

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Physiologie I
Vorstand: Professor Dr. med. S. Silbernagl

**Untersuchungen zum Wirkmechanismus des klinisch angewandten
Schwermetallchelators 2,3-Dimercapto-1-Propansulfonsäure (DMPS)**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Florian Islinger

aus Ansbach

Würzburg, November 2002

Referent: Prof. Dr. med. M. Gekle
Korreferent: Prof. Dr. med. H. Koepsell
Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 8.7.2003

Der Promovend ist Arzt.

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
1. Transport organischer Anionen.....	1
2. Der Organische Anionen-Transporter 1 (OAT1) und die OAT-Familie	2
3. Intoxikationen mit anorganischem Quecksilber und Therapie mit 2,3-Dimercapto-1-Propansulfonsäure (DMPS).....	8
4. DMPS: Chemie, Toxikologie, Pharmakokinetik	11
5. Postulierter Wirkmechanismus von DMPS	14
6. Fragestellung.....	19
II. MATERIAL UND METHODE	21
1. Theoretische Grundlagen	21
2. Das menschliche Ortholog von OAT1: hOAT1	28
3. In-vitro-Expression von hOAT1	28
a) <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	29
b) HeLa-Zellen	34
4. „Kidney-specific“ Organischer-Anionen-Transporter 2 (OAT-K2).....	37
5. In-vitro-Expression von OAT-K2.....	37
a) <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	37
b) MDCK-Zellen.....	38
6. Opossum-Kidney-Zellen (OK-Zellen).....	43
7. Handhabung von DMPS	44
8. Messung freier Thiol-Gruppen	45
9. Statistik	47
III. ERGEBNISSE.....	48
1. hOAT1 in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	48
a) Charakterisierung von hOAT1 in Oozyten.....	48

b)	Einfluss von reduziertem und oxidiertem DMPS auf den [³ H]PAH-Transport in Oozyten.....	53
c)	Einfluß von Albumin auf die Inhibition des PAH-Transportes durch reduziertem und oxidiertes DMPS.....	56
d)	Einfluss des Hg-DMPS-Chelats auf den PAH-Transport.....	58
2.	hOAT1 in HeLa-Zellen.....	61
a)	Charakterisierung von hOAT1 in HeLa-Zellen	61
b)	Verhalten von intrazellulärem PAH ohne Transstimulation.....	64
c)	Transstimulation des PAH-Effluxes durch PAH, reduziertem und oxidiertes DMPS	66
3.	OAT-K2 in Xenopus laevis Oozyten.....	68
4.	OAT-K2 in MDCK-Zellen	69
5.	Transepithelialer Transport von DMPS an OK-Zellen.....	70
6.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	72
IV. DISKUSSION.....		74
1.	Expression von hOAT1 in Oozyten und HeLa-Zellen: Methode und Charakterisierung.....	74
2.	Interaktion von reduziertem und oxidiertem DMPS mit hOAT1	77
3.	Einfluss von Albumin auf den Transport von DMPS durch hOAT1.....	81
4.	Interaktion des Hg-DMPS-Chelats mit hOAT1.....	84
5.	Expression von OAT-K2 in Oozyten und MDCK-Zellen	85
6.	Untersuchung des transzellulären Transports von DMPS an OK-Zellen.....	86
7.	Synopsis	87
V. ZUSAMMENFASSUNG.....		91
VI. LITERATUR.....		95

I. Einleitung

1. Transport organischer Anionen

Die Niere spielt neben anderen exkretorischen Organen, wie z.B. der Leber, eine zentrale Rolle bei der Elimination organischer Anionen. Dazu zählt eine große Vielfalt endogener und exogener chemischer Verbindungen einschließlich zahlreicher Medikamente (z.B. Antibiotika, Chemotherapeutika, Diuretika, NSAR, Röntgenkontrastmittel), deren Metaboliten (v.a. Konjugationsprodukte mit Glutathion, Glukuronsäure, Glycin, Sulfat) sowie Toxine (z.B. Mykotoxine, Herbizide, u.a.) und deren Metaboliten (1). Um diese Vielzahl an organischen Verbindungen mit unterschiedlichsten chemischen Strukturen aus dem Körper auszuschleiden, verfügt die Niere über verschiedene Transportsysteme, die in der Zellmembran der Epithelzellen der proximalen Tubuli lokalisiert sind. Die meisten der heute bekannten Transporter sind durch eine bemerkenswert breite Substratspezifität charakterisiert. Überlappungen der Substratspezifitäten der verschiedenen Systeme tragen zu der bemerkenswerten Effektivität der Ausscheidung unterschiedlichster Verbindungen über die Niere bei.

Die Geschichte der Erforschung der tubulären Sekretion organischer Anionen reicht bis in das späte 19. Jahrhundert zurück: Heidenhain (2) zeigte bereits 1874 an Kaninchen, dass das Anion Indigokarmin trotz stark reduzierter glomerulärer Filtration sowohl in den Zellen als auch im Lumen des proximalen Tubulus akkumulierte. Er schloss daraus korrekt, dass organische Anionen im proximalen Tubulus der Niere sezerniert werden und dass es sich dabei um zwei getrennte Vorgänge, nämlich an der basolateralen und der luminalen Membran der Tubuluszellen, handeln muss. Da man sich diese Transportvorgänge zur damaligen Zeit aber nicht erklären konnte und zudem eine rein mechanistische Vorstellung bezüglich der Urinproduktion vorherrschte, wurde dieser wichtigen Entdeckung lange keine große Bedeutung zugemessen. Erst in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts setzte sich – basierend auf den Arbeiten von Rowntree und Geraghty (3) sowie Marshall und Vickers (4) – die Vorstellung durch, dass die tubuläre Sekretion einen wichtigen Prozess in der Entstehung des Urins darstellt. Shannon (5, 6) beschrieb

in den 30er Jahren erstmals die Sättigbarkeit dieses tubulären Sekretionsprozesses und wandte zur Analyse dieses katalytischen Vorganges die Michaelis-Menten-Gleichung an. Aufbauend auf der Erkenntnis, dass das organische Anion PAH bei einer Nierenpassage des Blutes beinahe vollständig eliminiert wird, prägten Smith et al. (7) im selben Zeitraum den Begriff des „effektiven renalen Plasmaflusses“. So konnte die Nierendurchblutung erstmals anhand der Berechnung der PAH-Clearance auf relativ einfache Art und Weise ausreichend genau beurteilt werden.

Schon bei den Untersuchungen durch Smith (8, 9) zeigte sich, dass ein Substrat die Sekretion eines anderen Substrates inhibieren konnte. Daraus schloss man zunächst auf ein einziges System, welches alle Anionen transportiert (10). Erst durch die Arbeiten von Ullrich et al. (11, 12) an perfundierten Tubuli ergab sich Ende der 80er Jahre, dass es sich um verschiedene Transportsysteme handeln müsse, die die unterschiedlichen Moleküle sezernieren.

2. Der Organische Anionen-Transporter 1 (OAT1) und die OAT-Familie

Ullrich et al. (12) konnten durch diese Arbeiten erstmals den Mechanismus des „klassischen Organische-Anionen-Transportsystems“, d.h. des PAH-Transports über die basolaterale Membran der Tubuluszellen, erklären: da das Zellinnere gegenüber dem Interstitium negativ geladen ist, benötigt der Transport negativ geladener Verbindungen – wie organischer Anionen – in das Zellinnere gegen den elektrischen Gradienten Energie. Dafür wird in diesem tertiär aktiven Transportprozess zunächst unter ATP-Verbrauch ein einwärts gerichteter Na^+ -Gradient durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase geschaffen. Angetrieben durch diesen Na^+ -Gradienten wird α -Ketoglutarat (α -KG) durch den Na^+ /Dicarboxylat-Kotransporter in der Zelle angereichert, wodurch zusammen mit dem im intrazellulären Stoffwechsel entstandenen α -Ketoglutarat ein auswärts gerichteter Gradient für das Dicarboxylat α -Ketoglutarat entsteht. Dieser Gradient wiederum unterhält den Dicarboxylat/Organische-Anionen-Austauscher, welcher verschiedene organische

Anionen (OA), im besonderen PAH, in die Tubuluszelle transportieren kann. Durch diese Verkettung verschiedener Prozesse wird letztlich die Energie aus dem Zellstoffwechsel, umgesetzt in Konzentrationsgradienten verschiedener Moleküle, zum Transport organischer Anionen sowohl gegen den elektrischen als auch gegen den chemischen Gradienten verwendet (13-16).

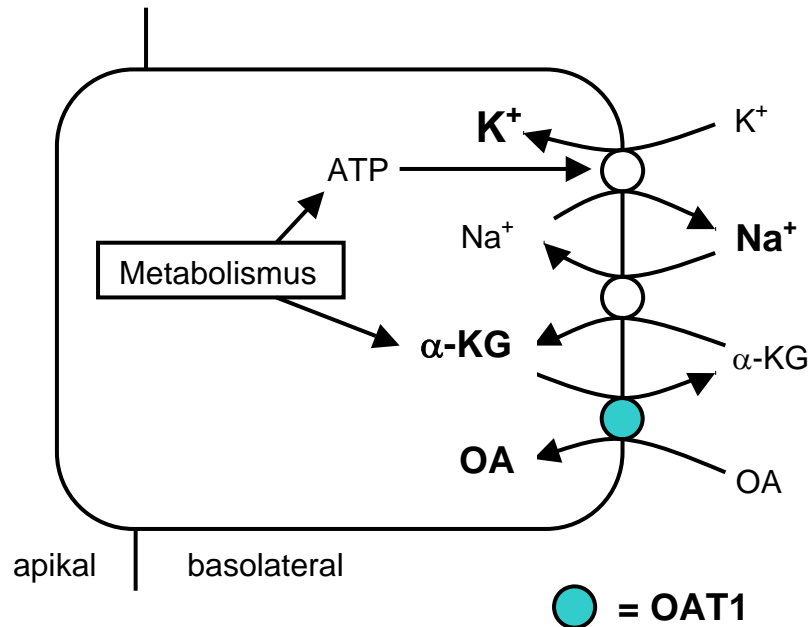


Abb. 1: Modell des klassischen Organische-Anionen-Austauschers (OAT) der basolateralen Membran der proximalen Tubulusepithelzelle der Niere.

Neben dem Na⁺/Dicarboxylat-Kotransporter (17-19) wurde 1997 der Dicarboxylat/Organische-Anionen-Austauscher gleichzeitig und unabhängig durch zwei Forschungsgruppen (20, 21) aus der Rattenniere kloniert und ROAT1 (20) („R“ = renal) bzw. OAT1 (21) benannt. Wie durch das oben beschriebene Modell vorausgesagt, konnte der PAH-Transport durch den Dicarboxylat/Organische-Anionen-Austauscher dosisabhängig durch die Dicarboxylate Glutarat und α-Ketoglutarat sowohl cis-inhibiert als auch trans-stimuliert werden (20).

OAT1

Die Isolation von ROAT1 bzw. OAT1 – aus systematischen Gründen wird ROAT1/OAT1 heute vielfach als rOAT1 bezeichnet, wobei „r“ für die Spezies Ratte gebraucht wird – legte den Grundstein für die Klonierung einer Reihe von OAT1-Orthologen anderer Spezies: Winterflunder (fOAT1(22)), Mensch (hOAT1(23-27)), Kaninchen (rbOAT1; Bahn et al. (2000), unpubliziert; Genbank-Nr. AJ242871). Das ursprünglich als erstes Mitglied dieser Gruppe klonierte Maus-Ortholog wurde zunächst als NKT bezeichnet und erst später aufgrund der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit rOAT1 (96%) und hOAT1 (91%) in mOAT1 umbenannt ((28); alternativ: NKT). Lediglich fOAT1 ist mit nur 57-58% Übereinstimmung mit rOAT1, mOAT1 und hOAT1 entfernter verwandt (29). Alle Orthologe – mit Ausnahme von fOAT1, für welches keine Daten vorliegen – werden überwiegend in der Niere, auf niedrigerem Niveau auch im Gehirn und anderen Organen, exprimiert. Ein wesentliches Merkmal von OAT1 ist die bereits erwähnte, extrem breite Substratspezifität – daher bezeichnet man OAT1 auch als „polyspezifischen“ Transporter. Eine Auswahl ist in Tabelle 1 abgebildet:

OAT2/OAT3/OAT4

Bereits 1994 wurde von Simonson et al. (30) ein Transportprotein aus der Rattenleber kloniert und mit NLT (novel liver-specific transport protein) benannt. Ein Vergleich mit den später entdeckten OATs ergab sowohl Übereinstimmungen der Proteinstruktur (12 Transmembrandomänen) als auch der Aminosäuresequenz (42% Identität mit rOAT1). Die von Sekine et al. (31) 1998 durchgeführten Transportstudien zeigten, dass NLT eine ähnliche Substratspezifität wie rOAT1 besitzt, wenn auch mit anderen Schwerpunkten (geringe Affinität zu PAH, höhere Affinität zu Salicylaten). Darüber hinaus wird NLT auch in der Niere exprimiert – wenn auch auf wesentlich niedrigerem Niveau als in der Leber. Diese Erkenntnisse führten letztlich zur Umbenennung von NLT in rOAT2. rOAT2 stellt damit das zweite Mitglied der OAT-Familie dar.

Endogene Verbindungen		Nichtsteroidale Antirheumatika	
cAMP	(+)	Acetylsalicylat	428
cGMP	+	Diclofenac	+
Prostaglandin E ₂	+	Ibuprofen	3.5
Taurocholat	-	Indomethacin	10
Medikamente		Naproxen	2
Antibiotika, Chemotherapeutika		Paracetamol	2,099
Benzylpenicillin	+	Phenacetin	488
Cephaloridin	+	Salicylat	341
Nalidixat	+	Salicylurat	11
Antiepileptika		Dicarboxylate	
Valproat	+	Glutarat (C5)	+
Diuretika		C -Ketoglutarat (C5)	+
Étacrynsäure	+	Adipat (C6)	+
Furosemid	+	Pimelat (C7)	+
		Suberat (C8)	+

Tab. 1: Cis-Inhibition von rOAT1 in vitro; Zahlenwerte sind K_i-Werte (in µM); +, starke Inhibition (>50%); (+), schwache Inhibition (>20%, <50%); -, keine Inhibition; aus Burckhardt and Wolff (29).

1998 wurde von Kusuhara et al. (32) aus dem Rattenhirn ein weiterer multispezifischer Transporter für organische Anionen isoliert, der daneben auch in der Niere lokalisiert ist. Aufgrund der relativ hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz (49% zu rOAT1 und 39% zu rOAT2) sowie der Affinität zu verschiedenen organischen Anionen – wenn auch mit wiederum anderer Substratspezifität als rOAT1 und rOAT2 (geringe Affinität zu PAH, höhere Affinität zu Benzylpenicillin) – wurde der Transporter rOAT3 benannt. Im Gegensatz zu rOAT1 und rOAT2, die v.a. in Niere und Leber, d.h. in exkretorischen Organen exprimiert sind, scheint die Aufgabe von rOAT3 im Transport organischer Anionen durch die Blut-Hirn- sowie die Blut-Liquor-Schranke zu liegen (32). Kürzlich

wurde von Race et al. (25) aus der menschlichen Niere hOAT3 kloniert, dessen Aminosäuresequenz zu 84% mit der von rOAT3 identisch ist. Da hOAT3 allerdings keine Affinität zu PAH, dem klassischen Substrat der OAT-Familie, zeigt, wird es nicht als menschliches Ortholog von rOAT3 angesehen (1, 25).

Das bislang letzte Mitglied der OAT-Familie, hOAT4, wurde 1999 von Cha et al. (33) aus der menschlichen Plazenta isoliert. Es vermittelt den Transport organischer Anionen durch die Blut-Plazenta-Schranke – wie auch die anderen OATs hat es damit seinen Sitz in einem gewebsspezifischen Schrankensystem. Neben der Plazenta fand sich die Niere als weitere Lokalisation. hOAT4 zeigt 38-44% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zu hOAT1, rOAT1, rOAT2 und rOAT3. Die Substratspezifität von hOAT4 unterscheidet sich deutlich von der anderer OATs: während die Steroide Estronsulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA) effizient transportiert wurden, hatten PAH, Glutarat (beides OAT1-typische Substrate), Salicylat (OAT2-typisch), Penizillin G (OAT3-typisch) keine oder nur sehr niedrige Affinität zu hOAT4 (33).

Bisher wurde weder die genaue Verteilung von OAT2, OAT3 und OAT4 im Tubulussystem der Niere noch die Lokalisation der Proteine zur apikalen bzw. basolateralen Membran der Tubulusepithelzellen untersucht. Zudem scheint der Transport organischer Anionen im Gegensatz zum tertiär aktiv arbeitenden OAT1 unabhängig von der Konzentration von Natrium und Glutarat zu sein (31-34). Im Falle von OAT2 handelt es sich daher vermutlich um einen passiven Transporter, der nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion in Richtung des Konzentrationsgradienten des Substrats arbeitet. Allerdings sind genauere Aussagen über den Funktionsmechanismus aufgrund des Fehlens wesentlicher Daten zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich (1, 33).

Aus diesem kurzen Überblick wird deutlich, dass die OAT-Familie zurecht als „multispezifisches Transportsystem für organische Anionen“ bezeichnet wird: die Substratspezifitäten der einzelnen OATs sind nicht nur für sich gesehen relativ breit, sondern auch unterschiedlich und überlappen sich gegenseitig. Dies gewährleistet die

extreme Breite des Spektrums an insgesamt sezernierten Verbindungen. Darüber hinaus soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass neben der beschriebenen OAT-Familie weitere Gruppen Organischer-Anionen-Transporter beschrieben wurden: Organic Anion Transport Polypeptides Oatp 1-3, kidney-specific Organic Anion Transporters OAT-K1 und OAT-K2, Multidrug Resistance Protein MRP1-5, Concentrative Nucleoside Transporters CNT1 und CNT2, Peptide-Transporters PEPT1 und PEPT2 (1). Auf eine genauere Einteilung und Beschreibung dieser Systeme wird im Hinblick auf den Kern und die Übersichtlichkeit der Arbeit verzichtet; lediglich OAT-K2 soll im Abschnitt I.5 genauer erläutert werden.

Die medizinische Relevanz dieser Transportproteine wurde bereits im ersten Absatz angesprochen: zahlreiche Medikamente, Toxine sowie deren beider Metaboliten werden über die angesprochenen Systeme transportiert (1). Die Bedeutung dieses Vorgangs liegt also überwiegend in der Elimination dieser teilweise gefährlichen Verbindungen aus dem Körper. Darüber hinaus existieren in-vivo-Untersuchungen an Tieren (Ratten (35), Hühner (36)), die darauf hinweisen, dass der klassische Transportmechanismus für organische Anionen eine wichtige Rolle im Wirkmechanismus des Quecksilberantidots DMPS (2,3-Dimercapto-1-Propansulfonsäure) spielt – und zwar nicht durch einfache transepitheliale Ausscheidung dieser Substanz über OAT und einen apikalen Transporter in den Urin, sondern durch den Transport des Antidots durch OAT an den Ort der Vergiftung, nämlich in die Tubuluszelle der Niere. Allerdings gründet diese These lediglich auf den Ergebnissen der angesprochenen in-vivo-Studien sowie auf Experimenten an isolierten, perfundierten Kaninchen-Tubuli (37), die es bei der Vielzahl an bisher bekannten und noch unbekanntem Transportsystemen in der basolateralen Membran nicht ermöglichen, eine sichere Aussage über einen einzelnen Transporter, nämlich OAT1, zu treffen.

3. Intoxikationen mit anorganischem Quecksilber und Therapie mit 2,3-Dimercapto-1-Propansulfonsäure (DMPS)

Quecksilber ist ein Element, das in verschiedenen Formen auftreten kann: als elementares bzw. metallisches Quecksilber, welches bei Raumtemperatur flüssig ist und aufgrund des hohen Dampfdruckes an die Umwelt abgegeben wird; in anorganischer Form als Kation im Oxidationsstadium +1 (mercurous) oder +2 (mercuric), meist als Quecksilbersulfid und -chlorid; sowie als organische Verbindung, meist als Methylquecksilber, welches aus anorganischen Quecksilberverbindungen durch Mikroorganismen in Erdboden und Wasser entsteht (38, 39). Aufgrund der vielfältigen Verwendung kommen zahlreiche Menschen regelmäßig mit niedrigen Dosen von Quecksilber in Kontakt. Ein Beispiel ist der Quecksilberdampf, der aus Amalgamfüllungen (Amalgam besteht zu 50% aus elementarem Hg) freigesetzt wird (40). Von größerer Bedeutung ist allerdings der Kontakt mit größeren Mengen Quecksilber, der bei Arbeiten in Industrieanlagen, bei Verschmutzung der Umgebung solcher Anlagen oder in der Umgebung von Sondermülldeponien stattfinden kann. Auch Verbrennungsanlagen, die fossile Brennstoffe mit oftmals hohem Quecksilbergehalt verwenden, kommen als Verursacher in Frage. Nicht zu vergessen sind kriminelle Umweltsdelikte, die z.B. zur Anreicherung von Methylquecksilber in Fischen geführt haben (39), sowie die Verwendung von Quecksilber(II)-chlorid (HgCl_2 , Sublimat), einem starken Ätzgift, als Suizidmittel (41).

Die verschiedenen Quecksilberformen können in beinahe jedem Organ des menschlichen Körpers Schäden verursachen – abhängig von der chemischen Form sowie der Art und Weise der Exposition. Obwohl alle Quecksilberformen nephrotoxisch sind, hat sich die Niere als besonders empfindlich gegenüber anorganischem (+1 und +2) Quecksilber erwiesen (39): die Niere, genauer die proximale Tubulusepithelzelle, stellt das wichtigste Zielorgan für die Akkumulation von anorganischem Quecksilber dar (42). Versuche an Ratten ergaben, dass bereits wenige Stunden nach Injektion einer geringen Menge anorganischen Quecksilbers (Quecksilberchlorid) 50% dieser Dosis in den Nieren akkumuliert war (43, 44). Durch verschiedene Untersuchungen (histochemisch (45), autometallographisch (46), tubuläre Mikrodissektion (47)) wurden die proximale Tubuli

(Pars convoluta et recta) als Ort der Quecksilber-Anreicherung identifiziert. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, auf welchem Weg das Quecksilber in die Tubulusepithelzellen gelangt. Zwei Möglichkeiten werden dabei favorisiert:

- 1) Da anorganisches Quecksilber eine nachgewiesene hohe Affinität zu SH-Gruppen besitzt, wird ein Großteil in der Blutbahn an niedermolekulare endogene Thiole (v.a. Glutathion und Cystein, die in ausreichender Menge im Plasma vorhanden sind (48)) gebunden (42, 43). Ein möglicher Weg für die entstandenen Quecksilberkonjugate in die Tubuluszellen stellt das Transportsystem für organische Anionen in der basolateralen Membran dieser Zellen dar (43, 48-51).
- 2) Daneben gibt es zahlreiche Hinweise, dass das glomerulär filtrierte Quecksilberkonjugat an der apikalen Membran der Tubuluszelle nach Spaltung von Glutathion durch die luminal lokalisierte γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) über verschiedene Transportsysteme (Dipeptid-Transporter; Aminosäuretransporter nach weiterer Spaltung durch eine luminale Dipeptidase) aufgenommen werden kann (42, 51-61).

Die gemeinsame Bedeutung dieser beiden Wege zeigten Untersuchungen durch Zalups (56): gleichzeitige Inhibition von OAT (durch PAH) und der γ -Glutamyltranspeptidase (durch Acivicin) reduzierte die Quecksilberaufnahme in die Niere bzw. die Tubulusepithelzellen um 90%.

In der Tubuluszelle verteilt sich das anorganische Quecksilber auf alle Zellorganellen, wobei der größte Teil in Zellkern und Zytosol zu finden ist (62, 63). Die bereits erwähnte hohe Affinität der Quecksilberkationen zu Thiol-Gruppen macht fast alle Proteine der Zelle zu potentiellen Reaktionspartnern (64): Enzyme werden durch diese Bindung im allgemeinen inaktiviert wodurch der Zellstoffwechsel stark beeinträchtigt wird (65-67). Dies führt letztlich zum Zelluntergang. Klinische Folgen sind neben dem akuten Nierenversagen Kreislaufversagen, Schock und schließlich der Tod (38). Die LD_{50} (Mensch) für anorganisches Quecksilber beträgt $10-42 \text{ mg kg}^{-1}$ (68).

Die angesprochenen Störungen durch die intrazelluläre Akkumulation und Bindung von Quecksilber sind im einzelnen sehr komplex und bislang nicht in ihrer Gesamtheit erfasst. Neben der erwähnten Enzyminaktivierung spielt der Verbrauch intrazellulärer Thiole (v.a. GSH) durch die Bindung an Quecksilber eine weitere ursächliche Rolle. Der niedrige intrazelluläre Thiolgehalt macht die Zellen anfälliger für oxidativen Stress (69). Darüber hinaus wird auch der Gehalt an anderen Antioxidantien wie Vitamin E und C durch Quecksilber erniedrigt und die Aktivität zahlreicher antioxidativer Enzyme, wie z.B. Katalase, GSH-Peroxidase, GSSG-Reduktase und Superoxiddismutase, deutlich erniedrigt (70). Des Weiteren sind negative Effekte auf die Mitochondrienfunktion, Permeabilitätsänderungen der Zellmembran, Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und die Inaktivierung der Na^+ - K^+ -ATPase bekannt. Für eine ausführlichere Darstellung dieser Mechanismen wird an dieser Stelle auf Referenz (39) verwiesen.

Das Antidot DMPS (2,3-Dimercapto-1-Propansulfonsäure) ist heutzutage Mittel der Wahl für die Behandlung von Vergiftungen mit anorganischem Quecksilber. Vor der Verfügbarkeit von DMPS wurden Quecksilbervergiftungen mit BAL (BritishAntilewisite; 2,3-Dimercapto-1-Propanol), D-Penicillamin und N-Acetyl-DL-Penicillamin behandelt. Allerdings hatten diese Wirkstoffen zahlreiche Nachteile: BAL, das traditionelle Quecksilber-Antidot in den USA über viele Jahre, ist wasserunlöslich und konnte daher nur durch tiefe intramuskuläre Injektion verabreicht werden. Zudem litten ca. 50% der Patienten an einer der zahlreichen Nebenwirkungen (Hypertonus, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Parästhesien, u.a) (71, 72). Penicillamin ist zwar wasserlöslich und kann oral verabreicht werden, ist allerdings weit weniger wirksam als BAL. Daneben ist auch Penicillamin mit schweren Nebenwirkungen wie dem nephrotischen Syndrom, aplastischer Anämie, Leukopenie und allergischen Reaktionen bei vorliegender Penicillin-Allergie assoziiert (73, 74). Diese Nachteile führten zur Entwicklung der wasserlöslichen Analoga von BAL, nämlich DMPS und DMSA (Meso-2,3-Dimercaptosuccinylsäure) (75-79). DMPS hat sich gegenüber dem früher verwendeten BAL aus mehreren Gründen als überlegen erwiesen (80): in klinischen Tests bezüglich der Quecksilbervergiftung zeigt DMPS die größere Wirksamkeit (81),

kann oral angewendet werden (80) und ist zudem weitaus weniger toxisch als sein Vorgänger BAL (82). Alle diese Vorteile machen DMPS heute zum Mittel der Wahl bei der Behandlung von Vergiftungen mit anorganischem Quecksilber. Darüber hinaus stellen auch Vergiftungen mit organischem und metallischem Quecksilber sowie Blei-Intoxikationen Indikationen für den Einsatz von DMPS dar (83). Im Falle akuter Vergiftungen wird die parenterale Therapie mit DMPS empfohlen (zusätzlich zu Magenspülung, Hämodialyse, Peritonealdialyse, Hämofiltration, Hämo-perfusion, Plasmaaustausch, forcierter Diurese (84-86)), bei chronischer Quecksilbervergiftung wird die orale Einnahme bevorzugt, weil diese bei der meist nötigen Langzeittherapie einfacher durchzuführen ist (65).

4. DMPS: Chemie, Toxikologie, Pharmakokinetik

Chemie:

(R,S)-2,3-**D**imercapto-1-**P**ropansulfonsäure (DMPS, Natriumsalz) ist ein weißes, kristallines Pulver (65). Die Synthese von DMPS wurde erstmals 1955 von Johary et al. (87) beschrieben. Bei der Herstellung entsteht wegen des asymmetrisch substituierten Kohlenstoffatoms C-2 ein Razemat aus (+)-DMPS ($[\alpha]^{20} = + 2,5^{\circ}$) und (-)-DMPS ($[\alpha]^{20} = - 2,5^{\circ}$) (65). Da sich die beiden Isomere bezüglich Absorption, Toxizität und Wirksamkeit nicht unterscheiden, kann auf eine aufwendige Trennung verzichtet werden (65, 84, 88). Die polare Sulfonsäure-Gruppe an C-1 ist für die gute Wasserlöslichkeit von DMPS (65, 89, 90) und damit auch für einige der pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanz verantwortlich (65, 91): DMPS ist frei löslich in Wasser (350 mg/ml, (92, 93)), weniger gut in Methanol und unlöslich in unpolaren Lösungsmitteln wie Ether (65, 92). Die beiden Sulfhydryl-Gruppen sind nicht nur für die hohe Affinität zu Schwermetallionen verantwortlich, sondern erklären insbesondere die rasche Oxidation, der die Verbindung unterliegt (94). Siehe dazu Abschnitt I.4: Pharmakokinetik.

Formel: $C_3H_7NaO_3S_3$

Molekulargewicht: 210,27 g/mol

inkl. 1 Molekül H_2O (Kristallisation): 228,28 g/mol

Schmelzpunkt: 235 °C

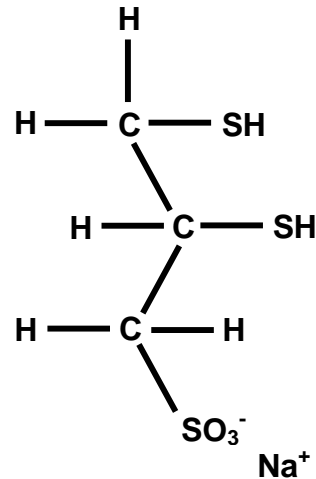


Abb. 2: 2,3-Dimercapto-1-Propansulfonsäure

Toxikologie:

Im Tierversuch (Hund, Katze, Kaninchen, Ratte) zeigte sich sowohl die akute (einmalige Verabreichung) als auch die chronische Toxizität (wiederholte Anwendung) von DMPS als sehr gering:

LD₅₀ akut (Maus, i.m.) = 1710 mg/kg KG

LD₅₀ chronisch/kumulativ (Maus, i.m.) = 4218 mg/kg KG

Allerdings erwiesen sich Tiere, die an Schwermetallvergiftungen litten, als empfindlicher gegenüber hohen DMPS-Dosen als gesunde Tiere (95).

Therapeutische Dosen (5 mg/kg KG) hatten auf Niere, Leber, kardiovaskuläres System, Blut, Gastrointestinaltrakt, Milz und Thymus keine negativen Auswirkungen (65). Weiterhin hatte DMPS im Tierversuch weder mutagene (79) noch teratogene (96) Wirkung.

