

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie

(Prof. Dr. med. G. Burckhardt)

im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die pH-Abhängigkeit des NaDC3-Transporters

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Astrid Sophie Hoffmann

aus

Bremen

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

Referent/in: Prof. Dr. Birgitta-Christina Burckhardt

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Mladen Tzvetkov

Datum der mündlichen Prüfung: 4.12.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die pH-Abhängigkeit des NaDC3-Transporters" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 15.01.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Nieren.....	1
1.1.1 Aufgaben und Funktionen.....	1
1.1.2 Transportprozesse in den proximalen Tubuluszellen	2
1.2 Humaner Natrium-abhängiger Dicarboxylattransporter 3 (hNaDC3)	3
1.2.1 Zugehörigkeit zur SLC13-Familie	3
1.2.2 Aufbau und Struktur	6
1.2.3 Substrate.....	7
1.3 <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten als Expressionssystem.....	9
1.3.1 Eignung	9
1.3.2 Entwicklung und Morphologie	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Verwendung von <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten als Expressionssystem	11
2.1.1 Überblick über den zeitlichen Ablauf der Versuche.....	11
2.1.2 Entnahme und Selektion der Oozyten.....	12
2.1.3 Injektion der cRNA in Oozyten	14
2.2 Lösungen.....	15
2.2.1 Oozyten-Ringer (ORi): Grundrezeptur	15
2.2.2 Calcium-freier Oozyten-Ringer (Calcium-freier ORi)	16
2.2.3 Oozyten-Ringer zur Aufbewahrung der Oozyten	16
2.2.4 Oozyten-Ringer und Testsubstanzen	16
2.2.5 Natrium-freier Oozyten-Ringer (Natrium-freier ORi).....	17
2.2.6 Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (CCCP)	17
2.3 Chemikalien	18
2.4 Geräte und Materialien	19
2.5 Elektrophysiologische Messungen.....	21
2.5.1 Prinzip der <i>Two-Electrode-Voltage-Clamp</i> (TEVC)	21
2.5.2 Aufbau der Messapparatur	22
2.5.3 Durchführung der elektrophysiologischen Messungen	23
2.6 Programme zur Auswertung der Daten.....	25

3 Ergebnisse.....	26
3.1 Methodenvalidierung: Überprüfung einer erfolgreichen Expression	26
3.2 pH-Reihe mit Succinat und Citrat.....	30
3.2.1 pH-Abhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms	30
3.2.2 pH-Abhängigkeit des Citrat-vermittelten Stroms	33
3.2.3 Vergleich der pH-Reihen von Succinat und Citrat	35
3.3 Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) von Succinat und Citrat bei pH 6,5 und pH 7,5.....	36
3.3.1 Konzentrations- und pH-Abhängigkeit Succinat-vermittelter Ströme	36
3.3.2 Konzentrations- und pH-Abhängigkeit Citrat-vermittelter Ströme	43
3.3.3 Vergleich der Michaelis-Menten-Konstanten von Succinat und Citrat.....	50
3.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Natriumabhängigkeit Substrat-vermittelter Ströme.....	51
3.4.1 Natriumabhängigkeit der Succinat- bzw. Citrat-vermittelten Ströme bei pH 6,5 und pH 7,5 bei Ersatz des Natriums durch NMDG oder Cholin	51
3.4.2 Michaelis-Menten-Konstanten von Natrium bei pH 6,5 und pH 7,5.....	63
3.5 Einfluss von Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (CCCP) als Protonophor.....	70
4 Diskussion	73
4.1 Vorbemerkungen zur verwendeten Methode.....	73
4.2 pH-Reihe mit Succinat und Citrat.....	75
4.3 K_m -Bestimmung für Succinat und Citrat	77
4.4 Succinat- und Citrat-vermittelte Ströme bei Ersatz von Natrium.....	78
4.5 Einfluss von CCCP	80
4.6 pH-Effekt auf das Transportprotein	81
4.7 Ausblick	81
5 Zusammenfassung	84
6 Literaturverzeichnis	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Kopplung der organischen Anionentransporter (OATs) an die Natrium-abhängigen Dicarboxylattransporter zur Ausscheidung von Fremdstoffen, Stoffwechselendprodukten und Pharmaka in einer proximalen Tubuluszelle	3
Abbildung 2:	Vergleich der Aminosäuresequenzen des hNaDC3 und des rNaDC3	7
Abbildung 3:	Zeitlicher Verlauf von der Entnahme der Oozyten bis zur elektrophysiologischen Messung	12
Abbildung 4a, b, c:	<i>Xenopus laevis</i>	12
Abbildung 5a, b:	Situs intraoperativ.....	13
Abbildung 6a, b, c:	Injektion der Oozyten	15
Abbildung 7:	Schaltskizze der <i>Two-Electrode-Voltage-Clamp</i>	21
Abbildung 8:	Versuchsaufbau	23
Abbildung 9a, b:	Originalregistrierungen der Succinat-abhängigen Depolarisation im <i>Current-Clamp-Modus</i> und des Succinat-abhängigen Stroms im <i>Voltage-Clamp-Modus</i>	28
Abbildung 10:	Vergleich der Depolarisation im <i>Current-Clamp-Modus</i> und des Succinat-abhängigen Stroms im <i>Voltage-Clamp-Modus</i> bei -60 mV	29
Abbildung 11:	Vergleich der Succinat-vermittelten Depolarisationen und Einwärtsströme bei pH 7,5.....	30
Abbildung 12:	pH-Abhängigkeit der Succinat-vermittelten Ströme NaDC3-exprimierender und Wasser-injizierter Oozyten	31
Abbildung 13:	pH-Abhängigkeit des Citrat-vermittelten Stroms.....	33
Abbildung 14:	Vergleich der pH-Reihen von Succinat und Citrat.....	35
Abbildung 15:	Originalregistrierung des Succinat-vermittelten Stroms in Abhängigkeit von aufsteigenden Succinatkonzentrationen bei pH 7,5	36
Abbildung 16:	Succinat-vermittelter Strom in Abhängigkeit von aufsteigenden Succinatkonzentrationen bei pH 6,5.....	37
Abbildung 17:	Auftragung des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 6,5 nach Eadie-Hofstee.....	38
Abbildung 18:	Succinat-vermittelter Strom in Abhängigkeit von aufsteigenden Succinatkonzentrationen bei pH 7,5.....	39
Abbildung 19:	Auftragung des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 7,5 nach Eadie-Hofstee.....	40
Abbildung 20:	Halblogarithmische Darstellung der Succinat-vermittelten Ströme in Abhängigkeit von der extrazellulären Succinatkonzentration bei pH 6,5 und pH 7,5	41
Abbildung 21a, b:	Vergleich der Einzelwerte von K_m und I_{max} für Succinat bei pH 6,5 und pH 7,5	42
Abbildung 22:	Vergleich der Mittelwerte von K_m und I_{max} für Succinat bei pH 6,5 und pH 7,5	43

Abbildung 23:	Citrat-vermittelter Strom in Abhängigkeit von aufsteigenden Citratkonzentrationen bei pH 6,5	44
Abbildung 24:	Auftragung des Citrat-vermittelten Stroms bei pH 6,5 nach Eadie-Hofstee.....	45
Abbildung 25:	Citrat-vermittelter Strom in Abhängigkeit von aufsteigenden Citratkonzentrationen bei pH 7,5	46
Abbildung 26:	Auftragung des Citrat-vermittelten Stroms bei pH 7,5 nach Eadie-Hofstee.....	47
Abbildung 27:	Halblogarithmische Darstellung der Citrat-vermittelten Ströme in Abhängigkeit von der extrazellulären Citratkonzentration bei pH 6,5 und pH 7,5	48
Abbildung 28a, b:	Vergleich der Einzelwerte von K_m und I_{max} für Citrat bei pH 6,5 und pH 7,5	49
Abbildung 29:	Vergleich der Mittelwerte von K_m und I_{max} für Citrat bei pH 6,5 und pH 7,5	50
Abbildung 30:	Vergleich der K_m für Succinat und Citrat bei pH 6,5 und pH 7,5	51
Abbildung 31:	Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms von Oozyten mit Expression des NaDC3 und von Wasser-injizierten Oozyten bei Ersatz des Natriums durch NMDG bei pH 6,5.....	53
Abbildung 32:	Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms von Oozyten mit Expression des NaDC3 und von Wasser-injizierten Oozyten bei Ersatz des Natriums durch NMDG bei pH 7,5.....	54
Abbildung 33:	Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms von Oozyten mit Expression des NaDC3 und von Wasser-injizierten Oozyten bei Ersatz des Natriums durch Cholin bei pH 6,5	55
Abbildung 34:	Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms von Oozyten mit Expression des NaDC3 und von Wasser-injizierten Oozyten bei Ersatz des Natriums durch Cholin bei pH 7,5	56
Abbildung 35a, b:	Vergleich des Succinat-vermittelten Stroms bei Ersatz des Natriums durch NMDG oder Cholin bei pH 6,5 und pH 7,5	58
Abbildung 36:	Natriumabhängigkeit des Citrat-vermittelten Stroms von Oozyten mit Expression des NaDC3 und von Wasser-injizierten Oozyten bei Ersatz des Natriums durch NMDG bei pH 6,5.....	60
Abbildung 37a, b:	Vergleich der Natriumabhängigkeit von Succinat-vermittelten und Citrat-vermittelten Strömen bei pH 6,5 und pH 7,5	62
Abbildung 38:	Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 6,5	64
Abbildung 39:	Auftragung der Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 6,5 nach Eadie-Hofstee.....	64
Abbildung 40:	Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 7,5	65
Abbildung 41:	Auftragung der Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 7,5 nach Eadie-Hofstee.....	66
Abbildung 42:	Halblogarithmische Darstellung der Succinat-vermittelten Ströme in Abhängigkeit von der extrazellulären Natriumkonzentration bei pH 6,5 und pH 7,5.....	67

Abbildung 43a, b:	Vergleich der Einzelwerte von K_m und I_{max} für Natrium bei pH 6,5 und pH 7,5	68
Abbildung 44:	Vergleich der Mittelwerte von K_m und I_{max} für Natrium bei pH 6,5 und pH 7,5	69
Abbildung 45:	Originalregistrierung des Succinat-vermittelten Stroms bei Perfusion mit Succinat in ORi und Succinat + CCCP in ORi bei einer Oozyte mit Expression des fNaDC3 und pH 7,5	70
Abbildung 46:	Originalregistrierung des Succinat-vermittelten Stroms bei Perfusion mit Succinat in ORi und Succinat + CCCP in ORi bei einer Wasserinjizierten Oozyte und pH 7,5	71
Abbildung 47:	Vergleich der Succinat-vermittelten Ströme in ORI und mit CCCP bei Oozyten mit Expression des NaDC3 bei pH 6,5 und pH 7,5	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Transporter der SLC13-Familie	5
Tabelle 2:	Substrate des humanen NaDC3	8
Tabelle 3:	Oozyten-Ringer (ORi): Grundrezeptur	15
Tabelle 4:	Calcium-freier Oozyten-Ringer.....	16
Tabelle 5:	Natrium-freier Oozyten-Ringer	17
Tabelle 6:	Chemikalien mit Molekulargewicht und Bezugsfirma	18
Tabelle 7:	Geräte und Materialien.....	19
Tabelle 8:	Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere bei allen Versuchen ...	26
Tabelle 9:	Mittelwerte der pH-Reihe mit Succinat als Substrat bei Wasserinjizierten Oozyten und NaDC3-exprimierenden Oozyten	32
Tabelle 10:	Mittelwerte der pH-Reihe mit Citrat als Substrat bei Wasserinjizierten und NaDC3-exprimierenden Oozyten.....	34

Abkürzungsverzeichnis

2-MS	2-Methylsuccinat
2,2-DMSA	2,2-Dimethylsuccinat
2,3-DMSA	2,3-Dimethylsuccinat
α -KG	Alpha-Ketoglutarat
CaCl ₂	Calciumchlorid
Calcium-freier ORI	Calcium-freier Oozyten-Ringer
CCCP	Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cRNA	<i>coding ribonucleic acid</i> (codierende Ribonukleinsäure)
DC ²⁻	Dicarboxylat
fNaDC3	Natrium-abhängiger Dicarboxylattransporter 3 der Flunder
H ⁺	Wasserstoffion
HCl	Salzsäure
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
hNaDC3	humaner Natrium-abhängiger Dicarboxylattransporter 3
I	Strom
I _{max}	maximaler Strom
kbp	Kilo-Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
mNaDC3	Natrium-abhängiger Dicarboxylattransporter 3 der Maus
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
N	Normalität
Na ⁺	Natriumion
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NaCl	Natriumchlorid
NaCT	Natrium-abhängiger Citrattransporter
NaDC1, 3	Natrium-abhängiger Dicarboxylattransporter 1, 3
NaDCs	Natrium-abhängige Dicarboxylattransporter
NaS1, 2	Natrium-abhängiger Sulfattransporter 1, 2
NMDG	<i>N</i> -Methyl-D-glucamin

NMDG-Chlorid	<i>N</i> -Methyl-D-glucamin-Chlorid
OA ⁻	Organische Anionen
OAT1, 3	Organischer Anionentransporter 1, 3
OATs	Organische Anionentransporter
ORi	Oozyten-Ringer
p	Signifikanzwert
pH _{ex}	extrazellulärer pH-Wert
pH _i	intrazellulärer pH-Wert
rNaDC3	Natrium-abhängiger Dicarboxylattransporter 3 der Ratte
SDCT 1, 2	Sodiumdicarboxylatcotransporter 1, 2
SLC	<i>Solute Carrier</i>
Succ.	Succinat
TEVC	<i>Two-Electrode-Voltage-Clamp</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V _m	Membranspannung
<i>Xenopus laevis</i>	Südafrikanischer Krallenfrosch

1 Einleitung

1.1 Nieren

1.1.1 Aufgaben und Funktionen

Die Aufgaben der Nieren sind die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes und damit verbunden die Regulation des Blutdruckes. Die Nieren scheiden Stoffwechselendprodukte und Pharmaka aus, regulieren den Säuren-Basen-Haushalt und besitzen endokrine Funktionen.

Die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes erfolgt in den Nieren durch Resorption und Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten. Gesteuert werden diese Vorgänge u.a. über endokrine Funktionen mit der Produktion von Renin und nachfolgend oder parallel der Freisetzung von Aldosteron und dem antidiuretischen Hormon (ADH), sodass Plasmavolumen und Plasmaosmolalität und damit der Blutdruck konstant gehalten werden. Infolge eines Abfalls des Sauerstoffpartialdruckes in Fibroblasten der Nierenrinde synthetisieren sie Erythropoetin, welches die Erythropoese erhöht. Über und mithilfe der Plasmakonzentration von Calcium und Phosphat steuern die Nieren über Calcitriol und Parathormon die Mineralisierung der Knochen. Die Kontrolle des Säuren-Basen-Haushaltes erfolgt über die Ausscheidung von Wasserstoffionen (H^+) und die Resorption von Bicarbonat (HCO_3^-), aber auch über die Ausscheidung von H^+ als Ammoniumion (NH_4^+), das aus Glutamin gewonnen wird.

Die Eliminierung harnpflichtiger Substanzen wie z.B. Harnstoff, Harnsäure und Ammoniak und die Ausscheidung von Pharmaka und Giftstoffen wird von den ca. eine Million Nephronen pro Niere erfüllt. Neben der Eliminierung werden für den Körper wertvolle Substanzen wie Glukose, Milchsäure und Aminosäuren durch Resorption zurückgewonnen. Dies geschieht durch Filtration, Resorption und Sekretion. Pro Minute fließt ca. 1 l Blut – das entspricht 20 % des Herzminutenvolumens – durch beide Nieren. In den Glomeruli werden in der gleichen Zeit 100 ml Primärharn gebildet. Auf diese Weise werden pro Tag ca. 1,5 l Urin gebildet, wobei ca. 99 % des filtrierte Plasmawassers und 90 % der im Filtrat gelösten Substanzen rückresorbiert werden (Lang 2010).

1.1.2 Transportprozesse in den proximalen Tubuluszellen

Der proximale Tubulus ist der Abschnitt des Tubulussystems, in dem ein Großteil des Wassers und weiterer, für den Körper wichtiger Substanzen rückresorbiert werden. Die meisten dieser Transportprozesse benötigen Natrium für den Substrattransport.

Die treibende Kraft für den Aufbau des Natriumgradienten, entlang dem die Substrate in die proximale Tubuluszelle aufgenommen werden, ist die in der basolateralen Membran lokalisierte Natrium-Kalium-ATPase ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$). Auch die Natrium-abhängigen Dicarboxylattransporter 1 (NaDC1) und 3 (NaDC3) nutzen diesen Gradienten, um ihre Substrate wie z.B. Glutarat, α -Ketoglutarat (α -KG), Succinat (Succ.) und divalentes Citrat, aufsteigend nach physiologisch vorliegender Plasmakonzentration im Menschen aufgelistet, in die Zelle zu transportieren (Pajor 2014).

Ein Teil des in die Zelle über NaDC1 und NaDC3 aufgenommenen Dicarboxylats wird von den organischen Anionentransportern (OATs) benutzt, um ihr Substrat, das organische Anion, im Austausch gegen ein Dicarboxylat (DC^{2-}) in die Zelle aufzunehmen (Abbildung 1). Berechnungen von Dantzler (2002) haben gezeigt, dass der NaDC3 ca. 60 % der Dicarboxylate bereitstellt, die von den OATs für die Aufnahme ihrer Substrate, hauptsächlich Pharmaka, benötigt werden (Pelis und Wright 2011).

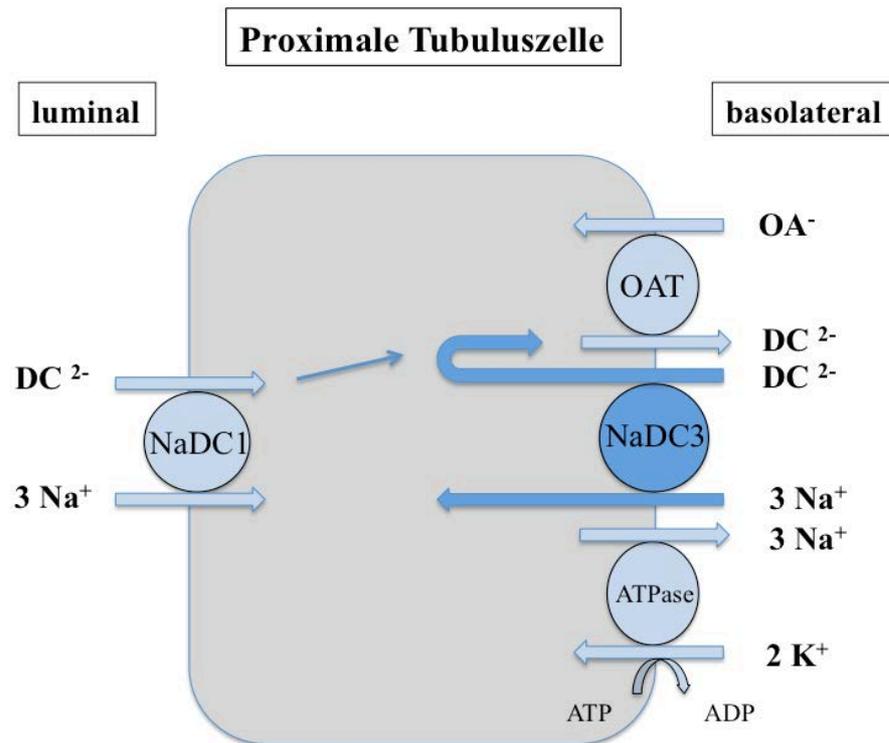


Abbildung 1: Kopplung der organischen Anionentransporter (OATs) an die Natrium-abhängigen Dicarboxylattransporter zur Ausscheidung von Fremdstoffen, Stoffwechselendprodukten und Pharmaka in einer proximalen Tubuluszelle

Dargestellt sind die in der basolateralen Membran lokalisierte Na⁺-K⁺-ATPase, der NaDC3 und der OAT. In der basolateralen Membran kommen die organischen Anionentransporter 1 und 3 (OAT1 und OAT3) vor, die in dieser Übersichtszeichnung unter „OAT“ zusammengefasst sind. Die Na⁺-K⁺-ATPase baut unter ATP-Verbrauch den für den Transportvorgang des NaDC3 benötigten Natriumgradienten auf. Der somit sekundär aktive NaDC3 wiederum transportiert wie auch der in der luminalen Membran lokalisierte NaDC1 Dicarboxylate (DC²⁻) in die Zelle. Diese Dicarboxylate werden von den tertiär aktiven OATs in der basolateralen Membran im Austausch gegen organische Anionen (OA⁻) aus der Zelle heraus transportiert und die organischen Anionen somit in die Zellen hinein transportiert.

1.2 Humaner Natrium-abhängiger Dicarboxylattransporter 3 (hNaDC3)

1.2.1 Zugehörigkeit zur SLC13-Familie

Der humane Natrium-abhängige Dicarboxylattransporter 3 (hNaDC3) gehört zur SLC13-Familie. SLC steht für *Solute Carrier* und bezeichnet eine Gruppe von 52 Transporterfamilien mit ca. 395 codierenden Genen (Hediger et al. 2013).

Die SLC13-Familie besteht aus fünf strukturell verwandten Mitgliedern, die im Menschen, bei Säugetieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien vorkommen. Allen Transportern dieser Familie ist gemeinsam, dass sie zu mindestens 55 % in ihrer Aminosäuresequenz

identisch sind. Die Proteine der SLC13-Familie bestehen aus 572-627 Aminosäuren, die in 8-13 Transmembrandomänen angeordnet sind (Markovich und Murer 2004).

Die fünf Mitglieder werden abhängig von ihrem Referenzsubstrat in zwei Gruppen eingeteilt: Di- und Tricarboxylattransporter und Sulfattransporter. Zu den Sulfattransportern gehören die zwei Transporter NaS1 und NaS2, zu den Di- und Tricarboxylattransportern die drei Transporter NaDC1, NaDC3 und NaCT. Die wissenschaftliche Nomenklatur ist in ihrer Bezeichnung nicht einheitlich. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Bezeichnungen für die Transporter der SLC13-Familie, deren Gewebelokalisation und Substrate mit den Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) für Succinat und Citrat.

Tabelle 1: Transporter der SLC13-Familie

Die Angaben wurden den Übersichtsarbeiten von Markovich und Murer (2004) und Pajor (2014) entnommen. Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge: 2-Methylsuccinat (2-MS); 2,2-Dimethylsuccinat (2,2-DMSA); 2,3-Dimethylsuccinat (2,3-DMSA); Alpha-Ketoglutarat (α -KG); Natrium-abhängiger Citrattransporter (NaCT); Sodiumdicarboxylatcotransporter (SDCT1, 2).

Transporter	Unterschiedliche Bezeichnungen			Gewebelokalisation (mRNA oder Protein)	Substrat	K _m -Wert Succ. (μ M)	K _m -Wert Citrat (μ M)
	Neuer Proteinname	Früherer Proteinname/ Synonym	Genname				
Sulfattransporter	NaS1	NaSi-1	SLC13A1	Bürstensaummembran des proximalen Tubulus	Selenat, Sulfat, Thiosulfat	-	-
Sulfattransporter	NaS2	SUT-1	SLC13A4	Plazenta, hochendotheliale Venolen, Tonsillen, Hoden, Herz	Chrom, Selen, Sulfat	-	-
Carboxylattransporter	NaC1	NaDC1/ SDCT1	SLC13A2	Bürstensaummembran des proximalen Tubulus und der Enterozyten	2-MS, 2,2-DMSA, α -KG, Citrat, Fumarat, Malat, Succinat, Tricarbalylat	590-800	6800
Carboxylattransporter	NaC2	NaCT	SLC13A5	Leber, Gehirn, Hoden	Citrat, Malat, Pyruvat, Succinat	1900	600
Carboxylattransporter	NaC3	NaDC3/ SDCT2	SLC13A3	Basolaterale Membran des proximalen Tubulus, sinusoidale Membran der Hepatozyten, Pancreas, Auge, Gehirn, Plazenta	2-MS, 2,2-DMSA, 2,3-DMSA, 2,3-Dimercaptosuccinat, 3-OH-Glutarat, α -KG, Adipat, Citrat, Glutarat, Fumarat, Malat, N-Acetyl-Aspartat, Oxalacetat, Succinat, Tricarbalylat	2-25	220

Die Natrium-abhängigen Dicarboxylattransporter werden nach ihrer Substrataffinität in zwei Kategorien eingeteilt (Pajor 2014): Der niedrigaffine Natrium-abhängige Dicarboxylattransporter NaDC1 wird u.a. in der Bürstensaummembran proximaler Tubuluszellen der Niere exprimiert. Der hochaffine Natrium-abhängige Dicarboxylattransporter NaDC3 hat eine breitere Gewebeverteilung und ist neben den Nieren auch in Leber, Pancreas, Gehirn und Plazenta (Markovich und Murer 2004) sowie dem Auge (Schlessinger et al. 2014) nachgewiesen worden.

1.2.2 Aufbau und Struktur

Die cDNA des hNaDC3 codiert für ein Protein, das aus 602 Aminosäuren und zwölf Transmembrandomänen besteht (Wang et al. 2000). Neben dem hNaDC3 wurde der NaDC3 aus der Maus (Pajor et al. 2001), der Ratte (Kekuda et al. 1999), der Flunder (Steffgen et al. 1999) und dem südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) (Oshiro und Pajor 2005) isoliert.

Das humane NaDC3-Gen ist auf dem Chromosom 20q12-13 lokalisiert und mehr als 80 Kilo-Basenpaare (kbp) lang und besteht aus 13 Exons und 12 Introns (Wang et al. 2000). Es wird angenommen, dass das hNaDC3-Protein drei am Amino-terminus lokalisierte Glykosylierungsstellen besitzt. Die erste Bindungsstelle befindet sich zwischen der sechsten und siebten Transmembrandomäne der insgesamt zwölf Transmembrandomänen, die anderen beiden Bindungsstellen sind am Carboxyterminus lokalisiert. Ausgehend von zwölf Transmembrandomänen und extrazellulär liegenden Glykosylierungsstellen ergibt sich daraus die Annahme, dass sowohl der Amino- als auch der Carboxyterminus extrazellulär lokalisiert sind. Intrazellulär zeigen sich abgeleitet aus der Aminosäuresequenz (Abbildung 2) acht Bindungsstellen mit übereinstimmender Sequenz für eine Proteinkinase-C-abhängige Phosphorylierung und eine Bindungsstelle in übereinstimmender Sequenz für cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasephosphorylierung (Hagos et al. 2004; Wang et al. 2000).

Tabelle 2: Substrate des humanen NaDC3

*: K_m ermittelt mit radioaktiv markiertem Substrat, **: K_m ermittelt über elektrophysiologische Messungen mit der *Two-Electrode-Voltage-Clamp* (TEVC), ***: ausschließlich Messung eines Einwärtsstroms. Alle Daten wurden an mit hNaDC3-cRNA-injizierten *Xenopus laevis*-Oozyten erhoben.

Substrat	K_m (μM)	Zitat
3-Hydroxy-Glutarat	$950 \pm 180^{**}$	Stellmer et al. 2007
α -Ketoglutarat	$45 \pm 13^{**}$	Burckhardt et al. 2004
<i>N</i> -Acetyl-Aspartat	$300 \pm 40^{**}$	Huang et al. 2000
<i>N</i> -Carbamoylglutamat	26 ± 2	Schwob et al. 2014
Fumarat	***	Burckhardt et al. 2004
Glutathion	1650 ± 560	Schorbach et al. 2013
Glutarat	40 ± 12	Burckhardt et al. 2004
Malat	***	Burckhardt et al. 2004
Oxalacetat	***	Burckhardt et al. 2004
Succinat	$25 \pm 16^*, **$	Burckhardt et al. 2004, Huang et al. 2000

1.3 *Xenopus laevis*-Oozyten als Expressionssystem

1.3.1 Eignung

Xenopus laevis-Oozyten haben sich seit vielen Jahren als Expressionssystem für verschiedene Transportproteine bewährt. Die Verwendung von *Xenopus laevis*-Oozyten als Expressionssystem für Proteine geht auf Gurdon et al. (1971) im Jahr 1971 zurück. Diese stellten erstmals dar, dass Transkription und Translation von artfremdem genetischen Material durch *Xenopus laevis*-Oozyten möglich ist. Sie zeigten, dass die Oozyten nach Injektion mit entsprechender mRNA Hämoglobin synthetisierten. Wenige eigene endogene Transporter und Kanäle machen die Oozyten zu geeigneten Expressionssystemen für Transporter und Ionenkanäle (Dascal 1987). Genetische Informationen in Form von DNA oder RNA werden in den Oozyten im Kern (DNA) bzw. im Zytosol (RNA) in exprimierte Proteine transformiert. Dadurch ist es möglich, die Funktion der exprimierten Transportproteine an den Oozyten zu untersuchen und durch Zugabe verschiedener Testsubstanzen unterschiedlichste Bedingungen zu simulieren. Die Entnahme der Oozyten durch eine Operation und die kostengünstige und unkomplizierte Haltung der für die Laborhaltung gezüchteten *Xenopus laevis*-Weibchen sind weitere Punkte, die für die Verwendung der *Xenopus laevis*-Oozyten sprechen.

1.3.2 Entwicklung und Morphologie

Die Entwicklung von *Xenopus laevis*-Oozyten verläuft asynchron. Das bedeutet, dass alle sechs Entwicklungsstadien, die eine einzelne Oozyte durchläuft, parallel vorliegen. Hauptsächlich sind Oozyten der Stadien V und VI vorhanden. Diese großen, runden Zellen haben einen Durchmesser von ca. 1,1-1,3 mm und sind durch ein äquatoriales Band charakterisiert, welches die dunkle, animalische Hemisphäre von der hellen, vegetativen Hemisphäre trennt. Die dunkle Hemisphäre ist aufgrund eines höheren Melanin gehaltes stärker pigmentiert und enthält den Zellkern (Dumont 1972).

Die Oozyten selbst haben relativ wenige endogene Transporter. Bei der Expression neuer Transportproteine kann es bei Vorliegen funktionell ähnlicher eigener Transporter der Oozyte zu Schwierigkeiten bei der Differenzierung von endogenen und exogenen Transportereigenschaften kommen. In diesem Fall sollte die Expression der exogenen Transporter deutlich überwiegen und die Funktion der vorhandenen endogenen überschreiten.

Ein Verfahren zur Überprüfung einer positiven Expression stellen elektrophysiologische Messungen dar. Hierzu zählen die *Two-Electrode-Voltage-Clamp*-Methode (TEVC), welche für die Durchführung der Versuche dieser Arbeit gewählt wurde, aber auch Messungen mit pH- und Ionen-selektiven Mikroelektroden. Bei elektrogenen Transportern ist es durch Messung der Änderungen des Membranpotentials bzw. der eingespeisten Ströme möglich, Rückschlüsse auf die Expression von Transportern sowie deren Eigenschaften zu erhalten (Sigel und Minier 2005). Das Membranpotential von *Xenopus laevis*-Oozyten liegt bei ca. -40 mV. Es entspricht nahezu dem Gleichgewichtspotential von Chlorid, dessen Ioneneinfluss reguliert durch Calciumionen den Hauptionenstrom in einer Oozyte darstellt (Dascal 1987).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, die pH-Abhängigkeit des NaDC3 zu untersuchen. NaDCs sind in Verbindung mit den OATs unabdingbar beim Transport organischer Anionen und pharmazeutischer Wirkstoffe. Da die Aufnahme von *p*-Aminohippurat über OAT1 und von Estronsulfat über OAT3 bei sauren pH-Werten höher als bei alkalischen pH-Werten war (Henjakovic et al. 2015), liegt es nahe, die pH-Abhängigkeit des NaDC3 zu untersuchen, zumal OAT1 und OAT3 eng an den NaDC3 gekoppelt sind. Der NaDC3 weist in seiner Aminosäuresequenz Histidine auf, die bei extrazellulären pH-Änderungen durch Änderung ihrer Netto-Ladung zu Konformationsänderungen des NaDC3 führen können. Diese möglichen Konformationsänderungen könnten die Bindung der Substrate Succinat und Citrat und damit die Affinität dieser Substrate zum NaDC3 verändern.

Konformationsänderungen, die pH-abhängig sind, könnten auch die Natriumbindungsstellen beeinflussen. Dies wird getestet, indem bei zwei unterschiedlichen pH-Werten Natrium durch *N*-Methyl-D-glucamin (NMDG) oder Cholin ersetzt wird und die Natriumabhängigkeit des NaDC3 untersucht wird.

