -150 mV (Parent et al., 1992a). Weitere Messungen zeigten einen Abfall um einen Faktor 2 im Bereich zwischen -30 und -150 mV (Hirayama et al., 1996). Bei all diesen Messungen verläuft K_M^{Na} im Bereich von -150 mV bis ca. -70 mV eher konstant und steigt erst zu depolarisierenden Potentialen hin an. Spannungen größer als 0 mV wurden in den Zweielektroden-Voltage-Clamp Messungen leider nicht getestet, doch aus dem eher exponentiellen Verlauf der Kurve lässt sich extrapolieren, dass der Anstieg bei positiven Potentialen noch wesentlich steiler verläuft als im negativen Spannungsbereichs, womit sich K_M^{Na} um mehr als Faktor 10 erhöht. In

dem in dieser Arbeit getesteten Spannungsbereich von -60 mV bis $+60$ mV lag die Abnahme des intrazellulären K_M^{Na} bei einem Faktor $1,5 - 2$. Dies deutet auf eine deutlich geringere Spannungsabhängigkeit der intrazellulären Na^+ -Bindung hin verglichen mit der extrazellulären. Immerhin ist die Spannungsabhängigkeit messbar, so dass sie in die Simulation des Modells miteinbezogen werden sollte.

4.1.3.4 Vergleich mit indirekten Messungen der intrazellulären Na^+ -Affinität

In der schon vorher erwähnten Arbeit (siehe 4.1.1.2), in der die intrazellulären Eigenschaften des SGLT1 an sekretorischen Vesikeln aus Hefezellen untersucht wurden (Firmges et al., 2001), wurde auch die Abhängigkeit des Glucose-Transports von der Na^+ -Konzentration bestimmt. Hierbei scheinen die Autoren zeigen zu können, dass sowohl der Glucose-Einwärtstransport wie auch der -Auswärtstransport nicht von der Na^+ -Konzentration abhängen, sondern sogar unter nominell Na^+ -freien Bedingungen stattfinden können. Dies zeigten die gleiche Gruppe auch in einer älteren Arbeit durch Flux-Messungen an Bürstensaum-Membran-Vesikeln (Centelles et al., 1991). Die Autoren postulieren deshalb ein Transportmodell (Centelles et al., 1991), in dem auch der nur mit Glucose beladenen Transporter [TG] zur anderen Seite der Membran wechseln kann. Die Ergebnisse stehen in starkem Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Hier kann gezeigt werden, dass eine Verringerung der Na^+ -Konzentration eine Abnahme der Stromamplituden bei konstanter αMDG -Konzentration zur Folge hat. Eine Extrapolation der Daten zeigt, dass für 0 mM Na^+ kein Strom mehr zu erwarten ist. Dies zeigt deutlich, dass ein Zuckertransport nur stattfinden kann, wenn beide Substrate gebunden sind.

Für diese unterschiedlichen Ergebnisse gibt es keine befriedigende Erklärung. Ob die unterschiedlichen Methoden eine Begründung sein können, erscheint ungewiß.

4.1.4 Physiologische Bedeutung der Affinitäten

Die Ergebnisse zeigen, dass SGLT1 ein reversibler Transporter ist, der Zucker in die Zelle hinein-, aber durchaus auch aus der Zelle heraus transportieren kann. Dass unter physiologischen Bedingungen ein Auswärtstransport von Glucose stattfindet, ist sehr unwahrscheinlich, da das Zusammenwirken der Faktoren negatives Membranpotential, geringe Zuckeraffinität, Na^+ -Affinität und Na^+ -Gradient einen Auswärtstransport verhindern. Unter physiologischen Bedingungen liegen intrazellulär ca. 12 mM Na^+ ,

extrazellulär ca. 145 mM Na⁺ vor bei einem Membranpotential von ca. -70 mV (Schmidt und Thews, 1993).

Die Strom-Spannungs-Kennlinien zeigen, dass eine Hyperpolarisierung zu geringeren Stromamplituden und damit zu einer Verringerung des Auswärtstransports führt. Weiterhin verursachen die kleine intrazelluläre Na⁺-Konzentration und das negative Membranpotential eine sehr geringe intrazelluläre Zuckeraffinität im Bereich von ca. 75 mM α MDG, so dass ein merklicher Auswärtstransport nur bei einer hohen intrazellulären Zuckerkonzentration stattfinden kann. Allerdings verhindert der Glucose-Transporter GLUT2 eine hohe Zuckerakkumulation in der Zelle, indem er mit einem K_M von 17 - 20 mM (Thorens und Waeber, 1997) die Glucoseabgabe über die basolaterale Membran an das Blut generiert. Ein dritter Faktor, der den Auswärtstransport verhindert, ist die intrazelluläre Na⁺-Affinität, die sich zwar nicht stark von der extrazellulären unterscheidet, jedoch bei der geringen intrazellulären Na⁺-Konzentration zu einer geringen Transportaktivität führt. Die asymmetrische Funktionsweise des SGLT1 gewährleistet, dass der Glucose-Transport nur in eine physiologisch sinnvolle Richtung, nämlich der Aufnahme von Glucose in die Epithelzellen, stattfindet.

4.1.5 Na⁺-Leckstrom

Zusätzlich zum gekoppelten Glucose-Einwärts-Transport tritt in Abwesenheit von Zucker ein ungekoppelter Na⁺-Leckstrom $[TNa_2]_e \rightarrow [TNa_2]_i$ auf, durch den nur Na⁺ in die Zelle transportiert wird (Umbach et al., 1990; Parent et al., 1992a ; Chen et al., 1995; Panayotova-Heiermann et al., 1995; Chen et al., 1997). Mit zunehmender extrazellulärer Zuckerkonzentration nimmt der Na⁺-Leckstrom ab, wobei bei ca. 40 μ M α MDG, einer Konzentration, die 5mal kleiner als $K_M^{\alpha MDG}$ ist, die Ströme von Na⁺-Leckstrom und von zuckerinduziertem Transport gleichgroß sind (Chen et al., 1995). Der Na⁺-Leckstrom beträgt nur ca. 2,5% des Maximalstroms unter sättigenden Substratbedingungen (Chen et al., 1995), weshalb der Einfluss des Na⁺-Leckstroms auch für kleine Zuckerkonzentrationen vernachlässigbar ist. Der Na⁺-Leckstrom kann experimentell gezeigt werden, indem man in Abwesenheit von Zucker den Inhibitor Phlorizin appliziert, der den Na⁺-Leckstrom mit einem $K_i \approx 3 \mu$ M inhibiert (Umbach et al., 1990). Phlorizin bindet an den Na⁺-beladenen Transporter und verhindert den Transport über die Membran.

Ob und in welchem Maß ein Na⁺-Leckstrom $[TNa_2]_i \rightarrow [TNa_2]_e$ von der intra- zur extrazellulären Seite auftritt, kann in dieser Arbeit nicht ermittelt werden, da Phlorizin intrazellulär nicht als Inhibitor arbeitet und somit der Na⁺-Leckstrom nicht gehemmt

werden kann. Da die Größenordnung des auswärtsgerichteten Na^+ -Leckstroms nicht bestimmt werden kann, ist eine Abschätzung des Fehlers nicht möglich, der sich bei Messungen mit kleinen Zuckerkonzentrationen durch den zusätzlichen, auswärtsgerichteten Na^+ -Leckstrom ergibt. Dadurch wird ein fälschlich höherer Strom gemessen.

