

Aus dem ehemaligen Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie  
(Prof. Dr. med. em. G. Burckhardt)  
im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Interaktion des NaDC3 und des NaCT mit Carbaglu, einem  
Medikament zur Behandlung der Hyperammonämie**

**INAUGURAL – DISSERTATION**

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

vorgelegt von

**Elisabeth Schwob**

aus Leinefelde

Göttingen 2017

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

Referent/in: Prof. Dr. phil. nat. B. C. Burckhardt

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. A. R. Asif

Drittreferent/in: .....

Datum der mündlichen Prüfung: 05.12.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Interaktion des NaDC3 und des NaCT mit Carbaglu, einem Medikament zur Behandlung der Hyperammonämie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 31.07.2017

.....

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 AMMONIUMSTOFFWECHSEL UND HARNSTOFFZYKLUS.....	1
1.2 HARNSTOFFZYKLUSSTÖRUNGEN.....	2
1.2.1 <i>N-Acetylglutamat-Synthase (NAGS)-Defizienz</i> .....	2
1.3 SYMPTOME DER HYPERAMMONÄMIE.....	3
1.4 THERAPIEMÖGLICHKEITEN DER HARNSTOFFZYKLUSSTÖRUNGEN.....	4
1.5 <i>N-CARBAMYLGLUTAMAT (NCG)</i> .....	5
1.6 TRANSPORTER UND IHRE BEDEUTUNG.....	7
1.7 DIE <i>SOLUTE CARRIER (SLC)13</i> -GENFAMILIE .....	8
1.7.1 <i>Der natriumabhängige Dicarboxylat-Transporter NaDC1</i> .....	9
1.7.2 <i>Der natriumabhängige Dicarboxylat-Transporter NaDC3</i> .....	9
1.7.3 <i>Der natriumabhängige Citrat-Transporter NaCT</i> .....	11
1.8 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN <i>XENOPUS LAEVIS</i> -OOZYTEN ...	13
1.9 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	14
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
2.1 CHEMIKALIEN UND MEDIEN .....	15
2.1.1 <i>Medien für die Präparation und Aufbewahrung der Oozyten</i> .....	16
2.1.2 <i>Medien für die elektrophysiologischen Messungen</i> .....	17
2.2 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	18
2.3 VORBEREITUNG DER <i>XENOPUS LAEVIS</i> -OOZYTEN.....	20
2.3.1 <i>Entnahme und Präparation der Oozyten</i> .....	20
2.3.2 <i>Präparation der Oozyten für die cRNA-Injektion</i> .....	22
2.3.3 <i>Vorbereitung der Injektion</i> .....	23
2.3.4 <i>Injektion von cRNA und Aqua dest.</i> .....	24
2.4 MESSUNGEN MIT DER ZWEI-ELEKTRODEN-SPANNUNGSKLEMME .....	25
2.4.1 <i>Aufbau der Messapparatur</i> .....	25
2.4.2 <i>Vorgehensweise bei elektrophysiologischen Messungen</i> .....	27

---

2.5	AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE .....	28
2.6	VERWENDETE SOFTWARE.....	29
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>30</b>
3.1	ERGEBNISSE DER VERSUCHE AN NADC3-EXPRIMIERENDEN OOZYTEN .....	30
3.1.1	<i>Nachweis einer funktionellen Expression des NaDC3 .....</i>	<i>31</i>
3.1.2	<i>Gegenüberstellung der Substrat-vermittelten Ströme.....</i>	<i>35</i>
3.1.3	<i>Natriumabhängigkeit NCG-vermittelter Ströme.....</i>	<i>38</i>
3.1.4	<i>Potentialabhängigkeit NCG-vermittelter Ströme .....</i>	<i>42</i>
3.1.5	<i>Konzentrationsabhängigkeit Substrat-vermittelter Ströme .....</i>	<i>46</i>
3.1.6	<i>Additivität der NCG- und Succinat-vermittelten Ströme .....</i>	<i>58</i>
3.2	ERGEBNISSE DER VERSUCHE AN NACT-EXPRIMIERENDEN OOZYTEN.....	60
3.2.1	<i>Gegenüberstellung Substrat-vermittelter Ströme .....</i>	<i>60</i>
3.3	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	63
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>65</b>
4.1	LIMITATIONEN DES VERSUCHSAUFBAUS.....	65
4.2	INTERAKTION VON <i>N</i> -CARBAMYLGLUTAMAT MIT DEM HUMANEN NADC3 .....	67
4.2.1	<i>Struktur-Wirkungsbeziehung der Substrate .....</i>	<i>70</i>
4.2.2	<i>Vergleich der Ergebnisse zwischen hNaDC3 und fNaDC3.....</i>	<i>73</i>
4.3	INTERAKTION VON <i>N</i> -CARBAMYLGLUTAMAT MIT DEM HUMANEN NACT.....	74
4.4	AUSBLICK AUF WEITERE FORSCHUNG.....	74
4.4.1	<i>Mögliche Transporter für Resorption, Verteilung und Elimination von NCG</i>	<i>74</i>
4.4.2	<i>hNaDC3 im Rahmen der Ausweitung der NCG-Anwendung .....</i>	<i>76</i>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>81</b>

---

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>Ag</b>	Silber
<b>AgCl</b>	Silberchlorid
<b><math>\alpha</math>KG</b>	$\alpha$ -Ketoglutarat
<b>ANOVA</b>	<i>analysis of variance</i> , Varianz-Analyse-Test
<b>ARG1</b>	Arginase I
<b>ASL</b>	Argininosuccinat-Lyase
<b>ASS</b>	Argininosuccinat-Synthase
<b>CLS II</b>	<i>collagenase II</i> , Kollagenase Typ II
<b>CoA</b>	Coenzym A
<b>CPS1</b>	Carbamoylphosphat-Synthetase I
<b>cRNA</b>	<i>complementary ribonucleic acid</i> , komplementäre Ribonukleinsäure
<b>dest.</b>	<i>destillata</i> , destilliert
<b>DMSA</b>	Meso-2,3-Dimercaptosuccinat
<b>DMPS</b>	Dimercaptopropan-1-sulfonat
<b>E<sub>E</sub></b>	Badelektrode
<b>E<sub>I</sub></b>	stromeinspeisende Elektrode
<b>E<sub>R</sub></b>	Referenzelektrode
<b>et al.</b>	<i>et alii</i> , und andere
<b>E<sub>V</sub></b>	spannungsmessende Elektrode
<b>F</b>	Winterflunder
<b>g</b>	Leitfähigkeit
<b>GSA</b>	Guanidinosuccinat
<b>h</b>	<i>human</i> , menschlich
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HEK</b>	<i>human embryonic kidney cells</i> , menschliche embryonale Nierenzellen
<b>HEPES</b>	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
<b>HRPE</b>	<i>human retinal pigment epithelial cells</i> , menschliches retinales Pigmentepithelzellen
<b><math>\Delta I, I</math></b>	Differenzstrom, Strom
<b>IC<sub>50</sub></b>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
<b>I<sub>max</sub></b>	maximaler Strom

---

<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>K<sub>m</sub></b>	Michaelis-Menten-Konstante, Halbsättigungskonstante
<b>mRNA</b>	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
<b>n</b>	Anzahl der Messungen
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium-Ion
<b>NAA</b>	<i>N</i> -Acetylaspartat
<b>NaC</b>	natriumabhängige Carboxylattransporter der SLC13-Familie
<b>NaCT</b>	natriumabhängiger Citrat-Transporter
<b>NaDC1</b>	natriumabhängiger Dicarboxylat-Transporter 1
<b>NaDC3</b>	natriumabhängiger Dicarboxylat-Transporter 3
<b>NAG</b>	<i>N</i> -Acetylglutamat
<b>NAGS</b>	<i>N</i> -Acetylglutamat-Synthetase
<b>NCG</b>	<i>N</i> -Carbamylglutamat, <i>N</i> -Carbamoylglutamat, <i>N</i> -Carbamyl- <i>L</i> -Glutamat
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>NMDG</b>	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Glucamin
<b>OAT</b>	Organischer-Anionen-Transporter
<b>OATP</b>	Organisches-Anionen-Transporter-Protein
<b>ORi</b>	Oozyten-Ringer-Lösung
<b>ORNT1</b>	Ornithin-Citrullin-Antiporter I
<b>OTC</b>	Ornithin-Transcarbamylase
<b>p</b>	Signifikanzwert
<b>R</b>	Widerstand
<b>[S]</b>	Substrat-Konzentration
<b>σ</b>	Standardabweichung
<b>SIRT1</b>	NAD <sup>+</sup> -abhängige Histondeacetylase Sirtuin 1
<b>SLC</b>	<i>solute carrier</i> , Transporter löslicher Substanzen
<b>Succ</b>	Succinat
<b>TEVC</b>	<i>two electrode voltage clamp</i> , Zwei-Elektroden-Spannungsklemme
<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U</b>	Spannung
<b>V<sub>c</sub></b>	Klemmpotential, Klemmspannung
<b>V<sub>m</sub></b>	Membranpotential
<b><math>\bar{x}</math></b>	Mittelwert
<b>x<sub>i</sub></b>	Messwert

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 2.1</b> Verwendete Chemikalien.....	15
<b>Tab. 2.2</b> Zusammensetzung der Medien zur Präparation und Aufbewahrung der Oozyten	16
<b>Tab. 2.3</b> Testsubstanzen für den Transportnachweis .....	17
<b>Tab. 2.4</b> Natriumhaltige und natriumfreie Oozyten-Ringer-Lösung (ORi) .....	17
<b>Tab. 2.5</b> Verwendete Arbeitsgeräte.....	18
<b>Tab. 2.6</b> Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	19
<b>Tab. 2.7</b> Verwendete Software .....	29
<b>Tab. 3.1</b> Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere.....	30
<b>Tab. 3.2</b> $K_m$ - und $I_{max}$ -Werte Succinat-vermittelter Ströme .....	49
<b>Tab. 3.3</b> $K_m$ - und $I_{max}$ -Werte NCG-vermittelter Ströme .....	53
<b>Tab. 3.4</b> $K_m$ - und $I_{max}$ -Werte NAG-vermittelter Ströme .....	55
<b>Tab. 3.5</b> $K_m$ - und $I_{max}$ -Werte Glutamat-vermittelter Ströme .....	58
<b>Tab. 3.6</b> $K_m$ - und $I_{max}$ -Werte Succinat-, NCG-, NAG- und Glutamat-vermittelter Ströme nach Michaelis-Menten .....	64
<b>Tab. 3.7</b> $K_m$ - und $I_{max}$ -Werte Succinat-, NCG-, NAG- und Glutamat-vermittelter Ströme nach Eadie-Hofstee.....	64
<b>Tab. 4.1</b> Vergleich des hNaDC3-vermittelten Transportes verschiedener Dicarboxylate..	72
<b>Tab. 4.2</b> Vergleich der Succinat-Interaktionen hNaDC3- und fNaDC3-exprimierender Oozyten bei -60mV .....	74

---

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1.1</b> Harnstoffzyklus .....	1
<b>Abb. 1.2</b> Wichtige Symptome der Hyperammonämie .....	4
<b>Abb. 1.3</b> Strukturformeln von NCG und NAG .....	6
<b>Abb. 1.4</b> Lokalisation des hNaDC3.....	10
<b>Abb. 1.5</b> Lokalisation des hNaCT .....	12
<b>Abb. 2.1</b> Übersicht des Versuchsablaufs.....	20
<b>Abb. 2.2</b> <i>Xenopus laevis</i> -Weibchen in einem Institutsaquarium.....	21
<b>Abb. 2.3</b> Entnahme der Oozyten .....	22
<b>Abb. 2.4</b> Ausschnitt eines Ovarläppchens und Oozytenstadien nach Dumont .....	23
<b>Abb. 2.5</b> Herstellung der Injektionskanülen und Arbeitstisch zur Injektion.....	24
<b>Abb. 2.6</b> Aufbau der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme .....	26
<b>Abb. 2.7</b> Elektrophysiologischer Messplatz.....	27
<b>Abb. 3.1</b> Gegenüberstellung der Originalregistrierungen im <i>Current-Clamp</i> - und <i>Voltage-Clamp</i> -Modus von hNaDC3 und <i>mock</i> bei Perfusion mit 5 mM Succinat ...	32
<b>Abb. 3.2</b> Gegenüberstellung des Ruhemembranpotentials und der Succinat-vermittelten Depolarisation bzw. der Succinat-vermittelten Depolarisation und der Succinat- vermittelten Ströme bei -60 mV .....	33
<b>Abb. 3.3</b> Gegenüberstellung der Einzelmessungen und des arithmetischen Mittels Succinat-vermittelter Ströme (5 mM) von hNaDC3, fNaDC3 und <i>mock</i> bei -60 mV	34
<b>Abb. 3.4</b> Originalregistrierungen induzierter Ströme von 5 mM Succinat, 5 mM NAG, 5 mM NCG und 5 mM Glutamat von hNaDC3 und <i>mock</i> .....	36
<b>Abb. 3.5</b> Gegenüberstellung induzierter Ströme von je 5 mM Succinat, NAG, NCG und Glutamat bei hNaDC3 und <i>mock</i> .....	36
<b>Abb. 3.6</b> Gegenüberstellung der Mittelwerte der induzierten Einwärtsströme bzw. der Succinat-normierten Ströme von je 5 mM Succinat, NAG, NCG und Glutamat von hNaDC3 und <i>mock</i> .....	37
<b>Abb. 3.7</b> Originalregistrierungen zur Natriumabhängigkeit NCG-induzierter Ströme (5 mM) von hNaDC3, fNaDC3 und <i>mock</i> .....	39

---

<b>Abb. 3.8</b> Einzelmessungen und arithmetisches Mittel Succinat-vermittelter Ströme (5 mM) in An- und Abwesenheit von Natrium beim hNaDC3, fNaDC3 und <i>mock</i> ...	40
<b>Abb. 3.9</b> Einzelmessungen und arithmetisches Mittel NCG-vermittelter Ströme (5 mM) in An- und Abwesenheit von Natrium beim hNaDC3, fNaDC3 und <i>mock</i> .....	41
<b>Abb. 3.10</b> Strom-Spannungs (I/V)-Kennlinien in Ab- und Anwesenheit von 5 mM Succinat bzw. NCG von hNaDC3 und <i>mock</i> .....	43
<b>Abb. 3.11</b> Strom-Spannungs (I/V)-Kennlinien der Succinat- und NCG-vermittelten Ströme von hNaDC3 und <i>mock</i> .....	44
<b>Abb. 3.12</b> Leitfähigkeiten als Funktion des Klemmpotentials ( $V_c$ ) in Ab- und Anwesenheit von 5 mM Succinat bzw. NCG von hNaDC3 und <i>mock</i> .....	45
<b>Abb. 3.13</b> Einzelmessungen und arithmetisches Mittel Succinat-induzierter Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden Succinat-Konzentrationen von hNaDC3 und <i>mock</i>	47
<b>Abb. 3.14</b> Auftragung des arithmetischen Mittels Succinat-induzierter Ströme nach Eadie-Hofstee vom hNaDC3.....	48
<b>Abb. 3.15</b> Succinat-induzierte Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden Konzentrationen von fNaDC3 und <i>mock</i> .....	48
<b>Abb. 3.16</b> Einzelmessungen und arithmetisches Mittel NCG-induzierter Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden NCG-Konzentrationen von hNaDC3 und <i>mock</i> .....	50
<b>Abb. 3.17</b> Einzelmessungen und arithmetisches Mittel NCG-induzierter Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden NCG-Konzentrationen von fNaDC3 und <i>mock</i> .....	51
<b>Abb. 3.18</b> Auftragung des arithmetischen Mittels NCG-induzierter Ströme nach Eadie- Hofstee von hNaDC3 und fNaDC3.....	52
<b>Abb. 3.19</b> Einzelmessungen und arithmetisches Mittel NAG-induzierter Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden NAG-Konzentrationen von hNaDC3 und <i>mock</i> .....	54
<b>Abb. 3.20</b> Auftragung des arithmetischen Mittels NAG-induzierter Ströme nach Eadie- Hofstee vom hNaDC3 .....	55
<b>Abb. 3.21</b> Einzelmessungen und arithmetisches Mittel Glutamat-induzierter Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden Glutamat-Konzentrationen von hNaDC3 und <i>mock</i> .....	57
<b>Abb. 3.22</b> Auftragung des arithmetischen Mittels Glutamat-induzierter Ströme nach Eadie-Hofstee vom hNaDC3.....	58

---

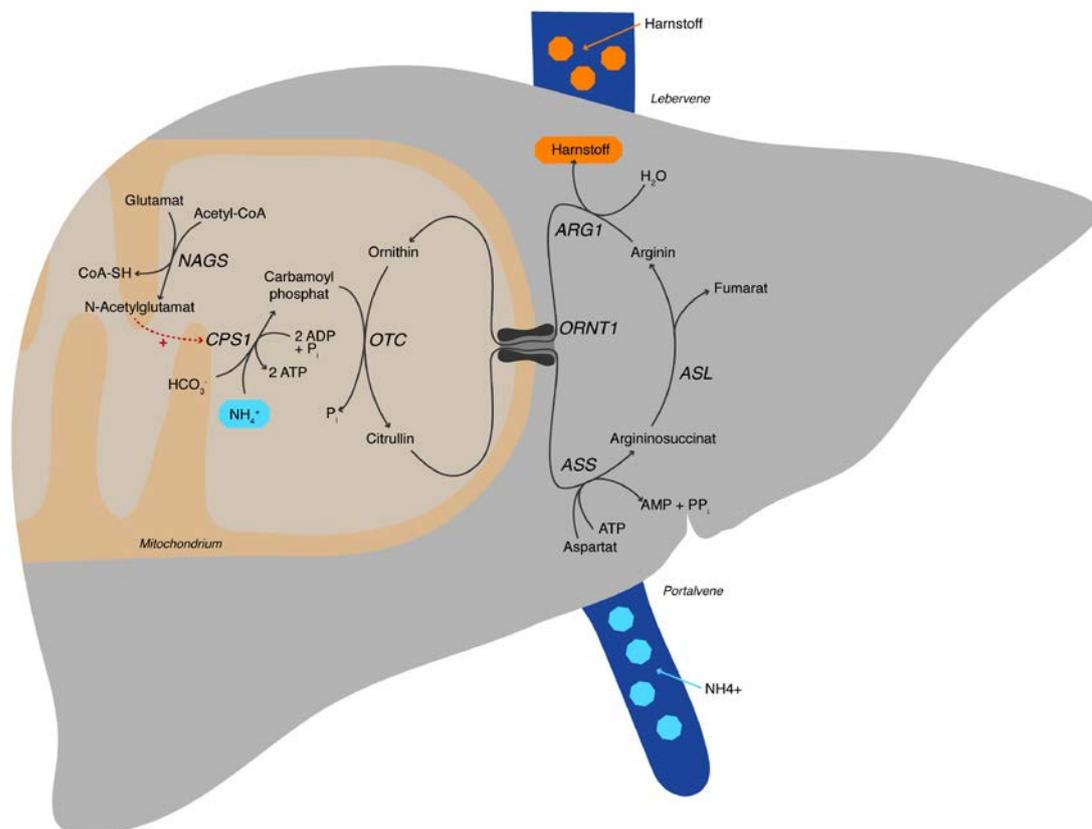
<b>Abb. 3.23</b> Originalregistrierungen der Addition von 20 $\mu$ M Succinat zu 20 $\mu$ M NCG bei hNaDC3 und <i>mock</i> .....	59
<b>Abb. 3.24</b> Veränderung des NCG-induzierten Stroms (20 $\mu$ M) in Ab- und Anwesenheit von 20 $\mu$ M Succinat von hNaDC3 und <i>mock</i> .....	60
<b>Abb. 3.25</b> Originalregistrierungen induzierter Ströme von 1 mM Citrat, 5 mM Succinat und 5 mM NCG von hNaCT und <i>mock</i> .....	61
<b>Abb. 3.26</b> Gegenüberstellung der Substrat-vermittelten Ströme von 1 mM Citrat, 5 mM Succinat und 5 mM NCG bei hNaCT und <i>mock</i> .....	62
<b>Abb. 4.1</b> Strukturformeln verschiedener Dicarboxylate .....	72

## 1 Einleitung

### 1.1 Ammoniumstoffwechsel und Harnstoffzyklus

Ammonium spielt für viele Stoffwechselprozesse des Körpers eine Rolle. Als Stickstoffquelle ist es an der Protein- und Neurotransmittersynthese und als schwache Säure an der pH-Homöostase beteiligt (Übersichten in Daniotti et al. 2011; Häussinger 1990).

Da Ammonium in hohen Mengen toxisch ist, muss es ausgeschieden werden. Dies geschieht hauptsächlich in Form von Harnstoff, welcher im Harnstoffzyklus in der Leber gebildet wird (Übersichten in Braissant 2010). **Abb. 1.1** zeigt die einzelnen Schritte des Harnstoffzyklus als Übersicht.



**Abb. 1.1** Harnstoffzyklus (eigene Abbildung)

Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), welches von der Portalvene zur Leber transportiert wird, wird mithilfe des Harnstoffzyklus zu Harnstoff umgesetzt. Dieser gelangt über die Lebervene in den systemischen Kreislauf. Der Harnstoffzyklus besteht aus den Enzymen N-Acetylglutamat-Synthetase (NAGS), Carbamoylphosphat-Synthetase I (CPS1), Ornithin-Transcarbamylase (OTC), Ornithin-Citrullin-Antiporter I (ORNT1), Argininosuccinat-Synthase (ASS), Argininosuccinat-Lyase (ASL) und Arginase I (ARG1).

Der Harnstoffzyklus besteht aus fünf Enzymen: der Carbamoylphosphat-Synthetase I (CPS1), der Ornithin-Transcarbamylase (OTC), der Argininosuccinat-Synthase (ASS), der Argininosuccinat-Lyase (ASL) und der Arginase I (ARG1) und einem aktivierenden Enzym, der *N*-Acetylglutamat-Synthetase (NAGS). Da er in zwei unterschiedlichen zellulären Kompartimenten, im Mitochondrium und im Zytoplasma, abläuft, muss das Mitochondrium über den Ornithin-Citrullin-Antiporter I (ORNT1) mit den entsprechenden Substraten versorgt werden (Übersichten in Häberle et al. 2012).

## **1.2 Harnstoffzyklusstörungen**

Kommt es zu einer Störung eines Reaktionsschrittes innerhalb des Harnstoffzyklus, führt dies zur Hyperammonämie. Dies kann entweder direkt durch eine angeborene Störung der Enzyme und Transporter oder indirekt durch Hemmung des Zyklus, z. B. infolge eines Leberversagens geschehen (Übersichten in Braissant 2010).

Mit einer geschätzten Inzidenz von 1:8.000-1:40.000 gehören Harnstoffzyklusstörungen zu den häufigsten angeborenen Störungen des Lebermetabolismus (Häberle et al. 2012; Summar et al. 2013). Der OTC-, ASL- und ASS-Mangel sind dabei deutlich häufiger als der CPS1- und NAGS-Mangel. Seit der ersten Beschreibung durch Bachmann 1981 wurden erst circa 50 Patienten mit NAGS-Defizienz diagnostiziert (Bachmann et al. 1981; van Leynseele et al. 2014).

### **1.2.1 *N*-Acetylglutamat-Synthase (NAGS)-Defizienz**

Die primäre *N*-Acetylglutamat-Synthase (NAGS)-Defizienz zeigt einen autosomal-rezessiven Erbgang. Sie ist durch die Mutation des auf Chromosom 17 lokalisierten NAGS-Gens bedingt (Caldovic et al. 2007). Das Alter bei Ausbruch erster Symptome ist sehr variabel, wobei am häufigsten Symptome neonatal auftreten (Daniotti et al. 2011).

Ein NAGS-Mangel kann auch sekundär durch Mangel an intramitochondrialem Coenzym A (CoA), Acetyl-CoA oder Glutamat oder durch Hemmung der NAGS hervorgerufen werden (Ah Mew und Caldovic 2011). So führt sowohl die direkte als auch die indirekte Hemmung der NAGS durch Reduktion des notwendigen Substrates Acetyl-CoA bei den Organoazidopathien Propionazidurie, Isovalerialazidurie und Methylmalonazidurie zu hyperammonämischen Krisen (Übersichten in Gebhardt et al. 2003; Valayannopoulos et al. 2016; Kasapkara et al. 2011). Eine Reduktion der NAGS-Aktivität zeigt sich zudem beim

Hyperinsulin-Hyperammonämie-Syndrom, bei Benzoat-Gabe und als Nebenwirkung der Valproat-Therapie (Caldovic et al. 2010).

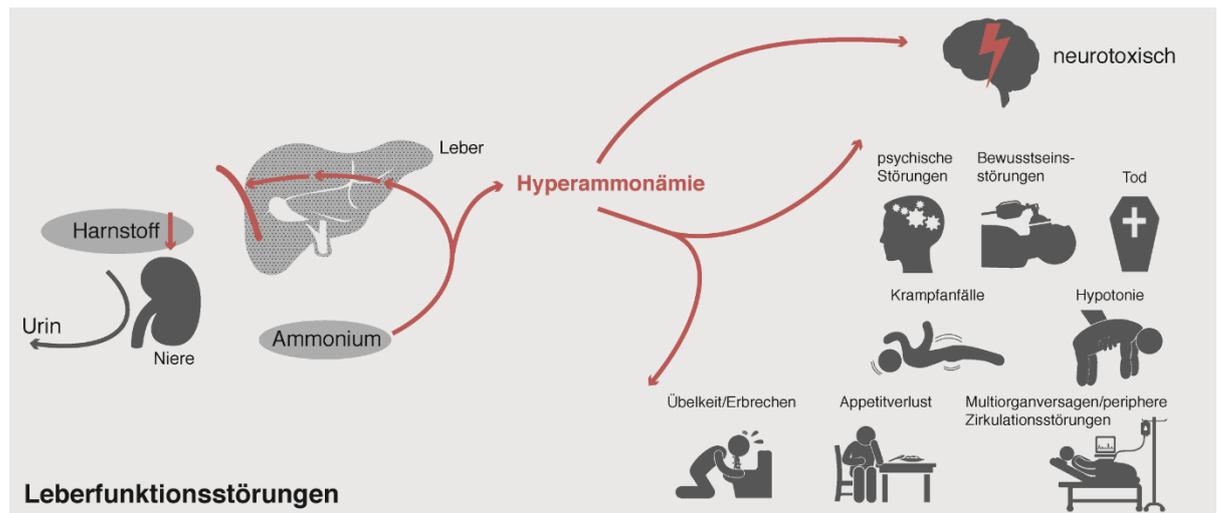
### **1.3 Symptome der Hyperammonämie**

Symptome werden bei Harnstoffzyklusstörungen v. a. durch die Hyperammonämie verursacht (Kölker et al. 2015b). Die Symptome sind sehr variabel und unspezifisch, was die Diagnostik erschwert (Kölker et al. 2015a) und so trotz Existenz effektiver Therapiemöglichkeiten eine schlechte klinische Prognose bedingt (Häberle et al. 2012; Cartagena et al. 2013).

Typische klinische Symptome sind neurologischer, gastrointestinaler oder psychiatrischer Art, wobei neurologische Symptome im Vordergrund stehen (Häberle et al. 2012). Symptombeginn und Schwere korrelieren dabei mit den genetischen Veränderungen der Enzyme. So haben Patienten mit partieller Enzymdefizienz ihre ersten hyperammonämischen Krisen oft erst Monate bis Jahre nach der Geburt, meist verursacht durch katabolischen Stress, resultierend in erhöhtem Proteinabbau, z. B. infolge von Infektionen, Diäten, Operationen, Traumata, Wehen oder exzessiver Proteinaufnahme (Kölker et al. 2015a; Cartagena et al. 2013). Zwar kann es beim *late-onset*-Beginn auch zur akuten hyperammonämischen Krise mit Begleit-Enzephalopathie kommen (Martín-Hernández et al. 2014), meistens sind Symptome aber milder ausgeprägt. Typischerweise weisen die Patienten Symptome wie Appetitverlust und zyklisches Erbrechen auf. Psychiatrische Auffälligkeiten und Lernschwierigkeiten sind ebenfalls häufig (Braissant 2010).

Dagegen kommen bei kompletter Defizienz die ersten Symptome schon neonatal vor. Sie sind zudem deutlich gravierenderer Art (Vernon 2015). So zeigt sich hier zwar auch eine reduzierte Nahrungsaufnahme sowie Übelkeit und Erbrechen, aber diese sind meist begleitet von einer erhöhten Erregbarkeit mit erhöhtem Krampfanfallrisiko, muskulären Hypotonien und Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma. Ein weiterer Anstieg des Plasmaammoniumspiegels kann zum Multiorganversagen und im schlimmsten Falle zum Tod des Patienten führen (Kölker et al. 2015a; Walterfang et al. 2013). Ursächlich für den neonatalen Symptombeginn sind vermutlich der katabolische Stress infolge des Geburtsvorgangs und die niedrige Flüssigkeitsaufnahme in der postnatalen Periode (Cartagena et al. 2013).

**Abb. 1.2** zeigt die typischen Symptome bei Hyperammonämie.



**Abb. 1.2** Wichtige Symptome der Hyperammonämie (eigene Abbildung)

*Ammonium wird hauptsächlich im hepatischen Harnstoffzyklus zu Harnstoff abgebaut. Ist dies nicht möglich, kommt es zu einer Hyperammonämie mit den verschiedensten unspezifischen Symptomen. Es wird hier keine Unterscheidung zwischen Hyperammonämie beim Neonaten oder Erwachsenen vorgenommen.*

#### **1.4 Therapiemöglichkeiten der Harnstoffzyklusstörungen**

Die Hyperammonämie stellt einen medizinischen Notfall dar und bedarf einer sofortigen zielgerichteten Therapie (Kölker et al. 2015a). Therapien zielen entweder auf eine Reduktion der Stickstoffbildung oder auf eine Steigerung der Stickstoffelimination ab (Waisbren et al. 2016).

Eine Reduktion der Stickstoffbildung wird durch Proteinrestriktion und Umstellung auf eine anabole Stoffwechsellage gewährleistet. Die Freisetzung endogenen Stickstoffs aus aminogenen Aminosäuren ist in anabolen Stoffwechsellagen reduziert. Dabei ist es wichtig, die Proteinzufuhr an die aktuellen Bedürfnisse anzupassen, um keine Mangelsituation auszulösen. So ist der Bedarf während des Wachstums höher als später im Erwachsenenalter (Adam et al. 2012).

Die Elimination überflüssigen Stickstoffs wird durch die Gabe von Natriumbenzoat, Natriumphenylacetat, Natriumphenylbutyrat und Glycerolphanylbutyrat gewährleistet. Diese konjugieren stickstoffhaltige Aminosäuren und ermöglichen so deren renale Ausscheidung und damit indirekt die Ausscheidung überflüssigen Stickstoffs (Daniotti et al. 2011; Matoori und Leroux 2015).

*L*-Arginin und *L*-Citrullin sind wichtige Substrate des Harnstoffzyklus. Bei allen Harnstoffzyklusstörungen mit Ausnahme der ARG1-Defizienz zeigen sich reduzierte Plasmaargininspiegel. Mit der Gabe von *L*-Arginin bei ASS- und ASL-Mangel und *L*-Citrullin bei NAGS-, CPS1-, OTC-Mangel und beim Hyperinsulin-Hyperammonämie-Syndrom kann diesem Mangel entgegengewirkt werden und so der Harnstoffzyklus aktiviert und die Harnstoffproduktion gesteigert werden (Häberle et al. 2012).

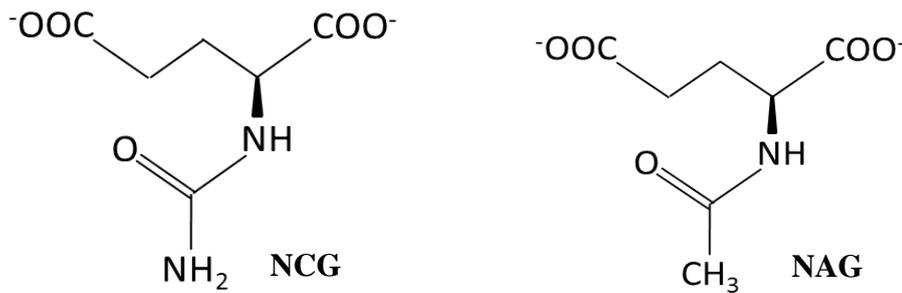
Bei ungenügendem Ansprechen auf die konventionelle Therapie kann bei gravierender Hyperammonämie die Dialyse erwogen werden. Dabei sollte auf Austauschtransfusionen verzichtet werden, denn diese können einen katabolen Stoffwechsel auslösen (Häberle et al. 2012).

Als endgültige Lösung ist die orthotope Lebertransplantation in Betracht zu ziehen. Diese ist die einzige Heilung aller Harnstoffzyklusstörungen (Lee und Goss 2001). Bei erfolgreicher Transplantation kann auf die Proteinrestriktion und Medikation zur Senkung des Plasmaammoniumspiegels verzichtet werden (Häberle et al. 2012). Aufgrund einer nicht unerheblichen Morbidität und Mortalität (Waisbren et al. 2016) sollte die Indikation kritisch geprüft werden. Bei NAGS-Mangel sollte sie nicht in Erwägung gezogen werden, da durch *N*-Carbamylglutamat (NCG) (Häberle et al. 2012) eine sehr effiziente Therapiemöglichkeit besteht.

### **1.5 *N*-Carbamylglutamat (NCG)**

*N*-Carbamylglutamat bzw. *N*-Carbamoylglutamat oder *N*-Carbamyl-*L*-Glutamat (NCG) ist als Carbaglu® seit 2003 in Europa und seit 2010 in den USA zur enteralen Therapie der akuten und chronischen primären NAGS-Defizienz zugelassen (Häberle 2011). Die Wirksamkeit der Therapie liegt in der strukturellen Analogie von NCG zum natürlichen Aktivator der CPS1, dem *N*-Acetyl-*L*-Glutamat (NAG), und in seiner Resistenz gegenüber der Hydrolyse durch Aminoacylasen. So wird NAG vor Erreichen des Wirkortes abgebaut, NCG dagegen nicht (Tuchman et al. 2008; Kim et al. 1972; Häberle 2011).

**Abb. 1.3** stellt die Strukturformel von NCG der von NAG gegenüber. NCG hat im Gegensatz zu NAG eine endständige Aminogruppe, NAG dagegen eine Methylgruppe.



**Abb. 1.3** Strukturformeln von NCG und NAG (eigene Abbildung)

Die Gabe von NCG sollte bei akuter Hyperammonämie schon bei Verdacht einer NAGS-Defizienz erfolgen, denn die schnelle Initiierung der NCG-Therapie verbessert deutlich die Prognose (Caldovic et al. 2007; Kim et al. 2015). NCG führt meist schon innerhalb der ersten 8 Stunden zu einer signifikanten Reduktion des Plasmaammoniumspiegels (van Leynseele et al. 2014). Im Rahmen der Langzeitanwendung ermöglicht die NCG-Therapie den Verzicht auf andere Therapien zur Senkung des Ammoniumspiegels (Häberle 2011).

Ein NAGS-Mangel kann auch sekundär ausgelöst werden (siehe **1.2.1**), sodass NCG auch zur Therapie anderer Hyperammonämie verursachender Erkrankungen eingesetzt werden kann (Daniotti et al. 2011). Es wird sogar empfohlen, NCG in Fällen schwerer neonataler Hyperammonämie unbekannter Ursache anzuwenden (Reigstad et al. 2017). In Europa ist NCG zudem für die Therapie der Organoazidopathien Isovalerianazidurie, Propionazidurie und Methylmalonazidurie zugelassen. Für die Therapie der Ahornsirupkrankheit, einer weiteren Organoazidopathie, des Hyperinsulin-Hyperammonämie-Syndroms und der Valproat-induzierten Hyperammonämie ist NCG nicht zugelassen; es konnte jedoch im *off-label*-Verfahren erfolgreich eingesetzt werden (Daniotti et al. 2011). Zudem kann NCG durch Stimulation der Restaktivität bei manchen Formen des partiellen CPS1-Mangels helfen (Ah Mew et al. 2014).

NCG ist ein sicheres, schnell wirkendes und leicht zu verabreichendes Therapeutikum (Daniotti et al. 2011) mit nur geringen Nebenwirkungen (Übersichten in: Daniotti et al. 2011; Häberle 2011). Bei Gabe von 100 mg/kg NCG an männliche gesunde Probanden konnten zwei bis vier Stunden nach Gabe Plasmaspitzenkonzentrationen an freiem NCG von 1,8-4,8 µg/ml bzw. von 9,5 bis 25 µM gemessen werden, wobei eine intestinale Resorption von circa 30% angenommen wurde (Orphan Europe 2010; Häberle 2011).

NCG wird nur gering metabolisiert und wird zu großen Teilen unverändert ausgeschieden. Dies geschieht zu 60% enteral und zu 5-9% renal. Bei einer renalen Clearance von

204-445 ml/min (Orphan Europe 2010; Häberle 2011) liegt diese deutlich über der glomerulären Filtrationsrate eines gesunden Erwachsenen, welche mit 90-125 ml/min angegeben wird (Elinder et al. 2014). Es kann daher von einer aktiven renalen Sekretion ausgegangen werden.