Das Protonophor Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (CCCP) gleicht den intrazellulären dem extrazellulären pH-Wert an. CCCP ermöglicht es damit, den Einfluss des intrazellulären pH-Wertes auf die Substrat-abhängigen Ströme zu untersuchen.

2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden Aufbau und Ablauf der Versuche dargestellt. Neben den verwendeten Lösungen sind die entsprechenden Chemikalien, Materialien und Geräte aufgelistet und beschrieben.

2.1 Verwendung von *Xenopus laevis*-Oozyten als Expressionssystem

Für die Expression des Transportproteins NaDC3 und der sich anschließenden elektrophysiologischen Untersuchung mit verschiedenen Substanzen wurden Oozyten des *Xenopus laevis* als Expressionssystem gewählt.

2.1.1 Überblick über den zeitlichen Ablauf der Versuche

Die im Institut gehaltenen Frösche der Gattung *Xenopus laevis* wurden von Nasco, Fort Atkinson, USA, für wissenschaftliche Zwecke bezogen. An Tag eins des jeweils viertägigen Versuchszeitraums wurde einem weiblichen *Xenopus laevis* operativ ein kleiner Ovarlappen entnommen. Dieser wurde manuell zerkleinert und über Nacht in Oozyten-Ringer (ORi) und Kollagenase bei 18 °C in einem Inkubator aufbewahrt. Die Kollagenase wurde für die Separation der einzelnen Oozyten durch Auflösung des sie umgebenden bindegewebigen Verbandes hinzugegeben. Die Herstellung und die genaue Zusammensetzung von ORi für die unterschiedlichen Versuchsbedingungen werden in den Abschnitten 2.2.1 bis 2.2.6 beschrieben.

An Tag zwei wurde in Oozyten der Stadien V und VI cRNA oder als Kontrolllösung Wasser injiziert. Die so präparierten Oozyten wurden in mit jeweils 2 ml Oozyten-Ringer zur Aufbewahrung (ORi zur Aufbewahrung (2.2.3)) gefüllte 24-Well-Platten gesetzt und erneut in den auf 18 °C temperierten Inkubator gestellt.

An Tag drei erfolgte die Überführung der Oozyten in frischen ORi zur Aufbewahrung. Morphologisch auffällige Oozyten wurden verworfen. In Einzelfällen war bereits an Tag drei die Verwendung der cRNA-injizierten Oozyten für Messungen möglich. In der Mehrzahl der Fälle erfolgte die Messung mit den Oozyten jedoch erst an Tag vier. Für die Messung war eine ausreichende Expression des NaDC3-Transporters erforderlich. Diese wurde anhand einer Änderung der Membranspannung (V_m) bei Zugabe von ORi

mit Succinat (2.2.4) bei einem pH-Wert von 7,5 überprüft. In Abbildung 3 wird der Ablauf des Versuchs in Form eines Zeitstrahls dargestellt.

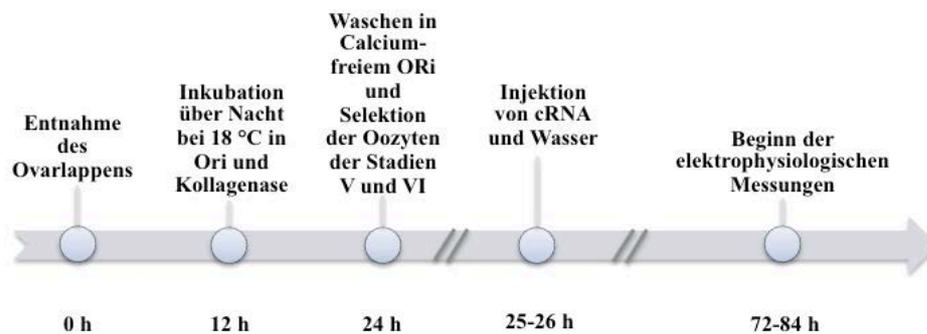


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf von der Entnahme der Oozyten bis zur elektrophysiologischen Messung. Nach der Entnahme des Ovarlappens und dem Herauslösen der einzelnen Oozyten aus ihrem bindegewebigen Verband mit Kollagenase erfolgte das Waschen der Oozyten mit Calcium-freiem Oozyten-Ringer (Calcium-freier Ori) sowie die Selektion der Oozyten. Anschließend wurde cRNA oder eine äquivalente Menge an Wasser in die selektierten Oozyten der Stadien V und VI injiziert und nach 72-84 Stunden konnte mit der Durchführung der elektrophysiologischen Messungen begonnen werden.

2.1.2 Entnahme und Selektion der Oozyten

Die ordnungsgemäße Entnahme der Oozyten aus dem *Xenopus laevis* (Abbildung 4a, b, c) erfolgte durch eine hierzu befugte Institutsmitarbeiterin mit entsprechender Genehmigung für das Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie nach § 9 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (Aktenzeichen 509.42502/01-A-02.04).

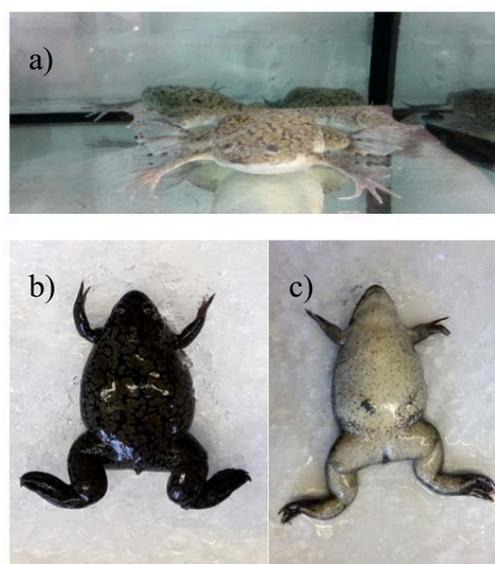


Abbildung 4a, b, c: *Xenopus laevis*

a) *Xenopus laevis* im Aquarium, b) *Xenopus laevis* in Bauchlage auf einem Eisbett, c) *Xenopus laevis* in Rückenlage auf einem Eisbett und bereit für die Entnahme der Oozyten

Die Oozyten befinden sich im Abdomen des Froschweibchens. Für ihre Entnahme wurde ein *Xenopus laevis* aus dem Aquarium (Abbildung 4a) entnommen und nach Injektion mit Tricain auf einem Eisbett gelagert (Abbildung 4b, c).

Nach eintretender Anästhesie wurde der Schnitt am Abdomen des Tieres gesetzt und der Ovarlappen durch Muskel- und Hautschicht hindurch mobilisiert (Abbildung 5a). Der Ovarlappen wurde dann mit einem Skalpell aus dem bindegewebigen Verband herausgelöst und in eine Petrischale mit ORi überführt (Abbildung 5b).

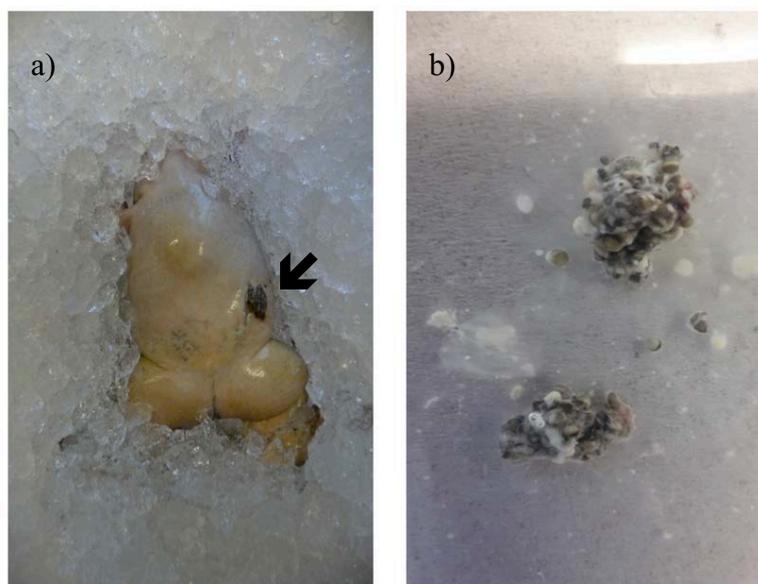


Abbildung 5a, b: Situs intraoperativ

a) Ovarlappen nach abdomineller Schnittführung (Pfeil), b) Entnommener Ovarlappen im bindegewebigen Verband in ORi

Der Situs des *Xenopus laevis* wurde zweischrittig mit Nahtmaterial verschlossen. Im Anschluss wurde der *Xenopus laevis* in ein separates Aquarium gesetzt und dort bis zur vollständigen Rekonvaleszenz überwacht.

Der entnommene Ovarlappen wurde mit stumpfen Metallinstrumenten manuell in kleinere Segmente geteilt und in eine Glaspetrischale mit 20 ml ORi überführt, der 5-8 mg Kollagenase hinzugefügt wurde. Die Einwirkzeit der Kollagenase betrug 12-16 Stunden bei 18 °C. Danach erfolgte das Waschen der Oozyten mit zwei verschiedenen Lösungen, um neben der Kollagenase auch gelöste Bindegewebsbestandteile zu entfernen: Zunächst wurden die Oozyten dreimalig mit Calcium-freiem Oozyten-Ringer (Calcium-freiem ORi (2.2.2)) gewaschen und anschließend für zehn Minuten in dieser Lösung belassen. Nach der zehnminütigen Inkubationszeit wurden die Oozyten im zweiten Schritt fünfmal mit ORi (2.2.1) gewaschen.

Die Selektion geeigneter Oozyten erfolgte sodann unter mikroskopischer Sicht. Es wurden ausschließlich Oozyten der Stadien V und VI für die Versuche ausgewählt, da diese in ihrer Entwicklung so fortgeschritten sind, dass sie nach Injektion artfremder cRNA das entsprechende Protein auf ihrer Membranoberfläche exprimieren können.

2.1.3 Injektion der cRNA in Oozyten

Für die Injektion von cRNA oder Wasser in die Oozyten wurde eine dafür vorgesehene mikroskopische Injektionsapparatur benutzt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde bei allen folgenden Schritten mit Handschuhen gearbeitet. Der Injektionsvorgang in die Oozyten gliederte sich wie folgt: Es wurde eine im Institut mit einem Kapillarenziehgerät (Puller) gefertigte Glaskapillare luftblasenfrei mit Mineralöl befüllt. Die Glaskapillare wurde in die Injektionsapparatur geschraubt und ihre Spitze mit einer Pinzette unter mikroskopischer Kontrolle auf einen Durchmesser von ca. 10 μm gekappt. Eine gleichmäßige Tröpfchenform der aus der Glaskapillare heraustretenden Mineralöltropfen wurde durch die Betätigung des Injektionsschalters in einer mit destilliertem Wasser befüllten Petrischale visuell überprüft. Anschließend wurden jeweils 0,001 ml cRNA oder eine äquivalente Menge Wasser mit einer Pipette aufgezogen und in die Glaskapillare überführt (Abbildung 6a, b, c).

Bei den Versuchsreihen wurde mit zwei unterschiedlichen cRNAs gearbeitet, die entweder für den humanen NaDC3 (hNaDC3) oder den NaDC3 der Flunder (fNaDC3) codierten und für die Versuche in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vorlagen. Die cRNA wurde von einer Mitarbeiterin des Institutes hergestellt und für die durchgeführten Versuchsreihen bereitgestellt. Die Aufbewahrung der cRNA erfolgte in einem Gefrierschrank bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Für die Injektion wurde die cRNA aus dem Gefrierschrank entnommen und aufgetaut.

Für den Injektionsvorgang wurden die Oozyten auf der Injektionsbank positioniert. Um ihren Nucleus nicht zu beschädigen, wurden die einzelnen Oozyten am vegetativen Pol mit der Glaskapillare angestochen und 23 nl cRNA bzw. eine äquivalente Menge Wasser injiziert. Die Wasser-injizierten Oozyten dienten bei den Versuchen als Kontrolle, ob die gemessenen Einwärtsströme auf endogene Transporter der Oozyten oder auf die Expression des NaDC3 zurückzuführen sind.



Abbildung 6a, b, c: Injektion der Oozyten

a) Vereinzelte und gewaschene Oozyten nach 12-16 Stunden Einwirkzeit von ORi und Kollagenase, b) Mikroskop und Injektionsapparatur für die Injektion der Oozyten, c) Mit cRNA befüllte Glaskapillare und Oozyten der Stadien V und IV auf der Injektionsbank; die Spitze der Glaskapillare sticht in den hellen, vegetativen Pol ein (Pfeil).

2.2 Lösungen

Als Ausgangslösung diente ORi. Basierend auf dieser Grundrezeptur (2.2.1) wurden Lösungen hergestellt, in denen die Oozyten aus dem Ovarverband gelöst (ORi und Kollagenase; Calcium-freier ORi) und anschließend bis zur Messung (ORi plus Natriumpyruvat und Gentamycin) aufbewahrt wurden. Die zu untersuchenden Substanzen (Succinat, Citrat, Carbonylcyanid-3-chlorophenylhydrazon) wurden ebenfalls in ORi gelöst. Sollten Natrium-freie Bedingungen vorliegen müssen, wurde Natriumchlorid durch *N*-Methyl-D-glucamin-Chlorid (NMDG-Chlorid) bzw. Cholinchlorid ersetzt.

2.2.1 Oozyten-Ringer (ORi): Grundrezeptur

Die Grundrezeptur (Tabelle 3) diente der Perfusion der Oozyten bei den Versuchsreihen zu Beginn der Messungen sowie zwischen der Perfusion mit verschiedenen Testsubstanzen. Die Lösung wurde mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) auf pH 7,5 bei Raumtemperatur eingestellt.

Tabelle 3: Oozyten-Ringer (ORi): Grundrezeptur

Substanzen	Konzentrationen
Natriumchlorid (NaCl)	110 mmol/l = 6,4284 g/l
Kaliumchlorid (KCl)	3 mmol/l = 0,2237 g/l
Calciumchlorid (CaCl ₂)	2 mmol/l = 0,2940 g/l
<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure (HEPES)	5 mmol/l = 1,1915 g/l

2.2.2 Calcium-freier Oozyten-Ringer (Calcium-freier ORi)

Calcium-freier ORi wurde zum Waschen, Lösen aus dem Ovarverband und Vereinzeln der Oozyten verwendet. Der pH-Wert der Lösung wurde bei Raumtemperatur mit TRIS auf pH 7,5 titriert.

Tabelle 4: Calcium-freier Oozyten-Ringer

Substanzen	Konzentrationen
NaCl	82,5 mmol/l = 4,8213 g/l
KCl	2 mmol/l = 0,1491 g/l
HEPES	5 mmol/l = 1,1915 g/l

2.2.3 Oozyten-Ringer zur Aufbewahrung der Oozyten

In diese Lösung wurden die Oozyten nach der Injektion mit cRNA gegeben und bis zur Messung aufbewahrt. Sie enthielt neben ORi Natriumpyruvat (0,275 g/l), das die Oozyten als Nährstoff während der Expression der Transporter benötigen, und zur Vermeidung von Infektionen das Antibiotikum Gentamycin (0,05 g/l). Der pH-Wert wurde wiederum mit TRIS auf pH 7,5 eingestellt.

2.2.4 Oozyten-Ringer und Testsubstanzen

Zunächst wurde ORi hergestellt und anschließend die Natriumsalze von Succinat bzw. Citrat hinzugefügt, um die Testlösungen für die Versuchsreihen zu erhalten. Die Lösung ORi plus 1 mmol/l Natriumsuccinat (0,2701 g/l) diente als Kontrolllösung zum Überprüfen einer erfolgreichen Expression des NaDC3 nach Injektion der Oozyten mit cRNA.

Für die Versuchsreihen zum Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf die Succinat- bzw. Citrat-abhängigen Ströme wurden die Testlösungen ORi plus 1 mmol/l Succinat (0,2701 g/l) und ORi plus 1 mmol/l Citrat (0,2941 g/l) auf pH-Werte zwischen 5,4 und 8,9 eingestellt. Die Titration erfolgte bei Raumtemperatur in 0,5 pH-Wertschritten ausschließlich mit TRIS, da die Testlösungen nach Einwaage des entsprechenden Dicarboxylats bereits einen pH-Wert < 5 aufwiesen.

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten im Rahmen der zweiten Versuchsreihe wurde ORi mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumsuccinat und Natriumcitrat mit TRIS bei Raumtemperatur auf pH 6,5 und pH 7,5 einge-

stellt. Die Verdünnung auf die verschiedenen Konzentrationen erfolgte mit ORi, der entsprechend auf die pH-Werte 6,5 bzw. 7,5 eingestellt war.

2.2.5 Natrium-freier Oozyten-Ringer (Natrium-freier ORi)

Für die Herstellung der Natrium-freien Lösung (Tabelle 5) wurde Natrium durch NMDG oder Cholin ersetzt. NMDG-Chlorid wurde durch Zugabe von Salzsäure (HCl) (ca. 55 ml einer 2 N HCl-Lösung) erhalten. Cholinchlorid liegt als Salz vor. Anschließend erfolgte die exakte Einstellung auf die pH-Werte 6,5 bzw. 7,5 bei Raumtemperatur durch Titration mit TRIS.

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante von Natrium wurde Natrium-freier ORi mit einem pH-Wert von 6,5 und 7,5 hergestellt und durch Zugabe von ORi die verschiedenen Natriumkonzentrationen (110 mM, 88 mM, 44 mM, 22 mM, 11 mM, 0 mM) eingestellt.

Tabelle 5: Natrium-freier Oozyten-Ringer

NMDG-Chlorid wurde durch die Zugabe von HCl zu *N*-Methyl-D-glucamin (NMDG), wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, erhalten. In der Tabelle stehen sowohl NMDG-Chlorid als auch Cholinchlorid. Es wurde bei der Herstellung von Natrium-freiem ORi jedoch jeweils nur einer der beiden Stoffe verwendet.

Substanzen	Konzentrationen
NMDG-Chlorid	110 mmol/l = 21,4730 g/l
Cholinchlorid	110 mmol/l = 15,3500 g/l
KCl	3 mmol/l = 0,2237 g/l
CaCl ₂	2 mmol/l = 0,2940 g/l
HEPES	5 mmol/l = 1,1915 g/l

2.2.6 Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (CCCP)

Für die Versuchsreihe mit CCCP wurde die Lösung ORi plus 1 mmol/l Natriumsuccinat (0,2701 g/l) mit 5 µmol/l CCCP (0,001 g/l) versetzt. Im Anschluss daran wurden mit TRIS bei Raumtemperatur die pH-Werte von 6,5 und 7,5 eingestellt.

2.3 Chemikalien

Tabelle 6 beinhaltet die verwendeten Chemikalien mit ihren Molekulargewichten und der jeweiligen Bezugsfirma. Gentamycin und Kollagenase Typ CLS II wurden im Kühlschrank bei 4 °C, CCCP bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Die übrigen Substanzen wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 6: Chemikalien mit Molekulargewicht und Bezugsfirma

Substanzen	Molekulargewicht	Bezugsfirma
Calciumchlorid (CaCl ₂) bzw. Calcium-Chlorid Dihydrat	147,02 g/mol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (CCCP)	204,62 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Cholinchlorid	139,62 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Gentamycinsulfat	694,75-723,75 g/mol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure (HEPES)	238,31 g/mol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	74,56 g/mol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase Typ CLS II	265 U/mg	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Mineralöl		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	58,44 g/mol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat (Tri-(Natriumcitrat-Dihydrat))	294,10 g/mol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	110,05 g/mol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumsuccinat	270,14 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>N</i> -Methyl-D-glucamin (NMDG)	195,21 g/mol	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Salzsäure (2N HCl)	36,46 g/mol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	121,14 g/mol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.4 Geräte und Materialien

In der Tabelle 7 sind die verwendeten Geräte und Materialien mit ihrer Typenbezeichnung und der Bezugsfirma in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Tabelle 7: Geräte und Materialien

Geräte	Typenbezeichnung	Bezugsfirma
Faraday'scher Käfig		Eigenbau der Institutswerkstatt
Feinwaage	Sartorius 2002 MP1	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Flachbettstreiber	2-Kanal-Modell BD 112	Kipp & Zonen, Delft, Niederlande
Gerät zur Herstellung der Glas- und Injektionskapillaren (Puller)	PE-2	Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan
Glaskapillaren (zur cRNA Injektion)	Sodaklarglas	World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA
Glaskapillaren mit Filament (Mikroelektroden für die TEVC)	Borosilikat mit Filament GC150F-10	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Glasmaterialien	Laborglas	Duran Group GmbH, Mainz, Deutschland
Kaltlichtquellen	KL 1500	Schott Glaswerke, Wiesbaden, Deutschland
Kühlschrank 4 °C (Aufbewahrung der Medien)	FKS 3610	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlschrank 4 °C (Aufbewahrung der Medien), Gefrierschrank bei -20 °C (Aufbewahrung von CCCP)	Type I	Beko Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C (Aufbewahrung cRNA etc.)	Herafreeze	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikroliterpipetten (0,5 ml-1 ml)		Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mikromanipulator		Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop (Oozytenselektion)	Wild M38	Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz
Mikroskop (Messapparatur)	Wild M3C	Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz

Geräte	Typenbezeichnung	Bezugsfirma
Nahtmaterial	Prolene 7-0	Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Nanoliter-Injektor	500052	World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA
TEVC-Verstärker mit dazugehörigen Elektrodenhaltern	OC-725B	Warner Instrument Corp., Hamden, Connecticut, USA
Oozyteninkubator (18 °C)		Eigenbau der Institutswerkstatt
pH-Meter	Inolab pH 720	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipettenspitzen	36 M μ lti® UNIVERSAL 1-200 μ l, Art. 8156.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reinstwasseraufbereitungsanlage	Arium 611 VF	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Skalpellklingen	Fig. 18	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Trockenschrank	T 5042 EK	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
„24-Well-Platten“ für die Inkubation der Oozyten	Cellstar-24 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Wägetisch	9720	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze-Hänigsen, Deutschland

2.5 Elektrophysiologische Messungen

Die Versuche wurden mithilfe der *Two-Electrode-Voltage-Clamp*-Technik durchgeführt, um Transporter-vermittelte Änderungen des Membranpotentials der Oozyten und der einzuspeisenden Ströme zu messen. Nachfolgend werden die Funktionsweise dieser Methode und die beiden verwendeten Modi, d.h. der *Current-Clamp-Modus* und der *Voltage-Clamp-Modus*, erläutert und der Versuchsaufbau mit der Durchführung der vier Versuchsreihen beschrieben.

2.5.1 Prinzip der *Two-Electrode-Voltage-Clamp* (TEVC)

Das Prinzip der *Two-Electrode-Voltage-Clamp* (Zwei-Elektroden-Spannungsklemme) im *Current-Clamp-Modus* beruht auf der Messung von Änderungen des Membranpotentials der in den Stromkreislauf der Messapparatur eingeschlossenen Oozyte. Das bedeutet, das von der Oozyte selbst generierte Potential wird gemessen.

Beim *Voltage-Clamp-Modus* werden Ströme erfasst, die für die Aufrechterhaltung einer festgelegten Spannung in den Stromkreislauf eingespeist werden. Die Schaltskizze in Abbildung 7 verdeutlicht die Funktionsweise der *Two-Electrode-Voltage-Clamp*-Technik.

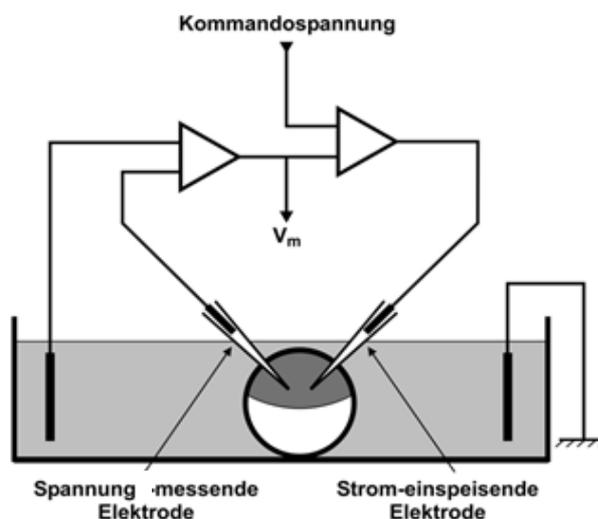


Abbildung 7: Schaltskizze der *Two-Electrode-Voltage-Clamp*

Dargestellt ist eine in den Stromkreislauf der Messapparatur eingeschlossene Oozyte im geerdeten Bad mit Perfusionslösung. Die erste Elektrode ist die Spannung-messende Elektrode. Sie misst das Membranpotential der Oozyte. Die zweite Elektrode ist die Strom-einspeisende Elektrode. Sie speist so viel Strom ein, dass das Potential auf den am Verstärker eingestellten Wert der Klemmspannung (V_m) gehalten werden kann. Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Birgitta C. Burckhardt.

Der größte Teil der Versuche wurde im *Voltage-Clamp-Modus* bei einer Klemmspannung von -60 mV, einige auch im *Current-Clamp-Modus* durchgeführt. Da der NaDC3 ein elektrogener Transporter ist, können über Änderungen der Membranspannung bzw. des eingespeisten Stroms Rückschlüsse auf die Transportaktivität bei den verschiedenen Substraten geschlossen werden.

2.5.2 Aufbau der Messapparatur

Die Messapparatur (Abbildung 8) befand sich zum Schutz vor elektrostatischen Einstrahlungen in einem Faraday'schen Käfig. Außerhalb des Faraday'schen Käfigs befanden sich der Verstärker und der Flachbettschreiber, der Veränderungen in der Potentialspannung bzw. der einzuspeisenden Ströme aufzeichnete.

An der Oberseite des Faraday'schen Käfigs wurden die Vorratsbehälter mit den unterschiedlichen Versuchslösungen aufgehängt. Vor Beginn jedes Versuches wurden die Vorratsbehälter und die ableitenden Perfusionsschläuche mit destilliertem Wasser gespült, um Kontaminationen durch zuvor verwendete Lösungen auszuschließen. Danach wurde ORI in einen Vorratsbehälter gefüllt und über einen Perfusionsschlauch der kontinuierliche Zufluss von ORI in die Perfusionskammer sichergestellt. Als zentrales Element des Messkreislaufts enthielt die Perfusionskammer die eingespannte und perfundierte Oozyte. Der Abfluss der zugeführten Flüssigkeit erfolgte über eine Öffnung in der Perfusionskammer mit einem daran angeschlossenen Trichter und einem weitlumigen Gummischlauch in ein Auffanggefäß.

Die Glaskapillaren mit den Mikrofilamenten wurden ohne Einschluss von Luftblasen mit 3-molarer KCl-Lösung befüllt. Die befüllten Glaskapillaren wurden dann beidseitig auf die Elektrodenhalter gesetzt, sodass eine Spannungs- und Strom-einspeisende Elektrode entstanden war.

Der Stromkreis wurde über Silberchloridelektroden als Erdungselektroden geschlossen. Die Justierung der Mikroelektroden erfolgte auf 0 mV bzw. 0 nA, um einen Referenzpunkt zu erhalten. Zum Einspannen einer Oozyte wurde die Perfusion unterbrochen und die Oozyte in die Perfusionskammer gelegt und mit den beiden Mikroelektroden, die auf Mikromanipulatoren befestigt waren, angestochen.

Der Zufluss von ORI wurde angestellt und der Oozyte ca. zehn Minuten Regenerationszeit gegeben, um sich auf ein stabiles Membranpotential einzustellen. Anschließend

wurde die Oozyte auf ein Haltepotential von -60 mV geklemmt und mit der Durchführung der Versuchsreihen begonnen.

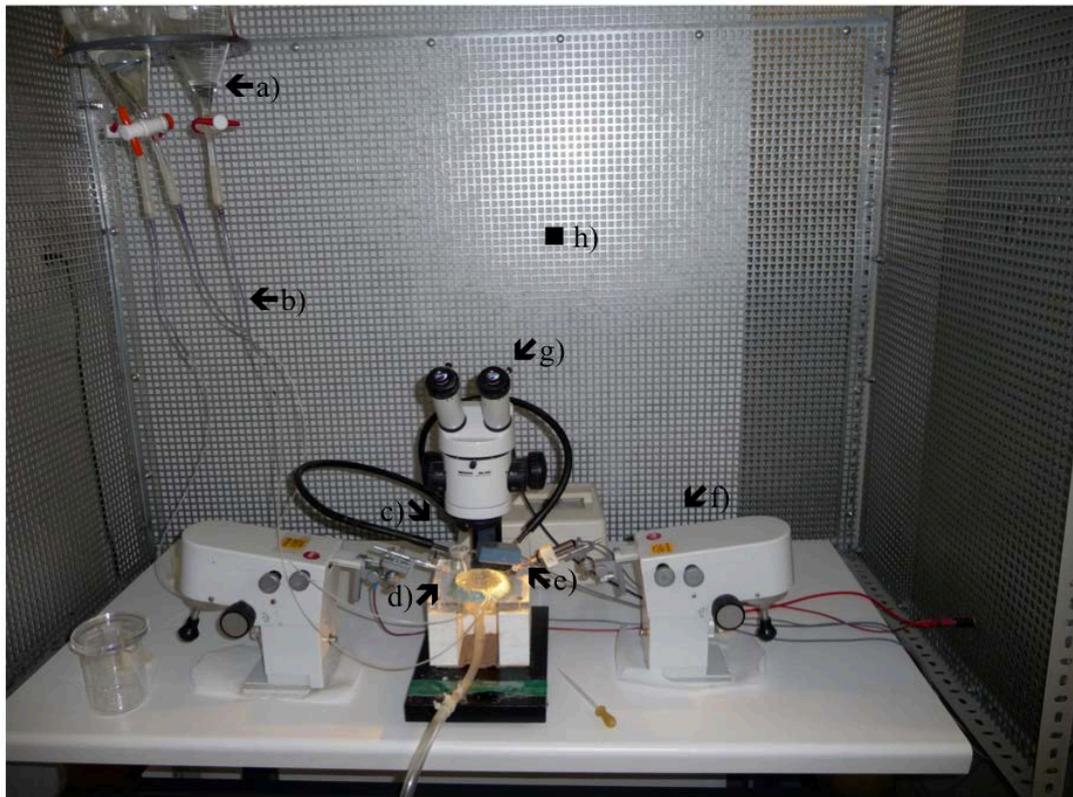


Abbildung 8: Versuchsaufbau

a) Vorratsbehälter für Perfusionslösungen, b) ableitende Perfusionsschläuche, c) Erdungselektroden, d) Perfusionsskammer mit eingespannter Oozyte, e) Mikroelektrode, f) Mikromanipulator, g) Mikroskop, h) Faraday'scher Käfig

2.5.3 Durchführung der elektrophysiologischen Messungen

Zuerst wurde bei einem Klemmpotential von -60 mV getestet, ob die Oozyte den hNaDC3 bzw. den fNaDC3 exprimiert hatte. Hierfür wurde die Perfusion der Oozyte von ORi auf ORi mit Succinat (pH 7,5) umgestellt. Hatten die Oozyten den NaDC3 exprimiert, kam es nach dem Lösungswechsel zu einem einwärts gerichteten Strom, der als negativer Ausschlag auf dem Flachbetschreiber ablesbar war. Oozyten, die den NaDC3 nicht exprimierten, wurden verworfen.

Alle nachfolgend dargestellten Versuchsreihen wurden parallel auch mit Wasserinjizierten Oozyten als Kontrolle durchgeführt. Hier sollten keine Succinat-induzierbaren Ströme nachweisbar sein.

Erste Versuchsreihe

Die erste Versuchsreihe bestand in der Perfusion der Oozyte mit ORi in Abwesenheit und Anwesenheit von Succinat oder Citrat bei pH-Werten zwischen 5,4 und 8,9. Messungen erfolgten in 0,5 pH-Wertschritten sowohl in aufsteigender als auch in absteigender pH-Richtung. In jeder pH-Stufe wurde die Oozyte für fünf Minuten mit dem entsprechenden pH-Wert in Ab- und anschließend fünf Minuten in Anwesenheit von Succinat oder Citrat perfundiert. Zwischen den einzelnen Messschritten einer Reihe wurde die Oozyte für jeweils fünf Minuten mit ORi bei pH 7,5 perfundiert, damit intraozytäre Ansäuerungen oder Alkalisierungen weitgehend ausgeschlossen werden konnten.

