

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

Elektrophysiologische Charakterisierung eines
Betain/GABA-Transporters

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Marc Reese

aus

Göttingen

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I. Berichterstatterin: Prof. Dr. phil. nat. B. C. Burckhardt
- II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. R. Asif
- III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. dent. R. F. Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Der BGT-1-Transporter (Betain/GABA-Transporter).....	1
1.2 Osmotische Regulation des renalen BGT-1-Transporters	3
1.3 Die SLC6-Familie	5
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	6
2 Material und Methoden.....	7
2.1 Tierhaltung	7
2.2 <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten und ihre Präparation.....	7
2.3 Aufbewahrung der cRNS und ihre Injektion	9
2.4 Lösungen	11
2.4.1 Kontrolllösungen.....	11
2.4.2 Testlösungen	12
2.4.3 Chemikalien	12
2.5 Messplatz	13
2.5.1 Perfusionssystem.....	13
2.5.2 Glasmikroelektroden.....	15
2.5.3 Aufbau der Versuchskomponenten.....	15
2.6 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (two-electrode voltage clamp)..	17
2.7 Durchführung	18
2.8 Auswertung und Darstellung	19
2.8.1 Auswertung der Schreiberdaten	19
2.8.2 Auswertung der Konzentrationsreihen.....	20
2.9 Geräte	21

3 Ergebnisse	22
3.1 Untersuchung GABA- und Mannit-abhängiger Ströme	22
3.2 Konzentrationsabhängigkeit GABA-induzierter Ströme	28
3.3 Zeitabhängige Änderung des GABA-assozierten Stromes durch Diocetanolglycerol (DOG).....	31
3.4 Aufhebung der DOG-induzierten Hemmung des GABA-assozierten Stromes durch Staurosporin	32
4 Diskussion	34
4.1 Untersuchung GABA- und Mannit-abhängiger Ströme	34
4.2 Konzentrationsabhängigkeit GABA-induzierter Ströme	36
4.3 Zeitabhängige Einwirkung und Hemmwirkung des GABA-assozierten Stromes durch DOG	37
4.4 Aufhebung der Hemmung des GABA-assozierten Stromes durch Staurosporin	38
5 Zusammenfassung.....	39
6 Literaturverzeichnis.....	40

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Skizze einer ephithelialen Nierenzelle mit dem auf der basolateralen Membranseite lokalisierten BGT-1.....	2
Abb. 2: Transportmechanismus des BGT-1.....	2
Abb. 3: Osmotisch beeinflusster Wasserstrom unter hyper- und hypoosmolaren Bedingungen.....	3
Abb. 4: <i>Xenopus laevis</i> in hypothermaler Anästhesie in Bauch- und Rückenlage.....	8
Abb. 5: Präparation der Ovarläppchen.....	8
Abb. 6: Aufziehen der cRNS in die Injektionskapillare	10
Abb. 7: Injektion der cRNS.....	10
Abb. 8: Perfusionskammer.....	14
Abb. 9: Glasmikroelektroden.....	15
Abb. 10: Aufbau der Versuchskomponenten im Faraday-Käfig	16
Abb. 11: Geräte außerhalb des Faraday-Käfigs	16
Abb. 12: Schaltskizze der two-electrode voltage clamp.....	18
Abb. 13: Strom-Spannungskennlinien in An- und Abwesenheit von 1 mM GABA in BGT-1 exprimierenden Oozyten	23
Abb. 14: Strom-Spannungskennlinien in An- und Abwesenheit von 1 mM GABA in BGT-1 exprimierenden Oozyten mit Zugabe von 61 mM Mannit	24
Abb. 15: Strom-Spannungskennlinien in An- und Abwesenheit von 1 mM GABA in BGT-1 exprimierenden Oozyten mit Zugabe von 122 mM Mannit	25
Abb. 16: GABA-assoziierte Ströme in Anwesenheit unterschiedlicher Osmolaritäten	26

Abb. 17: GABA-assoziierte Ströme bei unterschiedlichen Osmolaritäten im Säulendiagramm.....	27
Abb. 18: Umkehrpotenziale in Ab- und Anwesenheit von 1 mM GABA bei verschiedenen Osmolaritäten in BGT-1 exprimierenden Oozyten	27
Abb. 19: Leitfähigkeiten in Ab- und Anwesenheit von 1 mM GABA bei verschiedenen Osmolaritäten	28
Abb. 20: Sättigungsverhalten GABA-induzierter Ströme	29
Abb. 21: Strom-Spannungs-Kennlinien bei 0,01 mM GABA und 1 mM GABA von BGT-1 injizierten Oozyten als Funktion der Klemmspannung	30
Abb. 22: Darstellung der maximal von GABA induzierten Einwärtsströme (ΔI_{\max}) als Funktion der angelegten Spannung	30
Abb. 23: Halbmaximale Sättigungskonzentrationen (K_m) als Funktion der angelegten Klemmspannung bei BGT-1 injizierten Oozyten	31
Abb. 24: Wirkung von DOG auf den GABA-assoziierten Strom bei einem Klemmpotenzial von -60 mV	32
Abb. 25: Darstellung der GABA-induzierbaren Ströme nach Inkubation in Staurosporin und DOG.....	33

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der Kontrolllösung (ORi).....	11
Tab. 2: Eingesetzte Chemikalien und ihre Hersteller.....	12
Tab. 3: Auflistung der verwendeten Geräte	21

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATPase	Adenosintriphosphatase
BGT-1	Betain/GABA-Transporter 1
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CLS Typ II	Kollagenase Typ II
cm	Zentimeter
cRNS	copy-Ribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOG	2-Dioctanoylglycerol
et al.	und andere (et alii)
etc.	et cetera
EZ	extrazellulär
g	Leitfähigkeit bzw. Gramm
GABA	γ-Aminoisobuttersäure
GAT-1	Natrium-/Chlorid-/GABA-Transporter 1
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonat
H ₂ O	Wasser
ΔI, I	Differenzstrom, Strom
I _{max}	maximal induzierbarer Einwärtsstrom
IV-Kennlinie	Strom-Spannungs-Kennlinie
IZ	intrazellulär
K ⁺	Kalium-Ion
kb	Kilobasen

KCl	Kaliumchlorid
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
$K_{0,5}$	halbmaximale Sättigungskonstante
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol pro Liter
mM	Millimol pro Liter
mOsM	Milliosmol pro Liter
mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
n	Anzahl
nA	Nanoampere
Na^+	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
nl	Nanoliter
N.S.	nicht signifikant
ORi	Oozyten-Ringer-Lösung
p	Signifikanzgrenze
pH	pH-Wert
PKC	Proteinkinase C
RVI	Regulatory Volume Increase
S	Substratkonzentration
sek	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler
SLC6	Solute Carrier 6
SMIT	Sodium-Myo-Inositol-Transporter
Tab.	Tabelle
TAUT	Taurin-Transporter

TEVC	two-electrode voltage clamp technique (Zwei-Elektroden-Spannklemmtechnik)
TonE	Tonicity-responsive Enhancer
Tris	Trishydroxymethyl-Aminomethan
U	Spannung
v.a.	vor allem
V_c	Klemmpotenzial
V_m	Membranpotenzial
\bar{x}	Mittelwert

1 Einleitung

1.1 Der BGT-1 -Transporter (Betain/GABA-Transporter)

Der BGT-1-Transporter ist ein Mitglied der Familie der SLC6-Transporter (siehe 1.3). Diese gehören zu den Natrium- und Chlorid-gekoppelten Cotransportern für Osmolyte, Neurotransmitter und Aminosäuren (CHEN et al. 2004).

BGT-1 befindet sich in verschiedenen Geweben von Säugetieren, wie beispielsweise Gehirn und Niere. Im Folgenden wird auf den renalen Transporter eingegangen. Er liegt in der basolateralen Membranseite von epithelialen Nierenzellen und ist gehäuft im dicken aufsteigenden Ast sowie im Sammelrohr des Nephrons anzutreffen (MIYAI et al. 1996). BGT-1 transportiert sekundär aktiv GABA sowie das Methylamin Betain (MATSKEVITCH et al. 1999), dabei weist der Transporter für GABA eine höhere Affinität auf (AHN et al. 1996). Wahrscheinlich wird zunächst ein GABA- bzw. Betain-Molekül basolateral (extrazellulär) vom Transporter gebunden, gefolgt von drei Na⁺-Ionen. Danach binden ein bis zwei Cl⁻-Ionen und der gesamte Komplex wird schließlich nach intrazellulär transportiert. Dabei fördert Chlorid den Transport, es ist hierfür jedoch im Gegensatz zu Natrium nicht absolut nötig (MATSKEVITCH et al. 1999). Dies wird durch Abbildung 1 und 2 graphisch dargestellt.

Strukturell besteht BGT-1 aus 12 α -Helix-Transmembrandomänen, wobei der C- sowie der N-Terminus Richtung Zytoplasma lokalisiert sind (PEREGO et al. 1997). Für den Transporter codiert das BGT-1-Gen, welches 28 Kilobasen (kb) aufweist und 18 Exons enthält. Es sind acht verschiedene Varianten der mRNA bekannt, die in drei Haupttypen unterteilt werden. Sie unterscheiden sich in der 5' untranslatierten Region. Typ A kommt ausschließlich im Nierenmark vor, Typ B in Leber, Gehirn, Nierenrinde und -mark, Typ C nur in Gehirn, Nierenrinde und -mark. Die Umgebung des 5' Endes beinhaltet ein osmotisch sensitives Enhancerelement. Dieses wird als TonE bezeichnet (TAKENAKA et al. 1995). Die osmotische Regulation des Transporters wird unter 1.2 beschrieben.

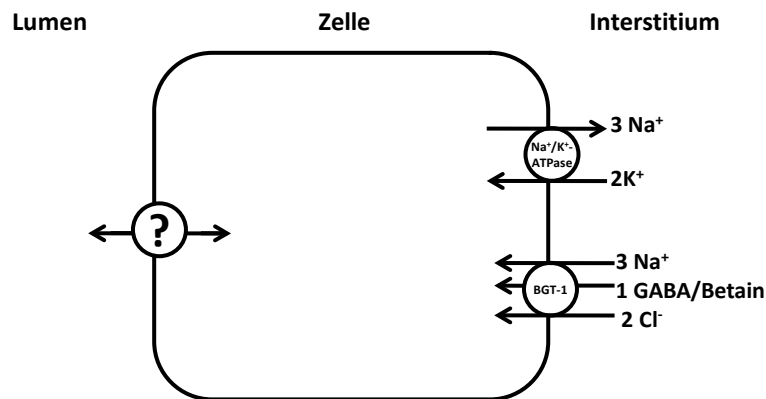


Abb. 1: Skizze einer epithelialen Nierenzelle mit dem auf der basolateralen Membranseite lokalisierten BGT-1

Als treibende Kraft für die Aufnahme der Ionen dient neben dem osmotischen Gradienten die Natrium-/Kalium-ATPase (Na⁺-/K⁺-ATPase). BGT-1 transportiert drei positiv geladene Natrium-Ionen zusammen mit ein bis zwei negativ geladenen Chlorid-Ionen und einem ungeladenem GABA oder Betain in einem elektrogenen Modus in die Zelle hinein. Die auf der luminalen Seite lokalisierten, an der osmotischen Regulation beteiligten Transporter und die Aquaporine zum Transport von Wasser sind nicht eingezeichnet, da dieser Transport nicht vollständig geklärt ist. Diese Mechanismen sind deshalb mit einem Fragezeichen versehen (eigene Darstellung).

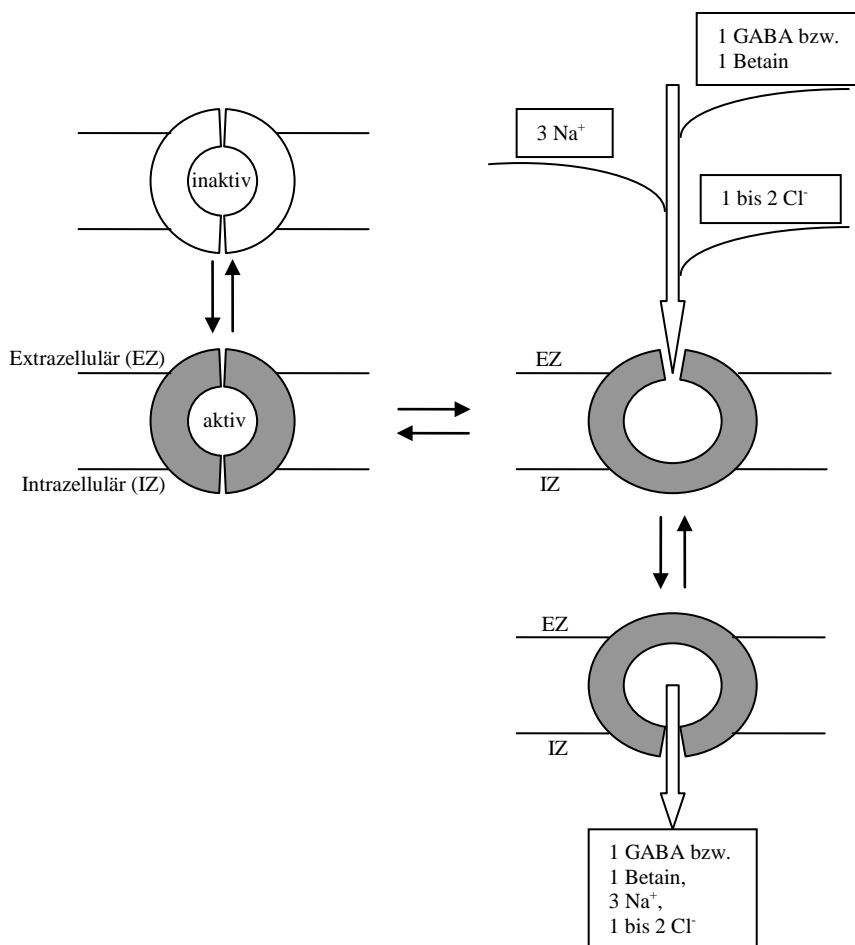


Abb. 2: Transportmechanismus des BGT-1

Der BGT-1-Transporter bindet ein GABA- bzw. Betain-Molekül, anschließend drei Na⁺- und ein bis zwei Cl⁻-Ionen. Der gesamte Komplex wird dann nach intrazellulär transloziert. Eigene Darstellung in Anlehnung an ZIEGLER et al. 2010.

