

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

**Transport von Glutathion über natriumabhängige Transporter der
basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von
Lena Schorbach
aus
Volkmarsen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Asif

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2011

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Posterpräsentation:

Schorbach L, Burckhardt G, Burckhardt BC (2010):

Transport von Glutathion über den Natrium-abhängigen Dikarboxylat-Transporter (NaDC3).

Kongress für Nephrologie/ 1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie,

Göttingen 26. – 29.09.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Die Rolle des Glutathions im Körper	1
1.1.1 Synthese und Struktur des Glutathions.....	1
1.1.2 Biologische Funktionen des Glutathions	3
1.2 Die Ausscheidung des Glutathions über die Nieren	5
1.2.1 Die renale Ausscheidung von Glutathion	5
1.2.2 Transport von Dicarboxylaten in der Niere	7
1.3 Die Gen-Familie der Sulfat- und Carboxylat-Transporter: SLC13.....	8
1.3.1 Die Natrium-Carboxylat-Transporter (NaC's)	10
1.3.2 Charakteristika des humanen natriumabhängigen Dicarboxylat-Transporters (hNaDC3)..	10
1.3.3 Charakteristika des humanen natriumabhängigen Citrat-Transporters (hNaCT)	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien.....	15
2.2 Geräte und Zubehör.....	16
2.3 Reaktions-Kits und Enzyme	18
2.4 Lösungen und Medien.....	18
2.5 cRNA-Synthese	20
2.5.1 Anzucht der E.coli-Kulturen und Plasmidpräparation	20
2.5.2 Verdau mit Restriktionsenzymen und Aufreinigung des geschnittenen Plasmids.....	20
2.5.3 Synthese der cRNA	21
2.6 <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten als Expressionssystem	23
2.6.1 Entnahme und Selektionierung der Oozyten	23
2.6.2 Injektion der cRNA in Oozyten.....	25
2.7 Aufnahme radioaktiv markierter Substrate	26
2.7.1 Vorinkubation der Oozyten	26
2.7.2 Aufnahme radioaktiv markierter Substanzen.....	26
3 Ergebnisse	28
3.1 Zeitabhängigkeit der hNaDC3-vermittelten Aufnahme von Succinat.....	28

3.2 Interaktionen von Succinat mit zusätzlich verwendeten Substanzen bzw. Reaktionsprodukten am hNaDC3-Transporter.....	30
3.2.1 Einfluss von Dithiothreitol oder oxidiertem Glutathion auf die Succinat-Aufnahme	30
3.2.2 Einfluss von GSH und dessen Aminosäurebausteinen auf die Succinat-Aufnahme.....	31
3.3 Optimierung der Versuchsbedingungen	33
3.3.1 Erhöhung der Konzentration an Glutathion im Versuchsmedium	33
3.3.2 Dixon-Plot zur Bestimmung der K_i	34
3.3.3 H_2O_2 -Vorinkubation hNaDC3-injizierter Oozyten zur intraozytären GSH-Depletion	36
3.3.4 Erhöhung der Substratkonzentration und zusätzliche Vorinkubation der Oozyten	37
3.4 Hemmbarkeit des hNaDC3-vermittelten Transports von Succinat nach Versuchsmodifikation	38
3.4.1 Interaktionen am hNaDC3-Transporter durch GSH und GSSG	39
3.4.2 Interaktionen am hNaDC3-Transporter durch GSH und dessen Aminosäurebausteine	41
3.5 Überprüfung einer Mitbeteiligung des hNaCT am renalen GSH-Transport.....	43
3.5.1 H_2O_2 -Vorinkubation hNaCT-injizierter Oozyten zur intraozytären GSH-Depletion	43
3.5.2 Hemmbarkeit des hNaCT-vermittelten Citrat-Transports durch GSH.....	44
3.5.3 Natriumabhängigkeit des hNaCT-vermittelten Transports von [^{35}S]-GSH	45
4 Diskussion	47
4.1 Testen der idealen Versuchsbedingungen.....	47
4.1.1 Zeitreihe des hNaDC3-Transporters	48
4.1.2 Einfluss von Substratkonzentration und H_2O_2 -Vorbehandlung.....	49
4.1.3 Einfluss von DTT auf die Interaktionsfähigkeit von GSH am hNaDC3-Transporter	50
4.2 Interaktionen am hNaD3-Transporter	52
4.2.1 Hemmbarkeit der Succinat-Aufnahme durch Glutathion.....	52
4.2.2 Hemmbarkeit der Succinat-Aufnahme durch den Redoxpartner GSSG	53
4.2.3 Hemmbarkeit der Succinat-Aufnahme durch die Aminosäurebausteine	54
4.3 Der humane natriumabhängige Citrat-Transporter (hNaCT).....	56
4.3.1 Transport von Glutathion über den hNaCT	57
4.3.2 Natriumabhängigkeit des Glutathion-Transports.....	58
4.4 Ausblick	59
5 Zusammenfassung.....	60
6 Literaturverzeichnis.....	61

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Strukturformel des GSH (freie Säure)	1
Abb.1.2: Biosynthese des Glutathions	2
Abb. 1.3: Redozyklus des GSH	3
Abb. 1.4: Übersicht über den renalen GSH-Metabolismus und -Transport	6
Abb. 1.5: Strukturformel des Succinat-Anions	7
Abb. 1.6: Phylogenetischer Stammbaum der SLC13-Genfamilie	8
Abb. 2.1: <i>Xenopus laevis</i>	23
Abb. 2.2: Oozyten nach der Entnahme	24
Abb. 2.3: Injektion der cRNA in Oozyten.....	25
Abb. 2.4: Szintillationscounter	27
Abb. 3.1: Zeitabhängigkeit der Succinat-Aufnahme in hNaDC3-exprimierenden Oozyten	29
Abb. 3.2: Versuch des Nachweises einer Hemmung der Succinat-Aufnahme durch GSH und GSSG ...	31
Abb. 3.3: Einfluss von GSH und dessen Aminosäurebausteinen auf die Succinat-Aufnahme	32
Abb. 3.4: Erhöhung der GSH-Konzentration im Versuchsmedium auf 3 mM.....	34
Abb. 3.5: Dixon-Plot zur Bestimmung der K_j	35
Abb. 3.6: Beeinflussung der hNaDC3-vermittelten Succinat-Aufnahme durch H_2O_2 -Vorinkubation ..	37
Abb. 3.7: Beeinflussung der Succinat-Aufnahme durch erhöhte Substratkonzentration und zusätzliche Vorinkubation der Oozyten.....	38
Abb. 3.8: Hemmbarkeit der Succinat-Aufnahme durch GSH und GSSG nach Versuchsmodifikation...	40
Abb. 3.9: Hemmbarkeit der Succinat-Aufnahme durch GSH und dessen Aminosäurebausteine nach Versuchsmodifikation	42
Abb. 3.10: Beeinflussung der hNaCT-vermittelten Citrat-Aufnahme durch H_2O_2 -Vorinkubation	44
Abb. 3.11: Hemmbarkeit der hNaCT-vermittelten Citrat-Aufnahme durch GSH.....	45
Abb. 3.12: Natriumabhängigkeit der GSH-Aufnahme über den hNaCT-Transporter.....	46
Abb. 4.1: Strukturformel des GSSG	53
Abb. 4.2: Strukturformeln der Aminosäurebausteine des GSH: Glycin, Cystein und Glutaminsäure...	56

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Übersicht über die SLC13-Gen-Familie	9
Tab. 1.2: Substratspezifität des humanen natriumabhängigen Dicarboxylat-Transporters (hNaDC3) .	12
Tab. 1.3: Substratspezifität des humanen natriumabhängigen Citrat-Transporters (hNaCT).....	13
Tab. 2.1: Auflistung verwendeter Chemikalien	16
Tab. 2.2: Auflistung verwendeter Materialien und Geräte	17
Tab. 2.3: Auflistung verwendeter Reaktions-Kits	18
Tab. 2.4: Auflistung verwendeter Medien.....	19

1 Einleitung

1.1 Die Rolle des Glutathions im Körper

1.1.1 Synthese und Struktur des Glutathions

Glutathion (GSH) ist ein ubiquitär im Organismus vorkommender Stoff, der an einer Vielzahl physiologischer und metabolischer Prozesse beteiligt ist. Es handelt sich dabei um ein Tripeptid (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-Glycin), bestehend aus Glycin, Cystein und Glutamat. Funktionell bedeutsam ist die endständige Thiolgruppe des Cysteins, über die GSH in seiner reduzierten Form verfügt. Abbildung 1.1 zeigt die Strukturformel des GSH.

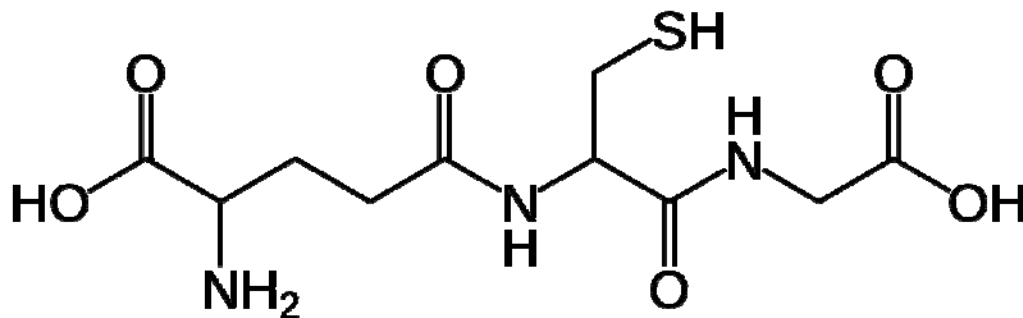


Abb. 1.1: Strukturformel des GSH (freie Säure)

(Quelle: Wikipedia, s.v. Glutathion)

In dieser reduzierten Form liegt GSH intrazellulär unter physiologischen Bedingungen zu 98% vor. Bei den übrigen 2% handelt es sich zum einen um dessen oxidierte Form, das Glutathion-Disulfid (GSSG), zum anderen um poteingebundenes Glutathion. Die intrazelluläre Konzentration von GSH liegt zwischen 0,5 und 10 mM, extrazellulär liegt sie etwa 200fach niedriger (LASH und JONES 1984; WANG W und BALLATORI 1998). Glutathion kann in allen Zellen des Organismus synthetisiert werden (MEISTER und TATE 1976), allerdings erfolgt die Synthese hauptsächlich in der Leber (DELEVE und KAPLOWITZ 1991). In zwei Reaktionsschritten wird dort im Cytosol GSH aus den drei Aminosäuren L-Glutamat, L-Cystein und Glycin unter Verbrauch von zwei Mol ATP pro Mol GSH synthetisiert. Dazu erfolgt in einem ersten Schritt durch Katalyse der γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase eine

Peptidbindung zwischen Glutamat und Cystein, anschließend erfolgt durch die Glutathion-Synthetase die Bindung zwischen dem Glycin und der Carboxylgruppe des Cysteins. Ungewöhnlich an dieser Struktur ist die Peptidbindung über die γ -Carboxylgruppe des Glutamats statt über die normalerweise genutzte α -Carboxylgruppe. Auf diese Weise wird erreicht, dass der Abbau des GSH nur durch die γ -Glutamyltransferase (γ -GT) erfolgen kann. Somit ist GSH vor intrazellulärem Abbau geschützt und kann lediglich extrazellulär in solchen Zellen abgebaut werden, die über die γ -GT auf ihrer Zellmembran verfügen. Der weitere Abbau von GSH erfolgt daraufhin über Dipeptidasen; die entstandenen Aminosäuren können zur erneuten Synthese reabsorbiert werden. In Abbildung 1.2 ist die Synthese des GSH schematisch dargestellt.

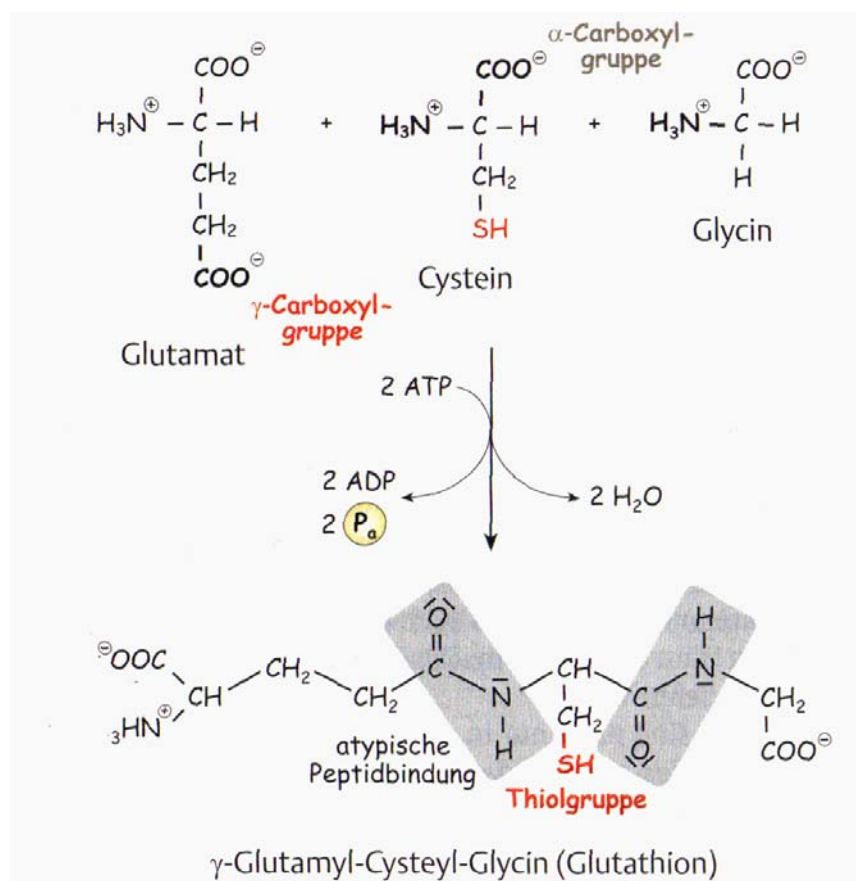


Abb.1.2: Biosynthese des Glutathions

(Quelle: HORN et al. 2002, Seite 481)

1.1.2 Biologische Funktionen des Gluthathions

Glutathion ist im menschlichen Organismus an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt. Eine der wichtigsten Aufgaben besteht in seiner Funktion als Schutz der Zelle und der Enzyme vor oxidativem Stress. Folgender Mechanismus liegt dem zugrunde: die endständige Thiolgruppe des Cysteins wird selbst oxidiert, d.h. es wird ein Wasserstoffatom abgegeben. Katalysiert wird diese Reaktion entweder Selen-abhängig durch die GSH-Peroxidase oder Selen-unabhängig mittels Glutathion-S-Transferase. Das reduzierte Glutathion wird dabei oxidiert und reagiert mit einem weiteren Molekül GSH unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zu einem Dimer, dem Glutathion-Disulfid (GSSG). Durch Katalyse des Enzyms GSSG-Reduktase wird dieses unter Verbrauch von NADPH/H^+ wieder zu zwei Molekülen Glutathion reduziert (siehe Abbildung 1.3). Da es sich dabei um einen sehr effektiven enzymatischen Prozess handelt, liegen intrazellulär etwa 98% des Glutathions in der reduzierten Form vor (WANG W und BALLATORI 1998).

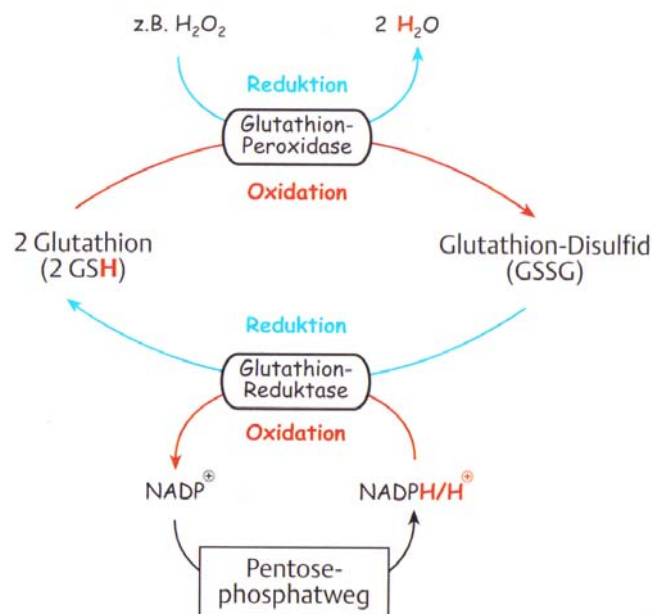


Abb. 1.3: Redoxzyklus des GSH

(Quelle: HORN et al. 2002, Seite 482)

Des Weiteren wird intrazelluläres GSH als Speicher für Cystein genutzt. Unter physiologischen Bedingungen findet in der Regel eine Autooxidation des Cysteins zu Cystin statt, wobei freie Radikale entstehen (OLNEY et al. 1990). Diese Toxizität wird vermieden, indem der Großteil des nicht-proteingebundenen Cysteins als GSH-Bestandteil gespeichert wird.

Eine weitere sehr wichtige Aufgabe des GSH besteht in seiner Entgiftungsfunktion. Fremdstoffe, toxische Metabolite oder Metalle werden entweder spontan durch GSH konjugiert oder es erfolgt eine durch die Glutathion-S-Transferase katalysierte Reaktion (BOYLAND und CHASSEAUD 1969; COLES und KETTERER 1990; HINCHMAN und BALLATORI 1994; JAKOBY 1978; MANNERVIK 1985).

Glutathion-S-Transferasen sind eine Familie multifunktionaler Enzyme, die im Cytosol fast aller Zellen vorhanden sind (MANNERVIK 1985). In der Regel wird bei diesen Reaktionen GSH an elektrophilen Kohlenstoff gebunden, sodass die mit GSH konjugierten Substanzen besser wasserlöslich werden und renal eliminiert werden können. Einige Beispiele für Substanzen, an deren Detoxifikation GSH beteiligt ist, sind Quecksilber und andere Schwermetalle, sowie Trichlorethylen, Epoxide und aromatische Kohlenstoffverbindungen.

Es kann allerdings durch die Konjugation mit Glutathion auch zur toxisierenden Wirkung kommen. Als Beispiel ist Dibromoethan anzuführen, das durch die Reaktion zu einem hochreaktiven Karzinogen wird (RANNUG 1980).

Als weiteren Punkt bezüglich der Funktion des GSH ist dessen Beteiligung an zahlreichen enzymatischen Reaktionen im Organismus zu erwähnen, wie beispielsweise die Arachidonsäurekaskade, in deren Verlauf sowohl Leukotriene als auch Prostaglandine entstehen, beides Mediatoren, zu deren Bildung GSH einen wichtigen Beitrag leistet. Zuletzt sei zu nennen, dass sowohl GSH als auch GSSG durch ihre Bindung an Enzyme diese erst aktivieren bzw. inhibieren können (GILBERT 1982).

1.2 Die Ausscheidung des Glutathions über die Nieren

1.2.1 Die renale Ausscheidung von Glutathion

Obwohl der größte Teil des körpereigenen GSH in der Leber synthetisiert wird, sind die Nieren das zentrale Organ, was die Homöostase und den Metabolismus des Glutathions betrifft. Der Grund dafür ist der hohe Bedarf an GSH zum Schutz vor oxidativem Stress, dem die Nieren ausgesetzt sind, sei es durch erhöhten aeroben Metabolismus oder aber durch die zahlreichen potentiell toxischen Stoffe, deren Ausscheidungsort die Nieren sind. Dieser Bedarf an GSH wird zum einen durch einen Transport von extrazellulär, zum anderen durch eine erhöhte Syntheseleistung intrazellulär gedeckt. Zudem verfügen die Nieren über große Mengen an Enzymen des Redox-Zyklus wie der GSSG-Reduktase und der GSH-Peroxidase (LASH und PUTT 1999).

Bereits während einer Passage durch Glomerulus und Nephron werden mehr als 80% des Plasma-GSH aus dem Blut entfernt, ein Wert, der die alleinige Filtrationsfähigkeit der Niere übersteigt (HÄBERLE et al. 1979; RANKIN et al. 1985). Demzufolge muss ein Teil der renalen GSH-Extraktion zusätzlich über Sekretionsmechanismen, sehr wahrscheinlich im proximalen Tubulus, erfolgen (RANKIN et al. 1985). Diese Transportmechanismen wurden erstmals von LASH und JONES 1984 untersucht, die damals eine Natriumabhängigkeit der GSH-Aufnahme über die basolaterale Membran proximaler Tubuluszellen entdeckten. Welche Transportsysteme dafür in Frage kommen oder von Lash diskutiert wurden, soll im Rahmen dieser Dissertationsarbeit weitergeführt werden.

Die renale Extraktion des Glutathions aus dem Plasma erfolgt auf zwei Wegen: Zum einen durch Filtration und intraluminalen Degradierung des GSH durch die γ -GT, zum anderen durch Transport aus dem Plasma mittels aktiver Transportsysteme über die basolaterale Membran und anschließender luminaler Sekretion über Transportsysteme der Bürstensaummembran (INOUE und MORINO 1985). Dabei handelt es sich um einen potentialabhängigen Prozess, da proximale Tubuluszellen ein innen negatives Potenzial von -70 mV besitzen, das den Efflux des negativ geladenen GSH begünstigt. Zum anderen liegt die luminalen GSH-Konzentration etwa 2 - 3fach unter der intrazellulären Konzentration an GSH, welches den Efflux entlang dem Konzentrationsgradienten begünstigt. Welche Transporter für die Sekretion in Frage kommen, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Es sind jedoch Proteine bekannt, die in der Bürstensaummembran lokalisiert sind und zu deren Substraten auch Glutathion gehört wie beispielsweise die „multidrug resistance-associated proteins (MRP's)“ oder das „Organische

Anionen transportierende Polypeptid (OATP1)“ (BALLATORI et al. 2009). Einen Überblick über die bisher bekannten an der Extraktion von GSH beteiligten Transporter gibt Abbildung 1.4.