Zweite Versuchsreihe

In der zweiten Versuchsreihe wurden die Michaelis-Menten-Konstanten für Succinat und Citrat bei einem pH-Wert von 6,5 und 7,5 bestimmt. Die Konzentration von ORi mit Succinat wurde hierfür zwischen 0,001-1 mM Succinat jeweils bei pH 6,5 und pH 7,5 variiert. Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für Citrat erfolgte mit Konzentrationen zwischen 0,05-1 mM Citrat in ORi mit Citrat ebenso bei pH 6,5 und pH 7,5.

Dritte Versuchsreihe

Bei der dritten Versuchsreihe wurde die Natriumabhängigkeit des Transporters bei pH 6,5 und pH 7,5 untersucht. Hierbei wurde Natriumchlorid durch NMDG-Chlorid bzw. Cholinchlorid ersetzt und die einzuspeisenden Ströme in Ab- und Anwesenheit von Succinat (1 mM) aufgezeichnet. Für Citrat wurde Natriumchlorid ausschließlich durch NMDG-Chlorid ersetzt und das Transportverhalten unter diesen Bedingungen untersucht. Außerdem wurde die Michaelis-Menten-Konstante für Natrium bei pH 6,5 und pH 7,5 bestimmt.

Vierte Versuchsreihe

Bei der vierten Versuchsreihe wurde der Einfluss von CCCP auf den NaDC3 untersucht. Nach Perfusion mit ORi bei pH 6,5 wurde die Oozyte für ca. zwei Minuten mit 1 mM Succinat plus CCCP in ORi bei einem pH-Wert von 6,5 perfundiert. Dann wurde die Oozyte mit ORi pH 6,5 perfundiert und nach ca. fünf Minuten ORi mit Succinat, eingestellt auf pH 6,5, hinzugegeben. Nach dem gleichen Schema wurde mit auf pH 7,5 eingestellten Lösungen vorgegangen. Der Versuch wurde abwechselnd mit einem pH-Wert von 6,5 und 7,5 begonnen.

2.6 Programme zur Auswertung der Daten

Die Verarbeitung der Daten und die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA). Sämtliche Graphen und die Berechnungen zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten und der Eadie-Hofstee-Analysen wurden mit dem Programm SigmaPlot 13.0 (Systat Software Inc., San Jose, Kalifornien, USA) erstellt. Ebenfalls mit SigmaPlot 13.0 wurden, wenn möglich, signifikante Änderungen in den einzuspeisenden Strömen mit dem gepaarten oder ungepaarten t-Test nach Student ermittelt.

3 Ergebnisse

Im ersten Teil wurde die pH-Abhängigkeit der Succinat- und Citrat-vermittelten Ströme im pH-Bereich zwischen pH 5,4 bis 8,9 untersucht. Im Anschluss daran wurden die Michaelis-Menten-Konstanten dieser beiden Substrate bei pH 6,5 und 7,5 bestimmt. Daran anschließend wurde untersucht, ob Änderungen des extrazellulären pH-Wertes Einfluss auf die Natriumabhängigkeit der Substrat-vermittelten Ströme haben. Versuche mit dem Protonophor CCCP sollten Aufschlüsse darüber geben, ob der intra- oder der extrazelluläre pH-Wert die Substrat-abhängigen Ströme beeinflusst.

Die genauen Zusammensetzungen der Lösungen sind in Kapitel 2.2 zu finden. Die Durchführung der Versuche wird in Kapitel 2.5 ausführlich beschrieben.

3.1 Methodenvalidierung: Überprüfung einer erfolgreichen Expression

Für die Durchführung der Versuche wurde mit Oozyten aus unterschiedlichen Spendertieren gearbeitet. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Anzahl der Oozyten und der Spendertiere, den exprimierten Transporter sowie über die Anzahl an Oozyten und Spendertieren der Wasser-injizierten Oozyten.

Tabelle 8: Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere bei allen Versuchen

	NaDC3-exprimierende Oozyten		Wasser-injizierte Oozyten
	fNaDC3	hNaDC3	
Oozyten	31	4	16
Spendertiere	15	2	10

Um die Reaktion der Oozyten auf die Perfusion mit Succinat zu testen, wurden alle Oozyten zu Beginn eines jeden Versuches zuerst mit ORi und anschließend mit ORi und Succinat bei pH 7,5 im *Current-Clamp-Modus* perfundiert. Danach wurde die Oozyte im *Voltage-Clamp-Modus* auf eine konstante Spannung von -60 mV geklemmt und der Einfluss von ORi mit Succinat als zusätzlich eingespeister Strom aufgezeichnet.

Dies wird in Abbildung 9a in Form einer exemplarischen Originalregistrierung anhand der Messung einer hNaDC3-exprimierenden Oozyte dargestellt. Die Succinat-vermittelte Depolarisation lag bei +16,5 mV, der zusätzlich eingespeiste Strom im *Voltage-Clamp-Modus* bei -17,0 nA.

Abbildung 9b zeigt eine Originalregistrierung einer Wasser-injizierten Oozyte im *Voltage-Clamp-Modus* unter Zugabe von ORi mit Succinat. Bei einer NaDC3-exprimierenden Oozyte (Abbildung 9a) wurde im Gegensatz zu einer Wasser-injizierten Oozyte (Abbildung 9b) unter Zugabe von Succinat als Substrat des Transporters ein Einwärtsstrom verzeichnet. Somit ist der aufgezeichnete Strom auf die Expression des NaDC3 und nicht auf endogene Transporter der Oozyte zurückzuführen. Damit wurde die Grundlage der Versuchsdurchführung verifiziert.

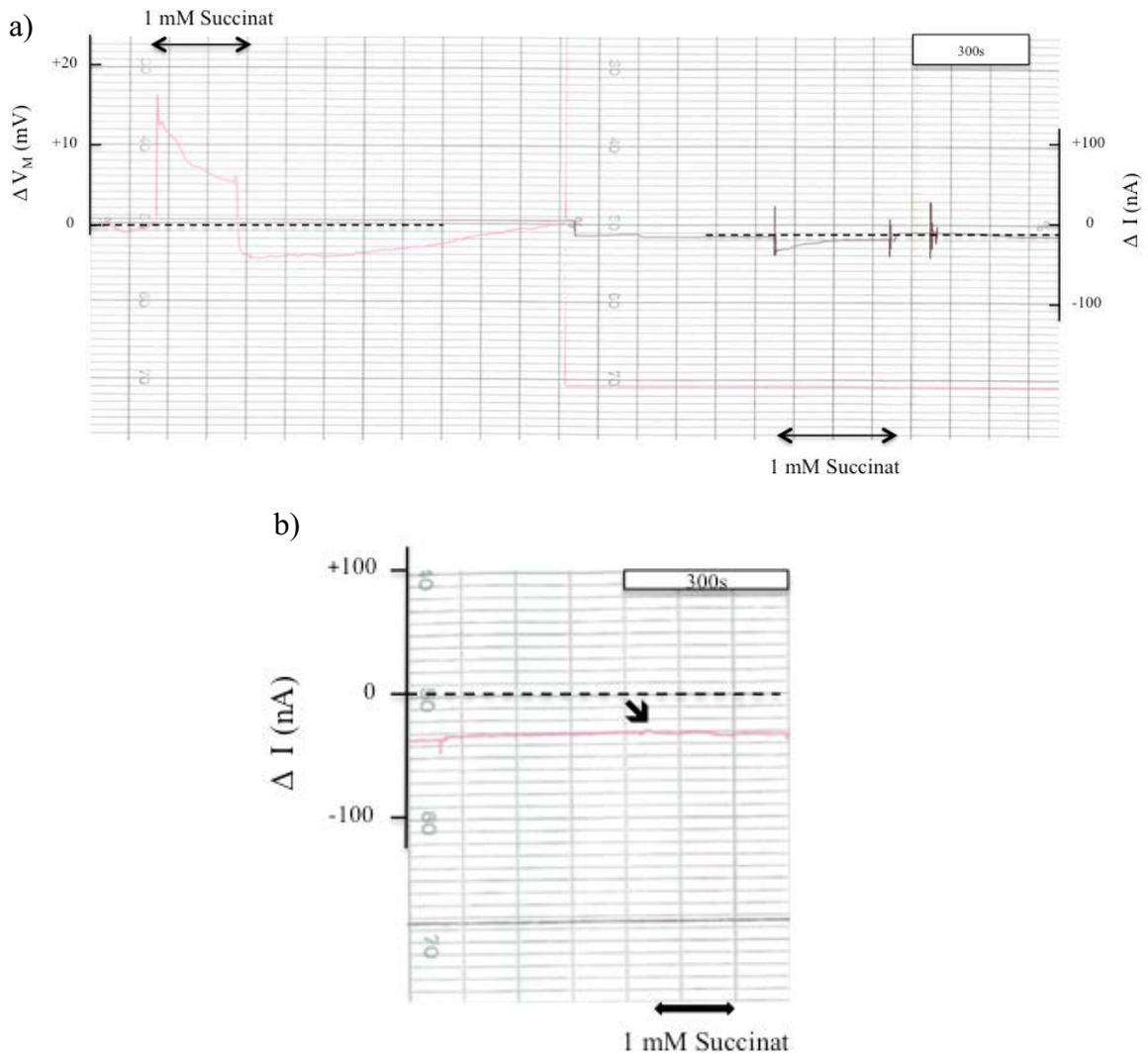


Abbildung 9a, b: Originalregistrierungen der Succinat-abhängigen Depolarisation im *Current-Clamp-Modus* und des Succinat-abhängigen Stroms im *Voltage-Clamp-Modus*

In Abbildung 9a wurde das Membranpotential einer exemplarischen Oozyte (hNaDC3), das bei $-50,5$ mV lag, gleich 0 gesetzt, um die Succinat-abhängige Depolarisation besser sichtbar zu machen. Die Applikation von Succinat (1 mM in ORi, schwarzer Doppelpfeil) resultierte in einer initialen Depolarisation der Oozyte von $+16,5$ mV, der eine langsame Repolarisation folgte. De- und Repolarisation dauerten nur so lange an, wie die Oozyte mit Succinat perfundiert wurde. Nach Herauswaschen des Succinats erfolgte eine weitere Repolarisation über das ursprüngliche Ruhemembranpotential der Oozyte hinaus. Während der anhaltenden Perfusion mit ORi wurde nach ca. zwölf Minuten das ursprüngliche Ruhemembranpotential der Oozyte wieder erreicht. Daraufhin erfolgte das Umschalten in den *Voltage-Clamp-Modus* auf ein Klemmpotential von -60 mV, was einem Einwärtsstrom von -10 nA entspricht. Auch dieser wurde, da nur die Succinat-abhängigen Ströme berücksichtigt werden sollten, gleich 0 gesetzt. Die Gabe von Succinat resultierte in einem transienten Strom von initial -17 nA. In allen folgenden Messungen werden ausschließlich initiale Depolarisationen (Abbildung 10, Abbildung 11) und initiale Ein- und Auswärtsströme (Abbildung 9b, Abbildung 10 und folgende) betrachtet.

Abbildung 9b zeigt eine Originalregistrierung des Succinat-abhängigen Stroms bei einer exemplarischen Wasser-injizierten Oozyte im *Voltage-Clamp-Modus*. Der Pfeil markiert den Succinat-abhängigen Strom (pinkfarbene Linie) im *Voltage-Clamp-Modus* bei -60 mV bei pH 7,5. Die Wasser-injizierte Oozyte reagierte mit kaum nachweisbaren Stromänderungen auf die Gabe von Succinat (1 mM in ORi).

Abbildung 10 zeigt den Vergleich der Depolarisation im *Current-Clamp-Modus* und der Succinat-abhängigen Ströme im *Voltage-Clamp-Modus*. Der Mittelwert für die Succinat-vermittelten Depolarisationen lag bei $+15,3 \pm 12,2$ mV. Der größte gemessene Wert betrug $+47,8$ mV, der niedrigste $+1,1$ mV. Der Mittelwert für die Succinat-vermittelten Ströme lag bei $-63,8 \pm 43,3$ nA. Hierbei wurden Werte zwischen -196 nA und -12 nA detektiert.

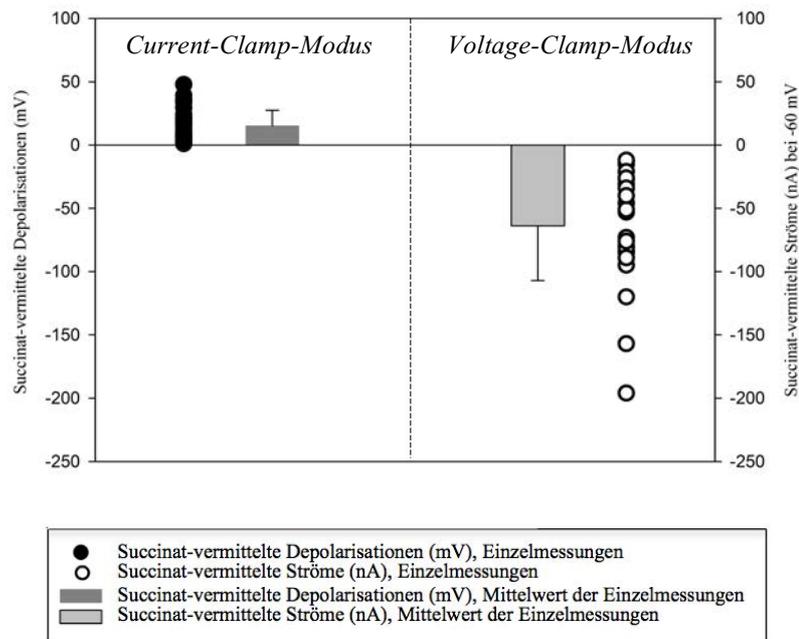


Abbildung 10: Vergleich der Depolarisation im *Current-Clamp-Modus* und des Succinat-abhängigen Stroms im *Voltage-Clamp-Modus* bei -60 mV

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen als Balken, die kreisförmigen Symbole daneben stellen die Werte aus den 27 Einzelmessungen dar. Auf der linken Seite der Graphik befindet sich die Darstellung der Messergebnisse im *Current-Clamp-Modus*, auf der rechten Seite befindet sich die Darstellung der Messergebnisse im *Voltage-Clamp-Modus*. Die Einzelmessungen aus den beiden Modi sind jeweils zueinander gehörende Wertepaare, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht miteinander verbunden wurden.

Abbildung 11 stellt exemplarisch die gepaarten Messungen der fünf größten Depolarisationen mit den zugehörigen Strömen dar. Die Abbildung verdeutlicht, dass bei Oozyten mit hohen Succinat-vermittelten Depolarisationen ebenso hohe Succinat-vermittelte Ströme auftreten. Die Mittelwerte dieser fünf Messungen betragen für die Succinat-induzierten Depolarisationen $+37,1 \pm 4,2$ mV und für die zugehörigen Succinat-induzierten Ströme $-123,4 \pm 35,4$ nA.

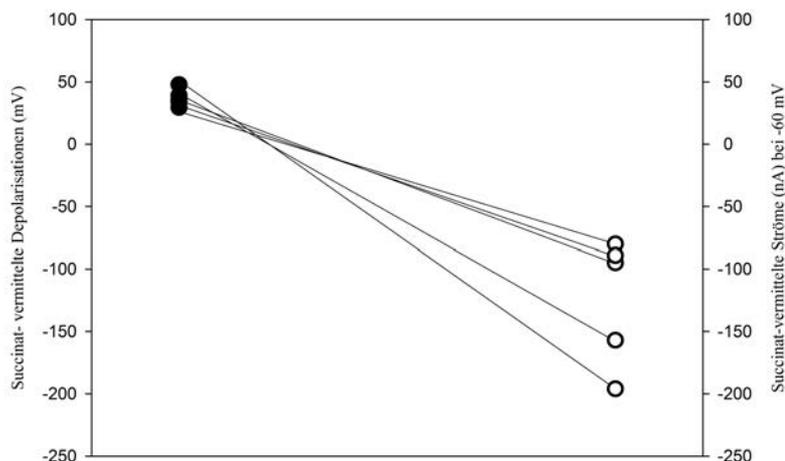


Abbildung 11: Vergleich der Succinat-vermittelten Depolarisationen und Einwärtsströme bei pH 7,5

3.2 pH-Reihe mit Succinat und Citrat

3.2.1 pH-Abhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms

Die Versuche für die pH-Reihe mit Succinat wurden insgesamt mit zehn NaDC3-exprimierenden Oozyten und vier Wasser-injizierten Oozyten durchgeführt. Von den zehn NaDC3-exprimierenden Oozyten exprimierten sechs den fNaDC3- und vier den hNaDC3-Transporter.

In Abbildung 12 sind die Mittelwerte der Succinat-vermittelten Ströme von NaDC3-exprimierenden und Wasser-injizierten Oozyten bei pH-Werten zwischen 5,4 und 8,9 dargestellt. Der Mittelwert der NaDC3-exprimierenden Oozyten basiert auf drei vollständig durchgeführten Messreihen von pH 5,4 bis pH 8,9. Die Succinat-vermittelten Einwärtsströme der NaDC3-exprimierenden Oozyten lagen in diesem pH-Bereich im Mittel zwischen -40 und -55 nA. Nur der bei pH 5,4 gemessene Einwärtsstrom war mit $-90,7 \pm 51,7$ nA deutlich größer. Im Vergleich hierzu waren die Succinat-vermittelten Ströme der Wasser-injizierten Oozyten deutlich geringer. Teilweise kam es zu positiven

Strömen, d.h. auswärts gerichteten Strömen (pH 5,4, pH 5,9, pH 8,4, pH 8,9). Bei den NaDC3-exprimierenden Oozyten lagen hingegen ausschließlich einwärts gerichtete Ströme bei Zugabe von Succinat durch die Expression des NaDC3 und dem dadurch vermittelten Substrattransport über die Membran vor.

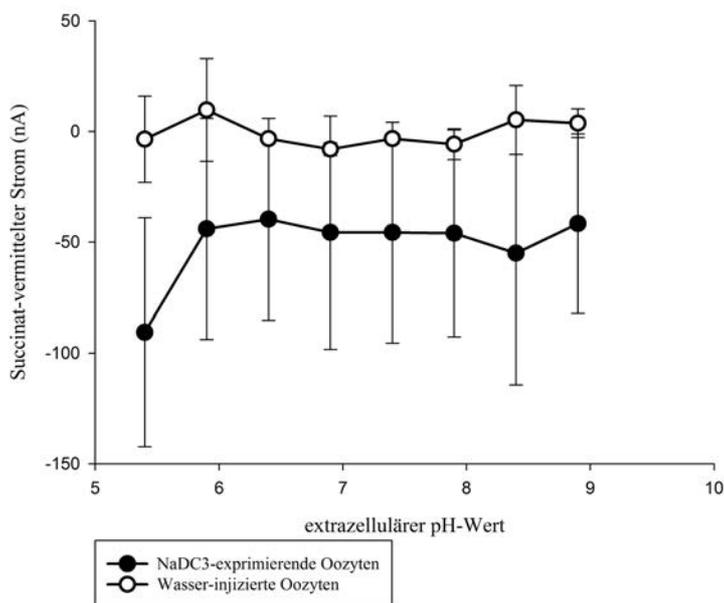


Abbildung 12: pH-Abhängigkeit der Succinat-vermittelten Ströme NaDC3-exprimierender und Wasser-injizierter Oozyten

Dargestellt ist der Succinat-vermittelte Strom (nA) als Mittelwert mit den jeweiligen Standardabweichungen in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert (pH 5,4-8,9) in Form der geschlossenen Kreise für die NaDC3-exprimierenden Oozyten und durch die offenen Kreise für die Wasser-injizierten Oozyten mit den zugehörigen Standardabweichungen. Die Abbildung unterscheidet nicht zwischen hNaDC3- und fNaDC3-exprimierenden Oozyten. Succinat wurde in einer Konzentration von 1 mM angeboten.

Die Darstellung der Mittelwerte aus der Versuchsreihe über den Einfluss des pH-Wertes auf den Succinat-vermittelten Strom erfolgt aufgrund der großen Standardabweichungen außerdem tabellarisch (Tabelle 9). Im sauren Milieu bei pH 5,4 und pH 5,9 sowie im alkalischen Milieu bei pH 8,9 kam es zunehmend zu Fluktuationen und einer Abnahme des Ruhemembranpotentials der Oozyten, sodass in diesem pH-Bereich höhere Halteströme eingespeist werden mussten. Aus diesem Grund war die vollständige Durchführung der Messungen bei diesen pH-Werten erschwert bzw. war der Nachweis aussagekräftiger Ströme nicht möglich.

Tabelle 9: Mittelwerte der pH-Reihe mit Succinat als Substrat bei Wasser-injizierten Oozyten und NaDC3-exprimierenden Oozyten

Dargestellt sind die Mittelwerte des Haltestroms bei den verschiedenen pH-Werten bei Perfusion mit ORi (Haltestrom) und unter Zugabe von 1 mM Succinat (+Succ. ΔI) mit der dazugehörigen Standardabweichung bei pH-Werten zwischen 5,4 und 8,9. Der eingespeiste Strom bei Perfusion mit ORi entspricht dem notwendigen Strom zum Halten der eingestellten Spannung von -60 mV im *Voltage-Clamp-Modus* und korreliert mit der Stabilität des Membranpotentials der Oozyte. Die zueinander gehörenden Messwerte sind farblich in einer Farbe gekennzeichnet und hinterlegt. Die erste Spalte in weiß gibt die pH-Werte an. Darauf folgt die hellblaue Spalte für die Wasser-injizierten Oozyten. In der Spalte „n“ ist die Anzahl der verwendeten Oozyten angegeben. Bei den NaDC3-exprimierenden Oozyten wird hier noch zwischen „f“ für fNaDC3 und „h“ für hNaDC3 differenziert. Die beigefarbene Spalte beinhaltet die Werte für die Messungen aus drei vollständigen Messreihen, die graue Spalte listet sämtliche Werte aus allen zehn Messungen auf, auch wenn diese nicht vollständig durchgeführt werden konnten.

pH-Wert	Wasser-injizierte Oozyten			NaDC3-exprimierende Oozyten (3)					NaDC3-exprimierende Oozyten (10)				
	Haltestrom (nA)	+Succ. ΔI (nA)	n	Haltestrom (nA)	+Succ. ΔI (nA)	n	f	h	Haltestrom (nA)	+Succ. ΔI (nA)	n	f	h
5,4	-170,8 ± 129,1	-3,5 ± 19,5	4	-72,3 ± 27,3	-90,7 ± 51,7	3	2	1	-87,0 ± 82,8	-77,0 ± 86,4	8	5	3
5,9	-105,5 ± 56,3	9,8 ± 23,2	4	-45,0 ± 8,5	-44,0 ± 49,9	3	2	1	-64,9 ± 71,1	-33,3 ± 52,1	10	5	5
6,4	-80,8 ± 18,3	-3,3 ± 1,5	4	-49,0 ± 11,8	-39,7 ± 45,6	3	2	1	-71,5 ± 81,4	-37,7 ± 52,3	10	5	5
6,9	-79,8 ± 24,4	-8,0 ± 2,9	4	58,7 ± 12,8	-45,7 ± 52,6	3	2	1	-78,2 ± 85,9	-39,5 ± 45,0	10	5	5
7,4	-73,3 ± 38,3	-3,3 ± 2,3	4	-64,0 ± 16,4	-45,7 ± 49,8	3	2	1	-83,2 ± 103,0	-46,8 ± 58,1	9	4	5
7,9	-69,8 ± 58,4	-5,8 ± 7,0	4	-46,0 ± 7,3	-46,0 ± 46,7	3	2	1	-36,4 ± 36,3	-52,1 ± 53,6	7	3	4
8,4	-58,5 ± 57,9	5,3 ± 15,6	4	-48,7 ± 15,1	-55,0 ± 59,4	3	2	1	-44,0 ± 13,8	-52,8 ± 46,3	5	2	3
8,9	-93,3 ± 23,6	3,8 ± 6,5	3	-67,7 ± 37,0	-41,7 ± 40,5	3	2	1	-60,5 ± 34,4	-44,5 ± 35,5	4	2	2

3.2.2 pH-Abhängigkeit des Citrat-vermittelten Stroms

Für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Citrat-vermittelten Stroms wurden sieben NaDC3-exprimierende Oozyten (fünf fNaDC3- und zwei hNaDC3-exprimierende Oozyten) aus fünf Spendertieren verwendet. Für die Kontrollmessung wurde vier Oozyten aus drei Spendertieren eine äquivalente Menge Wasser injiziert.

Wie bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit bei dem Succinat-vermittelten Strom (3.2.1) lag auch bei der Untersuchung mit dem Substrat Citrat eine verminderte Resistenz der Oozyte bei sehr niedrigen (pH 5,4 und pH 5,9) und sehr hohen pH-Werten (pH 8,9) mit daraus resultierenden fluktuierenden Verläufen der Membranpotentiale und entsprechenden einzuspeisenden Strömen vor, welche die Messungen erschwerten. Die Oozyten tolerierten pH-Werte $< 5,9$ und $> 8,4$ nur schlecht.

Die Mittelwerte der Citrat-vermittelten Ströme in Abhängigkeit vom pH-Wert bei NaDC3-exprimierenden Oozyten zeigt Abbildung 13. Im pH-Bereich zwischen 6,4 und 8,4 waren die Abweichungen gering. Insgesamt könnte in diesem pH-Bereich eine Tendenz zu höheren Citrat-vermittelten Einwärtsströmen vermutet werden, die allerdings kein Signifikanzniveau erreichte.

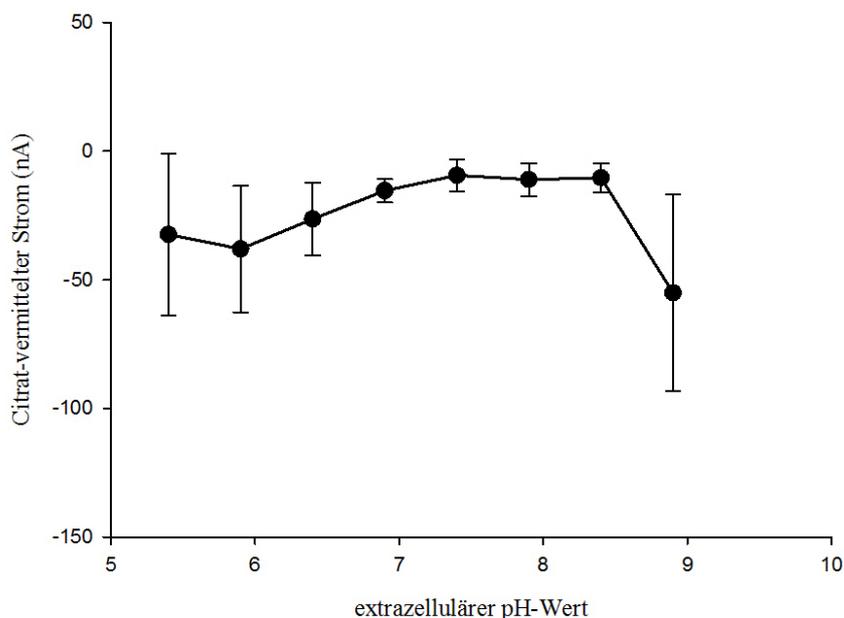


Abbildung 13: pH-Abhängigkeit des Citrat-vermittelten Stroms

Dargestellt ist der Citrat-vermittelte Strom (nA) in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert (pH 5,4-8,9). Die Mittelwerte mit den Standardabweichungen basieren auf Daten aus drei Versuchsreihen, die den gesamten pH-Bereich umfassten. Auf die Darstellung der Werte aus den Messungen mit Wasser-injizierten Oozyten wird in dieser Abbildung verzichtet, da diese relativ großen Fluktuationen unterlagen und aus diesem Grund tabellarisch in Tabelle 10 aufgeführt sind.

Die Darstellung der Mittelwerte für die Wasser-injizierten Oozyten mit dem Substrat Citrat erfolgt wie bei Succinat tabellarisch (Tabelle 10).

Tabelle 10: Mittelwerte der pH-Reihe mit Citrat als Substrat bei Wasser-injizierten und NaDC3-exprimierenden Oozyten

Dargestellt sind die Mittelwerte des Haltestroms bei den verschiedenen pH-Werten bei Perfusion mit ORi (Haltestrom) und unter Zugabe von 1 mM Citrat (+Citrat \square I) mit der dazugehörigen Standardabweichung bei pH-Werten zwischen 5,4 und 8,9. Der eingespeiste Strom bei Perfusion mit ORi entspricht dem notwendigen Strom zum Halten der eingestellten Spannung von -60 mV im *Voltage-Clamp-Modus* und korreliert mit der Stabilität des Membranpotentials der Oozyte. Die zueinander gehörenden Messwerte sind farblich gekennzeichnet und in einer Farbe hinterlegt. Die erste Spalte in weiß gibt die pH-Werte an. Darauf folgt die hellblaue Spalte für die Wasser-injizierten Oozyten. In der Spalte „n“ ist die Anzahl der verwendeten Oozyten angegeben. Bei den NaDC3-exprimierenden Oozyten wird hier noch zwischen „f“ für fNaDC3 und „h“ für hNaDC3 differenziert. Die beigefarbene Spalte beinhaltet die Werte für die Messungen aus drei vollständigen Messreihen, die graue Spalte listet sämtliche Werte aus allen sieben Messungen auf, auch wenn diese nicht vollständig durchgeführt werden konnten.

pH-Wert	Wasser-injizierte Oozyten			NaDC3-exprimierende Oozyten (3)					NaDC3-exprimierende Oozyten (7)				
	Haltestrom (nA)	+Citrat \square I (nA)	n	Haltestrom (nA)	+Citrat \square I (nA)	n	f	h	Haltestrom (nA)	+Citrat \square I (nA)	n	f	h
5,4	-133,8 ± 90,9	-13,8 ± 15,2	4	-183,0 ± 181,2	-32,3 ± 31,5	3	2	1	-103,5 ± 150,8	-44,7 ± 62,0	6	5	1
5,9	-123,8 ± 77,6	-9,00 ± 6,7	4	-161,7 ± 172,2	-38,0 ± 24,6	3	2	1	-83,1 ± 131,9	-40,4 ± 45,3	7	5	2
6,4	-88,0 ± 31,8	-6,3 ± 2,3	4	-147,7 ± 141,7	-26,3 ± 14,2	3	2	1	-79,7 ± 110,2	-30,9 ± 34,6	7	5	2
6,9	-89,0 ± 30,3	-11,3 ± 5,4	4	-88,0 ± 61,6	-15,3 ± 4,5	3	2	1	-60,6 ± 50,7	-16,3 ± 12,5	7	5	2
7,4	-69,3 ± 41,4	-8,0 ± 4,2	4	-61,0 ± 16,4	-9,3 ± 6,2	3	2	1	-48,3 ± 27,0	-14,0 ± 9,6	7	5	2
7,9	-69,0 ± 47,6	-12,0 ± 10,0	4	-39,0 ± 6,4	-11,0 ± 6,4	3	2	1	-18,4 ± 38,6	-12,0 ± 6,2	5	3	3
8,4	-40,7 ± 37,7	-35,3 ± 56,7	3	-34,7 ± 8,5	-10,3 ± 5,6	3	2	1	-9,2 ± 41,1	-14,5 ± 8,7	4	2	2
8,9	-76,0 ± 25,1	14,7 ± 6,4	3	-89,0 ± 63,8	-55,0 ± 38,3	3	2	1	-59,3 ± 75,5	61,5 ± 35,0	4	2	2

3.2.3 Vergleich der pH-Reihen von Succinat und Citrat

Abbildung 14 zeigt die Succinat- und Citrat-vermittelten Ströme im Vergleich. Citrat-vermittelte Ströme wiesen bis auf eine Ausnahme bei pH 8,9 ($-55,0 \pm 38,3$ nA) bei allen anderen pH-Werten geringere Einwärtsströme als die von Succinat bei den entsprechenden pH-Werten ermittelten Ströme auf (Tabelle 9 und Tabelle 10). Der geringste Succinat-vermittelte Strom lag bei einem pH-Wert von 6,4 bei $-39,7 \pm 45,6$ nA, der größte bei pH 5,4 mit $-90,7 \pm 51,7$ nA.

Bei der pH-Reihe mit Citrat lag der niedrigste Strom bei einem pH-Wert von 7,4 mit $-9,3 \pm 6,2$ nA. Der Maximalstrom lag bei pH 8,9 mit $-55,0 \pm 38,3$ nA.