1.2 Osmotische Regulation des renalen BGT-1-Transporters

Akkumulieren sich intrazellulär osmotisch aktive Substanzen, so ziehen diese Wasser nach und es kommt zu einem Anschwellen (Volumenzunahme) der Zelle. Dies geschieht auch, sobald die Osmolarität extrazellulär geringer ist als intrazellulär. Gegenteiliges führt zu einer Volumenabnahme der Zelle (siehe Abb. 3).

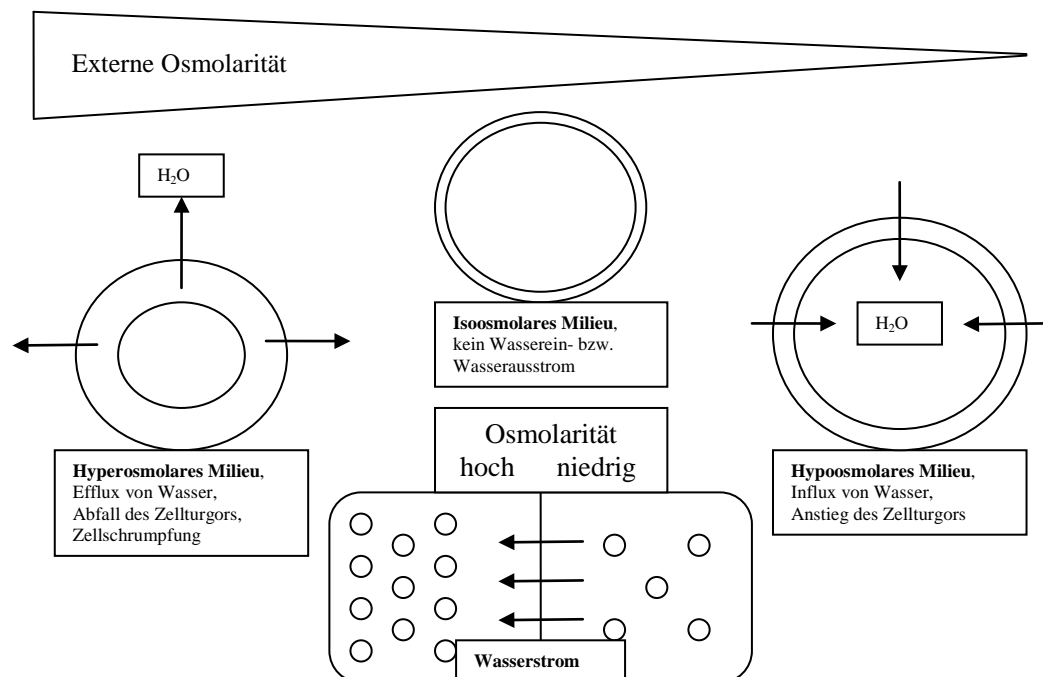


Abb. 3: Osmotisch beeinflusster Wasserstrom unter hyper- und hypoosmolaren Bedingungen
Eigene Darstellung in Anlehnung an ZIEGLER et al. 2010.

Die Zellen des Nierenmarks sind physiologischerweise im Rahmen der Urinkonzentration hohen extrazellulären Osmolaritäten ausgesetzt, verursacht durch hohe Konzentrationen an NaCl und Harnstoff (BURG et al. 2007). Eine sofortige Reaktion der Zelle darauf ist eine schnelle Aufnahme von anorganischen Osmolyten mit nachfolgender Wasseraufnahme. Dies wird als RVI (Regulatory Volume Increase) bezeichnet (HOFFMANN und SIMONSEN 1989). Hypertonizitäten/Hyperosmolaritäten durch intrazelluläre anorganische Osmolyte bewirken jedoch Brüche in der doppelsträngigen DNS der Zellen und somit eine bedeutende lebensfeindliche Bedrohung (KULTZ und CHAKRAVARTY 2001). BURG et al. beschreiben 2007 weitere negative Effekte, verursacht durch die

extremen Hypertonizitäten. So entstehen reaktive Sauerstoffgruppen, werden DNS-Replikation, -Transkription und -Translation gehemmt und Mitochondrien depolarisiert. Schließlich kann der Zelltod eintreten (KWON et al. 2009). Um in diesem Milieu ein Überleben zu sichern, sammeln sich intrazellulär organische Osmolyte an, welche nicht mit den beschriebenen Nachteilen einhergehen. Organische Osmolyte tragen ihrerseits dazu bei, den osmotischen Stress auszugleichen und ermöglichen die intrazelluläre Volumenregulation (SCHLIESS und HÄUSSINGER 2002).

Betain gehört neben Sorbitol, myo-Inositol, Aminosäuren, Taurin und anderen zu den wichtigen organischen Osmolyten in Säugetierzellen (KEMPSON und MONTROSE 2004). Dabei kann Betain in der Leber und Niere durch Oxidation von Cholin gebildet (GROSSMAN und HERBERT 1989) oder auch aus der Nahrung resorbiert werden (LEVER et al. 2004). Aufgenommen wird es über den BGT-1-Transporter (siehe 1.1), der sich in der basolateralen Plasmamembran von epithelialen Nierenmarkszellen (Zellen des dünnen aufsteigenden Astes der Henle'schen Schleife) befindet (KEMPSON und MONTROSE 2004).

Die extrazelluläre Hyperosmolarität wirkt sich auf die Regulation des BGT-1-Transporters aus. In Folge jener Hypertonizität und dem damit verbundenen osmotischen Stress resultiert eine Hochregulation der Transkription des BGT-1-Gens mit anschließender vermehrter BGT-1-Proteinsynthese und dessen gesteigertem Einbau in die Zellmembran (UCHIDA et al. 1993). Angriffspunkt ist auf Genebene das unter 1.1 beschriebene osmotisch sensible Enhancerelement. Eine Hypertonizität bewirkt stärkere Bindungen von einem oder mehreren Proteinen an der TonE-Region. Wahrscheinlich führt dies zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität (BURG et al. 1996).

Bei erhöhter intrazellulärer Konzentration von Betain, Inositol oder Sorbitol wird wiederum die Expression der Betaintransporter mRNS gehemmt, welche osmotisch beeinflusst und gesteigert ist (FERRARIS et al 1996). Angepasst an die Tonizität ist so eine Rückkopplung der osmotischen Regulation und der damit verbundenen Osmolytkonzentration vorhanden (BURG et al. 1996).

Sofern sich das extrazelluläre Milieu hin zu isotonischen Werten verändert, resultiert zunächst innerhalb von 15 min ein schneller Betain-Ausstrom gefolgt von einem langsameren Betain-Einstrom über 1-2 Tage. Der Efflux geschieht v.a. über die basolaterale Membranseite (GRUNEWALD et al. 2001) und steht

eventuell im Zusammenhang mit Arachidonsäure, welche über G-Protein-gekoppelte Prozesse freigesetzt wird. Zusätzlich kommt es zu einem frühen Anstieg der Calciumpermeabilität und damit dessen erhöhter intrazellulärer Konzentration (BAGNASCO et al. 1993). Wahrscheinlich führt dies zu einer gesteigerten Permeabilität der Zellmembran (GRUNEWALD und KINNE 1989) mit vermehrtem Einbau bzw. Öffnung von kanal- oder transporterähnlichen Proteinen und einem anschließenden Ausstrom von Osmolyten wie Betain. Es wird vermutet, dass Calcium für die Öffnung und/oder den Einbau dieser Transportproteine aus Vesikeln verantwortlich ist (KINNE et al. 1993). Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die BGT-1-Proteine innerhalb von 24-48 Stunden mittels Endozytose intrazellulär in Vesikeln aufgenommen werden. Dort verbleiben sie für ca. weitere 24 Stunden funktionstüchtig. So könnten bei erneuter Entwicklung eines hypertonen extrazellulären Milieus schnell BGT-1-Proteine in die Membran reintegriert werden (KEMPSON und MONTROSE 2004).

1.3 Die SLC6-Familie

Die Transporter der SLC6-Familie gehören zu den Natrium- und Chlorid-gekoppelten Cotransporten für Osmolyte, Neurotransmitter und Aminosäuren (CHEN et al. 2004). Neben dem BGT-1 beinhaltet die Familie unter anderem den TAUT, einen Transporter für Taurin, den GAT-1 (Natrium-/Chlorid-/GABA-Transporter), nicht aber den SMIT („Sodium-Myo-Inositol-Transporter“). TAUT und SMIT werden ähnlich dem BGT-1 (siehe 1.2) osmotisch reguliert (UCHIDA et al. 1992). Sie wurden hauptsächlich in den Nierenmarksregionen des Hundes nachgewiesen (BURG et al. 1996) und werden deshalb in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll mittels elektrophysiologischer Untersuchungen den Betain/GABA-Transporter BGT-1 funktionell detaillierter charakterisieren.

Für die Auswahl der einzelnen Materialien und Methoden sind verschiedene Überlegungen relevant. Grundlage der Experimente ist ein entsprechendes Modellsystem. Hierzu wird seinerseits ein Expressionssystem benötigt, welches mit dem zu untersuchenden Transportsystem möglichst wenig interferiert. Diese erwünschten Eigenschaften finden sich bei den Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Jene weisen eine sehr geringe Ausstattung endogener Transportsysteme auf (DASCAL 1987). Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit, dass endogene Transporter mit den exprimierten Transportern interferieren, gering gehalten (WAGNER et al. 2000).

Die Methode der Wahl ist die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik (siehe 2.6), da es sich bei dem untersuchten BGT-1 um einen elektrogenen Transport handelt. So können die Effekte verschiedener Substrate auf die Oozyten gemessen, aufgezeichnet und miteinander verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung

In den durchgeführten Experimenten werden Oozyten der Weibchen des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* verwendet. Die Frösche werden im Institut in Aquarien mit einem 12h-Tag-Nacht-Rhythmus und einer Wassertemperatur von 18 °C gehalten. Die Tiere werden mittels portionierter Rinderherzen und Pellets zur Froschernährung gefüttert.

2.2 *Xenopus-laevis*-Oozyten und ihre Präparation

Die Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* dienen für die Expression heterologer Proteine, da leicht cRNS injiziert und die Proteinexpression sowie -funktion mit verschiedenen Techniken erforscht werden kann. Da die Oogenese bei *Xenopus-laevis*-Weibchen asynchron verläuft, liegen die Oozyten gleichzeitig in verschiedenen Stadien vor und werden nach DUMONT in die Stadien I – VI eingeteilt (DUMONT 1972). Die Genese der Oozyten wird von diversen Faktoren beeinflusst, beispielsweise durch Jahreszeit, Ernährungszustand oder hormonelle Stimulation. Unter idealen Voraussetzungen enthalten die Ovarien von reifen Weibchen zahlreiche Oozyten der Stadien V und VI. Diese weisen eine regelmäßige Pigmentierung und eindeutig voneinander abgrenzbare animalische und vegetative Pole auf. Aufgrund ihres relativ großen Durchmessers von 1,1 bis 1,3 mm sind sie leicht zu handhaben. Die Oozyten sind mit sämtlichen Substraten, die für ihr Wachstum und eine effiziente Proteintranskription und -translation nötig sind, ausgestattet (WAGNER et al. 2000). Die Krallenfrösche bezieht das Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Georg-August-Universität Göttingen von der Firma Nasco in Ford Atkinson in Wisconsin, USA.



Abb. 4: *Xenopus laevis* in hypothermaler Anästhesie in Bauch- und Rückenlage

Die operative Entnahme der Oozyten wurde durch eine Mitarbeiterin des Institutes vorgenommen. Dabei wurden die geltenden Tierschutzvorschriften eingehalten. Die Genehmigungen nach § 11 Absatz 1, Nr. 1 und § 9 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes liegen vor.

Um die Oozyten den lebendigen Froschweibchen zu entnehmen, werden jene zunächst in Eiswasser gelegt, welchem Tricain (0,2 %) für eine anästhesierende Wirkung beigemischt ist (WAGNER et al. 2000). Nach Eintritt der Anästhesie werden die Frösche in ein Eisbett gelegt. Zur Freilegung des Ovars wird anschließend ein 1 bis 2 cm langer Schnitt im unteren Teil des Abdomens gesetzt, wobei Haut- und Muskelschicht separat durchtrennt werden. Einzelne Ovarläppchen werden mittels einer Sonde disloziert, abgetrennt und für die weitere Aufbereitung in Oozyten-Ringer-Lösung (ORi, Zusammensetzung siehe 2.4.1) aufbewahrt. Die Wunde wird mit je einer separaten Muskel- und Hautnaht verschlossen.