Pharmakokinetik:

Nach oraler Gabe wird DMPS rasch aus dem Magen-Darm-Trakt durch Diffusion absorbiert (97, 98). Im Tierversuch wurden 30-60% des verabreichten DMPS absorbiert (75). Die höchste Plasmakonzentration wurde beim Menschen nach 3.7 Stunden festgestellt. DMPS wird schnell und überwiegend in oxidierte Form über die Nieren in den Urin ausgeschieden (97, 99): die Eliminationshalbwertszeit beträgt beim Menschen nach intravenöser Zufuhr daher nur rund eine Stunde (79).

Untersuchungen von Maiorino et al. (100) an menschlichen Probanden ergaben, dass bereits nach 30 Minuten 80% des applizierten (injizierten) DMPS in oxidierte Form im Blutplasma vorliegt und nach 12 Stunden kein ursprüngliches, d.h. reduziertes DMPS mehr nachweisbar ist. Wie oben bereits erwähnt, basiert die rasche Oxidation auf der Anwesenheit der beiden Sulfhydrylgruppen: diese gehen in einem oxidativen Vorgang eine Bindung in Form sehr stabiler Disulfidbrücken mit einer anderen Sulfhydrylgruppe ein. Die entstehenden Reaktionsprodukte werden als Disulfide bezeichnet, wobei überwiegend reine DMPS-Disulfide entstehen und gemischte Formen mit Glutathion oder Cystein nur in geringem Ausmaß nachgewiesen werden (101, 102).

Nach Trennung der verschiedenen Formen durch eine hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (high-performance liquid chromatography, HPLC) und anschließende Analyse im Massenspektrometer konnte die Art der reinen DMPS-Disulfide genauer identifiziert werden (82): es handelt sich überwiegend um Dimere (siehe Abb. 3), wobei der Anteil der cyclischen Dimere mit der Zeit zu- und der Anteil der acyclischen Dimere mit die Zeit abnimmt. Daneben entstehen zu geringerem Anteil auch cyclische und acyclische Trimere und größere Polymere, welche ebenfalls mit der Zeit seltener werden, was für einen Zerfall dieser höhermolekularen Formen zu stabileren Di- und Trimeren spricht (unveröffentlichte Daten aus unserem Labor; (103)).

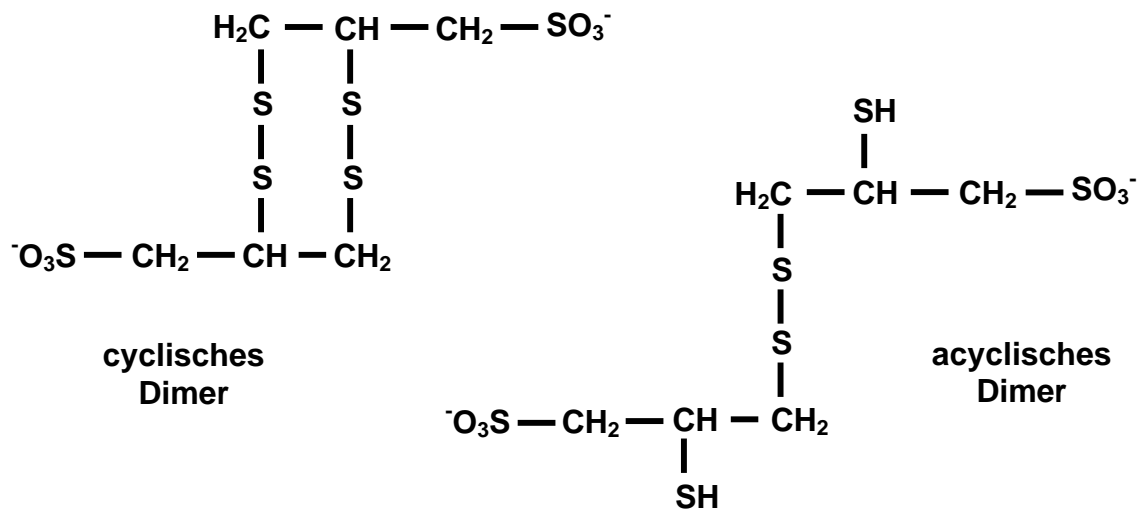


Abb. 3: Oxidationsprodukte von DMPS: das cyclische und acyclische Dimer.

5. Postulierter Wirkmechanismus von DMPS

„An antidot is a therapeutic substance which is used in order to counteract the toxic actions of certain xenobiotics”

WHO (65, 79)

Neben zahlreichen anderen Voraussetzungen, die ein gutes Antidot für Schwermetallvergiftungen erfüllen muss, sind drei Eigenschaften für eine hohe Effektivität des Antidots besonders wichtig:

- 1) sehr stabile Bindung des Schwermetalls
- 2) hohe Konzentration des Antidots am Ort der Vergiftung
- 3) effektive Elimination des gebundenen Schwermetalls aus dem Organismus

Die erste Bedingung ist aufgrund der dargestellten chemischen Struktur von DMPS in idealer Art und Weise erfüllt: durch die beiden benachbarten Sulphydryl-Gruppen hat DMPS sehr hohe Affinität zu Schwermetallen wie Quecksilber und bindet diese in äußerst stabilen Ringkomplexen.

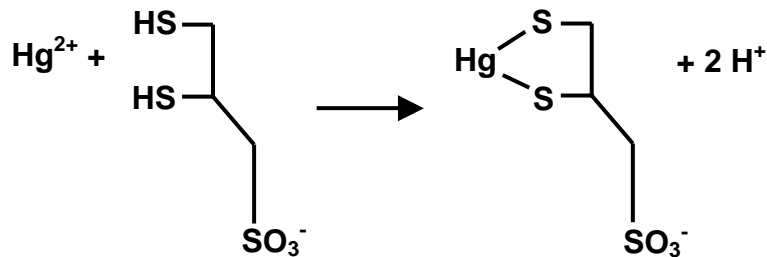


Abb. 4: Bildung des cyclischen Chelats aus DMPS und anorganischem Quecksilber (Hg^{2+}).

Diese wasserlöslichen Ringkomplexe werden als „Chelate“ bezeichnet (90, 104, 105), DMPS zählt damit zu den „Schwermetall-Chelatoren“ (106). [„Chelat“ ist vom griechischen Ausdruck für „Hummer“ abgeleitet: Chelatbildner „greifen“ die Schwermetallionen wie die beiden Zangen des Hummers. (79, 104, 107-109)] Quecksilber wird von allen Schwermetallen am besten gebunden (65); die hohe Festigkeit dieser Bindung mit Quecksilberionen (Hg^{2+}) wird durch die hohe Stabilitätskonstante verdeutlicht, deren Wert je nach Quelle zwischen 10^{26} und 10^{42} variiert (110-112). Im Gegensatz dazu sind die Bindungen zwischen Quecksilber und Monothiolen (GSH, Cystein, u.a.) wesentlich schwächer. Daher kann DMPS als Dithiol Quecksilber wesentlich effektiver aus der Bindung mit anderen Molekülen, v.a. Proteinen und Enzymen, lösen als Monothiole (113). Das erklärt, warum DMPS durch die hohe Affinität zu und stabile Bindung des Quecksilbers die SH-Gruppen von Proteinen und Enzymen vor einer Quecksilberbindung bewahren bzw. durch Entfernung des Quecksilbers von Proteinen/Enzymen deren Funktion wieder herstellen kann (90, 114).

Die zweite Voraussetzung – nämlich der effektive Zugang des Antidots DMPS zu den quecksilberspeichernden Kompartimenten, d.h. den Epithelzellen des proximalen Tubulus – wurde grundsätzlich bereits in Abschnitt I.2 angesprochen. Bei den an dieser Stelle erwähnten Tierversuchen handelt es sich um in-vivo-Studien an Hühnern (36) und Ratten (35). Dabei zeigte sich, dass die DMPS-Ausscheidung mit dem Urin durch PAH und Probenecid inhibiert wurde. Darüber hinaus zeigten Zalups et al. (37) an isolierten, perfundierten proximalen Kaninchentubuli, dass die Entfernung bereits akkumulierten Quecksilbers mittels DMPS durch die gleichzeitige Gabe von PAH blockiert werden konnte. Da es sich bei PAH um ein typisches Substrat des „klassischen Organische-Anionen-Transportsystems“ bzw. des 1997 klonierten, tertiär aktiven Anionenaustauschers OAT1 (20, 21) handelt, ergab sich rasch die Annahme, dass DMPS selbst auch ein Substrat dieses Systems ist und über OAT1 Zugang zur Tubuluszelle erhält. Dies würde sowohl die hohe Effektivität von DMPS als Quecksilberantidot als auch die kurze Eliminationshalbwertszeit der Substanz von nur einer Stunde nach intravenöser Zufuhr erklären. Wie bereits im Abschnitt I.2 erwähnt, wurde die direkte Interaktion von DMPS und seiner Metaboliten mit OAT1 bisher aber nicht untersucht.

Die dritte Bedingung, nämlich die rasche und effektive Elimination des Antidot-gebundenen Schwermetalls aus dem Körper, scheint ebenfalls erfüllt: zahlreiche Untersuchungen an Ratten und Kaninchen zeigten, dass unmittelbar nach Anwendung von DMPS nicht nur die Quecksilberbelastung der Niere stark zurückging, sondern gleichzeitig die Quecksilberausscheidung im Urin rapide anstieg (37, 42, 115, 116). Jedoch ist auch der Mechanismus der Ausscheidung des intrazellulär gebildeten DMPS-Hg-Chelats aus der Tubuluszelle in den Urin und damit aus dem Organismus unbekannt. Grundsätzlich sind dafür zwei potentielle Wege denkbar:

- 1) Basolateraler Transport des Chelats aus der Tubuluszelle zurück in die Blutbahn und anschließende Ausscheidung in den Urin durch glomeruläre Filtration
- 2) direkte apikale Sekretion des Chelats aus der Tubuluszelle in das Tubuluslumen

Trotz der sehr breiten Substratspezifität von OAT1 erscheint die erstgenannte Möglichkeit aufgrund der Untersuchungen von Zalups et al. (37) an isolierten, perfundierten Kaninchentubuli eher unwahrscheinlich: dabei konnte keine Interaktion des Chelats mit OAT1 nachgewiesen werden.

Die zweite Variante – die direkte Sekretion des Chelats aus der Tubuluszelle in das Tubuluslumen – wird aufgrund der Klonierung zahlreicher Transportproteine, die in der Bürstensaummembran der Tubulusepithelzellen der Niere lokalisiert sind, favorisiert. Zwei potentielle Kandidaten sollen an dieser Stelle erwähnt werden: MRP2 und OAT-K2.

MRP2

Bei MRP2 handelt es sich um einen ATP-abhängigen, primär aktiven Transporter organischer Anionen, der seine Substrate als „Exportpumpe“ ausschließlich aus der Zelle in den Extrazellulärraum transportiert (117). MRP2 wurde ursprünglich aus Hepatozyten kloniert und aufgrund seiner Lokalisation in der kanalikulären Membran der Hepatozyten auch als cMRP (canalicular MRP, (118)) oder cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter, (119)) bezeichnet. Daneben wird MRP2 auch in der apikalen Membran proximaler Tubuluszellen sowie der luminalen Membran des Dünndarmepithels exprimiert (1). Bisher wurde MRP2 aus Mensch (120), Ratte (121) und Kaninchen (122) kloniert. Bekannt wurde MRP2, ebenso wie MRP1, durch seine Beteiligung an der Resistenzentwicklung maligner Tumoren gegenüber verschiedener Chemotherapeutika (120, 123). Insgesamt ist die Substratspezifität dieser Transport-ATPase äußerst breit und umfasst zahlreiche endogene und exogene (xenobiotische) anionische Verbindungen – zumeist als Konjugate mit Glutathion, Glukuronsäure oder Sulfat (1, 118). Aufgrund dieser Eigenschaften wird MRP2 als wichtiges funktionelles Element in der Entgiftungsfunktion des Organismus angesehen (117). Darüber hinaus kann die Fähigkeit, Konjugate mit Glutathion (welches wie DMPS ein SH-Gruppen-Träger ist) sowie Glutathion-Disulfide zu transportieren, aber auch als wichtiger Hinweis auf eine Beteiligung an der apikalen Sekretion des DMPS-gebundenen Quecksilbers gewertet werden.

Daneben existieren interessante Untersuchungen an der sog. „Eisai Hyperbilirubinämie Ratte“: da diese Ratten-Art kein MRP2 in der kanalikulären Membran der Hepatozyten besitzt, ist die biliäre Ausscheidung von anionischen Konjugaten einschließlich Bilirubin-Glukuronid eingeschränkt, was letztlich zur Hyperbilirubinämie der Tiere führt (118). Daher wird auch injiziertes anorganisches Quecksilber, welches normalerweise als Glutathion-Konjugat über MRP2 in die Galle ausgeschieden wird, nicht mehr sezerniert (124). Interessanterweise erwiesen sich die Nieren dieser mutierten Tiere als besonders empfindlich gegenüber anorganischem Quecksilber (124). Vermutlich konnte das in den Tubuluszellen akkumulierte Quecksilber nicht mehr ausgeschieden werden und führte so bei den MRP2-defizienten Tieren wesentlich rascher zu Vergiftungserscheinungen als in Ratten, die MRP2 besaßen. Zusammenfassend deutet auch dies darauf hin, dass MRP2 an der Ausscheidung des DMPS-Hg-Chelats beteiligt sein könnte.

OAT-K2

OAT-K2 wurde 1998 nach OAT-K1 als zweites Mitglied der „kidney-specific“ organischen Anionentransporter aus der Ratte kloniert und wird ausschließlich in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen der Niere exprimiert (125). Die Aminosäuresequenz ist zu 91% identisch mit OAT-K1 und zu 62-65% mit rOATP1/2/3 (125) – allerdings besteht keinerlei Identität zu OAT1 (13). Anders als OAT-K1 besitzt OAT-K2 eine breite Substratspezifität einschließlich strukturell völlig unterschiedlicher Verbindungen, wie z.B. Taurocholat, Methotrexat und Prostaglandin E₂ (125). Demgegenüber sind nichtsteroidale Antiphlogistika (z.B. Indomethacin), Steroide (z.B. Testosteron, 17 β -Estradiol, Dexamethason), Diuretika (Furosemid) und andere Anionen (Sulfobromophthalein (BSP), PAH, Probenecid) zwar in der Lage, den Transport dieser Substraten zu hemmen, werden selbst aber nicht transportiert (1). Obwohl der exakte Transportmechanismus bisher noch nicht geklärt wurde, wird angenommen, dass OAT-K2 durch „erleichterte Diffusion“ einem Konzentrationsgradienten folgend arbeitet und damit ein passiver Transporter ist (125). Zudem kann der Transport im Gegensatz zu MRP2 in beide Richtungen erfolgen (125). Die breite Substratspezifität und die Lokalisation in der luminalen Membran lassen darauf schließen, dass OAT-K2 ebenfalls an der Ausscheidung und Entgiftung verschiedener endogener und exogener

(xenobiotischer) Anionen in der Niere teilnimmt (125) und damit auch an der luminalen Sekretion des intrazellulär gebildeten DMPS-Hg-Chelats beteiligt sein könnte.

6. Fragestellung

Inhalt dieser Arbeit ist daher die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die DMPS über die basolaterale Membran in die Zelle sowie das intrazellulär gebildete DMPS-Hg-Chelat über die apikale Membran aus der Zelle transportieren und damit wesentlich am Wirkmechanismus des Antidots beteiligt sind.

Basolateral

Im ersten Teil der Arbeit sollte die direkte Interaktion von DMPS mit OAT1 charakterisiert werden, um dadurch die Rolle von OAT1 im Wirkmechanismus des Quecksilber-Antidots DMPS aufzuklären.

Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Art der Interaktion von DMPS mit OAT1 vom Redoxzustand des Antidots (oxidiert, reduziert) abhängt. Dies ist von entscheidender physiologischer Bedeutung, da DMPS zwar in reduzierter Form, d.h. als Monomer, verabreicht wird, später aber in oxidiert Form, d.h. überwiegend als Dimer, am Transporter an der basolateralen Membran vorliegt (siehe Abschnitt I.4).

Apikal

Im zweiten Teil der Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf der Frage, auf welchem Wege das intrazellulär gebildete Hg-DMPS-Chelat die Tubuluszelle verlässt, um über den Urin ausgeschieden zu werden. Daher sollte erstens untersucht werden, ob das Hg-DMPS-Chelat in unserem Testsystem – entgegen anders lautender Ergebnisse (37) – Affinität zu OAT1 besitzt und die Zelle damit basolateral verlassen könnte. Zweitens sollte geklärt werden, ob OAT-K2 eine Rolle bei der Sekretion von DMPS und v.a. dem Hg-DMPS-Chelat spielt.

MRP2 stand als weiterer aussichtsreicher Kandidat für Untersuchungen zu diesem Thema nicht zur Verfügung.

II. Material und Methode

1. Theoretische Grundlagen

Um Antworten auf diese Fragen zu finden, wurde eine Reihe experimenteller Strategien entwickelt, die auf den Prinzipien der Cis-Inhibition und Trans-Stimulation aufbauen.

Beim Transport organischer Anionen durch OAT1 handelt es sich um einen spezifischen und sättigbaren Austauschprozess zwischen intra- und extrazellulären Substraten, der je nach Gradient in beide Richtungen ablaufen kann. „Sättigbar“ bedeutet, dass die Umsatzrate des Transporters begrenzt ist und bei ausreichend hoher Substratkonzentration nicht über ein Transportmaximum hinausgeht. „Spezifisch“ bedeutet, dass nur Verbindungen, die bestimmte chemische Voraussetzungen erfüllen, als Substrate für OAT1 in Frage kommen und transportiert werden. Dieselben Grundlagen gelten für OAT-K2: obwohl es sich bei OAT-K2 nicht um einen Austauscher handelt, sondern um einen passiven Transporter, der nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion arbeitet und durch den Konzentrationsgradienten des zu transportierenden Substrats angetrieben wird, ist auch dieser Prozess spezifisch und sättigbar.

Damit folgen beide Transportprozesse den gleichen Gesetzen wie eine enzymatische Reaktion und die Kinetik des Substrattransportes kann folglich auch durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden. Abbildung 5 verdeutlicht, dass die Transportprozesse sättigbar sind: im asymptotischen Bereich kann die Transportrate, d.h. die Menge an transloziertem Substrat pro Zeiteinheit, auch durch weitere Erhöhung der Substratkonzentration nicht mehr gesteigert werden.

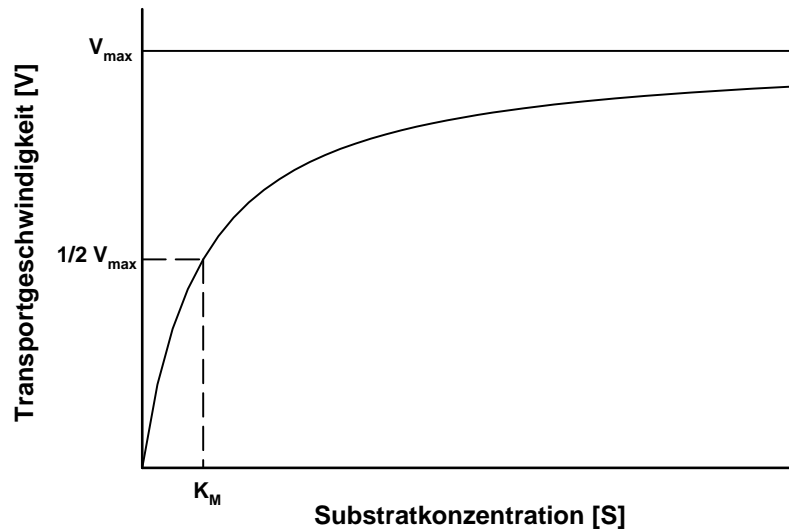


Abb. 5: Grafische Darstellung der Transportkinetik von OAT1 und OAT-K2 nach dem Michaelis-Menten-Modell.

Cis-Inhibition

Da bei Zugabe eines weiteren Substrats die Transportrate der ersten Substanz aufgrund der nun eingetretenen Konkurrenzsituation um die begrenzte Anzahl an Transportern fallen wird, spricht man von „Cis-Inhibition“ des Transportes: beide Substrate liegen auf der gleichen Seite der Membran (lat. cis = diesseits) am Transporter vor und hemmen ihren Transport gegenseitig kompetitiv.

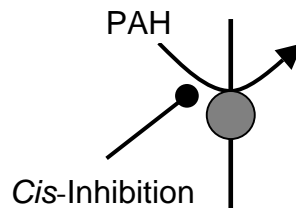


Abb. 6: Modell der Cis-Inhibition: kompetitive Hemmung des PAH-Transports durch Anwesenheit eines zweiten Substrates am Transporter.

Das bedeutet, dass man bei konstanter Konzentration eines Substrates A und steigender Konzentration eines Substrates B eine abnehmende Transportrate von Substrat A beobachtet, die sich graphisch als umgekehrte Michaelis-Menten-Kinetik darstellen lässt.

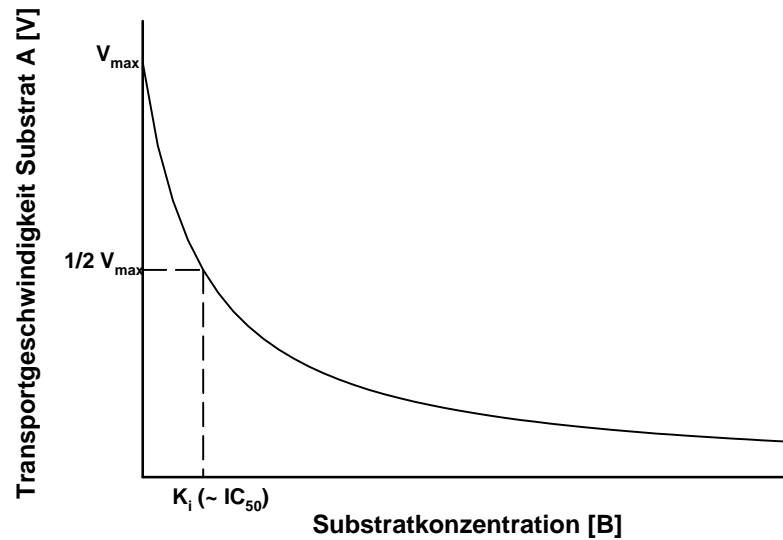


Abb. 7: Umgekehrte Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik: zunehmende kompetitive Hemmung des Transports von Substrat A durch steigende Konzentration von Substrat B.

Handelt es sich bei den Substraten A und B um identische Verbindungen, die sich lediglich durch ein Isotop unterscheiden (z.B. kaltes PAH und heißes, Tritium-markiertes [^3H]PAH), kann auf Basis der Michaelis-Menten-Gleichung der K_m -Wert des Substrates bestimmt werden: bei purer Anwesenheit des radioaktiven Tracers (z.B. [^3H]PAH) hält sich die Transportrate (V_T) des Tracers (T) am Transporter an die Michaelis-Menten-Kinetik: $V_T = (V_{\max} * (T))/(K_m + (T))$. Da sich zugegebenes kaltes Substrat (S) (z.B. PAH) als kompetitiver Inhibitor des Tracer-Transportes verhält, muss der K_m -Wert der Gleichung durch $K'_m = K_m (1 + (S)/K_m)$ ersetzt werden:

$$V_T = (V_{\max} * (T))/(K_m + (T) + (S))$$

Mit Hilfe dieser nichtlinearen Regressionsanalyse kann der K_M -Wert der Substanz durch Variation der Konzentration des kalten Substrates bei konstanter Konzentration des heißen Substrates (= Tracer) einfach ermittelt werden. Da stets ein Teil des Tracers unspezifisch (z.B. durch Diffusion) transloziert wird und daher definitionsgemäß nicht mit dem kalten Substrat konkurriert, kann die Konstante C, die dem Tracer-Transport bei vollständig inhibiertem Transporter entspricht, zu dem Term addiert werden (vgl. (126)).

Auf ähnliche Weise kann auch die bisher unbekannte Affinität einer Substrates B zum Transporter durch steigende Konzentrationen von B bei konstanter Konzentration eines bereits bekannten Substrates A durch Berechnung des K_i -Wertes für Substrat B ermitteln kann: $V_T = (V_{max} * (A))/(K_i + (B)) + C$. Genaugenommen wird auf diese Weise eigentlich die IC_{50} (Inhibitory Concentration) bestimmt und daraus mittels der Gleichung $K_i = IC_{50} / (1 + ((T)/K_M))$ [(mit (T) = Tracerkonzentration; K_M = Affinität des Tracers zum Transporter] erst der K_i -Wert. Da in unserem Fall die Tracerkonzentration aber lediglich 10% des K_M -Wertes beträgt (siehe Abschnitt II.3), ergibt der Term $1 + ((T)/K_M)$ den Wert 1.1, wodurch die IC_{50} annähernd K_i entspricht. Daher soll im weiteren nur noch der Begriff „ K_i -Wert“ verwendet werden.

Ebenso wie in der Enzymkinetik gibt der K_i -Wert für Substrat B diejenige Substratkonzentration an, bei der die Transportrate von Substanz A auf die Hälfte ihres Maximalwertes gefallen ist. Ein niedriger K_i -Wert bedeutet hohe Affinität, da schon eine geringe Konzentration des Substrats ausreicht, um die 50%ige Inhibition zu erreichen. Umgekehrt steht ein hoher K_i -Wert für eine niedrige Affinität, da eine höhere Substratkonzentration notwendig ist, um die halbmaximale Transportrate zu erreichen. In der Praxis bezeichnet man diese Art von Experiment als „Influx-Experiment“, da die Substratmenge bestimmt wird, die durch den jeweiligen Transporter ins Zellinnere verlagert wurde.

Trans-Stimulation

Wie bereits mehrmals detailliert beschrieben wurde, handelt es sich bei OAT1 um einen Antiporter, der organische Anionen gegeneinander austauscht und durch die Konzentrationsgradienten dieser Substrate angetrieben wird. Diese Translokation über die Membran funktioniert definitionsgemäß aber nur, solange auf beiden Seiten der Zellmembran Substrat am Transporter bindet: ist auf einer Seite kein Substrat vorhanden, kann damit auch kein Austausch stattfinden.

Bietet man daher einer Zelle, welche in ihrem Inneren ein Substrat A für OAT1 gespeichert hat, eine Substanz B extrazellulär an, kann man am Verhalten von Substrat A ablesen, ob es sich bei Substanz B um ein Substrat von OAT1 handelt oder nicht: ist Verbindung B ein Substrat, findet ein Austausch gegen das intrazelluläre Substrat A statt und der intrazelluläre Gehalt von A nimmt aufgrund des Effluxes messbar ab. Man spricht von „Trans-Stimulation“ des Transportes, weil der Transport eines Substrates von der gegenüberliegenden Seite (lat. trans = jenseits) der Membran aus durch Zugabe eines weiteren Substrates in Gang gesetzt wird.

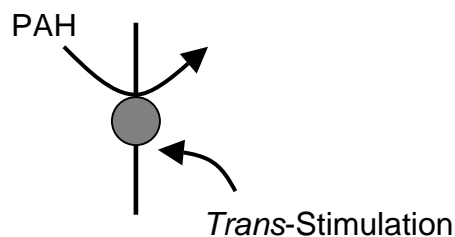


Abb. 8: Modell der Trans-Stimulation: Stimulation des PAH-Transports an OAT1 durch Austausch von PAH gegen ein weiteres Substrat auf der gegenüberliegenden Seite der Zellmembran.

Ist die extrazellulär angebotene Substanz B kein Substrat von OAT1, kann auch kein Austausch mit Substrat A und folglich auch keine messbare Abnahme des intrazellulären Gehalts von Substrat A stattfinden.

In der Praxis bezeichnet man diese Art von Experiment als „Efflux-Experiment“, da die Abnahme der intrazellulären Substratmenge aufgrund des Transports aus dem Zellinneren nach außen bestimmt wird.

Für die praktische Umsetzung dieser Grundlagen bedeutet das, dass für die Untersuchung der Interaktion von DMPS bzw. des Hg-DMPS-Chelats mit OAT1 und OAT-K2 bekannte Substrate des jeweiligen Transporters zur Verfügung stehen müssen:

OAT1

Für OAT1 wurde Para-Aminohippursäure (PAH) gewählt. Neben der bekannt hohen Affinität von PAH zu OAT1 (für hOAT1: $K_m = 4\mu\text{M}$ (27), $9\mu\text{M}$ (23), $5\mu\text{M}$ (24)), machen weitere günstige Charakteristika PAH zu einer häufig benutzten Substanz für Experimente an OAT1: PAH unterliegt nur geringen metabolischen Veränderungen und ist zudem sehr hydrophil (sehr niedriger Hexan/Wasser-Koeffizient), d.h. es ist nur eine sehr geringe Diffusion durch die Zellmembran zu erwarten.

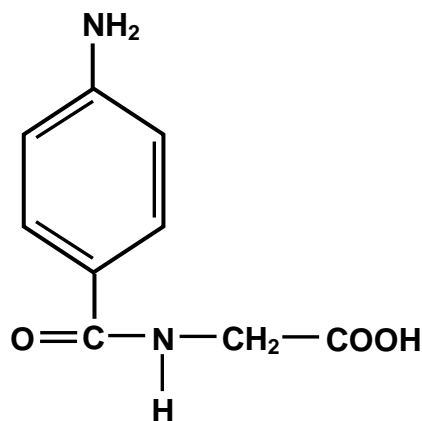


Abb. 9: Para-Aminohippursäure (PAH; MG = 194.19)

OAT-K2

Für OAT-K2 wurde Taurocholat (TCh) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Gallensäuresalz, welches aus der Reaktion von Taurin mit Cholyl-CoA entsteht und als Natriumsalz den Hauptbestandteil der Galle von Fleischfressern darstellt. Taurocholat ist frei in Wasser löslich und zeigt hohe Affinität zu OAT-K2 ($K_m = 10.3\mu\text{M}$ (125)).

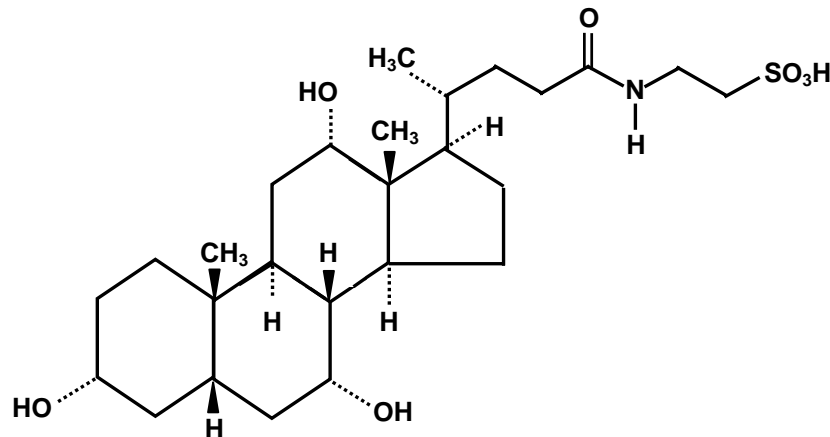


Abb. 10: Taurocholat (TCh, MG = 515.71)

Um den Gehalt dieser beiden Substanzen in den verschiedenen Kompartimenten (intra-, extrazellulär) bestimmen zu können, wurde Tritium-markiertes PAH ($[^3\text{H}]\text{PAH}$) bzw. TCh ($[^3\text{H}]\text{TCh}$) verwendet. Auf diese Weise konnte durch einfache Messungen der Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler die transportierte Substratmenge auf der Grundlage der bekannten spezifischen Aktivität der Substanzen berechnet werden. Mit Ausnahme der Radioaktivität haben Tritium-markiertes PAH und TCh die gleichen physikalischen und chemischen Eigenschaften wie die unmarkierten Formen.