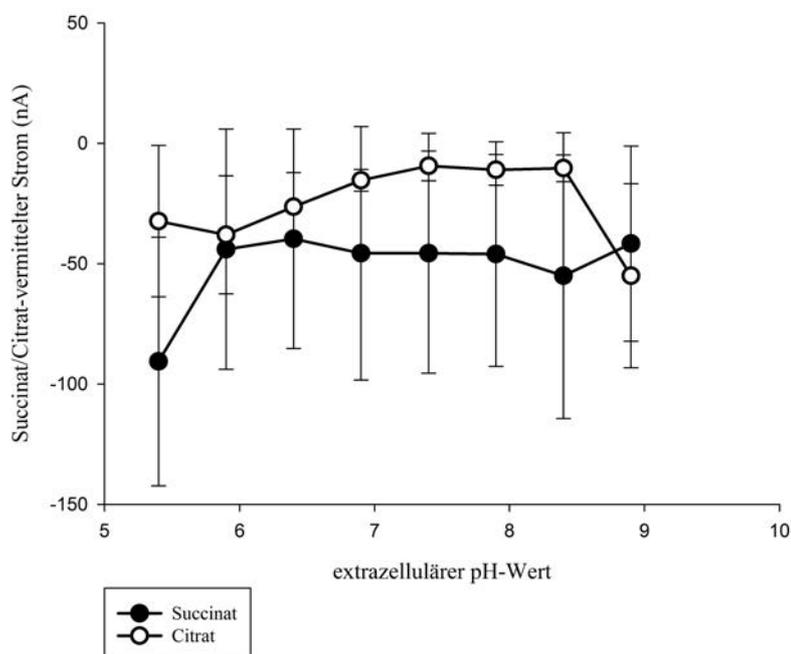


Abbildung 14: Vergleich der pH-Reihen von Succinat und Citrat

Dargestellt sind die Mittelwerte der Succinat- und Citrat-vermittelten Ströme (nA) in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert. Die geschlossenen Kreise symbolisieren die Succinat-vermittelten Ströme und die offenen Kreise stehen für die Citrat-vermittelten Ströme. Der Graph gibt die Werte der beigefarbenen Spalten der Tabellen 9 und 10 wieder.

3.3 Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) von Succinat und Citrat bei pH 6,5 und pH 7,5

3.3.1 Konzentrations- und pH-Abhängigkeit Succinat-vermittelter Ströme

Für die Untersuchung des Succinat-vermittelten Stroms des NaDC3 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und dem pH-Wert wurden die Succinatkonzentrationen durch die Verdünnung mit ORi von 1 μM bis 1 mM Succinat variiert und die Messungen mit auf pH 6,5 und pH 7,5 eingestellten Lösungen durchgeführt (2.2.4), um die jeweiligen Michaelis-Menten-Konstanten bei zwei unterschiedlichen pH-Werten vergleichen zu können. Grundlage für die Auswahl dieser pH-Werte waren die Ergebnisse aus der vorherigen Messung zur pH-Abhängigkeit. Aus diesen ergab sich, dass das Ruhemembranpotential in diesem pH-Bereich annähernd stabil war und die Substrat-vermittelten Ströme eine für den Vergleich ausreichende Amplitude besaßen. Als Abstand wurde eine ganze pH-Stufe gewählt (pH 6,5, pH 7,5), um möglichst große Änderungen im Hinblick auf die Substrat-abhängigen Ströme zu erhalten. Die Versuchsreihen wurden mit sechs fNaDC3-exprimierenden Oozyten aus vier Spendertieren und mit drei Wasser-injizierten Oozyten aus drei Spendertieren durchgeführt.

Die Originalregistrierung in Abbildung 15 zeigt exemplarisch die Succinat-vermittelten Ströme in Abhängigkeit von Succinatkonzentrationen im Bereich von 0,002 mM bis 0,05 mM bei einem pH-Wert von 7,5. Die Amplitude der Ströme nahm kontinuierlich mit Erhöhung der Succinatkonzentration zu: -11 nA, -20 nA, -34 nA, -40 nA, -41 nA und erreichte bei einer Konzentration von 0,02 mM Succinat Sättigung mit -40 nA.

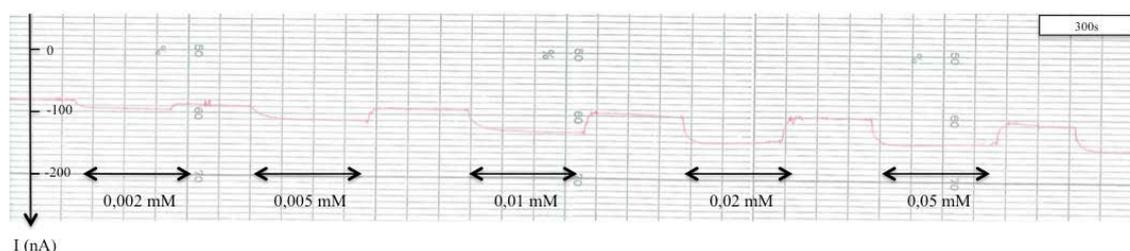


Abbildung 15: Originalregistrierung des Succinat-vermittelten Stroms in Abhängigkeit von aufsteigenden Succinatkonzentrationen bei pH 7,5

Die Succinatkonzentrationen wurden jeweils für ca. fünf Minuten, markiert durch die schwarzen Doppelpfeile, angeboten. Zwischen den einzelnen Succinatapplikationen erfolgte die Perfusion ausschließlich mit ORi. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment aus einem Kontingent von sechs vergleichbaren Messungen.

Succinat-vermittelter Strom bei pH 6,5

In Abbildung 16 wird der Verlauf des Succinat-vermittelten Stroms in Abhängigkeit der verschiedenen Succinatkonzentrationen bei fNaDC3-exprimierenden und bei Wasser-injizierten Oozyten dargestellt. Die Succinat-vermittelten Ströme waren im Mittel zwischen $-13,0 \pm 10,3$ nA (1 μ M Succinat) und $-58,2 \pm 29,6$ nA (1 mM Succinat) groß und damit sowohl in den Einzelmessungen als auch in den Mittelwerten signifikant voneinander verschieden ($p < 0,01$). Die Wasser-injizierten Oozyten zeigten, wie auch in den vorherigen Versuchen, keine bzw. nur geringfügig negative Einwärtsströme.

Für die Berechnung der K_m , der Halbsättigungskonstanten, wurde basierend auf den Werten der Ströme und der Konzentrationen für Succinat bei pH 6,5 mit der Formel $I = I_{\max} \cdot [S]/K_m + [S]$ gearbeitet, wobei [S] die Substratkonzentration, I den gemessenen Strom, I_{\max} den maximalen Strom und K_m die Michaelis-Menten-Konstante darstellen. Der Mittelwert der errechneten K_m aus sechs Messreihen betrug $6,0 \pm 3,9$ μ M, I_{\max} lag bei $-54,8 \pm 23,5$ nA.

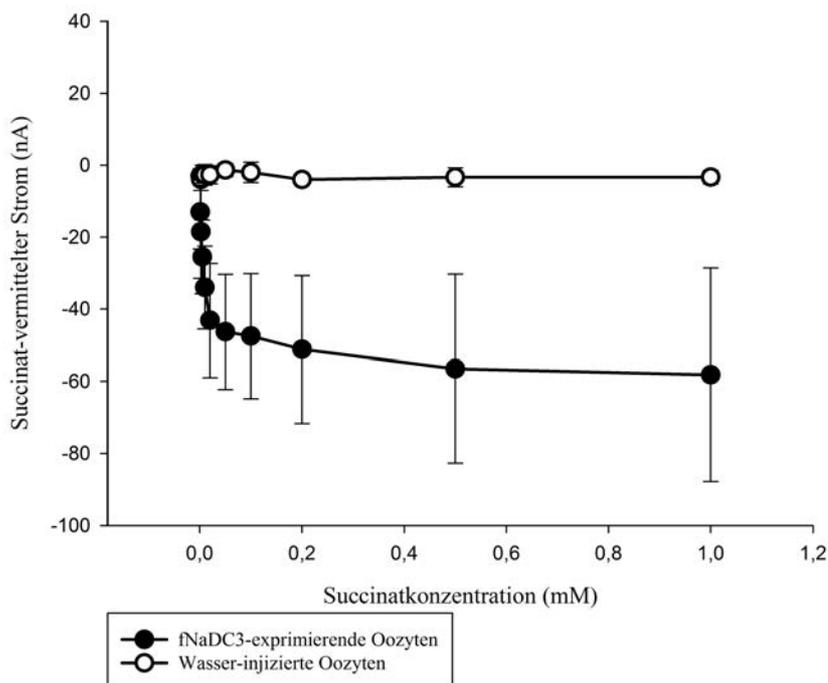


Abbildung 16: Succinat-vermittelter Strom in Abhängigkeit von aufsteigenden Succinatkonzentrationen bei pH 6,5

Dargestellt sind die Succinat-vermittelten Ströme (nA) bei pH 6,5 von sechs fNaDC3-exprimierenden Oozyten in Form der geschlossenen Kreise und von drei Wasser-injizierten Oozyten durch die offenen Kreise. Die Auftragung des Succinat-vermittelten Stroms (nA) für die Bestimmung der K_m für Succinat bei pH 6,5 erfolgte gegen die Succinatkonzentration (mM).

Abbildung 17 zeigt eine Auftragung nach Eadie-Hofstee. Diese Auftragung ermöglicht ein direktes Ablesen von I_{\max} als y-Achsenabschnitt und K_m als negative Steigung der Regressionsgeraden. Graphisch ergab sich ein maximaler Strom (y-Achsenabschnitt) von $-51,2 \pm 2,2$ nA. Aus der negativen Steigung resultierte eine K_m von $3,4 \pm 0,4$ μM . Diese Abweichung im Vergleich zur berechneten K_m ergab sich aus den in den Mittelwert einbezogenen Versuche mit einzelnen, höheren Michaelis-Menten-Konstanten mit Werten von 10 μM und 13 μM . Bei der graphischen Ermittlung aus der Regressionsgeraden hatten diese beiden Werte geringere Auswirkungen auf das Ergebnis. Aufgrund der „gebogenen“ Darstellung wurde das Vorliegen eines Zwei-Komponenten-Systems angenommen, welches durch die zwei gestrichelten Geraden dargestellt wird. Darüber, ob tatsächlich ein Zwei-Komponenten-System vorliegt oder ob die Konzentrationen oder andere Parameter zu der nicht-linearen Darstellung führten, kann nur spekuliert werden.

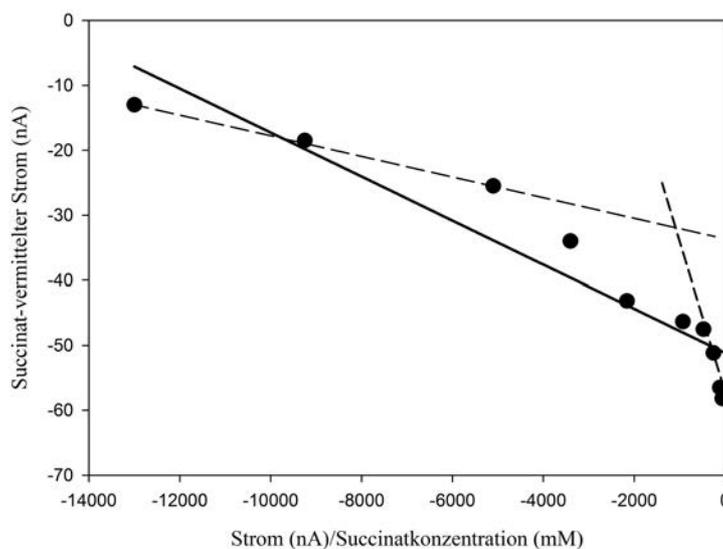


Abbildung 17: Auftragung des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 6,5 nach Eadie-Hofstee. Aufgetragen ist der Succinat-vermittelte Strom (nA) gegen den Quotienten aus Strom (nA) und Substratkonzentration (mM). Auf das Einzeichnen der Standardabweichungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Aufgrund des „gebogenen“ Verlaufs der Messwerte in diesem Eadie-Hofstee-Diagramm wurde „hypothetisch“ ein Zwei-Komponenten-Systems angenommen, das durch die gestrichelten Geraden dargestellt wird.

Succinat-vermittelter Strom bei pH 7,5

Ebenso wie bei pH 6,5 erfolgt auch bei pH 7,5 die graphische Darstellung des Succinat-vermittelten Stroms in Abhängigkeit von den verschiedenen Succinatkonzentrationen bei fNaDC3-exprimierenden und bei Wasser-injizierten Oozyten in Abbildung 18. Der Mittelwert der errechneten Konstanten aus sechs Messreihen betrug $3,9 \pm 2,0$ μM . Der

maximale Strom lag durchschnittlich bei $-47,6 \pm 16,2$ nA. Bei pH 7,5 kam es im Bereich der höheren Succinatkonzentrationen bei den Wasser-injizierten Oozyten teilweise zu Auswärts- statt zu Einwärtsströmen.

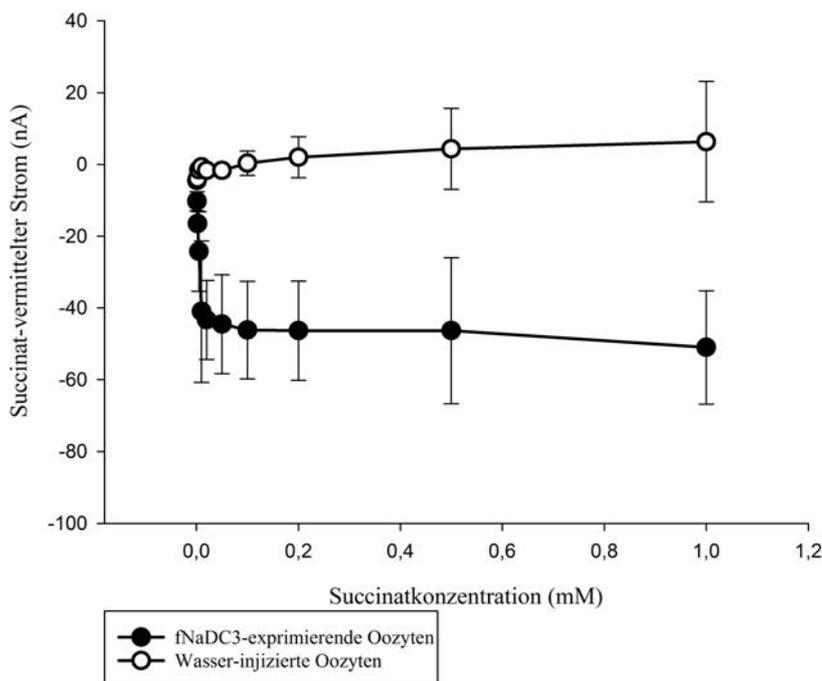


Abbildung 18: Succinat-vermittelter Strom in Abhängigkeit von aufsteigenden Succinatkonzentrationen bei pH 7,5

Dargestellt sind die Succinat-vermittelten Ströme (nA) bei pH 7,5 von sechs fNaDC3-exprimierenden Oozyten in Form der geschlossenen Kreise und von drei Wasser-injizierten Oozyten durch die offenen Kreise. Die Auftragung des Succinat-vermittelten Stroms (nA) für die Bestimmung der K_m für Succinat bei pH 7,5 erfolgte gegen die Succinatkonzentration (mM).

Abbildung 19 stellt ein Eadie-Hofstee-Diagramm für die graphische Darstellung von I_{max} und K_m bei pH 7,5 dar. I_{max} betrug $-48,9 \pm 1,7$ nA und entsprach dem in Abbildung 18 errechneten Wert von -48 nA. Über beide Auftragungen wurde ein ähnlicher K_m -Wert erhalten: $3,8 \pm 0,4$ μ M in der Eadie-Hofstee-Analyse und 3,9 μ M in der Darstellung in Abbildung 18.

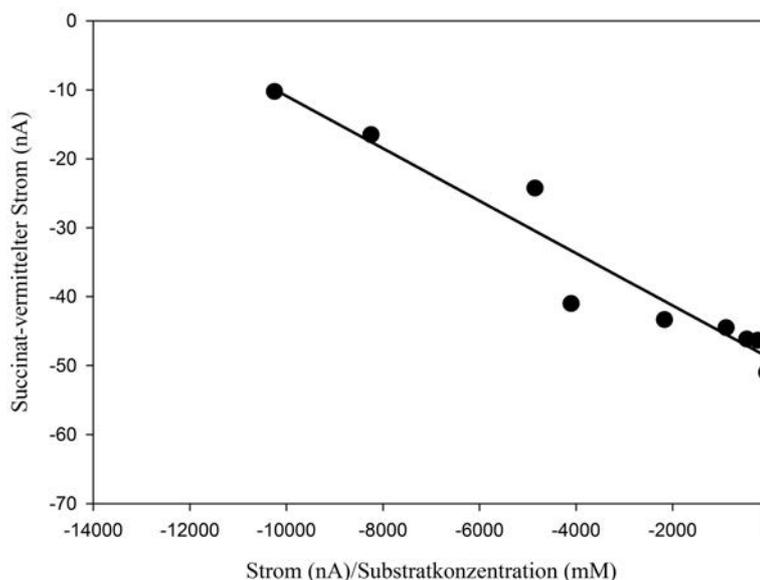


Abbildung 19: Auftragung des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 7,5 nach Eadie-Hofstee. Aufgetragen ist der Succinat-vermittelte Strom (nA) gegen den Quotienten aus Strom (nA) und Substratkonzentration (mM).

Vergleich des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 6,5 und pH 7,5

Die Höhe des Succinat-vermittelten Stroms war bei pH 6,5 und bei pH 7,5 relativ ähnlich und bei keinem pH-Wert signifikant voneinander verschieden. Um dies zu verdeutlichen sind die Werte aus den Abbildungen 16 und 18 in Abbildung 20 in halblogarithmischer Form direkt einander gegenübergestellt.

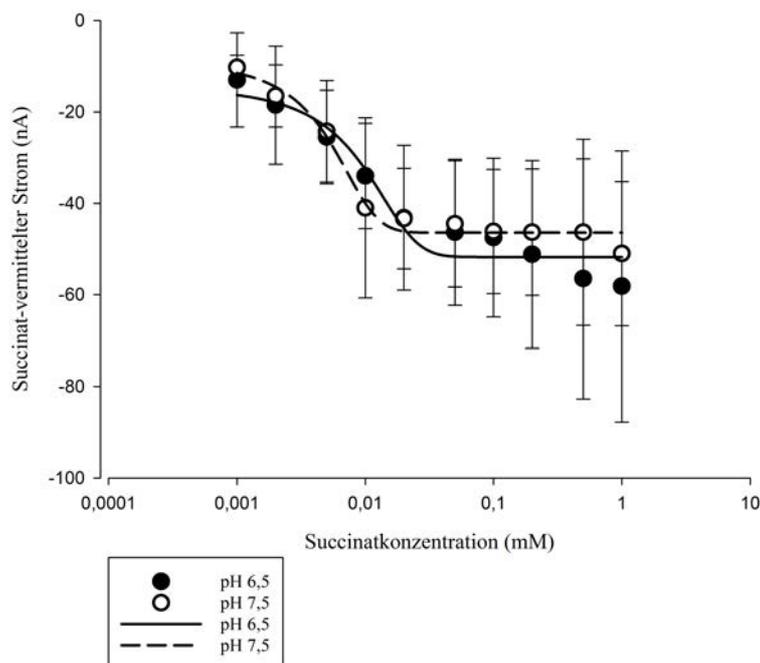


Abbildung 20: Halblogarithmische Darstellung der Succinat-vermittelten Ströme in Abhängigkeit von der extrazellulären Succinatkonzentration bei pH 6,5 und pH 7,5

Die Succinat-vermittelten Ströme (nA) in Abhängigkeit von der Succinatkonzentration (mM) bei pH 6,5 werden durch die geschlossenen Kreise und die durchgezogene Linie dargestellt. Die offenen Kreise und die gestrichelte Linie stellen ebenso die Succinat-vermittelten Ströme bei pH 7,5 dar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit in den niedrigen Konzentrationsbereichen erfolgt die Darstellung halblogarithmisch. Die Werte beider Graphen basieren auf den Werten aus den Abbildungen 16 und 18.

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Werte der errechneten Michaelis-Menten-Konstanten mit den dazugehörigen maximalen Strömen für Succinat für sechs Einzelmessungen bei pH 6,5 (Abbildung 21a) und bei pH 7,5 (Abbildung 21b) gezeigt. Die höheren K_m -Werte korrelieren mit denen der maximalen Ströme. So lagen bei pH 6,5 der größte K_m -Wert von 12,7 μM und zugleich der höchste maximale Strom mit -86,0 nA vor. Die niedrigste K_m wies mit 2,1 μM ebenfalls einen deutlich geringeren maximalen Strom von -40,2 nA auf.

Bei pH 7,5 lagen ähnliche Bezüge vor. Die höchste K_m von 7,9 μM war etwas geringer als bei pH 6,5, wies aber ebenfalls einen der höchsten maximalen Ströme mit -64,1 nA auf. Die niedrigste K_m bei pH 7,5 hatte einen Wert von 1,8 μM mit einem maximalen Strom von -29,9 nA.

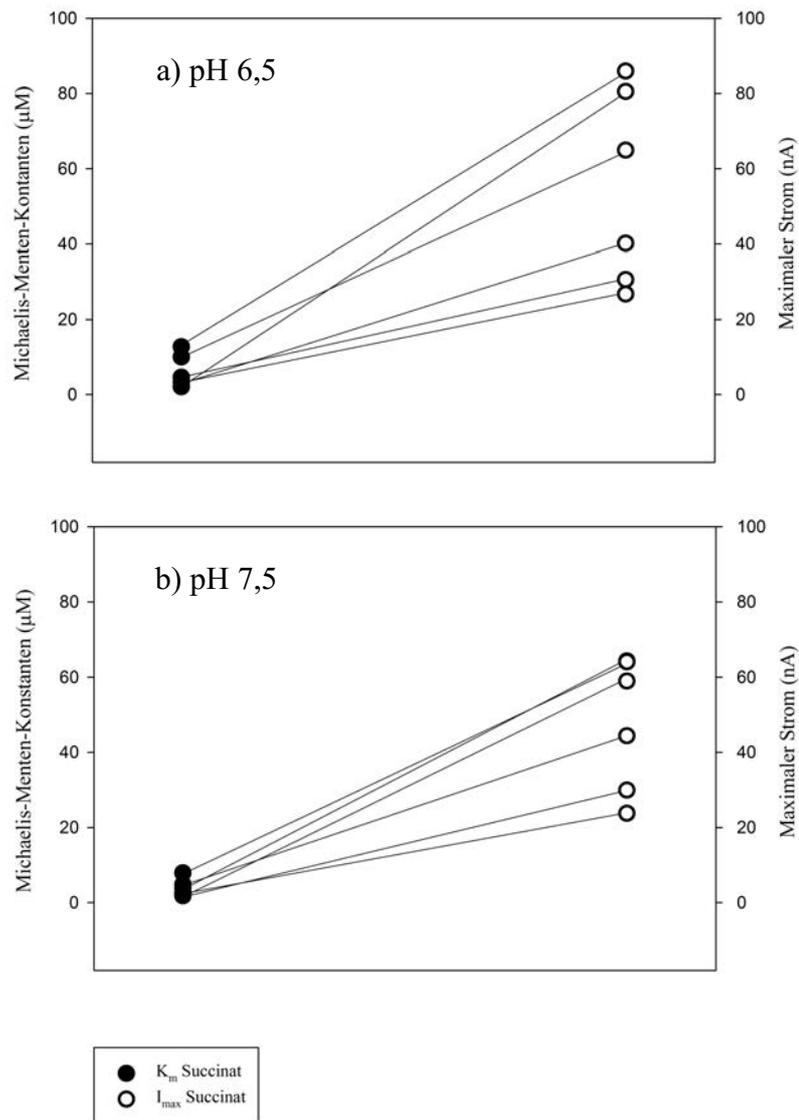


Abbildung 21a, b: Vergleich der Einzelwerte von K_m und I_{max} für Succinat bei pH 6,5 und pH 7,5. Die geschlossenen Kreise symbolisieren die einzelnen Werte der errechneten K_m (μM). Die offenen Kreise stehen für den jeweiligen I_{max} (nA). Durch die Linien werden die sechs Wertepaare aus sechs verschiedenen Messungen miteinander verbunden. Die Werte des maximalen Stroms in nA sind als positive Werte angegeben, obwohl die Differenz des durch den Substrat-vermittelten Stroms negativ ist, da unter Substratzufuhr weniger Strom in den Stromkreislauf eingespeist wurde. Da die Zuordnung von großer K_m zu großem (negativen) Strom eindeutig ist, wurde auf das Minuszeichen in der Darstellung verzichtet. Dies wurde bei allen folgenden Abbildungen dieser Art so fortgeführt.

Das Balkendiagramm (Abbildung 22) stellt die Mittelwerte der errechneten Michaelis-Menten-Konstanten für die beiden pH-Werte mit den jeweiligen Standardabweichungen nebeneinander. Die K_m für Succinat bei pH 6,5 betrug $6,0 \pm 3,9 \mu\text{M}$ und ist damit größer als die K_m bei pH 7,5 mit durchschnittlich $3,9 \pm 2,0 \mu\text{M}$. Eine analoge Beobachtung wurde für die maximalen Ströme gemacht. Aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen sind diese Unterschiede allerdings nicht signifikant voneinander

verschieden, sodass sowohl für K_m als auch für I_{max} kein Unterschied in Abhängigkeit des extrazellulären pH-Wertes im Bereich 6,5 und 7,5 gefunden wurde.

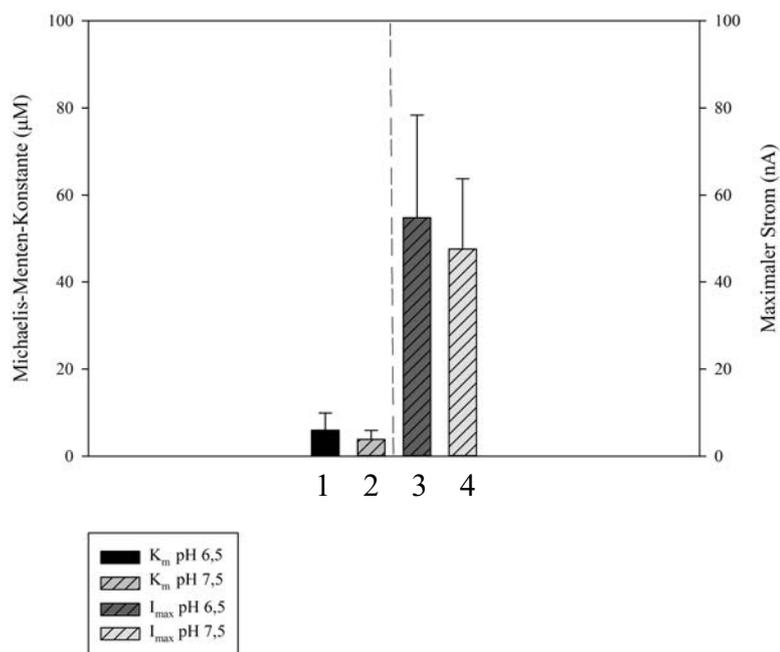


Abbildung 22: Vergleich der Mittelwerte von K_m und I_{max} für Succinat bei pH 6,5 und pH 7,5. Die beiden Balken stellen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen der errechneten K_m (μM) bei pH 6,5 (1) und bei pH 7,5 (2). Rechts daneben sind die I_{max} -Werte (nA) bei pH 6,5 (3) und bei pH 7,5 (4) dargestellt, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit auf das Minuszeichen der Ströme wie in der vorherigen Abbildung und bei allen folgenden Abbildungen dieser Art verzichtet wurde.

3.3.2 Konzentrations- und pH-Abhängigkeit Citrat-vermittelter Ströme

Der Citrat-vermittelte Strom des NaDC3 wurde ebenfalls in Abhängigkeit der Substratkonzentration bei pH 6,5 und 7,5 untersucht. Es wurden sieben fNaDC3-exprimierende Oozyten aus fünf Spendertieren und drei Wasser-injizierte Oozyten aus drei Spendertieren verwendet.

Citrat-vermittelter Strom bei pH 6,5

In Abbildung 23 sind die Citrat-vermittelten Ströme in Abhängigkeit von der Citratkonzentration linear dargestellt. Die Citrat-induzierten Einwärtsströme nahmen bei den fNaDC3-exprimierenden Oozyten mit aufsteigenden Konzentrationen von Citrat zu. Sie betragen $-7,6 \pm 5,5$ nA bei 0,05 mM und $-23,3 \pm 8,6$ nA bei 1 mM Citrat und waren damit bei diesen beiden Konzentrationen signifikant voneinander verschieden ($p < 0,01$). Ab einer Citratkonzentration von 0,5 mM konnte keine weitere Zunahme des Citrat-abhängigen Stroms mehr nachgewiesen werden.

Aus diesen Werten konnte eine K_m von $342,5 \pm 482,4 \mu\text{M}$ und ein maximaler Einwärtsstrom von $-30,2 \pm 8,3 \text{ nA}$ berechnet werden. Die Wasser-injizierten Oozyten zeigten, wie auch in den vorherigen Versuchen, keine bzw. kaum nachweisbare Einwärtsströme, die weder vom pH-Wert noch von der Citrat-Konzentration beeinflusst zu sein schienen.

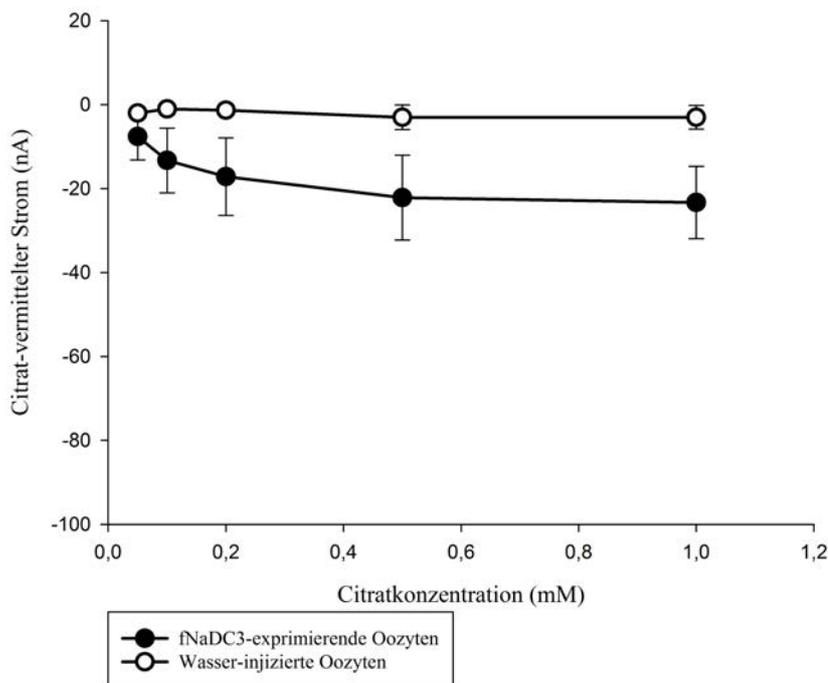


Abbildung 23: Citrat-vermittelter Strom in Abhängigkeit von aufsteigenden Citratkonzentrationen bei pH 6,5

Dargestellt sind die Citrat-vermittelten Ströme (nA) bei pH 6,5 von sieben fNaDC3-exprimierenden Oozyten in Form der geschlossenen Kreise und von drei Wasser-injizierten Oozyten durch die offenen Kreise. Die Auftragung des Citrat-vermittelten Stroms (nA) für die Bestimmung der K_m für Citrat bei pH 6,5 erfolgte gegen die Citratkonzentration (mM).

Zusätzlich zur Berechnung der K_m für Citrat war es mit der Auftragung nach Eadie-Hofstee – wie auch bei Succinat – möglich, die K_m graphisch zu bestimmen. Dazu wurde der Citrat-vermittelte Strom (nA) gegen den Quotienten aus Strom (nA) und Substratkonzentration (mM) aufgetragen (Abbildung 24): I_{\max} wurde zu $-26,7 \pm 1,4 \text{ nA}$ und K_m zu $114,7 \pm 13,8 \mu\text{M}$ bestimmt. Die Abweichung der K_m bei Bestimmung durch Berechnung und Bestimmung durch graphische Darstellung gründete auf der Berechnung des Mittelwerts unter Einbezug einer hohen K_m von $1511,0 \mu\text{M}$ und der Abschwächung des Wertes durch die Regressionsgerade bei der graphischen Bestimmung.

