

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

**Strukturwirkungsbeziehungen am Na⁺-abhängigen Dicarboxylat-
Cotransporter 3(hNaDC3)**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Cornelia Kaufhold
aus Magdeburg
Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

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

II. Berichtstatter/in:

III. Berichtstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

1	Einleitung	3
1.1	Funktion und Bedeutung der Nieren im menschlichen Organismus.....	3
1.2	Natrium-Dicarboxylat-Cotransporter 3 (NaDC3).....	5
1.2.1	Die SLC13A-Genfamilie.....	6
1.2.2	Biochemische Struktur des hochaffinen Natrium-Dicarboxylat-Cotransporters 3 des Menschen (hNaDC3).....	7
1.2.3	Biochemische Strukturen und Charakterisierung verwendeter Substanzen des hNaDC3-Transporters.....	8
1.3	Hypoxie-induzierter Faktor (HIF) und das von-Hippel-Lindau-Syndrom.....	10
1.4	Zielsetzung.....	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Lösungen	12
2.2	Geräte	14
2.3	<i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten	15
2.4	Oozytenaufbewahrung und Oozyteninjektion.....	17
2.5	Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Two Electrode Voltage Clamp; TEVC).....	19
2.6	Vorgehensweise.....	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Succinat-abhängiger Einwärtsstrom	23
3.1.1	Strom-Spannungskennlinien Succinat-induzierter Ströme.....	24
3.1.2	Leitfähigkeit hNaDC3-exprimierender Oozyten	25
3.1.3	Depolarisation in hNaDC3-exprimierenden Oozyten unter Succinat	26
3.1.4	Strom-Spannungskennlinien Wasser-injizierter und hNaDC3-exprimierender Oozyten	28
3.1.5	Vergleich von Succinat- und N-Oxalyl-Glycin-induzierten Strömen	29
3.1.6	Vergleich von Succinat- und Fumarat-induzierten Strömen an hNaDC3-exprimierten Oozyten.....	30
3.1.7	Vergleich von Succinat- und Glycin-induzierten Strömen.....	31
3.1.8	Vergleich von Succinat-, Glycin- und Glycylglycin-induzierten Strömen .	32

3.2	Strom-Spannungskennlinien hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Einfluss von Succinat, Glutathion und den Aminosäuren, aus denen Glutathion synthetisiert wird.....	34
3.2.1	Vergleich der Succinat- und Glutathion-induzierten Ströme	34
3.2.2	Vergleich der Succinat- und Glycin-induzierten Ströme.....	35
3.2.3	Vergleich der Succinat- und Cystein-induzierten Ströme.....	36
3.2.4	Vergleich der Succinat- und Glutamat-induzierten Ströme	37
3.3	Natrium-abhängige Strom-Transporter-Messungen	38
4	Diskussion.....	39
4.1	Transporter hNaDC3 und sein Zusammenspiel mit Dicarboxylaten	39
4.2	Charakterisierung des hNaDC3 unter Verwendung der eigenen Daten	39
4.2.1	Zusammenspiel des hNaDC3-Transporters mit Fumarat	41
4.2.2	Zusammenspiel des hNaDC3-Transporters mit Glutathion	42
4.2.3	Zusammenspiel des hNaDC3-Transporters mit N-Oxalyl-Glycin	43
4.2.4	Zusammenspiel des hNaDC3-Transporters mit Glycylglycin.....	44
5	Zusammenfassung	45
6	Literaturverzeichnis.....	46
7	Abkürzungsverzeichnis	49

1 Einleitung

1.1 Funktion und Bedeutung der Nieren im menschlichen Organismus

Die Nieren sind ein paarig angelegtes Ausscheidungsorgan des menschlichen Körpers. Sie übernehmen zahlreiche lebensnotwendige Funktionen für den Menschen. Eine ihrer Funktionen besteht in der Eliminierung von überflüssigen oder schädlichen harnpflichtigen Substanzen. Bei diesen Substanzen kann es sich zum einen um endogene Stoffwechselprodukte (z.B. Harnsäure, Harnstoff, Kreatinin) oder zum anderen um exogen zugeführte Fremdstoffe (z.B. Toxine, Medikamente) handeln. Die Nieren sind für die Kontrolle des Volumen- und des Elektrolythaushaltes verantwortlich und regulieren so die Wasser- und Salzausscheidung und zusätzlich über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System den Blutdruck. Durch die Ausscheidung von H^+ , HCO_3^- und NH_4^+ greifen die Nieren in den Säuren-Basen-Haushalt des Körpers ein, da der pH-Wert des Blutes zur Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen nur sehr kleine Schwankungen zulässt. Große Änderungen des pH-Wertes in den sauren oder alkalischen Bereich würden zum Tode führen. Neben diesen regulatorischen Aufgaben betreibt die Niere die Neusynthese von Glukose aus Nicht-Kohlenhydratvorstufen und die Synthese von Hormonen, wie Erythropoetin, das die Erythropoese stimuliert, und Calcitriol, welches in den Mineralhaushalt eingreift.

Die oben genannten Aufgaben der Nieren werden von ca. zwei Millionen Nephronen übernommen. Jedes Nephron besteht aus einem Glomerulus mit einer Bowman-Kapsel und einem Tubulussystem (proximaler Tubulus, Henle-Schleifensystem, distaler Tubulus). Mehrere Nephronen münden in ein gemeinsames Sammelrohr. Die Glomeruli befinden sich in der Nierenrinde, das Tubulussystem durchzieht je nach Ausprägung der Henle-Schleifen auch das Nierenmark. Ein Glomerulus besteht aus 30 Kapillarschlingen und ist von der Bowman-Kapsel umhüllt. Die Wand der Kapillaren besteht von innen nach außen aus einem gefensterten Endothel, einer Basalmembran und der Schlitzmembran mit den Podozyten. Bei einem gesunden, jungen Erwachsenen werden etwa 120 ml Primärharn pro Minute in den Bowman-Kapselraum abfiltriert. Die Elektrolytkonzentrationen des Primärharns entsprechen denen des Plasmas. Der Primärharn gelangt anschließend in den ersten Abschnitt des Tubulussystems, den proximalen Tubulus. Hier werden ca. 2/3 des Filtrats rück-

resorbiert. Der Grund für die erhöhte Transportaktivität in diesem Segment liegt zum einen an der massiv vergrößerten Oberfläche der luminalen und basolateralen Membran aufgrund von Mikrovilli und basolateralen Einfaltungen und zum anderen an der erhöhten Anzahl von Mitochondrien. Die Transportprozesse werden durch den elektrochemischen Natrium-Gradienten, welcher durch die Na^+/K^+ -ATPase aufgebaut wird, angetrieben. Die in der basolateralen Zellmembran liegende Na^+/K^+ -ATPase transportiert unter Verbrauch von einem Molekül ATP drei Na^+ -Ionen aus und zwei K^+ -Ionen in die Zelle hinein. Bei diesem primär-aktiven Transport wird eine positive Ladung nach außen verschoben. Diese aufgebaute Potentialdifferenz und die niedrige intrazelluläre Natrium-Konzentration nutzen sekundär-aktive Transporter wie der Na^+/H^+ -Antiporter oder die verschiedenen Natrium-Symporter für sich aus, um ihr Substrat zusammen mit Natrium in die Zelle zu transportieren. Sie ermöglichen den Transport von organischen Substanzen und Anionen (z.B. Glukose, Laktat, Aminosäuren, Phosphat). Durch diese Resorptionsvorgänge werden der Tubulusflüssigkeit osmotisch aktive Substanzen entzogen. Dieses hat einen Wasserstrom über Wasserkanäle (Aquaporine) in die Zelle und als „solvent drag“ zusammen mit gelösten Teilchen, vorzugsweise Natrium und Chlorid, durch Tight Junctions in das Interstitium zur Folge.

Insgesamt werden 2/3 des filtrierten Wassers und Kochsalzes, 95% des filtrierten Bikarbonats und fast 100% der filtrierten Glukose und Aminosäuren im proximalen Tubulus resorbiert. Darüber hinaus finden im proximalen Tubulus auch sekretorische Prozesse für die Ausscheidung von organischen Säuren und Basen (z.B. Harnsäure) sowie Fremdstoffen (z.B. Penicillin) statt.

Bei der Sekretion werden z.B. Fremdstoffe, die in geladener und ungeladener Form vorliegen können, über einen Transportmechanismus in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus aus dem Interstitium in die Nierentubuluszelle aufgenommen und danach über einen Transportmechanismus in der luminalen Membran in den Primärharn sezerniert.

In der basolateralen Membran liegen, neben anderen Transportern, die organischen Anionen-Transporter OAT1 und OAT3 vor. Durch sie erfolgt die Aufnahme eines negativ geladenen Fremdstoffes, ein sogenanntes organisches Anion (OA^-) aus dem Blut im Austausch gegen ein intrazelluläres Dicarboxylat (z.B. α -Ketoglutarat) in die Zelle (BURCKHARDT BC & BURCKHARDT G 2003). Über Natrium-gekoppelte

Transporter werden Dicarboxylate in die Zelle aufgenommen. Bei diesen Transportern handelt es sich um den in der luminalen Membran liegenden NaDC1 und den in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus liegenden NaDC3 (HENTSCHEL et al. 2003). Hierbei werden ein zweifach negativ geladenes α -Ketoglutarat im Symport mit 3 Na^+ -Ionen aus dem Blut in die Zelle transportiert. Die Triebkraft für diesen Transport liefert der einwärtsgerichtete, elektrochemische Gradient für Natrium, welcher über die Na^+/K^+ -ATPase aufgebaut wird. Das Zellschema für die Fremdstoffausscheidung ist in Abbildung 1 dargestellt.

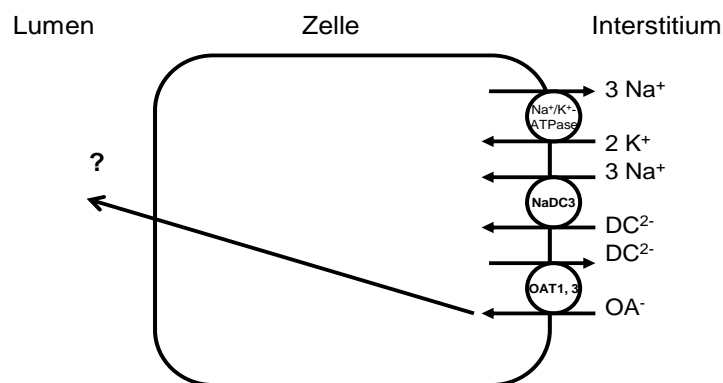


Abb. 1: Zellschema zur Aufnahme von Fremdstoffen, die als organische Anionen (OA) vorliegen, über die basolaterale Membran proximaler Tubuluszellen. Die Fremdstoffe werden über die „Organische Anionentransporter (OAT) 1 und 3“ aus dem Blut über die basolaterale Membran im Austausch gegen Dicarboxylate (DC) in die Zelle aufgenommen. Die Dicarboxylate gelangen über den Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporter 3 (NaDC3) in die Zelle. Die Dicarboxylate rezirkulieren zur Aufnahme organischer Anionen. Die Natrium-Kalium-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase) stellt den Gradienten für Natrium her, entlang dem die Dicarboxylate in die Zelle über den NaDC3 transportiert werden.

1.2 Natrium-Dicarboxylat-Cotransporter 3 (NaDC3)

Der Natrium-Dicarboxylat-Cotransporter 3 ist Mitglied der SLC13A-Transporter-Familie (SLC13=Solute Carrier family 13) (MARKOVICH & MURER 2004). Im Jahr 2000 wurde der hNaDC3 kloniert (WANG H et al. 2000). Man findet ihn im Gehirn, im Auge, in der Leber und in den Nieren, wo er wichtige physiologische Funktionen übernimmt (PAJOR 2006). Dafür nutzt dieses Protein den Natriumkonzentrationsunterschied zwischen dem Inneren und dem Äußeren der Zelle, um Di- und Tricarboxylate in die Zelle zu transportieren.

1.2.1 Die SLC13A-Genfamilie

Die SLC13A-Genfamilie besteht aus fünf strukturverwandten Proteinmitgliedern, welche sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Zellen sowie in Hefen und Bakterien identifiziert wurden. Diese Proteine sind zu 40-50% in ihrer Aminosäuresequenz identisch. Sie werden in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen, die Na^+ -Sulfat (NaS)-Cotransporter und die Na^+ -Carboxylat (NaC)-Cotransporter, eingeteilt (MARKOVICH & MURER 2004). Die zwei Na^+ -Sulfat (NaS)-Cotransporter NaS1 und NaS2 transportieren Substanzen wie Sulfat, Selen und Thiosulfat. Die drei Na^+ -Carboxylat-Cotransporter NaDC1, NaDC3 und NaCT transportieren mit unterschiedlicher Affinität Di- und Tricarboxylate (z.B. Succinat, Citrat und α -Ketoglutarat) (PAJOR 2006). NaDC1 verfügt im Vergleich zu NaDC3 über eine geringere Succinat-Affinität. Dagegen weist NaCT eine höhere Citrat-Affinität auf. Alle SLC13-Proteine sind Na^+ -abhängige Cotransporter, bei denen der Transport in einem stöchiometrischen Na^+ : Anion-Verhältnis von 3:1 (NaDCs) oder 4:1 (NaCT) stattfindet (MARKOVICH & MURER 2004; PAJOR 2006).

In der Abbildung 2 wird die SLC13A-Genfamilie im phylogenetischen Baum dargestellt. In ihm werden die bisher klonierten Sulfat- und Carboxylattransporter verschiedener Tierarten veranschaulicht.

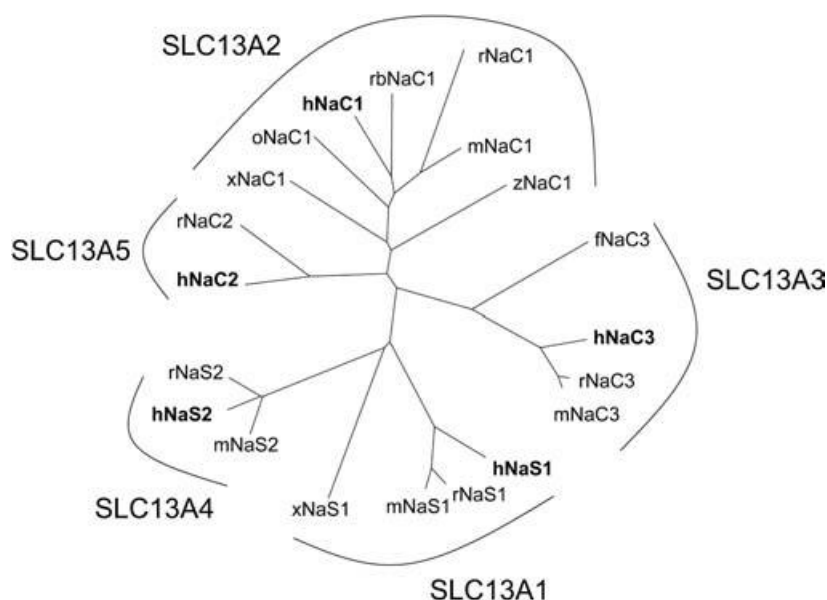


Abb. 2: Darstellung des phylogenetischen Baumes der SLC13A-Genfamilie mit der Unterteilung in Sulfat- und Carboxylattransporter in verschiedenen Spezies (h-Mensch, m-Maus, o-Opossum, r-Ratte, f-Winterflunder, x-Xenopus, z-Zebrafisch (aus: MARKOVICH & MURER 2004, S. 596). Der phylogenetische Baum wird durch Aminosäurevergleiche bestimmt. Die einzelnen Strecken spiegeln den Verwandtschaftsgrad wider.

Der Grad der genetischen Verwandtschaft zwischen den klonierten Proteinen verschiedener Spezies wurde in Abbildung 2 sehr anschaulich dargestellt. Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen Säugetieren erheblich höher als die Übereinstimmung zwischen Säugetieren und anderen Spezies ist. Mit 85% erreicht die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen dem hNaDC3 und dem rNaDC3 den höchsten Wert. hNaDC1 und hNaDC3 stimmen zu ca. 45% überein und fNaDC3 und hNaDC3 sind zu 62% identisch (WANG H et al. 2000).

1.2.2 Biochemische Struktur des hochaffinen Natrium-Dicarboxylat-Cotransporters 3 des Menschen (hNaDC3)

Der humane Natrium-Dicarboxylat-Cotransporter 3, hNaDC3, ist auf dem Chromosom 20q12-13 lokalisiert. Es besteht aus 13 Exons und 12 Introns. Die cDNA des hNaDC3 ist 3481 Basenpaare lang und hat eine Molekularmasse von 66,9 kDa. Sie kodiert für ein Protein aus 602 Aminosäuren. Über einen Hydrophobizitätsplot nach Kyte und Doolittle kann berechnet werden, dass das hNaDC3 Protein aus 11-12 Transmembrandomänen aufgebaut ist. Für die Berechnung wurde zugrunde gelegt, dass eine Membrandomäne aus 17 bis 33 hydrophoben Aminosäuren besteht (WANG H et al 2000). Diese Berechnungen ergaben außerdem, dass das Carboxyende (COOH) extrazellulär und das Aminoende (NH₂) intrazellulär gelegen ist. Diese berechnete Struktur wurde von Bai und Mitarbeitern mit Hilfe von Antikörperstudien bestätigt (BAI et al. 2007).

In Abbildung 3 wird der Aufbau des hNaDC3 in allen Einzelheiten dargestellt.

