

Versuch 2



Membranpotentiale

Till Biskup

Matrikelnummer: 155567

16. Mai 2000

Einleitung

Der vorliegende Versuch demonstrierte vergleichsweise einfach durchführbare Methoden zur Bestimmung von Transmembranpotentialen an lebenden Zellen. Als Versuchsobjekt kamen dabei menschliche Erythrocyten zum Einsatz, die Membranpotentiale wurden über die passive Verteilung kleiner Ladungsträger (Protonen) ermittelt.

1 Aufgaben

1. Eichung des pH-Meters und des Schreibers
2. Bestimmung der Zeitkonstanten der Elektrode
3. Bestimmung des Membranpotentials unbehandelter Erythrocyten
4. Bestimmung des K^+ -Diffusionspotentials nach Zugabe von A23187 (GARDOS-Effekt)
5. Bestimmung der pH-Abhängigkeit des DONNAN-Potentials

1.1 Eichung von pH-Meter und Schreiber

Die Messung der Protonen-Verteilung erfolgte mittels einer Einstab-pH-Glaselektrode, die über ein pH-Meter an einen y, t -Schreiber angeschlossen war. Da für die Auswertung pH-Wert-Differenzen von Interesse sind, mußte zunächst der Schreiber mittels dreier definierter Pufferlösungen kalibriert werden. Durch die Auftragung der Schreiber-Einheiten (E_s) des y, t -Schreibers gegen den pH-Wert und sich anschließende lineare Regression konnte eine Eichgerade ermittelt werden, die eine Zuordnung dieser beiden Größen und damit eine Ermittlung des pH-Wertes anhand der Meßkurve des Schreibers gestattet.

Eichgerade		lineare Regression			
pH	E_s	a	u_a	b	u_b
5.5	39.50	30.3	0.14	-127	4.4
6.5	70.00				
7.5	100.00				