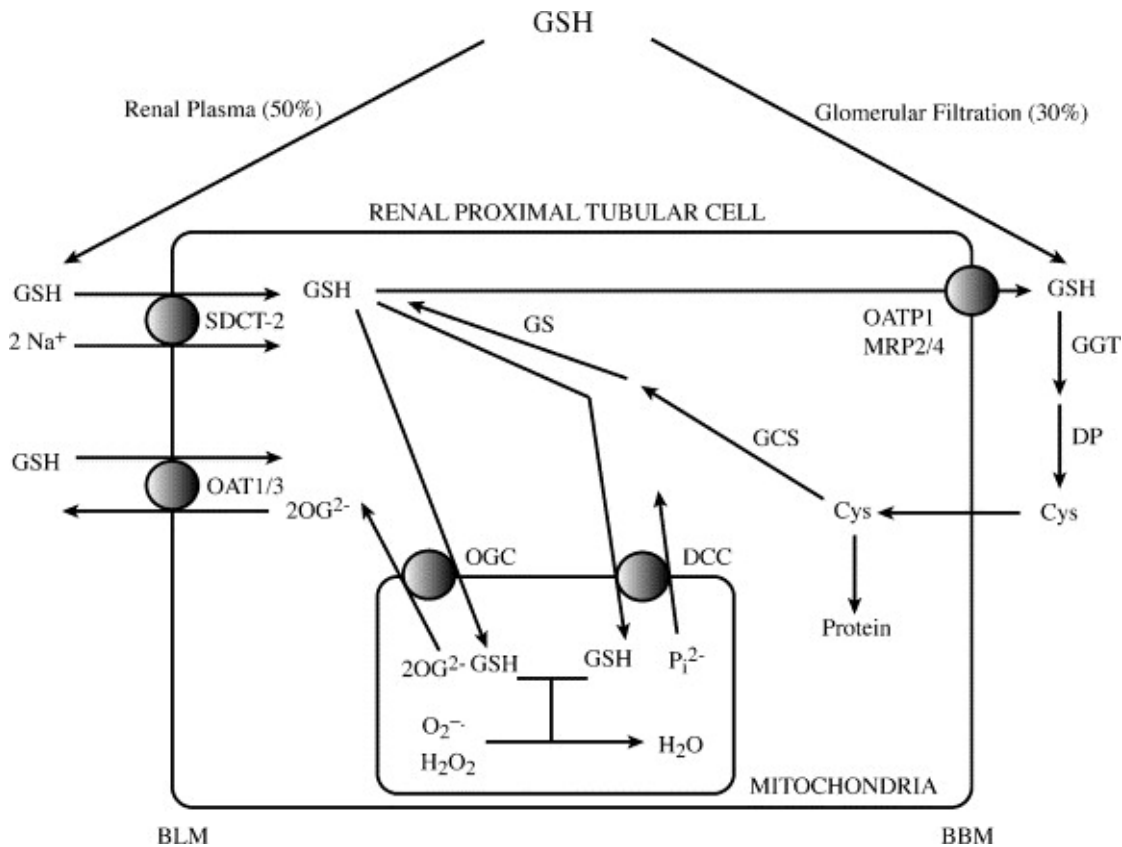


Abb. 1.4: Übersicht über den renalen GSH-Metabolismus und -Transport

(Quelle: LASH 2005, Seite 332)

In dieser Abbildung hat Lash alle Prozesse dargestellt, die den renalen GSH-Stoffwechsel beeinflussen. Dies umfasst Transport, Synthese und Abbau des Glutathions. In den Nieren werden etwa 80% des GSH aus dem Blut extrahiert. 30% davon werden glomerulär filtriert, die übrigen 50% werden über die Basolateralmembran (BLM) aufgenommen. Diese Aufnahme erfolgt entweder natriumabhängig (SDCT-2) oder im Austausch gegen 2-Oxoglutarat (2OG²⁻) über die organischen Anionen-Transporter OAT1/3. In das Lumen erfolgt entweder ein Efflux über das „Organische Anionen Transportierende Polypeptid“ (OATP1) oder die „multidrug resistance-associated proteins“ (MRP2/4). Weiterhin wird eine Aufnahme in die Mitochondrien im Austausch gegen 2OG²⁻ über den Oxoglutarat-Transporter (OGC) bzw. anorganische Phosphate (P_i²⁻) über einen Dicarboxylat-Transporter (DCC) diskutiert. Innerhalb der Mitochondrien dient GSH der Aufrechterhaltung des Redoxstatus. Auf der Außenseite der luminalen Membran (BBM) erfolgt durch die γ-GT (GGT) und Dipeptidasen (DP) der Abbau des GSH in seine Aminosäuren, beispielhaft ist Cystein (Cys) abgebildet. Über luminalen Aminosäuretransporter werden diese resorbiert und stehen intrazellulär zur erneuten Synthese von GSH zur Verfügung. Diese GSH-Synthese wird durch die γ-Glutamyl-Cystein-Synthetase (GCS) und die Glutathion-Synthetase (GS) katalysiert.

1.2.2 Transport von Dicarboxylaten in der Niere

Da GSH mit seinen zwei endständigen Carboxylgruppen (Abb. 1.1) in seiner Struktur sehr den Dicarboxylaten ähnelt, liegt die Vermutung nahe, wie auch von Lash (LASH 2005) schon angesprochen, dass GSH über Dicarboxylat-Transporter in die proximale Tubuluszelle aufgenommen werden kann.

Unter aeroben Bedingungen entstehen im Rahmen des Citratzyklus ubiquitär im Organismus Di- und Tricarboxylate, wie beispielsweise Succinat, α -Ketoglutarat, Fumarat oder Citrat, deren Gemeinsamkeit zwei endständige Carboxylgruppen (-COOH) sind.

Succinat ist das Salz der Bernsteinsäure (HOOC-CH₂-CH₂-COOH). Es kommt im Organismus aller Lebewesen als Succinat-Anion vor (Abbildung 1.5).

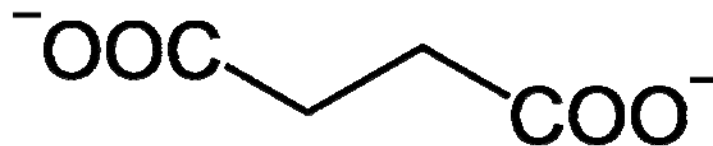


Abb. 1.5: Strukturformel des Succinat-Anions

(Quelle: Wikipedia, s.v. Succinate)

In den proximalen Tubuluszellen der Nieren werden über die natriumabhängigen Dicarboxylat-Transporter Metabolite des Citratzyklus sowohl über die apikale Membran aus dem Ultrafiltrat als auch über die basolaterale Membran aus dem Blut resorbiert. Man unterscheidet dabei beim Menschen ein Transportsystem der apikalen Bürstensaummembran mit niedriger Substrataffinität (hNaDC1) von einem der basolateralen Membran mit hoher Substrataffinität (hNaDC3) (PAJOR 2006).

1.3 Die Gen-Familie der Sulfat- und Carboxylat-Transporter: SLC13

Die SLC13-Gen-Familie umfasst den Menschen betreffend insgesamt fünf Mitglieder, die in ihrer Aminosäuresequenz zu etwa 40 - 50% identisch sind. Auch in weiteren Spezies, beginnend beim Fisch bis hin zu Säugetieren, sind Transportproteine mit verwandten Gensequenzen und Funktionen der SLC13-Familie nachweisbar (PAJOR 2006). Unterteilt wird diese Gen-Familie in zwei große Gruppen, die Natrium-Sulfat-Transporter (NaS) und die Natrium-Carboxylat-Transporter (NaC) (MARKOVICH und MURER 2004). Die Proteine werden in zahlreichen Geweben wie Niere, Plazenta, Gehirn oder auch dem Gastrointestinaltrakt exprimiert. Eine Übersicht über die Mitglieder der SLC13-Genfamilie gibt Tabelle 1.1, ein phylogenetischer Stammbaum, der die Verwandtschaft aller bis jetzt bekannten Mitglieder der SLC13-Familie zeigt, ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

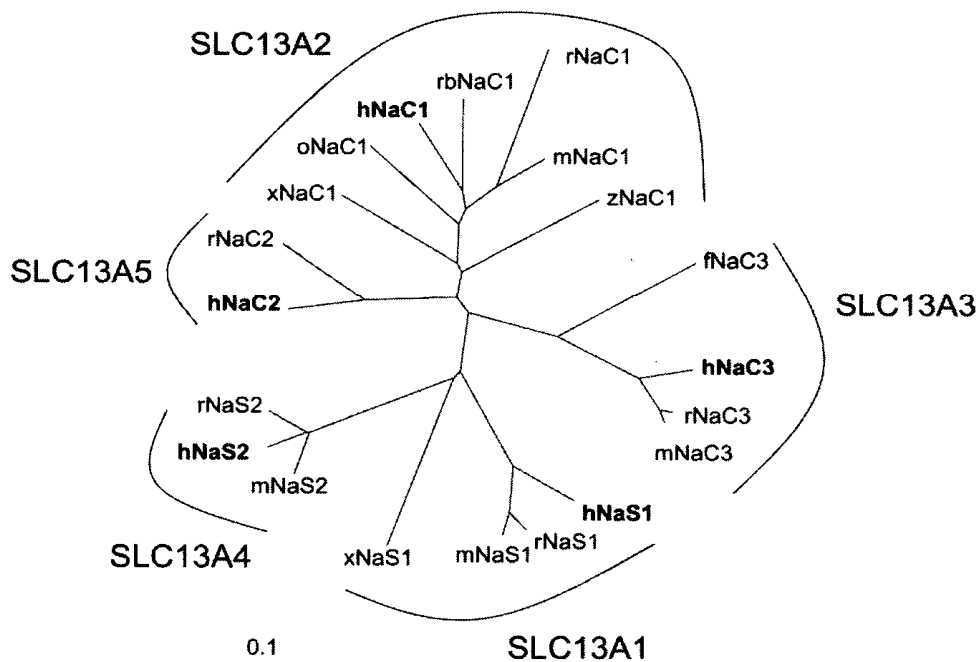


Abb. 1.6: Phylogenetischer Stammbaum der SLC13-Genfamilie
(Quelle: MARKOVICH und MURER 2004, Seite 596)

Gen	Transporter	Gewebeverteilung	Substrate	Spezies	Literatur
SLC13A1	NaS1	Niere (Mensch, Ratte), Gastrointestinaltrakt (Ratte)	Sulfat, K_m 0,4 mM	Mensch, Ratte, Maus, Aal	BECK und MARKOVICH 2000; LEE et al. 2000; MARKOVICH et al. 1993; NAKADA et al. 2005
SLC13A2	NaDC1	Niere, Dünndarm	Dicarboxylate (niedrige Affinität), K_m Succinat 0,8 mM	Mensch, Kaninchen, Opossum, Ratte, Maus, <i>Xenopus</i>	ARUGA et al. 2004; BAI und PAJOR 1997; CHEN XZ et al. 1998; PAJOR 1995; PAJOR 1996; PAJOR und SUN 2000; SEKINE et al. 1998
SLC13A3	NaDC3	Niere, Plazenta, Leber, Gehirn	Dicarboxylate (hohe Affinität), K_m Succinat 20 μ M	Mensch, Ratte, Maus, Flunder, <i>Xenopus</i>	CHEN X et al. 1999; KEKUDA et al. 1999; PAJOR et al. 2001; STEFFGEN et al. 1999; WANG et al. 2000
SLC13A4	NaS2	Plazenta, Hoden, Herz, Leber, Venolen	Sulfat (niedrige Affinität), K_m Sulfat 0,4 mM	Mensch	GIRARD et al. 1999; MARKOVICH et al. 2005
SLC13A5	NaCT	Leber, Gehirn, Hoden	Dicarboxylate, Citrat (K_m 0,6 mM)	Mensch, Ratte, Maus	INOUE et al. 2004; INOUE et al. 2002a; INOUE et al. 2002b

Tabelle 1.1: Übersicht über die SLC13-Gen-Familie

(modifiziert nach: PAJOR 2006, Seite 598)

1.3.1 Die Natrium-Carboxylat-Transporter (NaC's)

Die Natrium-Carboxylat-Transporter (NaC's) umfassen spezieübergreifend eine große Anzahl an Di- und Tricarboxylaten transportierenden Proteinen. Den menschlichen Organismus betreffend sind bisher lediglich drei NaC's identifiziert worden: das SLC13A2 Gen, das für das Protein hNaDC1 steht, sowie das SLC13A3 Gen, das für das Protein hNaDC3, und das SLC13A5 Gen, das für das Protein hNaCT steht. Da für hNaDC3 und hNaCT ein Beitrag zur Aufnahme von GSH vermutet wird und deshalb diese Proteine im Rahmen dieser Dissertationsarbeit untersucht wurden, werden sie nachfolgend näher charakterisiert.

1.3.2 Charakteristika des humanen natriumabhängigen Dicarboxylat-Transporters (hNaDC3)

Bei dem humanen natriumabhängigen Dicarboxylat-Transporter Typ 3 handelt es sich um ein aus 602 Aminosäuren bestehendes Protein mit insgesamt 12 Transmembrandomänen (WANG H et al. 2000). Der hNaDC3 ist ein natriumabhängiges Transportsystem mit hoher Affinität für Dicarboxylate wie beispielsweise Succinat. Exprimiert wird der hNaDC3 in der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen der Niere (WANG J et al. 2003), in der sinusoidalen Membran von Hepatozyten (CHEN X et al. 1999), im Gehirn (YODOYA et al. 2006) sowie in der Plazenta (PAJOR 2006).

Substrate des hNaDC3 sind Dicarboxylate wie Succinat, Dimethylsuccinat, Glutarat, α -Ketoglutarat, Fumarat, *N*-Acetyl-Aspartat und Citrat, wobei α -Ketoglutarat zur Zeit als das physiologische Substrat des hNaDC3 angesehen wird. In den meisten Untersuchungen wird jedoch Succinat als prototypisches Substrat eingesetzt, da es radioaktiv-markiert erhältlich ist. Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die bisher identifizierten Substanzen, mit denen der hNaDC3 interagiert. Diese Resultate wurden entweder in *cis*-Inhibitionsstudien (die Hemmung der Aufnahme von radioaktiv-markiertem Succinat wird in Abhängigkeit aufsteigender Konzentrationen des möglichen Substrats gemessen) oder, wenn das mögliche Substrat in radioaktiv-markierter Form vorlag, direkt in Aufnahmestudien erzielt (HUANG et al. 2000). Da es sich bei dem hNaDC3 um einen elektrogenen Transporter handelt, der drei Natrium-Ionen zusammen mit einem divalenten Succinat transportiert (WANG H et al. 2000), kann auch die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik herangezogen werden (BURCKHARDT et al. 2005). Als Expressionssystem dienten entweder *Xenopus-laevis*-Oozyten (BURCKHARDT et al. 2004; HAGOS et al. 2008) oder eine humane Zelllinie (HUANG et al.

2000). *Xenopus-laevis*-Oozyten besitzen die Eigenschaft, artfremde RNA zu transkribieren und zu translatieren, sodass das artfremde Protein in ihre Plasmamembran eingebaut wird (WAGNER et al. 2000). Die humane Zelllinie (HRPE: Human Retinal Pigment Endothelial) wird mit dem hNaDC3-Protein stabil-transfiziert (HUANG et al. 2000). Sowohl die *Xenopus-laevis*-Oozyten als auch die HRPE-Zellen besitzen wenig endogene Proteine, die mit dem überexprimierten hNaDC3 interagieren können.

Substrat	Expressions- system	Transport (K _m in μM)	Hemmung (IC ₅₀ in μM)	Referenzen
N-Acetylaspartat	HRPE-Zellen		232	HUANG et al. 2000
	Oozyten	300		HUANG et al. 2000
D- und L-Aspartat	HRPE-Zellen		+	WANG H et al. 2000
	HRPE-Zellen		3070	HUANG et al. 2000
Butyrat	HRPE-Zellen		–	WANG H et al. 2000
Citrat	HRPE-Zellen		+	WANG H et al. 2000
	Oozyten	+		WANG H et al. 2000
Dimethylsuccinat	Oozyten	112		WANG H et al. 2000
	HRPE-Zellen		+	WANG H et al. 2000
	Oozyten	+		BURCKHARDT et al. 2005
Dimercaptosuccinat	Oozyten	+		BURCKHARDT et al. 2005
Folat	Oozyten		+	BURCKHARDT et al. 2005
Fumarat	HRPE-Zellen	+		WANG H et al. 2000
	Oozyten	+		BURCKHARDT et al. 2005
Glutamat	HRPE-Zellen		–	HUANG et al. 2000
	Oozyten	+		BURCKHARDT et al. 2005
Glutarat, α-Keto- glutarat	HRPE-Zellen	+	+	WANG H et al. 2000
	Oozyten	40, 45		BURCKHARDT et al. 2005
D2-, L2- u. 3OHGA	Oozyten	164; 267; 930	+	HAGOS et al. 2008
Guanidinosuccinat	Oozyten	–		BURCKHARDT et al. 2005
Lactat	HRPE-Zellen		–	WANG H et al. 2000
	Oozyten	–		WANG H et al. 2000
Malat	HRPE-Zellen		+	WANG H et al. 2000
	Oozyten	+		WANG H et al. 2000

	Oozyten	+		BURCKHARDT et al. 2005
Maleat	HRPE-Zellen		–	WANG H et al. 2000
	Oozyten	–		WANG H et al. 2000
Malonat	HRPE-Zellen		–	WANG H et al. 2000
	Oozyten	–		WANG H et al. 2000
Oxalat	HRPE-Zellen	–	–	WANG H et al. 2000
	Oozyten	–		BURCKHARDT et al. 2005
Oxaloacetat	Oozyten	+		BURCKHARDT et al. 2005
Pyruvat	HRPE-Zellen		–	WANG H et al. 2000
	Oozyten	–		WANG H et al. 2000
Succinat	HRPE-Zellen	20,4	+	WANG H et al. 2000
	Oozyten	102		WANG H et al. 2000
		25		BURCKHARDT et al. 2005
Valerat	HRPE-Zellen		–	WANG H et al. 2000

Tabelle 1.2: Substratspezifität des hNaDC3

Die K_m -Werte wurden entweder elektrophysiologisch oder durch die Aufnahme der markierten Substanz bestimmt. Sie variieren je nach Expressionssystem (Oozyten oder HRPE (Human-Retinal-Pigment-Endothelial-Zellen)) und Versuchsbedingung.

1.3.3 Charakteristika des humanen natriumabhängigen Citrat-Transporters (hNaCT)

Bei dem humanen natriumabhängigen Citrat-Transporter handelt es sich um ein Mitglied der SLC13-Genfamilie. Unter dem Gen-Namen SLC13A5 wird er dabei der Gruppe der Natrium-Carboxylat-Transporter (NaC's) zugeordnet, die Stöchiometrie von Natrium und Substrat liegt bei diesem elektrogenen Transporter bei 4:1 (INOUE et al. 2002b).

Zwar gleicht die Aminosäuresequenz des NaCT der Ratte zu 44 - 50% der des NaDC3 der Ratte (INOUE et al. 2002b), in den funktionellen Eigenschaften unterscheidet er sich allerdings in einigen Punkten deutlich von den anderen Mitgliedern der Carboxylat-Transporter. Am auffälligsten ist diesbezüglich die geringe Affinität, die der hNaCT für Dicarboxylate aufweist. Sein stattdessen bevorzugtes Substrat ist das Tricarboxylat Citrat (INOUE et al. 2002b). Insgesamt weist der hNaCT ohnehin ein deutlich engeres Spektrum an Substraten als der hNaDC3 auf. Substanzen, die über ihn transloziert werden oder mit ihm interagieren, sind in Tabelle 1.3 zusammengestellt. Im Gegensatz zum hNaDC3 wurden beim hNaCT keine IC_{50} -Werte der Hemmung des prototypischen Substrats Citrat gemessen, sondern nur der prozentuale Anteil der Hemmung der Aufnahme von Citrat durch jeweils 2,5 mM der jeweiligen Substanz bestimmt.

Substrat	Transport (K_m in μM)	% der Aufnahme von Citrat
Citrat	650	16
<i>cis</i> -Aconitat		116
Fumarat		92
Isocitrat		125
α -Ketoglutarat		111
Lactat		128
Malat		62
Maleat		121
Malonat		120
Pyruvat		108
Succinat		67

Tabelle 1.3: Substratspezifität des hNaCT

(modifiziert nach: INOUE et al. 2002a)

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Da die Ausscheidungsrate von Glutathion (GSH) die der glomerulären Filtrationsrate übersteigt, muss GSH zusätzlich zur glomerulären Filtration sezerniert werden. Entlang des Nephrons ist der proximale Tubulus Ort vieler Sekretionsvorgänge. Da bereits in früheren Untersuchungen an isolierten Tubuli und an Nierenzellen natriumabhängige Transportmechanismen bei der Aufnahme von GSH in die Zelle aus dem Blutplasma nachgewiesen wurden, lag es nahe, bisher identifizierte natriumabhängige Transporter der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen auf ihre Interaktion mit GSH zu untersuchen. Da GSH zwei endständige Carboxylgruppen besitzt, könnte GSH mit einem Transportsystem für Dicarboxylate interagieren oder sogar von diesem als Substrat akzeptiert werden. Bisher wurden in der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen des Menschen ein natriumabhängiger Dicarboxylat (hNaDC3)- und ein natriumabhängiger Tricarboxylat (hNaCT)-Transporter identifiziert. Beide sind elektrogene Transporter, die drei bzw. vier Natrium-Ionen zusammen mit einem Di- bzw. Tricarboxylat translozieren. Bei Ersatz des Natriums durch ein anderes Kation erfolgt keine Aufnahme des prototypischen Substrats Succinat (hNaDC3) und Citrat (hNaCT). In dieser Arbeit wurden in *cis*-Inhibitionsexperimenten die Interaktionen von GSH mit Succinat und Citrat untersucht, um so Evidenzen für einen GSH-vermittelten Transport über den hNaDC3 bzw. den hNaCT zu erhalten.

2 Material und Methoden

Im nun folgenden Abschnitt werden die für die Versuchsreihen verwendeten Geräte, Chemikalien und Enzyme mit Bezeichnung bzw. entsprechendem Hersteller aufgeführt. Zudem werden die einzelnen Lösungen in ihren Zusammensetzungen und Konzentrationen beschrieben. Im Anschluss daran folgt in chronologischer Reihenfolge die Darstellung eines Versuchsablaufes von der Synthese der verwendeten RNA über das Operieren eines Frosches bis hin zum letztendlichen Aufbau und der Durchführung des Transportexperiments.

2.1 Chemikalien

<u>Stoffbezeichnung</u>	<u>Bezugsfirma</u>
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calcium-Chlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
DL-Dithiothreitol (DL-DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glutathion, reduzierte Form (GSH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glutathion, oxidierte Form (GSSG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Hepes-(N-(2-Hydroxyethyl)- piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure))	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kalium-Chlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase, Type CLS II	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Lithium-Chlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Lumasafe	Lumac LSC, Groningen, Niederlande
Natrium-Chlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

NaOH	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Pyruvat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Succinat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N-Methyl-D-Glucamin (NMDG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tricain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TRIS-Puffer (Tri-(Hydroxymethyl)-Aminoethan)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
[¹⁴ C]-Citrat	GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK
[³⁵ S]-GSH	PerkinElmer, Boston, MA, USA
[¹⁴ C]-Succinat	PerkinElmer, Boston, MA, USA

Tabelle 2.1: Auflistung verwendeter Chemikalien

2.2 Geräte und Zubehör

<u>Gerät</u>	<u>Typenbezeichnung</u>	<u>Bezugsfirma</u>
Feinwaage	Sartorius 2002 MP1	Sartorius AG Mechatronik, Göttingen, Deutschland
Gerät zur Herstellung der Kapillarspitzen	PE-2	Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan
Glaskapillaren (Herstellung der Injektionskanülen)	Sodaklarglas	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Glasmaterialien	Duran	Schott AG, Mainz, Deutschland
Inkubator (37°C, RNA-Synthese)		Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland
Inkubator für Schüttelkulturen	Typ 3031	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Kaltlichtquellen	KL 1500	Schott AG, Mainz, Deutschland
Kühlschrank 4°C (Aufbewahrung der Medien)	FKS 3610	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank –80°C (Aufbewahrung cRNA etc.)	Herafreeze	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland

Magnet-Rührer	KMO2 electronics	Janke & Kunkel GmbH, IKA-Werk, Staufen, Deutschland
Mikroliterpipetten		Eppendorf Deutschland Vertrieb GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mikroskop	Wild M38	Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz
Mini-Vials	6ml, 73680	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Nanoliter-Injektor	Nanoliter 2000	World Precision Instruments, Sarasota, Fl, USA
Oozyteninkubator (16°C)		Eigenbau der Institutswerkstatt
pH-Meter	pH-Meter CG 820	Schott-Geräte GmbH, Hofheim, Deutschland
Plexiglasabschirmung (Strahlenschutz)		Eigenbau in der Institutswerkstatt
Schüttler	Typ 4020	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Szintillationscounter	TRI-CARB 2900 TR	Packard BioScience Company, Meriden, CT, USA
„24-Well-Platten“ für die Inkubation der Oozyten		Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland

Tabelle 2.2: Auflistung verwendeter Materialien und Geräte

2.3 Reaktions-Kits und Enzyme

<u>Enzym/Kits</u>	<u>Bezugsfirma</u>
mMessage mMachine ^R T7 Transcription Kit	Ambion Inc., The RNA Company, Austin, Tx, USA
Pure Yield TM Plasmid Miniprep System	Promega Corporation, Madison, WI, USA
High pure PCR Cleanup Micro Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Not I	Fermentas Life Science GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

Tabelle 2.3: Auflistung verwendeter Reaktions-Kits

2.4 Lösungen und Medien

Oozyten-Ringerlösung (ORI)

NaCl	110 mM
KCl	3 mM
CaCl ₂	2 mM
Hepes	5 mM

Titration mit TRIS-Puffer auf pH 7,5 bei Raumtemperatur

Natriumfreier ORI

KCl	3 mM
CaCl ₂	2 mM
Hepes	5 mM
NMDG	110 mM
HCl	110 mM

Die Zugabe mit HCl bis zum Erreichen des pH-Wertes 7,5 erfolgt, um das entsprechende Anion für NMDG bereit zustellen.