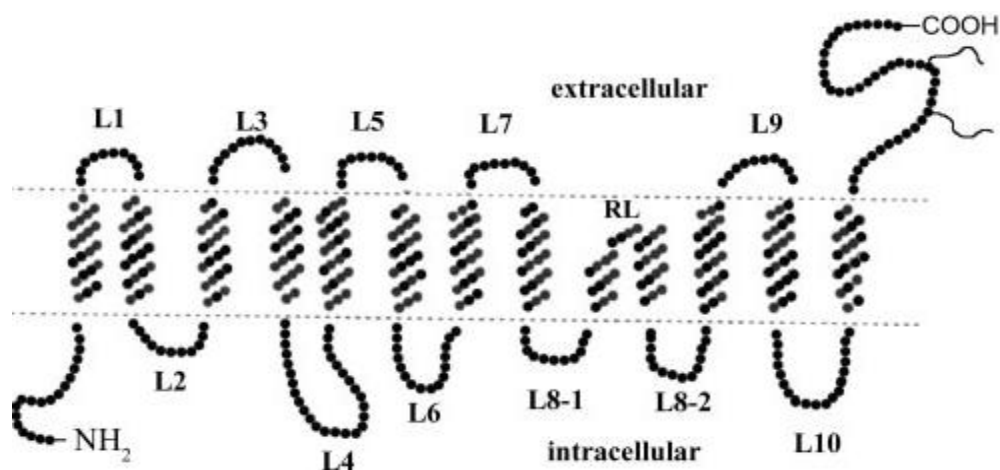


Abb. 3: Strukturmodell des NaDC3-Proteins (aus: BAI et al. 2007, S. 2415). Der NaDC3 besteht aus 11 Transmembrandomänen. Der N-Terminus ist dabei intrazellulär und der C-Terminus extrazellulär gelegen. Zusätzlich konnten noch hydrophile extra- und intrazelluläre Schleifen (L-Loops) identifiziert werden. Nach dem berechneten Modell wurden Antikörper gegen bestimmte Schleifenabschnitte generiert, die dann auch das berechnete Modell bestätigten. Zwischen den Transmembrandomänen 8 und 9 befindet sich ein sogenannter „re-entrant loop“, d.h. ein Bereich hydrophober Aminosäuren, der aber nicht die gesamte Membrandoppelschicht durchdringt.

1.2.3 Biochemische Strukturen und Charakterisierung verwendeter Substanzen des hNaDC3-Transporters

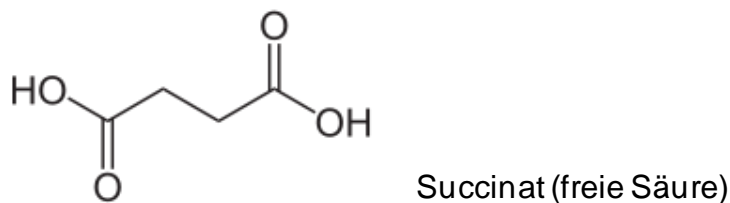


Abb. 4: Strukturformel von Succinat

Succinat wird als prototypisches Substrat des hNaDC3 in experimentellen Untersuchungen eingesetzt, da es chemisch stabil ist und für Untersuchungen auch radioaktiv markiert vorliegt. Das physiologische Substrat für den hNaDC3 scheint allerdings α -Ketoglutarat zu sein.

Der K_m -Wert (Michaelis-Menten-Konstante) für Succinat wurde für den hNaDC3 zu 20-25 μM bestimmt (KEKUDA et al. 1999). Succinat besteht aus einem Kohlenstoffgrundgerüst von 4 C-Atomen und 2 endständigen Carboxylgruppen.

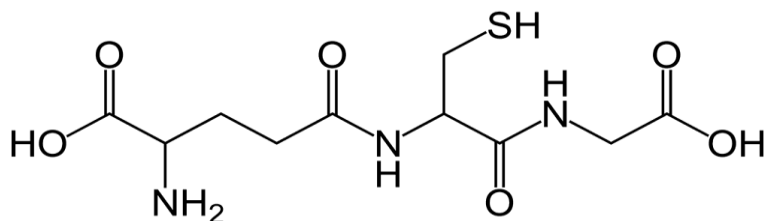


Abb. 5: Strukturformel von Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid, welches sich aus den drei Aminosäuren (Glutamat, Cystein und Glycin) zusammensetzt. Das Glutathion wird extraribosomal unter Verbrauch von zwei ATP und Wasserabspaltung synthetisiert. Glutathion besteht aus einem Kohlenstoffgrundgerüst von 10 C-Atomen mit zwei endständigen

Carboxylgruppen. GSH kommt in fast allen Zellen in millimolaren Konzentrationen vor. Ihm werden viele physiologische Funktionen zugeschrieben. Es nimmt als essentieller Cofaktor an enzymatischen Reaktionen teil, stellt ein Reservoir für Cystein dar, reduziert Peroxide und andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und ist für die Detoxifikation, beispielsweise von Quecksilber- und anderen Schwermetallen oder Trichlorethylen, zuständig (LASH & PUTT 1999; LASH et al. 2001; LASH 2005). Zusätzlich reguliert intrazelluläres GSH die Aktivität einiger Transporter (LEE et al. 2001; LI et al. 2000).

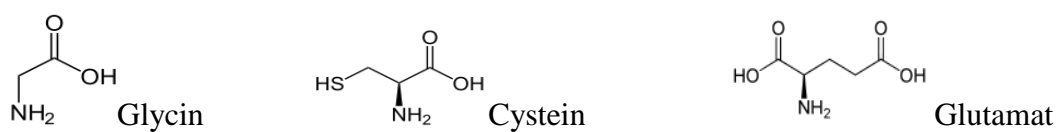


Abb. 6: Strukturformeln von Glycin, Cystein und Glutamat

Da GSH aus den Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutamat synthetisiert wird, sollen diese Aminosäuren mit in die Untersuchungen aufgenommen werden.

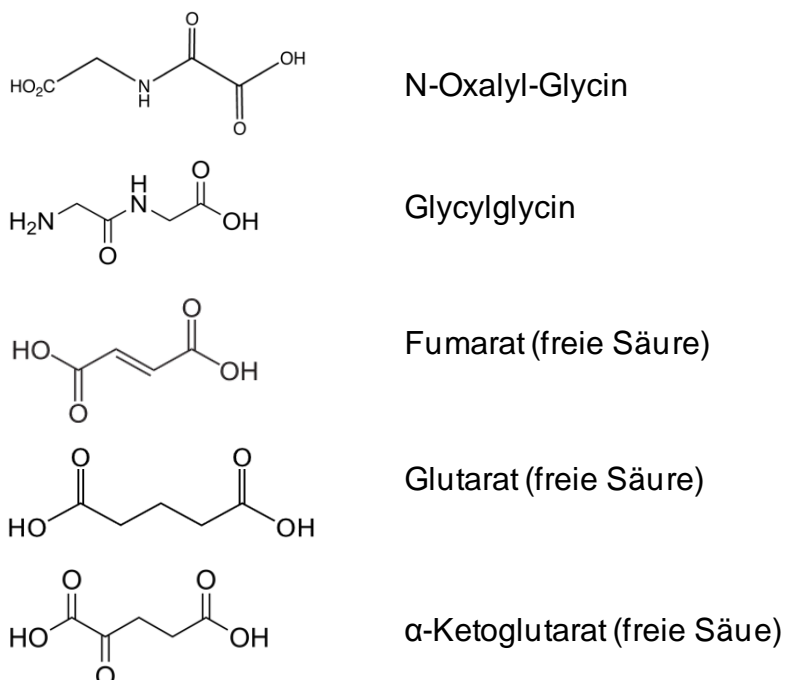


Abb. 7: Strukturformeln von N-Oxalyl-Glycin, Glycylglycin, Fumarat, Glutarat und α -Ketoglutarat

N-Oxalyl-Glycin besteht aus einem Kohlenstoffgrundgerüst von 4 C-Atomen und zwei endständigen Carboxylgruppen. Es gehört somit in die Gruppe der Dicarboxylate. N-Oxalyl-Glycin ist ein Inhibitor der Prolylhydroxylase-Domäne (PHD) und kann somit, wie in 1.3 beschrieben, den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) regulieren (MOLE et al. 2003). Glycylglycin ist ein kleines Peptid, das auch zur Synthese von GSH herangezogen werden kann. Da es eine dem N-Oxalyl-Glycin ähnliche Struktur aufweist, wurde es mit in die Testreihen aufgenommen, obwohl es kein Dicarboxylat darstellt. Das Dicarboxylat Fumarat verfügt über ein Kohlenstoffgrundgerüst von 4 C-Atomen mit 2 endständigen Carboxylgruppen. Das Substrat übernimmt genau wie das Succinat als Zwischenprodukt im Citratzyklus eine wichtige Rolle. Es ist ein physiologischer PHD-Inhibitor. Glutarat und α -Ketoglutarat sollen als Strukturanaloga mit in die Untersuchungen aufgenommen werden.

1.3 Hypoxie-induzierter Faktor (HIF) und das von-Hippel-Lindau-Syndrom

HIF ist ein Transkriptionsfaktor, der die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff gewährleistet. Er stellt das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffversorgung her. Seine Zusammensetzung erfolgt durch eine labile α -Untereinheit und eine konstitutiv exprimierte β -Untereinheit. Die α -Untereinheit lässt sich in drei Isoformen (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) gliedern. Eine normale Sauerstoffversorgung bedingt eine Hydroxylierung an einer von zwei spezifischen Prolyl-Resten der α -Untereinheit. Damit wird das HIF- α für den Ubiquitin-Ligase-Komplex vom Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Protein (pVHL) gekennzeichnet und abgebaut (RATCLIFFE 2007, 2006; BERCHNER-PFANNSCHMIDT et al. 2008). Eine Hypoxie (mangelhafte Sauerstoffversorgung) hemmt dagegen die Hydroxylierung von HIF- α . Dieses hat die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors zur Folge. Dabei wird eine Reihe von Genen, z.B. das Erythropoetin-Gen, aktiviert und die Anpassung der Zelle an die Sauerstoffunterversorgung erfolgt.

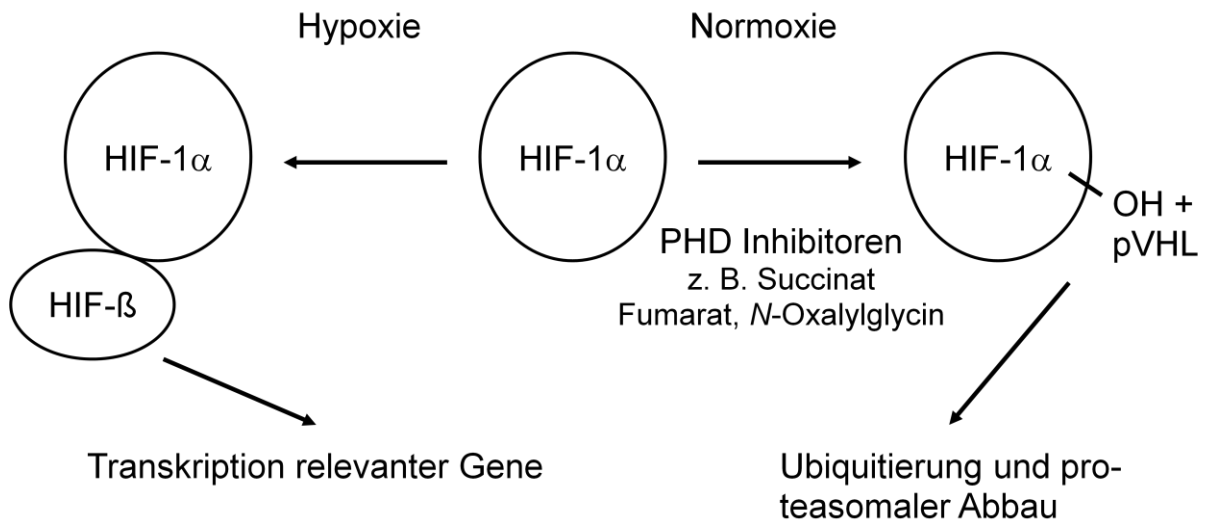


Abb. 8: Darstellung der Stabilisierung und Destabilisierung von HIF- α unter Normoxie und Hypoxie. Die PHD-Inhibitoren verhindern die Hydroxylierung der Prolyl-Reste.

1.4 Zielsetzung

Der hNaDC3 ist in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert. Seine primäre Aufgabe liegt in seinem Zusammenspiel mit den an der Fremdstoffausscheidung beteiligten OATs. Der NaDC3 stellt das für den Austausch notwendige Dicarboxylat bereit. Es rücken jedoch auch Überlegungen in den Fokus des Interesses, ob nicht nur Dicarboxylate mit einem Kohlenstoffgrundgerüst von 4-5 Kohlenstoffatomen und zwei endständigen Carboxylgruppen, wie sie Succinat, Fumarat, Glutarat und α -Ketoglutarat darstellen, sondern auch Substanzen mit einer Dicarboxylat-ähnlichen Struktur, wie Glutathion und Oxalyglycin, Substrate des NaDC3 sein könnten. Der Anlass dieser experimentellen Arbeit war es, detailliertere Informationen zum Transport von GSH und von PHD-Inhibitoren (N-Oxalyglycin und Fumarat) über den NaDC3 zu erhalten. PHD-Inhibitoren verhindern die Hydroxylierung der Prolyl-Reste der α -Untereinheit vom Transkriptionsfaktor. Dieser gewährleistet die Sauerstoffversorgung der Zelle. In der vorliegenden Arbeit wurde die Translokation dieser Substanzen an hNaDC3-exprimierenden Oozyten aus dem südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen

Die Oozyten-Ringer-Lösung (ORi) besteht nur aus vier, in Aqua dest. gelösten Komponenten: NaCl, KCl, CaCl₂ und HEPES. Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden die Oozyten in ORi inkubiert. Die Zusammensetzung des ORi und die Konzentrationen seiner Komponenten ist aus Tabelle 1 ersichtlich. Zur Gewinnung der einzelnen Oozyten muss das Ovarläppchen in calciumfreiem ORi inkubiert werden. Dieser calciumfreie ORi unterscheidet sich von dem anderen ORi nur dadurch, dass CaCl₂ nicht eingewogen wurde.

Bis zur Expression des hNaDC3 und zu den eigentlichen Messungen wurden die Oozyten in einer „Nährlösung“ aufbewahrt. Die bestand aus ORi, der zusätzlich noch 2,5 mM Natriumpyruvat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 50 µM Gentamycin (Applichem, Darmstadt, Deutschland), pH 7,5 beigemischt waren. Natriumpyruvat ist ein Substrat, um den Stoffwechsel der Oozyten aufrecht zu erhalten, Gentamycin verhindert den Bakterienbesatz.

Substanz	Molekulargewicht	Konzentration	Bezugsfirma
CaCl ₂	147,02 g/mol	2 mM	Merck VWR International, Darmstadt, Deutschland
HEPES	238,30 g/mol	5 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
KCl	74,56 g/mol	3 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	58,44 g/mol	110 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 1: Zusammensetzung der Oozyten-Ringer-Lösung (ORi). HEPES steht für N(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'(2-Äthansulfonsäure). ORi wird durch die Titration mit Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris, Merck VWR International) bei Raumtemperatur auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Für die Testreihen wurden der ORi unterschiedliche Substanzen zugesetzt (Tabelle 2), von denen angenommen wurde, dass sie mit dem hNaDC3 interagieren. Da der hNaDC3 streng natriumabhängig ist, mussten auch Messungen unter natriumfreien Bedingungen durchgeführt werden, wobei das Natrium durch N-Methyl-D-Glucamin

(NMDG, Fluka-Biochemica, Buchs, Schweiz) ersetzt wurde. Der pH-Wert wird mit 2 N HCl (Carl Roth GmbH) auf pH 7,5 eingestellt, sodass NMDG-Chlorid entsteht. Die Konzentrationen von KCl, CaCl₂ und HEPES bleiben unverändert.

Substanz	Molekulargewicht	Bezugsfirma
Fumarat	116,1 g/mol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glutamat	147,1 g/mol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glycin	75,07 g/mol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glycylglycin	132,12 g/mol	Merck VWR International, Darmstadt, Deutschland
GSH	307,33 g/mol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
L-Cystein	121,2 g/mol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
N-Oxalyl-Glycin	147,09 g/mol	Geschenk des Dept. Innere Medizin IV, Universität Erlangen-Nürnberg, Deutschland
Succinat	162,0 g/mol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Tabelle 2: Substanzen, deren Interaktion mit dem hNaDC3 untersucht wurde. Die einzelnen Substanzen wurden in einer Konzentration von 1 mM dem ORi beigesetzt. Danach wurde der pH-Wert der Testlösungen auf pH 7,5 eingestellt. Succinat, Fumarat, Glutamat lagen als Natriumsalze vor. GSH steht für reduziertes Glutathion.

2.2 Geräte

Gerätebezeichnung	Typen- bezeichnung	Firma/Bezugsquelle
Arbeitstisch		Anfertigung der Institutswerkstatt
Chlorierte Silberdrahtelektroden		Schütt Laborbedarf, Göttingen, Deutschland u. Eigenfabrikation
Elektrodenhalter (Spannung)	ESW-F15V, ESP-F15V	Warner Instruments Corp., Hamden, USA
Elektrodenhalter (Strom)	E45W	Warner Instruments Corp., Hamden, USA
Faraday-Käfig		Anfertigung der Institutswerkstatt
Glaskapillaren zur Herstellung der Mikroelektroden	Borosilikatglas mit Filament	BioMedical Instruments, Zöllnitz, Deutschland
Glasmaterialien	Duran	Schott, Mainz, Deutschland
Mikro-Injektionspumpe (Injektion der Oozyten mit cRNA)	Ultramicro Pump II	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Kaltlichtlampen	KL 1500 electronic	Schott, Mainz, Deutschland
Kapillarschlingenziehgerät	PE-2	Narishige, Tokio, Japan
Mikromanipulatoren	Modell M	Zeiss, Wetzlar, Deutschland
Oozyteninkubator		Liebherr, Umbau auf 16-18°C durch die Institutswerkstatt
Perfusionskammer		Anfertigung aus Plexiglas durch die Institutswerkstatt
Polyäthylenschläuche		Schütt Laborbedarf, Göttingen, Deutschland
Stereomikroskop		Wild, Heerbrugg, Schweiz
stumpfe Pasteurpipetten		Eigenherstellung
Verstärker (Potentialklemme/Stromapplikation)	OC 725 A	Warner Instruments Corp., Hamden, USA
Zwei-Kanal-Flachbettschreiber	BD 112	Kipp & Zonen, Delft, Niederlande

Tabelle 3: Aufzählung benötigter Geräte

2.3 *Xenopus-laevis*-Oozyten

Die Krallenfrösche werden von Nasco, Fort Atkinson, Wisconsin, USA bezogen. Für die Entnahme der Oozyten bzw. die Entnahme eines Ovarläppches mit Oozyten liegt für die Abt. Vegetative Physiologie und Pathophysiologie eine Genehmigung nach §9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes vor. Eine geschulte Mitarbeiterin des Institutes führte den Eingriff ordnungsgemäß durch. Ich erhielt nur das Ovarläppchen zur Weiterverwendung.