Da NCG seine Wirkung in der Leber entfaltet und teilweise fäkal ausgeschieden wird, sind Transporter zudem an der intestinalen und hepatischen Absorption und an der biliären Sekretion beteiligt (Orphan Europe 2010; Häberle 2011).

## **1.6 Transporter und ihre Bedeutung**

Zellen sind durch Membranen von ihrer Umgebung abgegrenzt. Diese sind nur von lipophilen Substanzen via Diffusion passierbar und stellen damit eine Barriere für Ionen und andere gelöste Substanzen wie Glukose, Aminosäuren und Harnstoff dar. Um dennoch einen Stoffaustausch mit der Umgebung zu ermöglichen, sind amphiphile Proteine wie Transporter, Pumpen oder Kanäle in die Membran eingelagert.

Der Transport von Substanzen über die Zellmembran kann aktiv oder passiv erfolgen. Der passive Transport erfolgt entlang des elektrochemischen Gradienten durch direkte Diffusion oder durch erleichterte Diffusion über Membranproteine. Der aktive Transport kann dagegen entgegen dem elektrochemischen Gradienten erfolgen. Es wird dabei zwischen primär-aktivem, sekundär-aktivem und tertiär-aktivem Transport unterschieden. Während beim primär-aktiven Transport direkt Energie via ATP-Hydrolyse verbraucht wird, findet beim sekundär- und tertiär-aktiven Transport die Translokation aufgrund des durch den primär-aktiven bzw. sekundär-aktiven Transport aufgebauten Gradienten statt (Marin 2012; Hermey et al. 2010; Hediger et al. 2013).

Aufgrund der Polarität, Größe und Verteilung der meisten Medikamente wird für deren Transport die Beteiligung von Membrantransportern benötigt (Marin 2012). Darum sind Membrantransporter zusammen mit metabolisierenden Enzymen bedeutend an Absorption, Verteilung und Elimination von Medikamenten beteiligt und beeinflussen so Pharmakokinetik und -dynamik einer Substanz (Giacomini et al. 2010). Funktionsverlust von Transportern durch Polymorphismen oder im Rahmen von Medikamenteninteraktionen können zu signifikanten Veränderungen der Effizienz, Disposition und Toxizität einer Substanz führen. Dies kann trotz nachgewiesenem klinischen Nutzen zur Rücknahme des Medikamentes führen. Zulassungsbehörden der USA und EU fordern daher im Rahmen der

Medikamentenentwicklung *in-vitro*-Studien zur Untersuchung potentieller Transporterinteraktionen (Maeda und Sugiyama 2013; Brouwer et al. 2013). In den darauffolgenden *in-vivo*-Studien können diese dann weiter untersucht und ihre Bedeutung für die Medikamentenanwendung bestimmt werden (Morrissey et al. 2013).

Physikochemische Eigenschaften, wie Ladung und molekulare Masse einer Substanz, können auf beteiligte Transporter hindeuten (Giacomini et al. 2010). NCG als ein Dicarboxylat mit einer Kettenlänge von 5 C-Atomen (siehe **Abb. 1.3**) könnte so Substrat der Carboxylattransporter der *Solute Carrier* (SLC)13-Genfamilie sein.

### 1.7 Die *Solute Carrier* (SLC)13-Genfamilie

Die *SLC13*-Genfamilie gehört zur SLC (*solute carrier*)-Familie, die sich aus 52 Familien und 395 Transportern zusammensetzt (Übersichten in Hediger et al. 2013). Die *SLC13*-Genfamilie besteht aus fünf sequenzverwandten Genen in Mensch und Säugetier, welche für fünf strukturell verwandte, aber funktionell unterschiedliche Proteine kodieren. Aufgrund des Symportes eines zweifach-negativ-geladenen Anions zusammen mit Natrium-Ionen, werden die Transporter der DASS (*Divalent Anion Sodium Symporter*)-Familie zugeordnet. Nach den zu transportierenden Anionen werden sie zudem in zwei Kategorien eingeordnet: in die Sulfat- und in die Carboxylat-Transporter (Übersichten in Pajor 2014).

Die Gruppe der Sulfattransporter wird von den Genen *SLC13A1* kodierend für den natriumabhängigen Anorganischen-Sulfattransporter 1 (NaS1, NaSi-1) und *SLC13A4* kodierend für den Sulfattransporter 1 (NaS2, SUT-1) repräsentiert. Die Gruppe der Carboxylat-Transporter (NaC-Gruppe) beinhaltet die Gene *SLC13A2* kodierend für den niedrig affinen natriumabhängigen Dicarboxylat-Transporter 1 (NaDC1, NaC1, SDCT1), *SLC13A3* kodierend für den hoch affinen natriumabhängigen Dicarboxylat-Transporter 3 (NaDC3, NaC3, SDCT2) und *SLC13A5* kodierend für den natriumabhängigen Citrat-Transporter (NaCT, NaC2) (Übersichten in Bergeron et al. 2013; Pajor 2014).

Die NaC-Gruppe transportiert Di- und Tricarboxylate. Sie unterscheiden sich untereinander durch ihre Substratspezifität, die Natrium-Stöchiometrie und bezüglich ihrer Gewebeverteilung und Membranlokalisation. Insgesamt vermitteln sie die zelluläre Aufnahme von Krebs-Zyklus-Zwischenprodukten wie Succinat, Citrat und  $\alpha$ -Ketoglutarat und tragen damit zum Energiemetabolismus der Zelle bei (Übersichten in Pajor 2014).

### 1.7.1 Der natriumabhängige Dicarboxylat-Transporter NaDC1

Der humane NaDC1 (hNaDC1) besteht aus 592 Aminosäuren und ist zu 54% identisch mit hNaCT und zu 43% mit hNaDC3. Er ist in apikalen Membranen proximaler Tubuluszellen und Dünndarm-Enterozyten exprimiert. Durch seine apikale Lage ist er für die Absorption von Citratzyklus-Intermediaten aus Darm und Primärharn wichtig. Da Citrat der Nierensteingeneese durch Bildung löslicher Calcium-Komplexe entgegenwirkt, ist der NaDC1 zudem durch Regulation der urinären Citrat-Konzentration mit der Genese der Nephrolithiasis assoziiert (Übersichten in Bergeron et al. 2013; Pajor 2014; Markovich und Murer 2004).

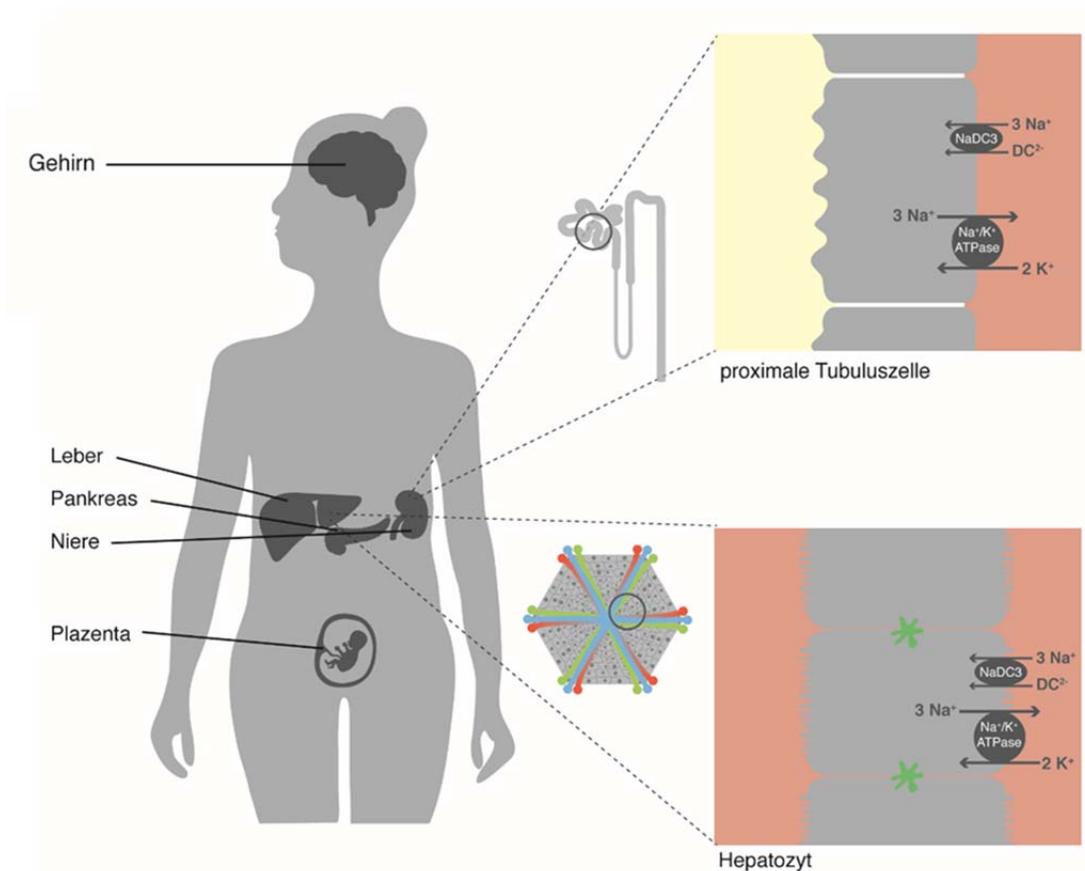
Der hNaDC1 transportiert drei Natrium-Ionen zusammen mit einem Di- oder Tricarboxylat in seiner zweifach negativ geladenen Form (Pajor et al. 1998). Im Gegensatz zum NaDC3 ist der NaDC1 weniger affin für seine Substrate. Der hNaDC1 zeigt Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_m$ ) von 800  $\mu\text{M}$  für Succinat und von circa 7 mM für Citrat bzw. bei Vorliegen des eigentlichen Substrates des hNaDC1, das zweifach-negativ-geladene Citrat<sup>2-</sup>, einen  $K_m$ -Wert kleiner als 100  $\mu\text{M}$  (Pajor und Sun 1996; Pajor 2014)).

### 1.7.2 Der natriumabhängige Dicarboxylat-Transporter NaDC3

Das *SLC13A3*-Gen ist auf Chromosom 20q12-13.1 lokalisiert. Sein dazugehöriges Membranprotein besteht aus 602 Aminosäuren und 11 Transmembranhelices. Es ist zu 43% identisch mit hNaDC1 und zu 47% identisch mit hNaCT (Bai et al. 2007; Markovich und Murer 2004).

Der hNaDC3 zeigt eine breite Gewebeverteilung. RNA wurde in Niere, Leber, Plazenta und Gehirn nachgewiesen (Wang et al. 2000). Innerhalb von Niere und Leber ist der NaDC3 im proximalen Nierentubulus und in perivenösen Hepatozyten nachweisbar. Im Gehirn ist er v. a. meningeal exprimiert (Chen et al. 1999). Während er sich in Leber und Niere in der basolateralen Membran befindet (Bai et al. 2006), wird er in der Plazenta in der apikalen Bürstensaummembran maternalseitiger Synziotrophoblasten exprimiert (Ganapathy et al. 1988). **Abb. 1.4** zeigt die Verteilung des hNaDC3.

Orthologe Gene wurden zudem in Winterflunder, Ratte, Maus, *Xenopus laevis* und Zebrafisch nachgewiesen (Steffgen et al. 1999; Übersichten in Bergeron et al. 2013).



**Abb. 1.4** Lokalisation des hNaDC3 (eigene Abbildung)

Der NaDC3 ermöglicht den elektrogenen Symport von drei Natrium-Ionen ( $\text{Na}^+$ ) gemeinsam mit einem zweifach negativ geladenen Dicarboxylat ( $\text{DC}^{2-}$ ) und induziert damit einen Einwärtsstrom ( $\Delta I$ ). Er ist ein hoch affiner Di- und Tricarboxylat-Transporter, der die dianionische Form bevorzugt. Während der optimale Succinat-Transport bei einem pH-Wert von 7,5-8,5 stattfindet, findet der optimale Citrat-Transport bei pH-Werten zwischen 5,5-6,5 statt. Dies liegt an der erhöhten Verfügbarkeit der zweifach negativ geladenen Form des Tricarboxylats Citrat als  $\text{H-Citrat}^{2-}$  bei diesen pH-Werten (Wang et al. 2000; Chen et al. 1999).

Im Vergleich zu den anderen beiden Carboxylat-Transportern zeigt er die größte Substratbreite. Er transportiert hoch affin die Substrate Succinat,  $\alpha$ -Ketoglutarat und Glutarat, mit geringerer Affinität die Citratzyklus-Intermediate Citrat, *cis*-Aconitat, Isocitrat, Fumarat, Malat und Oxaloacetat. (Wang et al. 2000; Burckhardt et al. 2005; Stellmer et al. 2007; Kaufhold et al. 2011).

Der NaDC3 mediiert gemeinsam mit den basolateralen Organischen-Anionen-Transportern OAT1 und OAT3 den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der renalen Eli-

mination organischer Anionen. Die Transporter OAT1 und OAT3 arbeiten als Austauscher, d. h. sie nehmen organische Anionen im Austausch gegen intrazelluläres  $\alpha$ -Ketoglutarat in die Zelle auf.  $\alpha$ -Ketoglutarat wird seinerseits über den NaDC3 in die Zelle aufgenommen (Kaufhold et al. 2011). Damit vermittelt NaDC3 indirekt die renale Clearance verschiedenster Therapeutika, wie  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, Schleifendiuretika und nicht-steroidale Rheumatika (Übersichten in Burckhardt und Burckhardt 2003). Zudem ist der NaDC3 OAT-unabhängig am Transport der Schwermetallchelatoren Meso-2,3-Dimercaptosuccinat (DMSA) und Dimercaptopropan-1-sulfonat (DMPS) in die proximale Tubuluszelle und damit an deren Wirksamkeit bei Schwermetallvergiftungen beteiligt (Burckhardt et al. 2002).

Da perivenöse Hepatozyten im Gegensatz zu periportalen Hepatozyten keinen Harnstoffzyklus besitzen, aber die Glutaminsynthetase exprimieren, die Ammonium und Glutamat zu Glutamin konvergiert (Übersichten in Häussinger 1990), ist der NaDC3 durch seine Lage in perivenösen Hepatozyten vermutlich für die Bereitstellung der dafür nötigen Substrate verantwortlich (Chen et al. 1999).

Im Gehirn steuert der hNaDC3 über die astrozytäre Aufnahme der Aminosäure *N*-Acetylaspartat (NAA) die Osmoregulation von Neuronen und schützt diese vor erhöhtem osmotischen Stress (Huang et al. 2000).

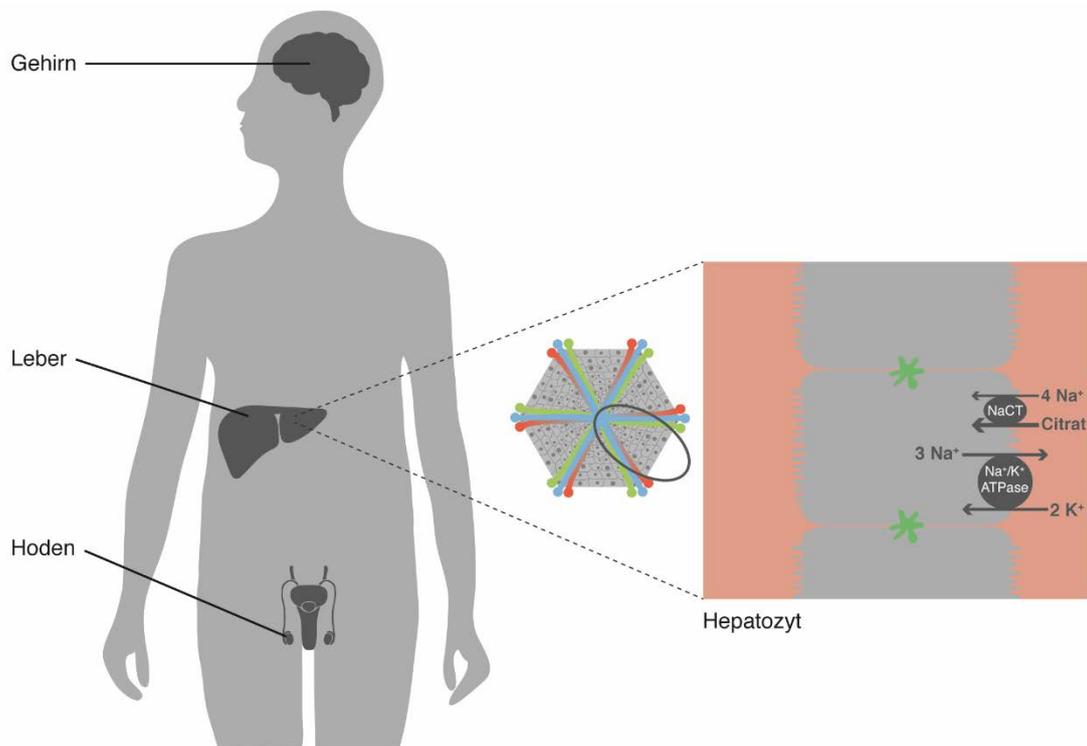
Zudem ist der NaDC3 an der zellulären Alterung durch Hemmung der  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Histondeacetylase Sirtuin 1 (SIRT1), der Glucarazidurie Typ 1, dem Morbus Canavan und dem Axenfeld-Rieger-Syndrom Typ 1 beteiligt. Die Mutation des humanen *SLC13A3*-Gens zeigt ferner eine schwache Assoziation mit dem Vorkommen von Diabetes mellitus Typ 2 (Liu et al. 2010; Bento et al. 2008; Übersichten in Bergeron et al. 2013).

### 1.7.3 Der natriumabhängige Citrat-Transporter NaCT

Das *SLC13A5*-Gen ist auf Chromosom 17p13 lokalisiert und kodiert für den aus 569 Aminosäuren bestehenden NaCT-Transporter (hNaCT). Dieser ist zu 54% identisch mit hNaDC1 und zu 47% identisch mit hNaDC3 und besteht aus 11 Transmembrandomänen. Eine Splicevariante mit bisher unbekannter Funktion konnte im Gehirn nachgewiesen werden (Übersichten in Bergeron et al. 2013).

Lokalisiert ist der hNaCT in der Leber, wo er sowohl in periportalen als auch in perivenösen Hepatozyten lokalisiert ist. Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) lässt sich zudem in Tes-

tis und Gehirn, speziell in Neuronen, nachweisen. In Bezug auf die Membranlokalisation befindet sich der NaCT auf der basolateralen Membranseite (Inoue et al. 2002; Gopal et al. 2007; Yodoya et al. 2006). **Abb. 1.5** zeigt die Verteilung des NaCT.



**Abb. 1.5** Lokalisation des hNaCT (eigene Abbildung)

Der Transport über den hNaCT verläuft elektrogen und natriumabhängig, sodass unter den Bedingungen der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme Einwärtsströme gemessen werden können. Im Gegensatz zu hNaDC1 und hNaDC3 transportiert er vier Natrium-Ionen zusammen mit einem Di- vorzugsweise aber einem Tricarboxylat (Inoue et al. 2003). Präferiertes Substrat ist Citrat<sup>3-</sup> mit einer Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) von 600  $\mu\text{M}$ . Dicarboxylate wie Succinat und Malat transportiert der hNaCT mit einer 3-4,5-fach geringeren Affinität (Inoue et al. 2002). Da er Citrat bevorzugt als dreifach negativ geladenes Anion (Citrat<sup>3-</sup>) transportiert, zeigt der hNaCT die höchste Citrat-Transport-Aktivität bei einem pH-Wert von 7,0-7,5, denn hier liegt Citrat primär als solches vor. Der Succinat-Transport ist dagegen pH-unabhängig (Inoue et al. 2004).

NaCT spielt eine wichtige Rolle in der Versorgung von Leber- und Gehirnzellen mit Citratzyklus-Intermediaten, v. a. Citrat. Bei Citrat-Plasmaspiegeln von circa 135  $\mu\text{M}$  ermög-

licht er die effektive zelluläre Versorgung mit diesem. Im Gehirn ist der hNaCT für die Versorgung der Neurone mit energiereichen Substraten zuständig. Da Neurone nicht selbst Citratzyklus-Intermediate synthetisieren können, sind sie auf die konstante Versorgung mit diesen angewiesen. Der NaCT spielt zudem eventuell eine pathophysiologische Rolle in der Genese von Glioblastomen. SCL13A5-Expression ist hier herunterreguliert (Yodoya et al. 2006; Etcheverry et al. 2010).

Da intrazelluläres Citrat die Aktivität von Schlüsselenzymen der Fettsäureoxidation und der Glykolyse reguliert, nimmt der NaCT Einfluss auf Fettsäure- und Cholesterolsynthese und den hepatischen Glukosemetabolismus und ist damit an der Pathogenese von Übergewicht und Diabetes mellitus beteiligt (Inoue et al. 2003; Übersichten in Bergeron et al. 2013; Pajor 2014).

### **1.8 Elektrophysiologische Untersuchungen an *Xenopus laevis*-Oozyten**

Da es sich bei der *SLC13*-Familie um elektrogene Transporter handelt, können diese bei Expression in Oozyten des südafrikanischen Klauenfrosches *Xenopus laevis* (*X. laevis*), elektrophysiologisch untersucht werden.

Das *X. laevis*-Oozyten-Expressionssystem stellt seit dem Nachweis von Barnard et al., dass exogene Membranproteine mithilfe elektrophysiologischer Methoden untersucht werden können, eines der Standardexpressionssysteme zur Charakterisierung elektrogener Membranproteine dar. Es hat gegenüber traditionellen Expressionssystemen, wie *Escherichia coli*, Hefen oder eukaryotischen Zellen, einige Vorteile (Barnard et al. 1982; Dascal 2001; Markovich 2008). In freier Wildnis lebt *X. laevis* in Tümpeln oder toten Flussarmen, sodass die abgelegten Oozyten unter schwierigen Umweltbedingungen überleben müssen (Sigel und Minier 2005). Sie zeichnen sich daher durch eine hohe Umweltresistenz aus und benötigen keine aufwendigen und sterilen Kulturbedingungen (Weber 1999). Die Oozyten haben zudem ausreichend Energieressourcen für Zellwachstum und Translation und bei einem hohen Expressionsgrad von exogener komplementäre Ribonukleinsäure (cRNA) nur eine geringe Anzahl an endogenen Membranproteinen (Wagner et al. 2000). Dadurch ist bei elektrophysiologischen Versuchen das Verhältnis von Signal- und Hintergrundaktivität deutlich zugunsten der Signalaktivität verschoben (Bröer 2010).

Mit einem Durchmesser von 1,2 bis 1,3 mm sind sie bezüglich Injektion und Kultur leicht handhabbar (Dascal 2001).

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ist die meist genutzte elektrophysiologische Technik zur Messung von Ganzzellströmen in *X. laevis*-Oozyten (Wagner et al. 2000). Dies liegt zum einen daran, dass sie hochsensitiv ist und zum anderen daran, dass sie stabil und praktikabel ist (Greuer et al. 2013; Buckingham et al. 2006). Das macht die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus laevis*-Oozyten zum geeigneten System zur Bestimmung als auch zur genaueren Charakterisierung des Transports von *N*-Carbamyl-*L*-Glutamat über NaDC3 und NaCT.

### **1.9 Zielsetzung der Arbeit**

In den letzten Jahren haben Transporter zunehmend an Bedeutung gewonnen. Gemeinsam mit metabolisierenden Enzymen beeinflussen sie die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik eines Pharmakons (Morrissey et al. 2013).

Es gibt gute Hinweise, dass *N*-Carbamyl-*L*-Glutamat (NCG) mithilfe von Transportern aus dem Magen-Darm-Trakt aufgenommen und zu seinem Wirkort, den periportalen Hepatozyten, transportiert wird und renal und biliär sezerniert und ausgeschieden wird (Senkevitch et al. 2012; Orphan Europe 2010; Elinder et al. 2014).

Da es sich bei NCG um ein Glutamatderivat und um ein divalentes Ion handelt, lässt sich vermuten, dass die *SLC13*-Familie an diesem Transport beteiligt ist. Die Transporter NaDC3 (*SLC13A3*) und NaCT (*SLC13A5*) mit ihrer Expression in Leber und Nieren (vgl. **Abb. 1.4** und **Abb. 1.5**) könnten die Aufnahme und Clearance von NCG vermitteln.

Weil es sich bei der *SCL13*-Genfamilie um elektrogene Transporter handelt, können diese nach Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten elektrophysiologisch untersucht werden. Der NCG-vermittelte Strom kann mit den induzierten Strömen anderer NaDC3- und NaCT-Substrate verglichen werden.

## 2 Material und Methoden

Im Folgenden werden sämtliche Materialien und Methoden aufgelistet, welche für die Versuche notwendig waren. Es erfolgte eine Einweisung durch erfahrene Mitarbeiter des Labors. Alle Dokumentationen und notwendigen Sicherheitsmaßnahmen wurden eingehalten.

### 2.1 Chemikalien und Medien

**Tab. 2.1** Verwendete Chemikalien

Substanz/ Chemikalie	Summenformel	Molare Masse (g/mol)	Bezugsfirma
Citronensäure	$C_6H_8O_7$	192,13	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	147,02	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gentamycinsulfat	$C_{19-21}H_{39-43}N_5O_7 \cdot 2,5 H_2SO_4$	694,75-723,75*	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	238,31	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	KCl	74,56	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase Typ II, CLS II			Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
L-Glutaminsäure	$C_5H_9NO_4$	147,13	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	$Mg Cl_2 \cdot 6 H_2O$	203,30	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N-Acetyl-DL-glutaminsäure	$C_7H_{11}NO_5$	189,17	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	NaCl	58,44	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	$C_3H_3NaO_3$	110,05	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumsuccinat-Hexahydrat	$C_4H_4O_4Na_2 \cdot 6 H_2O$	270,1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N-Carbamyl-L-glutaminsäure	$C_6H_{10}N_2O_5$	190,15	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Glucamin	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	195,21	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TRIS	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	121,14	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

\* *chargenabhängig*; HEPES: *N*-2-Hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-ethansulfonsäure; TRIS: *Tris*-(hydroxymethyl)-aminomethan

### 2.1.1 Medien für die Präparation und Aufbewahrung der Oozyten

Nach der Entnahme aus dem Froschweibchen wurde der Ovarlappen zunächst in Oozyten-Ringer-Lösung (ORi) und anschließend in ORi supplementiert mit Kollagenase Typ II (CLS II) überführt. Die 15-stündige Inkubation in Kollagenase-supplementierter ORi und anschließende 10-minütige Inkubation in calciumfreier Oozyten-Ringer-Lösung (ORi<sub>2</sub>) löst die Oozyten aus dem Zellverband.

Zum Aufbewahren der *Xenopus laevis*-Oozyten wurde ein Liter ORi mit 50 mg Gentamycinsulfat zur Verhinderung einer bakteriellen Besiedlung und 275 mg Natriumpyruvat als Nährstoffquelle verwendet (ORi<sub>3</sub>).

**Tab. 2.2** Zusammensetzung der Medien zur Präparation und Aufbewahrung der Oozyten

Substanz/ Chemikalie	Konzentrationen		
	ORi <sup>*/**</sup>	ORi <sub>2</sub> <sup>*</sup>	ORi <sub>3</sub> <sup>*</sup>
Calciumchlorid-Dihydrat	2 mM		2 mM
Gentamycinsulfat			69,08-71,97 µM <sup>***</sup>
HEPES	5 mM	5 mM	5 mM
Kaliumchlorid	3 mM	2 mM	3 mM
Magnesiumchlorid		1 mM	
Natriumchlorid	110 mM	82,5 mM	110 mM
Natriumpyruvat			2,5 mM

Die Substanzen werden in Aqua destillata (Aqua dest.) gelöst; \* Titration mit TRIS bei Zimmertemperatur auf einen pH-Wert von 7,5; \*\* Zur Defollikulation Supplementierung mit Kollagenase Typ II CLS II; \*\*\* *chargenabhängig*

### 2.1.2 Medien für die elektrophysiologischen Messungen

Für die Testreihen wurden zum ORi unterschiedliche Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen supplementiert. Die einzelnen Substanzen wurden in einer Konzentration von 5 mM oder 1 mM in ORi gelöst. Danach wurde der pH-Wert der Testmedien bei Zimmertemperatur auf 7,5 mit TRIS eingestellt.

**Tab. 2.3** Testsubstanzen für den Transportnachweis

Transporter	Testsubstanzen
humaner NaDC3 (hNaDC3)/ NaDC3 der Winterflunder (fNaDC3)	<i>L</i> -Glutaminsäure
	Natriumsuccinat
	<i>N</i> -Acetyl- <i>D/L</i> -glutaminsäure
	<i>N</i> -Carbamyl- <i>L</i> -glutaminsäure
humaner NaCT (hNaCT)	Citronensäure
	Natriumsuccinat
	<i>N</i> -Carbamyl- <i>L</i> -glutaminsäure

Im Rahmen des Nachweises der Natriumabhängigkeit Substrat-induzierter Ströme wurden Messungen unter natriumfreien Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde Natrium durch äquimolare Mengen an *N*-Methyl-*D*-Glucamin (NMDG) ersetzt (ORi<sub>4</sub>). Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 2 N Salzsäure.

**Tab. 2.4** Natriumhaltige und natriumfreie Oozyten-Ringer-Lösung (ORi)

Substanz/ Chemikalie	ORi*	ORi <sub>4</sub> **
Calciumchlorid-Dihydrat	2 mM	2 mM
HEPES	5 mM	5 mM
Kaliumchlorid	3 mM	2 mM
Natriumchlorid	110 mM	
<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Glucamin		110 mM

## 2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2.5** Verwendete Arbeitsgeräte

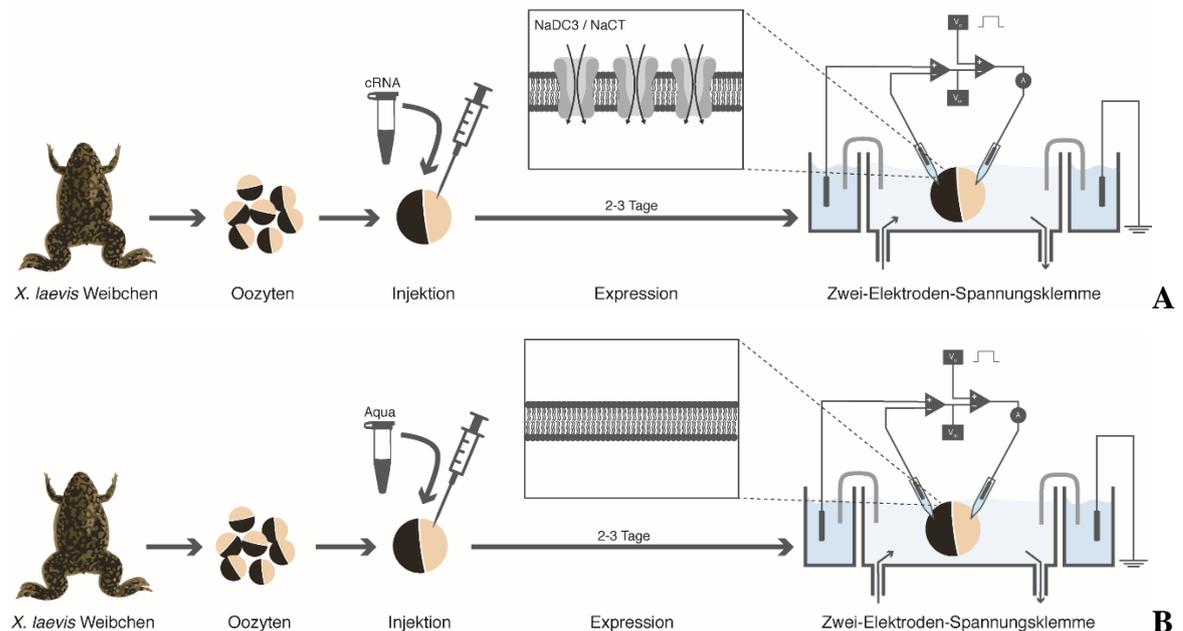
Geräte	Modellbezeichnung	Hersteller
Agarbrücken		Eigenbau der Institutswerkstatt
Arbeitstische mit Vestolitpuffer		Eigenbau der Institutswerkstatt
Faraday-Käfig		Eigenbau der Institutswerkstatt
Glasmaterialien	Duran	Schott, Mainz, Deutschland
Injektionsbank aus Plexiglas		Eigenbau der Institutswerkstatt
Kaltlichtquelle	KL1500	Schott AG, Mainz, Deutschland
Kühlschrank	FKS 3610	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühl-Gefrier-Kombination	CHA 33100	Beko GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Mikromanipulatoren	Micromanipulator M, Micromanipulator L	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskope	Basismikroskop 500052	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
	Stereomikroskope M3B, M3C, M3Z	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte	KM02 electronic	IKA (Staufen, Deutschland)
	MR 2002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Nanoliter-Injektor	A203XVZ	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Oozyteninkubator (17-19 °C)	FKS 2610	Liebherr, Bulle, Schweiz; Umbau in Institutswerkstatt
Perfusionssystem		Eigenbau der Institutswerkstatt
Pipetten	Eppendorf Research <sup>®</sup> 20, 200, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Eppendorf Varipette 4710 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	inoLab pH 720	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Reinstwasseranlage	arium <sup>®</sup> 611 VF	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Tiefkühlschrank	Herafreeze HFU 586 Basic	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Trockenschrank	5042 EK	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Vertikal-Elektroden-ziehgerät	PE-2	Narishige Group, Tokio, Japan
Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Verstärker	Oocyte Clamp OC-725A	Warner Instruments, Hamden, CT, USA
	Oocyte Clamp OC-725B	Warner Instruments, Hamden, CT, USA
Zweikanal-Flach-bettsschreiber	BD112	Kipp & Zonen B. V., Delft, Niederlande
Feinwaagen	2002 MP1	Sartorius Weighing Technology GmbH, Göttingen, Deutschland
	LC621S	Sartorius Weighing Technology GmbH, Göttingen, Deutschland

**Tab. 2.6** Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Name	Hersteller
Borosilikatglas-kapillaren mit Filament Sodaklarglas	30-0057	Harvard Bioscience Inc., Holliston, MA, USA
	4878	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Nahtmaterial	Prolene 7-0 blau monofil 8648H	Ethicon Inc, Somerville, NJ, USA
Pipettenspitzen	20µl, 200µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Sterile Skalpellklingen	Aesculap Größe 11	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
T7-Transkriptionskit	mMESSAGE mMACHINE® T7 Transcription Kit AM1344	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
24-Well-Zellkultur-platten	662 160	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

## 2.3 Vorbereitung der *Xenopus laevis*-Oozyten



**Abb. 2.1** Übersicht des Versuchsablaufs (eigene Abbildung)

- A) Zu untersuchende Transporter:** Nach Gewinnung der Oozyten konnte am Folgetag die cRNA injiziert und nach zwei Tagen mit den elektrophysiologischen Versuchen begonnen werden.
- B) Kontrolle (mock):** Zur Kontrolle wurde am Folgetag der Oozytengewinnung den Oozyten Aqua dest. injiziert. Parallel zu den elektrophysiologischen Versuchen an Transporter-exprimierenden Oozyten wurden Messungen an den Kontroll-Oozyten durchgeführt.

### 2.3.1 Entnahme und Präparation der Oozyten

Die Oozyten wurden mindestens zwei Jahre alten Froschweibchen entnommen, die von Nasco in Ford Atkinson in Wisconsin (USA) bezogen wurden und im Institut bei einer Wassertemperatur von 18 °C und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten werden. Ernährt werden die Tiere mit portionierten Rinderherzen und Pellets.

Die operative Entnahme der Oozyten erfolgte durch eine hierfür qualifizierte Mitarbeiterin des Institutes dreimal pro Woche. Die geltenden Tierschutzvorschriften wurden eingehalten. Die Genehmigung nach § 9 Absatz 1 und §11 Absatz 1, Nr. 1 des Tierschutzgesetzes lag vor.

Der Frosch wurde hierfür in einen Behälter mit Eis und Eiswasser, dem MS220 zugesetzt war, gelagert, bis sich eine Immobilität einstellte. Wenn der Frosch sich ohne Reaktion kopfüber drehen ließ, war er für die Operation bereit (vgl. Bröer 2010).