Aufbewahrungs-ORI

In dieser Lösung werden die mit RNA- bzw. Wasser-injizierten Oozyten für 3-4 Tage (bis zur Expression des Transportproteins) bei 16°C inkubiert.

NaCl	110 mM
KCl	3 mM
CaCl ₂	2 mM
Hepes	5 mM
Natrium-Pyruvat	2,5 mM
Gentamycin	0,05 g/l

Titration mit TRIS-Puffer auf pH 7,5 bei Raumtemperatur

Luria-Bertani-Medium (LB)

Hefeextrakt	5g/l
NaCl	10g/l
Trypton	10g/l

Ampicillin-Zugabe im Verhältnis 1:100, Titration mit NaOH auf pH 7,0 bei Raumtemperatur

Übersicht der jeweiligen Versuchsmedien

Zur besseren Übersicht werden die verschiedenen Lösungen mit Abkürzungen versehen. Für die jeweiligen Versuchsmedien wurde als Basis normale Oozyten-Ringerlösung (ORI) unter Zugabe des zu untersuchenden Stoffes verwendet.

Bezeichnung	Zugabe von	Konzentration
ORI _{Gly}	Glycin	3mM
ORI _{Cys}	Cystein	3mM
ORI _{Glu}	Glutamat	3mM
ORI _{GSH}	GSH	3mM
ORI _{GSSG}	GSSG	3mM
ORI _{DTT}	DTT	3mM

Tabelle 2.4: Auflistung verwendeter Medien

Für den Fall, dass abweichende Konzentrationen verwendet wurden, wie beispielsweise für GSH oder Succinat, so wird dies im Text erläutert.

2.5 cRNA-Synthese

Für die Synthese der hNaDC3-RNA wird das mMessage mMachine^R T7 Transcription Kit von Ambion verwendet. Die entsprechende DNA-Matrize wird zuvor in mehreren Arbeitsschritten gewonnen, beginnend mit der Anzucht von Plasmid-tragenden E.coli-Kulturen, über deren Aufreinigung bis hin zur Gewinnung des geschnittenen Plasmids durch den Verdau mit Restriktionsenzymen.

2.5.1 Anzucht der E.coli-Kulturen und Plasmidpräparation

Die Plasmid-tragenden E. coli-Kulturen werden in einer LB-Lösung, versetzt mit Ampicillin im Verhältnis 1:100, bei 37°C für 16-20 h in einem Schüttelinkubator bei einer Frequenz von 220 rpm gezogen. Anschließend wird die Aufreinigung des Plasmids mit dem Pure YieldTM Plasmid Miniprep System von Promega durchgeführt, das alle für die Präparation notwendigen Lösungen (Puffer) und die Säule enthält. Zu diesem Zweck werden zunächst 600 µl der Bakterienkultur bei Raumtemperatur bei 13000 g zentrifugiert, sodass sich die E.coli-Zellen am Boden absetzen. Dieses Pellet wird in 100 µl des Lyse-Puffer resuspendiert. Im Anschluss erfolgen eine Neutralisierung sowie eine weitere Zentrifugation, um Zelldetritus und Lysat voneinander zu trennen. In nachfolgenden Wasch- und weiteren Zentrifugationsschritten, jeweils bei 13000 g, wird aus diesem Lysat mit Hilfe einer Aufreinigungs-Säule, in deren Zentrum sich ein Silica-Gel-Filter befindet, die Plasmid-DNA gewonnen. In dieser Membran wird die DNA gebunden, während Salze, Zellbestandteile, etc. entfernt werden. Als Waschlösungen dienen zum einen die Endotoxin-Removal-Wash-, zum anderen die Column-Wash-Solution. In einem letzten Schritt wird die aufgereinigte DNA schließlich mit 30 µl Elutions-Puffer aus der Filtermembran gelöst und kann nun bei -20°C gelagert werden.

2.5.2 Verdau mit Restriktionsenzymen und Aufreinigung des geschnittenen Plasmids

Um die so gewonnene DNA für die spätere cRNA-Synthese nutzen zu können, ist zunächst die Linearisierung der Plasmid-DNA notwendig. Dies wird mit der Restriktionsendonuklease Not I von Fermentas Inc. durchgeführt. Mit Hilfe deren Zielsequenz, dem Palindrom 5'GCGGCCGC3', wird der für unseren Transporter codierende Abschnitt des Plasmids erkannt und aus dem Vektor herausgeschnitten. Für die Durchführung dieses Verdaus werden 10 µg des entsprechenden Plasmids zusammen mit 5 µl Puffer 0 (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂,

100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA) und 5 µl des Enzyms Not I, mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt, für 2 h bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss daran erfolgt die Aufreinigung des nun geschnittenen Plasmids mit dem High pure PCR Cleanup Micro Kit von Roche. Dazu wird die entsprechende Lösung mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt, mit 400 µl Bindungs-Puffer gemischt und in einem „High Pure Filter Tube“ bei 8000 g zentrifugiert, sodass das Plasmid innerhalb einer Filtermembran aus Silica-Gel gebunden wird, während der Rest der Lösung entfernt wird. Dieses Procedere wiederholt man zweimal mit 300 µl eines Wasch-Puffers, um optimale Reinheit zu gewährleisten. In einem letzten Schritt werden schließlich 20 µl eines Elutions-Puffers hinzugegeben, um die nun gereinigte DNA vom Filter zu trennen.

2.5.3 Synthese der cRNA

Da die zuvor linearisierte Plasmid-DNA über eine Promotor-Region für die T7-RNA-Polymerase verfügt, wird für die Synthese der mRNA des hNaDC3-Transporters das mMessage mMachine^R T7 Transcription Kit von Ambion verwendet.

Dazu werden in ein Eppendorfgefäß zunächst folgende Reagenzien gegeben:

- 10 µl 2x NTP/CAP (15 mM ATP, 15 mM CTP, 15 mM UTP, 3 mM GTP, 12 mM cap analog)
- 2 µl 10x Reaktions-Puffer (Salze, Puffer, Dithiothreitol)
- 2 µl Enzym-Mix (RNA-Polymerase, RNase Inhibitor)
- 1,05 µg geschnittene Plasmid-DNA.

Anschließend wird das Volumen des Reaktionsgemisches mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Innerhalb dieser Zeit wird die mRNA durch die RNA-Polymerase synthetisiert. Zudem erfolgt eine Modifizierung am 5'-Ende, das sog. capping, wodurch ein Transport der mRNA sowie eine Translation an den Ribosomen erst ermöglicht werden. In den nun folgenden Arbeitsschritten wird zunächst die Matrizen-DNA durch Zugabe von 1 µl TURBO-DNase während einer 15-minütigen Inkubationszeit entfernt, bevor die RNA durch Zugabe von 15 µl Ammoniumacetat-Stop-Lösung (5 mM Ammoniumacetat, 100 mM EDTA) gefällt wird.

Um eine Präzipitation der RNA zu erreichen, wird schließlich nach Zugabe von 150 µl Isopropanol und 115 µl nukleasefreiem Wasser für 45 min bei 13000 g und 4°C zentrifugiert.

Das auf diese Weise entstandene Pellet wird in zwei weiteren Schritten mit jeweils 200 μl Ethanol und folgender 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C gewaschen. Nach einem Trockenvorgang wird es anschließend in 15 μl nukleasefreiem Wasser resuspendiert und nach photometrischer Messung auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit RNAase-freiem Wasser verdünnt. Die Aufbewahrung erfolgt bei -80°C.

Die Synthese der RNA des hNaCT erfolgt in ähnlichen Arbeitsschritten und wird demzufolge nicht detailliert beschrieben.

2.6 *Xenopus-laevis*-Oozyten als Expressionssystem

2.6.1 Entnahme und Selektionierung der Oozyten

Zur Gewinnung der Oozyten erfolgt zunächst die Anästhesie eines *Xenopus-laevis*-Weibchens in einem Eisbad, dem 0,2 % Tricain zugesetzt sind. Über eine etwa 1 cm lange abdominale Inzision können nun Teile des Ovars entnommen werden. Anschließend erfolgt der Wundverschluss mit resorbierbarem Nahtmaterial. Dieser Eingriff wurde von einer Mitarbeiterin des Instituts unter Einhaltung der geltenden Tierschutzvorschriften durchgeführt (Ausnahmegenehmigung nach §9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes).

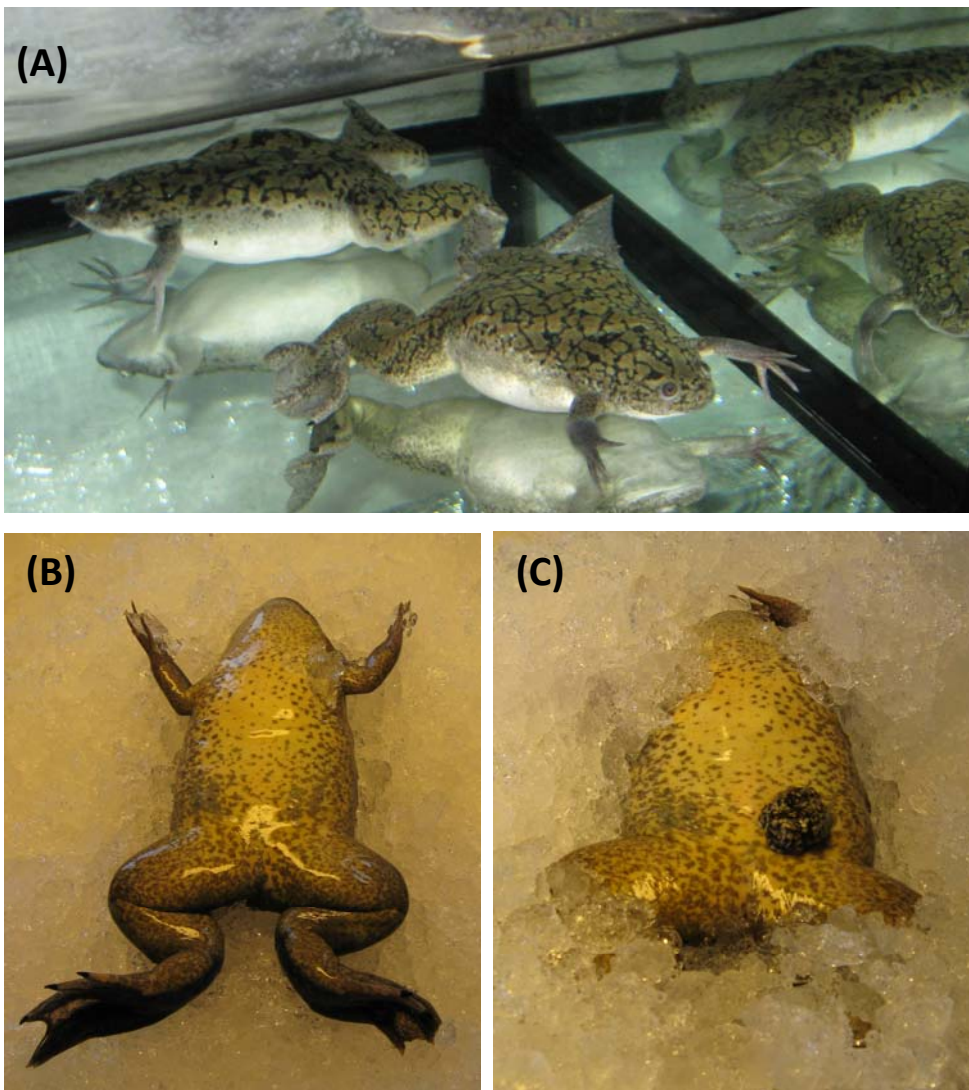


Abb. 2.1: *Xenopus laevis*

(A) Zwei *Xenopus-laevis*-Weibchen im auf 16°C aufgeheizten Aquarium, (B) Lagerung des Frosches im Eisbett vor der Entnahme des Ovars und (C) während der Operation mit isoliertem, aber noch nicht abgetrenntem Ovarlobus.

Um eine Trennung der Oozyten vom ovariellen Bindegewebe zu erreichen, wird das entnommene Material zunächst vorsichtig in kleinere Teile zerlegt, mehrfach mit Oozyten-Ringer-Lösung (ORI, Zusammensetzung siehe S. 18) gespült und anschließend für 16 h in ORI unter Zugabe von Kollagenase (6 mg auf 20 ml ORI) bei 16 - 18°C inkubiert. Um die Trennung der Oozyten von den noch vorhandenen Follikelresten nochmals zu beschleunigen, erfolgt die Zugabe von calciumfreier Oozyten-Ringer-Lösung für weitere 10 min. Nach mehrfacher gründlicher Spülung in ORI können die Oozyten nun selektioniert werden. Dies erfolgt unter dem Mikroskop, wobei die für die spätere Injektion verwendbaren im Stadium V und VI befindlichen Oozyten mit Hilfe einer Glaspipette in gesonderte Gefäße überführt werden.

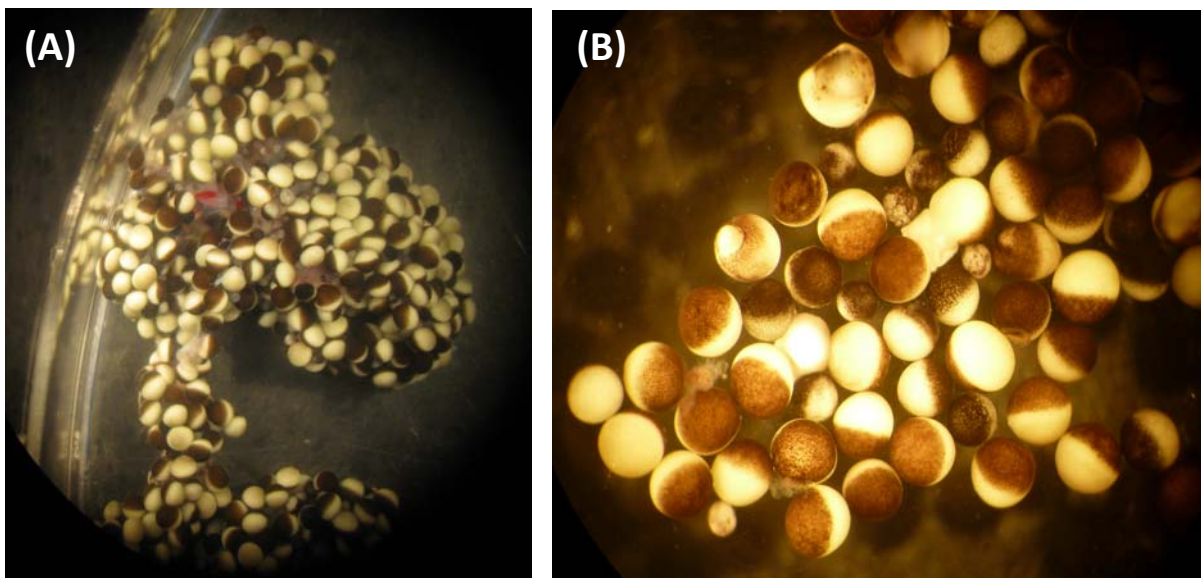


Abb. 2.2: Oozyten nach der Entnahme

(A) Teil eines entnommenen Ovars mit sichtbaren Bindegewebsstrukturen, (B) unselektionierte Oozyten nach 16-stündiger Inkubation in Kollagenase-Lösung

Die Stadien V und VI zeichnen sich dadurch aus, dass die Oozyten deutlich in eine dunkel-pigmentierte animale Hemisphäre, in der sich der Kern befindet, und eine helle, vegetative Hemisphäre unterteilt sind. Ab Stadium VI sind beide Hemisphären durch ein sichtbares äquatorielles Band getrennt (SIGEL und MINIER 2005). Der Durchmesser beträgt zu diesem Zeitpunkt etwa 1,1 - 1,2 mm und die Oozyten verfügen über große Mengen an Plasma (Dottermaterial) und Nährstoffen sowie die notwendigen Organellen, die für eine autonome Proteinsynthese erforderlich sind. Da die Oozyten zudem über sehr wenige endogene Ionenkanäle verfügen (SIGEL und MINIER 2005), sind sie als Expressionssystem für Untersuchungen an Transportproteinen sehr gut geeignet.

2.6.2 Injektion der cRNA in Oozyten

Nach dem Selektionieren sind die Oozyten bereit für die cRNA-Injektion. Zu diesem Zweck werden sie auf einer speziellen mit ORI gefüllten Injektionsbank platziert und mit Hilfe des Nanoliter-Injektors mit 23 nl cRNA injiziert. Dieser wurde zuvor mit einer präparierten Glaskapillare bestückt, deren Durchmesser durch Schmelzen und anschließendes Abbrechen mittels Pinzette auf 10 - 20 μm gebracht wurde. Die Kapillare wurde zudem mit Paraffin-Öl gefüllt, bevor die entsprechende cRNA aufgezogen werden konnte. Angestochen werden die Oozyten möglichst am Übergang vom animalen zum vegetativen Pol, um eine Verletzung des Zellkerns zu vermeiden. Des Weiteren ist ein konsequentes Arbeiten mit Handschuhen erforderlich, um eine Kontamination der Geräte mit RNasen zu verhindern, die ansonsten die Expression des entsprechenden Transportproteins verhindern würde. Als Kontrollgruppen werden Oozyten mit jeweils 23 nl nukleasefreiem Wasser injiziert.

Die anschließende Aufbewahrung der Oozyten erfolgt in 2 ml ORI unter Zugabe von Gentamycin und Pyruvat (Zusammensetzung s. Aufbewahrungs-ORI S.19) bei einer Temperatur von 16 - 18°C. Es erfolgt zudem eine tägliche Kontrolle, bei der die Lösung gewechselt und morphologisch auffällige Oozyten entfernt werden. Nach drei Tagen ist von einer Expression der Transportproteine auszugehen, sodass nun die weiteren Versuche erfolgen können.

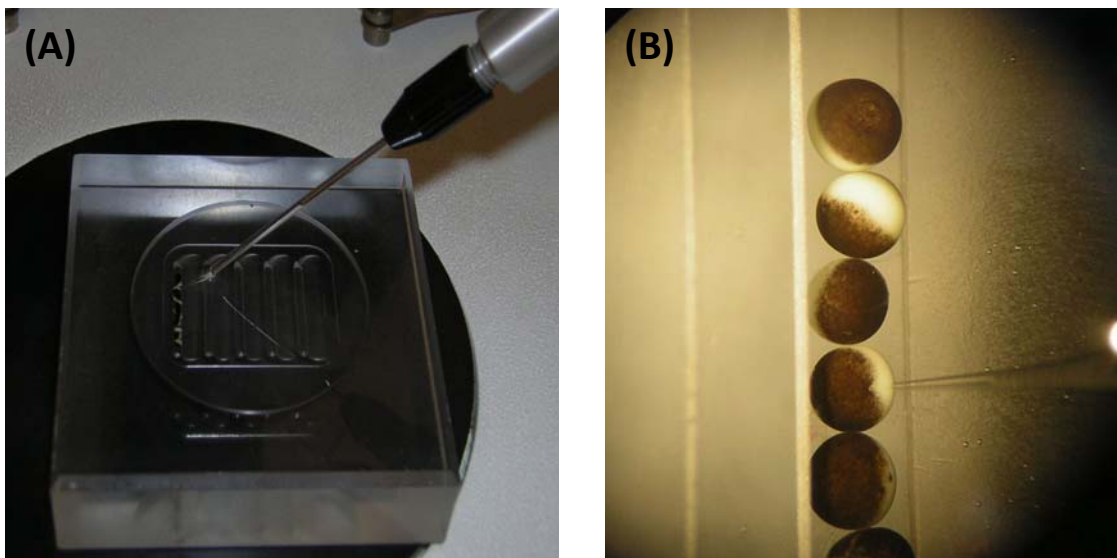


Abb. 2.3: Injektion der cRNA in Oozyten

(A) Anordnung der Oozyten auf der Injektionsbank, (B) mit der Glaskapillare angestochene Oozyte während der RNA-Injektion

2.7 Aufnahme radioaktiv markierter Substrate

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden die jeweiligen Transportproteine mittels Aufnahme radioaktiv markierter Substanzen über die Oozytenmembran untersucht. Dabei wurde für den hNaDC3 [¹⁴C]-Succinat und für den hNaCT entsprechend [¹⁴C]-Citrat und [³⁵S]-GSH verwendet.

2.7.1 Vorinkubation der Oozyten

Da in einem Großteil der Experimente die Hemmung der Aufnahme des spezifischen Substrates durch GSH bzw. die Aufnahme von [³⁵S]-GSH gemessen wurde, hat sich im Verlauf herausgestellt, dass aufgrund der stark variierenden endogenen Glutathionkonzentration der Oozyten eine Vorinkubation mit 2 mM H₂O₂ in ORI für 30 min bei Raumtemperatur sinnvoll ist. Dadurch wurden die Oozyten weitestgehend von intraoozytärem GSH depletiert, sodass die jeweiligen Triebkräfte für den Transport innerhalb der Oozytengruppen vergleichbar wurden (LI et al. 2000). Im Anschluss an diese Inkubation wurden die Oozyten gründlich in ORI gespült, um eine mögliche Kontamination der später zu untersuchenden Versuchsmedien zu verhindern.

2.7.2 Aufnahme radioaktiv markierter Substanzen

Für die Transportexperimente wurden die Oozyten zunächst in Gruppen von 10 - 12 in eine „24-Well“-Platte überführt. In diese Platte wurden im Anschluss 500 µl des entsprechenden mit radioaktiv-markiertem Substrat versehenen Versuchsmediums hineinpipettiert und die Oozyten für die jeweilige Inkubationszeit zugegeben. Diese betrug beim hNaDC3 15 min, beim hNaCT 30 min. Die Konzentration an Succinat im Versuchsmedium entsprach dabei stets 58 µmol/l (18 µmol/l [¹⁴C]-Succinat plus 40 µmol/l Natrium-Succinat), die des [¹⁴C]-Citrats 12 µmol/l und die des GSH ~1mM (2,02 µM [³⁵S]-GSH plus 1 mM GSH). Im Anschluss an die Inkubation wurden die Oozyten dreimal in eiskaltem ORI gespült und daraufhin jeweils in ein Szintillationsröhrchen überführt. In diesem wurden sie zunächst in 2,5 µl NaOH für 2 h durch Bewegen auf einem Schüttler lysiert und anschließend mit 2,5 µl HCl neutralisiert. Nach Zugabe von 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumasafe) konnten die Röhrchen verschlossen, manuell gemischt und schließlich zur Auszählung in den Flüssigkeits-Szintillationscounter gestellt werden. Pro Röhrchen dauerte die Messung etwa 5 min, die jeweilige Aktivität wurde in dpm (decays per minute) ausgegeben.