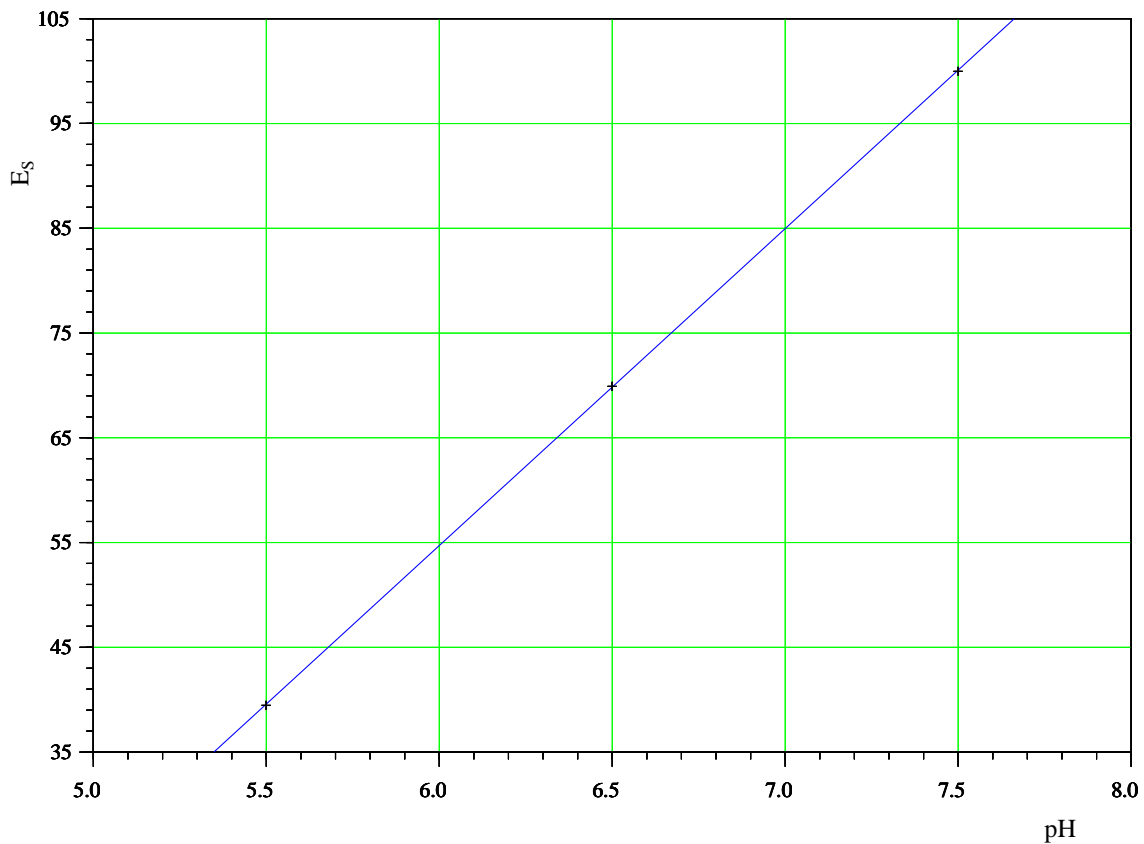


Abbildung 1: Eichgerade für pH-Meter und Schreiber

Stellt man die in Abb. 1 dargestellte, durch lineare Regression errechnete Geradengleichung nach x um, so ergibt sich zur Berechnung des pH-Wertes folgende Gleichung:

$$\text{pH} = \frac{E_s - b}{a} = \frac{E_s + 127}{30.3} \quad (1)$$

Sie erlaubt die Ermittlung der pH-Werte für alle weiteren Teilversuche.

1.2 Zeitkonstante der Elektrode

Zur Bestimmung der Zeitkonstante wurden 10 ml der gepufferten Versuchslösung (20mM NaCl und Saccharose) verwendet. Nach der Einstellung eines Plateaus wurden 50 ml einer 1-molaren HCl-Lösung hinzugegeben. Es konnte ein deutlicher pH-Abfall registriert werden, der sich exponentiell verhielt. Dies lässt sich durch folgende Formel darstellen:

$$\text{pH}(t) = \text{pH}_{\text{Ende}} + \Delta\text{pH} \cdot e^{-kt}$$

Um jedoch Aussagen über die erhaltenen Punkte machen zu können, wurde die Gleichung logarithmiert und etwas umgeformt:

$$\ln\left(\frac{\text{pH}(t) - \text{pH}_{\text{Ende}}}{\Delta\text{pH}}\right) = -kt \quad (2)$$

Zeitkonstante — Meßwerte				Zeitkonstante — Meßwerte			
t/s	E_s	pH	$\ln\left(\frac{\text{pH}(t)-\text{pH}_{\text{Ende}}}{\Delta\text{pH}}\right)$	t/s	E_s	pH	$\ln\left(\frac{\text{pH}(t)-\text{pH}_{\text{Ende}}}{\Delta\text{pH}}\right)$
0	91.75	7.22	-0.39	75	31.75	5.24	-3.71
5	77.50	6.75	-0.65	80	31.50	5.23	-3.83
10	65.00	6.34	-0.95	85	31.25	5.22	-3.96
15	55.50	6.03	-1.26	90	30.75	5.21	-4.30
20	49.00	5.81	-1.55	95	30.50	5.20	-4.52
25	44.75	5.67	-1.79	100	30.25	5.19	-4.81
30	41.25	5.56	-2.06	105	30.00	5.18	-5.21
35	39.00	5.48	-2.27	110	30.00	5.18	
40	37.50	5.43	-2.44	115	30.00	5.18	
45	36.00	5.38	-2.65	120	30.00	5.18	
50	34.50	5.33	-2.91	125	30.00	5.18	
55	34.00	5.32	-3.01	130	30.00	5.18	
60	33.00	5.28	-3.27	135	29.75	5.18	
65	32.50	5.27	-3.42	140	29.50	5.17	
70	32.25	5.26	-3.51	145	29.50	5.17	

Wie aus der Tabelle hervorgeht, sind die Werte bis 105 Sekunden für eine lineare Regression der halblogarithmischen Darstellung brauchbar. Die Zeitkonstante k der Elektrode ergibt sich nun gemäß Gleichung (2) als Steigung aus der durch die erhaltenen Werte gelegten Regressionsgerade.

