

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

**Die Rolle des Lysins 114 für die Funktion des
Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporters (NaDC-3)
in den Nieren der Winterflunder**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Philipp Nachtigal
aus
Gießen

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Posterpräsentation:

Nachtigal P, Hagos Y, Burckhardt G, Burckhardt BC (2007):

„Functional role of lysine 114 in the sodium-dependent dicarboxylate transporter 3 from winter flounder kidney (fNaDC3) “

Nieren- und Hochdruckkrankheiten 36: 408

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Funktion der Dicarboxylate im Organismus	1
1.2	Die Funktion des Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporters-3 im Organismus	3
1.3	Charakterisierung des Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporters-3	6
1.3.1	Die SLC13-Genfamilie	6
1.3.2	Eigenschaften des Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporters der Flunder (fNaDC-3) und des Menschen (hNaDC-3)	8
1.3.3	Entstehung des Einwärtsstromes	10
1.4	Die Eigenschaften der Aminosäuren an Position 114 im Dicarboxylat-Cotransporter der Flunder (fNaDC-3)	11
1.5	Zielsetzungen	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Lösungen und Chemikalien	16
2.1.1	Kontrolllösungen für die elektrophysiologischen Messungen	16
2.1.2	Testlösungen für die elektrophysiologischen Messungen	17
2.1.3	Kontroll- und Testlösungen für die radiochemische Aufnahme	18
2.2	Verwendung von <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten als Expressionssystem	19
2.3	Elektrophysiologische Messungen	23
2.3.1	Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme – Two Electrode Voltage Clamp	23
2.3.2	Aufbau der Messapparatur	24
2.3.3	Vorgehensweise	26
2.4	Radiochemische Aufnahme von [¹⁴ C]Succinat	27
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Elektrophysiologische Messungen	30
3.1.1	Der Succinat-induzierte Strom	30
3.1.2	Einfluss von Lithium auf Succinat-induzierte Ströme	33
3.1.3	Natrium-Abhängigkeit Succinat-induzierter Ströme	45
3.2	Radiochemische Aufnahme von [¹⁴ C]Succinat	52

Inhaltsverzeichnis	II
4 DISKUSSION	55
4.1 Einleitung	55
4.2 Der Einfluss von Lithium auf fNaDC-3 Wildtyp und seine Mutanten	58
4.3 Das Verhalten von fNaDC-3 Wildtyp und seinen Mutanten in Anwesenheit von Natrium	59
4.4 Das Verhalten von fNaDC-3 Wildtyp und seinen Mutanten in Abwesenheit von Natrium	61
4.4.1 Ersatz des Natriums durch Lithium (ORi2)	61
4.4.2 Ersatz des Natriums durch N-Methyl-D-Glucamin (ORi1)	63
4.5 Das Aufnahmeverhalten von fNaDC-3 Wildtyp und Mutante K114I in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration	65
4.6 Der Einfluss der Aminosäuren auf das Verhalten von fNaDC-3 Wildtyp und seine Mutanten	66
5 ZUSAMMENFASSUNG	68
6 LITERATURVERZEICHNIS	70
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	74

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen	Seite	Abbildungen	Seite
Abbildung 1	7	Abbildung 26	42
Abbildung 2	10	Abbildung 27	43
Abbildung 3	11	Abbildung 28	44
Abbildung 4	12	Abbildung 29	44
Abbildung 5	13	Abbildung 30	46
Abbildung 6	21	Abbildung 31	47
Abbildung 7	21	Abbildung 32	48
Abbildung 8	22	Abbildung 33	49
Abbildung 9	22	Abbildung 34	50
Abbildung 10	23	Abbildung 35	51
Abbildung 11	25	Abbildung 36	53
Abbildung 12	27	Abbildung 37	54
Abbildung 13	29		
Abbildung 14	32		
Abbildung 15	33		
Abbildung 16	34		
Abbildung 17	35		
Abbildung 18	36		
Abbildung 19	36		
Abbildung 20	37		
Abbildung 21	38		
Abbildung 22	39		
Abbildung 23	40		
Abbildung 24	40		
Abbildung 25	41		

Tabellen	Seite
Tabelle 1	3
Tabelle 2	9
Tabelle 3	12
Tabelle 4	13
Tabelle 5	16
Tabelle 6	16
Tabelle 7	17
Tabelle 8	18
Tabelle 9	18
Tabelle 10	19
Tabelle 11	30
Tabelle 12	30
Tabelle 13	37
Tabelle 14	41

1 Einleitung

1.1 Die Funktion der Dicarboxylate im Organismus

Dicarboxylate wie α -Ketoglutarat, Fumarat, Malat, Malonat, Oxalacetat und Succinat, daneben auch Tricarboxylate wie z.B. Citrat, spielen eine wichtige Rolle für eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen im Organismus. Einige wichtige Funktionen werden hier einführend dargestellt.

Der in allen aeroben Organismen im Mitochondrium zu findende Citratzyklus stellt das Bindeglied zwischen dem Substratabbau der drei großen Nahrungsstoffgruppen und der Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung dar. Im Rahmen seiner Funktion als Drehscheibe im Gesamtstoffwechsel des Organismus verbindet er fast alle Abbauege und viele Synthesewege miteinander, in denen den Dicarboxylaten eine essentielle Bedeutung zukommt. Ziel des Citratzyklus ist der oxidative Abbau von Acetyl-CoA, dem gemeinsamen Abbauprodukt von Kohlenhydraten, Fettsäuren und einiger Aminosäuren. Der Zyklus beginnt mit der Übertragung eines Acetylrestes auf Oxalacetat, wobei Citrat entsteht, welches über die Intermediärprodukte Isocitrat, α -Ketoglutarat, Succinyl-CoA, Succinat, Fumarat und Malat wieder zu Oxalacetat wird. In der Bilanz wird der Acetylkohlenstoff dabei zu 2 CO_2 oxidiert, wobei neben GTP auch NADH/H^+ und FADH_2 entstehen, die in der Atmungskette durch oxidative Phosphorylierung 12 ATP ergeben. Somit sind die Dicarboxylate des Citratzyklus ein essentieller Bestandteil in der für den Organismus lebensnotwendigen Energieerzeugung in Form von ATP.

Der amphibolen Natur des Citratzyklus entsprechend sind seine dicarboxylierten Intermediate neben dem eben beschriebenen oxidativen Substratabbau auch an zahlreichen wichtigen Biosyntheseprozessen beteiligt. So ist mitochondriales Acetyl-CoA Grundbaustein der zytoplasmatischen Fettsäure-Biosynthese. Es kann das Mitochondrium allerdings nur an Oxalacetat gebunden in Form von Citrat verlassen. Im Zytoplasma angekommen entsteht über die Citrat-Lyase wieder Acetyl-CoA, aus welchem dann zusammen mit CoA-aktiviertem Malonat (Malonyl-CoA) Fettsäuren synthetisiert werden können. Darüber hinaus ist Oxalacetat ein wichtiger Baustein der Glukose-Biosynthese. Pyruvat, über welches die Glukoneogenese am häufigsten betrieben wird, wird im Mitochondrium zu Oxalacetat carboxyliert. Oxalacetat verlässt nun nach Reduktion zu Malat über den

Malat- α -Ketoglutarat-Antiporter das Mitochondrium und wird im Zytoplasma wieder zu Oxalacetat oxidiert, dort kann dann die Glukoneogenese beginnen. CoA-aktiviertes Succinat (Succinyl-CoA) wird für die Häm-Biosynthese und den Ketonkörperabbau benötigt. Häm benötigt der Organismus, um es in Hämoglobin zum Transport von O_2 oder in Cytochrom zum Transport von Elektronen einzubauen. Grundbaustein dieses Synthesevorganges ist die δ -Aminolävulinsäure, welche aus Succinyl-CoA und Glycin entsteht.

Im Ketonkörperstoffwechsel wird Succinyl-CoA benötigt, um Acetoacetat zu Acetoacetyl-CoA abzubauen, welches dann als Acetyl-CoA im Citratzyklus Verwendung finden kann.

α -Ketoglutarat und Oxalacetat spielen eine zentrale Rolle im Stoffwechsel der Aminosäuren. So können durch Transaminierung Amino-Gruppen von verschiedenen Aminosäuren auf α -Ketoglutarat bzw. Oxalacetat übertragen werden. Die beiden wichtigsten Enzyme, die solche Reaktionen katalysieren, sind die Alanin-Aminotransferase (ALT) und die Aspartat-Aminotransferase (AST), mit deren Hilfe Alanin, Aspartat und Glutamat synthetisiert werden können. Auch die direkte Überführung von freiem neurotoxischem Ammoniak in eine kovalent gebundene Form benötigt α -Ketoglutarat. Mit Hilfe der Glutamat-Dehydrogenase wird aus α -Ketoglutarat unter Einbau von NH_3 Glutamat und aus diesem über die Glutamin-Synthetase durch Einbau eines weiteren NH_3 schließlich Glutamin. Der so fixierte Ammoniak kann nun in der Leber freigesetzt werden und durch Einspeisung in den Harnstoffzyklus entgiftet werden. Auf diesem Wege gelangt das erste Ammoniakmolekül in den Kreislauf. Das benötigte zweite Ammoniakmolekül gelangt über den Aminogruppendonator Aspartat in den Zyklus. Im Harnstoffzyklus entstehendes Fumarat wird im sog. Aspartatzyklus über die Zwischenstufen Fumarat, Malat und Oxalacetat (Aspartat-Aminotransferase) in Aspartat umgewandelt, welches dann wieder in den Harnstoffzyklus eingespeist wird. Somit teilen sich Harnstoff- und Citratzyklus eine ganze Reihe von Dicarboxylaten und sind über diese gewissermaßen funktionell gekoppelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Dicarboxylate ein unverzichtbarer Bestandteil vieler lebenswichtiger Stoffwechselprozesse, wie z.B. der Biosynthese von Kohlenhydraten, Fetten und Aminosäuren, sind. Darüber hinaus sind sie zwingend notwendig für den oxidativen Substratabbau zur Energiegewinnung und zur Ammoniakentgiftung des Organismus.

In dieser Arbeit wurde der Natrium-abhängige Dicarboxylat-Cotransporter-3 der Winterflunder (fNaDC-3) näher untersucht, welcher zusammen mit anderen Substraten (siehe Tabelle 2) oben genannte Di- und Tricarboxylate transportiert.

1.2 Die Funktion des Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporters-3 im Organismus

Der Natrium-abhängige Dicarboxylat-Cotransporter-3 ist in verschiedenen Organsystemen mehrerer Spezies entdeckt worden. Neben den hier ausführlicher behandelten Organen Niere, Leber und Zentralnervensystem kommt er auch Spezies-spezifisch in Darm, Pankreas und Plazenta vor. Einen Überblick über das Vorkommen des NaDC-3 in den verschiedenen Spezies und den jeweiligen Organen gibt Tabelle 1. Darüber hinaus scheint der NaDC-3 eine Rolle im Zellalterungsprozess zu spielen.

Transporter	Spezies	Organ	Referenz
hNaDC-3	Mensch	Gehirn, Leber, Niere, Pankreas, Plazenta	WANG H et al. 2000
rNaDC-3	Ratte	Gehirn, Leber, Niere, Plazenta	CHEN X et al. 1999; KEKUDA et al. 1999
mNaDC-3	Maus	Gehirn, Niere	PAJOR et al. 2001
xNaDC-3	Frosch (<i>Xenopus</i>)	Herz, Darm, Leber, Niere	OSHIRO und PAJOR 2005
fNaDC-3	Flunder (<i>Pleuronectes americanus</i>)	Niere	STEFFGEN et al. 1999

Tabelle 1: Überblick über den klonierten Transporter NaDC-3 und seine Organverteilung in den jeweiligen Spezies.

Niere

In der proximalen Nierentubuluszelle werden Di- und Tricarboxylate sowohl über die luminalen als auch über die basolaterale Membran aufgenommen (PAJOR 1999; PAJOR 2000; MARKOVICH und MURER 2004). Hierfür verantwortlich sind die Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporter-1 (NaDC-1) in der luminalen und die Natrium-abhängigen

Dicarboxylat-Cotransporter-3 (NaDC-3) in der basolateralen Membran, welche v. a. im S3-Segment des proximalen Tubulus vorkommen (CHEN XZ et al. 1998; SEKINE et al. 1998).

Die Aufgaben der NaDCs bestehen zum einen in der Versorgung proximaler Tubuluszellen mit Di- und Tricarboxylaten des Citratzyklus als Substrate der Glukoneogenese (SIMPSON 1983; MANDEL 1985; WIRTHENSON und GUDER 1986). Daneben speist ein Großteil der intrazellulär akkumulierenden Dicarboxylate (DANTZLER 2002) jedoch die Aufnahme organischer Anionen über die basolaterale Membran (SHIMADA et al. 1987; PRITCHARD 1988) und dient somit der Fremdstoffausscheidung. Beide NaDCs transportieren ca. 60% des α -Ketoglutarates in die Zelle, wobei der NaDC-3 mit ca. 85 % die Hauptarbeit leistet. So weisen NaDC-1 defiziente Mäuse, außer einer erhöhten Dicarboxylatausscheidung, keinerlei Beeinträchtigung der Nierenfunktion unter physiologischen und ischämischen Stressbedingungen auf (HO et al. 2007). Die restlichen 40 % der Dicarboxylate werden über den Zellstoffwechsel zur Verfügung gestellt (DANTZLER 2002).

Mittlerweile sind zwei Transporter für organische Anionen, die Organischen-Anionen-Transporter-1 und -3 (OAT-1 und OAT-3), in der basolateralen Membran lokalisiert worden (MOTOASHI et al. 2002; KOJIMA et al. 2002). Diese funktionieren als Anionenaustauscher, indem sie organische Anionen aus dem Interstitium im Austausch gegen intrazelluläres α -Ketoglutarat in die Zelle aufnehmen. Diese funktionelle Kopplung des basolateralen NaDC-3 an OAT-1 und -3 (Übersichtsarbeiten in: BURCKHARDT BC und BURCKHARDT G 2003; KOESELL und ENDOU 2004; ANZAI et al. 2006) ist die Voraussetzung für die Sekretion einer großen Anzahl von organischen Anionen, darunter viele Fremdstoffe wie z.B. Pharmaka. Motor dieser Transportprozesse ist die Na^+/K^+ -ATPase in der basolateralen Membran. Dieser (primär-)aktive Transport schafft die Voraussetzung für den (sekundär-)aktiven Transport von α -Ketoglutarat in die Zelle, welcher wiederum die (tertiär-)aktive Aufnahme organischer Anionen ermöglicht (DANTZLER 2002). Diese werden anschließend in einem zweiten Schritt über weitere Proteine in der luminalen Membran, wie z.B. den OAT-4 (HAGOS et al. 2006), in das Tubuluslumen ausgeschieden.

Klinische Bedeutung erlangt der NaDC-3 durch seine Beteiligung an der Sekretion einer Vielzahl häufig eingesetzter Pharmaka wie z.B. β -Laktam-Antibiotika, nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR), Diuretika, ACE-Hemmer, AT_1 -Rezeptorantagonisten und antiretrovirale Medikamente (SEKINE et al. 2000; BURCKHARDT G und WOLFF 2000; INUI et al. 2000; DRESSER et al. 2001; BURCKHARDT BC und BURCKHARDT G 2003). Des Weiteren

könnte eine Überexpression von NaDC im proximalen Tubulus die Entstehung von Nierensteinen durch Hypocitratämie im Primärharn begünstigen. Citrat fungiert als Chelatkomplexbildner für Calcium-Ionen und senkt so die Konzentration freien Calciums, dem Risikofaktor für die Entstehung von Nierensteinen, im Primärharn ab (PAK 1987).

Leber

Der Natrium-abhängige Dicarboxylat-Cotransporter-3 der Leber ist in der Sinusoidalmembran (= basolaterale Membran) der perivenösen Hepatozyten zu finden (CHEN X et al. 1999). Ebenfalls nur perivenös lokalisiert ist die Glutamin-Synthase, welche durch Einbau von Ammoniak in Glutamat einen wichtigen Beitrag zur Ammoniakfixierung leistet. Für die Glutamin-Synthase werden Dicarboxylate benötigt, die über den NaDC-3 in die Hepatozyten transportiert werden können (CHEN X et al. 1999). Der Großteil des aus der Pfortader kommenden Ammoniaks wird durch Enzyme des in den periportalen Hepatozyten gelegenen Harnstoffzyklus entgiftet. Diejenige Menge an Ammoniak, die nicht im vorgeschalteten Harnstoffzyklus eliminiert werden konnte, kann so mit Hilfe des NaDC-3 in perivenösen Hepatozyten als Glutamin fixiert werden.

Ähnlich wie in der Niere besteht auch in der Leber eine funktionelle Kopplung zwischen Transportern für Dicarboxylate (Chen X et al. 1999) und den ebenfalls in der Sinusoidalmembran gelegenen Transportern für organische Anionen oder Polypeptide (OATP). Diese Kopplung ist aber noch nicht ausreichend geklärt.

Zentralnervensystem

Im Zentralnervensystem von Menschen und Ratten konnte der Natrium-abhängige Dicarboxylat-Cotransporter-3 in den Meningen in Arachnoida und Pia mater, im Cortex in Astrozyten und im Cerebellum in den Bergmann-Gliazellen nachgewiesen werden (HUANG et al. 2000). *N*-Acetylaspartat, welches in den Neuronen synthetisiert wird, wird über den NaDC-3 in Astrozyten aufgenommen, wo die Acetyl-Gruppe durch Aspartoacylase II abgespalten wird (HUANG et al. 2000; GEORGE et al. 2004). Die Acetyl-Gruppen werden für die Synthese von Neurolipiden verwendet, die besonders für die Hirnentwicklung eine wichtige Rolle spielen und eng mit dem Myelinisierungsprozess verknüpft sind (BURRI et al. 1991). Ein Defekt der Aspartatoacylase II stellt die Ursache des Morbus Canavan dar, der zu spongiformer Degeneration der weißen Substanz (Leukodystrophie) mit mentaler Retardierung und Optikusneuropathie führt (MATALON und MICHALS-MATALON 1999). Dies

lässt vermuten, dass ein Defekt des *N*-Acetyl-Aspartat-Transportes via NaDC-3 ebenfalls ursächlich sein könnte für degenerative Erkrankungen der weißen Substanz durch gestörte Myelinisierung (FUJITA et al. 2005).

Zellalterung

An Menschen- und Rattennieren konnte beobachtet werden, dass der Natrium-abhängige Dicarboxylat-Cotransporter-3 der proximalen Tubuluszellen mit zunehmendem Alter vermehrt exprimiert wird, so dass Nieren älterer Menschen oder älterer Ratten im Vergleich zu Nieren jüngerer Menschen und Ratten eine signifikant höhere Anzahl dieser Transportproteine aufweisen (WANG J et al. 2003). Dadurch werden vermehrt Dicarboxylate zur Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung in die Zelle transportiert, was neben vermehrter Energiebereitstellung auch zur vermehrten Entstehung freier Sauerstoffradikale führt. Diese spielen eine entscheidende Rolle in der Zellalterung (LENAZ et al. 2002). Vereinbar mit diesen Erkenntnissen ist, dass eine Mutation des *INDY*-Genes von *Drosophila melanogaster* durch verminderte Expression von NaDC-3 zu einer deutlichen Verlängerung der Lebenserwartung führt (ROGINA et al. 2000). Dies lässt darauf schließen, dass eine moderate kalorische Reduktion durch Verminderung der NaDC-3-Aktivität zu erhöhter Lebenserwartung von Zellen bzw. Organismen führt (ROGINA et al. 2000). Diese Spekulation bezieht sich aber nur auf den in Fruchtfliegen vorhandenen Transporter.

1.3 Charakterisierung des Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporters-3

1.3.1 Die SLC13-Genfamilie

Der Natrium-abhängige Dicarboxylat-Cotransporter-3 (NaDC-3) ist ein Mitglied der SLC13-Genfamilie, zu welcher neben den Natrium-Dicarboxylat-Transportern auch Natrium-Sulfat-Transporter gehören (MARKOVICH und MURER 2004; PAJOR 2006). SLC ist die Abkürzung für **S**olute **C**arrier (HEDIGER et al. 2004). Die Transporter dieser Genfamilie kommen sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten vor (MARKOVICH und MURER 2004). Neben den Vertebraten (siehe Tabelle 1) wurden in jüngerer Zeit neue Mitglieder der SLC13-Familie in Insekten, Nematoden, Pflanzen und Bakterien entdeckt (PAJOR 2006). Die Transporter von Vertebraten und Non-Vertebraten unterscheiden sich in ihren Eigenschaften voneinander.

So sind alle Proteine der vertebraalen Vertreter Na^+ -abhängige Cotransporter, die auf der Plasmamembran exprimiert werden. Sie präferieren Natrium als kationisches Substrat und transportieren dieses im Symport mit dem Anion, Sulfat oder entsprechenden Dicarboxylat in einem stöchiometrischen Verhältnis von 3:1 (MARKOVICH und MURER 2004). Die Genfamilie der Vertebraten gliedert sich in die Unterfamilien SLC13A 1-5 auf (siehe Abbildung 1). Die Vertreter der Non-Vertebraten dagegen sind nicht zwingend Na^+ -abhängige Cotransporter und sind meist intrazellulär lokalisiert (PAJOR 2006).

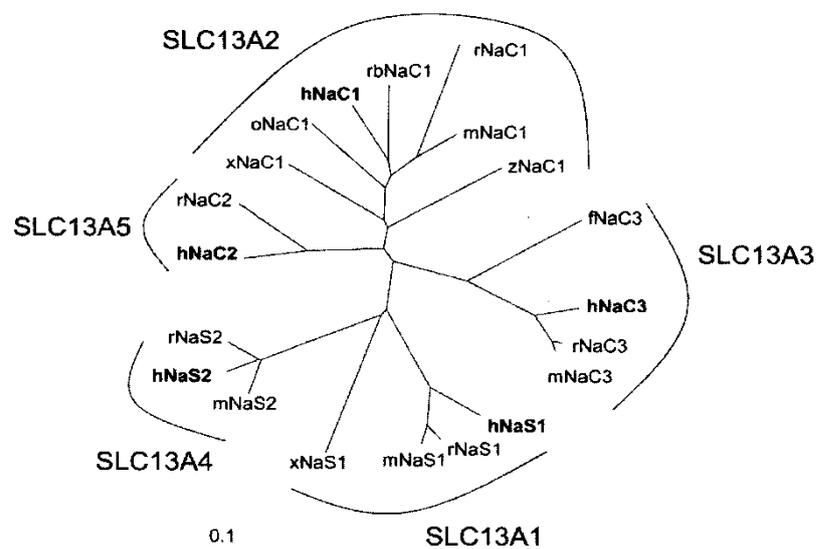


Abbildung 1: Darstellung des phylogenetischen Baumes der SLC13A3-Genfamilie (aus: MARKOVICH und MURER 2004, S.596). Die gewählten Abkürzungen stehen für: human (h), mouse (m), opossum (o), rat (r), winter flounder (f), xenopus (x), zebrafish (z). Es besteht eine enge Verwandtschaft zwischen dem Ortholog der Maus und dem der Ratte. Dem fNaDC-3 der Flunder ist der hNaDC-3 am nächsten verwandt.

1.3.2 Eigenschaften des Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporters der Flunder (fNaDC-3) und des Menschen (hNaDC-3)

Sowohl der NaDC-3 der Winterflunder (*Pleuronectes americanus*) als auch der NaDC-3 des Menschen gehören zur Familie der SLC-13A3. Die wichtigsten Eigenschaften der SLC13A3 sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die cDNA des fNaDC-3 besteht aus 2384 Nukleotiden und kodiert für ein Protein aus 601 Aminosäuren, das ein errechnetes Molekulargewicht von 66,4 kDa aufweist (STEFFGEN et al. 1999). Vermutlich besitzt fNaDC-3 11 – 12 Transmembrandomänen (STEFFGEN et al. 1999).

Das Gen des hNaDC-3 wurde mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation (FISH) auf dem langen Arm des Chromosom 20 (20q12-13.1) lokalisiert und besteht aus 13 Exons und 12 Introns (WANG H et al. 2000). Die cDNA ist 3481 Basenpaare lang und kodiert für ein Protein aus 602 Aminosäuren, das vermutlich 11 - 12 Transmembrandomänen besitzt (WANG H et al. 2000). Das berechnete Molekulargewicht beträgt 66,9 kDa (WANG H et al. 2000.)