Als Standardwerte wurden zudem aus dem Versuchsmedium jeder Oozytengruppe 4 Proben zu je 5 μl (V_{Stand}) entnommen, ebenfalls mit 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt und im Counter gemessen. Die spezifische Aktivität (A_{spez}) in dpm/pmol der jeweiligen Versuchsmedien konnte somit aus der gemessenen Aktivität der Standardwerte (A_{Stand}) berechnet werden. Die Konzentration der jeweiligen Substrate, in der Formel beispielhaft für Succinat (C_{Suc}) dargestellt, lag bei Versuchen mit Succinat stets bei 58 μM (18 μM [^{14}C]-Succinat plus 40 μM Natrium-Succinat), für [^{14}C]-Citrat bei 12 μM und die des GSH lag bei ~1mM (2,02 μM [^{35}S]-GSH plus 1 mM GSH).

$$A_{\text{spez}} = \frac{A_{\text{Stand}}}{C_{\text{Suc}} \cdot V_{\text{Stand}}}$$

Mit Hilfe der gemessenen Aktivität pro Oozyte (A_{Oozyte}) in dpm sowie der errechneten spez. Aktivität des Versuchsmediums (A_{spez}) konnte mit folgender Formel die jeweilige Substrataufnahme pro Oozyte (T_{Suc}) während der entsprechenden Inkubationszeit t_{trans} (für den hNaDC3 jeweils 15 min, die des hNaCT lag stets bei 30 min) in pmol/min berechnet werden:

$$T_{\text{Suc}} = \frac{A_{\text{Oozyte}}}{A_{\text{spez}} \cdot t_{\text{Trans}}}$$

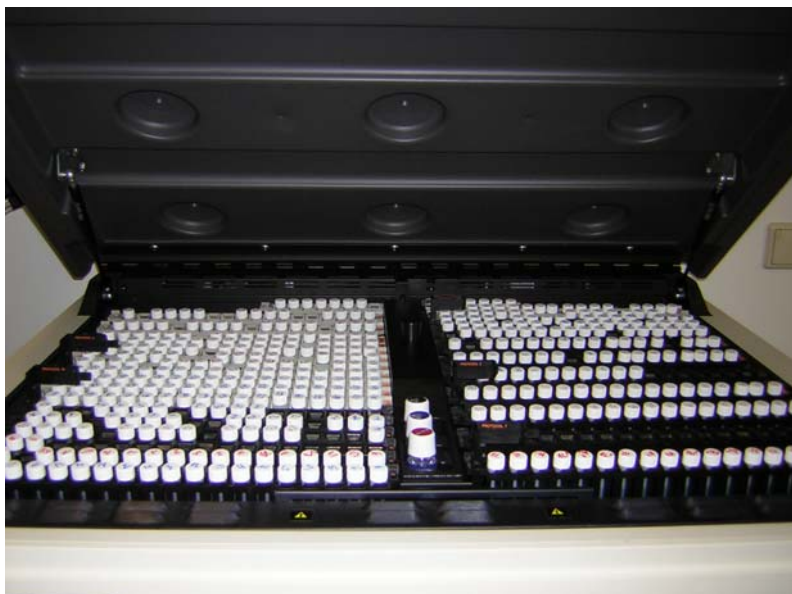


Abb. 2.4: Szintillationscounter

3 Ergebnisse

Da die Transportcharakteristika von Succinat, dem prototypischen Substrat des hNaDC3, bekannt sind (WANG H et al. 2000), wurde es in dieser Arbeit als Marker für einen hNaDC3-vermittelten Transport eingesetzt. Die unter verschiedenen Bedingungen gemessenen Aufnahmen von [^{14}C]-Succinat wurden immer auf die Aufnahme von [^{14}C]-Succinat in Abwesenheit eines Hemmstoffs bezogen. Um weitere Vergleichswerte zu haben, wurde zudem die Aufnahme von [^{14}C]-Succinat in hNaDC3-exprimierenden und Wasser-injizierten Oozyten gemessen.

3.1 Zeitabhängigkeit der hNaDC3-vermittelten Aufnahme von Succinat

Um zunächst eine für die geplanten Versuchsreihen günstige Inkubationszeit im jeweiligen Versuchsmedium herauszufinden, wurde in einer Zeitreihe die Aufnahme von Succinat über den hNaDC3 zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet. Auf diese Weise wurde sowohl eine zu kurze Inkubationszeit, in der der Transporter noch keine aussagekräftigen Aufnahmen zeigen kann, als auch eine zu lange Inkubationszeit vermieden, bei der letztlich die Transporter-vermittelte Succinat-Aufnahme durch Diffusion aus dem Versuchsmedium in die Oozyten verfälscht wird.

Zu diesem Zweck wurden die Oozyten zu Gruppen von je 8 - 12 für 5, 15, 30 und 60 min bei Raumtemperatur in ORI inkubiert, dem 58 μM Succinat (18 μM [^{14}C]-Succinat plus 40 μM Natrium-Succinat) zugegeben wurde.

Die Konzentration an Succinat in den Oozyten stieg sowohl bei hNaDC3-exprimierenden (Abb. 3.1 (A), geschlossene Dreiecke) als auch bei Wasser-injizierten Oozyten (Abb. 3.1 (A), offene Dreiecke) linear über einen Zeitraum von 60 min an. Bei hNaDC3-exprimierenden Oozyten lag nach 5 min der Mittelwert der Succinat-Konzentration bei $9,5 \pm 1,5$ pmol·Oozyte $^{-1}$, nach 15 min bei $23,27 \pm 5,1$ pmol·Oozyte $^{-1}$. Eine 30-minütige Inkubationszeit führte zu einer mittleren Succinat-Konzentration von $46,1 \pm 13,2$ pmol·Oozyte $^{-1}$, nach einer Stunde lag dieser Wert bei $137,5 \pm 25,0$ pmol·Oozyte $^{-1}$. Die ebenso behandelten Wasser-injizierten Oozyten zeigten im Vergleich eine deutlich geringere Succinat-Aufnahme. Hier lagen die Werte nach 5 min lediglich bei $7,3 \pm 2,2$ pmol·Oozyte $^{-1}$, nach 15 min bei $10,9 \pm 2,5$

pmol·Oozyte⁻¹, die Aufnahmen nach 30 und 60 min stiegen auf $17,7 \pm 6,4$ bzw. $46,6 \pm 28,0$ pmol·Oozyte⁻¹ an.

Durch Subtraktion der Succinat-Aufnahme hNaDC3-exprimierender und Wasser-injizierter Oozyten konnte die alleinige hNaDC3-vermittelte Aufnahme von Succinat berechnet werden (Abb. 3.1 (B)). Diese zeigte im untersuchten Zeitraum von bis zu 60 min ebenfalls kein Sättigungsverhalten. Sie betrug nach 5 min $2,2 \pm 0,8$ pmol·Oozyte⁻¹, nach 15 min $12,4 \pm 4,5$ pmol·Oozyte⁻¹, nach 30 min $28,4 \pm 10,5$ pmol·Oozyte⁻¹ und nach einer Stunde $90,9 \pm 39,8$ pmol·Oozyte⁻¹.

Für die folgenden Versuche wurde eine Inkubationszeit von 15 min gewählt, als Succinat-Konzentration wurden jeweils $58 \mu\text{M}$ ($18 \mu\text{M}$ [¹⁴C]-Succinat plus $40 \mu\text{M}$ Natrium-Succinat gelöst in ORI) eingesetzt.

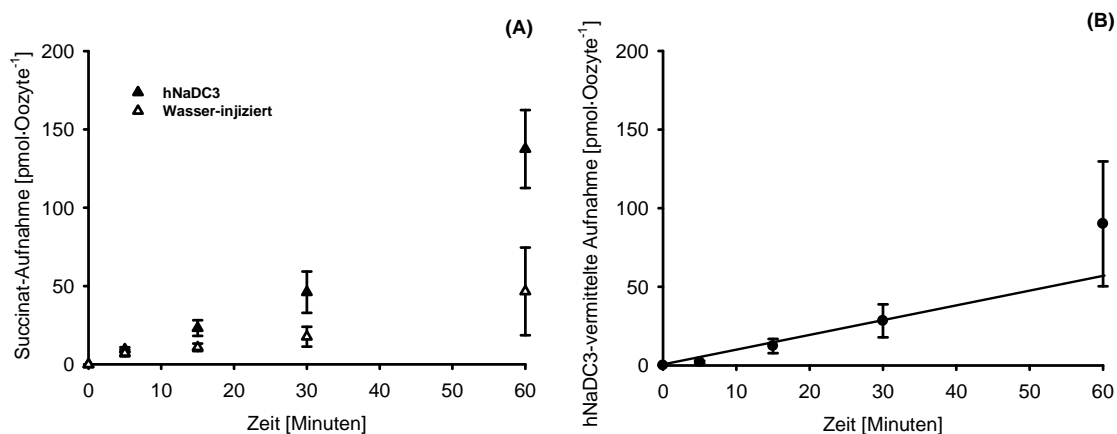


Abb. 3.1: Zeitabhängigkeit der Succinat-Aufnahme in hNaDC3-exprimierenden Oozyten

Die Abbildungen zeigen die Succinat-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nl cRNA des hNaDC3-Transporters bzw. 23 nl nukleasefreiem Wasser injiziert worden sind. Die Inkubationszeiten lagen bei 5, 15, 30 und 60 min, die Succinat-Konzentration betrug $58 \mu\text{M}$.

Untersucht wurden jeweils Gruppen von 8 - 12 Oozyten von insgesamt 3 verschiedenen Versuchstieren. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

(A) Dargestellt ist die jeweilige Succinat-Aufnahme pro Zeiteinheit für Transporter-injizierte Oozyten (▲) sowie für die sowie die zur Kontrolle gemessenen Wasser-injizierten Oozyten (△).

(B) Die Abbildung zeigt den hNaDC3-vermittelten Transport von Succinat als Funktion der Inkubationszeit (Differenzwerte (▲-△) der in Abb. (A) ermittelten Daten).

3.2 Interaktionen von Succinat mit zusätzlich verwendeten Substanzen bzw. Reaktionsprodukten am hNaDC3-Transporter

3.2.1 Einfluss von Dithiothreitol oder oxidiertem Glutathion auf die Succinat-Aufnahme

Ziel der Arbeit war es, den Transport von GSH über den hNaDC3 nachzuweisen. Da GSH in Anwesenheit von Sauerstoff sehr schnell zu GSSG oxidiert wird, war es notwendig, ein Reduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT) der GSH-Lösung zuzusetzen. Dabei handelt es sich um ein Reagenz, das die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen (SH-Gruppen) zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff verhindert. So wurde sichergestellt, dass GSH tatsächlich in seiner reduzierten Form vorlag und nicht bereits während der 15-minütigen Inkubationszeit zu GSSG oxidiert wurde. Um eine Wirkung sowohl von DTT als auch von GSSG selbst auf die Succinat-Aufnahme auszuschließen, wurde diese jeweils auch in Anwesenheit von 1 mM DTT bzw. GSSG in ORI gemessen.

In Abbildung 3.2 ist die Aufnahme von Succinat allein sowie in Anwesenheit von jeweils 1 mM GSH, DTT, GSSG und der gemeinsamen Gabe von DTT und GSH dargestellt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigten keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf eine verminderte Succinat-Aufnahme über den hNaDC3-Transporter bei Inkubation mit den genannten Substraten. Auffällig sind die insgesamt sehr hohen Werte der jeweiligen Standardabweichungen.

Der Mittelwert der in ORI inkubierten Oozyten lag bei $19,3 \pm 13,8$ pmol·Oozyte⁻¹, die mittlere Succinat-Aufnahme in der GSH-Gruppe betrug $24,9 \pm 18,5$ pmol·Oozyte⁻¹, die der GSSG-Gruppe lag bei $20,6 \pm 12,1$ pmol·Oozyte⁻¹. Unter Zugabe von 1 mM DTT zeigten die Oozyten eine Succinat-Aufnahme von $22,2 \pm 15,0$ pmol·Oozyte⁻¹, bei gemeinsamer Applikation von DTT und GSH lag der Mittelwert bei $20,9 \pm 12,2$ pmol·Oozyte⁻¹.

Erwartungsgemäß lagen die Werte der Wasser-injizierten Oozyten niedriger. Die in ORI inkubierten Oozyten zeigten eine mittlere Succinat-Aufnahme von $5,9 \pm 2,3$ pmol·Oozyte⁻¹, in der GSH-Gruppe lag dieser Wert bei $7,7 \pm 2,4$ pmol·Oozyte⁻¹. Die in GSSG inkubierten Oozyten wiesen eine mittlere Succinat-Aufnahme von $7,9 \pm 3,7$ pmol·Oozyte⁻¹ auf, die der DTT-Gruppe lag bei $5,3 \pm 2,1$ pmol·Oozyte⁻¹, für die DTT/GSH-Gruppe konnte ein Mittelwert von $6,4 \pm 2,0$ pmol·Oozyte⁻¹ gemessen werden. Alle Werte beziehen sich auf eine Inkubationszeit von 15 Minuten.

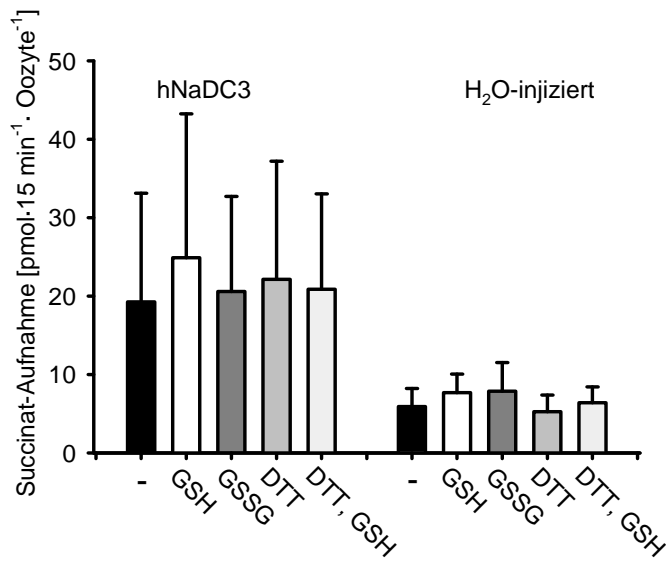


Abb. 3.2: Versuch des Nachweises einer Hemmung der Succinat-Aufnahme durch GSH und GSSG

Die Abbildung zeigt die Succinat-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nL cRNA des hNaDC3-Transporters bzw. nukleasefreiem Wasser injiziert worden sind. Die Inkubationszeit betrug jeweils 15 min, die Succinat-Konzentration lag für alle Versuchsbedingungen bei 58 μM , die Substratkonzentration von GSH, GSSG und DTT lag jeweils bei 1 mM. Im linken Teil der Abbildung sind die hNaDC3-Oozyten dargestellt, beginnend mit der in ORI inkubierten Gruppe (schwarzer Balken), von links nach rechts folgen die jeweiligen Gruppen in GSH (weißer Balken), GSSG (dunkelgrauer Balken), DTT (mittelgrauer Balken) und DTT/GSH (hellgrauer Balken). Die rechte Seite zeigt die zur Kontrolle gemessenen Wasser-injizierten Oozyten, die Farbgebung des Diagramms entspricht der der linken Seite. Untersucht wurden jeweils Gruppen von 8 - 11 Oozyten von insgesamt 7 verschiedenen Versuchstieren. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

3.2.2 Einfluss von GSH und dessen Aminosäurebausteinen auf die Succinat-Aufnahme

In diesem Versuch sollte getestet werden, ob neben GSH auch seine Bausteine – Glycin, Cystein und Glutamat – die Aufnahme von Succinat in hNaDC3-exprimierenden Oozyten beeinflussen. Alle Substanzen wurden in ORI in einer Konzentration von 1 mM und bei einem pH von 7.5 angeboten. Die Konzentration an Succinat betrug wieder 58 μM (18 μM [¹⁴C]-Succinat plus 40 μM Natrium-Succinat).

Der Mittelwert der nach 15 min gemessenen Succinat-Aufnahme der in ORI inkubierten Oozyten lag bei $19,4 \pm 16,2$ pmol·Oozyte⁻¹. Damit ist diese Succinat-Aufnahme vergleichbar mit der in Abb. 3.2 gemessenen. Die Zugaben von GSH, Glycin, Cystein und Glutamat hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die intraozytäre Succinat-Konzentration. Folgende Werte wurden nach Zugabe von jeweils 1 mM GSH, Glycin, Cystein und Glutamat erhalten: $21,9 \pm 18,9$ pmol·Oozyte⁻¹, $16,0 \pm 11,6$ pmol·Oozyte⁻¹, $18,0 \pm 14,5$ pmol·Oozyte⁻¹ und $16,0 \pm 11,9$

pmol·Oozyte⁻¹. Die Standardabweichungen waren mit bis zu 85% sehr hoch. Für die Wasserinjizierten Oozyten ergaben sich folgende Werte: in ORI betrug der Mittelwert der Succinat-Aufnahme $3,7 \pm 1,4$ pmol·Oozyte⁻¹, unter Zugabe von 1 mM GSH lag er bei $4,0 \pm 1,7$ pmol·Oozyte⁻¹. Auch die Zugaben von Glycin, Cystein und Glutamat beeinflussten die Aufnahme von Succinat nicht. Die entsprechenden Werte für die Succinat-Aufnahme lagen bei $4,5 \pm 2,1$ pmol·Oozyte⁻¹, $3,5 \pm 1,1$ pmol·Oozyte⁻¹ und $3,2 \pm 1,1$ pmol·Oozyte⁻¹. In Abbildung 3.3 sind die Resultate in Form eines Balkendiagramms graphisch dargestellt.

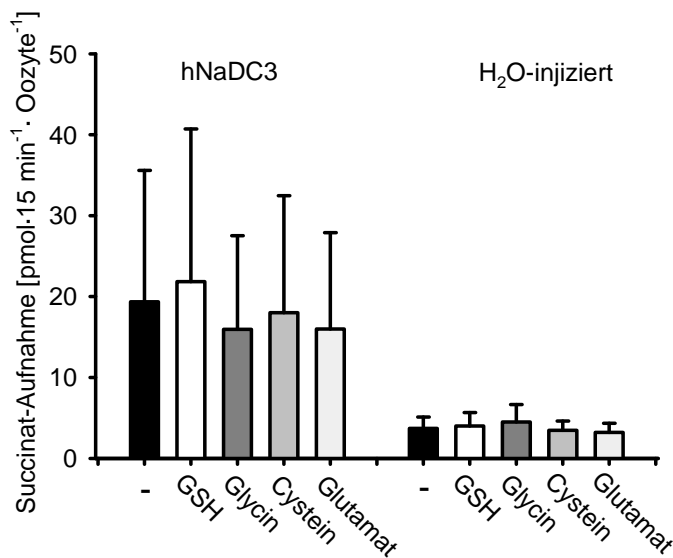


Abb. 3.3: Einfluss von GSH und dessen Aminosäurebausteinen auf die Succinat-Aufnahme

Die Abbildung zeigt die Succinat-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nl cRNA des hNaDC3-Transporters bzw. nukleasefreiem Wasser injiziert worden sind. Die Inkubationszeit betrug 15 min, die Succinat-Konzentration lag für alle Versuchsbedingungen bei 58 μ M, die Substanzkonzentration pro Versuchsmedium betrug 1 mM. Im linken Teil der Abbildung sind die hNaDC3-exprimierenden Oozyten dargestellt, beginnend mit der in ORI inkubierten Gruppe (schwarzer Balken), von links nach rechts folgen die jeweiligen Gruppen in GSH (weißer Balken), Glycin (dunkelgrauer Balken), Cystein (mittelgrauer Balken) und Glutamat (hellgrauer Balken). Die rechte Seite zeigt die zum Vergleich gemessenen Wasser-injizierten Oozyten, die Farbgebung des Diagramms entspricht der der linken Seite. Untersucht wurden jeweils Gruppen von 8 - 11 Oozyten von insgesamt 6 verschiedenen Versuchstieren. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

3.3 Optimierung der Versuchsbedingungen

Bei den in den Abbildungen 3.2 und 3.3 dargestellten Versuchen konnte keine Hemmung der hNaDC3-vermittelten Succinat-Aufnahme durch GSH nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden sehr unterschiedliche Succinat-Aufnahmen gemessen, die hohe Standardabweichungen nach sich zogen. Diese Schwankungen in der Succinat-Aufnahme konnten nicht ausschließlich auf saisonale Unterschiede in der Güte der Oozyten und damit auf ihr Expressionsverhalten zurückgeführt werden. Zur weiteren Überprüfung der Arbeitshypothese wurde deshalb eine Literaturrecherche unternommen. Diese ergab, dass die Oozyten selbst unterschiedliche endogene Konzentrationen an GSH besitzen können (LI et al. 2000). Dieser Sachverhalt kann dadurch umgangen werden, dass entweder die Konzentration an GSH im Versuchsmedium erhöht oder die intraoozytäre Konzentration an GSH gesenkt wird. Eine Depletion der Oozyten von GSH kann durch Inkubation der Oozyten in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erreicht werden (LI et al. 2000).

3.3.1 Erhöhung der Konzentration an Glutathion im Versuchsmedium

Der folgende Versuch diente der Überprüfung, inwieweit durch eine Erhöhung der Substratkonzentration im Versuchsmedium der Succinat-Transport über den hNaDC3 beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurden Gruppen von 7 - 11 Oozyten unter zwei Bedingungen verglichen: zunächst wurde die Succinat-Aufnahme in ORI unter alleiniger Zugabe von $58 \mu\text{M}$ Succinat ($18 \mu\text{M}$ [^{14}C]-Succinat plus $40 \mu\text{M}$ Natrium-Succinat gelöst in ORI) bestimmt, gegenübergestellt wurde eine Gruppe, deren ORI neben $58 \mu\text{M}$ Succinat 3 mM GSH zugegeben wurde. Die Aufnahme von Succinat war in den beiden Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander verschieden. Der Mittelwert der Succinat-Aufnahme der in ORI inkubierten Oozyten betrug $169,4 \pm 42,5 \text{ pmol}\cdot\text{Oozyte}^{-1}$, für die GSH-Gruppe lag dieser Wert bei $170,4 \pm 72,6 \text{ pmol}\cdot\text{Oozyte}^{-1}$. Die zur Kontrolle gleich behandelten Wasser-injizierten Oozyten zeigten unter beiden Bedingungen deutlich niedrigere Werte. Für die ORI-Gruppe lag die mittlere Succinat-Aufnahme bei $29,8 \pm 6,7 \text{ pmol}\cdot\text{Oozyte}^{-1}$, in der mit GSH inkubierten Gruppe betrug diese $32,5 \pm 11,3 \text{ pmol}\cdot\text{Oozyte}^{-1}$. In Abbildung 3.4 folgt eine graphische Darstellung der genannten Ergebnisse.

