

**Aus der Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie
(Prof. Dr. med. G. Burckhardt)
im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Elektrophysiologische Untersuchungen
von Transporteigenschaften des
Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters aus
der Flunderniere**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

vorgelegt von
Christine Herbst
aus Goslar

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. phil. nat. B.C. Burckhardt

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Literaturüberblick	1
2	Material und Methoden	11
2.1	Entnahme und Präparation der Oozyten	11
2.2	Messprinzip	12
2.3	Aufbau des Messplatzes	14
2.4	Dokumentation	15
2.5	Bestimmung der Halbsättigungskonstanten	15
2.6	Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstanten	15
2.7	Auswertung	16
2.8	Verwendete Lösungen	18
3	Ergebnisse	21
3.1	Einleitung: Substrat-induzierte Ströme	21
3.2	Succinat-induzierte Ströme: Vergleich Wildtyp/Mutante	24
3.2.1	Wasser-injizierte Oozyten (H ₂ O-Oozyten)	25
3.2.2	Potentialabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms	25
3.2.3	Konzentrationsabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms	27
3.2.4	Eadie-Hofstee-Auftragung	27
3.2.5	Halbsättigungskonstante für Succinat	30
3.2.6	Halbsättigungskonstante für Succinat im Beisein von Lithium	31
3.2.7	Zusammenfassung	32
3.3	2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat-induzierte Ströme	33
3.3.1	Wasser-injizierte Oozyten	33
3.3.2	Potentialabhängigkeit Dimethylsuccinat-induzierter Ströme	33
3.3.3	Konzentrationsabhängigkeit Dimethylsuccinat-induzierter Ströme	36
3.3.4	Eadie-Hofstee-Diagramme	36
3.3.5	Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten	37
3.3.6	Vergleich der maximalen Transportraten	40
3.3.7	Zusammenfassung	40
3.4	Hemmung der Succinatantwort durch Lithium	41
3.4.1	Wasser-injizierte Oozyten	41
3.4.2	Reststrom bei maximaler Hemmung durch Lithiumchlorid	42
3.4.3	Potentialabhängigkeit der Succinatantwort im Beisein von Lithium	42

3.4.4	Succinatantwort in Abhängigkeit von der Lithiumkonzentration	43
3.4.5	Dixon-Graphen	46
3.4.6	Potentialabhängigkeit der apparenten Inhibitionskonstanten für Lithium	47
3.4.7	Zusammenfassung	49
3.5	Natrium-induzierte Ströme	49
3.5.1	Voruntersuchung	50
3.5.2	H ₂ O-Oozyten	52
3.5.3	Potentialabhängigkeit natriumabhängiger Ströme	53
3.5.4	Konzentrationsabhängigkeit natriumabhängiger Ströme	53
3.5.5	Eadie-Hofstee-Diagramme	54
3.5.6	Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten für Natrium	55
3.5.7	Zusammenfassung	55
3.6	Succinat-induzierte Ströme im Beisein von 110 mM Lithiumchlorid	57
3.6.1	Voruntersuchungen	57
3.6.2	Potentialabhängigkeit der Ströme im Beisein von Lithium	58
3.6.3	Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat im Beisein von Lithium . . .	60
3.6.4	Zusammenfassung	62
4	Diskussion	63
4.1	Einfluss von Lithium auf den Wildtyp	64
4.2	Die Mutante	68
4.3	2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat	69
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	73

Abkürzungsverzeichnis

NaC	Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter
NaC1 (NaC3)	Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter 1 (3)
fNaC3	Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter 3 aus der Flunder
hNaC1 (hNaC3)	Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter 1 (3) aus dem Menschen
mNaC1 (mNaC3)	Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter 1 (3) aus der Maus
rNaC1 (rNaC2, rNaC3)	Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter 1 (2,3) aus der Ratte
rbNaC1	Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter 1 aus dem Kanarienvogel
xNaC2 (xNaC3)	Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter 2 (3) aus dem Krallenfrosch
CaCl ₂	Calciumchlorid
cRNS	Ribonukleinsäure
DMS	Dimethylsuccinat
H ₂ O-Oozyten	Wasser-injizierte Oozyten
IC ₅₀	Konzentration des Hemmstoffs, bei der eine halbmaximale Hemmung des Substrat-induzierten Stroms auftritt
<i>I</i>	Substrat-induzierter Strom
<i>I_{min}</i>	Substrat-induzierter Strom bei höchster verwendeter Konzentration eines Hemmstoffs
<i>I_{max}</i>	Substrat-induzierter Strom bei -90 mV und höchster verwendeter Konzentration eines Substrates, ohne Zusatz eines Hemmstoffs
K _{0,5}	Halbsättigungskonstante
KCl	Kaliumchlorid
LiCl	Lithiumchlorid
mM (μM)	Millimolar (Mikromolar)
mV	Millivolt
n=5/3	Experimente an 5 Oozyten von 3 Spendertieren
nA	Nanoampere
NaCl	Natriumchlorid
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
OAT-1 (OAT-3)	Organischer Anionentransporter 1 (3)
p	P-Wert aus statistischen Tests
SLC13	“Solute-carrier-13“-Familie

Tabellenverzeichnis

1.1	Ausschnitte N-terminaler Aminosäuresequenzen ausgewählter NaC1 und NaC3	8
2.1	Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen	20
4.1	Transporteigenschaften der NaC	67

Abbildungsverzeichnis

1.1	Dikarboxylat-Transport in Nierenzellen	2
1.2	Phylogenetischer Baum der SLC13	3
1.3	Strukturformeln von Succinat, 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat im Vergleich	6
2.1	Reifestadien isolierter Oozyten des Krallenfrosches	12
2.2	Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Methode	13
2.3	Schematische Darstellung des Oozytenbades	14
2.4	Beispiel einer Eadie-Hoffstee-Auftragung	16
2.5	Beispiel einer Auftragung nach Dixon	17
3.1	Beispiel eines Schreiberprotokolls.	22
3.2	Succinat-induzierter Strom im Beisein von 110 mM NaCl	23
3.3	Klemmstrom bei Wechsel von natrium- zu lithiumhaltiger Lösung	23
3.4	Succinat-induzierter Strom im Beisein von 110 mM LiCl	24
3.5	Strom-Spannungskennlinie für Succinat (H ₂ O-Oozyten)	25
3.6	Strom-Spannungskennlinie von Succinat für den Wildtyp	26
3.7	Strom-Spannungskennlinie von Succinat für die Mutante	27
3.8	Konzentrationsabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms (Wildtyp)	28
3.9	Konzentrationsabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms (Mutante)	28
3.10	Eadie-Hofstee-Auftragung von Succinat-induzierten Strömen (Wildtyp)	29

3.11 Eadie-Hofstee-Auftragung von Succinat-induzierten Strömen (Mutante)	29
3.12 Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten von Succinat (Wildtyp)	30
3.13 Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten von Succinat (Mutante)	31
3.14 Succinat-Halbsättigungskonstante mit und ohne 1 mM LiCl	32
3.15 Strom-Spannungskennlinie von 2,2-Dimethylsuccinat für H ₂ O-Oozyten	34
3.16 Strom-Spannungskennlinie von 2,3-Dimethylsuccinat für H ₂ O-Oozyten	34
3.17 Strom-Spannungskennlinie von 2,2-Dimethylsuccinat	35
3.18 Strom-Spannungskennlinie von 2,3-Dimethylsuccinat	35
3.19 Konzentrationsabhängigkeit des 2,2-Dimethylsuccinat-induzierten Stroms	36
3.20 Konzentrationsabhängigkeit des 2,3-Dimethylsuccinat-induzierten Stroms	37
3.21 Eadie-Hofstee-Diagramme für 2,2-Dimethylsuccinat	38
3.22 Eadie-Hofstee-Diagramme für 2,3-Dimethylsuccinat	38
3.23 Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten von 2,2-Dimethylsuccinat	39
3.24 Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten von 2,3-Dimethylsuccinat	39
3.25 Maximaler induzierter Strom durch 2,2-, 2,3-Dimethylsuccinat und Succinat	40
3.26 <i>I-V</i> -Kennlinien von Succinat im Beisein von LiCl (H ₂ O-Oozyten)	42
3.27 Reststrom bei maximaler Hemmung durch LiCl	43
3.28 Succinat- <i>I-V</i> -Kennlinien unterschiedlicher LiCl-Konzentrationen (Wildtyp)	44
3.29 Succinat- <i>I-V</i> -Kennlinien unterschiedlicher LiCl-Konzentrationen (Mutante)	44
3.30 Succinat-induzierter Strom als Funktion der LiCl-Konzentration (Wildtyp)	45
3.31 Succinat-induzierter Strom als Funktion der LiCl-Konzentration (Mutante)	45
3.32 Dixon-Graph für den Wildtyp bei einem Klemmpotential von -60 mV	46
3.33 Dixon-Graph für die Mutante bei einem Klemmpotential von -60 mV	47
3.34 Potentialabhängigkeit der apparenten Inhibitionskonstanten von LiCl (Wildtyp)	48

3.35	Potentialabhängigkeit der apparenten Inhibitionskonstanten von LiCl (Mutante)	48
3.36	Klemmstromverlauf nach Wechsel zur natriumfreien Lösung (Wildtyp)	50
3.37	Klemmstromverlauf nach Wechsel zur natriumfreien Lösung (H ₂ O-Oozyte)	51
3.38	<i>I-V</i> -Kennlinie von Natrium gemessen im Vergleich zu natriumfreier Lösung	52
3.39	<i>I-V</i> -Kennlinie von Natrium gemessen im Vergleich zu 110 mM Natrium	53
3.40	Succinat-medierte Ströme bei zwei verschiedenen Natrium-Konzentrationen	54
3.41	Konzentrationsabhängigkeit des Natrium-induzierten Stroms	55
3.42	Eadie-Hofstee-Diagramme für Natrium-induzierte Ströme	56
3.43	Halbsättigungskonstante für Natrium als Funktion des Klemmpotentials	56
3.44	Voruntersuchung: Strom-Spannungskennlinien von Succinat	58
3.45	<i>I-V</i> -Kennlinie von Succinat im Beisein von 110 mM LiCl (H ₂ O-Oozyten)	59
3.46	<i>I-V</i> -Kennlinie von Succinat im Beisein von 110 mM LiCl (Wildtyp)	59
3.47	<i>I-V</i> -Kennlinie von Succinat im Beisein von 110 mM LiCl (Mutante)	60
3.48	Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat im Beisein von 110mM NaCl	61
3.49	Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat im Beisein von 110mM LiCl	61

1 Einleitung und Literaturüberblick

Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter sind Proteine, die den Natriumkonzentrationsunterschied zwischen dem Inneren und dem Äußeren der Zelle nutzen, um Di- und Trikarboxylate wie Succinat, Zitrat oder Maleat in die Zelle zu transportieren. Viele Dikarboxylate sind als Teile des Krebszyklus wichtige Energielieferanten für die Zelle (Simpson 1983). Diese natrium-abhängigen Dikarboxylat-Kotransporter sind in Organen verschiedenster Lebewesen gefunden worden, zum Beispiel dem Gehirn, Darm, Herz oder Nieren von Mensch, Maus, Ratte oder Frosch. Ein Überblick findet sich bei Pajor (2006), Markovich und Murer (2004), Burckhardt BC und Burckhardt G (2003) und Pajor (1999). In der Niere, der Leber und im Gehirn wird die hohe Konzentration an Dikarboxylaten im Vergleich zum Plasma oder Urin außerdem von organischen Anionen-Transportern genutzt (OAT 1 und OAT 3, siehe Überblick in Burckhardt BC und Burckhardt G 2003), um zum Beispiel an proteingebundene anionische Pharmaka wie Antibiotika und nicht steroidale Antiphlogistika aus dem Blut in die Zelle zu transportieren (Endres et al. 2006, Sekine et al. 2006, Shitara et al. 2006, Launay-Vacher et al. 2006, Li et al. 2006, Wright SH und Dantzer 2004, Burckhardt BC et al. 2004).

In den Nieren werden Metabolite des Krebszyklus aus dem Primärfiltrat und aus den Kapillaren in die Tubuluszelle aufgenommen (Martin et al. 1989, Simpson 1983). Extrazelluläres Zitrat liefert etwa 15 Prozent des Energiebedarfs der menschlichen Nierenzellen (Nieth und Schollmeyer 1966). Bereits Anfang der 1980er Jahre zeigten Untersuchungen an der Rattenniere *in situ* (Sheridan et al. 1983) und an Vesikeln aus dem Bürstensaum (Wright EM et al. 1982, Wright SH et al. 1980, Wright SH et al. 1982, Fukuhara und Turner 1983) ein Natriumgekoppeltes Transportsystem für Di- und Trikarboxylate. Dieser Transport hatte eine Stöchiometrie von drei Natriumionen für ein divalentes Dikarboxylat (Wright SH et al. 1982) und war durch Lithium hemmbar. Diese Eigenschaften entsprechen denen der Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter (Burckhardt BC und Burckhardt G 2003).

Nachdem im Jahre 1995 (Pajor 1995) der erste natriumabhängige Dikarboxylat-Kotransporter aus den Nieren eines Kaninchens kloniert worden war, folgten in rascher Folge die Klonierungen weiterer Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter (Übersicht in Pajor 2006). Aus der Kenntnis dieser Datenlage konnte das in Abbildung 1.1 gezeigte Modell entwickelt werden. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung eines proximalen Tubulus aus der menschlichen Niere mit den für den Dikarboxylat-Transport wichtigen Transportern. Der NaC1 liegt luminal und ist für die Rückresorption von Krebszyklusmetaboliten aus dem Urin zuständig, während der NaC3 basolateral liegt und Dikarboxylate aus dem Blut in die Zelle transportiert (Pajor 2006,

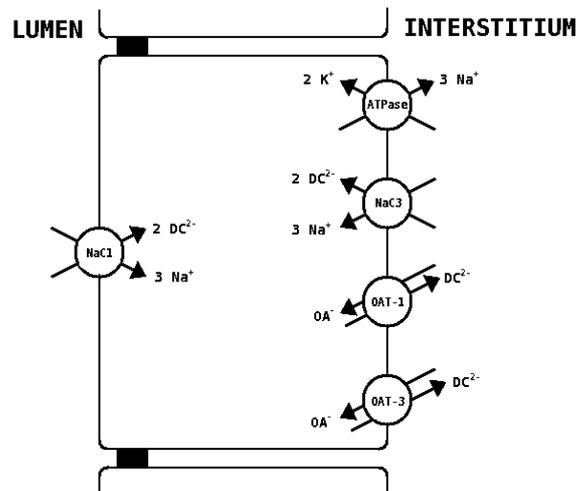


Abbildung 1.1: Dikarboxylat-Transport in Nierenzellen. Der Dikarboxylat-Transport in einer Zelle des proximalen Tubulus ist vom Natriumgradienten abhängig, der von der Na-K-ATPase hergestellt wird. Luminal transportiert der NaC1 Dikarboxylate in die Zelle, basolateral der NaC3. Der organische Anionen-Transporter 1 (OAT-1) nutzt den Dikarboxylatgradienten, um Anionen in die Zelle zu transportieren (modifiziert nach Burckhardt BC und Burckhardt G 2003, Markovich und Murer 2004).

Markovich und Murer 2004, Burckhardt BC und Burckhardt G 2003). Auch für den in dieser Arbeit untersuchten fNaC3 aus der Flunderniere wurde eine basolaterale Lokalisation gezeigt (Hentschel et al. 2003). Beide Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter, NaC1 und NaC3, transportieren drei Natriumionen zusammen mit einem divalenten Dikarboxylat in die Tubuluszelle, wobei der NaC3 eine höhere Affinität für Succinat hat als der NaC1. Ebenfalls basolateral liegen die organischen Anionen-Transporter 1 (OAT-1) und 3 (OAT-3), die den Dikarboxylatgradienten für einen Transport von Anionen in die Zelle nutzen (Markovich und Murer 2004, Burckhardt BC und Burckhardt G 2003).

Der Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter aus der Niere der amerikanischen Winterflunder (*Pseudopleuronectes americanus*) (fNaDC3 nach Steffgen et al. 1999 oder fNaC3 nach Markovich und Murer 2004) gehört zur Genfamilie der SLC13 (solute-carrier-13) -Proteine. Gemeinsames Merkmal dieser Proteinfamilie ist der sekundäre Natrium-gekoppelte Transport von Anionen oder Metaboliten aus dem Krebszyklus (Markovich und Murer 2004, Pajor 2000). Die zwei Unterfamilien, die Natrium-Sulfat- und die Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter, sind funktionell sehr unterschiedlich. Gemeinsamkeiten sind 8 bis 13 transmembrane Domänen, die auf Grund theoretischer Analysen der Aminosäuresequenzen nach Kyte und Doolittle (1982) bestimmt wurden und eine Länge von 572 bis 672 Aminosäuren aufweisen (Markovich und Murer 2004, Pajor 2000). Abbildung 1.2 zeigt den phylogenetischen Baum dieser Familie aus Markovich und Murer 2004 mit der von ihnen vorgeschlagenen Nomenklatur. Obwohl diese Nomenklatur leicht von den Namen der Erstbeschreiber abweicht, ist sie einheitlich und

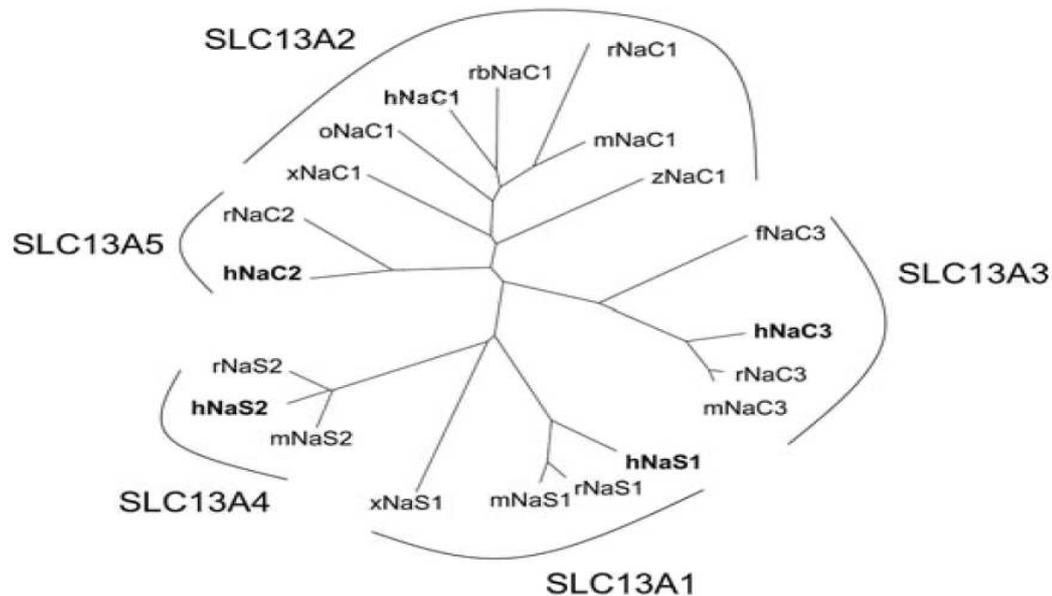


Abbildung 1.2: Phylogenetischer Baum der SLC13. Der phylogenetische Baum der SLC13 (solute carrier family 13) aus Markovich und Murer (2004), Seite 596, wurde durch Aminosäurevergleiche der Natrium-Dikarboxylat- und Natrium-Sulfat-Kotransporter bestimmt. Die Anzahl der Substitutionen pro 100 Aminosäuren wird durch die Länge der Striche wiedergespiegelt. Es gibt einen offensichtlichen Fehler: Statt rNaC2 muss es mNaC2 heißen.

beinhaltet eine klar definierte Zuordnung zu den Untergruppen. Der Grad der genetischen Verwandtschaft zwischen den klonierten Proteinen verschiedenster Tierarten ist in Abbildung 1.2 sehr anschaulich. Zu erkennen ist unter anderem, dass die Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter in drei Gruppen aufgeteilt werden, nämlich die beiden großen Gruppen NaC1 und NaC3 und die kleine Gruppe NaC2. Diese Einteilung findet sich auch in der funktionellen Einteilung nach der Succinataffinität in hochaffine Transporter mit niedriger Kapazität (NaC3) und niederaffine (NaC1 und NaC2) Transporter mit hoher Kapazität wieder (Pajor 2006, Markovich und Murer 2004). Der in dieser Arbeit untersuchte fNaC3 hat eine etwa 60-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit fast allen anderen Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen Säugetieren ist deutlich höher als die Übereinstimmung zwischen Säugetieren und anderen Tierarten. Die Aminosäuresequenz des NaC3 aus der Ratte ist zu 85 % identisch mit der des humanen NaC3 (Wang HC et al. 2000).

Der in dieser Arbeit untersuchte fNaC3 aus der Winterflunder gehört zu den hochaffinen Transportern. Bei der Winterflunder ist bislang kein niederaffiner Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter gefunden worden. Von den niederaffinen Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern (NaC1) wurden fünf aus Wirbeltieren kloniert. Elektrophysiologisch beschrieben sind Kaninchen-NaC1 (Pajor 1995), Ratten-NaC1 (Khatrı et al. 1996, Chen XZ et al. 1998, Se-

kine et al. 1998), humaner NaC1 (Pajor 1996) und Maus-NaC1 (Pajor et al. 2000). Exprimiert wird der NaC1 nicht nur in den Nieren (Mensch, Kaninchen, Ratte, Maus), sondern auch im Darm (Mensch, Kaninchen, Maus, Ratte, *Xenopus*) und in der Leber (Kaninchen, Ratte) (Markovich und Murer 2004). Die hochaffinen NaC3s wurden bislang aus dem Menschen (hNaC3, Wang HC et al. 2000), der Maus (mNaC3, Pajor et al. 2001), der Ratte (rNaC3, Chen X et al. 1999, Kekuda et al. 1999), der Flunder (fNaC3, Steffgen et al. 1999) und dem südamerikanischen Krallenfrosch - *Xenopus laevis* - (xNaC3, Oshiro und Pajor 2005) kloniert.

Zwischen dem fNaC3 und den anderen NaC3 besteht jeweils eine etwa 60-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz. Die als funktionell wichtig vermuteten Regionen haben stärkere Übereinstimmungen. Ein Genabschnitt mit besonders starker Übereinstimmung wurde durch Steffgen (2000) auf Gemeinsamkeiten im Hinblick auf die Lithiumempfindlichkeit untersucht. Aufgrund der Ähnlichkeiten der Genabschnitte im N-terminalen Ende vermutete er, dass die Aminosäure an der Stelle 445 des fNaC3 für diese Lithiumabhängigkeit verantwortlich sei. Bei allen hochaffinen Transportern (NaC3) ist die vergleichbare Aminosäure ein Cystein und bei den niedrigaffinen Transportern (NaC1) ein Serin. Die Mutante S513C wurde entwickelt, indem an der Aminosäure 445, die der Aminosäure 513 in der cRNA-Sequenz entspricht, das vorhandene Cystein durch ein Serin ersetzt wurde. Aufgrund eingeführter Priming-Sequenzen ist die Anzahl der Aminosäuren in der cRNA-Sequenz größer. Von dieser Mutante wurde erwartet, dass sie eine deutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber Lithium aufweise. Da bei denjenigen Transportern, deren Substrattransport nicht durch Lithium gehemmt wird (rbNaC1: Pajor 1995, xNaC1: Bai und Pajor 1997), Lithium das Natrium als Kation ersetzen kann, wurde auch erwartet, dass ein Substrattransport bei Verwendung von Lithium als Kation stattfindet. Den von Steffgen (2000) verglichenen Abschnitt aus der Gensequenz zeigt Tabelle 1.1 für die bis heute entdeckten Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter. Die gezeigte Sequenz beginnt bei Aminosäure 360 des Flunder-NaC3. Bei den anderen NaC beginnt die Sequenz in einem ähnlichen Bereich. Vollständige Vergleiche von Aminosäuresequenzen für den NaC3 finden sich in Oshiro und Pajor (2005), für die NaC1 bei Chen X et al. (1999), zum Teil auch bei Inoue et al. (2002b). Einen Überblick über die prozentuale Übereinstimmungen der Gensequenzen liefern Markovich und Murer (2004).

Proteintransportsysteme können auf verschiedene Weise untersucht werden. Für Systeme, die geladene Teilchen transportieren, sind elektrophysiologische Methoden wie die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Methode oder die Patch-Clamp-Methode besonders gut geeignet. Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Methode werden Ströme über eine gesamte Oozytenmembran gemessen, bei der Patch-Clamp-Methode werden die Ströme über einen Membranfleck gemessen, der nur wenige Transportproteine enthält (Stühmer 1998). Soll nur ein einzelnes Protein untersucht werden, wird die dazugehörige Ribonukleinsäure (cRNS) in Zellen mit wenigen eigenen Transportproteinen injiziert und dort translatiert (Wagner et al. 2000). Diese Zellen, meist Oozyten des südamerikanischen Krallenfrosches oder Pigmentepithelzellen des menschlichen Auges, überexprimieren dieses Protein. Das führt zu einer Vervielfachung des Messsignals (Dascal 1987, Wagner et al. 2000). Sowohl der Transport geladener

als auch der nicht geladener Teilchen kann mit Hilfe nicht-elektrophysiologischer Methoden untersucht werden. Dazu gehören Experimente, bei denen die Aufnahme eines Substrates in einem Zeitraum mit Hilfe einer Markierung (radioaktiv, fluoreszierend) sichtbar gemacht wird (im folgenden Aufnahme-Experimente genannt).

Da der Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter aus der Flunderniere (fNaC3) ein divalentes Dikarboxylat (wie z. B. Succinat) nur zusammen mit drei Kationen (meist Natrium-Ionen) transportieren kann, entsteht bei Transport von Succinat netto ein Strom positiver Ladungen in die Zelle (Steffgen et al. 1999). Somit kann die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Methode benutzt werden, um den Transport von Dikarboxylaten durch den fNaC3 zu untersuchen. Solche Untersuchungen wurden in dieser Arbeit an Oozyten des südamerikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) durchgeführt, denen die cRNS des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters aus der Flunderniere (fNaC3) injiziert wurde.

In den funktionellen Untersuchungen verschiedener Transporter ist das häufigste Vergleichssubstrat das Succinat oder Zitrat. Ein einfacher, aber aussagekräftiger Wert für die Affinität eines Substrates ist die Halbsättigungskonstante, also die Konzentration, bei der die Hälfte des maximal möglichen Substrattransports stattfindet. Tabelle 1.1 zeigt die Halbsättigungskonstanten für Succinat für die verschiedenen Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter. Die hohe Affinität der NaC3 gilt nicht nur für Succinat, sondern auch für 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat und α -Ketoglutarat (Burckhardt BC et al. 2002).

2,2-Dimethylsuccinat und 2,3-Dimethylsuccinat unterscheiden sich in der Lokalisation der zweiten Methylgruppe. Bei 2,2-Dimethylsuccinat sind beide Methylgruppen an Kohlenstoff 2, bei 2,3-Dimethylsuccinat ist eine Methylgruppe auch an Kohlenstoff 3 angebracht. Auf Grund der unterschiedlichen räumlichen Struktur von 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat sind unterschiedliche Transporteigenschaften nicht überraschend. Abbildung 1.3 zeigt die Strukturformeln für Succinat, 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über den Transport von 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat durch die Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter. Ein direkter Vergleich beider Substanzen beim fNaC3 (siehe Burckhardt BC et al. 2002) ist ein Schwerpunkt dieser Arbeit. In [^{14}C]-Aufnahme-Experimenten bei fNaC3 exprimierenden Oozyten war die Aufnahme von 2,3-Dimethylsuccinat nur halb so groß wie die Aufnahme von Succinat (Steffgen et al. 1999). Beim humanen NaC3 haben Wang H et al. (2000) eine Halbsättigungskonstante von 112 μM für Dimethylsuccinat bestimmt. Allerdings ist nicht klar, ob es sich um 2,2- oder 2,3-Dimethylsuccinat handelt. Burckhardt BC et al. (2005) haben einen höheren maximalen Substrat-induzierten Strom für 2,2 Dimethylsuccinat im Vergleich zu Succinat oder 2,3-Dimethylsuccinat beobachtet. Oshiro und Pajor (2005) haben 2,3-Dimethylsuccinat als Substrat des xNaC3 beschrieben, ohne den maximalen Transport mit dem von Succinat zu vergleichen und ohne einen Vergleich zu 2,2-Dimethylsuccinat zu machen. Bei vielen NaC1 hemmt 1 mM Dimethylsuccinat den Transport von Succinat nicht. Häufig ist unklar, ob es sich um 2,2- oder 2,3-Dimethylsuccinat handelt. Pajor et al. (1998a) beobachten keine Aufnahme von markiertem Dimethylsuccinat beim Kaninchen-NaC1. Das Gleiche gilt für den Ratten-

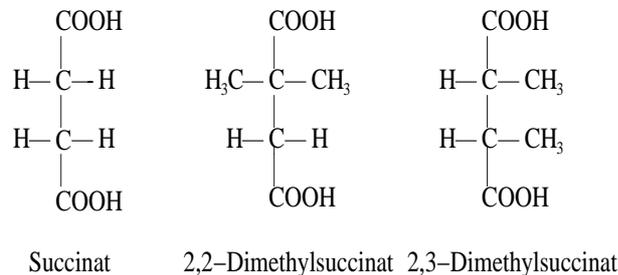


Abbildung 1.3: Strukturformeln von Succinat, 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat im Vergleich. 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat unterscheiden sich in der Anordnung der Methylgruppen.

NaCl durch Chen XZ et al. (1998). Für das Verständnis der genauen Transportbedingungen sind vergleichende Untersuchungen von Substraten mit unterschiedlichen Ladungen und unterschiedlicher räumlicher Verteilung von großer Bedeutung. Ob die zweite Methylgruppe an Kohlenstoffatom 2 oder 3 substituiert wurde, beeinflusst nicht nur die Halbsättigungskonstante, sondern auch den maximalen gemessenen Strom (maximale Transportrate) (Burckhardt BC et al. 2002).

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde die Abhängigkeit des Stroms von der Dikarboxylatkonzentration bei einer gleichbleibenden, hohen Natriumkonzentration untersucht. Auf der anderen Seite kann auch die Abhängigkeit des Stroms vom Kation in einer Lösung mit gleichbleibender, hoher Dikarboxylatlösung (meist Succinat) untersucht werden. Die Halbsättigungskonstante für Natrium(ionen) beträgt für den xNaCl 55 mM (Oshiro und Pajor 2005), den xNaCl 45 mM (Bai und Pajor 1997) und für den fNaCl 40 mM (Steffgen et al. 1999, [¹⁴C]-Aufnahme-Experimente) oder 18 mM (Burckhardt BC et al. 2000, elektrophysiologisch). Nicht bestimmt wurde die Halbsättigungskonstante für Natrium beim rNaCl. Schließlich wurde der Succinat-induzierte Strom bei einer gesättigten Lösung anderer Kationen untersucht. Andere Kationen sind bei den meisten Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern nicht in der Lage, einen Succinattransport zu induzieren. Eine Ausnahme bildet das Lithium, für das bei vielen Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern ein, wenn auch sehr geringer, Succinat-induzierter Strom beobachtet wurde. Die höchsten [¹⁴C]-Succinat-Aufnahmen unter Verwendung von Lithium als Kation wurden beim mNaCl und beim xNaCl mit 30 % bzw. 48 % des Succinattransports beobachtet, gegenüber 100 % bei Verwendung von Natrium als Kation. Nur beim rNaCl wurde ein Succinattransport bei Verwendung von Kalium als Kation beobachtet (Chen XZ et al. 1998). Die Kationen N-Methyl-D-Glucamin und Cholin hingegen dienen den meisten Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern nicht als Substrat (Pajor 1996, Pajor et al. 1998a, Yao und Pajor 2000, Kekuda et al. 1999).

Der Succinat-induzierte Strom bei Verwendung von Natrium als Kation kann bei fast allen Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern durch Zugabe von Lithium gehemmt werden. Die Hemmung des Succinat-induzierten Stroms durch Lithium wurde beim luminalen rbNaCl von Pa-

jor et al. (1998a) untersucht. Auf Grund der sogenannten hyperbolen Kinetik der Lithium-Inhibition schlossen sie, dass eine der drei Natriumbindungsstellen eine höhere Affinität für Lithium habe als für Natrium. Der Succinattransport beim rNaC1 wird zu 60 Prozent durch 2,5 mM Lithium gehemmt, während beim hNaC1 der Succinattransport nur zu 20 Prozent durch 10 mM Lithium gehemmt wird (Pajor und Sun 1996). Eine Halbhemmungskonstante (IC_{50}) wurde nicht bestimmt. Tabelle 1.1 zeigt einen Überblick über die Halbhemmungskonstanten für Lithium. Einige dieser Konstanten sind aus der Konzentration geschätzt worden, bei der eine 50- bis 60- prozentige Hemmung der Substratantwort stattfindet, da keine exakte Halbhemmungskonstante (IC_{50}) bestimmt wurde.

Name	Aminosäuren	$K_{0,5}$ Succ. (μM)	IC_{50} Li^+ (mM)	Referenzen
fNaC3	PWNIILLLLGGGFAMAKACEESGLASWIGGH	30	0,67	Steffgen et al. 1999, Burckhardt BC et al. 2000
rNaC3	PWNIILLLLGGGFAMAKGCEESGLSAWIGGQ	6-12	2,5-3	Kekuda et al. 1999, Chen X et al. 1999
hNaC3	PWNIILLLLGGGFAMAKGCEESGLSVWIGGQ	20	2,6	Wang H et al. 2000
xNaC3*	PWNIILLLLGGGFAMAKGCEASGLSTWIGGR	5	nicht untersucht	Oshiro und Pajor 2005
xNaC3*	PWNIILLLLGGGFAMAKGCEESGLSAWIGGQ	140	nicht untersucht	Pajor et al. 2001
xNaC1	PWNIVILLGGGFALAKGSEESGLSLWGEDK	278	keine	Bai und Pajor 1997
rNaC1	PWNIVILLGGGFALAKGSEESGLSEWLGDK	25-30	2	Chen XZ et al. 1998, Sekine et al. 1998
mNaC1	PWNILILLGGGFALAKGSEESGLSKWLGDK	350	2	Pajor et al. 2000
rNaC1	PWNIVILLGGGFALAKGSEQSGLSEWLGDK	25	3	Chen X et al. 1999, Chen XZ et al. 1998
hNaC1	PWNIVLLLGGGYALAKGSEERSGLSEWLGNK	800	20	Pajor und Sun 1996, Chen X et al. 1999
rbNaC1	PWNIVLLLGGGYALAKGSEESGLSQWLGNK	450	<2,5	Pajor 1995, Pajor und Sun 1996

Tabelle 1.1: Ausschnitte N-terminaler Aminosäuresequenzen ausgewählter NaC1 und NaC3. Die Aminosäure, die der Position 513 der cRNA für den fNaC3 entspricht, ist unterstrichen. Zum Zeitpunkt der Entwicklung der Mutante waren die Transporter, die mit * gekennzeichnet sind, noch unbekannt. Der xNaC3 ließ sich durch Lithium nicht hemmen, daher der Eintrag "keine". Die Halbhemmungskonstanten für den rNaC1, hNaC1 und mNaC1 sind geschätzt.