Um einen schmerzfreien abdominalen Schnitt von 1-2 cm zu setzen, wird das Froschweibchen anästhesiert. Dafür wird es in Eiswasser gelegt, dem 0,3% 3-Aminobenzoesäure-Ethylester (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben sind. Nach Durchtrennen der Haut- und der Muskelschicht wird mit einer Sonde das Ovar mobilisiert und ein Ovarläppchen aus dem Schnitt herausgezogen und mit einer Schere abgetrennt. Nach der Entnahme wird der Schnitt mit einer separaten Muskel- und Hautnaht verschlossen. Das Froschweibchen wird bis zum vollständigen Wiederkehren seiner Reflexe nur feucht gehalten und anschließend separat in ein Aquarium gesetzt, bis der Schnitt verheilt ist. Nachdem der Heilungsprozess abgeschlossen ist, kann das Froschweibchen wieder zu den anderen Tieren ins Becken gesetzt werden.



Abb. 9: Ausgewachsenes *Xenopus-laevis*-Weibchen auf einem Eisbett liegend.

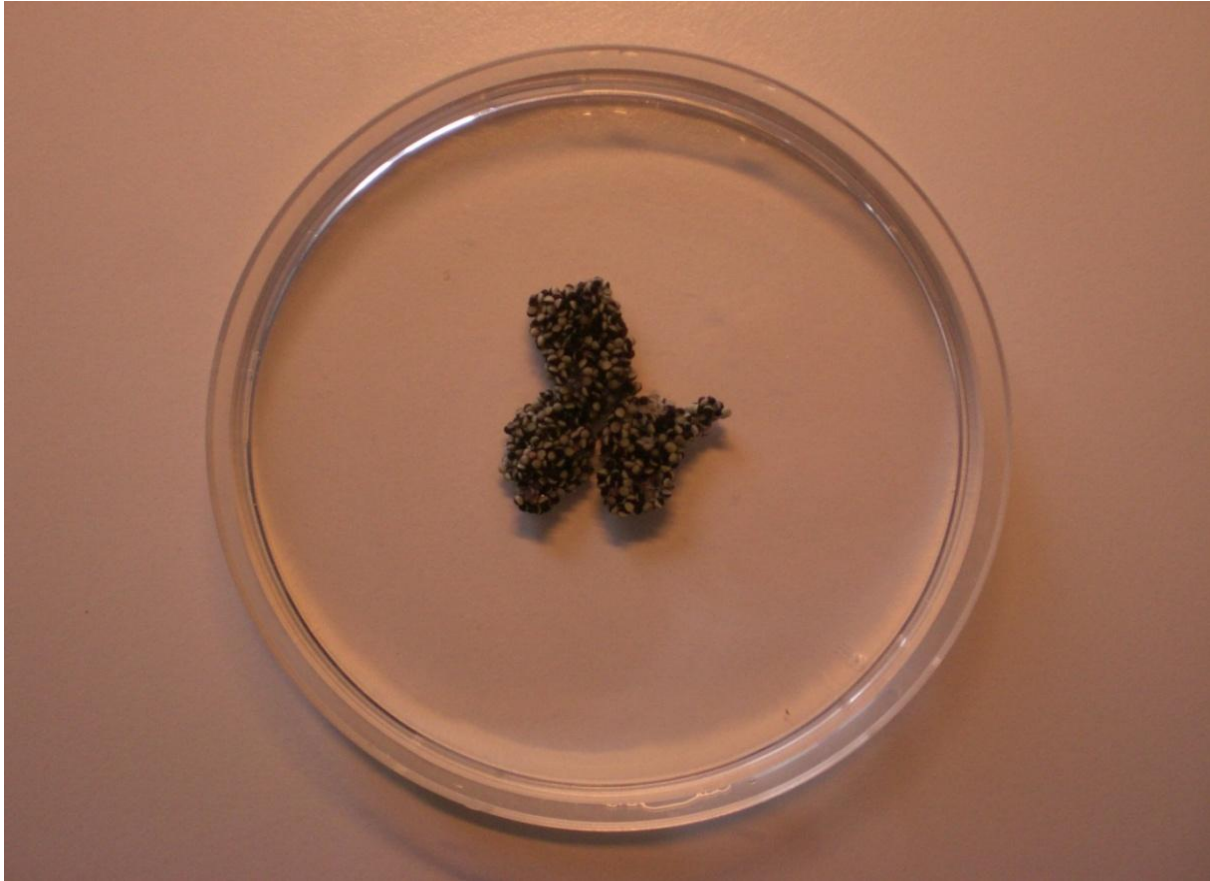


Abb. 10: Entnommene Ovarläppchen in einer Oozyten-Ringer-Lösung schwimmend.

Die entnommenen Ovarläppchen werden mit Pinzetten leicht zerpfückt und anschließend über Nacht in einem Becherglass mit ORi, dem Kollagenase (Typ CLS II, Biochrom, Berlin, Deutschland) zugegeben ist, im Oozyteninkubator bei einer Temperatur von 16-18°C aufbewahrt. Durch die Zugabe der Kollagenase werden bindegewebige Strukturen angedaut. Am darauffolgenden Tag werden die Oozyten für zehn Minuten in einer Calcium-freien ORi-Lösung inkubiert. Diese Behandlung verstärkt noch einmal das Auflösen bindegewebiger Strukturen zwischen den einzelnen Oozyten. Anschließend erfolgt eine mehrmalige Waschung mit ORi, um das Calciumchlorid, Follikelreste und Reste von Bindegewebe zu eliminieren. Die nun als Einzelzellen vorliegenden Oozyten werden unter einem Stereomikroskop nach ihrer Größe bzw. nach ihrem Stadium selektioniert. Ausgewählt für die Mikroinjektion werden nur Oozyten, die sich in den Stadien V und VI nach Dumont (WAGNER et al. 2000, STEFFGEN et al. 1999) befinden und eine klare Trennung von animalischem und vegetativem Pol aufweisen.

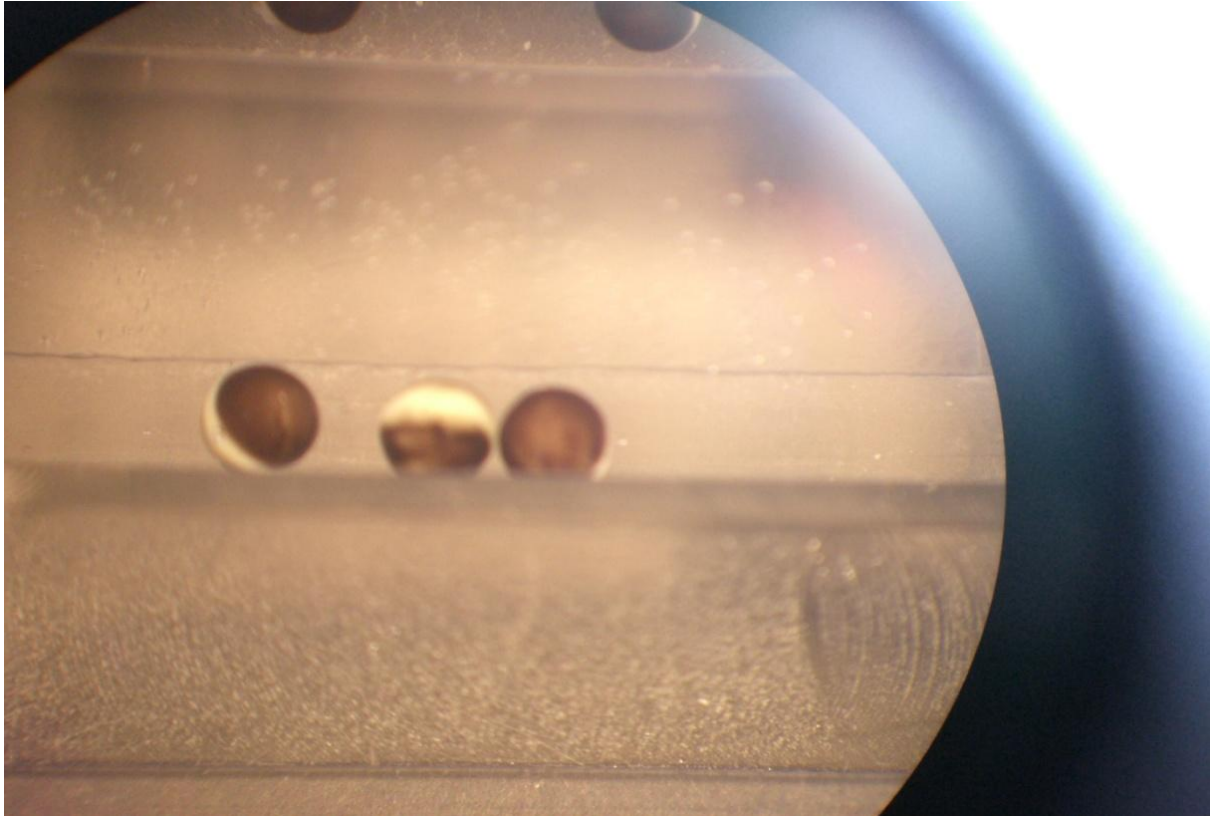


Abb. 11: Oozyten des Stadiums V und VI nach Dumont (WAGNER et al. 2000) mit deutlich voneinander abgegrenzten animalischen, dunklen und vegetativen, hellen Polen

2.4 Oozytenaufbewahrung und Oozyteninjektion

Nach der Synthese der cRNA durch eine Mitarbeiterin des Institutes wird die cRNA bei -80°C in einem Gefrierschrank aufbewahrt. Um mit der cRNA arbeiten zu können, muss sie aufgetaut werden. Außerdem muss mit autoklavierten Spitzen gearbeitet werden, um eine Kontamination der cRNA durch RNasen und damit einen Abbau der cRNA zu verhindern. Über eine Mikroinjektionspumpe werden 23 nl der cRNA bzw. eine äquivalente Menge an Wasser in die Oozyten injiziert. Die für den hNaDC3-codierende cRNA liegt in einer Konzentration von $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vor, sodass letztendlich 23 ng an cRNA injiziert werden. Das Injizieren von Wasser in andere Oozyten ist ein wichtiger Kontrollversuch, um ausschließen zu können, dass die zu untersuchenden Substanzen von bereits in der Oozyte vorliegenden endogenen Transportmechanismen transportiert werden.

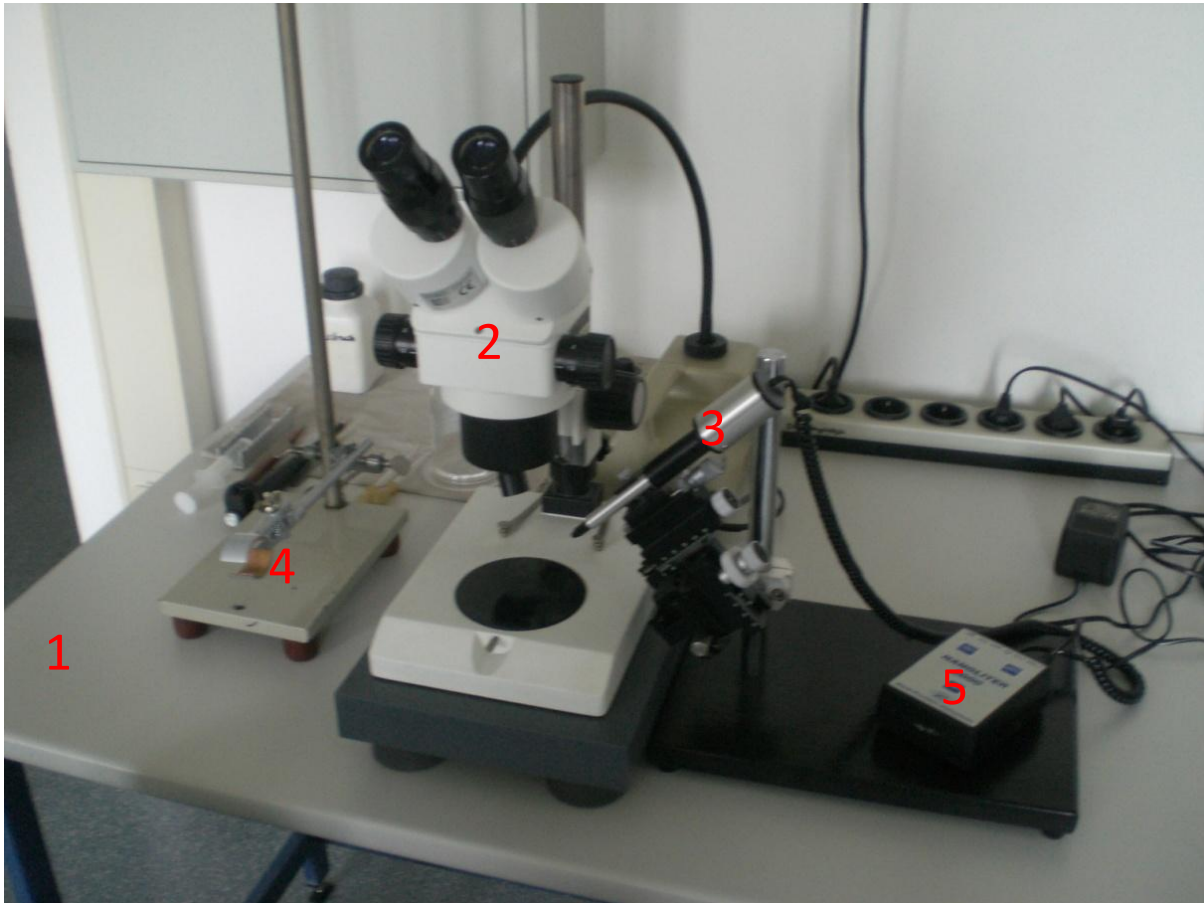


Abb. 12: Arbeitstisch (1) zum Injizieren der cRNA. Rechts vom Stereomikroskop (2) ist der Mikro-manipulator(3) zu sehen. Auf das links vom Stereomikroskop stehende Stativ (4) wird die Pipette mit der cRNA befestigt, aus der die Injektionspumpe (5) dann die cRNA aufnehmen kann.

Die Injektion der cRNA wird mit Sodaklarglaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) durchgeführt. Diese werden mit einem Kapillarziehgerät (Puller) gezogen und staubfrei aufbewahrt. Als erstes wird die Glasspitze unter dem Mikroskop auf einen Durchmesser von 5–7 μm gekappt. Danach wird RNase-freies Paraffinöl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit einem Mikromanipulator in die Kapillare aufgezogen, um sie gegen Luft abzudichten. Nun folgt das Aufziehen von 1–2 μl cRNA. Die Oozyten, welche in einer rillenförmigen Injektionsschale platziert werden und somit während des Injektionsvorganges an der Wand derselben fixiert sind, werden dann mit der Kapillare genau zwischen animalischem und vegetativem Pol angestoßen. Damit wird eine Verletzung des Zellkerns der Oozyte verhindert. Nach Abschluss der Injektion werden die Oozyten in einer 24-Lochplatte für zwei bis vier Tage in einem Inkubator bei 16-18 $^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Jede einzelne Vertiefung der Platte ist mit 2 ml Nährlösung gefüllt. Diese Nährlösung setzt sich aus ORi, 2,5 mM

Natriumpyruvat, als Nährstoff, und 50 μM Gentamycin zur Verhinderung von Bakterienbesiedlung zusammen. Während der Inkubationszeit wird täglich die Nährlösung gewechselt und abgestorbene Oozyten, erkenntlich an nicht mehr abgegrenzten animalischen und vegetativen Polen, entfernt. Mit den Messungen kann nach frühestens zwei Tagen begonnen werden, da dann erst genügend hNaDC3-Protein in die Membran der Oozyten eingebaut ist.



Abb. 13: Aufbewahrung der injizierten Oozyten in einer mit der Nährlösung gefüllten 24-Lochplatte.

2.5 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Two Electrode Voltage Clamp; TEVC)

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) ist eine elektrophysiologische Methode, die den Stromfluss durch Ionenkanäle und elektrogene Membrantransportproteine messen kann. Dabei entstehen Potenzialänderungen, die durch Einspeisung eines Kompensationsstromes ausgeglichen werden, so dass das Membranpotenzial bzw. das Potenzial, auf das die Oozyte geklemmt ist, auf einem konstanten Wert gehalten werden kann.

Bei der TEVC misst ein Rückkopplungsverstärker ständig das Membranpotential, vergleicht es mit dem Sollwert und korrigiert ihn über eine Stromapplikation. Ein Zweikanalschreiber zeichnet das Potenzial und den eingespeisten Strom

kontinuierlich auf. TEVC kann in zwei Modi unterschieden werden. In dem Current-Clamp-Modus werden die Potenzialänderungen gemessen. Im Voltage-Clamp-Modus werden hingegen die induzierten Ströme erfasst.