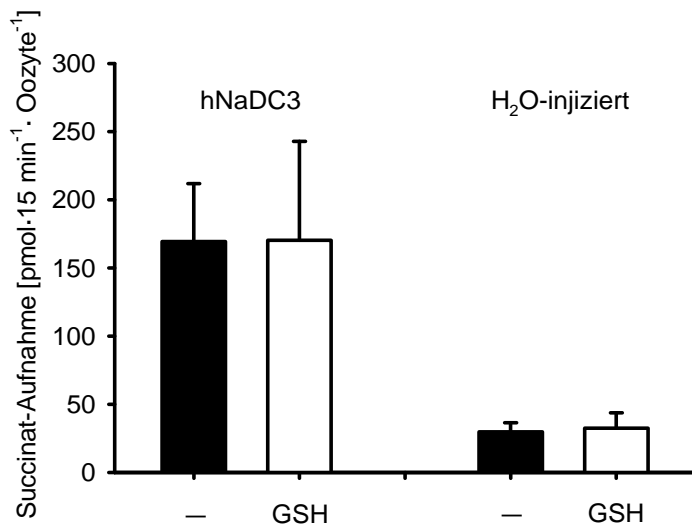


Abb. 3.4: Erhöhung der GSH-Konzentration im Versuchsmedium auf 3 mM

Diese Abbildung zeigt die Succinat-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nl cRNA des hNaDC3-Transporters injiziert worden sind (linke Seite) sowie die zur Kontrolle gemessenen Wasser-injizierten Oozyten (rechte Seite). Untersucht wurden zwei Bedingungen: eine 15-minütige Inkubation in ORI unter Zugabe von 58 μM Succinat (schwarzer Balken), sowie dieselbe Lösung mit zusätzlich 3 mM GSH (weißer Balken). Es zeigt sich bei alleiniger Erhöhung der Substratkonzentration auf 3mM ohne zusätzliche Vorinkubation der Oozyten kein signifikanter Unterschied ($p > 0.05$) bezüglich der Succinat-Aufnahme. Untersucht wurden jeweils Gruppen von 7 - 11 Oozyten von insgesamt 3 verschiedenen Versuchstieren. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

3.3.2 Dixon-Plot zur Bestimmung der K_i : Hemmung der Succinat-Aufnahme durch aufsteigende Konzentrationen an GSH

Um letztlich die Konzentration an GSH herauszufinden, durch die eine maximale Hemmung der Succinat-Aufnahme hervorgerufen wird, wurde die Aufnahme von Succinat bei aufsteigenden Konzentrationen an GSH gemessen und die Ergebnisse in einem Dixon-Plot dargestellt. In Gruppen von 7 – 8 Oozyten wurde bei unterschiedlicher Succinat-Konzentration von 18 μM bzw. 58 μM (18 μM [¹⁴C]-Succinat plus 40 μM Natrium-Succinat gelöst in ORI) die jeweilige Succinat-Aufnahme bei zunehmender Konzentration von GSH im Versuchsmedium gemessen. Dabei wurden GSH-Konzentrationen von 0, 1, 2, 3 und 4 mM eingesetzt, die Inkubationszeit betrug 15 min bei Raumtemperatur.

Bezüglich der mit 18 μM Succinat versetzten Versuchsmedien lag der Mittelwert für die in ORI inkubierten Oozyten bei $20,7 \pm 3,3$ pmol·Oozyte⁻¹, die mittlere Succinat-Aufnahme in der 1 mM GSH-Gruppe betrug $14,9 \pm 3,0$ pmol·Oozyte⁻¹, die der 2 mM GSH-Gruppe lag bei $18,3 \pm 3,4$ pmol·Oozyte⁻¹. Unter Zugabe von 3 mM GSH zeigten die Oozyten eine mittlere Succinat-

Aufnahme von $23,2 \pm 4,2 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$, der Mittelwert der in 4 mM GSH inkubierten Oozyten lag bei $45,0 \pm 13,7 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$.

Die entsprechenden Gruppen, die mit der höheren Succinat-Konzentration von 58 μM inkubiert wurden, zeigten folgende Werte: die in ORI inkubierten Oozyten zeigten eine mittlere Succinat-Aufnahme von $32,9 \pm 6,0 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$, in der 1 mM GSH-Gruppe lag dieser Wert bei $22,9 \pm 4,7 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$. Die in 2 mM GSH inkubierten Oozyten wiesen eine mittlere Succinat-Aufnahme von $62,5 \pm 28,2 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$ auf, die der 3 mM GSH-Gruppe lag bei $74,7 \pm 21,6 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$, für die 4 mM GSH-Gruppe konnte ein Mittelwert von $21,3 \pm 2,7 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$ gemessen werden.

Die K_i für GSH zur Hemmung der Aufnahme von Succinat in hNaDC3-exprimierenden Oozyten betrug in diesem Versuch $3,6 \pm 1,6 \text{ mM}$.

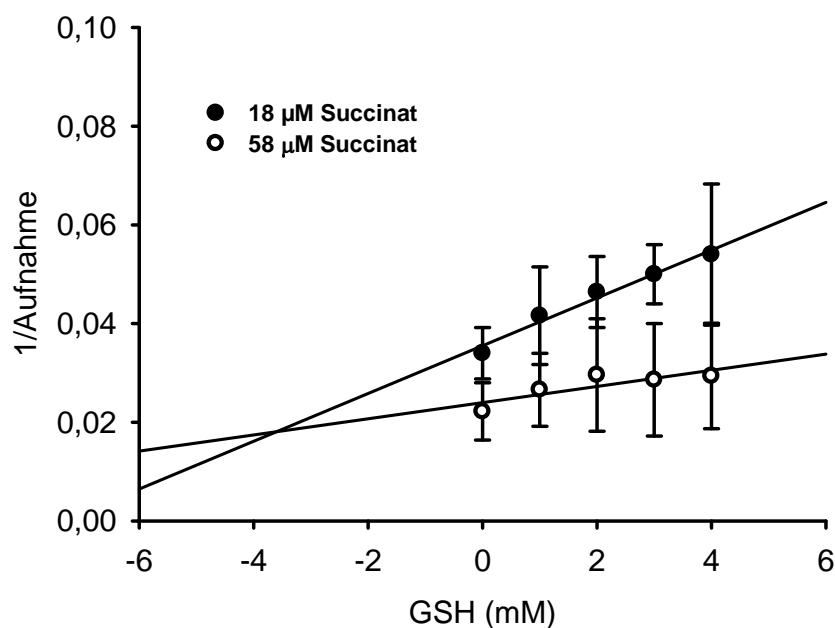


Abb. 3.5: Dixon-Plot zur Bestimmung der K_i

Die Abbildung zeigt die Succinat-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nl cRNA des hNaDC3-Transporters injiziert worden sind. Die Inkubationszeit betrug jeweils 15 min, die Succinat-Konzentration lag für alle Versuchsbedingungen bei 18 μM (geschlossene Kreise) bzw. bei 58 μM (offene Kreise). Gemessen wurde die Succinat-Aufnahme jeweils bei Konzentrationen von 0, 1, 2, 3 und 4 mM GSH im Versuchsmedium.

Untersucht wurden Gruppen von 7 - 8 Oozyten von lediglich einem Versuchstier. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

3.3.3 H₂O₂-Vorinkubation hNaDC3-injizierter Oozyten zur intraozytären GSH-Depletion

Mit den nun folgenden Versuchen sollte geprüft werden, ob durch eine 30-minütige Vorinkubation der Oozyten in 2 mM H₂O₂ in ORI die Versuchsergebnisse dahingehend beeinflusst werden können, dass die doch deutlichen Schwankungen in der Aufnahme von Succinat innerhalb der Oozytengruppen vermindert werden können. Diese Schwankungen sollten auf den stark variierenden endogenen Glutathion-Konzentrationen der einzelnen Oozyten beruhen. Dies versuchte man durch eine Vorbehandlung mit H₂O₂ zu minimieren (Li et al. 2000).

Zu diesem Zweck wurden hNaDC3-injizierte Oozyten für 30 min bei Raumtemperatur unter Zugabe von 2 mM H₂O₂ in ORI inkubiert, eine Vergleichsgruppe wurde in reinem ORI auf dieselbe Weise vorinkubiert. Entsprechend wurden jeweils Kontrollgruppen von Wasser-injizierten Oozyten behandelt. Während des Versuches wurden die Oozyten jeweils in 58 µM Succinat-Lösung (18 µM [¹⁴C]-Succinat plus 40 µM Natrium-Succinat gelöst in ORI) für 15 min inkubiert, anschließend wurde die Succinat-Aufnahme bestimmt. Für die hNaDC3-injizierten Oozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Gruppen mit bzw. ohne H₂O₂-Vorinkubation. Die Mittelwerte dieser Gruppen lagen bei $2,2 \pm 0,4$ pmol·Oozyte⁻¹ bzw. bei $3,0 \pm 1,0$ pmol·Oozyte⁻¹. Die entsprechenden Werte für die Wasser-injizierten Oozyten lagen für die mit H₂O₂ vorbehandelten Oozyten bei $0,3 \pm 0,1$ pmol·Oozyte⁻¹, für die unbehandelten bei $0,6 \pm 0,1$ pmol·Oozyte⁻¹. Die Transporter-vermittelte Aufnahme, d.h. die Differenz der Werte der jeweiligen Wasser-injizierten und der Transporterwerte, lag für die unbehandelte ORI-Vergleichsgruppe bei $2,33 \pm 0,52$ pmol·Oozyte⁻¹, der Wert der in H₂O₂ vorinkubierten Oozyten lag mit $1,95 \pm 0,21$ pmol·Oozyte⁻¹ niedriger. Abbildung 3.6 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms.

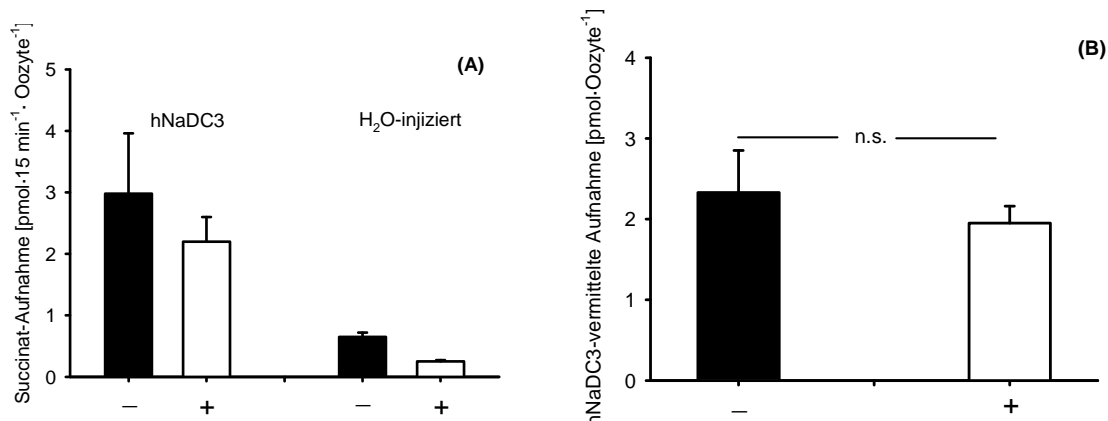


Abb. 3.6: Beeinflussung der hNaDC3-vermittelten Succinat-Aufnahme durch H₂O₂-Vorinkubation

Diese Abbildung zeigt die Succinat-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nl cRNA des hNaDC3-Transporters bzw. mit nukleasefreiem Wasser für die jeweiligen Kontrollmessungen injiziert worden sind. Dieser Versuch wurde exemplarisch an Gruppen von 9 - 11 Oozyten von einem Versuchstier durchgeführt. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

(A) Der schwarze Balken zeigt jeweils die Aufnahme von Succinat ohne vorherige Inkubation in 2 mM H₂O₂, links die der hNaDC3-injizierten, rechts die der Wasser-injizierten Oozyten. Die jeweils weißen Balken stehen für die entsprechende Succinat-Aufnahme nach Vorinkubation in 2 mM H₂O₂ in ORI.

(B) Die Differenzmessung zeigt keinen signifikanten Unterschied in der hNaDC3-vermittelten Aufnahme von Succinat ($p > 0.05$).

3.3.4 Erhöhung der Substratkonzentration und zusätzliche Vorinkubation der Oozyten

In diesem dritten Test, der ebenfalls dem Finden der idealen Versuchsbedingungen galt, wurden nun die beiden zuvor unter den Punkten 3.3.1 und 3.3.3 aufgeführten Rahmenbedingungen miteinander kombiniert. Gruppen von jeweils 7 - 11 Oozyten wurden zunächst für 30 min in 2 mM H₂O₂ in ORI vorbehandelt, die Versuchsmedien wurden mit 3 mM Substrat versetzt. In diesem Fall handelte es sich um 3 mM GSH, das der 58 μ M Succinat-Lösung hinzugefügt wurde. Als Vergleich galt eine substratfreie ORI-Lösung, ebenfalls unter Zugabe von 58 μ M Succinat. Zur Kontrolle sind Wasser-injizierte Oozyten auf dieselbe Weise behandelt worden.

In Abbildung 3.7 ist bereits die Transporter-vermittelte Aufnahme, d.h. die Differenz der Werte der jeweiligen Wasser-injizierten und der Transporterwerte dargestellt. Diese beträgt für die ORI-Vergleichsgruppe $34,8 \pm 13,0$ pmol·Oozyte⁻¹, der Wert der in GSH inkubierten Oozyten liegt mit $17,2 \pm 6,2$ pmol·Oozyte⁻¹ signifikant niedriger.

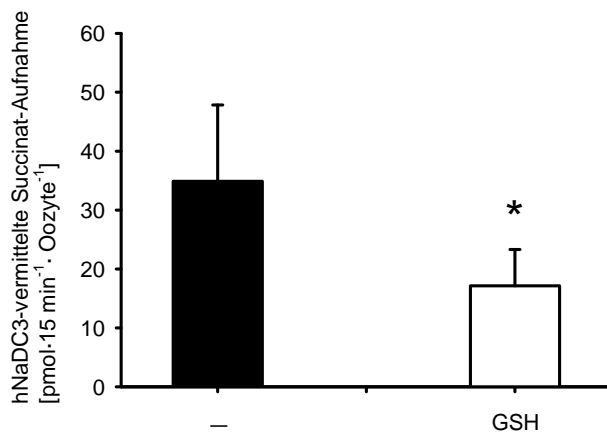


Abb. 3.7: Beeinflussung der Succinat-Aufnahme durch erhöhte Substratkonzentration und zusätzliche Vorinkubation der Oozyten

Diese Abbildung zeigt die Succinat-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nl cRNA des hNaDC3-Transporters injiziert worden sind. Getestet wurden nach 30-minütiger Vorinkubation in 2 mM H₂O₂ in ORI zwei Bedingungen: eine 15-minütige Inkubation in ORI unter alleiniger Zugabe von 58 μM Succinat (schwarzer Balken), sowie dieselbe Lösung mit zusätzlich 3 mM GSH (weißer Balken).

Dargestellt ist bereits die Transporter-vermittelte Aufnahme des Succinats über den hNaDC3-Transporter. In der mit GSH inkubierten Gruppe zeigt sich eine signifikant geringere Aufnahme des Succinat (*p<0,05).

Untersucht wurden jeweils Gruppen von 7 - 11 Oozyten von insgesamt 8 verschiedenen Versuchstieren. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

3.4 Hemmbarkeit des hNaDC3-vermittelten Transports von Succinat nach Versuchsmodifikation

Bei den nun nachfolgenden Versuchsreihen handelt es sich um Modifikationen der oben bereits aufgeführten Versuche. Die neu gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Substratkonzentrationen und einer notwendigen Vorinkubation der Oozyten mit H₂O₂ machten eine Wiederholung unumgänglich. In den nachfolgenden Versuchen wurden nun die Substrate jeweils in einer Konzentration von 3 mM verwendet, zudem fand eine 30-minütige Vorinkubation der Oozyten in 2 mM H₂O₂ in ORI statt.

3.4.1 Interaktionen am hNaDC3-Transporter durch GSH und GSSG

Wie in Punkt 3.2.1 bereits beschrieben, sollte in diesem Versuch geprüft werden, ob sowohl durch GSH als auch durch GSSG die Aufnahme von Succinat über den hNaDC3 reduziert werden kann. Eine zusätzliche Messung mit GSH/DTT bzw. alleiniger DTT-Zugabe wurde ebenfalls durchgeführt. Nach 30-minütiger Vorinkubation in 2 mM H₂O₂ in ORI fand nun der Aufnahmeversuch bei einer Konzentration von 3 mM des entsprechenden Hemmstoffes statt. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Versuchsmedien mit 58 µM Succinat (18 µM [¹⁴C]-Succinat plus 40 µM Natrium-Succinat gelöst in ORI) versetzt, anschließend wurden Oozytengruppen von 7 - 11 pro Medium für 15 min inkubiert. Dementsprechend sind Wasser-injizierte Oozyten als Kontrollgruppen auf dieselbe Weise behandelt worden.

Für die ORI-Gruppe zeigte sich eine mittlere Succinat-Aufnahme von $50,8 \pm 16,6$ pmol·Oozyte⁻¹, der Wert der GSH-Gruppe lag mit $34,4 \pm 10,2$ pmol·Oozyte⁻¹ deutlich niedriger. Für die in GSSG inkubierten Oozyten ergab sich ein Mittelwert von $49,7 \pm 15,5$ pmol·Oozyte⁻¹. In der DTT-Gruppe lag eine mittlere Succinat-Aufnahme von $46,2 \pm 20,0$ pmol·Oozyte⁻¹ vor, für die DTT/GSH-Gruppe lag diese bei $37,1 \pm 12,1$ pmol·Oozyte⁻¹.

Die entsprechenden Werte der Wasser-injizierten Oozyten lagen erwartungsgemäß deutlich unter denen der jeweiligen Transportergruppen. So lag die mittlere Succinat-Aufnahme der ORI-Vergleichsgruppe bei $13,2 \pm 4,7$ pmol·Oozyte⁻¹, die der GSH-Gruppe bei $21,8 \pm 16,0$ pmol·Oozyte⁻¹. Folgende Werte ergaben sich in den übrigen Kontrollgruppen: in GSSG inkubiert zeigten die Wasser-injizierten Oozyten eine mittlere Aufnahme von $10,0 \pm 3,2$ pmol·Oozyte⁻¹, in DTT lag diese bei $10,3 \pm 3,0$ pmol·Oozyte⁻¹ und die in DTT/GSH inkubierten Oozyten erreichten einen Mittelwert von $14,8 \pm 7,8$ pmol·Oozyte⁻¹.

Die Werte des hNaDC3-vermittelten Transportes als Differenz der jeweiligen Mittelwerte von Transporter- und Wasser-injizierten Oozyten lagen für die ORI-Gruppe bei $37,3 \pm 12,7$ pmol·Oozyte⁻¹, für die GSH-Gruppe signifikant niedriger bei $13,3 \pm 6,2$ pmol·Oozyte⁻¹. In der GSSG-Gruppe konnte ein Wert von $40,1 \pm 12,3$ pmol·Oozyte⁻¹ bestimmt werden. Die entsprechenden Werte für die in DTT und in DTT/GSH inkubierten Oozyten lagen bei $35,9 \pm 17,7$ pmol·Oozyte⁻¹ für DTT bzw. bei $22,2 \pm 14,9$ pmol·Oozyte⁻¹ für DTT/GSH.

In Abbildung 3.8 ist eine Übersicht dieses Versuchs in Form eines Balkendiagramms zu sehen.

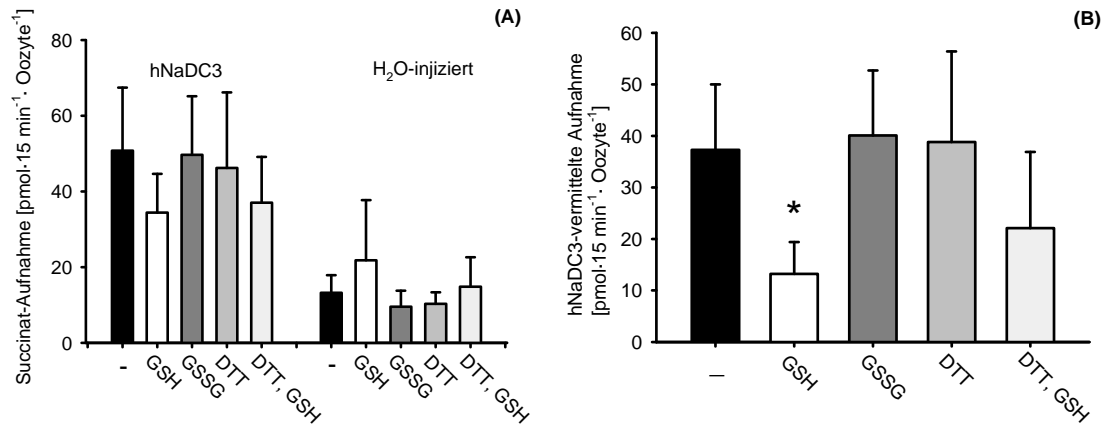


Abb. 3.8: Hemmbarkeit der Succinat-Aufnahme durch GSH und GSSG nach Versuchsmodifikation

Die Abbildungen zeigen die Succinat-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nl cRNA des hNaDC3-Transporters injiziert worden sind sowie die zur Kontrolle gemessenen Wasser-injizierten Oozyten. Die Inkubationszeit betrug jeweils 15 min, die Succinat-Konzentration lag für alle Versuchsbedingungen bei 58 μ M, die Konzentration des möglichen Hemmstoffes bei 3 mM, eine 30-minütige Vorinkubation in 2 mM H₂O₂ in ORI wurde vor dem Aufnahmeversuch durchgeführt. Untersucht wurden jeweils Gruppen von 7 - 11 Oozyten von insgesamt 4 verschiedenen Versuchstieren. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

(A) Im linken Teil der Abbildung sind die hNaDC3-Oozyten dargestellt, beginnend mit der in ORI inkubierten Gruppe (schwarzer Balken), von links nach rechts folgen die jeweiligen Gruppen in GSH (weißer Balken), GSSG (dunkelgrauer Balken), DTT (mittelgrauer Balken) und DTT/GSH (hellgrauer Balken). Die rechte Seite zeigt die zur Kontrolle gemessenen Wasser-injizierten Oozyten, die Farbgebung des Diagramms entspricht der der linken Seite.

(B) Diese Abbildung zeigt die in Abb. (A) aufgeführten Werte des Succinat-Transports, in diesem Fall jedoch zur vereinfachten Darstellung der alleinigen hNaDC3-vermittelten Aufnahme als Differenz der Mittelwerte von Transporter- und Wasser-injizierten Oozyten. Von links nach rechts sind die jeweiligen Substrate der verschiedenen Versuchsmedien wie folgt dargestellt: ganz links ist die in ORI inkubierte Gruppe abgebildet (schwarzer Balken), von links nach rechts folgen die jeweiligen Gruppen in GSH (weißer Balken), GSSG (dunkelgrauer Balken), DTT (mittelgrauer Balken) und DTT/GSH (hellgrauer Balken). Es zeigt sich eine signifikante Hemmung des hNaDC3-vermittelten Succinat-Transports in Anwesenheit von GSH (* $p < 0,05$) sowie eine deutliche, jedoch nicht signifikante Hemmung der Succinat-Aufnahme in der DTT/GSH-Gruppe (* $p > 0,05$).

3.4.2 Interaktionen am hNaDC3-Transporter durch GSH und dessen Aminosäurebausteine

Wie bereits in Kapitel 3.2.2 getestet, sollte unter modifizierten Versuchsbedingungen erneut geprüft werden, ob auch die Bausteine des GSH (Glycin, Cystein und Glutamat) die Aufnahme von Succinat über den hNaDC3 hemmen. Nach 30-minütiger Vorbehandlung in 2 mM H₂O₂ in ORI wurden Oozyten in Gruppen à 9 - 11 für 15 min im jeweiligen Versuchsmedium inkubiert. Diese wurden zuvor jeweils mit 58 µM Succinat (18 µM [¹⁴C]-Succinat plus 40 µM Natrium-Succinat gelöst in ORI) versetzt, zusätzlich wurden die zu untersuchenden Substrate GSH, Glycin, Cystein und Glutamat in 3 millimolarer Konzentration hinzugegeben. Eine substratfreie ORI-Gruppe diente als Vergleichswert. Zusätzlich sind Wasser-injizierte Oozyten als Kontrollgruppen in denselben Medien inkubiert worden.