Bei der bipolaren Erkrankung sind Lithiumsalze, wie zum Beispiel Lithiumkarbonat, Therapie der Wahl. Die bipolare Erkrankung ist eine weit verbreitete psychiatrische Erkrankung mit einer Lebenszeitprävalenz von 1 % in Deutschland (Jacobi et al. 2004). Charakteristisch ist das Auftreten von manischen und depressiven Phasen bei demselben Patienten. Diese Patienten haben eine deutlich erhöhte Mortalität (Müller-Oerlinghausen et al. 2003, Angst et al. 1999) mit einer Suizidrate von etwa 15 % (Quiroz et al. 2004). Lithiumsalze, Carbamazepin und Antidepressiva sind einige der Pharmaka, die zur Behandlung und Prophylaxe der manischen und depressiven Phasen eingesetzt werden. Eine deutliche Verminderung der Suizidrate wurde für Lithium in vielen klinischen und epidemiologischen Studien gezeigt. Meta-Analysen zu diesem Thema finden sich bei Kessing et al. (2005), Muzina und Calabrese (2005), Burgess et al. (2001), Tondo et al. (2001) und Schou (1998). Sowohl für trizyklische Antidepressiva (Ghaemi et al. 2003) als auch für Carbamazepin (Hirschfeld und Kasper 2004) ist nur eine geringe prophylaktische Wirkung sowie eine Verkürzung der manischen oder depressiven Phasen bekannt. Deswegen ist Lithium Therapie der Wahl bei der bipolaren Erkrankung. Allerdings hat Lithium im Gegensatz zu den o.g. Alternativen eine geringe therapeutische Breite und viele systemische Nebenwirkungen. Eine gefürchtete akute Komplikation ist die Lithiumintoxikation (Thomsen und Schou 1999, Timmer und Sands 1999). Insbesondere die Herzrhythmusstörungen (u.a. QT-Verlängerungen) machen diese Vergiftung so bedrohlich. Zentralnervöse Symptome von Tremor über Apathie bis zu Krampfanfällen sind ebenfalls typisch (Gitlin 1999, Timmer und Sands 1999, Thomsen und Schou 1999). Zu den chronischen Nebenwirkungen der Lithiumtherapie gehören Schilddrüsenunterfunktion, Kardiomyopathien, Dermatitisen, aplastische Anämien und Zitraturie (vgl. Gitlin 1999, Timmer und Sands 1999). Die vermehrte Zitratausscheidung im Urin kann eventuell durch die Hemmung luminal gelegener Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter erklärt werden (Pajor 1999, Pajor 1996). Der zentralnervöse Wirkmechanismus von Lithium ist nicht aufgeklärt. Überlegungen zur Pathophysiologie fassen Quiroz et al. (2004) zusammen. Auffällig ist bei Untersuchungen von Patienten mit bipolarer Erkrankung eine Minderaktivität im Hippocampus, die sich bei einer Lithiumtherapie bessert (Chen C et al. 2000). Da auch Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter im Gehirn lokalisiert wurden (Maus: Pajor et al. 2001, Mensch: Wang H et al. 2000, Inoue et al. 2002a, Inoue et al. 2002b, Huang et al. 2000), könnten Untersuchungen an den Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern zum Verständnis der vielfältigen peripheren und zentralnervösen Lithiumwirkungen beitragen.

Ziel dieser Arbeit war eine weitergehende elektrophysiologische Charakterisierung des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters aus der Flunderniere an *Xenopus-laevis*-Oozyten. Neben der Untersuchung der Bedeutung der stöchiometrischen Unterschiede von Succinat-Derivaten wurde besonderes Augenmerk auf die Eigenschaften der Natriumbindungsstellen gelegt. Dazu wurde zunächst eine Mutante untersucht, von der vermutet wurde, dass sie sich in Bezug auf die Lithiumempfindlichkeit vom Wildtyp unterscheidet. Bei der Hemmung des Succinat-induzierten Stroms durch Lithium wurden die maximale Hemmbarkeit und die apparente Hemmkonstante von Lithium bestimmt. Auch der Einfluss von 1 mM Lithium auf die

Halbsättigungskonstante von Succinat wurde untersucht. Weil ein Succinat-induzierter Strom oder [¹⁴C]-Succinat-Aufnahme mit Lithium als Kation bei einigen Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern beobachtet wurde, wurde der Succinat-induzierte Strom mit Lithium als Kation untersucht. Mit dem Ziel, den Einfluss von Lithium auf die Halbsättigungskonstante für Natrium zu bestimmen, wurden Versuche zur Natriumabhängigkeit der induzierten Ströme durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Entnahme und Präparation der Oozyten

Verwendet wurden Oozyten aus mindestens zwei Jahre alten südamerikanischen Krallenfroschweibchen (*Xenopus laevis*) von der Firma NASCO, Fort Atkinson, Wisconsin, USA. Nach cRNS-Injektion translatieren diese Oozyten effizient heterologe Proteine. Die Untersuchung solcher Membranproteine wird dadurch vereinfacht, dass sie nur wenige endogene Membrantransportsysteme haben. Außerdem erlauben sie wegen ihres großen Durchmessers von 1,1 bis 1,3 mm im Stadium V und VI nach Dumont (1972) und ihrer im Vergleich zu anderen Zellen größeren Unempfindlichkeit gegenüber mechanischen Schäden eine leichte Handhabung (Wagner et al. 2000, Wang HC et al. 1991, Dawid und Sargent 1998).

Zweimal pro Woche wurden Oozyten aus den Fröschen entnommen. Zur Anästhesie wurden die Krallenfroschweibchen auf Eis mit Tricainlösung gelegt. Die Oozyten wurden unter Beachtung der Tierschutzvorschriften durch eine qualifizierte Mitarbeiterin des Hauses entnommen. Dazu wurde am Unterbauch einzeln durch die Haut und die Muskelschicht geschnitten. Mit Hilfe eines Hakens wurde das Ovar mobilisiert und durch den 1 bis 2 cm großen Schnitt gezogen. Mit einer Schere wurden dann Teile des Ovars abgetrennt. Anschließend wurden separat die Muskelschicht und die Haut mit Einzelknopfnähten und resorbierbaren Fäden zugenäht. Anschließend wurde der Frosch in einen Eimer mit wenig Wasser gelegt, bis er wach wieder ins Aquarium zurückgetragen wurde. Nach einer Ruhepause von mehreren Monaten können von demselben Frosch erneut Oozyten entnommen werden.

Um die Oozyten vom Ovarstroma zu trennen, wurden die Oozyten über Nacht in eine Kollagenaselösung (Kollagenase A) gelegt und am nächsten Morgen gründlich gewaschen. Für die Injektion wurden nach einem Tag unter einem Binokular große, unversehrte Oozyten mit deutlicher Trennung zwischen dem vegetativen und dem animalischen Pol ausgewählt. Sie entsprechen den Stadien V und VI nach Dumont 1972. Da es metabolische Unterschiede zwischen diesen beiden Stadien gibt, wären Oozyten nur eines Stadiums wünschenswert. Sie sind allerdings optisch nicht zu unterscheiden (Wagner et al. 2000, Markovich et al. 1999). Durch eine Mitarbeiterin des Hause wurden in jede Oozyte mit Hilfe eines Mikroinjektors, der durch einen Mikromanipulator gesteuert wurde, 50 ng der cRNS des Wildtyps, der Mutante S513C oder Wasser injiziert. Die cRNS des Wildtyps und der Mutante wurden zur Verfügung gestellt. Bis zur Messung am 2. und oder 3. Tag nach der Injektion wurden die Oozyten in einer natrium-

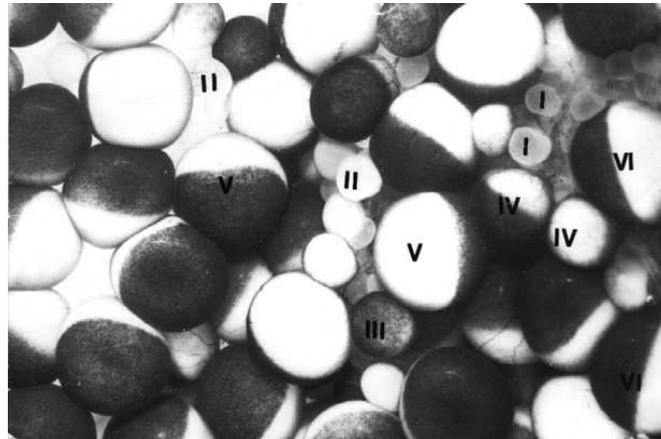


Abbildung 2.1: Reifestadien isolierter Oozyten des Krallenfrosches. Abgebildet sind isolierte *Xenopus-laevis*-Oozyten unterschiedlicher Reifestadien nach Dumont (1972). Die Pigmentierung der beiden Zellpole (dunkel bzw. hell) im Reifestadium V und VI ist deutlich. (Abbildung aus Middelberg 2004, Seite 9.)

haltigen Lösung (“Ori” aus Tabelle 2.1) aufbewahrt, wobei sie mit verkürzten Pasteurpipetten mit rundgeschmolzenen Spitzen täglich in frische Lösung übertragen wurden. Dabei wurden unregelmäßig pigmentierte Oozyten entfernt.

2.2 Messprinzip

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Methode ist eine sehr häufig verwendete elektrophysiologische Messmethode (Wagner et al. 2000), um Ströme durch Transporter oder Kanäle in einer Zellmembran zu messen. Beschreibungen des Messprinzips finden sich bei Wagner et al. (2000), Stühmer (1998) Dietzel et al. (1992) und Pikurves et al. (2001). Diese Methode erlaubt es, bei einem vom Untersucher definierten Potential Ströme durch diese Transporter, genauer durch die Oozytenmembran, zu messen. Dazu werden zwei Elektroden in die Oozyte gestochen. Die spannungsmessende Elektrode (vgl. Abbildung 2.2) misst das Potential gegenüber dem Bad, wo die Badelektrode liegt. Die andere Elektrode, die stromeinspeisende Elektrode, speist den Strom (Klemmstrom) ein, der zum Halten eines vorgegebenen Membranpotentials (Kommandospannung) notwendig ist. Die spannungsmessende Elektrode ist mit einem Rückkopplungsverstärker (OC 724 A) verbunden, der den zum Halten des gewünschten Potentials notwendigen Strom berechnet und über die stromeinspeisende Elektrode einspeist. Zusätzlich gibt es noch eine Erdungselektrode. Wenn eine Substanz zum Bad gegeben wird, die eine Veränderung der Leitfähigkeit der Oozytenmembran bewirkt, so folgt aus dem Ohmschen Gesetz, dass sich bei gleichbleibendem Membranpotential der Stromfluss verändert. Definitionsgemäß entspricht ein Zufluss positiver Ladung in die Zelle einem negativen Strom.

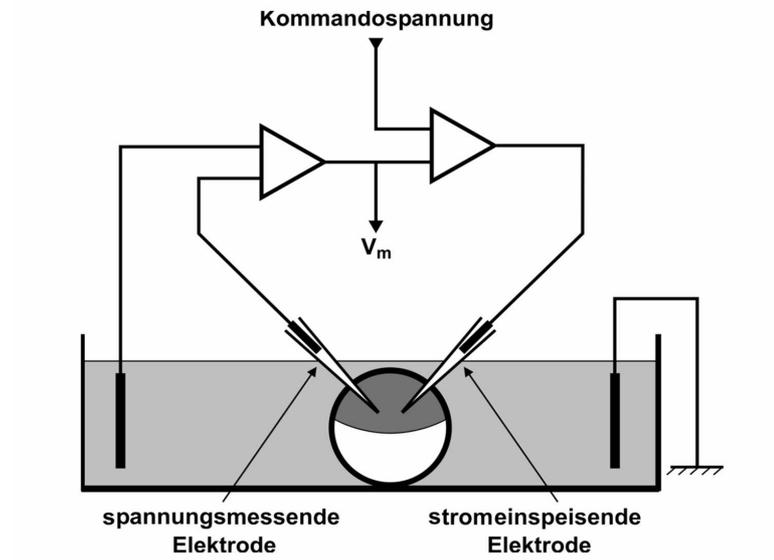


Abbildung 2.2: Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Methode. Am Rückkopplungsverstärker wird das gewünschte Potential (Kommandospannung) eingegeben. Das Membranpotential der Oozyte wird zwischen der spannungsmessenden Elektrode und der Badelektrode gemessen. Der Verstärker liefert den Strom zum Halten dieses Potentials durch die stromeinspeisende Elektrode. Über eine im Bad liegende Elektrode ist das System geerdet.

Vor Beginn eines jeden Experiments erfolgte ein Nullabgleich des gemessenen Potentials. Eine Klemmspannung kann erst etwa 20 Minuten nach Anstechen der Oozyte angelegt werden, da dies vorher von der Oozyte nicht toleriert wird. Während dieser 20 Minuten wird über der spannungsmessenden Elektrode und der Badelektrode das Potential über der Oozytenmembran gemessen und angezeigt. Erklärungen zur Badelektrode finden sich bei Alvarez-Leefmann (1992). Eine Veränderung der Leitfähigkeit der Oozyte führt zu einer Veränderung des gemessenen Membranpotentials.

Für die Elektroden werden Kapillare aus Borosilikatglas mit Filament (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,8 mm) mit Hilfe eines vertikalen Kapillarziehgeräts gezogen. Sie werden mit 3-molarer Kaliumchloridlösung gefüllt und über einen chlorierten Silberdraht mit dem Verstärker verbunden. Alle verwendeten Elektroden haben einen Widerstand von weniger als $1 \text{ M}\Omega$ (Burckhardt BC et al. 2000). Die Messapparatur wird mit einem nach vorne offenen Faraday-Käfig abgeschirmt (vgl. Ohlemeyer und Meyer 1992).

Der Substrat-induzierte Strom wird bestimmt, indem der einzuspeisende Strom (Klemmstrom) vor Substratgabe vom Klemmstrom nach Substratgabe abgezogen wird. Bei der Bestimmung der Potentialabhängigkeit des Substrat-induzierten Stroms wird der Klemmstrom für alle erwünschten Potentiale zunächst ohne Substrat und dann mit Substrat bestimmt. Bei einer Strom-Spannungskennlinie wird ausgehend vom Ruhepotential von -60 mV alle 10 Se-

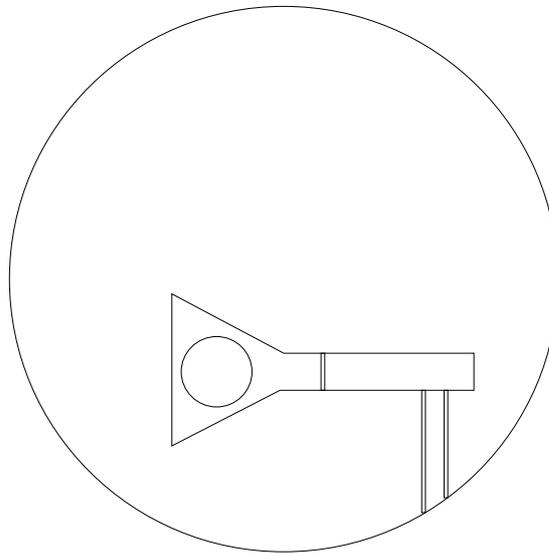


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Oozytenbades. In einer runden Plexiglasscheibe liegt das Bad für die Oozyte. Über die Bohrungen am rechten Rand erreichen die Lösungen die Kammer. Die Oozyte liegt bei den Messungen an der rechten Seite des 3 mm hohen Stegs. Der Steg vereinfacht das Einstechen in die Oozyte. Die Lösungen fließen über das Loch in der linken Seite ab.

kunden das Klemmpotential verändert. Zunächst wird das Klemmpotential in 10 mV Schritten vom Ruhepotential bis -90 mV und dann aufsteigend bis -10 mV und schließlich absteigend wieder auf das Ruhepotential von -60 mV variiert. Das gemessene Klemmpotential und der Wert des Klemmstroms werden kontinuierlich von einem Schreiber (Zipp & Zonen) registriert.

2.3 Aufbau des Messplatzes

Für das Experiment liegt die Oozyte in einer Kammer in einer Badlösung (meistens Lösung "Ori" aus Tabelle 2.1) in einer Perfusionskammer. Diese Kammer ist 3 cm lang und durch einen 3 mm hohen Steg in zwei Bereiche unterteilt. Der in der Abbildung 2.3 rechts gelegene Teil ist 0,5 cm breit und 0,5 cm hoch. In diesen Bereich können zwei verschiedene Lösungen über kleine Bohrungen einfließen. Im linken Bereich erweitert sich die Kammer auf ca. 2 cm Breite und hat im Boden ein Loch von etwa 0,5 cm Durchmesser. Über einen Trichter und Gummischläuche fließen verbrauchte Lösungen in einen Abfallbehälter.

Die Lösungen befinden sich in Scheidetrichtern in einer Halterung unter dem Dach des Faraday-Käfigs. Über dünne Polyäthylenschläuche fließen die Lösungen in die Bohrungen im Rand der Plexiglasskammer. Die Flussgeschwindigkeit beträgt etwa 4 ml/min. Die Oozytenkammer ist auf einem Tisch befestigt, der mit 10 cm dicken Gummifüßen gegen Erschütterungen abgeschirmt wird. Die Elektroden werden mittels Mikromanipulatoren (Leitz) platziert.

Zur Vereinfachung des Anstechens der Oozyten ist ein Stereo-Mikroskop mit vierfacher Vergrößerung angebracht. Es gibt zwei gleich aufgebaute Messtische.

2.4 Dokumentation

Abbildung 3.1 zeigt einen Ausschnitt aus einem Papierprotokoll, bei dem der Klemmstrom bei Verwendung der Ori-Lösung (siehe 2.1) bei 9 Potentialen bestimmt wurde. Gezeigt wird ein Abschnitt, bei dem ausgehend von der Ruhespannung von -60 mV die Klemmspannung in 10 mV-Schritten zunächst bis -90 mV dann bis -10 mV und wieder auf -60 mV verändert wurde. Alle 10 Sekunden wurde die Spannung verändert. Zur besseren Übersicht sind die Hilfslinien nicht abgebildet. Abgebildet ist auch der jeweils notwendige Klemmstrom. Es ist zu erkennen, dass innerhalb der 10 Sekunden außer einer kleinen Spitze zu Anfang keine Veränderung des Klemmstroms beobachtet werden kann. Bei niedrigen Potentialen ist zum Teil ein Anstieg des Klemmstroms während der 10 Sekunden sichtbar. In diesem Fall wurde der Wert am Ende der 10 Sekunden abgelesen. Strom-Spannungskennlinien (I - V -Kennlinien), bei denen der Strom bei 2 Potentialen um mehr als 5 nA abwich, wurden in der Regel wiederholt.

2.5 Bestimmung der Halbsättigungskonstanten

Die Halbsättigungskonstanten in dieser Arbeit wurden durch Eadie-Hofstee-Auftragungen bestimmt. Substrat-induzierte Ströme von unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden elektrophysiologisch gemessen. Der Substrat-induzierte Strom I bei einer Konzentration c wird aufgetragen gegen den Strom I dividiert durch die Konzentration c (I/c). Die Steigung der Regressionsgeraden durch diese Punkte entspricht dem Negativen der Halbsättigungskonstanten. Abbildung 2.4 zeigt ein Beispiel für eine Eadie-Hofstee-Auftragung. Fuhrmann und Volker (1993) beschreiben die Schwierigkeiten einer nicht linearen Kinetik bei Eadie-Hofstee-Auftragungen. Die Möglichkeit mehrerer Halbsättigungskonstanten wurde bedacht. Da aber keine Systematik in den Abweichungen erkannt wurde, wurde jeweils nur eine Halbsättigungskonstante bestimmt.

2.6 Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstanten

Die Inhibitionskonstanten für Lithium wurden mit Hilfe von Dixon-Auftragungen bestimmt. Der durch 1 mM Succinat induzierte Strom wurde bei verschiedenen Lithiumchloridkonzentrationen gemessen. In einer Dixon-Auftragung wird der gemessene Strom gegen die Konzentration des Hemmstoffs aufgetragen. Da keine vollständige Aufhebung des Succinat-induzierten

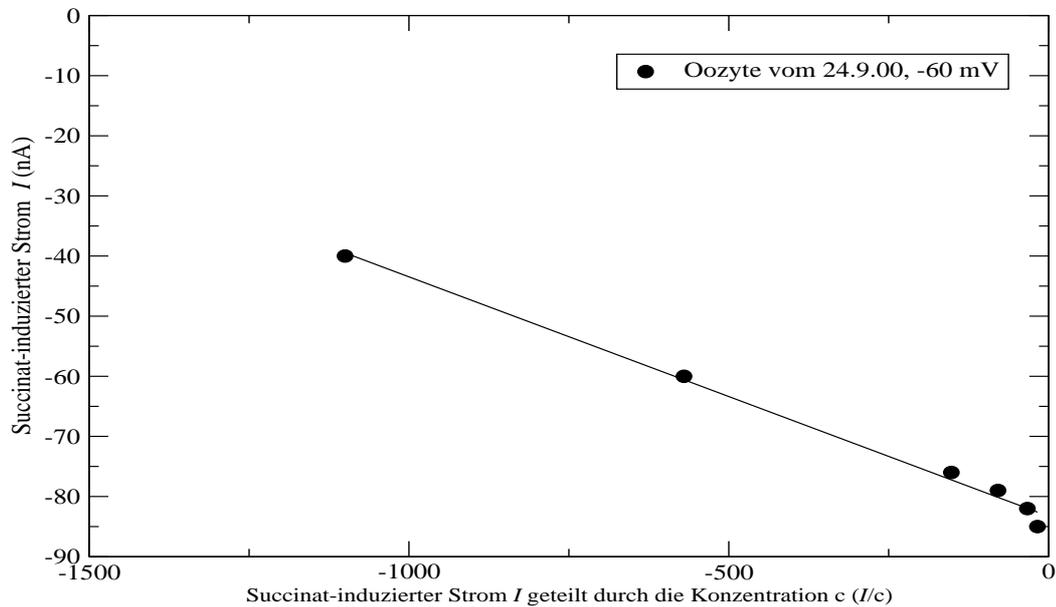


Abbildung 2.4: Beispiel einer Eadie-Hoffstee-Auftragung. Bei einer Eadie-Hofstee-Auftragung wird der gemessene (hier Succinat-induzierte) Strom I aufgetragen gegen den Strom I geteilt durch die dazugehörige Konzentration c . Die Steigung der Regressionsgeraden durch diese Punkte entspricht dem Negativen der Halbsättigungskonstanten.

Stroms durch Lithium erreicht wurde, wurde der korrigierte Strom aufgetragen, d.h. der Reststrom, gemessen bei einer Konzentration von 20 mM Lithium, wird vom jeweils gemessenen Strom substrahiert. Eine Regressionsgerade durch diese Punkte wird verlängert, bis sie die x -Achse schneidet. Der negative Wert dieses Schnittpunktes der Regressionsgeraden mit der x -Achse entspricht der apparenten Inhibitionskonstanten. Wird der Succinat-induzierte Strom verschiedener Lithiumkonzentrationen und zwei verschiedener Succinatkonzentrationen bestimmt und im Dixon-Graphen aufgetragen, entspricht der negative Wert des Schnittpunktes dieser Regressionsgeraden der (echten) Inhibitionskonstanten. Die apparente Inhibitionskonstante ist etwas größer als die (tatsächliche) Inhibitionskonstante, da sich die Geraden theoretisch vor dem Schnittpunkt mit der x -Achse schneiden. Abbildung 2.5 zeigt ein Beispiel für eine Dixon-Auftragung zur Bestimmung einer apparenten Inhibitionskonstanten.

2.7 Auswertung

Alle Versuchsreihen wurden an mindestens drei Oozyten von drei verschiedenen Fröschen durchgeführt. Bei den dargestellten Untersuchungsergebnissen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben, obwohl die Aussagekraft einer Standardabweichung bei sehr wenigen Messwerten gering ist. Unvollständige Messreihen wurden ebenfalls untersucht, aber

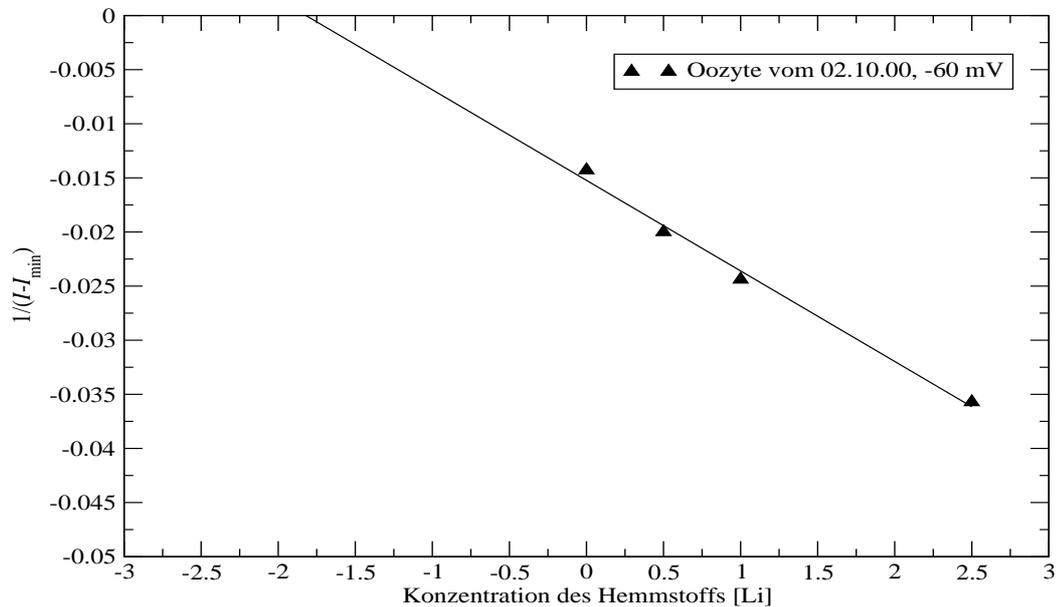


Abbildung 2.5: Beispiel einer Auftragung nach Dixon. Bei einer Auftragung nach Dixon zur Bestimmung einer apparenten Inhibitionskonstanten wird der korrigierte gemessene Strom gegen die Konzentration des Inhibitors (hier Lithium) aufgetragen. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x -Achse entspricht dem negativen Wert der apparenten Inhibitionskonstanten.

nicht in die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung einbezogen. In vielen Abbildungen wurde der Succinat-induzierte Strom normiert, da der maximale Succinat-induzierte Strom je nach Oozyte stark schwankt. Dazu wurde der gemessene Succinat-induzierte Strom durch den Succinat-induzierten Strom bei -90 mV und 1 mM Succinat dividiert. Um den Charakter des Einwärtsstroms zu erhalten, wurde dieser Wert mit -1 multipliziert. In den Unterschriften der Abbildungen des Ergebnisteils sind die Anzahl der Oozyten und der Spendertiere angegeben, die Grundlage der jeweiligen Messreihe waren. Dabei ist in Klammern die erste Zahl die Anzahl der Oozyten und die zweite die Anzahl der Spendertiere.

Die Standardabweichung σ wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \tilde{x})^2}, \quad (2.1)$$

wobei N die Anzahl der Messungen, x_i den Messwert der i -ten Messung und \tilde{x} den Mittelwert der Messwerte bezeichnet.

Da die Fallzahl häufig sehr klein war und nicht von einer Gaußverteilung der Meßwerte ausgegangen werden konnte, wurde ein nicht-parametrischer Test zur Bestimmung der statistischen Relevanz benutzt. Bei nicht gepaarten Ergebnissen wurde der (zweiseitige) Wilcoxon-Test verwendet, bei gepaarten Untersuchungen (Kontrolle und Test hintereinander an einer Oozyte) der

Wilcoxon-Test für gepaarte Untersuchungen. Der Test untersucht die Hypothese, ob die zwei unabhängigen (oder abhängigen) Gruppen von Daten aus derselben Population stammen. Dazu wird jedem Messwert aus der Messreihe X und aus der Messreihe Y sein Rang in der Gesamtgruppe ($X + Y$) zugeordnet. Aus den Summen dieser Ränge und der Anzahl an Messungen in jeder Gruppe wird eine Prüfgröße Z berechnet (Campell und Machin 1993):

$$Z = \frac{W_x - 0.5 - \frac{m(m+n+1)}{2}}{\sqrt{\frac{mn(m+n+1)}{12}}} . \quad (2.2)$$

Dabei bezeichnet W_x die Summe der Ränge der kleineren Gruppe, m die Anzahl der Messwerte in der kleineren Gruppe und n die Anzahl der Messwerte in der größeren Gruppe.

Um die statistische Signifikanz (p-Wert) zu bekommen, wird diese Prüfgröße in einer Tabelle nachgeschlagen (Campell und Machin 1993).

2.8 Verwendete Lösungen

Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen zeigt Tabelle 2.1. Die Lösung "Ori" diente auch als Aufbewahrungslösung für die Oozyten. Die Chemikalien stammten von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland).

Name	NaCl (mM)	KCl (mM)	CaCl ₂ (mM)	HEPES/ TRIS (mM)	Succ. (mM)	LiCl (mM)	2,2- DMS (μ M)	2,3- DMS (mM)
Aufbewahrung der Oozyten								
Ori	110	3	2	5	0	0	0	0
Abschnitt 3.2								
Ori + 0,05 mM Succ.	110	3	2	5	0,05	0	0	0
Ori + 0,1 mM Succ.	110	3	2	5	0,1	0	0	0
Ori + 0,5 mM Succ.	110	3	2	5	0,5	0	0	0
Ori + 1 mM Succ.	110	3	2	5	1	0	0	0
Ori + 2,5 mM Succ.	110	3	2	5	2,5	0	0	0
Ori + 5 mM Succ.	110	3	2	5	5	0	0	0
Abschnitt 3.2.6 zusätzlich folgende Lösungen								
Ori1	110	3	2	5	0	1	0	0
Ori1 + 0,05 mM Succ.	110	3	2	5	0,05	1	0	0
Ori1 + 0,1 mM Succ.	110	3	2	5	0,1	1	0	0
Ori1 + 0,5 mM Succ.	110	3	2	5	0,5	1	0	0
Ori1 + 1 mM Succ.	110	3	2	5	1	1	0	0
Ori1 + 2,5 mM Succ.	110	3	2	5	2,5	1	0	0
Ori1 + 5 mM Succ.	110	3	2	5	5	1	0	0
Abschnitt 3.3 mit Stern* - nur in Voruntersuchung								
Ori	110	3	2	5	0	0	0	0
Ori + 5 μ M 2,2-DMS	110	3	2	5	0	0	5	0
Ori + 10 μ M 2,2-DMS	110	3	2	5	0	0	10	0
Ori + 50 μ M 2,2-DMS	110	3	2	5	0	0	50	0
Ori + 100 μ M 2,2-DMS	110	3	2	5	0	0	100	0
Ori + 500 μ M 2,2-DMS	110	3	2	5	0	0	500	0
*Ori + 1 mM 2,2-DMS	110	3	2	5	0	0	1000	0
*Ori + 5 mM 2,2-DMS	110	3	2	5	0	0	5000	0
Ori + 10 μ M 2,3-DMS	110	3	2	5	0	0	0	10
Ori + 25 μ M 2,3-DMS	110	3	2	5	0	0	0	25
Ori + 50 μ M 2,3-DMS	110	3	2	5	0	0	0	50
Ori + 100 μ M 2,3-DMS	110	3	2	5	0	0	0	100
Ori + 500 μ M 2,3-DMS	110	3	2	5	0	0	0	500
*Ori + 1 mM 2,3-DMS	110	3	2	5	0	0	0	1000
*Ori + 5 mM 2,3-DMS	110	3	2	5	0	0	0	5000

<i>Name</i>	<i>NaCl</i> (mM)	<i>KCl</i> (mM)	<i>CaCl₂</i> (mM)	<i>Hepes</i> / <i>Tris</i> (mM)	<i>Succ.</i> (mM)	<i>LiCl</i> (mM)	<i>NMDG</i> (mM)
Abschnitt 3.4							
Ori	110	3	2	5	0	0	0
OriS + 0,5 mM LiCl	110	3	2	5	1	0,5	0
OriS + 1 mM LiCl	110	3	2	5	1	1	0
OriS + 2,5 mM LiCl	110	3	2	5	1	2,5	0
OriS + 5 mM LiCl	110	3	2	5	1	5	0
OriS + 10 mM LiCl	110	3	2	5	1	10	0
OriS + 20 mM LiCl	110	3	2	5	1	20	0
Abschnitt 3.5							
OriNMDG	0	3	2	5	1	0	110
OriNMDG + 11 mM NaCl	11	3	2	5	1	0	99
OriNMDG + 27,5 mM NaCl	27,5	3	2	5	1	0	82,5
OriNMDG + 55 mM NaCl	55	3	2	5	1	0	55
OriNMDG + 82,5 mM NaCl	82,5	3	2	5	1	0	27,5
OriNMDG + 99 mM NaCl	82,5	3	2	5	1	0	11
OriS	110	3	2	5	1	0	0
Abschnitt 3.6							
Ori	110	3	2	5	0	0	0
OriS	110	3	2	5	1	0	0
OriLiCl	0	3	2	5	0	110	0
OriLiCl + 0,1 mM Succ.	0	3	2	5	0,1	110	0
OriLiCl + 1 mM Succ.	0	3	2	5	1	110	0
OriLiCl + 5 mM Succ.	0	3	2	5	5	110	0
OriLiCl + 10 mM Succ.	0	3	2	5	10	110	0

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.

3 Ergebnisse

3.1 Einleitung: Substrat-induzierte Ströme

Alle Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Methode durchgeführt. Bei dieser Methode werden Ladungsverschiebungen über die Oozytenmembran gemessen. Der Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter transportiert drei Natriumionen zusammen mit einem divalenten Di- oder Trikarboxylat. Da der Rückkopplungsverstärker das Membranpotential konstant hält, verändert sich der Strom, der notwendig ist, um dieses Membranpotential zu halten (vgl. Abschnitt 2.2).

Abbildung 3.1 zeigt einen Abschnitt aus einem Original-Schreiberprotokoll, bei dem eine Strom-Spannungskennlinie bestimmt wurde. Zu erkennen sind Veränderungen des Klemmpotentials in 10-mV-Schritten alle 10 Sekunden. Ausgehend von -60 mV werden so zunächst -90 mV und dann -10 mV erreicht. Kurz nach jeder Veränderung des Klemmpotentials ist eine Veränderung des einzuspeisenden Haltestroms (Klemmstrom) zu beobachten.