Abb. 5: Präparation der Ovarläppchen

Die frisch entnommenen Oozyten liegen im Verbund mit Follikelzellen und kollagenem Bindegewebe vor. Um diese Gewebereste von den Oozyten zu trennen, wird das Ovarläppchen manuell mit Pinzetten etwas zerpfückt und anschließend über Nacht in ein Becherglas mit ORi, dem Kollagenase (7 - 8 mg/20 ml; Typ CLS II, Biochrom, Berlin, Deutschland) beigegeben ist, im Inkubator bei 16 – 18 °C aufbewahrt. Danach werden die Oozyten für 10 min in calciumfreiem ORi (Zusammensetzung siehe 2.4.1) inkubiert. Im nächsten Schritt werden die Oozyten mehrmals mit ORi gewaschen, bis alle Follikelzellreste entfernt sind. Unter einem Mikroskop werden unversehrte Oozyten der Stadien V und VI nach DUMONT (1972) ausgewählt und bis zur weiteren Verwendung in ORi aufbewahrt.

2.3 Aufbewahrung der cRNS und ihre Injektion

Die Aufbewahrung der cRNS erfolgt in einem Gefrierschrank bei -80 °C. Bevor die cRNS mit einer Mikroinjektionspumpe (WPI, Sarasota) in die einzelnen Oozyten injiziert werden kann, ist diese aufzutauen und in einer Zentrifuge vorzubehandeln. Für die Untersuchungen werden 23 nl der cRNS injiziert, die in einer Konzentration von 1 µg/µl vorliegt. Um sicherzustellen, dass die Substrate tatsächlich über BGT-1 und nicht über in den Oozyten bereits vorhandene Transportmechanismen aufgenommen werden, wird ein Teil der Oozyten mit einer der cRNS äquivalenten Menge an Wasser injiziert. Die so behandelten Oozyten werden als „Mocks“ bezeichnet.

Zur Durchführung der Injektion werden Sodaklarglaskapillaren mit einem Vertikal-Kapillarschlingenziehgerät gezogen. Man erhält so aus jeder Kapillare zwei Kapillaren mit zulaufenden Spitzen. Diese werden an der äußersten Spitze unter mikroskopischer Kontrolle gekappt, sodass die Spitze einen Durchmesser von ~10 µm besitzt. Die so hergestellten Kapillaren werden mit Paraffinöl blasenfrei gefüllt. Danach werden ca. 1 – 2 µl der cRNS, die sich in der Spitze einer Eppendorff-Pipette befindet, aufgezogen (siehe Abb. 6). Die cRNS wurde von einer Mitarbeiterin des Instituts zur Verfügung gestellt.

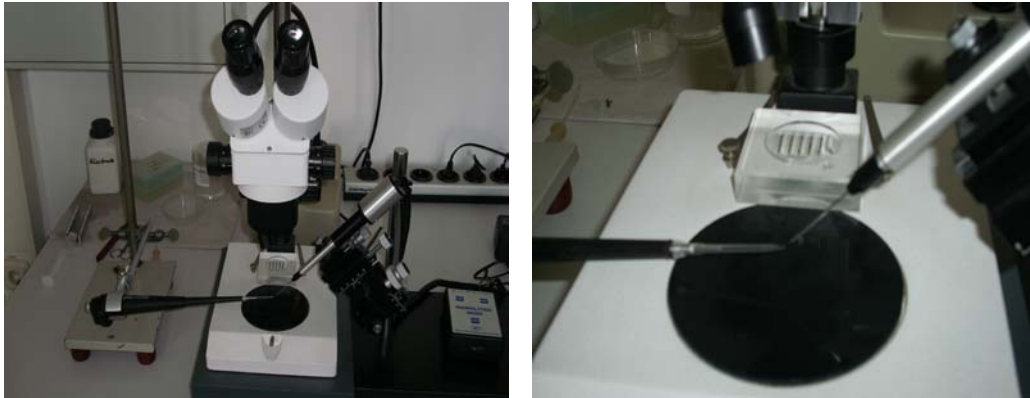


Abb. 6: Aufziehen der cRNS in die Injektionskapillare

Aufziehen der cRNS von der Eppendorff-Pipette in die auf die Mikroinjektionspumpe aufgesetzte Injektionskapillare unter mikroskopischer Kontrolle durch ein Stereomikroskop. Linke Abbildung: Übersicht; die Eppendorff-Pipette ist auf der linken Seite, die Injektionspumpe auf der rechten Seite des Arbeitstisches montiert. Das Stereomikroskop befindet sich dazwischen. Rechte Abbildung: Nahaufnahme; die Injektionskapillare wird unter mikroskopischer Kontrolle an die Eppendorff-Pipette herangefahren. Die Spitze der Injektionskapillare wird anschließend in die Spitze der Eppendorff-Pipette hineinjustiert, sodass die cRNS in die Injektionskapillare aufgesaugt werden kann, ohne mit Luft in Verbindung gekommen zu sein.

Zur Stabilisierung der Oozyten bei der Injektion werden diese in einer speziellen Schale platziert. Damit der Kern der Oozyten nicht beschädigt wird, ist das Anstechen der Oozyten mit den Glaskapillaren an der Grenze zwischen vegetativem und animalischem Pol vorzunehmen (siehe Abb. 7).



Abb. 7: Injektion der cRNS

Injektion der cRNS in die platzierten Oozyten unter mikroskopischer Kontrolle. Die Injektionsschale besitzt V-förmige Vertiefungen, in die die Oozyten gelegt werden. Mit der Injektionskapillare drückt man die Oozyten etwas weiter in die Vertiefung, sodass sie bei der Injektion nicht verrutschen und damit auch nicht beschädigt werden.

Die Aufbewahrung der Oozyten nach der Injektion erfolgt in einer 24-Lochplatte, deren Vertiefungen mit jeweils 2 ml einer Nährstofflösung gefüllt sind, welche sich aus Oozyten-Ringer (ORi), 2,5 mM Natriumpyruvat als Nährstoff und 12 mg/ml Gentamycin zur Verhinderung von Bakterienbesatz zusammensetzt. Im nächsten Schritt findet im Inkubator bei 16 – 18 °C eine zwei- bis viertägige Inkubation mit täglichem Mediumwechsel und Entfernung beschädigter oder abgestorbener Oozyten statt. Anschließend kann mit den Messungen begonnen werden.

2.4 Lösungen

2.4.1 Kontrolllösungen

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der Kontrolllösung.

Kontrolllösung (Oozyten-Ringer: ORi)

Substanz	Molekulargewicht	Konzentration	Bezugsfirma
NaCl	58,44 g/mol	110 mM	Carl Roth GmbH
KCl	74,56 g/mol	3 mM	Carl Roth GmbH
CaCl ₂ ·H ₂ O	147,02 g/mol	2 mM	Merck VWR International
HEPES (Hydroxyethyl- piperazin- Ethansulfonat)	238,30 g/mol	5 mM	Carl Roth GmbH

Tab. 1: Zusammensetzung der Kontrolllösung (ORi)

Diese Lösung wird mit Tris (Trishydroxymethyl-Aminomethan, Molekulargewicht 121,14 g/mol, Carl Roth GmbH) bei Raumtemperatur auf den pH-Wert 7,5 eingestellt. Bei Einsatz eines calciumfreien ORi wurde Calciumchlorid aus der Lösung ohne osmotischen Ersatz entfernt.

2.4.2 Testlösungen

Als Grundlage der Testlösungen gilt die in Tabelle 1 aufgeführte Oozyten-Ringer-Lösung (ORi) zuzüglich der jeweilig verwendeten Substrate in den entsprechenden Konzentrationen (siehe Tab. 2). Die Lösungen wurden mittels Tris bei Raumtemperatur auf den pH-Wert 7,5 eingestellt.

2.4.3 Chemikalien

Diese Tabelle stellt die während der Versuche eingesetzten Chemikalien und die dazugehörige Herstellerfirma dar. Natriumpyruvat und Gentamycin wurden der Aufbewahrungslösung der Oozyten (siehe 2.3) zugesetzt. GABA, Mannit, DOG und Staurosporin wurden in den in Kapitel 3 beschriebenen Versuchen eingesetzt.

Substanz	Hersteller
DOG (Dioctanoylglycerol)	Sigma
GABA (γ -Aminoisobuttersäure)	Sigma
Gentamycin	Applichem
Salzsäure (HCl)	Sigma
Kollagenase Typ CLS II	Biochrom
Mannit	Merck
Natriumpyruvat	Sigma
Staurosporin	Fluka

Tab. 2: Eingesetzte Chemikalien und ihre Hersteller

2.5 Messplatz

2.5.1 Perfusionssystem

Das Perfusionssystem besteht aus zwei Vorratsgefäßen, welche mit der Kontrolllösung bzw. mit der Testlösung gefüllt sind, der Perfusionskammer, dem Abfluss und dem Auffanggefäß. Die Vorratsgefäße sind ca. 60 cm über dem Versuchstisch befestigt und über englumige Polyethylenschläuche mit der Perfusionskammer verbunden. Durch dieses Schlauchsystem lässt sich eine konstante Fließgeschwindigkeit der Lösungen von ca. 4 ml/min einstellen. In Abbildung 8 ist eine vergrößerte Aufnahme der Perfusionskammer gezeigt. Die Lösungen erreichen den rechten Teil der Perfusionskammer über zwei horizontal verlaufende Bohrungen (1).

Die Perfusionskammer besteht aus einer runden Plexiglasscheibe (2) von 6 cm Durchmesser und einer Dicke von 1 cm. Sie wird über Kaltlichtlampen beleuchtet und muss exakt horizontal ausgerichtet sein, da ansonsten eine Anstauung der Lösungen bzw. ein beschleunigter Abfluss derselben resultieren. In die Plexiglasscheibe ist die eigentliche Perfusionskammer als ca. 2 auf 8 mm längliche, horizontale Vertiefung (3) eingefräst. Die linke Seite dieser Kammer wird durch ein ca. 1 mm hohes Widerlager (4) zur Fixierung der Oozyten (5) begrenzt, die rechte Seite der Kammer begrenzt sich durch die oben genannten Bohrungen für den Perfusionszufluss. Hinter dem Widerlager erweitert sich die Ausfräsung. Hier ist auch eine Abflusseinrichtung angebracht, durch die die Perfusionslösungen in ein Glasgefäß abfließen können.

A

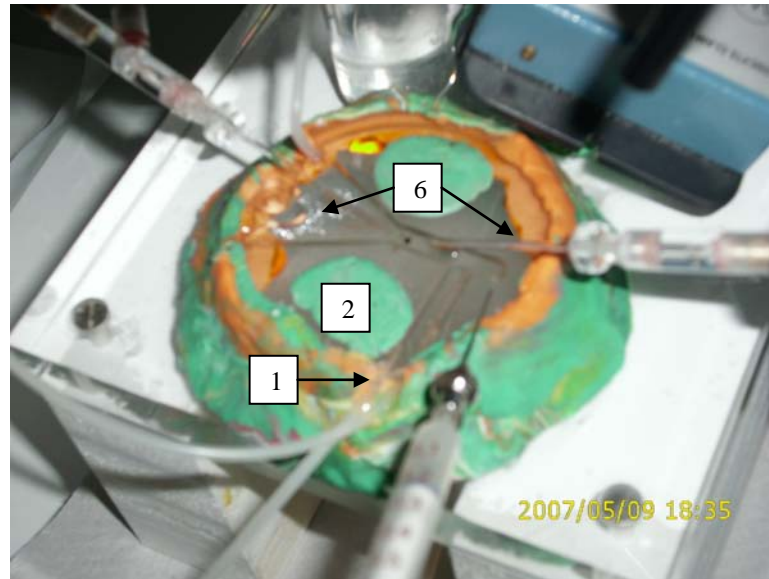


Abb. 8: Perfusionskammer

A: Perfusionskammer in toto. Durch die beiden Kunststoffschläuche (unterer Bildrand) gelangt die Perfusionslösung über die zwei horizontal verlaufenden Bohrungen (1) in die Perfusionskammer, welche in die runde Plexiglasscheibe (2) eingefräst ist. Weiterhin sind die Glasmikroelektroden zu erkennen (6), die in die Oozyten eingebracht sind (siehe auch Abb. 6 B).

B



B: Oozyte mit eingebrachten Glasmikroelektroden in der Perfusionskammer (vergrößerte Darstellung)

Die Oozyten (5) befindet sich in der Perfusionskammer (3) und werden allseits von der Perfusionslösung umspült. Das 1 mm hohe Widerlager (4) der Kammer fixiert die Oozyten und trägt zu deren Lagestabilität bei. Die Glasmikroelektroden (6) sind in die Oozyten eingebracht. Dabei ist die rechte Glasmikroelektrode die stromeinspeisende, die linke die strommessende Elektrode.