Genname	SLC13A3
Name des Proteins	NaC3
weitere verwendete Namen	NaDC-3 (WANG H et al. 2000; STEFFGEN et al. 1999; KEKUDA et al. 1999) SDCT2 (CHEN X et al. 1999)
Substrate	Succinat > Fumarat > α -Ketoglutarat > Glutarat > 2,3 Dimethylsuccinat > cis-Aconitat > Citrat > Isocitrat > Pyruvat > Malat*, Oxalacetat (WANG H et al. 2000), N-Acetylaspartat (HUANG et al. 2000), 2,2- und 2,3-Dimethylsuccinat, 2,3-Dimercaptosuccinat (BURCKHARDT BC et al. 2002), Benzylpenicillin (BURCKHARDT BC et al. 2004), D- und L-2 und 3-Hydroxyglutarat (HAGOS et al. 2008)
NaDC-3, K_M für Succinat	10 – 140 μM^{**} (PAJOR et al. 2001; WANG H et al. 2000)
fNaDC-3, K_M für Succinat	22 μM (HAGOS et al. 2006)
hNaDC-3, K_M für Succinat	25 μM (BURCKHARDT BC et al. 2004)
Transportmodus	Cotransport des divalenten Anions mit 3 Natrium-Ionen
Vorkommen (Protein) in den Nieren	basolaterale Membran des PII-Segments der Flunder (HENTSCHEL et al. 2003), basolaterale Membran des proximalen Tubulus (WANG J et al. 2003)

Tabelle 2: Die wichtigsten Eigenschaften der SLC13A3 / NaDC-3-Familie.

*Substrataufnahme des fNaDC-3 in abnehmender Reihenfolge (aus STEFFGEN et al. 1999, S.20195).

** Die Affinität für Succinat variiert in Abhängigkeit der Spezies, des Expressionssystems, sowie der Nachweismethode.

1.3.3 Entstehung des Einwärtsstromes

Für die Experimente wurde Succinat als Kontrollsubstanz verwendet, da es das Substrat des NaDC-3 ist (WANG H et al. 2000) und langsamer verstoffwechselt wird als α -Ketoglutarat. WANG H et al. konnten im Jahre 2000 in ihren Studien in Analogie zu früheren Studien an Vesikeln aus der basolateralen Membran an der Rattenniere in situ feststellen, dass Dicarboxylate mit vier oder fünf C-Atomen, wozu Succinat gehört, Substrate des NaDC-3 sind.

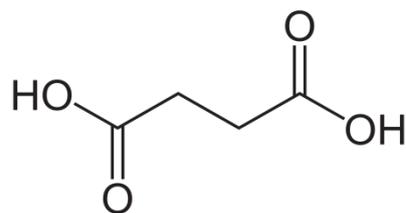


Abbildung 2: Strukturformel von Succinat (Säureform)

Der NaDC-3 ist ein Natrium-gekoppelter Transporter, der ein divalentes Dicarboxylat zusammen mit 3 Natrium-Ionen transloziert. Dadurch gelangt mit jedem transportierten Dicarboxylat eine positive Überschussladung in die Zelle, die bei konstantem Potential als Einwärtsstrom gemessen werden kann (Abbildung 3A). Im Falle der fNaDC-3 exprimierenden Oozyten heißt dies, dass der Einwärtsstrom nur so lange anhält, wie die Oozyte mit Succinat superperfundiert wird. Wird die Succinatperfusion abgestellt, kehrt der Haltestrom wieder auf sein Ursprungsniveau zurück (Abbildung 3B). Im Folgenden werden gemessene Einwärtsströme mit dem Vorzeichen -, Auswärtsströme mit dem Vorzeichen + gekennzeichnet.

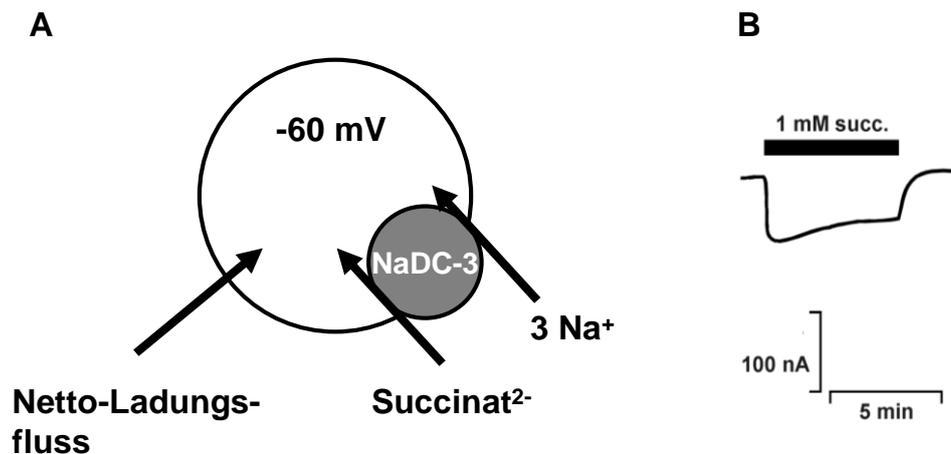


Abbildung 3: Vereinfachtes Schema zur Erklärung des beobachteten Einwärtsstromes

1.4 Die Eigenschaften der Aminosäuren an Position 114 im Dicarboxylat-Cotransporter der Flunder (fNaDC-3)

Aminosäuren sind die Polymerbausteine der Proteine, welche den bedeutendsten Teil organischer Makromoleküle in Zellen, Geweben und Organen ausmachen. Proteine nehmen hochspezialisierte Funktionen z.B. als Membran- und Zytoskelettbausteine, Katalysatoren chemischer Reaktionen, Signaltransduktoren oder aber als Transporter in der Zellmembran wahr. Ein solcher Transporter ist z.B. der in dieser Arbeit näher untersuchte fNaDC-3.

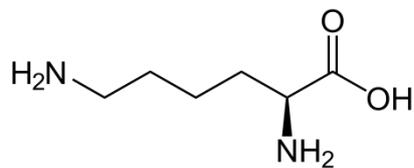
In allen Lebensformen setzen sich die Proteine aus den 20 sogenannten proteinogenen Aminosäuren zusammen. Das Grundgerüst einer jeden Aminosäure besteht aus einer Carboxyl- sowie einer Aminogruppe, einem Wasserstoffatom und einer Seitenkette, welche sich alle um das $\alpha\text{-C}$ -Atom gruppieren. Durch den unterschiedlichen Bau der Seitenketten unterscheiden sich die Aminosäuren in ihren physiologischen und chemischen Eigenschaften. Die strukturbildenden und funktionellen Eigenschaften der Proteine werden durch eine determinierte Sequenz von Aminosäuren bestimmt.

So können beispielsweise in/an Transmembrandomänen gelegene Aminosäuren die Funktion von Transportproteinen beeinflussen.

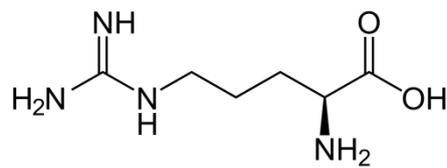
Im Wildtyp des fNaDC-3 befindet sich Lysin in der Transmembrandomäne 4 an Position 114. In den Mutanten des Wildtyps wurde Lysin durch Arginin, Glutamin, Isoleucin und Glutamat ersetzt.

Aminosäure an Position 114	Abkürzung	Buchstabensymbol	Bezeichnung fNaDC-3
Lysin	Lys	K	K114 (Wildtyp)
Arginin	Arg	R	K114R
Glutamin	Gln	Q	K114Q
Isoleucin	Ile	I	K114I
Glutamat	Glu	E	K114E

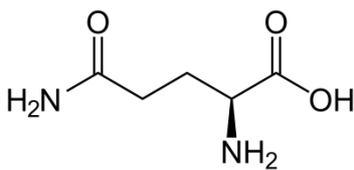
Tabelle 3: Überblick über den Wildtyp des fNaDC-3 und seine Mutanten



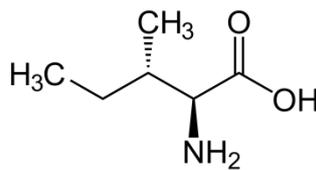
Lysin



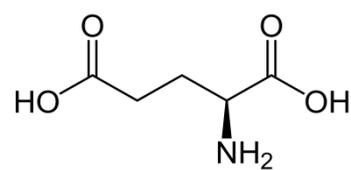
Arginin



Glutamin



Isoleucin



Glutamat (Säureform)

Abbildung 4: Strukturformeln der Aminosäuren

Aminosäure	Polarität der Seitenkette	Ladung der Seitenkette (pH 7,4)	Isoelektrischer Punkt (pH)
Lysin	polar (hydrophil)	positiv geladen (basisch)	9,82
Arginin	polar (hydrophil)	positiv geladen (basisch)	11,20
Glutamin	polar (hydrophil)	ungeladen (neutral)	5,65
Isoleucin	apolar (hydrophob)		5,94
Glutamat	polar (hydrophil)	negativ geladen (sauer)	3,22

Tabelle 4: wichtige Eigenschaften der Aminosäuren

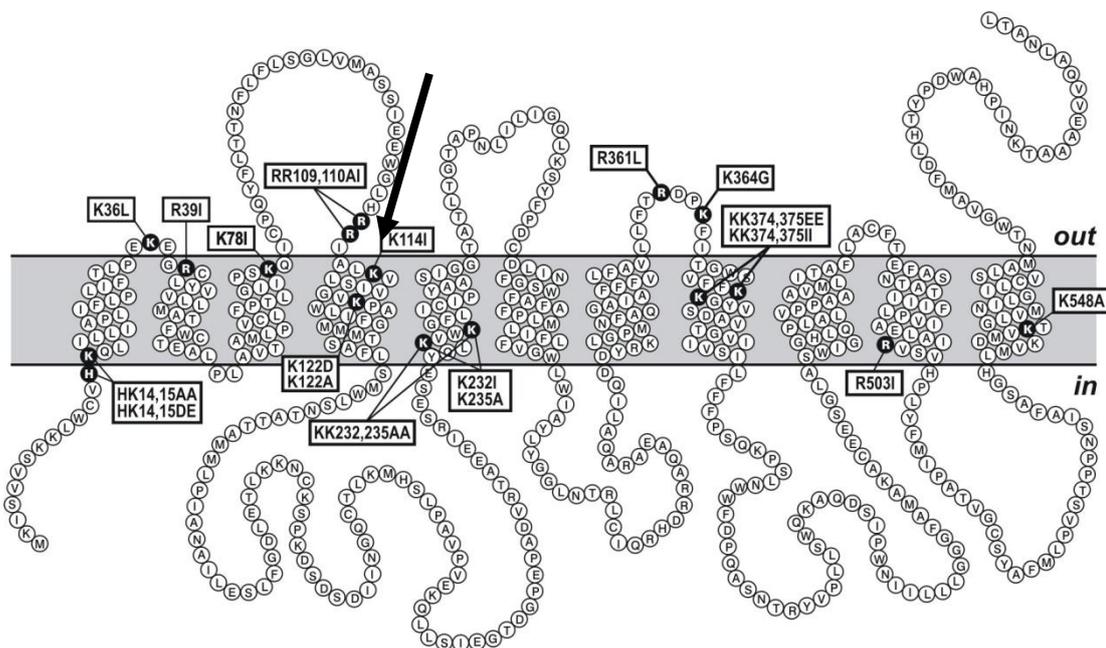


Abbildung 5: Transmembrandomänen

Vorläufiges, berechnetes Modell der Sekundärstruktur des Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporters-3 der Winterflunder (*fNaDC-3*) mit 11 Transmembrandomänen. Die Berechnung erfolgte durch das Programm TopPred2. Die Aminosäure Lysin an Position 114 (schwarzer Pfeil) wurde in dieser Arbeit durch die Aminosäuren Arginin, Glutamin, Isoleucin und Glutamat ersetzt.

1.5 Zielsetzungen

In dieser Arbeit wurden der fNaDC-3 der Winterflunder (*Pleuronectes americanus*) und seine Mutanten untersucht. In diesen wurde die Aminosäure Lysin an Position 114 des Wildtyps (K114) durch die Aminosäuren Arginin (K114R), Glutamin (K114Q), Isoleucin (K114I) und Glutamat (K114E) ausgetauscht. Der fNaDC-3 wurde vor allem ausgewählt, da sich im Gegensatz zum hNaDC-3 deutlich größere Einwärtsströme messen lassen, was für die Auswertung von großem Vorteil ist. Lysin an Position 114 ist hochkonserviert und an dieser Stelle in den NaDC-3 aller Spezies zu finden.

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass dem kationischen Lysin an dieser Position eine wichtige Rolle in der Erkennung der anionischen Substrate zukommen würde.

HAGOS et al. untersuchten 2006 die funktionelle Rolle einiger kationischer Aminosäuren des fNaDC-3, darunter auch Lysin an Position 114. Lysin wurde zunächst durch Isoleucin, später dann auch durch Arginin, Glutamin und Glutamat ersetzt. Auffällig war, dass alle Mutanten in Aufnahme-Experimenten ein dem Wildtyp ähnliches Transportverhalten zeigten. In den elektrophysiologischen Experimenten jedoch zeigte lediglich die Argininmutante (K114R) einen vergleichbaren Einwärtsstrom. Die restlichen Mutanten wiesen allesamt deutlich niedrigere Einwärtsströme auf.

Hieraus konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine positive Ladung an Position 114 (Lysin, Arginin) weniger für die Substraterkennung, sondern vielmehr für die Aufrechterhaltung des elektrogenen Transportes durch Translokation von 3 Natrium-Ionen mit einem divalenten Dicarboxylat von Bedeutung ist (HAGOS et al. 2006).

Aufbauend auf diese Erkenntnisse soll in meiner Arbeit durch Variation derjenigen Faktoren, welche die Stöchiometrie beeinflussen, das Transportverhalten von fNaDC-3 und seiner Mutanten näher untersucht werden. Hierzu soll das Verhalten von Wildtyp und Mutanten in natriumhaltigen und in natriumfreien Kontroll- und Testlösungen, sowie das Verhalten in lithiumhaltigen Kontroll- und Testlösungen untersucht werden. In den Experimenten wurde den Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) cRNA des fNaDC-3 der Flunder injiziert. Nach Expression dieses Transporters auf der Oberfläche wurden die Oozyten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme untersucht.

Die Oozyten wurden mit den zu untersuchenden Lösungen superperfundiert, anhand der Substrat-induzierten Ströme ließen sich Rückschlüsse auf Interaktionen mit dem Transporter ziehen. Des Weiteren wurden Transport-Experimente mit radioaktiv markiertem Substrat im Isotopenlabor des Institutes durchgeführt. Mittels eines Flüssigkeits-Szintillations-Zählers konnte die aufgenommene Substratmenge bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen und Chemikalien

2.1.1 Kontrolllösungen für die elektrophysiologischen Messungen

Kontrolllösung ORi (ORi, Na)

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mM)	Bezugsfirma
NaCl	58,44	110	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
KCl	74,56	3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
CaCl ₂	147,02	2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	238,31	5	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 5: Zusammensetzung der Kontrolllösung ORi: ORi = Oozyten-Ringer;

HEPES: N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)

Kontrolllösung ORi₁ (ORi, Ø Na, NMDG)

Für die Natrium-freie Kontrolllösung ORi₁ wird Natriumchlorid (NaCl) durch eine äquimolare Menge an *N-Methyl-D-Glucamin* (NMDG) ersetzt. Im Folgenden wird das Kation Na⁺ in Lösung als NaCl vereinfachend als Natrium bezeichnet.

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mM)	Bezugsfirma
NMDG*	195,22	110	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
KCl	74,56	3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
CaCl ₂	147,02	2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	238,31	5	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

*Tabelle 6: Zusammensetzung der Natrium-freien Kontrolllösung ORi₁. *Da NMDG nicht als Chloridsalz vorliegt, muss dieses durch Hinzufügen von 55 ml einer 2N HCl-Lösung hergestellt werden.*

Kontrolllösung ORi₂ (ORi, Ø Na, Li)

Für die Natrium-freie Kontrolllösung ORi₂ wird Natriumchlorid (NaCl) durch eine äquimolare Menge an Lithiumchlorid (LiCl) ersetzt. Im Folgenden wird das Kation Li⁺ in Lösung als LiCl vereinfachend als Lithium benannt.

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mM)	Bezugsfirma
LiCl	42,39	110	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
KCl	74,56	3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
CaCl ₂	147,02	2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	238,31	5	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 7: Zusammensetzung der Natrium-freien Kontrolllösung ORi₂.

Alle Kontrolllösungen werden, unabhängig von ihrer Zusammensetzung, mit Tris (Trisaminomethan, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) auf einen pH-Wert von 7,5 bei Raumtemperatur eingestellt.

2.1.2 Testlösungen für die elektrophysiologischen Messungen

Die Herstellung der einzelnen Testlösungen erfolgte durch Lösen der entsprechenden Substanzen in den jeweiligen Kontrolllösungen und durch anschließende Titration auf einen pH-Wert von 7,5. Da die höchste Konzentration einer Testsubstanz 5 mM betrug, wurde, da in Vorversuchen getestet, auf den osmotischen Ausgleich von ORi und Testlösung verzichtet. Die Testlösungen beinhalteten das prototypische Substrat des fNaDC-3, Natriumsuccinat, in einer festen Konzentration von 1 mM zum Überprüfen der Expression und aufsteigende Konzentrationen an Lithiumchlorid, einem potenziellen Hemmstoff der Succinat-assoziierten Ströme. Im Folgenden wird das Anion Succinat in Lösung als Natriumsuccinat vereinfachend als Succinat benannt.

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mM)	Bezugsfirma
LiCl	42,39	0,2	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
		0,5	
		1,0	
		2,0	
		5,0	
Natriumsuccinat	270,1	1,0	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

Tabelle 8: Konzentrationen der Testsubstrate

2.1.3 Kontroll- und Testlösungen für die radiochemische Aufnahme

Als Kontrolllösungen für die Aufnahme von [^{14}C]Succinat dienten ORI, ORI₁ und ORI₂, deren Zusammensetzung in 2.1.1 beschrieben wurde. Da in einer Versuchsreihe die Aktivierung der Aufnahme von [^{14}C]Succinat als Funktion der Natriumkonzentration ermittelt werden soll, müssen die Konzentrationen von Natriumchlorid und NMDG (Tabelle 9) gegeneinander variiert werden, so dass immer eine Gesamtkonzentration von 110 mM eingehalten wird.

Kontrolllösung ORI		Kontrolllösung ORI ₁	
NaCl (mM)	ORI (ml)	NMDG (mM)	ORI ₁ (ml)
0	0	110	20
10	1,8	100	18,2
25	4,5	85	15,5
50	9,1	60	10,9
75	13,6	35	6,4
110	20	0	0

Tabelle 9: Variation der Natriumkonzentration (Gesamtvolumen 20 ml)

Zur Überprüfung der Expression wurde [^{14}C]Succinat (Tabelle 10) den jeweiligen Kontrolllösungen zugesetzt, so dass die Endkonzentration für Succinat in allen Lösungen 18,1 μM betrug.

Substanz	mCi/mol	Konzentration (μM)	Bezugsfirma
[^{14}C]Succinat	17,0	18,1	NEN Life Science Products, Waltham, USA

Tabelle 10: Daten für [^{14}C]Succinat

2.2 Verwendung von *Xenopus-laevis*-Oozyten als Expressionssystem

Für alle Versuche wurden die Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (siehe Abbildung 6) verwendet. Seine natürliche Verbreitung beschränkt sich auf Afrika südlich der Sahara. Die Tiere wurden von der Firma Nasco, Fort Atkinson, USA bezogen. Sie werden dort ausschließlich für wissenschaftliche Zwecke gezüchtet.

Die Entnahme der Oozyten erfolgte durch eine Mitarbeiterin des Instituts, für die eine Ausnahmegenehmigung nach §6 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes vorlag. Aus dem Ovarläppchen wurden die einzelnen Oozyten durch Inkubation in Kollagenase (Typ CLS II, Biochrom AG, Berlin, 7 $\mu\text{g}/20\text{ ml ORI}$) über Nacht herausgelöst und am nächsten Morgen für ungefähr 10 Minuten in Ca^{2+} -freiem ORI inkubiert. Letzte Bindegewebsreste wurden manuell mit einer Pinzette entfernt und die nun einzeln vorliegenden Oozyten in ORI mehrmals gewaschen. Anschließend konnten unter mikroskopischer Kontrolle die Oozyten der Stadien V und VI nach Dumont (DUMONT 1972) herausgesucht werden, deren animalischer und vegetativer Pol klar voneinander abgegrenzt war (Abbildung 8).

Anschließend erfolgte die Injektion der Oozyten mit der cRNA des fNaDC3 (Wildtyp) und seiner Mutanten. Während aller Vorgänge, die den Umgang mit cRNA betrafen, wurden Handschuhe getragen und besonders darauf geachtet, dass die Arbeitsmaterialien nicht mit RNase oder mit Partikeln, welche die Injektionskanüle verstopfen könnten, kontaminiert wurden. Injiziert wurde unter binokularer Sicht (Wild M3C, Leica Mikrosystems GmbH, Wetzlar) mit Hilfe einer Mikroinjektionpumpe (Drummond, World Precision Instruments, Berlin), welche pro Oozyte 23 nl cRNA injizierte. Die jeweilige cRNA wurde von einem Mitarbeiter des Institutes mit dem Verfahren der „site-directed mutagenesis“ hergestellt und lag in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vor. Zur Injektion wurden die Oozyten auf einer speziellen Injektionsbank (Abbildung 10) in ORI-Lösung platziert und direkt mit einer

Glasmikroinjektionskanüle angestochen. Diese wurde in einem Kapillarschlingenziehgerät „Puller“ (Typ PE-2, Narishige, Tokio, Japan) hergestellt (Abbildung 9) und musste vor Beginn der Injektion unter binokularer Sicht mit einer Schere so gekürzt werden, dass eine Öffnung mit einem Durchmesser zwischen 10 und 20 μm entstand. Nach Füllung der Kanüle mit Mineralöl (Mineral Oil for Molecular Biology, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA) vom Kanülenende her konnte cRNA über die Kanülenspitze angesaugt werden. Schließlich wurden 23 nl cRNA pro Oozyte injiziert. In Kontrolloozyten wurden 23 nl H_2O injiziert. Dies ist notwendig, um sicherzustellen, dass die Substrate tatsächlich über den fNaDC-3 und nicht etwa über endogene, in der Oozyte schon selbst vorhandene Transportmechanismen transportiert werden. Die Eignung von *Xenopus*-Oozyten als Expressionssystem wird ausführlich in Kapitel 4 (Diskussion) besprochen.

Anschließend erfolgte die Aufbewahrung der Oozyten in 24-Lochplatten. Jede der Lochplattenvertiefungen war mit 2 ml einer Nährlösung gefüllt, welche aus Oozyten-Ringer (ORi), 2,5 mM Natriumpyruvat (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA) als Nährstoff und 0,35 mg/ml Gentamicin (AppliChem GmbH, Darmstadt) zur Prophylaxe von Bakterienbesatz bestand. Nach drei- bis viertägiger Inkubation bei $+16^\circ\text{C}$ in einem Inkubator (Liebherr AG, Kirchdorf, Umbau auf 16°C durch die Institutswerkstatt), täglichem Mediumwechsel und Entfernung abgestorbener und geschädigter Oozyten konnten die verbliebenen Oozyten für Untersuchungen genutzt werden. Zu einem früheren Zeitpunkt hatten sie den Transporter nicht genügend in ihrer Zellmembran exprimiert, so dass das Signal des Succinat-induzierbaren Stromes so gering war, dass keine verlässlichen Aussagen möglich waren.



Abbildung 6: Xenopus-laevis-Weibchen



Abbildung 7: Ansicht der rechten Inguinalregion mit Ovarläppchen nach Inzision



Abbildung 8: Abbildung eines Ovarlappchens nach der Entnahme aus dem Tier. Oozyten des Stadiums V und VI nach Dumont (DUMONT 1972) sind an den deutlich voneinander abgegrenzten animalischen und vegetativen Polen zu erkennen. Nur Oozyten solcher Stadien besitzen die Fähigkeit, artfremde cRNA zu transkribieren und zu translatieren.