Für die ORI-Gruppe zeigte sich eine mittlere Succinat-Aufnahme von $47,3 \pm 14,8$ pmol·Oozyte⁻¹, der Wert der GSH-Gruppe lag mit $32,7 \pm 6,3$ pmol·Oozyte⁻¹ deutlich darunter. Der Mittelwert der Glycin-Gruppe lag bei $78,6 \pm 27,5$ pmol·Oozyte⁻¹, der der Cystein-Gruppe bei $100,3 \pm 27,7$ pmol·Oozyte⁻¹. Für die in Glutamat inkubierten Oozyten lag eine mittlere Succinat-Aufnahme von $40,3 \pm 9,4$ pmol·Oozyte⁻¹ vor.

Erwartungsgemäß lagen die Wasser-injizierten Oozyten in ihrer Aufnahmefähigkeit weit hinter den Transportergruppen zurück. In ORI lag die mittlere Succinat-Aufnahme bei $14,8 \pm 5,1$ pmol·Oozyte⁻¹, in 3 mM GSH inkubierte Oozyten erreichten einen Mittelwert von $11,7 \pm 3,0$ pmol·Oozyte⁻¹. In den übrigen Gruppen lagen die Werte für Glycin bei $19,6 \pm 7,4$ pmol·Oozyte⁻¹, für Cystein bei $17,7 \pm 3,8$ pmol·Oozyte⁻¹ und für Glutamat bei $24,1 \pm 7,2$ pmol·Oozyte⁻¹.

Der Wert des hNaDC3-vermittelten Transports als Differenz der jeweiligen Mittelwerte von Transporter- und Wasser-injizierten Oozyten lag für die in ORI inkubierten Oozyten bei $32,5 \pm 9,7$ pmol·Oozyte⁻¹, für die GSH-Gruppe lag der Wert mit $21,1 \pm 3,9$ pmol·Oozyte⁻¹ signifikant darunter. In der Glycin-Gruppe wurde ein Wert von $55,9 \pm 22,3$ pmol·Oozyte⁻¹ erreicht, entsprechende Werte der Cystein- und der Glutamat-Gruppe lagen bei $75,3 \pm 23,7$ pmol·Oozyte⁻¹ bzw. bei $16,2 \pm 5,2$ pmol·Oozyte⁻¹. In Glutamat inkubierte Oozyten zeigten somit ebenfalls eine signifikant niedrigere Succinat-Aufnahme als die in ORI inkubierten.

In Abbildung 3.9 ist eine Übersicht dieses Versuchs in Form eines Balkendiagramms zu sehen.

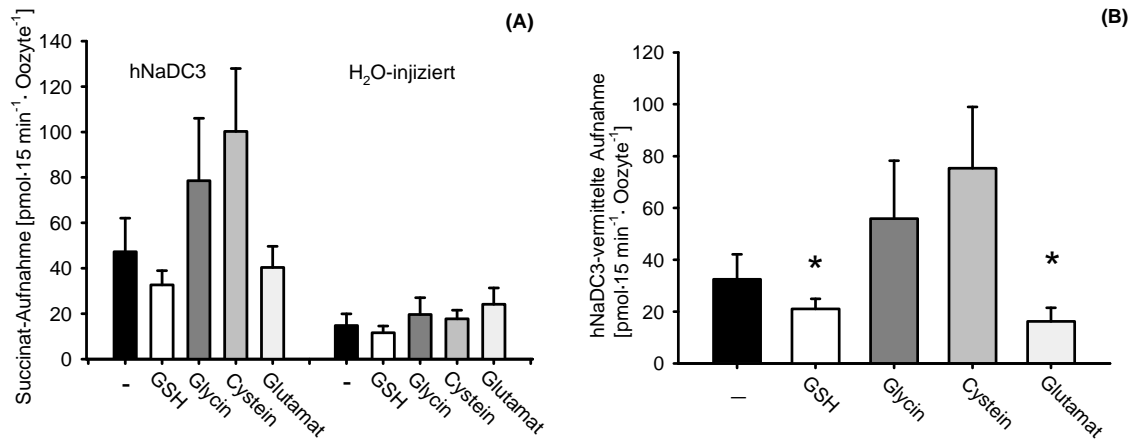


Abb. 3.9: Hemmbarkeit der Succinat-Aufnahme durch GSH und dessen Aminosäurebausteine nach Versuchsmodifikation

Die Abbildungen zeigen die Succinat-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nl cRNA des hNaDC3-Transporters injiziert worden sind sowie die zur Kontrolle gemessenen Wasser-injizierten Oozyten. Die Inkubationszeit betrug jeweils 15 min, die Succinat-Konzentration lag für alle Versuchsbedingungen bei 58 μ M, die Substratkonzentration pro Versuchsmedium bei 3 mM, eine 30-minütige Vorinkubation in 2 mM H₂O₂ in ORI wurde durchgeführt. Untersucht wurden jeweils Gruppen von 9 - 11 Oozyten von insgesamt 4 verschiedenen Versuchstieren. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

(A) Im linken Teil der Abbildung sind die hNaDC3-Oozyten dargestellt, beginnend mit der in ORI inkubierten Gruppe (schwarzer Balken), von links nach rechts folgen die jeweiligen Gruppen in GSH (weißer Balken), Glycin (dunkelgrauer Balken), Cystein (mittelgrauer Balken) und Glutamat (hellgrauer Balken). Die rechte Seite zeigt die zur Kontrolle gemessenen Wasser-injizierten Oozyten, die Farbgebung des Diagramms entspricht der der linken Seite.

(B) Diese Abbildung zeigt die in Abb. (A) aufgeführten Werte des Succinat-Transports, in diesem Fall jedoch zur vereinfachten Darstellung der alleinigen hNaDC3-vermittelten Aufnahme als Differenz der Mittelwerte von Transporter- und Wasser-injizierten Oozyten. Es zeigt sich eine signifikante Hemmung des hNaDC3-vermittelten Succinat-Transports in Anwesenheit von GSH (* $p < 0,05$) sowie in Anwesenheit von Glutamat (* $p < 0,05$).

3.5 Überprüfung einer Mitbeteiligung des hNaCT am renalen GSH-Transport

Da es sich bei dem humanen natriumabhängigen Citrat-Transporter (hNaCT) um den zweiten elektrogenen Transporter handelt, der in der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen des Menschen lokalisiert ist und somit für einen Transport von GSH aus dem Blutplasma in die Zelle verantwortlich sein könnte, wurden auch mit diesem Transporter Experimente durchgeführt, die der Überprüfung dieser Arbeitshypothese dienen. Eine Zeitreihe zur Aufnahme von Citrat war für diesen Transporter bereits von einer Mitarbeiterin des Instituts durchgeführt worden. Die Daten wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt und zeigten eine ideale Inkubationszeit von 30 min für Aufnahmeversuche am hNaCT-Transporter.

3.5.1 H₂O₂-Vorinkubation hNaCT-injizierter Oozyten zur intraozytären GSH-Depletion

Wie auch bei den hNaDC3-Versuchen wurden die Oozyten vor dem jeweiligen Versuch in ORI unter Zugabe von 2 mM H₂O₂ zur intraozytären GSH-Depletion vorinkubiert. Um zu überprüfen, ob diese Vorbehandlung auf die Aufnahme von Citrat über den hNaCT eine Auswirkung hat, wurde zunächst folgender Versuch durchgeführt: Gruppen von hNaCT-injizierten Oozyten wurden für 30 min in ORI plus 2 mM H₂O₂ inkubiert, bevor die Messung der Aufnahme von Citrat stattfand. Als Vergleich wurden hNaCT-injizierte Oozyten in reinem ORI inkubiert, der anschließende Aufnahmeversuch wurde identisch durchgeführt. Dazu wurden die jeweiligen Gruppen bei Raumtemperatur für 30 min in mit 12 µM [¹⁴C]-Citrat versetztem ORI inkubiert, in Anschluss wurde deren Citrat-Aufnahme bestimmt. Als Kontrollgruppen sind entsprechende Wasser-injizierte Oozyten auf dieselbe Weise behandelt worden. Die mittlere Citrat-Aufnahme der mit H₂O₂ vorbehandelten Transporter exprimierenden Oozyten lag bei $3,7 \pm 0,8$ pmol·Oozyte⁻¹, die der Oozyten ohne Vorinkubation bei $6,2 \pm 1,3$ pmol·Oozyte⁻¹. Die Wasser-injizierten Kontrollgruppen zeigten mit Vorinkubation eine mittlere Citrat-Aufnahme von $0,7 \pm 0,3$ pmol·Oozyte⁻¹, ohne diese lag der Mittelwert der Aufnahme bei $1,3 \pm 0,4$ pmol·Oozyte⁻¹.

Die alleinige hNaCT-vermittelte Citrat-Aufnahme zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Citrat-Aufnahme zwischen Oozyten mit bzw. ohne H₂O₂-Vorbehandlung. Mit H₂O₂-Vorinkubation lag die mittlere Aufnahme bei $2,7 \pm 0,6$ pmol·Oozyte⁻¹, ohne diese lag sie bei $4,6 \pm 1,2$ pmol·Oozyte⁻¹. Die Werte sind in Abb. 3.10 graphisch in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

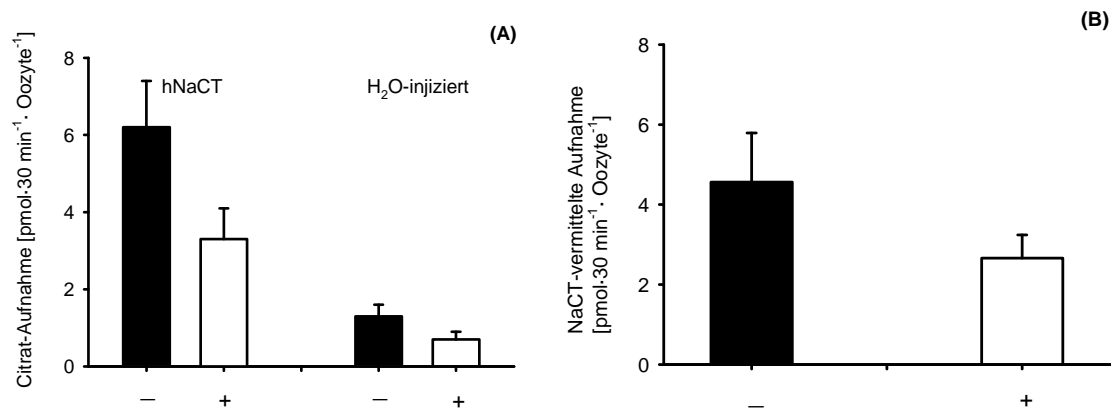


Abb. 3.10: Beeinflussung der hNaCT-vermittelten Citrat-Aufnahme durch H₂O₂-Vorinkubation

Die Abbildungen zeigen die [¹⁴C]-Citrat-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nl cRNA des hNaCT-Transporters bzw. mit nukleasefreiem Wasser für die jeweiligen Kontrollmessungen injiziert wurden. Dieser Versuch wurde an Gruppen von 10 - 11 Oozyten von insgesamt 3 Versuchstieren durchgeführt. Die Inkubationszeit während des Aufnahmeversuchs betrug jeweils 30 min, die [¹⁴C]-Citrat-Konzentration lag für alle Versuchsbedingungen bei 12 μM. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

(A) Der schwarze Balken zeigt jeweils die Aufnahme von Citrat ohne vorherige Inkubation in 2 mM H₂O₂, links die der hNaCT-injizierten, rechts die der Wasser-injizierten Oozyten. Die jeweils weißen Balken stehen für die entsprechende Citrat-Aufnahme nach Vorinkubation in 2 mM H₂O₂ gelöst in ORI.

(B) Die Differenzmessung zeigt keinen signifikanten Unterschied in der hNaCT-vermittelten Aufnahme von Citrat (*p>0,05).

3.5.2 Hemmbarkeit des hNaCT-vermittelten Citrat-Transports durch GSH

In diesem Versuch wurde überprüft, ob GSH tatsächlich, wie vermutet, zu den Substraten des hNaCT gehört. Um dies zu untersuchen, wurden hNaCT-injizierte Oozyten zunächst für 30 min in 2 mM H₂O₂ in ORI vorbehandelt, anschließend folgte der Aufnahmeversuch, bei dem Gruppen von Oozyten in ORI unter alleiniger Zugabe von 12 μM [¹⁴C]-Citrat für 30 min inkubiert wurden, während dem Versuchsmedium der Vergleichsgruppen 3 mM GSH hinzugefügt wurden. Zur Kontrolle wurden entsprechende Gruppen von Wasser-injizierten Oozyten auf dieselbe Weise behandelt. Der Mittelwert der Citrat-Aufnahme der in ORI inkubierten hNaCT-exprimierenden Oozyten lag bei 2,4 ± 0,5 pmol·Oocyte⁻¹, bei Zugabe von 3 mM GSH lag dieser Wert mit 1,3 ± 0,2 pmol·Oocyte⁻¹ darunter. Für die Wasser-injizierten Kontrollgruppen lagen die Mittelwerte der Citrat-Aufnahme in ORI bei 0,8 ± 0,3 pmol·Oocyte⁻¹ bzw. bei 0,7 ± 0,3 pmol·Oocyte⁻¹ für die mit GSH inkubierten Oozyten.

Die alleinige hNaCT-vermittelte Citrat-Aufnahme, die sich aus der Differenz der Aufnahme von hNaCT-injizierten zu Wasser-injizierten Oozyten errechnet, zeigte einen signifikanten

Unterschied bezüglich der Zugabe von GSH. Während die mittlere Citrat-Aufnahme der in ORI inkubierten Oozyten $1,7 \pm 0,2 \text{ pmol}\cdot\text{Oozyte}^{-1}$ betrug, lag die der mit GSH inkubierten Oozyten mit $0,7 \pm 0,3 \text{ pmol}\cdot\text{Oozyte}^{-1}$ signifikant niedriger.

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse graphisch in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

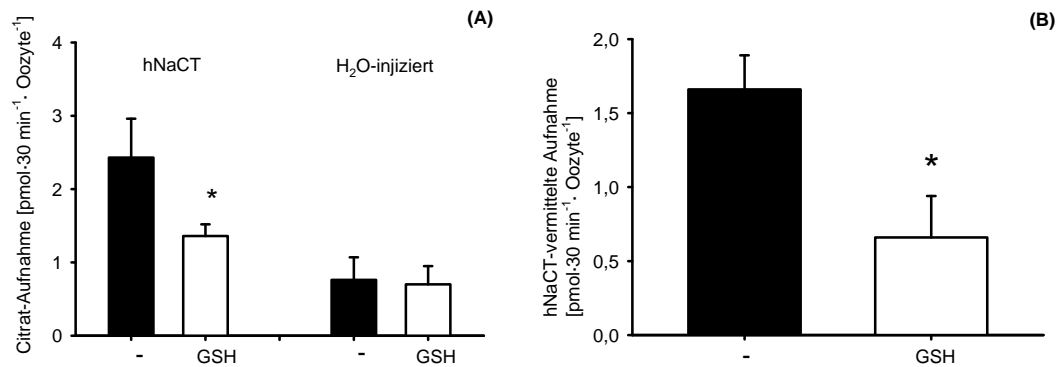


Abb. 3.11: Hemmbarkeit der hNaCT-vermittelten Citrat-Aufnahme durch GSH

Die Abbildung zeigt die [¹⁴C]-Citrat-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nl cRNA des hNaCT-Transporters bzw. mit nukleasefreiem Wasser für die jeweiligen Kontrollmessungen injiziert wurden. Dieser Versuch wurde an Gruppen von 9 - 11 Oozyten von insgesamt 3 Versuchstieren durchgeführt. Die Inkubationszeit während des Aufnahmeversuchs betrug jeweils 30 min, die [¹⁴C]-Citrat-Konzentration lag für alle Versuchsbedingungen bei 12 μM . Vor Versuchsbeginn wurden die Oozyten jeweils für 30 min in 2 mM H₂O₂ gelöst in ORI inkubiert. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

(A) Der schwarze Balken zeigt jeweils die Aufnahme von Citrat in reinem ORI, links die der hNaCT-injizierten, rechts die der Wasser-injizierten Oozyten. Die jeweils weißen Balken stehen für die entsprechende Citrat-Aufnahme bei Zugabe von 3 mM GSH zum Versuchsmedium.

(B) Die Differenzmessung zeigt einen signifikanten Unterschied (* $p < 0,05$) in der hNaCT-vermittelten Aufnahme von Citrat in An- und Abwesenheit von GSH.

3.5.3 Natriumabhängigkeit des hNaCT-vermittelten Transports von [³⁵S]-GSH

Mit dem folgenden Versuch sollte die Natriumabhängigkeit der Aufnahme von GSH über den hNaCT belegt werden. Zunächst wurden hNaCT-injizierte sowie zur Kontrolle Wasser-injizierte Oozyten für 30 min in 2 mM H₂O₂ in ORI vorbehandelt, anschließend folgte der Aufnahmeversuch. Als Versuchsmedium dienten ORI sowie ein natriumfreier ORI (Zusammensetzung siehe Seite 18), bei dem das Natrium durch *N*-Methyl-D-Glucamin (NMDG) ersetzt wurde. Diesen Medien wurde jeweils GSH in einer Konzentration von 2,02 μM [³⁵S]-GSH plus 1 mM GSH zugegeben, anschließend wurden die unterschiedlichen

Versuchsgruppen von Oozyten für 30 min darin inkubiert. Der Mittelwert der GSH-Aufnahme der in ORI inkubierten hNaCT-exprimierenden Oozyten lag bei $122,7 \pm 20,5 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$, bei Ersatz des Natriums durch NMDG lag dieser Wert mit $80,1 \pm 14,8 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$ deutlich niedriger. Für die Wasser-injizierten Kontrollgruppen lagen die Mittelwerte der GSH-Aufnahme in ORI bei $73,4 \pm 4,2 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$ bzw. bei $66,8 \pm 16,0 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$ für die im natriumfreien ORI inkubierten Oozyten. Die alleinige hNaCT-vermittelte GSH-Aufnahme, die sich aus der Differenz der jeweiligen Wasser-injizierten und der Transporterwerte errechnet, zeigte einen signifikanten Unterschied bezüglich der An- bzw. Abwesenheit von Natrium im Versuchsmedium. Während die mittlere GSH-Aufnahme der in ORI inkubierten hNaCT-exprimierenden Oozyten $49,3 \pm 24,6 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$ betrug, lag die der in natriumfreiem ORI inkubierten Oozyten mit $13,3 \pm 15,4 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$ deutlich darunter. In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse graphisch in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

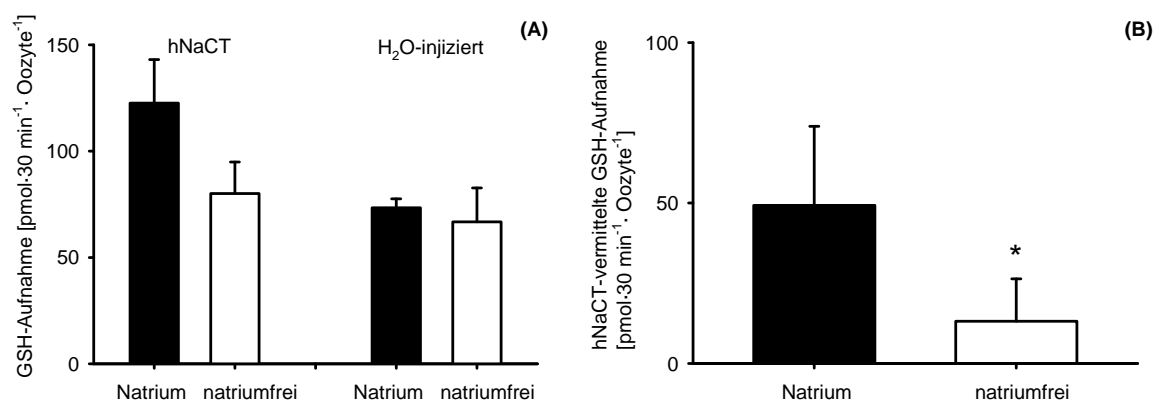


Abb. 3.12: Natriumabhängigkeit der GSH-Aufnahme über den hNaCT-Transporter

Die Abbildung zeigt die GSH-Aufnahme in Oozyten, die drei Tage zuvor mit 23 nl cRNA des hNaCT-Transporters bzw. mit nukleasefreiem Wasser für die jeweiligen Kontrollmessungen injiziert wurden. Dieser Versuch wurde an Gruppen von 10 - 11 Oozyten von insgesamt 3 Versuchstieren durchgeführt, es erfolgte eine Vorinkubation für 30 min in 2 mM H₂O₂ in ORI. Die Inkubationszeit während des Aufnahmeversuchs betrug jeweils 30 min, die GSH-Konzentration lag für alle Versuchsbedingungen bei ~1 mM. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Versuchsbedingung.

(A) Der schwarze Balken zeigt jeweils die Aufnahme von GSH in Anwesenheit von Natrium im Versuchsmedium, links die der hNaCT-injizierten, rechts die der Wasser-injizierten Oozyten. Die jeweils weißen Balken stehen für die entsprechende Citrat-Aufnahme im natriumfreien Versuchsmedium.

(B) Die Differenzmessung zeigt einen signifikanten Unterschied in der hNaCT-vermittelten Aufnahme von GSH in An- bzw. Abwesenheit von Natrium (* $p < 0,05$).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden mögliche Transportsysteme für Glutathion aus dem Blutplasma über die Basolateralmembran proximaler Tubuluszellen untersucht. Aufgrund der Konzentration von GSH im Tubuluslumen, die durch alleinige Filtration nicht erreicht werden kann, geht man neben der freien Filtration auch von einem aktiven Transport ins Tubuluslumen aus. Dementsprechende Transportproteine der apikalen Bürstensaummembran sind bekannt, für Transporter der Basolateralmembran, die eine Aufnahme aus dem Plasma medieren, gibt es bislang lediglich hypothetische Überlegungen, die noch nicht überprüft wurden: da GSH in seiner Struktur den Dicarboxylaten ähnelt und zudem eine Natriumabhängigkeit des Transports bekannt ist (LASH 2005), liegt die Vermutung nahe, dass einer oder möglicherweise auch beide elektrogenen und sich in der Basolateralmembran befindenden Di- bzw. Tricarboxylat-Transporter (hNaDC3 und hNaCT), am Transport von GSH beteiligt sein könnten.

Diese Hypothesen sollten nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit verifiziert werden. Allerdings gestaltete sich die Durchführung der Versuchsreihen schwieriger als erwartet, da häufig keine homogenen Ergebnisse erreicht wurden und somit zahlreiche Wiederholungen und Modifizierungen nötig waren. Gründe dafür waren beispielsweise das unterschiedliche Expressionsverhalten der Oozyten, saisonale Schwankungen in der Güte der Oozyten und variierende intraoozytäre Konzentrationen an zu untersuchenden Substanzen, hier speziell des GSH.

4.1 Testen der idealen Versuchsbedingungen

Zu Beginn der Untersuchungen am hNaDC3-Transporter waren etliche Versuche nötig, um die Versuchsbedingungen herauszufinden, unter denen die für die geplanten Testreihen bestmöglichen Ergebnisse erzielt werden konnten. Zur Verdeutlichung der Problematik der hohen Schwankungen innerhalb der jeweils untersuchten Oozytengruppen sind in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2 zwei „Negativ-Beispiele“ aufgeführt. In diesen Versuchen sollte geprüft werden, inwieweit die Aminosäurebausteine des Glutathions (Glycin, Cystein und Glutamat) sowie dessen Redoxpartner GSSG einen Einfluss auf den Transport von Succinat über den hNaDC3 haben. Es wurde im Laufe der o.g. ersten Versuchsreihen allerdings

deutlich, dass zwischen den mit unterschiedlichen Substanzen versetzten Versuchsmedien nur sehr geringfügige Unterschiede bezüglich der Hemmung der Aufnahme von Succinat zu erkennen waren und dass selbst Stoffe, die sich später als Inhibitoren herausstellen sollten, keinerlei Effekt bzw. sogar gegenteilige Effekte auszulösen schienen, wie beispielsweise das Glutathion selbst (siehe Abb. 3.2 und Abb. 3.3).