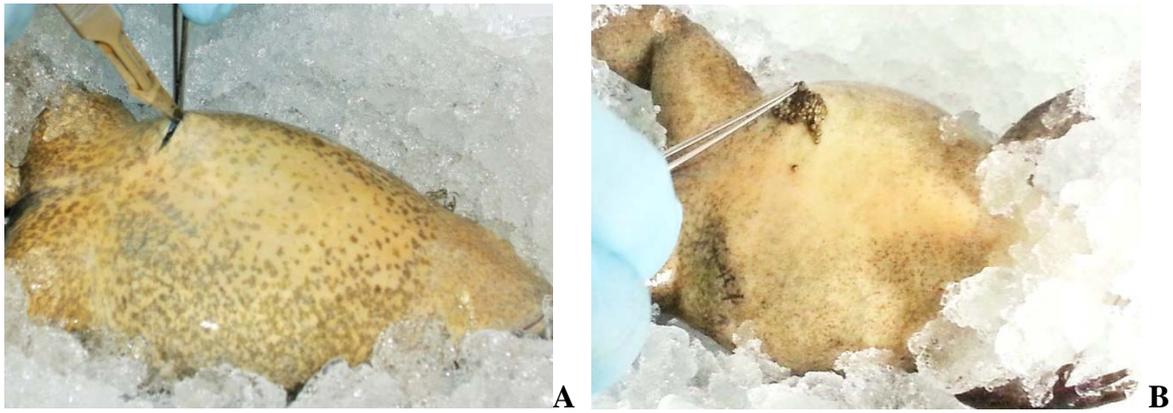
Es wurden zwei separate 1 bis 2 cm lange Haut- und Muskelschnitte inguinal seitlich der Mittellinie durchgeführt. Mithilfe einer Pinzette konnte das nun sichtbare Ovar aus dem Bauchraum mobilisiert und mithilfe einer Schere ein Ovarlappen abgetrennt werden. Der Ovarlappen wurde bis zur weiteren Aufbereitung in ORi (siehe **Tab. 2.2**) überführt und im Inkubator bei 17-19 °C aufbewahrt.

Nachdem sichergestellt worden war, dass das zurückgelagerte Ovar im Bauchraum frei beweglich war, wurde mit zwei bis drei Einzelknopfnähten zunächst die Muskelschicht und dann die Hautschicht verschlossen. Durch den getrennten Verschluss war die Verschieblichkeit der beiden Schichten gewährleistet.

Anschließend konnte das *Xenopus laevis*-Weibchen in 17-19 °C temperiertes Wasser transferiert werden. Bei ausreichender Vigilanz des Tieres war die Überführung in das Aquarium möglich.



**Abb. 2.2** *Xenopus laevis*-Weibchen in einem Institutsaquarium (eigene Fotografie)



**Abb. 2.3** Entnahme der Oozyten (eigene Fotografien)

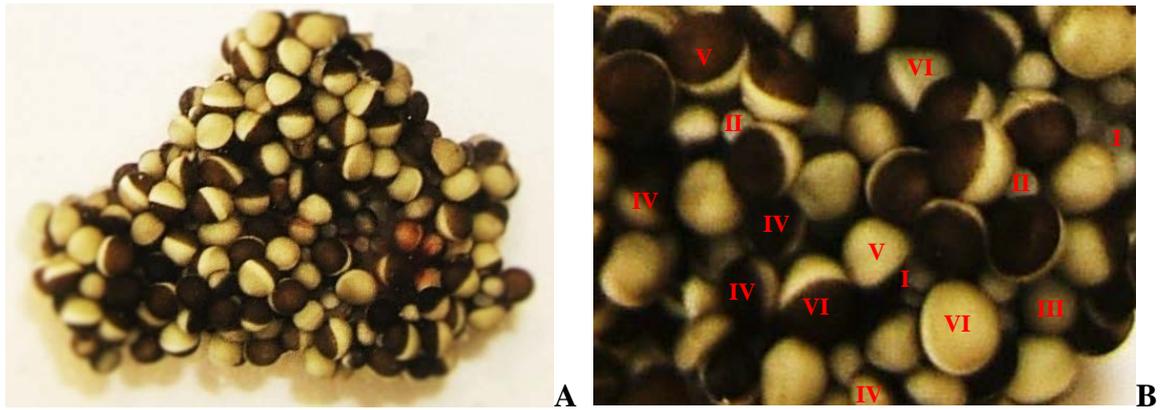
- A) Separate Eröffnung der Haut- und Muskelschicht mit Skalpellklinge*
- B) Mobilisierung eines Ovarlappens mit einer Pinzette aus dem Bauchraum*

### 2.3.2 Präparation der Oozyten für die cRNA-Injektion

Das in ORi aufbewahrte Ovarlappchen wurde mithilfe von zwei Pinzetten in kleinere Abschnitte à 10-20 Oozyten zerteilt. Anschließend erfolgte die Inkubation für ca. 15 Stunden in CLS II-Lösung (6-7 mg/20 ml ORi) bei 17-19 °C (vgl. **Tab. 2.2**). Dies löste die umgebenden bindegewebigen Schichten wie Oberflächenepithel, Thekagewebsschicht und Follikelzellen ab. Die Vitellinmembran, welche zum Schutz der Plasmamembran und zum Erhalt des zellulären Zytoskeletts und damit der Form der Oozyte dient, blieb dagegen erhalten (vgl. Liu und Liu 2006; Dascal 2001).

Am darauffolgenden Morgen erfolgte eine zehnmünütige Inkubation in ORi<sub>2</sub> mit anschließendem dreimaligem Waschen in ORi (vgl. **Tab. 2.2**). Dadurch wurden Follikelreste und Reste zerstörter Oozyten entfernt.

Mithilfe eines Stereomikroskops konnten Oozyten der Stadien V und VI nach Dumont (Dumont 1972) ausgewählt werden. Diese zeichnen sich durch eine deutliche Trennung des dunkelbraunen animalischen und des beigefarbenen vegetativen Pols aus. Im Stadium VI existiert zudem zwischen beiden Polen ein depigmentiertes Band (Dumont 1972).

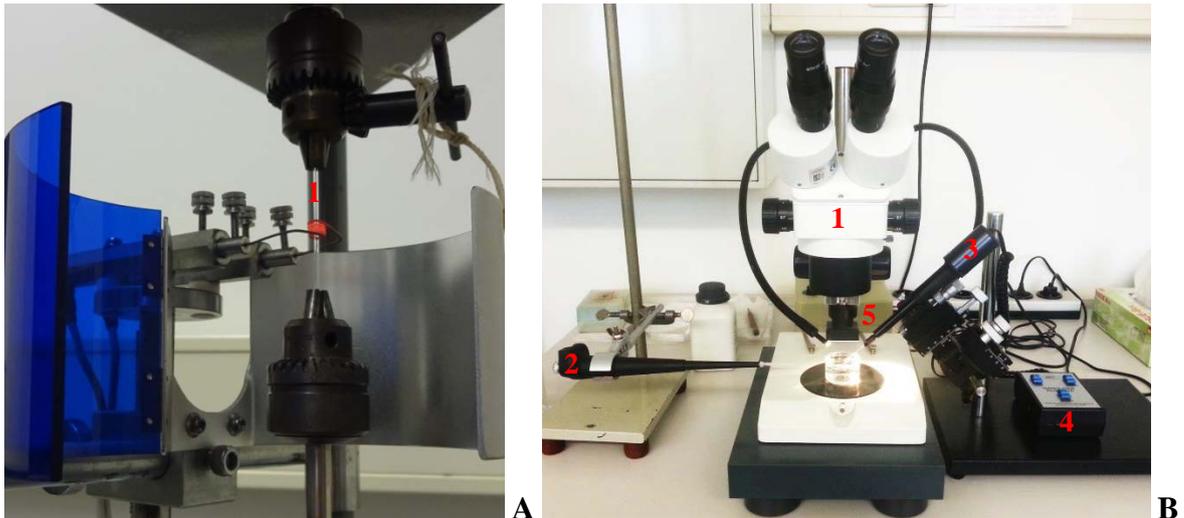


**Abb. 2.4** Ausschnitt eines Ovarläppchens (A) und Oozytenstadien nach Dumont (B) (eigene Fotografien). Die Stadien sind durch römische Ziffern gekennzeichnet.

### 2.3.3 Vorbereitung der Injektion

Die von einer Mitarbeiterin des Instituts bereitgestellte cRNA war mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt worden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zur *in-vitro*-Transkription wurde linearisierte cRNA des menschlichen NaCT (Genbank-Zugangsnummer AY151833), des menschlichen NaDC3 (Genbank-Zugangsnummer AF154121) und der Winterflunder (Genbank-Zugangsnummer AF102261) über das T7-Transkriptionskit transkribiert.

Die zur RNA-Injektion notwendigen Injektionskanülen wurden mithilfe eines Vertikal-Elektrodenziehgerätes aus Sodaklarglaskapillaren hergestellt. Aus einer Glaskapillare entstanden dabei jeweils zwei Injektionskapillaren mit konischer Spitze (**Abb.2.5.A**). Anschließend erfolgte die Kürzung der Spitze mithilfe einer Pinzette, sodass eine 10-20 µm große Öffnung entstand. Die Injektionskapillare wurde darauffolgend bis zur Abdichtung mit Mineralöl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) blasenfrei befüllt und über einen Mikromanipulator mit dem Nanoliter-Injektor verbunden.



**Abb. 2.5** Herstellung der Injektionskanülen und Arbeitstisch zur Injektion  
(eigene Fotografien)

- A) Herstellung der Injektionskanülen mit Vertikalelektrodenziehgerät:** Die unter Zugspannung stehende Glaskapillare wird in der Mitte durch eine Heizspirale erhitzt und die beiden Enden mit hoher Geschwindigkeit durch einen Elektromagneten auseinandergezogen.
- B) Arbeitstisch zum Injizieren von cRNA bzw. Aqua dest.:** Stereomikroskop (1), Pipette mit cRNA (2), Mikromanipulator (3), Nanoliter-Injektor (4), Kaltlichtlampe (5)

#### 2.3.4 Injektion von cRNA und Aqua dest.

Oozyten der Stadien V und VI nach Dumont (Dumont 1972) wurden mithilfe einer Glaspipette mit abgerundeter feuerpolierter Öffnung zur Verletzungsprävention auf eine Plexiglas-Injektionsbank mit fünf parallelen Vertiefungen so platziert, dass sie weiterhin von ORi bedeckt waren. Nachdem die cRNA aus dem  $-80\text{ °C}$  Tiefkühlschrank durch die Handwärme erwärmt worden war, wurden unter Binokular-Sicht circa  $5\text{ }\mu\text{l}$  in eine Pipettenspitze und aus dieser, möglichst blasenfrei, in die Glaskapillare des Nanoliter-Injektors aufgezogen (siehe **Abb. 2.5.B**).

Da sich der Nucleus im dunklen animalischen Pol befindet (Sigel und Minier 2005), wurden  $23\text{ nl}$  der cRNA in den vegetativen Pol der Oocyte injiziert. Für die Kontrollgruppe wurde das Prozedere mit  $23\text{ nl}$  Aqua dest. wiederholt. Die so behandelten Oozyten werden hier als *mocks* bezeichnet.

Der gesamte Injektionsvorgang erfolgte mit Handschuhen, um eine Desintegration der RNA zu verhindern.

Die injizierten Oozyten wurden anschließend in Gruppen von bis zu 8 in jeweils mit 2 ml  $\text{ORi}_3$ -befüllte Wells (siehe **Tab. 2.2**) auf einer 24-Well-Platte aufgeteilt und für zwei bis drei Tage in einem 17-19 °C temperierten, lichtgeschützten Inkubator untergebracht. Die Oozyten wurden täglich in frische  $\text{ORi}_3$  umgesetzt und morphologisch veränderte Oozyten aussortiert. Diese zeichneten sich durch eine weniger glatte Membran, Verlust von Dottermaterial oder durch Schrumpfung aus (Dascal 2001). Sie setzen Substanzen frei, welche gesunde Oozyten schädigen können (Markovich 2008).

## **2.4 Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme**

Die elektrophysiologischen Messungen wurden mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt.

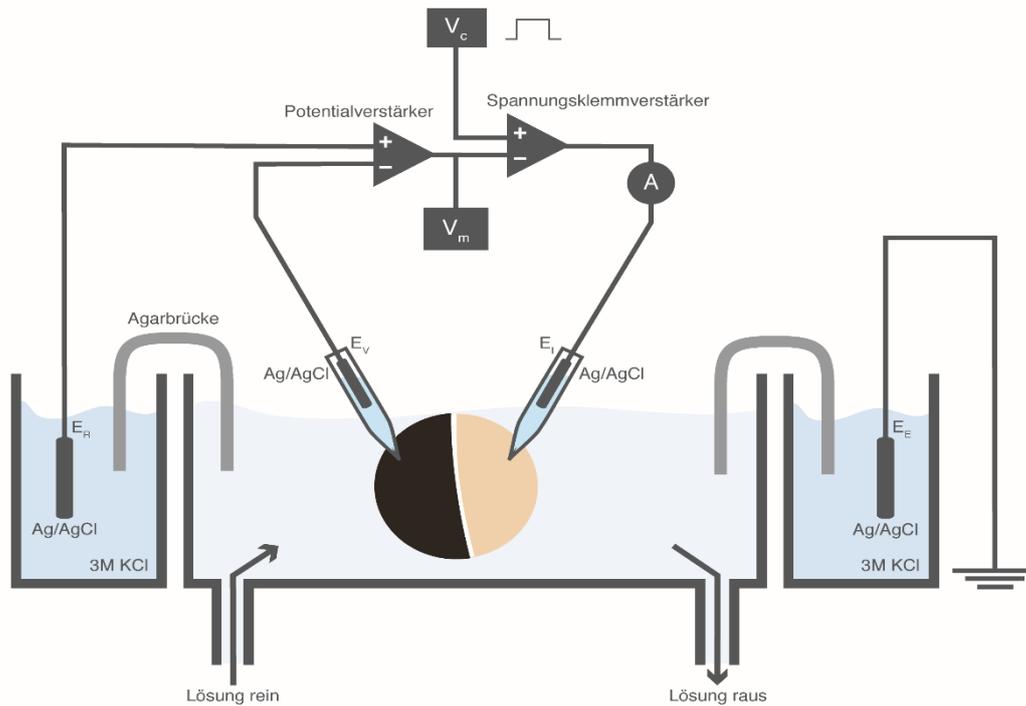
### 2.4.1 Aufbau der Messapparatur

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme besteht aus zwei intrazellulären Elektroden, einer Spannungsmessenden Elektrode ( $E_V$ ) und einer stromeinspeisenden Elektrode ( $E_I$ ), und zwei extrazellulären Elektroden, der Bad-Referenzelektrode ( $E_R$ ) und der Erdungselektrode ( $E_E$ ). Die Verbindung zum Verstärker erfolgt über chlorierte Silberdrähte (Ag/AgCl), die in eine 3 molare Kaliumchlorid-Lösung (KCl) eintauchen, und eine Agarbrücke. Über die Elektroden  $E_V$  und  $E_R$  kann die Membranspannung ( $V_m$ ), d. h. die Potentialdifferenz zwischen Oozyteninnerem und Badlösung, gemessen werden. Das Signal wird zunächst mithilfe eines Potentialverstärkers mit hohem Eingangswiderstand verstärkt und anschließend mit der festgelegten Kommandospannung ( $V_c$ ) verglichen. Es erfolgt die Einspeisung eines Stromes proportional zur resultierenden Differenz zwischen  $V_c$  und  $V_m$  über die stromeinspeisende Elektrode ( $E_I$ ). Die Höhe des eingespeisten Stroms wird über ein Amperemeter bestimmt und via Zweikanal-Schreiber aufgezeichnet.

In Abwesenheit eines Substrats bleibt der eingespeiste Strom bei konstanter Klemmspannung gleich. Werden durch Zugabe eines möglichen Substrats die exprimierten Transporter aktiv, fließt ein Kompensationsstrom über die Zellmembran. Um den Nettoeinstrom positiver Ionen zu kompensieren, muss dabei der Einstrom negativer Ionen erfolgen. Der eingespeiste Strom ( $\Delta I$ ) besitzt die gleiche Amplitude wie der Ionenstrom, aber eine entgegengesetzte Richtung (Dascal 2001).

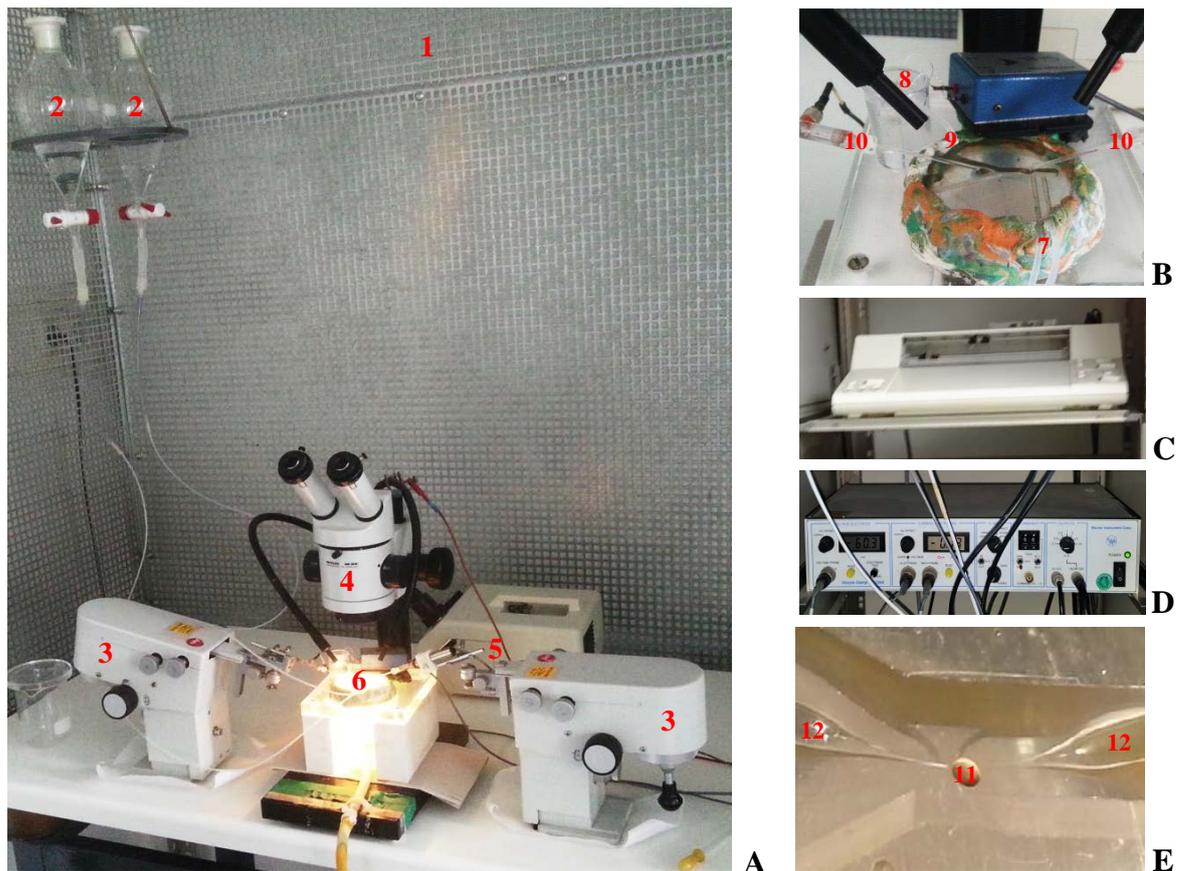
Bei ausreichender Expression des Proteins in der Plasmamembran wird der Ionenstrom von dem zu untersuchenden Transporter dominiert (Bröer 2010).

Die Messapparatur ist gegenüber elektrischen Einstreuungen durch einen Faradayschen Käfig und gegenüber Vibrationen durch einen auf Vestolit-Puffer gelagertem Arbeitstisch abgeschirmt.



**Abb. 2.6** Aufbau der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (eigene Abbildung)

Die Oozyte mit zwei intrazellulären Elektroden befindet sich in einer mit ORi gefüllten Perfusionskammer. Über eine Zu- und Abflussvorrichtung ist eine kontinuierliche Perfusion gewährleistet. Über die Agarbrücke, die 3M KCl-Lösung und die chlorierten Silberdrähte (Ag/AgCl) erfolgt der Anschluss an den Verstärker. Geerdet wird das System über eine Badelektrode ( $E_E$ ). Der Potentialverstärker ermittelt aus der spannungsmessenden Elektrode ( $E_V$ ) und der Referenzelektrode ( $E_R$ ) die Membranspannung ( $V_m$ ). Mithilfe des Spannungsklemmverstärkers wird  $V_m$  mit der festgelegten Kommandospannung ( $V_c$ ) verglichen. Über die stromeinspeisende Elektrode ( $E_I$ ) wird die ermittelte Differenz zwischen  $V_m$  und  $V_c$  in die Oozyte eingespeist.



**Abb. 2.7** Elektrophysiologischer Messplatz (eigene Fotografien)

- A)** Arbeitstisch für elektrophysiologische Messungen: Faradayscher Käfig (1), Scheidetrichter als Vorratsgefäße für Test- und Referenzlösungen (2), Mikromanipulatoren mit spannungsmessender bzw. stromeinspeisender KCl-gefüllter Elektrode  $E_V$  bzw.  $E_I$  (3), Stereomikroskop (4), Kaltlichtlampe (5), Perfusionskammer mit Oozyte (6)
- B)** Nahaufnahme der Perfusionskammer: Zu- und Abflussvorrichtung (7), 3M-KCl-Lösung mit eingetauchten extrazellulären Elektroden  $E_E$  und  $E_R$  (8), Agarbrücke (9), spannungsmessende bzw. stromeinspeisende Elektrode  $E_V$  und  $E_I$  (10)
- C)** Zweikanal-Flachbetschreiber zur Aufzeichnung des eingespeisten Stroms und der Klemmspannung
- D)** Oocyte Clamp OC-725A
- E)** Nahaufnahme der in der Perfusionskammer platzierten Oozyte (11) mit spannungsmessender und stromeinspeisender Elektrode  $E_V$  und  $E_I$  (12)

#### 2.4.2 Vorgehensweise bei elektrophysiologischen Messungen

Zu Beginn jedes Versuchstages wurde der Messplatz vorbereitet. Die für die ORi und für die Substratlösung vorgesehenen Scheidetrichter wurden befüllt, dann die Perfusionskammer mit ORi gespült und ein gleichförmiger Zu- und Abfluss der Perfusionslösungen sichergestellt. Dies ist für die Stabilität der Messungen wichtig (vgl. Guan et al. 2013).

Daraufhin wurde die Oozyte in der Perfusionskammer so platziert, dass die auf je einem Mikromanipulator sitzende spannungsmessende und stromeinspeisende Elektrode in die Oozyte eingestochen werden konnte.

Nach dem Einstechen der Elektroden wurde gewartet, bis sich ein stabiles Membranpotential eingestellt hatte. Anschließend erfolgte die Klemmung der Oozyte auf das gewünschte Potential von -60 mV. Nachdem ausreichend Zeit zur Stabilisierung des einzuspeisenden Stromes vergangen war, konnte mit den elektrophysiologischen Experimenten begonnen werden.

## **2.5 Auswertung der Ergebnisse**

Alle Versuche wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, an mindestens drei Oozyten von drei verschiedenen Froschweibchen durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Versuche an *Aqua dest.*-injizierten Oozyten (*mocks*) wiederholt.

Die Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) mit Standardabweichung ( $\sigma$ ) dargestellt ( $\bar{x} \pm \sigma$ ) mit:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i) \quad \bar{x}: \text{arithmetischer Mittelwert}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad n: \text{Anzahl der Messungen}$$

$$\quad \quad \quad x_i: \text{Messwert}$$

$$\quad \quad \quad \sigma: \text{Standardabweichung}$$

Da von einer Normalverteilung der Messwerte ausgegangen wird, wurde für die Untersuchung der statistischen Signifikanz Substrat-induzierter Ströme der gepaarte *t*-Test für Messungen an derselben Oozyte verwendet. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz zwischen Substrat-induzierten Strömen in *mocks*, hNaDC3- bzw. fNaDC3- oder hNaCT-exprimierenden Oozyten wurde der ungepaarte *t*-Test herangezogen. Zur Unterscheidung zwischen Substrat-induzierten Strömen hNaDC3- und fNaDC3-exprimierender Oozyten wurde der ANOVA (analysis of variance)-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei einem Signifikanzwert  $p < 0,05$  angenommen.

Die Leitfähigkeit (*g*) wurde nach dem Ohmschen Gesetz berechnet:

$$g = \frac{1}{R} = \frac{I}{U} \quad g: \text{Leitfähigkeit [S]} \quad R: \text{Widerstand [\Omega]}$$

$$\quad \quad \quad I: \text{Stromstärke [A]} \quad U: \text{Spannung [V]}$$

Die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit erfolgte durch die nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten und über die Eadie-Hofstee-Analyse. Bei der Auftragung nach Eadie-Hofstee kann die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) zudem als negative Steigung der Regressionsgeraden und der maximale Substrat-induzierte Strom ( $I_{max}$ ) als Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate direkt abgelesen werden.

Bestimmung nach Michaelis-Menten:

$$I = I_{max} \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

*I*: gemessener Substrat-induzierter Strom (nA)  
*I<sub>max</sub>*: maximaler Substrat-induzierter Strom (nA)  
*[S]*: Substrat-Konzentration (μM bzw. mM)  
*K<sub>m</sub>*: Michaelis-Menten-Konstante (μM bzw. mM)

Bestimmung nach Eadie-Hofstee:

$$I = -K_m \times \frac{I}{[S]} + I_{max}$$

*I*... gemessener substrat-induzierter Strom (nA)  
*K<sub>m</sub>*... Michaelis-Menten-Konstante (μM bzw. mM)  
*[S]*... Substrat-Konzentration (μM bzw. mM)  
*I<sub>max</sub>*... maximaler substrat-induzierter Strom (nA)

## 2.6 Verwendete Software

**Tab. 2.7** listet die benutzte Software zur Erstellung, Bearbeitung und Darstellung der Ergebnisse auf.

**Tab. 2.7** Verwendete Software

Software	Name	Hersteller
Abbildungsbearbeitung	Microsoft Paint	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
	Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Abbildungserstellung	Adobe Illustrator	Adobe Systems Inc. (San José, CA, USA)
Grafische Datenanalyse	SigmaPlot	Systat Software Inc. (San José, CA, USA)
Strukturformelerstellung	Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Textverarbeitung	Microsoft Word	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)

### 3 Ergebnisse

Zur Klärung der Fragestellung, ob *N*-Carbamylglutamat (NCG) über den natriumabhängigen Dicarboxylat-Transporter NaDC3 und den natriumabhängigen Citrat-Transporter NaCT transportiert wird, wurde die NCG-Interaktion jeweils einzeln für jeden Transporter untersucht. Dabei wurde dem menschlichen NaDC3-Transporter (hNaDC3) teilweise der NaDC3 der Winterflunder (fNaDC3) gegenübergestellt, da der fNaDC3 Substrat-abhängige Ströme größerer Amplitude generiert. Als Kontrolle (*mocks*) dienten Oozyten von *Xenopus laevis*, denen im Gegensatz zur Transporter-spezifischen RNA *Aqua dest.* injiziert worden war. Eine Aufstellung der verwendeten Oozyten und Spendertiere gibt **Tab. 3.1**.

Zwischen den einzelnen Substratgaben wurden die Oozyten für mindestens 10 Minuten mit Oozyten-Ringer-Lösung (ORi; siehe **Tab. 2.4**) umspült. Nach dieser Zeit hatte sich der vor der Substratgabe vorliegende Haltestrom wieder eingestellt.

**Tab. 3.1** Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere

	hNaDC3	fNaDC3	hNaCT	<i>mock</i>
Oozyten	51	7	6	27
Spendertiere	18	5	6	22

#### **3.1 Ergebnisse der Versuche an NaDC3-exprimierenden Oozyten**

Zur Ermittlung eines möglichen Transportvorganges von NCG über den NaDC3 wurden die NCG-abhängigen Ströme denen von Succinat, dem Referenzsubstrat des NaDC3, *N*-Acetylglutamat (NAG), dem natürlichen Aktivator der Carbamoylphosphat-Synthetase I (CPS1) und Glutamat gegenübergestellt. Bei einem Klemmpotential von -60 mV wurden die verschiedenen Derivate in einer Konzentration von 5 mM den NaDC3-exprimierenden Oozyten angeboten.

Da der Transport über den NaDC3 natriumabhängig und elektrogen ist, wurde der NCG-vermittelte Strom zudem in Abwesenheit von Natrium gemessen und über Strom-Spannungskennlinien dessen Potentialabhängigkeit eruiert.

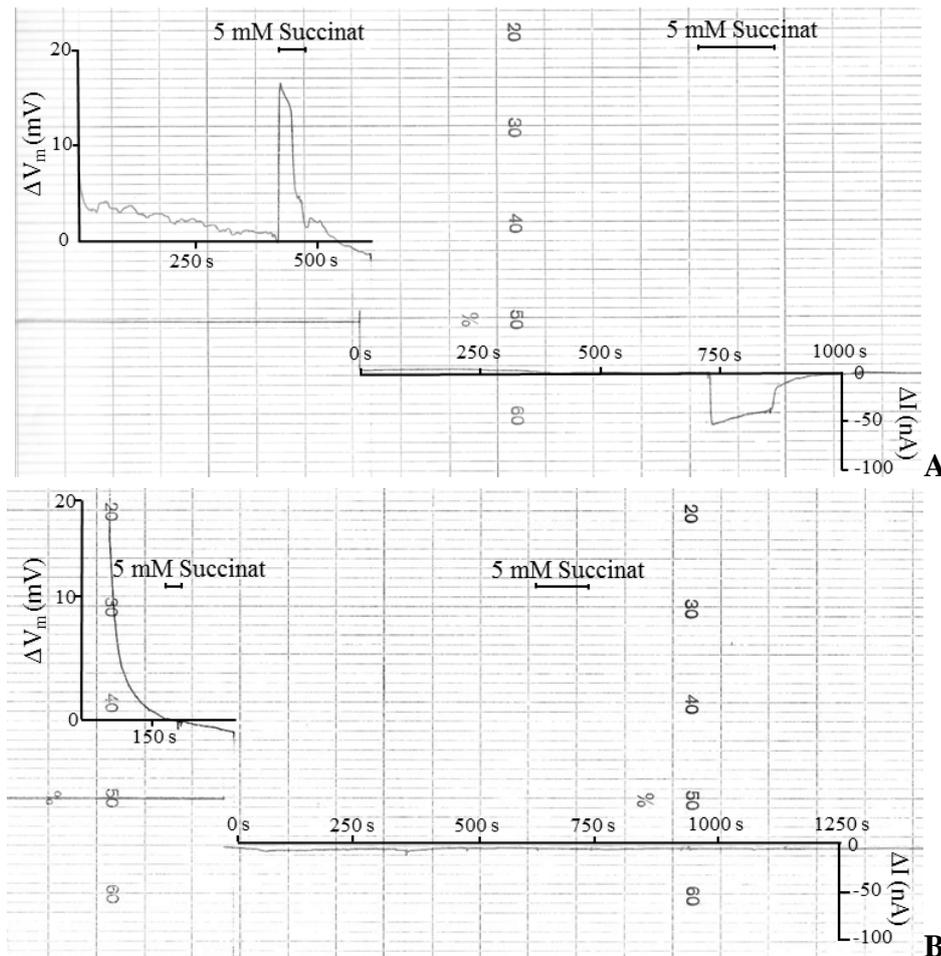
Zur Spezifizierung der NCG-vermittelten Einwärtsströme wurden die Konzentrationsabhängigkeiten dieser Ströme mit Ermittlung der Halbsättigungskonstante ( $K_m$ ) und des maximalen Stromes ( $I_{max}$ ) und die Additivität NCG-induzierter Ströme bei einer Konzentration unterhalb des  $K_m$ -Wertes untersucht.

### 3.1.1 Nachweis einer funktionellen Expression des NaDC3

Zur Überprüfung einer funktionellen Expression des NaDC3 in den Oozyten wurden zu Beginn einer jeden Messreihe im *Current-Clamp*-Modus die NaDC3-exprimierenden Oozyten mit ORi in Ab- und Anwesenheit von 5 mM Succinat umspült. Bei erfolgreicher Expression konnte - nach Einstellen auf ein stabiles Ruhemembranpotential - eine Depolarisation in Anwesenheit von 5 mM Succinat nachgewiesen werden. Anschließend wurde die Oozyte im *Voltage-Clamp*-Modus auf die Spannung von -60 mV geklemmt. Die Applikation von Succinat führte zu einem Einwärtsstrom, der nur so lange anhielt, wie sich Succinat in der Perfusionslösung befand. Zur Kontrolle wurden identische Messungen an *mocks* durchgeführt. Bei diesen konnten im *Current-Clamp*-Modus keine Depolarisationen und im *Voltage-Clamp*-Modus keine Einwärtsströme nachgewiesen werden.

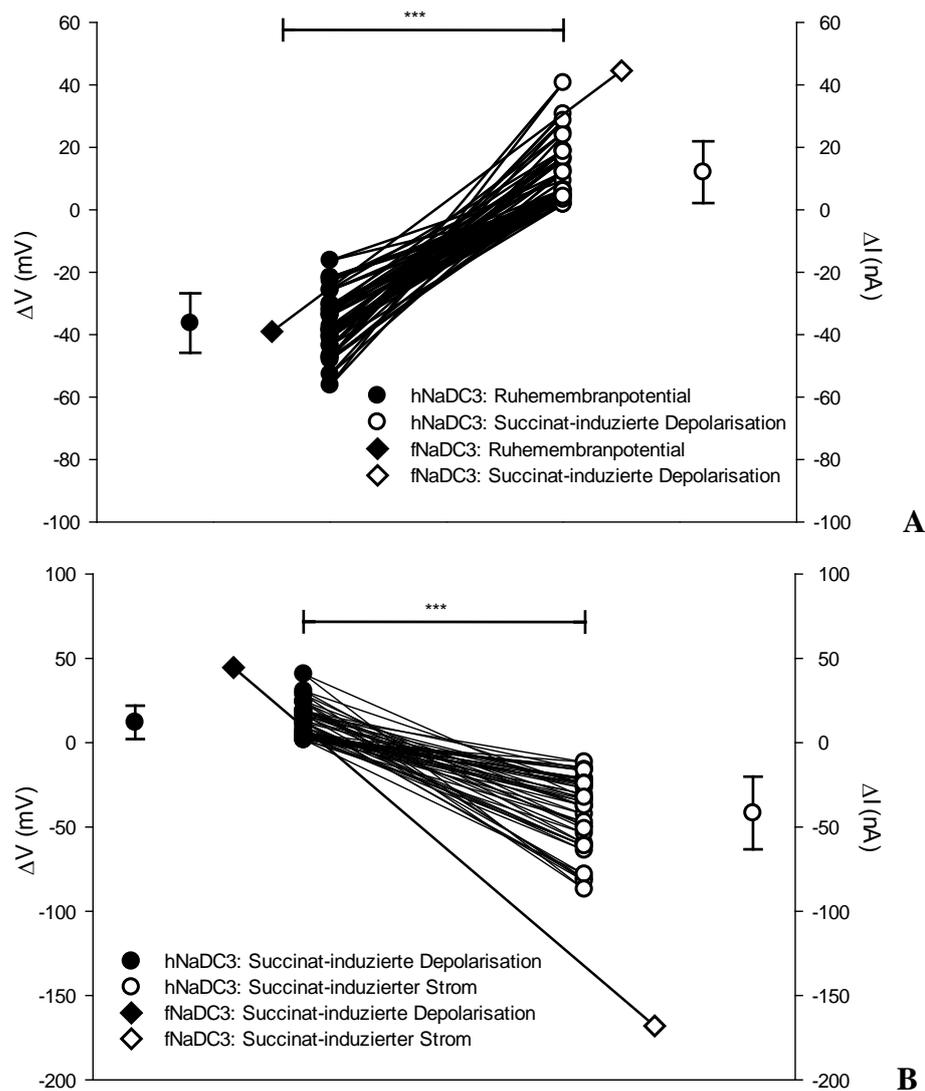
**Abb. 3.1** zeigt exemplarisch die Originalregistrierung einer hNaDC3-exprimierenden Oozyte und der als Kontrolle dienenden *mock*.

Bei Gegenüberstellung des Ruhemembranpotentials und der Succinat-induzierten Depolarisation in **Abb. 3.2.A** konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe des Ruhemembranpotentials und der Höhe der Depolarisation der NaDC3-exprimierenden Oozyten festgestellt werden. Dagegen zeigte sich eine Korrelation zwischen der Succinat-vermittelten Depolarisation und der Höhe des induzierten Einwärtsstromes (siehe **Abb. 3.2.B**). Je höher die Depolarisation bei Gabe von 5 mM Succinat ausfiel, umso höher war der entsprechend registrierte Einwärtsstrom. Dies konnte sowohl für hNaDC3- als auch für fNaDC3-exprimierende Oozyten gezeigt werden. Für hNaDC3-exprimierende Oozyten wurde nach Applikation von 5 mM Succinat, gelöst in ORi, eine Depolarisation von  $12,05 \pm 9,89$  mV und ein Einwärtsstrom von  $-41,68 \pm 21,53$  nA bei -60 mV gemessen (30 Oozyten, 18 Spendertiere). In einem Einzelerperiment wurden ähnliche Ergebnisse auch für den fNaDC3 beobachtet: 5 mM Succinat depolarisierte die Oozyte um 44,6 mV, das entsprach einem Einwärtsstrom von -168 nA bei -60 mV.