4.1.6 Bindungsreihenfolge

Die Bindungsreihenfolge kann unter der Annahme eines schnellen Vorgleichgewichts aus der Abhängigkeit der Affinität für αMDG , $K_M^{\alpha\text{MDG}}$, und des Maximalstroms I_{Max} von der Na^+ -Konzentration bestimmt werden, wobei I_{Max} bei der sättigenden αMDG -Konzentration von 250 mM αMDG bestimmt wird (siehe 3.5). Der Einfluss der Na^+ -Konzentration auf $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ und I_{Max} für die 3 möglichen Bindungsreihenfolgen ($2\text{Na}^+:\text{G}$), ($\text{Na}^+:\text{G}:\text{Na}^+$) und ($\text{G}:2\text{Na}^+$) zeigt sich in den Vorfaktoren in der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung [1]). Die Vorfaktoren sind in Tab. 9 (siehe 3.5) dargestellt. Die Abhängigkeiten der Parameter $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ und I_{Max} von der Na^+ -Konzentration werden simuliert und mit den experimentell ermittelten Verläufen verglichen. Da die Gleichgewichtskonstanten K_D für Zucker und Na^+ nicht bekannt sind, werden sie näherungsweise durch die gemessenen, apparenten K_M bei sättigender Konzentration des jeweils anderen Substrats ersetzt. Prinzipiell sollte jedoch der wahre K_D -Wert größer sein und damit eine kleinere Affinität zeigen als der apparente K_M -Wert.

Der Vergleich der simulierten Kurven mit den Ergebnissen zeigt sowohl bei I_{Max} als auch bei $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ für die Bindungsreihenfolge ($2\text{Na}^+:\text{G}$) eine bessere Übereinstimmung als für die Bindungsreihenfolgen ($\text{Na}^+:\text{G}:\text{Na}^+$) und ($\text{G}:2\text{Na}^+$). Dies deutet auf eine intrazelluläre Bindungsreihenfolge von ($2\text{Na}^+:\text{G}$) unter den hier gemachten Annahmen für die Bindungskonstanten für αMDG und Na^+ hin.

Die Bindungsreihenfolge von Substrat und Cosubstrat auf der extrazellulären Seite wird noch kontrovers diskutiert (Kessler and Semenza, 1983; Restrepo and Kimmich, 1985; Parent et al., 1992b; Chen et al., 1997). Messungen zeigen, dass Na^+ als essentieller Aktivator wirkt, denn die extrazelluläre Bindung von Na^+ an SGLT1 bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins, die dann zu einer Erhöhung der apparenten Affinität für Zucker führt (Peerce and Wright, 1984; Kimmich, 1990; Hediger and Rhoads, 1994; Hirayama et al., 1997; Loo et al., 1998). Damit ergibt sich für die Bindungsreihenfolge die Bedingung, dass sie geordnet erfolgen muss, wobei zumindest ein Na^+ -Ion vor der Glucose binden muss. Die weitere Reihenfolge der Substratbindung wird durch zwei unterschiedliche Modelle beschrieben (siehe 1.1.6). In Modell I bindet

zuerst 1 Na⁺, danach 1 Glucosemolekül, gefolgt von der Bindung des 2. Na⁺-Ions (Na⁺:G:Na⁺) (Restrepo and Kimmich, 1985; Chen et al., 1997). Modell II beschreibt eine sehr schnelle, entweder simultane oder sequentielle Bindung der beiden Na⁺-Ionen aus, die in einem einzigen Reaktionsschritt zusammengefasst wird (Parent et al., 1992b). Danach erfolgt die Glucosebindung (2Na⁺:G). Beiden Modellen gemeinsam ist die Annahme eines spiegelsymmetrischen Modells. Danach sollte die intrazelluläre Bindungsreihenfolge der extrazellulären entsprechen.

4.2 Vergleichgewichtsströme

Aus den Messungen der zuckerinduzierten stationären Ströme können Eigenschaften des Transporters wie Affinität für Substrat und Cosubstrat, die Spannungsabhängigkeit und die Bindungsreihenfolge bestimmt werden. Untersuchungen zu einzelnen Reaktionsschritten im Transportzyklus sind aber nicht möglich, da die Ströme jeweils den kompletten Transportzyklus widerspiegeln. Um den Mechanismus genauer untersuchen zu können, sind Untersuchungen der Vergleichgewichtsströme nötig.

Die 6 Zustände im Transportzyklus des SGLT1 (Abb. 39) werden abhängig von den vorliegenden Substrat- und Cosubstratkonzentrationen und dem anliegenden Membranpotential besetzt (siehe 1.1.7). Durch geeignete Wahl dieser Parameter kann die Besetzungsdichte beeinflusst werden. Eine schnelle Änderung eines der Parameter, z. B. durch schnelle Spannungssprünge, stört das Gleichgewicht. Ist das Einstellen auf das neue Gleichgewicht mit einer Verschiebung von Ladungen verbunden, wird dies durch das Auftreten sogenannter Vergleichgewichtsströme sichtbar, die sich als schnelle Transiente nach der Störung bis zum Erreichen des neuen Gleichgewichts zeigen. Die Vergleichgewichtsströme können bestimmten Schritten im Transportzyklus zugeordnet werden und aus ihrem zeitlichen Verlauf die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte festgestellt werden und Aussagen über den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt gemacht werden.

Vergleichgewichtsströme nach einem Spannungssprung können bei vielen sekundär aktiven Transportern beobachtet werden, z. B. beim Na⁺/Ca²⁺-Austauscher NCX1 (Hilgemann et al., 1991), beim GABA Transporter GAT1 (Lu und Hilgemann, 1999), beim Na⁺/Jodid Symporter NIS (Eskandari et al., 1997), beim Na⁺/Phosphat Cotransporter NaPi-5 (Forster et al., 1997) und beim Glutamat-Transporter EAAT2 (Wadiche et al., 1995). SGLT1 zeigt für den Einwärtstransport Vergleichgewichtsströme nach einem depolarisierenden Spannungssprung in Anwesenheit von Na⁺ und Abwesenheit von Zucker (Parent et al., 1992a; Parent et al., 1992b; Loo et al., 1993;

Chen et al., 1996; Hazama et al., 1997). Durch die Zugabe von Zucker oder Phlorizin verringern sich die Vergleichgewichtsströme. Der Vergleichgewichtsstrom wird dabei zwei spannungsabhängigen Reaktionsschritten zugeordnet, nämlich der extrazellulären Na^+ -Bindung bzw. -Dissoziation und der Translokation des leeren Transporters. Unter den genannten Bedingungen dissoziiert Na^+ nach einem depolarisierenden Spannungssprung aus der Bindungstasche und es erfolgt eine Reorientierung der Besetzungszahl der Transporterzustände. Demzufolge sollte sich der Vergleichgewichtsstrom aus 2 verschiedenen Reaktionsschritten zusammensetzen und somit der Abfall des Stroms durch 2 Exponentialfunktionen anpassbar sein (Wierzbicki et al., 1990). In bisherigen Untersuchungen mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik und der „cut-open-oocyte“-Technik an SGLT1-exprimierenden Oozyten konnte eine der beiden Zeitkonstanten gefunden werden, die der Translokation des leeren Transporters zugeordnet wurde (Parent et al., 1992a; Parent et al., 1992b; Loo et al., 1993; Chen et al., 1996; Hazama et al., 1997). Die zweite Zeitkonstante, die der schnellen Na^+ -Bindung entspricht, liegt vermutlich im Bereich von 100 μs (Hazama et al., 1997) und kann wegen der Zeitauflösung dieser Methoden (200 μs – 2 ms) nicht dargestellt werden.