2.5.2 Glasmikroelektroden

Um die Zwei-Elektroden-Spannklemmtechnik (two-electrode voltage clamp technique) anwenden zu können (siehe 2.6), müssen zuerst die Glasmikroelektroden hergestellt werden. Hierzu wird ein Borosilikatglasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm und einer Wandstärke von 0,1 mm in ein Kapillarschlingenziehgerät (Narishige, Japan) mittig eingespannt, mittels einer Heizspule erhitzt und durch einen vertikal gerichteten Magnetzug bis zum Abriss auseinander gezogen. So resultieren pro Rohling zwei spitz zulaufende (Innendurchmesser ca. 1 μm) Glasmikroelektroden.

Anschließend werden die Elektroden über eine Kanüle mit 3 M-Kaliumchloridlösung luftblasenfrei befüllt und mittels Elektrodenhaltern an Mikromanipulatoren befestigt.



Abb. 9: Glasmikroelektroden

Die Mikroelektroden wurden mit einem Vertikal-Kapillarschlingenziehgerät (Narishige, Japan) gezogen. Man erhält so aus jeder Kapillare zwei Kapillaren mit zulaufenden Spitzen.

2.5.3 Aufbau der Versuchskomponenten

Zum Schutz vor elektromagnetischen Einstrahlungen und somit eventuell resultierenden Messungenauigkeiten ist der Versuchsaufbau in einem von vorne zugänglichen Faraday-Käfig untergebracht. Dazu gehören das Perfusionssystem (siehe 2.5.1), die Glasmikroelektroden (siehe 2.5.2), die Mikromanipulatoren

sowie das Stereomikroskop (siehe Abb. 10). Die verschiedenen Komponenten stehen auf einem durch Vestolit-Puffer gegen Stöße und Vibrationen gesicherten Versuchstisch. Außerhalb des Faraday-Käfigs befinden sich der Voltage-Clamp-Verstärker und der daran angeschlossene Schreiber (siehe Abb. 11).



Abb. 10: Aufbau der Versuchskomponenten im Faraday-Käfig
Aufbau der Versuchskomponenten im Faraday-Käfig mit Stereomikroskop und Perfusionskammer (mittig) sowie links und rechts je einem Mikromanipulator mit Glasmikroelektrode. Von oben links zur Perfusionskammer verlaufen die Polyethylenschläuche.



Abb. 11: Geräte außerhalb des Faraday-Käfigs
Voltage-Clamp-Verstärker, darunter der 2-Kanal-Schreiber.

2.6 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (two-electrode voltage clamp)

Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) handelt es sich um eine elektrophysiologische Technik, welche die Messung von Strömen durch Ionenkanäle oder elektrogene Transporter erlaubt. Durch die TEVC kann ein festgelegtes Membranpotenzial durch permanente Zuführung eines Kompensationsstroms, der Potenzialänderungen ausgleicht, kontrolliert werden. Über eine KCl-gefüllte Glasmikroelektrode wird das Potenzial der Oozyten gemessen und mit einem am Gerät vorgegebenen Sollwert verglichen. Weicht der gemessene Wert vom Sollwert ab, wird über eine zweite KCl-gefüllte Glasmikroelektrode so lange Strom eingespeist, bis der Sollwert des Potenzials wieder erreicht ist (Kompensationsstrom). Auf diese Weise kann der Ionenfluss kompensiert und das Membranpotenzial konstant gehalten werden. Dadurch ist es möglich, das elektrische Verhalten eines Oozyten unter verschiedenen vorgegebenen Potenzialen zu untersuchen. Der Stromkreis wird über eine Erdung geschlossen. Die entstehenden Stromstärken liegen in nA-Bereichen und müssen vor ihrer Aufzeichnung verstärkt werden.

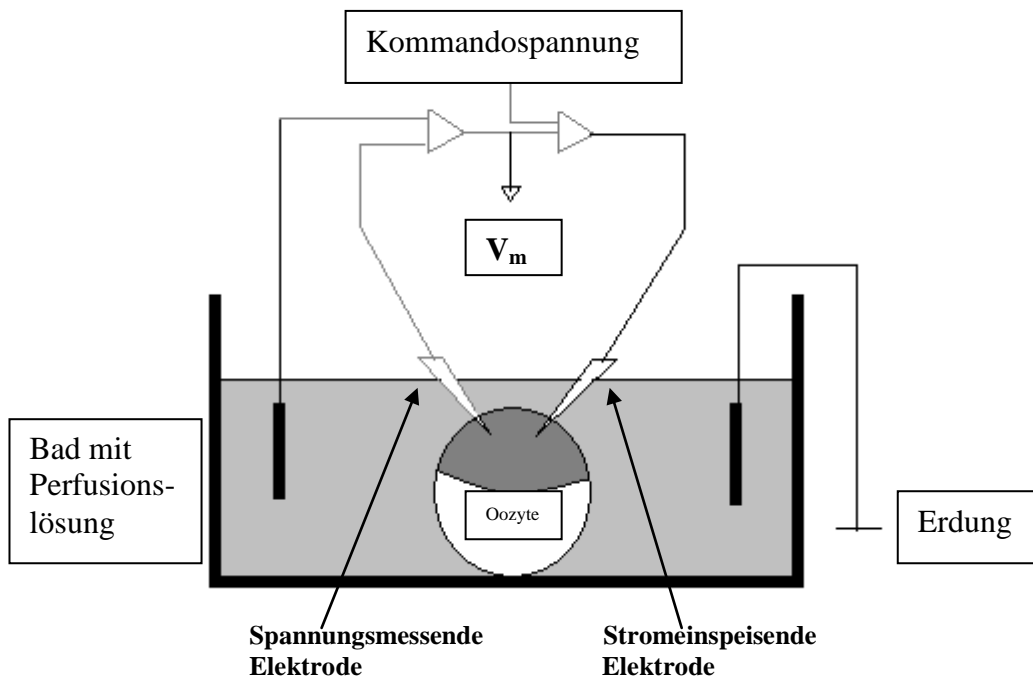


Abb. 12: Schaltskizze der two-electrode voltage clamp

Die Oozyten befinden sich in einem Bad, umgeben und umspült von der Perfusionslösung. Das Bad ist geerdet. Über die KCl-gefüllte, spannungsmessende Glasmikroelektrode wird das Potenzial der Oozyten gemessen und mit einem am Gerät vorgegebenen Sollwert verglichen. Weicht der gemessene Wert vom Sollwert ab, wird über eine zweite KCl-gefüllte Glasmikroelektrode so lange Strom eingespeist, bis der Sollwert des Potenzials wieder erreicht ist (Kompensationsstrom). Auf diese Weise kann der Ionenfluss kompensiert und das Membranpotenzial (V_m) konstant gehalten werden. Mit der Kommandospannung lässt sich der Sollwert variieren. Eigene Darstellung einer Schaltskizze der two-electrode voltage clamp in Anlehnung an STÜHMER 1992.

2.7 Durchführung

Zu Beginn jedes Versuchstages müssen der Aufbau der Versuchskomponenten und die Einrichtung des Arbeitsplatzes erfolgen. Dafür werden die beiden Vorratsgefäße befüllt, das eine mit der Kontroll- (ORi), das andere mit einer Testlösung. ORi wird perfundiert, sodass damit auch die Perfusionskammer geflutet ist. Daraufhin wird die Erdung des Systems vorgenommen. Dazu wird eine KCl-/Agar-Brücke mit Kontakt zur Lösung der Perfusionskammer und zu einer 3-M-KCl-Lösung (in einem externen Gefäß) platziert.

Im Anschluss werden die Glasmikroelektroden vorbereitet (siehe 2.5.2), an den Mikromanipulatoren befestigt und in die mit ORi geflutete Perfusionskammer eingetaucht. Danach erfolgt die Justierung des Verstärkers auf 0 mV bzw. 0 nA.

Es kann nunmehr ein geeigneter Oozyte aus dem Inkubator entnommen und in der Perfusionskammer positioniert werden. Mithilfe des Mikroskops und der Mikromanipulatoren werden die beiden Glasmikroelektroden an gegenüberliegenden Stellen in die Zelle eingebracht und anschließend die Perfusion mit ORi angestellt. Der Verstärker zeigt das gemessene Membranpotenzial des Oozyten an, das von dem Schreiber aufgezeichnet wird. Nach ca. 10 min hat sich das Membranpotenzial des Oozyten stabilisiert, es wird eine Klemmspannung von -60 mV angelegt und der Haltestrom gemessen. Anschließend wird die Klemmspannung alle 10 sek in 10 mV-Schritten variiert. Dies geschieht in einem Bereich von -60 mV (Ausgangswert) bis -90 mV, von dort bis auf $+10$ mV und schließlich wieder zurück auf -60 mV. Danach wird die ORi-Perfusion unterbrochen und mit der jeweiligen Testlösung (befindlich im zweiten Vorratsgefäß) wie oben beschrieben fortgefahren. Am Ende jenes Testdurchgangs wird die Testlösung ab- und auf die Kontrolllösung für 10 min umgestellt, bevor sich eine weitere Messung anschließt. Abweichende Versuchsdurchführungen werden in den entsprechenden Ergebnisteilen erläutert (siehe 3).

2.8 Auswertung und Darstellung

2.8.1 Auswertung der Schreiberdaten

Der verwendete Schreiber kann während der Messung die Spannung über der Oozytenmembran und zeitgleich den benötigten Kompensationsstrom getrennt aufzeichnen. Diese Strom-Spannungs-(IV)-Kennlinien werden mit Microsoft Excel ausgewertet.

2.8.2 Auswertung der Konzentrationsreihen

Für die Bewertung einer Konzentrationsabhängigkeit betreffend die Translokationsbereitschaft von BGT-1 für die Testsubstanzen werden die Michaelis-Menten-Konstanten (K_m), bzw. die Halbsättigungskonstanten $K_{0,5}$ sowie die maximal substratinduzierten Einwärtsströme ΔI_{max} ermittelt. Hierzu wird ein Quotient vom Nettostrom ΔI und der Konzentration des Substrats c gebildet. K_m entspricht der negativen Steigung der Geraden. Die verwendete Substratkonzentration wird mit S beschrieben. Mittels Microsoft Excel wird I nach folgender Gleichung berechnet:

$$I = I_{max} * [S] / K_m + [S]$$

ΔI_{max} ist dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate zu entnehmen.

2.9 Geräte

Die folgende Tabelle stellt die verwendeten Geräte und deren Bezugsfirmen dar.

Gerätebezeichnung	Typenbezeichnung	Bezugsfirma
Arbeitstisch mit Vestolit-Puffer		Eigenbau der Institutswerkstatt
Chlorierte Silberdrahtelektroden		Eigenfabrikation
Elektrodenhalter (Spannung)	ESW-F15V, ESP-F15V	Warner Instrument Corp., USA
Elektrodenhalter (Strom)	E45W	Warner Instrument Corp., USA
Faraday-Käfig		Eigenbau der Institutswerkstatt
Glaskapillaren (zur Herstellung der Mikroelektroden)	Borosilikatglas mit Filament	BioMedical Instruments, Zöllnitz
Glasmaterialien (Bechergläser, etc.)	Duran	Schott, Mainz
Injektionspipetten	Sodaklarglas, Artikelnummer 4878	WPI (World Precision Instruments Inc.), Sarasota, FL, USA
Injektionspumpe	UltraMicroPump II (UMP 2)	WPI, Sarasota, FL, USA
Kaltlichtlampen	KL 1500 electronic	Schott, Mainz
Kapillarschlingenziehgerät	PE-2	Narishige, Japan
Mikromanipulatoren	Modell M	Zeiss, Wetzlar
Oozyteninkubator (Kühlschrank)		Liebherr, Umbau auf 16 – 18 °C, Eigenbau der Institutswerkstatt
Perfusionskammer		Eigenbau aus Plexiglas
Polyethylenschläuche		Schütt Laborbedarf
Stereomikroskop	Serie M3	Wild/Zeiss
Stumpfe Pasteurpipetten		Eigenfabrikation
„Two-electrode voltage clamp device“ (Potenzialklemme/Stromapplikation)	OC 725 A, B, C	Warner, Hamden CT, USA
Zwei-Kanal-Flachbettschreiber	BD 112	Kipp & Zonen, Delft, Holland

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Geräte

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung GABA- und Mannit-abhängiger Ströme

BGT-1 transportiert drei positiv geladene Natrium-Ionen zusammen mit ein bis zwei negativ geladenen Chlorid-Ionen und einem ungeladenen GABA oder Betain in einem elektrogenen Modus in die Zelle hinein (siehe 1.1). Im Folgenden werden die durch GABA und Mannit induzierten beziehungsweise veränderten Ströme dargestellt. Das Mannit bewirkt bei Anwesenheit ein hyperosmolares Milieu.

Die elektrophysiologischen Versuche wurden jeweils an sechs Oozyten von drei verschiedenen *Xenopus-laevis*-Individuen durchgeführt. Dabei wurden die Versuchsreihen mit BGT-1 injizierten Oozyten und mit Wasser injizierten Kontrolloozyten (Mocks) vorgenommen. Die Versuchsdurchführung ist unter 2.7 beschrieben. Die Oozyten-Ringer-Lösung (ORi) fungiert als Kontrolllösung. Die Testlösungen waren 1 mM GABA in ORi, ORi versetzt mit 61 mM Mannit, ORi versetzt mit 61 mM Mannit und 1 mM GABA, ORi versetzt mit 122 mM Mannit, schließlich ORi versetzt mit 122 mM Mannit und 1 mM GABA.