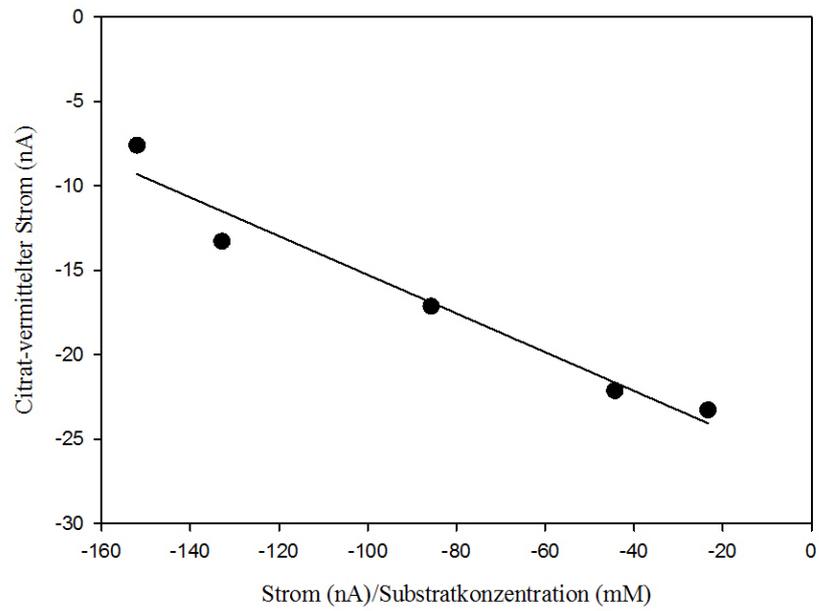


Abbildung 24: Auftragung des Citrat-vermittelten Stroms bei pH 6,5 nach Eadie-Hofstee
Aufgetragen ist der Citrat-vermittelte Strom (nA) gegen den Quotienten aus Strom (nA) und Substratkonzentration (mM).

Citrat-vermittelter Strom bei pH 7,5

Neben der K_m für Citrat bei pH 6,5 wurde ebenso die K_m für Citrat bei einem pH-Wert von 7,5 bestimmt. Abbildung 25 stellt die Citrat-vermittelten Ströme (nA) in Abhängigkeit von der Citratkonzentration dar. Die Mittelwerte der Citrat-vermittelten Ströme aus sieben durchgeführten Messungen an fNaDC3-exprimierenden Oozyten lagen bei $-3,5 \pm 5,5$ nA bei der geringsten Konzentration von Citrat von 0,05 mM bis zu $-27,6 \pm 30,8$ nA bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 1mM Citrat. Die auf diesen Daten basierende K_m betrug $360,1 \pm 343,3$ μ M mit einem I_{max} von $-45,6 \pm 62,1$ nA. Die Wasser-injizierten Oozyten zeigten keine oder nur sehr geringe Reaktionen auf Perfusion mit Citrat.

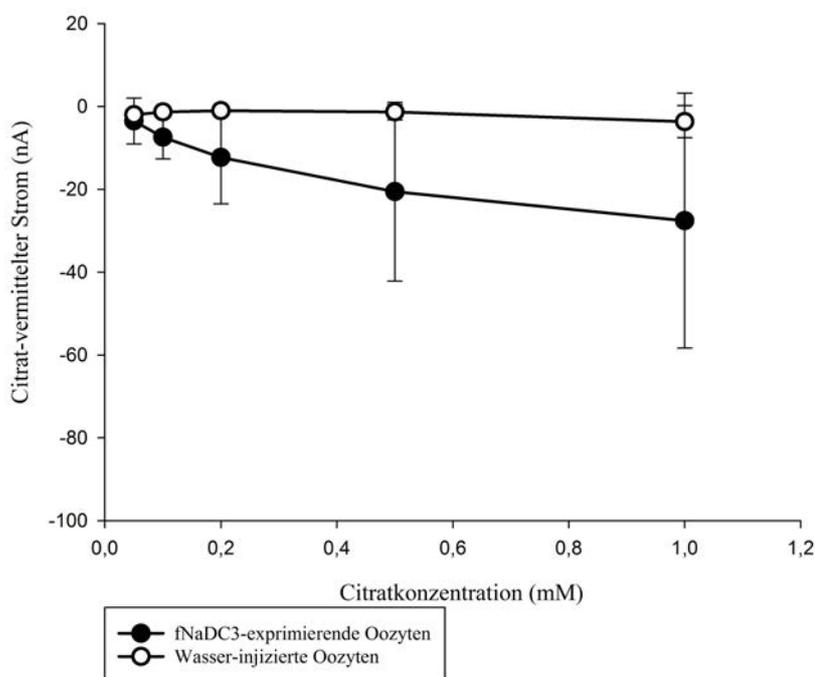


Abbildung 25: Citrat-vermittelter Strom in Abhängigkeit von aufsteigenden Citratkonzentrationen bei pH 7,5

Dargestellt sind die Citrat-vermittelten Ströme (nA) bei pH 7,5 von sieben fNaDC3-exprimierenden Oozyten in Form der geschlossenen Kreise und von drei Wasser-injizierten Oozyten durch die offenen Kreise. Die Auftragung des Citrat-vermittelten Stroms (nA) für die Bestimmung der K_m für Citrat bei pH 7,5 erfolgte gegen die Citratkonzentration (mM).

Vergleich des Citrat-vermittelten Stroms bei pH 6,5 und pH 7,5

Die Citrat-vermittelten Ströme bei den beiden untersuchten pH-Werten wichen, wie in Abbildung 27 gezeigt, nicht signifikant voneinander ab.

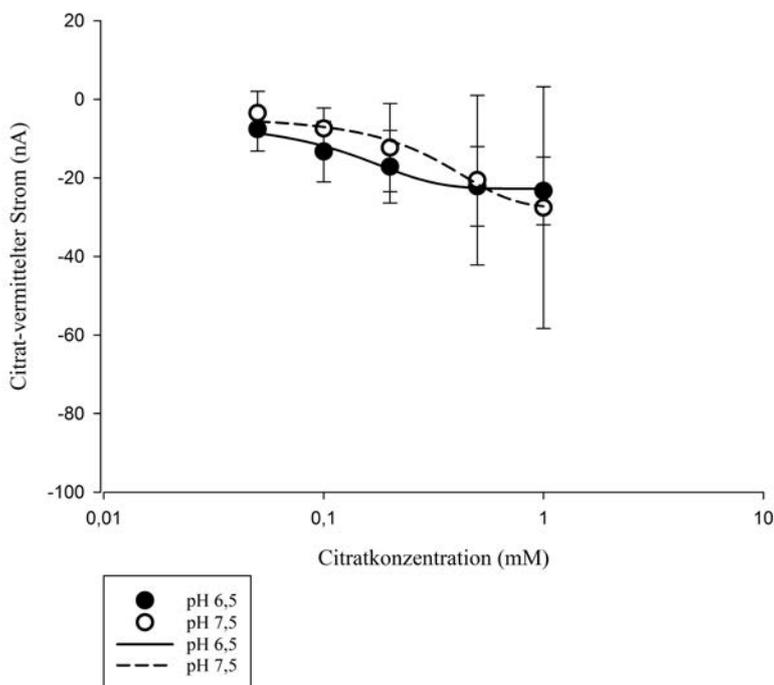


Abbildung 27: Halblogarithmische Darstellung der Citrat-vermittelten Ströme in Abhängigkeit von der extrazellulären Citratkonzentration bei pH 6,5 und pH 7,5

Die Citrat-vermittelten Ströme (nA) in Abhängigkeit von der Citratkonzentration (mM) bei pH 6,5 werden durch die geschlossenen Kreise und die durchgezogene Linie dargestellt. Die offenen Kreise und die gestrichelte Linie stellen ebenso die Citrat-vermittelten Ströme nur bei pH 7,5 dar. Wie auch bei Succinat erfolgt die vergleichende Darstellung der Citrat-vermittelten Ströme bei pH 6,5 und pH 7,5 halblogarithmisch basierend auf den Werten von Abbildung 23 und 25.

In den Abbildungen 28a und b sind die Einzelwerte der Michaelis-Menten-Konstanten mit den zugehörigen maximalen Strömen für pH 6,5 und pH 7,5 aus allen sieben Messungen gegenübergestellt. Bei pH 6,5 lagen die maximalen Ströme in den Einzelmessungen zwischen -15,4 nA und -40,8 nA mit einem Mittelwert von $-30,2 \pm 8,3$ nA.

Die errechneten Michaelis-Menten-Konstanten lagen bei pH 6,5 in einem Bereich zwischen 1511,0 μ M und 51,4 μ M. Die höchste K_m (1511,0 μ M) wich auffällig von den anderen Michaelis-Menten-Konstanten ab, sodass daraus die hohe Standardabweichung beim Mittelwert der K_m von $-342,5 \pm 482,4$ μ M resultierte. Die Gründe für diese hohe K_m konnten nicht aufgeklärt werden. Lässt man diesen Wert aus der Mittelwertbildung heraus, ergibt sich für die K_m bei pH 6,5 ein Wert von $147,7 \pm 52,4$ μ M.

Bei pH 7,5 lagen die maximalen Ströme zwischen -2,5 nA und -188,2 nA mit einem Mittelwert von $-45,6 \pm 62,1$ nA. Zu dem geringsten maximalen Strom von -2,5 nA gehörte die niedrigste K_m mit $17,9 \mu\text{M}$. Zu dem höchsten maximalen Strom von -188,9 nA gehörte die höchste K_m von $976,5 \mu\text{M}$.

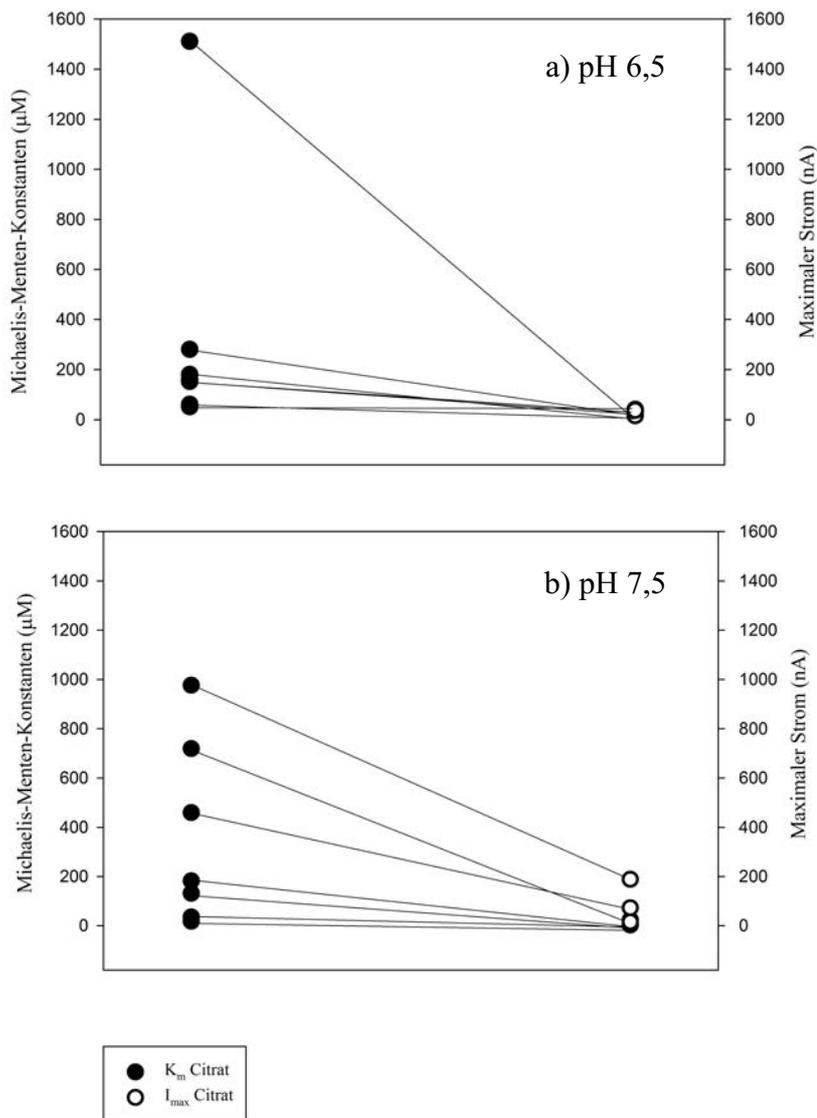


Abbildung 28a, b: Vergleich der Einzelwerte von K_m und I_{\max} für Citrat bei pH 6,5 und pH 7,5. Die geschlossenen Kreise symbolisieren die einzelnen Werte der errechneten K_m (μM). Die offenen Kreise stehen für den jeweiligen I_{\max} (nA). Durch die Linien werden die sieben Wertepaare aus sieben verschiedenen, aufeinanderfolgenden Messungen miteinander verbunden.

Abbildung 29 stellt die errechneten Michaelis-Menten-Konstanten sowie die maximalen Ströme für Citrat bei pH 6,5 und pH 7,5 in Form eines Balkendiagramms dar. Der Mittelwert für die K_m bei pH 6,5 lag bei $342,5 \pm 482,4 \mu\text{M}$. Die K_m bei pH 7,5 wich mit $360,1 \pm 343,3 \mu\text{M}$ nicht signifikant von der K_m für Citrat bei der niedrigeren pH-Stufe

ab. Der gemessene durchschnittliche maximale Strom lag mit $-45,6 \pm 62,1$ nA etwas höher als bei pH 6,5 mit $-30,2 \pm 8,3$ nA.

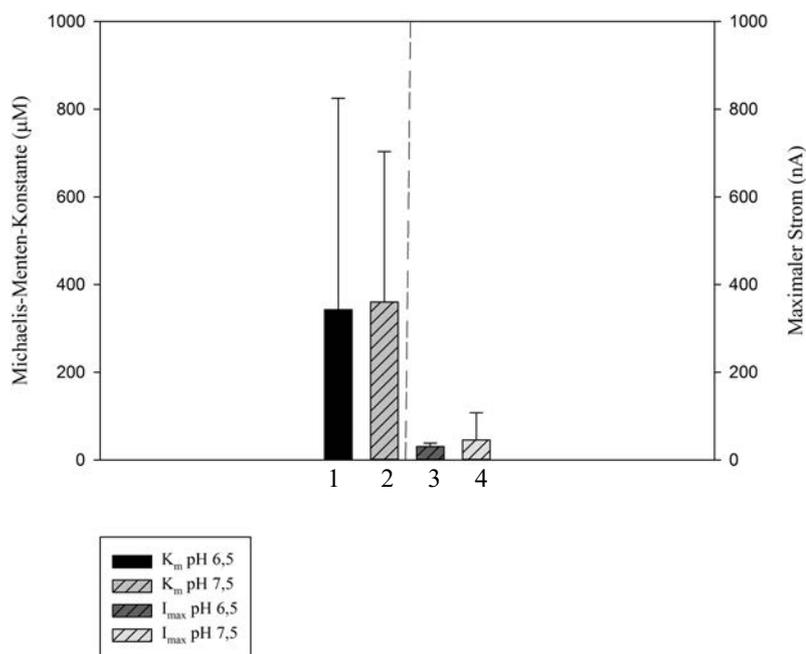


Abbildung 29: Vergleich der Mittelwerte von K_m und I_{max} für Citrat bei pH 6,5 und pH 7,5. Die beiden Balken stellen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen der errechneten K_m bei pH 6,5 (1) und bei pH 7,5 (2). Rechts daneben sind die I_{max} (nA) bei pH 6,5 (3) und bei pH 7,5 (4) dargestellt.

3.3.3 Vergleich der Michaelis-Menten-Konstanten von Succinat und Citrat

Das Balkendiagramm stellt die Michaelis-Menten-Konstanten von Succinat und Citrat vergleichend nebeneinander dar.

Sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 7,5 wiesen die K_m für Succinat mit $6,0 \pm 3,9$ μM und $3,9 \pm 2,0$ μM geringere Werte auf als die Konstanten für Citrat. Bei pH 6,5 war die berechnete K_m für Succinat geringfügig, aber nicht signifikant höher als bei pH 7,5. Zwischen den Michaelis-Menten-Konstanten von Citrat bestanden ebenso bei beiden pH-Werten keine signifikanten Unterschiede. Sie lagen aber deutlich über den Michaelis-Menten-Konstanten für Succinat mit Werten von $342,5 \pm 482,4$ μM für pH 6,5 bzw. $360,1 \pm 343,3$ μM (bei Herausnahme des sehr hohen K_m -Wertes) und $360,1 \pm 343,3$ μM für pH 7,5.

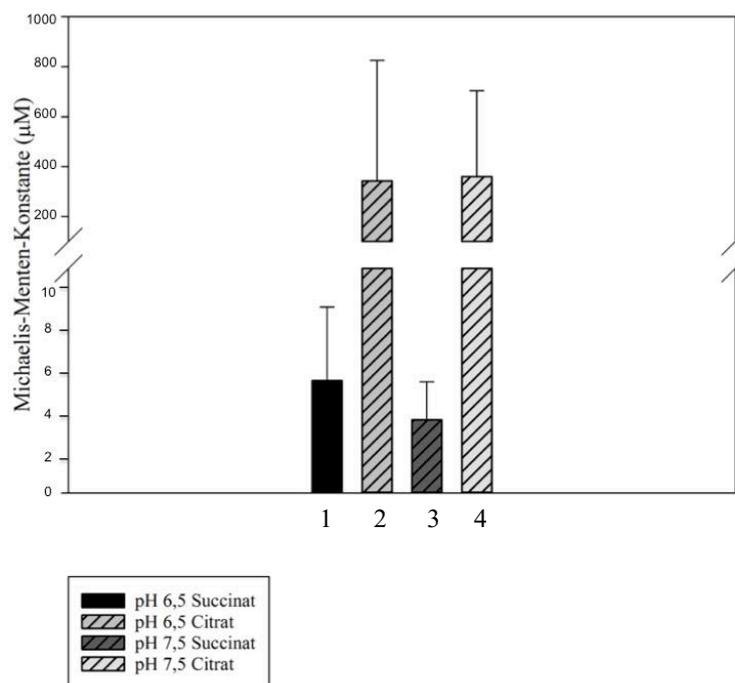


Abbildung 30: Vergleich der K_m für Succinat und Citrat bei pH 6,5 und pH 7,5

Der linke schwarze Balken (1) stellt den Mittelwert der K_m für Succinat bei pH 6,5 dar. Direkt daneben in einer helleren Grauschattierung ist die K_m für Citrat ebenfalls bei pH 6,5 (2) abgebildet. Der eingefügte „Break“ erleichtert durch die Zweiteilung der Skalierung die Darstellung der beiden Konstanten innerhalb einer Abbildung bei sehr unterschiedlichen Werten. Die beiden Balken daneben stehen für die K_m bei pH 7,5. Der dunklere Balken symbolisiert den Mittelwert für Succinat (3), der hellere Balken den Mittelwert für Citrat (4).

3.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Natriumabhängigkeit Substrat-vermittelter Ströme

3.4.1 Natriumabhängigkeit der Succinat- bzw. Citrat-vermittelten Ströme bei pH 6,5 und pH 7,5 bei Ersatz des Natriums durch NMDG oder Cholin

Die Natriumabhängigkeit des NaDC3 und die Auswirkungen der Abwesenheit von Natrium auf den Transport von Succinat und Citrat wurde durch den Ersatz des Natriumchlorids durch NMDG-Chlorid oder Cholinchlorid getestet. Die Herstellung der Lösungen und der Ablauf der Versuche wurde in den Abschnitten 2.2.5 und 2.5.3 beschrieben. Die Versuche wurden jeweils bei pH-Werten von 6,5 und 7,5 durchgeführt.

Succinat-vermittelter Strom bei Ersatz des Natriums durch NMDG

Für die Messung des Succinat-vermittelten Stroms bei Ersatz des Natriums durch NMDG zur Untersuchung der Natriumabhängigkeit wurden fünf fNaDC3-exprimierende Oozyten aus drei Spendertieren und drei Wasser-injizierte Oozyten aus drei Spendertieren verwendet.

Abbildung 31 bildet Mittelwerte mit Standardabweichungen für den Versuch bei pH 6,5 ab. Dargestellt sind durch die ersten drei Balken (1-3) die Ergebnisse der zeitlichen Abfolge der Versuche bei fNaDC3-exprimierenden Oozyten bei pH 6,5. Nach Einstellen eines konstanten Haltestroms bei -60 mV, der gleich Null gesetzt wurde und deshalb in der Abbildung nicht dargestellt ist, wurden die Oozyten mit Succinat-haltigem ORi perfundiert (Balken 1). Nach einer Erholungsphase unter Perfusion mit ORi wurde auf eine Natrium-freie Perfusion, bei der Natrium durch NMDG ersetzt war, umgeschaltet. Die Oozyten antworten auf die Natrium-freie Perfusion mit einem Auswärtsstrom (Balken 2). Direkt daran anschließend erfolgte die Perfusion von Succinat-haltiger Lösung unter Natrium-freien Bedingungen (Balken 3), worauf ein Einwärtsstrom registriert wurde.

Die gleiche Abfolge wurde bei den Versuchen mit den Wasser-injizierten Oozyten eingehalten. Die Darstellung der Werte für die Wasser-injizierten Oozyten erfolgte getrennt durch die gestrichelte Linie auf der rechten Seite der Abbildung (Balken 4-6).

Der Succinat-vermittelte Strom lag bei NaDC3-exprimierenden Oozyten bei $-84,4 \pm 33,8$ nA. Unter Natrium-freien Bedingungen lag der Mittelwert des Haltestroms bei $+58,0 \pm 5,7$ nA. Der Succinat-vermittelte Strom war mit $-21,2 \pm 10,9$ nA unter Natrium-freien Bedingungen signifikant geringer als in Anwesenheit von Natrium.

Die Wasser-injizierten Oozyten wiesen unabhängig vom extrazellulären Natrium keine bzw. sehr geringe Ströme auf. In Anwesenheit von Natrium betrug der Wert des Succinat-vermittelten Stroms $-1,7 \pm 1,2$ nA und in Abwesenheit von Natrium $-3,0 \pm 1,4$ nA. Der Haltestrom in Natrium-freiem ORi lag bei $+11,7 \pm 5,4$ nA und war somit ebenfalls niedriger als bei NaDC3-exprimierenden Oozyten.

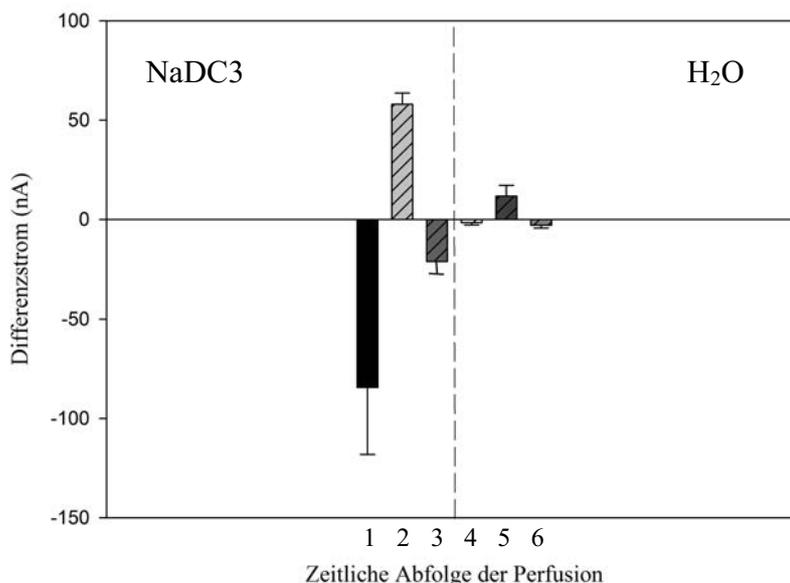


Abbildung 31: Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms von Oozyten mit Expression des NaDC3 und von Wasser-injizierten Oozyten bei Ersatz des Natriums durch NMDG bei pH 6,5. Das Balkendiagramm stellt die Differenzströme (nA) der Messungen bei Ersatz des Natriums durch NMDG dar. Die ersten drei Balken zeigen die Mittelwerte inklusive der Standardabweichungen bei den Messungen mit fNaDC3-exprimierenden Oozyten: Succinat-vermittelter Strom in ORi (1), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (2) und Succinat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (3). Getrennt durch die gestrichelte Linie folgen auf der rechten Seite die drei Balken mit den Mittelwerten und Standardabweichungen für die Messungen der Wasser-injizierten Oozyten: Succinat-vermittelter Strom in ORi (4), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (5) und Succinat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (6). Die Balken stehen zugleich in der Reihenfolge der zeitlichen Perfusion. Die Nulllinie markiert den Haltestrom bei -60 mV im *Voltage-Clamp-Modus*. Das bedeutet, Messungen mit Balken oberhalb der Nulllinie weisen einen positiven Differenzstrom auf. Dies war der Fall beim Haltestrom in Natrium-freiem ORi. Messungen mit Balken unterhalb der Nulllinie weisen einen negativen Differenzstrom auf. Dieser wurde bei Succinat-vermittelten Strömen unter Bedingungen mit und ohne Natrium beobachtet.

In Abbildung 32 werden die eingespeisten Ströme bei der Messung an NaDC3-exprimierenden Oozyten und Wasser-injizierten Oozyten bei pH 7,5 dargestellt. Die zeitliche Abfolge der Perfusion und die Darstellung in der Abbildung entsprechen dem Ablauf und der Graphik bei pH 6,5 (Abbildung 31).

Der Succinat-vermittelte Strom in ORi in Anwesenheit von Natrium lag bei pH 7,5 bei $-85,6 \pm 41,8$ nA. Unter Natrium-freien Bedingungen betrug der Mittelwert des Haltestroms $+49,2 \pm 4,8$ nA. Der Succinat-vermittelte Strom war mit $-14,4 \pm 3,3$ nA unter Natrium-freien Bedingungen signifikant niedriger als in Anwesenheit von Natrium.

Bei den Wasser-injizierten Oozyten als Kontrollversuch existierte kein signifikanter Unterschied zwischen der Messung des Succinat-vermittelten Stroms in Anwesenheit von Natrium und der Messung mit Ersatz des Natriums durch NMDG. Die Werte lagen bei $-2,0 \pm 3,7$ nA in Anwesenheit von Natrium und bei $-2,3 \pm 2,1$ nA in Abwesenheit von Natrium. Der Haltestrom in Natrium-freiem ORi betrug $+12,0 \pm 9,2$ nA und war

somit, ähnlich wie bei den Versuchen bei pH 6,5, geringer als bei NaDC3-exprimierenden Oozyten.

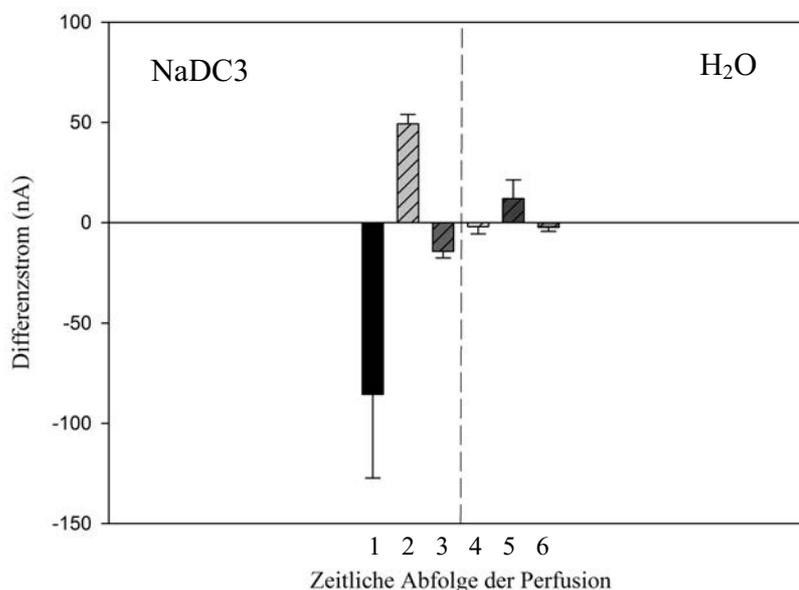


Abbildung 32: Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms von Oozyten mit Expression des NaDC3 und von Wasser-injizierten Oozyten bei Ersatz des Natriums durch NMDG bei pH 7,5

Das Balkendiagramm stellt die Differenzströme (nA) der Messungen bei Ersatz des Natriums durch NMDG dar. Die ersten drei Balken zeigen die Mittelwerte inklusive der Standardabweichungen bei den Messungen mit fNaDC3-exprimierenden Oozyten: Succinat-vermittelter Strom in ORi (1), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (2) und Succinat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (3). Getrennt durch die gestrichelte Linie folgen auf der rechten Seite die drei Balken mit den Mittelwerten und Standardabweichungen für die Messungen der Wasser-injizierten Oozyten: Succinat-vermittelter Strom in ORi (4), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (5) und Succinat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (6). Die Balken stehen zugleich in der Reihenfolge der zeitlichen Perfusion. Die Nulllinie markiert den Haltestrom bei -60 mV im *Voltage-Clamp-Modus*. Das bedeutet, Messungen mit Balken oberhalb der Nulllinie weisen einen positiven Differenzstrom auf. Dies war der Fall beim Haltestrom in Natrium-freiem ORi. Messungen mit Balken unterhalb der Nulllinie weisen einen negativen Differenzstrom auf. Dieser wurde bei Succinat-vermittelten Strömen unter Bedingungen mit und ohne Natrium beobachtet.

Succinat-vermittelter Strom bei Ersatz des Natrium durch Cholin

Der Versuch zur Untersuchung des Succinat-vermittelten Stroms bei Ersatz des Natriums durch Cholin wurde mit vier fNaDC3-exprimierenden Oozyten aus drei Spendertieren durchgeführt. Der Kontrollversuch erfolgte mit drei Wasser-injizierten Oozyten aus drei Spendertieren.

Die Succinat-vermittelten Ströme sowie der Haltestrom unter Natrium-freien Bedingungen bei Ersatz mit Cholin bei pH 6,5 wird in Abbildung 33 dargestellt. Der Aufbau des Balkendiagramms entspricht dem aus dem vorherigen Abschnitt über den Ersatz des Natriums durch NMDG.

Auch in diesem Diagramm wurde der bei einem Klemmpotential von -60 mV unter Natrium gemessene Haltestrom gleich Null gesetzt. Der Succinat-vermittelte Einwärtsstrom in Anwesenheit von Natrium bei fNaDC3-exprimierenden Oozyten betrug $-107,8 \pm 15,5$ nA. Bei Ersatz des Natriums durch Cholin fiel der bei Succinatperfusion gemessene Einwärtsstrom auf $-14,0 \pm 9,1$ nA ab. Der Haltestrom unter Natrium-freien Bedingungen betrug $+42,5 \pm 22,7$ nA. Bei Wasser-injizierten Oozyten lag er bei $+11,0 \pm 6,5$ nA und war damit deutlich niedriger.

Die Succinat-vermittelten Ströme bei den Kontrollversuchen mit Wasser-injizierten Oozyten lagen im Mittel bei $-0,3 \pm 1,7$ nA (in Anwesenheit von Natrium) und sogar im positiven Bereich mit $+1,7 \pm 1,2$ nA (in Abwesenheit von Natrium und bei Ersatz durch Cholin).

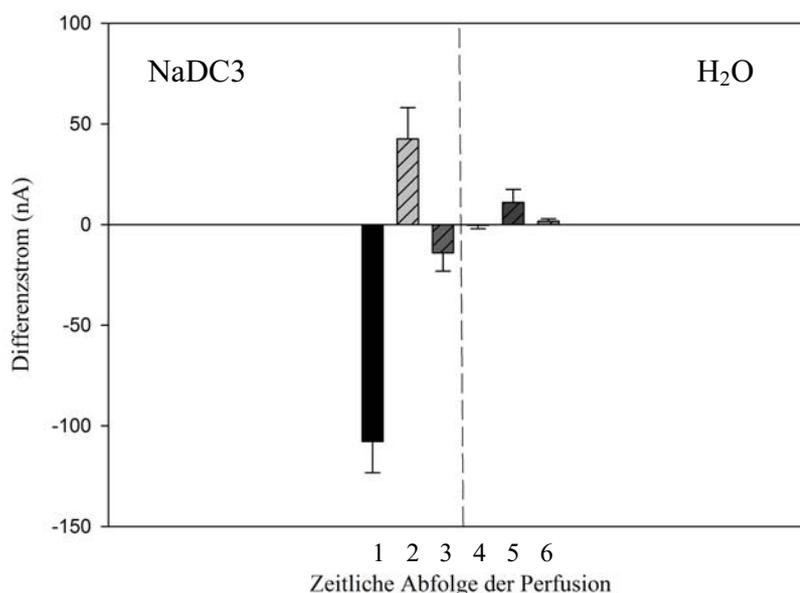


Abbildung 33: Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms von Oozyten mit Expression des NaDC3 und von Wasser-injizierten Oozyten bei Ersatz des Natriums durch Cholin bei pH 6,5

Das Balkendiagramm stellt die Differenzströme (nA) der Messungen bei Ersatz des Natriums durch Cholin dar. Die ersten drei Balken zeigen die Mittelwerte inklusive der Standardabweichungen bei den Messungen mit fNaDC3-exprimierenden Oozyten: Succinat-vermittelter Strom in ORi (1), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (2) und Succinat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (3). Getrennt durch die gestrichelte Linie folgen auf der rechten Seite die drei Balken mit den Mittelwerten und Standardabweichungen für die Messungen der Wasser-injizierten Oozyten: Succinat-vermittelter Strom in ORi (4), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (5) und Succinat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (6). Die Balken stehen zugleich in der Reihenfolge der zeitlichen Perfusion. Die Nulllinie markiert den Haltestrom bei -60 mV im *Voltage-Clamp-Modus*. Das bedeutet, Messungen mit Balken oberhalb der Nulllinie weisen einen positiven Differenzstrom auf. Dies war der Fall beim Haltestrom in Natrium-freiem ORi. Messungen mit Balken unterhalb der Nulllinie weisen einen negativen Differenzstrom auf. Dieser wurde bei Succinat-vermittelten Strömen unter Bedingungen mit und ohne Natrium beobachtet.