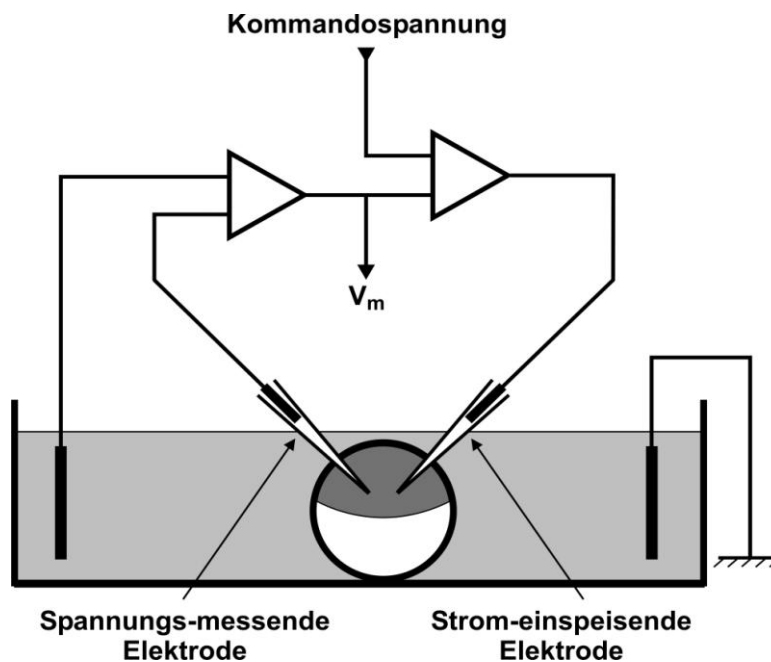


Abb. 14: Schaltbild eines Zwei-Elektroden-Spannungsklemmstromkreises. Die Oozyte ist in der Mitte des Bades dargestellt. Zwei Elektroden, die spannungsmessende und die strominjizierende, sind in die Oozyten eingestochen. Rechts und links der Oozyte sind die Bad- bzw. Erdungselektroden eingezeichnet.

Für die Durchführung der Experimente des TEVC müssen die Elektroden für jeden Versuchstag hergestellt werden. Diese werden aus Borosilicatglaskapillaren mit Filament in einem Kapillarschlingenziehgerät (Puller) hergestellt. Es entstehen durch das Ziehen zwei konisch zusammenlaufende Glasmikroelektroden. Diese Glasmikroelektroden werden mit einer Spritze, welche 3 M Kaliumchlorid-Lösung enthält, blasenfrei gefüllt. Luftblasen könnten eine Störung zwischen Elektrode und Oozyte hervorrufen und müssen durch Klopfen entfernt werden. Für das Experiment werden die Glasmikroelektroden behutsam über die Silberdrahtelektrode geführt, die in einem Elektrodenhalter steckt.



Abb. 15: Kapillarschlingenziehgerät (Puller) zum Ziehen der Mikrokapillaren und der Injektionskapillaren. In der Mitte des Gerätes sitzt eine Heizspirale, welche die Kapillaren erhitzt. Durch Anlegen eines Magnetfelds wird die erhitzte Kapillare auseinander gezogen, sodass zwei an der Spitze konisch zusammenlaufende Glaskapillaren entstehen.

Die eigentliche Messapparatur steht auf einer stoßgedämpften Tischplatte (Eigenbau der Institutswerkstatt) und ist zusätzlich von einem Faraday-Käfig umgeben, der gegen elektrische Einstrahlungen isoliert. In der Mitte der Messapparatur befindet sich ein Stereomikroskop (Wild, Heerbrugg, Schweiz) mit einer darunter aufgebauten Perfusionskammer. Diese ist aus einem Plexiglasstück von 1,5 cm Dicke und einem Durchmesser von 6 cm gefräst. Die eigentliche Kammer wird durch einen schmalen Steg in zwei Bereiche geteilt. Die linke, größere Kammer hat eine trichterartige Form. Die andere Kammer ist länglich geformt. Direkt neben den zwei Bereichen der Perfusionskammer befindet sich ein mit 3 M KCl-Lösung gefülltes Gefäß. Durch eine KCl-Agarbrücke wird es mit der Perfusionskammer verbunden. Zusätzlich ragen zwei chlorierte Silberdrahtelektroden, die als Erdung und Referenzpunkt dienen, in die KCl-Lösung. Die Kontroll- bzw. Testlösungen, welche sich in Perfusionskolben hängend am Dach des Faraday-Käfigs befinden, fließen in die rechte, kleinere Kammer über zwei dünne Polyethylenschläuche ein. Der Flüssigkeitsaustausch kann nun ungehindert über den niedrigen Steg stattfinden und über eine Bohrung in der

linken Kammer in einen Sammelbehälter unter der Tischplatte ablaufen. Die Oozyte wird mit einer Pasteurpipette direkt in den linken Bereich der Perfusionskammer eingebracht. Dort wird sie mit der spannungsmessenden Mikroelektrode angestochen. Während dieses Vorganges kann die Oozyte nicht entweichen, da der Steg als Barriere dient. Mit Hilfe des Manipulators wird unter mikroskopischer Sicht die Oozyte über den Steg in den anderen Bereich gehoben und platziert. Dort erfolgt das Anstechen mit der zweiten, der stromeinspeisenden Mikroelektrode. Der Stromkreis ist somit geschlossen.

2.6 Vorgehensweise

Als ersten Schritt wird eine Nullpunktgleichung der Elektroden durchgeführt, damit das korrekte Membranpotenzial angezeigt werden kann. Dann werden nacheinander die beiden Elektroden in die Oozyte eingestochen. Die Oozyte wird für ca. 15 Minuten mit ORi perfundiert, bis sich ein stabiles Membranpotenzial zwischen -20 bis -60 mV eingestellt hat. Nun wird das Potenzial auf -60 mV „geklemmt“. Dieses Potenzial entspricht ungefähr dem Membranpotenzial einer proximalen Nierentubuluszelle. Nach angemessener Wartezeit wird die Kontrolllösung durch einen drehbaren Hahn am Perfusionskolben abgestellt und die Testlösung mit 1 mM Succinat angestellt. Damit wird die Expression des hNaDC3 in der Oozyte kontrolliert. Da Succinat in einem elektrogenen Modus über den hNaDC3 transloziert wird, entstehen Succinat-induzierbare Einwärtsströme, welche vom Verstärker registriert und vom Schreiber aufgezeichnet werden. Lässt sich nur ein geringer oder gar kein Einwärtsstrom messen, wird die Oozyte verworfen, da sie dann nicht ausreichend den hNaDC3 exprimiert hat. Hat die Oozyte den hNaDC3 exprimiert, wird erneut für 15 Minuten mit ORi perfundiert. Hat sich der Ausgangswert des einzuspeisenden Stromes wieder eingestellt, kann mit dem Aufnehmen einer Strom-Spannungslinie (I-V-Kennlinie) begonnen werden. Alle zehn Sekunden wird das Potenzial um zehn mV verstellt. Die zehn mV-Schritte starten bei -60 mV, gehen bis -90 mV, danach zurück bis +10 mV und kehren am Ende wieder auf -60 mV zurück. Anschließend erfolgt eine I-V-Kennlinie in Anwesenheit von Succinat. Nach Beendigung dieser kann sich die Oozyte bis zum nächsten Lösungswechsel unter ORi-Perfusion erholen und sich der Ausgangswert erneut einstellen. Der substratinduzierbare Strom kann aus der Differenz der Werte mit und ohne Substrat errechnet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Succinat-abhängiger Einwärtsstrom

In den Übersichtsarbeiten von PAJOR (2000) und MARKOVICH & MURER (2004) wurde ausführlich beschrieben, dass Succinat über den hNaDC3 transportiert wird. Diese Erkenntnis führte dazu, dass Succinat in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten als prototypisches Substrat oder Kontrollsubstrat eingesetzt wurde. Die Messungen erfolgten an hNaDC3 exprimierenden Oozyten und Wasser-injizierten Oozyten über die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme sowohl im Current-Clamp-Modus als auch im Voltage-Clamp-Modus. Wasser-injizierte Oozyten werden auch als „mocks“ bezeichnet (z.B. Abb.21).

Zu den Messungen werden die beiden Mikroelektroden in die Oozyte eingestochen. Anschließend wird die Oozyte mit Oozyten-Ringer (ORi) perfundiert. Nach dem sich im Current-Clamp-Modus ein stabiles Membranpotential aufgebaut hat, wird der Oozyte durch Übergang in den Voltage-Clamp-Modus ein Membranpotential von -60 mV aufgezwungen. Dieses Potential entspricht in etwa dem frühen Abschnitt proximaler Nierentubuluszellen. Da das Membranpotential der Oozyten meist niedriger als -60 mV (DASCAL 1987; WEBER 1999) liegt, muss ein Strom eingespeist werden, um das Potential auf -60 mV zu halten. Dieser negative Haltestrom wird als Einwärtsstrom bezeichnet. Nachdem sich ein konstanter Haltestrom eingestellt hat, wird die Perfusion auf ORi, welcher zusätzlich mit 1 mM Succinat versetzt ist, umgestellt. Es fließen jetzt drei Natrium-Ionen zusammen mit einem divalenten Succinat in die Oozyte hinein. Dies führt zu einer Depolarisation. Damit das Potential auf -60 mV gehalten werden kann, muss ein zusätzlicher Einwärtsstrom eingespeist werden. Dieser Succinat-induzierte Einwärtsstrom kann nur bei hNaDC3-exprimierenden Oozyten gemessen werden. Er beträgt im Durchschnitt $-15,2 \text{ nA} \pm 2 \text{ nA}$. Bei Wasser-injizierten Oozyten kann hingegen kein Succinat-abhängiger Einwärtsstrom beobachtet werden, sondern ein Auswärtsstrom von $4,0 \pm 0,5 \text{ nA}$. Durch Umschalten der Perfusion auf ORi wird das Succinat herausgewaschen. Der Succinat-induzierbare Einwärtsstrom geht zurück und es muss nur der Strom eingespeist werden, der das Potential unter Kontrollbedingungen (in Abwesenheit von Succinat) auf -60 mV hält. Idealerweise entspricht dieser Haltestrom demjenigen, der vor der Perfusion mit Succinat detektiert wurde. Nach ca. 10 Minuten ist der Ausgangswert wieder erreicht und ein weiteres mögliches Substrat kann getestet werden.

3.1.1 Strom-Spannungskennlinien Succinat-induzierter Ströme

In Abbildung 16 werden die Strom-Spannungs (I-V)-Kennlinien hNaDC3-exprimierender Oozyten aufgezeigt. Den Oozyten wird durch Injektion von Strom als erstes ein Membranpotential von -60 mV aufgezwungen. Schrittweise erfolgt eine Hyperpolarisation bis -90 mV, dem anschließend eine Depolarisation bis 0 mV folgt. Der kontinuierliche Wechsel des Membranpotentials erfolgt stufenweise in 10 mV Schritten unter ständiger Perfusion von ORi. Der jeweils einzuspeisende Haltestrom wird bei jeder Änderung des Membranpotentials erfasst und registriert. Bei einer Klemmspannung von -90 mV wird ein Strom von $-58,5 \pm 14,8$ nA und bei einer Klemmspannung von 0 mV von $-71,6 \pm 13,7$ nA (Abb. 16, offene Kreise) registriert. Nach diesen Messungen erfolgt die Umschaltung auf ORi, dem 1 mM Succinat beigegeben ist. Das Klemmpotential wird wieder zwischen -90 mV und 0 mV variiert und die entsprechenden Halteströme werden bei den einzelnen Klemmpotentialen registriert. Bei einer angelegten Klemmspannung von -90 mV ergibt sich ein einzuspeisender Strom von $-80,2 \pm 15,7$ nA und bei 0 mV von $64,9 \pm 12,7$ nA (Abb. 16, geschlossene Kreise).

In Ab- und Anwesenheit von Succinat und in einem Potentialbereich zwischen -90 mV und 0 mV ergeben sich annähernd lineare I-V-Kennlinien, bei denen die Kennlinien in Anwesenheit von Succinat zu positiveren Potentialen verschoben sind.

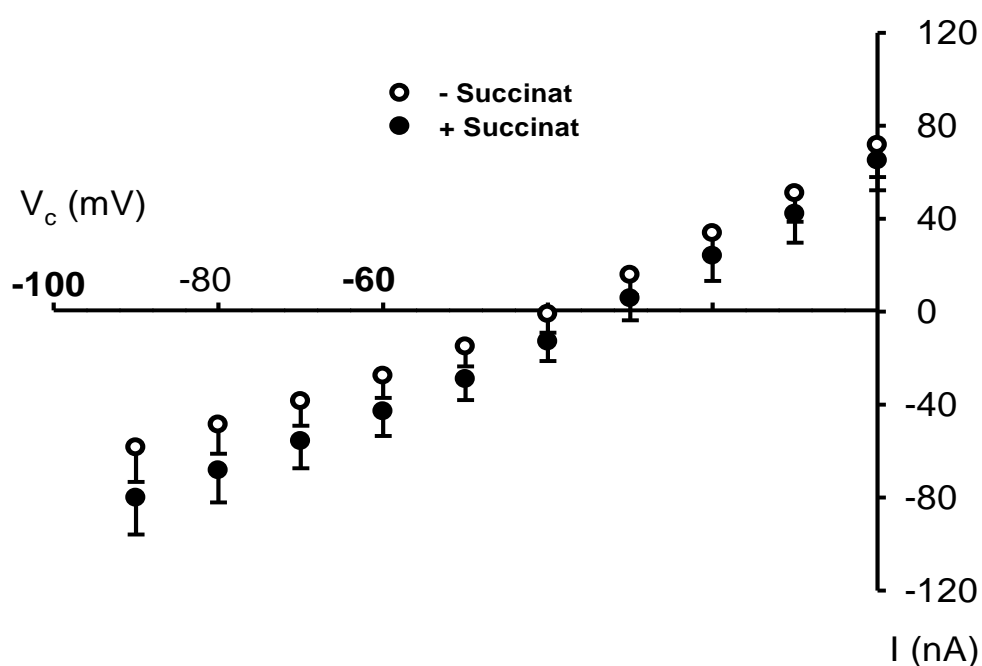


Abb. 16: I-V-Kennlinien hNaDC3-exprimierender Oozyten, welche mit ORi in Abwesenheit (offene Kreise) und Anwesenheit von 1 mM Succinat (geschlossene Kreise) perfundiert werden; Mittelwerte aus Messungen an 11 Oozyten von 6 verschiedenen Donoren.

3.1.2 Leitfähigkeit hNaDC3-exprimierender Oozyten

Abbildung 17 zeigt die Leitfähigkeit an einem Kollektiv von 11 hNaDC3-exprimierenden Oozyten von 6 verschiedenen Spendertieren in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Succinat. Bei einer Perfusion unter ORi ergibt sich eine Leitfähigkeit von $0,45 \pm 0,15 \mu\text{S}$. Nach Zusatz von 1 mM Succinat erhöht sich die Leitfähigkeit auf $0,7 \pm 0,17 \mu\text{S}$. Demnach ergibt sich eine Differenz, d.h. ein Anstieg der Leitfähigkeit, von $0,25 \pm 0,04 \mu\text{S}$.

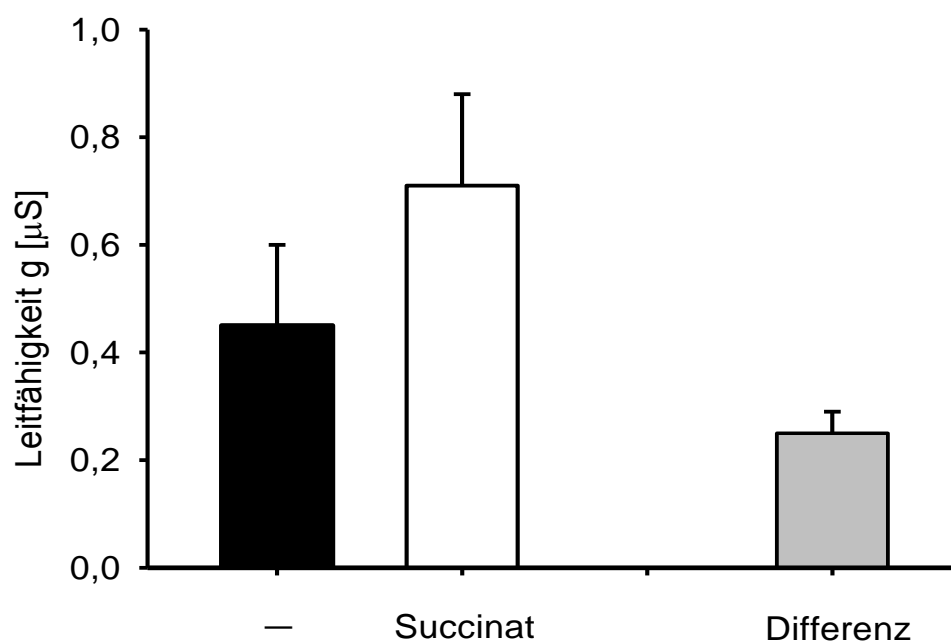


Abb. 17: Leitfähigkeit hNaDC3-exprimierender Oozyten in Ab- und Anwesenheit von Succinat (1 mM); gleiches Kollektiv an Oozyten wie in Abb. 16.

In Abbildung 18 wird erneut die Leitfähigkeit von 11 hNaDC3-exprimierenden Oozyten von 6 verschiedenen Spendertieren in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Succinat aufgezeigt. Es handelt sich hierbei um das gleiche Kollektiv an Oozyten wie in Abbildung 17. Im Gegensatz zu Abbildung 17 werden hier allerdings die Einzelmessungen aufgetragen, um die Erhöhung der Leitfähigkeit unter Zugabe von 1 mM Succinat deutlicher darzustellen.