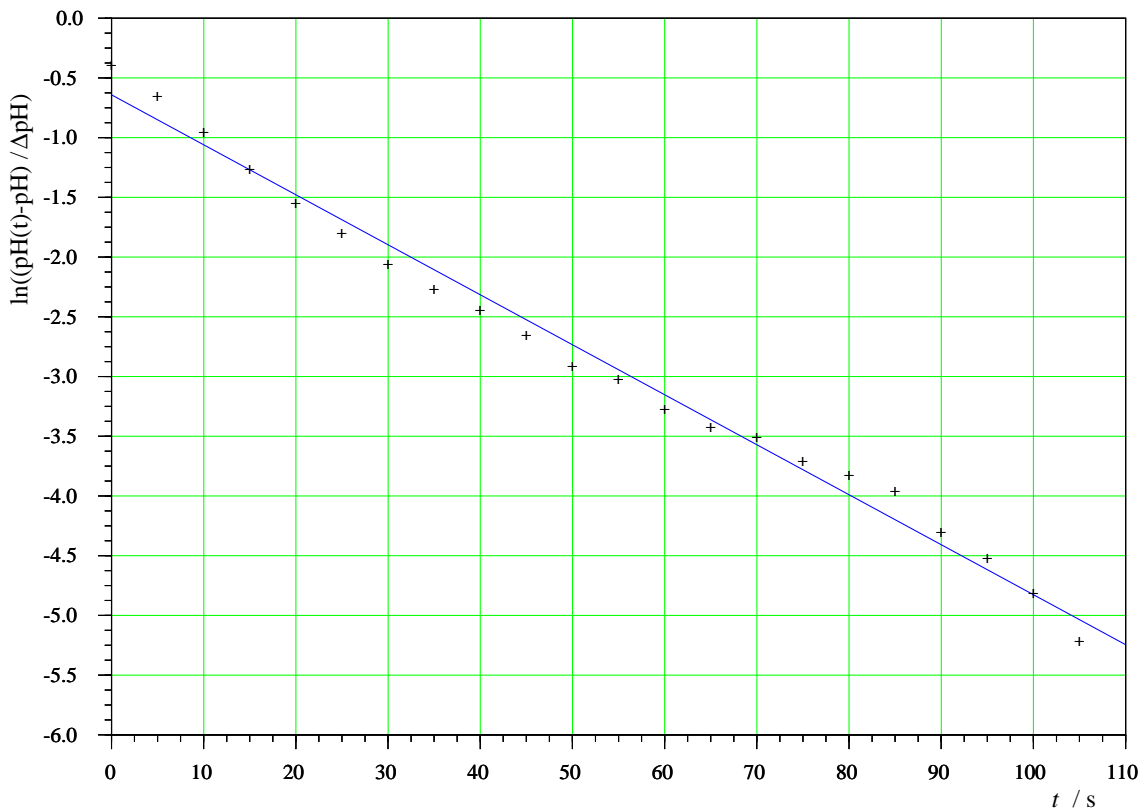


Abbildung 2: Zeitkonstante der Elektrode — Auftragung t gegen $\ln\left(\frac{\text{pH}(t)-\text{pH}_{\text{Ende}}}{\Delta\text{pH}}\right)$

lineare Regression			
a	u_a	b	u_b
-0.0419	0.0009	-0.64	0.02

Somit beträgt die Zeitkonstante k der Elektrode $(0.0419 \pm 0.0009) \text{ s}^{-1}$. Daraus ergibt sich eine Halbwertszeit $t_{\frac{1}{2}}$ von:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k} = (16.54 \pm 0.04) \text{ s}$$

1.3 Membranpotential unbehandelter Erythrocyten

Zur Bestimmung des Membranpotentials wurden 10 ml einer Suspension (Hämatokrit 5%) der Lösung I (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂) hergestellt. Die Zugabe von 5 μl des protonenspezifischen Ionophors CCCP diente der Permeabilitäts-erhöhung der Erythrocyten-Membran für Protonen und damit der beschleunigten Einstellung der passiven Verteilung der Protonen.