2. Das menschliche Ortholog von OAT1: hOAT1

Für alle Experimente, die Untersuchungen an OAT1 beinhalten, wurde das menschliche Ortholog von OAT1, hOAT1, verwendet, welches uns freundlicherweise von Dr. Sweet überlassen wurde. Dabei handelte es sich um eine 1999 von Cihlar et al. (27) klonierte cDNA (Genbank-Nr. AF124373), die in das Plasmid pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, Carlsbad, USA) subkloniert war. Die 2118bp lange cDNA umfasst ein 1650bp langes offenes Leseraster flankiert durch eine 257bp-UTR (**Untranslated Region**) am 5'-Ende sowie eine 211bp-UTR am 3'-Ende. Das offene Leseraster codiert für ein 550 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 60.3 kDa (27). Dieses Molekulargewicht wurde durch Immunoblot Analysen nach N-Glycosidase F – Behandlung, welche die modifizierenden Oligosaccharid-Ketten spezifisch entfernt, bestätigt (27). Im gleichen Zeitraum wurde auch durch mehrere andere Gruppen die Klonierung menschlicher Orthologe von OAT1 publiziert: hROAT1 (26), hOAT1-1 and hOAT1-2 (23), hPAHT (24). Vergleiche der Aminosäuresequenzen dieser Klone mit der von hOAT1 haben allerdings ergeben, dass sich hPAHT und hROAT1 jeweils nur durch einen Aminosäurerest von hOAT1 unterscheiden. Dieser Unterschied ist laut Cihlar et al. (27) durch PCR-Fehler während des Klonierungsprozesses zu erklären. hOAT1-2 hat eine zu hOAT1 100% identische Aminosäuresequenz, hOAT1-1 besitzt 13 zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus (23).

3. In-vitro-Expression von hOAT1

Um Untersuchungen an hOAT1 durchführen zu können, musste hOAT1 zunächst in einem Zellsystem exprimiert werden. Dazu standen zwei unterschiedlichen Expressionssystemen zu Verfügung:

- 1) *Xenopus laevis* Oozyten für Influx-Experimente
- 2) transient transfizierte HeLa-Zellen für Influx- und Efflux-Experimente

a) *Xenopus laevis* Oozyten

Es handelt sich dabei um sehr große Zellen mit einem Durchmesser von 1 – 1.3mm, welche sowohl eine einfache Handhabung mit gewöhnlichen Pasteurpipetten als auch das relativ problemlose Injizieren verschiedener Substanzen (einschließlich cRNA) erlauben (127). Diese Eigenschaften machen *Xenopus laevis* Oozyten zu einem häufig benutzten Expressionssystem für die Untersuchung von Kanälen, Transportern und Rezeptoren (127), die in der Zellmembran lokalisiert sind: nach Präparation der Oozyten wird eine zuvor in-vitro synthetisierte cRNA, die für das zu untersuchende Protein kodiert, in die Zelle injiziert. Die Oozyten sind in der Lage, aus der im Überfluss injizierten cRNA das kodierte Protein in großer Menge zu synthetisieren. Diese Überexpression ermöglicht die Messung von Membrantransportprozessen mit Hilfe verschiedener Messmethoden – unter Vernachlässigung der endogen vorhandenen membranösen Transportsysteme, die in weit geringerer Konzentration exprimiert sind.

Die Nachteile des Oozyten Systems liegen in saisonellen Unterschieden, biologischen Unterschieden zwischen Oozyten verschiedener Tiere, der kurzen Lebenszeit (ca. 14 Tage) sowie der starken Temperaturempfindlichkeit der Oozyten (127).

Präparation der Oozyten

Das folgende Protokoll wurde von A.Yool (Physiologisches Institut der University of Arizona, Tucson, USA) entwickelt und in ihrem Labor seit Jahren mit gutem Erfolg verwendet.

Oozyten-Entnahme

Das Tier wurde dabei zunächst mit Tricain für 30 Minuten anästhesiert und anschließend rücklings auf Eis platziert. Mit einer Nadel wurde eine Hautfalte im Unterbauchbereich seitlich der Mittellinie angehoben und die Haut- und Muskelschichten vorsichtig mit einer scharfen Schere (die Instrumente sollten mit Ethanol gewaschen werden, müssen aber nicht vollkommen steril sein) durchtrennt. Unter Schonung der inneren Organe wurden einige Ovarläppchen mit einer Pinzette angehoben, mit der Schere abgetrennt und

in eine Kulturschale (125mm) mit ND-96 (96mM NaCl, 2mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 5mM HEPES, 2.5mM Na-Pyruvat; 100mg/l Streptomycin, 60mg/l Penicillin; pH 7.6) gelegt. Anschließend wurden Muskel- und Hautschicht des Tieres separat durch Nähte verschlossen und das Tier in ein flaches Wasserbad gesetzt. War das volle Bewusstsein wiedererlangt, wurde das Wasserbad bis zu einer Tiefe von ca. 10cm aufgefüllt und das Tier nach einer zwei- bis dreistündigen Ruhephase zurück in das Aquarium gebracht. Jedes Tier konnte dieser Entnahme insgesamt dreimal im Abstand von mehreren Wochen zugeführt werden.

Defollikulation

Die fingerförmigen Ovarläppchen wurden der Länge nach aufgeschnitten und die darin enthaltenen Oozyten in ein steriles 50ml-Röhrchen mit 30ml kalziumfreien OR-2 (82mM NaCl, 2.5mM KCl, 1mM MgCl₂, 5mM HEPES, 100mg/l Streptomycin, 60mg/l Penicillin, pH 7.6) und 45mg Kollagenase (Typ 1A) überführt. Nach eineinhalb- bis zweistündigem vorsichtigem Schütteln (bei 18°C) wurden einige Oozyten auf den Verlust der von rötlichen Blutgefäßen durchzogenen Follikelhülle unter dem Mikroskop untersucht: hatten mehr als 50% der untersuchten Oozyten ihre Follikelhüllen verloren, wurde die Kollagenase-Lösung durch frisches OR-2 ersetzt und für weitere 30 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden die Oozyten fünfmal mit frischem OR-2 gespült und schließlich in sterile 60mm-Kulturschalen mit ND96 gegeben.

Selektion guter Oozyten

Gute Oozyten (Stadium 5-6) sind groß (1 – 1.3mm) und in zwei gleich große und gleichmäßig pigmentierte Hemisphären unterteilt: die animale Hemisphäre ist dunkelbraun mit leichter Maserung, die vegetative Hemisphäre ist blass gelblich bis weiß ohne dunkle Flecken. Die Beurteilung wurde unter dem Mikroskop vorgenommen und die guten Oozyten in separate 60mm-Kulturschalen mit ND-96 transferiert und bei 18°C in einer feuchten Kammer für 24 Stunden bis zur Injektion aufbewahrt. Unmittelbar vor der mRNA-Injektion wurden die Oozyten nochmals unter dem Mikroskop kontrolliert, um erkrankte Oozyten auszusortieren. Durch diese doppelte Auswahl wurden gesunde Oozyten selektiert, die das anschließende Prozedere (cRNA-Injektion, 2-3 Tage

Inkubation, Influx-Experiment) zu einem hohen Prozentsatz überstanden und damit sowohl die Ausfallquote als auch den cRNA-Verbrauch gering hielten.

Injektion

Unter sterilen Bedingungen wurden eine Injektionspipetten durch Ausziehen des erhitzten Glasröhrchen (Durchmesser 1mm) hergestellt und die erkalteten Spitze vorsichtig durch ein sauberes Papiertuch (z.B. Kim-Wipe) gestochen, um das sehr dünne Ende der Injektionspipette abzubrechen. Die Pipette wurde danach in die Injektionsvorrichtung installiert und durch Aspiration mit einem leichten Mineralöl gefüllt. Die Oozyten wurden in Gruppen zu je 20 in eine vorbereitete 25mm-Plastikschale mit ND-96 gegeben, in die vorher mit Hilfe einer Rasierklinge ein karoartiges Rillenwerk eingeritzt wurde, um die Oozyten bei der Injektion stabil zu halten.

Anschließend wurde ein kleiner Tropfen (ca. 1.5 μ l) der cRNA (0.4 μ g/ μ l; verdünnt in DEPC-H₂O) auf die Innenseite einer sterilen 25mm-Kulturschale gegeben und durch Aspiration in die Injektionspipette gezogen. Pro Oocyte wurden 50nl cRNA (= 20ng cRNA) langsam in die helle, d.h. vegetative Seite injiziert; als Negativkontrolle kann steriles Wasser oder eine andere cRNA injiziert werden. Die so behandelten Oozyten wurden für zwei bis drei Tage bei 18°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Diese Zeit ist für die Oozyten ausreichend, um das Transportprotein zu exprimieren und in die Zellmembran zu integrieren.

In-vitro cRNA-Synthese

Um den Anionen-Austauscher hOAT1 in Oozyten exprimieren zu können, musste die cRNA durch Transkription der hOAT1-cDNA unter Verwendung einer RNA-Polymerase zuvor in-vitro hergestellt werden. Dafür wurde die hOAT1-cDNA, die als hOAT1/pcDNA3.1-Konstrukt vorlag, nach der Synthese in transformierten E.coli Bakterien (Stamm: DH5 α) zunächst sequenziert, um Fehler vor der Verwendung der cDNA als Grundlage für die cRNA-Synthese auszuschließen.

Bevor die cRNA in-vitro synthetisiert werden konnte, musste das Plasmid am 3'-Ende des kodierenden Sinn-Stranges durch Schnitt mit einer Restriktionsendonuklease in der

MultipleCloningSite des Plasmids linearisiert werden, um die RNA-Polymerase an der Transkription der auf das hOAT1-Insert folgenden, sinnlosen Plasmidsequenz zu hindern. Nach dem Restriktionsenzymverdau wurde das linearisierte Plasmid durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion aus dem Ansatz isoliert und die Menge an linearisiertem Plasmid durch Elektrophorese in 0.8%igem Agarose-Gel bestimmt. Bei unbefriedigendem Ergebnis, d.h. viel ungeschnittenem Plasmid, wurden die vorhergehenden Schritte wiederholt.

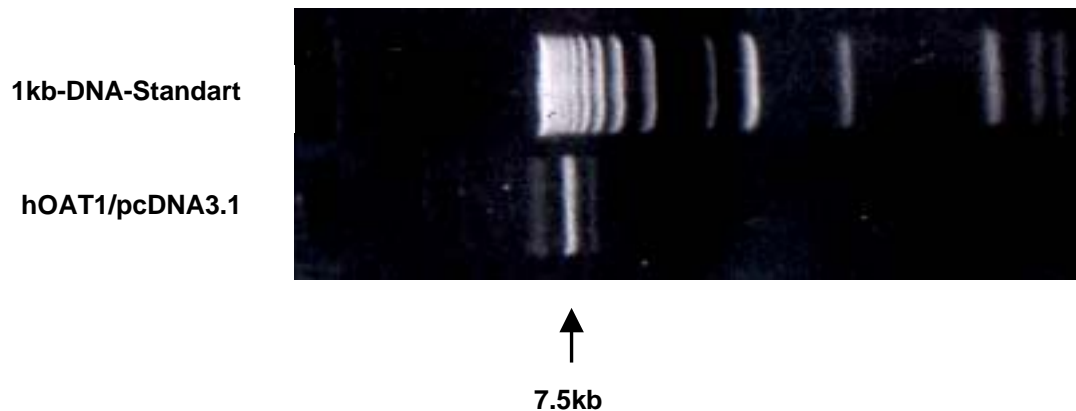


Abb. 11: Agarose-Gel-Elektrophorese des linearisierten hOAT1/pcDNA3.1-Plasmids.

Für die hOAT1-cRNA-Synthese wurde der Synthese-Ansatz (hOAT1-cDNA in DEPC-H₂O, 2.5mM jedes rNTPs, 10mM rGpppG Cap, 100mM DTT, 1x Transkriptionspuffer, RNase-Inhibitor, T7-RNA-Polymerase) für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von RQI DNase (RNase-frei) die noch vorhandene hOAT1-cDNA (inkl. Plasmid) abgebaut. Durch eine erneute Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die synthetisierte cRNA von allen anderen enthaltenen Komponenten des Synthese-Ansatzes und DNA-Abbaus gereinigt und in DEPC-H₂O bei -20°C tiefgefroren. Um Reinheit und Länge des Transkripts zu überprüfen, wurde ein Teil der

gerade synthetisierten hOAT1-cRNA durch Elektrophorese in einem formaldehydhaltigen denaturierenden Gel (Northern Gel) analysiert. Bei korrekter Bandenlage (ca. 2.1kb), ausreichend hoher Konzentration und guter Reinheit wurde die cRNA für die Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten verwendet.

Experimente

Alle Experimente an Oozyten wurden bei Raumtemperatur in 24-Well-Platten ausgeführt. Dazu wurde das Oozytenmedium ND96 zunächst durch einen natriumhaltigen Transportpuffer (100mM NaCl, 2mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM HEPES, pH 7.4) ersetzt und die Oozyten in dieser Lösung bei 18°C für eine Stunde vorinkubiert, um sie an die Bedingungen während des Experiments zu gewöhnen. Nach dieser Präinkubation wurden jeweils fünf Oozyten in ein Well einer 24-Well-Platte transferiert, welches 0.6ml des Transportpuffers mit 0.4µM des radioaktiven Tracers [³H]PAH (2µCi/ml) enthielt. Je nach Experiment waren in dieser Lösung weitere Substanzen enthalten, wie z.B. unmarkiertes PAH, reduziertes oder oxidiertes DMPS, HgCl₂. Eine detaillierte Beschreibung erfolgt für jedes Experiment im Abschnitt „III. Ergebnisse“. Nach der Inkubationszeit, die bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Zeitverlauf) 40 Minuten betrug, wurde die [³H]PAH-Aufnahme der Oozyten durch vorsichtiges Absaugen des radioaktiven Transportpuffers mit Hilfe einer Pasteurpipette und anschließendes viermaliges Spülen mit frischem, eiskaltem Transportpuffer (ohne [³H]PAH!) beendet. Die Oozyten wurden einzeln in Szintillationsgefäße überführt und in 0.5ml 10%iger SDS-Lösung aufgelöst. Nach Zugabe von 10ml Szintillationslösung und kurzem schütteln wurde die Menge an intrazellulär akkumuliertem [³H]PAH durch zehnmündige Messungen der Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler und anschließende Kalkulation auf Grundlage der bekannten spezifischen Radioaktivität von [³H]PAH bestimmt.

b) HeLa-Zellen

HeLa-Zellen (**Helene Lane**) sind ein seit vielen Jahren erfolgreich und vielseitig verwendetes Transfektionssystem für die stabile und transiente Expression verschiedenster Proteine. Dabei handelt es sich um eine humane, nicht-polarisierte Tumorzelllinie (zervikales Adenokarzinom), deren Handhabung im Gegensatz zur Haltung und Oozytengewinnung von *Xenopus laevis* wesentlich einfacher ist.

Gerade bei Efflux-Experimenten sind HeLa-Monolayers von großem Vorteil: durch die zum geringen Zellvolumen verhältnismäßig große Zelloberfläche kann in kurzer Zeit ein hoher Efflux des intrazellulär akkumulierten Transportsubstrats nach extrazellulär stattfinden. Im Gegensatz dazu fällt der Efflux aus den vergleichsweise riesigen Oozyten gering aus und beträgt meist nur wenige Prozent des zuvor intrazellulär akkumulierten Substrats.

Auf die zeitintensive Entwicklung einer stabil transfizierten HeLa-Zellreihe wurde verzichtet, da sich die Efflux-Experimente problemlos an transient transfizierten Zellen durchführen ließen.

Kultur

HeLa-Zellen wurden in 75ml-Kulturflaschen gehalten und einmal pro Woche im Verhältnis 1:10 mit Hilfe von Trypsin gesplittet. Das Kulturmedium (RPMI mit 5% FBS, 1% L-Glutamin und 1% Penizillin-Streptomycin) wurde nach 48 Stunden gewechselt. Die Zellen wurden unter konstanten Bedingungen (37°C, 5% CO₂) in einem Inkubator kultiviert.

Transiente Transfektion

Für transiente Transfektionen und die anschließenden Transportexperimente wurden die Zellen zunächst in 35mm-Platten gezogen. Dafür wurde Kulturmedium ohne Penizillin verwendet, da Penizillin ein organisches Anion ist, welches die folgenden Transportexperimente beeinflussen könnte. Sobald die Oberfläche zu 40-50% mit HeLa-

Zellen bewachsen war konnte transfiziert werden. Sämtliche transienten Transfektionen wurden mit „Effectene Transfection Reagent“ von Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt (Protokoll siehe Handbuch). Um die höchst mögliche Genexpression und Zellzahl, d.h. vollkommene Konfluenz, zu erreichen, wurden die transfizierten HeLa-Zellen nach Entfernung des Transfektionsmixes für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Experimente

Alle Experimente an transient transfizierten HeLa-Zellen wurden bei 37°C durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien wurden zuvor auf 37°C erwärmt, um bestmögliche Bedingungen für die Zellen zu schaffen.

Influx-Experimente

Für die Bestimmung der [³H]PAH-Aufnahme über hOAT1 wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit Transportpuffer (135mM NaCl, 5mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 1.2mM MgCl₂, 0.8mM MgSO₄, 13mM HEPES, 28mM D-Glucose; pH 7.4) gespült. Anschließend wurde pro 35mm-Platte 1ml Transportpuffer mit 0.2µM [³H]PAH (1µCi/ml) zugegeben, die je nach Experiment weitere Substanzen, wie z.B. unmarkiertes PAH, enthalten konnte. Dies ist im Abschnitt „III. Ergebnisse“ für jedes Experiment detailliert beschrieben. Danach wurden die 35mm-Platten für die Dauer des Transportintervalls bei 37°C inkubiert. Der [³H]PAH-Transport wurde durch Absaugen des radioaktiven Transportpuffers und dreimaliges vorsichtiges Spülen mit eiskaltem Transportpuffer gestoppt. Anschließend wurden die Zellen mit 0.5ml NaOH (1N) lysiert und das Lysat durch Zugabe von 0.5ml HCl (1N) neutralisiert. 0.75ml daraus wurde mit 10ml Szintillationsflüssigkeit in je einem Szintillationsgefäß gemischt und die Radioaktivität durch 10minütige Messungen im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt für Oozyten erklärt wurde, konnte über das Ergebnis der Radioaktivitätsmessung und der bekannten spezifischen Aktivität von [³H]PAH die Menge an intrazellulär akkumuliertem [³H]PAH berechnet werden. Der Teil der Radioaktivität, der nicht auf den Transport von [³H]PAH durch hOAT1 zurückzuführen ist, sondern von Zelloberfläche, Plastikwandungen und passiver

Diffusion stammt, wird durch Messung der Aktivität derjenigen HeLa-Zellen bestimmt, die zur Kontrolle mit leerem pcDNA3-Vektor transfiziert wurden und hOAT1 daher nicht exprimierten. Da vor jedem Transportexperiment per Mikroskop die 100%ige Konfluenz der Zellen optisch bestätigt wurde und zudem ausgeschlossen wurde, dass pcDNA3- und hOAT1-transfizierte Zellen unterschiedlich schnell wachsen, konnte auf eine Normalisierung der Ergebnisse durch Messung des Proteingehaltes jeder Platte verzichtet werden. Gleiches gilt auch für die Efflux-Experimente.

Efflux-Experimente

Für die Efflux-Experimente wurde zunächst das Kulturmedium von den mit hOAT1 transient transfizierten HeLa-Zellen abgesaugt und diese mit erwärmtem Transportpuffer einmal gespült. Um die Zellen für den späteren Efflux mit [³H]PAH zu beladen, wurden sie für eine Stunde in [³H]PAH-haltigem Transportpuffer (0.2µl [³H]PAH, (1µCi/ml)) bei 37°C präinkubiert. Nach diesem Intervall wurde der radioaktive Transportpuffer abgesaugt und die Zellen dreimal rasch mit vorgewärmtem Transportpuffer gespült, um oberflächlich haftendes [³H]PAH zu entfernen. Anschließend wurde 1ml Transportpuffer (37°C) mit oder ohne Efflux-stimulierenden Substanzen, wie z.B. unmarkiertem PAH, für das Efflux-Intervall auf die Zellen gegeben. Nach diesem Intervall wurden 0.75ml der Lösung, die im Falle von erfolgreich stimuliertem Efflux [³H]PAH enthalten sollte, abpipettiert und zusammen mit 10ml Szintillationscocktail in je ein Szintillationsgefäß gegeben. Zusätzlich wurden die Zellen in einigen Experimenten dreimal mit eiskaltem Transportpuffer gespült, mit 0.5ml NaOH (1N) lysiert, mit 0.5ml HCl (1N) neutralisiert und die Radioaktivität in 0.75ml dieses Lysates im Flüssigkeitszintillationszähler bestimmt. Daraus wurde die extrazelluläre [³H]PAH-Menge bestimmt und – nach Abzug der extrazellulären [³H]PAH-Menge bei nicht-stimuliertem Efflux – der Anteil an aktiv über hOAT1 transportiertem [³H]PAH berechnet.

4. „Kidney-specific“ Organischer-Anionen-Transporter 2 (OAT-K2)

Bisher wurde OAT-K2 einzig aus der Rattenniere kloniert, d.h. es existiert noch kein menschliches Ortholog. Daher fanden alle Untersuchungen an Ratten-OAT-K2 statt, welches uns freundlicherweise von Dr. Inui (125) überlassen wurde. Bei der 1998 klonierten cDNA (Genbank-Nr. AB012662) handelt es sich um eine 2472bp lange Nukleotid-Sequenz, die am 5'-Ende eine 563bp-UTR sowie am 3'-Ende eine 415bp-UTR enthält. Dazwischen befindet sich das offene Leseraster mit einer Länge von 1494bp, welches für ein Protein aus 498 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 55kDa kodiert. Die cDNA befand sich unter der Kontrolle des T7-Promotors in dem multifunktionellen Expressionsvektor pSPORT1 (Invitrogen, Carlsbad, USA).

5. In-vitro-Expression von OAT-K2

Wie hOAT1 sollte auch OAT-K2 sowohl in Oozyten als auch in einer Zellreihe (MDCK-Zellen) exprimiert werden, um die geplanten Untersuchungen durchführen zu können. Dafür wurden grundsätzlich die gleichen Techniken wie bei hOAT1 angewandt, ebenso für die Transportexperimente. Einige Details werden im folgenden kurz dargestellt.

a) *Xenopus laevis* Oozyten

Die cRNA-Synthese wurde nach der Phenol-Chloroformreaktion und der Überprüfung in einem Agarose-Gel mit der T7-RNA-Polymerase durchgeführt. Für die Injektion der OAT-K2-cRNA wurden pro Oozyte 10ng gelöst in 50nl DEPC-H₂O verwendet. Die Inkubation der so behandelten Oozyten unterschied sich in Zeit (2-3 Tage) und Bedingungen (18°C, feuchte Kammer) nicht von der für hOAT1 beschriebenen Vorgehensweise.

Influxexperimente:

Als Medium für die Oozyten-Experimente wurde ein natriumhaltiger Transportpuffer verwendet (siehe hOAT1: 100mM NaCl, 2mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM HEPES, pH 7.4) verwendet. Die Konzentration des radioaktiv markierten Substrats Taurocholat [³H]TCh im Transportpuffer betrug 0.8µM, die Aktivität 1.73 µCi/ml. Handhabung und Messung war identisch mit hOAT1.

b) MDCK-Zellen

Für Untersuchungen an OAT-K2 sollten stabil OAT-K2-transfizierte MDCK (**Madin-Darby Canine Kidney**)-Zellen entwickelt werden. Im Gegensatz zu HeLa-Zellen haben MDCK-Zellen den Nachteil, dass die Transfektionseffizienz selbst mit modernen Substanzen, wie z.B. Effectene Transfection Reagent von Qiagen, sehr niedrig ist: unter besten Bedingungen nehmen nur wenige Prozent der MDCK-Zellen die cDNA auf und exprimieren den Transporter. Das bedeutet, dass eine transiente Transfektion wie im Falle der HeLa-Zellen für Untersuchungen an MDCK-Zellen nicht geeignet ist. Durch Selektion eines OAT-K2-exprimierenden MDCK-Klons in Selektivmedium sollte daher eine stabil transfizierte und exprimierende Zellreihe entwickelt werden, um 100% OAT-K2-positive MDCK-Zellen für die Transportexperimente zur Verfügung zu haben.

Bei MDCK-Zellen handelt es sich im Gegensatz zu den oben beschriebenen HeLa-Zellen um eine polarisierte Zelllinie, d.h. es existiert ein apikaler und ein basolateraler Anteil der Zellmembran, in welchem jeweils unterschiedliche Transportproteine lokalisiert sind. MDCK-Zellen wurden aus den Epithelzellen des Sammelrohrs einer Hundeniere entwickelt und besteht aus verschiedenen Zellsubtypen. Aus diesem heterogenen Zellmix wurde von Gekle et al. (128) verschiedene Subtypen kloniert: für unsere Untersuchungen stand uns der Subtyp C11 zur Verfügung, welcher den Interkalierenden Zellen des renalen Sammelrohres sehr ähnlich ist und verschiedenen anderen MDCK-Subklonen gleicht: MDCK-2 cell type, MDCK-strain II, u.a. (129-133).

Durch Exprimierung von OAT-K2 in einer solch polarisierten Zellreihe kann untersucht werden, ob OAT-K2 auch in-vitro exklusiv in der apikalen Membran lokalisiert ist. Ermöglicht wird dies durch die Kultivierung der MDCK-Zellen auf durchlässigen Membranen (sog. Permeable Supports), welche es erlauben, den Zellen das Transport-Substrat wahlweise von basolateral oder apikal zuzuführen.

Kultur

MDCK-Zellen (C11-Klon) wurden in 75ml-Kulturflaschen gehalten und ca. einmal pro Woche im Verhältnis 1:10 mit Hilfe von Trypsin gesplittet. Das Kulturmedium (MEM mit 10% FBS, 0.292g/l L-Glutamin, 26mM NaHCO₃, 100U/ml Penizillin, 0.1mg/ml Streptomycin) wurde nach 48 Stunden gewechselt. Die Zellen wurden unter konstanten Bedingungen (37°C, 5% CO₂) in einem Inkubator kultiviert.

Subklonierung

Wie oben beschrieben, befand sich die OAT-K2-cDNA in dem Plasmid pSPORT1. Da pSPORT1 keinen Promotor enthält, der für die Expression in eukaryotischen Zellen, wie z.B. MDCK-Zellen, geeignet ist, musste die OAT-K2-cDNA zunächst in einen geeigneten Vektor subkloniert werden. Zielvektor war das Plasmid pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, USA), welches neben den T7- und Sp6-Promotoren auch einen Zytomegalievirus-Promotor enthält, der bei einer Vielzahl von Säugerzellen zu starker Expression des Inserts führt.

Um im Zielvektor kompatible Schnittstellen zu erzeugen, wurde in der MultipleCloningSite von pcDNA3 mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wie zur Herauslösung von OAT-K2 aus pSPORT1. Nach Auftrennung der Schnittfragmente durch Agarosegel-Elektrophorese wurden die Banden des OAT-K2-Inserts und des linearisierten Plasmids pcDNA3 aus dem Gel ausgeschnitten und die cDNA daraus isoliert. Anschließend wurden die beiden Stücke mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase ligiert und E.coli Bakterien (kompetente DH5 α) mit dem neuen Konstrukt OAT-K2/pcDNA3 transformiert. Nach Selektion einiger Plasmid-positiven E.coli-Kolonien auf Ampicillin-haltigen Kulturplatten, wurden diese durch PCR mit OAT-K2-Primern auf das OAT-K2-Insert überprüft. Diejenigen Kolonien, die OAT-K2 enthielten, wurden in 100ml Medium

über Nacht vermehrt und das Plasmid anschließend durch eine Plasmid-Präparation isoliert. Um zu überprüfen, ob die gesamte OAT-K2-cDNA erfolgreich in pcDNA3 subkloniert wurde, wurde das OAT-K2-Insert aus pcDNA3 mit Hilfe von Restriktionsenzymen ausgeschnitten und die Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Da beide Fragmente die richtige Länge hatten (OAT-K2: 2.5kb; pcDNA3: 5.4kb), konnte davon ausgegangen werden, dass die gesamte OAT-K2-cDNA einschließlich der UTRs in dem neuen Konstrukt mit pcDNA3 vorhanden war.

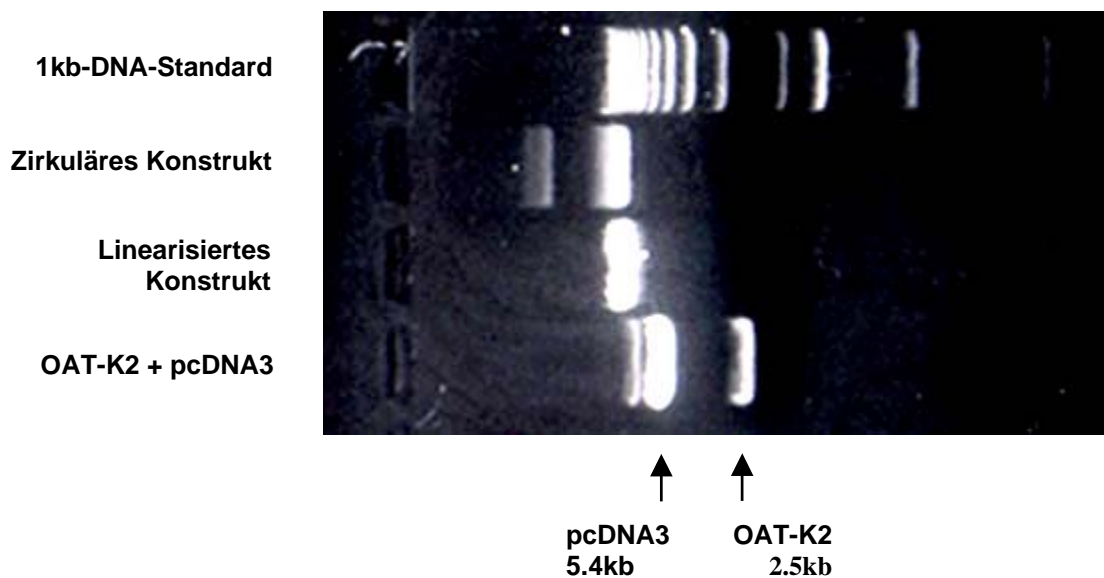


Abb. 12: Agarose-Gel-Elektrophorese von OAT-K2 und pcDNA3 nach Restriktionsenzymverdau.

Um auszuschließen, dass während der vorhergehenden Schritte Veränderungen an der OAT-K2-cDNA wie z.B. Nukleotidaustausch, -verlust oder -addition geschehen sind, wurde das OAT-K2-Insert sequenziert. Diese Sequenzierung ergab, dass direkt nach dem Startcodon ATG (Position 564) neun Basenpaare fehlen, die für die Aminosäuren Prolin (P), Isoleucin (I) und Methionin (M) kodieren (siehe Abb. 13).

	550	560	570	580	590	600
Position			→			
OAT-K2 (Genbank)	GTGGAATTGGTGAAACTCCCATCATGCCGATCATGCCCTTGGGTGTTTCCTACATAGAAA					
Ermittelte Sequenz	GTGGAATTGGTGAAACTCCCATCATG-----CCCTTGGGTGTTTCCTACATAGAAA					
Aminosäuren			P I M			

Abb. 13: Vergleich der DNA-Sequenzen von OAT-K2: Genbank-Sequenz gegen die neu ermittelte Sequenz.