Die Ergebnisse für die Testlösungen sind graphisch in den folgenden Abbildungen aufgeführt. Hier wird zum einen der Mittelwert (\bar{x}), zum anderen der so genannte „Standard Error of the Mean (SEM, Standardfehler)“ dargestellt. Der Standardfehler zeigt an, wie stark die Mittelwerte von zufälligen anderen Stichproben um den erhobenen Mittelwert streuen. Er wird nach der Formel $1/n \sum |x-\bar{x}|$ berechnet.

Zunächst zeigt die Abbildung 13 die Ergebnisse für die Kontrolllösung ORi und die Testlösung mit 1 mM GABA in BGT-1 injizierten Oozyten (A) und in Mocks (B). Die offenen Kreise symbolisieren die Ströme unter ORi, die geschlossenen Kreise die Ströme, wenn ORi zusätzlich mit 1 mM GABA versetzt wurde.

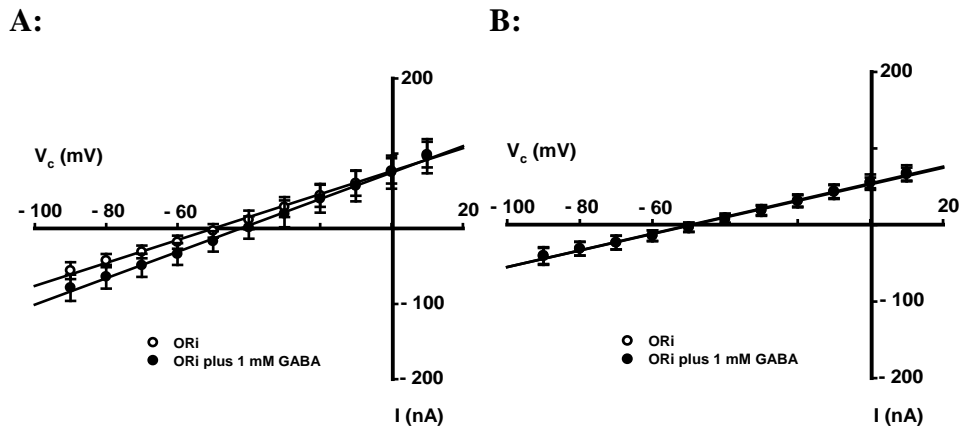


Abb. 13: Strom-Spannungskennlinien (IV-Kennlinien) in An- und Abwesenheit von 1 mM GABA in BGT-1 exprimierenden Oozyten (A) und in Wasser injizierten Kontrolloozyten (Mocks, B). Die Daten wurden an sechs Oozyten von drei Spendertieren gewonnen.

IV-Kennlinien BGT-1 exprimierender Oozyten in An- und Abwesenheit von 1 mM GABA: Die offenen Kreise (oberer Linienverlauf) zeigen den Strom I (nA) in Abhängigkeit einer bestimmten Klemmspannung V_c (mV) über der Zellmembran, der während der Perfusion mit ORi, also in Abwesenheit von GABA, auftrat. Die geschlossenen Kreise zeigen den Strom, der unter Perfusion mit 1 mM GABA Lösung verzeichnet wurde (Abb. 13 A).

Die gemessenen Ströme besaßen im Potenzialbereich zwischen -90 und -50 mV ein negatives Vorzeichen, da es sich um Kompensationsströme handelt, welche über die stromeinspeisende Elektrode zur Aufrechterhaltung des Klemmpotenzials in die Zelle geleitet werden. Somit handelte es sich um einen Einwärtsstrom über die stromeinspeisende Elektrode. Ab einem Klemmpotenzial von ca. -45 mV kehrte sich bei Abwesenheit von GABA der Einwärtsstrom in einen Auswärtsstrom um. Bei Anwesenheit von GABA geschieht dies erst bei ca. -40 mV. Der lineare Anstieg der IV-Kennlinien bei Anwesenheit von GABA erfolgte sichtbar steiler als in Abwesenheit von GABA. Auf den Anstieg der Leitfähigkeit unter Applikation von GABA wird in einer gesonderten Abbildung eingegangen. Die mit Wasser injizierten Oozyten (Mocks) wurden vergleichend hinzugezogen, um zu verifizieren, dass tatsächlich der BGT-1-Transporter für die registrierten Ströme verantwortlich war (Abb. 13 B). Den Mocks wurde statt der 23 nl cRNS des BGT-1-Transporters eine äquivalente Menge Wasser injiziert (siehe 2.3). An diesen wurden ebenfalls die Kontroll- und Testmessungen durchgeführt. Die IV-Kennlinien der Mocks in Ab- und Anwesenheit waren fast

identisch, was ein Beweis dafür ist, dass die Oozyten endogen keinen elektrogenen Transporter für GABA besitzen.

Die Ergebnisse für die Testlösung ORi versetzt mit 61 mM Mannit sowie mit 61 mM Mannit plus 1 mM GABA sind graphisch in Abbildung 14 aufgeführt.

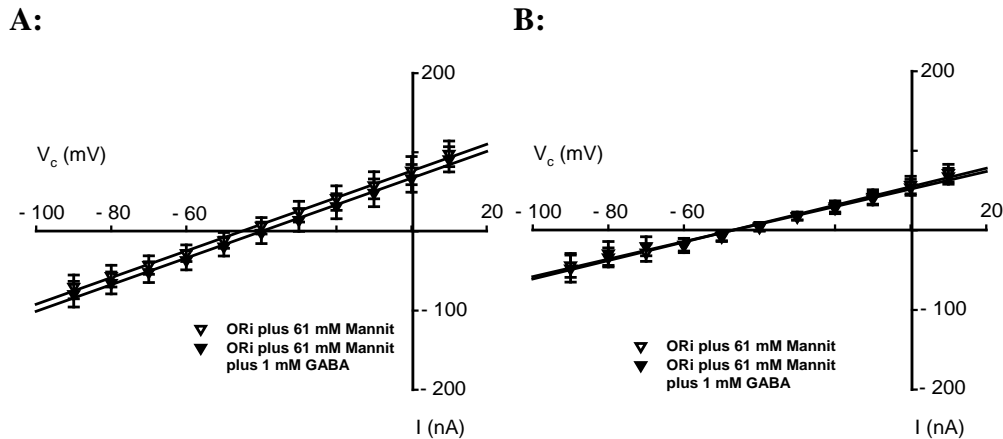


Abb. 14: Strom-Spannungskennlinien (IV-Kennlinien) in An- und Abwesenheit von 1 mM GABA in BGT-1 exprimierenden Oozyten (A) und in Mocks (B). Durch Zugabe von 61 mM Mannit zu der ORi-Lösung wurde ein hyperosmolares Medium geschaffen. Die Daten wurden an sechs Oozyten von drei Spendertieren gewonnen.

Auch unter hyperosmolaren Bedingungen zeigten die IV-Kennlinien einen linearen Verlauf (Abb. 14 A). Die Applikation von 1 mM GABA führte zu einem Anstieg des Stromes, der unabhängig vom angelegten Klemmpotenzial war und in den untersuchten Potenzialbereichen zwischen -7 und -10 nA lag. Eine Änderung der Osmolarität sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von 1 mM GABA hatte keinen Effekt auf die IV-Kennlinien der Mocks (Abb. 14 B). Das heißt, die Oozyten besitzen endogen weder einen elektrogenen Transporter für GABA, noch induziert eine Änderung der Osmolarität einen zusätzlichen Strom.

Eine weitere Erhöhung der Osmolarität um 122 mM durch die Zugabe von Mannit zu der ORi-Lösung zeigte die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse.

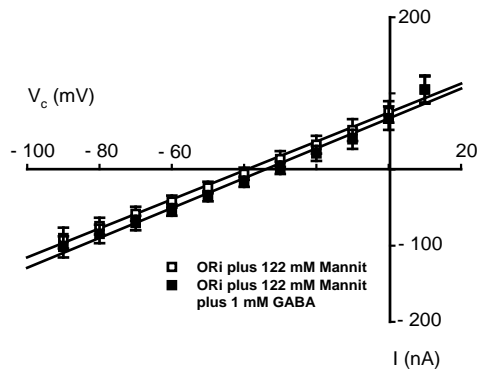
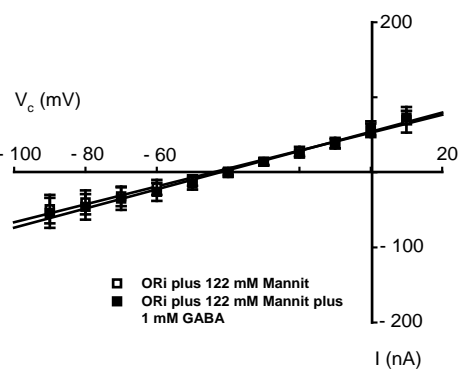
A:**B:**

Abb. 15: Strom-Spannungskennlinien (IV-Kennlinien) in An- und Abwesenheit von 1 mM GABA in BGT-1 exprimierenden Oozyten (A) und in Mocks (B). Die Osmolarität wurde durch Zugabe von 122 mM Mannit zu der ORi-Lösung erhöht. Die Daten wurden an sechs Oozyten von drei Spendertieren gewonnen.

Auch nach einer weiteren Erhöhung der Osmolarität um 122 mM wurden sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von 1 mM GABA lineare IV-Kennlinien detektiert (Abb. 15 A). Wiederum führte die Applikation von 1 mM GABA zu einem Anstieg des Stromes, der unabhängig vom angelegten Klemmpotenzial war und in den untersuchten Potenzialbereich zwischen -8 und -12 nA lag. In den Mocks (Abb. 15 B) hatte eine Änderung der Osmolarität sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von 1 mM GABA keinen Effekt auf die IV-Kennlinien. Das heißt, auch unter diesen hyperosmolaren Bedingungen wird in den Oozyten endogen kein elektrogener Transporter für GABA aktiviert. Nur bei Klemmspannungen im Bereich zwischen -90 und -70 mV wurde ein Strom niedriger Amplitude in Anwesenheit von GABA aktiviert, der jedoch nie eine Signifikanzgrenze von $p < 0,5$ erreichte.

Durch Subtraktion der gemessenen Ströme in Abwesenheit von GABA von denen in Anwesenheit von GABA können die GABA-assoziierten Ströme ermittelt werden (Abb. 13 – 15). Die Mittelwerte dieser Differenzströme sind für die drei unterschiedlichen Osmolaritäten in Abbildung 16 für die BGT-1 exprimierenden Oozyten und die Mocks zusammengestellt.

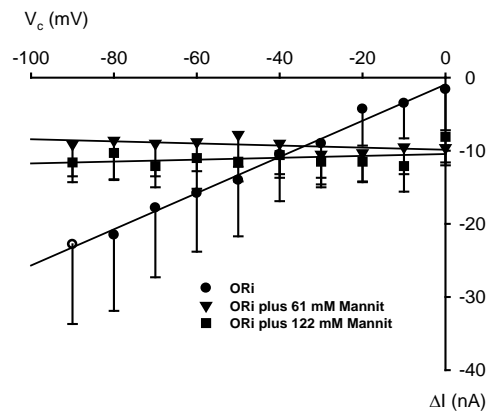
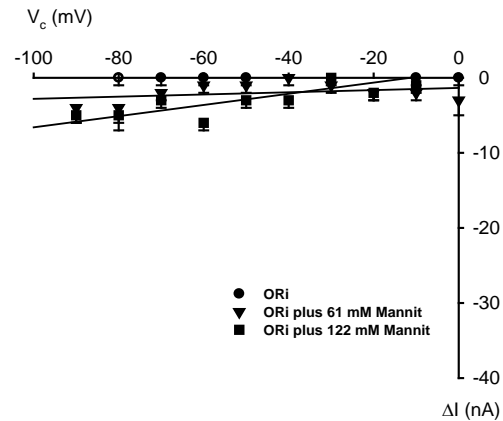
A:**B:**

Abb. 16: GABA-assoziierte Ströme in Anwesenheit unterschiedlicher Osmolaritäten. Die Ströme wurden aus den in den Abbildungen 13 – 15 gezeigten Originaldaten ermittelt. In (A) sind die Daten der BGT-1 exprimierenden Oozyten und in (B) die der Mocks dargestellt.

Bei einer für die Oozyten typischen Osmolarität von ca. 210 mOsM des Mediums zeigten die nach Applikation von 1 mM GABA detektierten Ströme bei -90 mV höhere Amplituden als bei 0 mV, d.h. der GABA-medierte Strom nahm bei Depolarisation des Oozyten ab. Dieses Potenzial-abhängige Verhalten ging bei Erhöhung der Osmolarität im Medium verloren. Die Erhöhung der Osmolarität um 61 mM und 122 mM führte zu Potenzial-unabhängigen GABA-assoziierten Strömen zwischen -7 und -12 nA (Abb. 16 A). Während sich bei den Mocks unter Kontrollbedingungen keine GABA-vermittelten Ströme nachweisen ließen (Abb. 16 B), konnten bei Erhöhung der Osmolarität solche geringerer Amplituden ermittelt werden. Sie erreichten aber nie das Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Zum besseren Verständnis sind bei einem Klemmpotenzial von -60 mV diese Ströme noch einmal für die drei untersuchten Osmolaritäten gesondert aufgetragen. Da die Zugabe von 1 mM GABA in Mocks nur sehr kleine Substrat-vermittelte Ströme induzierte, wurde auf das Zeigen dieser Daten in Abbildung 17 verzichtet.