In dieser Arbeit wird versucht, Vergleichgewichtströme für den Auswärtstransport zu messen, die durch die spannungsabhängige Reorientierung der Membranzustände $[\text{TNa}_2]_i \leftrightarrow [\text{T}]_i \leftrightarrow [\text{T}]_e$ entstehen. Mit einer Zeitauflösung von ca. 10 μs eignet sich die Makropatch-Technik dazu, auch die zweite, schnelle Zeitkonstante darzustellen. Ein weiteres Ziel besteht in der Überprüfung, ob die Vergleichgewichtsströme für den Einwärtstransport an einem Makropatch in der inside-out-Konfiguration gemessen werden können.

4.2.1 Vergleichgewichtsströme des Auswärtstransports

In Abb. 39 sind die 3 Zustände, die am Zustandekommen der Vergleichgewichtsströme im Auswärtstransport beteiligt sind, grau hervorgehoben. Das Haltepotential wird vor den eigentlichen Spannungssprüngen durch einen Vorpuls von 0 mV auf +50 mV geklemmt. Dadurch werden die zweifach negativ geladenen leeren Transporter, die bei $\text{HP} = 0$ mV gleichmässig extrazellulär und intrazellulär verteilt sind, zur Innenseite ausgerichtet $[\text{T}]_i$.

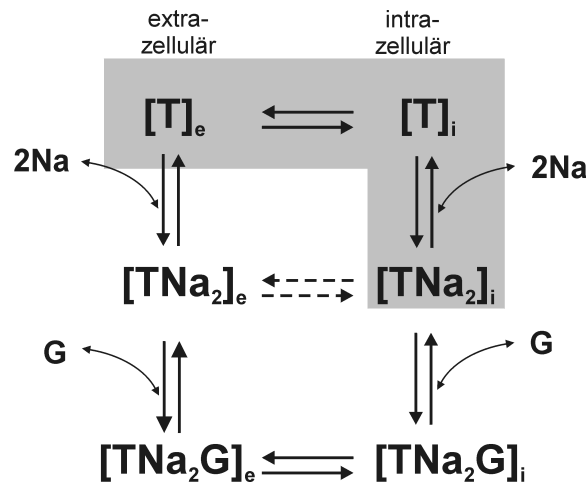


Abbildung 39: Zustände, die an möglichen Vorgleichgewichtsströmen im Auswärtstransport des SGLT1 beteiligt sein können. Die beteiligten Zustände sind grau unterlegt. Dabei wird davon ausgegangen, dass in Abwesenheit von intrazellulärem Zucker bei einem konditionierenden Vorpuls auf +50 mV Haltepotential der größte Teil der Transporter im Zustand $[TNa_2]_i$ vorliegt. Durch einen hyperpolarisierenden Spannungsprung wird Na^+ aus den Bindungstaschen gedrängt ($[TNa_2]_i \rightarrow [T]_i$), und der leere Transporter richtet sich unter den Einfluss der Spannung zur Außenseite aus ($[T]_i \rightarrow [T]_e$). Diese Ladungsverschiebungen sollten als Vorgleichgewichtsströme messbar sein.

Die hohe Na^+ -Konzentration in der Badlösung führt zu einer Sättigung der intrazellulären Na^+ -Bindung, so dass der Transporter hauptsächlich in Zustand $[TNa_2]_i$ und in geringerem Maße in Zustand $[T]_i$ vorliegt. Es wird erwartet, dass die Spannungssprünge auf Potentiale zwischen -100 mV und $+60$ mV zu einer Neuordnung der Zustände führen, wobei hyperpolarisierende Potentiale Na^+ -Ionen aus den Bindungsstellen drängen ($[TNa_2]_i \rightarrow [T]_i$) und der leere Transporter von Zustand $[T]_i$ nach $[T]_e$ übergeht.

Die Auswertung der Transienten nach den Spannungssprüngen zeigt hier überraschenderweise keine Vorgleichgewichtsströme, die auf eine Neuorientierung der Transporterzustände zurückgeführt werden können. Die Subtraktion der Stromspuren in α MDG-haltiger Lösung und Lösung ohne α MDG resultiert zwar in einem sehr schnellen Transienten. Allerdings liegt die Zeitkonstante des Abfalls im Bereich der Filterbandbreite ($2-4 \mu s$) und nicht im erwarteten ms- oder sub-ms-Bereich (Parent et al., 1992a; Parent et al., 1992b; Loo et al., 1993; Chen et al., 1996; Hazama et al., 1997). Da sich die Differenz-Transienten auch bei einer Messung an einem Patch einer nichtinjizierten Kontrollzelle zeigen, scheinen sie eher auf geringfügige Änderungen der systembedingten Kapazitäten zurückzuführen sein. Diese können sich z. B. durch eine Veränderung der Höhe des Lösungsstands ergeben. Der Abfall der Transienten in den Originalmessungen mit α MDG oder ohne α MDG zeigt ähnliche Zeitkonstanten im Bereich von $\tau_{1 \alpha MDG} = 42-60 \mu s$ bzw. $\tau_{1 Manni} = 30-55 \mu s$. Da die Transienten bei der

Differenzbildung verschwinden, werden sie vermutlich durch die Umladung der Kapazität des Patches verursacht.

Zwei Ursachen können dafür verantwortlich sein, dass keine Vergleichgewichtsströme nach einem hyperpolarisierenden Spannungssprung im Auswärtstransport messbar sind. Zu der Zeit, in der die Experimente durchgeführt werden, zeigen die Oozyten keine starke Expression. Die Expressionsüberprüfung durch einen α MDG-Konzentrationsprung resultiert meist in Strömen im Bereich von 10 - 15 pA. Unter der Annahme, dass die zu erwartenden Stromamplitude der Vergleichgewichtsströme sich in der gleichen Größenordnung wie im Voltage-Clamp-Experiment bestimmt bewegen, kann als erste grobe Näherung eine ca. 4mal höhere Amplitude der Vergleichgewichtsströme gegenüber dem Gleichgewichtsstrom erwartet werden (Parent et al., 1992a). Solch geringen Ströme im Bereich von 40 – 60 pA können bei der nötigen hohen Filterfrequenz von 50 kHz und den sehr hohen kapazitiven Ströme im Bereich von mehreren nA schwer detektiert werden. Bei der Verwendung einer kleineren Filterfrequenz lassen sich jedoch keine eindeutige Aussagen über die Zeitkonstanten des Abfalls machen. Die zweite Ursache kann darin begründet sein, dass die intrazelluläre Na^+ -Bindung keine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit zeigt. Nach dem depolarisierenden Spannungspuls von +50 mV sollte bei sättigender Na^+ -Konzentration der Transporter hauptsächlich im Zustand $[\text{TNa}_2]_i$ vorliegen. Bei geringer Spannungsabhängigkeit der intrazellulären Na^+ -Bindung wird bei einem hyperpolarisierenden Spannungssprung kaum Na^+ aus den Bindungsstellen verdrängt, so dass hier wenige Ladungsverschiebungen stattfinden. Dadurch existieren auch wenige Transporter im Zustand $[\text{T}]_i$ und der Übergang $[\text{T}]_i \rightarrow [\text{T}]_e$ findet nur in geringem Maße statt. Dadurch ergeben sich auch hier kaum Ladungsverschiebungen, so dass insgesamt keine Vergleichgewichtsströme detektierbar sind.