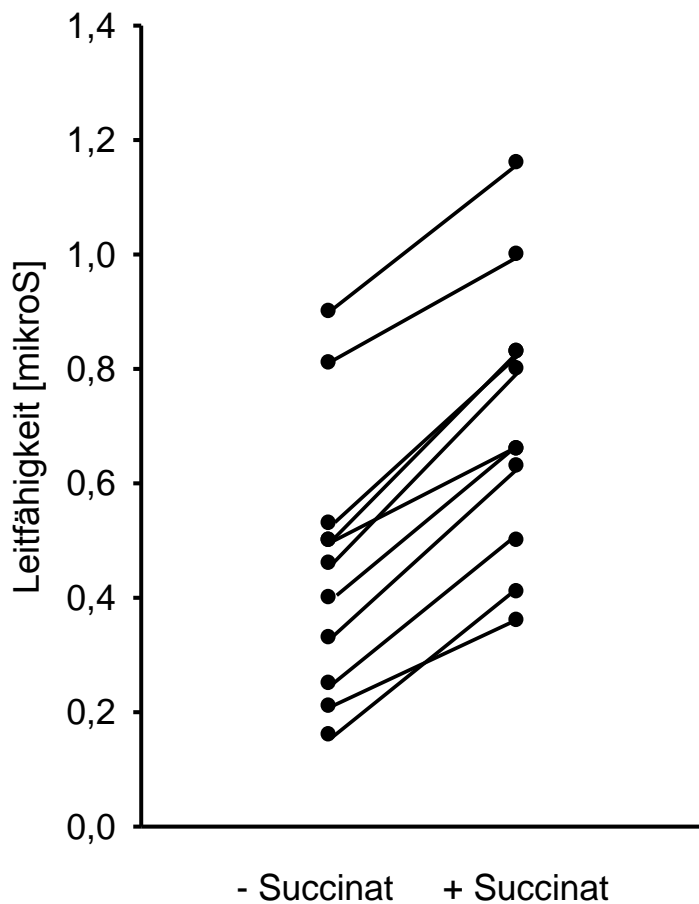


Abb. 18: Leitfähigkeit hNaDC3-exprimierender Oozyten in Ab- und Anwesenheit von Succinat (1 mM); gleiches Kollektiv an Oozyten wie in Abb. 16.

3.1.3 Depolarisation in hNaDC3-exprimierenden Oozyten unter Succinat

Abbildung 19 zeigt das gemessene Umkehrpotential an 11 hNaDC3-exprimierenden Oozyten von 6 Fröschen. Unter Perfusion mit ORi beträgt das Umkehrpotential $-39,3 \pm 5,9$ mV. Das Umkehrpotential, das gemessen wurde, wenn der ORi-Lösung zusätzlich 1 mM Succinat beigemischt wurde, beträgt $-32,4 \pm 5,2$ mV. Daraus ergibt sich eine Differenz von $6,9 \pm 2,1$ mV. Das Umkehrpotential steigt unter Zugabe von 1 mM Succinat und nähert sich damit dem Gleichgewichtspotential von Natrium (+61 mV).

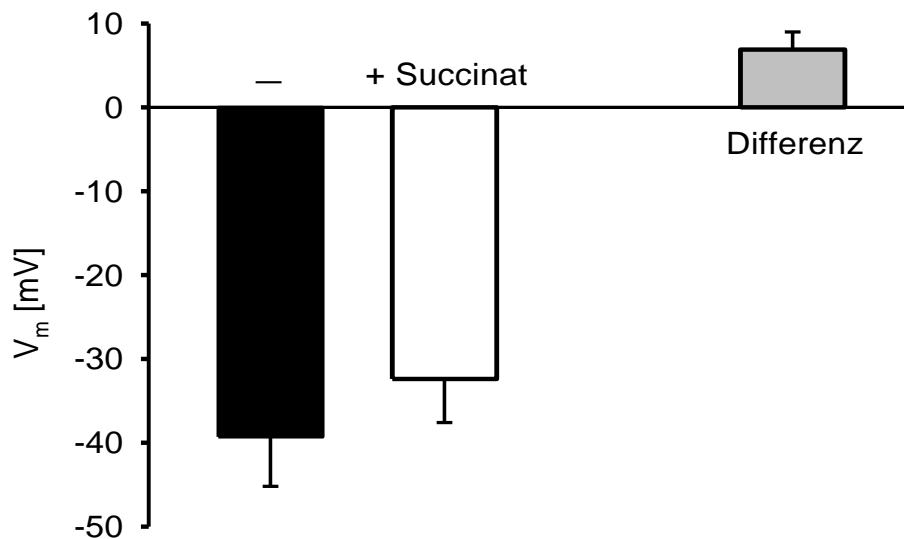


Abb. 19: Darstellung des Umkehrpotentials hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion mit ORi in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Succinat und die daraus resultierende Depolarisation (Differenz); gleiches Kollektiv wie Abb. 16.

In Abbildung 20 wird in Einzelmessungen das Umkehrpotential an 11 hNaDC3-exprimierenden Oozyten von 6 Spendertieren aufgezeigt. Hierbei wird ebenfalls das gleiche Kollektiv an Oozyten wie in Abbildung 16 verwendet. Wird der ORi-Lösung zusätzlich 1 mM Succinat beigemischt, steigt das Umkehrpotential und eine resultierende Depolarisation wird deutlich.

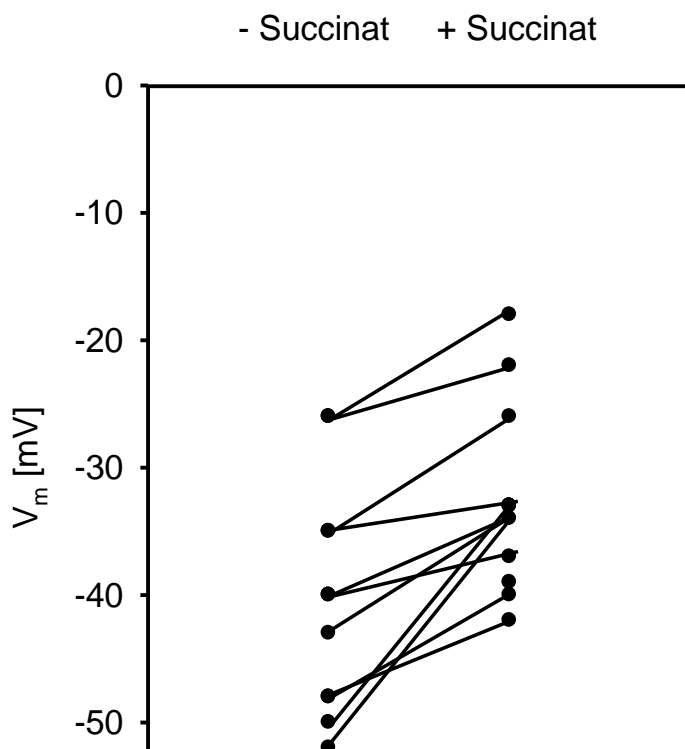


Abb. 20: Darstellung des Umkehrpotentials hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion mit ORi in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Succinat und die daraus resultierende Depolarisation (Differenz); gleiches Kollektiv wie Abb. 16.

3.1.4 Strom-Spannungskennlinien Wasser-injizierter und hNaDC3-exprimierender Oozyten

In Abbildung 21 sind die Differenzströme (Succinat-medierte Ströme) der bei den unterschiedlichen Klemmspannungen registrierten Ströme hNaDC3-exprimierender und Wasser-injizierter Oozyten (*mocks*) zusammengefasst. Die abgebildeten Differenzströme (ΔI) errechnen sich durch Subtraktion zwischen dem Strom (I) bei Perfusion mit ORi plus 1 mM Succinat und dem Strom (I) bei Perfusion mit ORi ohne Succinat. Die jeweils berechneten Ströme sind dargestellt als Funktion der angelegten Spannung (V_c). Bei hNaDC3-exprimierenden Oozyten beträgt der Strom bei einem Klemmpotential von -90 mV $-21,7 \pm 3$ nA und bei 0 mV $-6,7 \pm 5,2$ nA. Im Gegensatz dazu beträgt der Strom gemessen an *mocks* bei -90 mV $0,3 \pm 1,3$ nA und bei 0 mV $2 \pm 0,5$ nA. In Wasser-injizierte Oozyten ist ein nur sehr geringer Succinat-induzierbarer Strom nachweisbar. Zu den Berechnungen wurden die 11 Oozyten von 6 Spendertieren aus Abbildung 16 herangezogen. Die Rohwerte, aus denen ΔI berechnet wurde, sind in Abbildung 16 zu sehen. Die ΔI der *mocks* wurden aus Daten von 4 Oozyten aus 3 Donoren kalkuliert. Da die I-V-Kennlinien der Rohdaten der *mocks* in Ab- und Anwesenheit von Succinat nicht signifikant voneinander verschieden sind, wurde auf die separate Darstellung dieser Daten verzichtet.

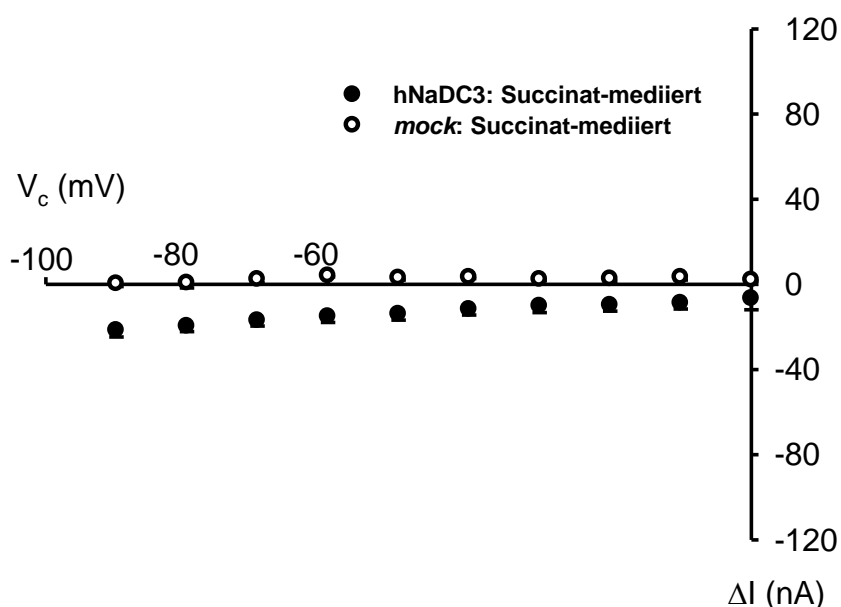


Abb. 21: Vergleich der I-V-Kennlinien der Succinat-medierten Differenzströme hNaDC3-exprimierender Oozyten bzw. Wasser-injizierter Oozyten (*mock*).

3.1.5 Vergleich von Succinat- und N-Oxalyl-Glycin-induzierten Strömen

In Abbildung 22 ist der zweite Teil der Messung dargestellt. Da den Oozyten mehrere mögliche Substrate hintereinander appliziert werden können, schließt sich an die Perfusionen mit ORI und ORI plus Succinat, wie sie in den Abbildungen 16 und 21 beschrieben wurden, eine weitere Messung unter Perfusion mit N-Oxalyl-Glycin an. Das hat den Vorteil, dass die Amplituden des Succinat-abhängigen Stromes mit der des N-Oxalyl-Glycin-abhängigen Stromes direkt miteinander verglichen werden können. Zum besseren Vergleich der beiden Substrate wurde eine andere Skalierung (max. -30 A) als in den Abbildungen 16 und 21 (max. -120 nA) gewählt. Die Daten für Succinat (geschlossene Kreise) entsprechen den geschlossenen Kreisen in Abbildung 21. Nachdem die Messungen mit Succinat abgeschlossen waren, wurde nach einer Erholungszeit von ca. 15 Minuten mit der Aufnahme von I-V-Kennlinien unter ORI in Ab- und Anwesenheit von 1mM N-Oxalyl-Glycin begonnen. Es wurde, analog wie für Succinat, der N-Oxalyl-Glycin-induzierte Strom berechnet. Dieser wird in Abbildung 22 durch die offenen Kreise symbolisiert. Unter Perfusion von 1 mM N-Oxalyl-Glycin ergibt sich bei -90 mV ein Substrat-abhängiger Strom von $-10,5 \pm 4,0$ nA und bei einem Klemmpotential von 0 mV ein Strom von $3,4 \pm 7,2$ nA. Die Differenzströme sowohl unter Perfusion von 1 mM Succinat als auch von 1 mM N-Oxalyl Glycin nehmen mit Depolarisation der Oozyten ab. Die I-V-Kennlinie unter N-Oxalyl-Glycin ist im Vergleich zur I-V-Kennlinie unter Succinat zu geringfügig positiveren Potentialen verschoben. Bei einem Klemmpotential von 0 mV und -10 mV wird unter N-Oxalyl-Glycin-Perfusion bereits ein Auswärtsstrom detektiert. Aufgrund der relativ großen Standardabweichungen kann jedoch keine Signifikanz berechnet werden. Auch scheint die I-V-Kennlinie für N-Oxalyl-Glycin nicht im gesamten untersuchten Potentialbereich linear zu verlaufen. *Mocks* induzieren weder auf Succinat noch auf N-Oxalyl-Glycin Substrat-abhängige Ströme. Diese Werte sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in Abbildung 22 mit aufgenommen.

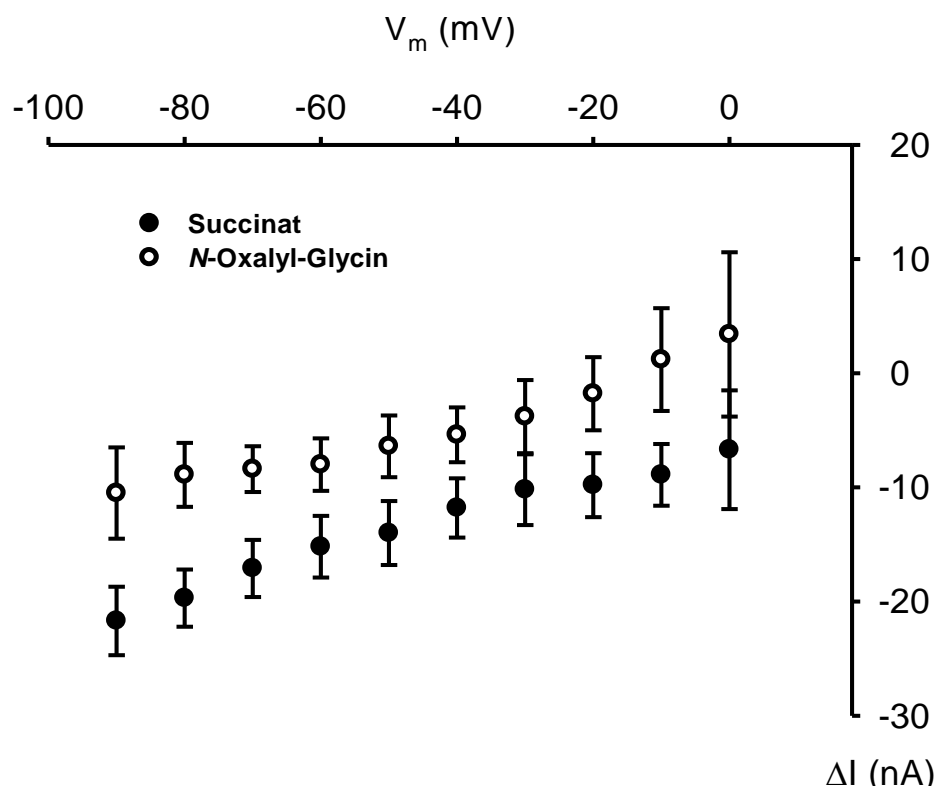


Abb. 22: Darstellung der I-V-Kennlinien der Differenzströme hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion von 1 mM Succinat und 1 mM N-Oxalyl-Glycin jeweils gelöst in ORi; Mittelwerte aus Messungen an 11 Oozyten von 6 unterschiedlichen Donoren.

3.1.6 Vergleich von Succinat- und Fumarat-induzierten Strömen an hNaDC3-exprimierten Oozyten

In Abbildung 23 wird erneut das Verhalten von hNaDC3-exprimierenden Oozyten unter Perfusion mit 1 mM Succinat dargestellt. Es dient wiederum als Kontrolle, da sich an die Messungen mit N-Oxalyl-Glycin nun, nach einer Erholungszeit von wiederum ca. 15 Minuten, Untersuchungen zur Interaktion von Fumarat mit dem hNaDC3 anschlossen. Die experimentelle Vorgehensweise ist die gleiche, wie in Abbildung 22 beschrieben. Im Gegensatz zu N-Oxalyl-Glycin induziert Fumarat (1 mM, gelöst in ORi) Differenzeinwärtsströme größerer Amplitude. In Anwesenheit von 1 mM Fumarat wird bei -90 mV ein Strom von -19 ± 5 nA und bei 0 mV ein Strom von $-9,5 \pm 6,2$ nA beobachtet. Zum Vergleich wurden bei diesen Potentialen unter Succinat Differenzströme von $-21,7 \pm 3$ nA und $-6,7 \pm 5,2$ nA gefunden. Diese Amplituden sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p > 0,5$). Sowohl der Succinat-induzierte Strom als auch der Fumarat-induzierte Strom nehmen mit Depolarisation der Oozyten ab. Fumarat induzierte in den *mocks* keine Substrat-

abhängigen Ströme. Diese Daten sind wiederum aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in die Abb. 23 aufgenommen worden.