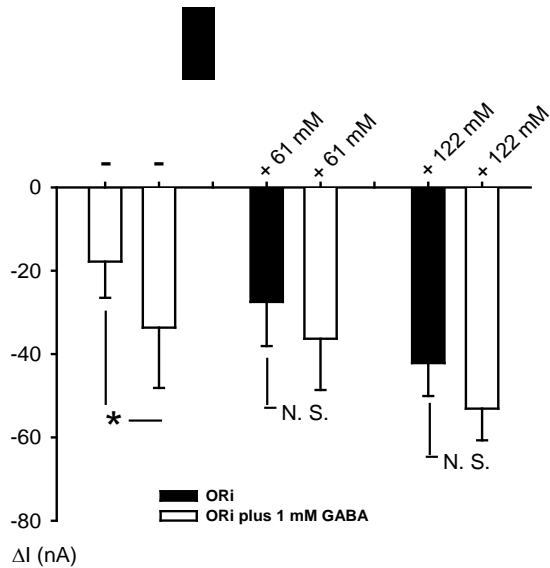


Abb. 17: GABA-assoziierte Ströme bei unterschiedlichen Osmolaritäten. Der Graph zeigt noch einmal die in Abbildung 16 A bei -60 mV gezeigten Daten in einer anderen Auftragung. Nur in Abwesenheit von Mannit induziert 1 mM GABA einen Strom, der signifikant von dem Strom in Abwesenheit von GABA verschieden ist. *: $p < 0,05$.

Die Zugabe von GABA verschob das Membranpotenzial zu mehr positiveren Potenzialen, also zu einer Depolarisation hin. Abbildung 18 zeigt die unter Normo- und Hyperosmolarität in Ab- und Anwesenheit von GABA ermittelten Werte.

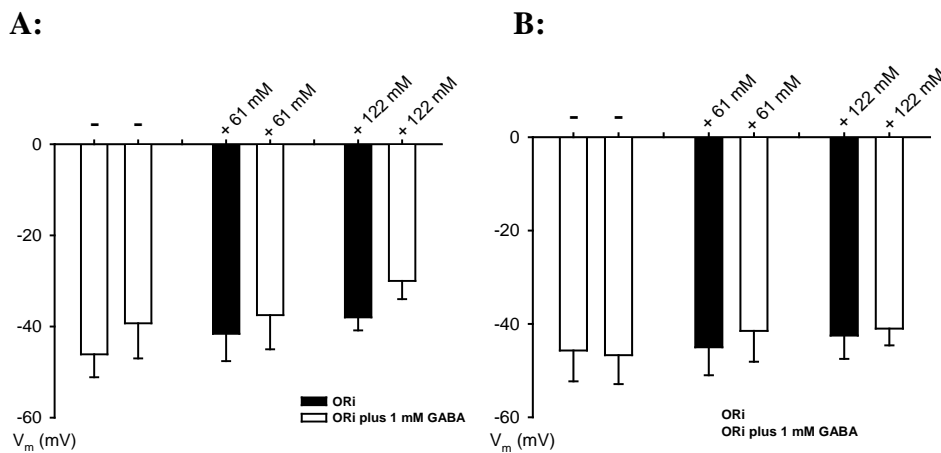


Abb. 18: Umkehrpotenziale in Ab- und Anwesenheit von 1 mM GABA bei verschiedenen Osmolaritäten ermittelt an BGT-1 exprimierenden Oozyten (A) und Mocks (B). Die Daten stellen Mittelwerte aus sechs Oozyten von drei unterschiedlichen Spendertieren dar, an denen alle Bedingungen subsequent durchgemessen wurden.

In der nachfolgenden Graphik sind die Leitfähigkeiten berechnet nach $g = I/U$ bei -60 mV dargestellt. Auch hier handelt es sich wieder um die Werte in Ab- und Anwesenheit von 1 mM GABA bei unterschiedlichen Osmolaritäten.

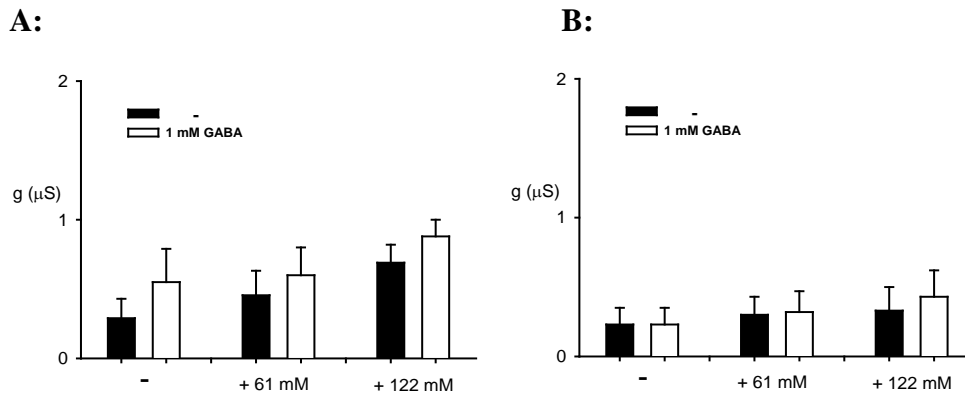


Abb. 19: Leitfähigkeiten in Ab- und Anwesenheit von 1 mM GABA bei verschiedenen Osmolaritäten ermittelt an BGT-1 exprimierenden Oozyten (A) und Mocks (B) bei -60 mV. Die Daten stellen Mittelwerte aus sechs Oozyten von drei unterschiedlichen Spendertieren dar an denen alle Bedingungen subsequent durchgemessen wurden.

Unter allen Versuchsbedingungen waren die für die BGT-1 exprimierenden Oozyten berechneten Leitfähigkeiten höher als die für die Mocks berechneten Leitfähigkeiten (Abb. 19 A und B). Dies spricht dafür, dass der BGT-1-Transporter in die Membran der Oozyten eingebaut wurde. Bei einem Anstieg der Osmolarität stieg auch die Leitfähigkeit an, ein Zeichen dafür, dass die Gabe von Mannit die Oozyten durchlässiger werden lässt.

3.2 Konzentrationsabhängigkeit GABA-induzierter Ströme

Eine weitere Versuchsreihe befasste sich mit der kinetischen Analyse GABA-induzierter Ströme. Dabei wurde anhand aufsteigender GABA-Konzentrationen zunächst die Sättigung der induzierbaren Ströme ermittelt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen GABA-Konzentrationen von 0,01 mM, 0,02 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM GABA angelegt. Den Mocks wurde jeweils nur die höchste Konzentration an GABA angeboten, da in den vorhergehenden Versuchen nachgewiesen worden war, dass Mocks keinen BGT-1 assoziierten Strom zeigen.

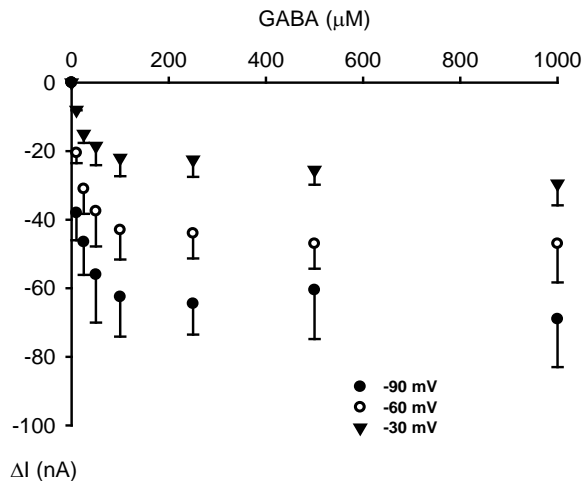


Abb. 20: Sättigungsverhalten GABA-induzierter Ströme

Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus Messungen an fünf Oozyten von drei Donoren. Auf die Darstellung GABA-induzierter Ströme in Mocks wurde verzichtet, da in keiner Messung die höchste eingesetzte Konzentration an GABA (1 mM) einen Strom induzierte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur die bei drei Klemmpotenzialen (-90, -60 und -30 mV) erhaltenen Ströme gezeigt. Gemessen wurde allerdings über einen Potenzialbereich von -90 bis 0 mV.

Bei allen untersuchten Klemmpotenzialen zeigten die GABA-vermittelten Ströme Sättigungsverhalten ab Konzentrationen von ca. 0,25 mM GABA. Bei negativen Klemmpotenzialen trat die Sättigung des GABA-vermittelten Stromes bei niedrigeren Konzentrationen an GABA ein. War das Klemmpotenzial zu mehr positiven Potenzialen hin verschoben, mussten höhere Konzentrationen an GABA angeboten werden, um die Sättigung des Stromes zu erreichen. Dieses Verhalten ist noch einmal zur Verdeutlichung in Abbildung 21 zu sehen. Hier werden die Amplituden der GABA-assoziierten Ströme bei einer sehr niedrigen, unterhalb der Sättigung liegenden Konzentration an GABA (0,01 mM) und bei einer hohen, oberhalb der Sättigung liegenden Konzentration (1 mM) gegenüber gestellt.

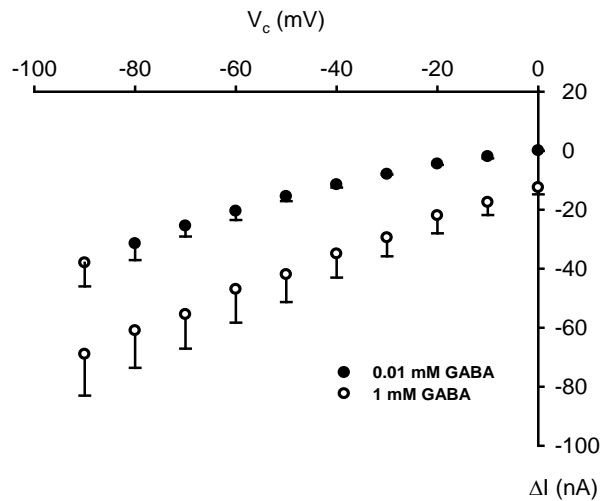


Abb. 21: IV-Kennlinien BGT-1 injizierter Oozyten bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen an GABA (0,01 mM und 1 mM GABA). Die Daten wurden an fünf Oozyten von drei Spendertieren gewonnen.

Aus diesen Daten konnten die kinetischen Parameter I_{\max} (maximal induzierbarer Strom) und K_m (Halbsättigungskonstante, Michaelis-Menten-Konstante) errechnet werden. Diese Parameter sind in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt.

Abbildung 22 zeigt die maximal von GABA induzierten Ströme als Funktion der angelegten Spannung beziehungsweise des Klemmpotenzials. Es ist zu erkennen, dass je positiver das Klemmpotenzial ist, die Stromamplitude umso niedriger ausfällt.

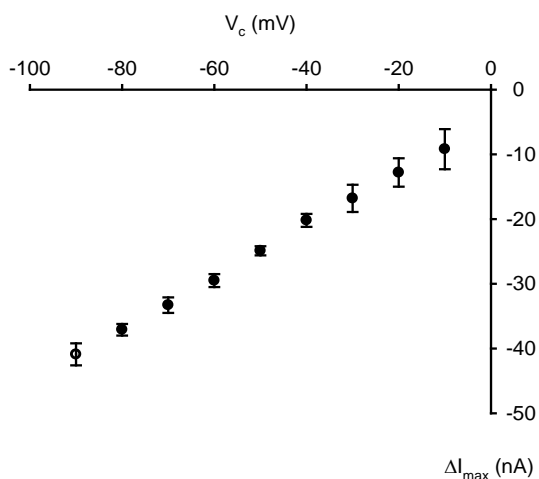


Abb. 22: Darstellung der maximal von GABA induzierten Einwärtsströme (ΔI_{\max}) als Funktion der angelegten Spannung. Auf die Darstellung der Mocks konnte verzichtet werden, da diese keine GABA induzierten Ströme zeigen.

Mittels der Eadie-Hofstee-Analyse wurden die halbmaximalen Sättigungskonzentrationen (K_m bzw. $K_{0,5}$ in μM) berechnet. Dafür herangezogene Formel lautet: $I = I_{\text{max}} * [S]/K_m + [S]$. Dabei sind S die Substratkonzentration und I_{max} der maximal nachweisbare Strom bei sättigenden Substratkonzentrationen.

Die K_m -Werte zeigten eine Abhängigkeit von der angelegten Klemmspannung. Die K_m steigt mit Depolarisation der Oozyten an.