Abbildung 9: Kapillarschlingenziehgerät „Puller“ zur Herstellung von Glasmikroinjektionskanülen und Glasmikroelektroden. Eine dünne unter Zugspannung stehende Glaskapillare wird in der Mitte von einer Heizspirale erhitzt und die beiden Enden mit hoher Geschwindigkeit durch einen Elektromagneten auseinandergezogen. So entstehen zwei Glaskapillaren mit konisch zulaufenden Spitzen.

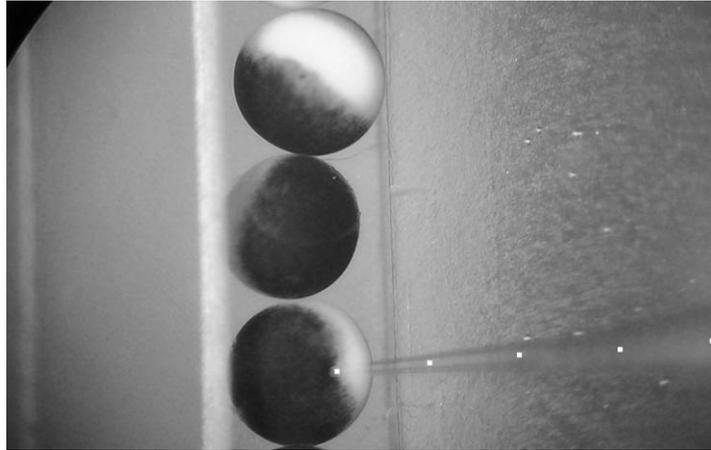


Abbildung 10: Injektion einer Oozyte. Die Injektion erfolgt mit Hilfe einer Mikroinjektionspumpe, welche 23 nl crRNA über eine Glasmikroinjektionskanüle appliziert. Das kurze Eindellen der Oozyte während der Injektion ist deutlich zu sehen. Der Verlauf der Injektionskanüle ist zur besseren Sichtbarkeit mit weißen Quadraten markiert.

2.3 Elektrophysiologische Messungen

2.3.1 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme – Two Electrode Voltage Clamp

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) ist eine elektrophysiologische Methode, die es ermöglicht, die Eigenschaften von Ionenkanälen und elektrogenen Membrantransportproteinen an Zellen zu untersuchen. Grundlage dieser Technik ist, ein vorgegebenes Membranpotenzial auf einem festgelegten Wert durch Einspeisen eines Kompensationsstromes aufrechtzuerhalten. Hierzu sind zwei Mikroelektroden nötig. Über die eine Elektrode wird die intrazelluläre Spannung gemessen. Weicht das erfasste Membranpotenzial von dem vorgegebenen Sollwert ab, so veranlasst dieses Signal die Einspeisung eines gleichwertigen, aber entgegengesetzten Stromes über die zweite Elektrode. Der elektrische Fluss der Ionen wird dadurch kompensiert und das Membranpotenzial bleibt konstant. So kann das elektrische Verhalten einer Zelle unter verschiedenen vorgegebenen Spannungswerten untersucht werden, wobei der einzuspeisende Strom immer den Ladungsverschiebungen über der Membran entspricht.

Für die Durchführung von Experimenten mit der TEVC werden ein Verstärker für die Potenzialmessung und ein Verstärker (OC-725C, Warner Instruments Corp., Hamden, USA)

zur Stromapplikation benötigt. Die Spannungen und eingespeisten Ströme werden von einem Zwei-Kanal-Schreiber (Typ BD 112, Kipp & Zonen, Delft, Niederlande) kontinuierlich aufgezeichnet. TEVC kann in zwei Modi betrieben werden. Im Current-Clamp-Modus werden Potenzialänderungen registriert, wohingegen im Voltage-Clamp-Modus die zur Konstanthaltung des vorgegebenen Potenzials zu induzierenden Ströme erfasst werden können.

Die Oozyten werden direkt mit KCl-gefüllten Glasmikroelektroden angestochen. Sie dienen zur Verlängerung der eigentlichen Elektroden, welche aus chloriertem Silberdraht (A-M Systems Inc., Carlsborg WA, USA) bestehen. Die Glasspitzen werden aus Borosilikatglaskapillaren (Biomedical Instruments, Zöllnitz) in einem Kapillarschlingenziehgerät „Puller“ hergestellt (Abbildung 9). Vor jeder Messung werden die Glasmikroelektroden mit Hilfe einer auf einer Spritze sitzenden flexiblen Kanüle mit einer 3 M Kaliumchlorid-Lösung gefüllt und über die Silberdrahtelektroden in den Elektrodenhalter gesteckt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftbläschen in den Glasspitzen verbleiben, damit eine störungsfreie elektrische Leitung zwischen Oozyte und Elektroden gewährleistet ist.

2.3.2 Aufbau der Messapparatur

Der Versuchsaufbau (Abbildung 11 A) befindet sich zur elektrischen und mechanischen Abschirmung in einem Faraday-Käfig (Eigenbau der Institutswerkstatt) und steht auf einer Tischplatte mit stoßdämpfendem Unterbau (Eigenbau der Institutswerkstatt), der vor mechanischen Erschütterungen und möglichem Herausrutschen der Elektroden und den damit verbundenen Verletzungen der Oozyten schützen soll.

Im Zentrum der Apparatur befindet sich eine Perfusionskammer (Eigenbau der Institutswerkstatt). Es handelt sich dabei um eine runde, ca. 1,5 cm starke Plexiglasscheibe, in die eine längliche, sich zu einer Seite erweiternde Aussparung eingelassen ist. Sie ist durch einen schmalen Steg, an dem die Oozyte platziert wird, geteilt. Dieser ist allerdings so niedrig, dass der ungehinderte Flüssigkeitsaustausch zwischen beiden Teilen der Kammer problemlos gewährleistet bleibt. Zwei dünne Polyäthylenschläuche führen auf der schmalen

Seite der Kammer die jeweiligen Testlösungen zu. Auf der gegenüberliegenden, verbreiterten Seite verbindet eine Bohrung das System mit einem Trichter, der die durchgelaufenen Perfusionsflüssigkeiten einem Sammelbehälter zuführt. Die Perfusionskammer ist über eine Agarbrücke und ein mit 3 M KCl-Lösung gefülltes Gefäß mit zwei chlorierten Silberdrahtelektroden verbunden. Dies ist Erdung und Referenzpunkt und schließt den Stromkreis, wenn die Mikroelektroden in der Oozyte platziert sind. Die Oozyte wird mit einer Pasteurpipette so im rechten Teil der Kammer neben dem Kunststoffsteg (Abbildung 11 B) platziert, dass dieser beim Anstechen als Widerlager dient. Die Elektroden werden manuell mit zwei Manipulatoren unter mikroskopischer Kontrolle in die Oozyte an den gegenüberliegenden Seiten eingestochen.

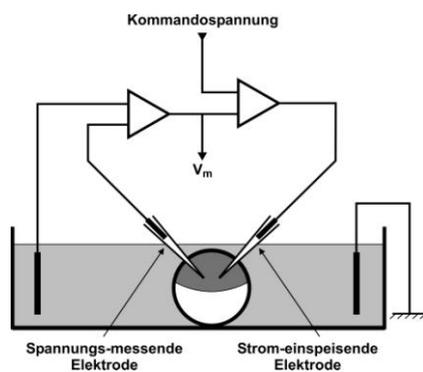
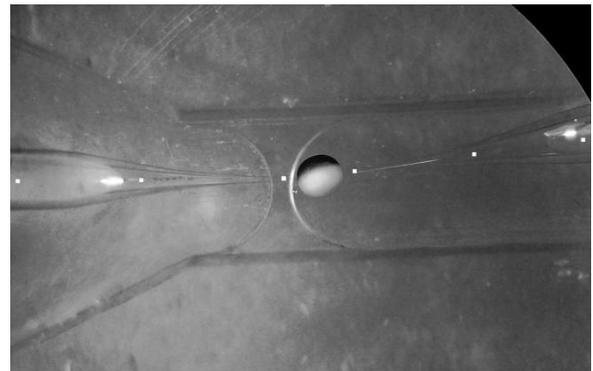
A**B**

Abbildung 11:

A: Schematischer Versuchsaufbau der TEVC

B: Angestochene Oozyte während der Messung. Zu beiden Seiten der Oozyte sind die Glasmikroelektroden, die die Spannung messen bzw. den Kompensationsstrom einspeisen, zu sehen. Die Glasmikroelektroden sind zur besseren Sichtbarkeit mit weißen Quadraten markiert.

2.3.3 Vorgehensweise

Nach dem Anstechen einer Oozyte wird diese zunächst mit ORi perfundiert bis sich ein stabiles Membranpotenzial zwischen -20 und -60 mV eingestellt hat. Dieses wird nach ca. 10 Minuten erreicht. Anschließend wird die Zelle auf eine Spannung von -60 mV „geklemmt“. Dieser Wert wird gewählt, weil er ungefähr dem Membranpotenzial einer frühproximalen Nierentubuluszelle entspricht. Nun wird die Oozyte mit ORi, dem 1 mM Succinat zugegeben ist, perfundiert. Das Vorliegen eines Einwärtsstromes (1.3.3, Abbildung 3) wird durch einen Ausschlag des kontinuierlich mitlaufenden Schreibers registriert. Hierdurch kann beurteilt werden, ob und wie intensiv das Transportprotein exprimiert ist. Succinat ist die Referenzsubstanz, von der bekannt ist, dass sie Substrat des NaDC-3 ist. Die Oozyte wird verworfen, wenn nach Applikation von Succinat kein Einwärtsstrom nachweisbar ist.

Zu Beginn eines jeden Experimentes wird eine Strom-Spannungskennlinie (I-V-Kennlinie) mit Succinat angefertigt, wobei jeder Messung eine Kontrollmessung mit ORi vorangeht (Abbildung 12 A). Das Potenzial wird alle 10 Sekunden von -60 mV in Schritten von 10 mV bis -90 mV, anschließend in denselben Abständen bis +10 mV und wieder zurück bis -60 mV verstellt. Nun wird die ORi- auf die ORi plus Succinat-Perfusion umgestellt und der Messvorgang wiederholt. Nach dieser Methode wird mit jeder weiteren Testlösung verfahren, wobei erst abzuwarten ist, dass sich der Ausgangswert für den einzuspeisenden Strom unter Perfusion mit ORi wieder eingestellt hat. Aus der Differenz der Werte mit und ohne Substrat lässt sich der Substrat-induzierbare Strom errechnen (Abbildung 12 B). Durch die I-V-Kennlinien können die Ergebnisse bei den verschiedenen Klemmspannungen miteinander verglichen werden.

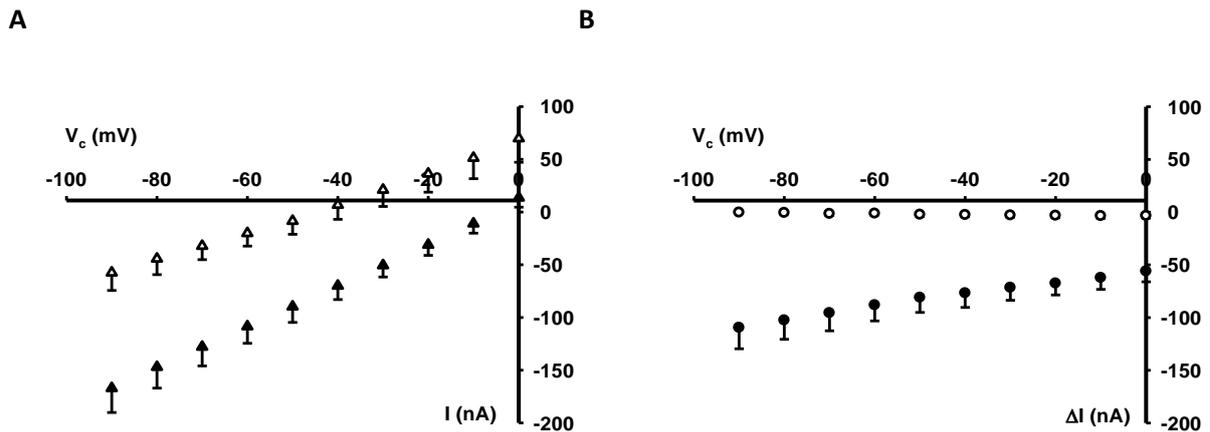


Abb. 12: Strom-Spannungskennlinien (I-V-Kennlinien) Succinat-induzierbarer Ströme in fNaDC-3 exprimierenden Oozyten. In **A** sind die Ströme in Ab- (\triangle) und Anwesenheit (\blacktriangle) von 1 mM Succinat, in **B** die Differenzströme in fNaDC-3 exprimierenden Oozyten (\bullet) und Wasser-injizierten Kontrolloozyten (\circ) dargestellt. Es handelt sich um Mittelwerte aus Messungen an 13 Oozyten aus 7 Spendertieren (fNaDC-3) und Messungen an 3 Oozyten aus 3 Spendertieren (Wasser-injizierte Kontrolloozyten).

2.4 Radiochemische Aufnahme von [¹⁴C]Succinat

Mithilfe dieser Experimente wurde untersucht, wieviel radioaktiv markiertes Succinat durch fNaDC-3 Moleküle oder die Mutanten dieses Transportproteins über die Oozytenmembran in das Zellinnere pro Zeiteinheit transportiert werden konnte. Alle Versuche erfolgten im Isotopenlabor des Institutes unter Plexiglasabschirmung (Eigenbau der Institutswerkstatt). Pro Bedingung wurden jeweils 10 Oozyten in 500 μ l Lösung, bestehend aus 495 μ l ORi und 5 μ l radioaktiv markiertem [¹⁴C]Succinat (NEN Life Science Products Inc., Boston, USA), inkubiert. Die Succinatkonzentration in allen Testlösungen betrug demnach 18,1 μ mol/l. Als Standardwerte wurden von jeder Testlösung 6 Proben à 5 μ l entnommen und jeweils in ein Szintillationsgefäß (Mini-Vial 6ml, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) gegeben. Die Oozyten wurden jeweils für eine Dauer von 30 min bei Raumtemperatur in der jeweiligen Testlösung inkubiert. Um die Aufnahme von [¹⁴C]Succinat zu stoppen und den Oozyten anhaftende Radioaktivität abzuwaschen, wurden diese dreimal hintereinander in 3 verschiedenen

Petrischalen mit eiskaltem ORI gewaschen. Anschließend wurde jede Oozyte in ein eigenes Szintillationsgefäß überführt und je 250 µl 1 N NaOH (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) zwecks Oozytenlyse zugegeben. Der Lyseprozess wurde durch automatisches Schütteln (Schüttelplatte, Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen) über 2 Stunden bei einer Frequenz von 150/min beschleunigt. Die anschließende Neutralisation des NaOH erfolgte durch Zugabe von 250 µl 1 N HCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Unter dem Abzug wurden nun pro Szintillationsgefäß 2,5 ml Szintillationslösung (Lumasafe, Lumac LSC, Groningen, Niederlande) zugefügt, die Szintillationsgefäße verschlossen, handgeschüttelt und schließlich zur Auszählung in einen Flüssigkeits-Szintillations-Zähler (TRI-CARB 2900 TR, Packard, USA) gestellt. Jedes Szintillationsgefäß wurde 5 min lang gemessen und dessen Aktivität in digits per minute (dpm) angegeben.

Anhand der gemessenen Aktivität der Standardwerte (A_{stand}) in dpm konnte nun die spezifische Aktivität (A_{spez} [dpm/pmol]) der einzelnen Inkubationsmedien errechnet werden:

$$A_{spez} = \frac{A_{stand}}{c_{succ}} * V_{stand}$$

Die Succinatkonzentration (c_{succ}) im Inkubationsmedium betrug bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche 18,1 µmol/l. Als Standardvolumen V_{stand} wurden, wie oben beschrieben, 5 µl pro Röhrchen entnommen. Anhand der gemessenen Aktivität für jede einzelne Oozyte (A_{oozyte} [dpm]) und der errechneten spezifischen Aktivität des entsprechenden Inkubationsmediums (A_{spez}) ließ sich die Aufnahme von Succinat (T_{succ} [pmol/min]) dann wie folgt errechnen.

$$T_{succ} = \frac{A_{oozyte}}{A_{spez}} * t_{transport}$$

Die Inkubationszeit für die Aufnahme des radioaktiv-markierten Substrats ($t_{transport}$) betrug bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen 30 min.

In einer Versuchsreihe wurde die Aktivierung der Aufnahme von [14 C]Succinat als Funktion der Natriumkonzentration untersucht. Die Berechnung der aus diesen Werten gewonnenen

Michaelis-Menten-Konstante (K_M) für Natrium erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit dem Programm SigmaPlot (Systat Software, Point Richmond, USA).



Abbildung 13: Flüssigkeits-Szintillations-Zähler bestückt mit Szintillationsgefäßen.

3 Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Messungen

3.1.1 Der Succinat-induzierte Strom

Die Abbildungen 14 – 15 zeigen das Verhalten des Wildtyps, der Mutanten K114I, K114R, K114E und K114Q sowie der Wasser-injizierten Kontrollloozyten „Mock“ in An- und Abwesenheit von Succinat. Für die Messungen kamen die Kontrolllösung (ORi) sowie die Testlösung (ORi + 1mM Succinat) zum Einsatz. Die Wasser-injizierten Kontrollloozyten werden der Einfachheit halber im weiteren Verlauf mit „Mock“ bezeichnet. Die Anzahl der für die Abbildungen 14 – 15 verwendeten Oozyten und Spendertiere ist in Tabelle 11 aufgeführt.

	Wildtyp	K114I	K114R	K114E	K114Q	„Mock“
Oozyten	11	10	10	6	7	10
Spendertiere	9	8	9	6	7	8

Tabelle 11: Anzahl der gemessenen Oozyten und der verwendeten Spendertiere von Wildtyp, Mutanten und „Mock“. Diese Angaben gelten für die Abbildungen 14 – 15.

Unter Perfusion mit der Kontrolllösung (ORi) konnte ein konstantes Membranpotenzial für alle Oozyten beobachtet werden, welches zwischen -17 und -66 mV rangierte. Die Einzelwerte sind Tabelle 12 zu entnehmen.

	Wildtyp	K114I	K114R	K114E	K114Q	„Mock“
Membranpotenzial (mV)	-17 - (-66)	-22 - (-64)	-43 - (-61)	-25 - (-45)	-30 - (-61)	-27 - (-53)

Tabelle 12: Spanne der Ruhemembranpotenziale von Wildtyp, Mutanten und „Mock“.

In Abbildung 14 A sind die gemittelten Membranpotenziale in Abwesenheit (schwarze Balken) und in Anwesenheit von Succinat (graue Balken) dargestellt. Die Messungen wurden

im „current-clamp-Modus“ durchgeführt. Auf Succinat-Applikation reagieren alle Oozyten mit einer Depolarisation, welche jedoch sehr variabel ausfällt. Beim Wildtyp und bei K114R kommt es zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Depolarisation von $-44,5 \pm 6,5$ mV auf $-18,8 \pm 8,9$ mV (Wildtyp) und von $-50,1 \pm 4,3$ mV auf $-22,7 \pm 8,1$ mV (K114R). Die Mutanten K114I (von $-41,9 \pm 6,5$ mV auf $-36,6 \pm 8,9$ mV) und K114Q (von $-46,9 \pm 5,6$ auf $-38,9 \pm 5,8$ mV) zeigen eine deutlich geringere, aber dennoch gut messbare Depolarisation. Bei K114E ist dagegen so gut wie keine Änderung des Membranpotenzials zu verzeichnen (von $-38,6 \pm 6,2$ mV auf $-38,1 \pm 7,0$ mV). Das Potenzial von „Mock“ ändert sich ebenfalls nur marginal von $-45,2 \pm 5,2$ mV auf $-44,9 \pm 5,0$ mV. Die Änderungen der Membranpotenziale von K114I, K114Q, K114E und der „Mocks“ sind nicht signifikant ($p > 0,01$).

Abbildung 14 B zeigt die Differenzwerte aus den in Abbildung 14 A dargestellten gemittelten Membranpotenzialen in An- und Abwesenheit von Succinat im „current-clamp-Modus“. Die Substrat-vermittelte Differenz fällt beim Wildtyp mit $28,9 \pm 8,1$ mV und bei K114R mit $27,4 \pm 10,6$ mV am größten aus. Zwischen beiden ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen ($p > 0,01$). Die restlichen Mutanten und „Mock“ dagegen zeigen eine signifikant geringere Depolarisation ($p < 0,01$) verglichen mit dem Wildtyp. K114I und K114Q weisen mit $5,5 \pm 5,1$ mV und $8,0 \pm 3,3$ mV nur ein geringes Depolarisationsverhalten auf. K114E zeigt mit nur $1,2 \pm 0,8$ mV die geringste Depolarisation unter den Mutanten. „Mock“ depolarisiert um $0,3 \pm 0,7$ mV.

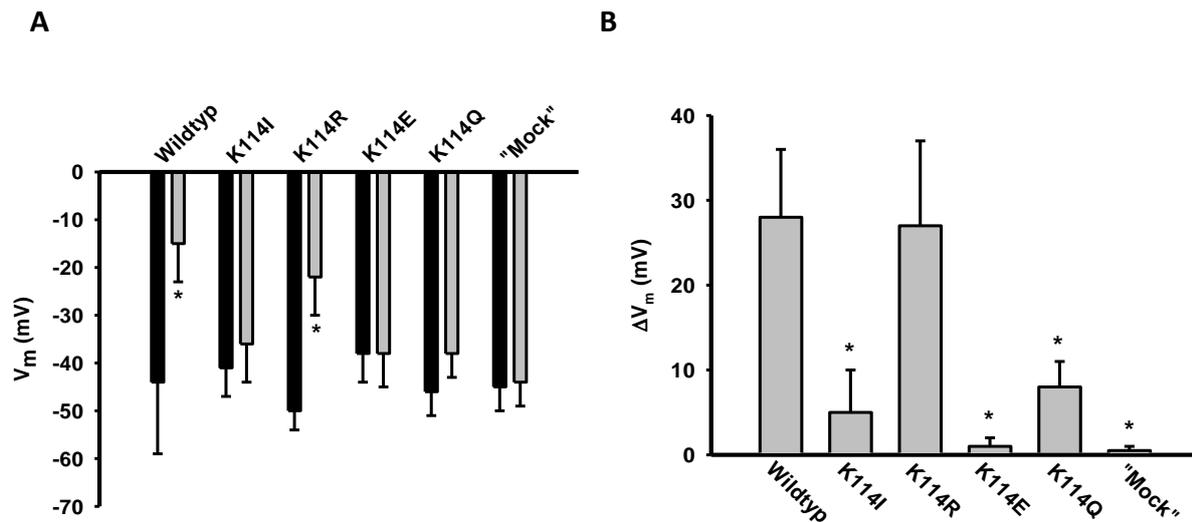


Abbildung 14: **A** zeigt die Mittelwerte der Membranpotenziale von Wildtyp, Mutanten und „Mock“ in Abwesenheit (schwarze Balken) und Anwesenheit (graue Balken) von Succinat (1 mM). Die mit * gekennzeichneten Balken zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen der An- und Abwesenheit von Succinat (1mM). **B** zeigt die Differenzwerte der Membranpotenziale von Wildtyp, Mutanten und „Mock“ in An- und Abwesenheit von Succinat (1 mM). Die mit * gekennzeichneten Balken weisen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zum Wildtyp auf. Die Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere zeigt Tabelle 11.

In Abbildung 15 werden die Succinat-induzierten Ströme bei einer angelegten Klemmspannung von -60 mV („voltage-clamp-Modus“) dargestellt. Die bei Wildtyp und Mutanten gemessenen Ströme sind Einwärtsströme. Entsprechend dem Depolarisationsverhalten aus Abbildung 14 B zeigen der Wildtyp mit -107 ± 22 nA und K114R mit -110 ± 72 nA die größten Einwärtsströme. Die Stromamplituden dieser beiden liegen so nah beieinander, dass kein signifikanter Unterschied ($p > 0,01$) festzustellen ist. Die verbleibenden Mutanten und „Mock“ weisen verglichen mit dem Wildtyp signifikant geringere Ströme auf ($p < 0,01$). Dem Wildtyp folgen mit großem Abstand die Einwärtsströme von K114Q mit -16 ± 6 nA und K114I mit -10 ± 10 nA. K114E zeigt lediglich einen marginalen Einwärtsstrom mit nur $-0,5 \pm 0,7$ nA. Succinat induziert bei „Mock“ keinen Einwärtsstrom (0 ± 0 nA).