Ein erster pH-Wert wurde nach Äquilibrierung festgehalten, ein zweiter nach der Hämolyse der Zellen durch Zugabe von 20 μl Triton. Der theoretische Hintergrund dieses Vorgehens ist die Annahme, daß die Pufferwirkung der Erythrocyten stark genug ist, um nach der Hämolyse auch die Lösung auf den zuvor im Erythrocyten vorherrschenden pH-Wert zu puffern, so daß auf diese Weise der intrazelluläre pH-Wert bestimmt werden kann.

Membranpotential		
	E_s	pH
Äquilibrierung	75.50	6.69
Hämolyse	73.50	6.62

Mit Hilfe der NERNST-Gleichung (Gl. 3) kann aus der Differenz der beiden pH-Werte wie folgt das Transmembranpotential errechnet werden.

$$\Delta\psi = 2.303 \cdot \frac{RT}{F} (\text{pH}_i - \text{pH}_a) \quad \begin{array}{l} R = \text{Gaskonstante: } 8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \\ T = \text{Temperatur: } 298 \text{ K} \\ F = \text{FARADAY-Konstante: } 9.6485 \cdot 10^4 \text{ A} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1} \end{array} \quad (3)$$

Für den vorliegenden Versuch ergab sich dabei ein Wert für das Potential $\Delta\psi$ von

$$\Delta\psi = -3.19 \text{ mV}$$

Dieser unterscheidet sich deutlich vom Literaturwert (-9 mV), hat aber immerhin dieselbe Dimension wie dieser.

1.4 GARDOS-Effekt

Als GARDOS-Effekt bezeichnet man die Ca²⁺-abhängige Öffnung spezifischer K⁺-Kanäle in der Erythrocytenmembran. Diese Öffnung tritt dabei erst bei einem drastischen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration auf. Im Versuch wurde dies durch Zugabe des Ca-Ionophors A23187 erreicht, das die Membranpermeabilität für Calcium-Ionen stark erhöht bzw. deren Permeieren erst ermöglicht.

Die Folge dieser Ca-vermittelten Öffnung der Kalium-Kanäle ist, daß sich ein K⁺-Diffusionspotential einstellt, das im folgenden Versuch experimentell ermittelt wurde.

Der Versuch wurde für zwei Lösungen (I und II) durchgeführt und jeweils das Ausgangspotential nach Äquilibrierung sowie die Potentiale nach Zugabe des Ca-Ionophors A23187 sowie der Hämolyse gemessen.

GARDOS-Effekt			GARDOS-Effekt		
Lösung I			Lösung II		
	E_s	pH		E_s	pH
Äquibrierung	79.00	6.80	Äquibrierung	79.75	6.81
A23187	91.00	7.20	A23187	77.00	6.74
Hämolyse	76.00	6.70	Hämolyse	76.00	6.70

Aus den erhaltenen und hier tabellarisch dargestellten Werten konnten je zwei Potentiale mit Hilfe der NERNST-Gleichung (Gl. 3) ermittelt werden:

$$\Delta\psi_I = 2.303 \cdot \frac{RT}{F} \left(\text{pH}_{\text{Äquibrierung}} - \text{pH}_{\text{A23187}} \right)$$

$$\Delta\psi_{II} = 2.303 \cdot \frac{RT}{F} \left(\text{pH}_{\text{Äquibrierung}} - \text{pH}_{\text{Hämolyse}} \right)$$

Potentiale in mV		
	Lösung I	Lösung II
$\Delta\psi_I$	23.47	-5.38
$\Delta\psi_{II}$	-5.87	-7.34

Aus den experimentellen Daten geht hervor, daß das Potential zwischen der Äquibrierung und der Ionophorzugabe in der ersten Lösung relativ stark positiv, in der zweiten Lösung dagegen leicht negativ ist. Das Potential zwischen Äquibrierung und Hämolyse ist dagegen in beiden Lösungen leicht negativ, in Lösung II sogar ein wenig stärker als in Lösung I.