Bei pH 7,5 lagen ähnliche Ergebnisse wie bei pH 6,5 vor. Die Werte der Succinat-vermittelten Ströme bei Ersatz des Natriums durch Cholin wurden erneut als Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 34).

Der Succinat-vermittelte Strom war mit $-107,0 \pm 27,6$ nA unter Natrium-haltigen Bedingungen deutlich höher als unter Natrium-freien Bedingungen bei Ersatz durch Cholin mit $-17,0 \pm 7,6$ nA. Die im rechten Teil der Abbildung dargestellten Mittelwerte der Wasser-injizierten Oozyten lagen bei $-5,3 \pm 3,4$ nA für den Succinat-vermittelten Strom unter Natrium-haltigen Bedingungen und bei $-4,0 \pm 4,3$ nA unter Natrium-freien Bedingungen.

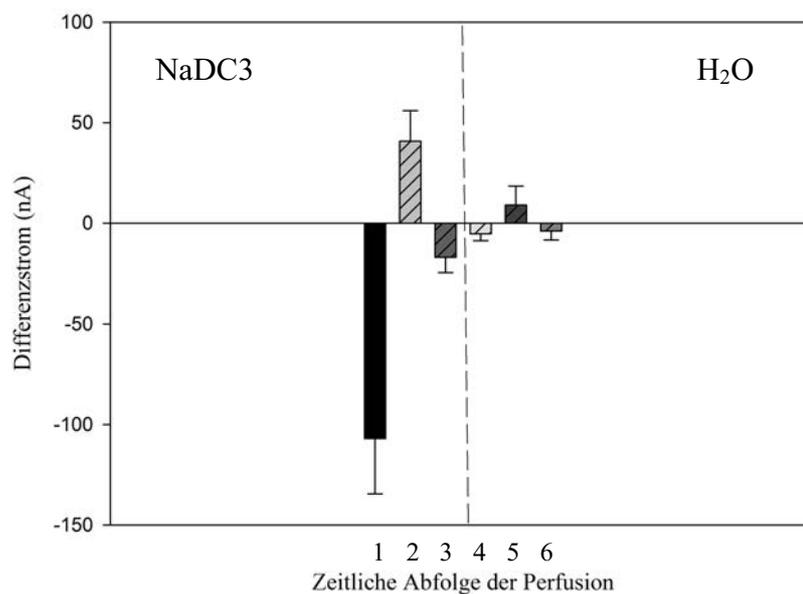


Abbildung 34: Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms von Oozyten mit Expression des NaDC3 und von Wasser-injizierten Oozyten bei Ersatz des Natriums durch Cholin bei pH 7,5

Das Balkendiagramm stellt die Differenzströme (nA) der Messungen bei Ersatz des Natriums durch Cholin dar. Die ersten drei Balken zeigen die Mittelwerte inklusive der Standardabweichungen bei den Messungen mit fNaDC3-exprimierenden Oozyten: Succinat-vermittelter Strom in ORi (1), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (2) und Succinat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (3). Getrennt durch die gestrichelte Linie folgen auf der rechten Seite die drei Balken mit den Mittelwerten und Standardabweichungen für die Messungen der Wasser-injizierten Oozyten: Succinat-vermittelter Strom in ORi (4), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (5) und Succinat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (6). Die Balken stehen zugleich in der Reihenfolge der zeitlichen Perfusion. Die Nulllinie markiert den Haltestrom bei -60 mV im *Voltage-Clamp-Modus*. Das bedeutet, Messungen mit Balken oberhalb der Nulllinie weisen einen positiven Differenzstrom auf. Dies war der Fall beim Haltestrom in Natrium-freiem ORi. Messungen mit Balken unterhalb der Nulllinie weisen einen negativen Differenzstrom auf. Dieser wurde bei Succinat-vermittelten Strömen unter Bedingungen mit und ohne Natrium beobachtet.

Vergleich des Succinat-vermittelten Stroms bei Ersatz des Natriums durch NMDG oder Cholin

In diesem Abschnitt werden die Werte aus den beiden vorherigen Versuchen miteinander verglichen. Aus diesem Grund wurden bei pH 6,5 und bei pH 7,5 die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen der Succinat-vermittelten Ströme aus den Versuchen mit NMDG und Cholin direkt nebeneinander gestellt (Abbildung 35a, b). Bei pH 6,5 und pH 7,5 war der Succinat-vermittelte Strom in ORi jeweils konstant. Bei dem Versuchsansatz mit NMDG lag der Succinat-vermittelte Strom bei pH 6,5 bei -84,4 nA und bei pH 7,5 bei -85,6 nA. Bei dem Versuchsansatz mit Cholin betrug der Succinat-vermittelte Strom in ORi, d.h. in Anwesenheit von Natrium, -107,8 nA (pH 6,5) und -107,0 nA (pH 7,5).

Unter Natrium-freien Bedingungen lag der Succinat-vermittelte Strom bei pH 6,5 bei -21,2 nA (NMDG) und -14,0 nA (Cholin). Bei pH 7,5 lagen die ermittelten Werte im Vergleich noch enger mit -14,4 nA (NMDG) und -17,0 nA (Cholin) zusammen. Die geringen Unterschiede zwischen den Ersatzstoffen von Natrium erreichten kein Signifikanzniveau.

Festzuhalten ist, dass bei beiden pH-Werten der Succinat-vermittelte Strom generell unter Natrium-freien Bedingungen geringer war als in Gegenwart von Natrium. Ob Natrium durch NMDG oder Cholin ersetzt wurde, war nicht von Bedeutung.

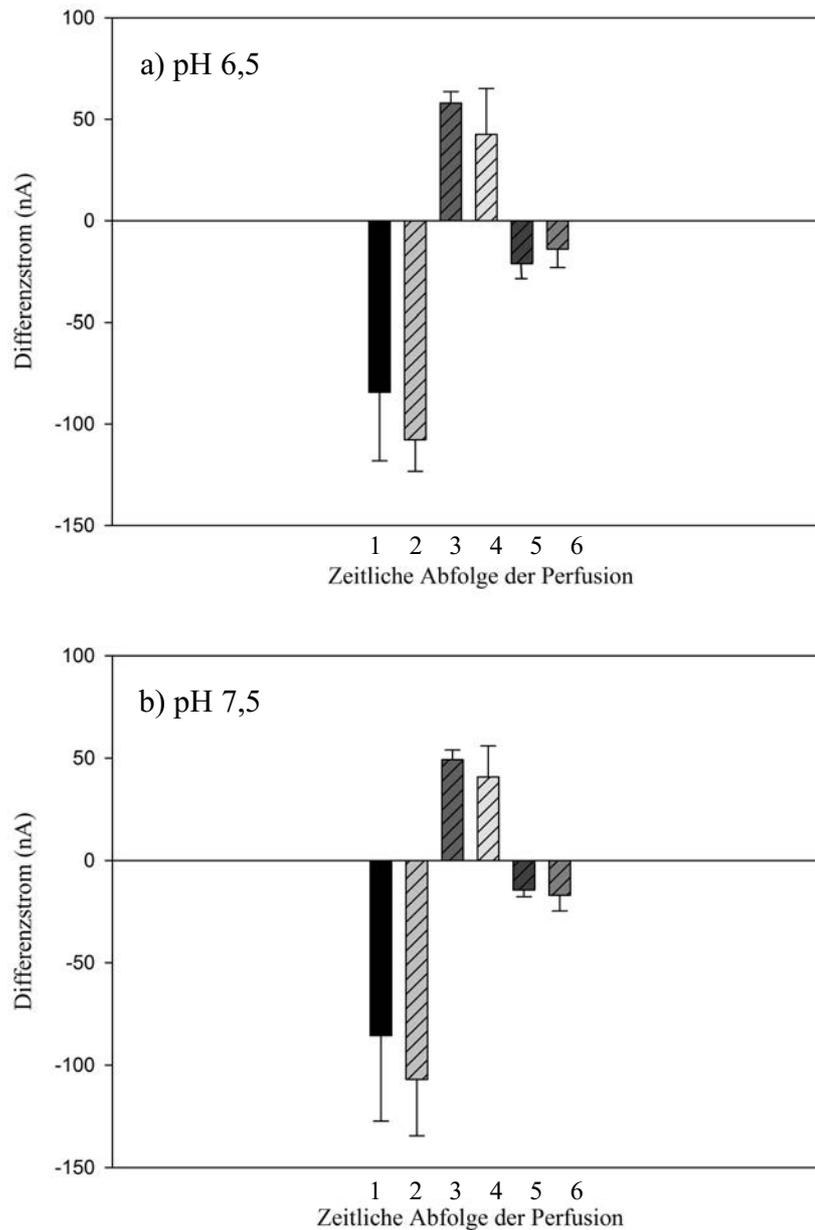


Abbildung 35a, b: Vergleich des Succinat-vermittelten Stroms bei Ersatz des Natriums durch NMDG oder Cholin bei pH 6,5 und pH 7,5

Die Balkendiagramme stellen die Differenzströme (nA) der Messungen bei Ersatz des Natriums durch NMDG (a) und Cholin (b) dar. Die Balken zeigen die Mittelwerte inklusive der Standardabweichungen bei den Messungen mit fNaDC3-exprimierenden Oozyten: Succinat-vermittelter Strom in ORi mit Ersatz durch NMDG (1), Succinat-vermittelter Strom in ORi mit Ersatz durch Cholin (2), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (NMDG) (3), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (Cholin) (4), Succinat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (NMDG) (5) und Succinat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (Cholin) (6). Die Nulllinie markiert den Haltestrom bei -60 mV im *Voltage-Clamp-Modus*. Das bedeutet, Messungen mit Balken oberhalb der Nulllinie weisen einen positiven Differenzstrom auf. Dies war der Fall beim Haltestrom in Natrium-freiem ORi. Messungen mit Balken unterhalb der Nulllinie weisen einen negativen Differenzstrom auf. Dieser wurde bei Succinat-vermittelten Strömen unter Bedingungen mit und ohne Natrium beobachtet.

Citrat-vermittelter Strom bei Ersatz des Natriums durch NMDG

Im vorherigen Abschnitt wurde dargestellt, dass es unerheblich für die Messung des Substrat-vermittelten Stroms unter Natrium-freien Bedingungen ist, ob Natrium durch NMDG oder Cholin ersetzt wurde. Daher wurde bei der Messung mit Citrat bei pH 6,5 und pH 7,5 nur noch mit NMDG gearbeitet.

Hierfür wurden vier fNaDC3-exprimierende Oozyten aus drei Spendertieren und drei Wasser-injizierte Oozyten aus drei Spendertieren verwendet.

Der Citrat-vermittelte Strom in ORi bei pH 6,5 lag bei $-47,3 \pm 12,3$ nA (Abbildung 36). Der Haltestrom unter Natrium-freien Bedingungen betrug $+49,0 \pm 19,7$ nA. Der Citrat-vermittelte Strom unter Natrium-freien Bedingungen verringerte sich auf $-8,5 \pm 6,8$ nA.

Die Wasser-injizierten Oozyten auf der rechten Seite des Balkendiagramms dienten als Kontrollversuch und wiesen nur sehr geringe Citrat-vermittelte Einwärtsströme auf. Ebenso war der Haltestrom unter Natrium-freien Bedingungen mit $+16,3 \pm 8,2$ nA kleiner als bei fNaDC3-exprimierenden Oozyten.

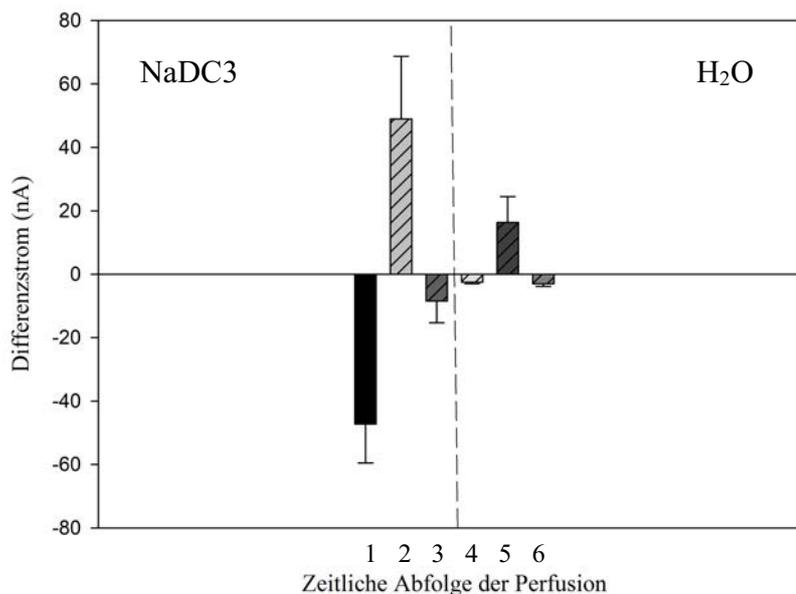


Abbildung 36: Natriumabhängigkeit des Citrat-vermittelten Stroms von Oozyten mit Expression des NaDC3 und von Wasser-injizierten Oozyten bei Ersatz des Natriums durch NMDG bei pH 6,5

Das Balkendiagramm stellt die Differenzströme (nA) der Messungen bei Ersatz des Natriums durch NMDG dar. Die ersten drei Balken zeigen die Mittelwerte inklusive der Standardabweichungen bei den Messungen mit fNaDC3-exprimierenden Oozyten: Citrat-vermittelter Strom in ORi (1), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (2) und Citrat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (3). Getrennt durch die gestrichelte Linie folgen auf der rechten Seite die drei Balken mit den Mittelwerten und Standardabweichungen für die Messungen der Wasser-injizierten Oozyten: Citrat-vermittelter Strom in ORi (4), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (5) und Citrat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (6). Die Balken stehen zugleich in der Reihenfolge der zeitlichen Perfusion. Die Nulllinie markiert den Haltestrom bei -60 mV im *Voltage-Clamp-Modus*. Das bedeutet, Messungen mit Balken oberhalb der Nulllinie weisen einen positiven Differenzstrom auf. Dies war der Fall beim Haltestrom in Natrium-freiem ORi. Messungen mit Balken unterhalb der Nulllinie weisen einen negativen Differenzstrom auf. Dieser wurde bei Succinat-vermittelten Strömen unter Bedingungen mit und ohne Natrium beobachtet.

Die Werte für pH 7,5 wurden nicht in einer separaten Abbildung dargestellt. Die Citrat-vermittelten Ströme waren in Abwesenheit von Natrium geringer als in Anwesenheit. Insgesamt waren die Citrat-vermittelten Ströme etwas geringer als bei pH 6,5, wobei der Haltestrom mit $+47,0 \pm 19,0$ nA kaum vom Haltestrom bei pH 6,5 abwich.

Vergleich des Succinat-vermittelten Stroms und des Citrat-vermittelten Stroms bei Ersatz des Natriums durch NMDG

In den beiden Balkendiagrammen (Abbildung 37a, b) sind die Succinat- und Citrat-vermittelten Ströme als Mittelwerte mit Standardabweichungen bei fNaDC3-exprimierenden Oozyten bei pH 6,5 und bei pH 7,5 in Anwesenheit von Natrium und bei Ersatz des Natriums durch NMDG nebeneinander abgebildet.

Bei pH 6,5 waren sämtliche Citrat-vermittelten Ströme geringer als die entsprechenden Succinat-vermittelten Ströme. Bei Ersatz des Natriums durch NMDG lag der Succinat-vermittelte Strom bei $-21,2 \pm 10,9$ nA. Der Citrat-vermittelte Strom unter den gleichen

Bedingungen lag bei $-8,5 \pm 6,8$ nA. Der Haltestrom unter Natrium-freien Bedingungen in Abwesenheit von Succinat oder Citrat betrug $+58,0 \pm 5,7$ nA (Messreihe mit Succinat) und $+49,0 \pm 19,7$ nA (Messreihe mit Citrat).

Auch bei pH 7,5 lagen sämtliche Citrat-vermittelte Ströme unterhalb der Succinat-vermittelten Ströme. Die Halteströme waren mit $+49,2 \pm 4,8$ nA (Messreihe mit Succinat) und $+47,0 \pm 19,0$ nA (Messreihe mit Citrat) sehr dicht beieinander. Im Vergleich zu den Strömen in Anwesenheit von Natrium waren die Substrat-vermittelten Ströme bei Succinat und Citrat bei Ersatz des Natriums mit NMDG deutlich niedriger. Der gemessene Strom lag unter diesen Bedingungen bei Succinat bei $-14,4 \pm 3,3$ nA und bei Citrat bei $-5,0 \pm 3,5$ nA.

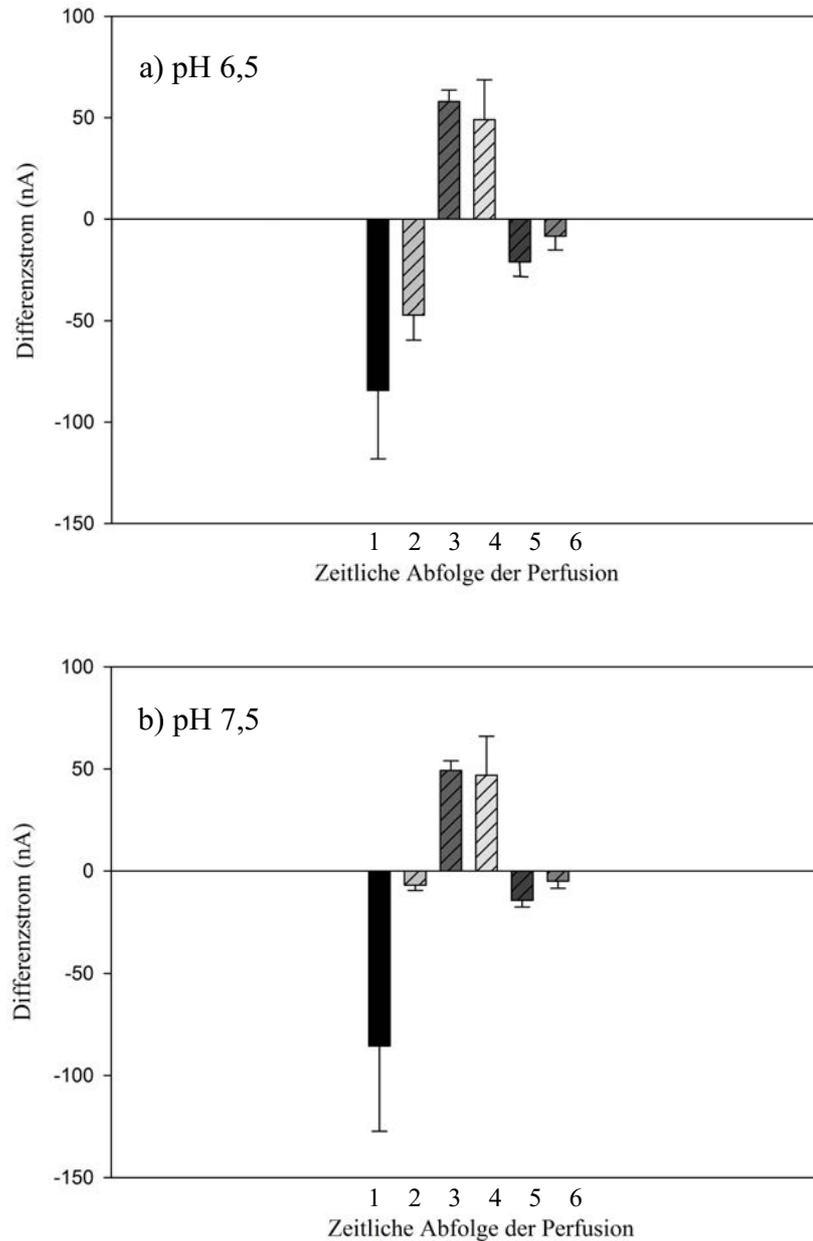


Abbildung 37a, b: Vergleich der Natriumabhängigkeit von Succinat-vermittelten und Citrat-vermittelten Strömen bei pH 6,5 und pH 7,5

Die Balkendiagramme stellen die Differenzströme (nA) der Messungen bei pH 6,5 (a) und pH 7,5 (b) bei Ersatz des Natriums durch NMDG dar. Die Balken zeigen die Mittelwerte inklusive der Standardabweichungen bei den Messungen mit fNaDC3-exprimierenden Oozyten: Succinat-vermittelter Strom in ORi (1), Citrat-vermittelter Strom in ORi (2), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (Succinat) (3), Haltestrom in Natrium-freiem ORi (Citrat) (4), Succinat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (5) und Citrat-vermittelter Strom in Natrium-freiem ORi (6). Die Nulllinie markiert den Haltestrom bei -60 mV im *Voltage-Clamp-Modus*. Das bedeutet, Messungen mit Balken oberhalb der Nulllinie weisen einen positiven Differenzstrom auf. Dies war der Fall beim Haltestrom in Natrium-freiem ORi. Messungen mit Balken unterhalb der Nulllinie weisen einen negativen Differenzstrom auf. Dieser wurde bei Succinat-vermittelten Strömen unter Bedingungen mit und ohne Natrium beobachtet.

3.4.2 Michaelis-Menten-Konstanten von Natrium bei pH 6,5 und pH 7,5

Für die Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante für Natrium wurden Messungen an drei fNaDC3-exprimierenden Oozyten aus drei Spendertieren und vier Wasser-injizierten Oozyten aus drei Spendertieren vorgenommen. Die Messungen wurden mit Lösungen durchgeführt, in denen die Natriumkonzentration zwischen 0 mM und 110 mM Natrium variierte, wobei Natrium gegen NMDG ausgetauscht wurde. Die pH-Werte der Lösungen waren auf pH 6,5 und 7,5 eingestellt. Die Succinatkonzentration betrug jeweils 1 mM.

Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 6,5

In Abbildung 38 ist der Succinat-vermittelte Strom als Mittelwert in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration dargestellt. Die Mittelwerte der gemessenen Ströme reichten von $-14,3 \pm 5,3$ nA bei 0 mM Natrium bis zu $-74,7 \pm 8,7$ nA bei der höchsten Natriumkonzentration von 110 mM. Dies zeigt, dass Succinat in Abwesenheit von Natrium einen Strom hervorruft. Mit ansteigenden Natriumkonzentrationen stieg die Amplitude des Succinat-abhängigen Stroms an. Ab einer Natriumkonzentration von ca. 30 mM wurde bei konstanter Succinatkonzentration keine Zunahme des Succinat-induzierten Stroms mehr beobachtet. Der auf diesen Werten basierende maximale Strom und die Michaelis-Menten-Konstante für Natrium bei pH 6,5 betragen $-83,9 \pm 6,1$ nA und $12,5 \pm 3,9$ mM. Wie in den vorherigen Versuchen wiesen die zur Kontrolle durchgeführten Messungen an Wasser-injizierten Oozyten im Vergleich keine oder nur sehr geringe Einwärtsströme auf.

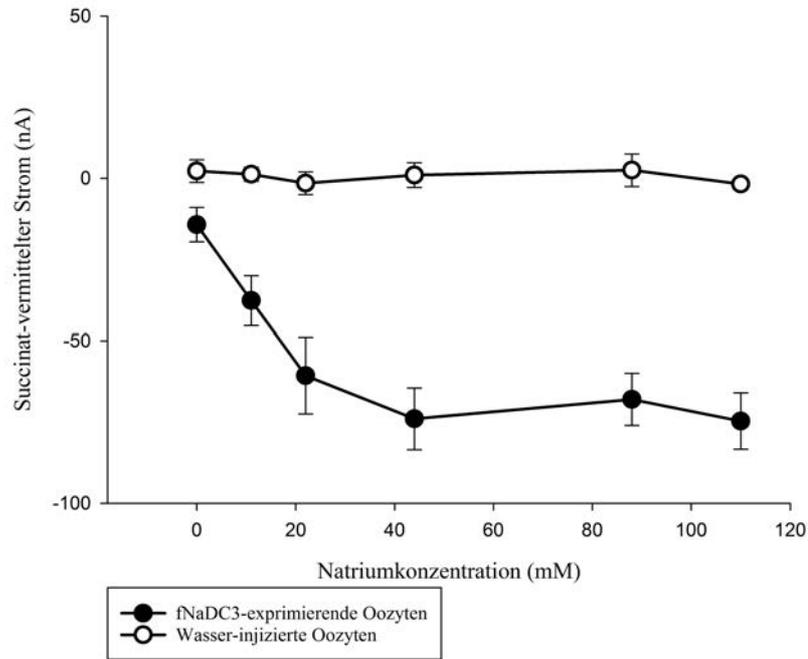


Abbildung 38: Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 6,5

Dargestellt sind die Succinat-vermittelten Ströme (nA) bei pH 6,5 von drei fNaDC3-exprimierenden Oozyten in Form der geschlossenen Kreise und von vier Wasser-injizierten Oozyten durch die offenen Kreise. Die Auftragung des Succinat-vermittelten Stroms (nA) für die Bestimmung der K_m für Natrium bei pH 6,5 erfolgt gegen die Natriumkonzentration (mM).

Über eine Eadie-Hofstee Analyse (Abbildung 39) ließen sich I_{max} und K_m zu $-83,0 \pm 8,2$ nA und $10,7 \pm 3,8$ mM bestimmen.

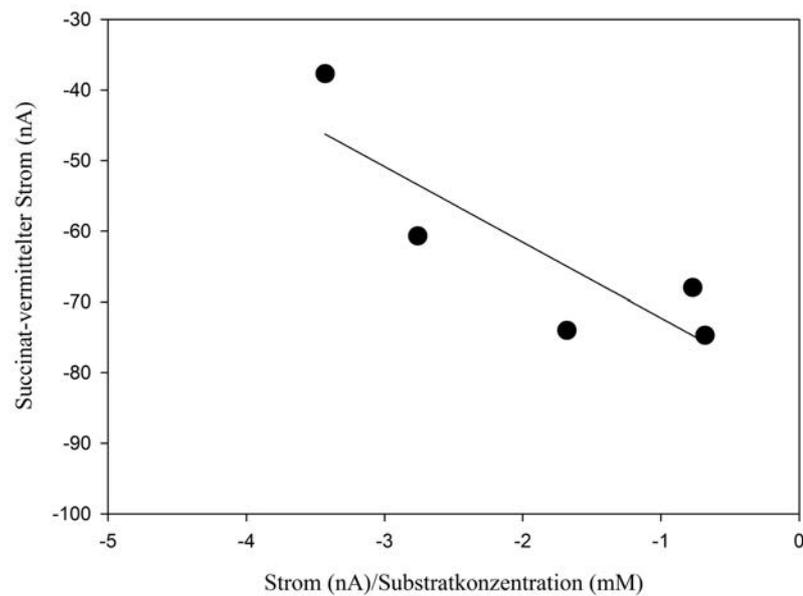


Abbildung 39: Auftragung der Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 6,5 nach Eadie-Hofstee

Aufgetragen ist der Succinat-vermittelte Strom (nA) gegen den Quotienten aus Strom (nA) und Substratkonzentration (mM). Die Daten wurden mit drei fNaDC3-exprimierenden Oozyten aus drei Spendertieren erhoben.

Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 7,5

Die Mittelwerte der Succinat-vermittelten Ströme bei den fNaDC3-exprimierenden Oozyten lagen zwischen $-11,0 \pm 2,0$ nA bei 0 mM Natrium und $-87,0 \pm 6,5$ nA bei 110 mM Natrium (Abbildung 40). Auch bei pH-Wert 7,5 konnte in Abwesenheit von Natrium ein Succinat-abhängiger Strom nachgewiesen werden. Dieser stieg mit zunehmender Natriumkonzentration an und sättigte bei ca. 35 mM Natrium. Der berechnete maximale Strom betrug $-97,0 \pm 4,3$ nA und der Mittelwert der K_m betrug $11,5 \pm 4,3$ mM.

Bei pH 7,5 sorgten zwei Werte bei den Wasser-injizierten Oozyten für relativ hohe Standardabweichungen. Zum einen war dies bei einem Strom von -20 nA bei einer Natriumkonzentration von 0 mM der Fall und zum anderen bei einer Natriumkonzentration von 88 mM mit einem positiven Strom von 53 nA.

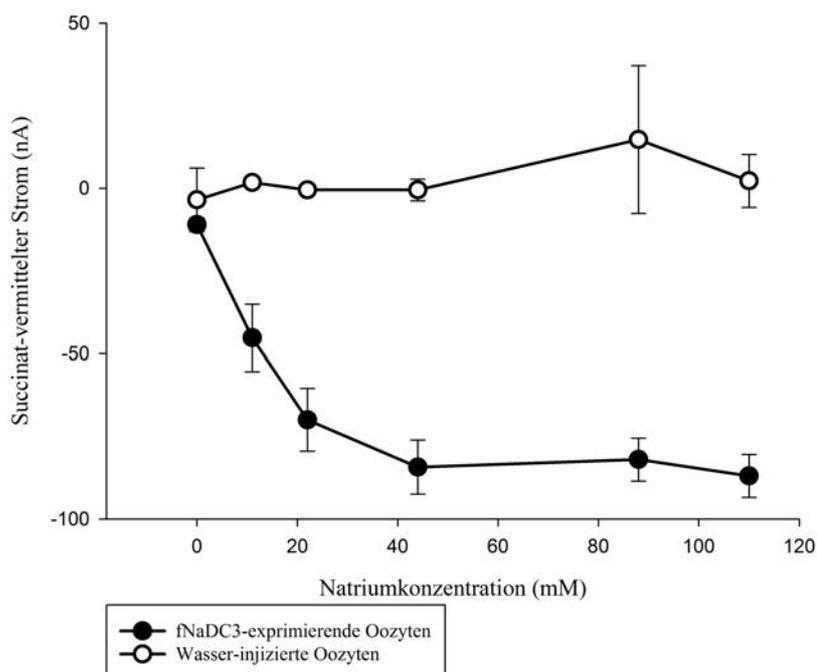


Abbildung 40: Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 7,5

Dargestellt sind die Succinat-vermittelten Ströme (nA) bei pH 7,5 von drei fNaDC3-exprimierenden Oozyten in Form der geschlossenen Kreise und von vier Wasser-injizierten Oozyten durch die offenen Kreise. Die Auftragung des Succinat-vermittelten Stroms (nA) für die Bestimmung der K_m für Natrium bei pH 7,5 erfolgt gegen die Natriumkonzentration (mM).

Die Auftragung nach Eadie-Hofstee (Abbildung 41) für pH 7,5 ergab für I_{\max} $-97,5 \pm 7,1$ nA und für K_m $10,9 \pm 2,8$ mM. Somit stimmen die graphisch ermittelten und die berechneten Werte für I_{\max} und K_m überein.