4.2.2 Vergleichgewichtsströme des Einwärtstransports

Nachdem überraschenderweise keine Vergleichgewichtsströme für den Auswärtstransport festgestellt werden können, wird in weiteren Experimenten überprüft, ob mit der Makropatch-Technik in der inside-out-Konfiguration Vergleichgewichtströme für den Einwärtstransport messbar sind. In Messungen mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik konnten Vergleichgewichtströme mit einer Zeitkonstanten von einigen ms für diese Transportrichtung gezeigt werden (Parent et al., 1992a; Parent et al., 1992b; Loo et al., 1993; Chen et al., 1996; Hazama et al., 1997). Abb. 40 zeigt die an den Vergleichgewichtsströmen beteiligten Zustände.

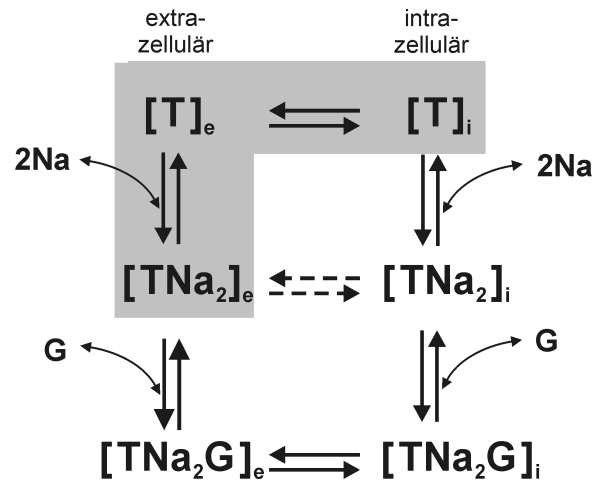


Abbildung 40: Zustände, die an möglichen Vorgleichgewichtströmen im Einwärtstransport des SGLT1 beteiligt sein können. Die beteiligten Zustände sind grau unterlegt. Dabei wird davon ausgegangen, dass in Abwesenheit von extrazellulärem Zucker bei einem konditionierenden Vorpuls auf -70 mV Haltepotential der größte Teil der Transporter im Zustand $[TNa_2]_i$ vorliegt. Durch einen depolarisierenden Spannungsprung wird Na^+ aus den Bindungstaschen gedrängt ($[TNa_2]_e \rightarrow [T]_e$), und der leere Transporter richtet sich unter den Einfluss der Spannung zur Innenseite aus ($[T]_e \rightarrow [T]_i$). Diese Ladungsverschiebungen sollten als Vorgleichgewichtsströme messbar sein.

Bei der Verwendung von inside-out-Patches wird der Einwärtsstrom des SGLT1 durch Zucker in der Pipettenlösung aktiviert. Da ein Austausch der Pipettenlösung sehr schwierig ist, werden die Spannungsprung-Experimente an 2 verschiedenen Patches derselben Oozyte durchgeführt. Somit können die Ströme mit und ohne α MDG nicht direkt verglichen werden und keine Differenz gebildet werden. Allerdings ist es möglich, die Transienten der Patches mit und ohne α MDG anzufitten und die Zeitkonstanten als Kriterium zu benutzen, ob Vorgleichgewichtsströme durch SGLT1 hervorgerufen werden oder nicht. Der transiente Strom der Messung, in der die Pipettenlösung kein α MDG enthält, lässt sich durch 2 Exponentialfunktionen mit $\tau_{1 \text{ ohne}} \approx 72 \mu\text{s}$ und $\tau_{2 \text{ ohne}} \approx 5 \mu\text{s}$ darstellen, wobei $\tau_{2 \text{ ohne}}$ durch die Filterbandbreite bestimmt ist. Mit α MDG in der Pipettenlösung kann für den zweiten Patch derselben Oozyte der transiente Strom durch nur eine Exponentialfunktion mit $\tau_{\alpha\text{MDG}} \approx 6 \mu\text{s}$ beschrieben werden, die wiederum die Filterbandbreite darstellt. Somit zeigt sich bei der Messung ohne α MDG eine zweite, langsamere Zeitkonstante, die auf das Auftreten von Vorgleichgewichtsströmen deuten könnte. Es werden aber keine Zeitkonstanten im Bereich von einigen Millisekunden beobachtet, wie sie in den Voltage-Clamp-Experimenten gezeigt wurden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass man zwei unterschiedliche Patches vergleicht, die leicht verschiedene Kapazitäten durch unterschiedliche Patch-Durchmesser, unterschiedliche Eintauchtiefen etc. besitzen. Die Kapazitätsunterschiede

zeigen sich dann auch in transienten Strömen mit unterschiedlichen Zeitkonstanten. Zusätzlich können sich Unterschiede auch durch eine leicht unterschiedliche Kompensation der systembedingten Kapazitäten durch die verstärkereigene Kapazitätskompensation ergeben. Ein weiterer Hinweis, dass $\tau_{1 \text{ ohne}} \approx 72 \mu\text{s}$ vermutlich nicht die Zeitkonstante einer Neuorientierung der Transporterzustände darstellt, ist das Auftreten von ähnlich großen Zeitkonstanten bei den Spannungssprung-Experimenten für den Auswärtstransport (siehe 3.6.3). Diese sind vermutlich auf die Umladung der Patch-Kapazität zurückzuführen, da sie bei der Differenzbildung der Messung mit und ohne αMDG verschwinden.

Die Transienten im Experiment ohne αMDG in der Pipettenlösung zeigen keine Zeitkonstante im Bereich von ms, wie es gemäß den Experimenten an ganzen Oozyten mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik zu erwarten wäre. Diesen Messungen zufolge sind 2 Zeitkonstanten für die Vergleichgewichtsströme des Einwärtstransports zu erwarten. Die langsame Zeitkonstante τ_1 im Bereich von einigen ms beschreibt die Translokation des leeren Transporters (Parent et al., 1992a; Parent et al., 1992b; Loo et al., 1993; Chen et al., 1996; Hazama et al., 1997). Die zweite, schnelle Zeitkonstante der Na^+ -Bindung/-Dissoziation wird auf ca. 0,1-0,3 ms abgeschätzt (Hazama et al., 1997).

Die Spannungssprung-Experimente zeigen, dass hier mit der Makropatch-Technik keine Vergleichgewichtsströme nachgewiesen werden können, die auf eine Neuorientierung der Transporterzustände nach einem Spannungssprung durch spannungsabhängige Schritte zurückzuführen sind. Eine mögliche Erklärung dafür, dass keine Vergleichgewichtsströme am Patch detektiert werden können, liegt in der vergleichsweise geringen zu erwartenden Stromamplitude der Vergleichgewichtsströme am Patch gegenüber den kapazitiven Transienten. Die zu erwartenden Stromamplituden der Vergleichgewichtsströme am Patch lassen sich aus dem Verhältnis der Amplituden des Vergleichgewichtsstroms zum stationären Strom aus den Voltage-Clamp-Messungen abschätzen. Danach ist der Vergleichgewichtsstrom ca. 4 mal höher als der stationäre Strom (Parent et al., 1992a), so dass am Patch die transienten Ströme bei ca. 80-160 pA liegen sollten, wenn der durchschnittliche stationäre Strom ca. 20-40 pA beträgt. Diese sind gegenüber den gemessenen kapazitiven Transienten von 10-20 nA sehr gering. Wenn die Stromamplituden der kapazitiven Transienten verringert werden können, könnten vorhandenen Vergleichgewichtsströme möglicherweise detektiert werden. Dies sollte durch weitere Versuche zur Verringerung der Pipettenkapazität, z. B. durch Beschichten der Pipette, oder aber auch durch eine andere Pipettenform, erfolgen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit erfolgt eine Untersuchung der intrazellulären Transporteigenschaften des Na^+ /Glucose Cotransporters SGLT1 aus dem Kaninchen. Der Transporter wird dazu heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Die hohe Expressionsdichte erlaubt die Anwendung der „giant excised patch clamp“-Technik in der inside-out Konfiguration. Die Patches mit Durchmessern von 20-30 μm enthalten ca. $2,5 - 5 \cdot 10^6$ Transportern bei einem durchschnittlichen Strom von 20-40 pA.