Dieser Sachverhalt läßt sich theoretisch wie folgt erklären: Durch Zugabe des Ca-Ionophors A23187 strömte Calcium in die Zelle ein und öffnete dort Kalium-Kanäle. Die Kaliumkonzentration des Erythrocyten beträgt etwa 133 mM. Da in der ersten Lösung die K^+ -Konzentration wesentlich geringer war als in der Zelle, kam es zu einem starken Kalium-Ausstrom, der sich in einer Positivierung der Lösung gegenüber dem Erythrocyten (einem stark positiven Transmembranpotential) bemerkbar machte. In der zweiten Lösung ist die Kaliumkonzentration dagegen etwas höher als in der Zelle. Somit strömt in geringem Maße Kalium durch die geöffneten Kanäle in die Zellen ein, die Lösung wird geringfügig negativ gegenüber dem Erythrocyten geladen, was sich am errechneten Membranpotential direkt ablesen läßt.

Das zweite errechnete Potential $\Delta\psi_{II}$ entspricht wieder den für unbehandelte Erythrocyten ermittelten Potentialen, da die Zellen hämolysiert wurden. Die Ladungsträger konnten sich nun wieder frei verteilen, durch die hohe Pufferkapazität des Hämoglobins wurde der pH-Wert der Lösung dem der Erythrocyten angepaßt.

1.5 pH-Abhängigkeit des DONNAN-Potentials

Durch Zugabe von Amphoterizin, einem unspezifischen Kationen-Ionophor, wird ein DONNAN-Gleichgewicht an der Erythrocyten-Membran eingestellt.

Im ersten Teil des Versuches wurde wieder der pH-Wert vor und nach der Hämolyse gemessen, um daraus das Transmembranpotential zu errechnen.

Membranpotential		
	E_s	pH
Äquibrierung	73.00	6.6
Hämolyse	65.5 ± 1^1	6.35 ± 0.03

Aus den in der Tabelle angegebenen Werten errechnete sich das Transmembranpotential für diesen Versuchsteil zu -14,67 mV.

Der zweite Versuchsteil, der die Abhängigkeit des DONNAN-Potentials vom pH-Wert demonstrieren sollte, mißlang durch zu schnelles Zusetzen der 0.1n HCl-Lösung. Infolge zu starker Ansäuerung kam es zur Lysis der Zellen, außerdem sank der pH-Wert unter den Bereich des y, t -Schreibers.

Zu erwarten wäre gewesen, daß das Potential mit abnehmenden pH-Wert größer wird, also von -14,67 mV ansteigt, bei einem pH von etwa 6,5 den Nullpunkt erreicht und dann weiter im positiven Bereich ansteigt.

2 Fehlerbetrachtung

Über die Ursachen der Abweichung des im Versuch 1.3 ermittelten Transmembranpotentials der Erythrocyten vom Literaturwert um den Faktor drei läßt sich nur spekulieren. In Betracht kommen hier in erster Linie das Alter des Blutes sowie Pipettierfehler aufgrund der hohen Viskosität des Blutes.

Beim GARDOS-Effekt könnten Abweichungen zwischen den beiden Lösungen dadurch erklärt werden, daß jeweils eine neue Verdünnung hergestellt wurde, also auch hier wieder Pipettierfehler möglich waren.

3 Fragen

1. Wie ist eine physiologische Lösung zusammengesetzt, die das extrazelluläre Milieu (Blutplasma) ersetzen soll? Welcher Unterschied besteht zur intrazellulären Lösung (Osmolarität, qualitative Ionenverteilung, pH).
2. Welche Prozesse sind am Zustandekommen des Transmembranpotentials der Erythrocyten beteiligt und wie hoch ist es normalerweise? Welche Rolle spielt das Hämoglobin dabei?
3. Welche Puffersysteme sind an der pH-Regulation im Erythrocyten beteiligt?
4. Wie bestimmt man die Zeitkonstante der Elektrode und wofür braucht man sie?
5. Was versteht man unter einer elektrochemischen Meßkette? Was sind Bezugselektroden?
6. Wie kann man mit der Glaselektrode pH-Werte messen?
7. Welche Voraussetzungen müssen in diesem Versuch erfüllt sein, damit das Membranpotential mithilfe der NERNST-Gleichung bestimmt werden kann?
8. Welche anderen Möglichkeiten, Membranpotentiale zu messen, gibt es?
9. Wie ist das K^+ -Diffusionspotential gepolt, wenn der $[K^+]_i = 133 \text{ mM}$, $[K^+]_a = 5 \text{ mM}$ betragen? Wie hoch könnte es sein, wenn es nicht zum großen Teil durch die Cl^- -Permeabilität kompensiert würde? Welche Gleichung erlaubt die Berechnung eines Diffusionspotentials? Was würde passieren, wenn $[K^+]_a = 140 \text{ mM}$ beträgt?
10. Wie entsteht ein DONNAN-Potential? Wo kann es auftreten?