Abbildung 3.2 zeigt den Verlauf des Succinat-induzierten Stroms bei einer Oozyte vom Wildtyp bei einem Klemmpotential von -60 mV. Direkt nach dem Wechsel von einer natriumhaltigen Lösung ("Ori" aus Tabelle 2.1) zu einer natriumhaltigen Lösung mit 1 mM Succinat ("OriS") gibt es einen starken Abfall des Klemmstroms, der als Einwärtsstrom interpretiert werden kann (Markierung A). Der Klemmstrom, oder eingespeiste Haltestrom, erreicht rasch einen Maximalwert und kurz darauf ein Plateau. Nach dem Wechsel zurück zur natriumhaltigen Lösung ohne Succinat (Markierung B) gibt es einen plötzlichen Anstieg des Klemmstroms, der wieder den Wert vor dem Wechsel der Lösungen erreicht. Der Verlauf der Ströme, die durch 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat induziert sind, ist qualitativ gleich.

Bei einem Fluss positiver Ladungen aus der Oozyte heraus hat die Veränderung des Klemmstroms das umgekehrte Vorzeichen. Abbildung 3.3 zeigt bei der Markierung "C" den Verlauf des Klemmstroms nach dem Wechsel von der natriumhaltigen Lösung ohne Succinat ("Ori") zur lithiumhaltigen Lösung ohne Succinat ("OriLiCl"). Der Anstieg des Klemmstroms nach dem Wechsel zur lithiumhaltigen Lösung ist gering (hier etwa 15 nA) und ein Plateau ist sehr schnell erreicht.

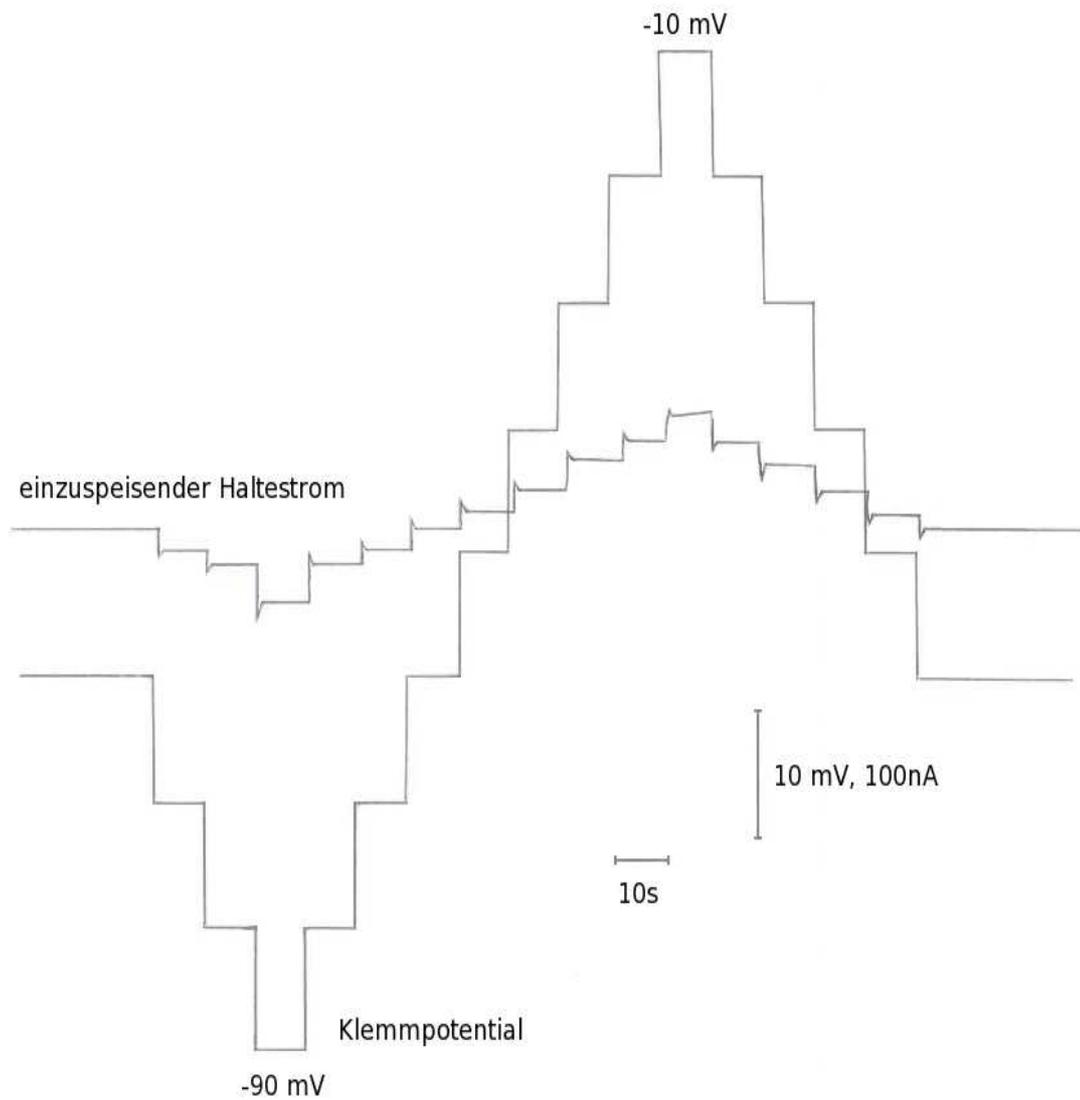


Abbildung 3.1: Beispiel eines Schreiberprotokolls. Zur besseren Übersicht sind in dieser verkleinerten Kopie aus einem Schreiberprotokoll die Hilfslinien zur Auswertung entfernt worden. Im Original ist der Wert des gemessenen Haltestroms rot und der Wert des Klemmpotentials schwarz aufgetragen. Die kantigen Potentialänderungen führen zu einer Veränderung des Klemmstroms, der nach weniger als einer Sekunde ein Plateau erreicht.

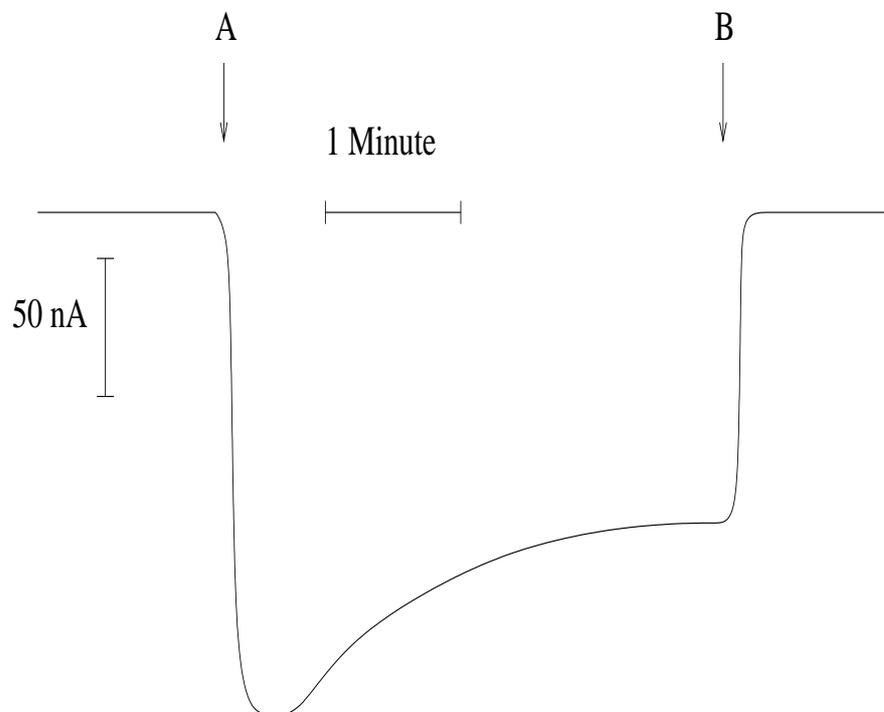


Abbildung 3.2: Succinat-induzierter Strom im Beisein von 110 mM NaCl. Kurz nach dem Wechsel von der succinatlosen ("Ori") zur succinathaltigen Lösung ("OriS") (A) kommt es zu einem Abfall des Klemmstroms. Der Klemmstrom erreicht ein Minimum, steigt dann etwas an und erreicht ein Plateau. Nach dem Wechsel zurück zur succinatlosen Lösung ("Ori") (B) wird sehr schnell wieder der gleiche Klemmstrom gemessen wie vor dem Wechsel der Lösungen. Dies ist ein Beispiel für einen Einwärtsstrom positiver Ladungen (Klemmpotential -60 mV).

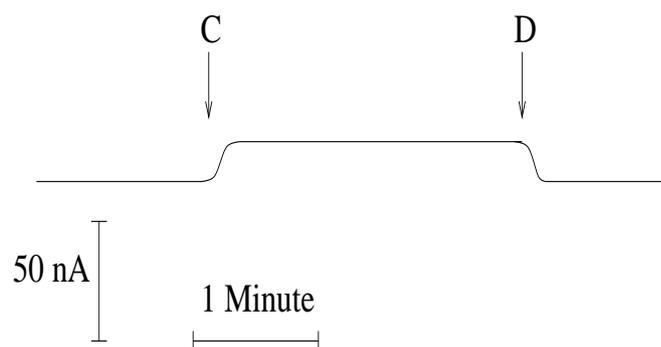


Abbildung 3.3: Klemmstrom bei Wechsel von natrium- zu lithiumhaltiger Lösung. Diese Abbildung zeigt bei der Markierung "C" einen Fluss positiver Ladungen aus der Zelle kurz nach dem Wechsel von der natriumhaltigen ("Ori") zur lithiumhaltigen ("OriLiCl") Lösung, beide ohne Succinat. Der Abfall des Klemmstroms ist sehr schnell und erreicht danach ein Plateau. Nach dem Wechsel zurück zur natriumhaltigen Lösung ("Ori") wird wieder der gleiche Haltestrom benötigt wie vor dem Wechsel der Lösungen (Markierung "D"). Das Klemmpotential beträgt -60 mV.

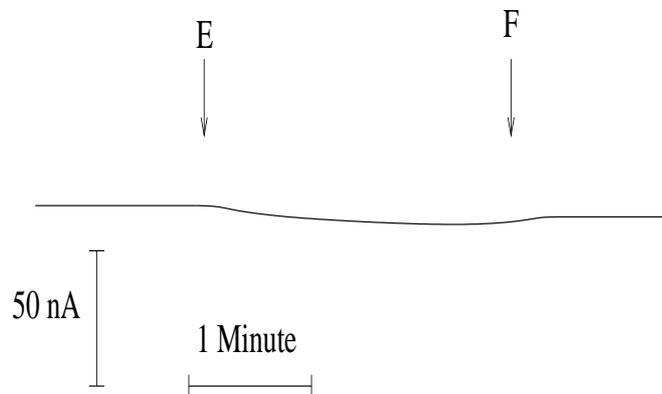


Abbildung 3.4: Succinat-induzierter Strom im Beisein von 110 mM LiCl. Der Wechsel von einer lithiumhaltigen succinatlosen Lösung (“OriLiCl”) zu einer lithiumhaltigen Lösung mit 1 mM Succinat (“OriLiCl + 1 mM Succ.”) ist bei Markierung E kaum zu erkennen. Dieser Wechsel bewirkt bei dieser typischen Oozyte keine deutliche Veränderung des Klemmstroms (Klemmpotential -60 mV).

Ein Einwärtsstrom ist bei Wechsel von einer natriumhaltigen, succinatfreien zu einer natrium- und succinathaltigen Lösung deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 3.2). Um zu untersuchen, ob Lithium als Kation einen Succinattransport induzieren kann, wurde der Succinat-induzierte Strom im Beisein von 110 mM Lithium gemessen. Abbildung 3.4 zeigt den Verlauf des Succinat-induzierten Stroms einer Oozyte vom Wildtyp im Beisein von 110 mM Lithiumchlorid. Im Vergleich zu Abbildung 3.2 ist kein klarer Succinat-induzierter Strom zu erkennen. Wenn überhaupt, handelt es sich um einen sehr geringen Einwärtsstrom. Ob der Abfall der Klemmspannung einem Succinattransport entspricht oder nur Schwankungen widerspiegelt, die durch den Wechsel der Lösungen bedingt werden, ist auf Abbildung 3.4 nicht zu erkennen. Die Auswertung der Messungen der Succinat-induzierten Ströme mit Lithium als Kation findet sich in Abschnitt 3.6.

3.2 Succinat-induzierte Ströme: Vergleich Wildtyp/Mutante

Da Steffgen et al. (1999) bei der ersten Beschreibung des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters aus der Flunderniere die Transporteigenschaften für Succinat mittels Aufnahme-Experimenten bestimmt haben, liegt es nahe, Succinat als Vergleichssubstrat zu verwenden. Der erste Schritt bei der elektrophysiologischen Untersuchung der Mutante ist die Beschreibung der Transporteigenschaften von Succinat im Vergleich zum Wildtyp, um sicher zu gehen, dass die Mutation zu keinen wesentlichen Veränderungen dieser Transporteigenschaften geführt hat.

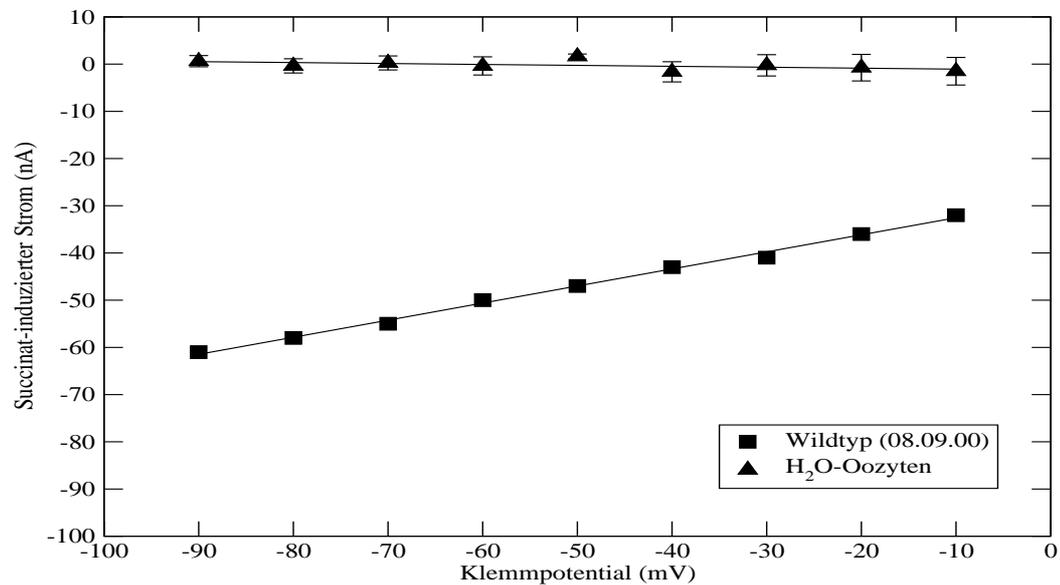


Abbildung 3.5: Strom-Spannungskennlinie für Succinat (H₂O-Oozyten). Der durch 1 mM Succinat induzierte Strom ist bei den 6 H₂O-Oozyten von 6 Fröschen etwa Null nA. Alle anderen Succinatkonzentrationen haben eine vergleichbare Strom-Spannungskennlinie. Zum Vergleich ist der durch 1 mM Succinat induzierte Strom bei einer Oozyte (Wildtyp) gezeigt (n=6/6: Es wurden Experimente an 6 Oozyten von 6 Fröschen durchgeführt).

3.2.1 Wasser-injizierte Oozyten (H₂O-Oozyten)

Succinatkonzentrationsreihen wurden an sechs Wasser-injizierten Oozyten von sechs Fröschen durchgeführt. Die Versuchslösungen enthielten folgende Succinatkonzentrationen: 5 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1000 μ M und 5000 μ M. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Succinatantwort wurde nicht beobachtet. Für alle Konzentrationen von Succinat und alle neun gemessenen Potentiale war der Succinat-induzierte Strom etwa gleich Null. Etwas größere Schwankungen wurden bei niedrigeren Klemm-Potentiale (-20 mV, -10 mV) beobachtet, ohne dass eine Systematik in diesen Abweichungen zu beobachten war (Abbildung 3.5). Eine Korrektur der Messwerte der mit cRNS injizierten Oozyten war also nicht notwendig.

3.2.2 Potentialabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms

Succinat-induzierte Ströme wurden beim Wildtyp und bei der Mutante für die Konzentrationen 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM und 5 mM jeweils für neun Klemmpotentiale bestimmt. Insgesamt wurden für die Mutante Experimente an 10 Oozyten von 5 Fröschen und für den Wildtyp an 6 Oozyten von 4 Fröschen durchgeführt (siehe Abbildungen 3.6 und 3.7). Auffällig war die häufig deutlich bessere Expression (maximaler Succinat-induzierter Strom)

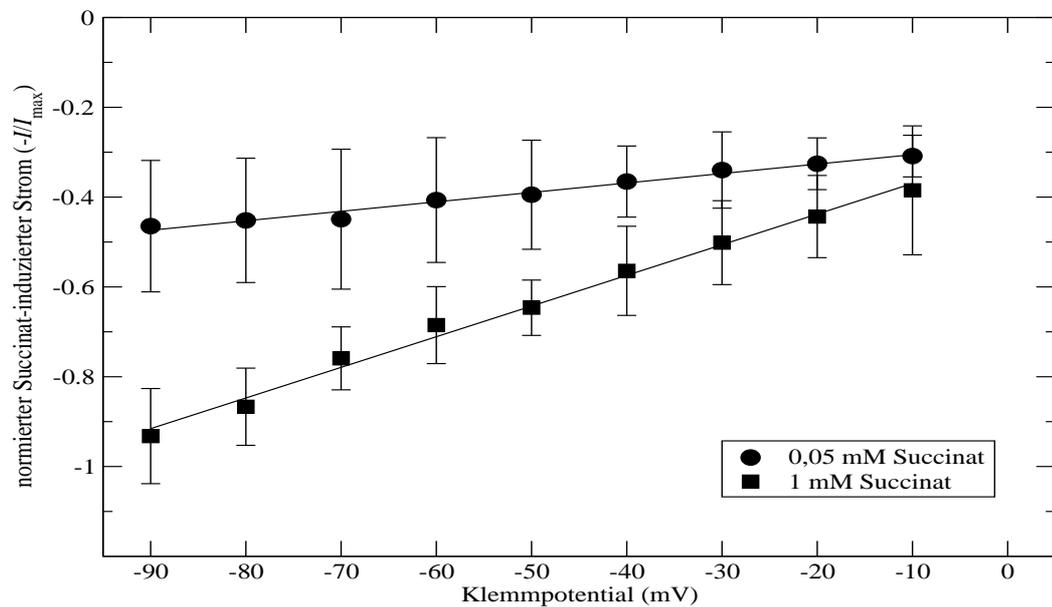


Abbildung 3.6: Strom-Spannungskennlinie von Succinat (Wildtyp). Der Succinat-induzierte Strom nimmt bei Depolarisation ab. Beispielhaft sind die Messwerte der Konzentration 0,05 mM (Kreise) und 1 mM Succinat (Quadrate) dargestellt (n=6/4).

bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Bei der Mutante streute der durch 1 mM Succinat induzierte Strom bei einer Klemmspannung von -60 mV von -60 nA bis -140 nA. Beim Wildtyp lag die Expression bei dem gleichen Klemm-Potential zwischen -50 nA und -80 nA. Aus diesem Grund wurden die maximalen Succinat-induzierten Ströme normiert, um die Messungen in den Abbildungen besser miteinander vergleichen zu können. Dabei wurde der normierte Wert mit -1 multipliziert, um den Charakter des Einwärtsstroms zu erhalten.

Sowohl bei der Mutante als auch beim Wildtyp bestand eine Abnahme des Succinat-induzierten Stroms bei Depolarisation. Abbildungen 3.6 und 3.7 zeigen die Potentialabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms bei zwei Konzentrationen: 0,05 mM und 1 mM Succinat. Die Abnahme des induzierten Stroms bei Depolarisation ist linear. Sie wurde für alle Succinatkonzentrationen an allen mit cRNS injizierten Oozyten beobachtet. Die Steigungen der Regressionsgeraden durch die Strom-Spannungskennlinien aus den normierten induzierten Strömen sind vergleichbar zwischen Wildtyp und Mutante. Bei einem Klemmpotential von -60 mV ist diese Steigung bei der Mutante $0,0058 \pm 0,0007$ und beim Wildtyp $0,0068 \pm 0,002$. Die Potentialabhängigkeit der Succinat-induzierten Ströme war also bei Wildtyp und Mutante ähnlich. Mit einem P-Wert von 0,18 war der Unterschied statistisch nicht signifikant.

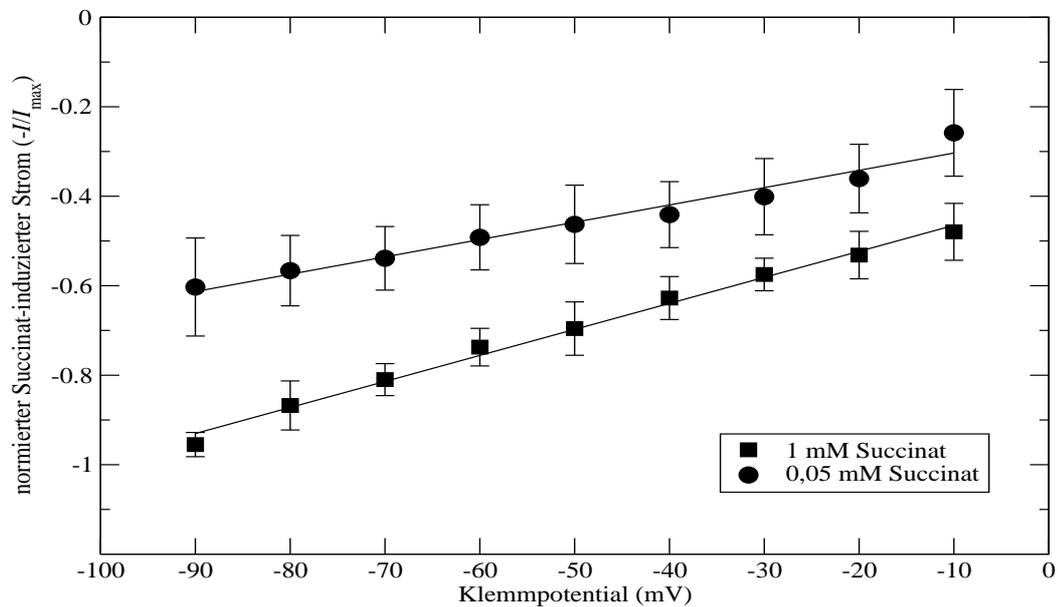


Abbildung 3.7: Strom-Spannungskennlinie von Succinat (Mutante). Der Succinat-induzierte Strom nimmt bei Depolarisation ab. Beispielhaft sind die Messwerte der Konzentrationen 0,05 mM (Kreise) und 1 mM Succinat (Quadrate) dargestellt (n=10/5).

3.2.3 Konzentrationsabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms

Bei niedrigen Konzentrationen von Succinat stieg der induzierte Strom bei kleinen Konzentrationserhöhungen stark an, bei hohen Konzentrationen zeigte der induzierte Strom ein Sättigungsverhalten. Dies ist die Voraussetzung für die Berechnung einer Halbsättigungskonstanten für Succinat nach Michaelis-Menten. Abbildungen 3.8 und 3.9 zeigen die Konzentrationsabhängigkeit des Mittelwertes des normierten Succinat-induzierten Stroms bei einem Klemmpotential von -30 mV und -90 mV beim Wildtyp und bei der Mutante.

3.2.4 Eadie-Hofstee-Auftragung

Abbildungen 3.10 und 3.11 zeigen Eadie-Hofstee-Auftragungen für den Wildtyp und für die Mutante. Zur Übersicht sind nur Mittelwerte eingezeichnet. Die Eadie-Hofstee-Diagramme aller Oozyten und aller Klemmpotentiale wurden analysiert. In einigen Diagrammen ist kein lineares Verhalten zu beobachten. Es gab sowohl Oozyten mit sub- als auch mit supralinearem Verhalten. Daher ist nicht anzunehmen, dass der fNaC3 mehrere Bindungsstellen für Succinat hat, die zusätzlich unterschiedliche Halbsättigungskonstanten haben. Bei der Mutante ist auch noch bei der Auftragung der Mittelwerte eine Abweichung von der Geraden zu beobachten. Dies liegt am wahrscheinlichsten an den stärker schwankenden Messwerten.

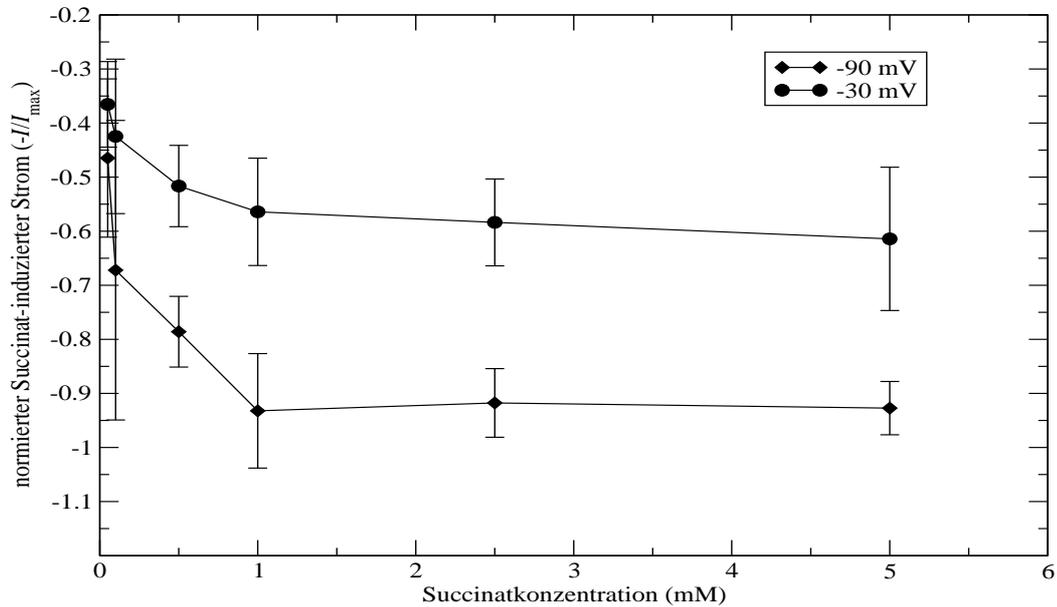


Abbildung 3.8: Konzentrationsabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms (Wildtyp). Mittelwerte mit Standardabweichung des normierten Succinat-induzierten Stroms des Wildtyps bei den Klemmpotentialen -90 mV und -30 mV. Der Succinat-induzierte Strom zeigt ein Sättigungsverhalten (n=6/4).

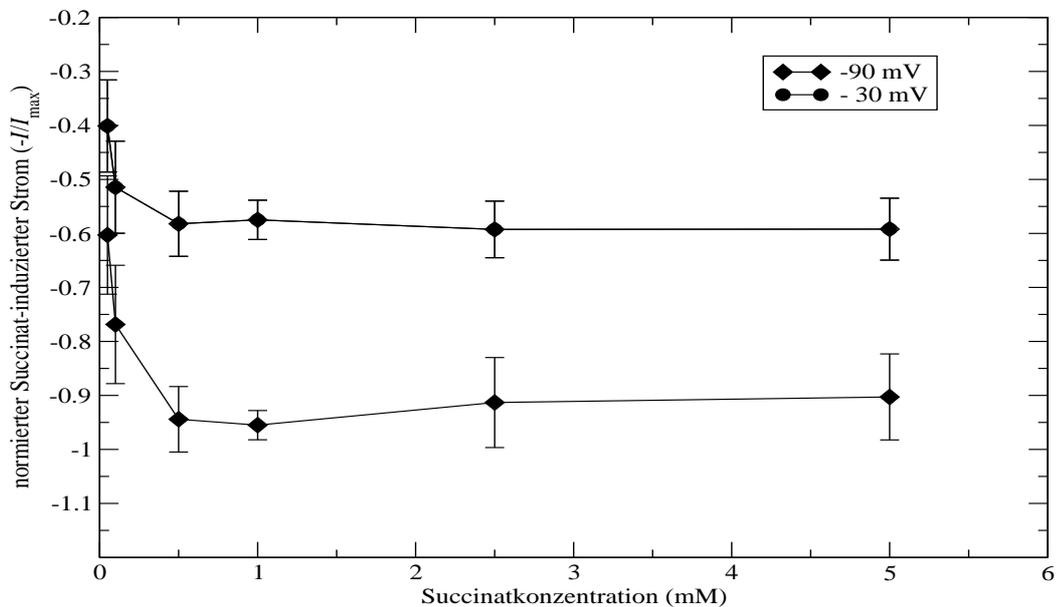


Abbildung 3.9: Konzentrationsabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms (Mutante). Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung des normierten Succinat-induzierten Stroms der Mutante bei den Klemmpotentialen -90 mV und -30 mV. Der Succinat-induzierte Strom zeigt ein Sättigungsverhalten (n=10/5).

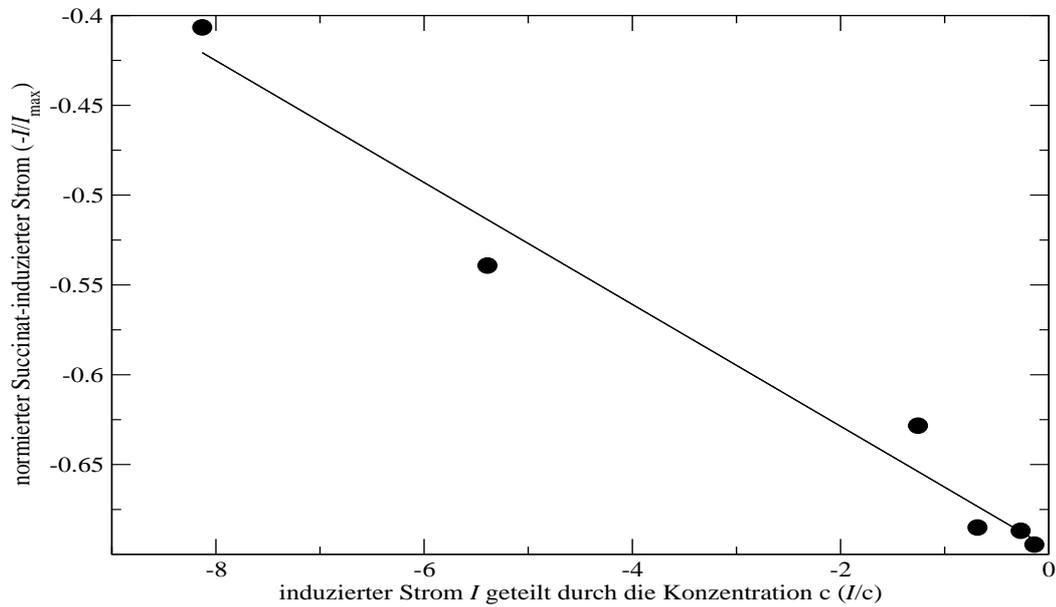


Abbildung 3.10: Eadie-Hofstee-Auftragung von Succinat-induzierten Strömen (Wildtyp). Die Eadie-Hofstee-Auftragung der Mittelwerte der Succinat-induzierten Ströme des Wildtyps ergab eine Gerade. Damit sind unterschiedliche Halbsättigungskonstanten für die zwei Succinatbindungsstellen unwahrscheinlich ($n=6/4$).

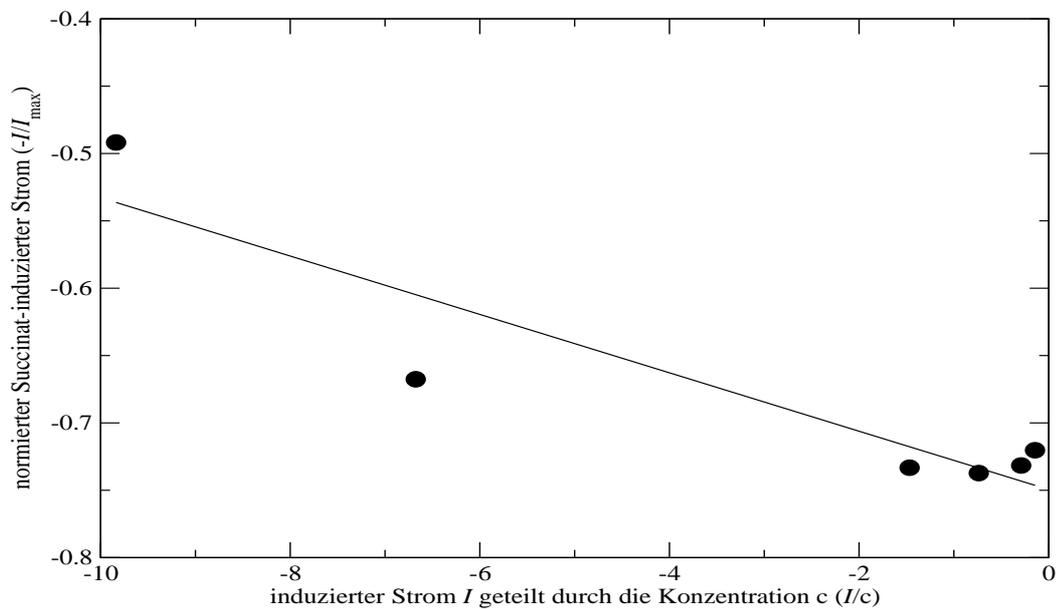


Abbildung 3.11: Eadie-Hofstee-Auftragung von Succinat-induzierten Strömen (Mutante). Die Eadie-Hofstee-Auftragung der Mittelwerte der Succinat-induzierten Ströme der Mutante ist weniger aussagekräftig als die Auftragung für den Wildtyp. Es wurde aber eine sehr ähnliche Halbsättigungskonstante für Succinat im Vergleich zum Wildtyp bestimmt ($n=10/5$).

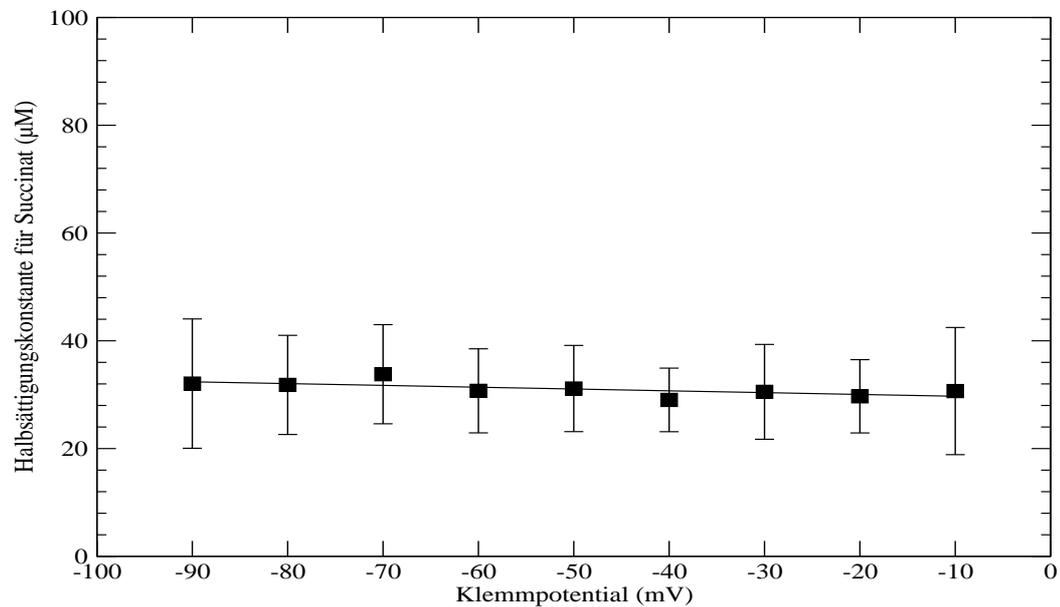


Abbildung 3.12: Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten von Succinat (Wildtyp). Die Halbsättigungskonstante des Wildtyps für Succinat wurde an 6 Oozyten von fünf Fröschen gemessen. Sie liegt bei etwa $30 \mu\text{M}$ und ist weitgehend unabhängig vom Klemmpotential, ($n=6/5$).