Der Transport des Substrats Glucose bzw. des hier verwendeten αMDG wird angetrieben durch den elektrochemischen Gradienten für das Cosubstrat Na^+ . Bei 0 mV Haltepotential wird zuerst die reine Konzentrationsabhängigkeit des Auswärtstransports durch die Bestimmung der apparenten intrazellulären Affinität für αMDG bei verschiedenen festen Na^+ -Konzentrationen untersucht. Es kann eine deutliche Abhängigkeit des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ von der Na^+ -Konzentration festgestellt werden. Eine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration von 10 mM auf 400 mM führt zu einer ca. 12fachen Abnahme des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$. Experimente mit symmetrischer Na^+ -Verteilung zeigen, dass auch ohne Na^+ -Konzentrations-Gradient Transport stattfinden kann, allerdings mit einer deutlich geringeren Affinität für αMDG . Verglichen mit Literaturwerten für die extrazelluläre αMDG -Affinität ist die intrazelluläre Affinität 10-15mal geringer als die extrazelluläre.

Die Untersuchung der Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration bei verschiedenen festen αMDG -Konzentrationen zeigt, dass K_M^{Na} eine geringe Abhängigkeit von der αMDG -Konzentration besitzt. Die 10fache Erhöhung der αMDG -Konzentration von 25 mM auf 250 mM führt nur zu einer leichten Erniedrigung des K_M^{Na} . Die intrazelluläre Na^+ -Affinität liegt in der gleichen Größenordnung wie die extrazelluläre.

Zur Untersuchung der intrazellulären Bindungsreihenfolge werden die gemessenen Abhängigkeiten des $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ und des I_{Max} von der Na^+ -Konzentration mit Simulationen für die 3 möglichen Bindungsreihenfolgen ($2\text{Na}^+:\text{G}$), ($\text{Na}^+:\text{G}:\text{Na}^+$) und ($\text{G}:2\text{Na}^+$) verglichen. Mit den hier gemachten Annahmen für die intrazellulären Bindungskonstanten für αMDG und Na^+ wird die beste Übereinstimmung für die intrazelluläre Bindungsreihenfolge ($2\text{Na}^+:\text{G}$) gefunden.

Zur Untersuchung des spannungsabhängigen Verhaltens der Affinitäten für αMDG und Na^+ werden Spannungssprünge unter denselben Konzentrationsbedingungen wie vorher durchgeführt. Die Strom-Spannungs-Kennlinien zeigen eine Zunahme der zuckerinduzierten Stromamplituden zu positiven Potentialen hin. Dabei wird weder bei

hyperpolarisierenden noch bei depolarisierenden Potentialen eine Sättigung erreicht. Dies läßt den Rückschluss, dass im betrachteten Spannungsbereich ein spannungsabhängiger Schritt im Transportzyklus geschwindigkeitsbestimmend ist.

Die apparenten Affinitäten für α MDG und Na^+ besitzen eine geringe Spannungsabhängigkeit. Der $K_M^{\alpha\text{MDG}}$ bei annähernd sättigender Na^+ -Konzentration fällt zwischen -40 mV und $+40$ mV um einen Faktor 4,4. Bei verringerter Na^+ -Konzentration beeinflusst das Membranpotential die α MDG-Affinität stärker. Der K_M^{Na} fällt unter sättigenden Zuckerbedingungen im gleichen Spannungsbereich auf die Hälfte ab, wobei der Hill-Koeffizient konstant bleibt. Die Erniedrigung der α MDG-Konzentration verursacht keine Veränderung des spannungsabhängigen Verlaufs.

Die Ergebnisse zeigen, dass SGLT1 ein reversibler Transporter ist, der sowohl Einwärts-, aber auch Auswärtstransport von Glucose generieren kann. Er zeigt dabei eine starke Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration und eine geringe Abhängigkeit vom Membranpotential. Die hier bestimmten Eigenschaften zeigen aber auch, dass unter physiologischen Bedingungen ein Auswärtstransport von Glucose sehr unwahrscheinlich ist. Das Zusammenwirken der Faktoren Richtung des Na^+ -Gradient, geringe Zuckeraffinität, negatives Membranpotential und geringe intrazelluläre Na^+ -Konzentration verhindern den Auswärtstransport. Der physiologische Na^+ -Gradient ist dem Auswärtstransport entgegengerichtet. Die geringe intrazelluläre Na^+ -Konzentration und das negative Membranpotential verursachen eine sehr geringe intrazelluläre Zuckeraffinität von ca. 75 mM α MDG, so dass ein merklicher Auswärtstransport nur bei einer hohen Zuckerkonzentration innerhalb der Epithelzellen stattfinden kann. Dies wird jedoch durch basolaterale Glucose-Transporter verhindert. Das negative Membranpotential führt zu einer geringen Aktivität des Auswärtstransports. Die geringe intrazelluläre Na^+ -Konzentration liegt weit unterhalb es K_M^{Na} , so dass auch hier die Transporteraktivität gering ist.

Die asymmetrische Funktionsweise des SGLT1 gewährleistet, dass der Glucose-Transport nur in eine physiologisch sinnvolle Richtung, nämlich der Aufnahme von Glucose in die Epithelzellen, stattfindet.

6 Literaturverzeichnis

- Alvarado, F. (1962)** Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine, in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 56: 170-180.
- Alvarado, F. (1967)** Hypothesis for the interaction of phlorizin and phloretin with membrane carriers for sugars. *Biochimica et Biophysica Acta* 135(3): 483-495.
- Aronson, P.S. (1978)** Energy-dependence of phlorizin binding to isolated renal microvillus membranes. Evidence concerning the mechanism of coupling between the electrochemical Na^+ gradient the sugar transport. *Journal of Membrane Biology* 42(1): 81-98.
- Barry, R.J.C., Dikstein, S., Matthews, J., Smyth, D.H. und Wright, E.M. (1964)** Electrical potentials associated with intestinal sugar transfer. *Journal of Physiology (London)* 171: 316-338.
- Baud, C., Kado, R.T. und Marcher, K. (1982)** Sodium channels induced by depolarization of the *Xenopus laevis* oocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(10): 3188-3192.
- Bennett, E. und Kimmich, G.A. (1996)** The Molecular Mechanism and Potential Dependence of the Na^+ /Glucose Cotransporter. *Biophysical Journal* 70(4): 1676-1688.
- Birnir, B., Loo, D.D. und Wright, E.M. (1991)** Voltage-clamp studies of the Na^+ /glucose cotransporter cloned from rabbit small intestine. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* 418(1-2): 79-85.
- Brot-Laroche, E. und Alvarado, F. (1983)** Mechanisms of Sugar Transport Across the Intestinal Brush Border Membrane. *Intestinal Transport*. Gilles-Baillien, M. und Gilles, R. Berlin Heidelberg, Springer Verlag: 145-169.
- Caspary, W.F. (1975)** Resorption von Kohlenhydraten und Proteinen im Dünndarm unter normalen und krankhaften Bedingungen. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Centelles, J.J., Kinne, R.K. und Heinz, E. (1991)** Energetic coupling of Na-glucose cotransport. *Biochimica et Biophysica Acta* 1065(2): 239-249.
- Chen, X.Z., Coady, M.J., Jackson, F., Berteloot, A. und Lapointe, J.Y. (1995)** Thermodynamic determination of the Na^+ : glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophysical Journal* 69(6): 2405-2414.
- Chen, X.Z., Coady, M.J., Jalal, F., Wallendorff, B. und Lapointe, J.Y. (1997)** Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na^+ -glucose cotransporter. *Biophysical Journal* 73(5): 2503-2510.
- Chen, X.Z., Coady, M.J. und Lapointe, J.Y. (1996)** Fast Voltage Clamp Discloses a New Component of Presteady State Current From the Na^+ -Glucose Cotransporter. *Biophysical Journal* 71(5): 2544-2552.
- Coleman, A. (1984)** Translation of eucaryotic messenger RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Transcription and Translation: a practical approach*. Hames, B.D. und Higgins, S.J. Oxford, IRL Press Limited: 271-302.
- Corey, D. und Stevens, C. (1983)** Science and technology of patch recording electrodes. *Single -Channel Recording*. Sakmann, B. und Neher, E. New York, Plenum Press: 53-68.
- Crane, R.K. (1962)** Hypothesis for mechanisms of intestinal active transport of sugars. *Federal Proceedings* 21: 891-895.
- Crane, R.K. (1977)** The Gradient Hypothesis and Other Models of Carrier-Mediated Active Transport. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 78: 99-159.