¹der Meßgraph zeigte periodische Oszillationen

3.1 Zusammensetzung einer physiologischen Lösung

Die physiologische Lösung, welche das Blutplasma ersetzen soll, ist eine 0,9% NaCl-Lösung in Wasser. Sie besitzt jedoch im Vergleich zur intrazellulären Lösung keine Anteile an K^+ -Ionen (In der intrazellulären Lösung liegen K^+ -Ionen vor allem innen, Na^+ -Ionen dagegen eher außen vor). NaCl ist ein 1–1–wertiges Salz, welches einmal dissoziiert die doppelt so hohe Osmolarität erreicht, als seine Molarität.

Man errechne nun die Höhe der Osmolarität: 0,9% bedeuten 9g NaCl in 1kg Wasser. Daraus lässt sich die Molmenge an NaCl berechnen. Sie lautet: 0,154 mol. Da die Rechnung bereits auf einen Liter Wasser bezogen wurde liegt das Endergebnis bereits vor: Die Osmolarität beträgt 0,154 M.

3.2 Transmembranpotential der Erythrocyten

Im Unterschied zu den meisten lebenden Zellen ist das Transmembranpotential menschlicher Erythrocyten (ca -9 mV) unter in vivo-Bedingungen ein DONNAN-Potential, wobei als feste Ladungsträger neben Hämoglobin auch die Kationen K^+ und in geringerem Maße Na^+ gehören. Die Kationen können in gewisser Weise als feste Ladungsträger aufgefaßt werden, da sie vor allem aktiv (d. h. durch Pumpen) transportiert werden und somit eine geringe Permeabilität besitzen.

3.3 Puffersysteme der pH-Regulation in Erythrocyten

- Bikarbonat-Puffer (CO_2 dissoziiert in Wasser zu H^+ und HCO_3^-)
- Protein-Puffer (hauptsächlich Imidazolgruppen des Histidins)
- Haldane-Effekt (desoxygeniertes Blut nimmt H^+ -Ionen auf)
- Carbamino-Hb (direkte Bindung von CO_2 an Hämoglobin)
- $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$

Das im Erythrocyten gebildete Bicarbonat stört das Donnan-Gleichgewicht und wird bis zur Gleichgewichtsherstellung mit Cl^- -Ionen aus Plasma ausgetauscht.

3.4 Zeitkonstante der Elektrode

Von der gepufferten Versuchslösung wird die pH-Kurve aufgezeichnet, bis sich ein Plateau ergibt. Dann werden 50 ml einer 1M HCl-Lösung und der pH-Abfall registriert. Es ergibt sich eine exponentielle Kurve, die nach einer Linearisierung ausgewertet werden kann, indem man die aus der Meßkurve entnommenen Werte auf halblogarithmisches Papier überträgt und an diesen Werten eine Gerade anlegt. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich die Zeitkonstante k der pH-Elektrode. Sie ermöglicht eine Aussage darüber, ob die verwendete Elektrode für die Potentialmessung geeignet ist.

3.5 Elektrochemische Meßkette und Bezugselektroden

Eine elektrochemische Meßkette ist die elektrisch leitende Verbindung zweier Elektroden zur Messung von Potentialdifferenzen. Eine der beiden Elektroden wird als Bezugselektrode verwendet, in der Regel die Standard-Wasserstoffelektrode, deren Potential willkürlich gleich Null gesetzt wird. Die so gemessene Potentialdifferenz entspricht damit direkt dem Elektrodenpotential

der Meßelektrode. Kommt als Bezugslektrode eine andere Elektrode zum Einsatz, so ist deren Potential bezogen auf die Standard-Wasserstoffelektrode bekannt und kann daher in den Berechnungen des Potentials der Meßelektrode berücksichtigt werden.