3.2.5 Halbsättigungskonstante für Succinat

Die Halbsättigungskonstante für Succinat wurde für neun Klemmpotentiale von -90 mV bis -10 mV bestimmt. Experimente wurden an 6 Oozyten von 4 Spendertieren für den Wildtyp und an 10 Oozyten von 5 Spendertieren für die Mutante durchgeführt. Für den Wildtyp lag die Halbsättigungskonstante bei $29 \pm 7 \mu\text{M}$ bei einem Klemmpotential von -60 mV . Die Halbsättigungskonstante der Mutante war vergleichbar mit einem Wert von $22 \pm 13 \mu\text{M}$. Unter der Annahme, dass die Halbsättigungskonstanten des Wildtyps und der Mutante gleich sind, ergibt die zweiseitige Teststatistik nach Wilcoxon für ein Klemmpotential von -60 mV einen p-Wert von 0,65. Damit ist das Ergebnis nicht statistisch signifikant. Sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante war bei den Versuchen keine Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten für Succinat zu erkennen. Auch bei Betrachtung der einzelnen Oozyten war eine Zunahme der Halbsättigungskonstanten bei Depolarisation genauso wahrscheinlich wie eine Abnahme der Halbsättigungskonstanten. Abbildungen 3.12 und 3.13 zeigen die Halbsättigungskonstanten des Wildtyps und der Mutante im Potentialverlauf. Auffällig waren die stärkeren Messwert-schwankungen bei der Mutante. Da dies die ersten Experimente waren, die ich durchgeführt habe, liegen diese Schwankungen wahrscheinlich an meiner noch geringen Erfahrung zu diesem frühen Zeitpunkt. Unabhängig davon hat die von Steffgen durchgeführte Mutation keinen Einfluss auf die Affinität des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters aus der Flunderniere für Succinat.

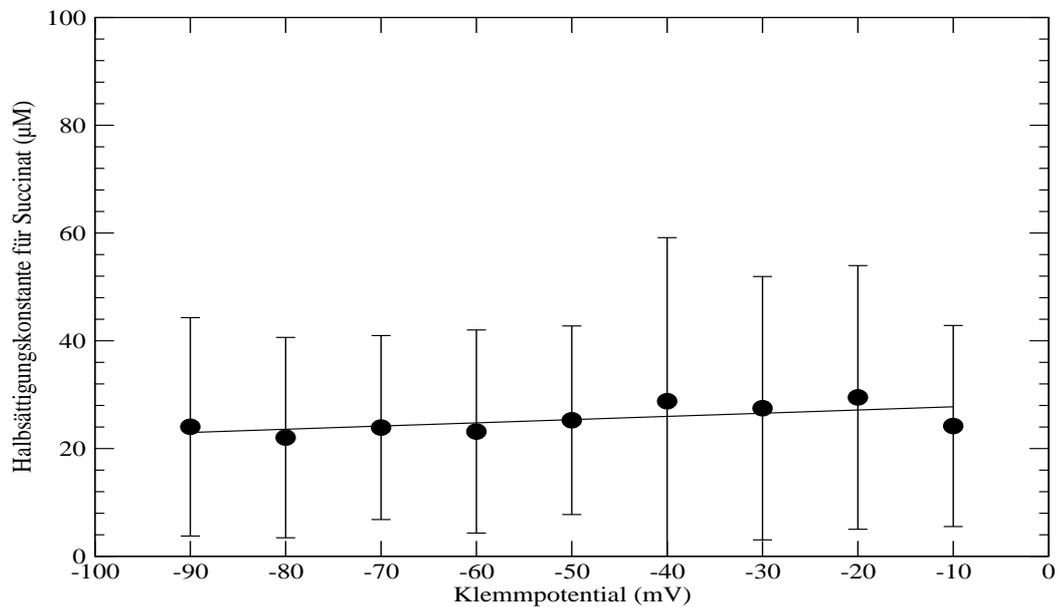


Abbildung 3.13: Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten von Succinat (Mutante). Die Halbsättigungskonstante der Mutante für Succinat wurde an 10 Oozyten von fünf Fröschen gemessen. Sie liegt bei etwa $22 \mu\text{M}$ und ist weitgehend unabhängig vom Klemmpotential, ($n=10/5$).

3.2.6 Halbsättigungskonstante für Succinat im Beisein von Lithium

An vier Oozyten des Wildtyps wurde bei einem Klemmpotential von -60 mV die Halbsättigungskonstante für Succinat unter 110 mM Natrium in Abwesenheit von Lithium als auch unter 110 mM Natrium im Beisein von 1 mM Lithium gemessen. Die Succinatkonzentrationen der Versuchslösungen waren $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$, $1000 \mu\text{M}$ und $5000 \mu\text{M}$. Diese Messung an einer Oozyte ermöglicht den direkten Vergleich zwischen der Halbsättigungskonstante von Succinat ohne und in Anwesenheit von Lithium und erlaubt auch kleinere Veränderungen zu messen. Allerdings ist es dann nicht mehr möglich, jeweils den Succinat-induzierten Strom bei neun Klemmpotentialen zu bestimmen. Da die Halbsättigungskonstante für Succinat potentialunabhängig ist, wären durch solche Experimente nicht wesentlich mehr Informationen zu erwarten. Es wird darauf verzichtet, den sehr ähnlichen potential- und konzentrationsabhängigen Verlauf des Succinat-induzierten Stroms zu zeigen. Qualitativ war das Beisein von Lithium bei den Strom-Spannungs- und Konzentrationsabhängigkeiten nicht zu erkennen. Abbildung 3.14 zeigt die gepaarten Halbsättigungskonstanten der vier Oozyten von 4 Fröschen. Bei drei der gemessenen Oozyten wurde eine leichte Abnahme der Halbsättigungskonstante beobachtet, bei einer Oozyte hingegen eine Zunahme. Die Anwendung des Wilcoxon Test für gepaarte Stichproben ergibt einen p-Wert von $0,125$. Damit ist das Ergebnis nicht statistisch signifikant. Das Beisein von 1 mM Lithium hatte also nur einen geringen Einfluss auf die Halbsättigungskonstante von Succinat.

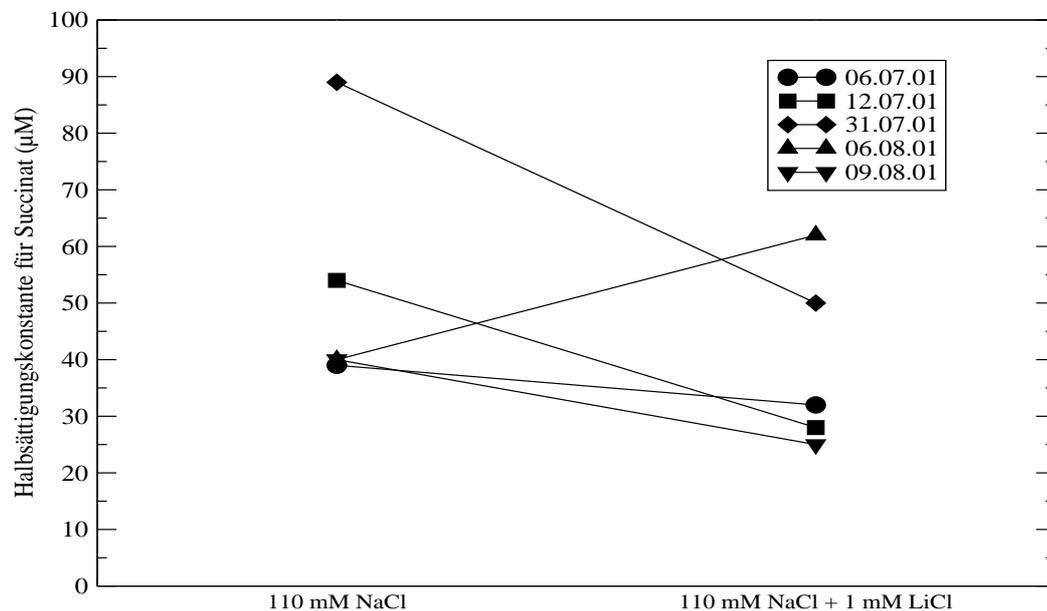


Abbildung 3.14: Succinat-Halbsättigungskonstante mit und ohne 1 mM LiCl. Die Halbsättigungskonstante für Succinat wurde an vier Oozyten von vier Fröschen bei einem Klemmpotential von -60 mV sowohl ohne als auch mit 1 mM LiCl bestimmt. Bei drei der Oozyten ist eine Abnahme der Halbsättigungskonstanten zu beobachten ($p=0,125$, $n=4/4$).

3.2.7 Zusammenfassung

Die Halbsättigungskonstante für Succinat betrug beim Wildtyp $29 \pm 7 \mu\text{M}$ und $22 \pm 13 \mu\text{M}$ für die Mutante. Wie erwartet, wurde keine Potentialabhängigkeit dieser Halbsättigungskonstanten beobachtet. Die von Steffgen entwickelte Mutante unterscheidet sich im Hinblick auf die untersuchten Transporteigenschaften für Succinat nicht vom Wildtyp.

Beim Wildtyp wurde auch untersucht, ob 1 mM Lithium die Halbsättigungskonstante für Succinat bei einem Klemmpotential von -60 mV verändert. Dazu wurde die Halbsättigungskonstante für Succinat an derselben Oozyte mit und ohne 1 mM Lithium bestimmt. Bei drei der vier gemessenen Oozyten wurde eine leichte Abnahme der Halbsättigungskonstanten beobachtet. Dieser Unterschied war nicht groß und statistisch nicht signifikant ($p=0,125$). 1 mM Lithium hat also nur einen sehr geringen Einfluss auf die Affinität des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters für Succinat.

3.3 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat-induzierte Ströme

Da die Mutante sich in Hinblick auf die Transporteigenschaften von Succinat nicht vom Wildtyp unterschied und kein Unterschied der Transporteigenschaften von 2,2- oder 2,3-Dimethylsuccinat zu erwarten war, wurden die Transporteigenschaften von 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat nur beim Wildtyp bestimmt.

3.3.1 Wasser-injizierte Oozyten

Für die Experimente mit 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat wurden jeweils vier mit Wasser injizierte Oozyten von vier Fröschen untersucht. Abbildungen 3.15 und 3.16 zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichung der Dimethylsuccinat-induzierten Ströme bei jeweils 500 μM 2,2- bzw. 2,3-Dimethylsuccinat. Bei beiden Substanzen war der Substrat-induzierte Strom bei allen Konzentrationen und Klemmpotentialen etwa Null. Die Schwankungen waren bei niedrigen Klemmpotentialen höher und Auswärtsströme häufiger. Eine Korrektur der Dimethylsuccinat-induzierten Ströme war bei den mit cRNS injizierten Oozyten aufgrund der hohen Abweichungen nicht sinnvoll. Zum Vergleich ist in den Abbildungen 3.15 und 3.16 der mittlere durch 500 μM 2,2- bzw. 2,3-Dimethylsuccinat induzierte Strom aufgezeichnet.

3.3.2 Potentialabhängigkeit Dimethylsuccinat-induzierter Ströme

Um bei der Bestimmung der durch 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat induzierten Ströme nur wenige Strom-Spannungskennlinien mit gesättigtem Dimethylsuccinat-induziertem Strom durchzuführen, wurden vorläufige Halbsättigungskonstanten für 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat bestimmt. Dafür wurde die folgende Konzentrationsreihe verwendet: 0,1 mM - 0,5 mM - 1 mM - 5 mM. Die so bestimmte Halbsättigungskonstante bei einem Klemmpotential von -60 mV war 21 μM für 2,2- und 56 μM für 2,3-Dimethylsuccinat. Die Konzentrationsreihe für die eigentlichen Experimente war 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 500 μM für 2,2-Dimethylsuccinat und 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM und 500 μM für 2,3-Dimethylsuccinat.

Abbildung 3.17 zeigt den normierten, durch 2,2-Dimethylsuccinat induzierten Strom der drei gemessenen Oozyten von drei Fröschen in Abhängigkeit vom Klemmpotential. Der maximale durch 2,2- bzw. 2,3-Dimethylsuccinat induzierte Strom wurde zur Vereinfachung des Vergleiches normiert. Gezeigt werden zwei Konzentrationen: 10 μM (offene Symbole) und 500 μM (geschlossene Symbole). Die lineare Abnahme des induzierten Stroms bei Depolarisation wurde bei allen Oozyten beobachtet und ist vergleichbar mit der Abnahme beim Succinat-induzierten Strom. Abbildung 3.18 zeigt den normierten durch 2,3-Dimethylsuccinat induzierten Strom von den vier gemessenen Oozyten von 3 Fröschen im Potentialverlauf. Auch hier ist eine lineare Abnahme des induzierten Stroms bei Depolarisation zu erkennen.

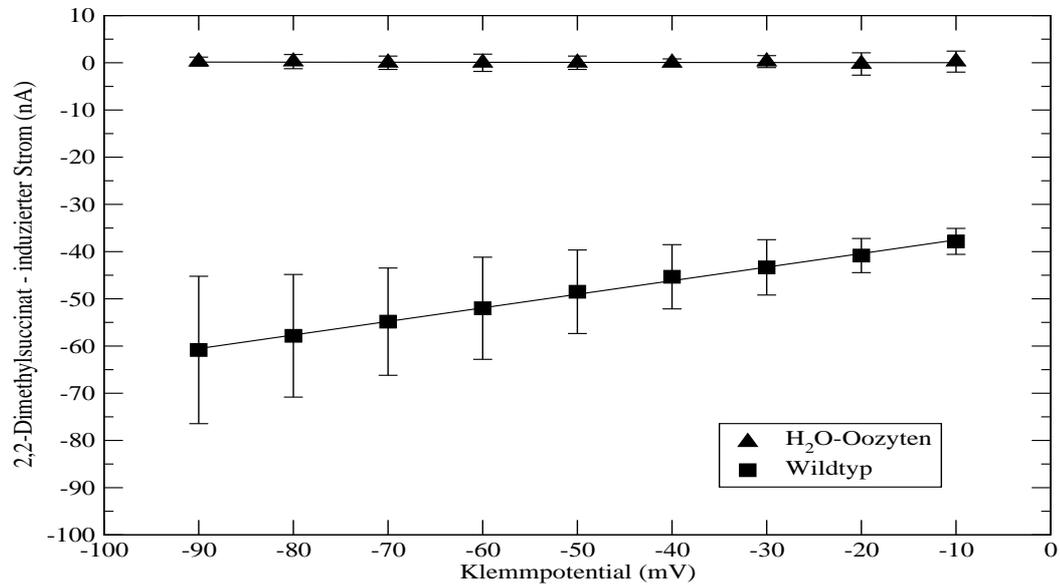


Abbildung 3.15: Strom-Spannungskennlinie von 2,2-Dimethylsuccinat für H₂O-Oozyten. Der durch eine maximale 2,2-Dimethylsuccinat-Konzentration von 0,5 mM induzierte Strom (Dreiecke) ist etwa Null. Alle anderen 2,2-Dimethylsuccinat-Konzentrationen haben eine vergleichbare Strom-Spannungskennlinie (n=4/4). Zum Vergleich ist der mittlere durch 0,5 mM 2,2-Dimethylsuccinat induzierte Strom (Quadrate) mit Standardabweichung gezeigt (n=3/3).

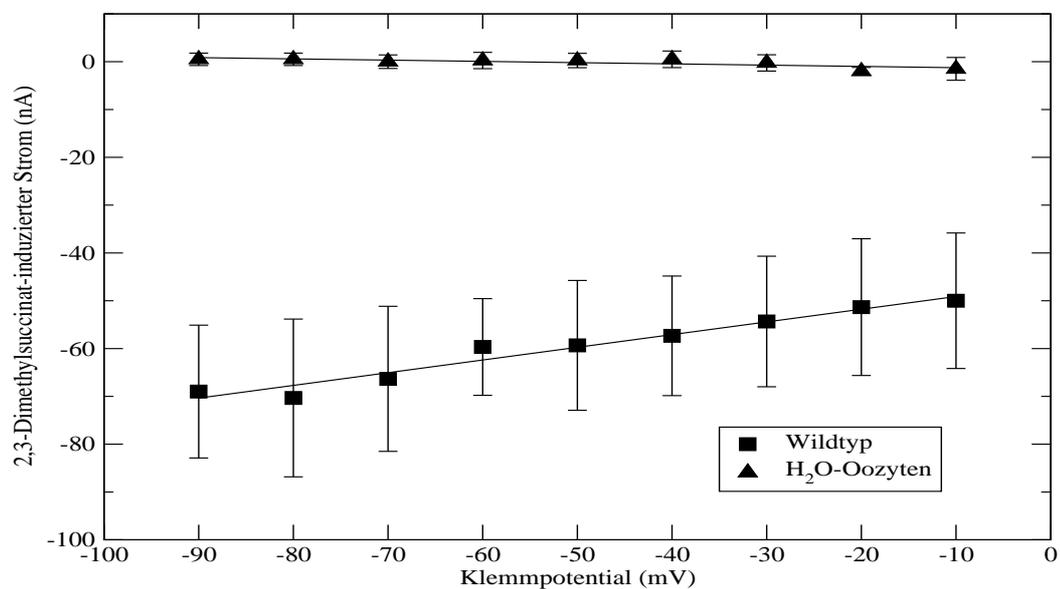


Abbildung 3.16: Strom-Spannungskennlinie von 2,3-Dimethylsuccinat für H₂O-Oozyten. Der durch eine maximale 2,3-Dimethylsuccinat-Konzentration von 0,5 mM induzierte Strom (Dreiecke) ist etwa Null. Alle anderen 2,3-Dimethylsuccinat-Konzentrationen haben eine vergleichbare Strom-Spannungskennlinie (n=4/4). Zum Vergleich ist der mittlere durch 0,5 mM 2,3-Dimethylsuccinat induzierte Strom (Quadrate) mit Standardabweichung gezeigt (n=4/3).

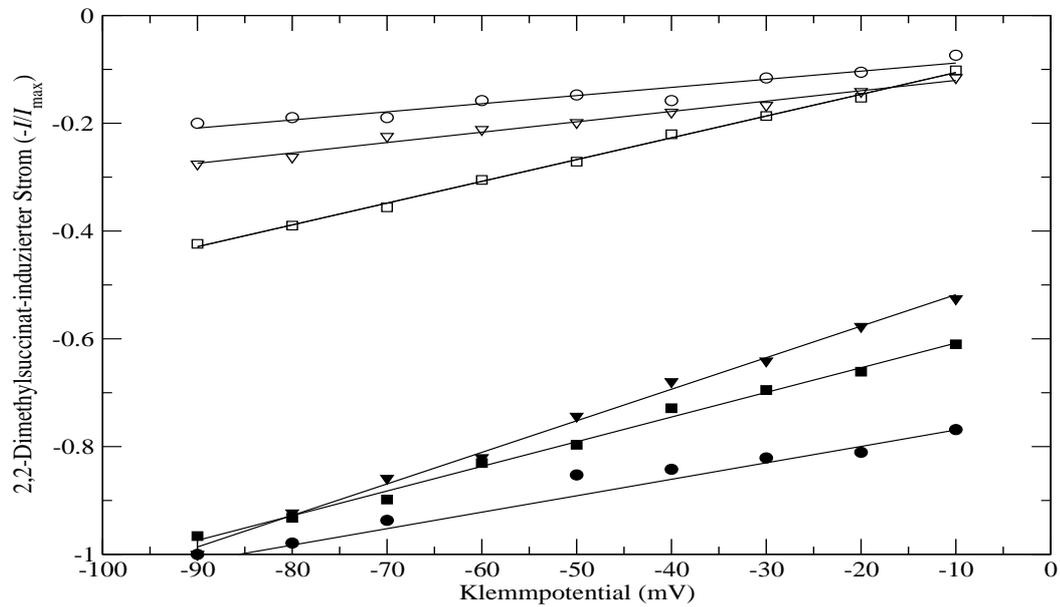


Abbildung 3.17: Strom-Spannungskennlinie von 2,2-Dimethylsuccinat. Bei Depolarisation nimmt der (normierte) 2,2-Dimethylsuccinat-induzierte Strom ab. Beispielhaft sind die Konzentrationen $5 \mu\text{M}$ (offene) und $500 \mu\text{M}$ (geschlossene Symbole) abgebildet. Gleiche Symbole zeigen Messdaten derselben Oozyte ($n=3/3$).

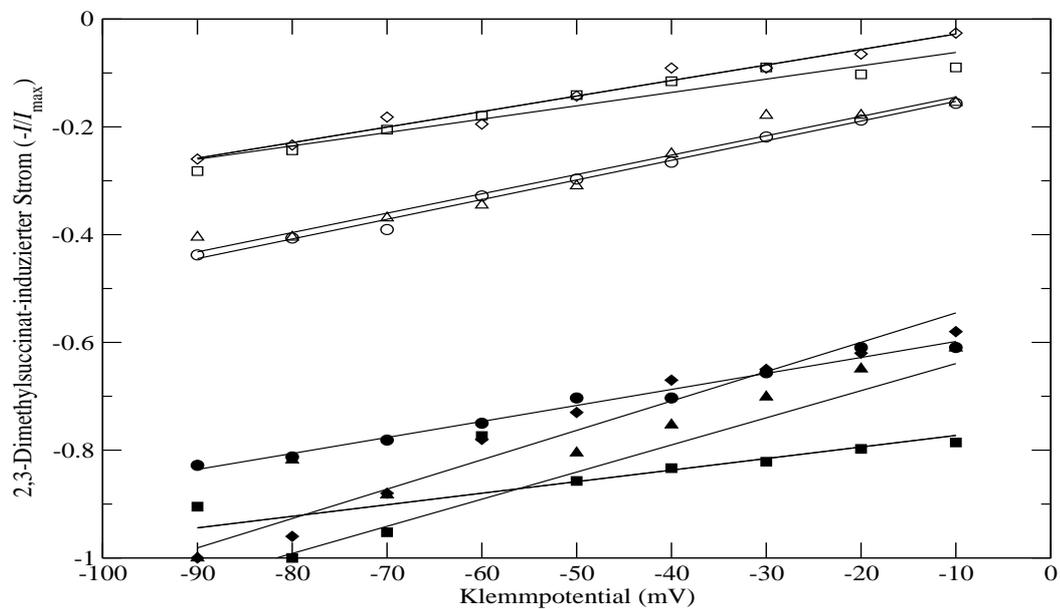


Abbildung 3.18: Strom-Spannungskennlinie von 2,3-Dimethylsuccinat. Bei Depolarisation nimmt der (normierte) 2,3-Dimethylsuccinat-induzierte Strom ab. Beispielhaft werden die Konzentrationen $10 \mu\text{M}$ (offene) und $500 \mu\text{M}$ (geschlossene) Symbole abgebildet. Gleiche Symbole zeigen Messdaten derselben Oozyte ($n=4/3$).

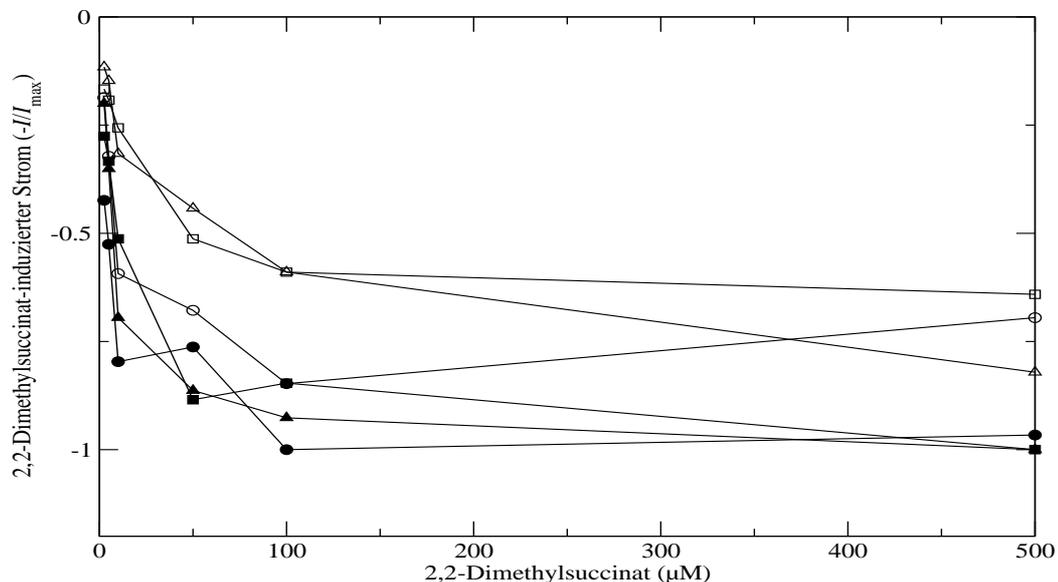


Abbildung 3.19: Konzentrationsabhängigkeit des 2,2-Dimethylsuccinat-induzierten Stroms. Der durch 2,2-Dimethylsuccinat induzierte Strom erreicht ein Maximum oberhalb einer Konzentration von 100 μM . Gleiche Symbole zeigen Messdaten derselben Oozyte. Offene Symbole entsprechen einem Klemmpotential von -30 mV und geschlossene einem von -90 mV ($n=3/3$).

3.3.3 Konzentrationsabhängigkeit Dimethylsuccinat-induzierter Ströme

Abbildungen 3.19 und 3.20 zeigen den normierten durch 2,2- bzw. 2,3-Dimethylsuccinat induzierten Strom in Abhängigkeit von der DMS-Konzentration. Gezeigt werden die Klemmpotentiale: -30 mV (offene) und -90 mV (geschlossene Symbole). Die Messwerte der einzelnen Oozyten sind durch die Art des Symbols (Kreis, Quadrat etc.) dargestellt. Erkennbar ist, dass nach einer raschen Zunahme des induzierten Stroms bei niedrigen Konzentrationen beider Substanzen bei weiterer Steigerung der Konzentration keine weitere Steigerung des induzierten Stroms erreicht wurde.

3.3.4 Eadie-Hofstee-Diagramme

Abbildungen 3.21 und 3.22 zeigen exemplarisch die Eadie-Hofstee-Auftragungen für 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat aller gemessenen Oozyten bei einem Klemmpotential von -60 mV. Die dazugehörigen Halbsättigungskonstanten sind in den Abbildungen eingetragen. Für 2,2-Dimethylsuccinat liegen die aufgetragenen Punkte bei allen drei Oozyten in der Nähe der Regressionsgeraden. Bei 2,3-Dimethylsuccinat sind die Abweichungen etwas größer, ohne dass eine Systematik in den Abweichungen zu erkennen ist. Für beide Substanzen gilt, dass die Eadie-Hofstee-Diagramme für die anderen Klemmpotentiale ähnlich sind. Abweichungen

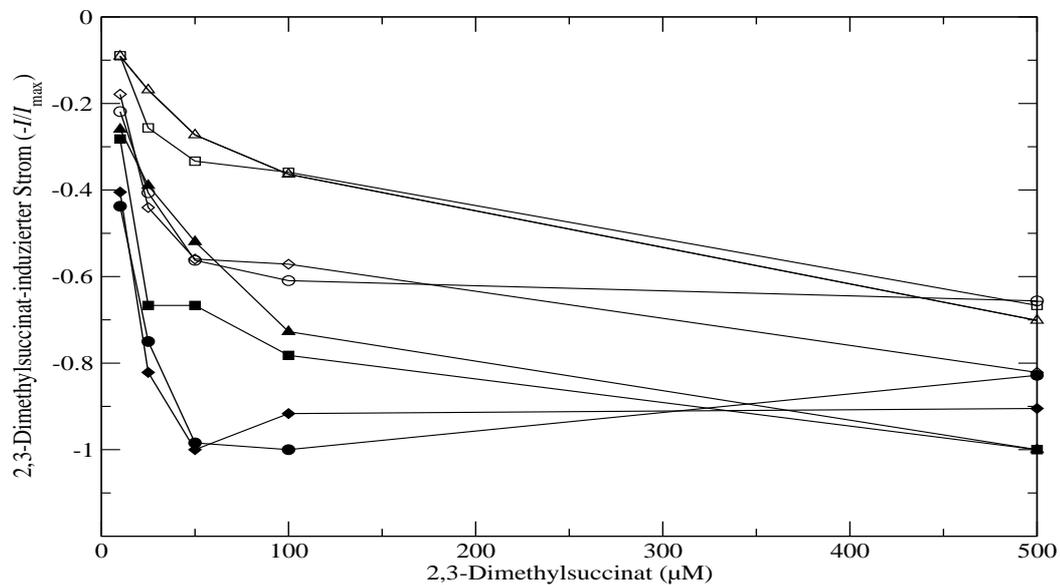


Abbildung 3.20: Konzentrationsabhängigkeit des 2,3-Dimethylsuccinat-induzierten Stroms. Der durch 2,3-Dimethylsuccinat induzierte Strom erreicht ein Maximum oberhalb einer Konzentration von 100 μM . Gleiche Symbole zeigen Messdaten derselben Oozyte. Offene Symbole entsprechen einem Klemmpotential von -30 mV und geschlossene einem von -90 mV. Zur Vereinfachung der Abbildung wurde der Strom normiert ($n=4/3$).

nehmen bei niedrigeren Klemmpotentialen geringfügig zu (Daten nicht gezeigt). Diese Graphen sprechen nicht gegen die Annahme einer (einigen) Bindungsstelle für 2,2- bzw. 2,3-Dimethylsuccinat.

3.3.5 Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten

Die Halbsättigungskonstanten von 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat wurden mit Hilfe von Eadie-Hofstee-Auftragungen bestimmt. Während es für 2,2-Dimethylsuccinat keinen Hinweis auf eine potentialabhängige Änderung der Affinität gibt, wurde bei allen vier Oozyten bei 2,3-Dimethylsuccinat eine Abnahme der Affinität bei Depolarisation beobachtet (Abbildungen 3.23 und 3.24). Die Affinität des Transporters ist für 2,2-Dimethylsuccinat in allen gemessenen Oozyten höher als für 2,3-Dimethylsuccinat. Bei einem Klemmpotential von -60 mV beträgt die Halbsättigungskonstante für 2,2-Dimethylsuccinat $7 \pm 3 \mu\text{M}$. Für 2,3-Dimethylsuccinat war die Bestimmung weniger präzise mit $32 \pm 25 \mu\text{M}$.

Die Hypothese für die Signifikanzberechnung nach dem Wilcoxon-Test lautet, dass die Halbsättigungskonstanten gleich sind. Beim zweiseitigen Test für Succinat im Vergleich zu 2,3-Dimethylsuccinat bei einem Klemmpotential von -60 mV beträgt der p-Wert 0,5, für Succinat im Vergleich zu 2,2-Dimethylsuccinat 0,01 und für 2,2-Dimethylsuccinat im Vergleich zu

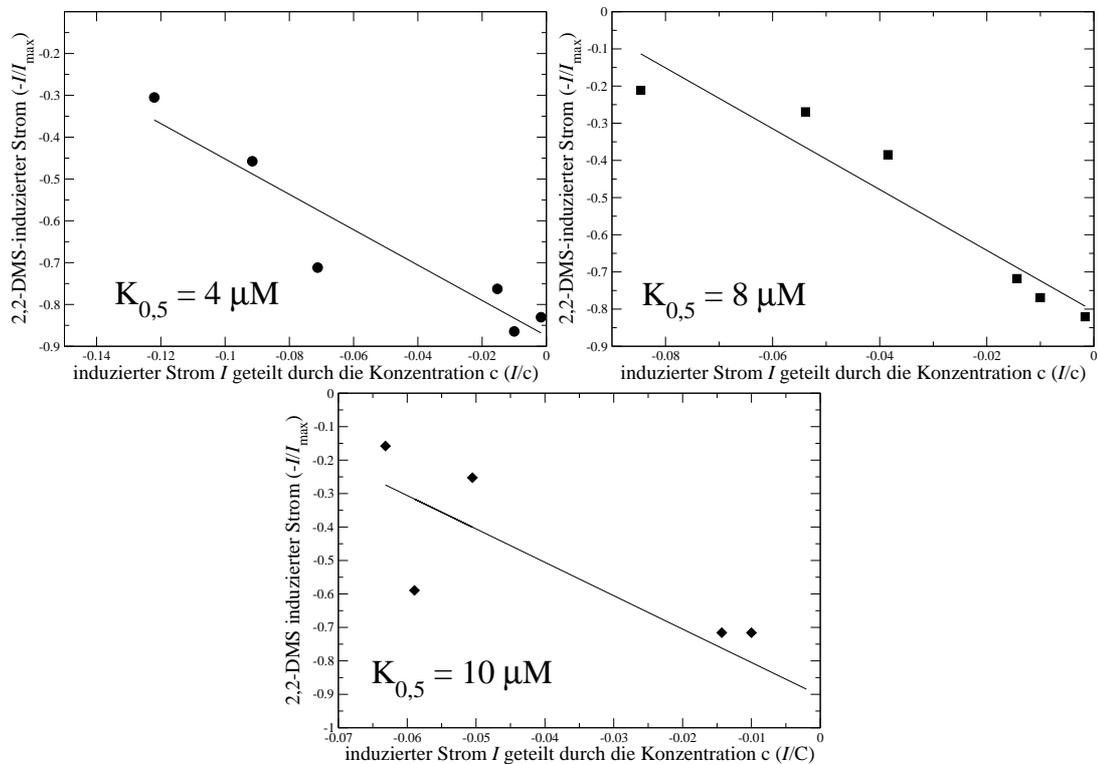


Abbildung 3.21: Eadie-Hofstee-Diagramme für 2,2-Dimethylsuccinat. Eadie-Hofstee-Diagramme für 2,2-Dimethylsuccinat von drei gemessenen Oozyten bei einem Klemmpotential von -60 mV .