**Abb. 3.1** Gegenüberstellung der Originalregistrierungen im *Current-Clamp*- (linke Spur) und *Voltage-Clamp*-Modus (rechte Spur) von hNaDC3 (A) und *mock* (B) bei Perfusion mit 5 mM Succinat

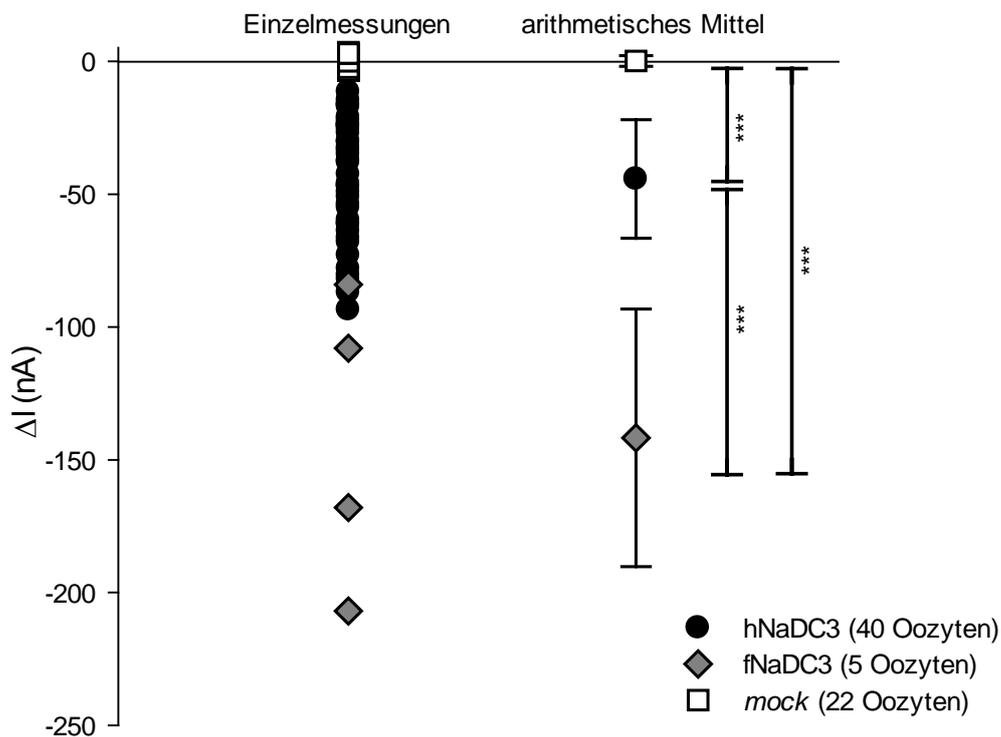
- A) hNaDC3:** Nach dem Einstechen der Mikroelektroden wurde im *Current-Clamp*-Modus (linke Spur) nach ca. 410 Sekunden ein Ruhemembranpotential von -32 mV registriert. Bei der Perfusion mit 5 mM Succinat kam es zu einer initialen Depolarisation ( $\Delta V$ ) um 16,5 mV, der eine langsamere Repolarisation folgte. Nach Wegnahme des Succinats erfolgte eine Repolarisation auf das Ruhemembranpotential. Nachdem sich bei einem Klemmpotential von -60 mV der einzuspeisende Strom auf -59 nA unter ORi-Perfusion eingestellt hatte (rechte Spur), wurde bei Perfusion von 5 mM Succinat, gelöst in ORi, ein initialer Einwärtsstrom ( $\Delta I$ ) von -53 nA beobachtet. Der Einwärtsstrom klang während der Succinat-Gabe langsam ab und erreichte eine Plateauphase. Bei Beendigung der Succinat-Zufuhr wurde nach wenigen Sekunden wieder der Ausgangsstrom erreicht, der vor dem Perfusionswechsel auf Succinat vorlag.
- B) mock:** Im *Current-Clamp*-Modus (linke Spur) kam es bei Perfusion mit 5 mM Succinat zu keiner Depolarisation. Nachdem sich der eingespeiste Strom im *Voltage-Clamp*-Modus (rechte Spur) auf -53 nA unter ORi-Perfusion eingestellt hatte, kam es bei Gabe von 5 mM Succinat zu keiner Stromveränderung ( $\Delta I$ ).



**Abb. 3.2** Gegenüberstellung des Ruhemembranpotentials und der Succinat-vermittelten Depolarisation (A) bzw. der Succinat-vermittelten Depolarisation und der Succinat-vermittelten Ströme bei -60 mV (B)

- A) Vergleich des Ruhemembranpotentials und der Succinat-vermittelten Depolarisation:** Die an 30 Oozyten von 18 Spendertieren gemessenen Ruhemembranpotentiale hNaDC3-exprimierender Oozyten lagen bei  $-36,28 \pm 9,57$  mV mit einer Schwankungsbreite von ca. 40 mV. Für die Substrat-induzierten Depolarisationen ergab sich ein arithmetisches Mittel von  $12,05 \pm 9,89$  mV bei einer Spannweite von 39 mV. An der fNaDC3-exprimierenden Oozyte wurde ein Ruhemembranpotential von -39 mV und eine Succinat-induzierte Depolarisation von 44,6 mV gemessen.
- B) Vergleich der Succinat-vermittelten Depolarisation und der Succinat-vermittelten Ströme bei -60 mV:** Die Succinat-induzierten Ströme des hNaDC3 zeigten Werte von -11,5 bis -87 nA bei einem Mittelwert von  $-41,68 \pm 21,53$  nA. Der Succinat-vermittelte Strom des fNaDC3 betrug -168 nA.

In **Abb. 3.3** sind alle Einzelmessungen der Succinat-induzierten Ströme hNaDC3-, fNaDC3-exprimierender Oozyten und der *mocks* gegeneinander aufgetragen. Bei den arithmetischen Mittelwerten zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Succinat-induzierten Strömen hNaDC3-exprimierender ( $-44,24 \pm 22,32$  nA) und fNaDC3-exprimierender Oozyten ( $-141,75 \pm 48,53$  nA) sowie jeweils zwischen hNaDC3 und *mock* ( $0,15 \pm 2,00$  nA) und fNaDC3 und *mock*.



**Abb. 3.3** Gegenüberstellung der Einzelmessungen und des arithmetischen Mittels Succinat-vermittelter Ströme (5 mM) von hNaDC3, fNaDC3 und *mock* bei -60 mV

\*\*\*  $p < 0,001$

**hNaDC3:** Die Einzelmessungen (40 Oozyten bei 18 Spendertieren) schwankten zwischen -11,5 und -93,5 nA bei einem Mittelwert von  $-44,24 \pm 22,32$  nA.

**fNaDC3:** Die Einzelmessungen (4 Oozyten bei 3 Spendertieren) schwankten zwischen -84 und -207 nA bei einem Mittelwert von  $-141,75 \pm 48,53$  nA.

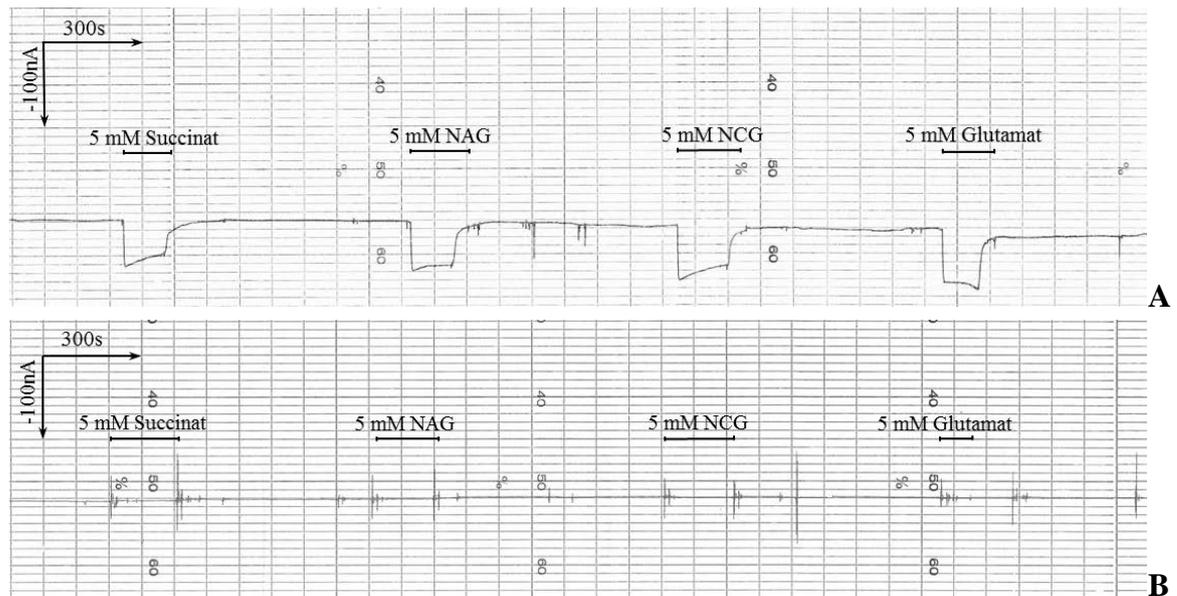
**mock:** Das arithmetische Mittel der Einzelmessungen (22 Oozyten bei 18 Spendertieren) lag bei  $0,15 \pm 2,00$  nA.

### 3.1.2 Gegenüberstellung der Substrat-vermittelten Ströme

Da nicht bekannt war, ob und mit welcher Affinität NAG und NCG über den NaDC3 transportiert werden, wurden alle Testsubstanzen (Succinat als Kontrolle, NAG, NCG und Glutamat) in einer Konzentration von 5 mM angeboten, um ausreichende Stromamplituden nachweisen zu können. Bei einem Klemmpotential von -60 mV kam es bei Oozyten mit exprimierten NaDC3-Transportern zu deutlichen Substrat-abhängigen Einwärtsströmen. Dabei waren die Antworten bei allen Substraten ungefähr gleich groß. Im Vergleich dazu führte bei den Kontroll-Oozyten (*mocks*) die Substratzugabe zu keiner nennenswerten Stromveränderung. Um auszuschließen, dass die Abfolge der Substrat-Gaben einen Einfluss auf die Stromantwort hatte, wurde die Reihenfolge zwischen den Versuchen variiert.

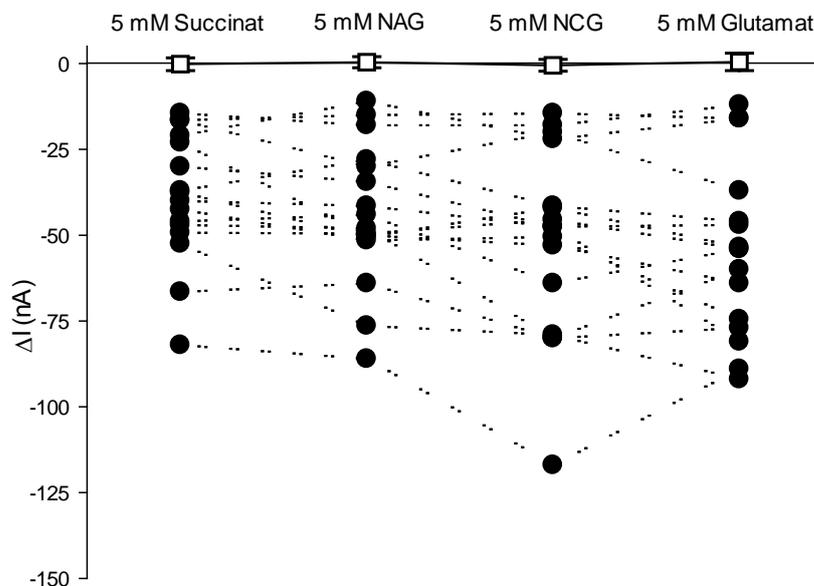
Während **Abb. 3.4** exemplarisch die Originalregistrierung von aufeinanderfolgenden Gaben von Succinat, NAG, NCG und Glutamat an einer hNaDC3-exprimierenden Oozyte und einer *mock* zeigt, sind in **Abb. 3.5** die Einzelmessungen dem arithmetischen Mittel in *mocks* gegenübergestellt.

Bei Auftragung der arithmetischen Mittel Substrat-vermittelter Ströme von hNaDC3-exprimierenden Oozyten (siehe **Abb. 3.6.A**) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem Succinat- ( $-38,86 \pm 18,20$  nA) und dem NAG-induzierten Strom ( $-43,62 \pm 20,23$  nA), sowie dem von Succinat und dem von NCG vermittelten Strom ( $-51,38 \pm 6,74$  nA) und dem von Succinat und von Glutamat induzierten Strom ( $-54,56 \pm 24,41$ ) beobachtet. Zudem zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Glutamat- und NCG- bzw. NAG-vermittelten Strömen. Bei Vergleich der normierten Ströme, d. h. die NAG-, NCG- und Glutamat-vermittelten Ströme wurden ins Verhältnis zu den von Succinat vermittelten Strömen gesetzt (siehe **Abb. 3.6.B**), konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den normierten Succinat-induzierten Strömen und den normierten NCG- bzw. Glutamat-induzierten Strömen und zwischen den Glutamat- und NAG-normierten Strömen festgestellt werden.



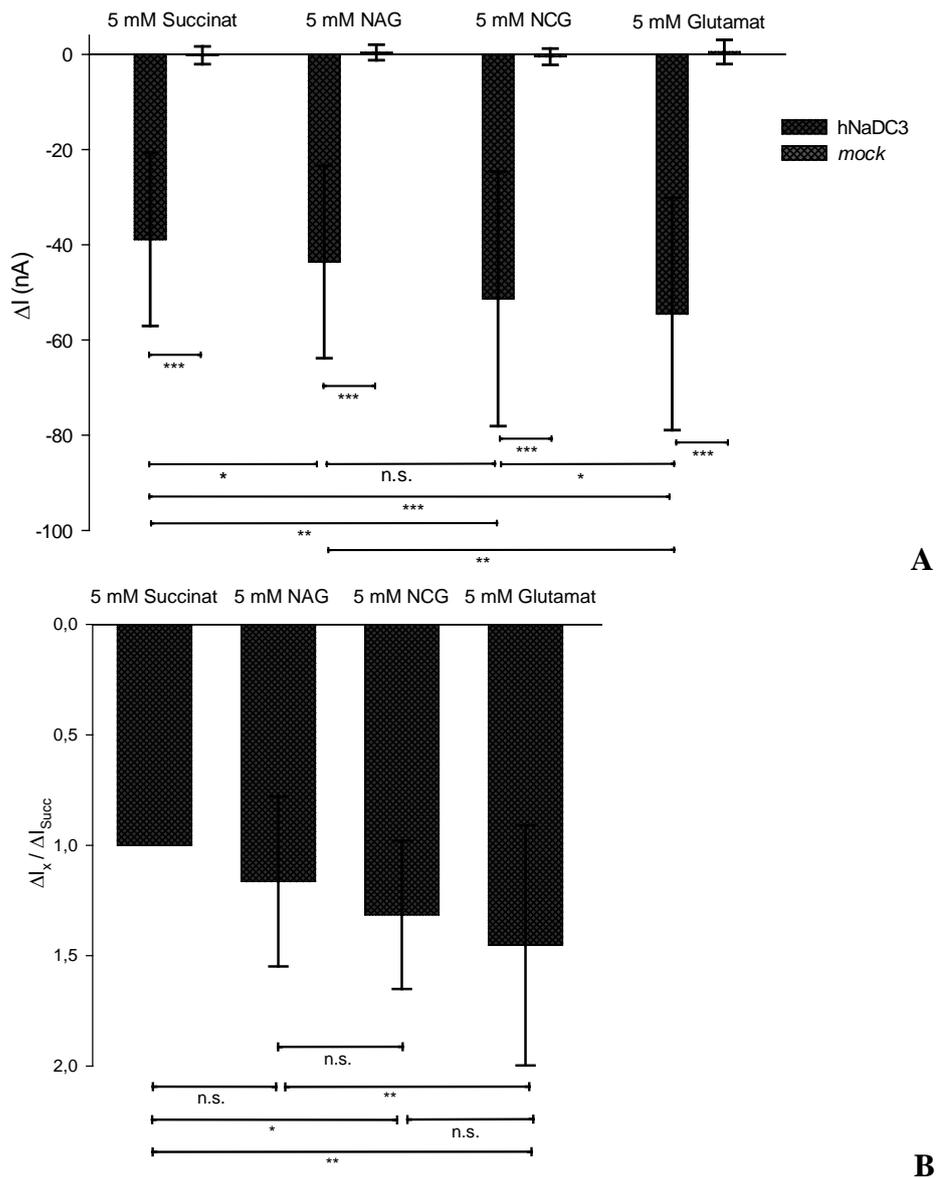
**Abb. 3.4** Originalregistrierungen induzierter Ströme von 5 mM Succinat, 5 mM NAG, 5 mM NCG und 5 mM Glutamat von hNaDC3 (A) und *mock* (B)

- A) hNaDC3:** Bei Zugabe von 5 mM Succinat zeigte sich initial ein induzierter Einwärtsstrom von -53 nA, bei 5 mM NAG von -58 nA, bei 5 mM NCG von -62 nA und bei Zugabe von 5 mM Glutamat von -61 nA.
- B) *mock*:** Die Zugabe von 5 mM Succinat, 5 mM NAG, 5 mM NCG oder 5 mM Glutamat induzierte nur marginale Stromänderungen.



**Abb. 3.5** Gegenüberstellung induzierter Ströme von je 5 mM Succinat, NAG, NCG und Glutamat bei hNaDC3 und *mock*

Die Substrate wurden in permutierender Reihenfolge appliziert. Für den hNaDC3 wurden 16 Einzelmessungen (●) und für den *mock* das arithmetische Mittel von 15 Einzelmessungen (□) aufgetragen.



**Abb. 3.6** Gegenüberstellung der Mittelwerte der induzierten Einwärtsströme (A) bzw. der Succinat-normierten Ströme (B) von je 5 mM Succinat, NAG, NCG und Glutamat von hNaDC3 und mock

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.s. nicht signifikant. Die Messungen erfolgten an 16 hNaDC3-exprimierenden Oozyten und 15 mocks von 12 bzw. 14 Spendertieren.

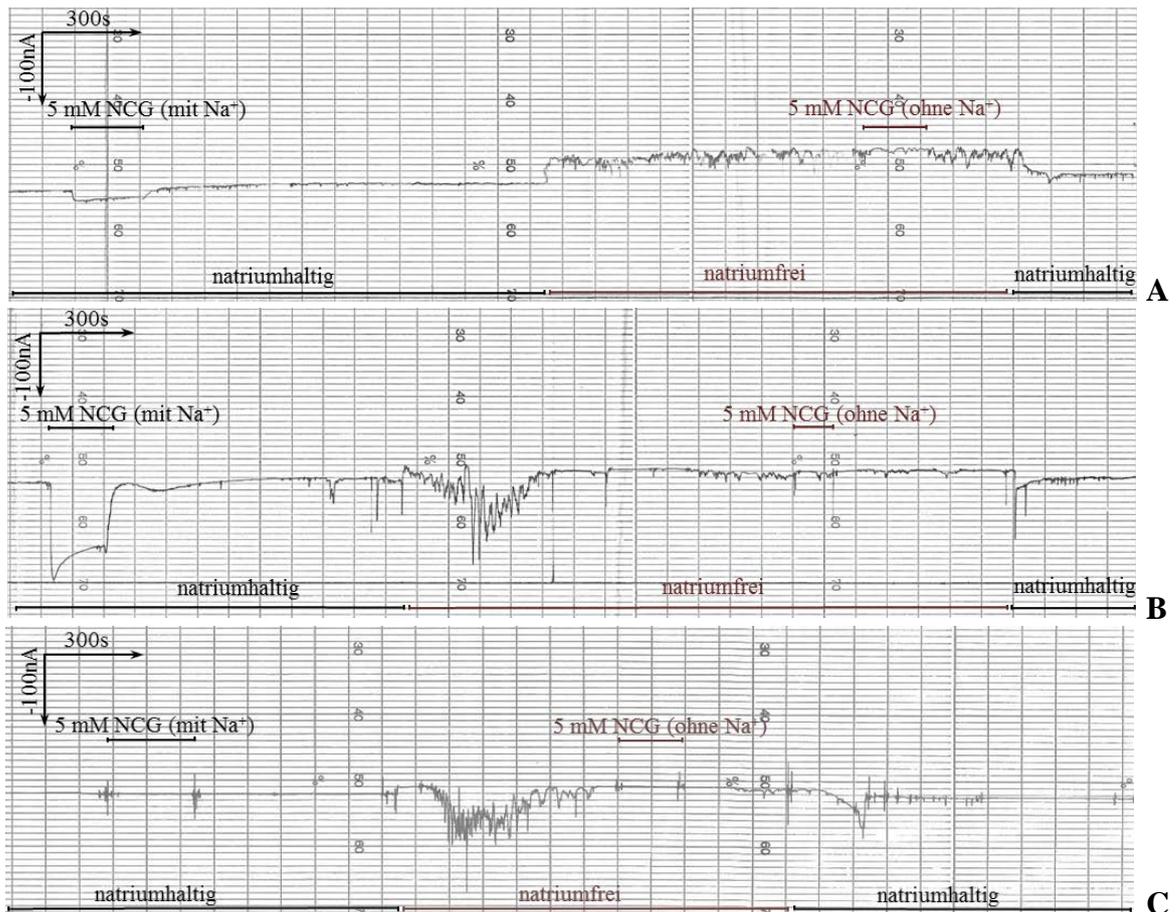
- A)** Gegenüberstellung der arithmetischen Mittel: Beim hNaDC3 wurden folgende Einwärtsströme ermittelt:  $-38,86 \pm 18,20$  nA für 5 mM Succinat,  $-43,62 \pm 20,23$  nA für 5 mM NAG,  $-51,38 \pm 26,74$  nA für 5 mM NCG und  $-54,56 \pm 24,41$  nA für 5 mM Glutamat. Beim mock induzierten 5 mM Succinat, 5 mM NAG, 5 mM NCG und 5 mM Glutamat Stromamplituden  $< 1$  nA.
- B)** Gegenüberstellung der Succinat-normierten Ströme (Substrat-induzierter Strom ( $\Delta I_x$ )/ Succinat-induzierter Strom ( $\Delta I_{Succ}$ )): Es ergeben sich folgende normierte Ströme:  $1,16 \pm 0,39$  für NAG,  $1,31 \pm 0,34$  für NCG und  $1,45 \pm 0,54$  für Glutamat.

### 3.1.3 Natriumabhängigkeit NCG-vermittelter Ströme

Um zu klären, ob die NCG-vermittelten Ströme natriumabhängig sind, wurde Natrium durch äquimolare Mengen an *N*-Methyl-*D*-Glucamin (NMDG) ersetzt (siehe **Tab. 2.4**).

**Abb. 3.7** zeigt die Originalregistrierungen der durch 5 mM NCG induzierten Ströme bei einem Klemmpotential von -60 mV in An- und Abwesenheit von Natrium. In Anwesenheit von Natrium werden sowohl bei hNaDC3- als auch bei fNaDC3-exprimierenden Oozyten bei Gabe von 5 mM NCG Einwärtsströme detektiert, die unter natriumfreien Bedingungen nicht mehr nachweisbar sind. Der Perfusionswechsel von natriumhaltigen zu natriumfreien Medium führt zu einem Auswärtsstrom. Die natriumfreie Umgebung ging häufig mit Stromfluktuationen einher.

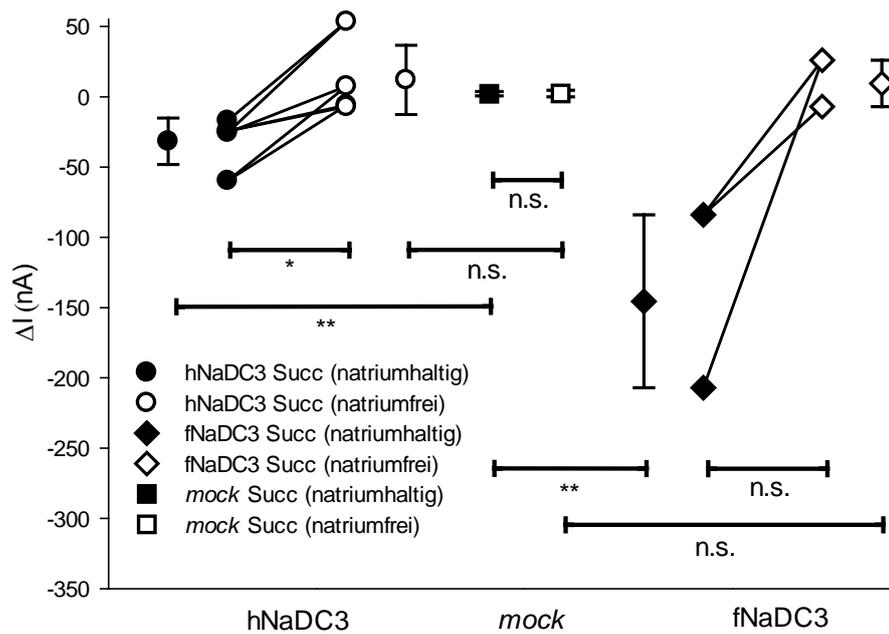
In **Abb. 3.8** und **Abb. 3.9** sind die Unterschiede zwischen Succinat- bzw. NCG-vermittelten Strömen in natriumhaltiger bzw. natriumfreier Umgebung bei hNaDC3-, fNaDC3-Oozyten und *mocks* graphisch dargestellt. Es zeigte sich bei den hNaDC3-exprimierenden Oozyten ein signifikanter Unterschied zwischen den Succinat- bzw. NCG-vermittelten Strömen in natriumhaltiger und natriumfreier Umgebung mit  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ . Im Vergleich dazu konnte bei den *mocks* kein signifikanter Unterschied zwischen den Substrat-induzierten Strömen in natriumhaltiger und natriumfreier Umgebung festgestellt werden.



**Abb. 3.7** Originalregistrierungen zur Natriumabhängigkeit NCG-induzierter Ströme (5 mM) von hNaDC3, fNaDC3 und mock

Gezeigt wird ein charakteristisches Experiment aus einem Kontingent von 4 hNaDC3-exprimierenden Oozyten, einer fNaDC3-exprimierenden Oozyte und 3 mocks von 4, einem bzw. 3 verschiedenen Spendertieren.

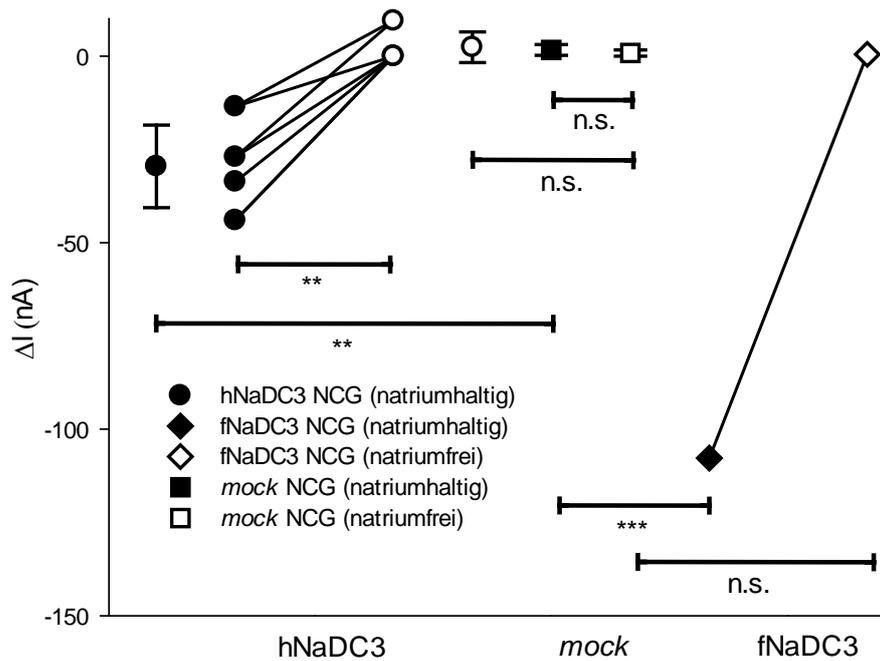
- A) hNaDC3:** In Anwesenheit von Natrium wurde initial ein NCG-induzierter Strom (5 mM NCG) von  $-16$  nA registriert, der unter natriumfreien Bedingungen zum Erliegen kam. Bei Umstellung von natriumhaltiger auf natriumfreie ORi wurde ein Auswärtsstrom von  $38$  nA registriert.
- B) fNaDC3:** In natriumhaltiger ORi wurde nach Zugabe von 5 mM NCG ein initialer Einwärtsstrom von  $-156$  nA gemessen, der unter natriumfreien Bedingungen nicht mehr nachweisbar war. Die Oozyten tolerierten eine natriumfreie Umgebung nur unzureichend, deshalb kam es nach Umstellung auf natriumfreie Perfusionslösung oft zu Stromfluktuationen, die im mittleren Abschnitt der Abbildung zu sehen sind.
- C) mock:** Sowohl unter natriumhaltigen als auch natriumfreien Bedingungen waren keine NCG-abhängigen Ströme (5 mM) nachweisbar.



**Abb. 3.8** Einzelmessungen und arithmetisches Mittel Succinat-vermittelter Ströme (5 mM) in An- und Abwesenheit von Natrium beim hNaDC3, fNaDC3 und mock

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; n.s. nicht signifikant. Die Messungen wurden an 3 mocks, 4 hNaDC3- und 2 fNaDC3-exprimierenden Oozyten von jeweils 3, 3 bzw. 2 Spendertieren durchgeführt.

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied bei 5 mM Succinat-vermittelten Strömen zwischen natriumhaltigem (-31,66 ± 16,55 nA) und natriumfreiem Milieu (12 ± 24,63 nA) in hNaDC3-exprimierenden Oozyten ( $p < 0,05$ ) und in natriumhaltigem Milieu zwischen hNaDC3 und mock (2,17 ± 1,55 nA;  $p < 0,01$ ) bzw. zwischen fNaDC3 (-145,50 ± 61,50 nA) und mock ( $p < 0,01$ ). Dagegen existierte in natriumfreier Umgebung kein signifikanter Unterschied zwischen hNaDC3 und mock (2,33 ± 2,36 nA) und fNaDC3 (9,50 ± 16,50 nA) und mock. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied Succinat-induzierter Ströme beim fNaDC3 und mock zwischen natriumhaltigem und natriumfreiem Milieu.



**Abb. 3.9** Einzelmessungen und arithmetisches Mittel NCG-vermittelter Ströme (5 mM) in An- und Abwesenheit von Natrium beim hNaDC3, fNaDC3 und *mock*

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.s. nicht signifikant. Die Messungen wurden an 3 *mocks*, 4 hNaDC3-exprimierenden Oozyten und einer fNaDC3-exprimierenden Oozyte von 3, 4 bzw. einem Tier/en durchgeführt.

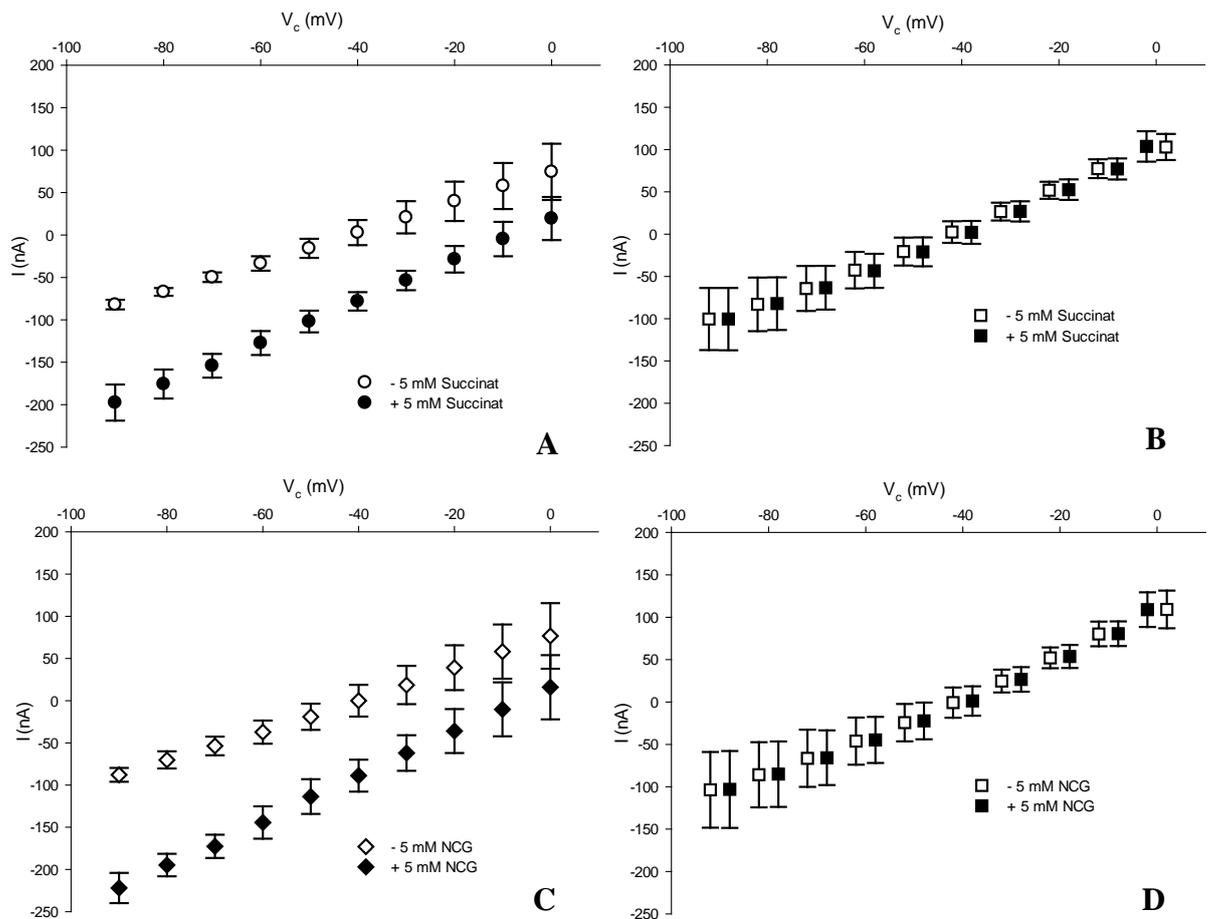
Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied NCG-vermittelter Ströme (5 mM) zwischen natriumhaltiger ( $-29,54 \pm 11,07$  nA) und natriumfreier ORi ( $2,37 \pm 4,11$  nA) in hNaDC3-exprimierenden Oozyten ( $p < 0,01$ ). Während in Anwesenheit von Natrium ein signifikanter Unterschied zwischen hNaDC3 und *mock* ( $1,67 \pm 1,43$  nA;  $p < 0,01$ ) bzw. zwischen fNaDC3 ( $-107,75$  nA) und *mock* ( $p < 0,001$ ) bestand, war der Unterschied in natriumfreien Milieu zwischen hNaDC3 und *mock* ( $0,83 \pm 0,85$  nA) bzw. fNaDC3 ( $0,50$  nA) und *mock* nicht signifikant. Es zeigte sich zudem kein signifikanter Unterschied beim *mock* zwischen NCG-induzierten Strömen in natriumhaltiger und natriumfreier Umgebung.

### 3.1.4 Potentialabhängigkeit NCG-vermittelter Ströme

Zum Nachweis der Potentialabhängigkeit wurden Potentiale von 0 bis -90 mV in 10 mV-Schritten für jeweils 5 Sekunden angelegt und Messungen in Abwesenheit und Anwesenheit der Substrate Succinat (5 mM) und NCG (5 mM) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden dann in Form von Strom-Spannungs (I/V)-Kennlinien aufgetragen. **Abb. 3.10** zeigt diese für hNaDC3-exprimierende Oozyten (**Abb. 3.10.A** und **Abb. 3.10.C**) und *mocks* (**Abb. 3.10.B** und **Abb. 3.10.D**). Aus den I/V-Kennlinien kann für hNaDC3-exprimierende Oozyten in Abwesenheit von Succinat ein Nullstrompotential von  $-40,21 \pm 8,80$  mV berechnet werden. Dieses verschiebt sich bei Applikation von Succinat (5 mM) signifikant ( $p < 0,01$ ) auf  $-5,93 \pm 10,17$  mV. Für NCG (5 mM) lässt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen dem Nullstrompotential in Abwesenheit ( $-38,63 \pm 9,49$  mV) und dem in Anwesenheit von NCG ( $-3,48 \pm 14,10$  mV) ermitteln. In *mocks* ergeben sich dagegen in Ab- und Anwesenheit von Succinat und NCG Nullstrompotentiale von  $-43,98 \pm 0,18$  mV.