Ansonsten war die Sequenz mit der publizierten Genbank-Sequenz (Nr: AB012662) vollkommen identisch. Da dieser Unterschied bei wiederholter Sequenzierung mit verschiedenen Primern bestehen blieb, erscheint es unwahrscheinlich, dass es sich dabei um ein Artefakt handelt. Um herauszufinden, ob diese Veränderung erst durch den Subklonierungsprozess in unserem Labor entstanden ist oder bereits in dem überlassenen Konstrukt aus OAT-K2 und pSPORT1 vorhanden waren, wurde das OAT-K2-Insert in pSPORT1 mit den gleichen Primern ebenfalls sequenziert. Auch in dem ursprünglichen Konstrukt fehlten die neun Basenpaare an gleicher Stelle. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass der Verlust durch die Subklonierung entstanden war. Nach Rücksprache mit Dr. Inui und Bestätigung, dass uns die korrekte OAT-K2-cDNA überlassen wurde, sollte die Sequenz der klonierten OAT-K2-cDNA mit der „originalen“ Sequenz der OAT-K2-mRNA einer Rattentubuluszelle verglichen werden. Dazu wurden Tubuli einer Rattenniere präpariert, die Tubuluszellen lysiert und die RNA daraus isoliert. Anschließend wurde die gesamte RNA mit Hilfe einer Reverse Transkriptase (SuperScript von Invitrogen, Carlsbad, USA) in Doppelstrang-cDNA umgeschrieben. Daraus wurde mit speziellen Primern für OAT-K2 nur die entstandene OAT-K2-cDNA sequenziert. Auch hier wich die Sequenz in den neun Basenpaaren von der offiziellen Genbank-Sequenz für OAT-K2 ab. Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass die publizierte Sequenz von OAT-K2 korrekt ist. In unserem Falle kann mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Sequenzierung fehlerfrei ablief.

Die Ergebnisse der RT-PCR mit anschließender Sequenzierung bestätigen dies zusätzlich.

Stabile Transfektion und Selektion

Die stabile Transfektion der MDCK-Zellen mit dem OAT-K2/pcDNA3-Konstrukt entsprach in weiten Teilen der oben beschriebenen transienten Transfektion der HeLa-Zellen. Allerdings wurde das Konstrukt vor der Transfektion durch einen Restriktionsenzymverdau in einer nicht kodierenden Region vor dem CMV-Promotor linearisiert. Dies ist ratsam, weil die cDNA bei einer stabilen Transfektion dauerhaft in das Erbgut der transfizierten Zelle integriert werden soll und dazu in linearer Form vorliegen muss – während das zirkuläre Plasmid bei einer transienten Transfektion normalerweise nicht in die Wirts-DNA eingebaut wird und daher nur über einen kurzen Zeitraum (transient!) exprimiert wird. Zwar ist die Aufnahme-Effizienz eines linearisierten Plasmid in die Zelle etwas niedriger als die eines zirkulär geschlossenen, aber durch die höhere Wahrscheinlichkeit eines korrekten Einbaus (keine unkontrollierten Schnitte in wichtigen Regionen des Plasmids!) in das Genom ist die Erfolgsrate letztlich höher. Zusätzlich wurde auch der leere Vektor pcDNA3 linearisiert, um für die Herstellung einer OAT-K2-negativen Kontrollzellreihe verwendet zu werden. Die MDCK-Zellen wurden in 6-Well-Platten (40% konfluent) mit linearisiertem OAT-K2/pcDNA3- bzw. leerem pcDNA3-Plasmid mit Hilfe von „Effectene Transfection Reagent“ (Qiagen, siehe II.3) transfiziert. Nach Entfernung des Transfektionsmixes wurden die Zellen für 24 Stunden in MDCK-Kulturmedium gehalten, anschließend 1:1 in je eine 60mm-Platte gesplittet und in Selektivmedium (MDCK-Kulturmedium mit 0.5mg/ml G418) kultiviert. Da der pcDNA3-Vektor ein Resistenzgen für das Aminoglykosid Neomycin (G418) enthält, konnten erfolgreich transfizierte MDCK-Zellen in dem toxischen Selektivmedium wachsen und Klone bilden. Nach ca. zehn Tagen waren die einzelnen Klone groß genug, um sie mit Hilfe von Klonieringen, die über die Zellinseln gesetzt wurden, einzeln in 35mm-Platten zu splitten. Die isolierten Klone wurden anschließend in Selektivmedium aufgezogen.

Experimente

Die Handhabung der stabil transfizierten MDCK-Zellen während der Transportexperimente entsprach der für hOAT1-transfizierte HeLa-Zellen beschriebenen Vorgehensweise. Als Transportpuffer wurde Dulbecco's PBS (137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, 1mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂; pH 7.4) mit 5mM D-Glukose verwendet. Als bekanntes OAT-K2-Transportsubstrat wurde wie bei den Oozyten [³H]TCh verwendet, hier allerdings in niedrigerer Konzentration (0.4µM, A=32kBq/ml). Die Experimente wurden entweder in 35mm-Platten oder 6-Well-Platten durchgeführt, stets aber bei 37°C. Lyse, Neutralisation und Bestimmung der Radioaktivität entsprach wiederum der für HeLa-Zellen beschriebenen Art und Weise. Bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit bestand kein Unterschied zwischen pcDNA3- und OAT-K2/pcDNA3-transfizierten Zellen. Aus diesem Grund erreichten die Zellen bei gleichzeitiger Aussaat in gleicher Dichte stets gleichzeitig 100%ige Konfluenz. Dies wurde vor jedem Experiment optisch bestätigt. Aus diesem Grund wurde – wie zuvor für die HeLa-Zellen erläutert – auf eine Messung des Proteingehalts jeder Platte verzichtet.

6. Opossum-Kidney-Zellen (OK-Zellen)

Für die Untersuchung des transepithelialen Transports von DMPS wurden OK-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um polarisierte Zellen, die von Epithelzellen der proximalen Tubuli des Opossums (OK = Opossum Kidney) abstammen und den Organische-Anionen-Transporter OAT1 in ihrer basolateralen Membran besitzen (134). Eine Transfektion wie im Fall der HeLa- und MDCK-Zellen war daher nicht nötig. OK-Zellen wurden wie MDCK-Zellen kultiviert.

Experimente

Um die transepitheliale Sekretion von DMPS (basolaterale Aufnahme und apikale Exkretion) zu untersuchen, wurden die OK-Zellen auf Permeable Supports in 6-Well-Platten kultiviert. Sobald die Zellen konfluent waren, wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit erwärmtem Transportpuffer (138mM NaCl, 4mM KCl, 1mM

CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM NaH₂PO₄, 4mM Na₂HPO₄, 5mM D-Glucose; pH 7.4) gespült. Anschließend wurde den Zellen 0.5mM reduziertes DMPS mit oder ohne 10mM PAH an der basolateralen Membran angeboten. Die Proben wurden aus dem apikalen Kompartiment entnommen und die DMPS-Konzentration durch Bestimmung der freien Thiol-Gruppen mittels Ellman's Reagenz (siehe II.8) spektrometrisch berechnet. Der gesamte Versuch wurde bei 37°C durchgeführt.

Die transepitheliale Sekretion von oxidiertem DMPS konnte in diesem System nicht untersucht werden, da keine geeignete Methode für den Nachweis von oxidiertem DMPS, das keine freien Thiolgruppen mehr besitzt, zur Verfügung stand.

7. Handhabung von DMPS

Die chemischen Eigenschaften von DMPS wurden in Punkt 4 der Einleitung bereits ausführlich dargestellt. Daraus geht hervor, dass DMPS aufgrund seiner beiden benachbarten Sulfhydrylgruppen rasch oxidiert, d.h. Disulfidbrücken überwiegend mit anderen DMPS-Molekülen, aber auch mit anderen SH-Gruppen-Trägern (Proteine, etc.) bildet. Die Anwesenheit zahlreicher Elektrolyte, wie z.B. in Blutplasma oder den verwendeten Transportpuffern, beschleunigt diesen Oxidationsprozess, während reduziertes DMPS in reinem Wasser relativ stabil ist (unveröffentlichte Daten aus unserem Labor). Da die hier verwendeten Transportpuffer allesamt elektrolytreich waren, wurden Lösungen des reduzierten, d.h. monomeren DMPS unmittelbar vor jedem Experiment frisch hergestellt und sofort verwendet, um den Oxidationsgrad so gering wie möglich zu halten. Unter den typischen Bedingungen eines Transportexperiment konnte für DMPS ein Oxidationsgrad von weniger als 6% nach 60 Minuten festgestellt werden ((103), eigene Daten).

Für Untersuchungen mit oxidiertem DMPS wurde eine 1mM Lösung von reduziertem DMPS in geeignetem Transportpuffer (je nach Experiment) bei 37°C für mindestens 24 Stunden mit 95% O₂, 5% CO₂ oxidiert. Dies geschah in einem geschlossenen System, um

das Volumen konstant zu halten. Anschließend wurde mit Ellman's Reagenz (siehe Abschnitt II.8) die Abwesenheit freier Thiol-Gruppen und damit die vollständige Oxidation von DMPS nachgewiesen. Wie bereits vorher durch Analysen im Massenspektrometer bestätigt worden war, bestand die oxidierte Lösung fast ausschließlich aus cyclischen Dimeren (>90%) und zu einem wesentlich geringeren Teil aus höhermolekulare cyclischen Oligomeren. Obwohl daraus hervorgeht, dass durch die überwiegende Bildung von DMPS-Dimeren aus Monomeren die DMPS-Konzentration der oxidierten Lösung annähernd 50% der ursprünglichen, reduzierten Lösung sein müsste, wurde aufgrund größerer Genauigkeit für die Darstellung der Ergebnisse die Variante der „DMPS-äquivalenten Konzentration“ gewählt: die Konzentration des oxidierten DMPS wurde als Konzentration des reduzierten DMPS ausgedrückt, welche vor der Oxidation vorhanden war (103). Eine weiterer Grund für die Wahl dieser Darstellung ist die Tatsache, dass die chemische Identität der höhermolekularen Oligomeren nicht genau bekannt war (103). Um einen Eindruck von der wahren Größenordnung der jeweiligen Konzentration zu erhalten, kann der Wert dieser „DMPS-äquivalenten Konzentration“ durch zwei dividiert werden.

8. Messung freier Thiol-Gruppen

Um die Konzentration freier Thiol-Gruppen in einer DMPS-Lösung zu bestimmen, wurde Ellman's Reagenz (135) verwendet. Dabei handelt es sich um 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (I), das wasserlösliche Derivat von Bis(p-Nitrophenyl)disulfid. In leicht alkalischem Milieu (pH 8) reagiert diese Substanz mit Thiol-Verbindungen, wie z.B. reduziertem DMPS oder Glutathion, unter rascher Bildung von einem Mol 2-Nitro-5-Thiobenzoensäure (II) pro Mol Thiol (siehe Abb. 14).

Im Gegensatz zur blass gelblichen Färbung der gelösten Ausgangssubstanz (I) ist das gebildete Anion (II) kräftig gelb-orange gefärbt und kann aufgrund dieser Eigenschaft zur photometrischen Bestimmung der Thiol-Konzentration einer Lösung verwendet werden. Messungen an Glutathion in unserem Labor haben ergeben, dass die photometrischen

Absorptionswerte bei 412nm bis zu einer Thiol-Konzentration von 250µM linear verlaufen. Da mit Ellman's Reagenz in diesem Falle einzig die vollständige Oxidation von DMPS, d.h. die völlige Abwesenheit freier Thiol-Gruppen nachgewiesen werden sollte, ist dieser Bereich ausreichend. Zudem ist diese Methode ausreichend sensitiv, d.h. selbst die Anwesenheit geringer Thiol-Konzentrationen, wie z.B. 1 µM, konnten sicher nachgewiesen werden.

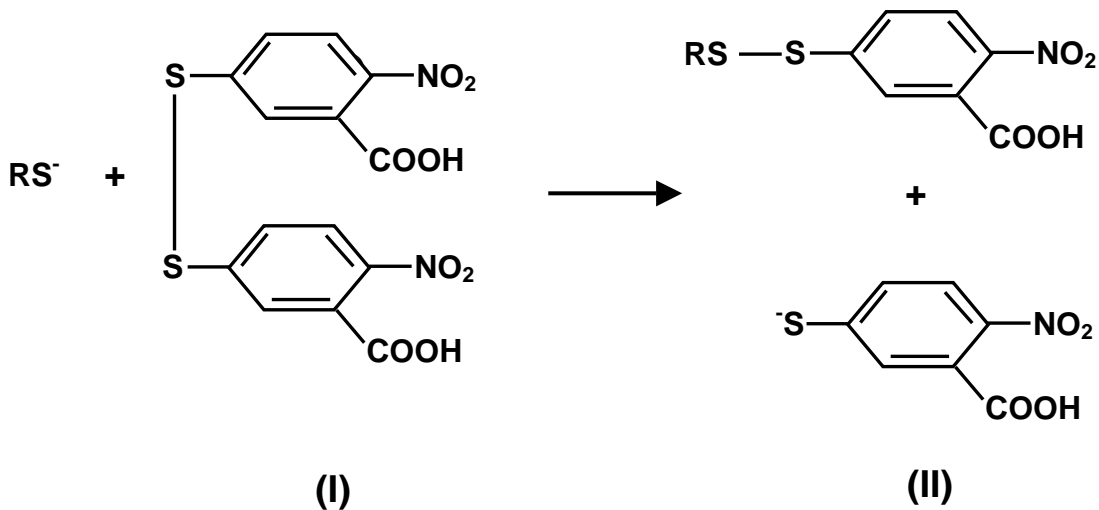


Abb. 14: Reaktion von Ellman's Reagenz (I) mit freien Thiolgruppen unter Bildung der gelb-orange-farbenen 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure (II).

Dazu wurden – vgl. (135) – 39.6mg Ellman's Reagenz in 10ml Phosphat-Puffer (0.1mM, pH 7) gelöst. 33.3µl dieser Lösung wurden zusammen mit 3ml der zu bestimmenden Thiol-Lösung und 2ml Phosphat-Puffer (0.1mM, pH 8) in eine Küvette gegeben und die Absorption im Photometer bei 412nm nach fünf Minuten (ausreichend für die vollständige Reaktion) bestimmt. Die Thiol-Konzentration konnte durch den Vergleich des Absorptionswertes mit einer jeweils neu aus bekannten Glutathion-Konzentrationen bestimmten Standardkurve ermittelt werden. Meist war allerdings der negative Ausfall

der Farbreaktion ein ausreichender Nachweis für die Abwesenheit von Thiol-Gruppen als Ergebnis einer vollständigen Oxidation von DMPS.

9. Statistik

Die Daten sind jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels t-Test für unpaarige Stichproben ermittelt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0.05$ zugrunde gelegt.

III. Ergebnisse

1. hOAT1 in *Xenopus laevis* Oozyten

a) Charakterisierung von hOAT1 in Oozyten

Zunächst sollte geklärt werden, ob der in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierte Transporter hOAT1 unter den gegebenen Versuchsbedingungen Transportaktivität besitzt und in seinen Eigenschaften mit den bekannten in-vitro-Daten übereinstimmt.

PAH-Aufnahme

Beginnend wurde dazu in einem einfach Experiment hOAT1-cRNA bzw. DEPC-H₂O (als Kontrolle) in Oozyten injiziert und der [³H]PAH-Gehalt in den Oozyten nach einem 30minütigen Transportintervall gemessen. Die [³H]PAH-Konzentration im Transportpuffer betrug 0.4µM.

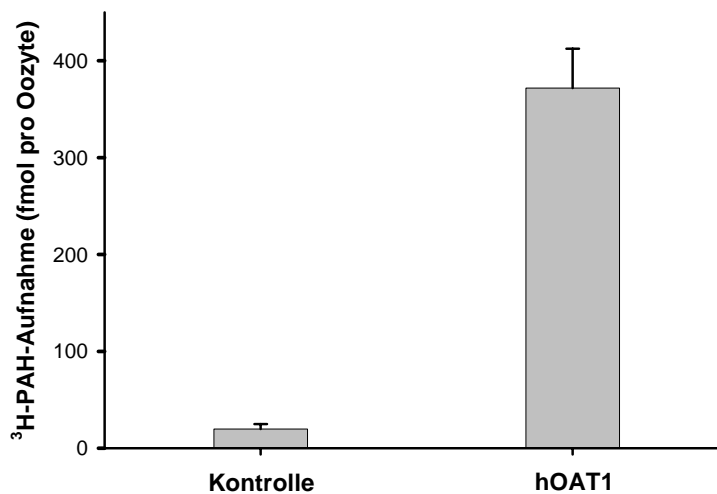


Abb. 15: Messung des [³H]PAH-Transports in hOAT1-exprimierende Oozyten (n=10) nach 30 Minuten. H₂O-injizierte Oozyten (n=5) dienten als Kontrolle.

Zeitverlauf der PAH-Aufnahme

Als nächstes wurde der Zeitverlauf der [^3H]PAH-Akkumulation in hOAT1-exprimierende Oozyten über 60 Minuten untersucht. Es sollte ein Zeitintervall für die folgenden Transportexperimente mit Oozyten ermittelt werden, welches einerseits groß genug ist, um ein ausreichend starkes [^3H]PAH-Signal zu gewährleisten. Andererseits sollte der Endpunkt dieses Intervalls nicht innerhalb des steady-state-Bereichs der [^3H]PAH-Aufnahme liegen, welcher auf den linearen Anstieg folgt. Zusätzlich wurden auch für diesen Versuch Kontrolle-Oozyten mit DEPC-H $_2\text{O}$ injiziert.

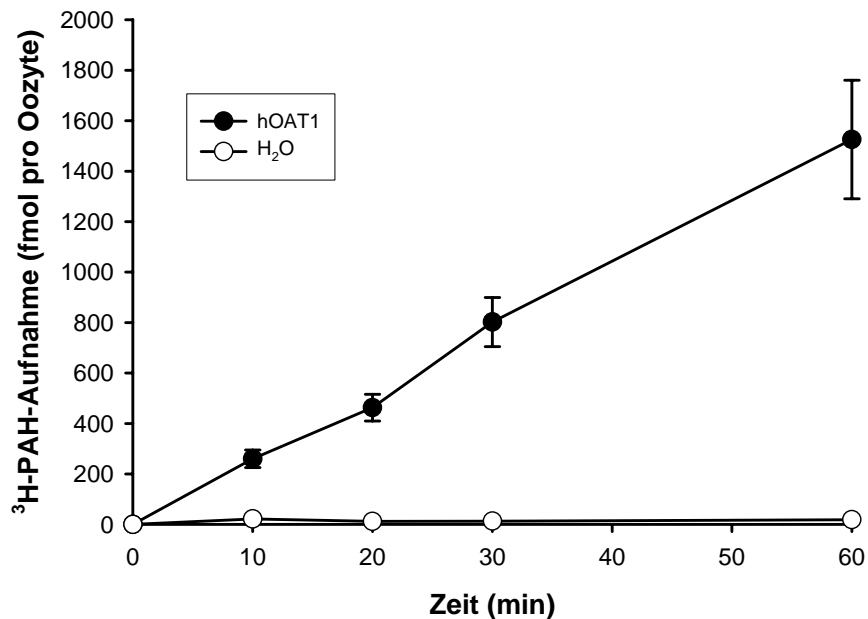


Abb. 16: Zeitverlauf der [^3H]PAH-Aufnahme über 60 Minuten in hOAT1-exprimierende Oozyten (n=8-10). H $_2\text{O}$ -injizierte Oozyten (n=3-5) dienten als Kontrolle.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, verlief die [³H]PAH-Aufnahme in den ersten 60 Minuten linear. In den Kontroll-Oozyten wurde dagegen weniger als 1% des in den hOAT1-injizierten Oozyten akkumulierten [³H]PAH gemessen.

Geht man von einem durchschnittlichen Oozyten-Volumen von 0.25µl aus, dann betrug die [³H]PAH –Anreicherung in den hOAT1-exprimierenden Oozyten nach 60 Minuten 6.1µM und damit das 15-fache der Konzentration des Transportpuffers (0.4µM). Damit wurde nachgewiesen, dass es sich bei hOAT1 wirklich um einen aktiven Transporter handelt, der einen Konzentrationsgradienten eines Substrat aufbauen bzw. ein Substrat gegen einen bestehenden Konzentrationsgradienten transportieren kann.

Als Ergebnis dieser Untersuchung wurde das Zeitintervall für die folgenden Influx-Experimente an Oozyten mit [³H]PAH auf 40 Minuten festgelegt, da dies den oben angesprochenen Bedingungen (Messung im linearen Bereich) sehr gut entspricht.

Kinetik des PAH-Transports

Nach Überprüfung der Transportaktivität von hOAT1 sowie dem Zeitverlauf der [³H]PAH-Aufnahme in die Oozyten sollte der K_m -Wert von PAH an hOAT1 ermittelt werden. Zuvor wurde bereits in einem weiteren Vorexperiment ermittelt, dass die [³H]PAH-Aufnahme durch die Anwesenheit von 0.5mM PAH vollständig, d.h. auf das niedrige Niveau der H₂O-injizierten Kontroll-Oozyten gehemmt werden konnte. In diesem Fall konkurrierten somit radioaktiv markiertes [³H]PAH und unmarkiertes PAH um die begrenzte Zahl vorhandener hOAT1-Moleküle. Die [³H]PAH-Konzentration betrug 0.4µM.

Das Ergebnis (Abb. 17) spiegelt das typische Bild eines sättigbaren, Carrier-vermittelten Transports wieder (siehe Abschnitt II.1). Aus den ermittelten Daten wurde ein K_m -Wert von $3.9 \pm 1.3\mu\text{M}$ für PAH an hOAT1 in Oozyten errechnet.

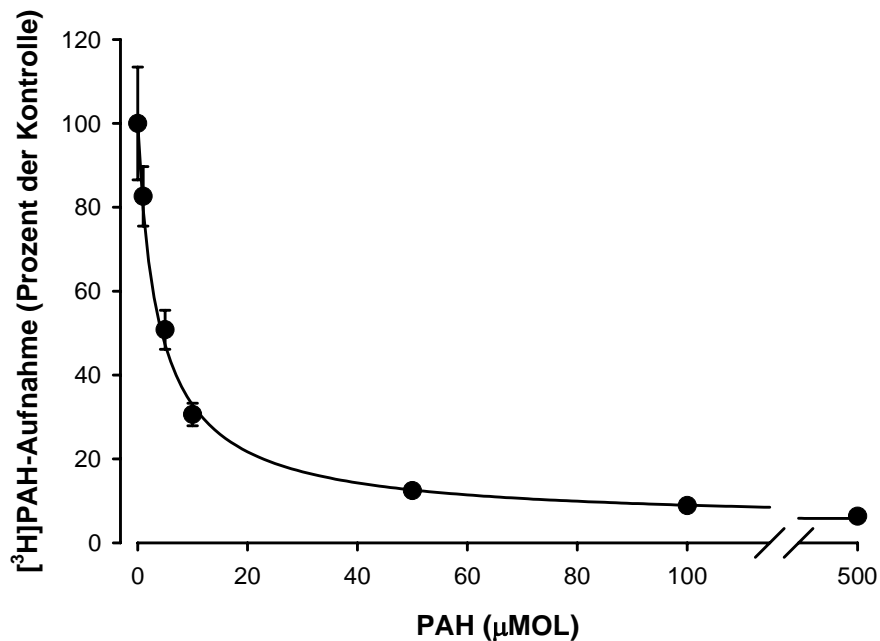


Abb. 17: Transportkinetik der PAH-Aufnahme in hOAT1-exprimierenden Oozyten (n=26-29) über 40 Minuten: 1, 5, 10, 50, 100, 500μM unmarkiertes PAH führten zu einer zunehmenden Hemmung des [³H]PAH-Transports.

Substratspezifität

Zum Abschluss der Charakterisierung von hOAT1 in Oozyten wurde die Substratspezifität des Transporters untersucht. Dazu wurde der Einfluss verschiedener Verbindungen auf die [³H]PAH-Aufnahme bestimmt: Probenecid (0.5mM), Penicillin G (1mM), Taurocholat (1mM), Fluorescein (0.1mM), Sulfobromophthalein (BSP; 0.1mM), DMSA (2,3-Dimercaptosuccinylsäure; 1mM) sowie PAH (0.1mM) als Positiv-Kontrolle. Neben diesen organischen Anionen wurde auch das organische Kation Tetraethylammonium (TEA), ein typisches Substrat der Organische Kationen Transporter (OCT) Familie, verwendet. Wie in den Experimenten zuvor betrug das Zeitintervall auch hier 40 Minuten.

Abbildung 18 zeigt, dass die organischen Anionen Probenecid (Urikosurikum), Fluorescein und Sulfobromophthalein (BSP) einen stark hemmenden Effekt auf die [³H]PAH-Aufnahme in Oozyten hatten. Dagegen war die Hemmung durch das anionische Gallensäurederivat Taurocholat relativ schwach. In Gegensatz dazu zeigte das β -Lactam-Antibiotikum Penicillin G keine statistisch signifikante Hemmung. Ebenso hatten der anionische Schwermetallchelator DMSA (2,3-Dimercaptosuccinylsäure) und das Kation Tetraethylammonium (TEA) keinen Einfluss auf den [³H]PAH-Transport und damit auch keine Affinität zu hOAT1.

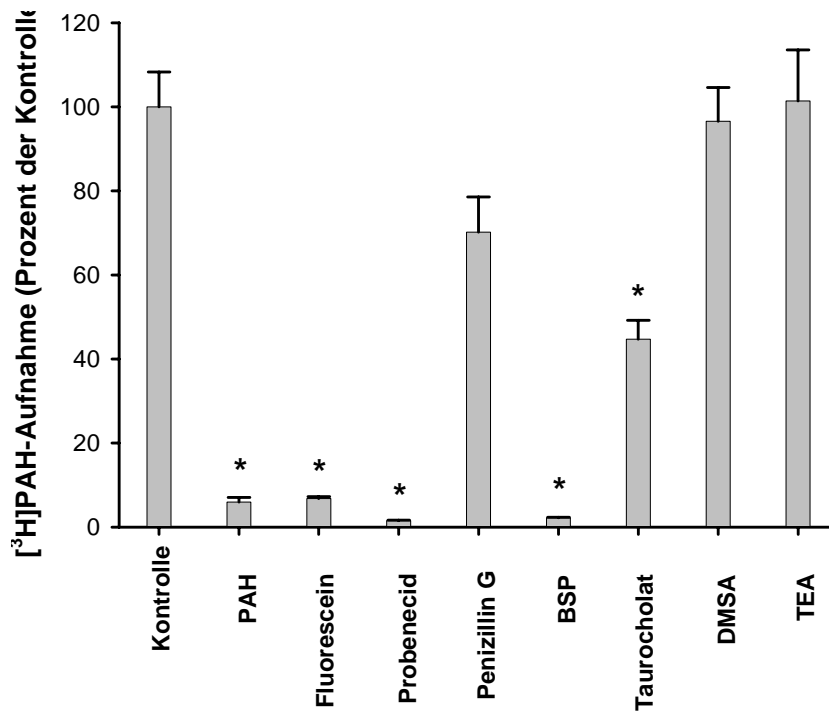


Abb. 18: Einfluß verschiedener Verbindungen (0.1mM PAH, 0.1mM Fluorescein, 0.5mM Probenecid, 0.1mM Sulfobromophthalein (BSP), 1mM Taurocholat, 1mM Penicillin G, 1mM 2,3-Dimercaptosuccinylsäure (DMSA), 1mM Tetraethylammonium (TEA)) auf die [³H]PAH-Aufnahme in hOAT1-exprimierende Oozyten (n=12-18); * = p < 0.05 gegen Kontrolle.

Alle dargestellten Ergebnisse der Charakterisierung von hOAT1 nach Expression in *Xenopus laevis* Oozyten stimmen mit zahlreichen bereits publizierten Daten aus ähnlichen Untersuchungen überein und wurden daher erfolgreich reproduziert. Insgesamt ist dies als Bestätigung des angewendeten Protokolls zu werten.

b) Einfluss von reduziertem und oxidiertem DMPS auf den [³H]PAH-Transport in Oozyten

Reduziertes DMPS

Zunächst wurde der Effekt von reduziertem DMPS auf die Interaktion von [³H]PAH mit hOAT1 untersucht. Dafür enthielt der Transportpuffer von acht hOAT1-exprimierenden Oozyten neben [³H]PAH auch 1mM reduziertem DMPS. Weitere acht hOAT1-positiven Oozyten hatten lediglich [³H]PAH in der Lösung und dienten als Kontrolle. Wie im Abschnitt II.7 erläutert, wurde die DMPS-Lösung erst unmittelbar vor dem Beginn des Experiments hergestellt, um eine ungewollte Oxidation durch den Sauerstoff der Luft zu vermeiden. Es zeigte sich, dass die Aufnahme von [³H]PAH in die Oozyten durch die Anwesenheit von 1mM reduziertem DMPS um 85% gehemmt werden konnte (siehe Abb. 19).

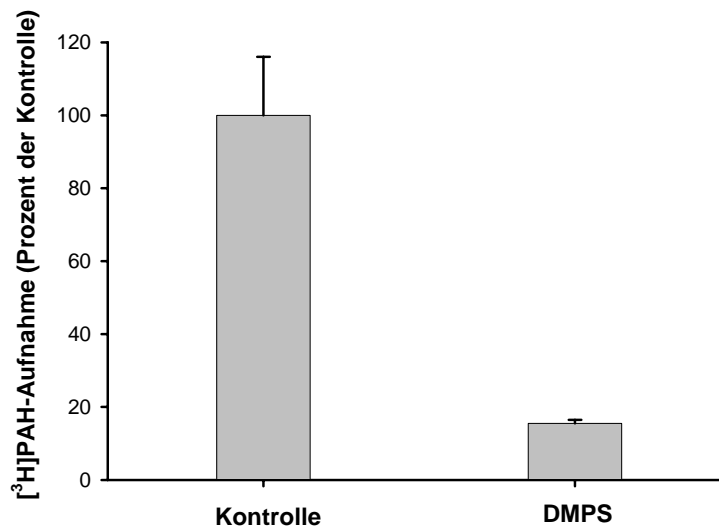


Abb. 19: Effekt von 1mM DMPS auf die [³H]PAH-Aufnahme in hOAT1-exprimierende Oozyten (n=8).

Affinität von reduziertem DMPS zu hOAT1

Um die Affinität von reduziertem DMPS zu hOAT1 in Oozyten zu ermitteln, wurde die Kinetik der Hemmung der [³H]PAH-Aufnahme durch reduziertem DMPS untersucht. Dazu wurde die [³H]PAH-Aufnahme in Gegenwart steigender Konzentrationen von reduziertem DMPS nach 40 Minuten gemessen. Die [³H]PAH-Konzentration blieb mit 0.4μM konstant.

Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, wurde die [³H]PAH-Aufnahme durch steigende DMPS-Konzentrationen zunehmend gehemmt. Über eine nichtlineare Regressionsanalyse auf Grundlage der Michaelis-Menten-Gleichung (siehe II.1) wurde ein K_i-Wert von 22.4 ± 8.4μM ermittelt.