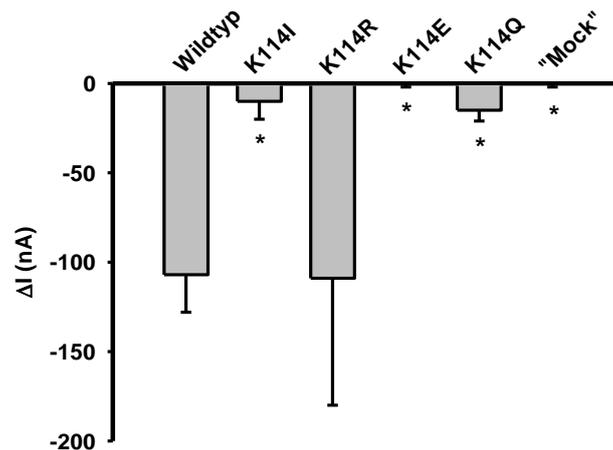


Abbildung 15: Succinat-induzierte Einwärtsströme von Wildtyp, Mutanten und „Mock“ bei -60 mV. Die mit * markierten Balken weisen einen signifikanten Unterschied in Bezug des Succinat-medierten Stromes zum Wildtyp auf ($p < 0,01$). Die Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere zeigt Tabelle 11.

3.1.2 Einfluss von Lithium auf Succinat-induzierte Ströme

In den Abbildungen 16 – 29 wurde untersucht, ob die Succinat-induzierten Ströme des Wildtyps und der Mutanten K114I, K114R, K114E und K114Q durch Lithium hemmbar sind. Zur Kontrolle wurden auch Wasser-injizierte Oozyten gemessen, im folgenden „Mock“ genannt. Es wurden I-V-Kennlinien aufgezeichnet. Alle verwendeten Testlösungen enthielten 1mM Succinat und zusätzlich in aufsteigender Konzentration entweder 0 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM oder 5 mM Lithium.

Wildtyp

Abbildung 16 zeigt die Hemmung des Succinat-induzierten Stromes des Wildtyps durch 0 (●), 0,2 (◐), 0,5 (▼), 1 (△), 2 (■) und 5 (◑) mM Lithium als Mittelwerte von Messungen mit 4 Oozyten aus 3 Spendertieren. Es ist zu erkennen, dass Lithium seine hemmende Wirkung in allen Konzentrationen und bei allen Potenzialen entfaltet. In den niedrigeren Dosisbereichen (0 – 2 mM) nimmt die Hemmwirkung mit zunehmender Lithiumdosis stetig zu. In den darauf folgenden höheren Dosisbereichen (2 – 5 mM) ist allerdings kaum ein zusätzlicher Hemmeffekt durch Dosissteigerung zu erreichen, so dass ein nicht hemmbarer

Reststrom verbleibt (siehe Abbildungen 17 – 19). Zudem fällt auf, dass in den niedrigeren Konzentrationsbereichen von 0 – 1 mM Lithium die Ströme mit zunehmend negativem Potenzial größer werden. Im Bereich von 2 – 5 mM bleiben sie jedoch unabhängig vom Potenzial konstant. Um die Frage einer möglichen Potenzialabhängigkeit der Hemmung des Succinat-induzierbaren Stromes durch Lithium zu klären wurden in den Abbildungen 17 – 19 die prozentualen Restströme bei unterschiedlichen Klemmspannungen dargestellt.

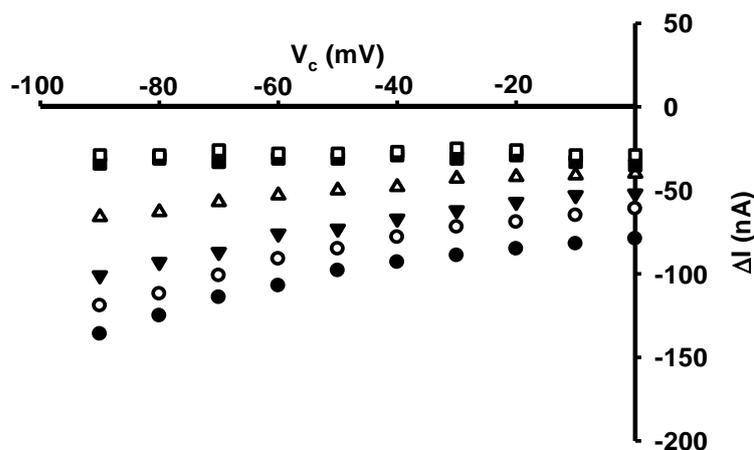


Abbildung 16: Hemmung des Succinat-induzierbaren Stromes durch aufsteigende Konzentrationen an Lithium an *fNaDC-3*-exprimierenden Oozyten (Wildtyp). In gepaarten Experimenten wurden sukzessive die folgenden Konzentration an Lithium simultan mit 1 mM Succinat appliziert: 0 mM (●), 0,2 mM (○), 0,5 mM (▼), 1 mM (△), 2 mM (■) und 5 mM (▣) Lithium. Dargestellt sind Messungen von 4 Oozyten aus 3 Spendertieren; auf das Einzeichnen der Standardabweichungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

In den Abbildungen 17 – 19 wird der prozentuale Reststrom (I/I_0) des Wildtyps als Funktion der Lithium-Konzentration bei Klemmspannungen von -90 mV, -60 mV und -30 mV dargestellt. Dazu wurde der bei der jeweiligen Lithiumkonzentration gemessene Strom (I) durch den gemessenen Strom bei Abwesenheit von Lithium (I_0) dividiert. Bei einer Konzentration von 0 mM Lithium liegt somit definitionsgemäß ein Strom von 100% vor.

In Abbildung 17 ist der prozentuale Reststrom bei -90 mV zu sehen. Der Reststrom beträgt $88,0 \pm 5,6\%$ bei 0,2 mM, $76,8 \pm 13\%$ bei 0,5 mM, $50,5 \pm 10,4\%$ bei 1 mM und noch

25,3 ± 6,9% bei 2 mM Lithium. Bei der Höchstdosis von 5 mM Lithium kann ein nicht hemmbarer Reststrom von 20,8 ± 4,2% beobachtet werden. Zwischen 2 und 5 mM Lithium ist kaum eine Zunahme der Hemmung zu verzeichnen.

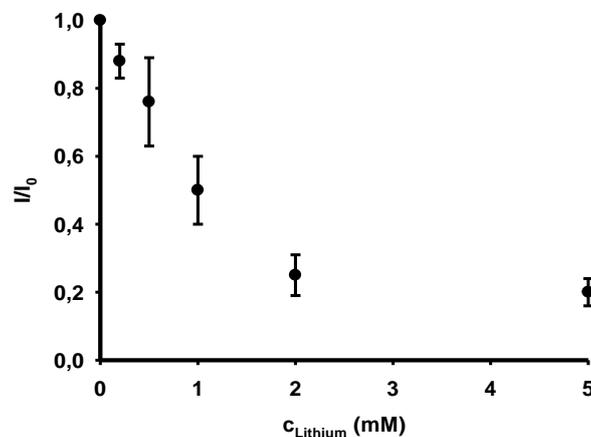


Abbildung 17: Darstellung des prozentualen Reststroms (I/I_0) für den Wildtyp als Funktion der Konzentration an Lithium im Bad. Die in Abbildung 16 bei -90 mV ermittelten Daten wurden umgerechnet und als Funktion der Lithiumkonzentration aufgetragen. Der Succinat-induzierbare Strom ist nicht vollständig durch Lithium hemmbar. Es verbleibt ein Reststrom von $20,8 \pm 4,2\%$.

In Abbildung 18 ist jetzt der prozentuale Reststrom bei einer Klemmspannung von -60 mV abgebildet. Der Reststrom beträgt diesmal $85,5 \pm 3,6\%$ für $0,2$ mM, $72,3 \pm 13\%$ für $0,5$ mM, $50,5 \pm 7,6\%$ für 1 mM und noch $30,5 \pm 7,2\%$ für 2 mM Lithium. Unter 5 mM Lithium verbleibt ein Reststrom von $25,8 \pm 3,0\%$. Auch hier ist zwischen 2 und 5 mM Lithium kaum eine Zunahme der Hemmung zu sehen.

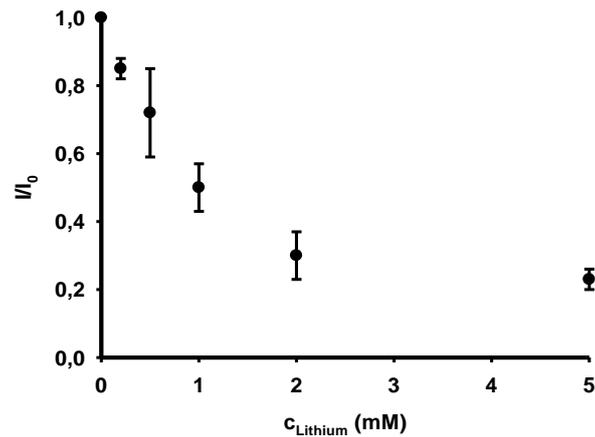


Abbildung 18: Darstellung des prozentualen Reststroms (I/I_0) für den Wildtyp als Funktion der Konzentration an Lithium im Bad. Die in Abbildung 16 bei -60 mV ermittelten Daten wurden umgerechnet und als Funktion der Lithiumkonzentration aufgetragen. Der Succinat-induzierbare Strom ist nicht vollständig durch Lithium hemmbar. Es verbleibt ein Reststrom von $25,8 \pm 3,0\%$.

In Abbildung 19 ist nun der verbleibende prozentuale Reststrom bei einer Klemmspannung von -30 mV dargestellt. Hier beträgt der gemessene Reststrom $81,3 \pm 5,8\%$ für 0,2 mM, $69,8 \pm 8,6\%$ für 0,5 mM, $49,3 \pm 7,8\%$ für 1 mM und $34,5 \pm 8,4\%$ für 2 mM Lithium. Der nicht hemmbare Reststrom bei 5 mM Lithium beträgt bei -30 mV $27,5 \pm 7,2\%$.

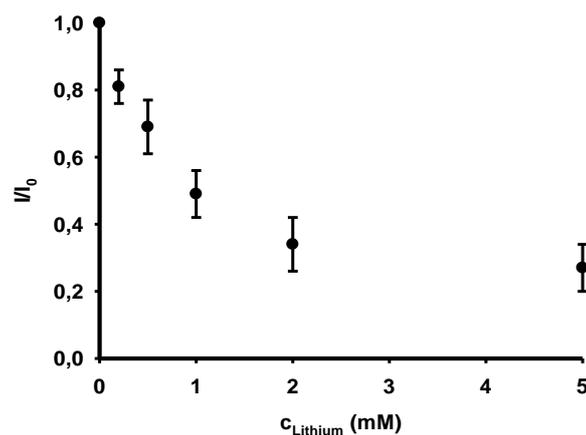


Abbildung 19: Darstellung des prozentualen Reststroms (I/I_0) für den Wildtyp als Funktion der Konzentration an Lithium im Bad. Die in Abbildung 16 bei -30 mV ermittelten Daten wurden umgerechnet und als Funktion der Lithiumkonzentration aufgetragen. Der Succinat-induzierbare Strom ist nicht vollständig durch Lithium hemmbar. Es verbleibt ein Reststrom von $27,5 \pm 7,2\%$.

In Abbildung 20 sind nun zusammenfassend die prozentualen Restströme des Wildtyps aus den Abbildungen 17 – 19 bei -90 (●), -60 (◐) und -30 (▼) mV dargestellt. Tabelle 13 zeigt die Restströme bei den entsprechenden Lithiumkonzentrationen und Klemmspannungen:

Klemmspannung	0,2 mM LiCl	0,5 mM LiCl	1 mM LiCl	2 mM LiCl	5 mM LiCl
-90 mV	88,0 ± 5,6%	76,8 ± 13,0%	50,5 ± 10,4%	25,3 ± 6,9%	20,8 ± 4,2%
-60 mV	85,5 ± 3,6%	72,3 ± 13,0%	50,5 ± 7,6%	30,5 ± 7,2%	25,8 ± 3,0%
-30 mV	81,3 ± 5,8%	69,8 ± 8,6%	49,3 ± 7,8%	34,5 ± 8,4%	27,5 ± 7,2%

Tabelle 13: Übersicht über die prozentualen Restströme des Wildtyps unter 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 5 mM Lithium bei -90 mV, -60 mV und -30 mV (Zusammenfassung der in den Abbildungen 17 – 19 gezeigten Daten).

Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, liegen die prozentualen Restströme aller 3 Klemmpotenziale sehr nahe beieinander und überlagern sich teilweise sogar, so dass kein signifikanter Unterschied besteht. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Hemmung des Succinat-induzierten Stromes beim Wildtyp potenzialunabhängig erfolgt.

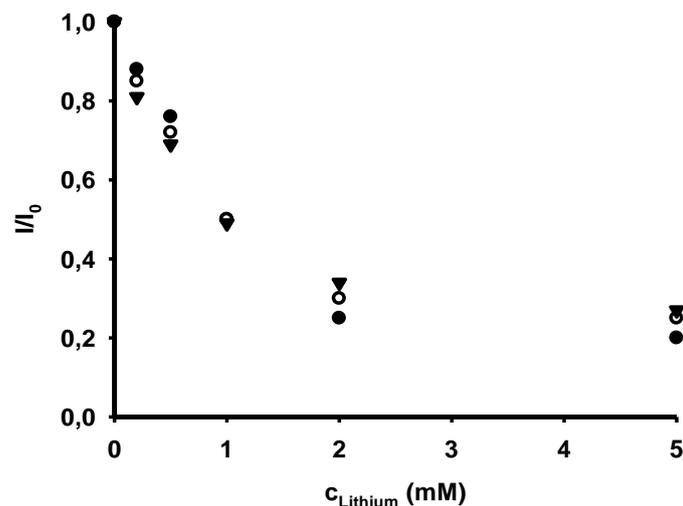


Abbildung 20: Übersicht über die prozentualen Restströme beim Wildtyp bei drei unterschiedlichen Potenzialen: -90 mV (●), -60 mV (◐) und -30 mV (▼). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf das Einzeichnen der Standardabweichungen verzichtet. Es handelt sich um die graphische Darstellung der in den Abbildungen 17 – 19 und Tabelle 13 gezeigten Ergebnisse.

K114I

Abbildung 21 zeigt den Einfluss von 0 (●), 0,2 (◐), 0,5 (▼), 1 (△), 2 (■) und 5 (◑) mM Lithium auf den Succinat-induzierten Strom von K114I bei Messungen von 3 Oozyten aus 3 Spendertieren. Insgesamt sind nur marginale Ströme zu registrieren, so ist bei 0 mM Lithium bei -90 mV nur ein Einwärtsstrom von -22 ± 9 nA zu messen. Bei einer Klemmspannung von 0 mV und 0 mM Lithium ist nur ein Auswärtsstrom von 16 ± 17 nA zu messen. Da so gut wie kein Succinat-induzierbarer Strom nachweisbar ist, ist auch kein Effekt des Lithiums zu erwarten.

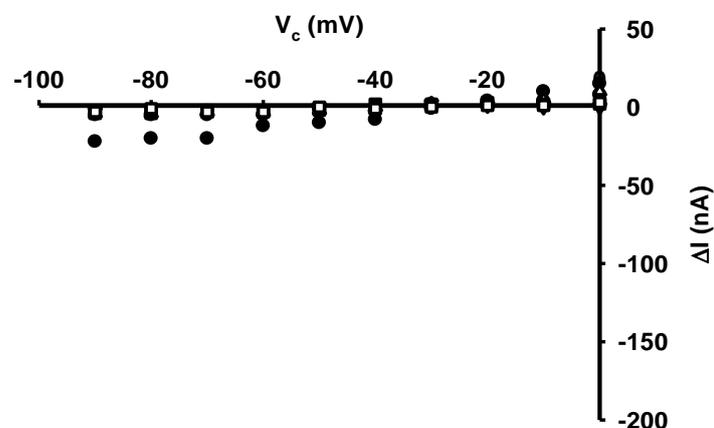


Abbildung 21: Beeinflussung des Succinat-induzierten Stromes der Mutante K114I durch aufsteigende Konzentrationen an Lithium: 0 mM (●), 0,2 mM (◐), 0,5 mM (▼), 1 mM (△), 2 mM (■) und 5 mM (◑) Lithium (Messungen von 3 Oozyten aus 3 Spendertieren).

K114R

In Abbildung 22 ist die Hemmung des Succinat-induzierten Stromes durch 0 (●), 0,2 (◐), 0,5 (▼), 1 (△), 2 (■) und 5 (◑) mM Lithium bei Mutante K114R dargestellt. Die Messungen wurden an 4 Oozyten aus 4 Spendertieren erhoben. Zu erkennen ist, dass Lithium in allen Konzentrations- und Potenzialbereichen eine hemmende Wirkung auf den Succinat-induzierten Strom hat. Im Konzentrationsbereich zwischen 0 – 2 mM Lithium lässt sich eine zunehmende Hemmung durch aufsteigende Lithiumkonzentrationen beobachten. Im Konzentrationsbereich zwischen 2 und 5 mM Lithium dagegen lässt sich nur noch ein kleiner Zuwachs der Hemmung durch Dosissteigerung erkennen, es verbleibt ein nicht hemmbarer Reststrom (siehe Abbildungen 23 – 25). Während im Bereich von 0 bis 2 mM Lithium die

registrierten Ströme bei zunehmend negativem Potenzial größer werden, wird der Strom bei 5 mM Lithium tendenziell kleiner. Um eine mögliche Potenzialabhängigkeit der Hemmung des Succinat-abhängigen Stromes durch Lithium zu klären, wurden in den Abbildungen 23 – 25 die prozentualen Restströme bei unterschiedlichen Klemmpotenzialen dargestellt.

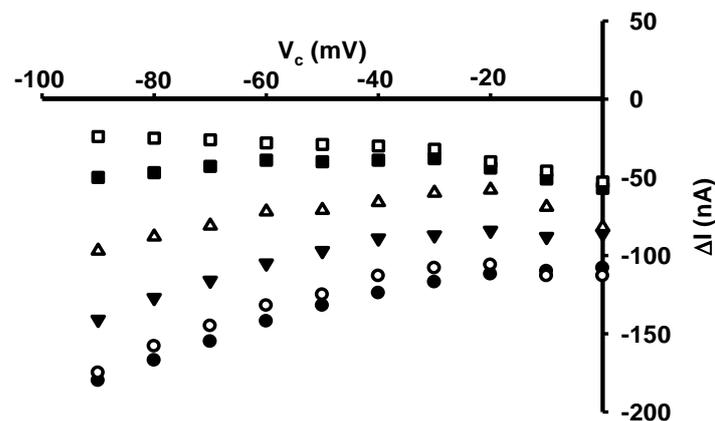


Abbildung 22: Beeinflussung des Succinat-induzierten Stromes der Mutante K114R durch aufsteigende Konzentrationen an Lithium: 0 mM (●), 0,2 mM (○), 0,5 mM (▼), 1 mM (△), 2 mM (■) und 5 mM (▣) Lithium. Messungen von 4 Oozyten aus 4 Spendertieren.

In den Abbildungen 23 – 25 wird der prozentuale Reststrom (I/I_0) von K114R als Funktion der Lithiumkonzentration bei Klemmspannungen von -90 mV, -60 mV und -30 mV dargestellt. Bei der Berechnung wurde wie für die Abbildungen 17 – 19 schon beschrieben verfahren.

Abbildung 23 zeigt den prozentualen Reststrom bei -90 mV. Der gemessene Reststrom beträgt $94,0 \pm 11,2\%$ für 0,2 mM, $74,8 \pm 11,3\%$ für 0,5 mM, $54,5 \pm 10,8\%$ für 1 mM und $28,0 \pm 3,2\%$ für 2 mM Lithium. Unter der Höchstkonzentration von 5 mM Lithium verbleibt ein nicht hemmbarer Reststrom von noch $12,3 \pm 2,2\%$.

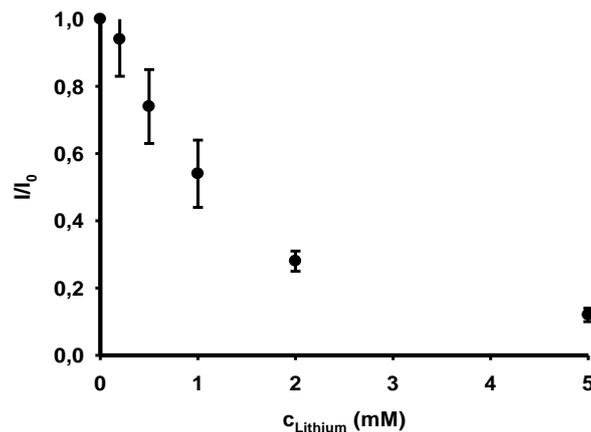


Abbildung 23: Darstellung des prozentualen Reststroms (I/I_0) für die Mutante K114R als Funktion der Konzentration an Lithium im Bad. Die in Abbildung 22 bei -90 mV ermittelten Daten wurden umgerechnet und als Funktion der Lithiumkonzentration aufgetragen. Der Succinat-induzierbare Strom ist nicht vollständig durch Lithium hemmbar. Es verbleibt ein Reststrom von $12,3 \pm 2,2\%$.

Als nächstes stellt Abbildung 24 den prozentualen Reststrom bei -60 mV dar. Hier beträgt der Reststrom $92,5 \pm 11,6\%$ für 0,2 mM, $69,5 \pm 11,0\%$ für 0,5 mM, $52,8 \pm 12,2\%$ für 1 mM und $25,5 \pm 4,2\%$ für 2 mM Lithium. Bei 5 mM Lithium verbleibt ein nicht hemmbarer Reststrom von $17,8 \pm 2,7\%$.

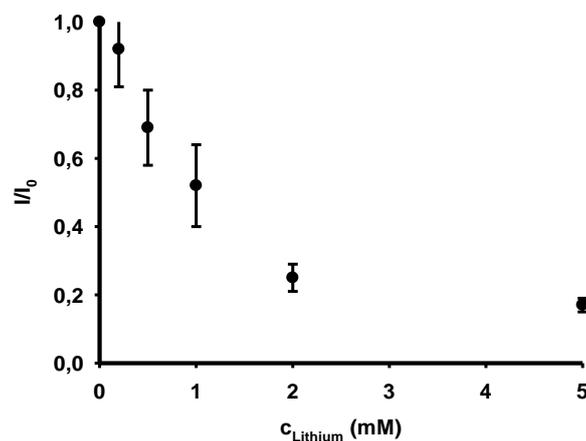


Abbildung 24: Darstellung des prozentualen Reststroms (I/I_0) für die Mutante K114R als Funktion der Konzentration an Lithium im Bad. Die in Abbildung 22 bei -60 mV ermittelten Daten wurden umgerechnet und als Funktion der Lithiumkonzentration aufgetragen. Der Succinat-induzierbare Strom ist auch bei -60 mV nicht vollständig durch Lithium hemmbar. Es resultiert ein Lithium-insensitiver Reststrom von $17,8 \pm 2,7\%$.

Schließlich zeigt Abbildung 25 den verbleibenden prozentualen Reststrom (I/I_0) bei -30 mV. Der Reststrom beträgt $90,3 \pm 7,1\%$ für $0,2$ mM, $66,8 \pm 10,2\%$ für $0,5$ mM, $50,5 \pm 4,4\%$ für 1 mM und $28,8 \pm 7,0\%$ für 2 mM Lithium. Bei der maximalen Dosis von 5 mM Lithium kann ein nicht hemmbarer Reststrom von $22,0 \pm 7,6\%$ gemessen werden.