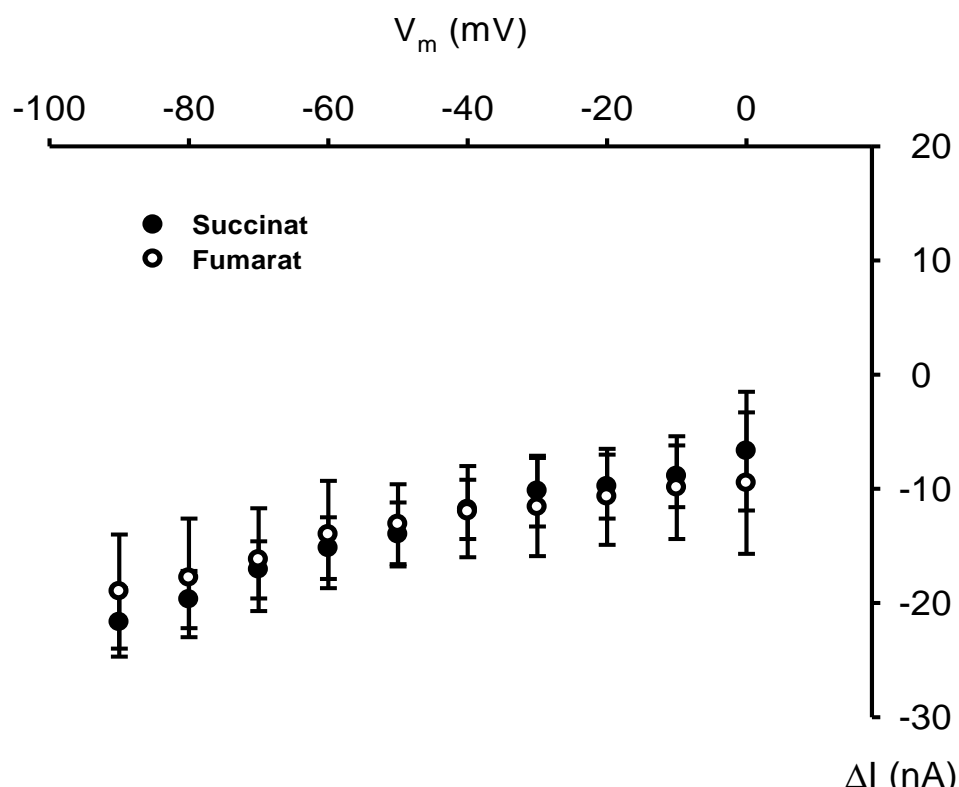


Abb. 23: Vergleich der I-V-Kennlinien der Differenzströme hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion von 1 mM Succinat bzw. 1 mM Fumarat; Messungen an 11 Oozyten von 6 verschiedenen Donoren.

3.1.7 Vergleich von Succinat- und Glycin-induzierten Strömen

Das Experiment, welches in Abbildung 24 dargestellt ist, folgt dem in Abbildung 23 direkt im Anschluss. Auch hier wurde eine erneute Erholungszeit von 15 Minuten eingehalten. Die aufgezeigten I-V-Kennlinien der Differenzströme (ΔI) hNaDC3-exprimierender Oozyten werden unter Perfusion von ORi plus 1 mM Succinat und unter Perfusion von ORi plus 1 mM Glycin registriert. Die Berechnung der Differenzströme wurde bereits ausführlich in Abbildung 21 abgehandelt. Die I-V-Kennlinien der Differenzströme unter 1 mM Succinat bzw. unter 1 mM Glycin im Potentialbereich von -90 und 0 mV verlaufen linear. Ihre Amplituden nehmen mit Depolarisation ab. Generell sind die Glycin-medierten Einwärtsströme niedriger als die von Succinat medierte. Diese betragen bei -90 mV für Glycin $-9,4 \pm 3,1$ nA, für Succinat $-21,7 \pm 3$ nA und bei 0 mV für Glycin $1,5 \pm 4,3$ nA, für Succinat $-6,7 \pm 5,2$ nA. Für die *mocks* konnte unter diesen Bedingungen wiederum kein Einwärtsstrom nachgewiesen werden.

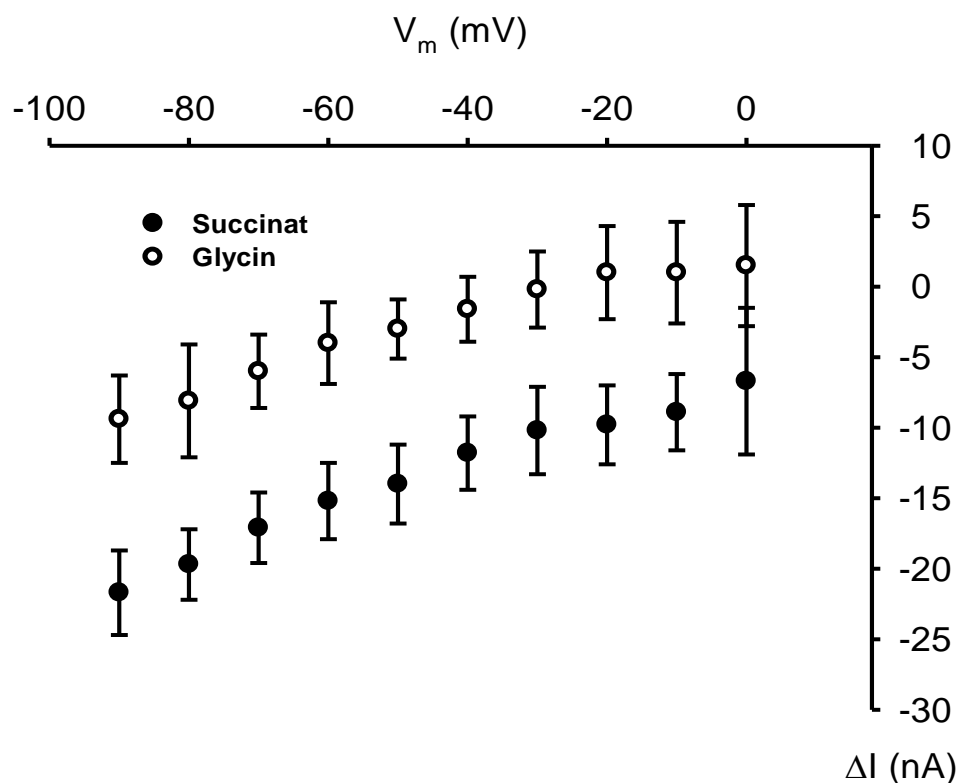


Abb. 24: Darstellung der I-V-Kennlinien der Differenzströme hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion von ORi plus 1 mM Succinat und ORi plus 1 mM Glycin, Mittelwerte aus Messungen an 11 Oozyten von 6 verschiedenen Donoren.

3.1.8 Vergleich von Succinat-, Glycin- und Glycylglycin-induzierten Strömen

In Abbildung 25 sind die I-V-Kennlinien der Differenzströme (ΔI) von hNaDC3-exprimierenden Oozyten zusammengefasst. Die Versuchsdurchführung entspricht der in 3.1.1 und 3.1.3 beschriebenen. Für diese Versuche musste jedoch ein neues Kollektiv von hNaDC3-exprimierenden Oozyten gewählt werden, da das Haltepotential der Oozyten, deren Substratabhängigkeit in den Abbildungen 21–24 zu sehen ist, nicht mehr stabil war und deshalb keine aussagekräftigen Resultate mehr erzielt werden konnten. In diesen neuen Versuchsreihen ergibt sich unter Perfusion von 1 mM Succinat bei einem Klemmpotential von -90 mV ein Substrat-abhängiger Strom von $-47,6 \pm 16,4$ nA und bei einem Klemmpotential von 0 mV ein Strom von $-15,6 \pm 5,1$ nA. Glycin und Glycylglycin induzieren ebenfalls Substrat-abhängige Ströme. Für Glycin (1 mM) und Glycylglycin (1 mM) konnten bei einem Klemmpotential von -90 mV ein Strom von -16 ± 8 nA bzw. $-8,1 \pm 4,9$ nA und bei einem Klemmpotential von 0 mV ein Strom von $5,6 \pm 7$ nA bzw. $7,3 \pm 3,7$ nA registriert werden. Die Ströme, welche durch Succinat, Glycin und Glycylglycin

induziert werden, nehmen mit Depolarisation der Oozyten ab, die Amplituden der Einwärtsströme von Glycin und Glycylglycin sind jedoch bei allen untersuchten Klemmpotentialen deutlich geringer als die Amplitude des Succinat-medierten Stromes. Aus diesem Grund wurde auch eine andere Skalierung als in den vorangegangenen Abbildungen gewählt. Unter diesen Bedingungen konnte in den *mocks* weder ein Succinat- noch ein Glycin- oder Glycylglycin-abhängiger Strom detektiert werden.

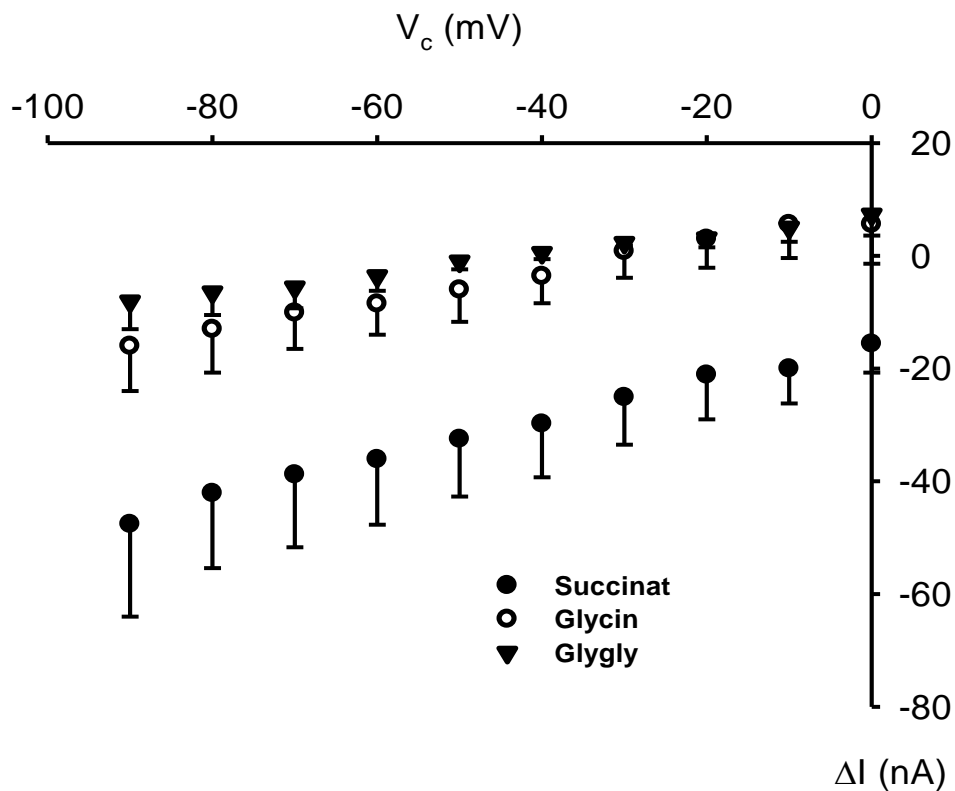


Abb. 25: Vergleich der I-V-Kennlinien der Differenzströme hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion von ORI plus 1 mM Succinat bzw. 1 mM Glycylglycin oder 1 mM Glycin, Mittelwerte aus Messungen an 6 Oozyten von 3 unterschiedlichen *Xenopus-laevis*-Weibchen.

3.2 Strom-Spannungskennlinien hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Einfluss von Succinat, Glutathion und den Aminosäuren, aus denen Glutathion synthetisiert wird

3.2.1 Vergleich der Succinat- und Glutathion-induzierten Ströme

Abbildung 26 vergleicht die Succinat- und Glutathion (GSH)-induzierten Differenzströme (ΔI) an hNaDC3-exprimierenden Oozyten. Die Berechnung der Differenzströme erfolgte analog der Beschreibung in 3.1.4. Die Versuche wurden an einem neuen Kollektiv von Oozyten vorgenommen, an dem nacheinander die durch Succinat, GSH, Glycin, Cystein und Glutamat hervorgerufenen Ströme getestet wurden. Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgte jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit in separaten Abbildungen.

Der von Succinat-induzierte Strom betrug bei -90 mV $-20,7 \pm 1,9$ nA und bei 0 mV $-1,5 \pm 3,4$ nA. Im Gegensatz dazu konnte unter Perfusion ORi plus 1 mM Glutathion (GSH) bei einem Klemmpotential von -90 mV nur ein GSH-abhängiger Strom von $-7,2 \pm 3,9$ nA nachgewiesen werden, der bei 0 mV auf $4 \pm 1,6$ nA abfiel. Die linearen I-V-Kennlinien der Differenzströme unter Succinat und GSH verlaufen weitgehend parallel. GSH rief in Wasser-injizierten Oozyten keinen Substrat-abhängigen Strom hervor, weshalb die Daten, wie in den vorangegangenen Experimenten, in der Abbildung nicht dargestellt wurden.

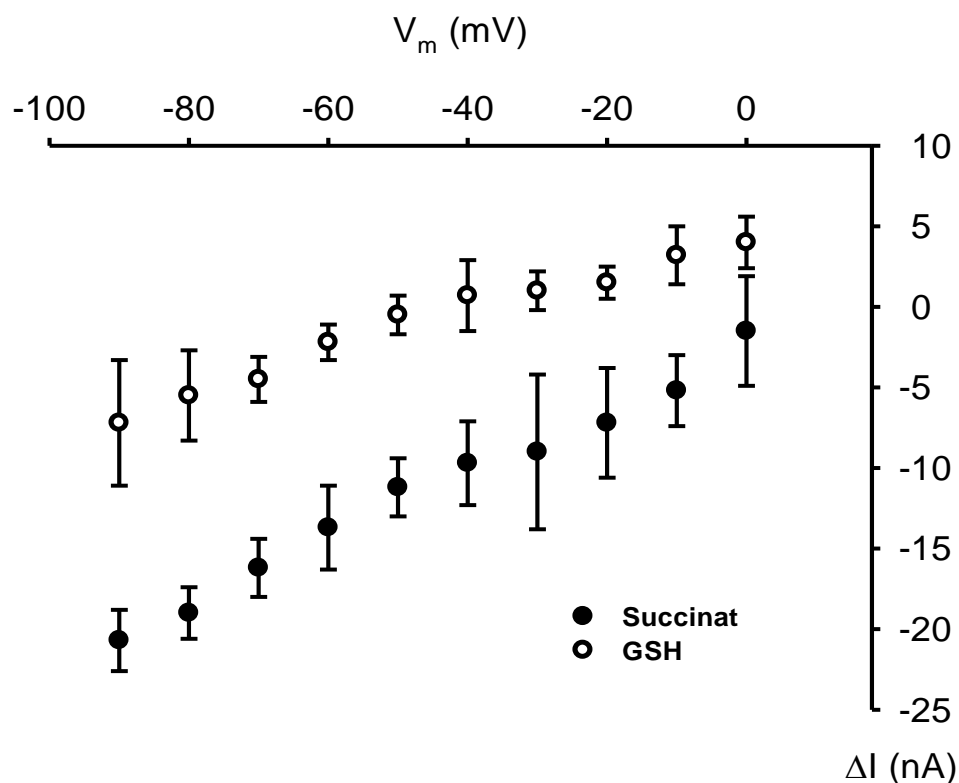


Abb. 26: Vergleich I-V-Kennlinien der Differenzströme hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion von ORi plus 1mM Succinat bzw. ORi plus 1 mM Glutathion (GSH), Mittelwerte aus Messungen an 4 Oozyten von 4 verschiedenen Donoren.

3.2.2 Vergleich der Succinat- und Glycin-induzierten Ströme

Bei den in Abbildung 27 dargestellten I-V-Kennlinien handelt es sich um Differenzströme (ΔI) hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion von Succinat und Glycin. Wie schon in den Abbildungen 24 und 25 werden die induzierten Ströme von 1 mM Glycin mit 1 mM Succinat erneut aufgegriffen und miteinander verglichen. Die Abbildungen 26, 27, 28 und 29 wurden unabhängig von den vorangegangenen Experimenten ausgewertet, da zwischen diesen Versuchsreihen eine Zeitspanne von einem Jahr lag. Die Vorgehensweise der Experimente und Berechnung der Differenzströme bleibt jedoch die gleiche und muss daher nicht mehr explizit beschrieben werden. Somit wird unter Perfusion mit 1 mM Succinat bei einem Klemmpotential von -90 mV ein Strom von $-20,7 \pm 1,9$ nA und bei 0 mV ein Strom von $-1,5 \pm 3,4$ nA registriert. Unter Perfusion mit 1 mM Glycin ergibt sich bei -90 mV ein Strom von $-11,2 \pm 1,9$ nA und bei 0 mV ein Differenzstrom von 2 ± 6 nA. Beide Ströme unter Perfusion von Succinat bzw. Glycin nehmen mit Depolarisation der Oozyten deutlich ab.