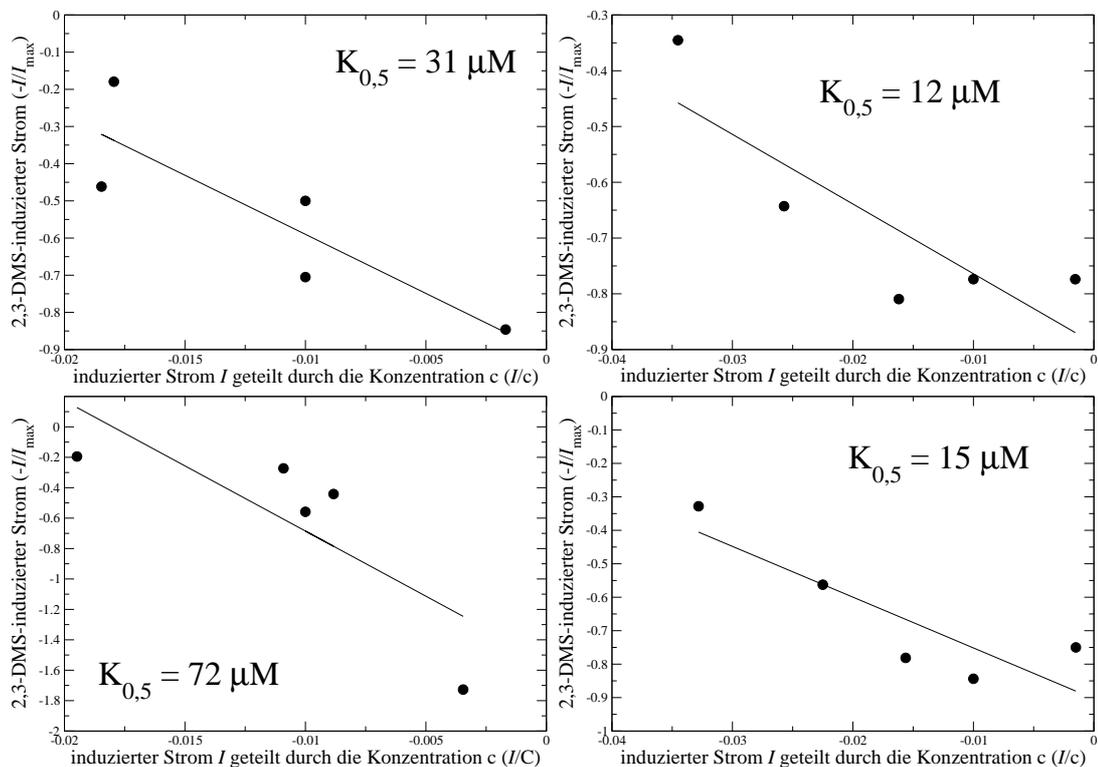


Abbildung 3.22: Eadie-Hofstee-Diagramme für 2,3-Dimethylsuccinat. Eadie-Hofstee-Diagramme für 2,3-Dimethylsuccinat von vier gemessenen Oozyten bei einem Klemmpotential von -60 mV .

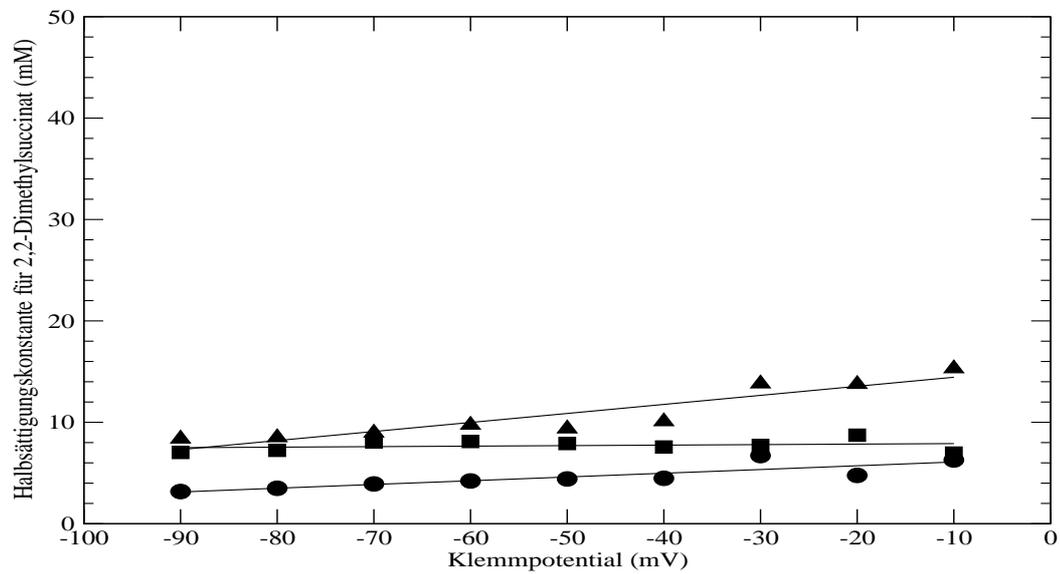


Abbildung 3.23: Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten von 2,2-Dimethylsuccinat. Die Halbsättigungskonstante für 2,2-Dimethylsuccinat ist vom Klemmpotential weitgehend unabhängig. Die unterschiedlichen Symbole entsprechen unterschiedlichen Oozyten ($n=3/3$).

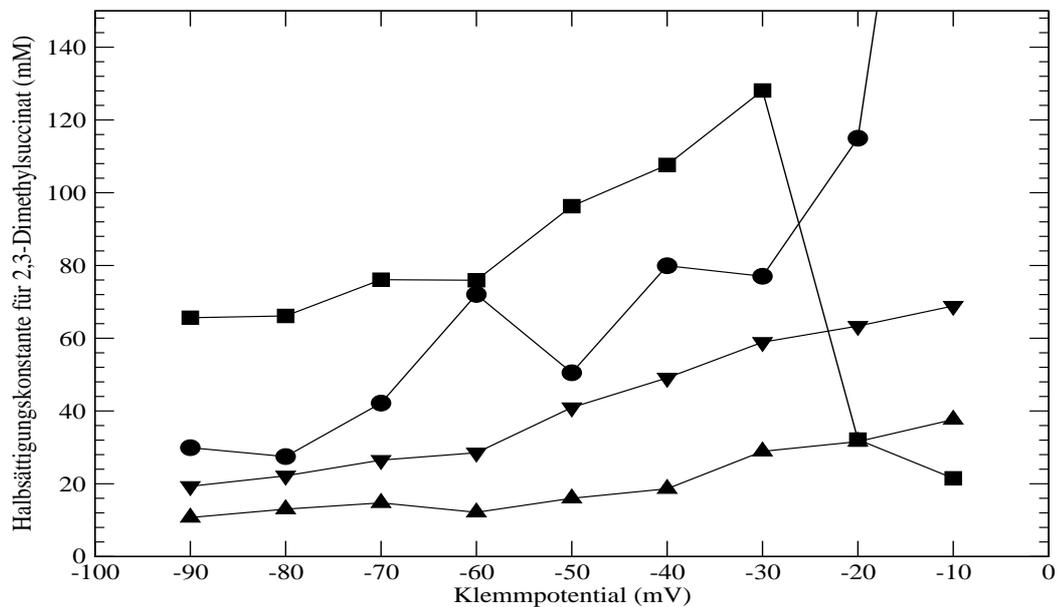


Abbildung 3.24: Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten von 2,3-Dimethylsuccinat. Die Halbsättigungskonstante für 2,3-Dimethylsuccinat steigt bei Depolarisation. Die unterschiedlichen Symbole entsprechen unterschiedlichen Oozyten. Zwei Oozyten zeigen größere Schwankungen ($n=4/3$).

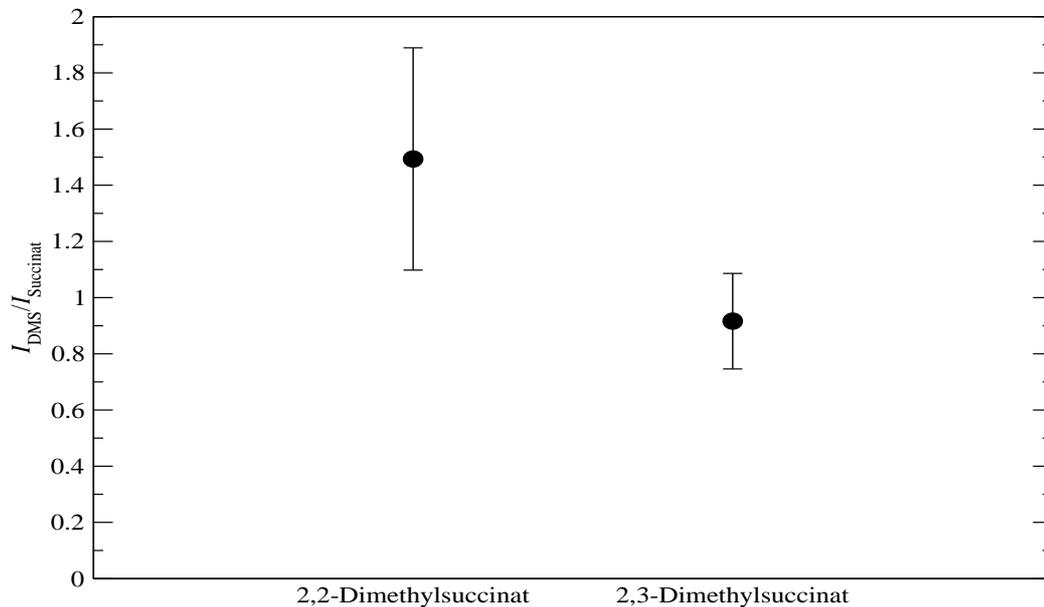


Abbildung 3.25: Maximaler induzierter Strom durch 2,2-, 2,3-Dimethylsuccinat und Succinat. Der maximale durch 2,3-Dimethylsuccinat-induzierte Strom entspricht etwa dem von Succinat. Bei 2,2-Dimethylsuccinat wurde ein etwa 30 Prozent höherer maximaler induzierter Strom beobachtet ($p=0,04$). Der Succinat-induzierte Strom der jeweiligen Oozyte wurde gleich 1 gesetzt. Das Klemmpotential ist -90 mV.

2,3-Dimethylsuccinat 0,017. Die p -Werte für die anderen gemessenen Klemmpotentiale sind ähnlich. Die Halbsättigungskonstante für 2,2-Dimethylsuccinat ist also (statistisch signifikant) niedriger als die für Succinat und 2,3-Dimethylsuccinat.

3.3.6 Vergleich der maximalen Transportraten

Der maximale Substrat-induzierte Strom entspricht der maximalen Transportgeschwindigkeit des Kotransporters. Für 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat wurde dieser maximale Strom mit dem durch 1 mM Succinat induzierten Strom verglichen. 2,3-Dimethylsuccinat hat einen vergleichbaren Sättigungsstrom, während 2,2-Dimethylsuccinat bei allen angelegten Potentialen etwa 30 Prozent höher ist (Abbildung 3.25). Die Berechnung der Teststatistik nach Wilcoxon ergibt einen p -Wert von 0,04. Damit ist das Ergebnis statistisch signifikant.

3.3.7 Zusammenfassung

Die Transporteigenschaften des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters für 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat wurden untersucht. 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat unterscheiden sich darin,

an welchem Kohlenstoffatom die zweite Methylgruppe angebracht ist. Dieser Unterschied führt im Vergleich zu Succinat nicht zu einem qualitativen Unterschied der Potentialabhängigkeit des Substrat-induzierten Stroms. Allerdings wird die Affinität des Transporters und die maximale Transportrate verändert. Die Affinität für 2,2-Dimethylsuccinat war mit der Halbsättigungskonstanten von $7 \pm 3 \mu\text{M}$ deutlich größer als für 2,3-Dimethylsuccinat ($32 \pm 25 \mu\text{M}$) oder Succinat ($29 \pm 7 \mu\text{M}$). Die Halbsättigungskonstanten von Succinat und 2,2-Dimethylsuccinat sind unabhängig vom Klemmpotential, während die Halbsättigungskonstante von 2,3-Dimethylsuccinat bei Depolarisation zunimmt. Der maximale induzierte Strom war bei 2,2-Dimethylsuccinat etwa 30 % größer als bei Succinat oder 2,3-Dimethylsuccinat.

3.4 Hemmung der Succinatantwort durch Lithium

Bei vielen der Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter wird der Succinattransport durch Lithium gehemmt. Die apparente Inhibitionskonstante für Lithium beträgt für den fNaC3 $0,67 \pm 11 \text{ mM}$ (Burckhardt BC et al. 2000). Von der entwickelten Mutante (Steffgen 2000) wurde erwartet, dass sie weniger stark durch Lithium gehemmt wird. Um dies zu untersuchen, wurde die Succinatantwort (1 mM Succinat) in Abhängigkeit von der Lithiumkonzentration bestimmt. Hierzu wurde der Succinat-induzierte Strom bei sechs verschiedenen Lithiumchloridkonzentrationen (0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM) gemessen. Außerdem wurde der Reststrom nach maximaler Hemmung durch 20 mM Lithium, sowie die Potentialabhängigkeit der apparenten Inhibitionskonstanten zwischen Wildtyp und Mutante verglichen.

3.4.1 Wasser-injizierte Oozyten

Die Experimente zur Lithiumabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms wurden an sechs mit Wasser injizierten Oozyten von fünf Fröschen durchgeführt. Bei gleichbleibender Succinatkonzentration wurden aufsteigend 6 verschiedene Lithiumchloridkonzentrationen bei neun Klemmpotentialen untersucht. Abbildung 3.26 zeigt den Mittelwert mit Standardabweichung des Succinat-induzierten Stroms im Beisein von 20 mM Lithium. Auch bei geringeren Lithiumkonzentrationen beträgt der induzierte Strom bei allen Klemmpotentialen ungefähr 0 nA. Eine Korrektur der Messwerte der mit cRNS injizierten Oozyten war deswegen unnötig. Als Beispiel ist der Succinat-induzierte Strom bei 20 mM Lithium bei einer Oozyte des Wildtyps aufgetragen.

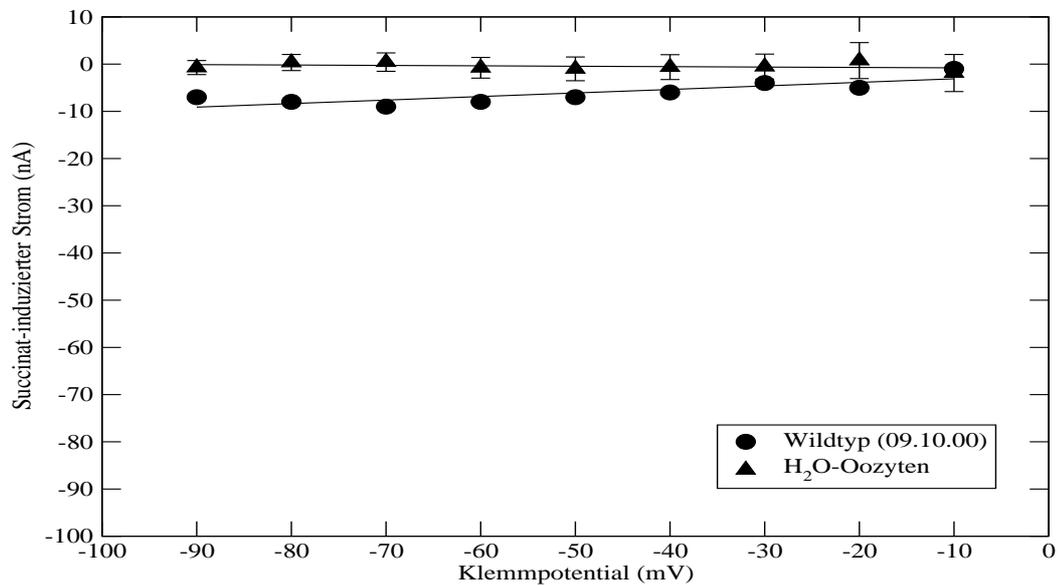


Abbildung 3.26: I-V-Kennlinien von Succinat im Beisein von LiCl (H₂O-Oozyten). 1 mM Succinat im Beisein von 20 mM Lithium induziert bei mit Wasser injizierten Oozyten keinen Strom. Niedrigere Lithiumkonzentrationen verhielten sich ähnlich. Zum Vergleich ist eine Messung an einem Wildtyp gezeigt, wo der Succinat-induzierte Strom im Beisein von 20 mM Lithium aufgezeichnet wurde. Niedrigere Lithiumkonzentration verursachen beim Wildtyp vom Betrag höhere Ströme (n=6/5).

3.4.2 Reststrom bei maximaler Hemmung durch Lithiumchlorid

Die Hemmung des Succinat-induzierten Stroms durch Lithium beim fNaCl3 war auch bei sehr hoher Lithiumkonzentration nicht vollständig. Gemessen wurde an 8 (Wildtyp) bzw 11 (Mutante) Oozyten von 6 bzw. 7 Fröschen. Bei 20 mM Lithiumchlorid wurden noch etwa 20 % der Succinatantwort ohne Lithium gemessen. Im Vergleich zu 10 mM Lithiumchlorid führte 20 mM nur zu einer geringfügig größeren Hemmung, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Lithium nicht in der Lage ist, die Succinatantwort komplett zu unterdrücken. Abbildung 3.27 zeigt die Succinatantwort im Beisein von 20 mM Lithium bei einem Klemmpotential von -60 mV als Anteil der Succinatantwort ohne Lithium für den Wildtyp und die Mutante. Bei der Mutante war die Streuung der Messwerte größer als beim Wildtyp. Ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die Sensitivität gegenüber Lithium zwischen der Mutante und dem Wildtyp war nicht zu erkennen ($p=0,07$).

3.4.3 Potentialabhängigkeit der Succinatantwort im Beisein von Lithium

Die Potentialabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms im Beisein von Lithium war bis auf die Höhe des induzierten Stroms vergleichbar mit der Succinatantwort ohne Lithium. Wie in

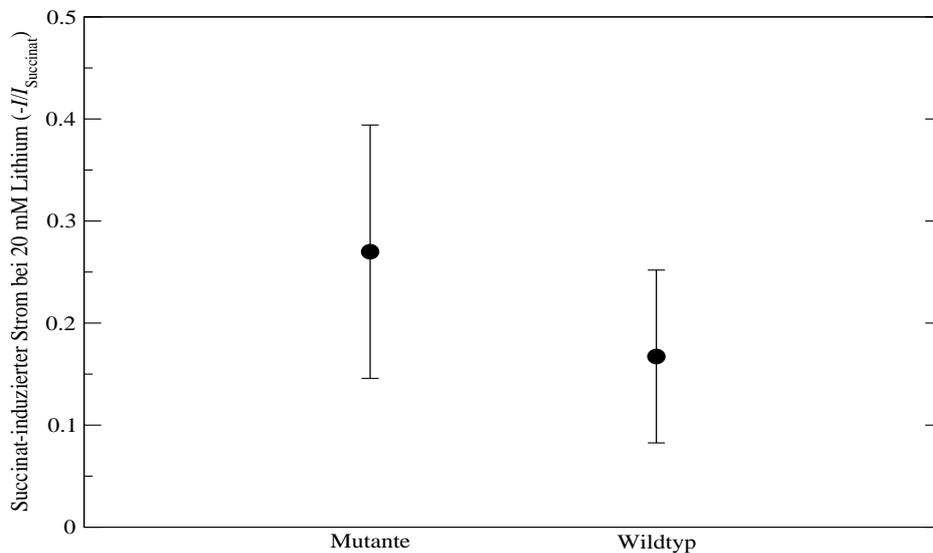


Abbildung 3.27: Reststrom bei maximaler Hemmung durch LiCl. Der Succinat-induzierte Strom bei 20 mM Lithiumchlorid beträgt etwa 20 % des Stroms in Abwesenheit von Lithiumchlorid ohne (statistisch) relevanten Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante. Der durch 1 mM Succinat induzierte Strom jeder Oozyte ist gleich 1 gesetzt worden, abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung. Nicht abgebildet sind Wasser-injizierte Oozyten, bei denen der Strom mit und ohne LiCl ungefähr gleich ist (Wildtyp: n=6/4, Mutante: n=11/4).

den Abbildungen 3.28 (Wildtyp) und 3.29 (Mutante) zu erkennen ist, findet bei Depolarisation eine lineare Abnahme des Succinat-induzierten Stroms statt. Gezeigt wird der Potentialverlauf für den Succinat-induzierten Strom bei den Lithiumkonzentrationen 0,5 und 20 mM. Bei anderen Konzentrationen von Lithiumchlorid (ohne Abbildung) war der Verlauf des durch 1mM Succinat induzierten Stroms ähnlich. Bei Betrachtung dieser Succinat-induzierten Ströme war kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante zu sehen.

3.4.4 Succinatantwort in Abhängigkeit von der Lithiumkonzentration

Die Hemmung des Succinat-induzierten Stroms durch Lithium war von der Höhe der Lithiumkonzentration abhängig. Allerdings kam es nicht zu einer vollständigen Hemmung des Stroms durch Lithium. Abbildungen 3.30 und 3.31 zeigen diese Konzentrationsabhängigkeit für den Wildtyp bzw. die Mutante. Gezeigt wird der Succinat-induzierte Strom in Abhängigkeit der Lithiumkonzentration für die Klemmpotentiale -30 mV und -90 mV.

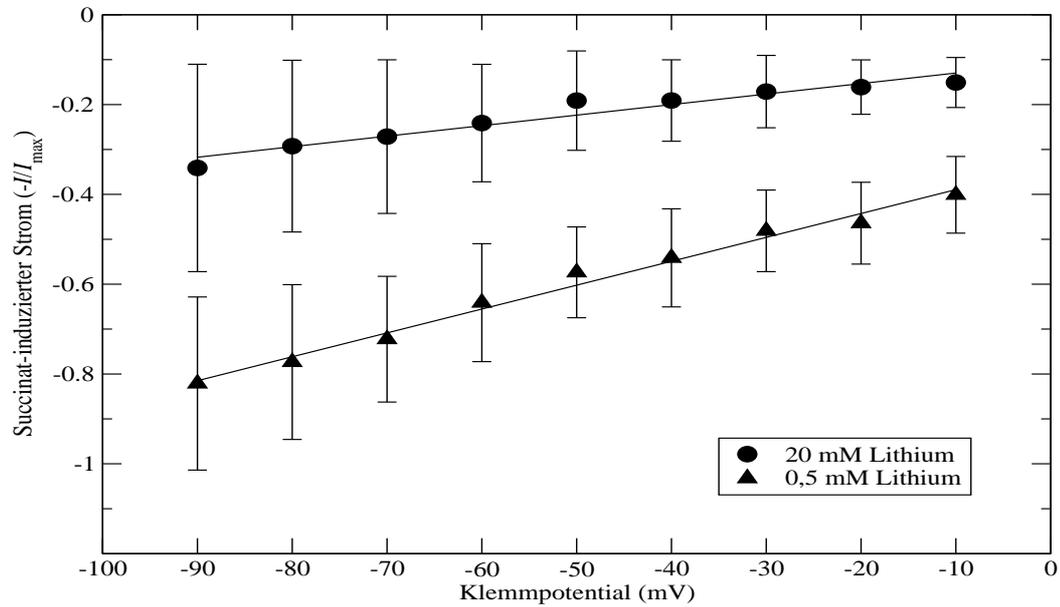


Abbildung 3.28: Succinat- I - V -Kennlinien unterschiedlicher LiCl-Konzentrationen (Wildtyp). Der durch 1 mM Succinat induzierte Strom im Beisein von 0,5 (Dreiecke) bzw. 20 mM Lithiumchlorid (Kreise) nimmt beim Wildtyp bei Depolarisation ab, ($n=6/4$).

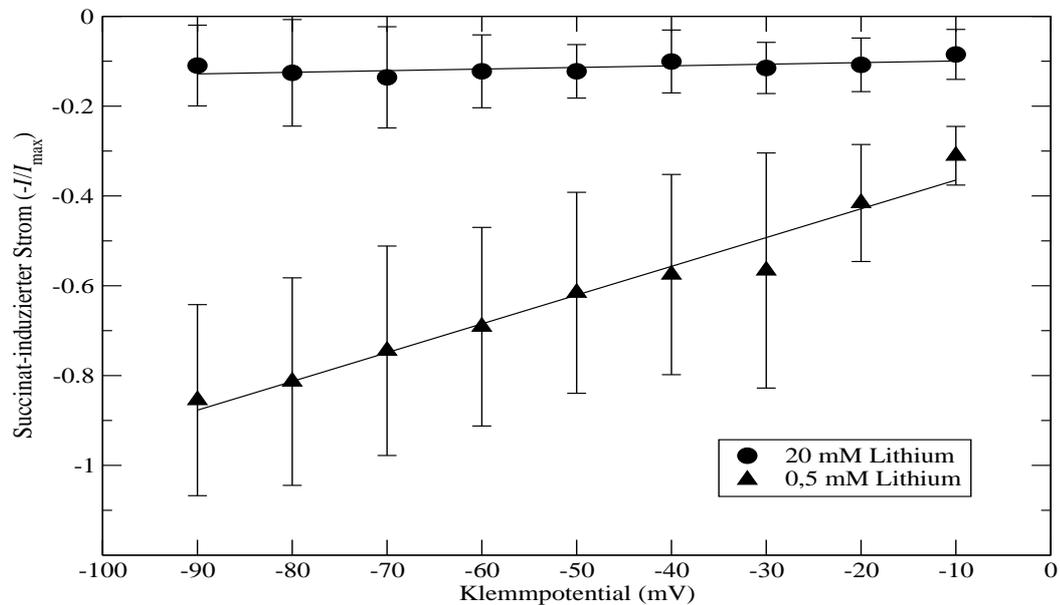


Abbildung 3.29: Succinat- I - V -Kennlinien unterschiedlicher LiCl-Konzentrationen (Mutante). Der durch 1 mM Succinat induzierte Strom im Beisein von 0,5 (Dreiecke) bzw. 20 mM Lithiumchlorid (Kreise) nimmt bei der Mutante bei Depolarisation ab. ($n=11/4$)

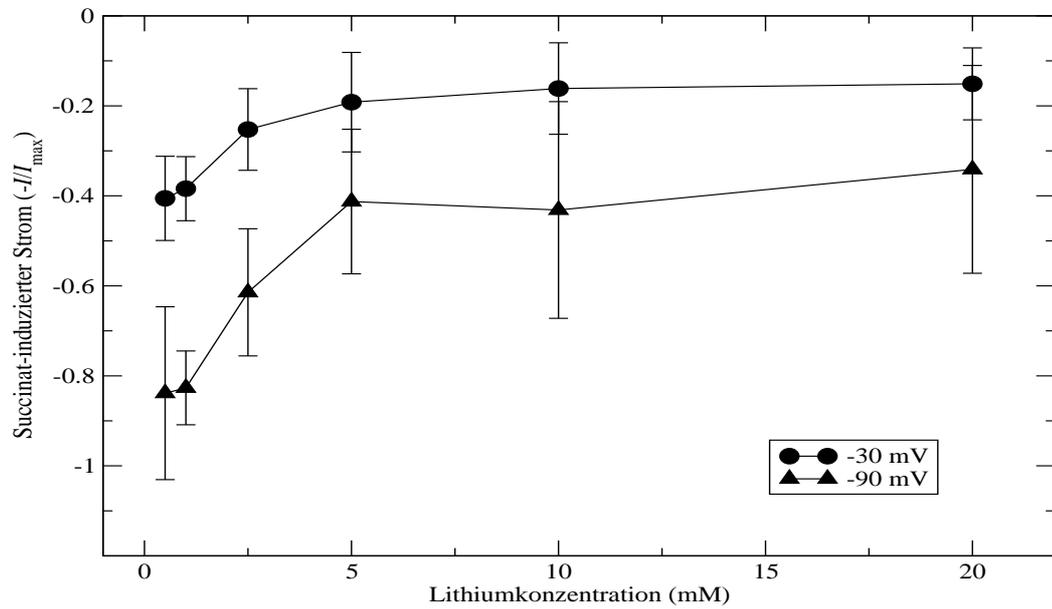


Abbildung 3.30: Succinat-induzierter Strom als Funktion der LiCl-Konzentration (Wildtyp). Steigende Lithiumkonzentrationen führen zu einer stärkeren Hemmung des durch 1 mM Succinat induzierten Stroms. Beispielhaft dargestellt sind die Succinat-induzierten Ströme bei -30 mV und -90 mV (n= 6/4).

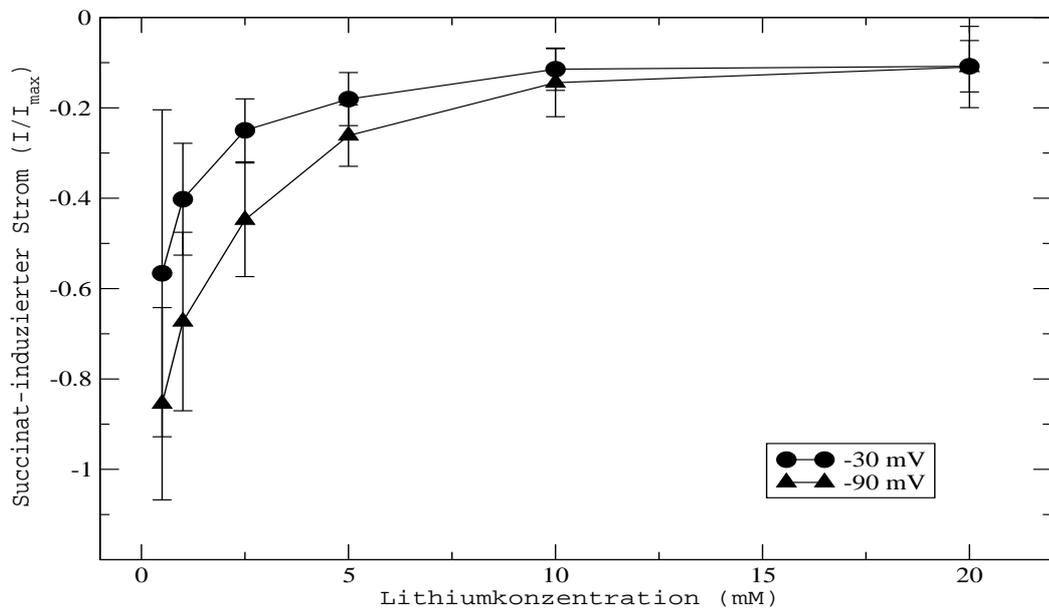


Abbildung 3.31: Succinat-induzierter Strom als Funktion der LiCl-Konzentration (Mutante). Steigende Lithiumkonzentrationen führen zu einer stärkeren Hemmung des durch 1 mM Succinat induzierten Stroms. Beispielhaft dargestellt sind die Succinat-induzierten Ströme bei -30 mV und -90 mV (n= 11/4).

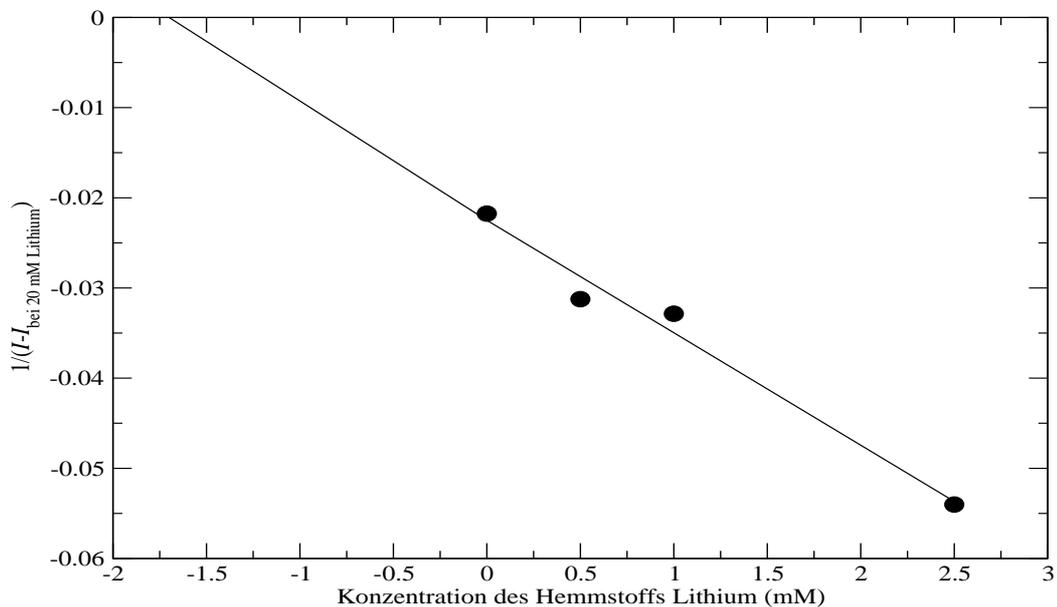


Abbildung 3.32: Dixon-Graph für den Wildtyp bei einem Klemmpotential von -60 mV. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x -Achse entspricht dem Negativen der apparenten Inhibitionskonstanten. Auf das Einzeichnen der Standardabweichungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet ($n=6/4$).

3.4.5 Dixon-Graphen

Anhand von Dixon-Graphen kann eine Inhibitionskonstante für einen Inhibitor bestimmt werden. Abbildungen 3.32 und 3.33 zeigen die Dixon-Graphen der Mittelwerte der Messwerte des Wildtyps bzw. der Mutante bei einem Klemmpotential von -60 mV. Der Kehrwert des Succinat-induzierten Stroms wurde nach Substraktion des induzierten Stroms bei 20 mM Lithium gegen die Konzentration von Lithium aufgetragen. Der negative Wert des Schnittpunktes der Regressionsgeraden mit der x -Achse entspricht der apparenten Inhibitionskonstanten (siehe Kapitel 2.6 auf Seite 15). Wegen der vielen Messreihen an mit cRNS injizierten Oozyten wurde darauf verzichtet, die Dixon-Graphen aller Messungen an (mit cRNS injizierten) Oozyten zu zeigen. Dixon-Graphen aller Oozyten bei neun unterschiedlichen Klemmpotentialen wurden ausgewertet und die Bestimmung aus jedem einzelnen Graphen ist in die Mittelwertberechnung eingeflossen. Abweichungen von den berechneten Regressionsgeraden in den Dixon-Graphen waren bei den Einzelmessungen zum Teil größer als in den Abbildungen 3.32 und 3.33. Häufig hatte der gemessene Strom bei 2,5 mM Lithium einen Einfluss auf die Lage der Regressionsgeraden. In der Regel wurde jedoch ein (fast) lineares Verhalten beobachtet, so dass die Anwendung nach Dixon gerechtfertigt war.