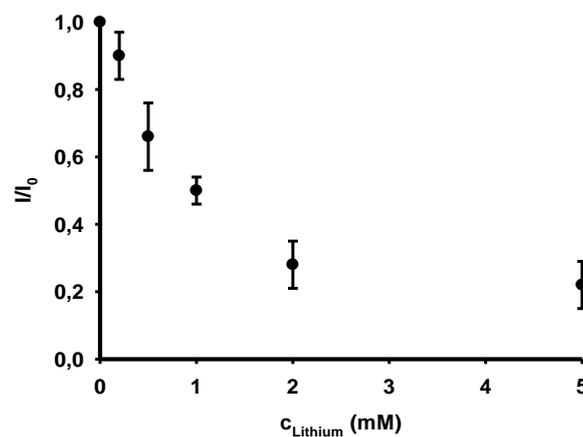


Abbildung 25: Darstellung des prozentualen Reststroms (I/I_0) für die Mutante K114R als Funktion der Konzentration an Lithium im Bad. Die in Abbildung 22 bei -30 mV ermittelten Daten wurden umgerechnet und als Funktion der Lithiumkonzentration aufgetragen. Der Succinat-induzierbare Strom ist auch bei -30 mV nicht vollständig durch Lithium hemmbar. Es resultiert ein Lithium-insensitiver Reststrom von $22,0 \pm 7,6\%$.

Zusammenfassend zeigt nun Abbildung 26 die prozentualen Restströme aus den Abbildungen 23 – 25 von K114R bei -90 (●), -60 (◐) und -30 (▼) mV. In Tabelle 14 sind die prozentualen Restströme bei den jeweiligen Klemmspannungen zu sehen.

Klemmspannung	0,2 mM LiCl	0,5 mM LiCl	1 mM LiCl	2 mM LiCl	5 mM LiCl
-90 mV	$94,0 \pm 11,2\%$	$74,8 \pm 11,3\%$	$54,5 \pm 10,8\%$	$28,0 \pm 3,2\%$	$12,3 \pm 2,2\%$
-60 mV	$92,5 \pm 11,6\%$	$69,5 \pm 11,0\%$	$52,8 \pm 12,2\%$	$25,5 \pm 4,2\%$	$17,8 \pm 2,7\%$
-30 mV	$90,3 \pm 7,1\%$	$66,8 \pm 10,2\%$	$50,5 \pm 4,4\%$	$28,8 \pm 7,0\%$	$22,0 \pm 7,6\%$

Tabelle 14: Übersicht über die prozentualen Restströme der Mutante K114R unter $0,2$ mM, $0,5$ mM, 1 mM, 2 mM und 5 mM Lithium bei -90 mV, -60 mV und -30 mV (Zusammenfassung der in den Abbildungen 23 – 25 gezeigten Daten).

Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, liegen die prozentualen Restströme aller 3 Klemmpotenziale nahe beieinander und überlagern sich teilweise sogar, so dass kein signifikanter Unterschied zu erkennen ist (lediglich bei 5 mM Lithium ist ein signifikanter Unterschied zwischen -90 und -60 mV zu erkennen). Diese Ergebnisse geben Anhalt dafür, dass die Lithium-Hemmpbarkeit von K114R unabhängig vom angelegten Klemmpotenzial erfolgt.

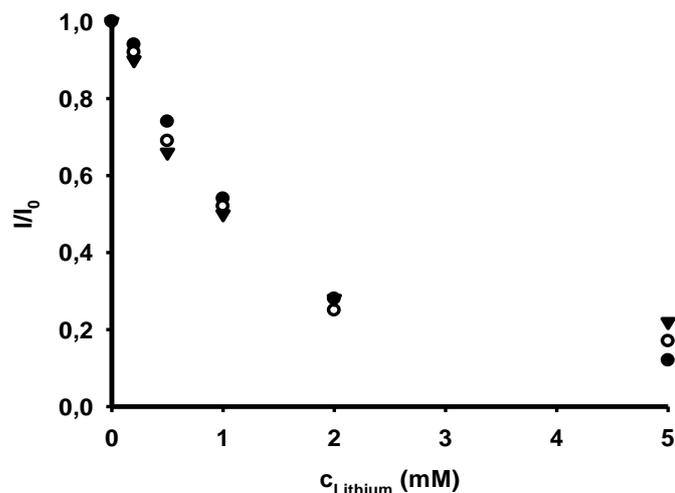


Abbildung 26: Übersicht über die prozentualen Restströme bei K114R bei drei unterschiedlichen Potenzialen: -90 mV (●), -60 mV (◐) und -30 mV (▼). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf das Einzeichnen der Standardabweichungen verzichtet. Es handelt sich um die graphische Darstellung der in den Abbildungen 23 – 25 und Tabelle 14 gezeigten Ergebnisse.

K114Q

In Abbildung 27 ist der Einfluss von Lithium auf den Succinat-induzierten Strom von K114Q gezeigt. Dazu wurden 3 Oozyten aus 3 Spendertieren gemessen. Insgesamt sind nur marginale Einwärtsströme zu erkennen. Unter 0 mM Lithium fließt bei -90 mV ein Strom von -18 ± 6 nA und bei 0 mV ein Strom von -17 ± 8 nA. Da durch Gabe von Succinat so gut wie kein Strom induziert werden kann, ist auch kein hemmender Effekt durch Lithium zu erkennen.

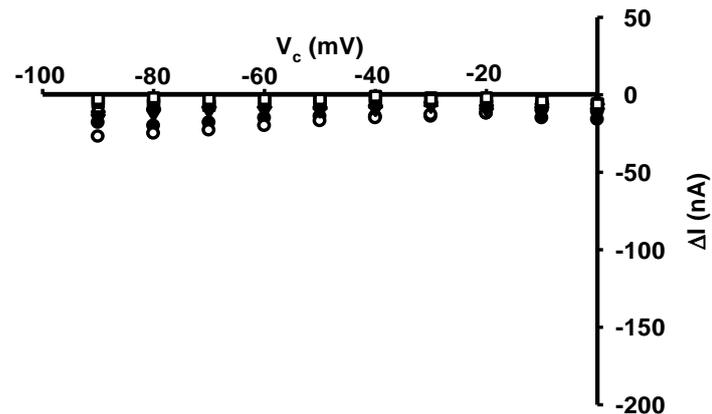


Abbildung 27: Beeinflussung des Succinat-induzierten Stromes der Mutante K114Q durch aufsteigende Konzentrationen an Lithium: 0 mM (●), 0,2 mM (◐), 0,5 mM (▼), 1 mM (△), 2 mM (■) und 5 mM (◑) Lithium (Messungen von 3 Oozyten aus 3 Spendertieren).

K114E

Der Einfluss von 0 (●), 0,2 (◐), 0,5 (▼), 1 (△), 2 (■) und 5 (◑) mM Lithium auf den Succinat-induzierten Strom von K114E ist in Abbildung 28 dargestellt. Die Ergebnisse stammen von Messungen an 3 Oozyten aus 3 Spendertieren.

Auch hier sind unter 0 mM Lithium nur marginale und vom Potenzial unabhängige Ströme zwischen -4 ± 1 nA bei -90 mV und -2 ± 2 nA bei 0 mV detektierbar, die sich auch unter dem Einfluss von Lithium nicht ändern. Damit weist K114E von allen Mutanten die geringsten Einwärtsströme auf.

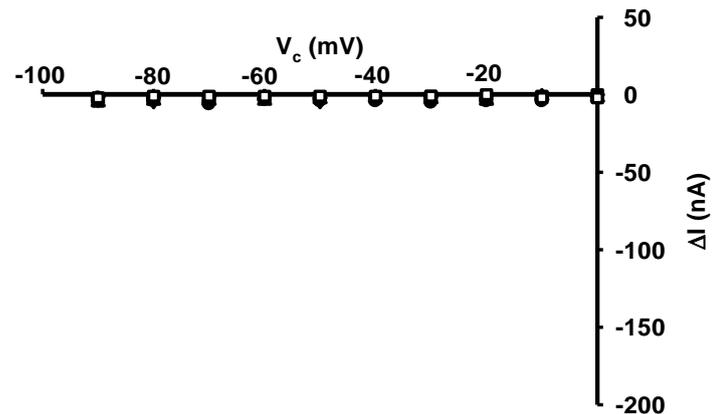


Abbildung 28: Beeinflussung des Succinat-induzierten Stromes der Mutante K114E durch aufsteigende Konzentrationen an Lithium: 0 mM (●), 0,2 mM (◐), 0,5 mM (▼), 1 mM (△), 2 mM (■) und 5 mM (◑) Lithium (Messungen von 3 Oozyten aus 3 Spendertieren).

„Mock“

Abschließend ist in Abbildung 29 der Einfluss von 0 mM (●) und 5 mM (◑) Lithium auf den Succinat-induzierten Strom der „Mocks“ dargestellt. Gemessen wurden hier 3 Oozyten aus 3 Spendertieren. Hier sind wie erwartet kaum Ströme messbar. Bei 0 mM Lithium sind bei -90 mV -3 ± 3 nA und bei 0 mV und 0 mM Lithium 5 ± 3 nA zu messen. Eine Hemmung des Succinat-induzierten Stromes durch Lithium ist nicht zu erkennen.

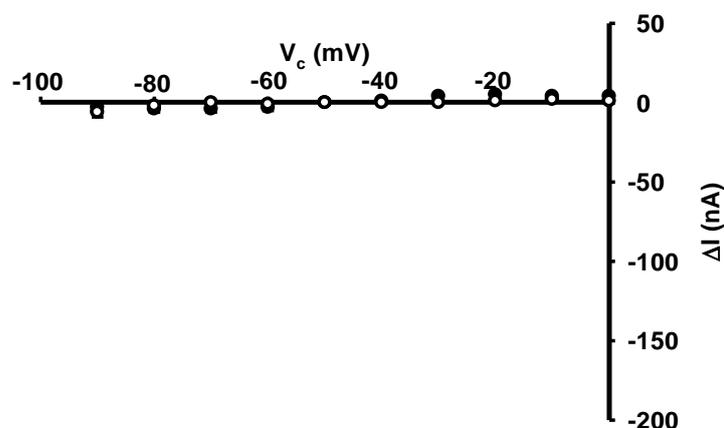


Abbildung 29: Beeinflussung des Succinat-induzierten Stromes durch 0 mM (●) und 5 mM (◑) Lithium an „Mocks“ (Messungen von 3 Oozyten aus 3 Spendertieren).

3.1.3 Natrium-Abhängigkeit Succinat-induzierter Ströme

In den folgenden Experimenten, dargestellt in den Abbildungen 30 – 35, wurde die Natrium-Abhängigkeit des Succinat-induzierbaren Stromes des Wildtyps, der Mutanten K114I, K114R, K114Q und K114E sowie der „Mocks“ untersucht. Hierzu wurden zwei komplett Natrium-freie Kontrolllösungen verwendet. In Kontrolllösung ORi_1 wurde Natrium durch eine äquimolare Menge an N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) ersetzt, in Kontrolllösung ORi_2 dagegen wurde Natrium durch eine äquimolare Menge an Lithium ersetzt. Die zu den Kontrolllösungen zugehörigen Testlösungen enthielten jeweils 1 mM Succinat. Vom Wildtyp, Mutanten und „Mock“ wurden I-V-Kennlinien mit den oben genannten Lösungen angefertigt.

Wildtyp

Abbildung 30 A zeigt das Verhalten des Succinat-induzierbaren Stromes in Anwesenheit von Natrium (●) und bei Ersatz von Natrium durch NMDG (●). Dargestellt sind die Ergebnisse von Messungen an 7 Oozyten aus 6 Spendertieren. Die Ströme in Abwesenheit von Natrium sind bei allen Potenzialen signifikant kleiner als diejenigen in Anwesenheit von Natrium. Während die Amplitude des Stromes unter ORi bei Depolarisation kleiner wird, wird die Amplitude unter ORi_1 bei Depolarisation größer. Bei einer Klemmspannung von -90 mV kann eine Reduktion des Einwärtsstromes von -109 ± 24 nA (ORi) auf -2 ± 27 nA (ORi_1) und bei 0 mV von -61 ± 21 nA auf -25 ± 15 nA registriert werden.

Abbildung 30 B zeigt nun das Verhalten des Succinat-induzierten Stromes bei Ersatz des Natriums (●) durch Lithium (●) an 3 Oozyten aus 3 Spendertieren. Die Ströme unter ORi_2 sind im Vergleich zu den Strömen unter ORi signifikant kleiner. Bei zunehmender Depolarisation wird die Amplitude des Stromes unter ORi_2 größer, wohingegen sie unter ORi kleiner wird. So kann bei -90 mV eine Reduktion des Stromes von -90 ± 12 nA (ORi) auf -7 ± 3 nA (ORi_2) beobachtet werden. Bei 0 mV dagegen ist eine deutlich geringere Reduktion von von -48 ± 14 nA auf -32 ± 7 nA zu registrieren.

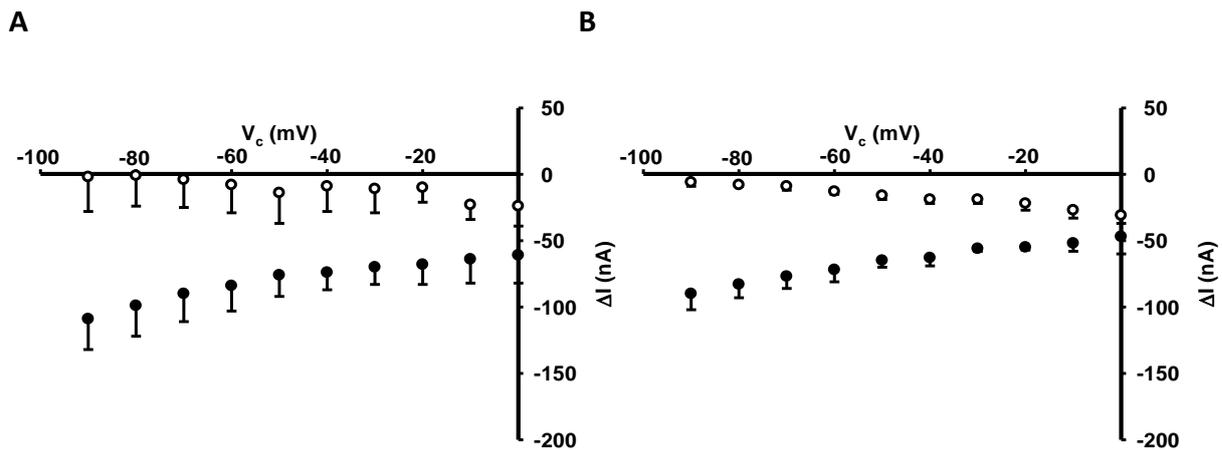


Abbildung 30: I-V-Kennlinien der Succinat-induzierbaren Ströme in An- (●) und Abwesenheit (○) von Natrium in *fNaDC-3*-exprimierenden Oozyten (Wildtyp). In **A** wurde Natrium durch NMDG ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 7 Oozyten aus 6 Spendertieren. In **B** wurde Natrium durch Lithium ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 3 Oozyten aus 3 Spendertieren.

Die Daten aus Abbildung 30 zeigen, dass der Einwärtsstrom des Wildtyps Natrium-abhängig ist. Der Ersatz von Natrium durch eine äquimolare Menge Lithium oder NMDG führt zu einer signifikanten Reduktion des Einwärtsstromes mit Verbleiben eines kleinen Reststromes, der aber im Vergleich zu Messungen in Natrium-haltigen Lösungen eine andere I-V-Charakteristik aufweist. Bei totalem Ersatz des Natriums durch Lithium oder NMDG steigt der Succinat-induzierbare Strom bei Depolarisation an.

K114I

In Abbildung 31 A ist das Verhalten des Succinat-induzierten Stromes von K114I in Anwesenheit von Natrium (●) und bei Ersatz des Natriums durch NMDG (○) dargestellt. Gemessen wurden 5 Oozyten aus 4 Spendertieren. Es sind nur marginale Ströme messbar. Bei -90 mV zeigt sich eine Reduktion von -21 ± 11 nA (ORi) auf 9 ± 11 nA (ORi₁), bei 0 mV dagegen eine Vergrößerung von -12 ± 8 nA auf -28 ± 24 nA. Die Amplitude des Stromes unter ORi₁ vergrößert sich bei starker Depolarisation etwas, dahingegen bleibt die Amplitude unter ORi unabhängig vom Potenzial konstant.

Abbildung 31 B zeigt nun das Verhalten des Succinat-induzierten Stromes von K114I bei Ersatz des Natriums (●) durch Lithium (○). Dargestellt sind Messungen an 3 Oozyten aus 3

Spendertieren. Es sind nur minimale Restströme messbar. So kommt es bei -90 mV lediglich zu einer Reduktion von -10 ± 5 nA (ORi) auf 0 ± 0 nA (ORi₂) und bei 0 mV zu einer Erhöhung von -2 ± 1 nA auf -4 ± 1 nA. Zwischen ORi und ORi₂ besteht kein signifikanter Unterschied. Die Amplitude der Ströme ist in beiden Fällen potenzialunabhängig konstant.

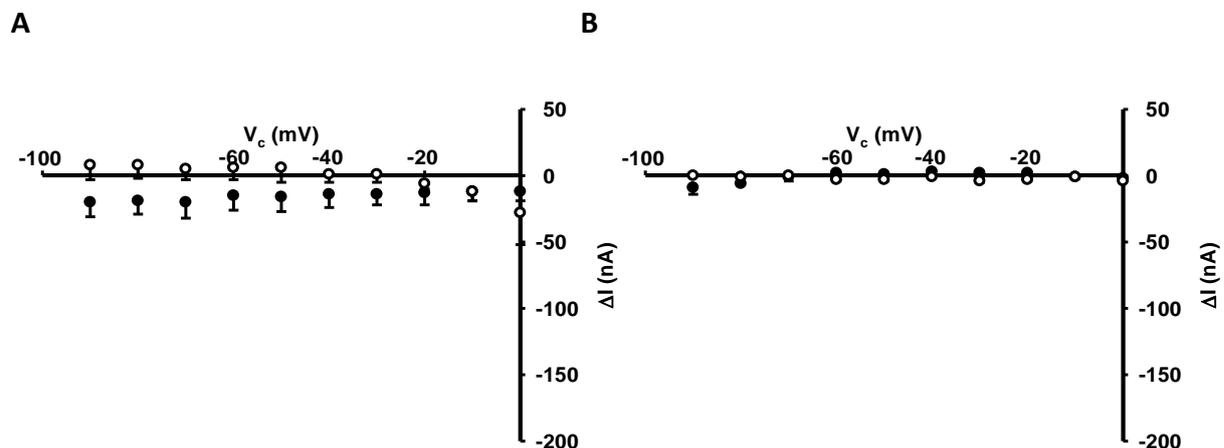


Abbildung 31: I-V-Kennlinien der Succinat-induzierbaren Ströme der Mutante K114I in An- (●) und Abwesenheit (○) von Natrium. In A wurde Natrium durch NMDG ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 5 Oozyten aus 4 Spendertieren. In B wurde Natrium durch Lithium ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 3 Oozyten aus 3 Spendertieren.

Aufgrund der sehr geringen Einwärtsströme lassen sich aus den Daten keine verlässlichen Aussagen über die Natrium-Abhängigkeit der Mutante K114I treffen. Hier geben die Experimente zur radiochemischen Aufnahme (siehe 3.2) weiteren Aufschluss über das Transportverhalten von K114I.

K114 R

In Abbildung 32 A wird das Verhalten des Succinat-induzierten Stromes von K114R in Anwesenheit von Natrium (●) und bei Ersatz des Natriums durch NMDG (○) an Messungen von 5 Oozyten aus 4 Spendertieren dargestellt. Bei allen Potentialen ist der Strom unter ORi₁ signifikant kleiner als unter ORi. Bei -90 mV lässt sich eine Reduktion von -132 ± 52 nA (ORi) auf noch -11 ± 5 nA (ORi₁) registrieren. Bei 0 mV reduziert sich der Strom von -70 ± 27 nA auf -48 ± 20 nA. Bei Depolarisation kommt es zu einem Anstieg der Amplitude des Stromes unter ORi₁, wohingegen es unter ORi zu einem Abfall der Amplitude kommt. Das Verhalten ähnelt dem des Wildtyps.

Abbildung 32 B zeigt das Verhalten des Succinat-induzierten Stromes von K114R bei Ersatz des Natriums (●) durch Lithium (○). Dargestellt sind die Messergebnisse von 4 Oozyten aus 4 Spendertieren. Die Ströme unter ORi_2 sind signifikant kleiner als die unter ORi . Bei -90 mV kommt es zu einer Reduktion von -39 ± 17 nA (ORi) auf -3 ± 1 nA (ORi_2) und bei 0 mV zu einer Reduktion von -46 ± 23 nA auf -33 ± 13 nA. Die Amplitude des Stromes unter ORi_2 wird bei zunehmender Depolarisation größer, unter ORi wird sie dagegen nur bei starker De- und Hyperpolarisation größer.

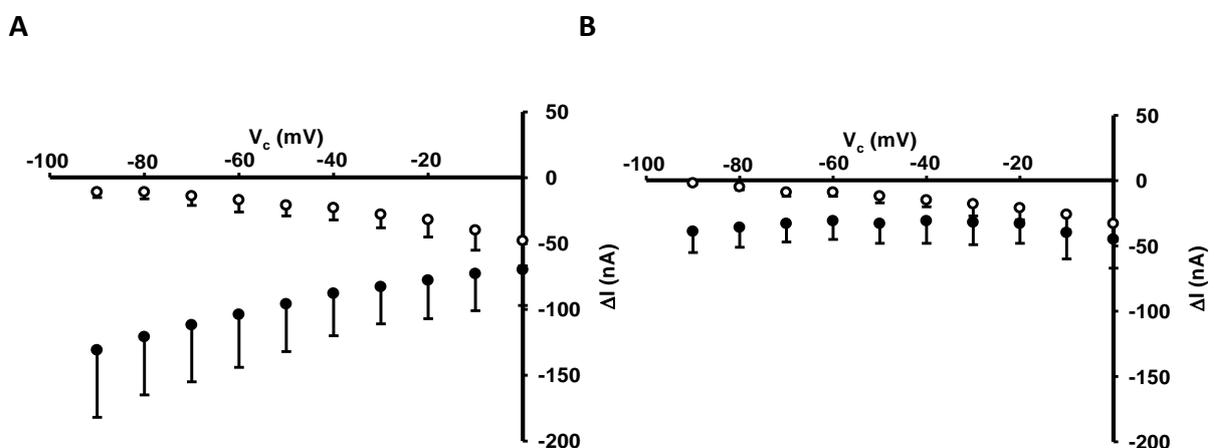


Abbildung 32 : I-V-Kennlinien der Succinat-induzierbaren Ströme der Mutante K114R in An- (●) und Abwesenheit (○) von Natrium. In A wurde Natrium durch NMDG ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 5 Oozyten aus 4 Spendertieren. In B wurde Natrium durch Lithium ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 4 Oozyten aus 4 Spendertieren.

Die in der Abbildung 32 erhobenen Daten zeigen eine Natrium-Abhängigkeit der Mutante K114R. Der Ersatz von Natrium durch eine äquimolare Menge NMDG oder Lithium führt zu einer Änderung der I-V-Charakteristik, indem die Succinat-medierte Ströme bei Depolarisation ansteigen.

K114Q

In Abbildung 33 A ist das Verhalten des Succinat-induzierten Stromes von K114Q in Anwesenheit von Natrium (●) und bei Ersatz des Natriums durch NMDG (○) zu sehen. Gemessen wurden 3 Oozyten aus 3 Spendertieren. Es sind nur kleine Ströme zu registrieren. Die Ströme unter ORi_1 bewegen sich eng um den Bereich 0 mV. Bei -90 mV kommt es zu

einer Reduktion des Stromes von -31 ± 9 nA (OR_i) auf 1 ± 5 nA (OR_{i1}). Bei 0 mV ist eine Reduktion von -15 ± 5 nA auf -10 ± 5 nA zu registrieren. Während die Amplitude des Stromes unter OR_{i1} potenzialunabhängig kaum nachweisbar ist, so ist sie unter OR_i bei Depolarisation abnehmend.

In Abbildung 33 B ist nun das Verhalten des Succinat-induzierten Stromes von K114Q bei Ersatz des Natriums (●) durch Lithium (○) zu sehen. Gemessen wurden hier 4 Oozyten aus 4 Spendertieren. Es sind nur marginale Restströme zu messen. Bei -90 mV kommt es zu einer Reduktion von -14 ± 5 nA (OR_i) auf 0 ± 0 nA (OR_{i2}), bei 0 mV von -13 ± 6 nA auf -9 ± 5 nA, d.h. eine Potenzialabhängigkeit ist aufgrund der niedrigen Succinat-induzierbaren Ströme nicht mehr nachweisbar.