Zur Ermittlung der Substrat-vermittelten I/V-Kennlinien wurden die Ströme in Anwesenheit der Substrate von denen in Abwesenheit subtrahiert (siehe **Abb. 3.11**). Die Amplitude dieser Succinat- bzw. NCG-Differenzströme hNaDC3-exprimierender Oozyten nimmt bei Hyperpolarisation zu, bei Depolarisation dagegen ab. Das Umkehrpotential liegt für 5 mM Succinat bei 81,20 mV und für 5 mM NCG bei 70,75 mV. Die *mocks* zeigten keine potentialabhängigen Differenzströme.

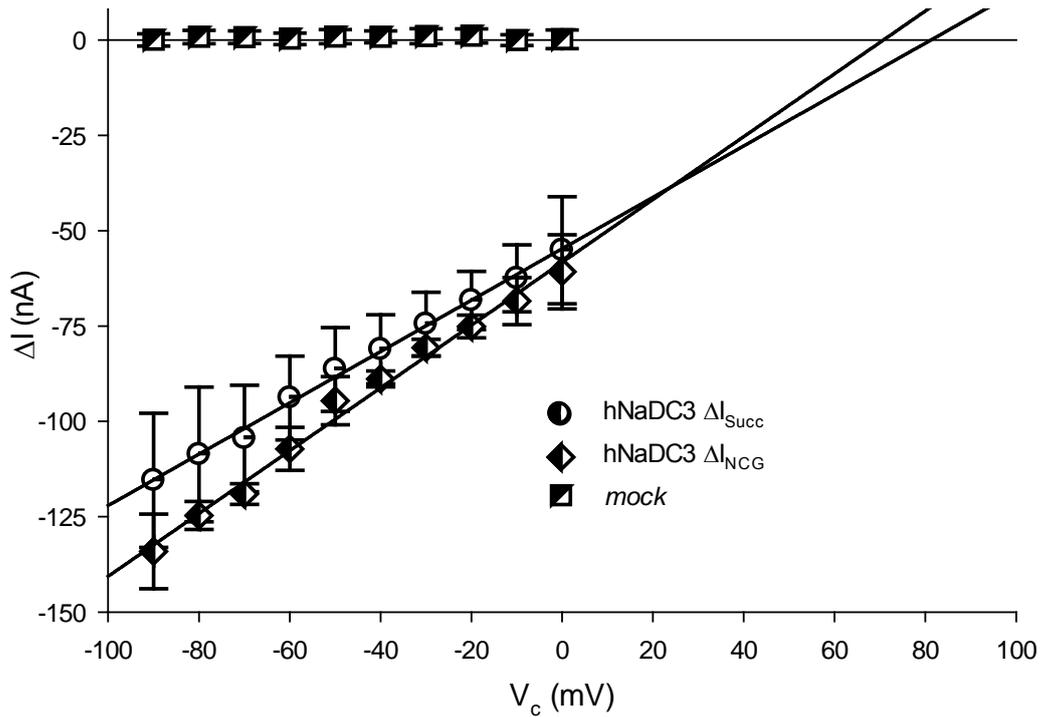
In **Abb. 3.12** sind die Leitfähigkeiten ( $g$ ) in Ab- und Anwesenheit von Succinat und NCG aufgetragen (zur Berechnung siehe **2.5**). Bei hNaDC3-exprimierenden Oozyten stiegen bei Applikation der Substrate die Leitfähigkeiten im Bereich von -90 mV bis -40 mV signifikant an. Bei -20 mV und -10 mV waren die Leitfähigkeiten dagegen in Abwesenheit der Substrate höher als bei ihrer Anwesenheit. Im Vergleich dazu zeigte sich bei den *mocks* kein signifikanter Unterschied zwischen den Leitfähigkeiten in Ab- und Anwesenheit der Substrate.



**Abb. 3.10** Strom-Spannungs (I/V)-Kennlinien in Ab- und Anwesenheit von 5 mM Succinat bzw. NCG von hNaDC3 und *mock*

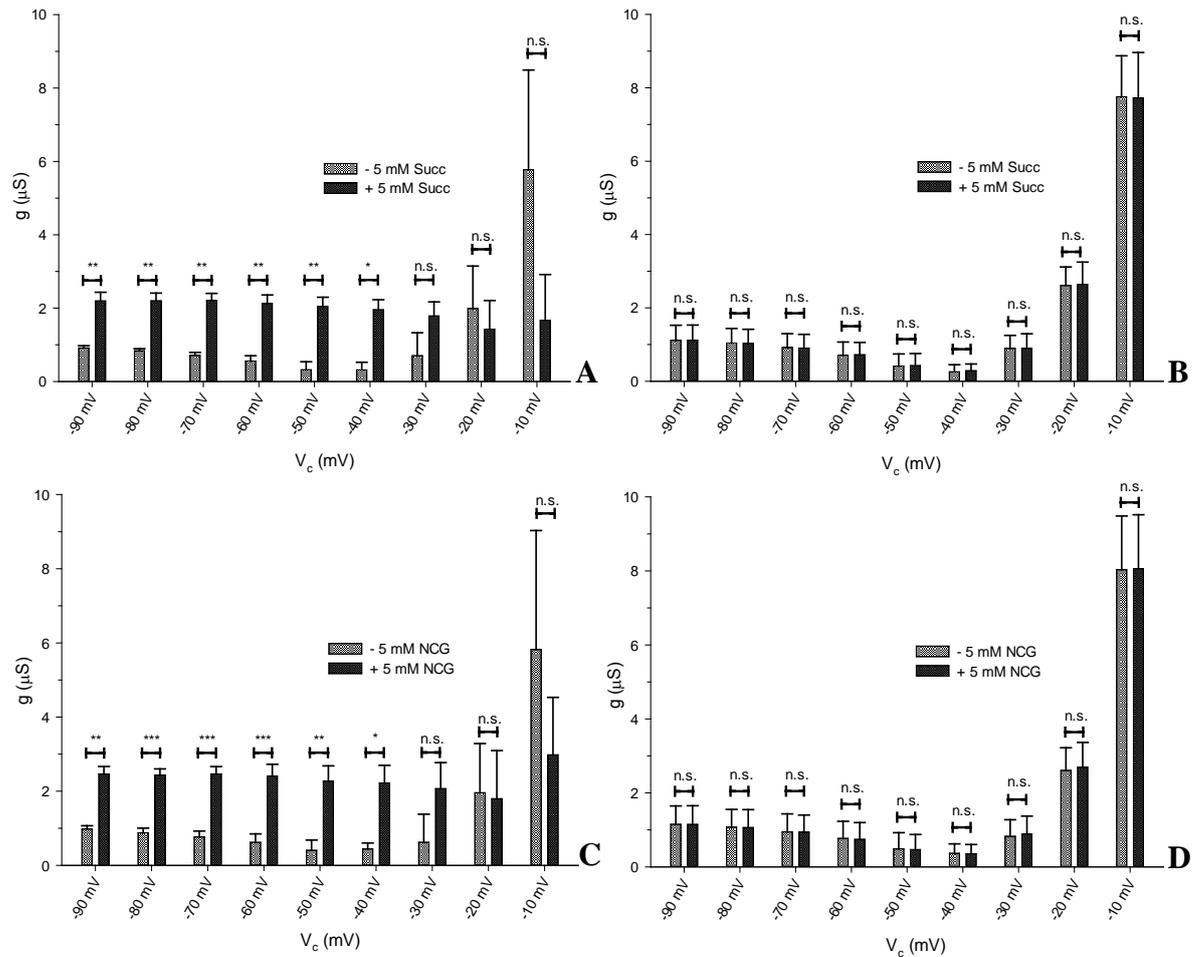
Messungen wurden an 3 hNaDC3-exprimierenden Oozyten und 3 *mocks* von jeweils 3 verschiedenen Tieren durchgeführt.

- A) hNaDC3 +/- Succinat:** In Abwesenheit von 5 mM Succinat ( $\circ$ ) ergaben sich Ströme von  $-82,12 \pm 5,66$  nA bei  $-90$  mV und von  $74,50 \pm 33,15$  nA bei  $0$  mV. In Anwesenheit von Succinat ( $\bullet$ ) verschoben sich die Ströme auf  $-197,58 \pm 21,29$  nA bei  $-90$  mV und auf  $19,42 \pm 25,39$  nA bei  $0$  mV.
- B) *mock* +/- Succinat:** Da die Amplituden der Ströme in Ab- und Anwesenheit von 5 mM Succinat ( $\square/\blacksquare$ ) fast gleich groß waren, wurden sie zur Übersichtlichkeit nebeneinander dargestellt. Es ergaben sich bei  $-90$  mV Ströme von ca.  $-100$  nA in Ab- und Anwesenheit von Succinat, bei  $0$  mV Ströme von ca.  $105$  nA.
- C) hNaDC3 +/- NCG:** In Abwesenheit von 5 mM NCG ( $\diamond$ ) wurden Ströme von  $-87,92 \pm 8,20$  nA bei  $-90$  mV und von  $76,75 \pm 38,82$  nA bei  $0$  mV ermittelt. In Anwesenheit von NCG ( $\blacklozenge$ ) verschoben sich die Ströme auf  $-222,00 \pm 17,95$  nA respektive  $16,00 \pm 38,03$  nA.
- D) *mock* +/- NCG:** Es ergaben sich bei  $-90$  mV Ströme von ca.  $105$  nA in Ab- ( $\square$ ) und Anwesenheit ( $\blacksquare$ ) von 5mM NCG, bei  $0$  mV Ströme von ca.  $110$  nA.



**Abb. 3.11** Strom-Spannungs (I/V)-Kennlinien der Succinat- und NCG-vermittelten Ströme von hNaDC3 und *mock*

Zur Ermittlung der Succinat- bzw. NCG vermittelten Ströme (●/◆) hNaDC3-exprimierender Oozyten wurden die Ströme in An- (●/◆) von denen in Abwesenheit (○/◇) subtrahiert (siehe **Abb. 3.10**). Für die Succinat-vermittelten Ströme des hNaDC3 konnte ein Umkehrpotential von 81,20 mV und für die NCG-vermittelten Ströme eines von 70,75 mV bestimmt werden. Die gleiche Subtraktion (■-□) wurde für die *mocks* durchgeführt (■).



**Abb. 3.12** Leitfähigkeiten als Funktion des Klemmpotentials ( $V_c$ ) in Ab- und Anwesenheit von 5 mM Succinat bzw. NCG von hNaDC3 und *mock*

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.s. nicht signifikant

- A) hNaDC3:** Im Bereich von -90 bis -40 mV stiegen bei Applikation von 5 mM Succinat die Leitfähigkeiten signifikant von  $<1 \mu\text{S}$  auf  $>1,9 \mu\text{S}$ . Bei -20 und -10 mV waren die Leitfähigkeiten in Ab- und Anwesenheit von Succinat nicht signifikant voneinander verschieden.
- B) mock:** Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Leitfähigkeiten in Ab- und denen in Anwesenheit von 5 mM Succinat festgestellt werden.
- C) hNaDC3:** Im Bereich von -90 bis -40 mV stiegen bei Applikation von 5 mM NCG die Leitfähigkeiten signifikant von  $<1 \mu\text{S}$  auf  $>2 \mu\text{S}$  an. Bei -20 und -10 mV waren die Leitfähigkeiten in Abwesenheit von NCG nicht signifikant verschieden von denen in Anwesenheit.
- D) mock:** Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Leitfähigkeiten in Ab- und denen in Anwesenheit von 5 mM NCG festgestellt werden.

### 3.1.5 Konzentrationsabhängigkeit Substrat-vermittelter Ströme

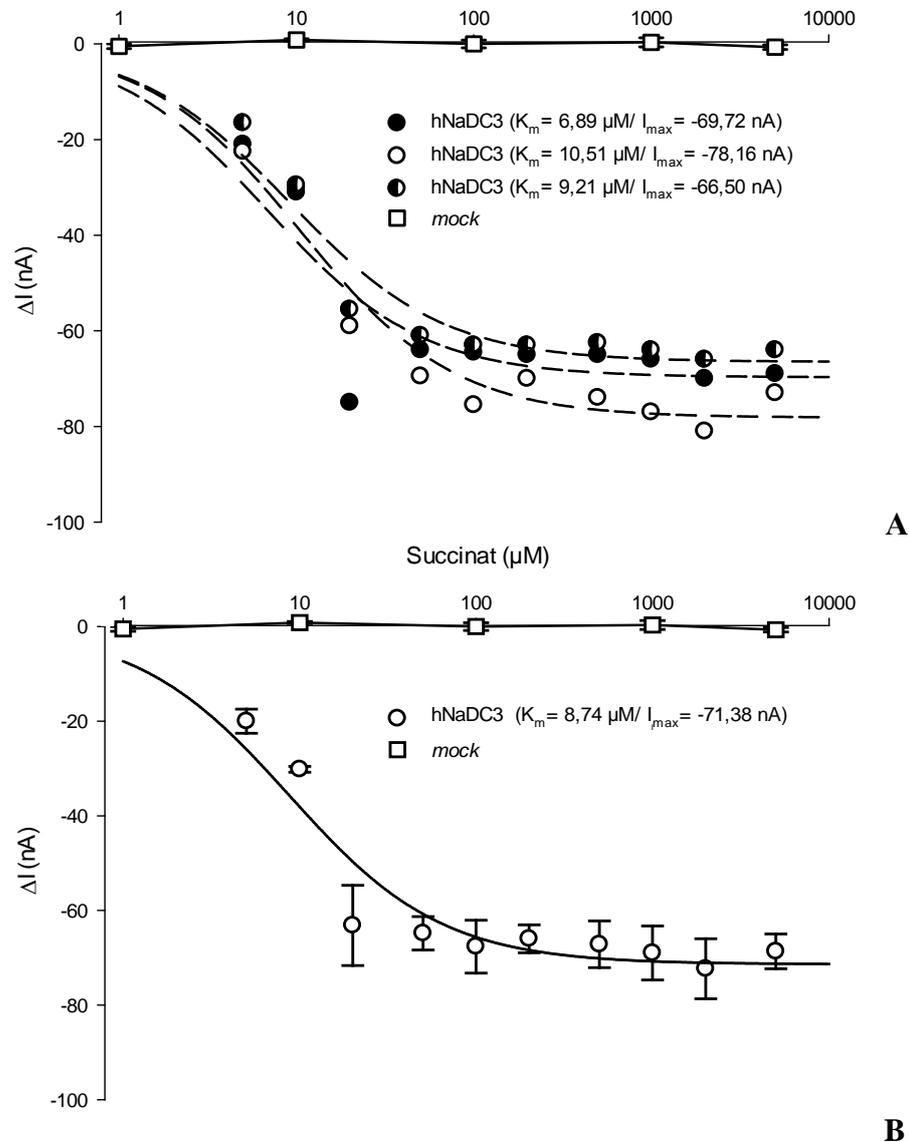
Zur kinetischen Analyse der Substrat-induzierten Ströme wurden Konzentrationen der Substrate Succinat, NCG, NAG von 5 bis 5000  $\mu\text{M}$  (5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000  $\mu\text{M}$ ) und für Glutamat von 50 bis 10.000  $\mu\text{M}$  in aufsteigender Konzentration angeboten. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Perfusionskammer mit ORi für mindestens zehn Minuten gespült. Die Stromwerte für die Konzentrationsreihen wurden 100 s nach Substratzugabe abgelesen. Durch die gewählte Reihenfolge und die immer wieder erfolgten Spülungen mit ORi sollte ein versehentliches Durchmischen von höhermolekularen mit niedermolekularen Substratlösungen verhindert werden. Zur Kontrolle wurden den *mocks* Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 5 mM (1, 10, 100, 1000, 5000  $\mu\text{M}$ ) angeboten. Aus den gemessenen Strömen ( $I$ ) konnten die Halbsättigungskonstanten bzw. Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_m$ ) und der maximale Strom ( $I_{\max}$ ) durch nicht-lineare Regressionsanalyse nach Michaelis-Menten ermittelt werden. Zur Identifikation der Beteiligung multipler Transporter bzw. Bindungsstellen erfolgte zudem die Auftragung nach Eadie-Hofstee.

#### **3.1.5.1 Konzentrationsabhängigkeit der Succinat-vermittelten Ströme**

In **Abb. 3.13** sind die induzierten Ströme in Abhängigkeit von den Succinat-Konzentrationen der hNaDC3-exprimierenden Oozyten und *mocks* aufgetragen. Dabei ist den verschiedenen Einzelmessungen (A) das arithmetische Mittel (B) gegenübergestellt. Es ließ sich nach Michaelis-Menten ein  $K_m$ -Wert von  $8,87 \pm 1,50 \mu\text{M}$  und ein  $I_{\max}$ -Wert von  $-71,46 \pm 4,92 \text{ nA}$  (gemittelt aus den Einzelberechnungen) bzw. von  $8,74 \pm 2,02 \mu\text{M}$  und von  $-71,38 \pm 2,62 \text{ nA}$  (berechnet aus dem arithmetischen Mittel induzierter Ströme) ermitteln. Die *mocks* zeigten dagegen über alle Substrat-Konzentrationen nur geringe Stromveränderungen von  $0,04 \pm 0,85 \text{ nA}$ . In **Abb. 3.14** sind die gemittelten Succinat-induzierten Ströme hNaDC3-exprimierender Oozyten nach Eadie-Hofstee aufgetragen. Es ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen  $\Delta I/\text{Substrat-Konzentration}$  und  $\Delta I$  mit einem Ausreißer. Es lässt sich ein  $K_m$ -Wert von  $11,70 \pm 1,30 \mu\text{M}$  und ein  $I_{\max}$ -Wert von  $-70,69 \pm 1,52 \text{ nA}$  ermitteln.

In **Abb. 3.15** ist die Einzelmessung Succinat-induzierter Ströme in Abhängigkeit von der Succinat-Konzentration einer fNaDC3-exprimierenden Oozyte aufgetragen. Daraus konnte ein  $K_m$ -Wert von  $8,11 \pm 2,55 \mu\text{M}$  und ein  $I_{\max}$ -Wert von  $-171,51 \pm 8,39 \text{ nA}$  nach Michaelis-Menten berechnet werden.

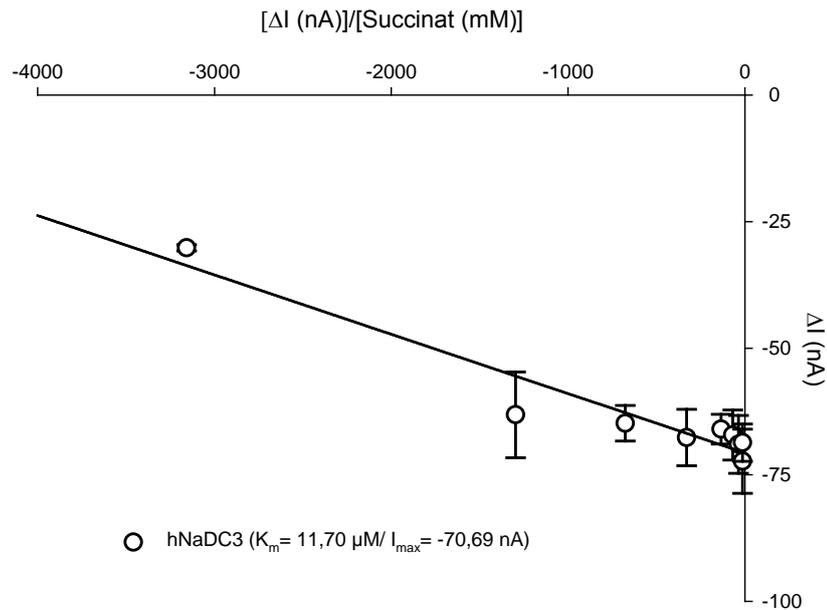
Tab. 3.2 zeigt die ermittelten Werte im Überblick.



**Abb. 3.13** Einzelmessungen (A) und arithmetisches Mittel (B) Succinat-induzierter Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden Succinat-Konzentrationen von hNaDC3 und *mock*. Messungen wurden an 3 hNaDC3-exprimierenden Oozyten und 3 *mocks* von jeweils 3 verschiedenen Spendertieren durchgeführt.

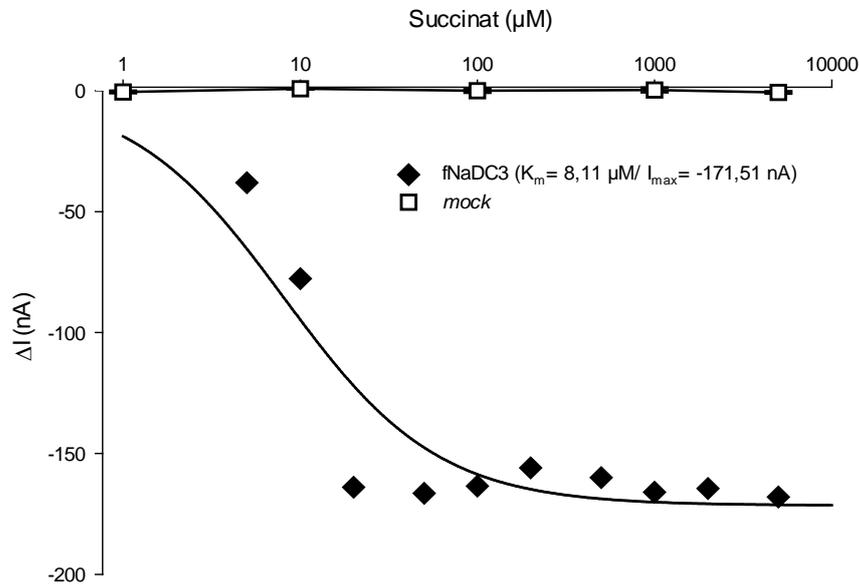
**A)** Darstellung der Einzelmessungen: Es konnten  $K_m$ -Werte von  $6,89 \pm 2,56 \mu\text{M}$ ,  $10,51 \pm 1,87 \mu\text{M}$  und  $9,21 \pm 1,86 \mu\text{M}$  und  $I_{max}$ -Werte von  $-69,72 \pm 3,87 \text{ nA}$ ,  $-78,16 \pm 2,29 \text{ nA}$  und  $-66,50 \pm 2,15 \text{ nA}$  nach Michaelis-Menten berechnet werden. Die *mocks* zeigten über alle Substratkonzentrationen nur geringe Stromveränderungen von  $0,04 \pm 0,85 \text{ nA}$ .

**B)** Darstellung des arithmetischen Mittels induzierter Ströme: Es ließ sich ein  $K_m$ -Wert von  $8,74 \pm 2,02 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-71,38 \pm 2,62 \text{ nA}$  nach Michaelis-Menten bestimmen.



**Abb. 3.14** Auftragung des arithmetischen Mittels Succinat-induzierter Ströme nach Eadie-Hofstee vom hNaDC3.

Aus der Darstellung ergibt sich ein  $K_m$ -Wert von  $11,70 \pm 1,30 \mu\text{M}$  und  $I_{max}$ -Wert von  $-70,69 \pm 1,52 \text{ nA}$ .



**Abb. 3.15** Succinat-induzierte Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden Konzentrationen von fNaDC3 (Einzelmessung) und *mock* (3 Oozyten, 3 Spendertiere)

Nach Michaelis-Menten konnte ein  $K_m$ -Wert von  $8,11 \pm 2,55 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-171,51 \pm 8,39 \text{ nA}$  bestimmt werden. Die *mocks* zeigen über alle Substrat-Konzentrationen nur geringe Stromveränderungen von  $0,04 \pm 0,85 \text{ nA}$ .

**Tab. 3.2**  $K_m$ - und  $I_{max}$ -Werte Succinat-vermittelter Ströme

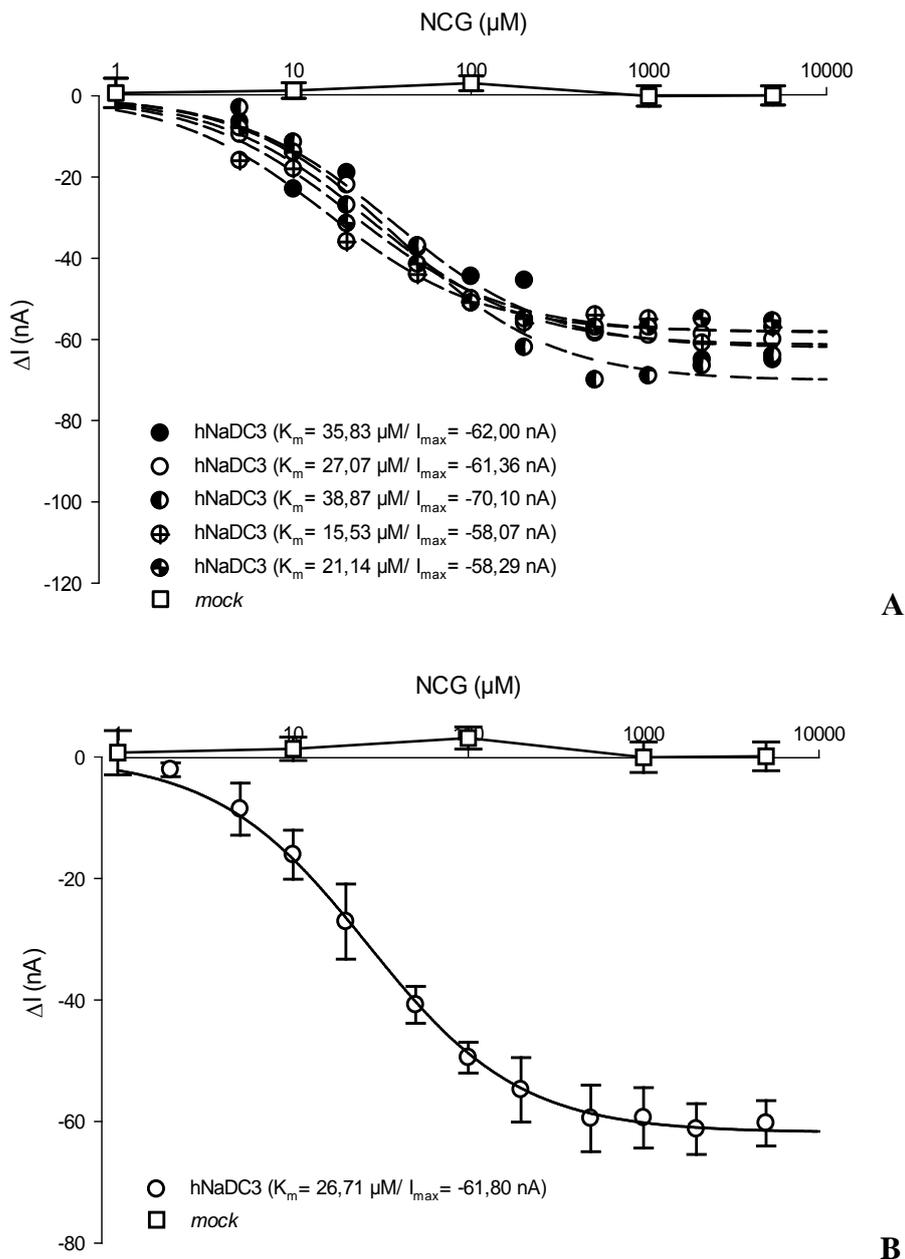
Transporter	Bestimmung		$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$I_{max}$ (nA)	$-I_{max}/K_m$ (nA/ $\mu\text{M}$ )	n/m
hNaDC3	Michaelis-Menten	aus $x_i$	$8,87 \pm 1,50$	$-71,46 \pm 4,92$	8,06	3/3
		aus $\bar{x}$	$8,74 \pm 2,02$	$-71,38 \pm 2,62$	8,17	3/3
	Eadie-Hofstee	aus $\bar{x}$	$11,70 \pm 1,30$	$-70,69 \pm 1,52$	6,04	3/3
fNaDC3	Michaelis-Menten		$8,11 \pm 2,55$	$-171,51 \pm 8,39$	21,15	1/1

$K_m$ : Halbsättigungs-Konstante;  $I_{max}$ : maximaler Strom; n/m: Oozyten/Spendertiere;  $x_i$ : Einzelmessungen;  $\bar{x}$ : arithmetischer Mittelwert

### 3.1.5.2 Konzentrationsabhängigkeit der N-Carbamylglutamat-vermittelten Ströme

In **Abb. 3.16** sind die induzierten Ströme in Abhängigkeit von den NCG-Konzentrationen der hNaDC3-exprimierenden Oozyten und *mocks* aufgetragen. Dabei ist den verschiedenen Einzelmessungen (A) das arithmetische Mittel (B) gegenübergestellt. Es ergab sich nach Michaelis-Menten ein  $K_m$ -Wert von  $27,69 \pm 8,75 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-61,97 \pm 4,37 \text{ nA}$  (gemittelt aus den Einzelberechnungen) bzw. von  $26,71 \pm 1,17 \mu\text{M}$  und von  $-61,80 \pm 0,52 \text{ nA}$  (berechnet aus dem arithmetischen Mittel induzierter Ströme). Die *mocks* zeigten über alle Substrat-Konzentrationen nur geringe Stromveränderungen von  $1,03 \pm 2,76 \text{ nA}$ . Aus der Messung an einer fNaDC3-exprimierenden Oozyte ließ sich im Vergleich ein  $K_m$ -Wert von  $24,31 \pm 1,40 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-145,50 \pm 43,59 \text{ nA}$  (gemittelt aus den Einzelberechnungen) bzw. von  $24,69 \pm 4,21 \mu\text{M}$  und von  $-145,49 \pm 4,63 \text{ nA}$  (berechnet aus dem arithmetischen Mittel induzierten Ströme) ermitteln (siehe **Abb. 3.17**).

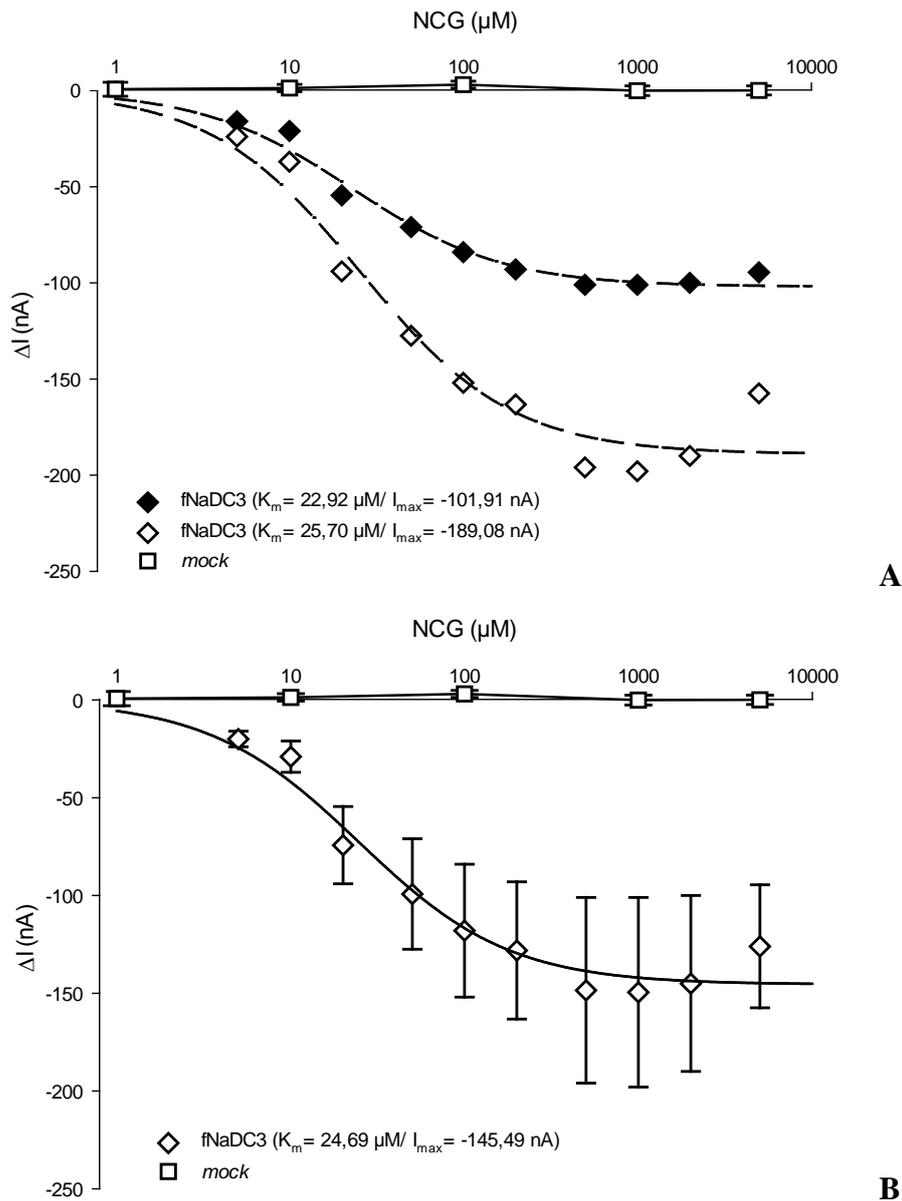
In **Abb. 3.18** sind die gemittelten NCG-induzierten Ströme hNaDC3- (A) und fNaDC3-exprimierender Oozyten (B) nach Eadie-Hofstee aufgetragen. Es wurde ein lineares Verhalten der induzierten Ströme sowohl für hNaDC3- als auch für fNaDC3-exprimierende Oozyten beobachtet. Während die Regressionsgerade der hNaDC3-exprimierenden Oozyten alle Werte gut widerspiegelt, wichen beim fNaDC3 zwei Messpunkte von der Regressionsgeraden ab. Es lässt sich ein  $K_m$ -Wert von  $28,80 \pm 1,10 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-62,45 \pm 1,03 \text{ nA}$  für hNaDC3-exprimierende und ein  $K_m$ -Wert von  $28,40 \pm 4,30 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-146,19 \pm 8,97 \text{ nA}$  für fNaDC3-exprimierende Oozyten ermitteln. **Tab. 3.3** fasst alle Werte noch einmal zusammen.



**Abb. 3.16** Einzelmessungen (A) und arithmetisches Mittel (B) NCG-induzierter Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden NCG-Konzentrationen von hNaDC3 und *mock*

Die Messungen wurden an 5 hNaDC3-exprimierenden Oozyten und 6 mocks von jeweils 5 bzw. 6 verschiedenen Spendertieren durchgeführt.

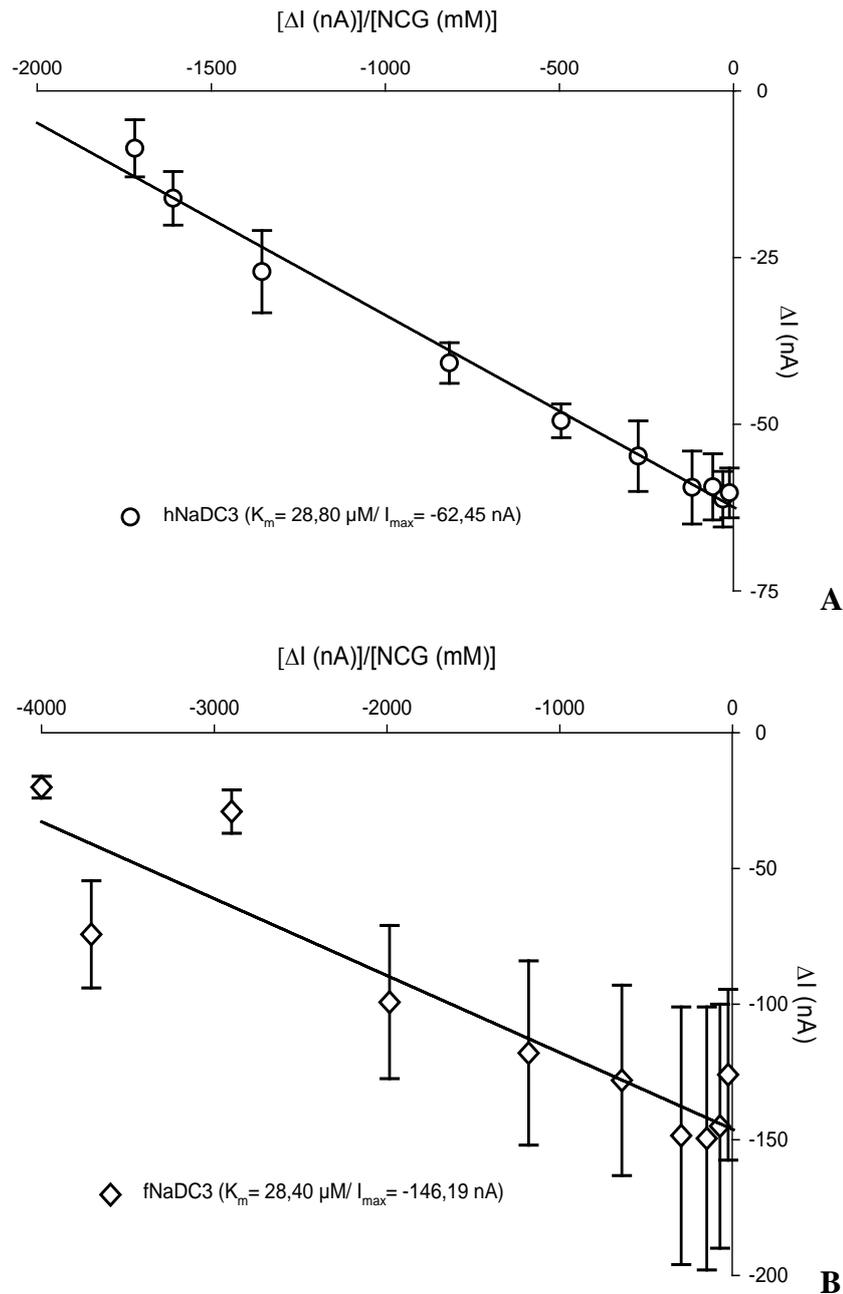
- A)** Darstellung der Einzelmessungen: Es ließen sich  $K_m$ -Werte von  $35,83 \pm 7,18 \mu\text{M}$ ,  $27,07 \pm 2,91 \mu\text{M}$ ,  $38,87 \pm 5,54 \mu\text{M}$ ,  $15,53 \pm 1,89 \mu\text{M}$  und  $21,14 \pm 2,69 \mu\text{M}$  und  $I_{max}$ -Werte von  $-62,00 \pm 2,43 \text{ nA}$ ,  $-61,36 \pm 1,24 \text{ nA}$ ,  $-70,10 \pm 1,98 \text{ nA}$ ,  $-58,07 \pm 1,24 \text{ nA}$  und  $-58,29 \pm 1,36 \text{ nA}$  nach Michaelis-Menten ermitteln. Die mocks zeigten über alle Substrat-Konzentrationen nur geringe Stromveränderungen von  $1,03 \pm 2,76 \text{ nA}$ .
- B)** Darstellung des arithmetischen Mittels induzierter Ströme: Aus den Daten ließ sich ein  $K_m$ -Wert von  $26,71 \pm 1,17 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-61,80 \pm 0,52 \text{ nA}$  berechnen.