- Crane, R.K. und Mandelstam, P. (1960)** The active transport of sugars by various preparations of hamster intestine. *Biochimica Biophysica Acta* 45: 460-476.
- Dascal, N. (1987)** The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 22(4): 317-387.
- Dascal, N., Landau, E.M. und Lass, Y. (1984)** *Xenopus* oocyte resting potential, muscarinic responses and the role of calcium and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Journal of Physiology* 352: 551-574.
- Diedrich, D.F. (1966)** Competitive Inhibition of Intestinal Glucose Transport by Phlorizin analogs. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 117: 248.
- Diedrich, D.F. (1990)** Photoaffinity-labeling analogs of phlorizin and phloretin: synthesis and effects on cell membranes. *Methods in Enzymology*. Fleischer, S. und Fleischer, B. San Diego, Academic Press. 191: 755-780.
- Diez-Sampedro, A., Eskandari, S., Wright, E.M. und Hirayama, B.A. (2001)** Na⁺-to-sugar stoichiometry of SGLT3. *American Journal of Physiology - Renal Fluid & Electrolyte Physiology* 280(2): F278-F282.
- Diez-Sampedro, A., Lostao, M.P., Wright, E.M. und Hirayama, B.A. (2000)** Glycoside binding and translocation in Na⁺-dependent glucose cotransporters: Comparison of SGLT1 and SGLT3. *Journal of Membrane Biology* 176(2): 111-117.
- Dumont, J.N. (1972)** Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin), 1. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology* 136: 153-180.
- Eskandari, S., Loo, D.D., Dai, G., Levy, O., Wright, E.M. und Carrasco, N. (1997)** Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *Journal of Biological Chemistry* 272(43): 27230-27238.
- Eskandari, S., Loo, D.D.F. und Wright, E.M. (1999)** Functional asymmetry of the sodium/glucose cotransporter. *FASEB Journal* 13(45): A399.
- Firnges, M.A., Lin, J.T. und Kinne, R.K.H. (2001)** Functional asymmetry of the sodium-D-glucose cotransporter expressed in yeast secretory vesicles. *Journal of Membrane Biology* 179(2): 143-153.
- Forster, I.C., Wagner, C.A., Busch, A.E., Lang, F., Biber, J., Hernando, N., Murer, H. und Werner, A. (1997)** Electrophysiological characterization of the flounder type II Na⁺/Pi cotransporter (NaPi-5) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Membrane Biology* 160(1): 9-25.
- Frasch, W., Frohnert, P.P., Bode, F., Baumann, K. und Kinne, R. (1970)** Competitive inhibition of phlorizin binding by D-glucose and the influence of sodium: a study on isolated brush border membrane of rat kidney. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* 320(3): 265-284.
- Gerencser, G.A. und Stevens, B.R. (1994)** Thermodynamics of symport and antiport catalyzed by cloned or native transporters. *Journal of Experimental Biology* 196: 59-75.
- Gibbs, E.M., Hosang, M., Reber, B.F., Semenza, G. und Diedrich, D.F. (1982)** 4-Azidophlorizin, a high affinity probe and photoaffinity label for the glucose transporter in brush border membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 688(2): 547-556.
- Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R. und Marbaix, G. (1971)** Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233(5316): 177-182.
- Haase, W., Heitmann, K., Friese, W., Ollig, D. und Koepsell, H. (1990)** Characterization and histochemical localization of the rat intestinal Na(+)-D-glucose cotransporter by monoclonal antibodies. *European Journal of Cell Biology* 52(2): 297-309.

- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F.J. (1981)** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 391(2): 85-100.
- Hazama, A., Loo, D.D.F. und Wright, E.M. (1997)** Presteady-State Currents of the Rabbit Na⁺/Glucose Cotransporter (Sglt1). *Journal of Membrane Biology* 155(2): 175-186.
- Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S. und Wright, E.M. (1987)** Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330(6146): 379-381.
- Hediger, M.A., Kanai, Y., You, G. und Nussberger, S. (1995)** Mammalian ion-coupled solute transporters. *Journal of Physiology* 482: 7S-17S.
- Hediger, M.A. und Rhoads, D.B. (1994)** Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiological Reviews* 74(4): 993-1026.
- Hilgemann, D.W. (1995)** The giant membrane patch. Single channel recording. Sakmann, B. und Neher, E. New York, Plenum Press: 307-327.
- Hilgemann, D.W., Nicoll, D.A. und Philipson, K.D. (1991)** Charge movement during Na⁺ translocation by native and cloned cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Nature* 352(6337): 715-718.
- Hilken, G., Iglauer, F. und Richter, H.-P. (1997)** Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labortier: Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung. Stuttgart, Enke.
- Hirayama, B.A., Loo, D.D. und Wright, E.M. (1994)** Protons drive sugar transport through the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1). *Journal of Biological Chemistry* 269(34): 21407-21410.
- Hirayama, B.A., Loo, D.D. und Wright, E.M. (1997)** Cation effects on protein conformation and transport in the Na⁺/glucose cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* 272(4): 2110-2115.
- Hirayama, B.A., Lostao, M.P., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D., Turk, E. und Wright, E.M. (1996)** Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT-1). *American Journal of Physiology* 270(6 Pt 1): G919-926.
- Hirsch, J.R., Loo, D.D.F. und Wright, E.M. (1996)** Regulation of Na⁺/Glucose Cotransporter Expression By Protein Kinases in *Xenopus Laevis* Oocytes. *Journal of Biological Chemistry* 271(25): 14740-14746.
- Hopfer, U., Sigrist-Nelson, K. und Groseclose, R. (1976)** Jejunal and ileal D-glucose transport in isolated brush border membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 426(2): 349-353.
- Ikeda, T.S., Hwang, E.S., Coady, M.J., Hirayama, B.A., Hediger, M.A. und Wright, E.M. (1989)** Characterization of a Na⁺/glucose cotransporter cloned from rabbit small intestine. *Journal of Membrane Biology* 110(1): 87-95.
- Kado, R.T. und Baud, C. (1981)** The rise and fall of electrical excitability in the oocyte of *Xenopus laevis*. *Journal de Physiologie* 77(9): 1113-1117.
- Kanai, Y., Lee, W.S., You, G., Brown, D. und Hediger, M.A. (1994)** The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *Journal of Clinical Investigation* 93(1): 397-404.
- Kessler, M. und Semenza, G. (1983)** The small-intestinal Na⁺, D-glucose cotransporter: an asymmetric gated channel (or pore) responsive to delta psi. *Journal of Membrane Biology* 76(1): 27-56.