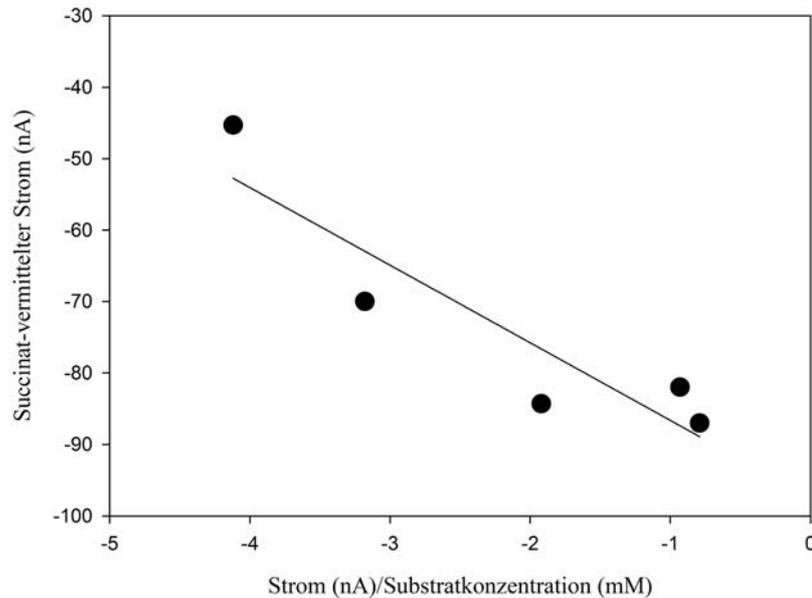


Abbildung 41: Auftragung der Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 7,5 nach Eadie-Hofstee
Aufgetragen ist der Succinat-vermittelte Strom (nA) gegen den Quotienten aus Strom (nA) und Substratkonzentration (mM). Die Daten wurden mit drei Oozyten aus drei Spendertieren erhoben.

Vergleich der Natriumabhängigkeit des Succinat-vermittelten Stroms bei pH 6,5 und pH 7,5

In Abbildung 42 wurden die Ergebnisse der Succinat-vermittelten Ströme in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration bei pH 6,5 und bei pH 7,5 in einem Graphen zusammengefasst. Insgesamt war eine Tendenz zu erkennen, dass bei pH 7,5 höhere Ströme einzuspeisen waren. Diese Tendenz erreichte aber nicht das Signifikanzniveau von $p < 0,01$.

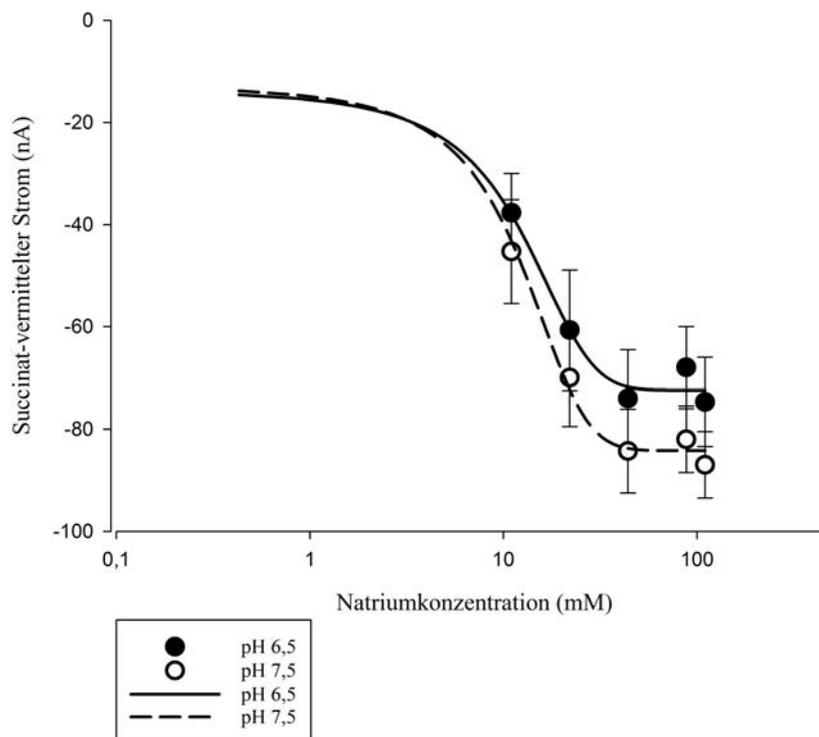


Abbildung 42: Halblogarithmische Darstellung der Succinat-vermittelten Ströme in Abhängigkeit von der extrazellulären Natriumkonzentration bei pH 6,5 und pH 7,5

Die Succinat-vermittelten Ströme (nA) in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration (mM) bei pH 6,5 werden durch die geschlossenen Kreise und die durchgezogene Linie dargestellt. Die offenen Kreise und die gestrichelte Linie stellen ebenso die Succinat-vermittelten Ströme nur bei pH 7,5 dar.

In den beiden Graphen in Abbildung 43a und Abbildung 43b sind die Einzelwerte der Michaelis-Menten-Konstanten von Natrium mit den zugehörigen maximalen Strömen für pH 6,5 und pH 7,5 aus drei Messungen abgebildet. Bei pH 6,5 wurden maximale Ströme zwischen -71,7 nA und -90,8 nA mit einem Mittelwert von $-83,9 \pm 6,1$ nA detektiert.

Die errechneten Michaelis-Menten-Konstanten lagen bei pH 6,5 zwischen 4,7 mM und 19,3 mM. Allerdings bildeten höchste K_m und größter Strom kein Wertepaar, sondern die größte K_m wies zugleich den geringsten maximalen Strom (-71,7 nA) auf.

Bei pH 7,5 wurden maximale Ströme zwischen -90,5 nA und -105,6 nA mit einem Mittelwert von $-97,0 \pm 4,3$ nA gemessen. Wie auch bei pH 6,5 wiesen die gebildeten Wertepaare keine Korrelation zwischen den niedrigsten und höchsten Werten auf.

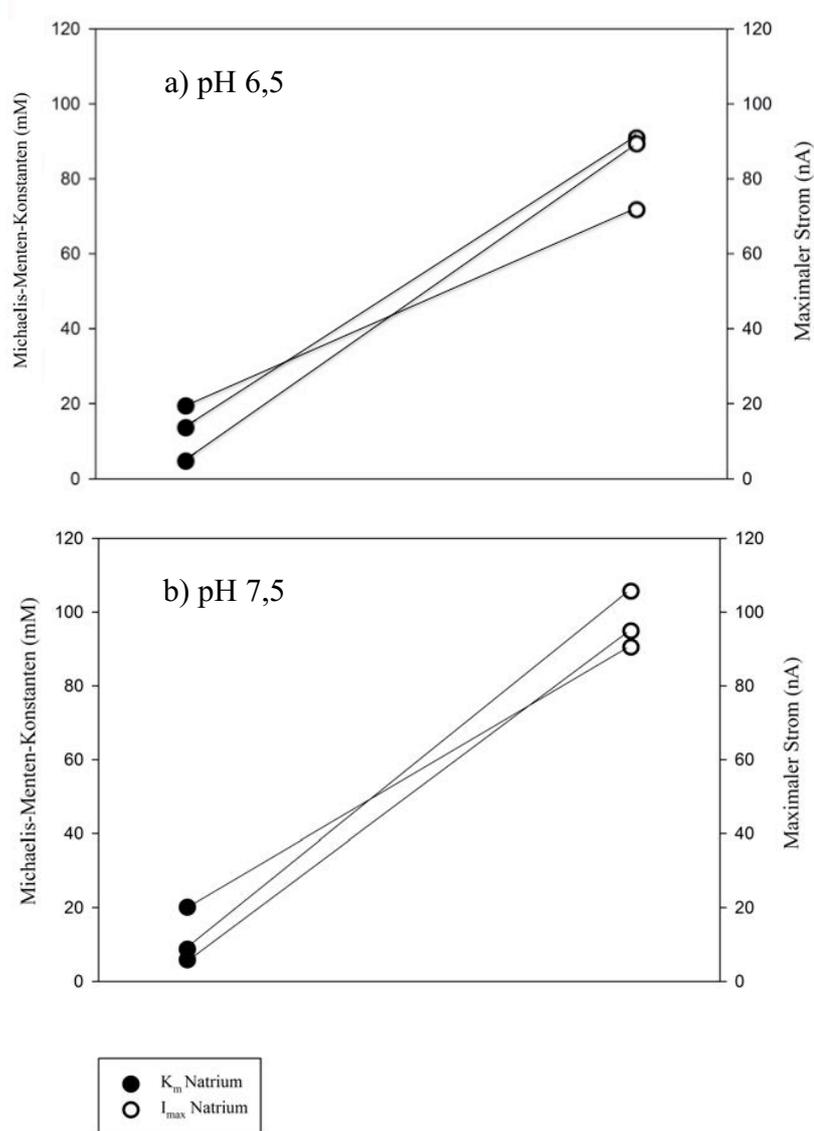


Abbildung 43a, b: Vergleich der Einzelwerte von K_m und I_{max} für Natrium bei pH 6,5 und pH 7,5. Die geschlossenen Kreise symbolisieren die einzelnen Werte der errechneten K_m (mM). Die offenen Kreise stehen für den jeweiligen I_{max} (nA).

Die K_m -Werte für Natrium bei pH 6,5 und 7,5 werden in Abbildung 44 zusammen mit den I_{max} -Werten in einem Balkendiagramm nebeneinander gestellt. Die K_m -Werte wichen mit $12,5 \pm 3,9$ mM bei pH 6,5 und $11,5 \pm 4,3$ mM bei pH 7,5 nicht signifikant voneinander ab. Der maximale Strom I_{max} betrug bei pH 6,5 $-83,9 \pm 6,1$ nA und war bei pH 7,5 mit $-97,0 \pm 4,3$ nA signifikant höher.

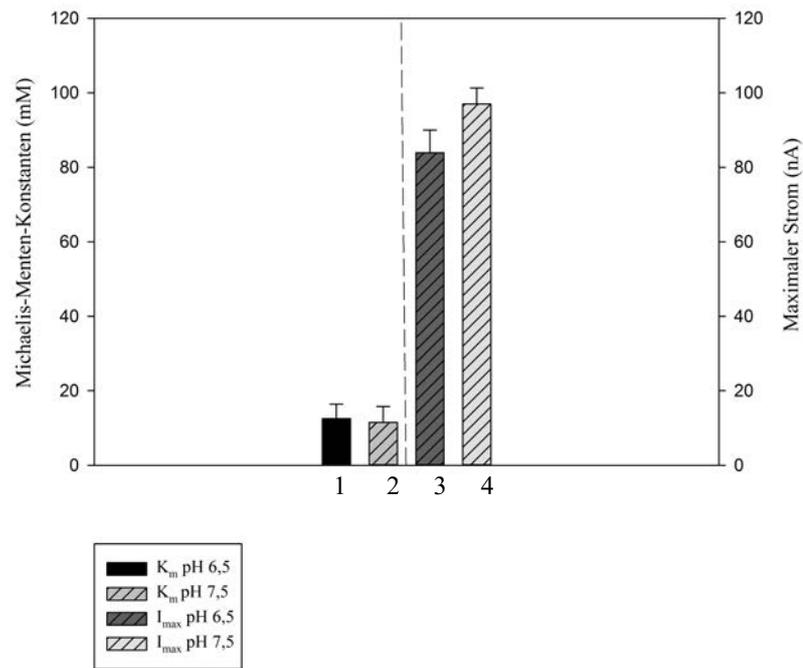


Abbildung 44: Vergleich der Mittelwerte von K_m und I_{max} für Natrium bei pH 6,5 und pH 7,5
Die beiden Balken stellen die Mittelwerte mit den Standardabweichungen der errechneten K_m (mM) bei pH 6,5 (1) und bei pH 7,5 (2) dar. Rechts daneben sind die I_{max} (nA) bei pH 6,5 (3) und bei pH 7,5 (4) dargestellt. Die Daten basieren auf den Messwerten aus drei Versuchsreihen.

3.5 Einfluss von Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (CCCP) als Protonophor

Die Herstellung der Lösungen wurde in Abschnitt 2.2.6 und der Ablauf der Versuchsdurchführung in 2.5.3 erläutert. Die Versuchsreihe wurde mit drei fNaDC3-exprimierenden Oozyten aus zwei Spendertieren und mit vier Wasser-injizierten Oozyten aus drei Spendertieren bei pH 6,5 und pH 7,5 durchgeführt.

Abbildung 45 zeigt eine exemplarische Originalregistrierung einer Messung bei pH 7,5: Zuerst erfolgte die Perfusion mit Succinat in ORi für 300 Sekunden. Die Oozyte reagierte mit einem raschen initialen Einwärtsstrom, der in der zweiten Phase abklang, jedoch immer noch deutlich als Einwärtsstrom registrierbar war. Erst nach dem Herauswaschen des Succinats kehrte der Haltestrom wieder auf seinen Ausgangswert vor der Perfusion mit Succinat zurück. Die Oozyte wurde ca. 450 Sekunden mit ORi perfundiert, danach erfolgte die Zugabe von Succinat (1 mM) plus CCCP (5 μ M) in ORi. Die Oozyte antwortete auf diese Perfusion mit einem Einwärtsstrom, dem sich in einer zweiten Phase ein weiterer transientser Einwärtsstrom überlagerte. Dieser „Peak“ in der Gesamtamplitude, der einen biphasischen Verlauf vermuten lässt, wurde in Abbildung 45 durch den roten Pfeil gekennzeichnet. Nach Herauswaschen des Succinats/CCCPs und einer Perfusion mit ORi über fünf Minuten erfolgte eine erneute Applikation von Succinat (1 mM gelöst in ORi, pH 7,5). Es wurde nun ein Succinat-vermittelter Einwärtsstrom mit deutlich geringerer Amplitude als vor der Gabe von CCCP registriert.

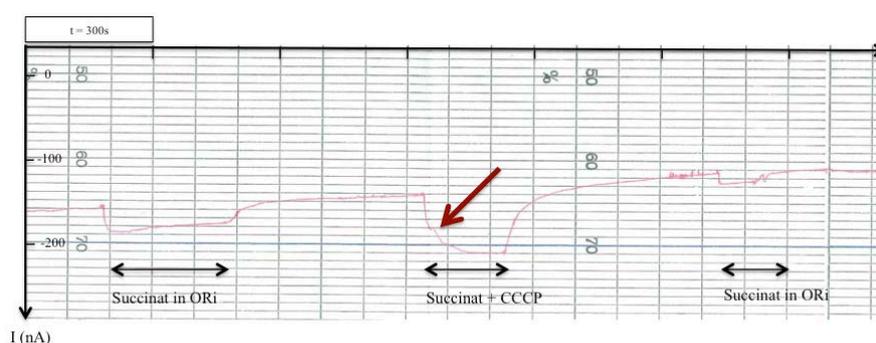


Abbildung 45: Originalregistrierung des Succinat-vermittelten Stroms bei Perfusion mit Succinat in ORi und Succinat + CCCP in ORi bei einer Oozyte mit Expression des fNaDC3 und pH 7,5

Die Achsenbeschriftung dient der Skalierung des eingespeisten Stroms (I) in nA im *Voltage-Clamp-Modus* bei -60 mV. Drei Kästchen, markiert durch den eingefügten größeren Kasten, entsprechen 300 Sekunden. Der Ausschlag der pinkfarbenen Linie zeigt den Succinat-abhängigen Strom bei Zugabe von Succinat (markiert durch den Doppelpfeil). Zwischen der Perfusion von Succinat in ORi bzw. Succinat + CCCP in ORi wurde die Oozyte mit ORi bei pH 7,5 perfundiert. Der rote Pfeil markiert einen „Peak“ der gesamten Amplitude, der den Übergang zwischen Succinat-vermitteltem Strom und CCCP-vermitteltem Strom darstellt.

Der durch den roten Pfeil markierte „Peak“ (Abbildung 45) war bei allen Messungen mit fNaDC3-exprimierenden Oozyten bei Perfusion mit Succinat + CCCP in ORi vorhanden. Bei den Wasser-injizierten Oozyten kam es bei Perfusion mit Succinat + CCCP in ORi hingegen nur zu einem Ausschlag ohne „Peak“ (Abbildung 46). An dieser Stelle wird auf diesen „Peak“ so ausführlich eingegangen, da dieser die Auswertung erschwerte. Dadurch, dass bei den Wasser-injizierten Oozyten ein Ausschlag bei Perfusion mit Succinat + CCCP in ORi vorlag, ist diese Amplitude höchstwahrscheinlich auf den Effekt von CCCP zurückzuführen. Bei Zugabe von Succinat in ORi wurde, wie bei sämtlichen vorherigen Versuchen, kein oder nur ein sehr geringer Einwärtsstrom detektiert.

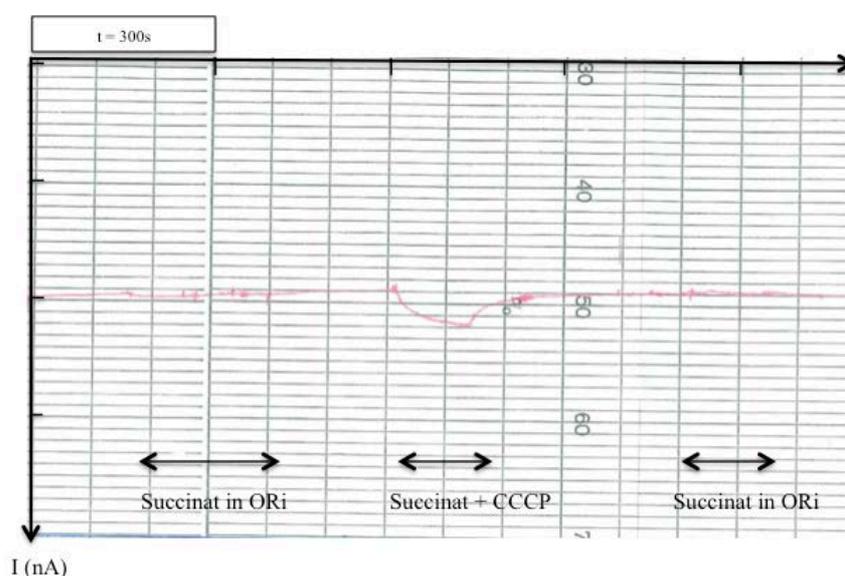


Abbildung 46: Originalregistrierung des Succinat-vermittelten Stroms bei Perfusion mit Succinat in ORi und Succinat + CCCP in ORi bei einer Wasser-injizierten Oozyte und pH 7,5

Die Achsenbeschriftung dient der Skalierung des eingespeisten Stroms (I) in nA im *Voltage-Clamp-Modus* bei -60 mV. Drei Kästchen, markiert durch den eingefügten größeren Kasten, entsprechen 300 Sekunden. Der Ausschlag der pinkfarbenen Linie zeigt den Succinat-abhängigen Strom bei Zugabe von Succinat (markiert durch den Doppelpfeil). Zwischen der Perfusion von Succinat in ORi bzw. Succinat + CCCP in ORi wurde die Oozyte mit ORi bei pH 7,5 perfundiert. Bei Perfusion mit Succinat + CCCP in ORi ist eine Amplitude vorhanden, allerdings ohne den „Peak“ der fNaDC3-exprimierenden Oozyten.

In dem Balkendiagramm (Abbildung 47) sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen von den Succinat-vermittelten Strömen bei fNaDC3-exprimierenden Oozyten bei pH 6,5 und pH 7,5 im Vergleich dargestellt. Der Ausschlag bei Perfusion mit Succinat + CCCP in ORi wurde ohne Berücksichtigung des „Peaks“ vollständig abgelesen. Bei pH 6,5 wurde bei Perfusion mit Succinat + CCCP in ORi ein Einwärtsstrom von $-68,7 \pm 15,3$ nA registriert. Bei pH 7,5 wurde ein eingespeister Strom von $-52,0 \pm 9,4$ nA aufgezeichnet.

Da jedoch bei der Versuchsdurchführung mit Wasser-injizierten Oozyten ebenfalls eine Amplitude abzulesen war, erfolgt die Bewertung dieser Werte in der Diskussion. Bei Subtraktion der Werte der Wasser-injizierten Oozyten von den fNaDC3-exprimierenden Oozyten verbleiben Succinat-vermittelte Ströme von $-36,8$ nA bei pH 6,5 und $-1,0$ nA bei pH 7,5.

Die Succinat-vermittelten Ströme in ORi waren sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 7,5 nach der Perfusion mit CCCP erniedrigt. Bei pH 6,5 betrug der Succinat-vermittelte Strom bei erstmaliger Perfusion mit Succinat in ORi $-21,7 \pm 14,7$ nA, bei der zweiten Perfusion wurden $-13,7 \pm 9,5$ nA eingespeist. Bei pH 7,5 lag der Mittelwert bei erstmaliger Perfusion mit Succinat in ORi bei $-32,0 \pm 11,2$ nA, bei der zweiten Perfusion betrug der Succinat-vermittelte Strom nur noch $-17,3 \pm 10,5$ nA.

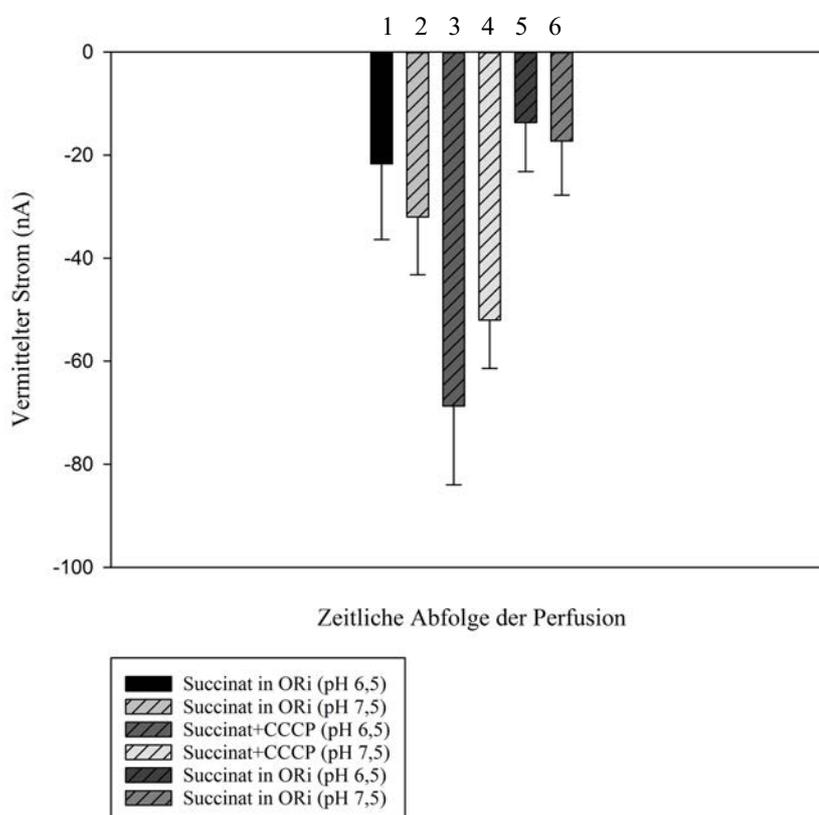


Abbildung 47: Vergleich der Succinat-vermittelten Ströme in ORi und mit CCCP bei Oozyten mit Expression des NaDC3 bei pH 6,5 und pH 7,5

Die Balken zeigen von links nach rechts den gemessenen Differenzstrom (nA) von Succinat in ORi bei pH 6,5 (1), Succinat in ORi bei pH 7,5 (2), Succinat + CCCP bei pH 6,5 (3), Succinat + CCCP bei pH 7,5 (4), Succinat in ORi bei pH 6,5 (5) und Succinat in ORi bei pH 7,5 (6).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der pH-Abhängigkeit des NaDC3-Transporters. Hierfür wurden vier Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurden zwei cRNAs (hNaDC3 und fNaDC3) verwendet. Bei den weiteren Versuchsreihen wurde ausschließlich mit dem fNaDC3-Transporter gearbeitet, da die Oozyten den hNaDC3-Transporter nicht genügend exprimierten, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Aus diesem Grund wird in der Diskussion zunächst die Methode an sich diskutiert, bevor die Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext erfolgt.

4.1 Vorbemerkungen zur verwendeten Methode

Die Verwendung von *Xenopus laevis*-Oozyten als Expressionssystem für Proteine ist bereits seit 1971 bekannt (Gurdon et al. 1971). Der Vorteil des Expressionssystems der *Xenopus laevis*-Oozyten besteht darin, artfremde cRNA transkribieren und translatieren zu können und so in einer relativ großen Zelle die Eigenschaften dieses exprimierten Proteins untersuchen zu können. Hierdurch ist es möglich, durch Variation der Inkubationsbedingungen, durch Variation des extrazellulären Milieus, durch Zugabe von potentiellen Inhibitoren oder weiterer Stimuli die Eigenschaften dieses Proteins isoliert zu untersuchen. Andererseits fehlt natürlich der komplexe Zusammenhang wie er im Gesamtorganismus vorliegt.

Einschränkend ist zu bemerken, dass es sich bei *Xenopus laevis*-Oozyten um Oozyten aus Amphibien handelt, die einem anderen inneren Milieu unterliegen, sodass unter Umständen gewisse Ko-Faktoren fehlen, die zu einer ausreichenden Expression benötigt werden. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass der fNaDC3, der ursprünglich aus den Nieren der Winterflunder stammt, höhere Succinat-abhängige Ströme zeigte, als der humane NaDC3. Diesem Nachteil steht jedoch der Vorteil gegenüber, dass Oozyten nur mit wenigen endogenen Transportern (Dascal 1987) ausgestattet sind, was den Nachweis exprimierter Transporter erleichtert. Weber stellte 1999 eine Übersicht über die bis zu diesem Zeitpunkt bekannten endogenen Ionenkanäle von *Xenopus laevis*-Oozyten zusammen (Weber 1999).

Praktisch traten folgende Probleme bei der Verwendung dieses Expressionssystems auf: Zum einen war es die Heterogenität der Oozyten in Bezug auf ihre Qualität, die ein Überleben und damit ein erfolgreiches Exprimieren des Transportsystems nach

Injektion der cRNA nicht gewährleistet. Obwohl primär nur Oozyten der Stadien V und VI nach Dumont (1972) für die Versuche eingesetzt wurden, die eine einwandfreie Trennung von vegetativem und animalischem Pol zeigten, überlebten nicht alle Oozyten den Expressionszeitraum von maximal 72 Stunden. Da die *Xenopus laevis*-Weibchen bereits mehrere Jahre im Labor unter standardisierten Bedingungen gehalten werden und kaum Todesfälle bei den gehaltenen Tieren auftraten, kann ein sogenannter „Qualitätsabfall“ der Oozyten nicht auf die Haltungsbedingungen zurückzuführen sein. In der Vergangenheit wurde versucht, dies mit den im Institut gehaltenen Weibchen zu berücksichtigen. Die Weibchen wurden markiert, um Oozyten ähnlicher Qualität zu erhalten. Allerdings zeigten die Oozyten eines Weibchens nach einer erneuten Entnahme dennoch nicht unbedingt die gleiche Güte wie zuvor. Vermutet wurden jahreszeitliche Schwankungen. Die Probleme jahreszeitlicher Schwankungen, biologische Variationen zwischen den Oozyten verschiedener Spendertiere und Temperaturschwankungen sind auch von anderen Laboren bekannt (Weber 1999).

Hatten die Oozyten erfolgreich das Transportprotein in ihre Plasmamembran eingebaut, wurden bei einem Klemmpotential von -60 mV zum anderen häufig Fluktuationen beobachtet, die den Nachweis Substrat-abhängiger Ströme erschwerten. Hierbei handelte es sich um Chlorid-abhängige Ströme, wie sie auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurden. Diese verschwanden meist nach längeren Perfusionszeiten mit ORi, sodass anzunehmen ist, dass das Einstechen der beiden Mikroelektroden zu geringfügigen Verletzungen der Plasmamembran führte. Die Oozyte versucht, ihr Membranpotential durch Ausgleichsströme zu halten, die nach Schließen der Mikroläsionen zum Erliegen kamen. Fluktuationen, die erst im weiteren Verlauf der Messungen auftraten, waren meist auf, auch für *Xenopus laevis*-Oozyten, widrige Bedingungen wie sehr alkalische oder saure pH-Werte zurückzuführen. Es ist verständlich, dass eine Oozyte, aus der nach Befruchtung ein lebensfähiger Frosch entstehen soll, solche von ihrem natürlichen Milieu abweichenden pH-Werte nicht unbedingt tolerieren wird.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die gewählte Methode grundsätzlich als aussagefähig angesehen werden kann, aber verschiedenen Einflüssen unterliegt. Dies muss bei der nun folgenden Diskussion der Ergebnisse berücksichtigt werden.

4.2 pH-Reihe mit Succinat und Citrat

In der ersten Versuchsreihe wurde die pH-Abhängigkeit des NaDC3-Transporters in einem Bereich zwischen pH 5,4 und 8,9 mit den Substraten Succinat und Citrat untersucht (Abschnitt 3.2). Die Succinat-vermittelten Ströme lagen bis auf eine Ausnahme zwischen -40 und -55 nA. Die Ausnahme lag bei pH 5,4 mit $-90,7 \pm 51,7$ nA. Dieser hohe Wert ist kritisch zu bewerten, da im Bereich der niedrigen und hohen pH-Werte die Oozyten teilweise kein stabiles Membranpotential haben und damit sehr unterschiedliche Halteströme eingespeist werden mussten. So lag zwar bei pH 5,4 der höchste Einwärtsstrom vor, zugleich war aber auch die Durchführbarkeit einer vollständigen Messung erschwert, da die Stabilität der Oozyten in diesem pH-Bereich nicht gewährleistet war und zwischen den einzelnen pH-Stufen oft längere Erholungszeiten eingeplant werden mussten bis der Haltestrom wieder seinen Ausgangswert erreicht hatte. Der Haltestrom war bei allen Messungen bei pH 5,4 mit Abstand am höchsten (Tabelle 9). Diese Beobachtung wird in einer hohen Anzahl an Versuchen bestätigt. Um insgesamt drei vollständige Messungen mit jeweils einer Oozyte durchgängig in allen pH-Stufen zu erhalten, wurden für die pH-Reihe mit Succinat zehn Oozyten und mit Citrat sieben Oozyten Messungen durchgeführt. Insgesamt ist als Ergebnis festzuhalten, dass die Succinat-vermittelten Ströme bei den verschiedenen pH-Stufen nicht signifikant voneinander abwichen. Somit ist von einer pH-Abhängigkeit des NaDC3-Transporters nicht auszugehen.

Andere Studien stellten eine pH-abhängige Hemmung des Transportes von Succinat im sauren pH-Bereich fest (Hentschel et al. 2003; Kekuda et al. 1999; Pajor et al. 2001; Steffgen et al. 1999). Steffgen et al. (1999) untersuchten elektrophysiologisch Succinat-vermittelte Ströme beim fNaDC3 bei pH 5,5 bis 7,5. Der größte Strom lag bei pH 7,5 vor und nahm bei pH 6,5 und bei 5,5 weiter ab. Die Ergebnisse von Kekuda et al. (1999) beruhten allerdings auf einer anderen Methode. Sie führten keine elektrophysiologischen Versuche, sondern radioaktiv markierte Substrataufnahmeversuche durch. Als Transporter wurden der NaDC3-Transporter aus der Plazenta der Ratte (rNaDC3) und bei Pajor et al. (2001) aus dem Gehirn der Maus (mNaDC3) untersucht. Die Aminosäuresequenzen von mNaDC3 und fNaDC3 sind zu 67 % identisch (Steffgen et al. 1999) und die Aminosäuresequenz von mNaDC3 und hNaDC3 stimmen zu 87 % überein (Wang et al. 2000), sodass Speziesdifferenzen eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein könnten.

Die Citrat-vermittelten Ströme wiesen bis auf eine Ausnahme bei pH 8,9 ($-55,0 \pm 38,3$ nA) bei allen anderen pH-Werten geringere Einwärtsströme auf als bei Succinat (Tabelle 9 und Tabelle 10). Diese lagen zwischen -9 und -55 nA und zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den pH-Stufen. Daraus ist zu folgern, dass keine pH-Abhängigkeit Citrat-vermittelter Ströme vorliegt.

In der Literatur ist die Ergebnislage in Bezug auf die Citrat-abhängigen Ströme nicht eindeutig. Pajor et al. (2001) stellten keine pH-Abhängigkeit bei Citrat-vermittelten Strömen fest. Andere Forschungsgruppen ermittelten hingegen eine pH-Abhängigkeit (Hentschel et al. 2003; Kekuda et al. 1999). Kekuda et al. (1999) beobachteten einen biphasischen Verlauf des Transportes von Citrat. Der Transport nahm von pH 8,5 zu pH 6,5 zu. Eine weitere Verringerung des pH-Wertes steigerte die Transportrate jedoch nicht. Wang et al. (2000) stellten einen Anstieg Citrat-vermittelter Ströme bei einer Erniedrigung von pH 7,5 auf pH 6,5 fest. Ebenso ermittelten Steffgen et al. (1999) eine Abnahme des Citrat-vermittelten Stroms bei Absinken des pH-Wertes von 7,5 auf 5,5. Zwischen den pH-Werten 6,5 und 7,5 lagen jedoch keine signifikanten Unterschiede vor.