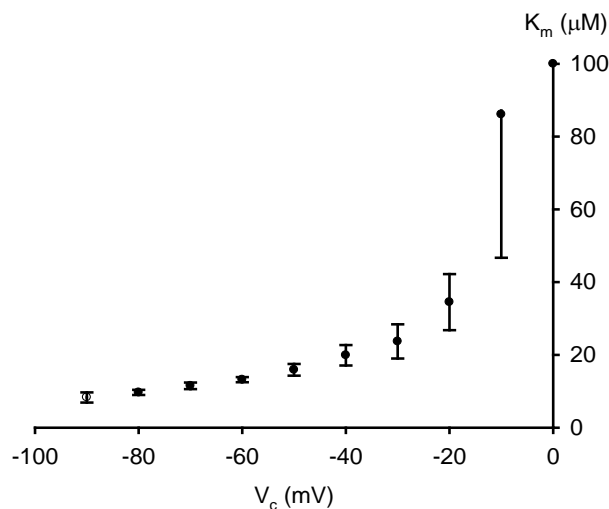


Abb. 23: Halbmaximale Sättigungskonzentrationen (K_m) als Funktion der angelegten Klemmspannung bei BGT-1 injizierten Oozyten. Die K_m wurde aus den in Abbildung 21 und 22 gezeigten Daten generiert.

3.3 Zeitabhängige Änderung des GABA-assoziierten Stromes durch Dioctanoylglycerol (DOG)

Dieser Versuch zeigt die zeitabhängige Wirkung von DOG auf die GABA-assoziierten Ströme bei -60 mV. Zunächst wurde der BGT-1 injizierte Oozyte jeweils unter reiner ORi-Perfusion, dann unter ORi plus 1 mM GABA gemessen. Anschließend wurde zum Zeitpunkt 0 mit einer Mikroliterspritze (2 ml) 5 μM DOG gelöst in ORi in das der Oozyte umgebende Milieu appliziert. Nach Einwirkzeiten von 15, 30 und 60 min wurde die Stromänderung abgelesen. Anschließend wurde ORi versetzt mit 1 mM GABA appliziert, die Stromänderung registriert und erneut ORi plus DOG in das die Oozyten umgebende Medium

gegeben. Analog wurde mit den Mocks verfahren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 zusammen gefasst.

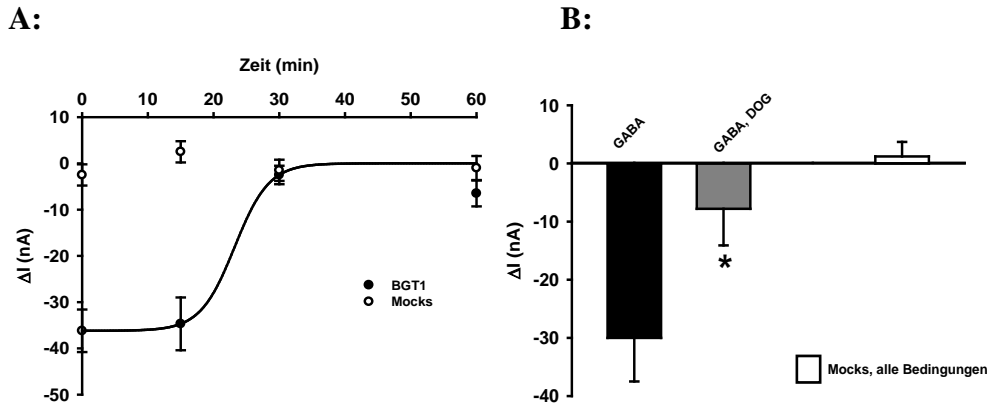


Abb. 24: Wirkung von DOG auf den GABA-assoziierten Strom bei einem Klemmpotenzial von -60 mV. (A) Zeitabhängige Wirkung von DOG; (B) Amplituden des GABA-induzierbaren Stromes in Ab- und Anwesenheit von DOG. Die Messungen wurden an drei BGT-1 exprimierenden Oozyten und drei Mocks von drei Donoren erhoben. Die Konzentrationen betragen für DOG 5 μ M und für GABA 1 mM. *: $p < 0,05$.

DOG reduzierte zeitabhängig den GABA-medierten Strom. Eine signifikante Erniedrigung dieses Stromes trat nach einer Inkubationszeit länger als 20 min ein, da nach 15 min der GABA-assoziierte Strom noch annähernd dem Strom in Abwesenheit von DOG entsprach. Nach 30 min war das Maximum der Inhibition erreicht, eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min hatte keinen weiteren Effekt. Mocks reagierten sowohl auf die Gabe von GABA als auch von DOG mit keiner Stromänderung.

3.4 Aufhebung der DOG-induzierten Hemmung des GABA-assoziierten Stromes durch Staurosporin

Die Aufhebung der DOG-induzierten Hemmung des GABA-assoziierten Stromes durch Staurosporin wird graphisch in Abbildung 25 dargestellt. Zunächst wurden die GABA mediierten Ströme unter Kontrollbedingungen, d.h. in Abwesenheit von Staurosporin und DOG, bei -60 mV gemessen. Anschließend wurden 10 μ M Staurosporin gelöst in ORi mittels einer Mikroliterspritze (2 ml) in das der Oozyte umgebende Milieu appliziert. Nach einer Einwirkzeit von 60 min wurde der GABA-assoziierte Strom gemessen. Im Anschluss daran wurden unter

Beibehaltung der Klemmspannung von -60 mV für weitere 30 min sowohl Staurosporin (10 μ M) als auch DOG (5 μ M) gelöst in ORi appliziert. Zum Schluss dieser letzten Inkubation wurden erneut die GABA-medierte Ströme gemessen.

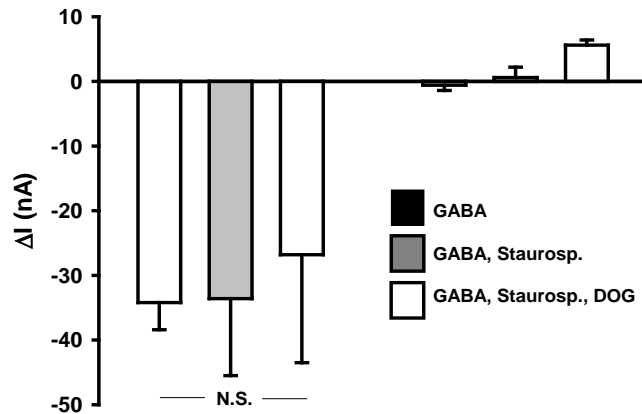


Abb. 25: Darstellung der GABA-induzierbaren Ströme nach Inkubation in Staurosporin und DOG. Die Säulen im linken Teil der Abbildung zeigen die Messwerte der BGT-1 exprimierenden Oozyten, die Säulen der rechten Seite die an Mocks gewonnenen Ergebnisse. Es wurden jeweils drei BGT-1 injizierte Oozyten und drei Mocks von unterschiedlichen Spendertieren untersucht. Die Konzentrationen für GABA, Staurosporin und DOG betragen 1 mM, 10 μ M und 5 μ M. Vor der Gabe an DOG wurden die Oozyten mit Staurosporin für 60 min vorinkubiert, anschließend erfolgte die simultane Applikation von Staurosporin und DOG. Staurosporin ist in der Lage den Effekt von DOG zu antagonisieren. Die GABA mediierten Ströme sind unter diesen Bedingungen nicht signifikant (N.S.) von einander verschieden.

Bei den BGT-1 injizierten Oozyten war praktisch kein Unterschied der Ströme zwischen GABA und GABA plus Staurosporin messbar. Dem hemmenden Einfluss auf die GABA-assoziierten Ströme durch DOG wurde durch Staurosporin entgegen gewirkt.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung GABA- und Mannit-abhängiger Ströme

Die Zellen des inneren Marks der Nieren sind permanent einem hypertonen Milieu ausgesetzt (BURG et al. 2007). Zur Aufrechterhaltung ihrer physiologischen Funktion und zur Verhinderung durch die hohe Osmolarität hervorgerufener Zellschäden akkumulieren diese Zellen organische Osmolyte. Betain und GABA sind solche Osmolyte. Die Aufnahme beider Substanzen in die Zelle wird über den Betain/GABA-Transporter, BGT-1, vermittelt.

Im Zuge dieser Dissertation wurde die Substratabhängigkeit des BGT-1 elektrophysiologisch untersucht. Hierzu wurde cRNS, die für den BGT-1 kodiert, in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) injiziert. Drei bis vier Tage nach Injektion der cRNS war das BGT-1-Protein in die Zellmembran des *Xenopus-laevis*-Oozyten eingebaut und konnte untersucht werden. Da GABA in BGT-1 exprimierenden Oozyten einen Strom größerer Amplitude hervorruft als Betain (MATSKEVITCH et al. 1999), wurden die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche ausschließlich mit GABA durchgeführt.

Mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik (two-electrode voltage clamp technique, TEVC) wurden nach Applikation von GABA und Mannit in BGT-1 exprimierenden Oozyten Substrat-assoziierte Ströme gemessen und aufgezeichnet. Mit volumenäquivalenten Mengen Wasser injizierte Oozyten (Mocks) dienten als Vergleichszellen dafür, dass ein bestimmtes Substrat tatsächlich per BGT-1 transloziert wurde. Bei der Untersuchung der Mocks konnten weder für GABA noch für Mannit signifikante Einwärtsströme nachgewiesen werden.

In Abbildung 13 ist ein deutlich steilerer Anstieg der IV-Kennlinien bei Perfusion mit 1 mM GABA erkennbar. In BGT-1 exprimierenden Oozyten hat, im Gegensatz zu den Mocks, die Leitfähigkeit der Membran zugenommen, ein Indiz dafür, dass BGT1 durch die Injektion in die Oozytenmembran eingebaut worden ist. Dies wird auch noch einmal in Abbildung 19 verdeutlicht: Hier sind die Leitfähigkeiten berechnet bei -60 mV in Ab- und Anwesenheit von GABA dargestellt. In Abwesenheit von Mannit steigt nach Applikation von GABA die

Leitfähigkeit um den Faktor 2 an. In Anwesenheit von Mannit ist dieser Effekt geringer ausgeprägt.

Mannit bewirkt bei seiner Anwesenheit ein hyperosmolares Milieu. In 1.2 ist beschrieben, dass die Zellen des Nierenmarks physiologischerweise im Rahmen der Urinkonzentrierung hohen extrazellulären Osmolaritäten ausgesetzt sind (BURG et al. 2007). Um in diesem Milieu überleben zu können, sammeln sich intrazellulär organische Osmolyte, wie zum Beispiel Betain an. Organische Osmolyte tragen dazu bei, den osmotischen Stress auszugleichen und ermöglichen die intrazelluläre Volumenregulation (SCHLISS und HÄUSSINGER 2002). In dieser Arbeit wurden Mannitkonzentrationen von 61 und 122 mM zu der ORI hinzugegeben. Diese Erhöhungen der Osmolarität sind niedriger als die im Nierenmark unter physiologischen Bedingungen bei der Harnkonzentrierung gemessenen Osmolaritäten, die bis zu 1200 mOsM ansteigen können. *Xenopus-laevis*-Oozyten werden im Vergleich zu humanen Zellen oder Säugetierzellen in einem Medium aufbewahrt, das eine niedrigere Osmolarität als das humane Plasma aufweist: ~200 vs. 300 mOsM. Eine Erhöhung der Osmolarität bewirkt in BGT-1 exprimierenden Oozyten bei -60 mV eine Zunahme der Leitfähigkeit (Abb. 19 A, schwarze Säulen), die in diesem Ausmaß bei den Mocks nicht beobachtet wurde (Abb. 19 B). Eine Erklärung für die Abnahme der Leitfähigkeit und der Substrat-medierte Ströme könnte eine Veränderung der Stöchiometrie des Transports sein. Versuche hierzu, die eine Variation sowohl der Natrium- als auch der Chloridkonzentration im Außenmedium bedeutet hätten, hätten deutlich den Rahmen dieser Dissertation gesprengt, wurden deshalb nicht ausgeführt und müssen zukünftigen Untersuchungen überlassen werden. Diese Versuche sollten neben der Variation der Elektrolyte im Außenmedium auch Versuche zur Aufnahme von radioaktiv-markiertem GABA beinhalten. Es wäre durchaus vorstellbar, dass durch Änderung der Stöchiometrie der Transport von einem elektrogenen in einen elektroneutralen Modus übergeht.

4.2 Konzentrationsabhängigkeit GABA-induzierter Ströme

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der GABA-induzierten Ströme wird zunächst die Sättigungskonzentration anhand aufsteigender Konzentration von GABA im Außenmedium ermittelt. Da der BGT-1 ein elektrogener Transporter ist, wurden die Sättigungskonstanten in einem Potenzialbereich zwischen -90 und 0 mV untersucht, da bei einem elektrogenen Transport das jeweils angelegte Klemmpotenzial einen Einfluss auf die Triebkraft haben kann. Diese Versuche wurden an BGT-1 exprimierenden Oozyten und an Mocks durchgeführt, wobei bei den Mocks nur die höchste Konzentration zum Einsatz kam, da alle vorhergehenden Versuche gezeigt hatten, dass bei den Mocks auf die Applikation von GABA keine Substrat-assoziierten Ströme registriert wurden. Sowohl die Auswertung der IV-Kennlinien als auch die Auftragungen der GABA-induzierten Ströme als Funktion der angelegten Spannung ergaben, dass ab einer Konzentration von 250 μ M GABA die GABA-induzierten Ströme in ihrer Amplitude nicht mehr anstiegen, dass also eine Sättigung des Stromes eingetreten war. Die aus diesen Versuchen errechneten maximal induzierbaren Ströme sind in Abbildung 22 und die Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) sind als Funktion der angelegten Spannung in Abbildung 23 zu sehen. MATSKEVITCH et al. (1999) geben sowohl für GABA als auch für Betain ebenfalls vom angelegten Klemmpotenzial abhängige K_m -Werte an. Die von dieser Arbeitsgruppe bestimmten K_m -Werte stimmen in etwa mit denen in dieser Arbeit ermittelten Werten überein. Es ist deutlich erkennbar, dass die maximal induzierbaren Ströme abhängig vom Potenzial sind und bei Depolarisation aufgrund der geringeren Triebkraft eine niedrigere Amplitude aufweisen. Die K_m -Werte steigen bei Depolarisation an, d.h. die Affinität des/der Substrats/e zu dem Transporter nimmt ab. Dies könnte mit einer durch die Depolarisation verursachten Veränderung der Bindungstasche/n für die Substrate zusammen hängen.