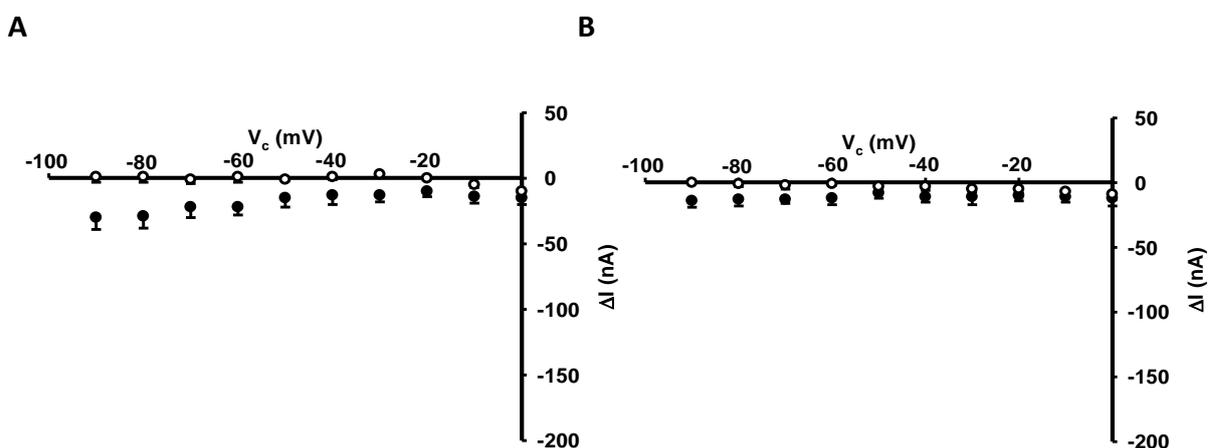


Abbildung 33: I-V-Kennlinien der Succinat-induzierbaren Ströme der Mutante K114Q in An- (●) und Abwesenheit (○) von Natrium. In A wurde Natrium durch NMDG ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 3 Oozyten aus 3 Spendertieren.

In B wurde Natrium durch Lithium ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 4 Oozyten aus 4 Spendertieren.

Die in der Abbildung 33 erhobenen Daten lassen aufgrund der marginalen Ströme keine zuverlässige Aussage zur Natrium-Abhängigkeit der Mutante K114Q zu. Die Versuche zur radiochemischen Aufnahme (siehe 3.2) ergeben weiteren Aufschluss über das Transportverhalten von K114Q.

K114E

Abbildung 34 A stellt das Verhalten des Succinat-induzierten Stromes von K114E in Anwesenheit von Natrium (●) und bei Ersatz von Natrium durch NMDG (○) in Messungen an 3 Oozyten aus 3 Spendertieren dar. Hier sind so gut wie keine Ströme messbar, es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen OR_i und OR_{i_1} . Bei -90 mV kommt es zu einer Reduktion von -3 ± 3 nA (OR_i) auf 3 ± 3 nA (OR_{i_1}) und bei 0 mV von -1 ± 1 nA auf $0,3 \pm 0,3$ nA. OR_i und OR_{i_1} verlaufen beide potenzialunabhängig konstant.

In Abbildung 34 B ist schließlich das Verhalten des Succinat-induzierten Stromes von K114E bei Ersatz des Natriums (●) durch Lithium (○) zu sehen. Die Ergebnisse stammen von 3 Oozyten aus 3 Spendertieren. Auch hier sind so gut wie keine Ströme messbar und es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen OR_i und OR_{i_2} . So ist bei -90 mV lediglich eine Reduktion von -1 ± 1 nA (OR_i) auf 1 ± 1 nA (OR_{i_2}) und bei 0 mV ein Anstieg von 0 ± 0 nA auf 1 ± 1 nA zu sehen. OR_i und OR_{i_2} verlaufen potenzialunabhängig konstant.

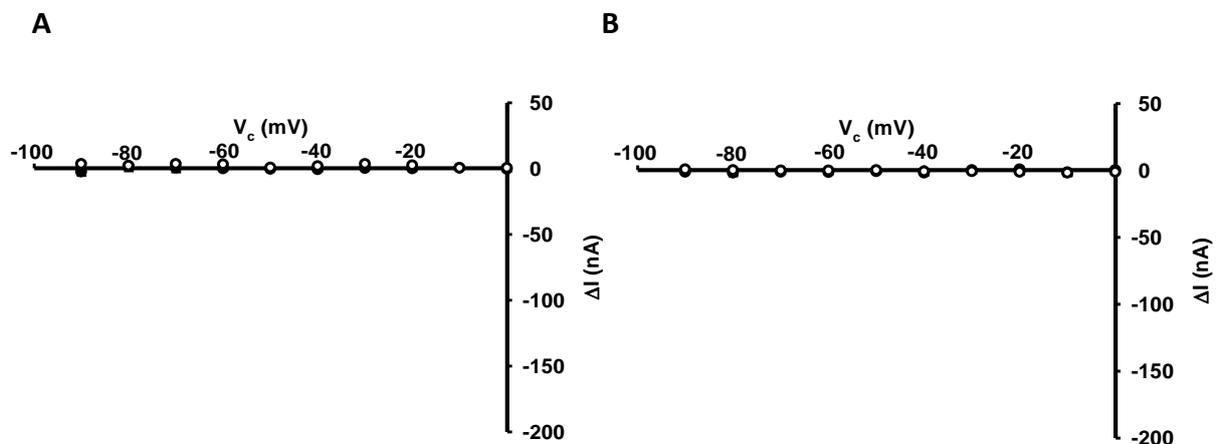


Abbildung 34: I-V-Kennlinien der Succinat-induzierbaren Ströme der Mutante K114E in An- (●) und Abwesenheit (○) von Natrium. In **A** wurde Natrium durch NMDG ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 3 Oozyten aus 3 Spendertieren. In **B** wurde Natrium durch Lithium ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 3 Oozyten aus 3 Spendertieren.

Da bei Mutante K114E (Abbildung 34) so gut wie keine Einwärtsströme messbar waren, kann keine Aussage über die Natrium-Abhängigkeit getroffen werden. Aufschluss über das Transportverhalten von K114E ergibt die radiochemische Aufnahme (siehe 3.2).

„Mock“

Abbildung 35 A zeigt das Verhalten der Wasser-injizierten Kontrolloozyten „Mock“ in Anwesenheit von Natrium (●) und bei Ersatz des Natriums durch NMDG (○). Dargestellt sind Messungen von 5 Oozyten aus 4 Spendertieren. Wie erwartet sind nur marginale Ströme zu registrieren. Bei -90 mV kommt es lediglich zu einer Reduktion von -3 ± 3 nA (ORi) auf -1 ± 3 nA (ORi₁) und bei 0 mV kommt es zu einer Reduktion von 3 ± 3 nA auf 4 ± 12 nA. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen ORi und ORi₁.

In Abbildung 35 B ist das Verhalten von „Mock“ bei Ersatz des Natriums (●) durch Lithium (○) an Messungen von 3 Oozyten aus 3 Spendertieren gezeigt. Auch hier sind nur marginale Ströme zu verzeichnen. So ist bei -90 mV eine Reduktion des Stromes von -5 ± 2 nA auf 7 ± 7 nA und bei 0 mV eine Erhöhung von 10 ± 5 nA auf 9 ± 6 nA zu verzeichnen. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen ORi und ORi₂.

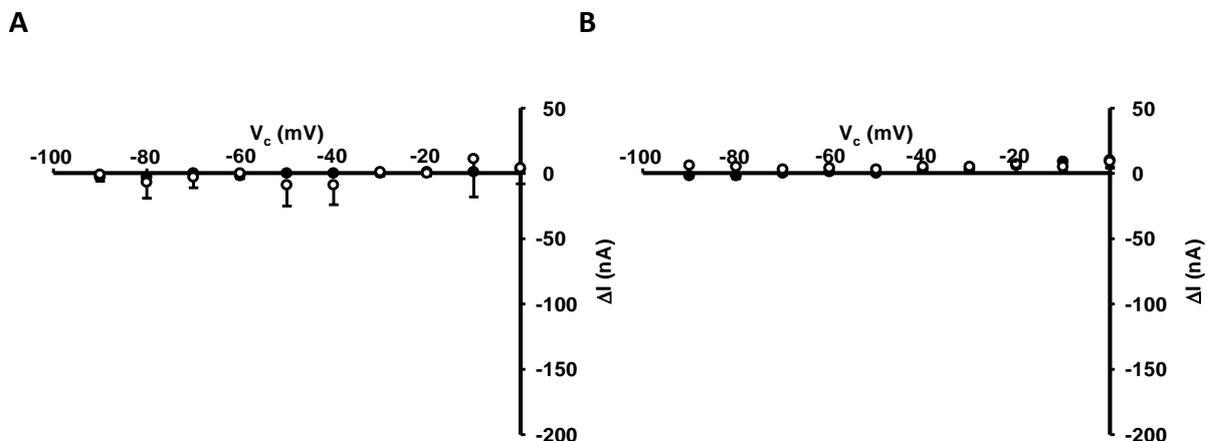


Abbildung 35 : I-V-Kennlinien der Succinat-induzierbaren Ströme in An- (●) und Abwesenheit (○) von Natrium in „Mocks“. In A wurde Natrium durch NMDG ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 5 Oozyten aus 4 Spendertieren. In B wurde Natrium durch Lithium ersetzt, der Graph zeigt Mittelwerte aus Messungen an 3 Oozyten aus 3 Spendertieren.

3.2 Radiochemische Aufnahme von [¹⁴C]Succinat

Im folgenden Versuch wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem Succinat in den Wildtyp und in seine Mutanten K114I, K114R, K114Q und K114E sowie in die Wasser-injizierten Oozyten „Mocks“ in An- und Abwesenheit von Natrium untersucht (Abbildung 36). Dazu wurden neben der Natrium-haltigen Lösung (ORi), zwei komplett Natrium-freie Lösungen hergestellt. In Kontrolllösung OR_{i1} wurde Natrium äquimolar durch N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) ersetzt, in Kontrolllösung OR_{i2} dagegen erfolgte der Ersatz von Natrium durch eine äquimolare Menge an Lithium. Diesen Lösungen wurde jeweils [¹⁴C]Succinat in einer Konzentration von 18,1 µmol/l als Substrat zugesetzt. Die hier angegebene relative Aufnahme in % bezieht sich auf die Substrat-Aufnahme des Wildtyps in Anwesenheit von Natrium (ORi), diese wurde als 100% definiert. Alle anderen Werte sind darauf bezogen.

In Abbildung 36 ist die relative Succinat-Aufnahme in den Wildtyp, in seine Mutanten und in „Mocks“ dargestellt. Die Aufnahme für den Wildtyp ergibt 100 ± 5,3% für ORi, 117,5 ± 6,6% für OR_{i2} (größter für OR_{i2} gemessener Wert) und 33,9 ± 1,7% für OR_{i1} (größter gemessener Wert für OR_{i1}).

Die Mutante K114R zeigt ein dem Wildtyp sehr ähnliches Aufnahmeverhalten. So kommt K114R auf 130,3 ± 8% für ORi (größter für ORi gemessener Wert), auf 101,5 ± 10,2% für OR_{i2} und schließlich auf 27,1 ± 2,5% für OR_{i1}. Die Mutante K114I erzielt nach dem Wildtyp und K114R die größte Succinat-Aufnahme. K114I kommt auf 108,9 ± 12,3% (ORi), 95,4 ± 9,7% (OR_{i2}) und 16,8 ± 2,2% (OR_{i1}). Die Mutante K114Q folgt mit 104,0 ± 11,2% für ORi, 67,7 ± 8,9% für OR_{i2} (kleinster für OR_{i2} gemessener Wert) und 9,6 ± 1,9% für OR_{i1}. Schließlich erreicht Mutante K114E 88,1 ± 8,7% für ORi (kleinster für ORi gemessener Wert), 72,8 ± 8% für OR_{i2} und lediglich 5,4 ± 0,5% für OR_{i1} (kleinster für OR_{i1} gemessener Wert). Abschließend folgt noch die Transportaktivität für die Wasser-injizierten Oozyten „Mocks“, welche erwartungsgemäß eine lediglich minimale Aufnahme zeigen: 2,1 ± 0,1% (ORi), 2,6 ± 0,2% (OR_{i2}) und 2,2 ± 0,1% (OR_{i1}).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nicht nur der Wildtyp, sondern auch alle seine Mutanten ein gutes Aufnahmeverhalten für Natrium (ORi) und Lithium (OR_{i2}) zeigen.

Das Aufnahmeverhalten in Anwesenheit von Natrium variiert zwischen 88,1 ± 8,7% (K114E) und 130 ± 8,5% (K114R). Bei Ersatz von Natrium durch Lithium rangiert die Aufnahme zwischen 67,7 ± 8,9% (K114Q) und 117,5 ± 6,6% (Wildtyp). So ist bei K114I, K114E und

„Mock“ kein signifikanter Unterschied ($p > 0,01$) zwischen der Aufnahme in ORi und ORi_2 festzustellen. Bei Ersatz von Natrium durch NMDG (ORi_1) zeigt sich dagegen ein deutlich geringfügigeres Aufnahmeverhalten im Bereich von $5,4 \pm 0,5\%$ (K114E) bis $33,9 \pm 1,7\%$ (Wildtyp). Hier ist beim Wildtyp und allen seinen Mutanten eine signifikant geringere Aufnahme ($p < 0,01$) in Anwesenheit von ORi_1 verglichen mit der Aufnahme in Anwesenheit von ORi zu verzeichnen.

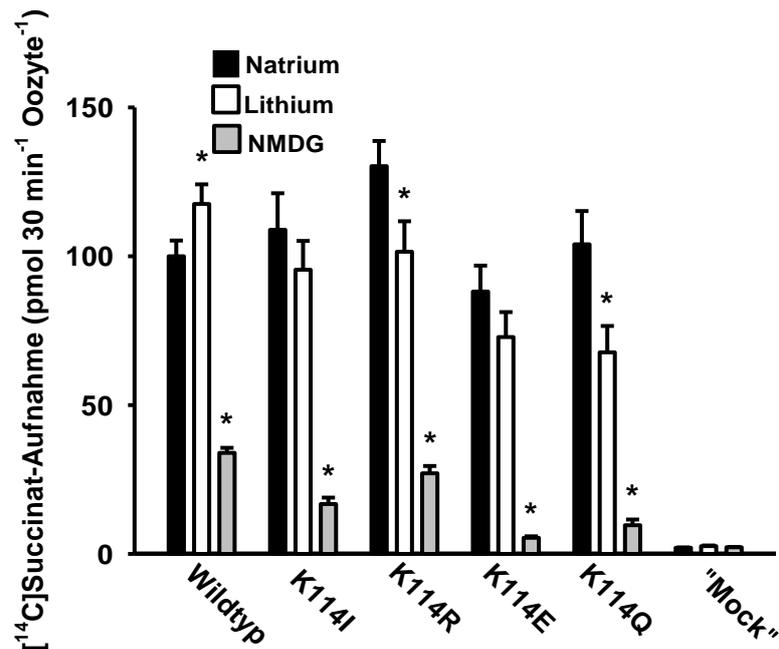


Abbildung 36: [¹⁴C]Succinat-Aufnahme in den Wildtyp und seine Mutanten sowie in „Mocks“. Die Aufnahme des Wildtyps in Natrium (ORi) wurde = 100% gesetzt. Die mit * gekennzeichneten Balken weisen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) bezogen auf die Aufnahme in ORi (schwarze Balken) auf. Gezeigt werden die Daten aus 5 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, pro Bedingung wurden jeweils 10 Oozyten untersucht.

Im folgenden Versuch (Abbildung 37) wurde die Aufnahme von [¹⁴C]Succinat in den Wildtyp (●) und in die Mutante K114I (○) bei Vorliegen unterschiedlicher Natriumkonzentrationen untersucht. Die jeweiligen Konzentrationen betragen 0 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM und 110 mM Natrium. Zum Erreichen der Gesamtkonzentration von 110 mM wurde der jeweilig fehlende Anteil an Natrium durch NMDG ersetzt. [¹⁴C]Succinat lag auch hier in einer Konzentration von 18,1 μmol/l vor.

Die Tatsache, dass auch in völliger Abwesenheit von Natrium eine geringfügige Aufnahme zu messen ist, lässt sich dadurch erklären, dass NMDG selbst in geringem Ausmaß als Substrat

von Wildtyp und K114I fungiert (siehe Abbildung 36). Mit zunehmender Natriumkonzentration steigt die Succinat-Aufnahme von Wildtyp und K114I, wobei die Aufnahme im Verlauf eine Sättigungskinetik aufweist. Die Aufnahme des Wildtyps liegt allerdings durchweg deutlich oberhalb derjenigen von K114I.

So beträgt die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) für Natrium beim Wildtyp $20,9 \pm 3,2$ mM, wohingegen die K_M für Natrium bei der Mutante K114I $105,8 \pm 73,9$ mM beträgt. Somit hat der Wildtyp eine höhere Affinität zu Natrium im Vergleich zu K114I. Der Hill-Koeffizient für den Wildtyp ergibt 1,57, wohingegen derjenige für K114I 1.01 ergibt. Dies bedeutet, dass an den Dicarboxylat-Transporter des Wildtyps mehr Natrium-Ionen binden als an den mutierten Dicarboxylat-Transporter von K114I.

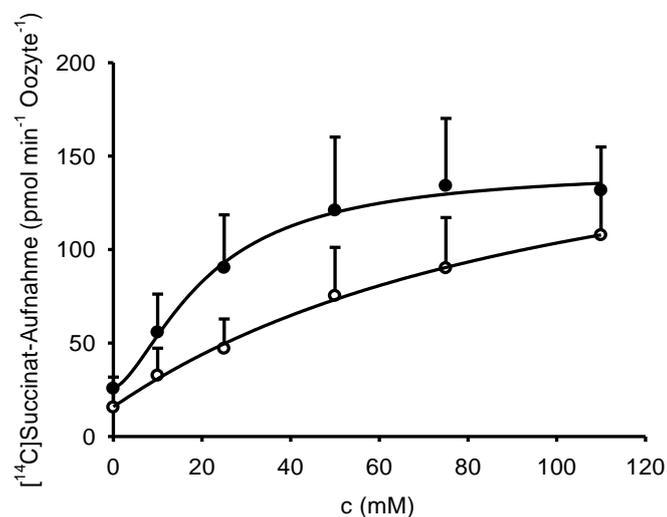


Abbildung 37: Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ Succinat in Abhängigkeit von der Natrium-Konzentration in den Wildtyp (●) und in K114 I (○). Die Natriumkonzentrationen variierten zwischen 0 und 110 mM: 0 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM und 110 mM. Gezeigt werden Daten aus 6 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, pro Datenpunkt wurden 10 Oozyten eingesetzt.

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Während am Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporter-1 (NaDC-1) bereits mehrere Mutationsexperimente zur Klärung der funktionellen Rolle der Aminosäuren in bzw. an mehreren der 11 Transmembrandomänen durchgeführt wurden (PAJOR et al. 2000; OSHIRO et al. 2006; JOSHI und PAJOR 2006; OSHIRO und PAJOR 2006; WEERACHAYPHORN und PAJOR 2008), ist dazu zum Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporter-3 (NaDC-3) kaum etwas bekannt. Bisher gibt es eine Arbeit, in welcher die funktionelle Rolle kationischer Aminosäurereste, insbesondere die von Lysin an Position 114 an Transmembrandomäne 4, in Mutationsexperimenten am NaDC-3 der Winterflunder *Pleuronectes americanus* (fNaDC-3) näher untersucht wurde (HAGOS et al. 2006). Neben dem Wildtyp (Lysin (K) an Pos. 114) wurden die Mutanten K114I (Isoleucin an Pos. 114), K114R (Arginin an Pos. 114), K114Q (Glutamin an Pos. 114) und K114E (Glutamat an Pos. 114) näher untersucht. Während Wildtyp und K114R in Anwesenheit von Natrium und Succinat sowohl Succinat-vermittelte Einwärtsströme vergleichbarer Amplitude als auch eine vergleichbare Aufnahme von [¹⁴C]Succinat zeigten, wiesen die restlichen Mutanten zwar ein ähnliches Aufnahmeverhalten, aber kaum messbare Einwärtsströme auf. Die Expression der Dicarboxylat-abhängigen Transportproteine des Wildtyps und seiner oben genannten Mutanten auf der Oozytenoberfläche konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden. Wasser-injizierte Oozyten „Mock“ exprimierten dagegen keine Transportproteine auf der Oozytenoberfläche. Hieraus wurde geschlossen, dass eine positive Ladung (Lysin und Arginin) an Position 114 für den elektrogeneren Transport von NaDC-3 von entscheidender Bedeutung ist (HAGOS et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden der fNaDC-3 Wildtyp und seine Mutanten in Bezug auf ihre Natrium-Abhängigkeit und ihre Hemmbarkeit durch Lithium weiterführend untersucht.

Der NaDC-3 ist ein Cotransporter, welcher drei Natrium-Ionen zusammen mit einem zweifach negativ geladenen Dicarboxylat in die Zelle transportiert (KEKUDA et al. 1999; STEFFGEN et al. 1999; WANG H et al. 2000), wobei ein transmembranaler Natrium-Gradient als Triebkraft wirkt. Substrate des NaDC-3 sind Di- und Tricarboxylate (in divalenter Form)

des Citratzyklus mit einer Grundstruktur von 4 – 5 C-Atomen. Bevorzugtes Substrat des NaDC-3, noch vor Fumarat und α -Ketoglutarat, ist Succinat (STEFFGEN et al. 1999), welches in dieser Arbeit als Testsubstrat Verwendung fand. Der NaDC-3 ist in einer Vielzahl von Organen wie Niere, Leber, Gehirn, Plazenta, Pankreas und Herz gefunden worden. In der Niere ist er in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert und ist neben der Versorgung der Zellen mit Dicarboxylaten über eine funktionelle Kopplung an die Organischen-Anionen-Transporter (OAT) an der renalen Fremdstoffausscheidung beteiligt (DANTZLER 2002). In der Leber ist der NaDC-3 in der basolateralen Membran der perivenösen Hepatozyten zu finden, wo er Dicarboxylate für die Glutaminsynthese im Rahmen der hepatischen Ammoniakfixierung in die Zellen transportiert (CHEN X et al. 1999). Im Gehirn wird der NaDC-3 benötigt, um *N*-Acetylaspartat in Astrozyten zu transportieren, wo daraus wichtige Neurolipide synthetisiert werden (BURRI et al. 1991; HUANG et al. 2000). Des Weiteren scheint der NaDC-3 an der Zellalterung beteiligt zu sein. So war in Nierenbiopsaten sowohl älterer Patienten als auch älterer Ratten signifikant mehr NaDC-3 exprimiert als in Proben jüngerer Patienten und Ratten (WANG J et al. 2003), dazu passend lebten Mutanten von *Drosophila melanogaster* mit verminderter NaDC-3 Expression signifikant länger (ROGINA et al. 2000).