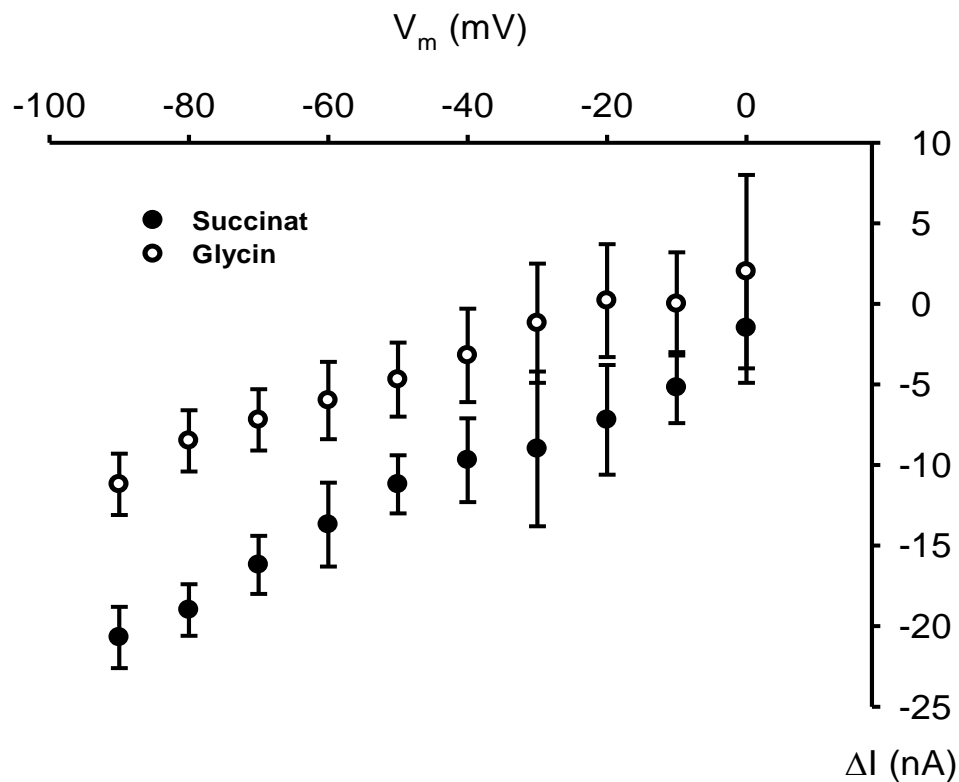


Abb. 27: Vergleich der I-V-Kennlinien der Differenzströme hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion von 1 mM Succinat und 1 mM Glycin, Mittelwerte aus Messungen an 4 Oozyten von 4 Donoren.

3.2.3 Vergleich der Succinat- und Cystein-induzierten Ströme

In Abbildung 28 sind die I-V-Kennlinien der Differenzströme (ΔI) hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion von Succinat und Cystein dargestellt. Im Gegensatz zu Succinat und Glycin, die gut detektierbare Ströme hervorriefen (3.2.2), weisen die Cystein-medierte Ströme nur sehr kleine Amplituden auf. Diese betragen bei einem Klemmpotential von -90 mV $-3 \pm 1,6$ nA und bei 0 mV $-3,7 \pm 5,7$ nA. Der Substrat-abhängige Strom für Cystein blieb zwischen -90 mV und 0 mV nahezu konstant, d.h. die für Succinat und Glycin beobachtete Potentialabhängigkeit war verloren gegangen. Cystein rief an *mocks* keinen Substrat-induzierbaren Strom hervor.

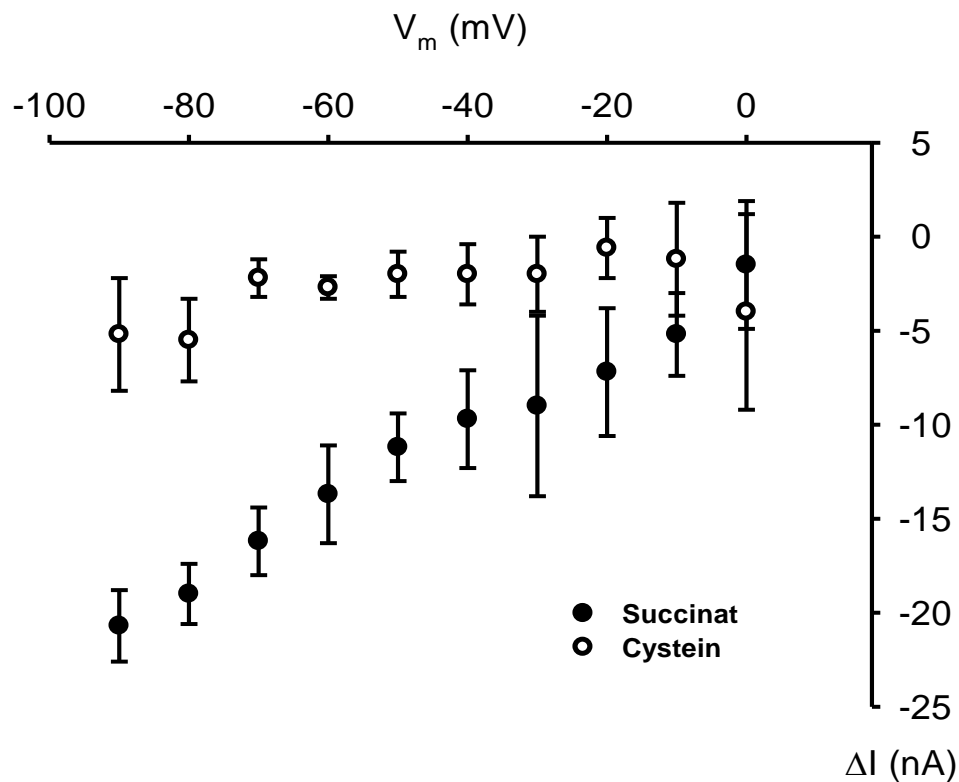


Abb. 28: I-V-Kennlinien der Differenzströme hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion mit Ori plus 1 mM Succinat bzw. Ori plus 1 mM Cystein, Mittelwerte aus Messungen an 4 Oozyten von 4 Donoren (*Xenopus-laevis*-Weibchen).

3.2.4 Vergleich der Succinat- und Glutamat-induzierten Ströme

Abbildung 29 zeigt I-V-Kennlinien der Differenzströme (ΔI), die in hNaDC3-exprimierenden Oozyten in Anwesenheit von 1 mM Succinat bzw. 1 mM Glutamat gewonnen wurden. Auch hier werden, ähnlich wie für Cystein beobachtet, nur sehr kleine Stromamplituden detektiert. Unter Perfusion von 1 mM Glutamat ergibt sich bei -90 mV ein Strom von $-5,2 \pm 3$ nA und bei 0 mV $-4 \pm 5,2$ nA. Unter Perfusion von 1 mM Glutamat bleibt der einzuspeisende Strom im Potentialbereich zwischen -90 mV und 0 mV weitgehend konstant. Im Gegensatz dazu nimmt der Succinat-induzierte Strom mit Depolarisation der Oozyten deutlich ab.

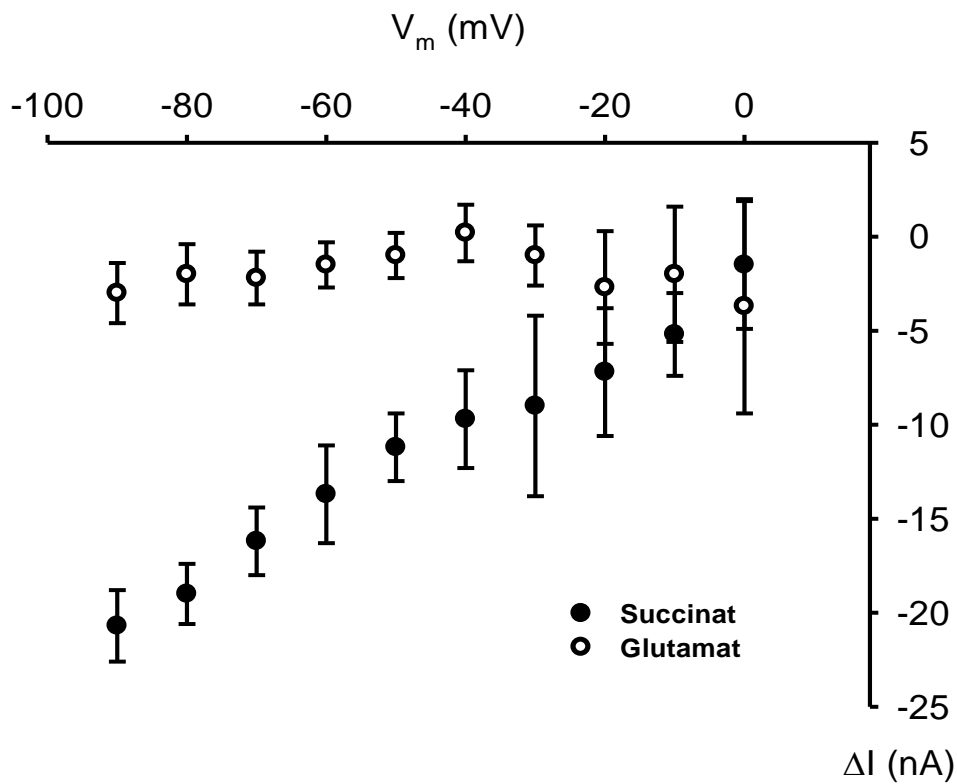


Abb. 29: Vergleich der I-V-Kennlinien der Differenzströme hNaDC3-exprimierender Oozyten unter Perfusion von 1 mM Succinat bzw. 1 mM Glutamat, Mittelwerte aus Messungen an 4 Oozyten von 4 unterschiedlichen Donoren.

3.3 Natrium-abhängige Strom-Transporter-Messungen

Messungen unter Natrium-freien Bedingungen waren nur sehr schwer möglich, aufgrund starker Fluktuationen der Oozyten. Daher wurden auf die Messungen verzichtet, welche aber in einer folgenden Arbeit aufgegriffen werden.

4 Diskussion

4.1 Transporter hNaDC3 und sein Zusammenspiel mit Dicarboxylaten

In der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszelle der Niere befindet sich ein primär aktiver Transporter, die Na^+/K^+ -ATPase. Diese baut unter dem Verbrauch von einem Molekül ATP den einwärts gerichteten Na^+ -Gradienten auf. Dabei werden 3 Na^+ -Ionen aus und 2 K^+ -Ionen in die Zelle transportiert. Über Natrium gekoppelte Transporter, wie den NaDC1, den NaDC3 oder den NaCT, werden mindestens 3 Natrium-Ionen im Symport mit einem Di- oder Tricarboxylat, wie Succinat, α -Ketoglutarat und Citrat, in die Zelle mit unterschiedlichen Affinitäten aufgenommen (PAJOR 1999, 2000, 2006; MARKOVICH & MURER 2004). Der Natrium-abhängige elektrogene hNaDC3-Transporter (PAJOR 2000, 2006) gehört zur Genfamilie der SLC13-Transporterproteine (PAJOR 2006) und befindet sich auf der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen der Niere (WANG J et al. 2003).

4.2 Charakterisierung des hNaDC3 unter Verwendung der eigenen Daten

Die höchste Affinität zum basolateral liegenden hNaDC3-Cotransporter besitzen die Dicarboxylate Succinat, Glutarat und α -Ketoglutarat (PAJOR 1999, 2000; MARKOVICH & MURER 2004; KAUFHOLD et al. 2011). Sie bestehen aus einem Kohlenstoffgerüst von vier (Succinat) oder fünf C-Atomen (Glutarat, α -Ketoglutarat) und zwei endständigen Carboxylgruppen. In den meisten Untersuchungen, so auch in dieser Doktorarbeit, wird Succinat als Referenzsubstrat eingesetzt, da es chemisch relativ stabil ist, nicht oder nur geringfügig verstoffwechselt wird und als radioaktiv-markierte Substanz erhältlich ist, sodass es keiner Spezialsynthese bedarf (PAJOR 1999, 2000; MARKOVICH & MURER 2004). Der hNaDC3 ist, wie auch der NaDC3 anderer Spezies, ein elektrogener Transporter (PAJOR 2000). Beim Transport des Dicarboxylats Succinat über den hNaDC3-Transporter entsteht ein einwärts gerichteter Strom positiver Ladungen, da das divalente Succinat zusammen mit drei Natrium-Ionen über die Oozytenmembran transportiert wird. Mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Methode (TEVC) werden diese Substrat-induzierten Ströme in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten an *Xenopus-laevis*-Oozyten, die den hNaDC3 exprimiert haben, gemessen. Diese Methode hat den großen Vorteil,

dass neben dem Referenzsubstrat weitere Substanzen, die als mögliche Substrate in Betracht kommen, an ein und derselben Oozyte getestet werden können. Durch Vergleich der von den jeweiligen Substanzen erzeugten Amplituden der Einwärtsströme kann die Translokation der einzelnen Substanzen miteinander verglichen werden. Dadurch können Schwankungen in Bezug auf das Expressionsniveau vermieden oder doch stark eingeschränkt werden. Beim Einsatz nicht elektrophysiologischer Methoden, wie der Verwendung radioaktiv markierter Substanzen, muss die Oozyte zum Nachweis der aufgenommenen Menge an radioaktiv markierter Substanz lysiert werden. So kann höchstens eine Substanz pro Oozyte gemessen werden, welches die Variabilität erhöht. Übersichten über den Einsatz von *Xenopus-laevis*-Oozyten und ihre Limitierung finden sich in FRASER & DJAMGOZ (1992); WEBER (1999); WAGNER et al. (2000). Die Oozyten verfügen über einen Durchmesser von bis zu einem 1 mm (WAGNER et al. 2000), wenige endogene Transportproteine und Kanäle, welches das Hintergrundrauschen erheblich vermindert, und sind einfach zu handhaben, was die Kultivierung in Expressionspuffern betrifft. Das erste Transportprotein, das in *Xenopus-laevis*-Oozyten kloniert wurde, war der Natrium-abhängige Glukosetransporter (HEDIGER et al. 1987). Seit dieser Zeit sind viele Transportproteine in *Xenopus-laevis*-Oozyten zur Expression gebracht worden. Der in dieser Arbeit untersuchte Transporter hNaDC3 wurde, wie in der Einleitung beschrieben 2000 von WANG H kloniert und in seiner Aminosäuresequenz aufgeklärt.

Obwohl der hNaDC3 sowohl von WANG H et al. (2000) als auch von HUANG et al. (2000), WANG J et al. (2003); BURCKHARDT BC et al. (2004), BURCKHARDT BC et al. (2005), STELLMER et al. (2007), HAGOS et al. (2008) mit mehreren Substanzen charakterisiert wurde, musste als erstes Experiment noch einmal der von Succinat (1 mM gelöst in ORi) an hNaDC3-exprimierenden Oozyten induzierte Einwärtsstrom gemessen werden. Im Durchschnitt lag dieser bei einem Klemmpotential von -60 mV bei $-14,45 \text{ nA} \pm 2,65 \text{ nA}$. Insgesamt gingen Messungen an 21 Oozyten von 13 Spendertieren ein. Der von mir bestimmte Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem Wert, der in den oben zitierten Publikationen angegeben wird. Zusätzlich wurden auch noch einmal die von Succinat (1 mM gelöst in ORi) an Wasser-injizierten Oozyten gemessenen Werte aufgenommen. Der an diesen Oozyten erhaltene Wert beträgt $-11,8 \text{ nA} \pm 2,6 \text{ nA}$ (4 Oozyten von 3 Spendertieren). Die erhöhten Einwärtsströme der hNaDC3-exprimierenden Oozyten

und die geringen fast nicht nachweisbaren Substrat-induzierten Einwärtsströme bei den Wasser-injizierten Oozyten lässt darauf schließen, dass die durch die Injektion der hNaDC3-Ribonukleinsäure (cRNS) ein elektrogenes Transportprotein in die Plasmamembran der Oozyten eingebaut wurde und das dieses Protein Succinat transportiert.

Abbildung 19 macht deutlich, dass Natrium-Ionen an den Transport von einem Dicarboxylat gekoppelt sind. Das Umkehrpotential in hNaDC3-exprimierten Oozyten beträgt in Abwesenheit von 1 mM Succinat $-39,3 \pm 5,9$ mV und in Anwesenheit von der Substanz $-32,4 \pm 5,3$ mV (11 Oozyten von 6 Spendern). Somit verschiebt sich das Umkehrpotential unter Zugabe von 1 mM Succinat in Richtung des Gleichgewichtspotentials von Natrium, das bei *Xenopus-laevis*-Oozyten bei ca. +60 mV liegt (FRASER & DJAMGOZ 1992; WEBER 1999).

4.2.1 Zusammenspiel des hNaDC3-Transporters mit Fumarat

Genau wie Succinat gehört Fumarat zu den bevorzugten Substraten des hNaDC3-Transporters. Grund dafür könnte das Kohlenstoffgrundgerüst, bestehend aus vier C-Atomen und die zwei endständigen Carboxylgruppen sein. Um diese Hypothese belegen zu können, wurde Ribonukleinsäure des hNaDC3-Transportproteins in die Oozyten des südamerikanischen Krallenfrosches injiziert. Nach drei Tagen wurde als erstes die Expression des Transporters mit dem Testsubstrat Succinat geprüft und anschließend Fumarat appliziert. Um die Amplituden der Einwärtsströme vergleichen zu können, wurden beide Substanzen in einer Konzentration von 1 mM gelöst in ORI angeboten. Wasser-injizierte Oozyten antworteten auf die Gabe von Fumarat nicht mit einem Einwärtsstrom. Fumarat ist ähnlich wie Succinat ein Dicarboxylat, das aus einen Kohlenstoffgrundgerüst von 4 C-Atomen und je zwei endständigen Carboxylgruppen besteht. Im Gegensatz zum Succinat befindet sich zwischen C2 und C3 eine Doppelbindung, die den Abstand der beiden endständigen Carboxylgruppen verkürzt. Trotzdem scheint der Abstand der beiden Carboxylgruppen noch auszureichen, damit Fumarat in die Bindungstaschen des hNaDC3 passt.