4.3 Zeitabhängige Einwirkung und Hemmwirkung des GABA-assozierten Stromes durch DOG

Der Einfluss von DOG auf den GABA-assozierten Strom wurde ausschließlich bei einem Klemmpotenzial von -60 mV untersucht. Die Hemmung des GABA-assozierten Stromes durch DOG war von der Einwirkungszeit abhängig. Eine fast vollständige Hemmung des GABA-mediierten Stromes war nach einer Einwirkungszeit von 30 min erreicht (Abb. 24). Bei der Konzentration von DOG wurde sich auf Literaturwerte bezogen und eine Konzentration von 5 μM gewählt. Mocks reagierten nicht auf die Behandlung mit DOG.

LOO et al. beschrieben 1996 Dioctanoylglycerol (DOG) als einen Aktivator der Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase C (PKC) auf den ebenfalls an der Osmoregulation beteiligten Taurin-Transporter TAUT. Sie vermuteten, dass die verminderte Transportaktivität des TAUT nach Applikation von DOG auf eine Reduktion der Anzahl der TAUT-Transporter in der Membran zurückzuführen ist. Der ebenfalls zu der SLC6-Familie zählende Natrium-/Chlorid-/GABA-Transporter (GAT-1) reagiert, ähnlich wie der BGT-1, auf die Behandlung mit DOG (BECKMAN et al. 1999). Die Aktivierung der Signalkaskade führt zu einem Austritt von Ca^{2+} -Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum sowie zu einem vermehrten Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen und damit zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (KORBMACHER 2009).

Im Einklang dazu konnten KEMPSON et al. 2006 nachweisen, dass die Transporteigenschaften des BGT-1 durch einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration geändert werden können. Dabei wird BGT-1 aus der Zellmembran abgebaut und internalisiert. Die Rolle der PKC konnte dabei nicht abschließend geklärt werden.

4.4 Aufhebung der Hemmung des GABA-assoziierten Stromes durch Staurosporin

In 3.3 wurde die Hemmung der GABA-assoziierten Ströme durch DOG behandelt. In der Folge soll nun unter 3.4 dessen Aufhebung, also die Hemmung der Hemmung, durch Staurosporin gezeigt werden. Dabei werden wieder Mocks und BGT-1 injizierte Oozyten den gleichen Versuchsbedingungen unterworfen und die Messergebnisse vergleichend in Abbildung 25 dargestellt.

Eine Vorinkubation der BGT-1 exprimierenden Oozyten mit Staurosporin beeinflusste, zumindest bei einem Klemmpotenzial von -60 mV, nicht den GABA-assoziierten Strom. Staurosporin ist ein unspezifischer Hemmstoff der PKC. Für die hier gezeigten Ergebnisse heißt das, dass eine Hemmung der PKC keinen Einfluss auf die GABA-induzierten Ströme hat. Da DOG die GABA-induzierten Ströme reduzierte, bedeutet das im Umkehrschluss, dass eine Aktivierung der PKC den BGT-1 so beeinflusst, dass er seine Substrate entweder überhaupt nicht mehr oder zumindest nicht mehr in einem elektrogenen Modus transportieren kann. Auch hier müssten sich Versuche mit radioaktiv-markiertem GABA anschließen, um zu klären, ob sich nur die Stöchiometrie der Substrate GABA, Natrium und Chlorid zueinander geändert hat, oder ob der BGT-1 nicht mehr in der Lage ist, diese Substrate zu transportieren.

5 Zusammenfassung

Durch elektrophysiologische Methoden wurde im Rahmen dieser Arbeit der Betain/GABA-Transporter BGT-1 funktionell untersucht.

Hierfür wurde zunächst die für dieses Transportprotein kodierende messenger-RNS (mRNS) in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* injiziert. Nach Inkubation und erfolgter Expression der Erbinformation konnten mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik etwaige induzierte Einwärtsströme während der Perfusion mit einem potenziellen Substrat aufgezeichnet werden. Insgesamt wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Hyperosmolare Bedingungen reduzieren den GABA-assoziierten Strom. Ob sich unter diesen Bedingungen nur die Stöchiometrie der Substrate Natrium, Chlorid und GABA des BGT-1 ändert oder ob diese Substrate weniger transportiert werden, konnte nicht geklärt werden.
- DOG hemmt zeitabhängig bei einem Klemmpotenzial von -60 mV den GABA-assoziierten Strom. Dies lässt einen Einfluss der PKC auf den Transport von GABA über den BGT-1 vermuten.
- Die Wirkung der PKC auf den GABA-assoziierten Strom kann durch Staurosporin aufgehoben werden, d.h. eine Aktivierung der PKC hemmt den GABA-assoziierten Strom.

Wie in der Diskussion schon angeklungen, müssen weitere Versuche folgen, um den genauen Mechanismus der PKC, insbesondere ihrer Untereinheiten, auf die Transportmodi des BGT-1 zu klären.

6 Literaturverzeichnis

Ahn J, Mundigl O, Muth TR, Rudnick G, Caplan MJ (1996): Polarized expression of GABA transporters in MDCK cells and cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 271, 6917 – 6924

Bagnasco SM, Montrose MH, Handler JS (1993): Role of calcium in organic osmolyte efflux when MDCK cells are shifted from hypertonic to isotonic medium. *Am J Physiol* 264, C1165 – C1170

Beckman ML, Bernstein EM, Quick MW (1999): Multiple G protein-coupled receptors initiate protein kinase C redistribution of GABA transporter in hippocampal neurons. *J Neurosci* 19, 1 – 6

Burg MB, Kwon ED, Kultz D (1996): Osmotic regulation of gene expression. *FASEB J* 10, 1598 – 1606

Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI (2007): Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 87, 1441 – 1474

Chen N-H, Reith MEA, Quick MW (2004): Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC 6. *Pflugers Arch* 447, 519 – 531

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

Dumont JN (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136, 153 – 157

Ferraris J, Burg M, Williams C, Peters E, Garcia-Perez A (1996): Betaine transporter cDNA cloning and effect of osmolytes on its mRNA induction. *Am J Physiol* 270, C650 – C654

Grossman EB, Herbert SC (1989): Renal inner medullary choline dehydrogenase activity: characterization and modulation. *Am J Physiol* 256, F107 – F112

Grunewald RW, Kinne RK (1989): Intracellular sorbitol content in isolated rat inner medullary collecting duct cells. Regulation by extracellular osmolarity. *Pflugers Arch* 414, 178 – 184

Grunewald RW, Oppermann M, Schettler V, Fiedler GM, Jehle PM, Schuettert JB (2001): Polarized function of thick ascending limbs of Henle cells in osmoregulation. *Kidney Int* 60, 2290 – 2298

Hoffmann EK, Simonsen LO (1989): Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev* 69, 315 – 382

Kempson SA, Montrose MH (2004): Osmotic regulation of renal betaine transport: transcription and beyond. *Pflugers Arch* 449, 227 – 234

Kempson SA, Edwards JM, Sturek M (2006): Inhibition of the renal betaine transporter by calcium ions. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F305 – F313

Kinne RK, Czekay RP, Grunewald RW, Mooren FC, Kinne-Saffran E (1993): Hypotonicity-evoked release of organic osmolytes from distal renal cells: systems, signals, and sidedness. *Renal Physiol Biochem* 16, 66 – 78

Korbmacher C: Funktion und Interaktion von Zellen; in: *Lehrbuch der Physiologie*, Band I, 6. vollständig überarbeitete Auflage; hrsg. v. Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009, 16 – 59

Kultz D, Chakravarty D (2001): Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 1999 – 2004

Kwon MS, Lim SW, Kwon HM (2009): Hypertonic Stress in the Kidney: A Necessary Evil. *Physiology* 24, 186 – 191

Lever M, Sizeland PCM, Frampton CM, Chambers ST (2004): Short- and long-term variation of plasma glycine betaine concentrations in humans. *Clin Biochem* 37, 184 – 190

Loo DDF, Hirsch JR, Sarkar HK, Wright EM (1996): Regulation of the mouse retinal taurine transporter (TAUT) by protein kinases in *Xenopus oocytes*. *FEBS Lett* 392, 250 – 254

Matskevitch I, Wagner CA, Stegen C, Broer S, Noll B, Risler T, Kwon HM, Handler JS, Waldegger S, Busch A, Lang F (1999): Functional characterization of the betaine/GABA transporter BGT-1 expressed in *Xenopus oocytes*. *J Biol Chem* 274, 16709 – 16716

Miyai A, Yamauchi A, Moriyama T, Kaneko T, Takenaka M, Sugiura T, Kitamura H, Ando A, Tohyama M, Shimada S, Imai E, Kamada T (1996): Expression of betaine transporter mRNA: its unique localization and rapid regulation in rat kidney. *Kidney Int* 50, 819 – 827

Perego C, Bulbarelli A, Longhi R, Caimi M, Villa A, Caplan MJ, Pietrini G (1997): Sorting of two polytopic proteins, the GABA and betaine transporters, in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* 272, 6584 – 6592

Schliess F, Häussinger D (2002): The cellular hydration state: a critical determinant for cell death and survival. *Biol Chem* 383, 577 – 583

Stühmer W (1992): Electrophysiological recordings from *Xenopus oocytes*. *Methods Enzymol* 207, 319 – 339

Takenaka M, Bagnasco S, Preston A, Uchida S, Yamauchi A, Kwon H, Handler J (1995): The canine betaine-GABA (γ -amino-n-butyric acid) transporter gene. Diverse mRNA isoforms are regulated by hypertonicity and are expressed in a tissue specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1072 – 1076

Uchida S, Kwon H, Yamauchi A, Preston A, Marumo F, Handler J (1992): Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na⁺ and Cl⁻-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. Proc Natl Acad Sci USA 89, 8230 – 8234

Uchida S, Yamauchi A, Preston AS, Kwon HM, Handler JS (1993): Medium tonicity regulates expression of the Na⁺ and Cl⁻-dependent betaine transporter in MDCK cells by increasing transcription of the transporter gene. J Clin Invest 91, 1604 – 1607

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

Ziegler C, Bremer E, Krämer R (2010): The BCCT family of carriers: from physiology to crystal. Mol Microbiol 78, 13 – 34

Danksagung

Zu besonderem Dank bin ich Frau Prof. Dr. B. C. Burckhardt für die freundliche und sehr gute Betreuung während aller Phasen bis zur Fertigstellung dieser Arbeit verpflichtet. Weiterhin richtet sich mein herzlicher Dank an Frau I. Markmann, die mir als technische Assistentin bis zu ihrer Pensionierung im Sommer 2010 bei der Durchführung der Experimente stets eine große Hilfe war.

Lebenslauf

Am 18.08.1983 bin ich als zweiter Sohn der Eheleute Margret Reese, geborene Pattke, und Hartwig Reese in Göttingen geboren. Meine Mutter war bis Ende 2009 als kaufmännische Angestellte bei einer Versicherung, mein Vater war bis zu seinem Tode am 27.11.2002 als leitender kaufmännischer Angestellter tätig. Dennis Reese, mein vier Jahre älterer Bruder, arbeitet seit Juli 2009 als Wirtschaftspädagoge an einer Berufsschule in Stuttgart.

Von 1990 bis 1994 besuchte ich in Hildesheim die Grundschule im Ortsteil Himmelsthür, im Anschluss daran für zwei Jahre die Orientierungsstufe am gleichen Ort. Im August 1996 wechselte ich auf das Gymnasium Himmelsthür. Dort erlangte ich im ersten Halbjahr 2003 meine allgemeine Hochschulreife.

Ab Juli 2003 trat ich meinen Grundwehrdienst als Sanitätssoldat in Kellinghusen (Schleswig-Holstein) an, welchen ich im März 2004 als Obergefreiter beendete.

Mit Anfang des Sommersemesters 2004 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Das Vorphysikum absolvierte ich im Anschluss an das Wintersemester 2004/2005 und das Physikum im Anschluss an das Sommersemester 2006 jeweils mit der Note „Sehr gut“. Die zahnärztliche Prüfung bestand ich am 12.06.09 mit der Gesamtnote „Sehr gut“. Die zahnärztliche Approbation wurde mir am 08.07.2009 erteilt.

Von Juni 2009 bis Februar 2011 führte ich die bereits im Jahr 2006 begonnene experimentelle Doktorarbeit auf dem Gebiet der Nephrophysiologie am Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Universität Göttingen fort.

Derweil arbeite ich seit November 2009 als Assistenz Zahnarzt in der Gemeinschaftspraxis Dr. Bonke, Bischoff, Dr. Herzog in Stuhr Moordeich bei Bremen.