Als Expressionssystem für den fNaDC-3 Wildtyp und seine Mutanten fanden die Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* Verwendung. Im Folgenden wird die Eignung dieses Systems diskutiert. Die Injektion in vitro hergestellter cRNA, z.B. von fNaDC-3 Wildtyp und Mutanten, in *Xenopus*-Oozyten führt zur Expression und Integration von Membranproteinen in die Plasmamembran der Oozyte innerhalb von drei Tagen. Damit ermöglicht dieses Expressionssystem eine effiziente funktionelle Untersuchung von Transportproteinen. 1971 gelang es GURDON et al. erstmalig die intraozytäre Synthese von Hämoglobin nach Injektion der entsprechenden mRNA nachzuweisen. HEDIGER et al. konnten 1987 erstmalig zeigen, dass *Xenopus* Oozyten klonierte Membrantransporter exprimieren können. Dabei begünstigen die zahlreich in den Eizellen vorhandenen RNA-Polymerasen, Histone und Ribonucleotidtriphosphate die Translation und Transkription (RICHTER et al. 1982). Als vorteilhaft erweisen sich der große Durchmesser (\emptyset 1,1 – 1,3 mm), der eine unproblematische Handhabung ermöglicht, sowie ihre Resistenz gegenüber Perforation bei der Mikroinjektion. Da die Translation in einer lebenden Zelle erfolgt, besteht

eine geringere Störanfälligkeit als dies in zellfreien Translationssystemen der Fall wäre. Darüber hinaus weisen *Xenopus* Oozyten eine geringe Spezies-Spezifität auf, die es erlaubt artfremde cRNA, wie z.B. von der Winterflunder, problemlos zu transkribieren und zu translatieren. Da die Eizellen bereits mit allen notwendigen Substraten für Wachstum und Proteinsynthese ausgestattet sind, benötigen sie nur eine kleine Anzahl endogener Membrantransportsysteme (WAGNER et al. 2000). Dadurch ist von einer niedrigen Hintergrundaktivität gegenüber den zu untersuchenden exogenen Transportsystemen auszugehen. Endogene Transportsysteme wurden für Phosphat (ECKARD und PASSOW 1987), Aminosäuren (BELLE et al. 1976; JUNG et al. 1984; STEFFGEN et al. 1991; VAN WINKLE 1993) und Glukose (WEBER et al. 1989) gefunden. Zudem hält ein Ca^{2+} gesteuerter Cl^- -Kanal das Membranpotenzial aufrecht (DASCAL 1987). Daher wurden sicherheitshalber zusätzlich immer Messungen an Wasser-injizierten Kontrolloozyten („Mock“) durchgeführt, um den möglichen Einfluss endogener Transporter auf das Messergebnis abgrenzen zu können. Darüber hinaus können Schwankungen im Expressionsverhalten der Zellen auftreten, die sich durch unterschiedliche Spendertiere und saisonale Beeinflussung erklären lassen (ASSELBERGS et al. 1979; SOREQ 1985). Wegen dieser Schwankungen im Expressionsverhalten der Oozyten wurden bei der Auswertung der Messergebnisse der radiochemischen Aufnahme immer Relativ-Werte, bezogen auf die ungehemmte Transportaktivität des Wildtyps des betreffenden Tages (jeweils 100%) berechnet.

Aufgrund der Elektrogenität des fNaDC-3 konnten elektrophysiologische Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) durchgeführt werden. Über die gemessenen Ströme konnten indirekt Rückschlüsse auf das Transportverhalten gezogen werden. Daneben wurden Versuche zur radiochemischen Aufnahme der Transporter durchgeführt, in welchen die aufgenommene Menge des radioaktiv markierten Succinats direkt bestimmt wurde. Hierbei betrug die Inkubationszeit in [^{14}C]Succinat 30 Minuten, da innerhalb dieser Zeitspanne eine linear ansteigende Substrataufnahme erfolgt (STEFFGEN et al. 1999). Die radiochemische Aufnahme war insbesondere für die weitere Untersuchung der Transportvorgänge in den elektroneutralen Mutanten notwendig und aufschlussreich.

4.2 Der Einfluss von Lithium auf fNaDC-3 Wildtyp und seine Mutanten

Hier wurde die Hemmbarkeit des Succinat-induzierbaren Stromes in Anwesenheit von Natrium (ORi) unter Zugabe aufsteigender Lithiumkonzentrationen von 0 bis 5 mM getestet.

Wildtyp und Mutante K114R

Lithium entfaltet seine hemmende Wirkung in allen Konzentrationen und bei allen Potenzialen (Abbildungen 16 und 22). Im Bereich von 0 – 2 mM Lithium nahm das Ausmaß der Hemmung mit steigender Dosis zu, wohingegen im Bereich von 2 – 5 mM Lithium kaum eine Zunahme der Hemmung durch Lithium beobachtet werden konnte. Des Weiteren nahm das Ausmaß der Hemmung mit zunehmender Hyperpolarisation in geringem Umfang zu. Entsprechend wurden die nicht hemmbaren Restströme bei zunehmender Hyperpolarisation geringfügig kleiner (Abbildungen 20 und 26). Beim Wildtyp (2 mM Lithium) sanken sie nicht-signifikant von $34,5 \pm 8,4\%$ (-30 mV) über $30,5 \pm 7,2\%$ (-60 mV) auf $25,3 \pm 6,9\%$ (-90 mV). Bei K114R (2 mM Lithium) kam es zu einer nicht-signifikanten Veränderung von $28,8 \pm 7,0\%$ (-30 mV) über $25,5 \pm 4,2\%$ (-60 mV) auf $28,0 \pm 3,2\%$ (-90 mV). Da der Unterschied in den oben aufgeführten prozentualen Restströmen nicht signifikant ist, ist davon auszugehen, dass die Hemmung des Succinat-induzierten Stromes beim Wildtyp und bei K114R potenzialunabhängig erfolgt. Somit ist das Ausmaß der Hemmung in erster Linie abhängig von der Höhe der Lithiumkonzentration.

Die Tatsache, dass eine relativ geringe Konzentration an Lithium (5 mM) bei einem Angebot einer viel größeren Konzentration an Natrium (110 mM) in der Lage ist, eine Hemmung von $79,3 \pm 4,2\%$ (Wildtyp) bzw. $88 \pm 2,2\%$ (K114R) bei -90 mV hervorzurufen, lässt darauf schließen, dass die Affinität des fNaDC-3 für Lithium deutlich höher sein muss als diejenige für Natrium. Lithium konkurriert mit Natrium um die Bindungsstellen. Je mehr Lithium vorhanden ist, desto mehr kann gebunden und transportiert werden. Da Lithium, wie in 4.4.1 beschrieben, unter Entstehung eines Auswärtsstromes (Symport eines Lithium-Ions mit einem divalenten Anion) transportiert wird, ist bei höheren Lithium-Konzentrationen (2 und 5 mM) keine Zunahme des Einwärtsstromes unter Hyperpolarisation mehr zu registrieren, so wie es noch in niedrigeren Lithium-Konzentrationen (0,2 - 1 mM) zu beobachten ist. Dies zeigt, dass der Natrium-induzierte Einwärtsstrom durch zunehmende Lithiumkonzentrationen, welche bei Transport einen Auswärtsstrom hervorrufen,

kompensiert werden kann. Der nicht hemmbare Reststrom wird durch das vorhandene Natrium aufrechterhalten. Auch hier verhält sich die Mutante K114R ebenso wie der Wildtyp.

Mutanten K114I, K114Q und K114E

Aufgrund des elektroneutralen Transportes von Natrium und Lithium in den Mutanten K114I, K114Q und K114E (siehe auch 4.3 und 4.4.1) waren insgesamt nur marginale Ströme zu messen, die keinen signifikanten Unterschied zwischen der An- und Abwesenheit von Lithium zeigten. Die Ströme bewegten sich zwischen 0 und -90 mV in einem Bereich von 16 ± 17 nA bis -22 ± 9 nA in Abwesenheit von Lithium. In Anwesenheit von 5 mM Lithium rangierten die Ströme zwischen 0 und -90 mV in einem Bereich von 3 ± 3 nA bis -7 ± 4 nA. Da kaum Ströme detektiert werden konnten, ist kein hemmender Effekt durch Lithium zu erkennen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Mutanten K114I, K114Q und K114E sowohl Natrium als auch Lithium zusammen mit einem Dicarboxylat, wahrscheinlich in einem Verhältnis von 2:1, elektroneutral transportieren.

Wasser-injizierte Oozyten „Mock“

Wie erwartet wurden in den Wasser-injizierten Kontrolloozyten lediglich Ströme mit sehr geringer Amplitude gemessen, die in Abwesenheit von Lithium zwischen 0 und -90 mV in einem Bereich von $5 \pm 2,5$ nA bis -4 ± 2 nA rangierten. In Anwesenheit von 5 mM Lithium lagen die Ströme zwischen 0 und -90 mV in einem Bereich von 2 ± 2 nA bis -7 ± 3 nA. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da „Mocks“ die untersuchten Transportproteine nicht exprimieren und somit kein Substrat transportieren können.

4.3 Das Verhalten von fNaDC-3 Wildtyp und seinen Mutanten in Anwesenheit von Natrium

Wildtyp und Mutante K114R

In Anwesenheit von Natrium (ORi) und 1 mM Succinat konnte bei einer Klemmspannung von -60 mV für den Wildtyp ein Einwärtsstrom von -107 ± 22 nA und für K114R ein Einwärtsstrom von -110 ± 72 nA gemessen werden. Die beiden Werte liegen so nahe

beieinander, dass kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und K114R in Bezug auf die Einwärtsströme festgestellt werden konnte ($p > 0.01$). In den Versuchen zur radiochemischen Aufnahme in Anwesenheit von Natrium und 1 mM Succinat zeigten der Wildtyp und K114R ebenfalls ein ähnliches Transportverhalten. So kam der Wildtyp definitionsgemäß auf $100,0 \pm 5,3\%$ und K114R sogar auf $130,3 \pm 8,5\%$ relative Aufnahme. Die gemessenen Einwärtsströme und die Ergebnisse der radiochemischen Aufnahme zeigen, dass es sich bei Mutante K114R, ebenso wie beim Wildtyp, um einen elektrogenen Transporter handelt, der 3 positiv geladene Natrium-Ionen zusammen mit einem zweifach negativ geladenen Dicarboxylat transportiert und somit durch den positiven Ladungsüberschuss einen Einwärtsstrom verursacht. Lysin an Position 114 kann also durch Arginin (R) unter Beibehaltung der 3:1-Stöchiometrie ausgetauscht werden, ohne dass das Aufnahmeverhalten beeinträchtigt wird.

Mutanten K114I, K114Q und K114E

In Anwesenheit von Natrium (ORi) und Succinat sind bei allen Mutanten, außer K114R, nur sehr viel kleinere Einwärtsströme im Vergleich zum Wildtyp (-107 ± 22 nA bei -60 mV) messbar.

So wurden bei einer angelegten Klemmspannung von -60 mV bei K114Q -16 ± 6 nA, bei K114I -10 ± 10 nA und bei K114E $-0,5 \pm 0,7$ nA gemessen. Diese Ergebnisse waren allesamt signifikant kleiner, als die von Wildtyp und K114R ($p < 0,01$). In der radiochemischen Aufnahme jedoch war eine Aufnahme von [^{14}C]Succinat zu messen, die derjenigen des Wildtyps (100%) ähnelte. So kam K114Q auf $104,0 \pm 11,2\%$, K114I auf $108,9 \pm 12,3\%$ und K114E auf $88,1 \pm 8,7\%$. Dieses gute Aufnahmeverhalten in der radiochemischen Aufnahme bei kaum messbaren Einwärtsströmen lässt darauf schließen, dass die Mutanten K114I, K114Q und K114E Natrium und Succinat in einem elektroneutralen Modus transportieren. Am wahrscheinlichsten erscheint, dass statt 3 nun nur noch 2 Natrium-Ionen pro divalentem Dicarboxylat binden. Diese 2:1-Stöchiometrie würde im Gegensatz zur 3:1-Stöchiometrie keinen positiven Ladungsüberschuss mehr in die Zelle transportieren und somit ließen sich keine Einwärtsströme mehr registrieren. Neben diesem Modell des elektroneutralen Transportes sind noch weitere Modelle denkbar. So wäre es auch möglich, dass es unter Beibehaltung der 3:1-Stöchiometrie zu einem zusätzlichen Auswärtstransport einer positiven Ladung durch das Transportprotein kommt. Somit würde der durch das dritte Natrium-Ion

verursachte Ladungsüberschuss, beispielsweise durch den Ausstrom eines einfach positiv geladenen Wasserstoff-Ions, kompensiert werden. Neben dem Ausstrom positiv geladener Ionen ist aber auch ein Einstrom negativ geladener Ionen denkbar, um so die positive Überschussladung zu neutralisieren. In diesem Falle könnte beispielsweise der gleichzeitige Einstrom eines einfach negativ geladenen Chlorid-Ions oder einer einfach negativ geladenen OH-Gruppe über das Transportprotein den positiven Ladungsüberschuss kompensieren. Der Ersatz von Lysin an Position 114 durch Isoleucin (I), Glutamin (Q) und Glutamat (E) verändert also die Stöchiometrie des Transporters wesentlich.

Wasser-injizierte Oozyten „Mock“

In Anwesenheit von Natrium (ORi) und 1 mM Succinat konnte bei einer Klemmspannung von -60 mV für „Mock“ kein Einwärtsstrom gemessen werden (0 ± 0 nA). In der radiochemischen Aufnahme in Anwesenheit von Natrium (ORi) und 1 mM Succinat betrug die Aufnahmeaktivität lediglich $2,1 \pm 0,1\%$ (Wildtyp: $100,0 \pm 5,3\%$). Dieses Ergebnis zeigt, dass „Mocks“ die untersuchten Transportproteine nicht exprimieren.

4.4 Das Verhalten von fNaDC-3 Wildtyp und seinen Mutanten in Abwesenheit von Natrium

4.4.1 Ersatz des Natriums durch Lithium (ORi2)

Wildtyp und Mutante K114R

In Abwesenheit von Natrium bei Ersatz durch eine äquimolare Menge an Lithium (ORi₂) wurden für den Wildtyp und K114R bei allen untersuchten Klemmpotenzialen deutlich kleinere Ströme gemessen als in Anwesenheit von Natrium (ORi). Des Weiteren fiel auf, dass die Ströme sich bei zunehmender Hyperpolarisation gegenläufig verhielten. Während der Einwärtsstrom unter Natrium größer wurde, wurde der Strom in Abwesenheit von Natrium immer kleiner. Für den Wildtyp bedeutet das, dass der Strom unter ORi von -48 ± 14 nA (0 mV) auf -90 ± 12 nA (-90 mV) anstieg, wohingegen der Strom unter ORi₂ von -32 ± 7 nA (0 mV) auf -7 ± 3 nA (-90 mV) abfiel. Im Falle von K114R kam es unter ORi₂ ebenfalls zu einer Verkleinerung des Stromes von -33 ± 13 nA (0 mV) auf -3 ± 3 nA (-90 mV). In der

radiochemischen Aufnahme in Abwesenheit von Natrium (ORi_2) erreichten der Wildtyp und K114R Aufnahmeergebnisse, die denen des Wildtyps in Anwesenheit von Natrium (100%) ähnelten. So kamen der Wildtyp und K114R je auf $117,5 \pm 6,6\%$ und $101,5 \pm 10,2\%$ relative Aufnahme. Dies zeigt, dass Lithium Substrat des fNaDC-3 ist und Natrium ohne Einschränkung ersetzen kann. K114R verhält sich bei Ersatz des Natriums durch Lithium genauso wie der Wildtyp, auch hier kann Lithium Natrium vollständig ersetzen. Die kleineren Ströme in Abwesenheit von Natrium bei vergleichbarer radiochemischer Aufnahme lassen sich dadurch erklären, dass Lithium in einem anderen stöchiometrischen Verhältnis als Natrium transportiert wird. Während unter Natrium ein Einwärtsstrom entsteht, kommt es unter Lithium zu einem Auswärtsstrom. Dies erklärt das zunehmende Auseinanderklaffen der I-V-Kennlinien in An- und Abwesenheit von Natrium bei zunehmender Hyperpolarisation (Abbildungen 30 B und 32 B). Pro transportiertem Lithium-Ion muss ein negativer Ladungsüberschuss in die Zelle gelangen. Dies ist am ehesten durch die Bindung von Lithium an nur eine der drei Natrium-Bindungsstellen zu erklären. Somit würde ein zweifach negativ geladenes Dicarboxylat zusammen mit einem einfach positiv geladenen Lithium-Ion in die Zelle transportiert werden und damit eine negative Überschussladung in die Zelle bringen. Mutante K114R verhält sich unter Ersatz des Natriums durch Lithium (ORi_2) genauso wie der Wildtyp. Beide akzeptieren Lithium als Substrat anstelle von Natrium und transportieren es in einem Verhältnis von 1:1 mit einem Dicarboxylat unter Entstehung eines Auswärtsstromes.

Mutanten K114I, K114Q und K114E

In den elektrophysiologischen Messungen in Abwesenheit von Natrium (ORi) zeigten sich, wie bereits beschrieben, lediglich marginale Ströme. So rangierten die in Anwesenheit von Natrium gemessenen Einwärtsströme der drei Mutanten zwischen 0 und -90 mV lediglich zwischen 0 ± 0 und -14 ± 5 nA. Die beim Wildtyp zwischen 0 und -90 mV gemessenen Werte dagegen bewegten sich zwischen -48 ± 14 und -90 ± 12 nA. Die Ströme der Mutanten waren damit allesamt signifikant kleiner als die des Wildtyps. Bei Ersatz des Natriums durch eine äquimolare Menge Lithium (ORi_2) wurden für die drei Mutanten Ströme gemessen, die sich zwischen 0 und -90 mV im Bereich von 1 ± 1 bis -9 ± 5 nA bewegten. Zum Vergleich bewegten sich die Ströme des Wildtyps unter ORi_2 zwischen 0 und -90 mV im Bereich von

-32 ± 7 nA bis -7 ± 3 nA. Aufgrund der minimalen Ströme waren keine Tendenzen in Richtung Einwärts- oder Auswärtsstrom zu erkennen.

In den Versuchen zur radiochemischen Aufnahme bei Ersatz des gesamten Natriums durch Lithium (ORi_2) kam K114I auf $95,4 \pm 9,7\%$, K114Q auf $67,7 \pm 8,9\%$ und K114E auf $72 \pm 8,4\%$. Der Wildtyp kam unter den gleichen Bedingungen auf $117,5 \pm 6,6\%$. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch in den Mutanten K114I, K114Q und K114E, ebenso wie im Wildtyp und in K114R, Natrium durch Lithium ersetzt werden kann. Somit fungiert Lithium als Substrat des fNaDC-3 Wildtyps und seiner vier Mutanten. Die marginalen Ströme in Abwesenheit von Natrium (ORi_2) lassen ein elektroneutrales Transportgeschehen vermuten, wie es bereits für die Mutanten unter Natrium (ORi) in 4.3 beschrieben wurde. Wahrscheinlich bindet Lithium an nur zwei der drei Natrium-Bindungsstellen und würde somit zusammen mit einem zweifach negativ geladenen Dicarboxylat elektroneutral in die Zelle transportiert werden. Ein solcher Mechanismus könnte das Transportverhalten von K114I, K114Q und K114E in Anwesenheit von Lithium erklären.

Wasser-injizierte Oozyten „Mock“

Die Wasser-injizierten Oozyten zeigten erwartungsgemäß lediglich minimale Ströme, die in Anwesenheit von Natrium (ORi) zwischen 0 und -90 mV in einem Bereich von 10 ± 5 nA bis -3 ± 3 nA lagen. Bei Ersatz des Natriums durch Lithium (ORi_2) lagen die gemessenen Ströme im Bereich von 9 ± 6 nA bis -3 ± 3 nA. Zwischen ORi und ORi_2 besteht, wie erwartet, kein signifikanter Unterschied. In der radiochemischen Aufnahme kamen die „Mocks“ bei Ersatz des Natriums durch Lithium (ORi_2) lediglich auf $2,6 \pm 0,2\%$ relative Aufnahme (Wildtyp: $117,5 \pm 6,6\%$). Somit besitzen „Mocks“ keine Transportproteine zum Transport von Succinat.

4.4.2 Ersatz des Natriums durch N-Methyl-D-Glucamin (ORi_1)

Wildtyp und Mutante K114R

Bei Ersatz des Natriums durch eine äquimolare Menge an N-Methyl-D-Glucamin (NMDG, ORi_1) waren die gemessenen Ströme sehr viel kleiner, als in Anwesenheit von Natrium (ORi). Die Ströme wiesen bei zunehmender Hyperpolarisation einen gegensinnigen Verlauf auf (Abbildungen 30 A und 32 A). Während der Strom unter ORi größer wurde, wurde der Strom

unter ORi_1 zunehmend kleiner. So kam es beim Wildtyp in Abwesenheit von Natrium zu einer Reduktion von -25 ± 15 nA (0 mV) auf -2 ± 27 nA (-90 mV) und bei K114R zu einer Reduktion von -48 ± 20 nA auf -11 ± 5 nA. In Anwesenheit von Natrium dagegen war eine Vergrößerung von -61 ± 21 nA auf -109 ± 24 nA beim Wildtyp (0 und -90 mV) und eine Vergrößerung von -70 ± 27 nA auf -132 ± 52 nA bei K114R zu registrieren. Die deutliche Abnahme der gemessenen Einwärtsströme bei zunehmender Hyperpolarisation spricht dafür, dass der Transport von NMDG über Wildtyp und K114R, ebenso wie Lithium, einen Auswärtsstrom verursacht. Der Transport von Natrium dagegen verursacht einen Einwärtsstrom, deshalb sind hier zunehmende Ströme zu registrieren. In der radiochemischen Aufnahme unter Ersatz von Natrium durch NMDG (ORi_1) war eine Substrat-Aufnahme detektierbar, allerdings deutlich weniger als unter Ersatz von Natrium durch Lithium (ORi_2). Unter ORi_1 kam der Wildtyp auf $33,9 \pm 1,7\%$ ($117,5 \pm 6,6\%$ unter ORi_2) und K114R auf $27,1 \pm 2,5\%$ ($101,5 \pm 10,2\%$ unter ORi_2). Diese Ergebnisse zeigen, dass NMDG Substrat von fNaDC-3 Wildtyp und K114R ist, allerdings verglichen mit Natrium und Lithium in deutlich geringerem Umfang transportiert wird. Dies mag daran liegen, dass NMDG mit einer Molekülmasse von 195,22 g/mol deutlich größer ist als Natrium (58,44 g/mol) oder Lithium (42,39 g/mol). Durch Diffusion in die Zelle kann die Aufnahme nicht erklärt werden, da NMDG nur sehr langsam durch Zellmembranen diffundieren kann. Wie bereits bei Lithium beobachtet, wird auch NMDG unter Entstehung eines Auswärtsstromes transportiert. Daher ist auch hier davon auszugehen, dass NMDG nur an eine der drei Natrium-Bindungsstellen bindet und dann zusammen mit einem zweifach negativ geladenen Dicarboxylat in die Zelle transportiert würde.

Mutanten K114I, K114Q und K114E

Wie bereits in 4.4.1 beschrieben waren in Anwesenheit von Natrium (ORi) bei diesen Mutanten nur marginale Ströme zu verzeichnen. Sie beliefen sich zwischen 0 und -90 mV in einem Bereich von $-1 \pm 0,5$ nA bis -31 ± 9 nA. In Abwesenheit von Natrium bei Ersatz durch NMDG (ORi_2) rangierten die gemessenen Ströme zwischen 0 und -90 mV in einem Bereich von 3 ± 3 nA bis -28 ± 24 nA. Aufgrund der minimalen Ströme waren keine Tendenzen in Richtung Auswärts- oder Einwärtsstrom zu erkennen. In der radiochemischen Aufnahme unter ORi_1 kam K114I auf $16,8 \pm 2,2\%$ ($95,4 \pm 9,7\%$ unter ORi_2), K114Q auf $9,6 \pm 1,9\%$ ($67,7 \pm 8,9\%$ unter ORi_2) und K114E auf $5,4 \pm 0,5\%$ ($72,8 \pm 8,4\%$ unter ORi_2).

NMDG fungiert also in geringem Umfang als Substrat dieser Mutanten, aber die Transportkapazität unter ORi_1 ist deutlich kleiner als die unter ORi_2 und immer signifikant kleiner als diejenige unter ORi . NMDG wird wahrscheinlich wie Lithium in den Mutanten K114I, K114Q und K114E elektroneutral im Verhältnis 2:1 mit dem Dicarboxylat transportiert, weshalb so gut wie keine Ströme zu messen waren.

Wasser-injizierte Oozyten „Mock“

Die Wasser-injizierten Oozyten zeigten erwartungsgemäß nur kleine Ströme, welche in Anwesenheit von Natrium zwischen 0 und -90 mV in einem Bereich von 3 ± 3 nA bis -3 ± 3 nA lagen. In Abwesenheit von Natrium (ORi_1) lagen die gemessenen Ströme zwischen 0 und -90 mV in einem Bereich zwischen 12 ± 29 nA und -9 ± 17 nA. Wie zu erwarten, besteht zwischen ORi und ORi_1 kein signifikanter Unterschied. Die radiochemische Aufnahme ergab eine Aufnahme von nur $2,2 \pm 0,1\%$ (Wildtyp: $33,9 \pm 1,7\%$). Diese Ergebnisse zeigen, dass „Mocks“ über keine Transportproteine verfügen, um Succinat aufzunehmen.