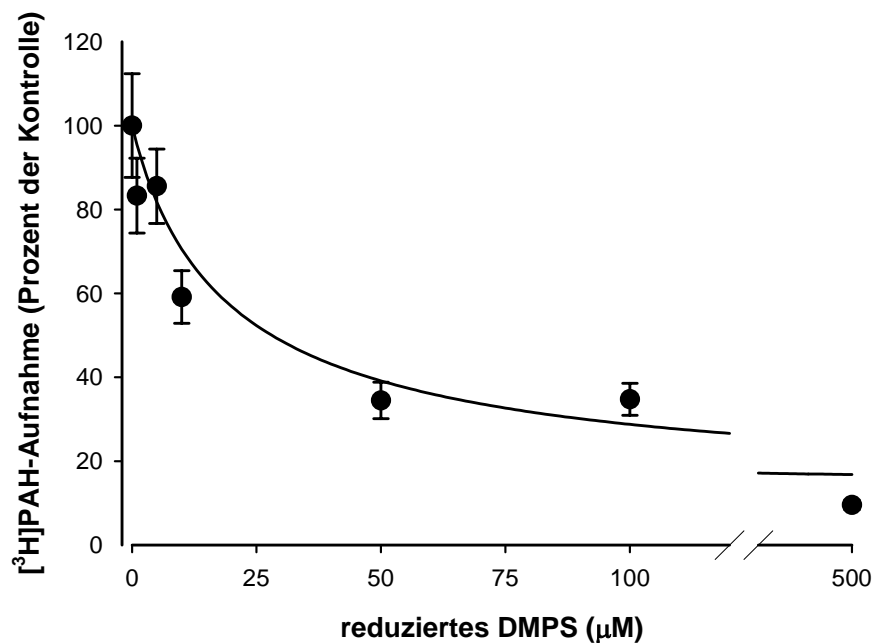


Abb. 20: Einfluss von reduziertem DMPS (1, 5, 10, 50, 100, 500μM) auf die PAH-Aufnahme in hOAT1-exprimierende Oozyten über 40 Minuten (n=28-30).

Affinität von oxidiertem DMPS zu hOAT1

Wie bereits zuvor festgestellt wurde, unterliegt DMPS nach seiner Aufnahme in die Blutbahn einer raschen Oxidation (75, 100), wobei überwiegend DMPS-Dimere, sogenannte Disulfide, gebildet werden. Da es daher wahrscheinlich ist, dass DMPS an hOAT1 in der basolateralen Membran des Tubulusepithels überwiegend als Dimer vorliegt, wurde auch der Einfluss von oxidiertem DMPS auf die [³H]PAH-Aufnahme untersucht. Dafür wurde eine 1mM Lösung von reduziertem DMPS in Transportpuffer oxidiert und die vollständige Oxidation durch einen negativen Test für freie Thiol-Gruppen mit Hilfe von Ellman's Reagenz bestätigt. Anschließend wurde mit dem oxidierten DMPS ein Transportversuch entsprechend dem Experiment zuvor mit reduziertem DMPS durchgeführt: nach jeweils 40 Minuten wurde die [³H]PAH-Aufnahme in die Oozyten bei Anwesenheit steigender Konzentrationen (0, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000µM DMPS-Äquivalente) von oxidiertem DMPS gemessen.

Aufgrund der im Abschnitt II.7 genannten Ursachen, wurde für die graphische Darstellung die Einheit „µM DMPS-Äquivalente“ zur Beschreibung der DMPS-Konzentration gewählt. Es zeigte sich, dass oxidiertes DMPS ebenso wie reduziertes DMPS mit steigenden Konzentrationen in der Lage ist, den [³H]PAH-Transport in die Oozyten zunehmend zu hemmen (Abb. 21). Hierfür wurde ein K_i-Wert von 66.0 ± 13.6µM (DMPS-Äquivalente) errechnet, der einer realistischen DMPS-Dimer-Konzentration von ca. 33µM entspricht und daher dem K_i-Wert für reduziertes DMPS (22.4 µM) vergleichbar ist.

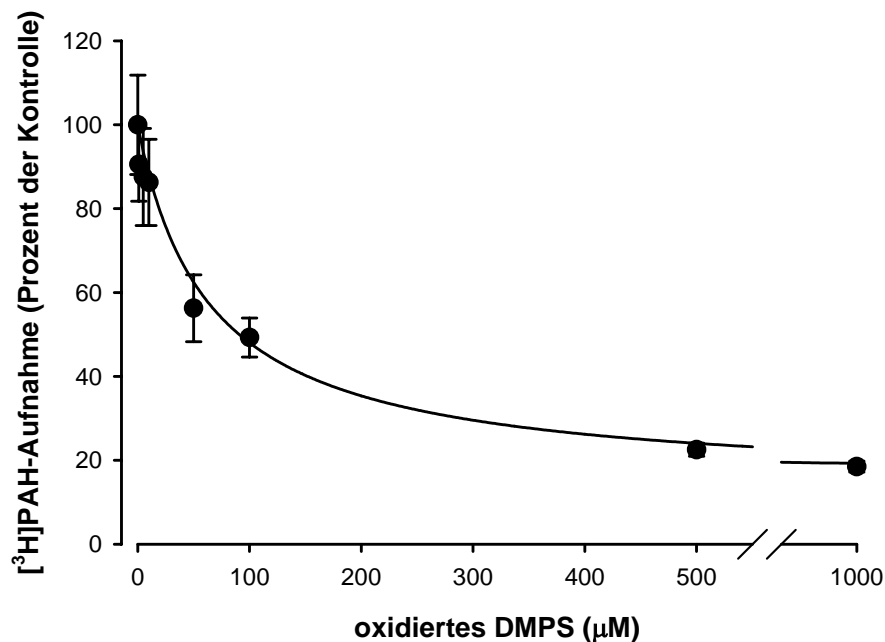


Abb. 21: Einfluss von oxidiertem DMPS (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000µM DMPS-Äquivalente) auf die PAH-Aufnahme in hOAT1-exprimierende Oozyten über 40 Minuten (n=27-29).

c) Einfluß von Albumin auf die Inhibition des PAH-Transportes durch reduziertes und oxidiertes DMPS

Unter physiologischen Bedingungen, d.h. im Blutkreislauf, ist DMPS zu 70-90% an Serumproteine, v.a. Albumin, gebunden (102). Deshalb sollte der Effekt von Albumin (hier: BSA) auf die Hemmung des [³H]PAH-Transportes durch reduziertes und oxidiertes DMPS auch unter in-vitro-Bedingungen untersucht werden. Da die normale physiologische Konzentration von Albumin im menschlichen Blut (3.5 – 5.5 g/dl = 0.5-0.8mM) aufgrund der schlechten Löslichkeit von Albumin in Transportpuffer unter den gegebenen Bedingungen nicht herstellbar war, wurde eine Albumin-Konzentration von

0.1mM verwendet. Die Konzentration von reduziertem und oxidiertem DMPS betrug jeweils 40 μ M bzw. 40 μ M DMPS-Äquivalente. Lösungen, die sowohl DMPS als auch Albumin enthielten, wurden für vier Stunden bei 4°C inkubiert, um eine ausreichend lange Interaktion zwischen DMPS und Albumin durch das vierstündige Intervall zu ermöglichen und im Falle des reduzierten DMPS die Oxidation durch die niedrige Temperatur gering zu halten. Als Kontrolle wurden zusätzlich die alleinigen Effekte von Albumin, reduziertem und oxidiertem DMPS auf die [3 H]PAH-Aufnahme gemessen.

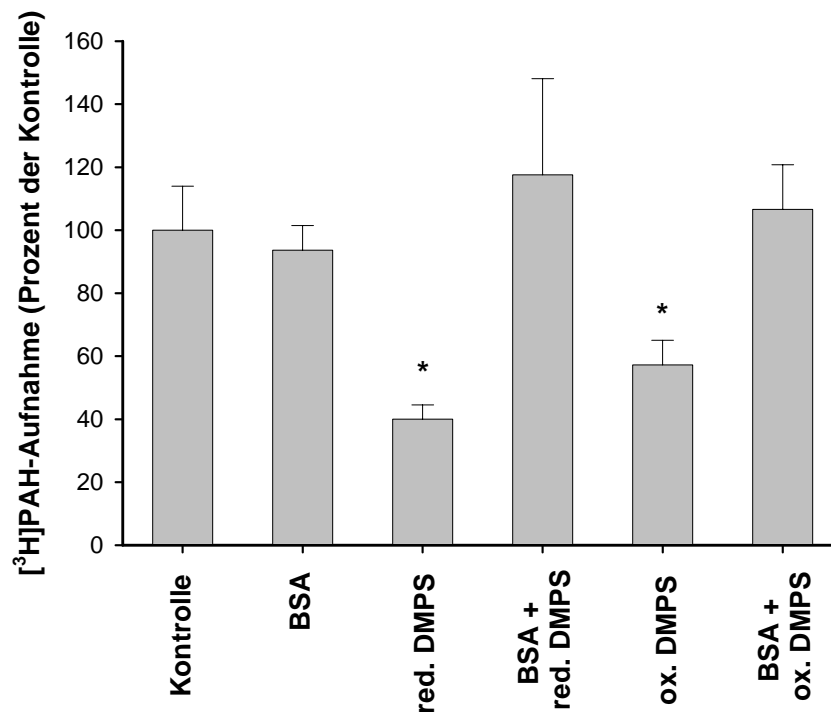


Abb. 22: Einfluß von 0.1mM Albumin (BSA) auf die Hemmung des PAH-Transports durch 40 μ M reduziertes und oxidiertes DMPS in hOAT1-exprimierende Oozyten (n=18-20); * = p < 0.05 gegen Kontrolle.

Reduziertes und oxidiertes DMPS alleine hemmten den Transport in erwartetem Ausmaß (60% bzw. 43%), Albumin alleine hingegen hatte keinen Einfluß auf den [³H]PAH-Transport (Abb. 22). In Gegenwart von 0.1mM Albumin erloschen die zuvor beobachteten hemmenden Effekte von reduziertem und oxidiertem DMPS vollständig: die [³H]PAH-Aufnahme war nicht signifikant unterschiedlich von den Kontrollbedingungen, d.h. es fand keine kompetitive Hemmung des [³H]PAH-Transports durch reduziertem oder oxidiertes DMPS statt.

d) Einfluss des Hg-DMPS-Chelats auf den PAH-Transport

Wie in der Einleitung beschrieben, zählt hOAT1 aufgrund seiner breite Substratspezifität zu den potentiellen Wegen, auf denen das Hg-DMPS-Chelat die Tubuluszelle basolateral wieder verlassen könnte, um anschließend z.B. durch glomeruläre Filtration in den Urin ausgeschieden zu werden. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob das Chelat Affinität zu hOAT1 hat.

Um die Ergebnisse dieser Untersuchung richtig interpretieren zu können, wurde zuvor der toxische Effekt von freiem anorganischem Quecksilber auf den [³H]PAH-Transport ermittelt. Dazu wurde die [³H]PAH-Aufnahme in Oozyten in Anwesenheit von 1 und 5µM HgCl₂ über 40 Minuten untersucht. Aus Abbildung 23 wird ersichtlich, dass bereits 1µM freies anorganisches Quecksilber den Transport um 50%, 5µM gar um 74% hemmt.

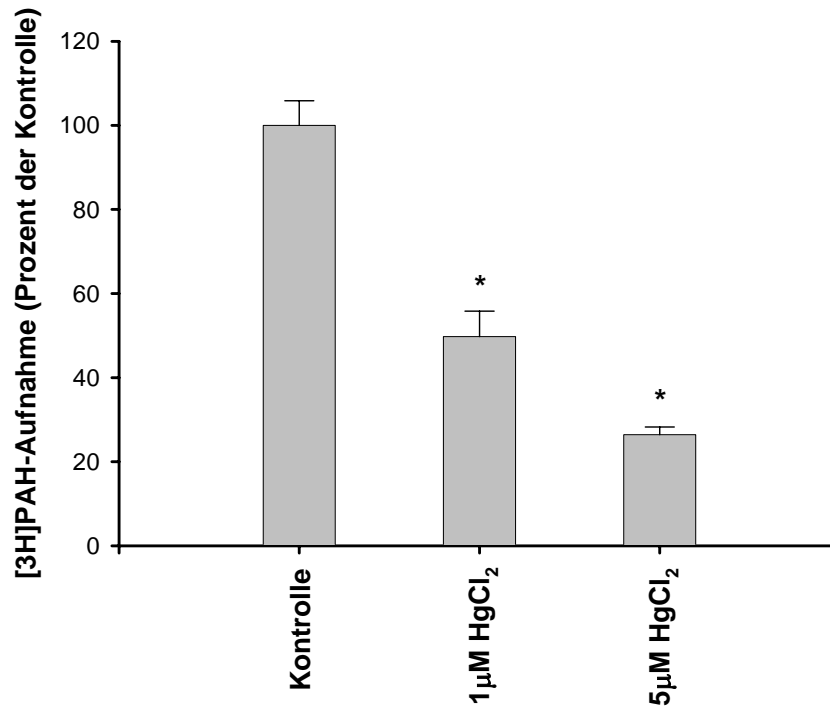


Abb. 23: Einfluß von freiem anorganischem Quecksilber (1 bzw. 5 µM HgCl₂) auf die PAH-Aufnahme in hOAT1-exprimierende Oozyten (n=7-9); * = p < 0.05 gegen Kontrolle.

Um den Einfluss des Hg-DMPS-Chelats auf den [³H]PAH-Transport in Oozyten zu bestimmen, wurde eine 40 µM Lösung von reduziertem DMPS in Transportpuffer mit steigenden Konzentrationen von HgCl₂ titriert: 0, 10, 20, 30, 40 µM. Aufgrund der dargestellten Eigenschaften von DMPS, bindet ein Mol DMPS ein Mol Quecksilber-Kationen: bei 40 µM HgCl₂ sollten daher aufgrund der 1:1-Ratio von DMPS zu Hg²⁺ idealerweise weder freies Quecksilber noch freies DMPS vorhanden sein, sondern ausschließlich Hg-DMPS-Komplexe.

Die verschiedenen Ansätze wurden für fünf Stunden bei 4°C inkubiert, um einerseits die Komplexierung des Quecksilbers durch den Chelator DMPS durch die lange Inkubationszeit zu maximieren, andererseits aber die Oxidation von DMPS zu Disulfiden durch die niedrige Temperatur zu minimieren. Nach Wiedererwärmung auf Raumtemperatur wurde zu jeder Kombination 0.4µM [³H]PAH gegeben und die [³H]PAH-Akkumulation in den Oozyten unter den verschiedenen Bedingungen nach 40 Minuten bestimmt.

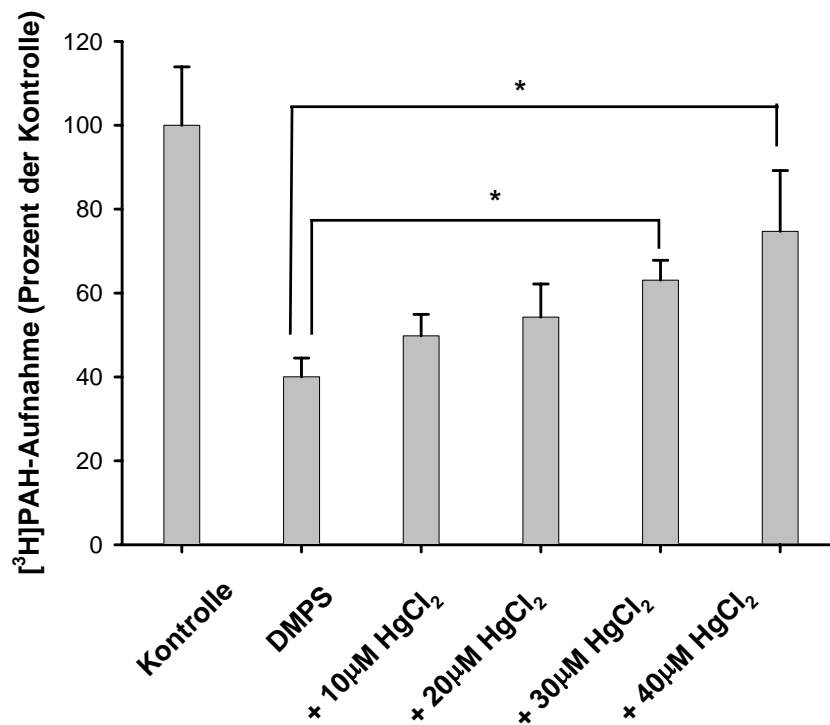


Abb. 24: Einfluß von steigenden Konzentrationen anorganischen Quecksilbers (10, 20, 30, 40µM HgCl₂) auf die Inhibition des PAH-Transports durch 40µM reduziertes DMPS in hOAT1-exprimierende Oozyten (n=8-10); * = p < 0.05.

Wie aufgrund des bereits ermittelten K_i -Wertes für reduziertes DMPS zu erwarten war, hemmten 40 μM DMPS die [^3H]PAH-Aufnahme in die Oozyten um 60%. Mit steigenden Konzentrationen von HgCl_2 im Transportpuffer ließ der hemmende Effekt von DMPS auf den [^3H]PAH-Transport zunehmend nach, d.h. mehr [^3H]PAH akkumulierte in den Oozyten innerhalb von 40 Minuten. Dies spricht dafür, dass das gebildete Hg-DMPS-Chelat keine Affinität zu hOAT1 besitzt und daher keine kompetitive Hemmung durch Konkurrenz mit [^3H]PAH ausüben kann. Zudem zeigte sich, dass die Chelat-Bildung fast vollständig war bzw. auch bei 40 μM HgCl_2 kein freies Quecksilber mehr vorhanden war, da ja bereits 1 μM freies Hg^{2+} die [^3H]PAH-Aufnahme aufgrund seines toxischen Effekts um ca. 50% erniedrigt hätte (siehe Abb. 23). Der leicht erniedrigte [^3H]PAH-Transport bei 40 μM ist eher auf geringe Mengen an ungebundenem DMPS zurückzuführen, der kompetitiv inhibierend wirkte. Gegen die Kontrolle zeigte der 40 μM - HgCl_2 -Wert allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied.

2. hOAT1 in HeLa-Zellen

a) Charakterisierung von hOAT1 in HeLa-Zellen

Wie bereits im Abschnitt „Experimentelle Methoden“ dargelegt wurde, sollte die Frage nach der Art der Interaktion von DMPS mit hOAT1 durch Efflux-Experimente an transient transfizierten HeLa-Zellen geklärt werden. Bevor diese Experimente durchgeführt werden konnten, sollte zunächst durch einige Vorexperimente die Transportaktivität von hOAT1 nach transienter Transfektion in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich sollten die geeigneten Bedingungen ([^3H]PAH-Konzentration, Efflux-Dauer, Spültechnik, etc.) für die Efflux-Experimente ermittelt werden.

PAH-Aufnahme

Durch ein einfaches Influx-Experiment an HeLa-Zellen wurde die Transportaktivität des transfizierten hOAT1 untersucht: an hOAT1-transfizierten Zellen sollte die [^3H]PAH-Aufnahme sowie der Effekt von 0.5mM unmarkiertem PAH auf diese untersucht werden. pcDNA3-transfizierte Zellen dienten unter identischen Bedingungen als Negativkontrolle. Die Konzentration von [^3H]PAH betrug 0.2 μM und das Transportintervall betrug 30 Minuten bei 37°C.

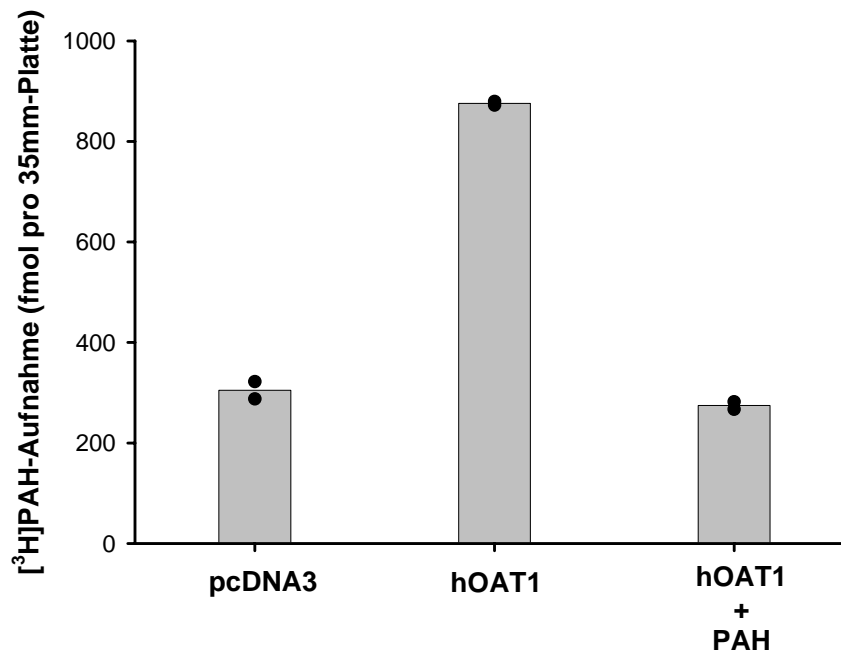


Abb. 25: PAH-Aufnahme in hOAT1-exprimierende HeLa-Zellen (n=2) und Einfluß von 0.5mM unmarkiertem PAH auf den PAH-Transport (n=2). pcDNA3-transfizierte HeLa-Zellen dienten als Kontrolle (n=2). Beide Werte werden jeweils durch einen Punkt repräsentiert; die Säule zeigt den Mittelwert.

Es zeigte sich erstens, dass die hOAT1-transfizierten Zellen [^3H]PAH aufnehmen, wohingegen die transiente Transfektion mit leerem Vektor pcDNA3 zu keiner hOAT1-vermittelten [^3H]PAH-Aufnahme führen konnte (Abb. 25). Die Anwesenheit einer hohen Konzentration von unmarkiertem PAH führt zur kompetitiven Hemmung des [^3H]PAH-

Transports über hOAT1 und senkt die intrazelluläre [^3H]PAH-Akkumulation auf das Niveau der pcDNA3-transfizierten Kontrollzellen. Die relativ hohe Hintergrundradioaktivität kommt durch die große Oberfläche des Zellrasens zustande, an welcher trotz sorgfältigen Spülens mehr [^3H]PAH haftet als an einigen wenigen Oozyten.

Zeitverlauf der PAH-Aufnahme

Ebenso wie beim [^3H]PAH-Transport an Oozyten wurde auch hier der Zeitverlauf der [^3H]PAH-Aufnahme in die hOAT1-transfizierten HeLa-Zellen untersucht, um Aufschluss über die Lage des linearen und steady-state Bereichs zu bekommen. Hintergrund war die Suche nach einem geeigneten Transportintervall für die folgenden Efflux-Experimente, welches in den steady-state Bereich reicht und damit eine gleichmäßige Beladung der HeLa-Zellen mit [^3H]PAH in der Präinkubationsperiode erlaubt. Als Meßzeitpunkte wurden 10, 30 und 60 Minuten gewählt. Als Kontrolle dienten pcDNA3-transfizierte HeLa-Zellen. Die [^3H]PAH-Konzentration im Transportpuffer betrug $0.2\mu\text{M}$.

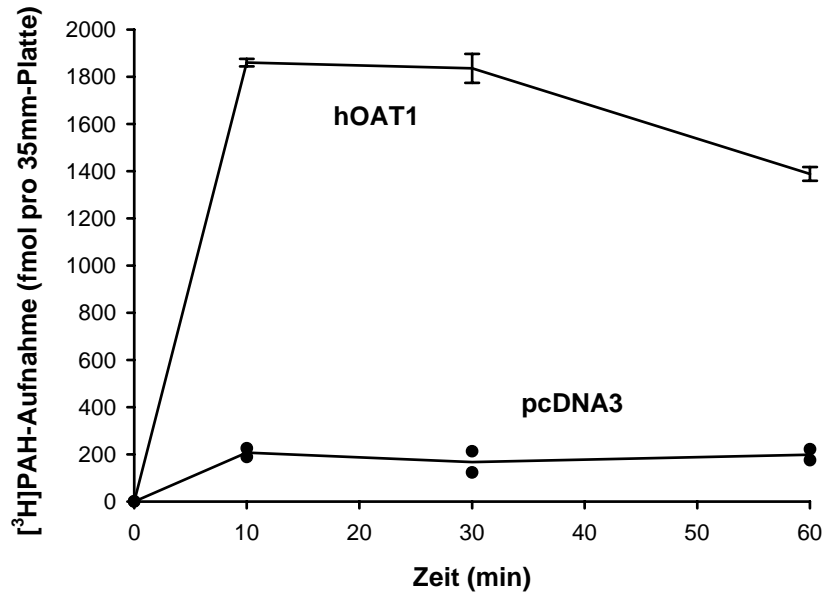


Abb. 26: Zeitverlauf der PAH-Aufnahme in hOAT1-exprimierende HeLa-Zellen (n=3). pcDNA3-transfizierte HeLa-Zellen dienten als Kontrolle (n=2; beide Werte sind als Punkte angegeben, der Graph schneidet den Mittelwert aus beiden).

Abbildung 26 zeigte, dass bereits nach zehn Minuten ein Maximum erreicht war und sich der [³H]PAH-Gehalt der hOAT1-exprimierenden HeLa-Zellen im Sinne eines Plateaus im folgenden nicht mehr wesentlich veränderte. Die pcDNA3-transfizierten HeLa-Zellen hingegen transportierten kein [³H]PAH und befanden sich über den gesamten Zeitraum auf gleichem Niveau.

b) Verhalten von intrazellulärem PAH ohne Transstimulation

Um den [³H]PAH-Efflux untersuchen zu können, mussten die HeLa-Zellen zunächst mit [³H]PAH beladen werden. Da das Zellvolumen gering und die Zelloberfläche in Relation dazu sehr groß ist, musste mit einem relativ starken Leck des intrazellulären [³H]PAH aus den Zellen gerechnet werden. Erschwerend kamen die nötigen Spülvorgänge hinzu, die nach der Präinkubation der Zellen mit [³H]PAH notwendig waren, um Zelloberflächen und Plastikwände von haftendem [³H]PAH zu befreien. Daher sollte zunächst der Zeitverlauf des [³H]PAH-Verlusts durch Leck (Diffusion, etc.) aus den Zellen untersucht werden, um das geeignete Zeitintervall für die Transstimulationen zu ermitteln.

Nach einstündiger Präinkubation mit 0.2µM [³H]PAH und sorgfältigem Spülen wurde jeweils 1ml Transportpuffer ohne potentielle Substrate in jede 35mm-Platte auf die hOAT1-transfizierten HeLa-Zellen gegeben. Nach 5 und 15 Minuten wurde der [³H]PAH-Gehalt jeweils in den lysierten Zellen und dem Transportpuffer bestimmt und mit dem Gehalt zum Zeitpunkt t_0 verglichen.

Es zeigte sich, dass der [³H]PAH-Gehalt des HeLa-Zelllysates nach fünf Minuten bereits um 66% abgenommen hatte (Abb. 27). Nach 15 Minuten betrug der Zellgehalt noch 19% des Ausgangswertes. Da aufgrund der vorhergehenden Experimente (Abb. 25, 26) davon auszugehen ist, dass die Hintergrundradioaktivität der Zellen (Zelloberfläche, etc.) zwischen 10 und 20% beträgt, hatten die Zellen nach 15 Minuten praktisch das gesamte zuvor akkumulierte [³H]PAH wieder verloren: die gemessene Aktivität befand sich auf dem gleichen Niveau, welches bereits bei den vorhergehenden Experimenten (Abb. 25, 26) an den pcDNA3-transfizierten Kontrollzellen beobachtet wurde. Analog stieg der [³H]PAH-Gehalt im Transportpuffer, so dass bei Addition beider Werte zum jeweiligen Zeitpunkt wieder 100% erreicht werden.

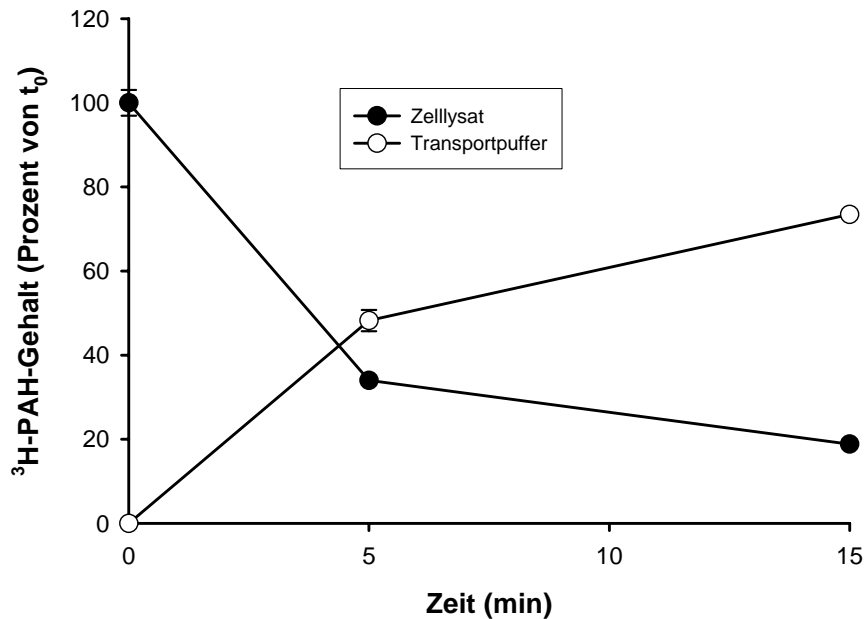


Abb. 27: PAH-Efflux aus hOAT1-exprimierenden HeLa-Zellen nach 5 und 15 Minuten: PAH-Gehalt in Zellysat und Transportpuffer. Zuvor wurde eine 60minütige Präinkubation mit PAH durchgeführt, um eine ausreichende intrazelluläre PAH-Akkumulation zu erreichen (n=3).

Da aufgrund dieses rapiden Verlusts von [^3H]PAH selbst fünf Minuten als Zeitintervall für die Efflux-Experimente zu lange war, wurde eine weitere Untersuchung mit kürzeren Intervallen durchgeführt: 1, 3, 7 Minuten. Zusätzlich wurde auch hier nach einstündiger Präinkubation mit $0.2\mu\text{M}$ [^3H]PAH in Transportpuffer und anschließendem Spülen der [^3H]PAH-Gehalt zum Zeitpunkt t_0 durch Messung der Aktivität bestimmt.

Aufgrund der kürzeren Zeitintervalle fiel der Verlust von [^3H]PAH durch Leck wesentlich geringer aus als zuvor (Abb.28). Daher wurde für die folgenden Transstimulations-Experimente drei Minuten als Zeitintervall gewählt.