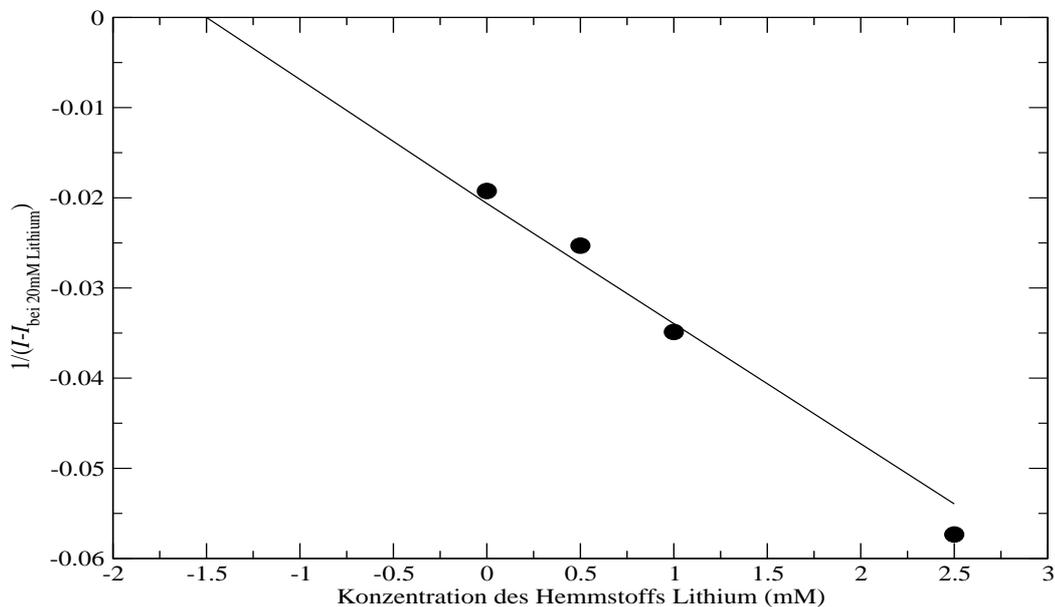


Abbildung 3.33: Dixon-Graph für die Mutante bei einem Klemmpotential von -60 mV. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x -Achse entspricht dem Negativen der apparenten Inhibitionskonstanten. Auf das Einzeichnen der Standardabweichungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet ($n=11/4$).

3.4.6 Potentialabhängigkeit der apparenten Inhibitionskonstanten für Lithium

Die Mittelwerte der apparenten Inhibitionskonstanten wurden aus den Inhibitionskonstanten berechnet, die in den Dixon-Graphen der (mit cRNS injizierten) Oozyten bestimmt wurden. Sowohl für die Mutante (Abbildung 3.35) als auch für den Wildtyp (Abbildung 3.34) war keine Potentialabhängigkeit dieser Inhibitionskonstanten zu erkennen. Die apparente Inhibitionskonstante für Lithium betrug bei einem Klemmpotential von -60 mV für die Mutante $1,4 \pm 0,6$ mM und für den Wildtyp $1,7 \pm 1,1$ mM. Die Teststatistik nach Wilcoxon ergab für den zweiseitigen Test bei einem Klemmpotential von -60 mV (bei der Annahme, dass die apparenten Inhibitionskonstanten gleich sind) einen p -Wert von 0,66. Die apparenten Inhibitionskonstanten waren damit nicht signifikant voneinander verschieden. Die durchgeführte Mutation hatte also keinen Einfluss auf die apparente Inhibitionskonstante von Lithiumchlorid beim Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter aus der Flunderniere.

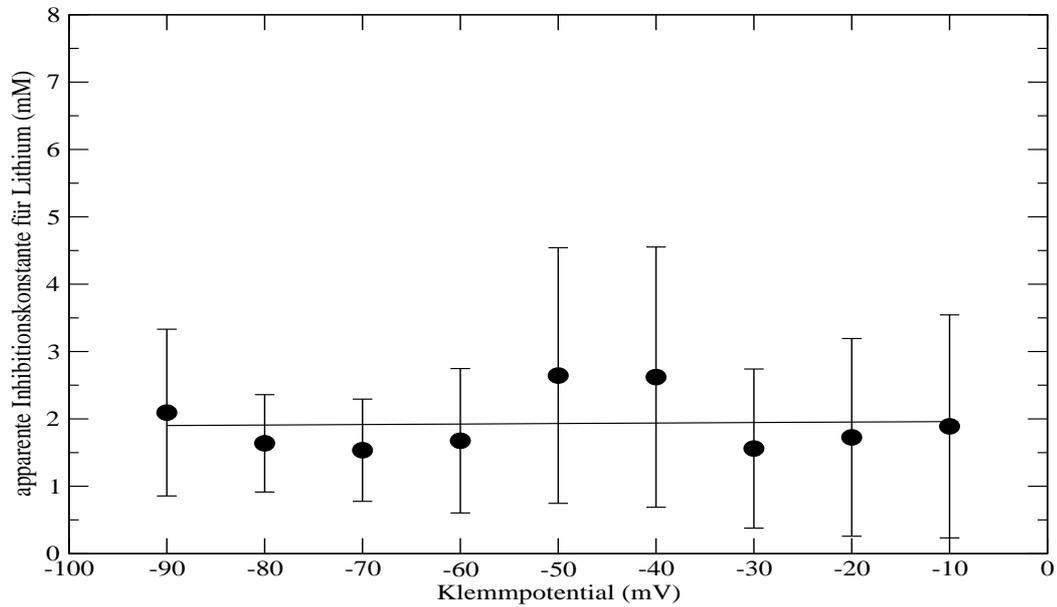


Abbildung 3.34: Potentialabhängigkeit der apparenten Inhibitionskonstanten von LiCl (Wildtyp). Die apparente Inhibitionskonstante des Wildtyps für Lithium liegt bei etwa 1,7 mM für das Substrat Succinat. Es ist keine Potentialabhängigkeit erkennbar (n=6/4).

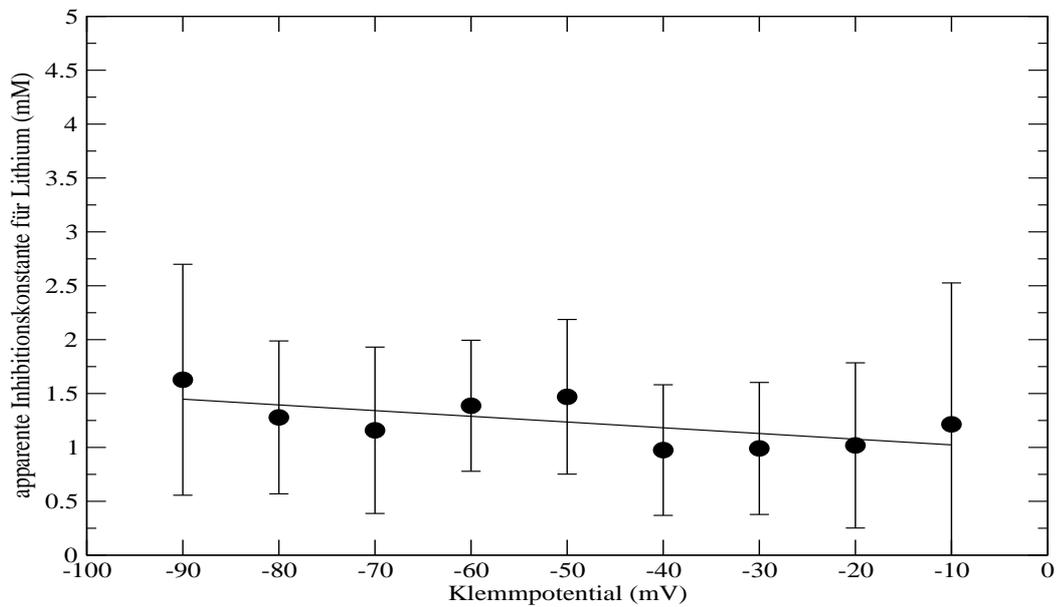


Abbildung 3.35: Potentialabhängigkeit der apparenten Inhibitionskonstanten von LiCl (Mutante). Die apparente Inhibitionskonstante der Mutante für Lithium im Beisein von 1 mM Succinat liegt bei etwa 1,4 mM. Es ist keine Potentialabhängigkeit erkennbar (n=11/4).

3.4.7 Zusammenfassung

Die Hemmung des Succinat-induzierten Stroms war bei niedriger Lithiumkonzentration von der Lithiumchloridkonzentration abhängig. Eine Konzentration von 20 mM Lithium führte allerdings nicht zu einer stärkeren Hemmung des Succinat-induzierten Stroms als eine Konzentration von 10 mM Lithium. Der Succinat-induzierte Strom betrug bei 20 mM Lithium etwa 20 % desjenigen ohne Lithium. Die apparente Inhibitionskonstante lag bei etwa 1,7 mM Lithium und war unabhängig vom Klemmpotential. Die Mutante unterschied sich weder im Reststrom nach Hemmung durch die maximale Lithiumkonzentration von 20 mM noch in der apparenten Inhibitionskonstanten statistisch signifikant vom Wildtyp.

3.5 Natrium-induzierte Ströme

Neben der Succinatbindungsstelle hat der Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter drei Natriumbindungsstellen. Die Affinität des Transporters für Natrium wurde elektrophysiologisch durch Burckhardt BC et al. (2000) auf etwa 18 mM bei einem Klemmpotential von -60 mV bestimmt. Ziel war es, die Lithiumempfindlichkeit der Halbsättigungskonstanten für Natrium zu untersuchen.

Eine Schwierigkeit bei der Bestimmung der Halbsättigungskonstanten für Natrium bestand darin, dass Schwankungen der Osmolarität je nach Größe dieser Veränderungen einen Einfluss auf die gemessenen (induzierten) Ströme haben konnten oder bei großen Osmolaritätsänderungen zum Verenden der Oozyten führen konnten. Natriumchlorid mit einer Konzentration von 110 mM ist Hauptbestandteil der natriumhaltigen Lösungen. Um große Osmolaritätsänderungen zu vermeiden, wurde das Natriumchlorid durch ein anderes Salz ersetzt. Um die Wirkung unterschiedlicher Natriumkonzentrationen zu messen, muss ein Kation verwendet werden, das nicht zu einem Transport über diese Membran führt. In dieser Arbeit wurde, wie auch bei Burckhardt BC et al. (2000), N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) verwendet. N-Methyl-D-Glucamin wird von den Oozyten allerdings nicht gut toleriert. Problematisch war vor allem der Wechsel von der 110-mM-Natrium-Lösung zur 110-mM-N-Methyl-D-Glucamin-Lösung. Häufig wurden starke Oszillationen des Klemmstroms beobachtet, die zum Absterben der Oozyten führten. Abbildungen 3.36 und 3.37 zeigen den typischen Verlauf des Klemmstroms nach dem Wechsel von einer natriumhaltigen ("Ori" in Tabelle 2.1) zu einer natriumfreien Lösung ("OriNMDG") bei einer Oozyte des Wildtyps (Abbildung 3.36) und einer H₂O-Oozyte (Abbildung 3.37). Innerhalb weniger Sekunden nach dem Wechsel zur natriumfreien Lösung ("OriNMDG") setzten bei beiden gezeigten Oozyten starke Oszillationen des Klemmstroms ein, die einen Wechsel zurück zur natriumhaltigen Lösung ("Ori") notwendig machten. Bei etwa 90% der Oozyten konnte der Spannungs-Klemmmodus nicht gehalten werden. Obwohl versucht wurde, die Messreihe an 16 Oozyten durchzuführen, konnte sie nur an einer Oozyte beendet werden. Bei allen anderen Oozyten wurde der Wechsel zur natriumfreien Lösung

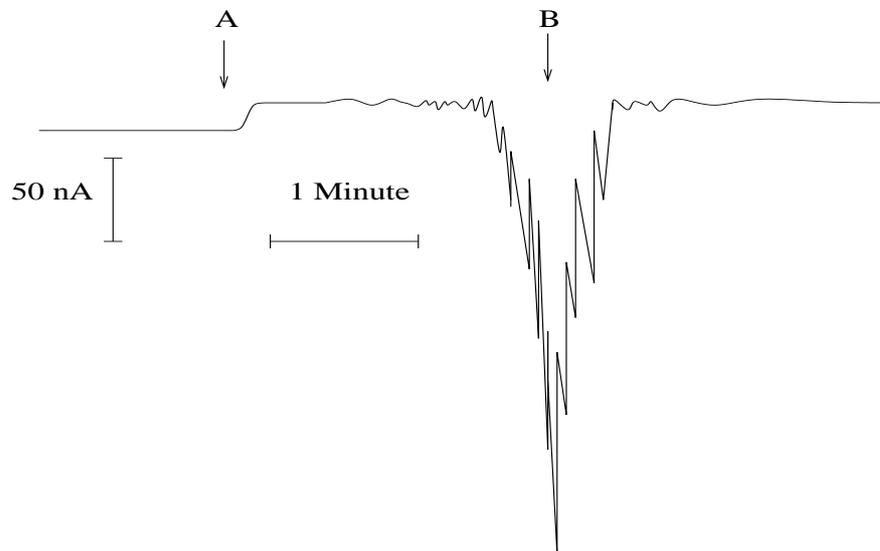


Abbildung 3.36: Klemmstromverlauf nach Wechsel zur natriumfreien Lösung (Wildtyp). Gezeigt ist der Verlauf des Klemmstroms nach dem Wechsel von der natriumhaltigen zur natriumfreien Lösung (“OriNMDG” aus Tabelle 2.1) bei Markierung A. Zunächst ist der induzierte Strom mit dem in Abbildung 3.3 vergleichbar. Allerdings beginnen bald starke Oszillationen des Klemmstroms, die einen Wechsel zurück zur natriumhaltigen Lösung (B) notwendig machen, wenn weiterhin das Klemmpotential bei -60 mV gehalten werden soll.

(“OriNMDG”) nicht toleriert, so dass keine Messreihe begonnen werden konnte. Wiederum tolerierte nur eine von 6 H₂O-Oozyten diesen Versuchsablauf. Daher habe ich versucht, die Halbsättigungskonstante für Natrium zu bestimmen, indem ich den induzierten Strom bei einer succinathaltigen Lösung mit geringerer Natriumkonzentration als bei der Lösung “Ori” mit dem induzierten Strom bei der gut tolerierten natriumhaltigen Lösung (“OriS” [mit Succinat] - siehe 2.1) zu vergleichen. Auswertbar ist ein solches Experiment zur Bestimmung der Halbsättigungskonstanten für Natrium nur, wenn man auch erfolgreich 110 mM Natrium mit 0 mM Natrium (110 mM N-Methyl-D-Glucamin) vergleichen kann. Eine einfache Umrechnung der induzierten Ströme erlaubt dann die Anwendung einer Eadie-Hofstee-Auftragung. Dieses Experiment wurde an drei Oozyten von drei Fröschen durchgeführt, allerdings schwankten die gemessenen Stromstärken sehr. Da die Bestimmung der Halbsättigungskonstanten schwierig und unzuverlässig war, wurde darauf verzichtet, die Halbsättigungskonstante im Beisein von Lithium zu bestimmen.

3.5.1 Voruntersuchung

Am 04.03.01 tolerierte eine Oozyte vom Wildtyp die natriumfreie Lösung (“OriNMDG”) und den Wechsel zu Lösungen mit unterschiedlichen Natriumkonzentrationen. Nach dem Wech-

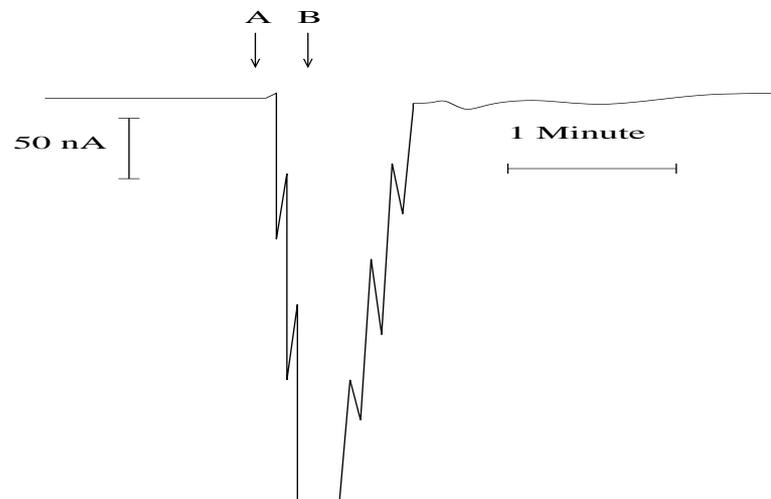


Abbildung 3.37: Klemmstromverlauf nach Wechsel zur natriumfreien Lösung (H₂O-Oozyte). Gezeigt ist der Verlauf des Klemmstroms nach dem Wechsel von der natriumhaltigen (“Ori” aus Tabelle 2.1) zur natriumfreien Lösung (“OriNMDG”) bei Markierung A. Bald nach Wechsel der Lösung beginnen starke Oszillationen des Klemmstroms, die einen Wechsel zurück zur natriumhaltigen Lösung (B) notwendig machen, wenn weiterhin das Klemmpotential bei -60 mV gehalten werden soll. Der kantige Verlauf des Klemmspannung kommt dadurch zustande, dass der Schreiber einen maximalen Klemmstrom von nur etwa 700 nA anzeigt.

sel von der natriumhaltigen (“Ori”) zur natriumfreien Lösung (“OriNMDG”) oszillierte der Klemmstrom über eine Stunde lang stark, wobei die Oozyte im Spannungs-Klemmmodus gehalten werden konnte. Schwankungen des Klemmstroms erschwerten das Ablesen des Klemmstroms aus dem Schreiber Ausdruck. Abbildung 3.38 zeigt die Werte für die aus dieser Messung bestimmte Halbsättigungskonstante für Natrium für die neun angelegten Klemmpotentiale.

Leider war dieses Experiment nicht reproduzierbar. Bei weiteren 15 Oozyten konnte nach dem Wechsel zur natriumfreien Lösung die Klemmspannung von -60 mV nicht gehalten werden. Deswegen wurde ein alternativer Versuchsaufbau gewählt. Die Oozyte wurde zu Ruhephasen und bei jeweils der ersten von zwei gemessenen Stromspannungskennlinien mit der natriumhaltigen Lösung umspült. Für die zweite Stromspannungskennlinie wurden Lösungen mit unterschiedlichen Natriumchloridkonzentrationen gewählt. Aus Osmolaritätsgründen wurde Natrium durch NMDG ersetzt. Die Versuchskonzentrationen von Natrium waren 87,5 mM, 55 mM, 27,5 mM, 11 mM, 0 mM. Zur Vergleichbarkeit mit anderen Experimenten und zur Anwendung einer Eadie-Hofstee-Auftragung wurde der durch das Fehlen von Natrium induzierte Strom in einen durch Natrium induzierten Strom umgerechnet. Dabei wurde für jede Natriumkonzentration die gemessene Stromdifferenz von der gemessenen Stromdifferenz bei 0 mM Natrium subtrahiert. Das Negative dieses Wertes entspricht einem Natrium-induzierten Strom, falls 110 mM Natrium eine Sättigungskonzentration ist. Da die Halbsättigungskonstante für Natrium elektrophysiologisch durch Burckhardt BC et al. (2000) bei einem Klemmpoten-

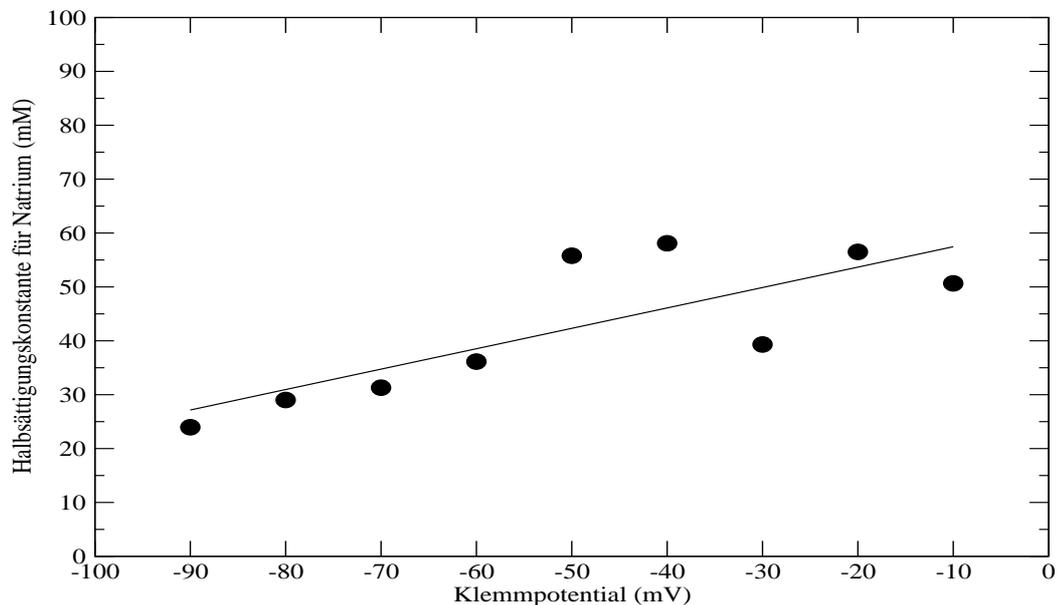


Abbildung 3.38: *I-V*-Kennlinie von Natrium gemessen im Vergleich zu natriumfreier Lösung. Potentialverlauf des Natrium-induzierten Stroms bei einer Oozyte, die die natriumfreie Lösung („OriNMDG“ nach Tabelle 2.1) toleriert hat.

tial von -60 mV auf 18 mM und durch Steffgen et al. (1999) mit Aufnahme-Experimenten auf 50 mM bestimmt wurden, ist es wahrscheinlich, daß bei 110 mM Natrium der maximale Natrium-induzierte Strom gemessen wurde.

3.5.2 H₂O-Oozyten

Nur eine von sechs mit Wasser injizierten Oozyten tolerierte die natriumfreie, N-methyl-D-Glucamin-haltige Lösung. Die Versuchsreihe, die mit 110 mM Natrium-Lösung verglichen wurde, wurde besser toleriert und konnte an drei von vier Oozyten durchgeführt werden. Im Vergleich zu den anderen H₂O-Experimenten fielen deutlich stärkere Schwankungen des Klemmstroms auf. Das Ablesen der Antworten war auch deshalb erschwert, weil der Klemmstrom häufig oszillierende Schwankungen von etwa 10 bis 15 nA aufwies. Bei denjenigen H₂O-Oozyten, die das NMDG nicht tolerierten, waren Schwankungen des Klemmstroms von über 100 nA zu beobachten, die zum Verenden der Oozyte führten. Abbildung 3.39 zeigt zwei Natriumkonzentrationen bei allen neun Klemmpotentialen. Eine systematische Korrektur der Messwerte der Oozyten vom Wildtyp war trotz der Tendenz zu induzierten Strömen um -5 nA bei niedrigen Natriumkonzentrationen auf Grund dieser starken Schwankungen nicht sinnvoll.

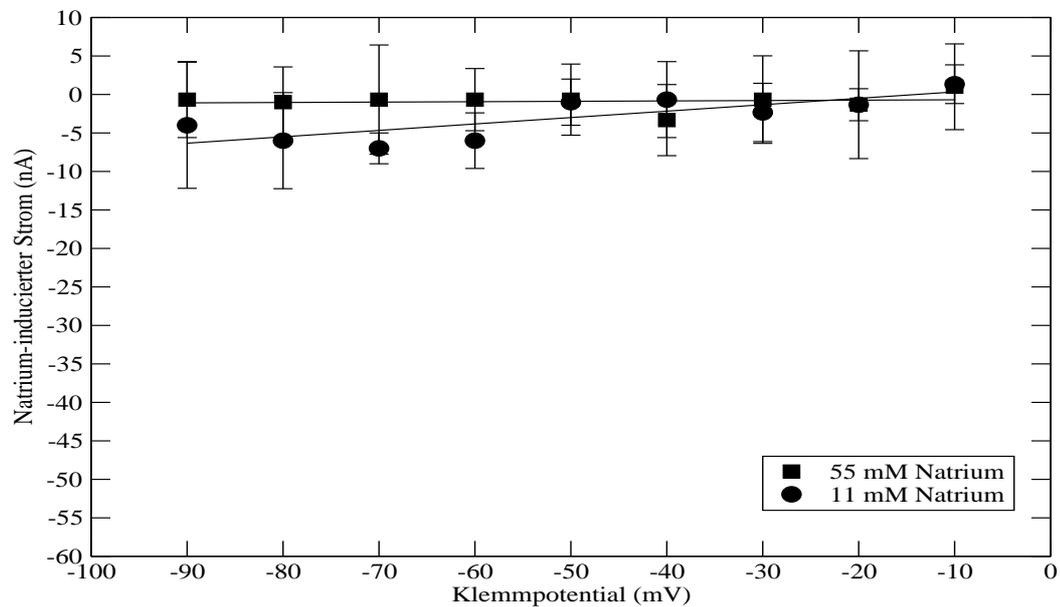


Abbildung 3.39: *I-V*-Kennlinie von Natrium gemessen im Vergleich zu 110 mM Natrium. Bei 3 Oozyten wurde erfolgreich eine absteigende Natriumkonzentrationsreihe im Vergleich zu 110 mM Natrium gemessen. Gezeigt sind die Konzentrationen 11 und 55 mM Natrium. Es wurden starke Schwankungen der Natriumantwort beobachtet ($n=3/3$).

3.5.3 Potentialabhängigkeit natriumabhängiger Ströme

Mit der soeben beschriebenen alternativen Versuchsanordnung konnten drei der vier begonnenen Messungen an den Oozyten vom Wildtyp beendet werden. Auch bei diesen Oozyten gab es bei niedrigeren Natriumkonzentrationen stärkere Oszillationen, die ein genaues Ablesen erschwerten. Alle Oozyten erreichten aber nach jeder Versuchskonzentration bei der Ruhephase wieder ihren alten Klemmstrom. Abbildung 3.40 zeigt die Natrium-induzierten Ströme für die Natriumkonzentrationen von 11 und 110 mM Natrium. Eine Abnahme des Natrium-induzierten Stroms bei Depolarisation war bei 110 mM Natrium bei allen Oozyten deutlich. Bei den nicht gezeigten Natriumkonzentrationen war eine solche Potentialabhängigkeit ebenfalls bei allen Oozyten zu erkennen. Nur bei 11 mM Natrium wurde dieses Verhalten bei drei der vier Oozyten nicht beobachtet. Dies kann an den stärkeren Schwankungen bei niedrigen induzierten Strömen liegen.

3.5.4 Konzentrationsabhängigkeit natriumabhängiger Ströme

Abbildung 3.41 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit des berechneten Natrium-induzierten Stroms für alle vier gemessenen Oozyten bei einem Klemmpotential von -60 mV. Der Natrium-

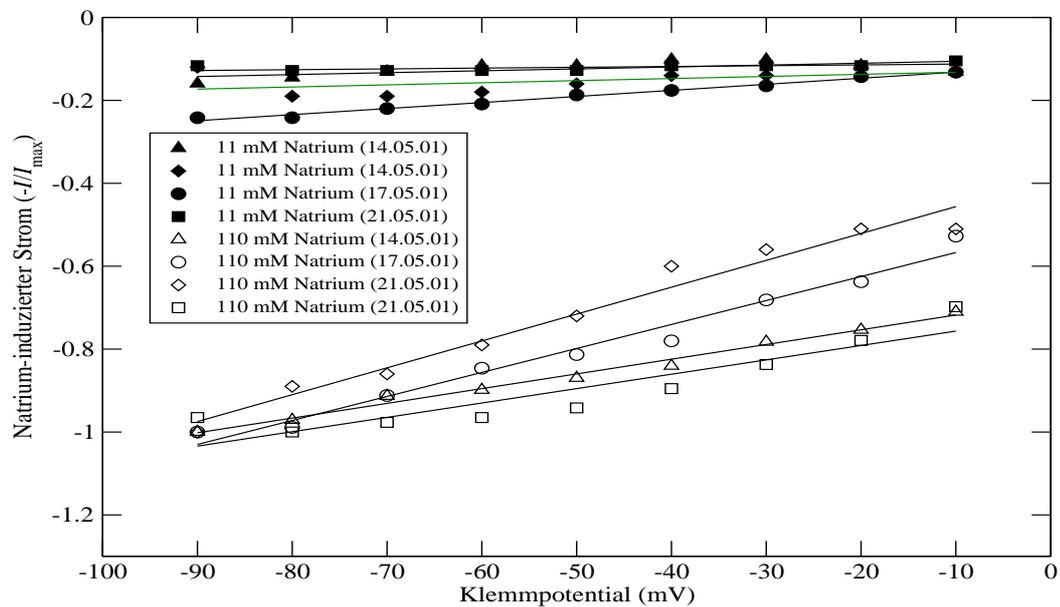


Abbildung 3.40: Succinat-mediierte Ströme bei zwei verschiedenen Natrium-Konzentrationen. An allen vier gemessenen Oozyten wird die Potentialabhängigkeit des Natrium-induzierten Stroms für 11 und 110 mM Natriumchlorid gezeigt. Diese Messwerte sind aus Experimenten mit absteigender Natriumkonzentration umgerechnet worden ($n=4/3$).

induzierter Strom ist bei allen Oozyten linear von der Natriumkonzentration abhängig. Auf Grund der Untersuchungen durch Burckhardt BC et al. (2000), die die Halbsättigungskonstante von Natrium auf knapp 20 mM bestimmten, ist ein maximaler Natrium-induzierter Strom spätestens bei der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von 87,5 mM Natrium zu erwarten. Es wurde jedoch von 11 mM Natrium bis 110 mM Natrium ein linearer Anstieg des Natrium-induzierten Stroms beobachtet. Demnach ist die Annahme falsch, dass bei 110 mM Natrium der maximale Natrium-induzierte Strom fließt. Damit war auch die Berechnung der Halbsättigungskonstanten aus diesen Daten problematisch. Da sowohl bei der Bestimmung der Halbsättigungskonstante von Burckhardt BC et al. (2000) und der von Steffgen et al. (1999) ein maximaler Natrium-induzierter Strom bei 110 mM Natrium gemessen wurde, liegt der Schluss nahe, dass der verwendete alternative Versuchsaufbau unzuverlässig und zur Bestimmung der Halbsättigungskonstanten von Natrium ungeeignet ist.

3.5.5 Eadie-Hofstee-Diagramme

Abbildung 3.42 zeigt die Eadie-Hofstee-Auftragungen der vier gemessenen Oozyten bei einem Klemmpotential von -60 mV. Drei der vier Auftragungen ergeben eine Gerade. Abbildung 3.42 (c) ist nach diesen Kriterien eine sehr unzuverlässige Messreihe. Bei anderen Klemmpotential-

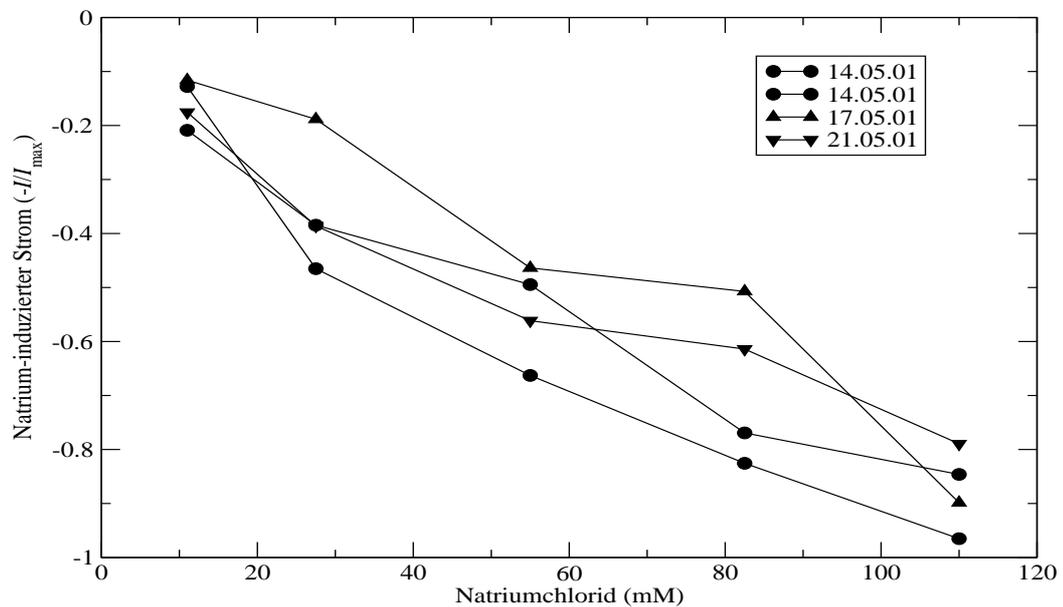


Abbildung 3.41: Konzentrationsabhängigkeit des Natrium-induzierten Stroms. Die Konzentrationsabhängigkeit des normierten Natrium-induzierten Stroms nimmt vom Betrag bei steigender Natriumkonzentration zu. Die unterschiedlichen Symbole stellen unterschiedliche Oozyten da. Gezeigt sind die Messungen bei einem Klemmpotential von -60 mV ($n=4/3$).

len sind solche unzuverlässigen Ergebnisse häufiger aufgetreten. Dies erklärt zum Teil auch die starken Schwankungen der Halbsättigungskonstanten in Abbildung 3.43.

3.5.6 Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten für Natrium

Abbildung 3.43 zeigt die berechneten Halbsättigungskonstanten für Natrium in Abhängigkeit vom Klemmpotential. Die Halbsättigungskonstante lag bei einem Klemmpotential von -60 mV bei 53 ± 3 mM. Eine Potentialabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten war nicht erkennbar. Diese Ergebnisse sind allerdings nicht zuverlässig.

3.5.7 Zusammenfassung

Eine zuverlässige Bestimmung der Halbsättigungskonstanten für Natrium gelang nicht. Die natriumfreie Lösung wurde weder von den H_2O -Oozyten noch von den Oozyten des Wildtyps toleriert. Nur eine einzige Messung an einer Oozyte vom Wildtyp gelang. Starke Oszillationen des Klemmstroms führten sehr häufig zu einem Verlust der Klemmbarkeit der Oozyten. Daher wurde eine alternative Versuchsanordnung mit absteigenden Natriumkonzentrationen im Vergleich zu der natriumhaltigen Lösung ("Ori") durchgeführt. Auch hier erschwerten Oszil-

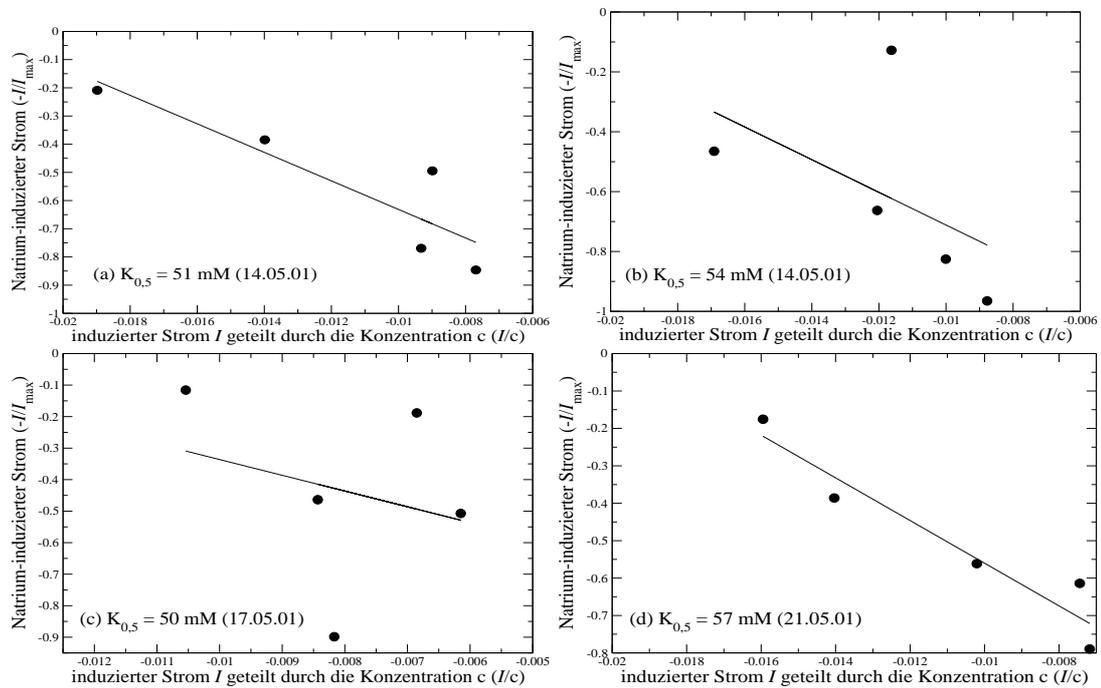


Abbildung 3.42: Eadie-Hofstee-Diagramme für Natrium-induzierte Ströme. Eadie-Hofstee-Diagramme für Natrium der Messungen an den vier Oozyten (Wildtyp) bei einem Klemmpotential von -60 mV . Die negative Steigungen der Regressionsgeraden entspricht den Halbsättigungskonstanten für Natrium ($n = 4/3$).