Bei diesen ersten Versuchsreihen wurden Stoffkonzentrationen von lediglich 1 mM eingesetzt und zudem wurden die Oozyten nicht, wie sich im späteren Verlauf als sinnvoll herausstellte, vor Versuchsbeginn in H₂O₂-haltiger Oozyten-Ringer-Lösung inkubiert, was einen entscheidenden Einfluss auf die Versuchsergebnisse hat. Dieser Sachverhalt wird in den folgenden Kapiteln anhand einiger Beispiele näher erläutert.

4.1.1 Zeitreihe des hNaDC3-Transporters

Um die nötige Inkubationszeit der hNaDC3-injizierten Oozyten festlegen zu können, wurde zunächst eine Zeitreihe der Aufnahme von Succinat durchgeführt (siehe Kapitel 3.1). Als Substrat wurde radioaktiv-markiertes Succinat verwendet, bei dem es sich um ein vom hNaDC3-Transporter bevorzugt transportiertes Dicarboxylat handelt (WANG H et al. 2000). Es zeigte sich ein linearer Anstieg der in die Oozyte aufgenommenen Substratmenge und auch nach 60 min bestanden noch keinerlei Anzeichen eines gesättigten Transports (siehe Abb. 3.1). Da bereits nach 15 min eine deutliche Differenz zwischen Transporter- und Wasser-injizierten Oozyten zu erkennen war, wurde dies als angemessene Aufnahmezeit für die geplanten Versuche gewählt.

Zwar hätte man aufgrund des linearen Anstiegs der intrazellulären Substratkonzentration auch eine längere Aufnahmezeit wählen können, allerdings gibt es einige Argumente, die dem widersprechen. So stieg beispielsweise die Succinat-Konzentration der Wasser-injizierten Oozyten ebenso linear an, wenn auch auf wesentlich niedrigerem Niveau, als die der mit der mRNA des hNaDC3 injizierten Oozyten. Es ist demzufolge von einer zusätzlich stattfindenden Diffusion des Substrats in die Oozyten auszugehen, die sich natürlich der Dauer der Inkubationszeit entsprechend erhöht. Um diese unspezifische Aufnahme so gering wie möglich zu halten, ist eine kurze Inkubationszeit sinnvoll.

Ein weiteres Argument für eine verkürzte Aufnahmezeit liegt im Versuchsablauf selbst. Die Oozytengruppen müssen aus sicherheitstechnischen Gründen bei Raumtemperatur in ihrem jeweiligen Versuchsmedium inkubiert werden. Dies hat natürlich zur Folge, dass solche

Oozyten, die über einen längeren Zeitraum Temperaturen ausgesetzt sind, die von denen von ihnen bevorzugten 16 – 18°C abweichen, schneller absterben bzw. keine verwertbaren Versuchsergebnisse mehr liefern. Das könnte auch der Grund sein, warum die Werte der für eine Stunde inkubierten Wasser- und auch der RNA-injizierten Oozyten so erhöht sind.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit 15 min die ideale Versuchszeit gewählt ist, da nach dieser Zeit bereits eine ausreichende Aufnahme des Substrats zu erkennen ist, während unspezifische Effekte so weit wie möglich reduziert werden.

4.1.2 Einfluss von Substratkonzentration und H₂O₂-Vorbehandlung

Aufgrund der anfangs nicht verwertbaren Ergebnisse stellte sich natürlich die Frage, welche Versuchsmodifikationen nötig sind, um dies zu ändern. Naheliegend war zunächst eine Veränderung der Substratkonzentration, die pro Versuchsmedium eingesetzt wurde, in diesem Fall eine Erhöhung von 1 mM auf 3 mM. Beispielfhaft soll dies nun anhand des Glutathions verdeutlicht werden.

In den oben genannten „Negativ-Experimenten“ führte eine GSH-Konzentration von 1 mM im Versuchsmedium kaum zu einer Veränderung der Aufnahme von Succinat im Vergleich zur Aufnahme der in reinem ORI inkubierten Oozyten (siehe Abb. 3.2 und Abb. 3.3). Es zeigte sich allerdings auch nach Erhöhung der Substratkonzentration auf 3 mM in den meisten Oozyten keine Hemmung der Aufnahme von Succinat (siehe Abb. 3.4). Zwar konnte in einem Dixon-Plot, der dazu diente, die Konzentration an GSH herauszufinden, die eine maximale Hemmung der Succinat-Aufnahme hervorruft, gezeigt werden, dass die K_i , die sog. Hemmkonstante, bei $3,6 \pm 1,6$ mM GSH liegt, allerdings traten auch bei diesem Versuch hohe Standardabweichungen auf (siehe Abb. 3.5).

Dies führte zu der Überlegung, dass es möglicherweise neben der Stoffkonzentration der zu untersuchenden Substanz einen weiteren Grund für die unerwartet niedrige Hemmung der Aufnahme von Succinat durch GSH geben muss. So wurde eine weitere Ursache im GSH selbst gesehen: Es ist bekannt, dass die Oozyten des *Xenopus laevis* über endogenes GSH variabler Konzentration verfügen (BALLATORI et al. 1996). Natürlich wäre das eine mögliche Erklärung für die starken Schwankungen innerhalb der einzelnen Oozytengruppen, da die jeweilige Triebkraft für eine Aufnahme des GSH über den hNaDC3 in die Oozyte direkt von der endogenen Stoffkonzentration bzw. dem Konzentrationsgefälle über der Membran abhängt. Zu diesem Zweck wurde in einer weiteren Versuchsreihe getestet, ob neben einer

Erhöhung der Substratkonzentration im Versuchsmedium durch eine zusätzliche Vorinkubation der Oozyten in 2 mM H₂O₂ in ORI vor Versuchsbeginn die endogene GSH-Konzentration gesenkt werden kann (LI et al. 2000) und dadurch homogene Versuchsergebnisse erreicht werden können. Auf diese Weise sollte durch Schaffung gleicher Bedingungen innerhalb der jeweiligen Oozytengruppen die hohe Schwankungsbreite der einzelnen Messungen minimiert werden. Es stellte sich heraus, dass durch dieses Verfahren in Kombination mit der erhöhten Substratkonzentration schließlich aussagekräftige Versuche möglich wurden. Ein Beispiel dafür findet sich in Kapitel 3.3.4, in dem unter diesen modifizierten Versuchsbedingungen die Succinat-Aufnahme über den hNaDC3-Transporter in An- und Abwesenheit von GSH verglichen wurde (siehe Abb. 3.7). Nun zeigte sich eine signifikante Hemmung der Aufnahme von Succinat durch die Anwesenheit von GSH.

Diese Ergebnisse belegten, dass die getesteten Veränderungen im Versuchsprotokoll durchaus sinnvoll waren und somit für die nachfolgenden Versuche beibehalten werden sollten. Es stellte sich allerdings die Frage, ob durch die Inkubation in 2 mM H₂O₂ in ORI vor Versuchsbeginn eine Beeinflussung der Transporteigenschaften besteht. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Versuch die Transportkapazität einer vorbehandelten mit der einer unbehandelten Oozytengruppe verglichen (siehe Kapitel 3.3.3), wobei eine leichte, jedoch nicht signifikant verminderte Aufnahme von Succinat in der mit H₂O₂ vorbehandelten Gruppe beobachtet wurde (siehe Abb. 3.6). Da allerdings in den geplanten Versuchsreihen alle Oozytengruppen diesbezüglich gleich behandelt wurden, sind die Ergebnisse untereinander vergleichbar und aussagekräftig, lediglich auf einem insgesamt erniedrigten Niveau.

4.1.3 Einfluss von DTT auf die Interaktionsfähigkeit von GSH am hNaDC3-Transporter

Eine weitere Hypothese, die einen mangelnden Einfluss von GSH auf den hNaDC3-vermittelten Succinat-Transport erklären könnte, war die Eigenschaft von GSH, durch Luftsauerstoff schnell zu GSSG oxidiert zu werden. Daher wurde in einer Versuchsreihe geprüft, ob sich der Succinat-Transport in einer Oozytengruppe, die in ORI unter Zugabe von GSH (ORI_{GSH}) inkubiert wurde, von dem einer solchen Gruppe unterscheidet, bei der dem Versuchsmedium neben GSH auch Dithiothreitol (DTT) zugegeben wurde. DTT ist ein Reagenz, das die Oxidation von Sulfhydryl- (SH-) Gruppen zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff verhindert. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass GSH tatsächlich

in seiner reduzierten Form vorliegt und nicht eventuell schon vor Versuchsbeginn bzw. während der Versuchsdurchführung zu GSSG oxidiert worden ist. Um eine alleinige Wirkung dieses Stoffes auszuschließen, wurde zudem eine weitere Oozytengruppe in ORI unter Zugabe von DTT (ORI_{DTT}) gemessen. Entsprechend den Erwartungen zeigte sich bei den in ORI_{GSH} inkubierten Oozyten eine signifikante Hemmung der Succinat-Aufnahme (siehe Abb. 3.8). Unter zusätzlicher Zugabe von DTT, das dazu dienen sollte, GSH in seiner reduzierten Form zu erhalten und somit letztlich den Transport des Succinats durch GSH noch stärker zu inhibieren, zeigte sich jedoch keine Signifikanz bezüglich der genannten Hemmung. Diese mangelnde Signifikanz ist durch einzelne Versuche zu erklären, bei denen die erwartete Hemmung ausblieb und die somit den Mittelwert aller Versuchsergebnisse dementsprechend beeinflussten. Wodurch diese Streuung der Ergebnisse zustande kam, ist im Nachhinein nicht feststellbar.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse der in ORI_{GSH} unter Zugabe von DTT inkubierten Oozyten denen der in ORI_{GSH} gemessenen entsprechen. Demzufolge liegt GSH auch ohne Vorhandensein eines Antioxidans während der Versuchsdauer in seiner reduzierten Form vor, was die vergleichbaren Ergebnisse in An- und Abwesenheit von DTT belegen.

Die zur Kontrolle in ORI_{DTT} inkubierten Oozyten zeigten bezüglich des Succinat-Transports fast identische Werte wie die der in reinem ORI gemessenen Oozyten (siehe Abb. 3.8). DTT hat somit auf den hNaDC3-Transporter keinerlei Wirkung, weder allein noch als Antioxidans für GSH, und wurde demzufolge in den folgenden Versuchen nicht weiter eingesetzt.

4.2 Interaktionen am hNaDC3-Transporter

Nachfolgend werden die Versuchsreihen diskutiert, die den Einfluss von GSH, GSSG und der Bausteine des GSH auf die hNaDC3-vermittelte Succinat-Aufnahme beschreiben.

4.2.1 Hemmbarkeit der Succinat-Aufnahme durch Glutathion

Im Glutathion-Stoffwechsel des Körpers nehmen die Nieren eine zentrale Stellung ein, da sie der Ort sind, an dem die Homöostase des GSH aufrecht erhalten wird. Aufgrund des hohen oxidativen Stresses, dem die Nieren durch ihre Rolle als Entgiftungsorgan ausgesetzt sind, besteht ein hoher Bedarf an GSH als Reduktionsmittel, aber auch die Ausscheidung des Glutathions über den Urin ist Aufgabe der Nieren. Da bereits während einer Nierenpassage mehr als 80% des Plasma-Glutathions aus dem Blut entfernt werden, ein Wert, der die alleinige Filtrationsfähigkeit der Niere übersteigt (HÄBERLE et al. 1979; RANKIN et al. 1985), muss demzufolge ein Teil der renalen GSH-Extraktion zusätzlich über die basolaterale Membran der Tubuluszellen direkt aus dem Plasma erfolgen (RANKIN et al. 1985) und in den Primärharn sezerniert werden. Die für diese Sekretion verantwortlichen luminalen Transporter sind bereits bekannt, es handelt sich dabei um Mitglieder der „multidrug resistance-associated protein (MRP)“- und der „organic anion transporting polypeptide (OATP)“-Familie (BALLATORI et al. 2005).

Dem gegenüber steht die Aufnahme des GSH aus dem Plasma über die basolaterale Membran der Tubuluszellen, die bisher nur unvollständig geklärt ist. Ein möglicher Transporter, der für diese Aufnahme in Frage kommt, ist der hNaDC3, der im Rahmen dieser Dissertationsarbeit dahingehend näher untersucht worden ist.

Um einen Transport von Glutathion über den hNaDC3-Transporter nachzuweisen, wurde an Oozyten, die 3 Tage zuvor mit der cRNA des hNaDC3 injiziert worden sind, der Transport von radioaktiv-markiertem Succinat in An- und Abwesenheit von GSH bestimmt. Dabei zeigte sich eine signifikante Hemmung (siehe Abb. 3.7, Abb. 3.8 und Abb. 3.9) der hNaDC3-vermittelten Aufnahme von Succinat in Gegenwart von Glutathion (OR_{GSH}). Dies bestätigt die Theorie, dass es sich bei GSH tatsächlich um ein Substrat des hNaDC3-Transporters handelt. Demzufolge ist davon auszugehen, dass dieser Transporter aufgrund seiner Lokalisation in der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen für die Aufnahme von Glutathion aus dem Plasma in die Zelle (mit-) verantwortlich ist. Er trägt somit entscheidend zur Elimination von GSH aus dem Körperkreislauf bei.

4.2.2 Hemmbarkeit der Succinat-Aufnahme durch den Redoxpartner GSSG

Ein weiterer Stoff, der auf mögliche Interaktionen am hNaDC3-Transporter untersucht wurde, ist der Redoxpartner des GSH, das Glutathion-Disulfid GSSG. Dabei handelt es sich um zwei Moleküle GSH, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (siehe Abb. 4.1). Aufgrund der geschlossenen Disulfidbrücke ist GSSG nicht reaktiv, d.h., Komplexierungen mit Schwermetallen o.ä. sind in dieser Form nicht möglich. Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob lediglich Glutathion als Tripeptid zu den Substraten des hNaDC3 gezählt werden kann oder ob es auch als Dimer transportiert wird. In ihren Untersuchungen 1984 haben LASH und JONES beispielsweise festgestellt, dass GSSG ebenfalls einem natriumabhängigen Prozess folgend über die basolaterale Membran aufgenommen wird, allerdings mit nur etwa 20 % eines entsprechenden GSH-Transports. Um diese Fragen zu klären, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, in der neben einer ORI-Vergleichsgruppe die hNaDC3-injizierten Oozyten in 3 mM GSSG (ORI_{GSSG}) inkubiert wurden (siehe Kapitel 3.4.1). Im Bezug auf eine Interaktion am hNaDC3-Transporter durch GSH in seiner Form als Disulfid GSSG konnte dabei bewiesen werden, dass Glutathion als Dimer nicht zu den Substraten dieses Transporters gerechnet werden kann. Die Succinat-Aufnahme in ORI_{GSSG} lag etwa im Bereich der Aufnahme der in der ORI-Vergleichsgruppe gemessenen (siehe Abb. 3.8). Da die bevorzugten Substrate des hNaDC3 Dicarboxylate mit einer Kettenlänge von 4 – 5 Kohlenstoffatomen sind (WANG H et al. 2000), ist es nicht überraschend, dass ein Molekül wie GSSG nicht über diesen Transporter aufgenommen wird.

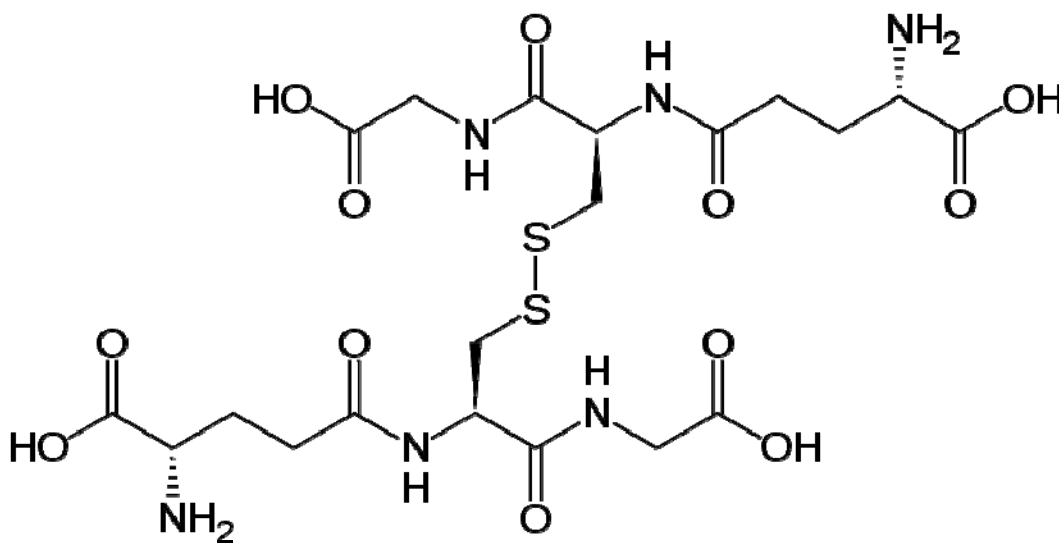


Abb. 4.1: Strukturformel des GSSG

(Quelle: www.commonswikimedia.org)

4.2.3 Hemmbarkeit der Succinat-Aufnahme durch die Aminosäurebausteine

Da die Nieren aufgrund ihrer Funktion einen hohen Bedarf an Glutathion haben, verfügen sie nicht nur über Transportsysteme, die GSH aus dem Blut zur Verfügung stellen, sondern auch über hohe Konzentrationen an Enzymen, die für die intrazelluläre Synthese des GSH benötigt werden. Dies setzt natürlich die Bereitstellung der Aminosäurebausteine des GSH voraus. Ein Teil dieser Bausteine gelangt über luminale Aminosäure- und Peptidtransporter aus dem Primärharn in die Tubuluszelle (GETHER et al. 2006; KANAI und HEDIGER 2004; RUBIO-ALIAGA und DANIEL 2008). Filtriertes GSH selbst wird beispielsweise durch die in der Bürstensaummembran lokalisierte γ -Glutamyltransferase in seine Grundbausteine Glycin, Cystein und Glutamat zerlegt, die wiederum in die Zelle aufgenommen werden und zur erneuten Biosynthese zur Verfügung stehen. Diese Abläufe finden an der luminalen Membran statt. Der in dieser Arbeit untersuchte hNaDC3-Transporter der basolateralen Membran sollte prinzipiell mit der Aufnahme der Aminosäuren aus dem Plasma nicht interagieren. Da es sich dabei jedoch um die Grundbausteine des Glutathion handelt, wurde der Transporter auch auf mögliche Interaktionen mit Glycin, Cystein und Glutamat untersucht, da diese Studie den Beleg liefern soll, dass der hNaDC3 bezüglich des GSH-Haushalts lediglich für die Aufnahme des intakten Tripeptids aus dem Blut verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurden Versuchsreihen durchgeführt, bei denen der reguläre Succinat-Transport über den hNaDC3 in Anwesenheit der drei Aminosäuren (ORI_{Gly} , ORI_{Cys} , ORI_{Glu}) bestimmt wurde (siehe Kapitel 3.4.2). Dabei stellte sich heraus, dass entgegen den Erwartungen durch Glycin eine Stimulation der Succinat-Aufnahme hervorgerufen wurde (siehe Abb. 3.9). Es handelt sich allerdings nicht um eine signifikante Stimulation, sodass dies auch als unspezifischer Effekt im Rahmen des Versuchsablaufes ausgelegt werden kann. Für diese Annahme spricht auch die hohe Standardabweichung von $55,9 \pm 22,3 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$ im Vergleich zu der der ORI-Gruppe mit $32,5 \pm 9,7 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1}$. Des Weiteren wird die Vermutung eines unspezifischen Effektes durch die Struktur des Glycin erhärtet. Bei Glycin handelt es sich um die Aminosäure mit dem niedrigsten Molekulargewicht. Überwiegend liegt es im Körper als sogenanntes Zwitterion vor, da die saure Carboxylgruppe an die basische Aminogruppe bindet, wodurch Glycin insgesamt ungeladen ist. Zudem „verliert“ es durch diese Struktur die endständige Carboxylgruppe, die viele der Substrate des hNaDC3 in der Regel aufweisen. Der hNaDC3 hat eine Präferenz für Dicarboxylate bzw. für anionische,

divalente Substrate (PAJOR 2006), so dass demzufolge Glycin kein Substrat des hNaDC3 sein sollte.

Aber auch eine Stimulation durch Glycin ließe sich begründen. So wäre beispielweise durch die Anwesenheit dieser Aminosäure eine Konformationsänderung des Transporters möglich, wodurch dessen Affinität für Succinat erhöht wird.

Das gleiche gilt auch für die Aminosäure Cystein, die ebenfalls auf Interaktionen am hNaDC3-Transporter getestet wurde und eine Stimulation des Succinat-Transports hervorruft (siehe Abb. 3.9). Ebenso wie Glycin liegt Cystein im Körper als Zwitterion vor, wodurch es insgesamt ungeladen ist und somit nicht über die Eigenschaften verfügt, die die bevorzugten Substrate des hNaDC3-Transporters in der Regel aufweisen. Demzufolge zeigte sich erwartungsgemäß keine Hemmung der Aufnahme von Succinat über den hNaDC3. Wodurch die doch deutliche Stimulation hervorgerufen wird, ist allerdings unklar, jedoch liegt auch in diesem Fall eine hohe Standardabweichung vor ($75,3 \pm 23,7 \text{ pmol-Oozyte}^{-1}$), was unspezifische Effekte als Ursache am sinnvoll erscheinen lässt. Eine sehr spekulative Erklärung könnte sein, dass Cystein eine Konformationsänderung am hNaDC3-Transporter hervorruft, durch die dessen Affinität für Succinat erhöht wird.

Anders verhält sich hingegen die ebenfalls getestete Aminosäure Glutamat bzw. Glutaminsäure, durch die eine signifikante Hemmung am hNaDC3-Transporter hervorgerufen wird (siehe Abb. 3.9). Glutaminsäure verfügt über zwei endständige Carboxylgruppen, wodurch es in seiner Struktur den Dicarboxylaten, den bevorzugten Substraten des hNaDC3, ähnelt. Wie auch bei GSH, das ebenso über zwei Carboxylgruppen verfügt, ist davon auszugehen, dass es diese Struktur ist, die einen Transport über den hNaDC3 ermöglicht (PAJOR 2006). Zudem spricht auch die Struktur des Glutamats für einen Transport über den hNaDC3: in einer Arbeit von 2000 gingen WANG H et al. davon aus, dass es Dicarboxylate mit einer Kettenlänge von 4 – 5 Kohlenstoffatomen seien, die die idealen Substrate des hNaDC3 darstellen. LASH und JONES hingegen vermuteten in einer Arbeit von 1984, dass die für die Substrate des hNaDC3 entscheidende Struktur in der Glutamygruppe zu finden ist. Auszuschließen ist diese Theorie nicht, da Glutathion und auch Glutaminsäure sowohl über zwei Carboxyl- als auch über eine Glutamygruppe verfügen.