**Abb. 3.17** Einzelmessungen (A) und arithmetisches Mittel (B) NCG-induzierter Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden NCG-Konzentrationen von fNaDC3 und *mock*

Messungen wurden an 2 fNaDC3-exprimierenden Oozyten und 6 *mocks* von jeweils 2 bzw. 6 verschiedenen Spendertieren durchgeführt.

- A)** Darstellung der Einzelmessungen: Nach Michaelis-Menten konnten  $K_m$ -Werte von  $22,92 \pm 2,96 \mu\text{M}$  und  $25,70 \pm 5,19 \mu\text{M}$  und  $I_{max}$ -Werte von  $-101,91 \pm 2,43 \text{ nA}$  und  $-189,08 \pm 7,15 \text{ nA}$  bestimmt werden. Die *mocks* zeigten über alle Substrat-Konzentrationen nur geringe Stromveränderungen von  $1,03 \pm 2,76 \text{ nA}$ , sodass keine Kinetiken berechnet werden konnten.
- B)** Darstellung des arithmetischen Mittels induzierter Ströme: Es ließ sich ein  $K_m$ -Wert von  $24,69 \pm 4,21 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-145,49 \pm 4,63 \text{ nA}$  nach Michaelis-Menten ermitteln.



**Abb. 3.18** Auftragung des arithmetischen Mittels NCG-induzierter Ströme nach Eadie-Hofstee von hNaDC3 (A) und fNaDC3 (B)

**A) hNaDC3:** Es ließ sich ein  $K_m$ -Wert von  $28,80 \pm 1,10 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-62,45 \pm 1,03 \text{ nA}$  nach Eadie-Hofstee bestimmen.

**B) fNaDC3:** Es ermittelte sich ein  $K_m$ -Wert von  $28,40 \pm 4,30 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-146,19 \pm 8,97 \text{ nA}$  nach Eadie-Hofstee.

**Tab. 3.3**  $K_m$ - und  $I_{max}$ -Werte NCG-vermittelter Ströme

Transporter	Bestimmung		$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$I_{max}$ (nA)	$-I_{max}/K_m$ (nA/ $\mu\text{M}$ )	n/m
hNaDC3	Michaelis-	aus $x_i$	$27,69 \pm 8,75$	$-61,97 \pm 4,37$	2,24	5/5
	Menten	aus $\bar{x}$	$26,71 \pm 1,17$	$-61,80 \pm 0,52$	2,31	5/5
	Eadie-Hofstee	aus $\bar{x}$	$28,80 \pm 1,10$	$-62,45 \pm 1,03$	2,17	5/5
fNaDC3	Michaelis-	aus $x_i$	$24,31 \pm 1,40$	$-145,50 \pm 43,59$	5,99	2/2
	Menten	aus $\bar{x}$	$24,69 \pm 4,21$	$-145,49 \pm 4,63$	5,90	2/2
	Eadie-Hofstee	aus $\bar{x}$	$28,40 \pm 4,30$	$-146,19 \pm 8,97$	5,15	2/2

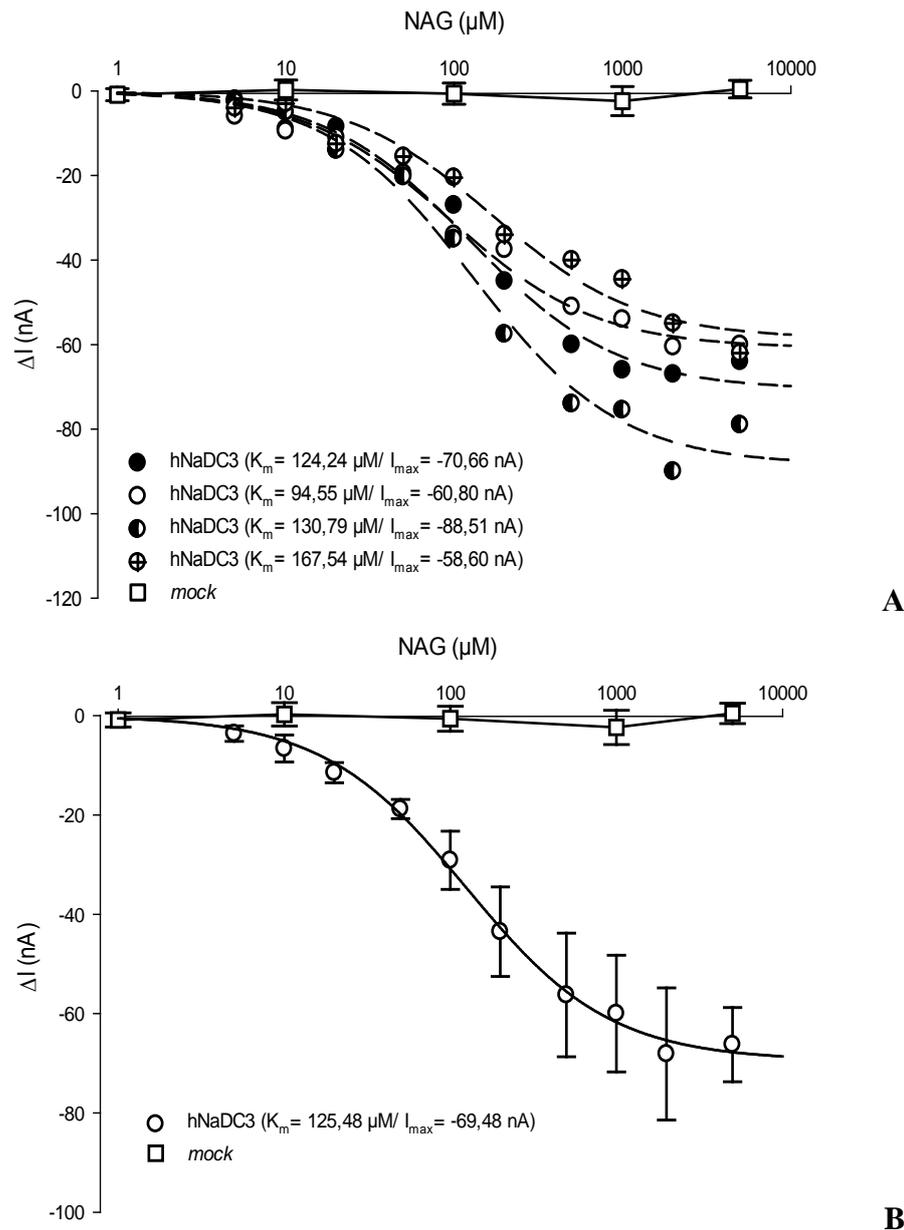
$K_m$ : Halbsättigungs-Konstante,  $I_{max}$ : maximaler Strom, n/m: Oozyten/Spendertiere;  $x_i$ : Einzelmessungen;  $\bar{x}$ : arithmetischer Mittelwert

### 3.1.5.3 Konzentrationsabhängigkeit der N-Acetylglutamat-vermittelten Ströme

In **Abb. 3.19** sind die induzierten Ströme in Abhängigkeit von den NAG-Konzentrationen der hNaDC3-exprimierenden Oozyten und *mocks* aufgetragen. Dabei ist den verschiedenen Einzelmessungen (A) das arithmetische Mittel (B) gegenübergestellt. Nach Michaelis-Menten konnte ein  $K_m$ -Wert von  $129,28 \pm 25,97 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-69,64 \pm 11,80 \text{ nA}$  (gemittelt aus den Einzelberechnungen) bzw. von  $125,48 \pm 8,73 \mu\text{M}$  und von  $-69,48 \pm 1,14 \text{ nA}$  (berechnet aus dem arithmetischen Mittel induzierter Ströme) bestimmt werden. Im Gegensatz dazu konnten bei den *mocks* über alle Substrat-Konzentrationen nur geringe Stromveränderungen von  $-0,58 \pm 2,63 \text{ nA}$  registriert werden.

In **Abb. 3.20** ist das arithmetische Mittel NAG-induzierter Ströme hNaDC3-exprimierender Oozyten nach Eadie-Hofstee aufgetragen. Die induzierten Ströme konnten nicht mit einer einzelnen Regressionsgeraden dargestellt werden. Zwei verschiedene Regressionsgeraden ermöglichten dagegen jeweils eine lineare Auftragung. Während sich mithilfe der Regressionsgeraden, welche die induzierten Ströme bei NAG-Konzentrationen von 0,005 bis 0,05 mM repräsentiert, ein  $K_m$ -Wert bzw.  $I_{max}$ -Wert von  $43,40 \pm 3,00 \mu\text{M}$  bzw.  $-35,53 \pm 1,78 \text{ nA}$  berechnen ließ, ergab sich mithilfe der zweiten Regressionsgeraden, welche die NAG-induzierten Ströme bei Konzentrationen von 0,1 bis 5 mM darstellt, ein  $K_m$ -Wert von  $133,50 \pm 10,50 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-70,09 \pm 1,66 \text{ nA}$ . Dies könnte auf ein Zwei-Komponenten-System hindeuten.

**Tab. 3.4** zeigt die ermittelten Werte im Überblick.

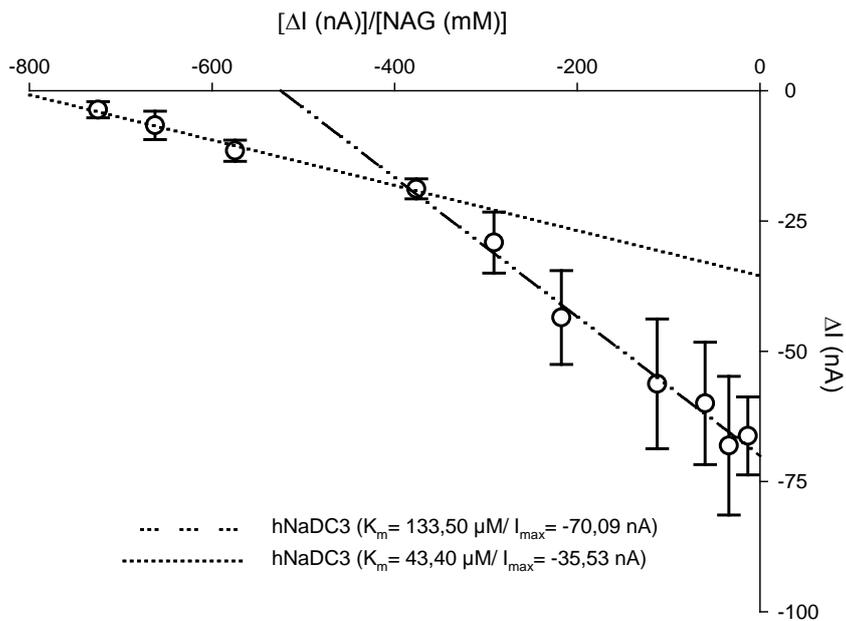


**Abb. 3.19** Einzelmessungen (A) und arithmetisches Mittel (B) NAG-induzierter Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden NAG-Konzentrationen von hNaDC3 und *mock*

*Messungen wurden an 4 hNaDC3-exprimierenden Oozyten und 5 mocks von jeweils 4 bzw. 5 verschiedenen Spendertieren durchgeführt.*

**A)** Darstellung der Einzelmessungen: Es ließen sich  $K_m$ -Werte von  $124,24 \pm 15,69 \mu\text{M}$ ,  $94,55 \pm 10,91 \mu\text{M}$ ,  $130,79 \pm 19,07 \mu\text{M}$  und  $167,54 \pm 32,97 \mu\text{M}$  berechnen. Die dazugehörigen  $I_{max}$ -Werte sind:  $-70,66 \pm 2,09 \text{ nA}$ ,  $-60,80 \pm 1,58 \text{ nA}$ ,  $-88,51 \pm 3,05 \text{ nA}$  und  $-58,60 \pm 2,84 \text{ nA}$ . Die mocks zeigten über alle Substrat-Konzentrationen nur geringe Stromveränderungen von  $-0,58 \pm 2,63 \text{ nA}$ .

**B)** Darstellung des arithmetischen Mittels induzierter Ströme: Es konnte ein  $K_m$ -Wert von  $125,48 \pm 8,73 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-69,48 \pm 1,14 \text{ nA}$  nach Michaelis-Menten ermittelt werden.



**Abb. 3.20** Auftragung des arithmetischen Mittels NAG-induzierter Ströme nach Eadie-Hofstee vom hNaDC3

Es ermittelt sich ein  $K_m$ -Wert von  $133,50 \pm 10,50 \mu\text{M}$  und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-70,09 \pm 1,66 \text{ nA}$  bzw. von  $43,40 \pm 3,00 \mu\text{M}$  und von  $-35,53 \pm 1,78 \text{ nA}$  nach Eadie-Hofstee.

**Tab. 3.4**  $K_m$ - und  $I_{max}$ -Werte NAG-vermittelter Ströme

Transporter	Bestimmung		$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$I_{max}$ (nA)	$-I_{max}/K_m$ (nA/ $\mu\text{M}$ )	n/m
hNaDC3	Michaelis-Menten	aus $x_i$	$129,28 \pm 25,97$	$-69,64 \pm 11,80$	0,54	4/4
		aus $\bar{x}$	$125,48 \pm 8,73$	$-69,48 \pm 1,14$	0,55	4/4
	Eadie-Hofstee		$133,50 \pm 10,50$	$-70,09 \pm 1,66$	0,53	4/4
		aus $\bar{x}$	$43,40 \pm 3,00$	$-35,53 \pm 1,78$	0,82	4/4

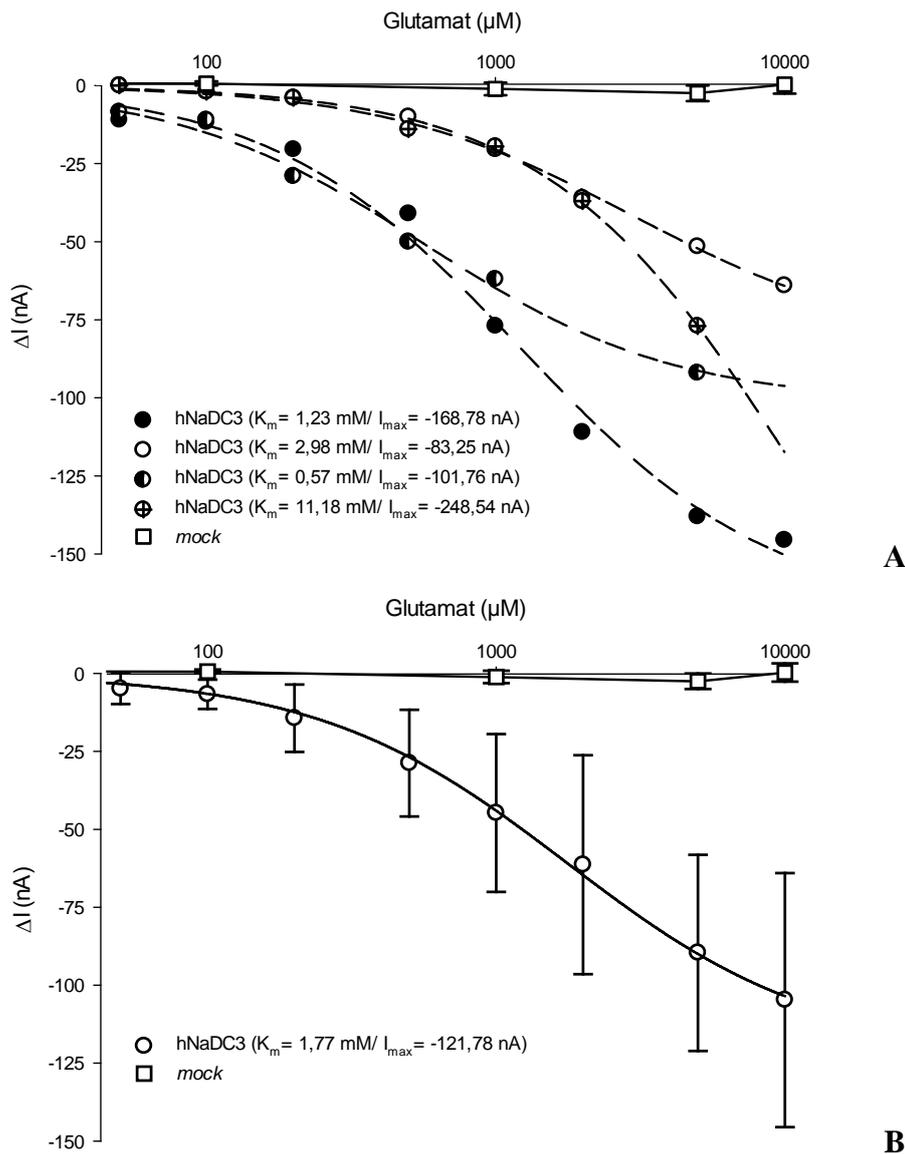
$K_m$ : Halbsättigungs-Konstante,  $I_{max}$ : maximaler Strom, n/m: Oozyten/Spendertiere;  $x_i$ : Einzelmessungen;  $\bar{x}$ : arithmetischer Mittelwert

#### 3.1.5.4 Konzentrationsabhängigkeit der Glutamat-vermittelten Ströme

In **Abb. 3.21** sind die induzierten Ströme in Abhängigkeit von den Glutamat-Konzentrationen der hNaDC3-exprimierenden Oozyten und *mocks* aufgetragen. Dabei ist den verschiedenen Einzelmessungen (A) das arithmetische Mittel (B) gegenübergestellt. Im Vergleich zu den in **Abb. 3.13.A**, **Abb. 3.16.A** und **Abb. 3.19.A** beobachteten Sättigungsverhalten, war das Sättigungsverhalten für Glutamat schwächer ausgeprägt. Trotzdem konnte nach Michaelis-Menten ein  $K_m$ -Wert von  $3,99 \pm 4,24$  mM und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-150,58 \pm 64,89$  nA (gemittelt aus den Einzelberechnungen) bzw. von  $1,77 \pm 0,11$  mM und von  $-121,78 \pm 2,66$  nA (berechnet aus dem arithmetischen Mittel induzierter Ströme) berechnet werden. Die *mocks* reagierten über alle Substrat-Konzentrationen nur mit geringen Stromänderungen von  $-0,11 \pm 2,13$  nA.

In **Abb. 3.22** sind die gemittelten Glutamat-induzierten Ströme nach Eadie-Hofstee aufgetragen. Die induzierten Ströme konnten nicht mit einer einzelnen Regressionsgeraden dargestellt werden. Das Hinzufügen einer zweiten Regressionsgeraden ermöglichte dagegen eine Darstellung. Dies könnte auf ein Zwei-Komponenten-System hindeuten. Mithilfe der Regressionsgeraden wurden  $K_m$ -Werte von  $1,72 \pm 0,04$  mM bzw. von  $1,15 \pm 0,04$   $\mu$ M und  $I_{max}$ -Werte von  $-121,73 \pm 1,52$  nA bzw. von  $-96,15 \pm 1,78$  nA ermittelt.

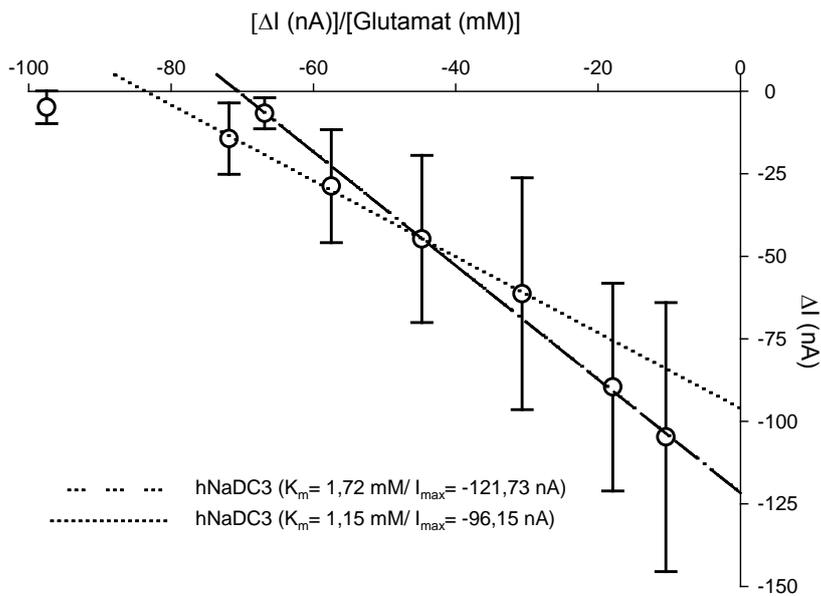
Zur besseren Veranschaulichung zeigt **Tab. 3.5** die verschiedenen ermittelten Werte noch einmal im Überblick.



**Abb. 3.21** Einzelmessungen (A) und arithmetisches Mittel (B) Glutamat-induzierter Ströme in Abhängigkeit von aufsteigenden Glutamat-Konzentrationen von hNaDC3 und *mock*

Die Messungen wurden an 4 hNaDC3-exprimierenden Oozyten und 5 mocks von jeweils 4 bzw. 5 verschiedenen Spendertieren durchgeführt.

- A)** Darstellung der Einzelmessungen: Es ließen sich  $K_m$ -Werte von  $1,23 \pm 0,13$  mM,  $2,98 \pm 0,28$  mM,  $0,57 \pm 0,06$  mM und  $11,18 \pm 2,40$  mM und  $I_{max}$ -Werte von  $-168,78 \pm 5,78$  nA,  $-83,25 \pm 3,10$  nA,  $-101,76 \pm 3,73$  nA und  $-248,54 \pm 39,53$  nA nach Michaelis-Menten ermitteln. Die mocks zeigten über alle Substrat-Konzentrationen nur geringe Stromveränderungen von  $-0,11 \pm 2,13$  nA.
- B)** Darstellung des arithmetischen Mittels induzierter Ströme: Es konnte ein  $K_m$ -Wert von  $1,77 \pm 0,11$  mM und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-121,78 \pm 2,66$  nA nach Michaelis-Menten ermittelt werden.



**Abb. 3.22** Auftragung des arithmetischen Mittels Glutamat-induzierter Ströme nach Eadie-Hofstee vom hNaDC3

Es ermittelt sich ein  $K_m$ -Wert von  $1,72 \pm 0,04$  mM und ein  $I_{max}$ -Wert von  $-121,73 \pm 1,52$  nA bzw. von  $1,15 \pm 0,04$   $\mu$ M und von  $-96,15 \pm 1,78$  nA nach Eadie-Hofstee.

**Tab. 3.5**  $K_m$ - und  $I_{max}$ -Werte Glutamat-vermittelter Ströme

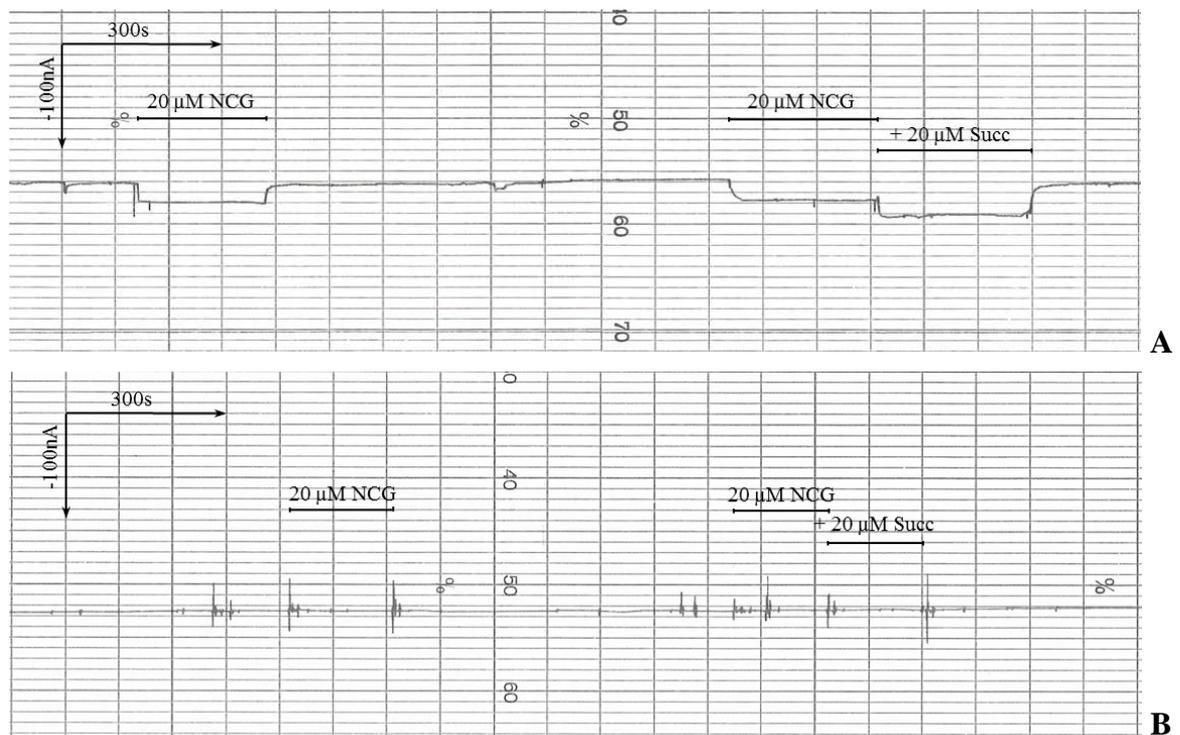
Transporter	Bestimmung		$K_m$ (mM)	$I_{max}$ (nA)	$-I_{max}/K_m$ (nA/ $\mu$ M)	n/m
hNaDC3	Michaelis-Menten	aus $x_i$	$3,99 \pm 4,24$	$-150,58 \pm 64,89$	0,04	4/4
		aus $\bar{x}$	$1,77 \pm 0,11$	$-121,78 \pm 2,66$	0,07	4/4
	Eadie-Hofstee		$1,72 \pm 0,04$	$-121,73 \pm 1,52$	0,07	4/4
		aus $\bar{x}$	$1,15 \pm 0,04$	$-96,15 \pm 1,78$	0,08	4/4

$K_m$ : Halbsättigungs-Konstante;  $I_{max}$ : maximaler Strom; n/m: Oozyten/Spendertiere;  $x_i$ : Einzelmessungen;  $\bar{x}$ : arithmetischer Mittelwert

### 3.1.6 Additivität der NCG- und Succinat-vermittelten Ströme

Zum Nachweis der Additivität NCG- und Succinat-vermittelter Ströme wurde zunächst der induzierte Strom bei Umspülung mit 20  $\mu$ M NCG, gelöst in ORi, bestimmt. Im nächsten Schritt wurde dieser Lösung zusätzlich 20  $\mu$ M Succinat hinzugefügt. **Abb. 3.23** zeigt die Originalregistrierungen. Die Addition von 20  $\mu$ M Succinat zur 20  $\mu$ M NCG-Lösung induzierte einen weiteren Einwärtsstrom von -15 nA in der hNaDC3-exprimierenden Oozyte. In der *mock* führte weder die reine NCG-Applikation noch die Zugabe von Succinat zu einer nennenswerten Stromänderung.

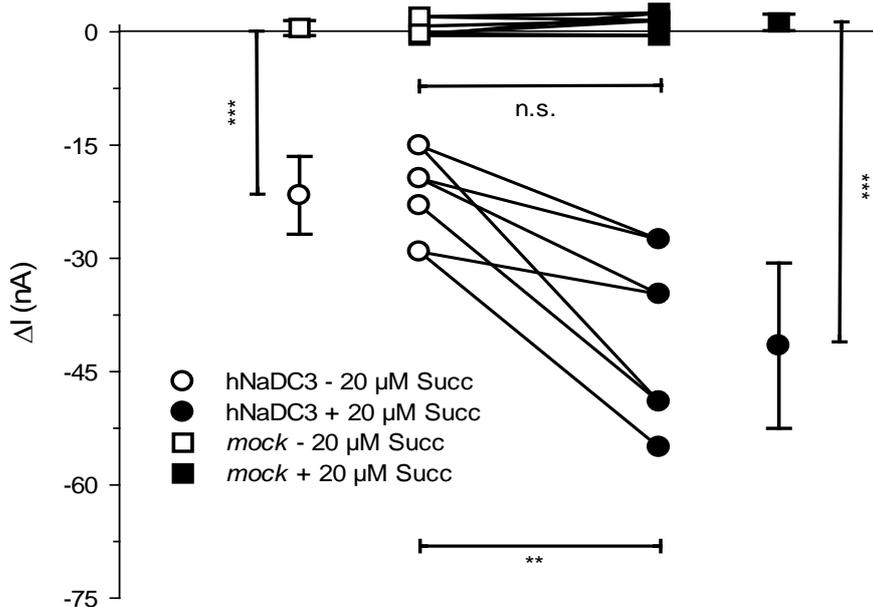
In **Abb. 3.24** sind die Einzelmessungen und die arithmetischen Mittel hNaDC3-exprimierender Oozyten *mocks* gegenüber gestellt. Die Addition von 20  $\mu\text{M}$  Succinat zur 20  $\mu\text{M}$  NCG-Lösung führte bei hNaDC3-exprimierenden Oozyten zu einer signifikanten ( $p < 0,01$ ) Verstärkung des Einwärtsstromes um  $-19,91 \pm 6,12$  nA bzw. um 91,9 % (normiert auf den von 20  $\mu\text{M}$  NCG hervorgerufenen Strom).



**Abb. 3.23** Originalregistrierungen der Addition von 20  $\mu\text{M}$  Succinat zu 20  $\mu\text{M}$  NCG bei hNaDC3 und *mock*

Gezeigt wird ein charakteristisches Experiment aus einem Kontingent von 4 hNaDC3-exprimierenden Oozyten und 4 *mocks* von jeweils 4 verschiedenen Spendertieren.

- A) hNaDC3:** Die Applikation von 20  $\mu\text{M}$  NCG induzierte einen initialen Einwärtsstrom von -17 nA bzw. von -20 nA. Bei Addition von 20  $\mu\text{M}$  Succinat verstärkte sich dieser um -15 nA.
- B) *mock*:** Die Applikation von 20  $\mu\text{M}$  NCG oder von 20  $\mu\text{M}$  NCG und 20  $\mu\text{M}$  Succinat induzierte nur marginale Stromänderungen.



**Abb. 3.24** Veränderung des NCG-induzierten Stroms (20  $\mu\text{M}$ ) in Ab- und Anwesenheit von 20  $\mu\text{M}$  Succinat von hNaDC3 und *mock*

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.s. nicht signifikant. Die Messungen wurden an 4 hNaDC3-exprimierenden und 4 *mocks* von jeweils 4 verschiedenen Spendertieren durchgeführt. Die Gabe von 20  $\mu\text{M}$  NCG induzierte einen Strom von  $-21,66 \pm 5,14 \text{ nA}$  beim hNaDC3. Die Addition von 20  $\mu\text{M}$  Succinat fügte diesem Einwärtsstrom einen weiteren Einwärtsstrom von  $-19,91 \pm 6,12 \text{ nA}$  ( $p < 0,01$ ) hinzu. Beim *mock* induzierte die additive Substratgabe Stromamplituden  $< 1 \text{ nA}$ .

### 3.2 Ergebnisse der Versuche an NaCT-exprimierenden Oozyten

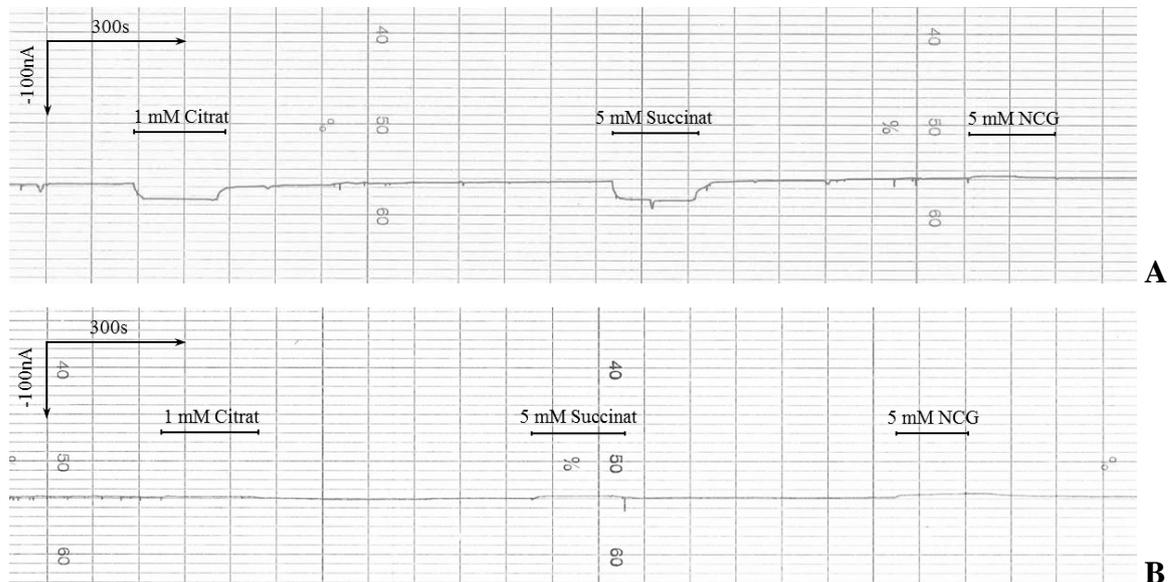
Zur Ermittlung eines möglichen Transports von NCG über den hNaCT wurden die NCG-vermittelten Einwärtsströme mit denen von Citrat und Succinat, als bekannte Substrate des hNaCT, verglichen.

#### 3.2.1 Gegenüberstellung Substrat-vermittelter Ströme

Um sicherzustellen, dass die zu untersuchenden Substanzen Citrat, Succinat und NCG ausreichend große Antworten ermöglichten, wurden Konzentrationen von 1 mM Citrat, 5 mM Succinat und 5 mM NCG, jeweils gelöst in ORi, angewendet. Um auszuschließen, dass die Abfolge der Substratzugabe einen Einfluss auf die Stromantwort hat, wurde die Reihenfolge der Substratzugabe jeweils abgewandelt. **Abb. 3.25** zeigt exemplarisch die Originalregistrierung von aufeinanderfolgenden Gaben von Citrat, Succinat und NCG an einer hNaCT-exprimierenden Oozyte und an einer *mock*. Während die Succinat- bzw.

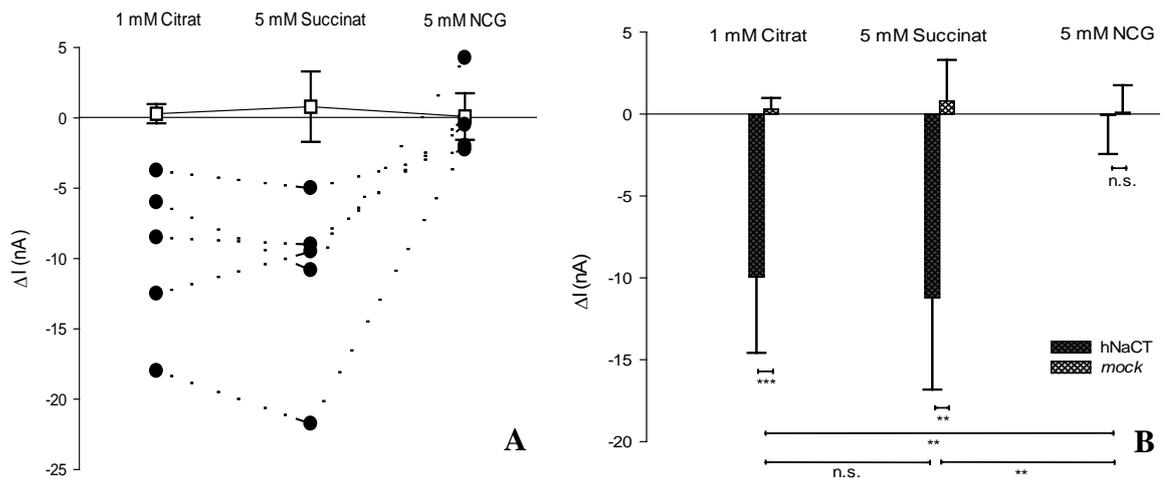
Citrat-Perfusion zu einem deutlichen Einwärtsstrom bei der hNaCT-exprimierenden Oozyte führte, wurde keine nennenswerte Stromänderung bei Zugabe von NCG detektiert. Bei der *mock* zeigte sich bei keinem der drei Substanzen eine nennenswerte Stromänderung.