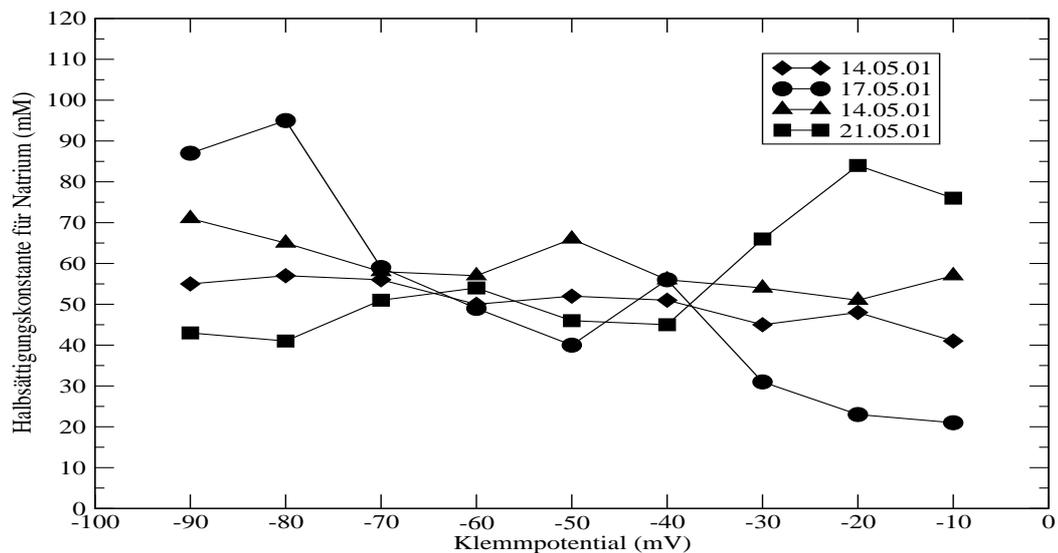


Abbildung 3.43: Halbsättigungskonstante für Natrium als Funktion des Klemmpotentials. Starke Schwankungen lassen keine Potentialabhängigkeit der berechneten Halbsättigungskonstante für Natrium bei den frei gemessenen Oozyten erkennen. Bei einem Klemmpotential von -60 mV liegt die Konstante bei $53 \pm 3 \text{ mM}$. Unterschiedliche Symbole stellen unterschiedliche Oozyten da ($n=4/3$).

lationen des Klemmstroms das Auswerten. Die ermittelte Strom-Konzentrationskurve ist nicht typisch für ein Sättigungsverhalten. Die Konzentrationsabhängigkeit des Natrium-induzierten Stroms weicht im Vergleich zu Burckhardt BC et al. (2000) und Steffgen et al. (1999) stark ab. Die daraus berechneten Halbsättigungskonstanten schwanken stark und haben eine untypische Potentialabhängigkeit. Daher wurde die Halbsättigungskonstante für Natrium im Beisein von Lithium nicht bestimmt.

3.6 Succinat-induzierte Ströme im Beisein von 110 mM Lithiumchlorid

In diesem Abschnitt wurde der Frage nachgegangen, ob Lithium das Natrium als Kation für den Succinattransport ersetzen kann. Ziel war die Bestimmung der Halbsättigungskonstanten für Succinat unter Verwendung von Lithium als Kation und dabei insbesondere der Vergleich zwischen dem Wildtyp und der Mutante.

3.6.1 Voruntersuchungen

Der Wechsel von der natriumhaltigen Lösung ("Ori") zur lithiumhaltigen Lösung ("OriLiCl") wurde von den meisten Oozyten gut toleriert. Allerdings waren einige Oozyten unter Verwendung der lithiumhaltigen Kontrolllösung instabil und konnten nach einiger Zeit nicht mehr im Spannungs-Klemmmodus gehalten werden. Bei der ersten Oozyte, die die lithiumhaltige Lösung über einen längeren Zeitraum tolerierte, gelang es, einen konzentrationsabhängigen Succinat-induzierten Strom zu messen. Abbildung 3.44 zeigt die Potentialabhängigkeit des induzierten Stroms dieser Oozyte (Wildtyp). Der Succinat-induzierte Strom unter Verwendung von Natrium ist bei dieser Oozyte unabhängig vom Klemmpotential und entspricht damit nicht der sonst beobachteten Potentialabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms. Unter Verwendung von Lithium kam es bei Depolarisation zu einer deutlichen Zunahme des Succinat-induzierten Stroms. Da die beiden Konzentrationen gut abgrenzbar waren, wurde mittels Eadie-Hofstee-Auftragung eine Abschätzung der Halbsättigungskonstanten unter Verwendung von Lithium durchgeführt. Die Halbsättigungskonstante unter Lithium betrug bei dieser Oozyte etwa 700 μ M. Bei einer anderen Oozyte (Mutante) wurde die Halbsättigungskonstante auf etwa 5 mM geschätzt. Dies ist der Grund für die Wahl der Konzentrationen 0,1 mM, 1 mM, 5 mM und 10 mM Succinat für eine Bestimmung der Halbsättigungskonstanten bei den mit cRNS injizierten Oozyten.

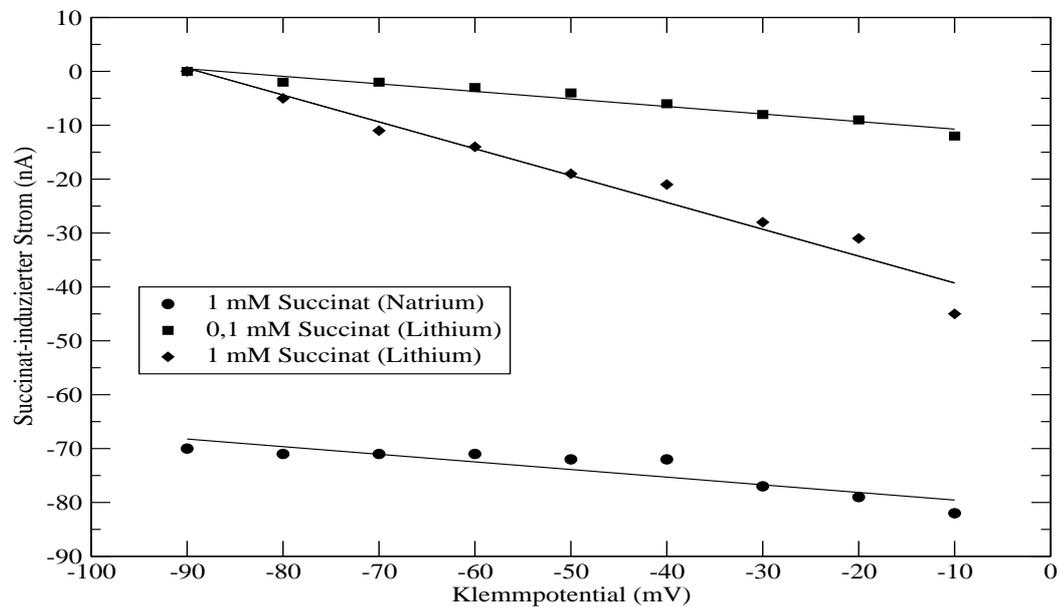


Abbildung 3.44: Voruntersuchung: Strom-Spannungskennlinien von Succinat. Bei der ersten gemessenen Oozyte des Wildtyps ist der Succinat-induzierte Strom unter Verwendung von Natrium konstant, während er unter Verwendung von Lithium zunimmt.

3.6.2 Potentialabhängigkeit der Ströme im Beisein von Lithium

Bei den nachfolgenden Messungen wurde keine Konzentrationsabhängigkeit des Succinat-induzierten Stroms beobachtet. Verwendet wurden Konzentrationen von 0,1 bis 10 mM Succinat. Nur bei einer sehr hohen Affinität für Succinat müssten alle diese Konzentrationen in der Sättigung liegen. Für den Wildtyp wurde an 9 Oozyten von 8 Fröschen gemessen, für die Mutante an 6 Oozyten von 5 Fröschen. Es wurden 4 H₂O-Oozyten von 3 Fröschen untersucht. Abbildungen 3.46, 3.47 und 3.45 zeigen die Potentialabhängigkeit des durch 1 mM Succinat induzierten Stroms beim Wildtyp, der Mutante bzw. bei H₂O-Oozyten. Bei wenigen Oozyten wurden relativ hohe Ströme (-30 nA) beim Wildtyp und der Mutante gemessen. Ströme bis -15 nA wurden aber auch bei den H₂O-Oozyten beobachtet. Ein etwas geringerer Anstieg des Succinat-induzierten Stroms wurde auch bei den H₂O-Oozyten gemessen. Wenn der Succinat-induzierte Strom für den Transporter typisch wäre, müsste eine Beziehung zwischen dem gemessenen Succinat-induzierten Strom unter Verwendung von 110 mM Lithium und demjenigen unter Verwendung von 110 mM Natrium bestehen. Eine solche Beziehung war nicht zu erkennen (ohne Abbildung).

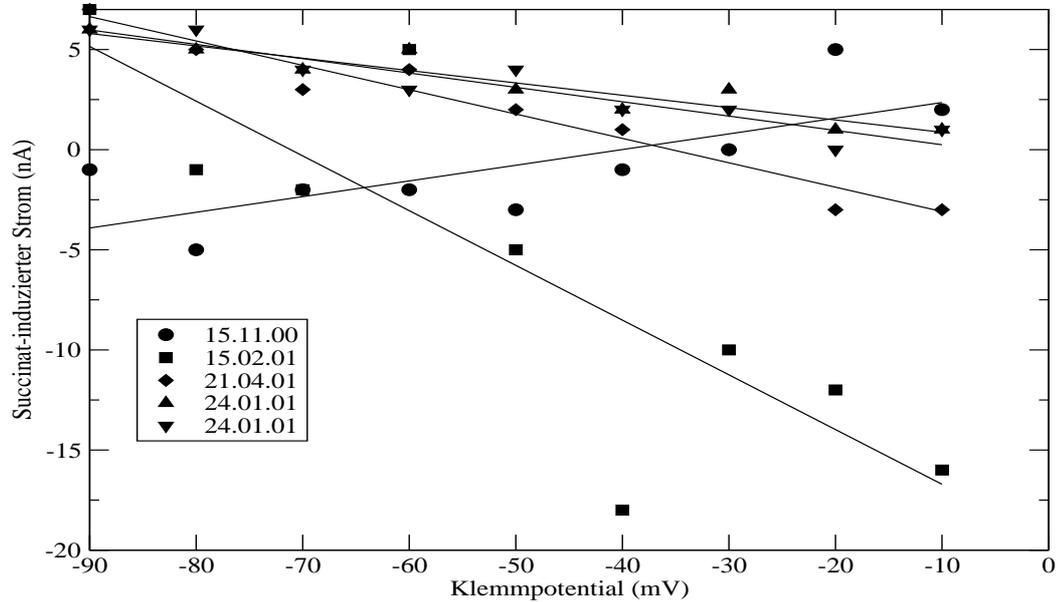


Abbildung 3.45: *I-V*-Kennlinie von Succinat im Beisein von 110 mM LiCl (H₂O-Oozyten). Bei H₂O-Oozyten ist häufig eine Zunahme des Succinat-induzierten Stroms bei Depolarisation im Beisein von 110 mM LiCl zu beobachten.

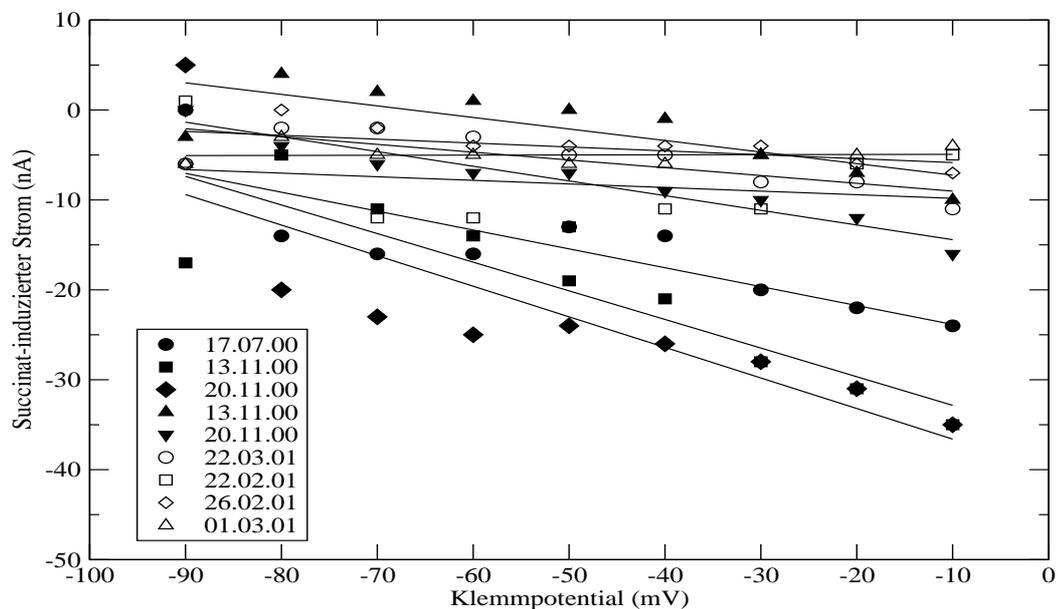


Abbildung 3.46: *I-V*-Kennlinie von Succinat im Beisein von 110 mM LiCl (Wildtyp). Der durch 1 mM Succinat induzierte Strom unter Verwendung von Lithium ist beim Wildtyp meist sehr gering und steigt bei Depolarisation. Die Linien zeigen die Regressionsgeraden durch die Messwerte der induzierten Ströme.

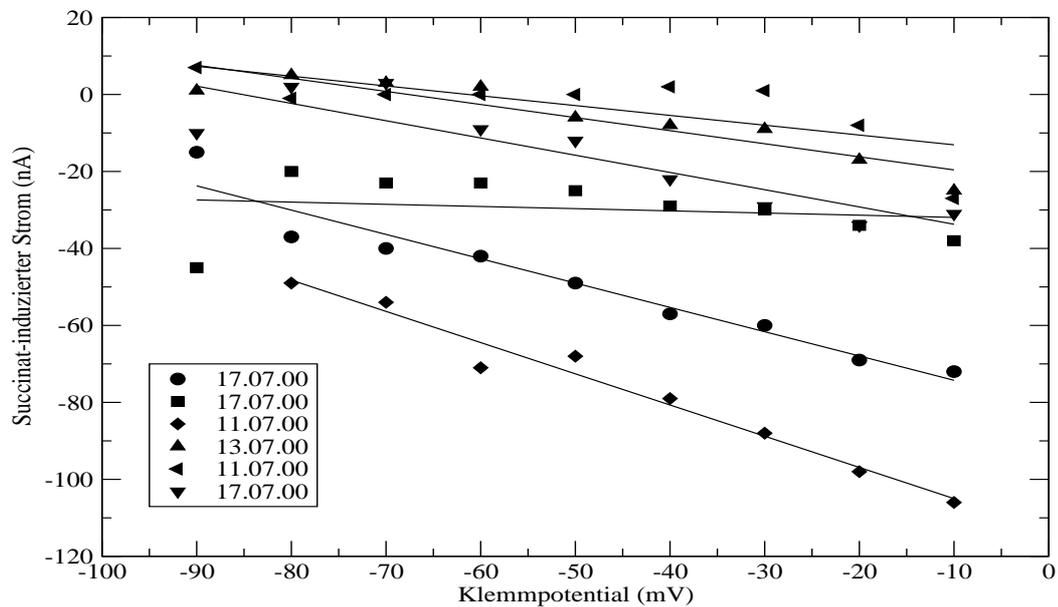


Abbildung 3.47: I-V-Kennlinie von Succinat im Beisein von 110 mM LiCl (Mutante). Der durch 1 mM Succinat induzierte Strom unter Verwendung von Lithium ist bei der Mutante meist sehr gering und steigt bei Depolarisation. Die feinen Linien zeigen die Regressionsgeraden durch die Messwerte der induzierten Ströme.

3.6.3 Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat im Beisein von Lithium

Da aus den Strom-Spannungskennlinien (siehe Abbildung 3.45, 3.46 und 3.47) nicht erkennbar ist, ob Succinat im Beisein von 110 mM Lithium einen Einwärtsstrom induziert, wurden die Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat bestimmt. Aus dem Ohmschen Gesetz folgt, dass die Leitfähigkeit

$$G = \frac{I}{U} \quad (3.1)$$

ist, wobei I den gemessenen Strom und U die Spannung über der Oozytenmembran bezeichnet. Wenn man die Leitfähigkeit der Oozyte im Beisein der natriumhaltigen Lösung ("Ori") von derjenigen im Beisein der natriumhaltigen Lösung mit Succinat subtrahiert, bekommt man die Leitfähigkeitsänderung ΔG . Abbildungen 3.48 und 3.49 zeigen die Änderungen der Leitfähigkeit durch Succinat der in diesem Abschnitt untersuchten Oozyten bei 110 mM Natrium bzw. Lithium. Unter Verwendung von 110 mM Natrium führte Succinat zu einer sehr deutlichen Änderung der Leitfähigkeit des Wildtyps bzw. der Mutante im Vergleich zu der Änderung bei den H₂O-Oozyten. Bei Verwendung von 110 mM Lithium wurde kein Unterschied zwischen den Leitfähigkeitsänderungen zwischen dem Wildtyp und der Mutante beobachtet.

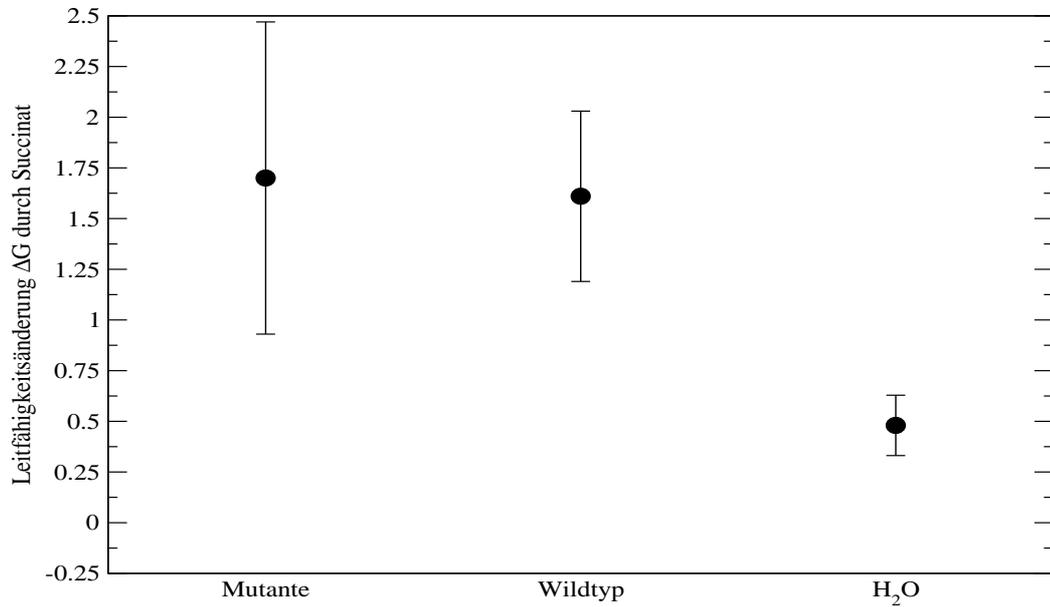


Abbildung 3.48: Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat im Beisein von 110mM NaCl. Gezeigt sind die Mittelwerte der Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat unter Verwendung von 110 mM Natriumchlorid bei einem Klemmpotential von -90 mV. Es gibt einen deutlichen Unterschied zwischen den H₂O-Oozyten und den mit cRNS injizierten Oozyten.

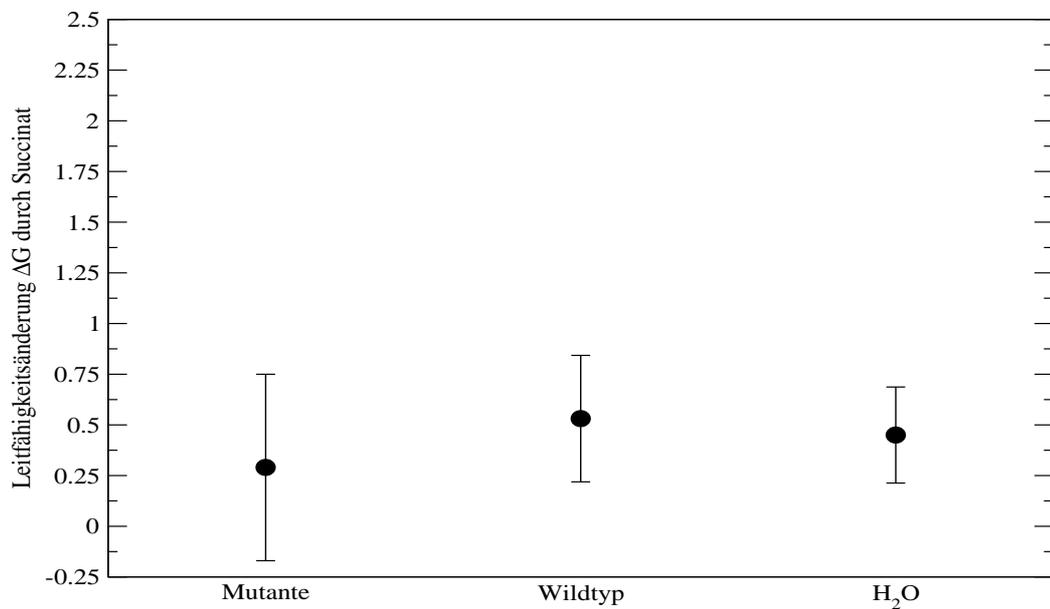


Abbildung 3.49: Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat im Beisein von 110mM LiCl. Unter Verwendung von 110 mM Lithium sind die Mittelwerte der Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat bei den H₂O-Oozyten vergleichbar mit denjenigen der mit cRNS injizierten Oozyten. Gezeigt sind die Messergebnisse bei einem Klemmpotential von -90 mV.

3.6.4 Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob das Kation Lithium für den Succinattransport Natrium als Kation ersetzen kann und ob die durch Steffgen (2000) entwickelte Mutante das Succinat im Beisein von Lithium besser transportiert. Der Succinat-induzierte Strom stieg beim Wildtyp, der Mutante und in geringerem Maß bei den H₂O-Oozyten an. Untersuchungen der Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat zeigten keinen Unterschied zwischen H₂O- und cRNS-injizierten Oozyten. Daher sind die beobachteten höheren induzierten Ströme bei den cRNS-injizierten Oozyten auf eine höhere Leitfähigkeit bei den Oozyten zurückzuführen, nicht aber auf einen Transport durch den fNaC3.

4 Diskussion

Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter (NaC) fungieren als Membrantransportproteine vieler Organe. Sie sind von physiologischer Bedeutung, da Dikarboxylate u.a. wichtige Energielieferanten für die Zellen sind. Dikarboxylate machen etwa 10-15 % des oxidativen Metabolismus der Nierenzellen aus (Simpson 1983). Pathophysiologische Bedeutung haben die Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter für die Entstehung von Kalzium-Citrat-Steinen (Chen X et al. 1999). Sie haben auch pharmakologische Bedeutung, da sie direkt oder indirekt an der Ausscheidung vieler Pharmaka über die Niere beteiligt sind. Außerdem wird insbesondere der basolaterale Transporter bei einer pharmakologisch relevanten Plasmakonzentration von Lithium gehemmt.

Ziel dieser Arbeit war eine funktionelle (elektrophysiologische) weiterführende Beschreibung des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters aus den Nieren der amerikanischen Winterflunder (fNaC3). Schwerpunkte dieser Arbeit sind der Einfluss von Lithium auf die Transporteigenschaften des hochaffinen fNaC3 und die Untersuchung der Transporteigenschaften von 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat.

Für die funktionelle Beschreibung des Transportproteins wurde die Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemmmethode verwendet. Die Experimente wurden an Oozyten des südamerikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) durchgeführt, die nach cRNS-Injektion das Transportprotein überexprimiert hatten. Diese Methode kann eingesetzt werden, da es sich beim NaC3 um einen elektrogenen Transport handelt. Es werden drei Natriumionen zusammen mit einem divalentem Succinat transportiert. In der Tabelle 4.1 wird für jedes Ergebnis die Untersuchungsmethode angegeben. Insbesondere beim Vergleich der Ergebnisse der Aufnahme-Experimente, bei denen die Aufnahme eines markierten Substrates über einen definierten Zeitraum mit der Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemmmethode bei einem Klemmpotential von -50 oder -60 mV gemessen wird, fallen deutliche Unterschiede auf. Zwischen den verschiedenen Gruppen, die sich mit dem Thema beschäftigen, gibt es zum Teil erhebliche Unterschiede in den Grundbedingungen der elektrophysiologischen Methode. In dieser Arbeit betrug der maximale Succinat-induzierte Strom meistens etwa -50 nA, bei vielen Arbeitsgruppen ist die Expression größer (z.B. -400 nA bei Wang H et al. 2000, siehe Tabelle 4.1). Jahreszeitliche Unterschiede in der Expression wurden von Stühmer (1998) beschrieben. Wahrscheinlich haben diese Unterschiede jedoch wenig Einfluss auf die Berechnung der Inhibitions- oder Halbsättigungskonstanten.

4.1 Einfluss von Lithium auf den Wildtyp

Lithium wird seit über vierzig Jahren in der Therapie der bipolaren Erkrankungen eingesetzt (Schou 1997). Da Lithium nicht nur auf die Länge und Häufigkeit der manischen und depressiven Phasen wirkt, sondern auch die hohe Suizidrate der Patienten senkt, bleibt Lithium Therapie der Wahl (Berk et al. 2005). Die therapeutische Breite von Lithium ist allerdings sehr gering, was regelmäßige Kontrollen der Plasmakonzentration von Lithium notwendig macht. Ziel ist eine Lithiumplasmakonzentration von knapp 1 mM Lithium (Schou 1997). Bereits bei dieser Plasmakonzentration von Lithium kommt es zu einer relevanten Hemmung des hochaffinen humanen Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters (Wang H et al. 2000).

Bei allen Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern wird der Succinattransport durch Lithium gehemmt. Wie Tabelle 4.1 zeigt, gibt es große Unterschiede bezüglich der Inhibitionskonstanten für Lithium. Einige dieser Konstanten werden aus der Lithiumkonzentration geschätzt, die notwendig ist, um eine 50 prozentige Hemmung (IC_{50}) des Succinat-induzierten Stroms zu erreichen. Bei den meisten NaC wird eine halbmaximale Hemmung bei einer Lithiumkonzentration unter 3 mM beobachtet. Es gibt drei Ausnahmen, nämlich den hNaC1 mit einer Inhibitionskonstanten von 20 mM Lithium, den mNaC1, dessen Hemmbarkeit durch Lithium gering ist und den xNaC2, dessen Succinatantwort nicht durch Lithium gehemmt wird. Untersuchungen zur Hemmung des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters aus der Flunderniere sind bei Burckhardt BC et al. (2000) beschrieben. Beobachtet wurde unter anderem eine unvollständige Hemmung des Succinat-induzierten Stroms im Beisein von 10 mM Lithium, ein Reststrom von etwa -30 nA wurde bei allen untersuchten Oozyten beobachtet. Die Inhibitionskonstante für Lithium wurde bestimmt zu $0,55 \pm 11$ mM bei einem Klemmpotential von -60 mV (Burckhardt BC et al. 2000). In dieser Arbeit wurde eine Mutante untersucht, die mit dem Ziel entwickelt wurde, weniger stark durch Lithium gehemmt zu werden. Erwartet wurde eine höhere Inhibitionskonstante (höhere IC_{50}) für Lithium, die sich auch in einem höheren Anteil des nicht durch Lithium hemmbaren Succinat-medierten Stromes widerspiegelt. Diese Erwartung hat sich nicht bestätigt. Zur Vereinfachung des Vergleichs zwischen Wildtyp und Mutante und um Störfaktoren wie z.B. jahreszeitliche Unterschiede zu vermindern, wurden alle Untersuchungen in einem ähnlichen Zeitraum auch an Oozyten durchgeführt, die den Wildtyp des fNaC3 exprimiert hatten. Wie im Folgenden näher dargestellt, haben sich für den Wildtyp die Beobachtungen von Burckhardt BC et al. (2000) im wesentlichen bestätigt.

Die apparente Inhibitionskonstante für Lithium wurde in dieser Arbeit zu etwa 1,5 mM bestimmt. Dies gilt sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante. Damit liegt sie etwa um einen Faktor drei über dem früher bestimmten Wert von $0,55 \pm 11$ mM (Burckhardt BC et al. 2000). Für die Berechnung wurde in dieser Arbeit der Dixon-Graph verwendet. Dabei wurde nur der nicht gehemmte Anteil des Succinat-induzierten Stroms jeweils von den induzierten Strömen subtrahiert. Die auf diese Weise bestimmte apparente Inhibitionskonstante liegt höher als die echte Inhibitionskonstante. Eine Erklärung findet sich im Kapitel 2.6 auf Seite 15.

Burckhardt BC et al. (2000) bestimmten die Inhibitionskonstante, indem sie die gemessenen Ströme an die Hill-Gleichung mittels des Sigmasoft-Programms anpassten. Die Unterschiede in der Höhe der apparenten Inhibitionskonstanten lassen sich aber nicht nur auf Grund der unterschiedlichen Methoden der Bestimmung erklären. Auf Grund der hohen Schwankungen und der Abweichungen zu Burckhardt BC et al. (2000) wurden diese Inhibitionskonstanten auf Plausibilität überprüft. Bei Betrachtung der Rohdaten liegt die Lithiumkonzentration, bei der eine halbmaximale Hemmung beobachtet wurde, stets zwischen 1 mM und 2,5 mM Lithium. Insbesondere stimmen die geschätzten Inhibitionskonstanten für jede gemessene Oozyte gut mit denen überein, die mit Hilfe der Dixon-Graphen bestimmt wurden. Problematischer sind die Bestimmungen der Inhibitionskonstanten bei weniger negativem Klemmpotential. In den von Burckhardt BC et al. (2000) publizierten Daten kann man die Lithiumkonzentration (annähernd) ablesen, bei der eine halbmaximale Hemmung der Succinatantwort auftritt. Sie beträgt etwa 1 mM Lithium.

In dieser Arbeit wurde außerdem untersucht, ob eine pharmakologisch relevante Konzentration von Lithium die Affinität des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters verändert. Bei einem Klemmpotential von -60 mV wurde an einer Oozyte jeweils die Affinität für Succinat ohne Lithium und die Affinität für Succinat im Beisein von 1 mM Lithium bestimmt. Durch einen solchen Versuchsaufbau können auch relativ kleine Unterschiede in der Affinität aufgedeckt werden. Das Beisein von 1 mM Lithium führte bei drei von vier Oozyten zu einer geringen Erhöhung der Affinität für Succinat, bei einer von vier Oozyten zu einer Verringerung der Succinataffinität. Es zeigte sich, dass das Beisein von Lithium keinen wesentlichen Einfluss auf die Succinataffinität des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters aus der Flunderniere hat. Vergleichbare Untersuchungen an anderen Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern gibt es nicht.

Untersuchungen des Succinattransports mit Lithium als Kation wurden für fast alle Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter durchgeführt. Nur zwei luminale Transporter haben einen deutlich messbaren Succinattransport unter Verwendung von Lithium als Kation. In Experimenten, bei denen der Transport bzw. die Aufnahme von Succinat untersucht wurde, konnte die Aufnahme durch Lithium nur um 30 % beim mNaCl (Pajor et al. 2000) bzw. 50 % beim xNaCl (Bai und Pajor 1997) reduziert werden. Die anderen niederaffinen Transporter, wie auch die hochaffinen NaCl₃, zeigen nur einen sehr geringen Succinattransport unter Verwendung von Lithium. Eine Ausnahme ist der hNaCl₁, für den in Aufnahme-Experimenten kein solcher Succinattransport beschrieben wurde (Pajor und Sun 1996). Damit ist dieser Transport im Gegensatz zu den Annahmen von Steffgen (2000) kein sicheres Unterscheidungsmerkmal zwischen den NaCl₁ und NaCl₃.

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Succinat-induzierte Strom unter Verwendung von Lithium als Kation über einen Transport von Succinat und Natriumionen durch den Transporter zurückzuführen ist, wurden die Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat bestimmt. Zwar gab es größere Schwankungen der Leitfähigkeitsänderungen bei den mit cRNS injizierten Oozyten im Vergleich zu den H₂O-Oozyten, allerdings ist diese Veränderung der Leitfähigkeit

durch Succinat im Mittel gleich. H₂O-Oozyten haben häufig eine geringere Leitfähigkeit als Versuchs-Oozyten. Das führte zu den beobachteten geringeren Succinat-induzierten Strömen unter Verwendung von Lithium.

Leitfähigkeitsänderungen durch Succinat unter Verwendung von Lithium sind bei den elektrophysiologischen Untersuchungen der anderen Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter nicht beschrieben. Ein ähnlicher Effekt könnte auch bei den anderen elektrophysiologisch bestimmten Succinat-induzierten Strömen, also beim rNaC3, hNaC3, mNaC3 und beim rNaC1, einen Succinattransport vortäuschen. Bei Vergleichen der Gensequenz in Hinblick auf den Succinattransport unter Verwendung von Lithium, wie sie durch Steffgen (2000) durchgeführt wurden, sollten aus diesen Überlegungen heraus die Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter funktionell in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Transporter mit hohem Transport unter Verwendung von Lithium (xNaC1 und mNaC1) und solche, die keinen oder nur einen sehr geringen Succinattransport unter Verwendung von Lithium zeigen.