- Kimmich, G.A. (1990)** Membrane potentials and the mechanism of intestinal Na(+)-dependent sugar transport. *Journal of Membrane Biology* 114(1): 1-27.
- Kimmich, G.A. und Randles, J. (1979)** Energetics of sugar transport by isolated intestinal epithelial cells: effects of cytochalasin B. *American Journal of Physiology* 237(1): C56-63.
- Kimmich, G.A. und Randles, J. (1980)** Evidence for an intestinal Na⁺:sugar transport coupling stoichiometry of 2.0. *Biochimica et Biophysica Acta* 596(3): 439-444.
- Kimmich, G.A. und Randles, J. (1981)** alpha-Methylglucoside satisfies only Na⁺-dependent transport system of intestinal epithelium. *American Journal of Physiology* 241(5): C227-232.
- Kimmich, G.A. und Randles, J. (1988)** Na⁺-coupled sugar transport: membrane potential-dependent K_m and K_i for Na⁺. *American Journal of Physiology* 255(4 Pt 1): C486-494.
- Kipp, H., Lin, J.T. und Kinne, R.K. (1996)** Interactions of alkylglucosides with the renal sodium/D-glucose cotransporter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1282(1): 125-130.
- Koepsell, H., Fritsch, G., Korn, K. und Madrala, A. (1990)** Two substrate sites in the renal Na(+)-D-glucose cotransporter studied by model analysis of phlorizin binding and D-glucose transport measurements. *Journal of Membrane Biology* 114(2): 113-132.
- Koepsell, H. und Madrala, A. (1987)** Interaction of phlorizin with the Na⁺-D-Glucose cotransporter from intestine and kidney. *Topics of Molecular Pharmacology* 4: 169-202.
- Kong, C.T., Yet, S.F. und Lever, J.E. (1993)** Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters. *Journal of Biological Chemistry* 268(3): 1509-1512.
- Lafaire, A.V. und Schwarz, W. (1986)** Voltage Dependence of the Rheogenic Sodium Potassium Atpase in the Membrane of Oocytes of *Xenopus-Laevis*. *Journal of Membrane Biology*.
- Lam, J.T., Martin, M.G., Turk, E., Hirayama, B.A., Bosshard, N.U., Steinmann, B. und Wright, E.M. (1999)** Missense mutations in SGLT1 cause glucose-galactose malabsorption by trafficking defects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1453(2): 297-303.
- Lee, W.S., Kanai, Y., Wells, R.G. und Hediger, M.A. (1994)** The high affinity Na⁺/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression. *Journal of Biological Chemistry* 269(16): 12032-12039.
- Lin, J., Kormanec, J., Homerova, D. und Kinne, R.K. (1999)** Probing transmembrane topology of the high-affinity Sodium/Glucose cotransporter (SGLT1) with histidine-tagged mutants. *Journal of Membrane Biology* 170(3): 243-252.
- Lo, B. und Silverman, M. (1998)** Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na⁺/Glucose cotransporter SGLT1. Evidence that this region participates in the Na⁺ and voltage dependence of the transporter. *Journal of Biological Chemistry* 273(45): 29341-29351.
- Loo, D.D., Hazama, A., Supplisson, S., Turk, E. und Wright, E.M. (1993)** Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(12): 5767-5771.
- Loo, D.D., Hirayama, B.A., Gallardo, E.M., Lam, J.T., Turk, E. und Wright, E.M. (1998)** Conformational changes couple Na⁺ and glucose transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(13): 7789-7794.

- Loo, D.D., Zeuthen, T., Chandy, G. und Wright, E.M. (1996)** Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(23): 13367-13370.
- Loo, D.D.F., Hirayama, B.A., Meinild, A.K., Chandy, G., Zeuthen, T. und Wright, E.M. (1999)** Passive water and ion transport by cotransporters. Journal of Physiology-London 518(1): 195-202.
- Lostao, M.P., Hirayama, B.A., Loo, D.D. und Wright, E.M. (1994)** Phenylglucosides and the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1): analysis of interactions. Journal of Membrane Biology 142(2): 161-170.
- Lu, C.C. und Hilgemann, D.W. (1999)** GAT1 (GABA:Na⁺:Cl⁻) cotransport function. Kinetic studies in giant Xenopus oocyte membrane patches. Journal of General Physiology 114(3): 445-457.
- Mackenzie, B., Loo, D.D. und Wright, E.M. (1998)** Relationships between Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. Journal of Membrane Biology 162(2): 101-106.
- Mackenzie, B., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D., Lever, J.E. und Wright, E.M. (1994)** SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. A reinterpretation. Journal of Biological Chemistry 269(36): 22488-22491.
- Martin, M.G., Turk, E., Lostao, M.P., Kerner, C. und Wright, E.M. (1996)** Defects in Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking and function cause glucose-galactose malabsorption. Nature Genetics 12(2): 216-220.
- Meinild, A., Klaerke, D.A., Loo, D.D., Wright, E.M. und Zeuthen, T. (1998)** The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. Journal of Physiology 508(Pt 1): 15-21.
- Miller, A.J. und Zhou, J.J. (2000)** Xenopus oocytes as an expression system for plant transporters. Biochimica et Biophysica Acta 1465(1-2): 343-358.
- Panayotova-Heiermann, M., Eskandari, S., Turk, E., Zampighi, G.A. und Wright, E.M. (1997)** Five transmembrane helices form the sugar pathway through the Na⁺/glucose cotransporter. Journal of Biological Chemistry 272(33): 20324-20327.
- Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D., Lostao, M.P. und Wright, E.M. (1994)** Sodium/D-glucose cotransporter charge movements involve polar residues. Journal of Biological Chemistry 269(33): 21016-21020.
- Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D. und Wright, E.M. (1995)** Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. Journal of Biological Chemistry 270(45): 27099-27105.
- Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D. und Wright, E.M. (1992a)** Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. Journal of Membrane Biology 125(1): 49-62.
- Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D. und Wright, E.M. (1992b)** Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions [published erratum appears in J Membr Biol 1992 Nov;130(2):203]. Journal of Membrane Biology 125(1): 63-79.
- Peerce, B.E. und Wright, E.M. (1984)** Sodium-induced conformational changes in the glucose transporter of intestinal brush borders. Journal of Biological Chemistry 259(22): 14105-14112.
- Rebbeor, J.F., Connolly, G.C., Dumont, M.E. und Ballatori, N. (1998)** Atp-Dependent Transport of Reduced Glutathione in Yeast Secretory Vesicles. Biochemical Journal 334(Part 3): 723-729.
- Restrepo, D. und Kimmich, G.A. (1985)** Kinetic analysis of mechanism of intestinal Na⁺-dependent sugar transport. American Journal of Physiology 248(5 Pt 1): C498-509.