Während in **Abb. 3.26.A** die Einzelmessungen der Substrat-vermittelten Ströme hNaCT-exprimierender Oozyten dem arithmetischen Mittel der *mocks* gegenübergestellt sind, sind in **Abb. 3.26.B** die arithmetischen Mittelwerte dargestellt. An hNaCT-exprimierenden Oozyten konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem NCG-vermittelten Strom ( $-0,10 \pm 2,34$  nA) und dem Citrat-vermittelten Strom ( $-9,96 \pm 4,63$  nA) bzw. dem Succinat-vermittelten Strom ( $-11,22 \pm 5,61$  nA) mit jeweils  $p < 0,01$  festgestellt werden. Während sich für den Citrat- und Succinat-vermittelten Strom ein signifikanter Unterschied zwischen hNaCT und *mock* ergab, war dies für NCG nicht der Fall. Es ließ sich keine signifikante Interaktion zwischen dem humanen natriumabhängigen Citrat-Transporter NaCT und NCG nachweisen.



**Abb. 3.25** Originalregistrierungen induzierter Ströme von 1 mM Citrat, 5 mM Succinat und 5 mM NCG von hNaCT (A) und *mock* (B)

- A) **hNaCT:** Bei Zugabe von 1 mM Citrat zeigte sich initial ein induzierter Einwärtsstrom von -17 nA, bei 5 mM Succinat von -20 nA. Die NCG-Akquise führte nur zu einer marginalen Stromänderung von 2 nA.
- B) **mock:** Die Zugabe von 1 mM Citrat, 5 mM Succinat oder 5 mM Glutamat induzierte jeweils nur eine marginale Stromänderung.



**Abb. 3.26** Gegenüberstellung der Substrat-vermittelten Ströme von 1 mM Citrat, 5 mM Succinat und 5 mM NCG bei hNaCT und mock

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.s. nicht signifikant. Die Messungen wurden an 5 hNaCT-exprimierenden Oozyten und 5 mocks von jeweils 5 verschiedenen Tieren durchgeführt. Die Substrate wurden in permutierender Reihenfolge verabreicht.

- A) Gegenüberstellung der Einzelmessungen:** Beim hNaCT vermittelte 5 mM Citrat einen Strom von  $-9,96 \pm 4,63$  nA bei einer Spannweite von 14,25 nA, 5 mM Succinat einen von  $-11,22 \pm 5,61$  nA bei einer Spannweite von 16,75 nA und 5 mM NCG einen von  $-0,10 \pm 2,34$  nA bei einer Spannweite von 6,5 nA. Beim mock induzierten 1 mM Citrat, 5 mM Succinat und 5 mM NCG Stromamplituden  $< 1$  nA.
- B) Gegenüberstellung der arithmetischen Mittel:** Beim hNaCT zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Citrat- und Succinat-induzierten Strömen zwischen hNaCT und mock mit  $p < 0,001$  respektive  $p < 0,01$ . Die Citrat- bzw. Succinat-vermittelten Ströme unterschieden sich zudem signifikant vom NCG-vermittelten Strom ( $p < 0,01$ ). Dagegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied des NCG-vermittelten Stroms zwischen hNaCT und mock.

### **3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Zwischen NCG und hNaCT war keine Interaktion nachweisbar. Dagegen konnte eine Interaktion von NCG mit dem hNaDC3 und fNaDC3 gezeigt werden. NCG induzierte in hNaDC3- und fNaDC3-exprimierenden Oozyten sowohl natriumabhängige als auch potentialabhängige Einwärtsströme.

Für die Konzentrationsabhängigkeit ergibt sich für NCG eine Halbsättigungskonstante ( $K_m$ ) von  $27,20 \pm 4,86 \mu\text{M}$  und ein  $-I_{\text{max}}/K_m$ -Wert von 2,27 nach Michaelis-Menten. Damit ordnet sich NCG mit seinem  $K_m$ - und  $I_{\text{max}}$ -Wert zwischen Succinat und NAG ein (siehe **Tab. 3.6**). Glutamat ist ein niedrig affines Substrat mit einer  $K_m > 2,0 \text{ mM}$  und einem  $I_{\text{max}} > 100 \text{ nA}$ .

In der Eadie-Hofstee-Analyse wurden für Succinat und NCG  $K_m$ - und  $I_{\text{max}}$ -Werte ermittelt, die denen der Michaelis-Menten-Kinetik entsprachen (vgl. **Tab. 3.6**, **Tab. 3.7**). Die Messwerte ließen sich im Diagramm jeweils durch eine einzelne Regressionsgerade repräsentieren. Für NAG und Glutamat bedurfte es jeweils einer weiteren Regressionsgeraden. Dies lässt ein Zwei-Komponenten-System vermuten.

Die Addition von  $20 \mu\text{M}$  Succinat zu  $20 \mu\text{M}$  NCG induzierte eine Verstärkung des Einwärtsstroms um  $-19,91 \pm 6,12 \text{ nA}$ , d. h. der Transporter scheint bei  $20 \mu\text{M}$  NCG noch nicht gesättigt zu sein.

Im Vergleich zu den hNaDC3-exprimierenden Oozyten zeigten fNaDC3-exprimierende Oozyten höhere Ströme bei gleicher Substrat-Konzentration. Die Affinität gegenüber NCG ( $K_m$ ) scheint vergleichbar, die Umsatzrate bei fNaDC3 aber höher zu sein (siehe **Tab. 3.6** und **Tab. 3.7**).

**Tab. 3.6**  $K_m$ - und  $I_{max}$ -Werte Succinat-, NCG-, NAG- und Glutamat-vermittelter Ströme nach Michaelis-Menten

Transporter	Substrat	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )*	$I_{max}$ (nA)*	$-I_{max}/K_m$ (nA/ $\mu\text{M}$ )	n/m
hNaDC3	Succinat	$8,80 \pm 1,75$	$-71,42 \pm 3,77$	8,12	3/3
	NCG	$27,20 \pm 4,86$	$-61,88 \pm 2,44$	2,27	5/5
	NAG	$127,38 \pm 17,35$	$-69,56 \pm 6,47$	0,55	4/4
	Glutamat	$2880 \pm 2175$	$-136,18 \pm 33,77$	0,07	4/4
fNaDC3	Succinat	$8,11 \pm 2,55$	$-171,51 \pm 8,39$	21,15	1/1
	NCG	$24,50 \pm 2,80$	$-145,49 \pm 24,11$	5,94	2/2

\* Es wurde das arithmetische Mittel aus dem  $K_m$ - bzw.  $I_{max}$ -Wert der Einzelberechnungen und dem  $K_m$ - bzw.  $I_{max}$ -Wert berechnet aus dem arithmetischen Mittel der induzierten Ströme gebildet.

$K_m$ : Halbsättigungs-Konstante;  $I_{max}$ : maximaler Strom; n/m: Oozyten/Spendertiere.

**Tab. 3.7**  $K_m$ - und  $I_{max}$ -Werte Succinat-, NCG-, NAG- und Glutamat-vermittelter Ströme nach Eadie-Hofstee

Transporter	Substrat	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$I_{max}$ (nA)	$-I_{max}/K_m$ (nA/ $\mu\text{M}$ )	n/m
hNaDC3	Succinat	$11,70 \pm 1,30$	$-70,69 \pm 1,52$	6,04	3/3
	NCG	$28,80 \pm 1,10$	$-62,45 \pm 1,03$	2,17	5/5
	NAG	$133,50 \pm 10,50$	$-70,09 \pm 1,66$	0,53	4/4
		$43,40 \pm 3,00$	$-35,53 \pm 1,78$	0,82	4/4
	Glutamat	$1722 \pm 38$	$-121,73 \pm 1,52$	0,07	4/4
$1149 \pm 37$		$-96,15 \pm 1,78$	0,08	4/4	
fNaDC3	NCG	$28,40 \pm 4,30$	$-146,19 \pm 8,97$	5,15	2/2

$K_m$ : Halbsättigungs-Konstante;  $I_{max}$ : maximaler Strom; n/m: Oozyten/Spendertiere

## 4 Diskussion

### 4.1 Limitationen des Versuchsaufbaus

Die Oozyte des südamerikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* stellt ein häufig eingesetztes Expressionssystem für Membrantransporter und -kanäle dar. Dieses Expressionssystem hat jedoch gewisse Limitationen. Um diskutieren zu können, ob *N*-Carbamylglutamat (NCG) über den natriumabhängigen Dicarboxylat-Transporter NaDC3 oder den natriumabhängigen Citrat-Transporter NaCT transportiert wird, ist es wichtig, diese Einschränkungen zu kennen, um falsche Interpretationen zu vermeiden.

Die RNAs unterschiedlicher Spezies werden in *Xenopus laevis*-Oozyten unterschiedlich prozessiert, was zu unterschiedlichen Expressionsgraden und funktionellen Eigenschaften führen kann (Dascal 2001). Diese unterschiedliche Prozessierung könnte dafür verantwortlich sein, dass der NaDC3 der Winterflunder (fNaDC3) deutlich höhere Ströme generierte als der humane NaDC3 (hNaDC3). Da Winterflunder und *Xenopus laevis* Amphibien sind, verläuft der Expressionsvorgang in beiden vermutlich ähnlich. Die Expression humaner RNA wird sich dagegen teilweise von der in Amphibien unterscheiden und deshalb in *Xenopus laevis*-Oozyten zu unterschiedlichen Expressionsgraden führen.

Im Laufe der Expression kann sich zudem z. B. durch Änderung des Phosphorylierungsgrades der Expressionsgrad und die Aktivität eines Membranproteines ändern (Cohen und Zilberberg 2006). Die Protein Kinase C-abhängige Phosphorylierung des fNaDC3 führt zu einer reduzierten Expression und Aktivität des Transporters (Hagos et al. 2004). Da sowohl der hier verwendete pH-Wert von 7,5 als auch Raumtemperatur zu einer Steigerung der Phosphorylierungsaktivität in *Xenopus laevis*-Oozyten führt (Cohen und Zilberberg 2006), könnte es im Laufe der Zeit zu einer Veränderung der Stromamplituden, vermutlich einer Reduktion dieser, kommen. Da die Substrat-induzierten Ströme sich trotz mehrstündiger Experimente kaum veränderten, ist eine Veränderung des Phosphorylierungsgrades im Rahmen der hier durchgeführten Versuche eher unwahrscheinlich. Nur bei repetitiver Verwendung millimolarer Substrat-Konzentrationen zeigte sich bei einigen Experimenten manchmal eine Reduktion der Substrat-vermittelten Stromamplituden. Dies scheint aber nicht das Resultat eines veränderten Phosphorylierungsgrades der Membrantransporter zu sein, sondern ist vermutlich auf die intrazelluläre Akkumulation der Substrate und der damit einhergehenden Veränderung des elektrochemischen Gradienten zurückzuführen (Burckhardt et al. 2005).

Ein größeres Problem stellte dagegen die Lebensfähigkeit und Qualität der Oozyten dar. Da die Kollagenase-Behandlung, die RNA-Injektion, der Einstich der Mikroelektroden und die repetitiven Wechsel verschiedener Perfusionslösungen zwangsläufig mit einer Reduktion der Oozyten-Qualität einhergehen, ist eine hohe Umweltresistenz der Oozyten wichtig (Sigel und Minier 2005; Polder et al. 2005). Eine geringe Umweltresistenz kann zu starken Stromfluktuationen innerhalb des Klemmodus führen, sodass die Durchführung und Auswertung der Messung erschwert bzw. unmöglich wird. Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente war aber, trotz variabler Qualität der Oozyten einzelner Froschweibchen, immer mindestens eine Oozyte für die Messungen geeignet.

Die *SLC13*-Transporter nutzen als sekundär-aktive Transporter den elektrochemischen Natrium-Gradienten (Übersichten in Pajor 2014). Diese Natriumabhängigkeit wurde genutzt, um zweifelsfrei festzustellen, ob die untersuchte Substanz ein Substrat der *SLC13*-Transporter ist. Der Ersatz von Natrium durch äquimolare Mengen an *N*-Methyl-*D*-Glucamin (NMDG) ließ die Substrat-induzierten Ströme verschwinden (vgl. auch Huang et al. 2000). Wie die extrazelluläre Natrium-Konzentration kann auch die intrazelluläre Natrium-Konzentration den Transport über die *SLC13*-Transporter und damit die induzierten Ströme beeinflussen (vgl. Sobczak et al. 2010). Bei oozytären Natrium-Konzentrationen zwischen 4 und 23 mM (Übersichten in Weber 1999) kann von einer gewissen Variabilität elektrochemischer Natrium-Gradienten und damit Substrat-induzierter Ströme ausgegangen werden. Eine Varianz Substrat-induzierter Stromamplituden zwischen verschiedenen Oozyten lässt sich nicht vermeiden. Dascal (2001) berichtet von Abweichungen um das 1,5-3-Fache zwischen Oozyten desselben und von noch größeren Deviationen zwischen Oozyten verschiedener Froschweibchen. Durch die Verwendung mindestens dreier verschiedener Oozyten von drei verschiedenen Weibchen wurde versucht, diese Einflüsse zu reduzieren.

Der Einfluss endogener Natrium-tranlozierender Kanäle (z.B. Natrium-Kanäle, nicht-selektive Kationenkanäle, mechanosensitive Kationenkanäle) und Transporter (z.B. natriumabhängige Aminosäure-Transporter), die ebenfalls indirekt zu einer veränderten intrazellulären Natrium-Konzentration und damit zu einem veränderten elektrochemischen Natrium-Gradienten führen könnten (Sobczak et al. 2010), konnte durch die Verwendung *Aqua dest.*-injizierter Oozyten (*mocks*) eruiert und ausgeschlossen werden.

Insgesamt zeigten sich die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse reproduzierbar. Der Vergleich der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse von Succinat und Citrat am NaDC3

bzw. NaCT mit den Literaturdaten (Kaufhold et al. 2011; Wang et al. 2000; Huang et al. 2000; Burckhardt et al. 2005; Stellmer et al. 2007) lässt annehmen, dass die für NCG erzielten Daten zuverlässig sind und für die Interpretation zur Verfügung stehen.

#### **4.2 Interaktion von *N*-Carbamylglutamat mit dem humanen NaDC3**

Der NaDC3 transportiert bevorzugt Dicarboxylate in divalenter Form. Als sekundär-aktiver Transporter nutzt er den durch die Natrium-Kalium-ATPase aufgebauten elektrochemischen Natrium-Gradienten. Durch die negative Ladung des Zellinneren und die niedrigere intrazelluläre Natrium-Konzentration werden positive Natrium-Ionen in das Zellinnere gezogen. Dies nutzt der NaDC3-Transporter und transportiert ein Dicarboxylat ( $DC^{2-}$ ) zusammen mit 3 Natrium-Ionen ( $Na^+$ ) in die Zelle. Daraus resultiert eine positive Überschussladung, die als Einwärtsstrom elektrophysiologisch gemessen werden kann und dadurch erlaubt, den Transport einer Substanz, hier *N*-Carbamylglutamat (NCG), über den NaDC3 zu untersuchen (Wang et al. 2000).

Um zu bestätigen, dass NCG über den hNaDC3 transportiert wird, muss aber nicht nur nachgewiesen werden, dass NCG einen Strom in hNaDC3-exprimierenden Oozyten induziert, sondern auch, dass dessen Eigenschaften dem beschriebenen Transportmodus des hNaDC3 unterliegen. Nachdem gezeigt worden war, dass NCG in hNaDC3-exprimierenden Oozyten, nicht aber in *mocks* einen Strom induzierte ( $-51,38 \pm 26,74$  nA versus  $-0,52 \pm 1,72$  nA), wurde im zweiten und dritten Schritt untersucht, ob der Strom vom elektrochemischen Natrium-Gradienten und vom Potential abhängt. Der beobachtete Einwärtsstrom müsste unter natriumfreien Bedingungen aufgehoben und sich bei Hyperpolarisation und Depolarisation der Zelle verändern (Huang et al. 2000; Burckhardt und Burckhardt 2003).

Tatsächlich konnten an hNaDC3-exprimierenden Oozyten in natriumfreier Umgebung nur marginale Stromänderungen bei NCG-Gabe ( $2,37 \pm 4,11$  nA) nachgewiesen werden, die sich nicht-signifikant von den Stromänderungen in *mocks* ( $0,83 \pm 0,85$  nA) unterschieden. Auch für Succinat, dem Referenzsubstrat des hNaDC3, wurde ein ähnliches Stromverhalten beobachtet.

Bei Umstellung der natriumhaltigen auf die natriumfreie Perfusion wurde sowohl in hNaDC3-exprimierenden Oozyten als auch in *mocks* ein Auswärtsstrom von durchschnittlich 15 nA und bei erneuter Umstellung auf die natriumhaltige Perfusion ein Einwärtsstrom gleicher Amplitude registriert. Costa et al. 1989 beschrieben Ströme ähnlicher Amplitude

und Richtung. Vermutlich sind die Ströme Resultat einer reduzierten Natrium-Diffusion. So kann das als Ersatz für Natrium hinzugefügte NMDG (siehe OR<sub>i4</sub>-Zusammensetzung in **Tab. 2.4**) zwar in das Zellinnere diffundieren, hat aber eine nur halb so hohe Membranpermeabilität wie Natrium (Vasilets und Schwarz 1992; Costa et al. 1989; Weber 1999), sodass bei Anwendung als Natrium-Ersatz das Membranpotential der Zelle beeinflusst wird.

Unter natriumfreier Perfusion kam es oft zu Fluktuationen des einzuspeisenden Haltestroms mit damit einhergehenden nicht mehr auswertbaren Antworten der Oozyte auf Substrat-Zugabe, die zu einem Abbruch des Versuchs führten. Es bleibt festzuhalten, dass Natrium einen stabilisierenden Einfluss auf die Güte der Messungen hat und maßgeblich die Lebensfähigkeit der Oozyten und damit die Qualität der Messungen beeinflusst.

Da die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) der hNaDC3-vermittelten Succinat-Aufnahme für Natrium bei ca. 45 mM liegt (Kaufhold et al. 2011), kann bei der hier verwendeten Natrium-Konzentration von 110 mM (siehe OR<sub>i</sub>-Zusammensetzung in **Tab. 2.4**) und NCG-Konzentration von 5 mM von einer alleinigen Abhängigkeit des NCG-Transportes und damit des NCG-vermittelten Stromes vom Klemmpotential ausgegangen werden (Huang et al. 2000; Übersichten in Pajor 2014). Um zu zeigen, dass der NCG-Transport ebenfalls potentialabhängig ist, wurden die Ströme in Ab- und Anwesenheit von 5 mM NCG bei unterschiedlichen Klemmpotentialen aufgezeichnet. Tatsächlich konnte eine direkt-proportionale Korrelation zwischen Membranpotential und induziertem Strom nachgewiesen werden. Bei Hyperpolarisation wurden höhere Ströme und Leifähigkeiten gemessen als bei Depolarisation. Es ließ sich für den NCG-vermittelten Strom ein Umkehrpotential von 70,75 mV ermitteln. Das bedeutet, dass bei 70,75 mV kein Nettostrom mehr fließt. Der Einwärtsstrom kehrt sich bei diesem Potential in einen Auswärtsstrom um (Hermeijer et al. 2010). Mithilfe des Umkehrpotentials kann abgeschätzt werden, welche Ionen am Transport beteiligt sind. So legt das ermittelte Umkehrpotential von 70,75 mV nahe, dass der NCG-induzierte Strom natriumgetragen ist. Das Umkehrpotential befindet sich nahe dem Nernst-Potential von Natrium der *Xenopus laevis*-Oozyten ( $64,06 \pm 14,65$  mV; berechnet nach Ionenkonzentrationsangabe in Sobczak et al. 2010). Dies unterstützt damit die Resultate der Versuche der Natriumabhängigkeit NCG-vermittelter Ströme.

Da NCG über den NaDC3 transportiert wird, wurde als nächstes der Grad der Substrat-Interaktion untersucht. Hierfür kann die Affinität, repräsentiert durch den  $K_m$ -Wert, die

Aktivität, repräsentiert durch den  $I_{\max}$ -Wert, oder die Effizienz, repräsentiert durch den  $-I_{\max}/K_m$ -Wert, herangezogen werden (Pajor 2006; Bisswanger 2015).

Zur Ermittlung des  $K_m$ -Wertes wird in der Literatur die nicht-lineare Regression nach Michaelis Menten empfohlen (Cleland 1967). Für NCG ergaben sich nach Michaelis-Menten folgende Werte:  $K_m$ -Wert von ca. 27  $\mu\text{M}$  und ein  $-I_{\max}/K_m$ -Wert von ca. 2  $\text{nA}/\mu\text{M}$ . Damit lässt sich NCG bezüglich seiner Affinität und Effizienz zwischen dem Referenzsubstrat Succinat ( $K_m$  ca. 9  $\mu\text{M}$ ,  $-I_{\max}/K_m$  ca. 8  $\text{nA}/\mu\text{M}$ ) und seinem strukturellen Analogon *N*-Acetylglutamat (NAG;  $K_m$  ca. 130  $\mu\text{M}$ ,  $-I_{\max}/K_m$  ca. 0,5  $\text{nA}/\mu\text{M}$ ) einordnen. Glutamat zeigt von allen vier die geringste Interaktion mit dem hNaDC3 mit einem  $K_m$ -Wert  $>2$  mM und einem  $-I_{\max}/K_m$ -Wert  $<0,1$   $\text{nA}/\mu\text{M}$ .

Da Fehlerabweichungen im halb-logarithmischen Diagramm schwer zu erkennen sind, wurden die arithmetischen Mittelwerte der Substrat-induzierten Ströme noch einmal nach Eadie-Hofstee aufgetragen. Dieses Diagramm gilt als besonders zuverlässig, um Streuungen zu erkennen, denn diese werden verstärkt, und Abweichungen von der Michaelis-Menten-Kinetik können leichter identifiziert werden (Dowd und Riggs 1965). Es hilft zudem bei der Identifikation multipler Transporter-Bindungsstellen (Rosenthal 1967) oder multipler Transporter (Brouwer et al. 2013; Coons et al. 1995). Während ein linearer Zusammenhang auf einen einfach-sättigbaren Prozess hindeutet (Gopal et al. 2007), kann die Abweichung der Messpunkte von der Regressionsgeraden verschiedene Gründe haben.

Die hohe Übereinstimmung NCG- und Succinat-induzierter Ströme mit der Regressionsgeraden deutet darauf hin, dass es sich hier um einen einfach-sättigbaren Transportprozess handelt. Den Abweichungen NAG- und Glutamat-induzierter Ströme von den einzelnen Regressionsgeraden könnten verschiedene Gründe zugrunde liegen. Da die in *mock* induzierten Ströme von NAG und Glutamat Stromamplituden  $<1\text{nA}$  aufwiesen und bei Zuhilfenahme einer zweiten Regressionsgeraden sich nun die arithmetischen Mittelwerte gut repräsentieren ließen, scheint der Einfluss endogener Transporter unwahrscheinlich. Stattdessen scheint hier ein Zwei-Komponentensystem, verursacht durch distinkte Bindungsstellen, vorzuliegen (Rosenthal 1967). Für NAG könnte neben der niedrig affinen Bindungsstelle ( $K_m$ -Wert von  $133,50 \pm 10,50$   $\mu\text{M}$ ) eine weitere deutlich affinere Bindungsstelle ( $K_m$ -Wert von  $43,40 \pm 3,00$   $\mu\text{M}$ ) vorliegen.

Neben der Effizienz und Affinität eines Substrates ist die Plasmakonzentration der Substanz für die Beurteilung des Transportes wichtig (Pajor 2006). Eine relevante Medikamenteninteraktion mit einem Transporter kann angenommen werden, wenn die maximale

ungebundene Konzentration des Therapeutikums mindestens einem Zehntel der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) bzw. der Halbsättigungs-Konstante ( $K_m$ ) entspricht (Hillgren et al. 2013). NCG zeigt mit Plasmaspitzenkonzentrationen von 9,5 bis 25  $\mu\text{M}$  (Orphan Europe 2010) und einer Halbsättigungs-Konstante von ca. 27  $\mu\text{M}$  dementsprechend eine relevante Interaktion mit anderen NaDC3-translozierten Medikamenten.

Dies bestätigt auch der Additionsversuch. Bei einer Konzentration unterhalb des  $K_m$ -Wertes von NCG induzierte die gemeinsame Gabe von 20  $\mu\text{M}$  NCG und 20  $\mu\text{M}$  Succinat einen Einwärtsstrom doppelter Amplitude im Vergleich zum Einwärtsstrom bei alleiniger Gabe von 20  $\mu\text{M}$  NCG.

Im Vergleich dazu scheint der hNaDC3-vermittelte Transport von NAG physiologisch bei einer Plasmakonzentration von ca. 5  $\mu\text{M}$  und einem  $K_m$ -Wert von ca. 130  $\mu\text{M}$  keine Bedeutung zu haben (Tavazzi et al. 2005). Bei Glutamat-Plasmakonzentrationen von ca. 100  $\mu\text{M}$  und einem  $K_m$ -Wert  $>2$  mM trifft dies auch für Glutamat zu (Psychogios et al. 2011). Dagegen ist für Succinat mit einem  $K_m$ -Wert von ca. 9  $\mu\text{M}$  und einer physiologischen Plasmakonzentration von 23,5  $\mu\text{M}$  eine relevante Interaktionen mit Medikamenten und anderen Krebszyklusderivaten, die vom hNaDC3 akzeptiert werden, möglich (Psychogios et al. 2011).

#### 4.2.1 Struktur-Wirkungsbeziehung der Substrate

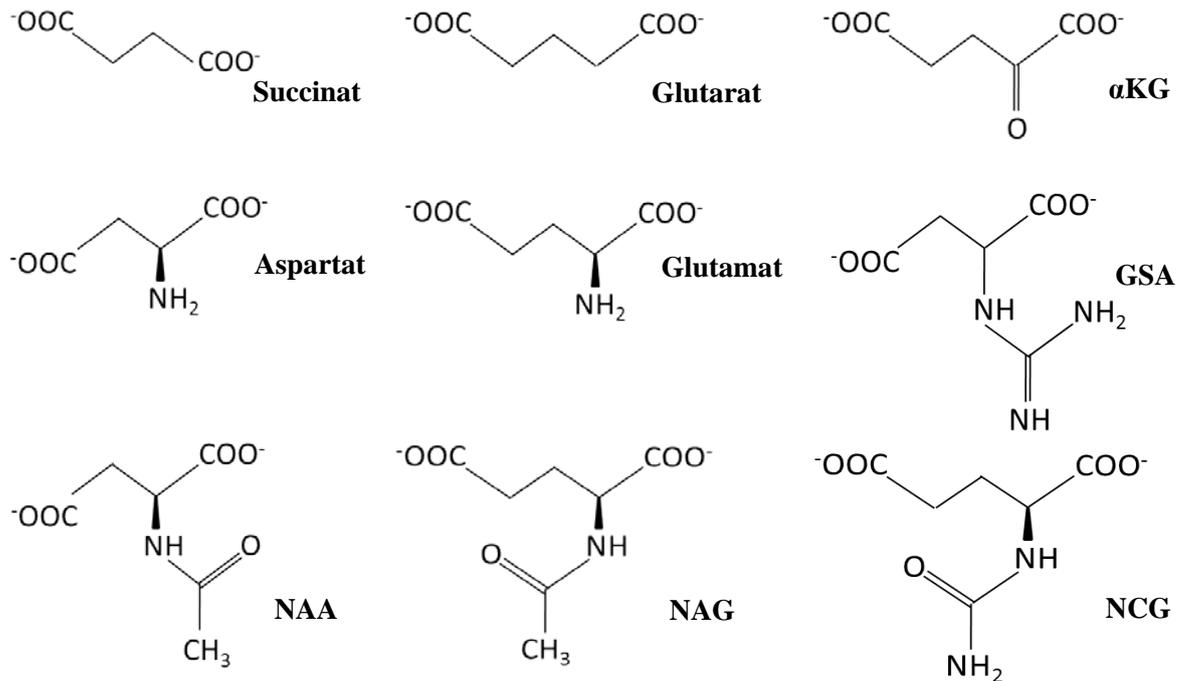
Nachdem die NCG-Interaktion im Rahmen dieser Arbeit mit Succinat, NAG und Glutamat verglichen worden ist, sind die ermittelten Werte in **Tab. 4.1** anderen Substraten des hNaDC3 gegenübergestellt. **Abb. 4.1** zeigt die Strukturformeln der hier beschriebenen Verbindungen.

Aus **Tab. 4.1** ist ersichtlich, dass die bevorzugten Substrate des hNaDC3 Dicarboxylate mit einer Kettenlänge von vier bis fünf C-Atomen sind (vgl. hierzu auch Wang et al. 2000). Die Länge der C-Kette, also ob diese aus vier oder fünf C-Atomen besteht, scheint dabei keinen Einfluss auf die Affinität der Substanz gegenüber dem hNaDC3 zu haben. Das unsubstituierte Substrat Succinat (4 C-Atome) weist eine höhere Affinität als das unsubstituierte Substrat Glutarat (5 C-Atome) auf, *N*-Acetylaspartat (NAA, 4 C-Atome) dagegen eine geringere Affinität als NAG (5 C-Atome).

Eine Substitution an der  $\alpha$ -Position spielt für die Affinität ebenfalls keine Rolle. Dies ändert sich aber, wenn die Substitution eine positive Ladung enthält. Es kommt zu einer

Abnahme der Affinität (vgl. Huang et al. 2000; Burckhardt und Burckhardt 2003).  $\alpha$ -Ketoglutarat (5 C-Atome, ungeladene Carbonylgruppe) besitzt gegenüber Glutarat (5 C-Atome, unsubstituiert) eine höhere, Glutamat (5 C-Atome, positiv-geladene Aminogruppe) dagegen eine 10- bis 100-fach geringere Affinität als Glutarat. Wird die positive Ladung der Aminogruppe dagegen wie bei NAG (5 C-Atome, ungeladene Acetamidogruppe) durch Acetylierung neutralisiert, steigt die Affinität gegenüber dem hNaDC3 um das 10-fache an. Ähnliche Zu- bzw. Abnahmen der Affinität können auch für Succinat (4 C-Atome, unsubstituiert), Aspartat (4 C-Atome, geladene Aminogruppe) und NAA (4 C-Atome, ungeladene Acetamidogruppe) beobachtet werden. Findet wie bei NCG statt der Acetylierung eine Carbamylierung der Aminogruppe statt, ist die Affinitätssteigerung sogar noch größer. Dies ist interessant, würde man doch vermuten, dass die positive Ladung der endständigen Aminogruppe im Carbamylrest eher mit einer geringeren Affinität einhergehen würde. Guanidinosuccinat (4 C-Atome, 3 Aminogruppen), das sich von NCG (4 C-Atome, 2 Aminogruppen, eine Carbonylgruppe) nur bezüglich der Kettenlänge und der Existenz einer weiteren Aminogruppe unterscheidet, zeigt keine relevante Interaktion mit dem hNaDC3; 10 mM Guanidinosuccinat-Lösung induzierte in hNaDC3-exprimierenden Oozyten einen Einwärtsstrom von  $-3 \pm 1$  nA bei -60 mV (Burckhardt et al. 2005). Eine Carbamylgruppe im Allgemeinen und eine Carbonylgruppe im Speziellen scheinen für die Affinität also wichtig zu sein. So führt die Carbonylgruppe in  $\alpha$ -Ketoglutarat (ungeladene Carbonylgruppe/Ketogruppe) im Vergleich zu Glutarat (unsubstituiert) zu einer leicht höheren Affinität gegenüber dem hNaDC3.

Da der NaDC3 Dicarboxylate bevorzugt als divalente Anionen transportiert, wurden die pKs-Werte der Dicarboxylate verglichen, um den divalenten Anteil an der Gesamtkonzentration zu errechnen. Sowohl Succinat als auch NCG, NAG und Glutamat liegen bei physiologischen pH-Werten als zweifach negativ geladene Anionen vor (EMEA 2004; Kyte 2006; Hovgaard et al. 2012), sodass ein Einfluss des Dissoziationsgrades im physiologischen pH-Bereich unwahrscheinlich ist.



**Abb. 4.1** Strukturformeln verschiedener Dicarboxylate (eigene Abbildungen)

*$\alpha$ KG*:  $\alpha$ -Ketoglutarat, *GSA*: Guanidinosuccinat, *NAA*: N-Acetylaspartat, *NAG*: N-Acetylglutamat, *NCG*: N-Carbamylglutamat

**Tab. 4.1** Vergleich des hNaDC3-vermittelten Transportes verschiedener Dicarboxylate

Substanz	Expressions-system	$K_m$	$IC_{50}^*$	Referenz
$\alpha$ -Ketoglutarat	HEK293		$69,2 \pm 8,2 \mu\text{M}$	Kaufhold et al. 2011
	HRPE	$45 \pm 13 \mu\text{M}$		Burckhardt et al. 2005
Aspartat	HRPE		$3,1 \pm 0,2 \text{mM}$	Huang et al. 2000
Glutamat	HRPE		$>10 \text{mM}$	Huang et al. 2000
	Oozyte	$2,0 \pm 2,2 \text{mM}$		diese Arbeit
Glutarat	HEK293		$138 \pm 6,5 \mu\text{M}$	Kaufhold et al. 2011
	Oozyte	$40 \pm 12 \mu\text{M}$		Burckhardt et al. 2005
GSA	Oozyte	(+)		Burckhardt et al. 2005
NAA	HRPE		$232 \pm 20 \mu\text{M}$	Huang et al. 2000
	Oozyte	$300 \mu\text{M}$		Huang et al. 2000
NAG	Oozyte	$127 \pm 17 \mu\text{M}$		diese Arbeit
NCG	Oozyte	$27 \pm 4,8 \mu\text{M}$		diese Arbeit

	HEK293	18 $\mu$ M	23,5 $\pm$ 6,6 $\mu$ M	Kaufhold et al. 2011
Succinat	HRPE	20 $\pm$ 1 $\mu$ M		Wang et al. 2000
		13 $\pm$ 0,6 $\mu$ M		Huang et al. 2000
	Oozyte	102 $\pm$ 20 $\mu$ M*		Wang et al. 2000
		25 $\pm$ 12 $\mu$ M		Burckhardt et al. 2005
		25 $\pm$ 16 $\mu$ M		Stellmer et al. 2007
		8,8 $\pm$ 1,7 $\mu$ M		diese Arbeit

\* Berechnung bezieht sich auf das jeweilige, in der Literaturstelle angegebene Referenzsubstrat;  
 \*\* Messung bei -50 mV;  $K_m$ : Halbsättigungs-Konstante;  $IC_{50}$ : halbmaximale inhibitorische Konzentration; HEK293: menschliche embryonale Nierenzellen 293; HRPE: Menschliche retinale Pigmentepithel-Zellen

#### 4.2.2 Vergleich der Ergebnisse zwischen hNaDC3 und fNaDC3

In Oshiro und Pajor (2005) wurde berichtet, dass die funktionellen Eigenschaften des NaDC3 der Winterflunder (fNaDC3) denen des humanen NaDC3 (hNaDC3) gleichen.

Bei Vergleich der verschiedenen  $K_m$ -,  $I_{max}$ - und  $-I_{max}/K_m$ -Werte von Succinat in NaDC3-exprimierenden Oozyten (siehe **Tab. 4.2**) fällt tatsächlich auf, dass hNaDC3- und fNaDC3-exprimierende Oozyten ähnliche Affinitäten gegenüber Succinat aufweisen. Es zeigen sich  $K_m$ -Werte zwischen 8 und 60  $\mu$ M. Bezüglich der  $I_{max}$ -Werte ergeben sich trotz starker Schwankungen innerhalb der Spezies insgesamt höhere  $I_{max}$ -Werte und höhere  $-I_{max}/K_m$ -Werte bei fNaDC3-exprimierenden Oozyten im Vergleich zu hNaDC3-exprimierenden Oozyten.

Dieses Verhalten spiegelt sich auch bei den hier ermittelten Werten für NCG wider: fNaDC3- und hNaDC3-exprimierende Oozyten zeigen  $K_m$ -Werte von ca. 27 bzw. 24  $\mu$ M und ein  $-I_{max}/K_m$ -Verhältnis von ca. 6 bzw. 2 nA/ $\mu$ M (siehe **Tab. 3.6**).