Eine weitere Erklärung für die verminderte Succinat-Aufnahme in Anwesenheit von Glutamat könnte allerdings auch auf folgenden Mechanismus zurückgeführt werden: bei Glutamat handelt es sich um einen stimulierenden Neurotransmitter, der allerdings in einer

3 millimolaren Konzentration, die für diesen Versuch gewählt wurde, unter physiologischen Bedingungen (nanomolarer Bereich) toxisch wirken würde. Demzufolge wäre es denkbar, dass ein Teil der gemessenen Oozyten während der Inkubationszeit so stark geschädigt wurde, dass eine Succinat-Aufnahme nicht mehr bzw. nur in sehr reduziertem Ausmaß stattfinden konnte. Dies würde einen inhibitorischen Effekt am Transporter vortäuschen.

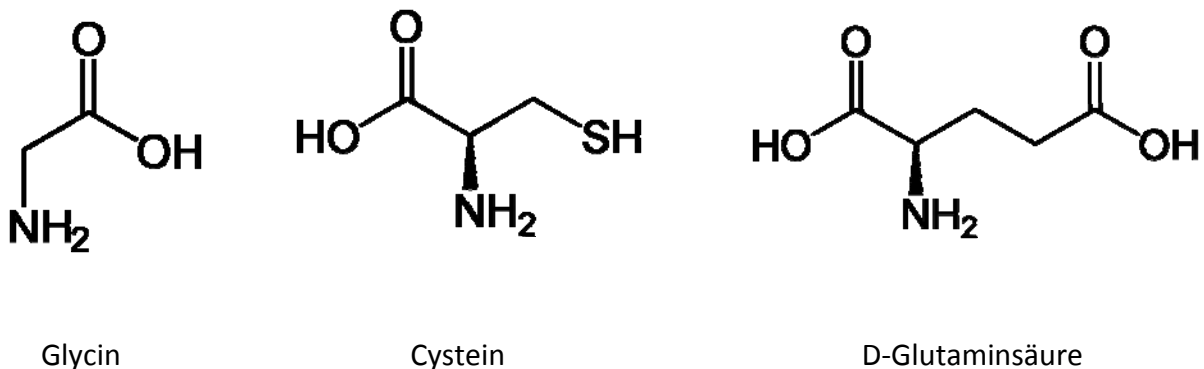


Abb. 4.2: Strukturformeln der Aminosäurebausteine des GSH: Glycin, Cystein und Glutaminsäure

(Quelle: Wikipedia, s.v. Glycin, Cystein und Glutaminsäure)

4.3 Der humane natriumabhängige Citrat-Transporter (hNaCT)

In den folgenden Kapiteln wird nun der Transporter näher charakterisiert, der neben dem hNaDC3 für ein weiteres natriumabhängiges GSH-Transportsystem der Basolateralmembran proximaler Tubuluszellen stehen könnte, der hNaCT.

Zunächst wird auf dessen Eigenschaften bezüglich der Aufnahme von Glutathion eingegangen, im Weiteren folgt eine tiefergehende Untersuchung der Charakteristika dieses Transports. Wie auch bei Versuchen am hNaDC3 wurden die verwendeten Oozyten vor dem jeweiligen Versuchsbeginn in einer H₂O₂-haltigen Lösung inkubiert, um die intraozytäre GSH-Konzentration so gering wie möglich zu halten. Es zeigte sich auch hier eine leicht erniedrigte Citrat-Aufnahme in Oozyten nach Vorinkubation (siehe Abb. 3.10), allerdings ergeben sich dadurch keine relevanten Beeinträchtigungen der Versuchsergebnisse, da alle Oozyten auf die gleiche Weise behandelt werden und die Vergleichbarkeit untereinander somit bestehen bleibt.

4.3.1 Transport von Glutathion über den hNaCT

Laut LASH's Theorie (LASH 2005) liegt die Vermutung nahe, dass möglicherweise der hNaCT-Transporter für das existierende zweite, natriumabhängige Transportsystem der Basolateralmembran proximaler Tubuluszellen stehen könnte. In einer Übersichtsarbeit (LASH 2005) ging er davon aus, dass es dort mindestens drei verschiedene Transporter geben muss, von denen es sich bei zweien um natriumabhängige Systeme handelt. Er beschäftigte sich seitdem jedoch mit lediglich zwei Systemen, für die es zum damaligen Zeitpunkt bereits konkrete Hinweise auf eine Beteiligung an der renalen GSH-Aufnahme gab. Es handelte sich dabei zum einen um den hNaDC3, für den allerdings nur spekuliert wurde, dass er GSH transloziert; der eigentliche Nachweis einer Interaktion von GSH mit dem hNaDC3 wurde erst in dieser Arbeit erbracht, sowie um den OAT3, für den LASH et al. 2007 in einer Studie den Beweis erbrachten, dass er am renalen GSH-Transport über die Basolateralmembran beteiligt ist.

Die vorliegende Arbeit befasst sich nun neben der Charakterisierung des hNaDC3 mit dem dritten, von LASH bisher nicht thematisierten Transportsystem. Für dieses käme ein Transporter in Frage, der 2006 erstmals auch in der Niere nachgewiesen wurde, allerdings lediglich auf RNA-Ebene (YODOYA et al. 2006). Dabei handelt es sich um den humanen natriumabhängigen Citrat-Transporter, hNaCT, ein Mitglied der Familie der natriumabhängigen Sulfat- und Carboxylat-Transporter (NaC's). Er unterscheidet sich in seinen funktionellen Eigenschaften in einigen Punkten jedoch deutlich von den anderen Mitgliedern dieser Familie, beispielsweise durch die geringe Affinität, die er für Dicarboxylate aufweist. Darüber hinaus weist der hNaCT bislang ein enges Spektrum an Substraten auf (siehe Tab. 1.3), was einen möglichen GSH-Transport in Frage stellt.

Es wurde daher in einer ersten Versuchsreihe zunächst getestet, ob GSH zu den Substraten des hNaCT gezählt werden kann. Zu diesem Zweck wurden Oozyten in radioaktiv markiertem Citrat inkubiert, dem bevorzugten Substrat des Transporters. Zum Vergleich wurde bei einer weiteren Gruppe neben GSH [¹⁴C]-Citrat dem Versuchsmedium zugefügt, um mögliche Interaktionen bezüglich der Citrat-Aufnahme durch Glutathion zu testen. Dabei stellte sich heraus, dass der Citrat-Transport über den hNaCT durch die Anwesenheit von GSH signifikant inhibiert wird (siehe Abb. 3.11). Somit ist davon auszugehen, dass zwischen diesen beiden Stoffen eine Interaktion im Sinne einer möglichen kompetitiven Hemmung am Transporter stattfindet.

Im Rahmen eines weiteren Versuchs, bei dem die Natriumabhängigkeit (siehe Kapitel 4.3.2) des hNaCT-vermittelten Transports von GSH untersucht werden sollte, wurde als Vergleichsgruppe eine in ORI inkubierte Oozytengruppe bezüglich der Aufnahme von radioaktiv-markiertem GSH getestet (siehe Abb. 3.12). Im Vergleich zur Wasser-injizierten Kontrollgruppe wurde eine deutlich höhere Aufnahme des GSH bei den hNaCT-injizierten Oozyten beobachtet.

Zusammenfassend ist somit festzustellen, dass aufgrund der Hemmung der Citrat-Aufnahme durch GSH sowie durch den Anstieg der intrazellulären Konzentration an radioaktiv-markiertem GSH nach 30-minütiger Inkubation, GSH zu den Substraten des hNaCT-Transporters gezählt werden kann. Er kann somit als ein weiteres Transportsystem der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen betrachtet werden, das an der Aufnahme von GSH aus dem Blutplasma beteiligt ist.

4.3.2 Natriumabhängigkeit des Glutathion-Transports

Um zu beweisen, dass der hNaCT hinter dem vermuteten zweiten natriumabhängigen Transportsystem für GSH stehen könnte, ist die Natriumabhängigkeit des hNaCT-vermittelten GSH-Transports zu belegen. Zwar ist bekannt, dass es sich bei dem hNaCT um einen elektrogenen Transporter handelt, der Natrium und Substrat in einem Verhältnis von 4:1 aufnimmt (INOUE et al. 2002b), allerdings wurde dies bislang nicht im Bezug auf GSH belegt. Aus diesem Grund wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Aufnahme von radioaktiv-markiertem GSH über den hNaCT in An- und Abwesenheit von Natrium untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass hNaCT-injizierte Oozyten, die in natriumfreiem ORI inkubiert wurden, eine signifikant niedrigere GSH-Aufnahme zeigten als solche, bei denen der Transport in regulärem ORI untersucht wurde (siehe Abb. 3.12).

Dadurch ist auch die Natriumabhängigkeit des GSH-Transports über den hNaCT bewiesen, sodass zusammenfassend tatsächlich davon auszugehen ist, dass mit dem hNaCT das Transportsystem gefunden wurde, das für die zweite Komponente im natriumabhängigen GSH-Transport über die Basolateralmembran proximaler Tubuluszellen steht.

4.4 Ausblick

In einer der nächsten geplanten Untersuchungen wird der hNaDC3-Transporter auf eine mögliche geschlechtsabhängige Expression getestet. Von vielen Transportern, beispielsweise den Organischen-Anionen-Transportern (OAT's), ist ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Expression der Transportproteine bekannt, wobei in den meisten Fällen das Transportprotein in männlichen Tieren höher exprimiert war (SABOLIC et al. 2007). Da bekannt ist, dass die OAT's an den hNaDC3 gekoppelt sind (RIZWAN und BURCKHARDT 2007; ROBERTSON und RANKIN 2006), liegt die Vermutung nahe, dass diese Eigenschaft auch für den hNaDC3 zutreffen könnte. Ein Punkt, der diese These stützt, ist eine von LASH beobachtete erhöhte Empfindlichkeit weiblicher Ratten bei der Aufnahme von GSH-Konjugaten (LASH et al. 2001).

Bezüglich der OAT's wurde bislang nicht ausgeschlossen, dass auch der OAT1 am GSH-Transport beteiligt sein könnte. LASH et al. haben 2007 lediglich den OAT3 dahingehend geprüft, sodass eine Untersuchung des OAT1 noch aussteht. Des Weiteren könnten diese Transporter auf Interaktionen zwischen GSH und seinem Dimer GSSG sowie den Aminosäurebausteinen Glycin, Cystein und Glutamat untersucht werden.

Was den hNaCT betrifft, so ist neben einer tiefergehenden Charakterisierung eine weitere Versuchsreihe bereits geplant. Diese dient dem immunhistochemischen Nachweis des Transporters. Bislang konnte lediglich die RNA des hNaCT in der Niere isoliert werden (YODOYA et al. 2006), mit Hilfe von Antikörpern soll der Transporter nun direkt nachgewiesen werden.

5 Zusammenfassung

Da die Ausscheidung von Glutathion (GSH) über die Nieren die tubuläre Filtration übersteigt, muss GSH zusätzlich sezerniert werden. Zudem war bekannt, dass die Aufnahme von GSH über die basolaterale Membran proximaler Tubuluszellen natriumabhängig ist. Es sollte deshalb in dieser Arbeit die Hypothese überprüft werden, ob einer oder beide der bisher bekannten, natriumabhängigen Carboxylat-Transporter (hNaDC3, hNaCT) für diesen Transport von GSH verantwortlich sein könnten. Diese Hypothese wurde auch dadurch gestützt, dass GSH aufgrund seiner endständigen Carboxylgruppen in seiner Struktur den Dicarboxylaten ähnlich ist.

Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des *Xenopus-laevis*-Oozyten-Expressionssystems. Die Oozyten wurden mit cRNA entsprechend der jeweiligen humanen Isoform des zu untersuchenden Transporters injiziert. Nach Expression der jeweiligen Transportproteine konnten die Interaktionen zwischen GSH und hNaDC3 bzw. hNaCT mittels radioaktiv markiertem Succinat, Citrat und GSH untersucht werden.

Nach Überwindung anfänglicher Schwierigkeiten in der Findung des besten Versuchsdesigns wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die Aufnahme des für den hNaDC3 prototypischen Substrats Succinat wird durch reduziertes GSH signifikant mit einer K_i von ~3 mM gehemmt.
- Oxidiertes GSH (GSSG) und die Bausteine des GSH - Glycin, Glutamat und Cystein – haben, mit Ausnahme von Glutamat, keinen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme von Succinat an hNaDC3-exprimierenden Oozyten.
- Die Aufnahme des für den hNaCT prototypischen Substrats Citrat wird durch reduziertes GSH ebenfalls signifikant gehemmt.
- Radioaktiv markiertes GSH wird über den hNaCT in die Oozyten aufgenommen. Diese Aufnahme ist bei Ersatz des Natriums nicht mehr nachweisbar.

Diese ersten Versuche bestätigen, dass der erste Schritt in der Sekretion von GSH in der Aufnahme von GSH über den hNaDC3 und den hNaCT stattfindet.

6 Literaturverzeichnis

- Aruga S, Pajor AM, Nakamura K, Liu L, Moe OW, Preisig PA, Alpern RJ (2004): OKP cells express the Na⁺-dicarboxylate cotransporter NaDC-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C64-C72
- Bai L, Pajor AM (1997): Expression cloning of NaDC-2, an intestinal Na⁺- or Li⁺-dependent dicarboxylate transporter. *Am J Physiol Gastrointest Liver* 273, G267-G274
- Ballatori N, Wang W, Li L, Truong AT (1996): An endogenous ATP-sensitive glutathione-S-conjugate efflux mechanism in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol* 270, R1156-R1162
- Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R (2005): Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Tox Appl Pharmacol* 204, 238-255
- Ballatori N, Krance SM, Marchan R, Hammond CL (2009): Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med* 30, 13-28
- Beck L, Markovich D (2000): The mouse Na⁺-sulfate cotransporter gene *Nas1*. Cloning, tissue distribution, gene structure, chromosomal assignment and transcriptional regulation by vitamin D. *J Biol Chem* 275, 11880-11890
- Boylard E, Chasseaud LF (1969): The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 32, 173-219
- Burckhardt BC, Lorenz J, Burckhardt G, Steffgen J (2004): Interactions of Benzylpenicillin and Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs with the 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
- 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 rat Na⁺-dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 273, 20972-20981
- Coles B, Ketterer B (1990): The role of glutathione and glutathione transferases in chemical cancerogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 25, 47-70
- Deleve LD, Kaplowitz N (1991): Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 52, 287-305
- Gether U, Anderson PH, Larsson OM, Schousboe A (2006): Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol Sci* 27, 375-383
- Gilbert HF (1982): Biological disulfides: The third messenger? Modulation of phosphofructokinase activity by thiol/disulfide exchange. *J Biol Chem* 257, 12086-12091
- Girard JP, Baekkevold ES, Feliu J, Brandtzaeg P, Amalric F (1999): Molecular cloning and functional analysis of SUT-1, a sulphate transporter from human high endothelial venules. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12772-12777
- Häberle D, Wahlander A, Sies H (1979): Assessment of the kidney function in maintenance of plasma glutathione concentration and redox state in anaesthetized rats. *FEBS Lett* 108, 335-340
- Hagos Y, Krick W, Bräulke T, Mühlhausen C, Burckhardt G, Burckhardt BC (2008): Organic anion transporters OAT1 and OAT4 mediate the high affinity transport of glutarate derivatives accumulating in patients with glutaric acidurias. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 457, 223-231
- Hinchman CA, Ballatori N (1994): Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. *J Toxicol Environ Health* 41, 387-409
- Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B: *Biochemie des Menschen*, 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2002
- Huang W, Wang H, Kekuda R, Fei Y-J, 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 M, Morino Y (1985): Direct evidence for the role of membrane potential in glutathione transport by renal brush-border membranes. *J Biol Chem* 260, 326-331

- 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
- Inoue K, Fei YJ, Zhuang L, Gopal E, Miyauchi S, Ganapathy V (2004): Functional features and genomic organization of mouse NaCT, a sodium-coupled transporter for tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biochem J* 378, 949-957
- Jakoby WB (1978): The glutathione S-transferases: A group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol* 46, 383-414
- Kanai Y, Hediger MA (2004): The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmaceutical aspects. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 447, 469-479
- 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
- Lash LH (2005): Role of glutathione transport processes in kidney function. *Toxicol App Pharmacol* 204, 329-342
- Lash LH, Jones DP (1984): Renal Glutathione Transport. Characteristics of the sodium-dependent system in the basal-lateral membrane. *J Biol Chem* 259, 14508-14514
- Lash LH, Putt DA (1999): Renal Cellular Transport of Exogenous Glutathione: Heterogeneity at Physiological and Pharmacological Concentrations. *Biochem Pharmacol* 58, 897-907
- Lash LH, Qian W, Putt DA, Hueni SE, Elfarra AA, Krause RJ, Parker JC (2001): Renal and hepatic toxicity of trichloroethylene and its glutathione-derived metabolites in rats and mice: Sex-, species-, and tissue-dependent differences. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 155-164
- Lash LH, Putt DA, Xu F, Matherly LH (2007): Role of Rat Organic Anion Transporter 3 (OAT3) in the Renal Basolateral Transport of Glutathione. *Chem Biol Interact* 170, 124-134

- Lee A, Beck L, Markovich D (2000): The human renal sodium sulfate cotransporter (SLC13A1; hNaSi-1) cDNA and gene: organization, chromosomal localization and functional characterization. *Genomics* 70, 354-363
- Li L, Meier PJ, Ballatori N (2000): Oatp2 Mediates Bidirectional Organic Solute Transport: A Role for Intracellular Glutathione. *Mol Pharmacol* 58, 335-340
- Mannervik B (1985): The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 57, 357-417
- Markovich D, Murer H (2004): The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 447, 594-602
- Markovich D, Forgo J, Stange G, Biber J, Murer H (1993): Expression cloning of rat renal $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{(2-)}$ cotransport. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8073-8077
- Markovich D, Regeer RR, Kunzelmann K, Dawson PA (2005): Functional characterization and genomic organization of the human Na^+ -sulfate cotransporter hNaS2 gene (SLC13A4). *Biochem Biophys Res Commun* 326, 729-734
- Meister A, Tate SS (1976): Glutathione and related γ -glutamyl-compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* 45, 559-604
- Nakada T, Zandi Nejad K, Kurita Y, Kudo H, Broumand V, Kwon CY, Mercado A, Mount DB, Hirose S (2005): Roles of Slc13a1 and Slc26a1 sulfate transporters of eel kidney in sulfate homeostasis and osmoregulation in freshwater. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R575-R585
- Olney JW, Zorumski C, Price MT, Labruyere J (1990): L-Cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin. *Science* 248, 596-599
- 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 Renal Fluid Electrolyte Physiol* 270, F642-F648
- Pajor AM (2006): Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulphate transporters. *Pflügers Arch* 451, 597-605
- Pajor AM, Sun N (2000): Molecular cloning, chromosomal organization and functional characterization of a sodium/dicarboxylate cotransporter from mouse kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 279, F482-F490

- Pajor AM, Gangula R, Yao X (2001): Cloning and functional characterization of a high-affinity Na⁺/dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1215-C1223
- Rankin BB, Wells W, Curthoys NP (1985): rat renal peritubular transport and metabolism of plasma [³⁵S]glutathione. *Am J Physiol* 249, F198-F204
- Rannug U (1980): Genotoxic effects of 1,2-dibromoethane and 1,2-dichloroethane. *Mutat Res* 76, 269-295
- Rizwan AN, Burckhardt G (2007): Organic anion transporters of the SLC22 family: Biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharmaceut Res* 24, 450-470
- Robertson EE, Rankin GO (2006): Human renal organic anion transporters: Characteristics and contributions to drug and drug metabolite excretion. *Pharmacol Therapeut* 109, 399-412
- Rubio-Aliaga I, Daniel H (2008): Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition. *Xenobiotica* 38, 1022-1042
- Sabolic I, Asif AR, Budach WE, Wanke C, Bahn A, Burckhardt G (2007): Gender differences in kidney function. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 455, 397-429
- Sekine T, Cha SH, Hosoyamada M, Kanai Y, Watanabe N, Furuta Y, Fukuda K, Igarishi T, Endou H (1998): Cloning, functional characterization and localization of a rat renal Na⁺-dicarboxylate cotransporter. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 275, F298-F305
- Sigel E, Minier F (2005): The *Xenopus* oocyte: System for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol Nutr Food Res* 49, 228-234
- Steffgen J, Burckhardt BC, Langenberg C, Kuhne L, Müller GA, Burckhardt G, Wolff NA (1999): Expression cloning and characterization of a novel sodium-dicarboxylate cotransporter from winter flounder kidney. *J Biol Chem* 274, 20190-20196
- Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Bröer 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 Y-J, 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 Cell Physiol* 278, C1019-C1030

-
- Wang J, Chen X, Zhu H, Penf L, Hong Q (2003): Relationship between aging and renal high-affinity sodium-dependent Dicarboxylate cotransporter-3 expression characterized with antifusion protein antibody. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58, 879-888
- Wang W, Ballatori N (1998): Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. *Pharmacol Rev* 50, 335-355
- Yodoya E, Wada M, Shimada A, Katsukawa H, Okada N, Yamamoto A, Ganapathy V, Fujita T (2006): Functional and molecular identification of sodium-coupled Dicarboxylate transporters in rat primary cultered cerebrocortical astrocytes and neurons. *J Neurochem* 97, 162-173

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen Beteiligten bedanken, die auf unterschiedlichste Weise am Entstehen dieser Dissertationsarbeit mitgewirkt haben.

Ganz besonders gilt dies für Frau Professor Dr. phil. nat. B. C. Burckhardt, die jederzeit ein offenes Ohr für Fragen hatte und sich mit viel Geduld und Zeit der regelmäßigen Betreuung gewidmet hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie bedanken, die nicht nur eine sehr angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre geschaffen haben, sondern auch stets Unterstützung boten, sei es moralisch oder fachlich. Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle Frau I. Markmann, die sich sehr geduldig dem Vermitteln praktischer Fähigkeiten gewidmet hat und mir stets freundlich und hilfsbereit zur Seite stand.

Lebenslauf

Am 27.01.1983 wurde ich als jüngeres von zwei Kindern der Geschäftsleute Franz Schorbach und Karin Schorbach, geb. Peters, in Volkmarsen geboren. Aufgewachsen bin ich in der hessischen Stadt Naumburg, wo ich von 1989 – 1994 die Elbetal-Grundschule mit Förderstufe besuchte. Zur 7. Klasse wechselte ich auf die Wilhelm-Filchner-Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe in Wolfhagen und erwarb dort 2002 die allgemeine Hochschulreife. Zum Wintersemester 2002 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen und legte im September 2004 die ärztliche Vorprüfung ab. Meinem lange gehegten Berufswunsch, Kinderärztin zu werden, versuchte ich, soweit möglich, während der Famulaturen und auch während des Wahl-Tertials im Praktischen Jahr näher zu kommen. Die beiden Pflichtfächer Chirurgie und Innere Medizin absolvierte ich im Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Northeim bzw. in den Kliniken Herzberg & Osterode GmbH in Herzberg, das Pädiatrie-Tertial im St. Vincenz-Krankenhaus in Paderborn. Während dieser Zeit stellte ich für mich selbst auch überraschenderweise fest, dass sich mein Interessenschwerpunkt von der Pädiatrie hin zur Kinder- und Jugendpsychiatrie gewandelt hatte. So kam es, dass ich mich nach Ablegen des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung im Dezember 2008 und dem folgenden Erhalt der Approbation als Ärztin auf eine Stelle in diesem Fachgebiet bewarb. Seit Oktober 2009 arbeite ich nun im Universitätsklinikum Göttingen als Assistenzärztin für Kinder- und Jugendpsychiatrie. Die Zeit von Januar bis Oktober 2009 verbrachte ich mit der Arbeit am experimentellen Teil dieser Dissertation im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie, Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie, der Georg-August-Universität in Göttingen.