Diese Beobachtungen können theoretisch durch den pKs-Wert von Citrat erklärt werden. Citrat, als ein mögliches physiologisches Substrat des NaDC3-Transporters, liegt bei pH 7,5 hauptsächlich (92,6 %) als trivalentes Anion vor (Hentschel et al. 2003). Die divalente Form steigt in ihrem Anteil erheblich bei einem Absinken des pH-Wertes auf 6,5, da der pKs (3) sich bei pH 6,4 befindet (Wang et al. 2000). Bei einer Gesamtkonzentration von 1 mM Citrat liegen nur ca. 0,08 mM als divalentes Citrat in der Perfusionslösung vor. Der hochaffine NaDC3-Transporter transportiert Dicarboxylate, die als divalente Anionen vorliegen, wahrscheinlich deutlich besser als in protonierter Form (Kekuda et al. 1999). Es steht zu vermuten, dass der pH-Wert beim Transport von Citrat eine Rolle spielt, da bei Erniedrigung des pH-Wertes die Anzahl der in divalenter Form vorliegender Anionen zunimmt und diese besser transportiert werden. Zugleich ist es aber möglich, dass die Funktion des Transporters bei Verringerung des pH-Wertes abnimmt, sodass trotz des vermehrten Vorliegens divalenter Anionen durch diese gegenteiligen Effekte kein erhöhter Einwärtsstrom gemessen werden konnte. An dieser Stelle müssen weitere Versuche erfolgen, um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob das Vorliegen divalenter Anionen von Citrat oder ein Effekt des pH-Wertes auf die Funktion des Transporters entscheidend sind.

4.3 K_m -Bestimmung für Succinat und Citrat

In der zweiten Versuchsreihe wurden die K_m -Werte für Succinat und Citrat bei pH 6,5 und 7,5 bestimmt (Abschnitt 3.3). Die Werte betragen für Succinat bei pH 6,5 durchschnittlich $6,0 \pm 3,9 \mu\text{M}$ und bei pH 7,5 durchschnittlich $3,9 \pm 2,0 \mu\text{M}$. Aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen sind diese Unterschiede allerdings nicht signifikant voneinander verschieden. Ebenso verhielt es sich bei den K_m -Werten für Citrat mit Werten bei pH 6,5 von $342,5 \pm 482,4 \mu\text{M}$ und $360,1 \pm 343,3 \mu\text{M}$ bei pH 7,5. Die maximalen Citrat-vermittelten Ströme und die K_m waren bei pH 6,5 zwar kleiner, aber auch in diesem Fall konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden pH-Werten festgestellt werden. Allenfalls die Tendenz der niedrigeren K_m für Citrat beim niedrigeren pH-Wert kann die These stützen, dass Citrat in protonierter Form transportiert wird und somit der pKs-Wert im Gegensatz zu Succinat einen Einfluss hat (4.2). Succinat hat einen niedrigeren pKs (2) mit 5,6 und liegt aus diesem Grund bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7,5 zu 89-99 % und sogar bei pH 5,5 noch zu 44 % als divalentes Anion vor (Hentschel et al. 2003). Daraus ist zu folgern, dass Succinat unabhängig vom pH-Wert aufgrund seines niedrigen K_m -Wertes ausreichend als divalentes Anion zur Verfügung steht und aufgrund dieser These der pH-Wert keine Auswirkung haben sollte.

Festzuhalten ist das Ergebnis, dass die K_m für Succinat signifikant kleiner ist als die K_m für Citrat.

Die Größenordnung und das Verhältnis stimmen mit den Werten für die Michaelis-Menten-Konstanten bei physiologischem pH-Wert in der Literatur überein (Tabelle 1) (Yodoya et al. 2006). Die K_m -Werte liegen je nach Quelle und Art des exprimierten NaDC3-Transporter für Succinat zwischen 2-25 μM und für Citrat bei 220 μM (Pajor 2014). Bei der K_m für Citrat gilt es zu berücksichtigen, dass es sich um den rNaDC3 handelt. NaDC3-Transporter verschiedener Gattungen und Gewebe können sich in ihrem Transportverhalten voneinander unterscheiden. Beispielsweise hat der xNaDC3 im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der SLC13-Familie durch Lithium oder Natrium aktivierbare Leckströme, obwohl er zu 65 % in der Aminosäuresequenz mit dem fNaDC3 übereinstimmt (Oshiro und Pajor 2005). Die Affinität des NaDC3-Transporters zu den Substraten spiegelt umgekehrt proportional die Substratkonzentration im menschlichen Blut wider. Citrat ist in großen Mengen vorhanden und wird daher mit einer geringeren Affinität als Succinat transportiert, welches in viel geringeren Kon-

zentrationen mit 40 μM im Vergleich zu 135 μM für Citrat als Substrat zur Verfügung steht (Inoue et al. 2002). Vor diesem Hintergrund ergibt das Verhältnis der Michaelis-Menten-Konstanten für Succinat und Citrat physiologisch durchaus Sinn. Allerdings liegt Citrat als bevorzugtes Substrat in Form des divalenten Anions nur in einer Konzentration von ca. 10 μM im Blut vor (Inoue et al. 2002).

4.4 Succinat- und Citrat-vermittelte Ströme bei Ersatz von Natrium

In der dritten Versuchsreihe wurde im ersten Schritt die Natriumabhängigkeit und im zweiten Schritt die pH-Abhängigkeit der Natrium-Bindungstasche des NaDC3 bei pH 6,5 und 7,5 überprüft (3.4). Die Substrat-vermittelten Ströme waren bei Ersatz des Natriums durch NMDG (mit Succinat und Citrat überprüft) oder durch Cholin (nur mit Succinat überprüft) deutlich verringert. Nicht entscheidend war der pH-Wert oder ob Natrium durch NMDG oder Cholin ersetzt wurde, was aus der Versuchsreihe mit Succinat abgeleitet werden konnte, da die Halteströme bei Ersatz des Natriums durch NMDG oder Cholin eine vergleichbare Amplitude aufwiesen. Die K_m für Natrium wurde bei pH 6,5 und 7,5 bestimmt, um die Auswirkung des pH-Wertes auf die Bindungstasche für Natrium zu untersuchen. Die ermittelten K_m mit den dazugehörigen maximalen Strömen wichen mit $12,5 \pm 3,9$ mM bei pH 6,5 und mit $11,5 \pm 4,3$ mM bei pH 7,5 nicht signifikant voneinander ab. Somit wies auch die Bindungstasche von Natrium keine pH-Abhängigkeit auf. Die maximalen Ströme wichen bei pH 6,5 mit $-83,9 \pm 6,1$ nA und bei pH 7,5 mit $-97,0 \pm 4,3$ nA signifikant voneinander ab. Eine signifikante Erhöhung von I_{max} lässt entweder auf eine Änderung der Transportrate oder aber eine pH-abhängige Veränderung des NaDC3 schließen. Eine Veränderung des NaDC3 ist aufgrund der jeweils kurzen Perfusionsdauer höchstwahrscheinlich auszuschließen. Ebenso ist eine Änderung der Bindungsaffinität wegen der ähnlichen K_m -Werte unwahrscheinlich.

In der Literatur liegen Vergleichswerte von elektrophysiologischen Versuchen mit dem hNaDC3 vor. Während Wang et al. (2000) keinen Succinat-abhängigen Strom unter Natrium-freien Bedingungen detektieren konnten, wurden in dieser Arbeit niedrige Succinat-induzierbare Ströme auch bei Ersatz des Natriums durch NMDG und Cholin nachgewiesen. Anhand von Transportversuchen mit dem mNaDC3-Transporter ermittelten Pajor et al. (2001) in ihrer Forschungsarbeit den Succinattransport bei Ersatz des Natriums durch Cholin und Caesium. Bei Ersatz des Natriums durch Cholin stellten sie

ebenfalls eine geringe Transportrate von 3 % fest, bei Caesium lag kein Substrattransport mehr vor. Oshiro und Pajor (2005) ermittelten bei Transportversuchen mit dem α NaDC2 eine Succinattransportrate von 6 % in Abwesenheit von Natrium. Aus der ebenfalls beobachteten sigmoidalen Beziehung zwischen der Natriumkonzentration und dem Succinattransport ist zu folgern, dass mindestens zwei oder drei Natriumionen in den Succinattransport involviert sind (Burckhardt et al. 2000; Oshiro und Pajor 2005) und dass die Affinität mit zunehmend gebundenem Natrium ansteigt. Des Weiteren stellten Oshiro und Pajor (2005) nicht einen Einwärtsstrom sondern einen Auswärtsstrom bei Perfusion mit Cholin und Succinat fest. Dieser Auswärtsstrom war auch bei den Wasser-injizierten Kontrolloozyten vorhanden. Hieraus kann gefolgert werden, dass Succinat wahrscheinlich einen inhibitorischen Effekt auf einen endogenen Strom der Oozyte hat. Diese These konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen jedoch nicht uneingeschränkt bestätigt werden, da nur bei pH 6,5 ein Auswärtsstrom bei Perfusion mit Cholin und Succinat bei den Wasser-injizierten Oozyten detektiert wurde. Bei den NaDC3-exprimierenden Oozyten und bei pH 7,5 wurden hingegen ausschließlich geringe Einwärtsströme aufgezeichnet. Auswärtsströme wurden ausschließlich beim Übergang von Natrium-haltiger zu Natrium-freier Perfusion beobachtet. Dies könnte, nach Ansicht von Pajor (1999), auf einen Natrium "Leak" zurückzuführen sein. Natrium durchläuft den Transportzyklus auch ohne ein Substrat wie Succinat.

Über die Natriumabhängigkeit in Kombination mit dem Substrat Citrat ist weniger bekannt. Yodoya et al. (2006) stellten im Rahmen von Substrataufnahmeversuchen vom α NaDC3 in Astrozyten eine verringerte Aufnahme von Succinat und Citrat in Abwesenheit von Natrium und mit Ersatz durch NMDG oder Cholin fest. In einer anderen Studie wurde die Natriumabhängigkeit bei der Aufnahme von *N*-Acetyl-L-Aspartat untersucht. Dabei wurde keine Substrataufnahme bei Ersatz des Natriums durch Cholin festgestellt (Fujita et al. 2005). Damit kann eine Natriumabhängigkeit des NaDC3 bestätigt werden.

Für die K_m -Werte für Natrium liegen Vergleichswerte vom SDCT2 (entspricht NaDC3) von 20 mM (Chen et al. 1999), vom α NaDC3 von 25 mM (Pajor et al. 2001) und vom α NaDC3 von 70 mM (Fujita et al. 2005) vor. Diese Werte sind etwas höher als die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte von etwa 12 mM bei pH 6,5 und 7,5. Allerdings handelte es sich bei diesen Befunden um NaDC3s der Ratte. Bei der Betrachtung des Transportes von Natrium in *Xenopus laevis*-Oozyten ist von Bedeutung, dass in der Membran von *Xenopus laevis*-Oozyten Transporter oder Kanäle existent sein können, die bei einer Depolarisation aktiviert werden und somit Natriumionen in die Zelle auf-

nehmen (Krafte et al. 1990). Allerdings greift dieser Transport erst bei Spannungen im positiven Bereich bzw. Spannungen, die kleiner als -50 mV sind. Im *Voltage-Clamp-Modus* ist die Oozyte auf ein Potential von -60 mV geklemmt, sodass sehr wahrscheinlich von keinem zusätzlichen spannungsabhängigen Natrium-vermittelten Einwärtsstrom ausgegangen werden muss. Hierfür sprechen auch die sehr kleinen Substrat-vermittelten Ströme Wasser-injizierter Oozyten bzw. der beobachtete Auswärtsstrom bei Ersatz des Natriums durch Cholin bei pH 6,5.

4.5 Einfluss von CCCP

In der vierten Versuchsreihe wurden Oozyten mit Succinat plus CCCP in ORi perfundiert, um zu überprüfen, ob der pH-Gradient über der Membran eine Rolle spielt. Hierfür ist es wichtig zu wissen, wo der intrazelluläre pH-Wert (pH_i) von *Xenopus laevis*-Oozyten liegt, damit der Effekt des Angleichens des intrazellulären pH-Wertes an den extrazellulären pH-Wert (pH_{ex}) durch das Protonophor CCCP beurteilt werden kann. Burckhardt et al. (1992) untersuchten Transportmechanismen von Protonen durch die Membran von *Xenopus laevis*-Oozyten und ermittelten den intrazellulären pH-Wert zu $7,49 \pm 0,12$ bei extrazellulärer Perfusion mit einer Lösung (pH 7,4).

Bei den durchgeführten Versuchen waren die Succinat-vermittelten Ströme generell nach Perfusion mit CCCP und Succinat niedriger als vorher. Dies kann an der Auswirkung von CCCP auf die Oozyten als Expressionssystem liegen, da die Oozyten die Perfusion mit CCCP nur schlecht tolerierten. Nach Subtraktion der durch die Wasser-injizierten Oozyten erzielten Werte bei Perfusion mit CCCP und Succinat, konnten die Succinat-vermittelten Ströme bei den fNaDC3-exprimierenden Oozyten trotz der Problematik bei der Auswertung aufgrund des „Peaks“ berechnet werden (Abbildung 45). Bei pH 6,5 lag ein Succinat-vermittelter Strom von $-36,8$ nA vor, bei pH 7,5 betrug dieser nur noch $-1,0$ nA.

Bei pH 7,5 besteht kein Unterschied zwischen pH_i und pH_{ex} . Daher hat CCCP keine Auswirkung auf den Gradienten, bewirkt aber höchstwahrscheinlich eine Veränderung an den Oozyten selbst, da diese der Perfusion mit CCCP nur sehr schwer standhielten. Bei pH 6,5 war die Ausgangslage so, dass $\text{pH}_i > \text{pH}_{\text{ex}}$ war. Ein Angleichen von pH_i an pH_{ex} führte zu einem deutlich höheren Strom als bei pH 7,5. Somit kann gefolgert werden, dass der pH-Gradient, der nur bei pH 6,5 existiert, einen Einfluss auf den Succinat-abhängigen Einwärtsstrom hat, der noch zu klären ist.

4.6 pH-Effekt auf das Transportprotein

Ein Ansatz, um die pH-Abhängigkeit des NaDC3-Transporters zu klären, ist der pH-Effekt auf das Transportprotein selbst. Es ist möglich, dass Umladungen der Aminosäuren, insbesondere der Histidine, von denen drei vorliegen (Abbildung 2), eine Veränderung der Transportereigenschaften bewirken (Hagos et al. 2006). Vor diesem Hintergrund ist die basische Aminosäure Histidin von besonderem Interesse, da sie als Baustein des NaDC3 bekannt ist (Abbildung 2). Histidin ist durch seine Iminogruppe mit einem isoelektrischen Punkt im neutralen Bereich (pH 6) bei physiologischen pH-Werten in der Lage, sowohl eine Pufferfunktion einzunehmen als auch eine Konformationsänderung am Transportprotein zuzulassen.

Die genaue Funktion von Histidin war nicht zentraler Gegenstand dieser Arbeit; ein potentieller pH-Effekt auf das Transportprotein konnte nicht geklärt werden. Zum einen wurden keinen signifikanten Unterschiede bei Substrat-vermittelten Strömen des NaDC3 festgestellt, zum anderen ist die Struktur des Transportproteins noch nicht vollständig bekannt (Colas et al. 2015). Sämtliche Vorstellungen beruhen auf Modellen und somit ist die Aussagekraft von auf diesen Modellen basierenden Thesen limitiert. Je nach Modell ist es möglich, dass das Protein zwölf Transmembrandomänen mit extrazellulär lokalisiertem Amino- und Carboxyterminus besitzt (Wang et al. 2000) oder aber elf Transmembrandomänen mit intrazellulärem Aminoterminus und extrazellulärem Carboxyterminus aufweist (Bai et al. 2007). Des Weiteren ist noch nicht bekannt, wo exakt sich die funktionellen Bindungsstellen am NaDC3-Protein befinden. Bai et al. (2006) vermuten, dass der Aminoterminus für den Substrattransport wichtiger ist als der Carboxyterminus. Der Carboxyterminus besteht aus den Aminosäuren an den Stellen 1-16. Bei Abgleich mit der Aminosäuresequenz in Abbildung 2 wird deutlich, dass sich zumindest in diesem Abschnitt keine Histidine befinden. Dies würde belegen, dass der pH-Wert keinen Effekt auf das Transportprotein hat.

4.7 Ausblick

Die Transporter der SLC13-Familie sind in den Energiemetabolismus (Colas et al. 2015), die Sekretion von organischen Anionen (Pajor 1999), die Regulation des Säuren-Basen-Haushaltes (Bergeron et al. 2013), den Metabolismus von Aminosäuren (Fujita et al. 2005) und die Synthese von Glukokortikoiden involviert und können bei der Pathogenese der Nephrolithiasis (Markovich und Murer 2004) eine Rolle spielen. Trotz dieser

weitreichenden Bedeutung ist der NaDC3-Transporter als Mitglied der SLC13-Familie noch nicht ausreichend erforscht. Zum Abschluss der Diskussion soll auf Aspekte eingegangen werden, die Gegenstand der aktuellen Forschung über den NaDC3 sind. Bei all diesen Aspekten wäre das Wissen über eine pH-Abhängigkeit von großer Relevanz:

Forschungsschwerpunkt waren bisher die Transportfunktion und die transportierten Substrate. Citrat beispielsweise hat als Chelator für Calciumkomplexe eine Schlüssel-funktion bei der Vorbeugung von Nephrolithiasis (Moe 2006). Es wurde gezeigt, dass renale Tubuluszellen bei der luminalen Citratkonzentration eine Rolle spielen, da sie durch die Bürstenmembran aus dem Filtrat, ebenso wie durch die basolaterale Membran aus dem Blut, Citrat transportieren (Hamm 1990). Je mehr Citrat vorhanden ist, desto eher werden Calciumionen in Form von Komplexbildungen gebunden. Auf diese Weise wird der Entstehung von Nierensteinen durch die Verringerung der freien Calciumkonzentration vorgebeugt (Markovich und Murer 2004). In einer Studie konnte bei ca. 55 % der Patienten mit rezidivierenden Nierensteinen eine Hypocitraturie nachgewiesen werden (Nicar et al. 1983). Hieraus ergibt sich die Bedeutung einer möglichen pH-Abhängigkeit des NaDC3 mit seinem Substrat Citrat, da Veränderungen des Citrattransportes auf der basolateralen Seite den Metabolismus und den pH-Wert intrazellulär beeinflussen können. Diese intrazellulären Veränderungen wiederum können sich auf den luminalen Citrattransport auswirken. Somit stellt diese Kaskade einen Ansatz zur Behandlung von Patienten mit idiopathischer Nephrolithiasis dar. Diese Hypothese ist allerdings kritisch zu hinterfragen, da die Hauptaufgabe des NaDC3 in der Bereitstellung des Glutarats bzw. α -KG für die über die organischen Anionentransporter stattfindende Fremdstoffausscheidung besteht.

Für die OATs, die an den NaDC3-Transporter gekoppelt sind, ist bekannt, dass das Expressionslevel möglicherweise eine Auswirkung auf die renale Elimination von Medikamenten hat. Sakurai et al. (2004) untersuchten das Expressionslevel von den OATs bei Nierenkranken und verglichen dieses mit dem von gesunden Kontrollgruppen. Beim hOAT1 wurde eine verringerte Expression bei Nierenkranken im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen (Sakurai et al. 2004). Diesbezügliche Versuche zum NaDC3 stehen noch aus.

Der NaDC3 wird in Zusammenhang mit Alterungsprozessen gebracht, da er direkt am Energiemetabolismus beteiligt ist. Wang et al. (2003) fanden heraus, dass der NaDC3 bei älteren Menschen in der Niere im Vergleich zu Erwachsenen und Kindern vermehrt

vorhanden ist. Diesen Ansatz verfolgten sie in einer zweiten Studie weiter und untersuchten den Zusammenhang von Expressionslevel, oxidativem Stress und Mitochondrien als Ort des Energiemetabolismus. Das Ergebnis lässt den Schluss zu, dass eine Überexpression des NaDC3 zu einer beschleunigten Zellalterung führt (Chen et al. 2005). Dieser Ansatz wurde auch von Fei et al. (2003) am Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) verfolgt, bei dem sich die Lebensspanne bei einer Funktionsstörung des ceNaDC2, welcher dem NaDC3 sehr ähnelt, signifikant ausdehnte.

5 Zusammenfassung

Über elektrophysiologische Methoden wurde der NaDC3-Transporter funktionell auf seine pH-Abhängigkeit der Substrate Succinat und Citrat sowie seine Natriumabhängigkeit untersucht. Zunächst wurde die für dieses Transportprotein codierende cRNA in *Xenopus laevis*-Oozyten injiziert. Nach Inkubation und Expression des Transportproteins wurden Versuche zur Untersuchung von pH-Abhängigkeiten mit der *Two-Electrode-Voltage-Clamp*-Technik durchgeführt. Dabei wurden Transporter-vermittelte Änderungen der bei einem konstanten Potential von -60 mV einzuspeisenden Halteströme bei Perfusion mit verschiedenen Versuchslösungen gemessen. Insgesamt wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die untersuchten Substrate Succinat und Citrat wiesen im pH-Bereich zwischen pH 5,4 und 8,9 nur marginale Änderungen ihrer Amplituden auf, wobei der sehr saure und der höchste alkalische pH-Wert nur schlecht toleriert wurden.
2. Die bestimmten Michaelis-Menten-Konstanten von Succinat und Citrat wiesen keine signifikanten Unterschiede bei pH 6,5 und 7,5 auf. Die Affinität von Succinat war höher als die von Citrat. Dies könnte allerdings auch daran liegen, dass bei den untersuchten pH-Werten bei gleicher Gesamtkonzentration deutlich weniger Citrat in der divalenten Form vorliegt.
3. In Abwesenheit von Natrium, unabhängig davon, ob Natrium durch NMDG oder Cholin ersetzt wurde, waren nur geringfügige Substrat-abhängige Ströme detektierbar. Die K_m für Natrium war mit ca. 12 mM nicht abhängig vom vorliegenden pH-Wert.
4. CCCP führt als Protonophor zu einem Angleichen des intrazellulären an den extrazellulären pH-Wert. Generell waren die Substrat-abhängigen Einwärtsströme nach Perfusion mit CCCP bei pH 6,5 und pH 7,5 geringer als vor der Perfusion mit CCCP. Die Amplitude beider Ströme war vergleichbar, sodass der verringerte Einwärtsstrom vermutlich auf die Auswirkung des CCCPs auf die Oozyte selbst zurückzuführen ist. Während der Perfusion mit CCCP wurden bei pH 6,5 (pH-Gradient über der Membran der Oozyte) größere Ströme als bei pH 7,5 (kein pH-Gradient über der Membran der Oozyte) gemessen. Somit hat der

existierende pH-Gradient über der Membran bei pH 6,5 unter dem Einfluss von CCCP eine Auswirkung auf den Substrat-vermittelten Einwärtsstrom.

Wie in der Diskussion schon angeklungen, sollten weitere Versuche folgen. Ein besseres Verständnis über die Funktionsweise des Substrattransportes durch den NaDC3 und dessen Struktur erscheint insbesondere interessant vor dem Hintergrund des Beitrages des NaDC3 bei Alterungsprozessen zu sein.

6 Literaturverzeichnis

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

Bergeron MJ, Cl  men  on B, Hediger MA, Markovich D (2013): SLC13 family of Na⁺-coupled di- and tri-carboxylate/sulfate transporters. *Mol Aspects Med* 34, 299–312

Breljak D, Ljubojevi   M, Hagos Y, Micek V, Balen Eror D, Vrhovac Maduni   I, Brzica H, Karaica D, Radovi   N, Kraus O (2016): Distribution of organic anion transporters NaDC3 and OAT1-3 along the human nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 311, F227–238

Burckhardt BC, Kroll B, Fr  mter E (1992): Proton transport mechanism in the cell membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Pflueg Arch Eur J Physiol* 420, 78–82

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. *Pflueg Arch Eur J Physiol* 441, 323–330

Burckhardt BC, Lorenz J, Kobbe C, Burckhardt G (2004): Substrate specificity of the human renal sodium dicarboxylate cotransporter, hNaDC-3, under voltage-clamp conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F792–F799

Chen X, Tsukaguchi H, Chen X-Z, Berger UV, Hediger MA (1999): Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. *J Clin Invest* 103, 1159–1168

Chen X, Cao D, Wang J, Yuan L, Feng Z, Fu B, Hong Q, Zhang X, Bai X, Lu Y (2005): Effects of Human Na⁺/Dicarboxylate Cotransporter 3 on the Replicative Senescence of Human Embryonic Lung Diploid Fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60, 709–714

- Colas C, Pajor AM, Schlessinger A (2015): Structure-Based Identification of Inhibitors for the SLC13 Family of Na(+)/Dicarboxylate Cotransporters. *Biochemistry (Mosc)* 54, 4900–4908
- Dantzler WH (2002): Renal organic anion transport: a comparative and cellular perspective. *Biochim Biophys Acta* 1566, 169–181
- Dascal N (1987): The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22, 317–387
- Dumont JN (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136, 153–179
- Fei Y-J, Inoue K, Ganapathy V (2003): Structural and functional characteristics of two sodium-coupled dicarboxylate transporters (ceNaDC1 and ceNaDC2) from *Caenorhabditis elegans* and their relevance to life span. *J Biol Chem* 278, 6136–6144
- Fujita T, Katsukawa H, Yodoya E, Wada M, Shimada A, Okada N, Yamamoto A, Ganapathy V (2005): Transport characteristics of N-acetyl-L-aspartate in rat astrocytes: involvement of sodium-coupled high-affinity carboxylate transporter NaC3/NaDC3-mediated transport system. *J Neurochem* 93, 706–714
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971): Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233, 177–182
- 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, F86–93
- Hagos Y, Steffgen J, Rizwan AN, Langheit D, Knoll A, Burckhardt G, Burckhardt BC (2006): Functional roles of cationic amino acid residues in the sodium-dicarboxylate cotransporter 3 (NaDC-3) from winter flounder. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F1224–1231
- Hamm LL (1990): Renal handling of citrate. *Kidney Int* 38, 728–735
- Hediger MA, Cl  men  on B, Burrier RE, Bruford EA (2013): The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Mol Aspects Med* 34, 95–107

- Henjakovic M, Hagos Y, Krick W, Burckhardt G, Burckhardt BC (2015): Human organic anion transporter 2 is distinct from organic anion transporters 1 and 3 with respect to transport function. *Am J Physiol Renal Physiol* 309, F843–851
- Hentschel H, Burckhardt BC, Schölermann B, Kühne L, Burckhardt G, Steffgen J (2003): Basolateral localization of flounder Na⁺-dicarboxylate cotransporter (fNaDC-3) in the kidney of *Pleuronectes americanus*. *Pflueg Arch Eur J Physiol* 446, 578–584
- Huang W, Wang H, Kekuda R, Fei YJ, Friedrich A, Wang J, Conway SJ, Cameron RS, Leibach FH, Ganapathy V (2000): Transport of N-acetylaspartate by the Na⁽⁺⁾-dependent high-affinity dicarboxylate transporter NaDC3 and its relevance to the expression of the transporter in the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 392–403
- Inoue K, Zhuang L, Ganapathy V (2002): Human Na⁺-coupled citrate transporter: primary structure, genomic organization, and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 465–471
- Kekuda R, Wang H, Huang W, Pajor AM, Leibach FH, Devoe LD, Prasad PD, Ganapathy V (1999): Primary structure and functional characteristics of a mammalian sodium-coupled high affinity dicarboxylate transporter. *J Biol Chem* 274, 3422–3429
- Krafte DS, Goldin AL, Auld VJ, Dunn RJ, Davidson N, Lester HA (1990): Inactivation of cloned Na channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 96, 689–706
- Lang F: Niere. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*. (Springer-Lehrbuch). 31. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2010, 629–660
- Markovich D, Murer H (2004): The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflueg Arch Eur J Physiol* 447, 594–602
- Moe OW (2006): Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet Lond Engl* 367, 333–344
- Nicar MJ, Skurla C, Sakhaee K, Pak CYC (1983): Low urinary citrate excretion in nephrolithiasis. *Urology* 21, 8–14
- Oshiro N, Pajor AM (2005): Functional characterization of high-affinity Na⁺/dicarboxylate cotransporter found in *Xenopus laevis* kidney and heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1159–C1168

Pajor AM (1999): Sodium-coupled transporters for Krebs cycle intermediates. *Annu Rev Physiol* 61, 663–682

Pajor AM (2014): Sodium-coupled dicarboxylate and citrate transporters from the SLC13 family. *Pflueg Arch Eur J Physiol* 466, 119–130

Pajor AM, Gangula R, Yao X (2001): Cloning and functional characterization of a high-affinity Na(+)/dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1215–1223

Pelis RM, Wright SH (2011): Renal transport of organic anions and cations. *Compr Physiol* 1, 1795–1835

Sakurai Y, Motohashi H, Ueo H, Masuda S, Saito H, Okuda M, Mori N, Matsuura M, Doi T, Fukatsu A (2004): Expression levels of renal organic anion transporters (OATs) and their correlation with anionic drug excretion in patients with renal diseases. *Pharm Res* 21, 61–67

Schlessinger A, Sun NN, Colas C, Pajor AM (2014): Determinants of Substrate and Cation Transport in the Human Na⁺/Dicarboxylate Cotransporter NaDC3. *J Biol Chem* 289, 16998–17008

Schorbach L, Krick W, Burckhardt G, Burckhardt BC (2013): Glutathione Is a Low-Affinity Substrate of the Human Sodium-Dependent Dicarboxylate Transporter. *Nephron Physiol* 124, 1–5

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

Sigel E, Minier F (2005): The *Xenopus* oocyte: System for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol Nutr Food Res* 49, 228–234

Steffgen J, Burckhardt BC, Langenberg C, 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 (2007): 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *J Mol Med Berl Ger* 85, 763–770

Wang H, Fei Y-J, Kekuda R, Yang-Feng TL, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2000): Structure, function, and genomic organization of human Na⁺-dependent high-affinity dicarboxylate transporter. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C1019–C1030

Wang J, Chen X, Zhu H, Peng L, Hong Q (2003): Relationship between aging and renal high-affinity sodium-dependent dicarboxylate cotransporter-3 expression characterized with antifusion protein antibody. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58, B879–888

Weber WM (1999): Endogenous ion channels in oocytes of xenopus laevis: recent developments. *J Membr Biol* 170, 1–12

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

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. phil. nat. Birgitta C. Burckhardt für ihre große persönliche Unterstützung und die zu jeder Zeit hervorragende Betreuung. Mit außerordentlich viel Geduld und Freundlichkeit hat sie mir wertvolle Anregungen bei der Fertigstellung dieser Arbeit gegeben.

Außerdem danke ich Frau Andrea Paluschkiwitz, die mich durch den experimentellen Teil meiner Dissertationsarbeit begleitet hat und mir mit viel Geschick und Freundlichkeit die nötigen praktischen Fähigkeiten vermittelte.

Lebenslauf

Am 19.01.1991 wurde ich in Bremen als Tochter von Birgit Hoffmann, geb. Lindner, und Dr. Christoph Hoffmann geboren.

Von 1997 bis 2001 besuchte ich die Grundschule Schierbrok in Ganderkesee. Nach zwei Jahren an der Orientierungsstufe Bookholzberg in Ganderkesee ging ich ab 2003 auf das Gymnasium Ganderkesee, an dem ich im Juni 2010 meine Allgemeine Hochschulreife erlangte.

Im Oktober 2010 nahm ich das Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität in Göttingen auf. Dort absolvierte ich im September 2011 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und im März 2013 die Zahnärztliche Vorprüfung.

Im Februar 2014 begann ich in der Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie des Zentrums Physiologie und Pathophysiologie der Universität Göttingen mit dem experimentellen Teil der vorliegenden Dissertationsarbeit.

Im März 2015 famulierte ich in einer Zahnarztpraxis in San Francisco, USA.

Im Dezember 2015 beendete ich das Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität in Göttingen erfolgreich mit der Note „sehr gut“ im Staatsexamen.

Bis zum Beginn meiner Zeit als Vorbereitungsassistentin widmete ich mich der Fertigstellung meiner Dissertationsarbeit.

Seit Oktober 2016 arbeite ich in der Praxis Dr. Behring & Partner in Hamburg.