- Rettinger, J. (1994)** Elektrophysiologische Untersuchungen endogener und exogener Transportproteine in der Membran von Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* mit Hilfe einer neuen Variante der Patch-Clamp-Methode. Physik. Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe-Universität: 136.
- Reuss, L. (2000)** One-hundred years of inquiry: the mechanism of glucose absorption in the intestine. *Annual Review of Physiology* 62: 939-946.
- Schmidt, R.F. und Thews, G., Eds. (1993)** Physiologie des Menschen. Berlin, Springer.
- Segel, I.H. (1975)** Enzyme Kinetics. New York, John Wiles & Sons.
- Semenza, G., Kessler, M., Hosang, M., Weber, J. und Schmidt, U. (1984)** Biochemistry of the Na⁺, D-glucose cotransporter of the small-intestinal brush-border membrane. The state of the art in 1984. *Biochimica et Biophysica Acta* 779(3): 343-379.
- Sigel, E. (1990)** Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *Journal of Membrane Biology* 117(3): 201-221.
- Silverman, M. (1980)** Participation of the ring oxygen in sugar interaction with transporters at renal tubular surfaces. *Biochimica et Biophysica Acta* 600(2): 502-512.
- Silverman, M. und Black, J. (1975)** High affinity phlorizin receptor sites and their relation to the glucose transport mechanism in the proximal tubule of dog kidney. *Biochimica et Biophysica Acta* 394(1): 10-30.
- Smith-Maxwell, C., Bennett, E., Randles, J. und Kimmich, G.A. (1990)** Whole cell recording of sugar-induced currents in LLC-PK1 cells. *American Journal of Physiology* 258(2 Pt 1): C234-242.
- Thorens, B. und Waeber, G. (1997)** GLUT2 Function, Expression and Transcriptional Regulation in Liver and Pancreatic β cells. *Facilitative Glucose Transporters*. Gould, G.W. Heidelberg, Springer: 167-182.
- Toggenburger, G., Kessler, M., Rothstein, A., Semenza, G. und Tannenbaum, C. (1978)** Similarity in effects of Na⁺ gradients and membrane potentials on D-glucose transport by, and phlorizin binding to, vesicles derived from brush borders of rabbit intestinal mucosal cells. *Journal of Membrane Biology* 40(3): 269-290.
- Toggenburger, G., Kessler, M. und Semenza, G. (1982)** Phlorizin as a probe of the small-intestinal Na⁺,D-glucose cotransporter. A model. *Biochimica et Biophysica Acta* 688(2): 557-571.
- Turk, E., Martin, M.G. und Wright, E.M. (1994)** Structure of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1. *Journal of Biological Chemistry* 269(21): 15204-15209.
- Turk, E. und Wright, E.M. (1997)** Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *Journal of Membrane Biology* 159(1): 1-20.
- Turner, R.J. (1981)** Kinetic analysis of a family of cotransport models. *Biochimica et Biophysica Acta* 649(2): 269-280.
- Umbach, J.A., Coady, M.J. und Wright, E.M. (1990)** Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophysical Journal* 57(6): 1217-1224.
- Vayro, S. und Silverman, M. (1999)** PKC regulates turnover rate of rabbit intestinal Na⁺-glucose transporter expressed in COS-7 cells. *American Journal of Physiology* 276(5 Pt 1): C1053-1060.
- Wadiche, J.I., Arriza, J.L., Amara, S.G. und Kavanaugh, M.P. (1995)** Kinetics of a human glutamate transporter. *Neuron* 14(5): 1019-1027.
- Weber, W. (1999)** Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochimica et Biophysica Acta* 1421(2): 213-233.
- Weber, W.M., Schwarz, W. und Passow, H. (1989)** Endogenous D-glucose transport in oocytes of *Xenopus laevis*. *Journal of Membrane Biology* 111(1): 93-102.

- Weinreich, F. (1999)** Untersuchungen zur Aktivierung und zum Öffnungszyklus von humanen CFTR-Chloridkanälen exprimiert in Oozyten von *Xenopus laevis*. Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie. Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- Wierzbicki, W., Berteloot, A. und Roy, G. (1990)** Presteady-state kinetics and carrier-mediated transport: a theoretical analysis. *Journal of Membrane Biology* 117(1): 11-27.
- Wright, E.M. (1998)** I. Glucose galactose malabsorption. *American Journal of Physiology* 275(5 Pt 1): G879-882.
- Wright, E.M., Hirsch, J.R., Loo, D.D.F. und Zampighi, G.A. (1997)** Regulation of Na⁺/Glucose Cotransporters. *Journal of Experimental Biology* 200(2): 287-293.
- Wright, E.M., Loo, D.D., Panayotova-Heiermann, M., Hirayama, B.A., Turk, E., Eskandari, S. und Lam, J.T. (1998)** Structure and function of the Na⁺/glucose cotransporter. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum* 643: 257-264.
- Wright, E.M., Loo, D.D., Panayotova-Heiermann, M., Lostao, M.P., Hirayama, B.H., Mackenzie, B., Boorer, K. und Zampighi, G. (1994)** 'Active' sugar transport in eukaryotes. *Journal of Experimental Biology* 196: 197-212.
- You, G.F., Lee, W.S., Barros, E.J.G., Kanai, Y., Huo, T.L., Khawaja, S., Wells, R.G., Nigam, S.K. und Hediger, M.A. (1995)** Molecular Characteristics of Na⁺-Coupled Glucose Transporters in Adult and Embryonic Rat Kidney. *Journal of Biological Chemistry* 270(49): 29365-29371.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Ernst Bamberg für die Möglichkeit bedanken, in seiner Abteilung meine Doktorarbeit durchführen zu können. Seine kompetenten, interessierten Anregungen waren dabei sehr hilfreich.

Dr. Klaus Hartung möchte ich für die persönliche Betreuung, seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken.

Dr. Christof Grewer war mir mit seinem hervorragenden Wissen über Transporter, Kanäle, Kinetik und praktischer Patch-Clamp-Technik eine große Hilfe. Für seine stete Diskussionsbereitschaft möchte ich mich bedanken.

Dr. Georg Nagel möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit und für hilfreiche Tipps danken.

Bei Prof. Hermann Koepsell möchte ich für die Überlassung des SGLT1-Klons und besonders für die engagierte Zusammenarbeit bei der Erstellung meines Papers danken.

Besonderer Dank gilt Andreas Haase, mit dem ich das Labor geteilt habe. Er stand mir mit seinen Computer-Kenntnissen und Hachez-Schokolade immer aufopfernd mit Rat und Tat zur Seite.

Natalie Watzke möchte ich für unsere Diskussionen über Bindungsreihenfolgen und die Nachhilfe in Biochemie und Kinetik danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts, darunter besonders Thomas Budiman, Ana Bicho, Verena Pintschovius, Anja Becker, Eva Grabsch, Barbara Legrum und Kerstin Meyer, möchte ich einfach für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die vielen schönen Stunden danken.

Uwe Knösel möchte ich danken für seine Unterstützung und für das Verständnis, mit denen er mich während meiner Arbeit begleitet hat.

Lebenslauf

Name Gudrun Anna Sauer
Anschrift Haagstrasse 21
61169 Friedberg
Geburtstag /-ort 22.09.1969 in Goldbach

Schulbildung:

1976-1980 Grundschule in Goldbach
1980-1989 Maria-Ward-Gymnasium in Aschaffenburg

Studium:

1990-1992 Studium an der J.W.-Goethe-Universität in Frankfurt
Studiengang Meteorologie (Abschluss Vordiplom)
1992-1997 Wechsel zum Studiengang Physik unter Anerkennung des
Vordiploms (Abschluss Diplom)
1995-1996 Diplomarbeit im Zentrum der Physiologie, Klinikum der J.W.-
Goethe-Universität in Frankfurt
(„Messung von Ionenkonzentrationen im Innenohr und
Abschätzung der Leitfähigkeiten des Tegmentum vasculosum
bei der Taube“)
seit 01.06.1997 Promotion am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt
(„Elektrophysiologische Untersuchungen an dem Na⁺/Glucose
Cotransporter SGLT1“)

Weitere Ausbildung:

1994-1998 Fernstudium an der Universität Kaiserslautern
Studiengang: Medizinische Physik und Technik