4.2.2 Zusammenspiel des hNaDC3-Transporters mit Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid, welches im Zytosol aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin synthetisiert wird. Am Transport des Dicarboxylates aus dem Blut in die proximale Tubuluszelle sind verschiedene Transporter verantwortlich wie z.B. die Transporter für organische Anionen (OAT1 und OAT3) und der in dieser Arbeit untersuchte hNaDC3. In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnte die Arbeitsgruppe die Hemmkonstanten (IC_{50}) unterschiedlicher Dicarboxylate (KAUFHOLD et al. 2011) zu OAT1, OAT3 und hNaDC3 bestimmen. Alle drei Transporter waren stabil in HEK293 Zellen transfiziert, sodass unabhängig vom Expressionssystem ein direkter Vergleich der IC_{50} -Werte möglich war. Es wäre sehr schön gewesen, wenn auch in diesen Zellen eine Untersuchung des Transports von GSH möglich gewesen wäre. Da aber zu Beginn der Messungen zu dieser Arbeit nicht klar war, ob die HEK293 Zellen eine γ -Glutamyltransferase (γ -GT), ein Enzym, das GSH sofort in seine Aminosäuren zerlegt, besitzen und da GSH sehr instabil ist und mit einer Halbwertszeit von ca. 8 Minuten zerfällt, sollten die Versuche zuerst an *Xenopus-laevis*-Oozyten durchgeführt werden. Zudem besitzen *Xenopus-laevis*-Oozyten keine γ -GT. In den hNaDC3-exprimierenden Oozyten konnte unter der Perfusion von ORI, dem 1 mM GSH zugesetzt war, bei einer Klemmspannung von -60 mV nur ein Einwärtsstrom von $-2,2 \pm 1,1$ nA (4 Oozyten, 4 Frösche) gemessen werden. Wasser-injizierte Oozyten zeigten einen kleinen Auswärtsstrom. Dieser niedrige Einwärtsstrom beweist zwar eine Translokation von GSH über den hNaDC3-Transporter, lässt jedoch vermuten, dass dieser Strom nicht ausreicht, die von mehreren Arbeitsgruppen beobachtete Sekretion von GSH zu erklären (RANKIN & CURTHOYS 1982; LASH & JONES 1983, 1984; RANKIN et al. 1985; LASH & PUTT 1999; PARKS et al. 1998). Die Gründe, warum nur ein so geringfügiger Einwärtsstrom in Anwesenheit von GSH detektiert werden konnte, sollen im Folgenden aufgelistet werden:

GSH besteht aus einem Kohlenstoffgrundgerüst von zehn C-Atomen mit zwei endständigen Carboxylgruppen. Der hNaDC3-Transporter besitzt jedoch nur eine hohe Affinität zu Dicarboxylaten mit einem Kohlenstoffgrundgerüst von 4 oder 5 C-Atomen (PAJOR 1999, 2000, 2006; MARKOVICH & MURER 2004). Der Abstand der beiden endständigen Carboxylgruppen erscheint deshalb zu lang, um in den Bindungstaschen des hNaDC3 geeignete Bindungsstellen zu finden. Da GSH aus

Cystein, Glycin und Glutamat synthetisiert wird, haben natürlich auch die Sulfhydrylgruppe des Cysteins, das H^+ des Glycins und die Aminogruppe des Glutamats einen Einfluss auf die Interaktion des GSH mit den Bindungsstellen des hNaDC3. Aus diesem Grund wurde getestet, ob Cystein, Glycin und Glutamat, obwohl sie keine Dicarboxylate darstellen, einen Substrat-abhängigen Strom induzieren. Eine positiv geladene $NH_2(NH_3^+)$ -Gruppe erschwert die Translokation einer Substanz über den hNaDC3. Dies konnte schon in früheren Versuchen gezeigt werden (HUANG et al. 2000; BURCKHARDT BC et al. 2005; FUJITA et al. 2005) und wurde in dieser Arbeit noch einmal bestätigt. In hNaDC3-exprimierten Oozyten und bei einer Klemmspannung von -60 mV wurde unter Glycin-Perfusion ein Strom von $-6 \pm 2,4$ nA, unter Cystein-Perfusion $-2,7 \pm 0,6$ nA und unter Glutamat-Perfusion $-1,5 \pm 1,2$ nA (4 Oozyten, 4 Frösche) gemessen. Bei allen drei Substanzen wurden damit sehr niedrige Einwärtsströme registriert. Cystein mit einer Sulfhydrylgruppe und Glycin mit einem Wasserstoff scheinen ebenfalls in einer Konfiguration vorzuliegen, die eine Bindung an das Transportprotein nicht ermöglicht.

4.2.3 Zusammenspiel des hNaDC3-Transporters mit N-Oxalyl-Glycin

Bei N-Oxalyl-Glycin handelt es sich ebenfalls um ein Dicarboxylat bestehend aus einem Kohlenstoffgrundgerüst (4 C-Atome) mit zwei endständigen Carboxylgruppen. Aufgrund der Struktur könnte N-Oxalyl-Glycin eine erhöhte Affinität zum hNaDC3-Transporter aufweisen. Um die aufgestellte Hypothese zu überprüfen, wurden N-Oxalyl-Glycin-medierte Ströme mit denen von Succinat verglichen. Diese betragen in hNaDC3-exprimierten Oozyten bei einer Klemmspannung von -60 mV unter Perfusion von Succinat $-15,2 \pm 2,7$ nA und unter N-Oxalyl-Glycin $-8,0 \pm 2,3$ nA (4 Oozyten, 4 Frösche). Der Einwärtsstrom von N-Oxalyl-Glycin halbierte sich im Vergleich zum Testsubstrat Succinat. N-Oxalyl-Glycin besitzt im Gegensatz zu Glutarat eine weitere keto-Gruppe und hat anstelle des mittleren C-Atoms im Kohlenstoffgrundgerüst eine NH-Gruppe. Vom α -Ketoglutarat unterscheidet es sich nur durch diese NH-Gruppe. Da sowohl Glutarat als auch α -Ketoglutarat eine hohe Affinität zum hNaDC3 besitzen (HUANG et al. 2000; BURCKHARDT BC et al. 2005), wird N-Oxalyl-Glycin aufgrund seiner strukturellen Übereinstimmung mit Glutarat und α -Ketoglutarat ebenfalls über den hNaDC3 transloziert. Die NH-Gruppe scheint die Translokation nur dahingehend zu beeinflussen, dass die Amplitude des Stromes im

Vergleich zu Succinat geringer war. Weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Affinität sollten folgen.

4.2.4 Zusammenspiel des hNaDC3-Transporters mit Glycylglycin

Glycylglycin könnte auch als Monocarboxylat eingestuft werden. Es verfügt über ein Kohlenstoffgrundgerüst von 4 C-Atomen mit einer endständigen Carboxylgruppe und einer endständigen NH₂-Gruppe, welche ein Kriterium für einen geringen oder gar keinen Einwärtsstrom über den hNaDC3-Transporter ist. Bei den vorliegenden Experimenten wurde unter einer Klemmspannung von -60 mV ein Succinat-induzierter Strom von $-36,1 \pm 11,6$ nA und ein Glycylglycin-induzierter Strom von $-3,6 \pm 2,6$ nA registriert. Damit ist bewiesen, dass die NH₂-Gruppe essenziell die Translokation über den hNaDC3-Transporter verhindert.

5 Zusammenfassung

Diese experimentelle Arbeit untersucht die Interaktionen diverser Substanzen (Succinat, Glutamat, Glutathion, Glycin, Cystein, Fumarat, N-Oxalyl-Glycin, Glycylglycin) mit dem Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Transporter (hNaDC3). Bei den aufgezählten Substraten handelt es sich um Mono- und Dicarboxylate und Abkömmlinge dieser Substanzklassen. Um Wechselwirkungen und unter Umständen Überlappungen mit anderen Transportproteinen zu vermeiden, wurde Ribonukleinsäure (cRNS) des hNaDC3-Transporters in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) injiziert. Oozyten besitzen selbst sehr wenige endogene Transportproteine. Sie können fremde cRNS transkribieren und das fertige Protein, für das diese cRNS kodiert, in ihre Membran einbauen, welches dann z.B. mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Methode (TEVC) untersucht werden kann. Das Dicarboxylat Succinat dient dabei jeweils als Test- und Referenzsubstrat, da es unter der TEVC die höchsten Substrat-mediierten Ströme induziert. Ströme vergleichbarer Amplitude wurden von Fumarat, solche von etwas niedriger Amplitude von N-Oxalyl-Glycin hervorgerufen. Im Gegensatz dazu waren unter Perfusion von Glutathion, Glutamat, Glycylglycin und Cystein sehr geringe oder keine Einwärtsströme mehr registrierbar. Aus diesen Versuchen lassen sich Struktur-Wirkungsbeziehungen ablesen:

- Dicarboxylate mit einem Kohlenstoffgrundgerüst von 4 oder 5 C-Atomen, wie Succinat, Fumarat und N-Oxalyl-Glycin, interagieren mit dem hNaDC3 und induzieren Substrat-abhängige Ströme,
- NH₂-Gruppen, wie in Glutamat und Glutathion, erschweren die Interaktion mit dem hNaDC3,
- SH-Gruppen, wie in Cystein, erschweren ebenfalls die Interaktion mit dem hNaDC3.

6 Literaturverzeichnis

- Bai XY, Chen X, Sun AQ, Feng Z, Hou K, Fu B (2007): Membrane topology structure of human high-affinity, sodium-dependent dicarboxylate transporter. *FASEB J* 21:2409-2417
- Berchner-Pfannschmidt U, Frede S, Wotzlaw C, Fandrey J (2008): Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: insights into oxygen sensing. *Eur Respir J* 32:210-217
- Burckhardt BC, Burckhardt G (2003): Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146:95-158
- Burckhardt BC, Lorenz J, Burckhardt G, Steffgen J (2004): Interactions of benzylpenicillin and non-steroidal anti-inflammatory drugs with the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *Cell Physiol Biochem* 14:415-424
- Burckhardt BC, Lorenz J, Kobbe C, Burckhardt G (2005): Substrate specificity of the human sodium dicarboxylate cotransporter, hNaDC3, under voltage clamp conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:792-799
- Dascal N (1987): The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22:317-387
- Fraser SP, Djamgoz MBA: *Xenopus* oocytes: Endogenous electrophysiological characteristics. In: *Current Aspects of the Neuroscience*. 4. Auflage The Macmillan Press, New York 1992
- Fujita T, Katsukawa H, Yodoya E, Wada M, Shimada A, Okada N, Yamamoto A, Ganapathy V (2005): Transport characteristics of N-acetyl-L-aspartate in rat astrocytes: involvement of sodium-coupled high-affinity carboxylate transporter NaC3/NaDC3-mediated transport system. *J Neurochem* 93: 706-714
- 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
- Hediger MA, Ikeda T, Coady M, Gundersen CB, Wright EM (1987): Expression of size-selected mRNA encoding the intestinal Na/glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2634-2637
- Hentschel H, Burckhardt BC, Schölermann B, Kühne L, Burckhardt G, Steffgen (2003): Basolateral localization of flounder Na⁺-dicarboxylate cotransporter (fNaDC-3) in the kidney of *Pleuronectes americanus*. *Pflügers Arch* 446:578-584
- Huang W, Wang H, Kekuda R, Fei YJ, Friedrich A, Wang J, Conway SJ, Cameron RS, Leibach FH, Ganapathy V (2000): Transport of N-acetylaspartate by the Na(+)-dependent high-affinity dicarboxylate transporter NaDC3 and its relevance to the expression of the transporter in the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 295:392-403
- Kaufhold M, Schulz K, Breljak D, Gupta S, Henjakovic M, Krick W, Hagos Y, Sabolic I, Burckhardt BC, Burckhardt G (2011): Differential interaction of dicarboxylates with human sodium- dicarboxylate cotransporter 3 and organic anion transporters 1 and 3. *Am J Physiol Renal Physiol* 301:1026-1034
- Kekuda R, Wang H, Huang W, Pajor AM, Leibach FH, Devoe LC, 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 Appl Pharmacol* 204:329-342

- Lash LH, Jones DP (1983): Transport of glutathione by renal basal-lateral membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 112:55-60
- 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
- Lee TK, Hammond CL, Ballatori N (2001): Intracellular glutathione regulates taurocholate transport in HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 174:207-215
- Li L, Meier PJ, Ballatori N (2000): Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol* 58:335-340
- Markovich D, Murer H (2004): The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 447:594-602
- Mole DR, Schlemminger I, McNeill LA, Hewitson KS, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Schofield CJ (2003): 2-oxoglutarate analogue inhibitors of HIF prolyl hydroxylase. *Bioorg Med Chem Lett* 13:2677-2680
- Pajor AM (1999): Sodium-coupled transporters for Krebs cycle intermediates. *Annu Rev Physiol* 61:663-682
- Pajor AM (2000): Topical review: Molecular Properties of Sodium/Dicarboxylat Cotransporters. *J Membr Biol* 175:1-8
- Pajor AM (2006): Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflugers Arch* 451:597-605
- Parks LD, Zalups RK, Barfuss DW (1998): Heterogeneity of glutathione synthesis and secretion in the proximal tubule of the rabbit. *Am J Physiol* 274:924-931
- Rankin BB, Curthoys NP (1982): Evidence for renal paratubular transport of glutathione. *FEBS Lett* 147:193-196
- Rankin BB, Wells W, Curthoys NP (1985): Rat renal peritubular transport and metabolism of plasma [³⁵S]glutathione. *Am J Physiol* 249:198-204
- Ratcliffe PJ (2006): Understanding hypoxia signalling in cells-a new therapeutic opportunity? *Clin Med* 6:573-578
- Ratcliffe PJ (2007): HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest* 117:862-865
- Steffgen J, Burckhardt BC, Langenberg C, Kühne 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* 274:20191-20196
- Stellmer F, Keyser B, Burckhardt BC, Koepsell H, Streichert T, Glatzel M, Jabs S, Thiem J, Herdering W, Koeller DM, Goodman SI, Lukacs Z, Ullrich K, Burckhardt G, Braulke T, Mühlhausen C (2007): 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *J Mol Med* 85:763-770
- 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* 278:1019-1030
- Wang J, Chen X, Zhu H, Peng L, Hong Q (2003): Relationship between aging and renal high-affinity sodium-dependent dicarboxylate cotransporter-3 expression characterized with antifusion protein antibody. *J Gerontol Biol Sci* 58/10:879-888
- Weber WM (1999): Endogenous ion channels in oocytes of *xenopus laevis*: recent developments. *J Membr Biol* 170:1-12

7 Abkürzungsverzeichnis

αKG^{2-}	α -Ketoglutarat
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium-Ion
CaCl_2	Calciumchlorid
cDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
COOH	Carboxylgruppe
cRNA	copy ribonucleic acid
DC	Dicarboxylate
ΔI	Differenzströme
γ -GT	γ -Glutamyltransferase
GSH	Glutathion
GSSH	Glutathion-Disulfid
H^+	Wasserstoff-Ion
HCO_3^-	Hydrogencarbonat
HEK-293	Human embryonic kidney cell line
HEPES	N(2-Hydroxyethyl)piperazin-N' (2Äthansulfonsäure)
HIF	Hypoxie-induzierte-Faktor
hNaDC3	Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Cotransporter des Menschen
IC_{50}	Inhibitorkonzentration bei 50% Hemmung
I-V-Kennlinie	Strom-Spannungskennlinie
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
Km-Wert	Michaelis-Menten-Konstante
M	molar
mM	Millimol/l
mV	Millivolt
μM	Mikromol/l
μS	Mikrosiemens
Na^+	Natrium-Ion
nA	Nanoamper
NaC-Cotransporter	Natrium-Carboxylat-Cotransporter
NaCl	Natriumchlorid
NaDC-3	Natrium-Dicarboxylat-Cotransporter-3
NAS-Cotransporter	Natrium-Sulphat-Cotransporter
NH_4^+	Ammonium-Ion
OA^-	Organische Anionen
OAT	Organischer Anionentransporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
ORi	Oozyten-Ringer
PHD	Polyhydroxylase-Domäne
pVHL	Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Protein
SH-Gruppe	Sulfhydrylgruppe
TEVC	Two Electrode Voltage-clamp
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
V	Spannung
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Sehr viele liebe Menschen haben mich während meiner Arbeit an meiner Dissertation in den ganzen Jahren begleitet. Für diese großartige Unterstützung danke ich vor allem Frau Prof. Dr. Birgitta C. Burckhardt. Sie brachte mir Freundlichkeit und viel Geduld entgegen und gab mir anregende Hilfestellungen. Durch den experimentellen Teil meiner Dissertation führte mich mit ihrer humorvollen Art Frau Irmgard Markmann. Mit einem lustigen Spruch auf den Lippen, aber die Arbeit nie aus den Augen verlierend, vermittelte sie mir die grundlegenden praktischen Fähigkeiten.

Lebenslauf Cornelia Kaufhold

Am 13.11.1978 wurde ich in Magdeburg als Tochter von Ursula Ziegenspeck, geb. Riedel, und Thomas Ziegenspeck geboren.

Von 1985 bis 1991 besuchte ich die Hans-Löscher-Oberschule in Magdeburg. Danach wechselte ich auf das Gymnasium Otto von Guericke, wo ich im Juli 1997 meine Allgemeine Hochschulreife erlangte. Im September 1997 ging ich als Au Pair nach Amerika. Ein Jahr später begann ich meine Ausbildung zur Zahntechnikerin. Diese beendete ich erfolgreich im Januar 2002. In den Monaten März bis September 2002 bereiste ich die Länder Großbritannien und Spanien. Im Oktober 2002 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität. Im Sommer 2006 famulierte ich für zehn Wochen in der Zahnklinik Marangu Tansania in Afrika. Im Juni 2008 begann ich in der Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie des Zentrums Physiologie und Pathophysiologie der Universität mit dem experimentellen Teil der vorliegenden Dissertation. Das Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität beendete ich im Juli 2008 erfolgreich mit dem Staatsexamen. Danach habe ich im Oktober 2008 als Vorbereitungsassistentin in der Praxis Z17 in Göttingen begonnen und die Assistenzzeit dort auch im September 2010 beendet. Im Anschluss daran habe ich als selbstständige Zahnärztin in der Praxis Z17 meine Arbeit aufgenommen. Am 26. September 2011 wurde meine Tochter Marlene geboren. Bis August 2012 befand ich mich in Elternzeit. Danach habe ich meine zahnärztliche Tätigkeit wieder aufgenommen.