**Tab. 4.2** Vergleich der Succinat-Interaktionen hNaDC3- und fNaDC3-exprimierender Oozyten bei -60mV

Spezies	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$I_{\text{max}}$ (nA)	$-I_{\text{max}}/K_m$ ( $\mu\text{M}/\text{nA}$ )	Referenz
Mensch	$25 \pm 16$	$-34,5 \pm 8,96$	1,38	Burckhardt et al. 2005
	$8,80 \pm 1,75$	$-71,42 \pm 3,77$	8,12	diese Arbeit
Flunder	$59,3 \pm 15$	$-160 \pm 15$	2,70	Burckhardt et al. 2000
	$31 \pm 9$	$-54,87 \pm 5,22$	1,77	Burckhardt et al. 2002
	$8,11 \pm 2,55$	$-171,51 \pm 8,39$	21,15	diese Arbeit

### **4.3 Interaktion von N-Carbamylglutamat mit dem humanen NaCT**

Zur Untersuchung der Interaktion von N-Carbamylglutamat (NCG) mit dem humanen natriumabhängigen Citrat-Transporter (hNaCT) wurde der NCG-induzierte Strom mit den Succinat- und Citrat-induzierten Strömen verglichen. Da der hNaCT einen  $IC_{50}$ -Wert von  $0,69 \pm 0,15$  mM für Citrat, seinem prototypischen Substrat, und von  $1,92 \pm 0,48$  mM für Succinat aufweist (Inoue et al. 2002), wurden zur Sicherung ausreichend hoher Stromamplituden eine 1 mM Citrat-Lösung und jeweils 5 mM Succinat- und NCG-Lösungen verwendet.

Während Succinat und Citrat in NaCT-exprimierenden Oozyten Substrat-abhängige Ströme induzierten, konnte für NCG kein solcher nachgewiesen werden. Die Gabe von 5 mM NCG generierte sowohl in *mocks* als auch in hNaCT-exprimierenden Oozyten nur geringe Ströme mit Stromamplituden  $<1$  nA. Zwar lässt sich trotzdem ein möglicher Transport von NCG über den hNaCT nicht völlig ausschließen, da die 1 mM Citrat- und 5 mM Succinat-vermittelten Einwärtsströme in hNaCT-exprimierenden Oozyten zwar signifikant von *mocks* verschieden waren, aber insgesamt nur geringe Amplituden von  $-9,96 \pm 4,63$  nA und  $-11,22 \pm 5,61$  nA aufwiesen. Ein Transport ist aber sehr unwahrscheinlich.

### **4.4 Ausblick auf weitere Forschung**

#### **4.4.1 Mögliche Transporter für Resorption, Verteilung und Elimination von NCG**

Die bisherigen Versuche zeigten, dass NCG ein Substrat des NaDC3, nicht jedoch des NaCT ist. Die Affinität bzw. der  $K_m$ -Wert von NCG liegt im Bereich der therapeutischen

Plasmakonzentration von NCG, gemessen bei gesunden Probanden und Patienten, denen NCG verabreicht wurde (Orphan Europe 2010).

Da NCG oral verabreicht wird, muss es enteral resorbiert werden. Bisher ist ungeklärt, über welche Transporter NCG im Darm resorbiert und zu seinem Wirkort, der Leber, gebracht und in diese aufgenommen wird. Überschüssiges NCG wird unverändert zu 60% enteral und zu 5-9% renal ausgeschieden. Die renale Clearance übersteigt um den Faktor 2-3,5 die glomeruläre Filtrationsrate eines gesunden Erwachsenen, sodass neben Transportern für die intestinale und hepatische Resorption zudem solche für die biliäre und renale Sekretion vorhanden sein müssen (Orphan Europe 2010; Elinder et al. 2014).

Die RNA des hNaDC3 lässt sich in Leber, Pankreas, Niere und Plazenta nachweisen (siehe **Abb. 1.4**; Wang et al. 2000). Während sie in den Nieren in den für die Sekretion zuständigen proximalen Tubuluszellen exprimiert ist, kommt sie in der Leber hauptsächlich in perivenösen Hepatozyten vor (Chen et al. 1999). Da der Harnstoffzyklus jedoch in periportalen Hepatozyten stattfindet (Häussinger 1990), wäre der NaDC3 mit seiner Lokalisation nicht an der hepatischen Resorption von NCG beteiligt. Zwar kann ein geringer mRNA-Expressionsgrad auch mit einem hohen Proteinexpressionsgrad einhergehen, wie Cheng et al. (2016) zeigten, jedoch ist für ein spezifisches Gen das Protein/mRNA-Verhältnis in allen menschlichen Zellen gleich (Edfors et al. 2016). Da der NaDC3 einen hohen mRNA-Expressionsgrad in perivenösen Hepatozyten aufweist, ist daher ein Vorkommen unterhalb der Nachweisgrenze in periportalen Hepatozyten unwahrscheinlich. Somit ist der NaDC3 nicht an der hepatischen Aufnahme von NCG beteiligt. Im Darm konnte keine RNA des NaDC3 nachgewiesen werden, sodass für die intestinale und hepatische Aufnahme und die fäkale Clearance ebenfalls andere Transporter verantwortlich sein müssen.

Bisher konnte nur nachgewiesen werden, dass die in der Niere vorkommenden humanen Organische-Anionen-Transporter 1 (basolateral) und 4 (apikal) NCG effektiv transportieren (Schwob et al. 2014). Der hauptsächlich in Hepatozyten und gering im Ileum exprimierte hOAT2 (Übersichten in Koepsell 2013) und das nur in Hepatozyten exprimierte humane Organische-Anionen-transportierende Polypeptid 1B3 (hOATP1B3) (Übersichten in Hagenbuch und Stieger 2013) interagieren nur marginal mit NCG, sodass ein Transport von NCG über diese Transporter unwahrscheinlich erscheint (Schwob et al. 2014).

Damit ist bisher nur die renale Clearance von NCG geklärt. Die renale Sekretion wird basolateral über hNaDC3 ( $K_m$  von  $27,20 \pm 4,86 \mu\text{M}$ ) und hOAT1 ( $IC_{50}$  von  $203 \pm 23 \mu\text{M}$ ) vermittelt, welche NCG aus dem Blut in die Zelle aufnehmen (Schwob et al. 2014). Wäh-

rend der NaDC3-Transport durch den von der Natrium-Kalium-ATPase aufgebauten elektrochemischen Natrium-Gradienten vermittelt wird, nutzt der OAT1 intrazelluläres  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ KG), welches er in Austausch mit NCG aus der Zelle in das Blut transportiert. Da das intrazelluläre  $\alpha$ KG durch den NaDC3 zur Verfügung gestellt wird (Kaufhold et al. 2011), ist der NaDC3 damit sowohl direkt durch den Transport von NCG als auch indirekt durch den Transport von  $\alpha$ KG an der renalen NCG-Ausscheidung beteiligt. Die Abgabe in den Primärharn wird durch den hOAT4 vermittelt. Da dieser ebenfalls ein Organischer-Anionen-Austauscher ist, wird im Rahmen der apikalen NCG-Sekretion ein Organisches Anion aus dem Primärharn rückresorbiert.

#### 4.4.2 hNaDC3 im Rahmen der Ausweitung der NCG-Anwendung

NCG ist für die Behandlung der primären und sekundären NAGS-Defizienz im Rahmen der Organoazidopathien Isovalerianazidurie, Methylmalonazidurie und Propionazidurie zugelassen (Häberle 2011). Da erste Symptome meist schon neonatal auftreten (Daniotti et al. 2011), spielt die Gabe von NCG ab der Geburt eine große Rolle.

Zerebrale MRTs der ersten Lebensstage von Neonaten mit einer CPS1-Defizienz lassen aber vermuten, dass hier Schäden schon *in utero* verursacht worden sind (Braissant 2010). Da die NAGS-Defizienz eine reduzierte Aktivität der CPS1 zur Folge hat, wäre dies auch für den NAGS-Mangel wahrscheinlich. Es gibt zudem Hinweise, dass die NAGS andere Funktionen als nur die Stimulation des Harnstoffzyklus bzw. der Citrullinbildung, einem Teilschritt des Harnstoffzyklus, ausführt. Dies betrifft z.B. die embryonale Entwicklung. So lässt sich die NAGS unabhängig von den Harnstoffzyklusenzymen CPS1 und OTC im embryonalen Mausstadium Tag 7 nachweisen (Ah Mew und Caldovic 2011). Van Leynseele et al. (2014) stellten die Vermutung auf, dass die extreme Seltenheit des NAGS-Mangels im Vergleich zu den anderen Harnstoffzyklusstörungen Resultat eines verringerten embryonalen Überlebens sein könnte.

Geht man also von einer überlebenswichtigen bisher noch unbekanntem Funktion der NAGS in der Embryonalentwicklung aus wäre eine Therapie *in utero* wichtig. Bezüglich Embryotoxizität und Fetotoxizität gilt NCG als sicher. In Tierexperimenten zeigten sich nur bei hohen maternal-toxischen Konzentrationen eine erhöhte Mortalität der Neugeborenen bei reduziertem Körpergewicht (Orphan Europe 2010), sodass eine Anwendung in der Schwangerschaft möglich wäre, wobei sich die Frage stellt, wie NCG zum Embryo transportiert wird. Mit der Lokalisation des hNaDC3 in der Bürstensaummembran maternal-

seitiger plazentärer Synzytiotrophoblasten (Ganapathy et al. 1988; Wang et al. 2000), der ersten Grenzschicht der Plazentaschranke (Walker et al. 2017) könnte der NaDC3 an dem Transport von NCG beteiligt sein.

Da der hNaDC3 bisher nur in der reifen postgestalen Plazenta nachgewiesen worden ist (Wang et al. 2000; Ganapathy et al. 1988), aber zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft ein unterschiedliches plazentäres Expressionsprofil an Membrantransportern vorliegt (Übersichten in Walker et al. 2017) und speziell für den hNaDC3 bekannt ist, dass er während des Geburtsvorgangs hochreguliert wird (Peng et al. 2011), wäre sein Expressionsmuster während der embryonalen Entwicklung zu eruieren.

Untersuchungen bezüglich der Sicherheit von NCG während der Schwangerschaft für Mutter und Kind und zur optimalen Dosierung müssten ebenfalls erfolgen.

Neben der Anwendung bei NAGS-Mangel untersuchten Chen et al. (2015) eine mögliche Anwendung von NCG bei einigen Tumorerkrankungen. NCG hemmt das Wachstum des duktales Adenokarzinoms des Pankreas. Bei einer nachgewiesenen besseren Verträglichkeit als übliche Chemotherapeutika könnte NCG eine Behandlungsalternative darstellen (Chen et al. 2015). Der NaDC3-Transporter könnte hierbei die NCG-Aufnahme in das Pankreas generieren. Bei einer solchen Indikationserweiterung müsste jedoch zunächst geklärt werden, in welchen Abschnitten und auf welcher Membran der hNaDC3 im Pankreas vorkommt (Wang et al. 2000).

## 5 Zusammenfassung

*N*-Carbamylglutamat (NCG) ist als Medikament Carbaglu® zur Therapie der primären und der sekundären *N*-Acetylglutamat-Synthetase-Defizienz (NAGS-Defizienz) im Rahmen der Organoazidopathien Isovalerialazidurie, Methylmalonazidurie und Propionazidurie zugelassen. Die Defizienz der NAGS führt zu einem Mangel an *N*-Acetylglutamat (NAG), dem natürlichen Aktivator des Harnstoffzyklus, und damit zu einer Reduktion der Ammoniumausscheidung. Die Gabe von NCG, einem stabilen strukturellen Analogon zu NAG, kann die CPS1 aktivieren und damit die Ammoniumausscheidung wieder möglich machen.

Während die Wirksamkeit von NCG wissenschaftlich untersucht und bestätigt ist, sind Resorption, Verteilung und Elimination von NCG weitgehend unbekannt. Da das dianionische NCG zu 30% intestinal resorbiert wird, hepatisch wirkt und zu 60% enteral und zu 5-9% renal unmetabolisiert ausgeschieden wird, müssen an der Distribution bzw. Verteilung im Körper intestinale, hepatische, biliäre und renale Transporter beteiligt sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von NCG mit den natriumabhängigen Dicarboxylat-Transportern NaDC3 und NaCT untersucht. Da die beiden Transporter elektrogen sind und eine Translokation von NCG mit dem Transport von Ladungen über die Zellmembran einhergeht, konnten die Interaktion elektrophysiologisch mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme untersucht werden. Als Expressionssystem dienten Oozyten von *Xenopus laevis*, denen die Transporter-kodierende cRNA injiziert worden war. Als Kontrolloozyten (*mocks*) wurden *Aqua dest.*-injizierte Oozyten verwendet.

Die Versuche identifizierten NCG als ein Substrat des menschlichen NaDC3-Transporters (hNaDC3). Der durch die Translokation resultierende Einwärtsstrom ist potentialabhängig mit höheren Stromamplituden bei Hyperpolarisation und niedrigeren Stromamplituden bei Depolarisation. Bei einem Umkehrpotential nahe dem Nernst-Potential für Natrium und Aufhebung nachweisbarer Einwärtsströme unter natriumfreien Bedingungen ist davon auszugehen, dass der Transport natriumvermittelt ist.

Die Gegenüberstellung der Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_m$ ) von Succinat (9  $\mu\text{M}$ ), dem prototypischen Substrat des NaDC3, NCG (27  $\mu\text{M}$ ) und NAG (130  $\mu\text{M}$ ) identifizierte NCG als hoch affines Substrat des hNaDC3. NAG stellt ein mittel affines Substrat dar. Die Effizienz, repräsentiert durch den  $-I_{\text{max}}/K_m$ -Wert, ist ebenfalls für Succinat am größten (8 nA/ $\mu\text{M}$ ), gefolgt von NCG (2 nA/ $\mu\text{M}$ ) und NAG (0,5 nA/ $\mu\text{M}$ ). Bezüglich des maximal-

induzierten Stromes ( $I_{\max}$ ) zeigen sich die drei Substrate dagegen mit Stromamplituden von -60 bis -70 nA vergleichbar.

Glutamat wurde als niedrig affines und niedrig effizientes Substrat mit einem  $K_m$ -Wert im millimolaren Bereich und einem  $-I_{\max}/K_m$ -Wert  $<0,1$  nA/ $\mu$ M identifiziert.

Im Rahmen der klinischen Anwendung kann bei einer freien NCG-Plasmaspitzenkonzentration von 9,5-25  $\mu$ M eine Beteiligung des hNaDC3 am ersten Schritt der renalen Sekretion, d. h. der Aufnahme über die basolaterale Membran in die proximalen Tubuluszellen, angenommen werden. Eine Medikamenteninteraktion zwischen NCG und anderen NaDC3-translozierten Medikamenten wie z.B. den Schwermetallchelatoren DMSA und DMPS ist vorstellbar. Auch eine Interaktion mit endogenen Substraten wie den Krebszykluszwischenprodukten ist wahrscheinlich.

NCG ist kein Substrat des hNaCT.

Damit zeigt diese Arbeit, dass der hNaDC3 an der renalen Sekretion von NCG beteiligt ist, der hNaCT dagegen nicht.

---

**Veröffentlichungen im Rahmen einer Erstautorenschaft**

**Teile dieser Dissertationsarbeit wurden bereits im Rahmen einer Erstautorenschaft veröffentlicht:**

Schwob E, Hagos Y, Burckhardt G, Burckhardt BC (2014): Transporters involved in renal excretion of *N*-carbamoylglutamate, an orphan drug to treat inborn *n*-acetylglutamate synthase deficiency. *Am J Physiol Renal Physiol* 307, F1373-F1379

**6 Literaturverzeichnis**

- Adam S, Champion H, Daly A, Dawson S, Dixon M, Dunlop C, Eardley J, Evans S, Ferguson C, Jankowski C et al. (2012): Dietary management of urea cycle disorders: UK practice. *J Hum Nutr Diet* 25, 398–404d
- Ah Mew N, Caldovic L (2011): N-acetylglutamate synthase deficiency: an insight into the genetics, epidemiology, pathophysiology, and treatment. *Appl Clin Genet* 4, 127–135
- Ah Mew N, McCarter R, Daikhin Y, Lichter-Konecki U, Nissim I, Yudkoff M, Tuchman M (2014): Augmenting Ureagenesis in Patients with Partial Carbamyl Phosphate Synthetase 1 Deficiency with N-carbamyl-L-glutamate. *J Pediatr* 165, 401–403
- Bachmann C, Krahenbuhl S, Colombo JP, Schubiger G, Jaggi KH, Tonz O (1981): N-Acetylglutamate Synthetase Deficiency: A Disorder of Ammonia Detoxication. *N Engl J Med* 304, 543
- Bai X, Chen X, Feng Z, Hou K, Zhang P, Fu B, Shi S (2006): Identification of Basolateral Membrane Targeting Signal of Human Sodium-Dependent Dicarboxylate Transporter 3. *J Cell Physiol* 206, 821–830
- Bai X-Y, Chen X, Sun A-Q, Feng Z, Hou K, Fu B (2007): Membrane topology structure of human high-affinity, sodium-dependent dicarboxylate transporter. *FASEB J* 21, 2409–2417
- Barnard EA, Miledi R, Sumikawa K (1982): Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 215, 241–246
- Bento JL, Palmer ND, Zhong M, Roh B, Lewis JP, Wing MR, Pandya H, Freedman BI, Langefeld CD, Rich SS et al. (2008): Heterogeneity in gene loci associated with type 2 diabetes on human chromosome 20q13.1. *Genomics* 92, 226–234
- Bergeron MJ, Cl  men  on B, Hediger MA, Markovich D (2013): SLC13 family of Na<sup>+</sup>-coupled di- and tri-carboxylate/sulfate transporters. *Mol Aspects Med* 34, 299–312
- Bisswanger H: *Enzyme: Struktur, Kinetik und Anwendungen*. Wiley-VCH, Weinheim 2015
- Braissant O (2010): Current concepts in the pathogenesis of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab* 100, S3-S12
- Br  er S (2010): *Xenopus laevis* Oocytes. *Methods Mol Biol* 637, 295–310
- Brouwer KLR, Keppler D, Hoffmaster KA, Bow DAJ, Cheng Y, Lai Y, Palm JE, Stieger B, Evers R (2013): *In Vitro* Methods to Support Transporter Evaluation in Drug Discovery and Development. *Clin Pharmacol Ther* 94, 95–112
- Buckingham SD, Pym L, Sattelle DB (2006): Oocytes as an Expression System for Studying Receptor/Channel Targets of Drugs and Pesticides. *Methods Mol Biol* 322, 331–345
- Burckhardt BC, Steffgen J, Langheit D, M  ller GA, Burckhardt G (2000): Potential-dependent steady-state kinetics of a dicarboxylate transporter cloned from winter flounder kidney. *Pflugers Arch* 441, 323–330

- Burckhardt BC, Drinkuth B, Menzel C, König A, Steffgen J, Wright SH, Burckhardt G (2002): The Renal Na<sup>+</sup>-Dependent Dicarboxylate Transporter, NaDC-3, Translocates Dimethyl- and Disulphydryl-Compounds and Contributes to Renal Heavy Metal Detoxification. *J Am Soc Nephrol* 13, 2628–2638
- Burckhardt BC, Burckhardt G (2003): Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146, 95–158
- Burckhardt BC, Lorenz J, Kobbe C, Burckhardt G (2005): Substrate specificity of the human renal sodium dicarboxylate cotransporter, hNaDC-3, under voltage-clamp conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F792-F799
- Caldovic L, Morizono H, Tuchman M (2007): Mutations and Polymorphisms in the Human N-Acetylglutamate Synthase (NAGS) Gene. *Hum Mutat* 28, 754–759
- Caldovic L, Ah Mew N, Shi D, Morizono H, Yudkoff M, Tuchman M (2010): N-acetylglutamate synthase: Structure, function and defects. *Mol Genet Metab* 100, S13-S19
- Cartagena A, Prasad AN, Rupa CA, Strong M, Tuchman M, Ah Mew N, Prasad C (2013): Recurrent Encephalopathy: NAGS (N-Acetylglutamate Synthase) Deficiency in Adults. *Can J Neurol Sci* 40, 3–9
- Chen C-T, Chen Y-C, Yamaguchi H, Hung M-C (2015): Carglumic acid promotes apoptosis and suppresses cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Am J Cancer Res* 5, 3560–3569
- Chen X, Tsukaguchi H, Chen XZ, Berger UV, Hediger MA (1999): Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. *J Clin Invest* 103, 1159–1168
- Cheng Z, Teo G, Krueger S, Rock TM, Koh HWL, Choi H, Vogel C (2016): Differential dynamics of the mammalian mRNA and protein expression response to misfolding stress. *Mol Syst Biol* 12, 1–12
- Cleland WW (1967): The statistical analysis of enzyme kinetic data. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 29, 1–32
- Cohen A, Zilberberg N (2006): Fluctuations in *Xenopus* oocytes protein phosphorylation levels during two-electrode voltage clamp measurements. *J Neurosci Methods* 153, 62–70
- Coons DM, Boulton RB, Bisson LF (1995): Computer-Assisted Nonlinear Regression Analysis of the Multicomponent Glucose Uptake Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177, 3251–3258
- Costa PF, Emilio MG, Fernandes PL, Ferreira HG, Ferreira KG (1989): Determination of ionic permeability coefficients of the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes under voltage clamp. *J Physiol* 413, 199–211
- Daniotti M, La Marca G, Fiorini P, Filippi L (2011): New developments in the treatment of hyperammonemia: emerging use of carglumic acid. *Int J Gen Med* 4, 21–28
- Dascal N (2001): Voltage Clamp Recordings from *Xenopus* Oocytes. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 6, 6.12.1-6.12.20

- Dowd JE, Riggs DS (1965): A Comparison of Estimates of Michaelis-Menten Kinetic Constants from Various Linear Transformations. *J Biol Chem* 240, 863–869
- Dumont JN (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136, 153–179
- Edfors F, Danielsson F, Hallström BM, Käll L, Lundberg E, Pontén F, Forsström B, Uhlén M (2016): Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. *Mol Syst Biol* 12, 1–10
- Elinder C-G, Bárány P, Heimbürger O (2014): The Use of Estimated Glomerular Filtration Rate for Dose Adjustment of Medications in the Elderly. *Drugs Aging* 31, 493–499
- EMA (2004): Carbaglu: EPAR- Scientific Discussion [[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000461/WC500021582.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000461/WC500021582.pdf) (Zugriff am 22.06.2017)]
- Etcheverry A, Aubry M, Tayrac M de, Vauleon E, Boniface R, Guenot F, Saikali S, Hamlat A, Riffaud L, Menei P et al. (2010): DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics* 11, 1–11
- Ganapathy V, Ganapathy ME, Tirupathi C, Miyamoto Y, Mahesh VB, Leibach FH (1988): Sodium-gradient-driven, high-affinity, uphill transport of succinate in human placental brush-border membrane vesicles. *Biochem J* 249, 179–184
- Gebhardt B, Vlaho S, Fischer D, Sewell A, Böhles H (2003): *N*-carbamylglutamate enhances ammonia detoxification in a patient with decompensated methylmalonic aciduria. *Mol Genet Metab* 79, 303–304
- Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM et al. (2010): Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 9, 215–236
- Gopal E, Miyauchi S, Martin PM, Ananth S, Srinivas SR, Smith SB, Prasad PD, Ganapathy V (2007): Expression and functional features of NaCT, a sodium-coupled citrate transporter, in human and rat livers and cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G402–G408
- Grewer C, Gameiro A, Mager T, Fendler K (2013): Electrophysiological Characterization of Membrane Transport Proteins. *Annu Rev Biophys* 42, 95–120
- Guan B, Chen X, Zhang H (2013): Two-electrode voltage clamp. *Methods Mol Biol* 998, 79–89
- Häberle J (2011): Role of carnitine in the treatment of acute hyperammonemia due to *N*-acetylglutamate synthase deficiency. *Ther Clin Risk Manag* 7, 327–332
- Häberle J, Boddaert N, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Huemer M, Karall D, Martinelli D, Crespo PS, Santer R et al. (2012): Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet J Rare Dis* 7, 1–30
- Hagenbuch B, Stieger B (2013): The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol Aspects Med* 34, 396–412

- Hagos Y, Burckhardt BC, Larsen A, Mathys C, Gronow T, Bahn A, Wolff NA, Burckhardt G, Steffgen J (2004): Regulation of sodium-dicarboxylate cotransporter-3 from winter flounder kidney by protein kinase C. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F86-F93
- Häussinger D (1990): Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem J* 267, 281–290
- Hediger MA, Clémenton B, Burrier RE, Bruford EA (2013): The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Mol Aspects Med* 34, 95–107
- Hermey G, Mahlke C, Schwake M, Sommer T: *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010
- Hillgren KM, Keppler D, Zur AA, Giacomini KM, Stieger B, Cass CE, Zhang L (2013): Emerging Transporters of Clinical Importance: An Update From the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther* 94, 52–63
- Hovgaard L, Frokjaer S, van de Weert M: *Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins*. 2. Auflage; Taylor & Francis, Boca Raton 2012
- 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<sup>+</sup>-Dependent High-Affinity Dicarboxylate Transporter NaDC3 and Its Relevance to the Expression of the Transporter in the Brain. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 392–403
- Inoue K, Zhuang L, Ganapathy V (2002): Human Na<sup>+</sup>-coupled citrate transporter: primary structure, genomic organization, and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 465–471
- Inoue K, Zhuang L, Maddox DM, Smith SB, Ganapathy V (2003): Human sodium-coupled citrate transporter, the orthologue of *Drosophila* Indy, as a novel target for lithium action. *Biochem J* 374, 21–26
- Inoue K, Fei Y-J, Zhuang L, Gopal E, Miyauchi S, Ganapathy V (2004): Functional features and genomic organization of mouse NaCT, a sodium-coupled transporter for tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biochem J* 378, 949–957
- Kasapkar CS, Ezgu FS, Okur I, Tumer L, Biberoglu G, Hasanoglu A (2011): *N*-carbamylglutamate treatment for acute neonatal hyperammonemia in isovaleric acidemia. *Eur J Pediatr* 170, 799–801
- Kaufhold M, Schulz K, Breljak D, Gupta S, Henjakovic M, Krick W, Hagos Y, Sabolic I, Burckhardt BC, Burckhardt G (2011): Differential interaction of dicarboxylates with human sodium-dicarboxylate cotransporter 3 and organic anion transporters 1 and 3. *Am J Physiol Renal Physiol* 301, F1026-F1034
- Kim JH, Kim Y-M, Lee BH, Cho JH, Kim G-H, Choi J-H, Yoo H-W (2015): Short-term efficacy of *N*-carbamylglutamate in a patient with *N*-acetylglutamate synthase deficiency. *J Hum Genet* 60, 395–397
- Kim S, Paik WK, Cohen PP (1972): Ammonia Intoxication in Rats: Protection by *N*-Carbamoyl-*L*-Glutamate Plus *L*-Arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 3530–3533

- Koepsell H (2013): The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med* 34, 413–435
- Kölker S, Garcia-Cazorla A, Valayannopoulos V, Lund AM, Burlina AB, Sykut-Cegielska J, Wijburg FA, Teles EL, Zeman J, Dionisi-Vici C et al. (2015a): The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 1: the initial presentation. *J Inher Metab Dis* 38, 1041–1057
- Kölker S, Valayannopoulos V, Burlina AB, Sykut-Cegielska J, Wijburg FA, Teles EL, Zeman J, Dionisi-Vici C, Barić I, Karall D et al. (2015b): The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype. *J Inher Metab Dis* 38, 1059–1074
- Kyte J: *Structure in Protein Chemistry*. Taylor & Francis, Boca Raton 2006
- Lee B, Goss J (2001): Long-term correction of urea cycle disorders. *J Pediatr* 138, S62–S71
- Liu W, Hong Q, Bai X-Y, Fu B, Xie Y, Zhang X, Li J, Shi S, Lv Y, Sun X et al. (2010): High-affinity Na<sup>+</sup>-dependent dicarboxylate cotransporter promotes cellular senescence by inhibiting SIRT1. *Mech Ageing Dev* 131, 601–613
- Liu XS, Liu XJ (2006): Oocyte isolation and enucleation. *Methods Mol Biol* 322, 31–41
- Maeda K, Sugiyama Y (2013): Transporter biology in drug approval: Regulatory aspects. *Mol Aspects Med* 34, 711–718
- Marin JGG (2012): Plasma Membrane Transporters in Modern Liver Pharmacology. *Scientifica (Cairo)* 2012, 1–15
- Markovich D, Murer H (2004): The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch* 447, 594–602
- Markovich D (2008): Expression cloning and radiotracer uptakes in *Xenopus laevis* oocytes. *Nat Protoc* 3, 1975–1980
- Martín-Hernández E, Aldámiz-Echevarría L, Castejón-Ponce E, Pedrón-Giner C, Couce ML, Serrano-Nieto J, Pintos-Morell G, Bélanger-Quintana A, Martínez-Pardo M, García-Silva MT et al. (2014): Urea cycle disorders in Spain: an observational, cross-sectional and multicentric study of 104 cases. *Orphanet J Rare Dis* 9, 1–14
- Matoori S, Leroux J-C (2015): Recent advances in the treatment of hyperammonemia. *Adv Drug Deliv Rev* 90, 55–68
- Morrissey KM, Stocker SL, Wittwer MB, Xu L, Giacomini KM (2013): Renal Transporters in Drug Development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53, 503–529
- Orphan Europe (2010): Carglumic Acid. NDA 22-562. Briefing Document [<https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/EndocrinologicandMetabolicDrugsAdvisoryCommittee/UCM196838.pdf> (Zugriff am 01.11.2016)]
- Oshiro N, Pajor AM (2005): Functional characterization of high-affinity Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporter found in *Xenopus laevis* kidney and heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1159–C1168

- Pajor AM, Sun N (1996): Functional differences between rabbit and human Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransporters, NaDC-1 and hNaDC-1. *Am J Physiol* 271, F1093-F1099
- Pajor AM, Hirayama BA, Loo DDF (1998): Sodium and Lithium Interactions with the Na<sup>+</sup>/Dicarboxylate Cotransporter. *J Biol Chem* 273, 18923–18929
- Pajor AM (2006): Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflugers Arch* 451, 597–605
- Pajor AM (2014): Sodium-coupled dicarboxylate and citrate transporters from the SLC13 family. *Pflugers Arch* 466, 119–130
- Peng H-H, Kao C-C, Chang S-D, Chao A-S, Chang Y-L, Wang C-N, Cheng P-J, Lee Y-S, Wang T-H, Wang H-S (2011): The effects of labor on differential gene expression in parturient women, placentas, and fetuses at term pregnancy. *Kaohsiung J Med Sci* 27, 494–502
- Polder HR, Weskamp M, Linz K, Meyer R: Voltage-Clamp and Patch-Clamp Techniques. In: Dhein S, Mohr FW, Delmar M (Hrsg.): *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Springer-Verlag, Heidelberg 2005, 272–323
- Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B et al. (2011): The human serum metabolome. *PLoS ONE* 6, 1–23
- Reigstad H, Woldseth B, Häberle J (2017): Normal Neurological Development During Infancy Despite Massive Hyperammonemia in Early Treated NAGS Deficiency. *JIMD Rep*, 1–3
- Rosenthal HE (1967): A Graphic Method for the Determination and Presentation of Binding Parameters in a Complex System. *Anal Biochem* 20, 525–532
- Schwob E, Hagos Y, Burckhardt G, Burckhardt BC (2014): Transporters involved in renal excretion of *N*-carbamoylglutamate, an orphan drug to treat inborn *n*-acetylglutamate synthase deficiency. *Am J Physiol Renal Physiol* 307, F1373-F1379
- Senkevitch E, Cabrera-Luque J, Morizono H, Caldovic L, Tuchman M (2012): A novel biochemically salvageable animal model of hyperammonemia devoid of *N*-acetylglutamate synthase. *Mol Genet Metab* 106, 160–168
- Sigel E, Minier F (2005): The *Xenopus* oocyte: System for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol Nutr Food Res* 49, 228–234
- Sobczak K, Bangel-Ruland N, Leier G, Weber W-M (2010): Endogenous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Methods* 51, 183–189
- Steffgen J, Burckhardt BC, Langenberg C, Kühne L, Müller GA, Burckhardt G, Wolff NA (1999): Expression Cloning and Characterization of a Novel Sodium-Dicarboxylate Cotransporter from Winter Flounder Kidney. *J Biol Chem* 274, 20191–20196
- Stellmer F, Keyser B, Burckhardt BC, Koepsell H, Streichert T, Glatzel M, Jabs S, Thiem J, Herdering W, Koeller DM et al. (2007): 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *J Mol Med (Berl)* 85, 763–770
- Summar ML, Koelker S, Freedenberg D, Le Mons C, Haberle J, Lee H-S, Kirmse B (2013): The incidence of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab* 110, 179–180

- Tavazzi B, Lazzarino G, Leone P, Amorini AM, Bellia F, Janson CG, Di Pietro V, Ceccarelli L, Donzelli S, Francis JS et al. (2005): Simultaneous high performance liquid chromatographic separation of purines, pyrimidines, *N*-acetylated amino acids, and dicarboxylic acids for the chemical diagnosis of inborn errors of metabolism. *Clin Biochem* 38, 997–1008
- Tuchman M, Caldovic L, Daikhin Y, Horyn O, Nissim I, Nissim I, Korson M, Burton B, Yudkoff M (2008): *N*-carbamylglutamate Markedly Enhances Ureagenesis in *N*-acetylglutamate Deficiency and Propionic Acidemia as Measured by Isotopic Incorporation and Blood Biomarkers. *Pediatr Res* 64, 213–217
- Valayannopoulos V, Baruteau J, Delgado MB, Cano A, Couce ML, Del Toro M, Donati MA, Garcia-Cazorla A, Gil-Ortega D, Gomez-de Quero P et al. (2016): Carglumic acid enhances rapid ammonia detoxification in classical organic acidurias with a favourable risk-benefit profile: a retrospective observational study. *Orphanet J Rare Dis* 11, 1–11
- van Leynseele A, Jansen A, Goyens P, Martens G, Peeters S, Jonckheere A, Meirleir L de (2014): Early treatment of a child with NAGS deficiency using *N*-carbamyl glutamate results in a normal neurological outcome. *Eur J Pediatr* 173, 1635–1638
- Vasilets LA, Schwarz W (1992): Regulation of endogenous and expressed  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Pumps in *Xenopus* Oocytes by Membrane Potential and Stimulation of Protein Kinases. *J Membr Biol* 125, 119–132
- Vernon HJ (2015): Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy. *JAMA Pediatr* 169, 778–782
- Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Bröer S (2000): The Use of *Xenopus laevis* Oocytes for the Functional Characterization of Heterologously Expressed Membrane Proteins. *Cell Physiol Biochem* 10, 1–12
- Waisbren SE, Gropman AL, Batshaw ML (2016): Improving long term outcomes in urea cycle disorders-report from the Urea Cycle Disorders Consortium. *J Inherit Metab Dis* 39, 573–584
- Walker N, Filis P, Soffientini U, Bellingham M, O'Shaughnessy PJ, Fowler PA (2017): Placental transporter localization and expression in the Human: the importance of species, sex, and gestational age differences. *Biol Reprod* 96, 733–742
- Walterfang M, Bonnot O, Mocellin R, Velakoulis D (2013): The neuropsychiatry of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 36, 687–702
- 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  $\text{Na}^+$ -dependent high-affinity dicarboxylate transporter. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C1019-C1030
- Weber W (1999): Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* 1421, 213–233
- Yodoya E, Wada M, Shimada A, Katsukawa H, Okada N, Yamamoto A, Ganapathy V, Fujita T (2006): Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons. *J Neurochem* 97, 162–173

## Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Prof. Dr. phil. nat. B. C. Burckhardt danken. Sie stellte mir nicht nur das Thema zur Verfügung, sondern half mir auch bei der praktischen Umsetzung der Fragestellung.

Sie stand mir während der Versuche und während des Verfassens der Promotionsarbeit zur Seite und unterstützte mich darin, die gewonnenen Daten bei den Göttinger Transporttagen und auf dem Kongress für Nephrologie in Berlin zu präsentieren und innerhalb des American Journals of Physiology - Renal Physiology - zu veröffentlichen. Hierbei möchte ich auch noch einmal herzlich Prof. Dr. med. em. G. Burckhardt danken, welcher mich bei diesen Vorhaben ebenfalls unterstützte.

Ein weiterer Dank gilt dem gesamten Team und allen Mitarbeitern des Instituts für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie, welche mich freundlich aufnahmen und mich unterstützten. Dabei möchte ich mich im Besonderen bei Frau Gesche Dahlmeier und Frau Andrea Paluschkiwitz bedanken, die mir die RNA zur Verfügung stellten, und bei Herrn Reinhard Schirmer, der mich bei der Anwendung der Gerätschaften und Gebrauchsgegenstände unterstützte.