Gegenüberstellung von Transporteigenschaften der NaC									
Name	Einwärtsstrom (nA)	[³ H] oder [¹⁴ C] Succ.-Aufnahme	DMS-ind. Ströme oder DMS-Aufnahme	Hemmung der Succ.-ind. Ströme oder der Succ.-Aufnahme durch DMS?	Lithium als Kation?	K _{0,5} Natrium (mM)	K _{0,5} Succ. (μM)	IC ₅₀ Li ⁺ (mM)	Referenzen
fNaC3	-120 (-60)	ja	ja 2,2- und 2,3-DMS	2,3-DMS auf 50 %*	nein	18-40*	30*-60	0,67 (1,5)	Steffgen et al. 1999, Burckhardt BC et al. 2000, Burckhardt BC et al. 2002
rNaC3	n.b.	ja HRPE	n.b.	ja auf 2 %*	sehr gering	n.b.	6*	<2,5*	Kekuda et al. 1999
rNaC2	-130	n.b.	ja (2,3-DMS)	n.b.	n.b.	n.b.	12	3	Chen X et al. 1999
hNaC3	-400	ja	n.b.	ja auf 1 %*	sehr gering	22	20*-100	2,6	Wang H et al. 2000
xNaC3	-90	ja HRPE	n.b.	2,3-DMS auf ca. 15 %*	nein	55*	5*	n.b.	Oshiro und Pajor 2005
mNaC3	-100	ja	n.b.	2,2- und 2,3-DMS auf <20 %*	gering	25*	178	n.b.	Pajor et al. 2001
xNaC2	n.b.	ja	n.b.	ja auf 80 %	ja 48 %*	45*	300*	keine*	Bai und Pajor 1997
rNaC1	-300 ^a (-60 ^b)	ja ^a	n.b.	n.b. ^a nein ^b *	sehr gering ^b	25 ^a	25 ^b -30 ^a	2	^a Sekine et al. 1998, ^b Chen XZ et al. 1998
mNaC1	-150	ja	n.b.	ja auf ca. 18 %	30 %*, 8 %	9.5*	ca. 350*	hoch	Pajor und Sun 2000
hNaC1	n.b.	ja	n.b.	nein	nein*	78*	360*	20*	Pajor 1996, Pajor und Sun 1996
rbNaC1	n.b.	ja	n.b.	nein	ja*	40*	450*	<2,5*	Pajor 1995, Pajor und Sun 1996, ^d Pajor et al. 1998

Tabelle 4.1: Transporteigenschaften der NaC. Wenn Lithium als Kation fungiert, ist (soweit bekannt) der Transport in % des Transports unter Verwendung von Natrium angegeben. Einige Autoren geben bei der Hemmung der Succinataufnahme an, wieviel Prozent des ohne Hemmstoff aufgenommenen Succinats bei Zugabe von 100 μM DMS aufgenommen wurde. Die mit * gekennzeichneten Daten stammen aus Aufnahme-Experimenten. Die Inhibitionskonstanten für den rNaC1, den hNaC1 und den mNaC1 sind geschätzt. Die fettgedruckten Daten wurden in dieser Arbeit bestimmt. n.b. = nicht bestimmt.

4.2 Die Mutante

Steffgen (2000) hat eine Mutante des fNaC3 entwickelt (Mutante S513C), von der erhofft wurde, dass sie sich in Hinblick auf die Lithiumeigenschaften vom Wildtyp des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters aus der Flunderniere unterscheidet. Bei Betrachtung der Aminosäuresequenzen der bis dahin bekannten Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter fiel ein Bereich auf, bei dem es eine sehr hohe Übereinstimmung der Aminosäuren gibt. Die Aminosäure, die der Aminosäure 445 beim fNaC3 (bzw. Stelle 513 der cRNA) entspricht, ist bei allen hochaffinen Transportern (NaC3) Cystein und bei den niederaffinen Transportern (NaC1) Serin (siehe Tabelle 1.1). Bei den hier vorgestellten Untersuchungen stellte sich heraus, dass sich das mutierte Protein im Hinblick auf die Lithiumeigenschaften nicht vom Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter des Wildtyps unterscheidet. A posteriori ist dies auch nicht überraschend, wie Daten einer aktuellen Literaturrecherche zeigen (siehe Tabellen 1.1 und 4.1). Auf Grund der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen in dem von Steffgen betrachteten Bereich zwischen den verschiedenen klonierten Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern ist es wahrscheinlich, dass dieser Bereich von besonderer Bedeutung für das Protein ist. Hinweise, dass das C-terminale Ende des Proteins besondere Bedeutung für die Transporteigenschaften hat, stammten aus Untersuchungen von rbNaC1 und hNaC1 Chimeren (Kahn und Pajor 1998). Aus diesen Untersuchungen wurde geschlossen, dass an einer der Transmembrandomainen 7, 10 oder 11 eine Bindungsstelle für ein Kation liegt. Die Transmembrandomaine 11 war allein für die Empfindlichkeit gegenüber Lithium verantwortlich. Punktmutationen wurden ebenfalls am rbNaC1 durchgeführt. Mutationen von mehreren sauren Aminosäuren des rbNaC1 zeigten, dass Mutationen an Aminosäuren Asparagin 373 und Glutamin 475 eine Veränderung der Affinität für Succinat und Natrium hervorrufen (Griffith und Pajor 1999). Ein Austausch einer Aminosäure Histidin durch eine andere Aminosäure an vielen Stellen des rbNaC1 verändert die wichtigsten Transporteigenschaften des rbNaC1 nicht (Pajor et al. 1998b). Dagegen führt eine Mutation der Aminosäure Cystein 476 zu einem Protein, das nicht zur Membran transportiert wird. Pajor et al. (2000) mutierten kationische Aminosäuren am rbNaC1 und fanden, dass von den untersuchten Aminosäuren nur Lysin 84 und Arginin 349 zu veränderten Transporteigenschaften führen. Für ein umfassendes Verständnis der für die Bindung und Translokation der Substrate bedeutenden Aminosäuren reichen diese Ergebnisse am rbNaC1 noch nicht aus. Weitere Forschung in diesem Bereich ist nötig.

Welche Bereiche des Proteins die Transporteigenschaften für die Dikarboxylate oder die Kationen beeinflussen, ist für die meisten Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter nicht bekannt. Mit Hilfe von Chimeren kann der Bereich eingegrenzt werden, der für die Bindung oder Translokation eines Substrates von Bedeutung ist. Mit Hilfe der gezielten Mutagenese (site-directed mutagenesis) können Punktmutationen durchgeführt werden. Viele solcher Mutanten sind notwendig, um die Regionen mit funktioneller Bedeutung zu finden. Genaue Analysen der Unterschiede zwischen der Aminosäuresequenz und der Transporteigenschaften der Transporter der verschiedenen Tierarten können die Anzahl an Mutationen verringern, die durchgeführt werden

müssen, um Informationen über funktionell wichtige Bereiche zu bekommen. Sie garantieren, wie die Mutante von Steffgen (2000) zeigt, jedoch nicht immer einen Erfolg.

4.3 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat

Für das Verständnis der physiologischen und pharmakologischen Rolle der Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter ist das Substrat- und Hemmstoffspektrum von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurde der Transport der Substrate 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat elektrophysiologisch charakterisiert und verglichen. 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat unterscheiden sich darin, an welchem Kohlenstoffatom die zweite Methylgruppe angebracht ist (siehe Abbildung 1.3). Die Affinität für 2,2-Dimethylsuccinat ist mit der Halbsättigungskonstanten von $7 \pm 3 \mu\text{M}$ bei einem Klemmpotential von -60 mV deutlich höher als für 2,3-Dimethylsuccinat ($32 \pm 25 \mu\text{M}$) oder Succinat ($29 \pm 7 \mu\text{M}$). Die Halbsättigungskonstanten von Succinat und 2,2-Dimethylsuccinat sind unabhängig vom Klemmpotential, während die Halbsättigungskonstante von 2,3-Dimethylsuccinat bei Depolarisation zunimmt. Die maximale Transportrate ist ebenfalls bei 2,2-Dimethylsuccinat etwa 30 % größer als bei Succinat oder 2,3-Dimethylsuccinat. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eventuell auch andere Dikarboxylate mit einer Substitution am zweiten Kohlenstoffatom bevorzugt transportiert werden könnten.

Tabelle 4.1 zeigt, bei welchen Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern Dimethylsuccinat transportiert oder der Succinat-induzierte Strom durch Dimethylsuccinat gehemmt wird. Für die meisten Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter wurde die Hemmung der Aufnahme von [^3H]- oder [^{14}C]Succinat durch Dimethylsuccinat bestimmt – anstelle des Dimethylsuccinat-induzierten Stroms. Häufig ist nicht klar, ob es sich um 2,2- oder 2,3-Dimethylsuccinat handelt. Es ist möglich, dass es auch für den Transport von 2,2- oder 2,3-Dimethylsuccinat einen Unterschied in den Transporteigenschaften gibt, der der Einteilung in hochaffine und niederaffine Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter folgt. Auffällig ist, dass die meisten niederaffinen Transporter nur einen sehr geringen Transport von Dimethylsuccinat zeigen, während dieser Transport bei den hochaffinen Natrium-Dikarboxylat-Kotransportern mit dem von Succinat vergleichbar ist. Allerdings sind die Angaben nur begrenzt vergleichbar, da unterschiedliche [^3H]- oder [^{14}C]Succinatkonzentrationen und unterschiedliche Konzentrationen von Dimethylsuccinat verwendet wurden. Am häufigsten wurde eine Succinatkonzentration von $10 \mu\text{M}$ und eine Dimethylsuccinat-Konzentration von 1 mM gewählt (mNaC1: Pajor und Sun 2000, mNaC3: Pajor et al. 2001 und xNaC3: Oshiro und Pajor 2005), wobei auch Succinatkonzentrationen von $100 \mu\text{M}$ verwendet wurden (xNaC2: Bai und Pajor 1997). Wang H et al. (2000) haben beim hNaC3 20 nM Succinat mit 2 mM Dimethylsuccinat gehemmt, was zu einer besonders starken Hemmung der Succinataufnahme führte. Weitere Untersuchungen, insbesondere von 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat im Vergleich der klonierten Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter verschiedener Tierarten, sind notwendig.

Die meisten Substrate der hochaffinen Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter sind Metabolite des Krebszyklus. Bei diesen Di- und Trikarboxylaten werden diejenigen Substanzen mit einer Trans-Konfiguration, wie zum Beispiel Succinat, α -Ketoglutarat oder Fumarat bevorzugt (Überblicke in Burckhardt BC und Burckhardt G 2003, Markovich und Murer 2004). Die Affinität für die Karboxylate mit Cis-Konfiguration, wie zum Beispiel Maleat, ist niedriger. Auch für Aminosäuren wie D- oder L-Aspartat, die zwei Karboxylgruppen haben, ist die Affinität deutlich niedriger als für Succinat. Noch niedriger ist die Affinität für Monokarboxylate, von denen nur für Pyruvat ein geringer Transport festgestellt wurde (Burckhardt BC und Burckhardt G 2003).

Die meisten Substrate der Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter sind Metabolite des Krebszyklus. Wenige andere Substanzen sind Substrate der Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter. Dimercaptosuccinat, Meso-2,3-Dimercaptosuccinat und 2,3-Dimercaptopropan-1-Sulfonat sind die einzigen bekannten Pharmaka, die vom oben genannten Transporter transportiert werden (Burckhardt BC und Burckhardt G 2003). Meso-2,3-Dimercaptosuccinat und 2,3-Dimercaptopropan-1-Sulfonat spielen eine Rolle bei der Entgiftung von Schwermetallen. Durch Ulrich (1999) wurden in ganzen Rattennieren viele verschiedene Pharmaka im Hinblick auf die Hemmung des Succinattransports untersucht. Nur Benzylpenicillin und Furosemid inhibierten den Succinattransport (Ulrich 1999). Dies ist ein Hinweis dafür, dass nur wenige Pharmaka durch die hochaffinen Transporter transportiert werden oder den Dikarboxylat-Transport behindern. Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter stellen also sehr zuverlässig den α -Ketoglutarat-Konzentrationsunterschied zwischen dem Inneren und dem Äußeren der Zelle her, der von den organischen Anionen-Transportern 1 und 3 verwendet wird, um eine Vielzahl von Pharmaka zu eliminieren (Burckhardt BC und Burckhardt G 2003, Wright SH und Dantzer 2004).

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden ausgewählte Transporteigenschaften des hochaffinen Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters aus der Flunderniere untersucht. Ein Schwerpunkt lag auf den Untersuchungen über den Einfluss von Lithium auf den Succinattransport des Proteins. Lithium, das zur Therapie der bipolaren Erkrankung eingesetzt wird, hemmt den Succinattransport des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter aus der Flunderniere erheblich, wobei der Transport von Succinat über den von Succinat mediierten Strom gemessen wurde. Den zweiten Schwerpunkt meiner Arbeit bildet die Untersuchung der Transporteigenschaften von 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat. Erkenntnisse über den Einfluss der Struktur der Substrate auf die Transporteigenschaften vereinfachen Voraussagen über Transporteigenschaften anderer Substrate und erlauben damit ein besseres Verständnis der pharmakologischen Bedeutung der hochaffinen Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter.

Die Untersuchungen des Einflusses von Lithium auf den Succinattransport schließen die Untersuchung einer Mutante des fNaC3 von Steffgen (2000) ein. Steffgen (2000) hat die Mutante S513C entwickelt, von der erhofft wurde, dass sie sich im Hinblick auf die Hemmbarkeit und den Transport von Lithium vom Wildtyp des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters aus der Flunderniere unterscheidet. Um dies zu untersuchen, wurden der Reststrom nach maximaler Hemmung durch Lithium, die apparente Inhibitionskonstante für Lithium und der Succinat-induzierte Strom mit Lithium als Kation sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante bestimmt. Für alle Observablen wurde außerdem die Abhängigkeit vom Klemmpotential untersucht. In der Hoffnung, den Einfluss von Lithium auf die Affinität für Natrium zu bestimmen, wurde versucht, die Halbsättigungskonstante für Natrium zu bestimmen. Auf Grund von Oszillationen des Klemmstroms bei Verwendung der natriumfreien Lösung waren auch bei einem alternativen Versuchsaufbau die Ergebnisse sehr unzuverlässig, so dass darauf verzichtet wurde, die Versuche im Beisein von Lithium zu wiederholen. Es wurde gezeigt, dass sich die Mutante in den untersuchten Transporteigenschaften nicht messbar vom Wildtyp unterscheidet. Für den Wildtyp wurden im Wesentlichen die Ergebnisse von Burckhardt BC et al. (2000) bestätigt. Etwa 30 % des durch 1 mM Succinat induzierten Stroms ist auch durch 20 mM Lithium nicht zu hemmen. Die apparente Inhibitionskonstante, bestimmt mit Hilfe von Dixon-Graphen, beträgt unabhängig vom Klemmpotential etwa 1,5 mM.

Besonders genau untersucht wurde der Succinat-induzierte Strom bei Verwendung von Lithium als Kation. Bei der Betrachtung der Succinat-induzierten Ströme fiel auf, dass die Ströme unter Verwendung von Lithium als Kation bei Depolarisation zunehmen. In geringerem Ausmaß

wurde diese Zunahme auch bei H₂O-Oozyten beobachtet. Die Untersuchungen der Änderungen der Leitfähigkeit hingegen zeigten vergleichbare Änderungen bei den Messungen an den mit cRNS injizierten Oozyten und an den H₂O-Oozyten. Daher sind die beobachteten Ströme vermutlich eher auf eine insgesamt erhöhte Leitfähigkeit der Oozyten sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante bei Verwendung von Lithium als Kation als auf einen Transport durch den Natrium-Dikarboxylat-Kotransporter zurückzuführen.

Ebenfalls neu in dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von Lithium auf die Halbsättigungskonstante von Succinat. Dazu wurde ein gepaarter Versuchsaufbau verwendet, bei dem bei einem Klemmpotential von -60 mV an jeder Oozyte die Halbsättigungskonstante für Succinat und die Halbsättigungskonstante für Succinat im Beisein von 1 mM Lithium bestimmt wurde. Bei drei von vier Oozyten kam es zu einer kleinen Verringerung der Halbsättigungskonstante für Succinat im Beisein von Lithium. 1 mM Lithium hat also nur einen unwesentlichen Einfluss auf die Halbsättigungskonstante für Succinat.

Die Transporteigenschaften des Natrium-Dikarboxylat-Kotransporters für 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat wurden ebenfalls untersucht. 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat unterscheiden sich durch die Position der zweiten Methylgruppe. Dieser Unterschied führt, auch im Vergleich zu Succinat, nicht zu einem qualitativen Unterschied der Potentialabhängigkeit des Substrat-induzierten Stroms. Allerdings wird die Affinität des Transporters und die maximale Transportrate verändert. Die Affinität für 2,2-Dimethylsuccinat ist mit der Halbsättigungskonstanten von $7 \pm 3 \mu\text{M}$ bei einem Klemmpotential von -60 mV deutlich höher als für 2,3-Dimethylsuccinat ($32 \pm 25 \mu\text{M}$) oder Succinat ($29 \pm 7 \mu\text{M}$). Die Halbsättigungskonstanten von Succinat und 2,2-Dimethylsuccinat sind unabhängig vom Klemmpotential, während die Halbsättigungskonstante von 2,3-Dimethylsuccinat bei Depolarisation zunimmt. Die maximale Transportrate ist ebenfalls bei 2,2-Dimethylsuccinat etwa 30 Prozent größer als bei Succinat oder 2,3-Dimethylsuccinat. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eventuell andere Dikarboxylate mit einer Substitution am zweiten Kohlenstoffatom bevorzugt transportiert werden könnten.

6 Literaturverzeichnis

Alvarez-Leefmann FJ: Extracellular reference electrode. In: Grantyn R, Kettenmann H, editors: Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. 1st ed. Jossey-Bass Verlag New York 1992, 171-182

Angst J, Angst F, Stassen HH (1999): Suicide risk in patients with major depressive disorder. *J Clin Psychiatry* 60 Suppl. 2, 57-62

Bai L, Pajor AM (1997): Expression cloning of NaDC-2, an intestinal Na⁺- or Li⁺-dependent dicarboxylate transporter. *Am J Physiol* 273, G267-G274

Berk M, Dodd S, Berk L (2005): The management of bipolar disorder in primary care: A review of existing and emerging therapies. *Psychiatry Clin Neurosci* 59, 229-239

Burckhardt BC, Burckhardt G (2003): Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146, 95-158

Burckhardt BC, Steffgen J, Langheit D, Müller GA, Burckhardt G (2000): Potential-dependent steady-state kinetics of a dicarboxylate transporter cloned from a winter flounder kidney. *Pflügers Arch* 441, 323-330

Burckhardt BC, Drinkuth B, Menzel C, König A, Steffgen J, Wright SH, Burckhardt G (2002): The renal Na⁽⁺⁾-dependent dicarboxylate transporter, NaDC-3, translocates dimethyl- and disulfhydryl-compounds and contributes to renal heavy metal detoxification. *J Am Soc Nephrol* 13, 2628-2638

Burckhardt BC, Lorenz J, Burckhardt G, Steffgen J (2004): Interactions of benzylpenicillin and non-steroidal anti-inflammatory drugs with sodium dependent dicarboxylate transporter NaDC-3. *Cell Physiol Biochem* 14, 415-424

Burckhardt BC, Lorenz J, Kobbe C, Burckhardt G (2005): Substrate specificity of the human renal sodium dicarboxylate cotransporter, hNaDC-3, under voltage-clamp conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F792-F799

Burckhardt G (1984): Sodium-dependent dicarboxylate transport in rat renal basolateral membrane vesicles. *Pflügers Arch* 401, 254-261

Burgess S, Geddes J, Hawton K, Townsend E, Jamison K, Goodwin G (2001): Lithium for maintenance treatment of mood disorders. *Cochrane Database Syst Rev* 3 : CD003013

Campbell MJ, Machin D: *Medical statistics. A commonsense approach*. 2nd Edition John Wiley & Sons Wiltchire 1993, 72-75

Chen C, Rajkowska C, Du F, Seraji-Bonzorogzad N, Maniji HK (2000): Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem* 75, 1729-1734

Chen X, Tsukaguchi H, Chen XZ, Berger UV, Hediger MA (1999): Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. *J Clin Invest* 103, 1159-1168

Chen XZ, Shayakul C, Berger UV, Tian W, Hediger MA (1998): Characterization of a rat Na⁺-dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 273, 20972-20981

Dascal N (1987): The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22, 317-387

Dawid IB, Sargent TD (1988): *Xenopus laevis* in developmental and molecular biology. *Science* 240, 1443-1448

Dietzel ID, Brun D, Polder HK, Lux HD: Voltage Clamp recording. In: Grantyn R, Kettenmann H, eds: *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology*. 1st ed. Jossey-Bass Verlag New York 1992, 256-262

Dumont JN (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136, 153-197

Endres CJ, Hsiao P, Chung FS, Unadkat JD (2006): The role of transporters in drug interactions. *Eur J Pharm Sci* 27, 501-517

Fuhrmann GF, Volker B (1993): Misuse of graphical analysis in nonlinear sugar transport kinetics by Eadie-Hofstee plots. *Biochim Biophys Acta* 1145, 180-182

Fukuhara Y, Turner RJ (1983): Sodium-dependent succinate transport in renal outer cortical brush border membrane vesicles. *Am J Physiol* 245, F374-F381

Ghaemi SN, Hsu DJ, Soldani F, Goodwin FK (2003): Antidepressants in bipolar disorder: the case for caution. *Bipolar Disord* 5, 421-433

Gitlin M (1999): Lithium and the kidney: an updated review. *Drug Saf* 20, 231-243

Griffith DA, Pajor AM (1999): Acidic residues involved in cation and substrate interactions in the Na⁺/dicarboxylate cotransporter, NaDC-1. *Biochemistry* 38, 7524-7531

Hentschel H, Burckhardt BC, Scholermann B, Kuhne L, Burckhardt G, Steffgen J (2003): Basolateral localization of flounder Na⁺-dicarboxylate cotransporter (fNaDC-3) in the kidney of *Pleuronectes americanus*. *Pflügers Arch* 446, 578-584

Hirschfeld RM, Kasper S (2004): A review of the evidence for carbamazepine and oxcarbazepine in the treatment of bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 7, 507-522

Huang W, Wang H, Kekuda R, Fei YJ, Friedrich A, Wang J, Conway SJ, Cameron RS, Leibach FH, Ganapathy V (2000): Transport of N-acetylaspartate by the Na⁺-dependent high-affinity dicarboxylate transporter NaDC3 and its relevance to the expression of the transporter in the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 392-403

Inoue K, Zhuang L, Ganapathy V (2002a): Human Na⁺-coupled citrate transporter: primary structure, genomic organization, and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 465-471

Inoue K, Zhuang L, Maddox DM, Smith SB, Ganapathy V (2002b): Structure, function, and expression pattern of a novel sodium-coupled citrate transporter (NaCT) cloned from mammalian brain. *J Biol Chem* 277, 39469-39476

Inui KI, Masuda S, Saito H (2000): Cellular and molecular aspects of drug transport in kidney. *Kidney Int* 58, 944-958

Jacobi F, Wittchen HU, Holtin CC, Hofer M, Pfister H, Müller N, Lieb T (2004): Prevalence, co-morbidity and correlates of mental disorders in the general population: results from the German Health Interview and Examination Survey (GHS). *Psychol Med* 34, 597-611

Kekuda R, Wang H, Huang W, Pajor AM, Leibach FH, Devoe LD, Prasad PD, Ganapathy V (1999): Primary structure and functional characteristics of a mammalian sodium-coupled high affinity dicarboxylate transporter. *J Biol Chem* 274, 3422-3429

Kessing LV, Sondergaard L, Kuist K, Anderson PK (2005): Suicide risk in patients treated with lithium. *Arch Gen Psychiatry* 62, 860-866

Khatri IA, Kovacs SV, Forstner JF (1996): Cloning of the cDNA for a rat intestinal Na⁺/dicarboxylate cotransporter reveals partial sequence homology with a rat intestinal mucin. *Biochim Biophys Acta* 1309, 58-62

Kyte J, Doolittle RF (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132

Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G (2006): Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol* 103, 97-106

Li M, Anderson GD, Wang J (2006): Drug-drug interactions involving membrane transporters in the human kidney. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2, 505-532

Markovich D, Murer H (2004): The SLC13 gene family of sulphate/corboxylate cotransporters. *Pflugers Arch* 447, 594-602

Markovich D, Werner A, Murer H: Expression cloning with *Xenopus* oocytes. In: Hildebrandt F, Igarashi P (eds): *Techniques in molecular medicine*. Springer, Berlin Heidelberg New York 1999, 310-318

Martin M, Ferrier B, Baverel G (1989): Transport and utilization of α -ketoglutarate by the rat kidney in vivo. *Pflugers Arch* 413: 217-224

Middelberg C: Die Bedeutung der Hüllschichten der *Xenopus*-Oocyte für den Effekt der Antiarrhythmika Propafenon, Flecainid und Verapamil auf den klonierten Kaliumkanal Kv2.1. *Med. Diss. Münster* 2004

Müller-Oerlinghausen B, Berghofer A, Ahrens B (2003): The antisuicidal and mortality-reducing effect of lithium prophylaxis: consequences for guidelines. *Can J Psychiatry* 48, 433-439

Muzina DJ, Calabrese JR (2005): Maintenance therapy in bipolar disorders: focus on randomized controlled trials. *Aust N Z J Psychiatry* 39, 652-661

Nieth H, Schollmeyer P (1966): Substrate-utilization of the human kidney. *Nature* 209, 1244-1245

Ohlemeyer C, Meyer JW: The Faraday cage and grounding experiments. In: Gatyn R, Kettenmann H (eds): *Practical electrophysiological methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology*. 1st ed. Jossey-Bass Verlag New York 1992, 3-5

Oshiro N und Pajor AM (2005): Funktional characterization of a high affinity Na(+)/dicarboxylate cotransporter found in *Xenopus laevis* kidney and heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1159-C1168

Pajor AM (1995): Sequence and functional characterization of a renal sodium/dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 270, 5779-5785

Pajor AM (1996): Molecular cloning and functional expression of a sodium-dicarboxylate cotransporter from human kidney. *Am J Physiol* 270, F642-F648

Pajor AM (1999): Sodium-coupled transporters for Krebs cycle intermediates. *Annu Rev Physiol* 61, 663-682

Pajor AM (2000): Molecular properties of sodium/dicarboxylate cotransporters. *J Membr Biol* 175, 1-8

Pajor AM (2006): Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflugers Arch* 451, 597-605

Pajor AM, Sun N (1996): Functional differences between rabbit and human Na(+)-dicarboxylate cotransporters. *Am J Physiol* 271, F1093-F1099

Pajor AM, Sun N (1999): Protein kinase C-mediated regulation of the renal Na⁺/dicarboxylate cotransporter, NaDC-1. *Biochim Biophys Acta* 1420, 223-230

Pajor AM, Sun N (2000): Molecular cloning, chromosomal organization, and functional characterization of a sodium-dicarboxylate cotransporter from mouse kidney. *Am J Renal Physiol* 279, F482-F490

Pajor AM, Hirayama BA, Loo DD (1998a): Sodium and lithium interactions with the Na⁺/Dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 273, 18923-18929

Pajor AM, Sun N, Bai L, Markovich D, Sule P (1998b): The substrate recognition domain in the Na⁺/dicarboxylate and Na⁺/sulfate cotransporters is located in the carboxy-terminal portion of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1370, 98-106

Pajor AM, Kahn ES, Gangula R (2000): Role of cationic amino acids in the Na(+)-dicarboxylate co-transporter NaDC1. *Biochem J* 350, 80-89

Pajor AM, Gangula R, Yao X (2001): Cloning and functional characterization of a high-affinity Na⁺/dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol* 280, C1215-C1223

Pikurves D, Augustine GJ, Fitzpatr D, Katz LC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM (eds): Neuroscience. Kapitel I. Neural Signaling, 3. Voltage-Dependent Membrane Permeability. Sinauer Associates, Sunderland, USA, 2001 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=neurosci> (letzter Zugriff 21.11.2006)

Quiroz JA, Singh J, Gould TP, Denicoff KD, Zarate CA, Maniji JR, Maniji HK (2004): Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: clues from the molecular pathophysiology. *Mol Psychiatr* 9, 756-776

Schou M (1997) Forty years of lithium treatment. *Arch Gen Psychiatry* 54, 9-13

Schou M (1998): The effect of prophylactic lithium on mortality and suicidal behavior: a review for clinicians. *J Affect Disord* 50, 253-259

Sekine T, Cha SH, Hosoyamada M, Kanai Y, Watanabe N, Furuta Y, Fukuda K, Igarashi T, Endou H (1998): Cloning, functional characterization, and localization of a rat renal Na⁺-dicarboxylate transporter. *Am J Physiol* 275, F298-F305

Sekine T, Miyazaki H, Endou H (2006): Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F251-261

Sheridan E, Rumrich G, Ullrich KJ (1983): Reabsorption of dicarboxylic acids from the proximal convolution of rat kidney. *Pflugers Arch* 399, 18-28

Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y (2006): Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci* 27, 425-446

Simpson DP (1983): Citrate excretion: a window on renal metabolism. *Am J Physiol* 224, F223-F224

Steffgen J, Göttingen: mündliche Mitteilungen, 2000

Steffgen J, Burckhardt BC, Langenberg C, Kuhne L, Muller GA, Burckhardt G, Wolff NA (1999): Expression cloning and characterization of a novel sodium-dicarboxylate cotransporter from winter flounder kidney. *J Biol Chem* 274, 20191-20196

Stühmer W (1998): Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol* 207, 319-339

Thomsen K, Schou M (1999): Avoidance of lithium intoxication: advice based on knowledge about the renal lithium clearance under various circumstances. *Pharmacopsychiatry* 32, 83-86

Timmer RT, Sands JM (1999): Lithium Intoxication. *J Am Soc Nephrol* 10, 666-674

Tondo L, Hennen J, Baldessini RJ (2001): Suicide risk with long term lithium treatment in major affective illness: a meta analysis. *Acta Psychiatr Scand* 104, 162-172

Ullrich KJ (1997): Renal transporters for organic anions and organic cations. Structural requirements for substrates. *J Membr Biol* 158, 95-107

Ullrich KJ (1999): Affinity of drugs to the different renal transporters for organic anions and organic cations. *Pharm Biotechnol* 12, 159-179

Ullrich KJ, Fasold H, Rumrich G, Kloss S (1984): Secretion and contraluminal uptake of dicarboxylic acids in the proximal convolution of rat kidney. *Pflugers Arch* 400, 241-249

Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S (2000): The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 10, 1-12

Wang H, Fei YJ, Kekuda R, Yang-Feng TL, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2000): Structure, function, and genomic organization of human Na⁺-dependent high-affinity dicarboxylate transporter. *Am J Physiol* 278, C1019-C1030

Wang HC, Beer B, Sassano D, Blume AJ, Ziai M (1991): Gene Expression in *Xenopus* oocytes. *Int J Biochem* 23, 271-276

Wright EM, Wright SH, Hirayama B, Kippen I (1982): Interactions between lithium and renal transport of Krebs cycle intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 7514-7517

Wright SH, Dantzer WH (2004): Molecular and cellular physiology of renal organic anion transport. *Physiol Rev* 84, 987-1049

Wright SH, Kippen I, Klinenberg JR, Wright EM (1980): Specificity of the transport system for tricarboxylic acid cycle intermediates in renal brush border. *J Membr Biol* 57, 73-82

Wright SH, Kippen I, Wright EM (1982): Stoichiometry of Na⁺-succinate cotransport in renal brush border membranes. *J Biol Chem* 157: 1773-1778

Yao X, Pajor AM (2000): The transport properties of human renal Na⁽⁺⁾-dicarboxylate cotransporter under voltage clamp conditions. *Am J Renal Physiol* 279, F54-F64

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. phil. nat. B. C. Burckhardt für die unermüdliche und hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. G. Burckhardt für konstruktive Kritik.

Ich danke Frau I. Markmann für die Hilfe im Labor und allen anderen Mitarbeitern des Institutes der Vegetativen Physiologie, die mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. med. J. Steffgen für die Initiierung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Ich wurde als Christine Menzel am 14.12.1977 in Goslar als erstes Kind von Reinhard G. Menzel, Diplom-Mathematiker, und Agnes Menzel, geb. Wolff, Diplom-Sozialpädagogin, geboren. Als ich 10 Monaten alt war zogen meine Eltern mit mir nach Montreal, Kanada. Dort wurden meine beiden jüngeren Brüder Peter und Philipp geboren. Meine Schulbildung von 1983 bis 1993 erhielt ich an der Miss Edgar's and Miss Cramp's School in Montreal, Kanada. 1993 zog ich nach Deutschland und besuchte bis zum Abitur 1997 die Jugenddorf-Christophorusschule (Dr. Wilhelm-Meyer Gymnasium) in Braunschweig, Deutschland. Nach dem Abitur absolvierte ich von August 1997 bis Januar 1998 ein Krankenpflegepraktikum an den HEH-Kliniken in Braunschweig und nahm im Sommer 1998 das Medizinstudium in Göttingen auf. Dort legte ich im März 2000 die ärztliche Vorprüfung und im März 2001 das erste Staatsexamen ab. Von September 2001 bis September 2002 studierte ich im Rahmen des europäischen Erasmus-Programms an der Universität Lille in Frankreich. Im April 2004 legte ich in Göttingen das zweite Staatsexamen ab. Anschließend arbeitete ich im Rahmen des Praktischen Jahres (PJ) am Reinhard-Nieter-Krankenhaus in Wilhelmshaven, wo ich im April 2005 das dritte Staatsexamen bestand. Ich beendete das Medizinstudium mit der Gesamtnote 1,66. Kurz darauf erhielt ich die Approbation als Ärztin in Deutschland. Ab Oktober 2005 studierte ich an der Hebräischen Universität in Jerusalem, Hadassah, im internationalen Programm Öffentliche Gesundheit (Public Health), was ich im Mai 2007 mit einem Master of Public Health (MPH) abschloss. Seit Juni 2007 arbeite ich in Köln in der Cochrane Haematological Malignancies Group als Reviewer. Dank meiner Auslandsaufenthalte spreche ich fließend deutsch, englisch und französisch. Ich spiele Geige und musiziere seit 1987 in verschiedensten Orchestern, darunter über viele Jahre in der Akademischen Orchestervereinigung in Göttingen und in Israel im Tismoret HaSimfonit Campus Ramat HaSharon in Tel-Aviv. Seit 2007 bin ich Mitglied in der Jungen Sinfonie Köln. Seit Mai 2006 bin ich verheiratet mit dem Diplom-Physiker Dr. rer. nat. Olaf Herbst.