4.5 Das Aufnahmeverhalten von fNaDC-3 Wildtyp und Mutante K114I in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration

Vergleicht man die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) für Natrium des Wildtyps mit derjenigen der Mutante K114I, so fällt ein deutlicher Unterschied auf. Der Wildtyp zeigt mit einer K_M von $20,9 \pm 3,2$ mM eine deutlich höhere Affinität für Natrium verglichen mit der ermittelten K_M von $105,8 \pm 73,9$ mM für K114I. Dies lässt darauf schließen, dass der Austausch von Lysin (Wildtyp) durch Isoleucin (K114I) an Position 114, neben der unter 4.3 beschriebenen Veränderung der Transportstöchiometrie, auch zu einer Verminderung der Affinität gegenüber Natrium führt.

Neben der K_M für Natrium unterscheiden sich der Wildtyp und K114I auch in ihrem Hill-Koeffizienten, so beträgt der Hill-Koeffizient für den Wildtyp 1,57 und derjenige für K114I 1,01. Daraus lässt sich schließen, dass an den Dicarboxylat-Transporter des Wildtyps mehr Natrium-Ionen binden könnten als an den Dicarboxylat-Transporter von K114I. Dieses Ergebnis passt zu der unter 4.3 beschriebenen Änderung der Transportstöchiometrie für K114I. Im Gegensatz zum Wildtyp, in welchem 3 Natrium-Ionen pro divalentem Dicarboxylat

elektrogen transportiert werden, werden in K114I nur 2 Natrium-Ionen pro divalentem Dicarboxylat in einem elektroneutralen Modus transportiert.

4.6 Der Einfluss der Aminosäuren auf das Verhalten von fNaDC-3 Wildtyp und seine Mutanten

Vergleicht man das Verhalten von Wildtyp (Lysin an Position 114) mit dem von K114R (Arginin an Position 114), so fällt auf, dass beide sich in An- und Abwesenheit von Natrium, in ihrer Lithium-Hemmbarkeit in den elektrophysiologischen Messungen sowie in der radiochemischen Aufnahme gleich verhalten. Beide transportieren Natrium unter Entstehung eines Einwärtsstromes im Verhältnis 3:1 und Lithium bzw. NMDG unter Entstehung eines Auswärtsstromes im Verhältnis 1:1 mit einem divalenten Anion. Lysin kann also durch Arginin ersetzt werden, ohne die Eigenschaften des fNaDC-3 Transportproteins zu verändern. Dieses gleiche Verhalten ist durch den ähnlichen Aufbau der Aminosäuren Lysin und Arginin (Strukturformeln siehe 1.4, Abbildung 4) zu erklären. Bei beiden handelt es sich um polare (hydrophile) positiv geladene (basische) Aminosäuren. Beide sind ungefähr gleich lang und tragen bei physiologischem pH eine positiv geladene Stickstoffgruppe am Rest. Die Verzweigung und die Doppelbindung am Rest von Arginin scheinen keinen Einfluss zu haben.

Vergleicht man nun die Mutanten K114I (Isoleucin an Position 114) und K114Q (Glutamin an Position 114) mit dem Wildtyp, so fällt ein unterschiedliches Verhalten auf. Im Gegensatz zum Wildtyp transportieren K114I und K114Q Natrium sowohl als auch Lithium und in geringem Umfang NMDG zusammen mit einem divalenten Anion in einem elektroneutralen Transportmodus. Diese Änderung der Transportstöchiometrie lässt sich durch den Unterschied im Aufbau von Isoleucin (I) und Glutamin (Q) im Vergleich zu Lysin (K) erklären. Isoleucin und Glutamin liegen bei physiologischem pH beide ungeladen vor. Außerdem sind sie deutlich kürzer und verzweigter im Vergleich zu Lysin.

Die Mutante K114E (Glutamat an Position 114) transportiert ebenfalls Natrium, Lithium und in geringem Umfang NMDG zusammen mit einem divalenten Anion elektroneutral. Allerdings waren die gemessenen Ströme bzw. Aufnahmen immer kleiner als diejenigen von

K114I und K114Q. Glutamat (E) ist eine polare (hydrophile) bei physiologischem pH negativ geladene (saure) Aminosäure. Ebenso wie Glutamin und Isoleucin besitzt sie weniger CH_2 -Gruppen, ist also deutlich kürzer als Lysin.

Die Aminosäure Lysin an Position 114 an Transmembrandomäne 4 des Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporters der Winterflunder (fNaDC-3) beeinflusst die Transportstöchiometrie der kationischen Substrate. Für die „klassische“ 3:1-Stöchiometrie, wobei 3 Natrium-Ionen zusammen mit einem divalenten Anion transportiert werden, scheint eine positiv geladene Aminosäure, die in ihrer Länge dem Lysin entspricht, notwendig zu sein. Diese Voraussetzungen erfüllt Arginin, daher kann diese Aminosäure ohne Änderung in Bezug auf den Transport Lysin ersetzen. Eine Verzweigung oder eine Doppelbindung im Rest wie bei Arginin scheint den Transport nicht zu beeinflussen. Kürzere Aminosäuren mit ungeladenem oder aber negativ geladenem Rest wie Isoleucin, Glutamin oder Glutamat verändern die Transportstöchiometrie hin zu einem elektroneutralen Transport von Natrium und einem divalenten Dicarboxylat.

5 Zusammenfassung

Der Natrium-abhängige Dicarboxylat-Cotransporter NaDC-3 ist ein elektrogener Transporter, welcher drei Natrium-Ionen zusammen mit einem zweifach negativ geladenen Dicarboxylat, wie z.B. Succinat, in die Zellen transloziert. Er ist in mehreren Organsystemen wie z.B. Niere, Leber, Gehirn, Herz oder Pankreas zu finden.

In dieser Arbeit wurde der NaDC-3 der Winterflunder *Pleuronectes americanus* (fNaDC-3) untersucht. Neben dem fNaDC-3-Wildtyp wurden auch Mutanten mit veränderter Aminosäure an Position 114, welche mit dem Verfahren der „site-directed-mutagenesis“ hergestellt wurden, untersucht. An Position 114 wurde Lysin (Wildtyp) durch Isoleucin (K114I), Arginin (K114R), Glutamin (K114Q) und Glutamat (K114E) ersetzt. Ziel der Arbeit war es, das Verhalten von Wildtyp und Mutanten in An- sowie in Abwesenheit von Natrium (bei Ersatz des Natriums durch Lithium bzw. NMDG) zu untersuchen. Darüber hinaus wurde die Lithium-Hemmbarkeit des Natrium-induzierten Stromes untersucht.

Als Expressionssystem für den Wildtyp und seine Mutanten kamen Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* zur Anwendung, welche die jeweiligen Transportproteine an ihrer Oberfläche exprimierten. Da es sich bei dem fNaDC-3 um ein elektrogenes Transportprotein handelt, konnten die Substrat-induzierten Ströme mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik (TEVC) untersucht werden. Aus den bei Superperfusion der Oozyten registrierten Substrat-induzierten Strömen konnten indirekt Rückschlüsse auf das Transportverhalten von Wildtyp und Mutanten gezogen werden. Darüber hinaus konnte in den Versuchen zur radiochemischen Aufnahme das Transportverhalten von Wildtyp und Mutanten direkt untersucht werden. In allen Versuchen kam Succinat als prototypisches Substrat zum Einsatz.

Die Mutante K114R verhält sich genauso wie der fNaDC-3-Wildtyp, Arginin kann also Lysin an Position 114 ersetzen, ohne dass sich die Transporteigenschaften verändern. So transportieren beide Transportproteine elektrogen unter Entstehung eines Einwärtsstromes im Verhältnis von 3 Natrium-Ionen zu einem divalenten Dicarboxylat-Anion. Lithium ist Substrat vom Wildtyp und von K114R. Es wird unter Entstehung eines Auswärtsstromes in

einem Verhältnis von 1:1 mit einem divalenten Anion transportiert. Wildtyp und K114R haben eine höhere Affinität zu Lithium als zu Natrium. NMDG ist ebenfalls Substrat von Wildtyp und K114R und wird in geringem Ausmaß elektrogen unter Entstehung eines Auswärtsstromes im Verhältnis von 1:1 mit einem divalenten Anion transportiert.

Die Mutanten K114I, K114Q und K114E transportieren Natrium und Lithium, sowie in sehr geringem Ausmaß auch NMDG elektroneutral mit einem zweifach negativ geladenen Dicarboxylat. Am wahrscheinlichsten erscheint eine veränderte Transportstöchiometrie mit einem Verhältnis von zwei Natrium-Ionen zu einem divalenten Anion (2:1). Daneben ist aber auch denkbar, dass drei Natrium-Ionen mit einem divalenten Anion und einer zusätzlichen einfach negativen Ladung (Cl^- oder OH^-) in die Zelle transportiert werden. Ebenfalls denkbar wäre der gleichzeitige Auswärtstransport einer einfach positiven Ladung (H^+) aus der Zelle bei Transport von drei Natrium-Ionen und einem divalenten Anion. Der Ersatz von Lysin durch Isoleucin, Glutamin oder Glutamat führt also zu einer Veränderung der Kationen-Stöchiometrie, die sich in einem elektroneutralen Transportgeschehen äußert.

Der fNaDC-3-Wildtyp hat eine niedrigere Michaelis-Menten-Konstante (K_M) für Natrium ($20,9 \pm 3,2$ mM) und somit verglichen mit der Mutante K114I ($105,8 \pm 73,9$ mM) eine höhere Affinität für Natrium. Der Ersatz von Lysin (Wildtyp) durch Isoleucin (K114I) verursacht also eine Abnahme der Affinität für Natrium am Transportmolekül.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Aminosäure mit unter physiologischem pH positiv geladenem Rest und in der Länge vergleichbar mit Lysin notwendig ist, für die Aufrechterhaltung der 3:1-Transportstöchiometrie in Anwesenheit von Natrium und divalentem Anion. Lithium bindet an nur eine der drei Natrium-Bindungsstellen und ist Substrat des fNaDC-3. Die Affinität von fNaDC-3 ist für Lithium größer als für Natrium. NMDG bindet ebenfalls nur an eine der drei Natrium-Bindungsstellen des fNaDC-3 und wird in geringem Ausmaß transportiert.

6 Literaturverzeichnis

- Anzai N, Kanai Y, Endou H (2006): Organic Anion Transporter Family: Current Knowledge. *J Pharmacol Sci* 100: 411-426
- Asselbergs FA, van Venrooij WJ, Bloemendal H (1979): Messenger RNA competition in living *Xenopus* oocytes. *Eur J Biochem* 94: 1, 249-254
- Belle R, Marot J, Ozon R (1976): Nature of progesterone action on amino acid uptake by isolated full-grown oocyte of *Xenopus laevis*. *Biochim Biophys Acta* 419: 2, 342-348
- 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, Drinkuth B, Menzel C, König A, Steffgen J, Wright SH, Burckhardt G (2002): The Renal Na⁺-Dependant Dicarboxylate Transporter, NaDC-3, Translocates Dimethyl- and Disulfhydryl-Compounds and Contributes to Renal Heavy Metal Detoxification. *J Am Soc Nephrol* 13: 2628-2638
- Burckhardt BC, Lorenz J, Kobbe C, Burckhardt G (2004): Substrate specificity of the human renal sodium dicarboxylate cotransporter, NaDC-3, under voltage-clamp conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F792-F799
- Burckhardt G, Wolff NA (2000): Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol* 278: F853-866
- Burri R, Steffen C, Herschkowitz N (1991): N-acetyl-L-aspartate is a major source of acetyl groups for lipid synthesis during rat brain development. *Dev Neurosci* 13: 403-411
- Chen X, Tsukaguchi H, Chen XZ, Berger UV, Hediger MA (1999): Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel sodium-dependant Dicarboxylate transporter. *J Clin Invest* 103: 1159-1168
- Chen XZ, Shayakul C, Berger UV, Tian W, Hediger MA (1998): Characterization of a rat Na⁺-dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 273: 20972-20981
- Dantzler WH (2002): Renal organic anion transport: a comparative and cellular perspective. *Biochim Biophys Acta* 1566: 169-181
- Dascal N (1987): The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22: 317-386
- Dresser MJ, Leabman MK, Giacomini KM (2001): Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: Organic anion transporters and organic cation transporters. *J Pharmacol Sci* 90: 397-421
- Dumont JN (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis*. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136: 153-157
- Eckard P, Passow H (1987): Sodium-dependant and sodium-independent phosphate uptake by full-grown, prophase-arrested oocytes of *Xenopus laevis* before and after progesterone-induced maturation. *Cell Biol Int Rep* 11: 5, 349-358
- 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
- George RL, Huang W, Naggari HA, Smith SB, Ganapathy V (2004): Transport of N-acetylaspartate via murine sodium/dicarboxylate cotransporter NaDC3 and expression of this transporter and aspartoacylase II in ocular tissues in mouse. *Biochim Biophys Acta* 1690: 63-69

- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971): Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 5316, 177-82
- Hagos Y, Steffgen J, Rizwan AN, Langheit D, Knoll A, Burckhardt G, Burckhardt BC (2006): Functional roles of cationic amino acid residues in the sodium-dicarboxylate cotransporter 3 (NaDC-3) from winter flounder. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: 1224-1231
- Hagos Y, Krick W, Braulke 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. *Pflugers Arch-EUR J Physiol* 457: 223-231
- Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, Wright EM (1987): Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330: 6146, 379-381
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs Q, Takanaga H, Bruford EA (2004): The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 447: 465-468
- Hentschel H, Burckhardt BC, Schölermann B, Kühne L, Burckhardt G, Steffgen J (2003): Basolateral localization of flounder Na⁺-dicarboxylate cotransporter (fNaDC-3) in the kidney of *Pleuronectes americanus*. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 446: 578-584
- Ho HT, Ko BC, Cheung AK, Lam AK, Tam S, Chung SK, Chung SS (2007): Generation and characterization of sodium-dicarboxylate cotransporter-deficient mice. *Kidney Int* 72(1): 63-71
- 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⁺-dependant high-affinity-Dicarboxylate Transporter NaDC3 and its relevance to the expression of the Transporter in the brain. *J Pharm Exp Ther* 295: 392-403
- Inui KI, Masuda S, Saito H (2000): Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int* 58: 944-958
- Joshi AD, Pajor AM (2006): Role of conserved prolines in the structure and function of the Na⁺/dicarboxylate cotransporter 1, NaDC1. *Biochem* 45(13):4231-9
- Jung D, Lafaie AV, Schwarz W (1984): Inhibition of Na-alanine cotransport in oocytes of *Xenopus laevis* during meiotic maturation is voltage-regulated. *Pflügers Arch* 402: 1, 39-41
- Kekuda R, Wang H, Huang W, et al. (1999): Primary structure and functional characteristics of a mammalian sodium-coupled high affinity dicarboxylate transporter. *J Biol Chem* 274: 3422-3429
- Koepsell H, Endou H (2004): The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch – EUR J Physiol* 447: 666-676
- Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Ho Cha S, Suzuki Y, Endou H (2002): Immunolocalization of Multispecific Organic Anion Transporters, OAT1, OAT2 and OAT3, in Rat Kidney. *J Am Nephrol* 13: 848-857
- Lenaz G, Bovina C, D' Aurelio M et al. (2002): Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* 959: 199-213
- Mandel LJ (1985): Metabolic substrates, cellular energy production, and the regulation of proximal tubular transport. *Am Rev Physiol* 47: 85-101
- Markovich D, Murer H (2004): The SLC13 gene family of sodium sulphate/ carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 447: 594-602
- Matalon R, Michals-Matalon K (1999): Biochemistry and molecular biology of Canavan Disease. *Neurochem Res* 24: 507-513

- Motoashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, Fukuatsu A, Pgawa O, Inui KI (2002): Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in human kidney. *J Am Soc Nephrol* 13: 866-874
- Oshiro N, Pajor AM (2005): Functional characterization of high-affinity Na⁺/dicarboxylate cotransporter found in *Xenopus laevis* kidney and heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: 1159-1168
- Oshiro N, Pajor AM (2006): Ala-504 is a determinant of substrate binding affinity in the mouse Na⁽⁺⁾/dicarboxylate cotransporter. *Biochim Biophys Acta* 1758(6): 781-8
- Oshiro N, King SC, Pajor AM (2006): Transmembrane helices 3 and 4 are involved in substrate recognition by the Na⁺/dicarboxylate cotransporter, NaDC1. *Biochem* 45(7):2302-10
- 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/ Dicarboxylate Cotransporters. *J Membr Biol* 175: 1-8
- Pajor AM (2006): Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 451: 597-605
- Pajor AM, Kahn ES, Gangula R (2000): Role of cationic amino acids in the Na⁺/dicarboxylate cotransporter NaDC-1. *J Biochem* 3: 677-83
- Pajor AM, Gangula R, Yao X (2001): Cloning and functional characterization of a high-affinity Na⁺/Dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol* 280: C1215-1223
- Pak CYC (1987): Citrate and renal calculi. *Miner Electrolyte Metab* 13: 257-266
- Pritchard JB (1988): Coupled transport of p-aminohippurate by rat kidney basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 255: F597-F604
- Richter JD, Wassermann WJ, Smith LD (1982): The mechanism for increased protein synthesis during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev Biol* 89: 1, 159-167
- Rogina B, Reenan RA, Nilsen SP, Helfand SL (2000): Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*. *Science* 290: 2137-2140
- Sekine T, Cha SH, Hosoyamada M, Kanai Y, Watanabe N, Furuta Y, Fukuda K, Igarashi T, Endou H (1998): Cloning, functional characterization, and localization of a rat renal Na⁺-dicarboxylate transporter. *Am J Physiol* 275: F298-F305
- Sekine T, Cha SH, Endou H (2000): The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pfluegers Arch-Eur J Physiol* 440: 337-350
- Shimada H, Moeves B, Burckhardt G (1987): Indirect coupling to Na⁺ of p-aminohippuric acid uptake into rat renal basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 253: F795-F801
- Simpson DP (1983): Citrate excretion: a window on renal metabolism. *Am J Physiol* 244: F223-F234
- Soreq H (1985): The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit Rev Biochem* 18: 3, 199-238
- Steffgen J, Koepsell H, Schwarz W (1991): Endogenous L-glutamate transport in oocytes of *Xenopus laevis*. *Biochim Biophys Acta* 1066: 1, 14-20
- Steffgen J, Burckhardt BC, Langenberg C, Kühne L, Müller GA, Burckhardt G, Wolff NA (1999): Expression cloning and characterization of a novel sodium-dependant Dicarboxylate Cotransporter from Winter Flounder kidney. *J Biol Chem* 274: 20191-20196
- Van Winkle LJ (1993): Endogenous amino acid transport systems and expression of mammalian amino acid transport proteins in *Xenopus* Oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1154: 2, 157-172

- Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S (2000): The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 10: 1-2, 1-12
- Wang H, Fei YJ, Kekuda R, Yang-Feng TL, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2000): Structure, function, and genomic organization of human Na⁺-dependant high-affinity Dicarboxylate transporter. *Am J Physiol* 278: C1019-C1030
- Wang J, Chen X, Zhu H, Peng L, Hong Q (2003): Relationship between aging and renal high-affinity sodium-dependant Dicarboxylate Cotransporter-3. Expression characterized with antifusion protein antibody. *J Gerontol* 58A, 10: 879-888
- Weber WM, Schwarz W, Passow H (1989): Endogenous D-glucose transport in oocytes of *Xenopus laevis*. *J Membr Biol* 111: 1, 93-102
- Weerachayaphorn J, Pajor AM (2008): Threonine-509 is a determinant of apparent affinity for both substrate and cations in the human Na⁺/dicarboxylate cotransporter. *Biochem* 47(3):1087-93
- Wirthenson G, Guder WG (1986): Renal substrate metabolism. *Physiol Rev* 66: 469-497

7 Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Hemmstoff des Angiotensin-konvertierenden Enzyms
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
AT ₁ -Rezeptorantagonisten	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonist
ATP	Adenosintriphosphat
α	Alpha
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRNA	complementary ribonucleic acid
dpm	digits per minute
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation
fNaDC-3	Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Cotransporter-3 der Flunder (<i>Pleuronectes americanus</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
H	Wasserstoff
HCl	Wasserstoffchlorid
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
hNaDC-3	humaner Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Cotransporter-3
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K _M	Michaeliskonstante
LiCl	Lithiumchlorid
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol/l
mNaDC-3	Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Cotransporter-3 der Maus
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol/l
N	Stickstoff
Na ⁺	Natrium
nA	Nanoampere
NaCl	Natriumchlorid

NaC3	Na ⁺ -carboxylate cotransporter 3
NaDC-1	Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Cotransporter-1
NaDC-3	Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Cotransporter-3
NADH/H ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)
NH ₃	Ammoniak
nl	Nanoliter
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OAT-1	Organischer-Anionen-Transporter-1
OAT-3	Organischer-Anionen-Transporter-3
OAT-4	Organischer-Anionen-Transporter-4
OATP	organic anion transporting polypeptide
ORi	Oozyten-Ringer
pH	potentia Hydrogenii
pmol	Pikomol
rNaDC-3	Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Cotransporter-3 der Ratte
RNase	Ribonuklease
SDCT2	sodium-dependent dicarboxylate transporter 2
SLC13	Solute Carrier 13
TEVC	Two Electrode Voltage-clamp
Tris	Trisaminomethan
xNaDC-3	Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Cotransporter-3 des Frosches (<i>Xenopus</i>)
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. phil. nat. B.-C. Burckhardt für die Überlassung des Dissertationsthemas bedanken. Sie hat mich während der experimentellen Phase sowie bei der anschließenden Verfassung und Korrektur der Dissertation mit großem Engagement unterstützt und gefördert.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Y. Hagos für die gute Betreuung meiner Versuche zur radiochemischen Aufnahme.

Darüber hinaus danke ich Frau I. Markmann, die mir mit großem Engagement die nötigen Techniken und Fertigkeiten für meine Versuche in der Elektrophysiologie vermittelt hat. Insbesondere möchte ich mich bei Ihr für die regelmäßige Bereitstellung von Oozyten und das Umsetzen derselben bedanken.

Des Weiteren geht mein Dank an Frau G. Dallmeyer, die mich in die Technik der Oozyten-Injektion eingearbeitet hat, sowie an Herrn S. Petzke, der mir die nötigen Techniken und Fertigkeiten für meine Versuche im Isotopenlabor vermittelt hat.

Lebenslauf

Am 20.01.1982 wurde ich als Sohn der Eheleute Bärbel Ellen Irmgard Nachtigal geb. Kiefer und Jürgen Michael Nachtigal in Gießen geboren.

Von 1988 bis 1992 besuchte ich die Gemeinschaftsgrundschule in Brakel. Seit 1992 war ich Schüler der Annette-von-Droste-Hülshoff Realschule in Brakel, welche ich im Juni 1998 nach dem Erwerb der Fachoberschulreife mit Berechtigung zum Besuch der gymnasialen Oberstufe verließ. Im Anschluss besuchte ich ab 1998 das Gymnasium Brede in Brakel und erlangte dort im Juni 2001 die Allgemeine Hochschulreife.

Von August 2001 bis Mai 2002 leistete ich meinen Zivildienst in der Krankenpflege in der Weserberglandklinik in Höxter ab.

Im Oktober 2002 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Im September 2004 legte ich dort den 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.

Im Mai 2006 begann ich in der Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie des Zentrums Physiologie und Pathophysiologie mit dem experimentellen Teil der vorliegenden Dissertation. Im September 2007 präsentierte ich ein Poster mit den Ergebnissen meiner Dissertation unter dem Titel „Functional role of lysine 114 in the sodium-dependent dicarboxylate transporter 3 from winter flounder kidney (fNaDC3)“ auf dem 38. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie in München.

Während meiner Famulaturen arbeitete ich in der Allgemein- und Unfallchirurgie sowie in der Anaesthesiologie des Kreiskrankenhauses Mosbach/Baden. Darüber hinaus absolvierte ich eine Famulatur im Ndolage Hospital in Tanzania. Schließlich leistete ich eine weitere Famulatur in einer allgemeinmedizinischen Gemeinschaftspraxis in Brakel ab.

Das erste Tertial des Praktischen Jahres verbrachte ich in der Allgemein- und Unfallchirurgie im Hôpital de Morges im Kanton Waadt, Schweiz. Die beiden folgenden Tertiale absolvierte ich in der Anaesthesiologie sowie in der Medizinischen Klinik des St. Vincenz Krankenhauses in Paderborn.

Im Juni 2009 legte ich schließlich den 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Georg-August Universität in Göttingen ab. Seit Oktober 2009 arbeite ich als Assistenzarzt im Zentrum für Anaesthesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin der Universitätsmedizin Göttingen.