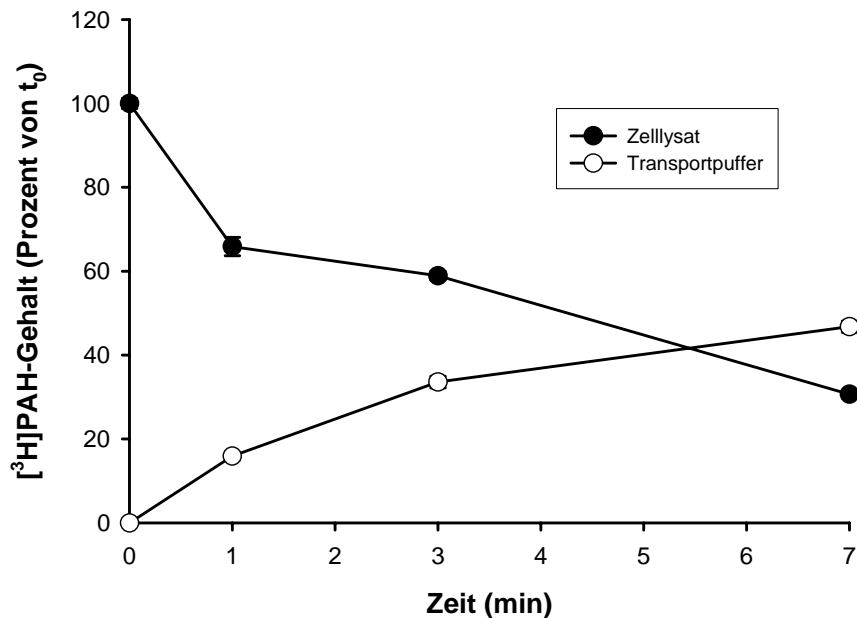


Abb. 28: Zeitverlauf des PAH-Effluxes aus hOAT1-exprimierenden HeLa-Zellen (1, 3, 7 Minuten): PAH-Gehalt in Zellysat und Transportpuffer. Zuvor wurde eine 60minütige Präinkubation mit PAH durchgeführt, um eine ausreichende intrazelluläre PAH-Akkumulation zu erreichen (n=3).

c) Transstimulation des PAH-Effluxes durch PAH, reduziertes und oxidiertes DMPS

Um letztlich herauszufinden, ob DMPS aktiv als Substrat von hOAT1 transportiert wird, sollte untersucht werden, ob DMPS den Efflux von $[^3\text{H}]\text{PAH}$ trans-stimulieren kann. Wie oben bereits beschrieben wurde, wäre eine erfolgreiche Transstimulation des $[^3\text{H}]\text{PAH}$ -Effluxes durch einen einwärts gerichteten DMPS-Gradienten ein Nachweis, dass DMPS an hOAT1 gegen $[^3\text{H}]\text{PAH}$ ausgetauscht wurde und damit selbst aktiv transportiert wurde.

Dazu wurden die hOAT1-transfizierten HeLa-Zellen zunächst genauso behandelt wie im vorhergehenden Experiment (Präinkubation in $0.2\mu\text{M}$ $[^3\text{H}]\text{PAH}$; Spülen mit

Transportpuffer). Allerdings enthielt die Pufferlösung während des anschließenden Transportintervalls von drei Minuten jeweils folgenden Verbindungen: PAH (100 μ M, Positiv-Kontrolle), reduziertes DMPS (0.4mM), oxidiertes DMPS (1mM DMPS-Äquivalente). Da das Hg-DMPS-Chelat bereits an Oozyten keinerlei Affinität zu hOAT1 zeigte und damit auch nicht von hOAT1 transportiert werden kann, wurde ein aufwendiger Efflux-Versuch mit HeLa-Zellen an dieser Stelle nicht mehr vorgenommen. Zusätzlich wurde als Kontrolle reiner Transportpuffer verwendet. Nach drei Minuten wurden die Zellen mit eiskaltem Transportpuffer gespült, lysiert und die Menge des in den Zellen verbliebenen [3 H]PAH durch Messung der Aktivität bestimmt.

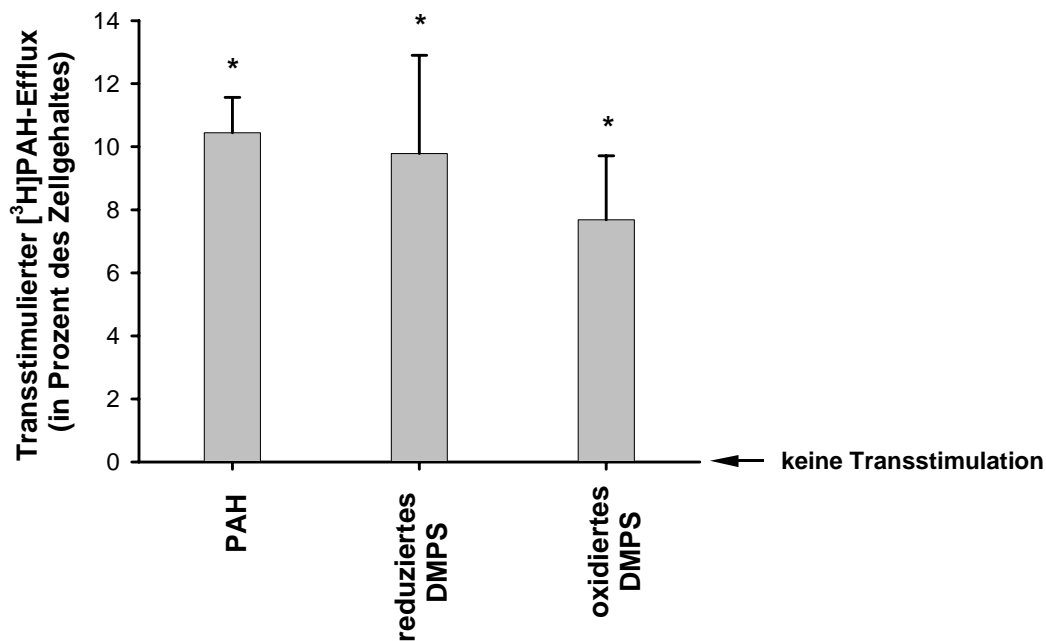


Abb. 29: Anteil des PAH-Effluxes aus hOAT1-exprimierenden HeLa-Zellen, der durch extrazelluläres PAH (0.1mM) sowie reduziertes (0.4mM) und oxidiertes (1mM DMPS-Äquivalente) DMPS in drei Minuten transstimulierbar war. Zuvor wurde eine 60minütige Präinkubation mit PAH durchgeführt, um eine ausreichende intrazelluläre PAH-Akkumulation zu erreichen (n=9). * = $p < 0.05$ gegen Kontrolle (kein extrazelluläres Substrat).

Wie zu erwarten war, stimulierte PAH als bekanntes Substrat den Efflux des intrazellulär akkumulierten [³H]PAH – daher war der nach drei Minuten übrige [³H]PAH-Gehalt im Zelllysate signifikant niedriger als unter Kontrollbedingungen ohne extrazelluläres stimulierendes Substrat. Die Differenz zwischen beiden Werten stellt denjenigen Anteil des [³H]PAH-Effluxes dar, der auf die Transstimulation des PAH-Transports an hOAT1 zurückzuführen ist.

Ebenso zeigte sich, dass der [³H]PAH-Gehalt im Zelllysate auch bei Anwesenheit von reduziertem und oxidiertem DMPS gegenüber der Kontrolle ohne extrazelluläres Substrat signifikant abnahm und das gleiche Niveau erreichte wurde wie zuvor mit PAH. Daher war auch DMPS unabhängig vom Oxidationszustand in der Lage, den PAH-Transport an hOAT1 in gleicher Weise zu transstimulieren wie PAH.

3. OAT-K2 in *Xenopus laevis* Oozyten

Zunächst sollte in einem Experiment an *Xenopus laevis* Oozyten überprüft werden, ob OAT-K2 als Transporter in diesen Zellen aktiv ist. Dazu wurden OAT-K2-injizierte Oozyten für 60 Minuten in Transportpuffer inkubiert, welcher 0.8µM [³H]TCh enthielt. Als Kontrolle dienten H₂O-injizierte Oozyten, die unter identischen Bedingungen inkubiert wurden. Nach Abschluss des Transportintervalls wurden die Oozyten gespült, lysiert und die Radioaktivität des in den Oozyten enthaltenen [³H]TCh bestimmt.

Abbildung 30 zeigt, dass die OAT-K2-exprimierenden Oozyten signifikant mehr [³H]TCh akkumulierten als die OAT-K2-negativen Kontroll-Oozyten. Allerdings war der produzierte Unterschied (ca. 1.7-fach) nach 60 Minuten zu gering, um dieses System als Grundlage für weiterführende Untersuchungen zu OAT-K2 sinnvoll verwenden zu können.

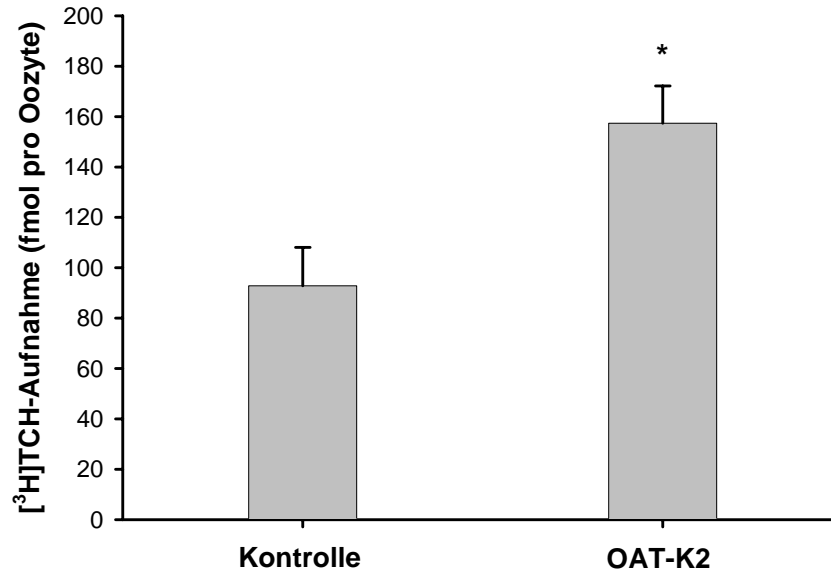


Abb. 30: TCh-Aufnahme in OAT-K2-exprimierende Oozyten über 60 Minuten (n=10). H₂O-injizierte Oozyten dienten als Kontrolle (n=5). * = p < 0.05 gegen Kontrolle.

4. OAT-K2 in MDCK-Zellen

TCh-Aufnahme

20 MDCK-Zell-Klone, die erfolgreich mit dem Konstrukt pcDNA3/OAT-K2 transfiziert wurden und daher in dem toxischen Selektivmedium wachsen konnten, sollten in einfachen Transportexperimenten mit dem bekannten OAT-K2-Substrat [³H]TCh auf OAT-K2-Expression gescreent werden. Dazu wurde pro Klon eine konfluente 6-Well-Platte verwendet: in drei Wells wurde mit 0.4µM [³H]TCh in Transportpuffer (32kBq/ml) der [³H]TCh-Transport untersucht. In weiteren drei Wells wurde zusätzlich 1mM unmarkiertes Taurocholol (TCh) zugegeben, um die Hemmbarkeit des Transportprozesses zu untersuchen. Die Experimente dauerten 60 Minuten und wurden bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde die in den Zellen akkumulierte Radioaktivität gemessen.

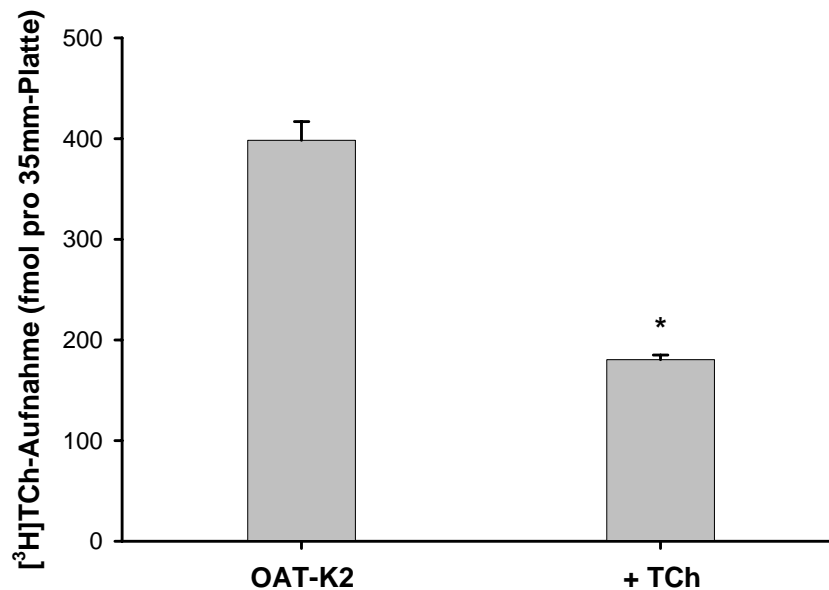


Abb. 31: [³H]TCh-Aufnahme in OAT-K2-transfizierte MDCK-Zellen und Einfluß von 1mM unmarkiertem Taurocholat (TCh) auf den Transport (n=3). * = p < 0.05 gegen OAT-K2.

Abbildung 31 veranschaulicht das Ergebnis des Screenings: zwar zeigten einige Klone eine signifikant inhibierbare [³H]TCh-Aufnahme, jedoch gilt auch hier (wie zuvor für OAT-K2 in Oozyten), dass der Anteil der Taurocholat-Akkumulation, der inhibierbar und damit auf einen Transport durch OAT-K2 zurückzuführen war, zu gering ist (vgl. (125)), um dieses Expressionssystem für weiterführende Untersuchungen zu OAT-K2 verwenden zu können.

5. Transepithelialer Transport von DMPS an OK-Zellen

Für die Untersuchung des transepithelialen Transports von reduziertem DMPS wurden OK-Zellen (134) auf Permeable Supports kultiviert.

Die Zellen bekamen basolateral im Transportpuffer entweder 0.5mM DMPS oder 0.5mM DMPS mit 10mM PAH angeboten. Die DMPS-Konzentration im apikalen Kompartiment wurden nach 15, 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten spektrometrisch bestimmt.

Aus Abbildung 32 geht hervor, dass die DMPS-Konzentration apikal über 150 Minuten linear anstieg, wenn basolateral kein PAH zugegeben wurde. Bei basolateraler Anwesenheit von PAH flachte die apikale DMPS-Akkumulation zunehmend ab: ein Teil des apikal vorhandenen DMPS war demnach von der Translokation durch den PAH-sensitiven Transporter OAT1 abhängig.

Dies zeigt, dass OAT1-exprimierende Tubuluszellen, wie z.B. OK-Zellen, unter in vitro-Bedingungen in der Lage sind, DMPS transzellulär zu sezernieren.

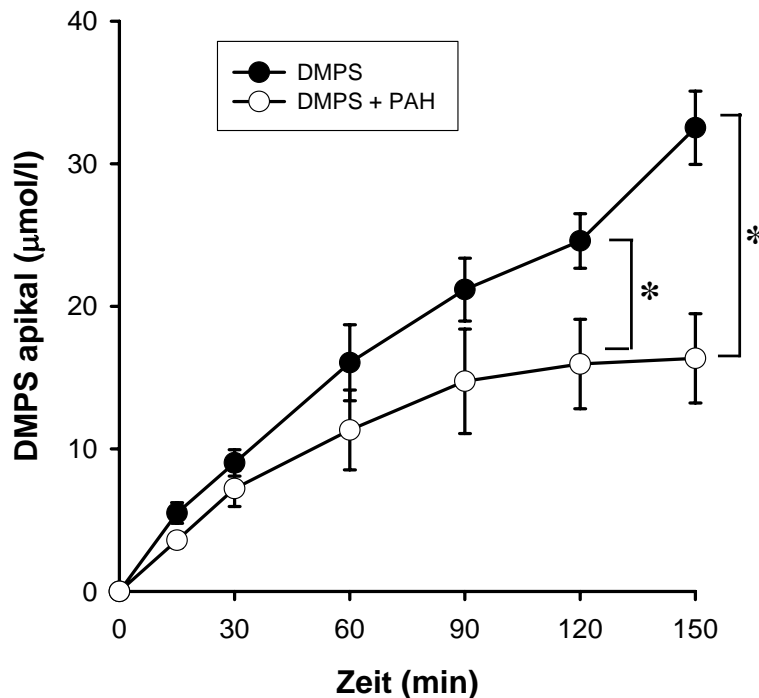


Abb. 32: Untersuchung des transepithelialen Transports von reduziertem DMPS an OK-Zellen. Zeitverlauf der DMPS-Akkumulation im apikalen Kompartiment eines Permeable Supports über 150 Minuten nach Angebot von 0.5mM reduziertem DMPS bzw. 0.5mM reduziertem DMPS + 10mM PAH im basolateralen Kompartiment (n=6). * = $p < 0.05$.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. hOAT1 konnte in *Xenopus laevis* Oozyten erfolgreich exprimiert werden und zeigte Transportaktivität ($K_m[\text{PAH}] = 3.9 \mu\text{M}$). Verschiedene organische Anionen hatten Affinität zu hOAT1 und hemmten den Transport von [^3H]PAH kompetitiv.
2. Sowohl reduziertes (monomeres) als auch oxidiertes (v.a. dimeres) DMPS hemmten den Transport von [^3H]PAH in Oozyten konzentrationsabhängig: K_i [red.DMPS bzw. ox.DMPS] = 22.4 bzw. 66.0 μM (DMPS-Äquivalente).
3. Bei Anwesenheit von 0.1mM Albumin verloren reduziertes und oxidiertes DMPS ihren hemmenden Effekt auf den [^3H]PAH-Transport in Oozyten – während Albumin per se keinen Effekt auf den [^3H]PAH-Transport hatte.
4. Im Gegensatz zu oxidiertem und reduziertem DMPS besaß das Hg-DMPS-Chelat keinen inhibierenden Effekt auf die [^3H]PAH-Aufnahme in Oozyten. Dagegen verringerte der toxische Effekt von 1 bzw. 5 μM freiem HgCl_2 den Transport um 50 bzw. 74%.
5. hOAT1 konnte auch in HeLa-Zellen erfolgreich exprimiert werden.
6. Oxidiertes und reduziertes DMPS waren wie PAH in der Lage, den Efflux von intrazellulärem [^3H]PAH aus HeLa-Zellen zu transstimulieren.
7. OAT-K2 konnte in Oozyten und MDCK-Zellen nicht ausreichend exprimiert werden, so dass keine weiterführenden Untersuchungen zur Interaktion von DMPS mit OAT-K2 möglich waren. Bei der Sequenzierung der OAT-K2-cDNA fiel auf, dass die verwendete cDNA neun Basenpaare weniger enthielt als die offizielle Genbank-Sequenz.

8. Reduziertes DMPS konnte von OK-Zellen transepithelial sezerniert werden, wobei ein Teil dieses Transports durch PAH inhibiert werden konnte.

IV. Diskussion

DMPS ist das Mittel der Wahl für die klinische Behandlung von Vergiftungen mit anorganischem Quecksilber, weil es nicht nur sehr gut verträglich und oral anwendbar, sondern auch sehr potent ist. Diese Wirksamkeit liegt neben der hohen Affinität von DMPS zu Quecksilber-Ionen (Hg^{2+}) und der äußerst festen Bindung zwischen beiden Partnern v.a. im effektiven Transport des Antidots an den Ort der stärksten Quecksilberakkumulation, nämlich die proximale Tubuluszelle der Niere, begründet. Zahlreiche Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung des „klassischen Organische-Anionen-Transporters OAT“ an diesem Vorgang hin (35-37) – allerdings wurde der Mechanismus der DMPS-Aufnahme in die Tubuluszelle bisher nicht aufgeklärt. Nach der Klonierung des menschlichen Orthologs des Dicarboxylat/Organische-Anionen-Austauschers (hOAT1) durch verschiedene Gruppen (23-27), war es nun erstmals möglich, die direkte Interaktion des Antidots DMPS mit hOAT1 zu untersuchen.

1. Expression von hOAT1 in Oozyten und HeLa-Zellen: Methode und Charakterisierung

Für die Expression von hOAT1 wurden zwei unterschiedliche Systeme gewählt: *Xenopus laevis* Oozyten und HeLa-Zellen. Aufgrund der detailliert beschriebenen Vor- und Nachteile (siehe Abschnitt II.3) wurden die Oozyten für die ausführliche Charakterisierung von hOAT1 verwendet, während die HeLa-Zellen in den Trans-stimulationsexperimenten zur Aufklärung der Art der Interaktion zwischen DMPS und hOAT1 dienten.

Oozyten

Zunächst wurde hOAT1 nach Expression in Oozyten unter den gegebenen Laborbedingungen funktionell charakterisiert indem Kinetik und Zeitverlauf am Beispiel

des bekannten Substrats PAH sowie die Substratspezifität des Transporters ermittelt wurden.

Die PAH-Aufnahme in die Oozyten verlief in den ersten 60 Minuten linear, d.h. es wurde kein Gleichgewichtszustand erreicht, in welchem intra- und extrazelluläres PAH so gegeneinander ausgetauscht werden, dass die Konzentration in den Oozyten konstant blieb. Da Untersuchungen der Kinetik und Substratspezifität eines Transportvorganges zeitlich sinnvollerweise innerhalb dieses linearen Bereiches liegen sollten, wurde für die folgenden Experimente mit hOAT1 in Oozyten 40 Minuten als Transportintervall gewählt. Darüber hinaus zeigte sich, dass die H₂O-injizierten Kontroll-Oozyten nahezu kein (<1% der extrazellulären PAH-Konzentration) PAH aufnahmen. Dies spricht zum einen dafür, dass die Oozyten nur eine äußerst geringe endogene Transportaktivität für organische Anionen wie PAH besitzen, was sie für diese Art von Transportexperimente sehr geeignet macht. Andererseits sind die niedrigen Werte aber auch als Bestätigung der angewandten Methode zu werten: durch die vorgenommenen Spülvorgänge konnte das oberflächlich haftende, Tritium-markierte PAH bis auf ein Minimum reduziert werden, wodurch die Hintergrundradioaktivität konstant niedrig blieb.

Für PAH wurde ein K_m -Wert von $3.9 \pm 1.3 \mu\text{M}$ ermittelt. Dieser Wert ist praktisch identisch mit den Ergebnissen von Cihlar et al. ($4 \mu\text{M}$; (27)) und Hosoyamada ($9 \mu\text{M}$; (23)) und veranschaulicht die hohe Affinität des organischen Anions PAH zu hOAT1.

Aus der Literatur ist bekannt, dass hOAT1 über eine sehr breite Substratspezifität verfügt – ein wesentliches Charakteristikum dieses Transporters. Auch nach Expression in Oozyten zeigte hOAT1 gute Affinität zu einer Reihe strukturell unterschiedlicher organischer Anionen, wie z.B. Probenecid, Fluorescein, Sulfobromophthalein (BSP), während das anionische Gallensäurederivat Taurocholat den PAH-Transport nur um 55% hemmte. Penizillin G zeigte hingegen keine statistisch signifikante Hemmung des PAH-Transportes. Dies steht im Einklang mit anderen Untersuchungen (24, 136), die zeigen, dass OAT1 zwar in der Lage ist, Penicillin G und andere β -Lactam-Antibiotika aktiv zu transportieren, die Affinität und Transportrate dieser Verbindungen durch OAT1 aber

sehr niedrig ist. Heute weiß man, dass Penicillin G hohe Affinität zu OAT3 hat, welches ebenfalls in der Niere exprimiert wird (siehe Abschnitt I.2): Kusuhara et al. (32) zeigten, dass 1mM Benzylpenicillin den Transport radioaktiv markierter Substrate durch OAT3 um ca. 90% hemmte. Daher dürfte OAT3 neben anderen renalen Transportproteinen eine wichtige Rolle bei der Ausscheidung von Penicillin spielen, während OAT1 eher von untergeordneter Bedeutung ist.

Wie zu erwarten war, hatte weder DMSA noch TEA einen inhibierenden Effekt auf die PAH-Aufnahme: das Kation Tetraethylammonium (TEA) ist das typische Substrat der „Organische-Kationen-Transporter“ (z.B. OCT1/2/3 (29)) und hat demnach aufgrund seiner chemischen Struktur keine Affinität zu einem Anionentransporter wie hOAT1 – daher wurde TEA in diesem Versuch als Negativ-Kontrolle verwendet. Der Weg des anionischen Schwermetallchelators DMSA (2,3-Dimercaptosuccinylsäure), der ebenso wie DMPS bei Vergiftungen mit anorganischem Quecksilber verwendet wird, in die Tubuluszelle ist bisher unbekannt. Eine Beteiligung von OAT1 am Wirkungsmechanismus des Antidots konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

HeLa-Zellen

Ebenso wurde die Expression und Transportaktivität von hOAT1 in transient transfizierten HeLa-Zellen überprüft. Auch hier konnten wesentliche Daten reproduziert werden: die hOAT1-transfizierten HeLa-Zellen akkumulierten im Gegensatz zu pcDNA3-transfizierten Kontrollzellen PAH. Diese Aufnahme konnte durch Anwesenheit einer hohen Konzentration von unmarkiertem PAH vollkommen kompetitiv inhibiert werden. Aufgrund der effizienten PAH-Aufnahme wurde auf eine transstimulierende Präinkubation mit Glutarat oder α -Ketoglutarat, wie sie gelegentlich zur Transportsteigerung praktiziert wird (24), verzichtet. Die Untersuchung des Zeitgangs der PAH-Aufnahme über 60 Minuten zeigte, dass die zelluläre PAH-Akkumulation bereits nach zehn Minuten ein Plateau erreicht hatte und sich bis zum 60-Minuten-Wert nicht mehr wesentlich änderte.

Zusammenfassend kann an dieser Stelle bemerkt werden, dass die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung von hOAT1 in Oozyten und HeLa-Zellen dem bereits bekannten Bild entsprechen und beide Expressionssysteme daher durchaus für die folgenden Untersuchungen an DMPS geeignet sind.

2. Interaktion von reduziertem und oxidiertem DMPS mit hOAT1

Es wurde der Einfluss von reduziertem und oxidiertem DMPS auf den [³H]PAH-Transport untersucht, um Aufschluss über den Weg des organischen Anions in die Tubuluszelle zu erhalten. DMPS liegt in seiner Grundform reduziert, d.h. als Monomer, vor – während es unter physiologischen Bedingungen, z.B. in der Blutbahn des Menschen, fast ausschließlich oxidiert, d.h. als Dimer, vorliegt (75, 100).

Die Untersuchungen an Oozyten zeigten, dass sowohl reduziertes als auch oxidiertes DMPS die [³H]PAH-Aufnahme konzentrationsabhängig blockierten. Berechnungen der K_i -Werte ergaben, dass DMPS in beiden Zustandsformen hohe Affinität zu hOAT1 hatte: $K_i(\text{red.DMPS}) = 22.4\mu\text{M}$ bzw. $K_i(\text{ox.DMPS}) = 66.0\mu\text{M DMPS-Äquivalente}$. Wie bereits zuvor ausgeführt, bestand oxidiertes DMPS überwiegend aus Dimeren (90%) und nur zu einem geringen Anteil aus höhermolekularen Oligomeren. Daher wurde aus Gründen der Genauigkeit die Einheit der „DMPS-Äquivalente“ gewählt, die der Konzentration des reduzierten DMPS vor der Oxidation entspricht. Jedoch ist die wahre Konzentration der DMPS-Moleküle in der oxidierten Lösung wesentlich geringer: da fast ausschließlich Dimere aus Monomeren entstanden, kann der K_i -Wert für oxidiertes DMPS auch annäherungsweise als 50% der DMPS-Äquivalente, d.h. ca. $33\mu\text{M}$ beschrieben werden. Dabei zeigt sich, dass die Affinitäten von reduziertem und oxidiertem DMPS zu hOAT1 durchaus vergleichbar sind. Dies erscheint auf den ersten Blick verwunderlich, denn beide Moleküle – das DMPS-Monomer und das cyclische Dimer – unterscheiden sich in ihrem Aufbau, dem Molekulargewicht und der Zahl der negativen Ladungen erheblich voneinander. Dennoch ist ihr Verhalten an hOAT1 bis zu diesem Punkt praktisch identisch. Zu diesem Zeitpunkt bestand aber noch keine Information darüber, ob DMPS

tatsächlich von hOAT1 transportiert wurde und die PAH-Aufnahme in die Oozyten kompetitiv hemmte oder ob lediglich eine Blockade des PAH-Transports durch feste Bindung von DMPS an hOAT1 und nachfolgende Konformationsänderung von hOAT1 ohne eigentlichen DMPS-Transport vorlag – dann wäre es durchaus möglich, dass die beiden unterschiedlichen Formen von DMPS (Monomer und Dimer) den Transporter durch Bindung mit identischen Gruppen inhibierten. Da bei den durchgeführten Influxexperimenten aber intrazellulär [³H]PAH und nicht DMPS nachgewiesen wurde, konnte mit Hilfe dieser Methode keine Aussage über die Art der Interaktion von DMPS mit hOAT1 (Transport oder feste Bindung) getroffen werden.

Eine Möglichkeit, die Art der Interaktion zu untersuchen, ist die Verwendung von radioaktiv markiertem DMPS, welches dann ebenso wie [³H]PAH direkt intrazellulär nachgewiesen werden kann. Allerdings ist die Synthese dieser Verbindung aufwendig und kostspielig, so dass für die Klärung der Frage nach dem Transport von DMPS eine andere, elegante Methode verwendet wurde: das Efflux-Experiment. Wie bereits im Abschnitt II.1 beschrieben wurde, liegt dem Efflux-Experiment das Prinzip der Transstimulation zugrunde: nur bei Anwesenheit eines Substrates von hOAT1 im Transportpuffer wird der Transport des zuvor intrazellulär akkumulierten PAH über die Zellmembran nach außen stimuliert und der Zellgehalt von PAH nimmt messbar ab. Im Gegensatz zum oben beschriebenen Influx-Experiment, in welchem eine Substanz durch einfache Bindung ohne Transport den Austausch cis-inhibieren konnte (wie z.B. BSP), kann die einfache Bindung ohne Transport den Transport nicht trans-stimulieren.

Die Auswertung dieser Transstimulationsexperimente an transient hOAT1-transfizierten HeLa-Zellen zeigte, dass reduziertes und oxidiertes DMPS in gleichem Maße in der Lage waren, den Efflux von zuvor intrazellulär akkumuliertem [³H]PAH zu stimulieren: die zelluläre Radioaktivität war nach drei Minuten bei Anwesenheit von DMPS in beiden Oxidationszuständen auf dem gleichen niedrigen Niveau wie bei der Positivkontrolle mit PAH. Dies lässt nur den Schluss zu, dass sowohl reduziertes als auch oxidiertes DMPS genau wie PAH aktiv gegen intrazelluläres [³H]PAH ausgetauscht wurde, wodurch der Anteil des intrazellulären [³H]PAH erniedrigt wurde.

Durch diesen indirekten Nachweis des aktiven Transports von DMPS durch hOAT1 – unabhängig vom Oxidationszustand der Verbindung – tritt auch hier wieder die Frage auf, warum zwei Moleküle wie das DMPS-Monomer und das Dimer trotz unterschiedlichen Gewichts, Ladung und Konformation ein so ähnliches Verhalten an hOAT1 zeigen konnten: beide Formen haben vergleichbare Affinität zu hOAT1 und werden darüber hinaus beide als Substrate für die aktive Translokation akzeptiert. Bei dieser Frage liegt das Augenmerk mehr auf der oxidierten Form, da das DMPS-Monomer aufgrund seiner einfach negativen Ladung und des Molekulargewichtes einem typischen Substrat von hOAT1 entspricht – während das Dimer davon abweicht. Allerdings gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass verschiedene Dicarboxylate neben α -Ketoglutarat (siehe Tab. 1, Abschnitt I.2) ebenfalls Substrate von OAT1 sind (15, 137). Abbildung 33 zeigt, dass der Abstand der beiden negativen Valenzen des cyclischen Dimers von DMPS interessanterweise bei 7Å (cis-Isomer) bzw. 8.5Å (trans-Isomer) liegt – und damit genau in dem Bereich, den die beiden Carboxylat-Reste der bekannten OAT1-Substrate Adipat (6.3Å) und Suberat (8.9Å) einschließen (29, 103, 138).