3.6 pH-Wert-Messung mit der Glaselektrode

Eine Meßkette zur Erfassung des pH-Wertes besteht immer aus zwei Komponenten: der Sensorelektrode (Meßelektrode) und der Bezugslektrode. Zwischen diesen beiden wird eine Spannung gemessen, die für den jeweiligen pH-Wert typisch ist. Beide Elektroden sind heute zu einer Einstab-Glaselektrode zusammengefaßt, die man als pH-Sensor bezeichnet.

Wird ein pH-Sensor in eine wäßrige Lösung eingetaucht, bildet sich am pH-sensitiven Membranglas eine Quellschicht. Dies geschieht auch an der Glasmembraninnenseite, die mit einer definierten Pufferlösung (Innenpuffer) in Kontakt steht. Je nach pH-Wert der Meßlösung diffundieren die H^+ -Ionen aus der Quellschicht heraus oder in sie hinein. Bei alkalischen Lösungen diffundieren die H^+ -Ionen nach außen, wobei sich ein negatives Potential an der Quellschichtaußenseite aufbaut. Da die Glasmembran an der Innenseite einen konstanten pH-Wert hat, ändert sich das Potential innen während der Messung nicht. Die für den pH-Wert der Lösung typische Spannung ergibt sich aus der Potentialdifferenz ΔE zwischen innen und außen nach der NERNSTschen Gleichung:

$$\Delta E = \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{[H^+]_i}{[H^+]_a}$$

Für $n = 1$ und mit den eingesetzten Größen für R , T und F sowie unter Berücksichtigung von \ln in \lg vereinfacht sich die NERNSTsche Gleichung wie folgt:

$$\Delta E = 0,059 \cdot (\lg[H^+]_i - \lg[H^+]_a) = 0,059 \cdot (pH_a - pH_i)$$

Der unbekannte pH_a -Wert kann durch eine einfache Potentialmessung bestimmt werden. Die Potentialdifferenz ΔE wird mittels eines empfindlichen Spannungsmeßgerätes (pH-Meter) direkt als pH-Wert dargestellt.

3.7 Voraussetzungen für die Bestimmung des Membranpotentials mittels NERNST-Gleichung

Die Außenlösung muß ungepuffert sein und die Blutzellen müssen hämolysiert werden. Dadurch findet ein Angleich der pH-Werte von Außenlösung und Erythrocyten-Plasma statt, da letzteres sehr stark gepuffert ist.

3.8 Weitere Möglichkeiten der Messung von Membranpotentialen

Als weitere Möglichkeiten der Messung von Membranpotentialen bieten sich an:

- Mikroelektroden (Spitzendurchmesser 0.1 – 0.5 mm).
- optische Methode
Bestimmung des Membranpotentials aus der Verteilung von membranpermeablen Ionen zwischen Zelläußerem und -innerem
- Riesen-Neuronen
Potentialdifferenz-Messung zwischen einer in axialer Richtung im Axonplasma und einer im Außenmedium liegenden Elektrode

3.9 K⁺-Diffusionspotential

Das Membranpotential (Diffusionspotential) berechnet sich nach der NERNST-Gleichung wie folgt:

$$\Delta\psi = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_a}{a_i}$$

Für die Aktivitäten gelte im ersten Fall folgendes:

$$a_a = 5 \text{ mM}$$

$$a_i = 133 \text{ mM}$$

Durch Einsetzen der verschiedenen Konstanten bei einer Raumtemperatur $T = 298,15\text{K}$ folgt für den ersten Fall:

$$\Delta\psi = -0,0843 \text{ V}$$

Das innere Medium ist also positiver als das äußere und somit positiv gepolt.

Für den zweiten Fall, bei einer im Außenmedium vorherrschenden Aktivität $a_i = 140 \text{ mM}$ der K⁺-Ionen, gilt für die Potentialdifferenz:

$$\Delta\psi = +0,0013 \text{ V}$$

Hier liegen die Polaritäten also genau umgekehrt zum ersten Fall, das äußere Medium ist positiver gegenüber dem Innenmedium und damit positiv gepolt.

3.10 DONNAN-Potential

Das DONNAN-Potential kann in Zweiphasensystemen auftreten, in denen es neben austauschbaren Ladungsträgern auch solche Ladungsträger gibt, die die Phasengrenze nicht durchdringen können.