Ein weiteres Argument für das DMPS-Dimer als Substrat von hOAT1 liefert α -Ketoglutarat: dieses Molekül stellt im Normalfall das intrazellulär vorhandene Austausch-Anion für die extrazellulären Anionen an hOAT1 dar (siehe Abschnitt I.2) und ist selbst ein Dicarboxylat, d.h. besitzt zwei negative Valenzen. Vergleicht man die reelle sterische Konformation von α -Ketoglutarat mit der von cyclischem DMPS, fallen beachtliche Gemeinsamkeiten auf (Abb. 34):

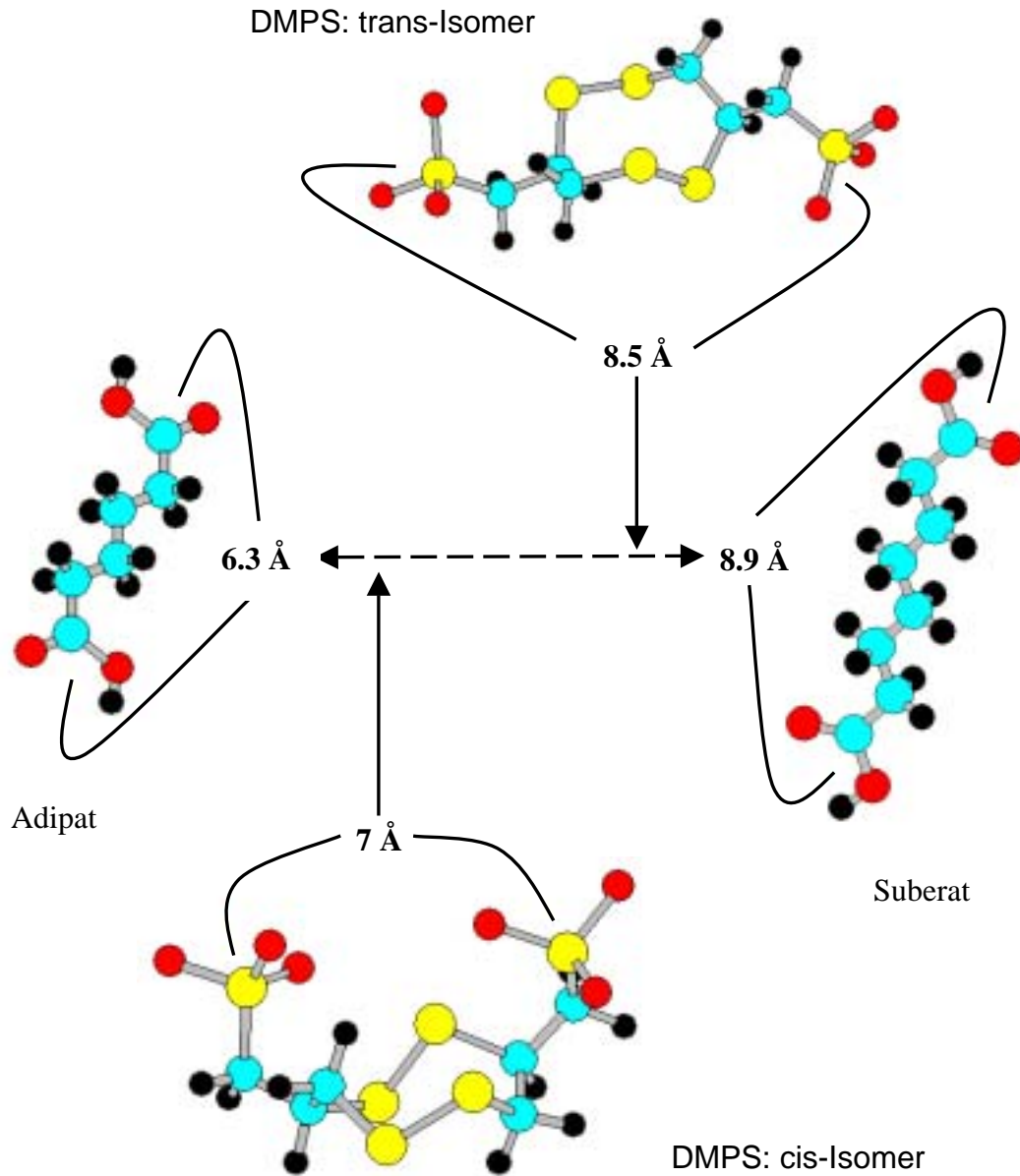


Abb. 33: Vergleich der Konformationen der Dicarboxylate und OAT1-Substrate Adipat und Suberat sowie der cis- und trans-Isomere von DMPS.

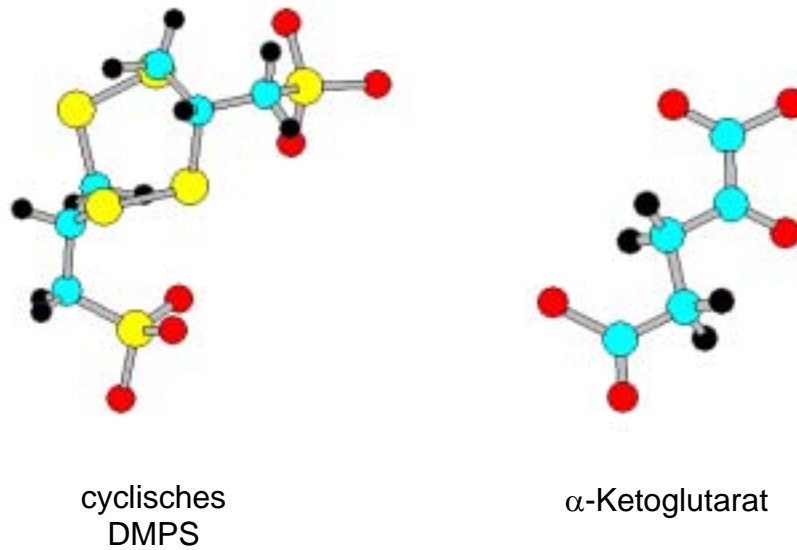


Abb. 34: Vergleich der sterischen Konformation von α -Ketoglutarat und cyclischem DMPS (cis-Form).

Daher erscheint es wahrscheinlich, dass hOAT1 zumindest das cyclische Dimer, welches die am weitesten häufiger vorkommende Dimer-Form von DMPS ist, aufgrund der dargestellten strukturellen Gemeinsamkeiten mit den genannten Dicarboxylaten als Substrat akzeptiert und sehr effizient in die Tubuluszelle transportiert (103).

3. Einfluss von Albumin auf den Transport von DMPS durch hOAT1

Wie bereits erläutert, ist DMPS im Blut überwiegend an Plasmabestandteile wie Cystein und Proteine gebunden (vgl. (103, 139)). Im Menschen ist DMPS zu ca. 80% an Albumin gebunden (139). Unsere Untersuchungen zeigen, dass bereits 0.1mM Albumin (physiologische Konzentration: 0.6mM) unter in-vitro-Bedingungen ausreichen, um die kompetitive Hemmung des PAH-Transports durch reduziertes und oxidiertes DMPS vollständig aufzuheben. Da 0.1mM Albumin per se keinerlei Auswirkung auf die PAH-

Aufnahme in die Oozyten hatte, war klar, dass dieser Effekt durch die Bindung von DMPS an Albumin zustande kam. Interessanterweise war auch hier das Verhalten von reduziertem und oxidiertem DMPS gleich, obwohl das überwiegend vorhandene cyclische Dimer von DMPS keine freien Thiol-Gruppen für die Ausbildung einer Disulfid-Brücken-Bindung mit den Thiol-Gruppen des Albumins hatte. Dennoch wurde auch die oxidierte Form so effizient von Albumin gebunden, dass der inhibierende Effekt auf den PAH-Transport vollständig aufgehoben wurde. Das widerspricht den Aussagen von Maiorino et al. (139), die Disulfid-Bindungen zwischen Albumin und DMPS postulierten, und bestätigt andere Untersuchungen, in denen sich zeigte, dass DMPS durch „lockere“ Bindungen an Proteine bindet und eine ausgeprägte Bildung von Disulfid-Bindungen nicht stattfindet (65, 103).

Dieses Verhalten von DMPS ist eine weitere wichtige Eigenschaft, die zu seiner bemerkenswerten Wirksamkeit beiträgt: im Plasma liegt DMPS locker an Albumin (und andere Plasmaproteine) gebunden vor, während es an hOAT1 in freier Form vorliegen muss, um in die proximale Tubuluszelle transportiert zu werden. Die lockere Bindung an Albumin ermöglicht ein schnelles Abdissoziieren von DMPS und den Austritt ins Interstitium. Durch die unmittelbare Nähe der renalen Kapillaren zu den proximalen Tubuli und den raschen Transport von freiem DMPS durch hOAT1 aus dem Interstitium in die Zelle wird ein DMPS-Konzentrationsgradient zwischen Interstitium und Blutbahn in Richtung des Interstitiums aufgebaut. Die schnelle Gleichgewichtseinstellung unterhält den fortlaufenden Austritt des dissoziierten DMPS aus den Kapillaren. Würde die Verbindung zwischen beiden Molekülen in Form einer potenten Disulfid-Bindung bestehen, wäre eine rasche Dissoziation von DMPS und Albumin in der Kapillare nicht möglich. Folglich könnte das DMPS-Gleichgewicht zwischen Interstitium und Blutgefäß nicht aufrecht erhalten werden und kein effizienter Transport des DMPS durch hOAT1 in die Tubuluszelle stattfinden (103) (vgl. schnelle Gleichgewichtseinstellung von Ochratoxin A an OAT1, Bahnemann et. al. (140)).

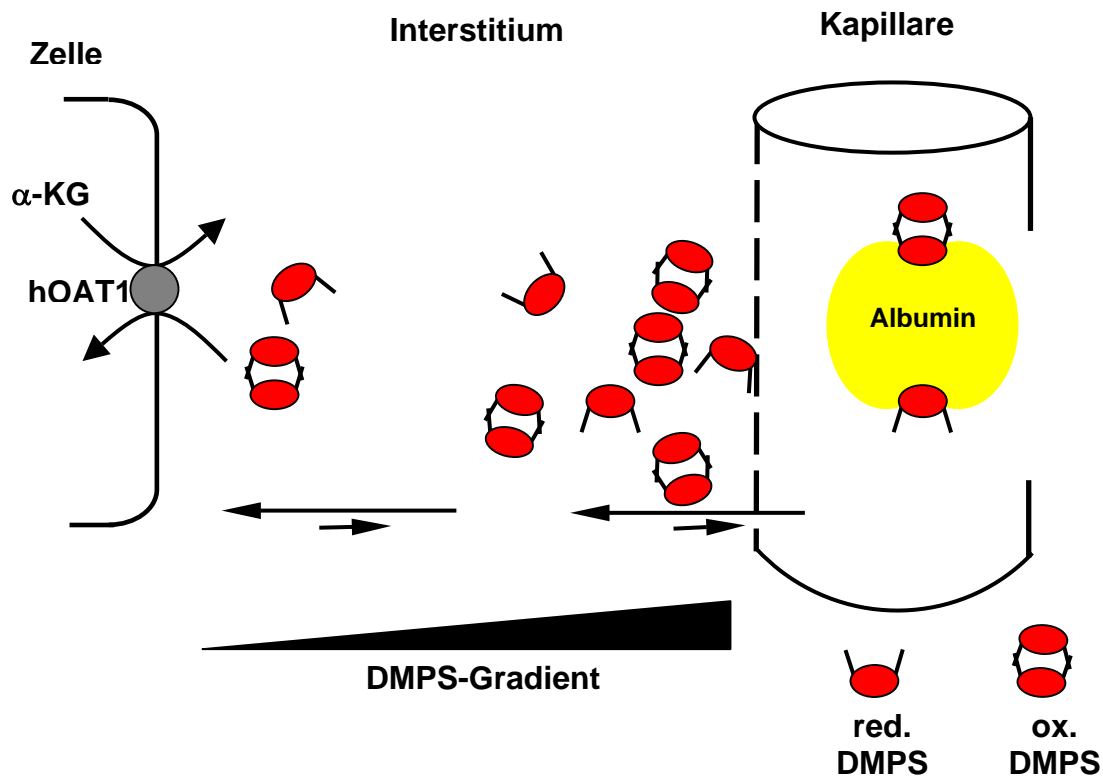


Abb. 35: Schema des DMPS-Transports zur proximalen Tubuluszelle: Die lockere Bindung von DMPS an Albumin ist die Grundlage der raschen Abdissoziation vom Trägermolekül Albumin in der Blutbahn und der schnellen Gleichgewichtseinstellung mit der DMPS-Konzentration im Interstitium der Niere. Diese wird durch den effizienten Transport von DMPS in die proximalen Tubuluszellen stets niedrig gehalten, wodurch sich das Fließgleichgewicht Richtung extravasal und intrazellulär verschiebt.

Darüber hinaus wird DMPS durch die Bindung an Plasmaproteine vor einer glomerulären Filtration und damit vor einer raschen Ausscheidung aus dem Körper unter Umgehung der Tubuluszellen, welche das Quecksilber speichern, bewahrt.

4. Interaktion des Hg-DMPS-Chelats mit hOAT1

Neben dem Verhalten von DMPS an hOAT1 ist auch die Frage nach einer möglichen Interaktion des sehr stabilen Hg-DMPS-Chelats mit hOAT1 aus mehreren Gründen von großem Interesse: zum einen könnte der basolaterale Transporter hOAT1 einen potentiellen Weg für intrazellulär komplexiertes Quecksilber aus der Zelle darstellen. Zum anderen könnte intravasal oder in anderen Geweben gebildetes Hg-DMPS-Chelat über hOAT1 in die Tubuluszelle aufgenommen und anschließend über einen apikalen Transportvorgang in den Urin sezerniert werden.

Unsere Untersuchungen zeigen jedoch, dass steigende Konzentrationen von anorganischem Quecksilber (HgCl_2) in einer DMPS-Lösung durch zunehmende Bildung des Hg-DMPS-Chelats bei gleichzeitiger Abnahme des freien (reduzierten) DMPS zu einer steigenden intrazellulären PAH-Akkumulation führte. Das bedeutet, dass das gebildete Chelat selbst keinen hemmenden Effekt auf den PAH-Transport hatte und durch Abnahme des freien DMPS immer weniger Substrat für die kompetitive Hemmung zur Verfügung stand. Damit kann festgestellt werden, dass das Hg-DMPS-Chelat im Gegensatz zu DMPS keine Affinität zu hOAT1 besitzt und daher auch kein Substrat des Transporters sein kann – weder für einen Transport in noch aus der Tubuluszelle. Dies steht im Einklang mit den bereits genannten Untersuchungen von Zalups et al. (37) an Kaninentubuli: dabei zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Perfusion des Tubuluslumens mit ^{203}Hg und DMPS kein Quecksilber in den Tubuluszellen akkumulierte, da der gebildete Quecksilber-DMPS-Komplex von keinem vorhandenen basolateralen Transporter, u.a. OAT1, transportiert wurde.

Die Tatsache, dass das Hg-DMPS-Chelat nicht durch hOAT1 transportiert wird und hOAT1 damit keinen Weg für das Chelat aus oder in die Tubuluszelle darstellt, ist eine weitere wichtige Ursache für die hohe Wirksamkeit von DMPS: zum einen bewahrt dies die bereits geschädigten Tubuluszellen vor einer weiteren, DMPS-vermittelten Quecksilber-Aufnahme bei Anwendung des Antidots. Zum anderen wird dadurch verhindert, dass das intrazellulär akkumulierte Quecksilber nach der Komplexbildung

durch DMPS über hOAT1 wieder aus der Niere zurück in den Kreislauf gelangt. Das ist ein wesentlicher Punkt, denn durch diese „Ventilfunktion“ von hOAT1 kann DMPS zwar über die basolaterale Membran in die Zelle gelangen, dem DMPS-gebundenen Quecksilber bleibt aber nur der Weg über die apikale Membran aus der Zelle in das Tubuluslumen und damit die Exkretion aus dem Körper. Der Weg des bereits intravasal vorhandenen Hg-DMPS-Chelats in den Urin ist bislang unbekannt – glomeruläre Filtration und anschließende Ausscheidung mit dem Urin stellt eine denkbare Möglichkeit dar (103).

5. Expression von OAT-K2 in Oozyten und MDCK-Zellen

Neben einer hohen Antidot-Konzentration am Ort der Vergiftung und einer stabilen Bindung des Schwermetalls ist auch eine effiziente Ausscheidung des gebildeten Schwermetall-Komplexes aus dem Organismus von wesentlicher Bedeutung für die Wirksamkeit eines Antidots. Im Falle von DMPS ist dies nachweislich gewährleistet: zahlreiche Untersuchungen (35, 81, 116) zeigten, dass nach Anwendung von DMPS die Quecksilberbelastung der Niere (und damit des ganzen Körpers) stark reduziert wird, während die Quecksilber-Konzentration im Urin in Form des Hg-DMPS-Chelats stark ansteigt. Allerdings ist der Weg des Chelats aus der Tubuluszelle in den Urin bisher unbekannt. Im vorherigen Abschnitt wurde bereits erläutert, dass der basolaterale Transporter hOAT1 keine Rolle bei der Sekretion des komplexierten Quecksilbers spielt. Ein anderer Weg könnte der apikal lokalisierte, passive Transporter OAT-K2 sein.

Die Expression von OAT-K2 sollte in zwei Systemen durchgeführt werden: *Xenopus laevis* Oozyten und MDCK-Zellen. Zwar konnte OAT-K2 sowohl in *Xenopus laevis* Oozyten als auch in MDCK-Zellen exprimiert werden, jedoch waren in beiden Expressionssystemen die gemessenen Transportraten für Taurocholat, ein typisches Substrat von OAT-K2 (125), zu gering, um damit sinnvolle Untersuchungen zu OAT-K2 und der Interaktion mit DMPS anstellen zu können. Wie im Abschnitt II.5 ausführlich beschrieben wurde, ergab die Sequenzierung der uns von Dr. Inui überlassenen OAT-K2-

cDNA, dass diese cDNA neun Basenpaare weniger enthielt als die offizielle Genbank-Sequenz (Nr. AB012662) für OAT-K2. Zusätzlich wurde die Nukleotid-Sequenz für OAT-K2 aus der RNA einer Tubuluszelle einer Wistar-Ratte ermittelt. Auch diese Sequenz, die sich nach RT-PCR und anschließender Sequenzierung der erhaltenen cDNA ergab, hatte an der gleichen Stelle neun Nukleotide weniger als die offizielle Sequenz. Damit kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Genbank-Sequenz fehlerhaft ist und neun Nukleotide zuviel aufweist.

Abschliessend kann jedoch angemerkt werden, dass MRP2 aufgrund seiner bereits ausführlich beschriebenen Eigenschaften und Fähigkeiten (siehe Abschnitt I.5) im Vergleich zu OAT-K2 den bei weitem aussichtsreicheren Kandidaten für die luminaire Exkretion des Hg-DMPS-Chelats darstellt. Zudem wurde das menschliche Ortholog von MRP2 bereits kloniert (120) – im Gegensatz zu OAT-K2, welches bislang einzig aus der Ratte isoliert wurde. Leider stand MRP2 für Untersuchungen zu diesem Thema nicht zur Verfügung, so dass bislang keine weiterführenden Aussagen zu einer Beteiligung von MRP2 am Wirkungsmechanismus des Schwermetallchelators DMPS gemacht werden können.

6. Untersuchung des transzellulären Transports von DMPS an OK-Zellen

OK-Zellen imitieren aufgrund ihres Ursprungs die realen Verhältnisse im proximalen Tubulus auf ideale Art und Weise: die polarisierten Zellen bilden durch ihre engen Schlussleisten eine zusammenhängende Schicht, die die transzelluläre Diffusion minimiert. Darüber hinaus besitzen die Zellen OAT1 in der basolateralen Membran. Aufgrund dieser Eigenschaften sind OK-Zellen ein gutes in-vitro-Modell für die Untersuchung des transepithelialen Transports von reduziertem DMPS. Dies ist von hoher physiologischer Relevanz, denn letztlich beweist nur der Nachweis eines möglichen transzellulären Transports von DMPS die Beteiligung von OAT1 am Sekretions- und Wirkmechanismus des Quecksilberantidots.

Bei der Untersuchung zeigte sich, dass OK-Zellen in der Lage waren, reduziertes DMPS transepithelial zu sezernieren. Ein Teil dieses DMPS-Transports konnte durch basolaterale Zugabe von PAH inhibiert werden und ist daher auf den aktiven Transport durch OAT1 zurückzuführen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass OAT1 in der Lage ist, reduziertes DMPS aktiv zu transportieren. Auch wenn über die sezernierenden Mechanismen in der apikalen Membran der OK-Zellen keine weiteren Angaben gemacht werden können, so zeigt dieses Ergebnis doch, dass apikal Transportsysteme vorhanden sind, die DMPS als Substrat akzeptieren.

Wie im Abschnitt II.6 beschrieben wurde, mußte auf Untersuchungen mit oxidiertem DMPS an dieser Stelle verzichtet werden, da kein geeignetes Nachweis-System dafür zur Verfügung stand.

7. Synopsis

Ziel dieser Arbeit war ein Beitrag zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus des Schwermetallchelators DMPS: zum einen sollte eine mögliche Beteiligung des basolateralen Transportproteins hOAT1 am Transport des Quecksilber-Antidots an den Ort der Vergiftung – die proximale Tubuluszelle – untersucht werden. Zum anderen sollte geklärt werden, ob das apikale Kanalprotein OAT-K2 eine Rolle bei der Sekretion des Hg-DMPS-Komplexes in den Urin spielt. Letzteres war aufgrund der dargestellten Problematik leider nicht möglich.

Die dargestellten Ergebnisse lassen sich in folgendem Modell vereinigen: nach oraler Zufuhr und anschließender Resorption aus dem Darmlumen bzw. direkter intravenöser Verabreichung wird DMPS in der Blutbahn rasch zu Disulfiden (und höhermolekularen Verbindungen) oxidiert. Ein Großteil des DMPS liegt locker an Plasmaproteine (insbesondere Albumin) gebunden vor, was DMPS vor einer ungenutzten Ausscheidung durch glomeruläre Filtration unter Umgehung der Tubuluszellen bewahrt. Die lockere Bindung zwischen DMPS und Albumin ermöglicht eine rasche Dissoziation der beiden

Moleküle und einen Austritt von DMPS aus den Kapillaren ins Interstitium. Dies geschieht v.a. in der Niere, da sowohl das reduzierte (monomere) als auch das oxidierte (dimere) DMPS hohe Affinität zu hOAT1 haben: der basolaterale Transporter für organische Anionen verschiebt DMPS sehr effizient in die Epithelzellen des proximalen Tubulus – und damit an den Ort der höchsten Konzentration des anorganischen Quecksilbers. Dieser Transport aus dem Interstitium in den Intrazellulärraum schafft einen Konzentrationsgradienten für DMPS, welcher die Dissoziation von DMPS und Albumin in der Kapillare, den Austritt von DMPS aus der Kapillare in das Interstitium sowie die anschließende Diffusion von DMPS zur basolateralen Membran der Tubuluszellen unterstützt. In der Tubuluszelle bildet das zu einem geringeren Anteil monomer vorliegende, reduzierte DMPS direkt mit dem akkumulierten, anorganischen Quecksilber einen Komplex: das Hg-DMPS-Chelat. Die extrem hohe Affinität von DMPS zu Hg^{2+} ist nicht nur Ursache für die sehr hohe Stabilität des Chelats (Stabilitätskonstante $\sim 10^{42}$ (111)), sondern ermöglicht auch die Entfernung und Bindung des Quecksilbers von Proteinen und Enzymen, die dadurch regeneriert werden und ihre Funktion wieder aufnehmen können. Der Grossteil des DMPS wird jedoch nicht in reduzierter, sondern in oxidiert Form in die Tubuluszelle aufgenommen. Diese Disulfide werden allerdings in den Tubuluszellen durch eine Glutathion-abhängige Thiol-Disulfid-Austauschreaktion wieder zu wirksamen DMPS-Monomeren rückreduziert: Untersuchungen von Stewart, Diamond und Klotzbach (35, 36, 141) zeigten, dass die Niere in der Lage ist, DMPS-Disulfide durch eine Austauschreaktion mit reduziertem Glutathion zu DMPS-Monomeren zu reduzieren. In dieser Form kann DMPS, wie bereits beschrieben, intrazelluläres Quecksilber binden. Da das Hg-DMPS-Chelat kein Substrat von hOAT1 darstellt, wird ein Rücktransport des gebundenen Quecksilbers in den Körperkreislauf verhindert. Damit bleibt dem Chelat nur der Weg über einen apikal lokalisierten Transporter in den Urin und damit die Ausscheidung aus dem Körper. Obwohl eine Beteiligung von OAT-K2 an diesem Prozess nicht untersucht werden konnte, scheint es aufgrund des aktuellen Kenntnisstandes wahrscheinlicher, dass die ATP-verbrauchende Exportpumpe MRP2 eine Rolle bei der Sekretion des Chelats spielt: wie bereits beschrieben, kann MRP2 eine Vielzahl von Verbindungen transportieren, darunter Glutathion-Konjugate und

Glutathion-Disulfide (1, 118), und spielt eine wichtige Rolle bei der Ausscheidung des Hg-Glutathion-Konjugats aus den Hepatozyten in die Galle (124). Daher scheint auch die Ausscheidung des Hg-DMPS-Chelats in das Tubuluslumen durchaus naheliegend. Eine Beteiligung von MRP2 hätte einen weiteren wesentlichen Vorteil: im Gegensatz zu OAT-K2, welches dem Prinzip der „erleichterten Diffusion“ folgt und seine Substrate damit in beide Richtungen – je nach elektrochemischem Gradient – transportieren kann, arbeitet MRP2 als primär aktive Exportpumpe nur in einer Richtung, nämlich von intra- nach extrazellulär. Damit wäre ein Rücktransport des Hg-DMPS-Chelats in die Tubuluszelle nach erfolgter Sekretion in den Urin auf diesem Wege nicht möglich: MRP2 könnte in der apikalen Membran genau wie hOAT1 in der basolateralen Membran eine Art Ventilfunktion ausüben, die dem gebundenen Quecksilber keinen Weg zurück in den Organismus bietet. Quecksilber, das bereits intravasal oder in anderen Organen außer der Niere von DMPS gebunden wurde, sollte nach glomeruläre Filtration ausgeschieden werden (103), da ein Transport über hOAT1 nicht möglich ist. Auch hier würde die angesprochene Ventilfunktion von MRP2 in der luminalen Membran der Tubuluszellen eine Rückresorption des filtrierte Chelats in die Tubuluszellen verhindern.

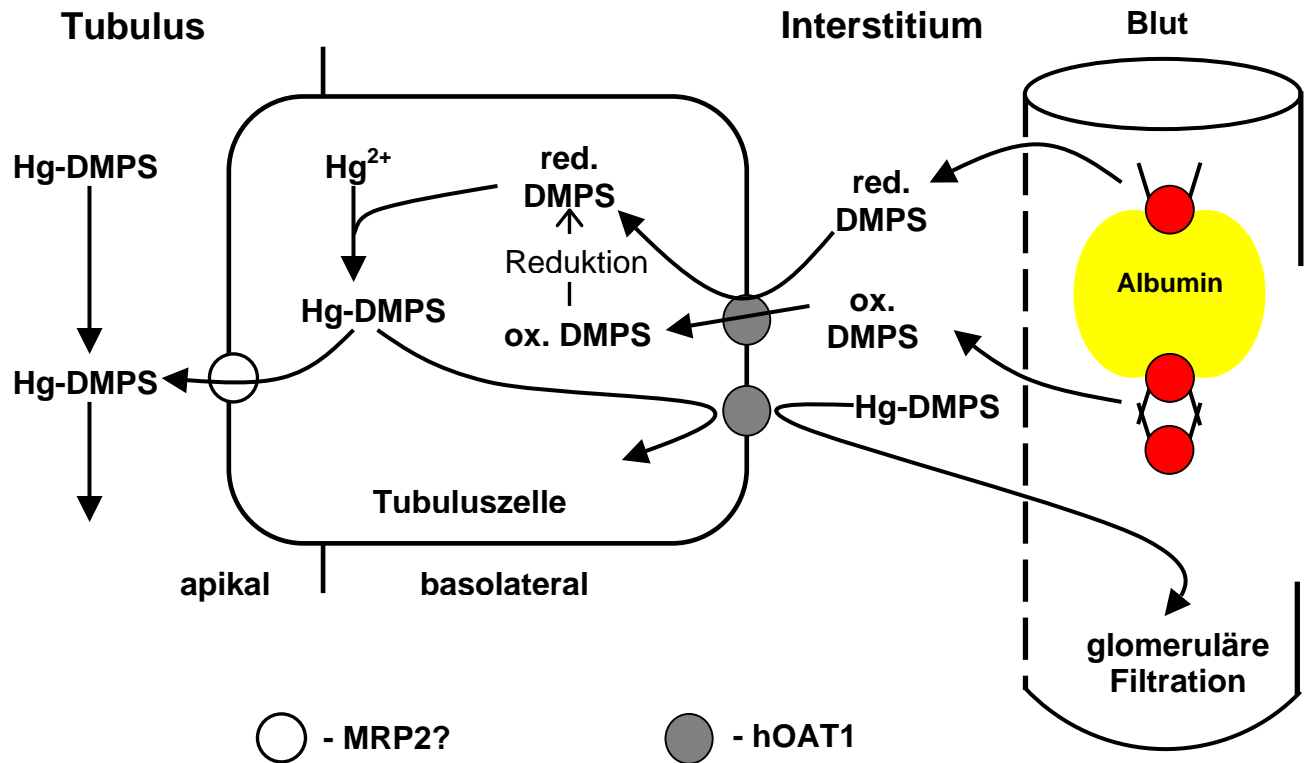


Abb. 36: Darstellung der molekularen Wirkungsweise des Quecksilberchelators DMPS. Nach dem Transport zur proximalen Tubuluszelle der Niere wird DMPS in reduzierter und oxidiertes Form durch hOAT1 in die Zelle transportiert. Dort bindet DMPS (oxidiertes DMPS nach Reduktion zum wirksamen monomeren DMPS) das toxische Quecksilber stabil und inaktiviert es damit. Da das Hg-DMPS-Chelat kein Substrat von OAT1 ist, wird ein Rücktransport in den Organismus verhindert. DMPS wird anschließend effizient mit dem Urin ausgeschieden: der apikal lokalisierte Transporter MRP2 könnte eine möglichen Weg für die luminalen Sekretion darstellen.

V. Zusammenfassung

Die Niere ist in der Lage, eine große Vielzahl endogener und exogener Verbindungen aus dem Körper zu eliminieren (1). Grundlage dieser Fähigkeit sind eine Reihe von membranösen Transportproteinen, die über sehr breite Substratspezifitäten verfügen: dabei spielt der tertiär aktive, basolateral lokalisierte Organische-Anionen-Transporter 1 (OAT1) eine entscheidende Rolle in diesem Transportsystem, indem er strukturell sehr unterschiedliche Verbindungen im Austausch gegen intrazelluläres α -Ketoglutarat in die Epithelzellen des proximalen Tubulus aufnimmt (1).

Die Ergebnisse verschiedener in-vivo und in-vitro Studien an Ratten (35), Hühnern (36) und Kaninchen (37) lassen den Schluss zu, dass OAT1 auch am Wirkmechanismus des Quecksilberantidots 2,3-Dimercapto-1-Propansulfonsäure (DMPS) entscheidend beteiligt ist: durch den Transport von DMPS ermöglicht OAT1 dem Antidot den Zugang zum primären Ort der Vergiftung mit anorganischem Quecksilber, der proximalen Tubuluszelle der Niere.

Fragestellung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine direkte Interaktion zwischen DMPS und OAT1 stattfindet und DMPS ein Substrat von OAT1 ist. Von entscheidendem Interesse war dabei die Frage, ob der Redoxzustand von DMPS (reduziert-monomer, oxidiert-dimer) einen Einfluß auf einen möglichen Transport durch OAT1 hat. Darüber hinaus sollte die Rolle von Albumin, welches unter physiologischen Bedingungen im Blutkreislauf des Menschen in hoher Konzentration vorhanden ist, bei diesem Vorgang geklärt werden.

Im zweiten Teil lag das Interesse auf den Mechanismen, die DMPS und v.a. den intrazellulär gebildeten Quecksilber-DMPS-Komplex (Hg-DMPS-Chelat) aus der Tubuluszelle sezernieren und damit aus dem Organismus eliminieren: zum einen sollte untersucht werden, ob das Hg-DMPS-Chelat ein Substrat von OAT1 ist und die Zelle

daher auf basolateralem Weg verlassen kann. Zum anderen sollte geklärt werden, ob DMPS und das Hg-DMPS-Chelat Substrate des apikal lokalisierten, passiven Transporters OAT-K2 („kidney-specific“ Organische-Anionen-Transporter 2) sind und auf diesem Weg direkt in das Tubulus-Lumen sezernieren werden können.

Ergebnisse

Für die in-vitro-Untersuchung der Transportvorgänge an hOAT1 (menschliches Ortholog von OAT1) und OAT-K2 wurden verschiedene experimentelle Systeme verwendet, die aufgrund ihrer Eigenschaften für die jeweilige Fragestellung besonders geeignet waren:

- *Xenopus laevis* Oozyten und MDCK-Zellen für Influxexperimente
- HeLa-Zellen für Effluxexperimente
- OK-Zellen für die Untersuchung des transepithelialen Transports

Die Untersuchung der Affinität von PAH zu hOAT1 an Oozyten ergab einen K_m -Wert von $3.9\mu\text{M}$, welcher mit den Ergebnissen verschiedener publizierter in-vitro-Studien übereinstimmt (23, 27). Weiterhin zeigte hOAT1 die erwartete breite Substratspezifität: der PAH-Transport in die Oozyten wurde durch eine Reihe organischer Anionen inhibiert.

Ebenso war auch das organische Anion DMPS sowohl in reduzierter als auch in oxidierter Form in der Lage, den Transport von PAH kompetitiv zu hemmen: K_i (reduziertes DMPS) = $22.4\mu\text{M}$ bzw. K_i (oxidiertes DMPS) = $66.0\mu\text{M}$ DMPS-Äquivalente.

Bei Anwesenheit von 0.1mM Albumin erlosch die Hemmung des PAH-Transports durch reduziertes und oxidiertes DMPS vollständig. Albumin alleine hatte hingegen keinen Einfluß auf den PAH-Transport durch hOAT1.

Die Transstimulations-Experimente an hOAT1-transfizierten HeLa-Zellen zeigten, dass reduziertes und oxidiertes DMPS den Efflux von PAH stimulieren konnten: innerhalb

von drei Minuten wurden so 10 bzw. 8% des PAH-Zellgehaltes aktiv über hOAT1 aus der Zelle sezerniert.

Das Hg-DMPS-Chelat hatte im Gegensatz zu den beiden Einzelkomponenten Quecksilber und DMPS keinen hemmenden Einfluß auf den PAH-Transport in Oozyten. Damit hat der Komplex auch keine Affinität zu hOAT1, womit der basolaterale Weg für die Elimination des gebundenen Quecksilbers aus der Zelle keine Rolle spielt.

Untersuchungen an OAT-K2 konnte mangels Expression des Transporters in Oozyten und MDCK-Zellen nicht durchgeführt werden. Bei Sequenzierungen zeigte sich aber, dass sowohl die von Dr. Inui übersendete OAT-K2-cDNA als auch die präparierte mRNA einer Rattentubuluszelle neun Basenpaare weniger enthielt als die offizielle Genbank-Sequenz ausweist.

OK-Zellen, die OAT1 aufgrund ihres Ursprungs aus dem proximalen Tubulus des Opossums endogen exprimieren, waren in der Lage, reduziertes DMPS transzellulär zu sezernieren. Nach 150 Minuten waren 50% dieses Transports durch PAH hemmbar. Damit zeigte sich nicht nur, dass hOAT1 DMPS als Substrat für den Transport über die basolaterale Membran akzeptiert, sondern darüber hinaus auch, dass in der apikalen Membran der Tubuluszelle Transporter lokalisiert sind, die DMPS in das Tubuluslumen sezernieren können.

Schlußfolgerung

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass hOAT1 eine tragende Rolle im Wirkmechanismus des Quecksilberantidots DMPS spielt: hOAT1 ist entscheidend am Transport von DMPS an der Ort der Vergiftung, die proximale Tubuluszelle, beteiligt. Dabei spielt es keine Rolle, ob die reduzierte oder oxidierte Form am Transporter vorliegt, da beide nachweislich Substrate von hOAT1 sind. Von wesentlicher Bedeutung ist die lockere Bindung von DMPS an Albumin, die DMPS einerseits vor einer raschen glomerulären Filtration bewahrt, andererseits aber durch einfaches Abdiffundieren eine rasche Gleichgewichtseinstellung mit dem perivaskulären Intersitium der Niere und

anschließenden Transport in die Tubuluszelle erlaubt. Das intrazellulär gebildete Hg-DMPS-Chelat hat im Gegensatz zu DMPS keine Affinität zu hOAT1, wodurch eine Rückkehr des mobilisierten Quecksilbers in den Körperkreislauf auf diesem Weg verhindert wird.

Wie das Hg-DMPS-Chelat die Tubuluszelle letztlich verläßt konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Auch wenn Untersuchungen am apikalen Transporter OAT-K2 nicht möglich waren, wird aufgrund der derzeitigen Datenlage ohnehin der primär aktive apikale Transporter MRP2 favorisiert.

VI. Literatur

1. Van Aubel RA, Masereeuw R, Russel FG. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279(2): F216-32.
2. Heidenhain R. Versuche über den Vorgang der Harnabsonderung. *Pflügers Arch.* 1874; 9: 1-27.
3. Rowntree LG, Geraghty JT. An experimental and clinical study of the functional activity of the kidneys by means of phenolsulphonephthalein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1909; 1: 579-661.
4. Marshall EK, Jr., Vickers JL. The mechanism of the elimination of phenolsulphonephthalein by the kidney - a proof of secretion by the convoluted tubules. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 1923; 34: 1-7.
5. Shannon JA. The excretion of phenol red by the dog. *Am. J. Physiol.* 1935; 113: 602-610.
6. Shannon JA. Renal tubular excretion. *Physiol. Rev.* 1939; 19: 63-93.
7. Smith HW, Goldring W, Chassis H. The measurement of the tubular excretory mass, effective blood flow, and filtration rate in the normal human kidney. *J. Clin. Invest.* 1938; 17: 263-278.
8. Smith HW. *The Kidney: Structure and Function in Health Disease.* New York: Oxford University Press; 1951.

9. Smith HW, Finkelstein H, Alimososa L, Crawford B, Graber M. The renal clearance of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acid in the dog and man. *J. Clin. Invest.* 1945; 24: 388-404.
10. Weiner IM. *Handbook of Physiology, Section 8: Renal Physiology*. Washington, D.C.; 1973.
11. Fritzsich G, Rumrich G, Ullrich KJ. Anion transport through the contraluminal cell membrane of renal proximal tubule. The influence of hydrophobicity and molecular charge distribution on the inhibitory activity of organic anions. *Biochim Biophys Acta* 1989; 978(2): 249-56.
12. Ullrich KJ, Rumrich G. Contraluminal transport systems in the proximal renal tubule involved in secretion of organic anions. *Am J Physiol* 1988; 254(4 Pt 2): F453-62.
13. Sweet DH, Pritchard JB. The molecular biology of renal organic anion and organic cation transporters. *Cell Biochem Biophys* 1999; 31(1): 89-118.
14. Burckhardt G. Sodium-dependent dicarboxylate transport in rat renal basolateral membrane vesicles. *Pflugers Arch* 1984; 401(3): 254-61.
15. Shimada H, Moewes B, Burckhardt G. Indirect coupling to Na⁺ of p-aminohippuric acid uptake into rat renal basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 1987; 253(5 Pt 2): F795-801.
16. Pritchard JB. Coupled transport of p-aminohippurate by rat kidney basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 1988; 255(4 Pt 2): F597-604.

17. Pajor AM. Sequence and functional characterization of a renal sodium/dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 1995; 270(11): 5779-85.
18. Pajor AM. Molecular cloning and functional expression of a sodium-dicarboxylate cotransporter from human kidney. *Am J Physiol* 1996; 270(4 Pt 2): F642-8.
19. Sekine T, Cha SH, Hosoyamada M, *et al.* Cloning, functional characterization, and localization of a rat renal Na⁺-dicarboxylate transporter. *Am J Physiol* 1998; 275(2 Pt 2): F298-305.
20. Sweet DH, Wolff NA, Pritchard JB. Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney. *J Biol Chem* 1997; 272(48): 30088-95.
21. Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem* 1997; 272(30): 18526-9.
22. Wolff NA, Werner A, Burkhardt S, Burckhardt G. Expression cloning and characterization of a renal organic anion transporter from winter flounder. *FEBS Lett* 1997; 417(3): 287-91.
23. Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H. Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol* 1999; 276(1 Pt 2): F122-8.

24. Lu R, Chan BS, Schuster VL. Cloning of the human kidney PAH transporter: narrow substrate specificity and regulation by protein kinase C. *Am J Physiol* 1999; 276(2 Pt 2): F295-303.
25. Race JE, Grassl SM, Williams WJ, Holtzman EJ. Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3). *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255(2): 508-14.
26. Reid G, Wolff NA, Dautzenberg FM, Burckhardt G. Cloning of a human renal p-aminohippurate transporter, hROAT1. *Kidney Blood Press Res* 1998; 21(2-4): 233-7.
27. Cihlar T, Lin DC, Pritchard JB, *et al.* The antiviral nucleotide analogs cidofovir and adefovir are novel substrates for human and rat renal organic anion transporter 1. *Mol Pharmacol* 1999; 56(3): 570-80.
28. Lopez-Nieto CE, You G, Bush KT, *et al.* Molecular cloning and characterization of NKT, a gene product related to the organic cation transporter family that is almost exclusively expressed in the kidney. *J Biol Chem* 1997; 272(10): 6471-8.
29. Burckhardt G, Wolff NA. Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278(6): F853-66.
30. Simonson GD, Vincent AC, Roberg KJ, Huang Y, Iwanij V. Molecular cloning and characterization of a novel liver-specific transport protein. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 4): 1065-72.

31. Sekine T, Cha SH, Tsuda M, *et al.* Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. *FEBS Lett* 1998; 429(2): 179-82.
32. Kusuhara H, Sekine T, Utsunomiya-Tate N, *et al.* Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J Biol Chem* 1999; 274(19): 13675-80.
33. Cha SH, Sekine T, Kusuhara H, *et al.* Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J Biol Chem* 2000; 275(6): 4507-12.
34. Apiwattanakul N, Sekine T, Chairoungdua A, *et al.* Transport properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by organic anion transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* 1999; 55(5): 847-54.
35. Klotzbach JM, Diamond GL. Complexing activity and excretion of 2,3-dimercapto-1-propane sulfonate in rat kidney. *Am J Physiol* 1988; 254(6 Pt 2): F871-8.
36. Stewart JR, Diamond GL. Renal tubular secretion of the alkanesulfonate 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate. *Am J Physiol* 1987; 252(5 Pt 2): F800-10.
37. Zalups RK, Parks LD, Cannon VT, Barfuss DW. Mechanisms of action of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate and the transport, disposition, and toxicity of inorganic mercury in isolated perfused segments of rabbit proximal tubules. *Mol Pharmacol* 1998; 54(2): 353-63.

38. ATSDR. Toxicological Profile for Mercury. *US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substance and Disease Registry* 1994; TP-93/10.
39. Zalups RK. *Renal Toxicity of Mercury*. In: Goldstein RS, ed. *Comprehensive Toxicology*. Vol. 7. Renal Toxicology. New York; 1997: 633-651.
40. WHO. *Environmental Health Criteria 118: Inorganic Mercury*. Geneva: World Health Organization; 1991.
41. Henschler D. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 7 edn: Spektrum; 1996.
42. Zalups RK, Lash LH. Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. *J Toxicol Environ Health* 1994; 42(1): 1-44.
43. Zalups RK. Basolateral uptake of inorganic mercury in the kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 151(1): 192-9.
44. Zalups RK. Early aspects of the intrarenal distribution of mercury after the intravenous administration of mercuric chloride. *Toxicology* 1993; 79(3): 215-28.
45. Hultman P, Enestrom S. Localization of mercury in the kidney during experimental acute tubular necrosis studied by the cytochemical Silver Amplification method. *Br J Exp Pathol* 1986; 67(4): 493-503.

-
46. Zalups RK. Autometallographic localization of inorganic mercury in the kidneys of rats: effect of unilateral nephrectomy and compensatory renal growth. *Exp Mol Pathol* 1991; 54(1): 10-21.
47. Zalups RK. Method for studying the in vivo accumulation of inorganic mercury in segments of the nephron in the kidneys of rats treated with mercuric chloride. *J Pharmacol Methods* 1991; 26(2): 89-104.
48. Lash LH, Jones DP. Distribution of oxidized and reduced forms of glutathione and cysteine in rat plasma. *Arch Biochem Biophys* 1985; 240(2): 583-92.
49. Dantzler WH, Evans KK, Wright SH. Kinetics of interactions of para-aminohippurate, probenecid, cysteine conjugates and N-acetyl cysteine conjugates with basolateral organic anion transporter in isolated rabbit proximal renal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272(2): 663-72.
50. Lash LH, Anders MW. Uptake of nephrotoxic S-conjugates by isolated rat renal proximal tubular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 248(2): 531-7.
51. Zalups RK, Barfuss DW. Participation of mercuric conjugates of cysteine, homocysteine, and N-acetylcysteine in mechanisms involved in the renal tubular uptake of inorganic mercury. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(4): 551-61.
52. Berndt WO, Baggett JM, Blacker A, Houser M. Renal glutathione and mercury uptake by kidney. *Fundam Appl Toxicol* 1985; 5(5): 832-9.

53. de Ceaurriz J, Payan JP, Morel G, Brondeau MT. Role of extracellular glutathione and gamma-glutamyltranspeptidase in the disposition and kidney toxicity of inorganic mercury in rats. *J Appl Toxicol* 1994; 14(3): 201-6.
54. Tanaka T, Naganuma A, Imura N. Role of gamma-glutamyltranspeptidase in renal uptake and toxicity of inorganic mercury in mice. *Toxicology* 1990; 60(3): 187-98.
55. Tanaka-Kagawa T, Naganuma A, Imura N. Tubular secretion and reabsorption of mercury compounds in mouse kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264(2): 776-82.
56. Zalups RK. Organic anion transport and action of gamma-glutamyl transpeptidase in kidney linked mechanistically to renal tubular uptake of inorganic mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 132(2): 289-98.
57. Zalups RK, Minor KH. Luminal and basolateral mechanisms involved in the renal tubular uptake of inorganic mercury. *J Toxicol Environ Health* 1995; 46(1): 73-100.
58. Zalups RK, Barfuss DW. Renal disposition of mercury in rats after intravenous injection of inorganic mercury and cysteine. *J Toxicol Environ Health* 1995; 44(4): 401-13.
59. Zalups RK, Barfuss DW. Pretreatment with p-aminohippurate inhibits the renal uptake and accumulation of injected inorganic mercury in the rat. *Toxicology* 1995; 103(1): 23-35.
60. Zalups RK, Barfuss DW. Nephrotoxicity of inorganic mercury co-administrated with L-cysteine. *Toxicology* 1996; 109(1): 15-29.

61. Zalups RK, Lash LH. Binding of mercury in renal brush-border and basolateral membrane-vesicles. *Biochem Pharmacol* 1997; 53(12): 1889-900.
62. Madsen KM. Mercury accumulation in kidney lysosomes or proteinuric rats. *Kidney Int* 1980; 18(4): 445-53.
63. Madsen KM, Hansen JC. Subcellular distribution of mercury in the rat kidney cortex after exposure to mercuric chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 54(3): 443-53.
64. Aposhian HV, Bruce DC, Alter W, *et al.* Urinary mercury after administration of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid: correlation with dental amalgam score. *Faseb J* 1992; 6(7): 2472-6.
65. Ruprecht J. Dimaval (DMPS). *Heyltex Corporation, Houston, TX* 1997.
66. Kistner A. Quecksilbervergiftung durch Amalgam: Diagnose und Therapie. *ZWR* 1995; 104: 412-417.
67. Schleicher W. *Untersuchungen zur Verteilung und Dekorporation von anorganischem Quecksilber. In-vivo-Versuche mit Ratten, in-vitro-Experimente mit Humanserum*; 1977.
68. Gleason MN, Gosselin RE, Hodge DC. *Clinical Toxicology of Commercial Products*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1957.
69. Fukino H, Hirai M, Hsueh YM, Yamane Y. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 73(3): 395-401.

70. Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P. Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol* 1983; 32(19): 2969-72.
71. Woody NC, Kometani JT. BAL in treatment of arsenic ingestion of children. *Pediatrics* 1948; 1: 372-378.
72. Longcope WT, Luetscher JA, Wintrobe MM, Jager V. Clinical uses of 2,3-dimercaptopropanol (BAL) on excretion of arsenic in arsenical intoxication. *J. Clin. Invest.* 1946; 25: 534.
73. Shannon MW, Graef J, Woolf A. The efficacy of d-penicillamine in children with very low level lead poisoning (Abstract). *Vet. Hum. Toxicol.* 1989; 31: 341.
74. Sue Y, Shannon MW, Graef J. Urine abnormalities in childhood plumbism after penicillamine (Abstract). *Vet. Hum. Toxicol.* 1991; 33: 393.
75. Hurlbut KM, Maiorino RM, Mayersohn M, *et al.* Determination and metabolism of dithiol chelating agents. XVI: Pharmacokinetics of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate after intravenous administration to human volunteers. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268(2): 662-8.
76. Aposhian HV. DMSA and DMPS--water soluble antidotes for heavy metal poisoning. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23: 193-215.

-
77. Aposhian HV, Aposhian MM. meso-2,3-Dimercaptosuccinic acid: chemical, pharmacological and toxicological properties of an orally effective metal chelating agent. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 279-306.
78. Jones MM. New developments in therapeutic chelating agents as antidotes for metal poisoning. *Crit Rev Toxicol* 1991; 21(3): 209-33.
79. Kemper FH, Jelat FW, Bertram HP, Eckard R. *New chelating agents. Basic Science in Toxicology, Proceedings of the 5th International Congress of Toxicology, England.* In: *New chelating agents. Basic Science in Toxicology, Proceedings of the 5th International Congress of Toxicology, England*; 1990; 1990.
80. Aposhian HV. Mobilization of mercury and arsenic in humans by sodium 2,3-dimercapto-1-propane sulfonate (DMPS). *Environ Health Perspect* 1998; 106 Suppl 4: 1017-25.
81. Gonzalez-Ramirez D, Zuniga-Charles M, Narro-Juarez A, *et al.* DMPS (2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate, dimaval) decreases the body burden of mercury in humans exposed to mercurous chloride. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287(1): 8-12.
82. Maiorino RM, Weber GL, Aposhian HV. Determination and metabolism of dithiol chelating agents. III. Formation of oxidized metabolites of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid in rabbit. *Drug Metab Dispos* 1988; 16(3): 455-63.
83. Monographie: Dimercaptopropansulfonsäure. *Bundesanzeiger* 13.10.1994.

84. Nadig J, Knutti R, Hany A. [DMSP treatment in acute sublimate (mercury chloride) poisoning]. *Schweiz Med Wochenschr* 1985; 115(15): 507-11.
85. Ludewig R, Lohs K. *Akute Vergiftungen-Ratgeber für toxikologische Notfälle*. Stuttgart: Gustav-Fischer-Verlag; 1988.
86. Schwohl T, Schroeder B, Müller-Esch G, Djongalic H. Zur Quecksilberelimination mittels Hämofiltration und Hämo-perfusion bei akuter Sublimatintoxikation. *Intensivmedizin* 1988; 25: 198-201.
87. Johary NS, Owen LN. Dithiols. Some water-soluble derivatives containing the sulphonic acid group. *J. Chem. Soc.* 1955: 1307-1311.
88. Hursh JB, Clarkson TW, Nowak TV, *et al.* Prediction of kidney mercury content by isotope techniques. *Kidney Int* 1985; 27(6): 898-907.
89. O'Connor RJ, McGown EL, Dill K, Hallowell SF. Relative binding constants of arsenical-antidote adducts determined by NMR spectroscopy. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1990; 69(3): 365-8.
90. Golota LG. Therapeutic and antidotal properties of Unithiol. *Farm. Zh.* 1980; 1: 18-22.
91. Lee V, Oberdoerster G. Effect of chelating agents on cadmium retention in rats after inhalation exposure. *8th Annual Report - Environmental Health Sciences Center at the University of Rochester* 1983: 85-87.

-
92. Hruby K, Donner A. 2,3-Dimercapto-1-propanesulphonate in heavy metal poisoning. *Med Toxicol Adverse Drug Exp* 1987; 2(5): 317-23.
93. Hopkins S. 2,3-Dimercaptopropane sodium sulphonate. *Drugs of the Future* 1981; 6: 75-77.
94. Zheng W, Maiorino RM, Brendel K, Aposhian HV. Determination and metabolism of dithiol chelating agents. VII. Biliary excretion of dithiols and their interactions with cadmium and metallothionein. *Fundam Appl Toxicol* 1990; 14(3): 598-607.
95. Jones MM, Weaver AD, Weller WL. The relative effectiveness of some chelating agents as antidotes in acute cadmium poisoning. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1978; 22(3): 581-8.
96. Planas-Bohne F, Gabard B, Schaffer EH. Toxicological studies on sodium 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate in the rat. *Arzneimittelforschung* 1980; 30(8): 1291-4.
97. McGown EL, Tillotson JA, Knudsen JJ, Dumlao CR. Biological behavior and metabolic fate of the BAL analogues DMSA and DMPS. *Proc West Pharmacol Soc* 1984; 27: 169-76.
98. Wiedemann P, Fichtl B, Szinicz L. Pharmacokinetics of ¹⁴C-DMPS (sodium-1,3-¹⁴C-2,3-dimercaptopropane-1-sulphonate) in beagle dogs. *Biopharm Drug Dispos* 1982; 3(3): 267-74.

99. Gabard B. Distribution and excretion of the mercury chelating agent sodium 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate in the rat. *Arch Toxicol* 1978; 39(4): 289-98.
100. Maiorino RM, Dart RC, Carter DE, Aposhian HV. Determination and metabolism of dithiol chelating agents. XII. Metabolism and pharmacokinetics of sodium 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259(2): 808-14.
101. Maiorino RM, Barry TJ, Aposhian HV. Determination and metabolism of dithiol-chelating agents: electrolytic and chemical reduction of oxidized dithiols in urine. *Anal Biochem* 1987; 160(1): 217-26.
102. Maiorino RM, Aposhian HV. Determination and metabolism of dithiol chelating agents. XVIII Comparison of the biotransformation of sodium 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate in humans after intravenous and oral administration. *Unpublished results* 1997.
103. Islinger F, Gekle M, Wright SH. Interaction of 2,3-dimercapto-1-propane sulfonate with the human organic anion transporter hOAT1. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299(2): 741-7.
104. Aposhian HV, Maiorino RM, Gonzalez-Ramirez D, *et al.* Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. *Toxicology* 1995; 97(1-3): 23-38.
105. Nigrovic V. Der Einfluss von Chelatbildnern auf das Verhalten von Quecksilber im Organismus. *Arzneim. Forsch.* 1963; 13: 787-792.

106. Jones MM, Basinger MA. A hypothesis for the selection of chelate antidotes for toxic metals. *Med Hypotheses* 1982; 9(5): 445-53.
107. Schunk W. [Therapy of occupational heavy metal poisoning]. *Z Gesamte Hyg* 1986; 32(8): 478-80.
108. Williams DR, Halstead BW. Chelating agents in medicine. *J Toxicol Clin Toxicol* 1982; 19(10): 1081-115.
109. Kaupp M, Kleine-Homann D. Chelating agents. *Heavy Metal Bulletin* 1995; 2: 19-21.
110. Basinger MA, Casas JS, Jones MM, Weaver DD. Structural requirements for Hg(II) antidotes. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1981; 43: 1419-1425.
111. Casas JS, Jones MM. Mercury(II) complexes with sulfhydryl containing chelating agents; Stability constant in consistencies and their resolutions. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1980; 42: 99-102.
112. Nukhin AN. Thermochemistry of unithiolate mercury (II) complexes in aqueous solution. *Russ. J. Inorg. Chem.* 1995; 40: 610-611.
113. Rabenstein DL, Isab AA. A proton nuclear magnetic resonance study of the interaction of mercury with intact human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1982; 721(4): 374-84.
114. Bertram HP. *Spurenelemente-Analytik, ökotoxikologische und medizinisch-klinische Bedeutung*: Urban & Schwarzenberg; 1992.

115. Zalups RK. Influence of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate (DMPS) and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) on the renal disposition of mercury in normal and uninephrectomized rats exposed to inorganic mercury. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267(2): 791-800.
116. Diamond GL, Klotzbach JM, Stewart JR. Complexing activity of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate and its disulfide auto-oxidation product in rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246(1): 270-4.
117. Keppler D, Leier I, Jedlitschky G, König J. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chem Biol Interact* 1998; 111-112: 153-61.
118. Buchler M, König J, Brom M, *et al.* cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 1996; 271(25): 15091-8.
119. Taniguchi K, Wada M, Kohno K, *et al.* A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 1996; 56(18): 4124-9.
120. Cui Y, König J, Buchholz JK, *et al.* Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 1999; 55(5): 929-37.

121. Kepler D, König J. Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *Faseb J* 1997; 11(7): 509-16.
122. van Aabel RA, van Kuijk MA, Koenderink JB, *et al.* Adenosine triphosphate-dependent transport of anionic conjugates by the rabbit multidrug resistance-associated protein Mrp2 expressed in insect cells. *Mol Pharmacol* 1998; 53(6): 1062-7.
123. Koike K, Kawabe T, Tanaka T, *et al.* A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57(24): 5475-9.
124. Sugawara N, Lai YR, Sugawara C, Arizono K. Decreased hepatobiliary secretion of inorganic mercury, its deposition and toxicity in the Eisai hyperbilirubinemic rat with no hepatic canalicular organic anion transporter. *Toxicology* 1998; 126(1): 23-31.
125. Masuda S, Ibaramoto K, Takeuchi A, *et al.* Cloning and functional characterization of a new multispecific organic anion transporter, OAT-K2, in rat kidney. *Mol Pharmacol* 1999; 55(4): 743-52.
126. Malo C, Berteloot A. Analysis of kinetic data in transport studies: new insights from kinetic studies of Na(+)-D-glucose cotransport in human intestinal brush-border membrane vesicles using a fast sampling, rapid filtration apparatus. *J Membr Biol* 1991; 122(2): 127-41.
127. Weber WM. Endogenous ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*: recent developments. *J Membr Biol* 1999; 170(1): 1-12.

128. Gekle M, Wunsch S, Oberleithner H, Silbernagl S. Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch* 1994; 428(2): 157-62.
129. Richardson JC, Scalera V, Simmons NL. Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochim Biophys Acta* 1981; 673(1): 26-36.
130. Cereijido M, Robbins ES, Dolan WJ, Rotunno CA, Sabatini DD. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol* 1978; 77(3): 853-80.
131. Misfeldt DS, Hamamoto ST, Pitelka DR. Transepithelial transport in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73(4): 1212-6.
132. Nakazato Y, Suzuki H, Saruta T. Characterization of subclones of Madin-Darby canine kidney renal epithelial cell line. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1014(1): 57-65.
133. Nichols GE, Lovejoy JC, Borgman CA, Sanders JM, Young WW, Jr. Isolation and characterization of two types of MDCK epithelial cell clones based on glycosphingolipid pattern. *Biochim Biophys Acta* 1986; 887(1): 1-12.
134. Sauvant C, Holzinger H, Gekle M. Modulation of the basolateral and apical step of transepithelial organic anion secretion in proximal tubular opossum kidney cells. Acute effects of epidermal growth factor and mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2001; 276(18): 14695-703.

-
135. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-77.
136. Jariyawat S, Sekine T, Takeda M, *et al.* The interaction and transport of beta-lactam antibiotics with the cloned rat renal organic anion transporter 1. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290(2): 672-7.
137. Sullivan LP, Grantham JJ. Specificity of basolateral organic anion exchanger in proximal tubule for cellular and extracellular solutes. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2(7): 1192-200.
138. Uwai Y, Okuda M, Takami K, Hashimoto Y, Inui K. Functional characterization of the rat multispecific organic anion transporter OAT1 mediating basolateral uptake of anionic drugs in the kidney. *FEBS Lett* 1998; 438(3): 321-4.
139. Maiorino RM, Xu ZF, Aposhian HV. Determination and metabolism of dithiol chelating agents. XVII. In humans, sodium 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate is bound to plasma albumin via mixed disulfide formation and is found in the urine as cyclic polymeric disulfides. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277(1): 375-84.
140. Bahnemann E, Kerling HP, Ensminger S, *et al.* Renal transepithelial secretion of ochratoxin A in the non-filtering toad kidney. *Toxicology* 1997; 120(1): 11-7.
141. Stewart JR, Diamond GL. In vivo renal tubular secretion and metabolism of the disulfide of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate. *Drug Metab Dispos* 1988; 16(2): 189-95.

VII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Bedanken, die mir während der Durchführung dieser Arbeit hilfreich und unterstützend zur Seite standen. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Gekle für die Überlassung des Dissertationsthemas und die gute Betreuung.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. S. Wright, der mir während der Durchführung der Studie stets hilfreich zur Seite stand.

Des weiteren möchte ich mich bei T. Wunz und Dr. D. Bednarczyk für die Betreuung in labortechnischen Fragen und die zahlreichen Anregungen während dieser Arbeit bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Koepsell möchte ich mich im Besonderen für die Übernahme des Korreferates bedanken.

Vor allem aber möchte ich mich bei meinen Eltern und Großeltern bedanken, die mich während all der Jahre des Studiums nach Kräften unterstützt haben.

Lebenslauf

von

Florian Islinger

Geburtstag: 28. April 1976

Geburtsort: Ansbach

Schulbildung: 1982 – 1986 Grundschule Ansbach
1986 – 1995 Platen-Gymnasium Ansbach

Schulabschluß: Abitur am 30. Juni 1995

Wehrdienst: 1995 – 1996 in Perleberg und Altstadt

Studium:

Mai 1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Würzburg
März 1998	Ärztliche Vorprüfung
März 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2001 – September 2002	Praktisches Jahr
1. Tertial:	Chirurgie: Yale Medical School, New Haven, USA
2. Tertial:	Pathologie: Yale Medical School, New Haven, USA
3. Tertial:	Innere Medizin: Medizinische Poliklinik der Universität Würzburg
Oktober 2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung