

Wege des Exports von Glutathion aus Astrocyten

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2008

vorgelegt von
Tobias Florian Minich

Tag der Prüfung: 18.7.2008
Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann
1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Hamprecht
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Wiesinger

Dem Andenken an jene meiner Familie,
die mich lange auf meinem Lebensweg begleitet haben
und gehen mussten, bevor dieses Werk vollendet wurde.

Günther Schwalbe

Adam Minich

Erich Minich

Ingeborg Schwalbe

Franz-Dieter Jaeger

requiescant in pace

‘Look,’ said Arthur, ‘would it save you a lot of time if I just gave up and went mad now?’

— Douglas Adams: Hitchhiker’s Guide to the Galaxy

‘It always takes longer than you expect, even when you take Hofstadter’s Law into account.’

— Hofstadter’s Law, Douglas Hofstadter: Gödel, Escher, Bach: An Eternal Golden Braid

Dieses Werk ist unter einem *Creative Commons Namensnennung-Keine kommerzielle Nutzung-Keine Bearbeitung 2.0 Deutschland* Lizenzvertrag lizenziert.

Um die Lizenz anzusehen, gehen Sie bitte zu <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/> oder schicken Sie einen Brief an Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California 94105, USA.



Copyright ©2008 Tobias Florian Minich

Danksagung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2002 bis Juni 2005 im Labor von Herrn Priv. Doz. Ralf Dringen am Lehrstuhl von Herrn Prof. Bernd Hamprecht im Interfakultären Institut für Biochemie (ehemals Physiologisch-Chemisches Institut) der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Ralf Dringen für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und für die fundierte Ausbildung, die ich in seinem Labor erhielt, bedanken.

Herrn Prof. Bernd Hamprecht danke ich für seine konstruktiven Fragen und Anregungen in den Arbeitsgruppenseminaren während meiner Doktorarbeit. Insbesondere möchte ich ihm für seine beispiellose Unterstützung während der Zeit der Fertigstellung des vorliegenden Werkes danken. Ohne ihn hätte ich es wohl nicht geschafft.

Herzlichst bedanke ich mich bei den ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Dringen, Johannes Hirrlinger, meinen Mitdoktoranden Cornelia Rüdig und Hans-Hermann Höpken sowie den Diplomanden Julia Hullmann, Petra Pawlowski, Thomas Knorpp, Till Korten, Jan Riemer und Jens Waak für das exzellente Arbeitsklima und ihre Unterstützung durch Rat und Tat. Ihre aufmunternden Worte halfen über manche Durststrecke hinweg. Im Besonderen möchte ich mich bei Johannes Hirrlinger bedanken, der mir viel beigebracht hat und jederzeit hilfsbereit war. Ferner möchte ich ihm für die Bereitstellung und Genotypisierung der Connexin 43-*Knockout*-Mäuse während seiner Zeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Kirchhoff in Göttingen danken.

Allen Mitarbeitern des ehemaligen Lehrstuhls Hamprecht danke ich für ihre Unterstützung und

die freundliche Aufnahme. Ich möchte weder den Spaß, den wir hatten, noch die Ratschläge missen, die ich von Brigitte Pfeiffer-Guglielmi, Daniela Scheible, Heide Schmid, Benedikt Dolderer, Wolfgang Hirschner, Radovan Murin, Bhavani Kowtharapu Shankar, Stephan Verleysdonk, John Wellard und Heiner Wiesinger erhielt. Mein Dank gilt auch den technischen Assistentinnen Barbara Birk, Katharina Rehn, Ruth Schmid und Ulrike Thieß sowie Claudia Heberle, Erika Mikeler und Hermann Liggesmeyer, ohne deren Arbeit und freundlichen Worte meine Doktorarbeit weitaus schwieriger gewesen wäre.

Herrn Prof. Piet Borst und Dr. Peter Wielinga möchte ich für die Möglichkeit danken, mit Mrp1- und Mrp5-*Knockout*-Mäusen zu arbeiten. Ferner haben sie mich bei dieser Arbeit mit wertvollen Ratschlägen unterstützt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jörg B. Schulz (ehemals Neurologische Klinik in Tübingen) auf der einen und dem *fortune*-Programm des Universitätsklinikums Tübingen auf der anderen Seite für die finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Großer Dank gebührt meinen Eltern, die es nicht immer leicht mit mir hatten und mich trotz allem immer bedingungslos in jeder Hinsicht unterstützt und ermutigt haben.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin Barbara Birk für ihre unendliche Geduld und den Halt, den sie mir gegeben hat. Ohne sie wäre ich sicherlich so manches Mal verzweifelt. Vielen Dank für alles!

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen und Nomenklatur	1
1.1	Abkürzungen und Akronyme	1
1.2	Nomenklatur	5
1.3	Strukturformeln einiger wichtiger in vorliegender Arbeit eingesetzter Substanzen	7
2	Einleitung	13
2.1	Glutathion	13
2.1.1	Synthese und Abbau	13
2.1.2	Funktionen von Glutathion	15
2.2	Zelltypen des Gehirns und ihre Beziehung zu Glutathion und oxidativem Stress	18
2.2.1	Zelltypen	19
2.2.2	Glutathion im Gehirn	22
2.2.3	Oxidativer Stress im Gehirn	24
2.3	Transportsysteme	27
2.3.1	Die ABC-Superfamilie	28
2.3.1.1	Die ABCA-Familie	29
2.3.1.2	Die ABCB-Familie	30
2.3.1.3	Die ABCC-Familie	32
2.3.1.4	Die Familien ABCD bis ABCG	39
2.3.2	Transportproteine und Transporter für organische Anionen	41
2.3.3	Connexone	42
2.4	<i>Knockout</i> -Tiere	44
2.5	Aufgabenstellung	45

3	Ergebnisse	47
3.1	Darstellung der Ergebnisse	47
3.2	Voruntersuchungen zum Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von NMRI-Mäusen	48
3.2.1	Acivicin-Abhängigkeit	48
3.2.2	Efflux von reduziertem und oxidiertem Glutathion	49
3.2.3	Dauerstressmodell	51
3.2.4	Wirkung von Mk571	54
3.3	Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von <i>Knockout</i> -Mäusen . . .	54
3.3.1	Charakterisierung astrogliareicher Primärkultur von <i>Knockout</i> -Mäusen	55
3.3.1.1	Zellbilder	55
3.3.1.2	Polymerasekettenreaktion	56
3.3.2	Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von FVB/N-Mäusen	59
3.3.3	Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von <i>Mrp1-Knockout</i> -Mäusen	62
3.3.4	Vergleich des Glutathioneffluxes aus astrogliareicher Primärkultur von Wildtyp-Mäusen und <i>Mrp1</i> - sowie <i>Mrp5-Knockout</i> -Mäusen	67
3.4	Restefflux	72
3.4.1	Transportproteine für organische Anionen, der Cystische-Fibrose-Transmembranleitfähigkeitsregulator und IP ₃ -Rezeptor	72
3.4.2	Untersuchung der Beteiligung von Connexinen/ <i>Gap-Junction</i> -Halbkanälen am Glutathionefflux	73
3.4.2.1	Untersuchungen an <i>Mrp1-Knockout</i> -Mäusen	74
3.4.2.2	Untersuchungen an Connexin 43- <i>Knockout</i> -Mäusen	78
4	Diskussion	83
4.1	Glutathionefflux aus astrogliareichen Mäuse-Primärkulturen	83
4.2	Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von <i>Knockout</i> -Mäusen . . .	87
4.3	Weitere potenzielle Glutathiontransporter	92
4.4	Nicht von <i>Mrp1</i> vermittelter Glutathionefflux	97
4.5	Ausblick	104

5	Material und Methoden	107
5.1	Material und Geräte	107
5.1.1	Material	107
5.1.2	Geräte	107
5.2	Reagenzien, Chemikalien und <i>Knockout</i> -Tiere	109
5.3	Methoden	110
5.3.1	Zellkulturen	110
5.3.2	Immuncytochemische Anfärbungen und Chromatinanfärbungen	111
5.3.3	Experimentelle Inkubation von Zellkulturen	112
5.3.3.1	Experimente zur Freisetzung von Glutathion und Glutathion- disulfid	112
5.3.3.2	Dauerstressmodell	113
5.3.4	Bestimmungsmethoden	113
5.3.4.1	Enzymaktivitäten	113
5.3.4.1.1	Glutathionreductase	114
5.3.4.1.2	Glutathionperoxidase	114
5.3.4.1.3	Catalase	114
5.3.4.2	Glutathion und Glutathiondisulfid	115
5.3.4.3	Wasserstoffperoxid	116
5.3.4.4	Zellvitalität	116
5.3.4.5	Proteingehalt	117
5.3.5	Molekularbiologische Methoden	117
5.3.5.1	Sequenzanalyse und <i>Primerdesign</i>	117
5.3.5.2	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion zum Nach- weis der MRP-mRNAs sowie der mRNAs anderer möglicher Glutathiontransporter	119
5.3.5.3	Generierung der Maus-Mrp9-Sequenz aus dem Genom	120
5.3.5.4	Genotypisierung der Mrp1- <i>Knockout</i> -Mäuse	120
6	Zusammenfassung	123
7	Literatur	125

Inhaltsverzeichnis

A	Mrp9-Sequenz	171
B	Genotypisierung	185

1 Abkürzungen und Nomenklatur

1.1 Abkürzungen und Akronyme

Im Folgenden wurden nur Abkürzungen und Akronyme definiert, die laut Autorenrichtlinien des *Journal of Neurochemistry* auch dort definiert werden müssen.

2VP	2-Vinylpyridin (Abb. 5)
ABC	ATP-Bindungskassettenprotein (engl.: <i>ATP-binding cassette protein</i>). Das Akronym wird auch in Verbindung mit dem jeweiligen Buchstaben der Familie (A-G) der Superfamilie der ABC-Transporter als Bezeichnung jener Unterfamilie verwendet.
AGA	18 α -Glycyrrhetinsäure (engl.: <i>18α-Glycyrrhetic acid</i> , Struktur: Abb. 2)
AIDS	Erworbenes Immundefizienzsyndrom (engl.: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
APK	Astrogliareiche Primärkultur(en)
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
Atm1p	Mitochondrialer ABC-Transporter 1, andere Bezeichnung für ABCB7.
BCRP	„Brustkrebsresistentes“ Protein (engl.: <i>breast cancer resistant protein</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	Beziehungsweise

1 Abkürzungen und Nomenklatur

cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure (engl.: <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystische-Fibrose-Transmembranleitfähigkeitsregulator (engl.: <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>)
cGMP	3',5'-cyclisches Guanosinmonophosphat
Cx	Connexin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DHEA	Dehydroepiandrosteron (Abb. 1)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DTNB	5,5'-Dithio-bis(nitrobenzoesäure) (Abb. 1)
DVC	Divalente Kationen (engl.: <i>divalent cations</i>). Wird in vorliegender Arbeit für eine Mischung von Ca^{2+} und Mg^{2+} verwendet.
ECC	Embryonale Carcinomzellen (engl.: <i>embryonal carcinoma cells</i>)
EGC	Embryonale Keimzellen (engl.: <i>embryonal germ cells</i>)
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESC	Embryonale Stammzellen (engl.: <i>embryonal stem cells</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FFA	Flufensäure (engl.: <i>Flufenamic acid</i> , Struktur: Abb. 2)
γ GT	γ -Glutamyltranspeptidase
GFAP	Gliales Fibrilläres Saures Protein (engl.: <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GPx	Glutathionperoxidase(n)
GR	Glutathionreductase
GST	Glutathion-S-Transferase
GSx	Gesamtglutathion (Menge an GSH + 2 x Menge an GSSG)
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (engl.: <i>high density lipoprotein</i>)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HX	Hypoxanthin (Abb. 2)

1.1 Abkürzungen und Akronyme

IC50-Wert	Konzentration einer Substanz, bei der sie einen Meßwert halbmaximal beeinflusst.
IgG	Immunglobulin G
IP	Inkubationspuffer
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
K _{ATP}	ATP-abhängiger Kaliumkanal
K _{IR}	Engl.: <i>potassium (K) channel, inward-rectifying</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
LTC ₄	Leukotrien C ₄
LTD ₄	Leukotrien D ₄
MAPEG	Membran-assoziiertes Protein im Eicosanoid- und Glutathionstoffwechsel
MDR	Mehrfachresistenz gegenüber Chemotherapeutika (engl.: <i>multidrug resistance</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MM	Minimalmedium
mRNA	Botenribonucleinsäure (engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MRP	Klasse MDR-vermittelnder Proteine (engl.: <i>multidrug-resistance protein(s)</i>)
MS	Multiple Sklerose
MTABC3	Mitochondriales ABC-Protein 3 der Säugetiere (engl.: <i>mammalian mitochondrial ABC protein 3</i>)
n.u.	Nicht untersucht
NBD	Nucleotidbindungsdomäne
NBF	Nucleotidbindungstasche (engl.: <i>nucleotide binding fold</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat (Abb. 3)
Nrf	NF-E2-verwandter Faktor (engl.: <i>NF-E2-related factor</i>)

1 Abkürzungen und Nomenklatur

OAT	Transporter für organische Anionen (engl.: <i>organic anion transporter</i>)
OATP	Transportprotein für organische Anionen (engl.: <i>organic anion transporter protein</i>)
OCT	Transporter für organische Kationen (engl.: <i>organic cation transporter</i>)
OCTN	Transporter für organische Zwitterionen/Kationen (engl.: <i>organic cation transporter, novel</i>)
ORF	Offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i>)
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (engl.: <i>phosphate-buffered saline</i>)
PGC	Keimzellvorläufer (engl.: <i>primordial germ cells</i>)
Prx	Peroxiredoxin
PXE	<i>Pseudoxanthoma Elasticum</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>reactive oxygen species</i>)
RT-PCR	Reverse Transkription gefolgt von PCR (siehe dort)
s. o.	Siehe oben
s. u.	Siehe unten
siRNA	Kleine RNA-Stücke, die die Expression von mRNA verhindern (engl. <i>small interfering ribonucleic acid</i>)
SLC	Transporter für lösliche Substanzen (engl.: <i>solute carrier</i>)
SOD	Superoxiddismutase(n)
sog.	Sogenannte/sogenannter/sogenanntes
SSS	Sulfosalicylsäure (Abb. 4)
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor (engl.: <i>sulfonylurea receptor</i>)
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer
TAP	Antigenprozessierungsassoziierter Transporter (engl.: <i>transporter associated with antigen processing</i>)
TAPL	TAP-ähnlich (engl.: <i>TAP-like</i>)
TMD	Transmembrandomäne
TNF α	Tumornekrosefaktor α
URAT	Ureatransporter (engl.: <i>urate transporter</i>)
X-ALD	X-verknüpfte Adrenoleukodystrophie

XO	Xanthinoxidase
Yfc1p	Akronym unbekannter Herkunft; Hefe-Ortholog zu MRP1/2

1.2 Nomenklatur

Zur Unterscheidung von neuronalen Zellen in Kultur und im Gehirn werden Zellen in Kultur als Astrogliazellen, Microgliazellen und Oligodendrogliazellen bezeichnet. Sind die entsprechenden Zellen *in vivo* gemeint, werden sie als Astrocyten, Microglia bzw. Oligodendrocyten bezeichnet.

Bei einigen der in der Liste genannten Akronyme handelt es sich um offizielle Gen- und Proteinkürzel. Bei diesen gilt die gebräuchliche Konvention, dass das Akronym in Großbuchstaben für das menschliche Gen/Protein steht (z.B. ABCC, OATP). In dieser Arbeit wird diese Schreibweise auch verwendet, wenn das entsprechende Gen/Protein generell gemeint ist. Wird nur der erste Buchstabe groß geschrieben, ist das entsprechende Gen/Protein in Ratte oder Maus gemeint (z.B. Oatp). Dabei ist zu beachten, dass auch folgende Buchstaben der Bezeichnung, die eigentlich nicht zum Akronym gehören, in diesem Fall klein geschrieben werden (z.B. Abcc).

Der Einfachheit halber wurden in dieser Arbeit die alten Bezeichnungen für Oatp1 und Oatp2 beibehalten. Sie entsprechen nach Hagenbuch und Meier (2004) den Proteinen Oatp1a1 und Oatp1a4 der Gene Slco1a1 bzw. Slco1a4 (siehe auch Abschnitt 2.3.2).

Soweit sinnvoll und vorhanden sind in dieser Arbeit deutsche Fachbegriffe verwendet worden. Sofern keine geeigneten deutschen Fachbegriffe genutzt werden konnten oder deutsche Begriffe keine eindeutige Bezeichnung darstellten, wurden englische Fachbegriffe verwendet. Diese sind, ebenso wie alle anderen Begriffe aus Fremdsprachen, kursiv geschrieben.

1 Abkürzungen und Nomenklatur

1.3 Strukturformeln einiger wichtiger in vorliegender Arbeit eingesetzter Substanzen

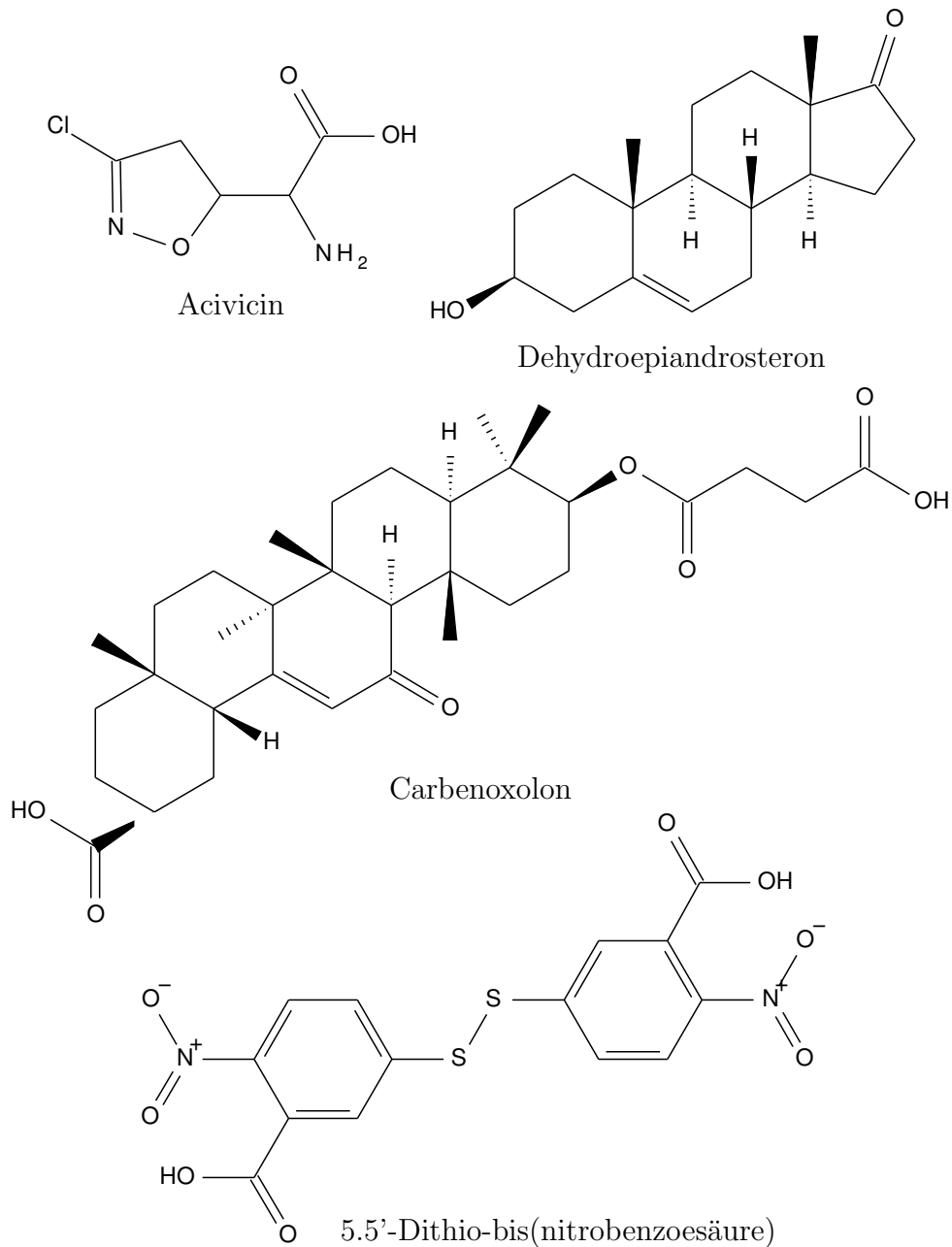


Abb. 1. Acivicin, Carbenoxolon, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und 5,5'-Dithio-bis(nitrobenzoessäure) (DTNB)

1 Abkürzungen und Nomenklatur

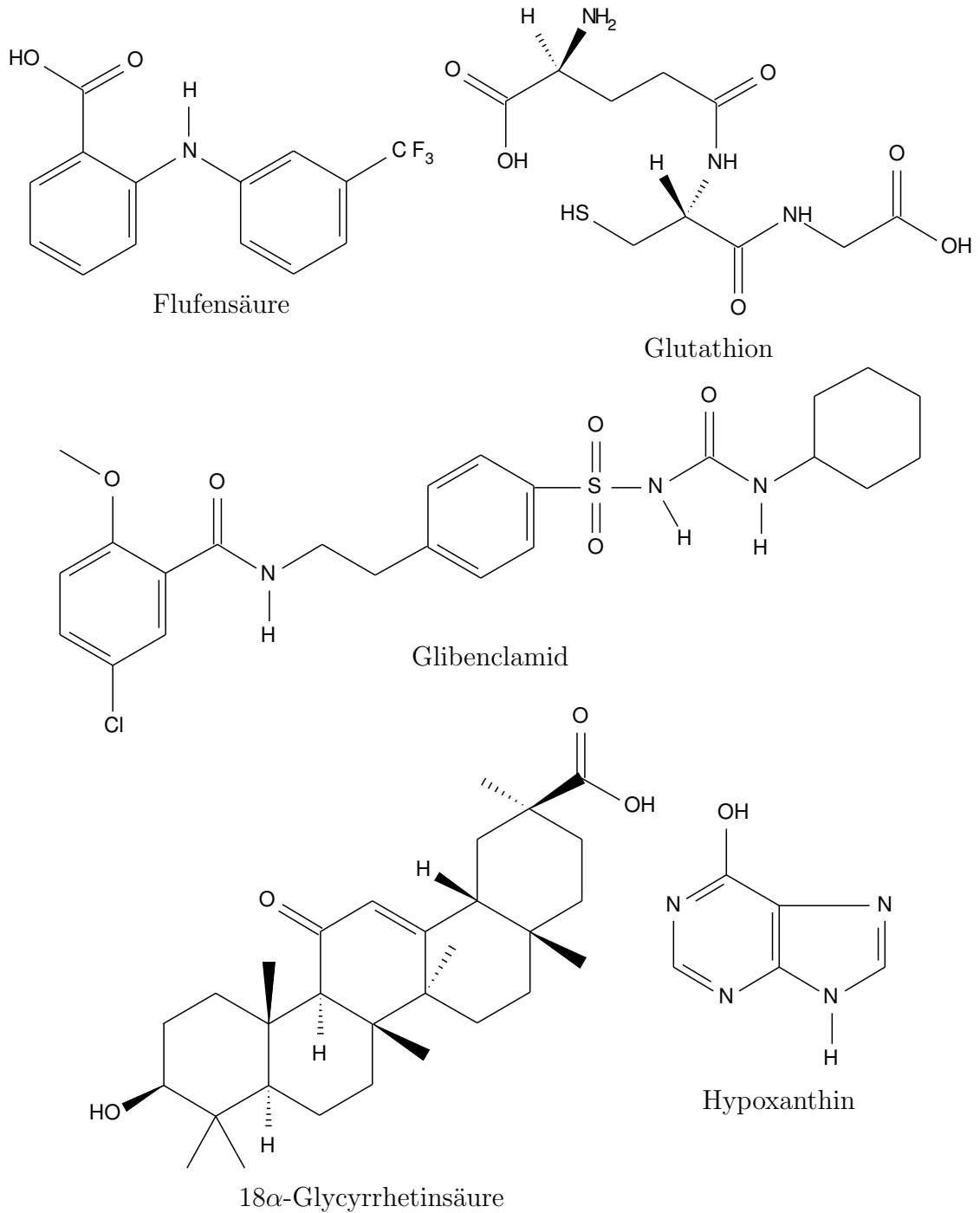
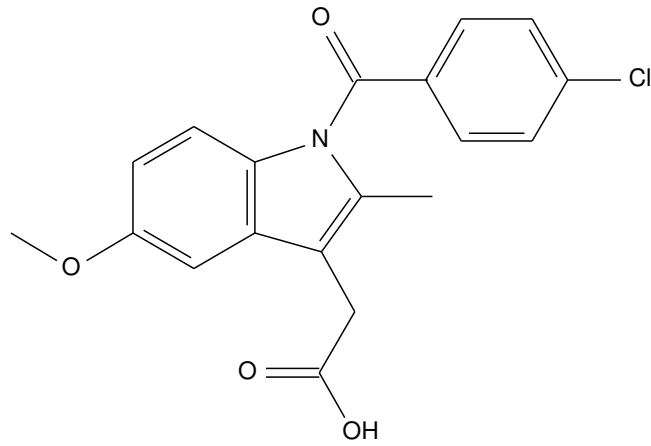
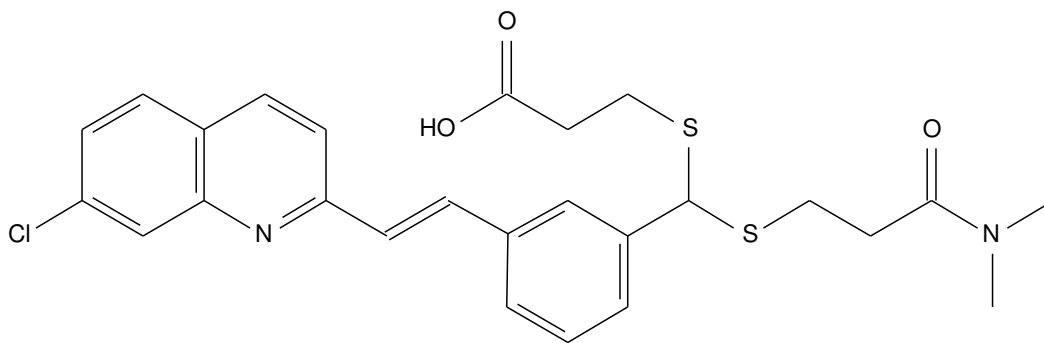


Abb. 2. Flufenensäure (FFA), Glibenclamid, Glutathion (GSH), 18 α -Glycyrrhetinsäure (AGA) und Hypoxanthin (HX)

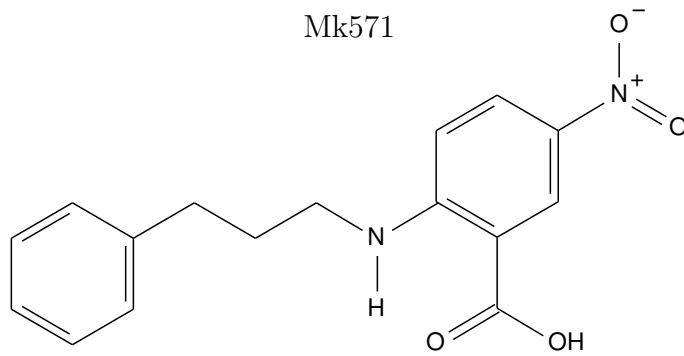
1.3 Strukturformeln einiger wichtiger in vorliegender Arbeit eingesetzter Substanzen



Indomethacin



Mk571



5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid

Abb. 3. Indomethacin, Mk571 und 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB)

1 Abkürzungen und Nomenklatur

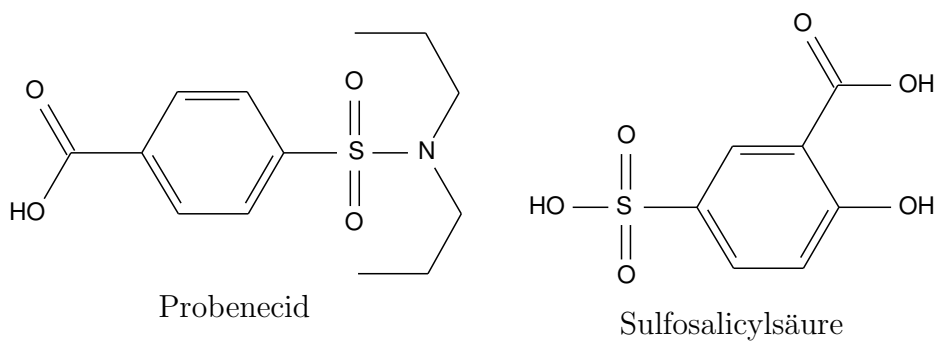
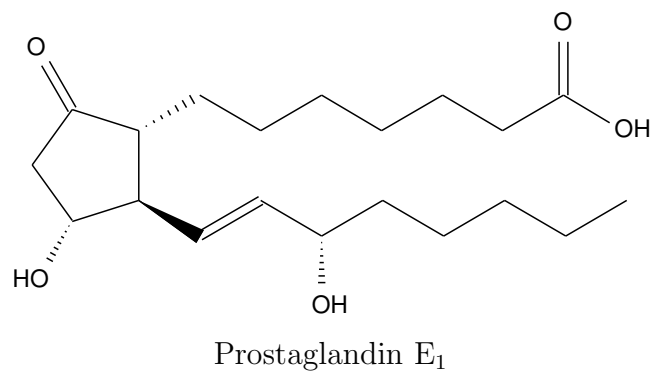
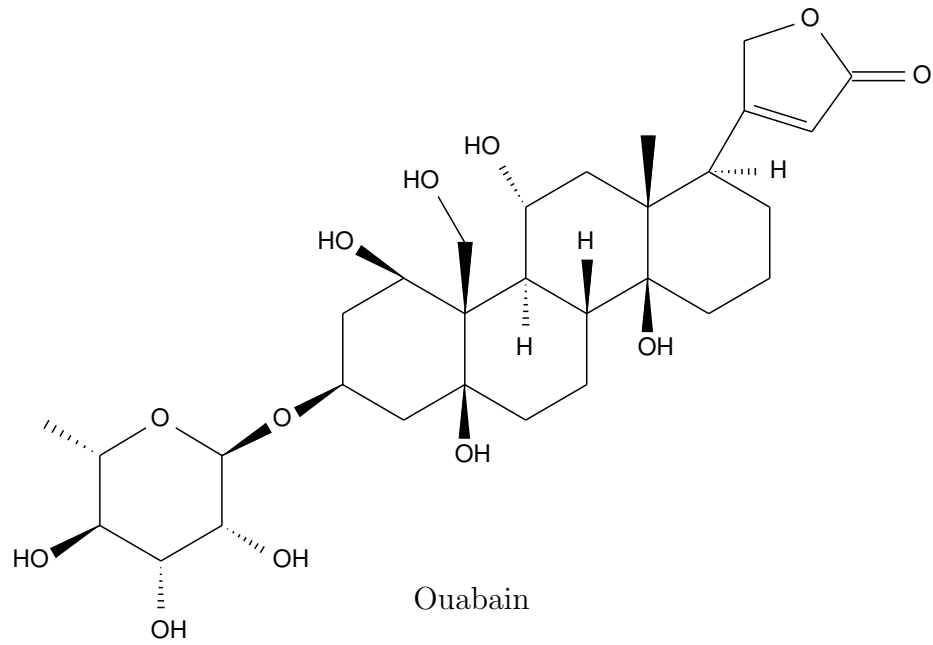
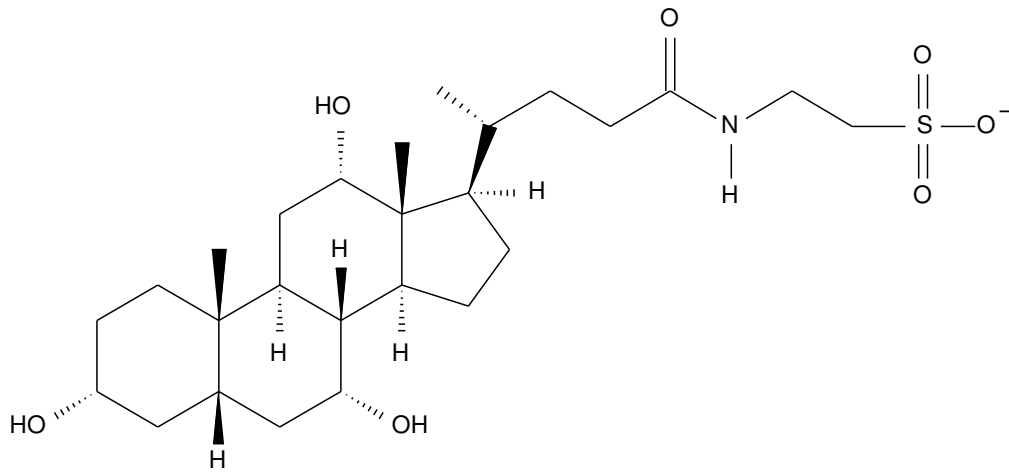
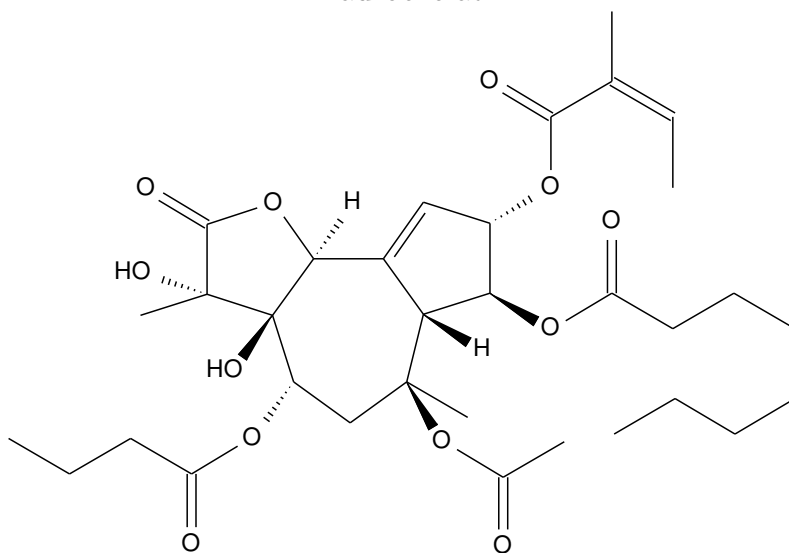


Abb. 4. Ouabain, Prostaglandin E₁, Probenecid und Sulfosalicylsäure (SSS)

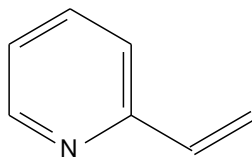
1.3 Strukturformeln einiger wichtiger in vorliegender Arbeit eingesetzter Substanzen



Taurocholat



Thapsigargin



2-Vinylpyridin

Abb. 5. Taurocholat, Thapsigargin und 2-Vinylpyridin (2VP)

1 Abkürzungen und Nomenklatur

2 Einleitung

2.1 Glutathion

Glutathion (Abb. 2) ist ein thiolisches Tripeptid, das aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin besteht. Es wurde im Jahre 1920 von Sir Frederick Gowland Hopkins entdeckt und kommt in allen Körperzellen vor. In Säugerzellen wurden Konzentrationen von bis zu 12 mM bestimmt (Cooper, 1997). Die Funktionen von Glutathion sind vielfältig (Abb. 6). Zu den wichtigsten gehören die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies und die Rolle als Konjugationspartner für Xenobiotica.

2.1.1 Synthese und Abbau

Zur Synthese des Glutathions aus den einzelnen Aminosäuren sind zwei Enzyme notwendig (Meister und Anderson, 1983). In der ersten Reaktion wird - katalysiert durch γ -Glutamylcysteinsynthetase - Glutamat über seine γ -Carboxylgruppe mit Cystein verknüpft. Im zweiten Schritt hängt die Glutathionsynthetase Glycin an und erzeugt so Glutathion. Beide Enzyme verwenden ATP als Energiequelle (Meister, 1974). Um den intrazellulären Glutathionspiegel konstant zu halten, wird der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Glutathionsynthese, die von der γ -Glutamylcysteinsynthetase katalysierte Reaktion, durch GSH gehemmt (Richman und Meister, 1975; Misra und Griffith, 1998).

2 Einleitung

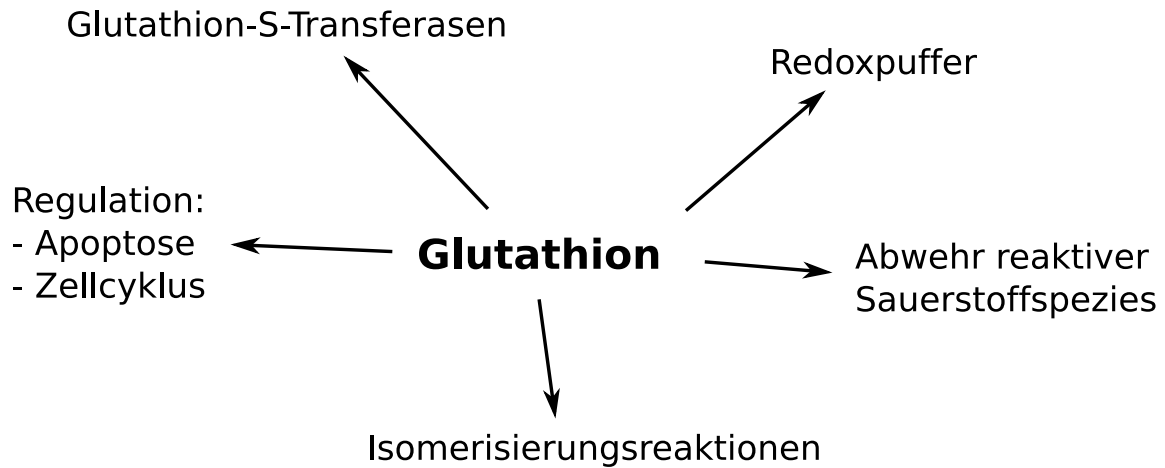


Abb. 6. Übersicht der Funktionen von Glutathion

Glutathion kann nach gegenwärtigem Kenntnisstand nur extrazellulär abgebaut werden. Dazu muss Glutathion zunächst in reduzierter Form, in oxidierter Form oder als Glutathion-S-Konjugat exportiert werden (vgl. Abschnitt 2.3). Extrazelluläres Glutathion ist Substrat der γ -Glutamyltranspeptidase (γ GT) (Tate und Meister, 1981). Dieses Enzym kann entweder den γ -Glutamylrest von Glutathion oder Glutathion-S-Konjugaten auf eine Aminosäure, ein Dipeptid oder Glutathion (Produkt: L- γ -Glu-Glutathion) übertragen oder die γ -Peptidbindung hydrolysieren (Tate und Meister, 1981; Wang und Ballatori, 1998). Übrig bleibt Cysteinylglycin bzw. ein Cysteinylglycin-S-Konjugat.

Cysteinylglycin kann zum einen durch Exopeptidasen in Cystein und Glycin gespalten werden (Tate, 1985; Dringen *et al.*, 2001), die dann von Aminosäuretransportern in die Zelle aufgenommen werden und somit wieder für die Glutathionsynthese zur Verfügung stehen. Zum anderen vermögen zumindest Astrogliazellen mittels Dipeptidtransportern Cysteinylglycin direkt aufzunehmen (Dringen *et al.*, 1998a). Nach Hydrolyse des Dipeptids können die gewonnenen Aminosäuren erneut für die Glutathionsynthese verwendet werden (Dringen *et al.*, 1997b).

Die Freisetzung von Cysteinylglycin-S-Konjugaten ist ein wichtiger Schritt im Stoffwechsel endo- und exogener Substanzen. Einer dieser Stoffwechselwege endogener Substanzen ist der

Prostaglandinstoffwechsel (Cagen *et al.*, 1976) und die Umwandlung von Leukotrien C₄ in Leukotrien D₄ (Anderson *et al.*, 1982; Frey, 1993). Bei der Ausscheidung von Xenobiotica (vgl. Abschnitt 2.1.2) ist die Abspaltung des γ -Glutamylrestes vom entsprechenden Glutathion-S-Konjugat nur der erste extrazelluläre Schritt. Um mit dem Urin ausgeschieden werden zu können, müssen noch weitere Modifikationen, wie die Abspaltung des Cysteinylrestes und N-Acetylierung, folgen (Taniguchi und Ikeda, 1998).

2.1.2 Funktionen von Glutathion

Wie bereits erwähnt sind die Funktionen von Glutathion vielfältig. So gibt es einige Isomerisierungsreaktionen, die glutathionabhängig sind, z.B. die Glyoxylasereaktion (zur Übersicht siehe Meister und Anderson, 1983; Cooper, 1997). Auch wurde Glutathion als Speicher- und Transportform von Cystein bezeichnet (Meister und Anderson, 1983). Eine weitere wichtige Funktion des Glutathions ist die Beeinflussung des Zellschicksals. Auf der einen Seite gibt es Hinweise darauf, dass Glutathion eine Rolle bei der Apoptose spielt (Hall, 1999). Während der Apoptose wird Glutathion schnell durch einen transporterabhängigen Prozess von der Zelle exportiert (van den Dobbelen *et al.*, 1996; Ghibelli *et al.*, 1998). Inhibiert man diesen Transportprozess, wird die Apoptose verzögert oder gar angehalten (van den Dobbelen *et al.*, 1996; Ghibelli *et al.*, 1998). Auf der anderen Seite ist Glutathion an der Regulation des Zellcyclus beteiligt und somit wichtig für die Zellteilung (Poot *et al.*, 1995). Diese Effekte sind vermutlich eng mit der Rolle des Glutathions bei der Aufrechterhaltung des Thiolredoxpotentials und des reduzierten Zustandes von Proteinthiolgruppen verbunden (Cotgreave und Gerdes, 1998). Ein weiterer Aspekt dieser Rolle im Endoplasmatischen Reticulum ist die Unterstützung der Proteinfaltung als Redoxpuffer (Wilkinson und Gilbert, 2004).

Bei der Beschreibung des Glutathionabbaus wurden bereits Glutathion-S-Konjugate angesprochen. Deren Synthese wird intrazellulär von Glutathion-S-Transferasen (GSTs; auch nur Glutathiontransferasen genannt) katalysiert (zur Übersicht siehe Hayes *et al.*, 2005). Es gibt vier Familien von GSTs (Hayes *et al.*, 2005). Die ersten zwei bestehen vorwiegend aus löslichen Enzymen, die auf Grund ihrer Lokalisation als cytosolische und mitochondriale GSTs bezeich-

2 Einleitung

net werden (Ladner *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2004). Die dritte Familie der microsomalen GSTs wird mittlerweile den Membran-assoziierten Proteinen im Eicosanoid- und Glutathionstoffwechsel (MAPEGs) zugeordnet (Jakobsson *et al.*, 1999). Die letzte Familie ist von geringerer Bedeutung (Hayes *et al.*, 2005). Sie kommt nur in Bakterien vor und vermittelt Fosfomycinresistenz (Armstrong, 2000).

Die größte Familie ist die der cytosolischen GSTs (Hayes *et al.*, 2005). Sieben (Alpha, Mü, Pi, Sigma, Theta, Zeta und Omega) der insgesamt elf GST-Klassen in Säugetieren gehören in diese Familie (Hayes *et al.*, 2005). Alle cytosolischen GSTs bilden Dimere, in manchen Fällen (Alpha und Mü) sogar Heterodimere (Hayes und Pulford, 1995). Die meisten der cytosolischen GSTs kommen frei gelöst vor (Hayes *et al.*, 2005), jedoch können einige wenige Mitglieder der Alpha- und Mü-Klasse auch mit der Plasmamembran oder Mitochondrien assoziiert sein (Gardner und Gallagher, 2001; Raza *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2002; Robin *et al.*, 2003). Die mitochondriale Familie besteht nur aus der Kappa-Klasse (Hayes *et al.*, 2005). Auch die Enzyme dieser Klasse sind dimer (Hayes *et al.*, 2005) und sie besteht in Mäusen, Ratten und Menschen aus nur je einem Vertreter (Jowsey *et al.*, 2003; Ladner *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2004). Im Menschen sind Vertreter von dreien (I, II und IV) der insgesamt vier MAPEG-Klassen oder -Untergruppen bekannt (Jakobsson *et al.*, 1999; Hayes *et al.*, 2005). Die Stöchiometrie der Untereinheiten der MAPEGs ist weniger homogen als die der Enzyme der beiden anderen eukaryontischen GST-Familien. Sie können monomer, dimer, trimer oder sogar in komplexeren Aggregaten vorkommen (Holm *et al.*, 2002; Thorén *et al.*, 2003; Mandal *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2005).

Die Substrate der GSTs sind vielfältig und können, wie bereits erwähnt, exo- oder endogenen Ursprungs sein. Auf die Einzelheiten soll hier nicht näher eingegangen werden, da GSTs nicht Gegenstand der Untersuchungen vorliegender Arbeit waren. Eine Übersicht wurde von Hayes *et al.* (2005) zusammengestellt.

Glutathion spielt auch die Hauptrolle des zentralen Moleküls im Glutathionsystem zur Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ROS entstehen als Nebenprodukte der mitochondrialen Atmungskette oder der Reaktion autoxidierbarer Substanzen mit molekularem Sauerstoff (Halliwell, 2001). Zu den ROS gehören unter anderem Wasserstoffperoxid, Superoxid, Hydroxylra-

dikale und Alkylhydroperoxide. All diese ROS müssen von der Zelle schnellstmöglich beseitigt werden. Andernfalls können sie die Zelle schädigen, beispielsweise durch Lipidperoxidation, Proteinmodifikationen und DNA-Strangbrüche (Halliwell und Gutteridge, 1999; Halliwell, 2001; Marnett *et al.*, 2003). Unter normalen physiologischen Bedingungen sind die zellulären Verteidigungsmechanismen, deren zentraler Bestandteil das Glutathionsystem ist, in der Lage, ROS-bedingte Zellschäden innerhalb tolerierbarer Grenzen zu halten. Übersteigt die ROS-Produktion die antioxidativen Kapazitäten der Zelle, spricht man von oxidativem Stress. Dies ist ein pathologischer Zustand, der durch eine gegenüber dem Normalzustand erhöhte ROS-Produktion oder Beeinträchtigung der zellulären Abwehrsysteme verursacht wird. Oxidativer Stress wird mit verschiedenen physiologischen und pathologischen Abläufen in Zusammenhang gebracht, insbesondere im Gehirn (Abschnitt 2.2.3).

Glutathion ist auf drei Arten an der Vermeidung und Beseitigung oxidativer Schäden beteiligt. Zum einen kann Glutathion direkt mit Superoxid reagieren und wird dabei zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert (Winterbourn und Metodiewa, 1994). Andererseits ist es Cosubstrat der Glutathionperoxidase (GPx), wobei es als Elektronendonator für die Reduktion von Peroxiden dient (Chance *et al.*, 1979). Auch bei diesen Reaktionen entsteht GSSG. Es wurden mehrere Selenocystein-enthaltende Isoformen von GPx beschrieben (Ursini *et al.*, 1995), jedoch können auch GSTs GPx-Aktivität besitzen, insbesondere gegenüber Lipidperoxiden (Hurst *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2002; Prabhu *et al.*, 2004). Zur Regeneration von reduziertem Glutathion (GSH) aus GSSG enthalten Zellen das Flavoenzym Glutathionreductase (GR), welches NADPH als Elektronendonator nutzt (Schirmer *et al.*, 1989; Lopez-Barea *et al.*, 1990). Glutathion wird also bei der Entgiftung von ROS nicht verbraucht, so lange NADPH zur Regeneration zur Verfügung steht. Im Falle von oxidativem Stress könnte es allerdings vorkommen, dass die Kapazität zur Regeneration von GSH auf Grund zu geringer GR-Aktivität oder von Mangel an NADPH nicht ausreicht, das intrazelluläre Thioredoxpotenzial auf ausreichend negativem Niveau zu halten. Für Astrocyten wurde postuliert, dass der Export von GSSG unter solchen Bedingungen zu einer Aufrechterhaltung des Thioredoxpotenzials dient (Hirrlinger *et al.*, 2001).

Die dritte Rolle des Glutathions ist die der Entgiftung toxischer Oxidationsprodukte von Lipiden, Nucleotiden und Catecholaminen. Wie bereits oben erwähnt können die zellulären antioxidativen Systeme Zellschäden zwar in tolerierbaren Grenzen halten, jedoch nicht vollständig

2 Einleitung

verhindern, so dass in einem gewissen Umfang schädliche hoch- und niedermolekulare Oxidationsprodukte entstehen (Marnett *et al.*, 2003). Neben der bereits erwähnten GPx-Aktivität vermögen GSTs toxische Oxidationsprodukte von Lipiden (z.B. Acrolein und Crotonaldehyd) an Glutathion zu koppeln (Hayes und Pulford, 1995; Hubatsch *et al.*, 1998; Hayes und McLellan, 1999; Hiratsuka *et al.*, 2000). Hydroperoxide von Phospholipiden können auch durch 1-Cys Peroxiredoxin (Prx IV) reduziert werden, dessen Cysteinylnrest dabei zur Sulfensäure oxidiert wird. Es wird vermutet, dass 1-Cys Peroxiredoxin über eine Kopplung an Glutathion mittels einer GST gefolgt von einer Reduktion des gemischten Disulfids regeneriert wird (Manevich *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2005). Oxidation von Nucleotidbasen und Catecholaminen erzeugt Basenpropenale bzw. Chinone, von denen letztere als *Redoxcycler* Superoxidradikale und somit weitere Schäden erzeugen. Dies wird durch GST-vermittelte Kopplung an Glutathion verhindert (Dagnino-Subiabre *et al.*, 2000). Die entstandenen Glutathion-S-Konjugate werden von den Zellen exportiert, weshalb auf diese Weise verbrauchtes Glutathion neu synthetisiert werden muss und nicht durch GR regeneriert werden kann.

2.2 Zelltypen des Gehirns und ihre Beziehung zu Glutathion und oxidativem Stress

Das komplexeste Organ in Menschen und anderen Säugetieren ist das Gehirn. Es kann einerseits im makroskopischen Maßstab in verschiedene Regionen und andererseits im mikroskopischen Maßstab in verschiedene Zelltypen unterteilt werden. Der Komplexität des Gehirns liegt die Vielfalt der Wechselwirkungen der einzelnen Zellen und Zelltypen zu Grunde. Solche Wechselwirkungen können einerseits zwischen Zellen des selben Zelltyps auftreten, z.B. bei der Verschaltung der Neuronen, wobei Neuronen oft sowohl innerhalb der selben Region als auch zwischen verschiedenen Regionen durch Neurite verbunden sind. Auf der anderen Seite können Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen auftreten, z.B. bei metabolischer Kooperation.

2.2.1 Zelltypen

Neben den Neuronen, denen historisch gesehen die meiste Aufmerksamkeit galt, wurden im Gehirn noch weitere Zelltypen charakterisiert, die man unter dem Oberbegriff „Glia“ zusammenfasst. Dabei werden Astrocyten, Oligodendrocyten und Ependymzellen zur Macroglia gerechnet, der die Microgliazellen gegenüberstehen. Gliazellen werden neben den Neuronen als klassischer erster Säule des Gehirns auch als funktionelle zweite Säule des Gehirns bezeichnet (Kuffler und Nicholls, 1966; Somjen, 1988; Kettenmann und Ransom, 1995). Bei dieser groben Einteilung darf jedoch nicht vergessen werden, dass sich sowohl Neuronen als auch Gliazellen je nach Hirnregion oder sogar Sublokalisierung innerhalb einer solchen in ihren Eigenschaften stark unterscheiden können (Denis-Donini *et al.*, 1984; Prochiantz und Mallat, 1988; Raine, 1999).

Aus heutiger Sicht sind nach wie vor Neuronen die zelluläre Basis der Informationsverarbeitung im Gehirn. Sie besitzen meist mehrere Fortsätze, die in die informationsaufnehmenden Dendriten (afferente Fasern) und informationsweiterleitenden Axone (efferente Fasern) eingeteilt werden. Diese Fortsätze können einen Großteil des Zellvolumens von Neuronen ausmachen, obwohl diese unter den Hirnzelltypen bereits große Somata besitzen (Raine, 1999). Ihre zentrale Fähigkeit ist die Weiterleitung und Prozessierung von Reizen, deren physiologisches Grundelement das Aktionspotenzial ist. Damit stellt das von den Neuronen gebildete Netzwerk die Grundlage für die Fähigkeit des Gehirns zur Steuerung der willkürlichen sowie der meisten unwillkürlichen Vorgänge einschließlich der Bewegungen des Körpers dar. Zur Einteilung der Vielfalt der Neuronen werden verschiedene Kriterien herangezogen. So ist zunächst die Grobeinteilung in Haupt- und Interneuronen zu nennen, wobei die Hauptneuronen ihrem Namen nach die zentrale Erregungsleitung übernehmen und in ihrer Aktivität durch die Interneuronen beeinflusst werden. Letztere sind meist inhibitorischer Natur. Daraus ergibt sich mit dem auf die Zielzelle ausgeübten Effekt (exzitatorisch, inhibitorisch oder sekretorisch) die zweite Einteilungsmöglichkeit für Neuronen. Eine weitere Einteilung kann über den verwendeten Neurotransmitter getroffen werden, wobei es jedoch zu beachten gilt, dass ein einzelnes Neuron mehr als einen Neurotransmitter zu benutzen vermag (Lundberg *et al.*, 1980; Lundberg und Hökfelt, 1983; Changeux, 1986; Hökfelt *et al.*, 1986; Raine, 1999; Thompson, 2000). Zu den von Neuro-

2 Einleitung

nen verwendeten Neurotransmittern zählen Aminosäuren (Glutamat, Glycin, GABA), biogene Amine (z.B. Dopamin), Nucleoside, Nucleotide, Peptide und Proteine. Neuronen im adulten Gehirn werden nur in wenigen Regionen regeneriert (Lie *et al.*, 2004). In weiten Teilen des Gehirns muss der Organismus daher anscheinend Zeit seines Lebens mit der bereits kurz nach der Geburt festgelegten Neuronenzahl auskommen.

Astrocyten sind der häufigste Zelltyp des menschlichen Gehirns (Nedergaard *et al.*, 2003). Sie unterstützen andere Zelltypen und sind daher essentiell für die Aufrechterhaltung der Funktionen des Gehirns (Kirchhoff *et al.*, 2001). Die Fortsätze der Astrocyten bilden ein enges Netz, in das die anderen Zelltypen des Gehirns eingebettet sind (Nedergaard *et al.*, 2003). Teil dieses Netzes ist die Blut-Hirn-Schranke, deren Ausbildung und Aufrechterhaltung eine der Hauptfunktionen der Astrocyten ist (Kuffler und Nicholls, 1966). Ferner spielen Astrocyten eine wichtige Rolle als Kooperationspartner anderer Zellen, insbesondere der Neuronen. Zum ersten können sie Neurotransmitter und Ionen wie Glutamat und K^+ aufnehmen, um die Erregungsweiterleitung schneller zu beenden (Coles und Deitmer, 2005; Newman, 2005; Swanson, 2005). Zweitens können sie auf Signale von Neuronen oder anderen Astrocyten durch Ausschüttung neuroaktiver Substanzen wie Glutamat oder ATP reagieren und dadurch umgebende Synapsen beeinflussen (Parpura *et al.*, 1994; Pasti *et al.*, 1997; Newman, 2005; Malarkey und Parpura, 2006). Zum dritten versorgen sie andere Zelltypen mit essentiellen Synthesestufen, so z.B. Neuronen mit Cystein (Dringen *et al.*, 2000, 2001). Sie sind der einzige Zelltyp des Gehirns, der Gluconeogenese betreiben kann (Dringen *et al.*, 1993b; Schmoll *et al.*, 1995; Hamprecht und Dringen, 1995), und sind in der Lage, „Brennstoff“ in Form von Glycogen zu speichern (Dringen und Hamprecht, 1992; Dringen *et al.*, 1994; Bergbauer *et al.*, 1996; Pfeiffer-Guglielmi *et al.*, 2003). Diese gespeicherte Energiereserve kann dann im Bedarfsfall in Form von Milchsäure an Neuronen weitergegeben werden (Dringen *et al.*, 1993a). Weitere Beispiele für die metabolische Kooperation von Astrocyten und Neuronen sind die Synthese von Hypotaurin (Brand *et al.*, 1998) und Cholesterol für Neuronen (Pfrieger, 2003a,b) sowie die Reduktion von Dehydroascorbat zu Ascorbat (Astuya *et al.*, 2005) und die Unterstützung in der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies (Dringen *et al.*, 2000, 2001; Gegg *et al.*, 2005).

Die Hauptaufgabe der Oligodendrocyten ist die Bildung der Myelinschicht um Axone (Baumann und Pham-Dinh, 2001; Butt, 2005). Sie übernehmen somit im zentralen Nervensys-

2.2 Zelltypen des Gehirns und ihre Beziehung zu Glutathion und oxidativem Stress

tem die Aufgabe, welche die Schwannschen Zellen im peripheren Nervensystem inne haben. Im Gegensatz zu letzteren myelinisiert jedoch ein einziger Oligodendrocyt mehrere Axone. Ansonsten ähnelt die Myelinisierung durch die Oligodendrocyten derjenigen der Schwannschen Zellen. Wie auch im peripheren Nervensystem sorgt der hohe Lipidgehalt des Myelins für gute elektrische Isolation der Axone (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Ebenso ist das oligodendrocytische Myelin segmentiert und durch sog. Ranviersche Schnürringe unterbrochen, die die saltatorische und damit schnelle Erregungsleitung erlauben (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Neben ausdifferenzierten Oligodendrocyten enthält das adulte Gehirn auch Oligodendrocyten-Vorläuferzellen, die etwa 5 - 8 % der Gliazellen ausmachen (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Diese Vorläuferzellen können zu Oligodendrocyten differenzieren und so abgestorbene Oligodendrocyten ersetzen. Solch ein Verlust tritt z.B. bei demyelinisierenden Erkrankungen wie Multipler Sklerose (MS) auf (Storch und Lassmann, 1997; Keegan und Noseworthy, 2002), deren Ursache noch weitgehend ungeklärt ist (Keegan und Noseworthy, 2002). Da Oligodendrocyten-Vorläuferzellen durch Stimulation mittels extrazellulärer Signale zu neuronalen Stammzellen revertieren können (Kondo und Raff, 2000), ist ihre Rolle möglicherweise die einer generellen Regenerationsreserve.

Das Ependym ist ein einschichtiges Epithel, welches aus spezieller Glia, den Ependymzellen, besteht. Es kleidet das cerebrale Ventrikelsystem aus, das aus den beiden Lateralventrikeln (Ventrikel eins und zwei) sowie dem dritten und vierten Ventrikel besteht. Ventrikel sind Hohlräume im Gehirn, die von der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) ausgefüllt sind. Ependymzellen wurden zuerst von Purkinje (1836) und Valentin (1836) beschrieben und zeichnen sich neben ihrer einzigartigen Position durch die Tatsache aus, dass sie meist mehrere Cilien tragen. Das Verhältnis von nicht- zu polycylierten Zellen variiert stark von Spezies zu Spezies, während der Entwicklung und zwischen verschiedenen Spezialisierungsbereichen des Ependyms (persönliche Mitteilung S. Verleysdonk; Verleysdonk, 2006). Im Menschen, zumindest bei Kindern, scheinen die meisten Ependymzellen Kinocilienbündel zu besitzen (Dempsey und Nielsen, 1976). Über die Funktion der Ependymzellen und des Ependyms wird nach wie vor hauptsächlich spekuliert (Del Bigio, 1995; Bruni, 1998). Auch ist unklar, ob die Cilien bei einer solchen Funktion eine Rolle spielen und wenn ja, worin diese besteht. Neue Resultate sprechen allerdings für eine Beteiligung der Ependymzellen und ihrer Cilienbewegung bei der Wanderung von Neuroblasten aus der subventrikulären Zone in den Riechkolben (Sawamoto

2 Einleitung

et al., 2006). Auch führen Fehler in der Ausbildung des Ependyms oder in dessen Cilienschlag zur Ausbildung verschiedener Formen eines Hydrocephalus (Banizs *et al.*, 2005; Domínguez-Pinos *et al.*, 2005). Im Falle des menschlichen fötalen Hydrocephalus hat vermutlich ein Fehler in der Entwicklung der Ependymzellen eine Störung der Ordnung der subventrikulären Zone und eine abnormalen Wanderung von Neuroblasten zur Konsequenz (Domínguez-Pinos *et al.*, 2005).

Microgliazellen sind Phagozyten des Gehirns, die mesenchymalen Ursprungs sind. Auf der einen Seite besitzen sie immunologische Funktionen zur Abwehr von Krankheitserregern und ähneln den Macrophagen der Peripherie. Auf der anderen Seite nehmen sie Zellüberreste auf, die durch apoptotische Vorgänge während der Entwicklung (Stolzing und Grune, 2004; Bessis *et al.*, 2007) oder beim Abbau von Synapsen bei der Gedächtnisformung (Bessis *et al.*, 2007) zurückbleiben. Im Gegensatz zu den anderen Zellen des Gehirns sind sie territorial und halten einen gewissen Abstand zueinander (Streit, 2005). Im adulten Hirn wurden drei verschiedene Zustände von Microgliazellen beschrieben: ruhende ramifizierte Zellen, aktivierte reaktive Zellen und runde phagocytierende Zellen (Streit, 2005). Nach heutiger Ansicht handelt es sich bei Microgliazellen um Macrophagen, die vor der Bildung der Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn eingewandert sind. In immunologischer Hinsicht ähneln sie aber nicht nur den Macrophagen, sondern weisen auch Eigenschaften anderer Zelltypen des Immunsystems auf. Wie Lymphocyten können sie mittels des Enzyms NADPH-Oxidase Superoxid produzieren (Colton und Gilbert, 1987; Sonderer *et al.*, 1987; Sankarapandi *et al.*, 1998) und sie sind in der Lage, Antigene zu präsentieren (Giulian, 1987). Ferner exprimieren sie das Antigen CD4, das vom humanen Immundefizienzvirus (HIV) als Rezeptor benützt wird (Perry und Gordon, 1987), weshalb sie eine Rolle bei der für das erworbene Immundefizienzsyndrom (AIDS) typischen Encephalopathie spielen (Johnson und McArthur, 1986; Budka *et al.*, 1987).

2.2.2 Glutathion im Gehirn

Die Glutathionkonzentration im Gehirn bewegt sich im Bereich von 1 bis 3 mM (Cooper, 1997). Dieses Glutathion kommt sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen vor (Hjelle *et al.*, 1994).

2.2 Zelltypen des Gehirns und ihre Beziehung zu Glutathion und oxidativem Stress

Glutathion ist jedoch nicht nur intrazellulär lokalisiert, sondern wurde auch im extrazellulären Raum mittels Microdialyse nachgewiesen (Orwar *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Lada und Kennedy, 1997; Han *et al.*, 1999). Auch die Cerebrospinalflüssigkeit enthält Glutathion (Anderson *et al.*, 1989; Do *et al.*, 2000). Die Freisetzung von Glutathion wurde zunächst an Hirnschnitten gezeigt (Zängerle *et al.*, 1992), später jedoch als unter den Gehirnzelltypen spezifische Funktion der Astrocyten erkannt (Yudkoff *et al.*, 1990; Sagara *et al.*, 1996; Dringen *et al.*, 1997a; Hirrlinger *et al.*, 2002c).

Sowohl γ -Glutamylcysteinsynthetase als auch Glutathionsynthetase kommen im Gehirn vor, wobei sich die größten spezifischen Aktivitäten im *choroidalen Plexus* fanden (Tate *et al.*, 1973; Okonkwo *et al.*, 1974). Im Gesamthirn waren die Aktivitäten jedoch geringer als in der Leber oder Niere (Sekura und Meister, 1977; Oppenheimer *et al.*, 1979). Sowohl Neuronen als auch Astrocyten können Glutathion synthetisieren, bevorzugen jedoch unterschiedliche extrazelluläre Substrate (Kranich *et al.*, 1996, 1998). Astrocyten nutzen dafür einerseits Cystin und andererseits Glutamat oder Glutamin (Dringen und Hamprecht, 1996; Kranich *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2005). Von Astrocyten freigesetztes Glutathion wird - wie bereits oben beschrieben (Abschnitt 2.1.1) - von der astroglialen γ GT zu Cysteinylglycin umgesetzt (Dringen *et al.*, 1997a). Dieses Dipeptid wird anschließend lokal von Neuronen mittels des Ectoenzym Aminopeptidase N in Cystein und Glycin gespalten. Diese beiden Aminosäuren werden schließlich von den Neuronen aufgenommen und zur Glutathionsynthese genutzt (Dringen *et al.*, 2001). Neuronen sind auf diese metabolische Kooperation angewiesen, da sie Cystin nicht zur Glutathionsynthese nutzen können (Sagara *et al.*, 1993a,b; Kranich *et al.*, 1996; Dringen *et al.*, 1999) und extrazelluläres Cystein schnell durch Sauerstoff zu Cystin oxidiert wird.

Neben der Rolle als Zwischenstufe metabolischer Kooperation hat exportiertes Glutathion möglicherweise auch noch andere Funktionen im Gehirn. So wurde Glutathion als Neurohormon diskutiert (Janáky *et al.*, 1999; Dringen *et al.*, 2000), basierend auf der Tatsache, dass Glutathion in Gehirnschnitten nach Stimulation freigesetzt wird (Zängerle *et al.*, 1992), an spezifische Rezeptoren bindet (Guo *et al.*, 1992; Lanius *et al.*, 1994; Hermann *et al.*, 2002) und in Astrocyten Signalkaskaden auslöst (Guo *et al.*, 1992). Auch wurde postuliert, dass Glutathion selbst oder γ -Glutamylpeptide an Glutamatrezeptoren binden und als Agonisten oder Modulatoren wirken (Varga *et al.*, 1994, 1997; Ogita *et al.*, 1995; Janáky *et al.*, 1999; Dringen und Hirr-

2 Einleitung

linger, 2003). Eine Vielzahl von γ -Glutamylpeptiden wurde im Hirn nachgewiesen (Kakimoto *et al.*, 1964; Kanazawa *et al.*, 1965; Reichelt, 1970; Sandberg *et al.*, 1994). Auch indirekt könnte Glutathion durch seine Rolle im Leukotrienstoffwechsel an Signaltransduktionswegen beteiligt sein (Dringen *et al.*, 2000).

2.2.3 Oxidativer Stress im Gehirn

Die mit hoher Wahrscheinlichkeit wichtigste Funktion des Glutathions im Gehirn ist die Verteidigung gegen oxidativen Stress. Im Vergleich zu anderen Organen hat das Gehirn einige Nachteile in dieser Hinsicht. Seine Regenerationsfähigkeit ist beschränkt, zerstörte Neuronen können - soweit man heute weiß - selten ersetzt werden. Der stark oxidative Stoffwechsel des Gehirns verbraucht 20 % des vom Körper aufgenommenen Sauerstoffs (Clarke und Sokoloff, 1999), woraus wahrscheinlich eine hohe Spontanproduktion von ROS folgt. Ferner wurde in einigen Hirnbereichen ein hoher Gehalt an Eisen gefunden (Gerlach *et al.*, 1994; Lan und Jiang, 1997). Eisen kann über Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion die Schädlichkeit von ROS erhöhen (Halliwell, 1992). Dies fällt besonders ins Gewicht, da das Gehirn außerdem reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist, welche leicht zu Fettsäureperoxiden oxidiert werden (Porter, 1984; Halliwell, 1992). Hinzu kommen die vergleichsweise geringen Aktivitäten antioxidativer oder am Glutathion-„Redoxcycling“ beteiligter Enzyme wie Superoxiddismutase, Catalase, Glutathionreductase und Glutathionperoxidase im Gehirn (Cooper, 1997; Ho *et al.*, 1997). Speziellere Quellen von ROS im Gehirn sind zum einen Microgliazellen, die mittels des Enzyms NADPH-Oxidase direkt Superoxid zur Abwehr von Krankheitserregern erzeugen (Sankarapandi *et al.*, 1998). Zum anderen können Neurotransmitter aus der Familie der Catecholamine autoxidieren, wobei ROS entstehen (Halliwell und Gutteridge, 1999; Halliwell, 2001).

Oxidativem Stress im Gehirn wird in vielen Fällen eine Rolle bei neurodegenerativen Prozessen zugesprochen (zur Übersicht siehe Halliwell, 2006a). Solche Prozesse können, wie im Falle des Alterns (Benzi und Moretti, 1995; Halliwell, 2001; Barja, 2004; Junqueira *et al.*, 2004; Poon *et al.*, 2004), physiologischer oder pathologischer Natur sein. Zu den Erkrankungen, bei deren

2.2 Zelltypen des Gehirns und ihre Beziehung zu Glutathion und oxidativem Stress

Verlauf oxidativem Stress eine Rolle zugesprochen wird, zählen das Idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS), die Alzheimersche Krankheit, Schlaganfall und die Amyotrophe Lateralsklerose (Jenner, 2003; Andersen, 2004; Emerit *et al.*, 2004; Loh *et al.*, 2006). Dabei werden verschiedene Ursachen für das Auftreten des oxidativen Stresses diskutiert. Eine Möglichkeit ist die Mutation eines oder mehrerer Enzyme, die zu einer erhöhten ROS-Konzentration führt (Morrison und Morrison, 1999). Enzyme, die davon betroffen sein könnten, sind die der mitochondrialen Atmungskette. So wurde an aus Herzzellen isolierten Mitochondrien gezeigt, dass Hemmung oder ischaemische Schädigung von Enzymen der Atmungskette die ROS-Produktion verstärkt (Chen *et al.*, 2008). Auch Erhöhung der Eisenkonzentration im Gehirn durch eine Störung des Eisenstoffwechsels wird als Ursache in Betracht gezogen (Todorich und Connor, 2004; Zecca *et al.*, 2004). Insbesondere neuere Berichte erwägen auch eine Fehlfunktion des Proteasoms, die zur Aggregation durch ROS geschädigter Proteine führen kann (Grune *et al.*, 2004; Hyun *et al.*, 2004; Halliwell, 2006b). In einigen Fällen geht man auch von einer irrtümlichen Aktivierung von Microgliazellen aus. Dies wurde für die Alzheimersche Krankheit und bei HIV-Infektion berichtet (Meda *et al.*, 1995; Bissel und Wiley, 2004; Verani *et al.*, 2005).

Vielfältige Hinweise auf eine Beteiligung von oxidativem Stress an der Pathogenese finden sich beim IPS (Litvan *et al.*, 2007). Diese neurodegenerative Erkrankung zeichnet sich durch eine progressive Zerstörung dopaminerger Neuronen in der *pars compacta* der *substantia nigra* aus und geht mit der Bildung von Proteinaggregaten aus α -Synuclein, sogenannten *Lewy Bodies*, einher. Bereits bei der präsymptomatischen Form, der *Incidental Lewy Body Disease*, wurde in der *substantia nigra* ein verringerter Glutathiongehalt festgestellt (Dexter *et al.*, 1994). Bei vollem Ausbruch wurde (ebenfalls in der *substantia nigra*) eine Reduktion des Glutathiongehalts um bis zu 50 % im Verhältnis zu gesunden Vergleichspersonen gefunden (Sofic *et al.*, 1992; Sian *et al.*, 1994; Pearce *et al.*, 1997). Dies wurde als Hinweis auf oxidativen Stress interpretiert (Nakamura *et al.*, 1997). Neben dieser Störung des Glutathionstoffwechsels wurden bei IPS außerdem ein erhöhter Eisengehalt in der *substantia nigra* (Youdim und Riederer, 1993; Gerlach *et al.*, 1994; Jenner, 2003) und verstärkte Lipidperoxidation (Jenner *et al.*, 1992; Dexter *et al.*, 1994) festgestellt. Erhöhter Eisengehalt könnte in der Tat eine Rolle bei oxidativen Schäden im Hirn im Zusammenhang mit IPS spielen, da neugeborene Mäuse, denen eine Woche lang Eisen gegeben wurde, im Alter verstärkt Anzeichen oxidativer Schäden und Verlust der Integrität dopaminerger Neuronen zeigen (Kaur *et al.*, 2007). Ein weiterer Beleg für den Zusammenhang

2 Einleitung

zwischen oxidativem Stress und IPS sind die Erkenntnisse über das Gen DJ-1. In einigen Familien, bei denen IPS auftritt, scheint die Ursache in einer Mutation dieses Gens zu liegen (Bonifati *et al.*, 2003). An *Drosophila* wurde gezeigt, dass Mutationen des Gens oder seine Inaktivierung zu neuronalen Schäden und erhöhter ROS-Produktion führen (Yang *et al.*, 2005; Meulener *et al.*, 2006). Die genaue Funktion des von DJ-1 kodierten Proteins ist unbekannt. Das Protein wird jedoch bei oxidativem Stress zu einer saureren Form modifiziert (Wilson *et al.*, 2003; Kinumi *et al.*, 2004) und in die Mitochondrien transportiert (Canet-Avilés *et al.*, 2004). Diese saure Form wurde auch bei der sporadischen Form des Parkinsonsyndroms im Gehirn in erhöhten Mengen gefunden (Bandopadhyay *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2006). Die mitochondriale Translokation von DJ-1 ist ein weiterer Verknüpfungspunkt zum Parkinsonsyndrom, da mitochondriale Schäden und Fehlfunktionen schon sehr früh zur Erklärung der Pathogenese von IPS herangezogen wurden (Gandhi und Wood, 2005).

Die Ursache des oxidativen Stresses bei IPS liegt noch im Dunkeln, jedoch scheint die Beteiligung einer Funktionsstörung umgebender Glia möglich (Jenner und Olanow, 1998; Vila *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002; Heales *et al.*, 2004). Der gemessene Glutathionverlust in der *substantia nigra* kann nicht ausschließlich auf den Verlust an dopaminergen Neuronen zurückzuführen sein, deshalb liegt die Vermutung nahe, dass auch Gliazellen bei IPS unter oxidativem Stress leiden (Jenner und Olanow, 1998). Ob dieser gliale Glutathionverlust auf verringerte Synthese oder erhöhten Verbrauch zurückzuführen ist, ist ungeklärt (Jenner, 2003). Ferner könnten Gliazellen auch Verbindungen wie NO oder Cytokine freisetzen, die zur Schädigung der Neuronen beitragen (Hirsch *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 2001).

Im Gehirn von IPS-Patienten wurde auch eine erhöhte Konzentration von 5-Cysteinyl-Dopamin gefunden (Spencer *et al.*, 1998), einer Verbindung, die zu den Cysteinyl-Catecholaminen zählt. Letztere wurden zusammen mit anderen Chinonderivaten der Catecholamine als neurotoxisch eingestuft (Graham, 1978; Zhang *et al.*, 2000a; Spencer *et al.*, 2002). Die Bildung von Chinonen wurde auch als Form von oxidativem Stress im Zusammenhang mit sporadischen oder toxininduzierten Formen des Parkinsonsyndroms diskutiert (Asanuma *et al.*, 2004). 5-Cysteinyl-Dopamin entsteht durch Umsetzung von 5-S-Glutathionyl-Dopamin mittels der γ GT (Wang und Ballatori, 1998). Die Bildung von 5-S-Glutathionyl-Dopamin könnte mitverantwortlich für den Glutathionverlust sein, da es in einer superoxidabhängigen Reaktion aus Glutathion und Do-

pamin entsteht (Spencer *et al.*, 1995; Hirrlinger *et al.*, 2002b). Möglicherweise spielen jedoch neben Autoxidationsprodukten auch andere Dopaminmetabolite eine Rolle bei der Pathogenese von IPS (Übersicht: siehe Galvin, 2006).

2.3 Transportsysteme

Zellen sind von ihrer Umgebung durch eine biologische Membran, die Plasmamembran, abgetrennt. Eukaryontische Zellen enthalten Kompartimente, die ihrerseits durch eigene intrazelluläre Membranen vom Cytosol abgegrenzt sind. Der unpolare Teil biologischer Membranen stellt ein unüberwindliches Diffusionshindernis für die meisten ionischen und anderen polaren Substanzen dar. Der Zellmetabolismus erfordert jedoch die Zufuhr neuer Metabolite und die Ausscheidung verbrauchter Stoffe sowie den Stoffaustausch zwischen Zellkompartimenten. Um dies zu gewährleisten, benötigt die Zelle Transportproteine, die solche Substanzen durch Membranen schleusen können.

Man kann primär zwei Arten von Transport unterscheiden, passiven und aktiven Transport. Beim passiven Transport, auch erleichterte Diffusion genannt, folgen transportierte Stoffe ihren Konzentrationsgradienten, die zwischen den beiden Seiten einer biologischen Membran bestehen. Bei den Proteinen, die diesen passiven Transport ermöglichen, kann es sich zum einen um Kanäle handeln, die Substanzen spezifisch erlauben, die Membran frei zu passieren. Zum anderen gibt es auch Transporter, die ihre Substrate auf der einen Seite der Membran binden, daraufhin ihre Konformation ändern und ihr Substrat dann auf der anderen Seite freisetzen. Bei aktivem Transport werden Substrate entgegen einem Konzentrationsgradienten unter Energieverbrauch transportiert. Die Energie kann dabei aus verschiedenen Quellen stammen. Viele Transporter nutzen direkt die Spaltung der endständigen energiereichen Bindung des ATP als Energiequelle (direkter aktiver Transport). Weitere aktive Transporter nutzen den Konzentrationsgradienten anderer Stoffe und/oder das elektrische Potenzial über die Membran als Energiequelle. Man spricht bei letzterem auch von indirektem aktivem Transport, da die notwendigen antreibenden Gradienten meist durch direkten aktiven Transport erzeugt werden.

2 Einleitung

Eine zweite Einteilungsmöglichkeit für Transporter besteht in der Transportstöchiometrie. Man unterscheidet Uniport, Symport und Antiport. Beim Uniport wird nur ein Molekül auf einmal transportiert. Im Falle des Symports werden mehrere Substrate (meist zwei) gleichzeitig in die selbe Richtung transportiert. Im Gegensatz dazu werden beim Antiport mehrere Substrate (ebenfalls meist zwei) in entgegengesetzter Richtung durch die Membran transportiert. Weiterhin werden Transportprozesse in elektroneutrale und elektrogene unterteilt. Im ersten Fall ändert sich das elektrische Potenzial über die Membran durch den Transportprozess nicht, im zweiten Fall dagegen schon.

Zur Organisation der Vielfalt an Transportern werden diese anhand von Transportcharakteristika oder Sequenzhomologien in Familien und Superfamilien eingeteilt. Prominente Vertreter sind die Superfamilie der Transporter löslicher Substanzen (SLC) und die Superfamilie der ABC-Transporter (Wipf *et al.*, 2002; Nishimura und Naito, 2005).

2.3.1 Die ABC-Superfamilie

Mitglieder der Superfamilie der ATP-Bindungskassettentransporter (ABC-Transporter) finden sich in Zellen aller Lebensformen (Higgins, 1992). Die Superfamilie wurde 1986 definiert (Higgins *et al.*, 1986), ihre Mitglieder zeichnen sich durch eine aus vier Domänen bestehende minimale Funktionseinheit aus (Higgins *et al.*, 1986). Zwei dieser vier Domänen sind Transmembrandomänen (TMD1 und TMD2), die meist aus je sechs Transmembran- α -Helices bestehen und sowohl für die Substratspezifität als auch für den Transport sorgen. Die zwei anderen sind Nucleotidbindungsdomänen (NBD1 und NBD2), die die ATP-Hydrolyse katalysieren. Sie werden auch als Nucleotidbindungstaschen (NBF) bezeichnet und sind der Ursprung des Namens „ATP-Bindungskassettentransporter“. Auf der Sequenzhomologie dieser NBFs beruht die Zuordnung zur ABC-Superfamilie (Dean und Annilo, 2005). Die Sequenz jeder NBF enthält drei konservierte Motive. Zwei davon, das Walker A- und das Walker B-Motiv, finden sich in allen ATP-bindenden Proteinen (Dean und Annilo, 2005). Hinzu kommt das Signatur C-Motiv, das in der Nähe des Walker B-Motivs liegt (Dean und Annilo, 2005).

Die minimale Funktionseinheit der ABC-Transporter kann entweder von einem Protein allein

2.3 Transportsysteme

- man spricht dann von einem Volltransporter - oder durch ein (Homo- oder Hetero-) Dimer aus zwei „Halbtransportern“ gebildet werden. Die meisten Mitglieder der ABC-Superfamilie sind ATP-abhängige aktive Transporter, jedoch gibt es auch einige Ausnahmen. Ein Beispiel hierfür ist der Cystische-Fibrose-Transmembranleitfähigkeitsregulator (CFTR, ABCC7), bei dem es sich um einen Ionenkanal handelt. Mit Ausnahme einiger weniger bakterieller ABC-Proteine findet der Transport immer ausgehend vom Cytosol statt, entweder hinaus aus der Zelle oder hinein in Zellkompartimente (Linton und Higgins, 2007).

Das erste ABC-Protein, das in Säugetieren entdeckt wurde, ist das 1976 beschriebene P-Glycoprotein (MDR1, ABCB1) (Juliano und Ling, 1976). Es wurde auf der Suche nach der Ursache von Mehrfachresistenz (MDR) gegenüber Krebs-Chemotherapeutica entdeckt (Übersicht über MDR: Sheps und Ling, 2007). Mittlerweile umfasst die ABC-Superfamilie in Säugetieren 7 Familien (A-G) mit insgesamt 48 einzelnen Transportern (Dean und Annilo, 2005). Drei dieser Familien (B, C und G) enthalten Proteine, die MDR vermitteln (Sheps und Ling, 2007). Viele der Transporter versehen wichtige Aufgaben im Zellmetabolismus. Dies zeigt sich an der Tatsache, dass Erbkrankheiten basierend auf Defekten in 17 der 48 ABC-Transporter bekannt sind (Dean und Annilo, 2005). Auf Grund der langen Entdeckungsgeschichte und der Vielfältigkeit der ABC-Superfamilie wurden für die einzelnen Proteine verschiedenste Nomenklaturen verwendet. Eine Übersicht über die gebräuchlichsten Abkürzungen findet sich in Nishimura und Naito (2005).

2.3.1.1 Die ABCA-Familie

Die Mitglieder der ABCA-Familie sind meist am Lipidtransport beteiligt (Albrecht und Viturro, 2007; Zarubica *et al.*, 2007). Sie sind allesamt Volltransporter und stellen die Mitglieder der ABC-Superfamilie mit den größten Massen (Albrecht und Viturro, 2007). Menschliches ABCA13 ist mit einer Länge von 5058 Aminosäuren und einer vorhergesagten molekularen Masse von über 450 kDa der größte bekannte ABC-Transporter (Prades *et al.*, 2002; Albrecht und Viturro, 2007). ABCA-Transporter werden weiter unterteilt in zwei Unterfamilien, lange (1-4, 7, 12 und 13) und kurze (5, 6 und 8-10). ABCA1 transportiert Cholesterin und ist mitverantwortlich für die Bildung von HDL (Zarubica *et al.*, 2007). ABCA2 ähnelt ABCA1 und

2 Einleitung

ist möglicherweise durch eine Genverdopplung entstanden (Albrecht und Vitorro, 2007). Er kommt hauptsächlich im Gehirn vor und scheint eine Rolle bei der Myelinisierung zu spielen (Albrecht und Vitorro, 2007). ABCA4 ist als Vitamin A-Transporter am Sehprozess beteiligt (Dean, 2002). Die Gene für die kurzen ABCA-Transporter befinden sich sowohl beim Menschen als auch bei der Maus im selben Chromosomenabschnitt (Albrecht und Vitorro, 2007). Sie sind wesentlich kürzer als die der anderen ABCA-Transporter und zeigen mit Ausnahme von ABCA5 sehr hohe Homologie untereinander (Albrecht und Vitorro, 2007). Hinzu kommt, dass ihnen das Signatur C-Motiv fehlt, was nahelegt, dass sie durch Genduplikation aus einander oder aus einem gemeinsamen Ursprungsgen entstanden sind (Albrecht und Vitorro, 2007). Die mRNAs der meisten langen Transporter (1-4 und 7) und die mRNA von ABCA8 wurden im Gehirn gefunden (Kim *et al.*, 2008).

Defekte in einigen der ABCA-Transporter wurden als verantwortlich für einige Erbkrankheiten identifiziert. Zum Beispiel löst eine Mutation in ABCA1 die Tangier-Krankheit aus, eine autosomal rezessive Störung des Lipidstoffwechsels, bei der fast kein HDL und ApoA-I mehr im Blut nachgewiesen werden können (Brooks-Wilson *et al.*, 1999; Zarubica *et al.*, 2007). ABCA12 scheint für das Lipidgleichgewicht der Haut mitverantwortlich zu sein. Ein Defekt in diesem Protein löst die lamellare Ichthyose Typ 2 und die Harlekinichthyose aus (Lefèvre *et al.*, 2003; Kelsell *et al.*, 2005; Albrecht und Vitorro, 2007). ABCA1 und ABCA2 spielen möglicherweise auch eine Rolle bei der Entwicklung der Alzheimerschen Krankheit (zur Übersicht siehe Kim *et al.*, 2008).

2.3.1.2 Die ABCB-Familie

Die ABCB-Familie ist sehr heterogen. Die Tatsache, dass sie sowohl Voll- als auch Halbtransporter enthält, macht sie bei den Säugetieren einzigartig (Dean, 2002). Wie bereits oben erwähnt gehört MDR1/ABCB1, das erste entdeckte ABC-Protein, in diese Familie. Es ist ein Volltransporter und scheint wie die anderen Volltransporter der Familie (ABCB4 und ABCB11) Lipide zu transportieren (Pohl *et al.*, 2002; Elferink und Paulusma, 2007; Stieger *et al.*, 2007). ABCB4 und ABCB11 transportieren Phospholipide bzw. einfach geladene Gallensalze aus den Hepatocyten in die Galle (Elferink und Paulusma, 2007; Stieger *et al.*, 2007). Die mRNAs von ABCB1

und ABCB4 wurden im Hirn nachgewiesen (Kim *et al.*, 2008). Einige der Halbtransporter der Familie sind Peptidtransporter (Herget und Tampé, 2007), die sich in die Unterfamilie der antigenprozessierungsassoziierten Transporter (TAP) und möglicherweise ABCB8 und ABCB10 gliedern (Herget und Tampé, 2007). Die eigentlichen TAPs, ABCB2/TAP1 und ABCB3/TAP2, sitzen in der ER-Membran und transportieren die Peptidprodukte des Proteinabbaus im Cytosol ins ER, damit sie von MHC Klasse I-Proteinen präsentiert werden können (Herget und Tampé, 2007). Sie bilden Heterodimere (Tusnády *et al.*, 2006). ABCB9 bildet ein Homodimer und wird, da er den beiden TAPs ähnelt, als TAPL („TAP like“) bezeichnet (Herget und Tampé, 2007). Funktion und genaue Lokalisation sind ungeklärt, es existieren sowohl Hinweise für lysosomale Lokalisation als auch für Lokalisation im ER (Herget und Tampé, 2007). ABCB8 und ABCB10 sind mitochondrial lokalisiert (Herget und Tampé, 2007). Ihre Rollen sind ungeklärt und werden kontrovers diskutiert. Zu den vermuteten Funktionen gehören der Peptidtransport auf Grund ihrer Ähnlichkeit zu der TAP-Unterfamilie (Herget und Tampé, 2007), der Eisen-transport (Dean, 2002; Burke und Ardehali, 2007) und möglicherweise eine Beteiligung an der Verteidigung gegen oxidativen Stress (Burke und Ardehali, 2007). ABCB6/MTABC3 und ABCB7/Atm1p sitzen in den Membranen der Mitochondrien, ABCB6 in der äußeren (Burke und Ardehali, 2007), ABCB7 in der inneren Membran (Kispal *et al.*, 1997). ABCB6 scheint Porphyrine zu binden und ist vermutlich als Transporter an der Hämbiosynthese beteiligt (Krishnamurthy *et al.*, 2006; Burke und Ardehali, 2007). Ein Defekt in ABCB7 führt zur X-chromosomalen sideroblastischen Anämie mit cerebraler Ataxie, die sich durch abnormal hohe mitochondriale Eisenkonzentrationen auszeichnet (Allikmets *et al.*, 1999; Burke und Ardehali, 2007). Deshalb wird auch diesem Transporter eine Rolle im Eisenstoffwechsel zugeschrieben, möglicherweise bei der Bildung von Eisen-Schwefel-*Clustern* (Burke und Ardehali, 2007).

Neben der durch den Defekt in ABCB7 ausgelösten Anämie gibt es auch noch weitere Erbkrankheiten, die durch Mutationen in ABCB-Proteinen ausgelöst werden. Veränderungen in ABCB4 und ABCB11 sind verantwortlich für Typ 3 bzw. Typ 2 der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase (Deleuze *et al.*, 1996; Strautnieks *et al.*, 1998; de Vree *et al.*, 1998; Stefková *et al.*, 2004; Elferink und Paulusma, 2007). Ein Defekt in ABCB1 könnte auch am Parkinsonsyndrom beteiligt sein (Kortekaas *et al.*, 2005). Fehlt eines der beiden TAPs, fällt der Transporter vollständig aus und es kommt zu einem schweren Immundefizienzsyndrom, dem TAP-Defizienzsyndrom (Gadola *et al.*, 2000).

2 Einleitung

2.3.1.3 Die ABCC-Familie

Die ABCC-Familie umfasst die *multidrug-resistance*-Proteine (MRPs), den Cystische-Fibrose-Transmembranleitfähigkeitsregulator (CFTR/ABCC7) und die Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR1/ABCC8 und SUR2/ABCC9). In Säugetieren wurden insgesamt 13 Gene identifiziert, die dieser Familie zugerechnet werden (Annilo und Dean, 2004; Dean und Annilo, 2005), wovon 11 in den meisten Säugetieren vorhanden sind und ABC-Volltransporter kodieren (Dean, 2002; Dean und Annilo, 2005). Eine Übersicht über einige wichtige Eigenschaften von ABCC1 bis ABCC12 wurde in Tabelle 1 zusammengetragen. Über ABCC13 ist wenig bekannt, außerdem handelt es sich dabei vermutlich um ein Pseudogen (Annilo und Dean, 2004).

Die größte Untergruppe der ABCC-Familie ist die der MRPs. Sie werden anhand ihrer Membrantopologie und Phylogenie in zwei Untergruppen eingeteilt, die ABCC1/MRP1-ähnlichen und die ABCC4/MRP4-ähnlichen Transporter (Dean und Annilo, 2005). Die Transporter der ABCC1-Gruppe unterscheiden sich dabei von denen der ABCC4-Gruppe durch den Besitz einer weiteren Transmembrandomäne (TM0) (Borst *et al.*, 1999). Sie besteht im Gegensatz zu den beiden ABC-typischen Transmembrandomänen nur aus 5 Transmembranhelices und sorgt dafür, dass der C-Terminus der zugehörigen Proteine extrazellulär liegt (Borst *et al.*, 1999).

MRP1 ist das erste beschriebene MDR-vermittelnde Protein aus der ABCC-Familie (Cole *et al.*, 1992) und wird ubiquitär exprimiert (Bakos und Homolya, 2007). Es besitzt ein breites Substratspektrum und transportiert verschiedene Tumorthapeutika (Cole *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1994; Zaman *et al.*, 1994), Glutathionkonjugate, Glucuronkonjugate und organische Sulfate (Leier *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1994; Jedlitschky *et al.*, 1996). Zu den transportierten Substanzen gehört auch Leukotrien C₄, weswegen MRP1 eine Rolle bei der Entzündungsantwort zugesprochen wurde (Leier *et al.*, 1994; Wijnholds *et al.*, 1997; König *et al.*, 1999). MRP1 wird durch den Leukotrien D₄-Rezeptorantagonisten Mk571 (Abb. 3) gehemmt (Leier *et al.*, 1994). Es gibt mehrere Hinweise für eine Beteiligung von MRP1 an der Verteidigung gegen oxidativen Stress. Wie in Tabelle 1 beschrieben, transportiert MRP1 sowohl reduziertes als auch oxidiertes Glutathion (Leier *et al.*, 1996; Paulusma *et al.*, 1999; Hirrlinger und Dringen, 2005).

Tabelle 1. Einige Eigenschaften der ABC-Transporter ABCC1 bis ABCC12. Anmerkungen: Die mRNA-Konzentrationen nach Nishimura und Naito (2005) wurden entsprechend des dort definierten Verhältnisses als kein (0, < 0.001), wenig (+, < 0.01) und viel (++, > 0.01) quantifiziert. Von Hirrlinger *et al.* (2002a) wurden Neuronen-, Astroglia-, Oligodendrocyten- und Microgliakulturen aus Ratte untersucht. (*) Abcc6 war schwach in Astrocyten exprimiert. Referenzen: ¹Paulusma *et al.* (1999); ²Hirrlinger und Dringen (2005); ³Leier *et al.* (1996); ⁴Fernández-Checa *et al.* (1992); ⁵Nishida *et al.* (1992); ⁶Kool *et al.* (1999b); ⁷Lai und Tan (2002); ⁸Wijnholds *et al.* (2000); ⁹Jedlitschky *et al.* (2000); ¹⁰Madon *et al.* (2000); ¹¹Linsdell und Hanrahan (1998); ¹²Kogan *et al.* (2003); ¹³Nishimura und Naito (2005); ¹⁴Nies *et al.* (2004); ¹⁵Hirrlinger *et al.* (2002a). Abkürzungen für Lokalisationen der mRNA: sm Skelettmuskel; l Leber; nn Nebenniere; pr Prostata; pa Pankreas; g Gehirn; pl Plazenta; h Hoden.

ABCC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Alt. Namen	MRP1	MRP2	MRP3	MRP4	MRP5	MRP6	CFTR	SURI	SUR1	SUR2	MRP7	MRP8	MRP9
ABCC-Gruppe	1	1	1	4	4	1	-	-	-	-	1	4	4
GSH-Transport	ja ^{1,2}	ja ¹	nein ⁶	ja ⁷	ja ⁸	n.u.	ja ^{11,12}	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
GSSG-Transport	ja ^{2,3}	ja ^{4,5}	n.u.	n.u.	nein ⁹	nein ¹⁰	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
mRNA im Gehirn ¹³	+	0	0	++	++	0	0	++	+	++	0	0	0
mRNA Maximalkonz. ¹³	sm	l	nn	pr	sm	l	pa	g	sm	pl	h	h	h
Protein im Gehirn ¹⁴	ja	nein	nein	ja	ja	nein	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
mRNA in Kulturen ¹⁵	ja	nein	ja	ja	ja	*	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

2 Einleitung

Unkonjugiertes GSH stellt jedoch nur ein schlechtes Substrat dar (Leier *et al.*, 1996; Loe *et al.*, 1998, 2000), der Transport kann allerdings durch verschiedene Substanzen stimuliert werden (Loe *et al.*, 2000; Leslie *et al.*, 2003). Gegenüber oxidiertem Glutathion besitzt MRP1 einen apparenten K_m -Wert von 100 μM (Leier *et al.*, 1996). Deshalb könnte MRP1 bei oxidativem Stress GSSG exportieren, sollte die Kapazität der Glutathionreductase zur Reduktion nicht ausreichen (Hirrlinger *et al.*, 2001; Hirrlinger und Dringen, 2005; Bakos und Homolya, 2007). Überexpression von MRP1 wirkte nicht protektiv gegenüber oxidativem Stress (Balcerczyk *et al.*, 2003), jedoch wurde MRP1-vermittelter GSSG-Export unter oxidativem Stress für Astrocyten (Hirrlinger *et al.*, 2001) und Endothelzellen (Mueller *et al.*, 2005) gezeigt. Weitere Indizien für Beteiligung von MRP1 an der Verteidigung gegen oxidativen Stress sind mehrere Promotorregionen des MRP1-Gens, die auf oxidativen Stress (Zhu und Center, 1994), Nrf2 (Hayashi *et al.*, 2003) oder ROS (Yamane *et al.*, 1998; Tatebe *et al.*, 2002) reagieren.

Im Gegensatz zu MRP1 kommt MRP2 nur in der apikalen Membran polarisierter Zellen wie Hepatocyten, dem Epithel des renalen proximalen Tubus und dem Darmepithel vor (Keppler und König, 1997; König *et al.*, 1999; Nies und Keppler, 2007). Es wurde nach MRP1 als zweites MRP entdeckt (Mayer *et al.*, 1995) und zeigt eine Substratspezifität, die fast identisch zu der von MRP1 ist (König *et al.*, 1999; Jedlitschky und Keppler, 2002; Nies und Keppler, 2007). Ebenso wie MRP1 wird es von Mk571 inhibiert (Büchler *et al.*, 1996). Eine der Hauptaufgaben von MRP2 ist der Export von Bilirubin-Glucuroniden und Gallensalzen in die Galle (Akita *et al.*, 2001; Nies und Keppler, 2007; Stieger *et al.*, 2007). Ist MRP2 defekt, führt dies zu einer chronischen erblichen Form von Gelbsucht, dem Dubin-Johnson-Syndrom (Dubin und Johnson, 1954; Kartenbeck *et al.*, 1996; Keppler und Kartenbeck, 1996), welches mit einem Überschuss an Bilirubinkonjugaten einhergeht. Andere Funktionen von MRP2 können bei einem Ausfall durch Hochregulation anderer Transporter (vor allem ABCC3/MRP3) kompensiert werden (Keppler und Kartenbeck, 1996; Donner und Keppler, 2001; König *et al.*, 2003). Alles in allem spielt MRP2 vermutlich eine Schlüsselrolle bei der Ausscheidung anionischer Konjugate (Nies und Keppler, 2007).

Unter den MRPs hat MRP1 die höchste Sequenzhomologie zu MRP3 (Belinsky *et al.*, 1998). Die Substratspezifität ist ähnlich, jedoch bevorzugt MRP3 Glucuronide (Borst *et al.*, 2007). Beispiele für gute Substrate sind Morphin-3-Glucuronid (Zelcer *et al.*, 2005), Etoposid-Glucuronid

2.3 Transportsysteme

(Zelcer *et al.*, 2001), Östradiol-17 β -Glucuronid (Hirohashi *et al.*, 1999) und Bilirubin-Glucuronide (Belinsky *et al.*, 2005). MRP3 kann auch Gallensalze transportieren, jedoch ist die Affinität stark speziesabhängig (Borst *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu Glutathionkonjugaten wird GSH von MRP3 nicht transportiert (Kool *et al.*, 1999b). Die Verbreitung der Expression ist nicht ganz so ubiquitär wie die von MRP1, das MRP3-Protein wurde in Leber, Niere, Nebenniere, Darm, Bauchspeicheldrüse, Gallenblase und Milz gefunden (Scheffer *et al.*, 2002b). Die publizierten Resultate zur Expression von MRP3 in Leber schwanken stark (Borst *et al.*, 2007), was möglicherweise auf die hohe Induzierbarkeit von MRP3 in Leber zurückzuführen ist (Donner und Keppler, 2001; Scheffer *et al.*, 2002b; Borst *et al.*, 2007). Die physiologische Aufgabe von MRP3 ist noch unklar, möglicherweise spielt es eine Rolle bei der Ausscheidung giftiger organischer Anionen (Borst *et al.*, 2007).

MRP4 und MRP5 können neben mehreren anderen organischen Anionen auch cyclische Nucleotide transportieren (Jedlitschky *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001), jedoch sind die genauen Transportcharakteristika noch umstritten (Borst *et al.*, 2007). Beide Proteine können GSH transportieren (Wijnholds *et al.*, 2000; Lai und Tan, 2002; Rius *et al.*, 2003). Sowohl MRP4 als auch MRP5 kommt in fast allen Geweben vor (Lee *et al.*, 1998; Wijnholds *et al.*, 2000), wobei jedoch MRP5 nur in geringen Mengen gefunden wurde und bisher technische Schwierigkeiten eine genauere Bestimmung der Gewebeverteilung dieses Transporters unmöglich machten (Borst *et al.*, 2007). MRP4 hat die einzigartige Eigenschaft, in polarisierten Zellen abhängig vom Zelltyp sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran vorkommen zu können (Borst *et al.*, 2007). Die physiologischen Funktionen von MRP4 und MRP5 sind noch weitgehend ungeklärt. Physiologische Substrate von MRP4 sind möglicherweise Gallensalze (Rius *et al.*, 2003, 2006) und Ureate (van Aabel *et al.*, 2005). MRP5 wurde als Hochaffinitätstransporter für cGMP beschrieben (Jedlitschky *et al.*, 2000), jedoch werden diese Ergebnisse kontrovers diskutiert (Borst *et al.*, 2007).

MRP6 ist in 43 % der Aminosäuren identisch mit MRP1 (Kool *et al.*, 1999a). Außerdem gibt es im menschlichen Genom zwei MRP6/ABCC6-Pseudogene (Cai *et al.*, 2001; Germain, 2001). MRP6 wird stark in Leber und Niere exprimiert (Kool *et al.*, 1999b; Bergen *et al.*, 2000) und kommt schwach exprimiert in vielen anderen Geweben vor (Kool *et al.*, 1999b; Bergen *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2005). In menschlichen Hepatocyten ist MRP6 in der basolateralen Membran

2 Einleitung

lokalisiert, was für eine Funktion beim Rücktransport von Substanzen ins Blut spricht (Scheffer *et al.*, 2002a). Generell sind physiologische Funktion und Substrate von MRP6 noch unbekannt (Bergen *et al.*, 2007), allerdings führen Mutationen in MRP6 zu PXE, *Pseudoxanthoma Elasticum* (Le Saux *et al.*, 1999, 2000; Bergen *et al.*, 2004), einer seltenen autosomal rezessiven Erbkrankheit des Bindegewebes, die zur Calcifizierung elastischer Fasern führt (Iliás *et al.*, 2002; Bergen *et al.*, 2007). Sie beeinträchtigt hauptsächlich die Haut, die Augen und das kardiovaskuläre System (Connor *et al.*, 1961; Pope, 1975; Neldner, 1988; Plomp *et al.*, 2004). Der Zusammenhang zwischen defektem MRP6 und dem Auftreten von PXE ist unbekannt, Hauptexpressionsort von MRP6 und von PXE beeinträchtigte Gewebe stimmen nicht überein. Einerseits ist es möglich, dass PXE systemisch ist und defektes MRP6 in Leber und Niere die Krankheit verursacht (Uitto, 2004). Andererseits könnten auch lokale Fehlfunktionen von MRP6 die Ursache der Krankheit sein (Pasquali-Ronchetti *et al.*, 1981, 1986; Passi *et al.*, 1996; Quaglini *et al.*, 2000).

MRP7 wurde bei einer systematischen Datenbanksuche gefunden (Hopper *et al.*, 2001). Seine Topologie ähnelt der von MRP1, MRP2, MRP3 und MRP6 (Kruh *et al.*, 2007), jedoch gleicht es diesen Proteinen auf Aminosäureebene nicht mehr als anderen Mitgliedern der ABCC-Familie (Kruh *et al.*, 2007). Studien über Proteinexpression und -lokalisation von MRP7 in Geweben wurden bisher nicht publiziert, jedoch wurde MRP7-mRNA in verschiedenen Geweben wie Hoden, Haut, Magen, Milz, Dickdarm, Niere, Herz und Gehirn gefunden (Hopper *et al.*, 2001; Takayanagi *et al.*, 2004; Kruh *et al.*, 2007). MRP7-Protein wurde außerdem in zwei Zelllinien nachgewiesen (Naramoto *et al.*, 2007). Die physiologische Funktion von MRP7 ist ebenfalls noch ungeklärt. Ein einziger Hinweis auf eine mögliche Rolle bei der Beeinflussung von Immunreaktionen durch Inhibition der von natürlichen Killerzellen vermittelten Zelllyse wurde publiziert (Wooden *et al.*, 2005). Transport einiger verbreiteter MRP-Substrate wie Östradiol-17 β -Glucuronid und LTC₄ wurde nachgewiesen (Hopper-Borge *et al.*, 2004), jedoch werden andere MRP-Substrate wie Taurocholat (Abb. 5) von MRP7 nicht transportiert (Kruh *et al.*, 2007). Andererseits scheint MRP7 Resistenz gegen Taxane zu vermitteln (Kruh *et al.*, 2007; Naramoto *et al.*, 2007), eine Stoffgruppe, die von MRPs im allgemeinen nicht transportiert wird (Kruh *et al.*, 2007). In dieser Hinsicht ähnelt MRP7 eher P-Glycoprotein (ABCB1) und ABCG2 (Kruh *et al.*, 2007).

MRP8 und MRP9 ähneln in ihrer Topologie MRP4 und MRP5 (Kruh *et al.*, 2007). Sie sind untereinander stark homolog (47 % Identität) und ihre Gene liegen im menschlichen Genom nah beieinander (Tammur *et al.*, 2001; Yabuuchi *et al.*, 2001; Bera *et al.*, 2002). Eine phylogenetische Analyse weist darauf hin, dass beide vor nicht allzu langer Zeit aus einer Genduplikation hervorgingen (Tammur *et al.*, 2001). Beide weisen alternative Spleißvarianten auf (Yabuuchi *et al.*, 2001; Bera *et al.*, 2002). In Mäusen gibt es nur ein Ortholog zu MRP9, MRP8 ist im Genom nicht vorhanden (Shimizu *et al.*, 2003). Die Gewebeverteilung von MRP8 und MRP9 wurde bisher fast nur auf mRNA-Ebene festgestellt. Bei MRP8 divergieren die Ergebnisse dieser Verteilung. Zwei Gruppen fanden MRP8-mRNA weitreichend in verschiedenen Geweben (Tammur *et al.*, 2001; Yabuuchi *et al.*, 2001), eine andere Gruppe fand MRP8-mRNA hauptsächlich in Leber, Hirn und Plazenta (Bera *et al.*, 2001). MRP9-mRNA wurde in Hoden, Eierstock, Hirn, Prostata und Brust gefunden (Tammur *et al.*, 2001; Bera *et al.*, 2002), am stärksten im Hoden (Augustine *et al.*, 2005; Maher *et al.*, 2005). Außerdem wurde MRP9 mittels monoklonaler Antikörper in Mäuse- und Ebersperma nachgewiesen (Ono *et al.*, 2007). Über die physiologischen Rollen von MRP8 und MRP9 ist nur wenig bekannt. MRP8 transportiert neben gebräuchlichen MRP-Substraten wie Östradiol-17 β -Glucuronid, LTC₄, Glycocholat und Taurocholat (Bortfeld *et al.*, 2006; Kruh *et al.*, 2007) auch cyclische Nucleotide und Nucleotidanaloga (Kruh *et al.*, 2007; Oguri *et al.*, 2007). Außerdem bestimmt überraschenderweise ein Einzelnucleotidpolymorphismus in MRP8 den Ohrenschmalztyp (nass oder trocken, Yoshiura *et al.*, 2006; Kruh *et al.*, 2007). Die physiologische Rolle von MRP9 ist völlig unklar. Neben einem Transkript der vollen Länge von 4.5 kb wurde auch noch ein verkürztes Transkript von 1.3 kb nachgewiesen (Bera *et al.*, 2002). Trotz des Vollängentranskripts steht nicht fest, ob MRP9 überhaupt ein funktionaler Transporter ist. Ono *et al.* (2007) jedenfalls konnten keinen Transport gebräuchlicher MRP-Substrate durch MRP9 nachweisen.

CFTR (ABCC7) ist der einzige Ionenkanal unter den ABC-Transportern (Aleksandrov *et al.*, 2007). Nach Aleksandrov *et al.* (2007) handelt es sich bei CFTR um einen ligandenaktivierten Ionenkanal, bei dem die ATP-Hydrolyse einzig der schnelleren Freisetzung des Liganden ADP dient. Beide Nucleotidbindungsdomänen binden ATP, jedoch wird es nur in NBD2 hydrolysiert (Aleksandrov *et al.*, 2002; Basso *et al.*, 2003). Neben der Funktion als Chloridkanal wurde auch Transport von GSH beschrieben (Linsdell und Hanrahan, 1998; Kogan *et al.*, 2003). Der Name des Proteins zeigt seine Verbindung zur cystischen Fibrose (CF) an. Unter Kaukasiern ist sie

2 Einleitung

die verbreitetste Erbkrankheit, sie wird durch fehlerhaftes CFTR ausgelöst (Aleksandrov *et al.*, 2007). Bei ungefähr 90 % der CF-Patienten ist Phenylalanin 508 von CFTR deletiert (Aleksandrov *et al.*, 2007). Diese Deletion verhindert korrekte Faltung von CFTR (Kopito, 1999; Rioridan, 2005) und führt zur Polyubiquitinylierung und damit zum proteasomalen Abbau von CFTR (Ward *et al.*, 1995).

Die Sulfonylharnstoffrezeptoren SUR1 (ABCC8) und SUR2 (ABCC9) regulieren die Aktivität der K⁺-selektiven Poren K_{IR}6.1 oder K_{IR}6.2, mit denen zusammen sie ATP-sensitive K⁺-Kanäle (K_{ATP}) bilden (Bryan *et al.*, 2007). Sie besitzen selbst keine bekannte Transporteraktivität (Bryan *et al.*, 2007). SUR1 verbindet sich hauptsächlich mit K_{IR}6.2 und kommt vorzugsweise im neuroendokrinen System vor (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999). Von SUR2 gibt es zwei alternative Spleißvarianten, zum einen SUR2A, die sich ebenfalls mit K_{IR}6.2 verbindet und im Herz- und Skelettmuskel vorkommt, und zum anderen SUR2B, die sich mit K_{IR}6.1 verbindet und in glatten Muskelzellen vorkommt (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999). Der SUR1/K_{IR}6.2-Kaliumkanal ist wichtig für den Zucker- und Insulinhaushalt des Körpers. Defekte in SUR1 oder K_{IR}6.2 führen zu hyperinsulinämischer Hypoglykämie oder neonatalem Diabetes (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999; Koster *et al.*, 2000; Cartier *et al.*, 2001; Bryan *et al.*, 2007). Es sind keine Erbkrankheiten bekannt, die einzig auf einen Defekt in SUR2 zurückzuführen sind, jedoch spielen Mutationen in SUR2 möglicherweise eine Rolle bei der Herzerweiterung (Bienengraeber *et al.*, 2004).

Das letzte Mitglied der ABCC-Familie ist ABCC13. Das Gen wurde zum ersten Mal von Yabuuchi *et al.* (2002) beschrieben, scheint aber zumindest im Menschen keinen vollständigen ABC-Transporter zu kodieren (Yabuuchi *et al.*, 2002; Annilo und Dean, 2004). Mittels *Northern Blot* wurden die höchsten ABCC13-mRNA-Konzentrationen in Dickdarm, Knochenmark, Speicheldrüse und fötaler Leber gefunden (Annilo und Dean, 2004). Untersuchungen in Menschen, Menschenaffen und Halbaffen zeigten, dass sich ABCC13 von einem normalen Gen zu einem Pseudogen entwickelt hat (Annilo und Dean, 2004). In Menschen und Menschenaffen enthält das endgültige Haupttranskript von ABCC13 Kopien von 6 Exons, wobei das letzte transkribierte Exon eine 11 bp-Verschiebung des Leserahmens gegenüber der orthologen Sequenz der Halbaffen aufweist (Annilo und Dean, 2004). Das endgültige Transkript des Orthologs in Rhesus-Makakken enthält Kopien von 28 Exons (Annilo und Dean, 2004). Der

Abcc13-Genlokus ist auch in Ratten und Mäusen vorhanden, jedoch ist das Gen viel stärker durch Mutationen verändert als bei Menschen und Menschenaffen (Annilo und Dean, 2004). Im Licht dieser Ergebnisse ist zu bezweifeln, dass ABCC13 im Menschen überhaupt eine Funktion zukommt; ein funktionaler ABC-Transporter ist es mit Sicherheit nicht (Annilo und Dean, 2004).

2.3.1.4 Die Familien ABCD bis ABCG

Die ABCD-Familie ist die der peroxisomalen ABC-Transporter (Shani und Valle, 1998; Theodoulou *et al.*, 2006; Wanders *et al.*, 2007). Sie besteht im Menschen aus vier Halbtransportern (Shani und Valle, 1998), von denen ABCD3 zuerst entdeckt wurde (Kamijo *et al.*, 1990). Die Maus hat ebenfalls vier Abcd-Gene, die strikt ortholog zu den menschlichen sind (Schriml und Dean, 2000). Es steht nicht fest, ob die Transporter dieser Familie vorzugsweise Homo- oder Heteromere bilden. Verschiedene Gruppen fanden Hinweise für beide Alternativen (Übersicht: Wanders *et al.*, 2007). Generell wird den ABCD-Transportern die Funktion des Transports sehr langkettiger Fettsäuren zugesprochen, obwohl ihre genaue Funktion im Menschen noch unklar ist (Wanders *et al.*, 2007). Defekte in ABCD1 führen zur X-verknüpften Adrenoleukodystrophie (X-ALD), einer neurodegenerativen Erbkrankheit, die zu fortschreitender Demyelinisierung von Neuronen in der weißen Hirnsubstanz und zu Nebenniereninsuffizienz führt (Mosser *et al.*, 1993). Die biochemischen Zusammenhänge sind noch unklar, allerdings führt X-ALD zur Akkumulation sehr langkettiger Fettsäuren (Wanders *et al.*, 2007). Erbkrankheiten im Zusammenhang mit anderen ABCD-Transportern sind nicht bekannt (Wanders *et al.*, 2007).

Die ABCE und ABCF-Familien sind mit einem bzw. drei Mitgliedern die kleinsten ABC-Familien (Dean, 2002; Dean und Annilo, 2005). Beide haben zwar ABC-typische Nucleotidbindungsdomänen, aber keine Transmembrandomänen und sind somit auch nicht an Membrantransportvorgängen beteiligt (Allikmets *et al.*, 1996; Dean, 2002). Das ABCE-Gen hat ebenfalls ein Ortholog in Archaea und ist damit das einzige menschliche ABC-Gen, das außerhalb der Eukaryonten konserviert ist (Dean und Annilo, 2005). Es ist allgemein hoch konserviert und das kodierte Protein enthält zwei Eisen-Schwefel-Cluster (Barthelme *et al.*, 2007). Dieses Protein wird als oligoadenylatbindendes Protein oder RNAse L-Inhibitor bezeichnet (Bisbal *et al.*,

2 Einleitung

1995; Dean, 2002). Es wird als Reaktion auf die Infektion mit bestimmten Viren exprimiert (Dean, 2002). Fest steht, dass es wichtig ist für die Bildung des HIV-1-Capsids (Zimmerman *et al.*, 2002; Lingappa *et al.*, 2006). In Hefe wurde ein ABCE-ähnliches Protein gefunden, das am Präinitiationskomplex der Translation beteiligt ist (Dong *et al.*, 2004). Über die ABCF-Familie ist wenig bekannt. ABCF1 wird von $TNF\alpha$ induziert (Richard *et al.*, 1998). Ein Hefe-Ortholog von ABCF1 wird zur Aktivierung einer Kinase benötigt, die den Translationsinitiationsfaktor eIF2 phosphoryliert (Marton *et al.*, 1997). Vermutlich hat ABCF1 auch im Menschen eine ähnliche Funktion, da es ribosomenassoziiert und mit eIF2 zusammen isolierbar ist (Tyzack *et al.*, 2000). Die Funktionen von ABCF2 und ABCF3 sind unbekannt (Dean, 2002).

Die ABCG-Familie besteht im Menschen aus fünf Halbtransportern, die als ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 und ABCG8 bezeichnet werden (Kusuhara und Sugiyama, 2007). Die ersten drei bilden Homodimere, die letzten beiden Heterodimere (Kusuhara und Sugiyama, 2007). Mit der Ausnahme von ABCG2 transportieren sie überschüssiges Cholesterol aus der Zelle in HDL oder die Galle (Jessup *et al.*, 2006; Kusuhara und Sugiyama, 2007). ABCG5 und ABCG8 vermitteln außerdem die Ausscheidung mit der Nahrung aufgenommener Phyto- und Muschelsterole in die Galle und deren Export in das Darmlumen (Kusuhara und Sugiyama, 2007). ABCG2 nimmt in der ABCG-Familie eine einzigartige Stellung ein, da es MDR vermittelt (Doyle *et al.*, 1998) und kein Cholesterol transportiert (Wang *et al.*, 2004). Es wurde zuerst aus einer Brustkrebszelllinie isoliert und wird daher auch als „brustkrebsresistentes“ Protein (BCRP) bezeichnet (Doyle *et al.*, 1998). Auf Grund seiner breiten Substratspezifität transportiert es eine Vielzahl von Substanzen wie Pharmazeutika, Sulfatkonjugate und Carcinogene (zur Übersicht siehe Kusuhara und Sugiyama, 2007). Hohe ABCG2-mRNA-Konzentrationen wurden außer in Tumorzellen auch in Plazenta gefunden, ferner in Gehirn, Leber, Prostata, Dünndarm und Dickdarm (Allikmets und Dean, 1998; Doyle *et al.*, 1998). Der Ausfall von Abcg2 führt im *Knockout*-Mausmodell zur Akkumulation unkonjugierten Bilirubins und zu einer Sensitivierung gegenüber Pheophorbid-A-induzierter Phototoxizität (Jonker *et al.*, 2002). Mutationen in ABCG5 oder ABCG8 führen zu Sitosterolaemie, einer seltenen autosomal-rezessiven Erbkrankheit (Berge *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2001). Sie ist durch Hyperabsorption von Phytosterolen, Muschelsterolen und Cholesterol im Darm gekennzeichnet und führt zur Bildung von Xanthomen (Kusuhara und Sugiyama, 2007).

2.3.2 Transportproteine und Transporter für organische Anionen

Die Transportproteine für organische Anionen (OATPs) und Transporter für organische Anionen (OATs) gehören in die Superfamilie der Transporter löslicher Substanzen (SLC). Die Familie der OATPs wurde früher als SLC21 bezeichnet. Diese Klassifizierung wurde jedoch von Hagenbuch und Meier (2004) revidiert und durch eine systematischere, speziesunabhängige Nomenklatur ersetzt. Danach bilden die OATPs eine eigene Superfamilie innerhalb der SLCs, deren Gene als SLCO und deren Proteine als OATP, jeweils gefolgt von einer dreigliedrigen Individualspezifikation, bezeichnet werden (Hagenbuch und Meier, 2004). Die OATs gehören zusammen mit den Transportern für organische Kationen (OCTs) und den Transportern für Zwitterionen/Kationen (OCTNs) in die SLC22-Familie (Koepsell und Endou, 2004).

Bisher wurden 36 Mitglieder der OATP-Familie in Menschen, Ratten und Mäusen identifiziert (Stand Hagenbuch und Meier, 2004). Sie besitzen 12 Transmembrandomänen und werden durch mehrere strukturelle Eigenheiten charakterisiert (Hagenbuch und Meier, 2003, 2004). OATP-ähnliche Proteine wurden außer im Menschen in vielen Tierspezies gefunden (Hagenbuch und Meier, 2004). OATPs sind Natrium-unabhängige Transporter (Jacquemin *et al.*, 1994; Kullak-Ublick *et al.*, 1995; Noé *et al.*, 1997; Walters *et al.*, 2000). Man hält sie im allgemeinen für Antiporter, die extrazelluläre organische Substanzen im Austausch gegen intrazelluläre Substrate wie Bicarbonat, Glutathion und/oder Glutathion-S-Konjugate in die Zelle transportieren (Shi *et al.*, 1995; Satlin *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998, 2000). Jedoch gibt es auch Hinweise auf OATP-vermittelten Cotransport (Briz *et al.*, 2006). Breite Substratspezifität wurde für Ratten-Oatp1a1 (Bossuyt *et al.*, 1996) und viele andere OATPs der OATP1A- und OATP1B-Unterfamilien gezeigt (Hagenbuch und Meier, 2004). OATPs des Menschen scheinen im Gegensatz zu denen der Ratte (Li *et al.*, 1998, 2000) reduziertes Glutathion nicht oder nur schwach zu transportieren (Ballatori *et al.*, 2005; Mahagita *et al.*, 2007). Die Expression von OATPs in diversen Organen hängt vom einzelnen Protein ab, jedoch sind sie meist entweder ubiquitär oder vorzugsweise in der Leber exprimiert (Hagenbuch und Meier, 2004). Detailliertere Untersuchungen zeigten das Vorkommen bestimmter OATPs in der Blut-Hirn- und Blut-Tumor(Gliom)-Schranke (Bronger *et al.*, 2005) sowie in den Epithelzellen des choroidalen Plexus (Gao und Meier, 2001).

Im Menschen wurden fünf OATs beschrieben, die zusammen mit dem Ureattransporter URAT1

2 Einleitung

eine der drei Untergruppen der SLC22-Familie bilden (Koepsell und Endou, 2004). Sie können Anionen in beide Richtungen transportieren, von einigen (OAT1, OAT3 und URAT1) ist bekannt, dass sie den Austausch mit divalenten organischen Anionen vermitteln (Sekine *et al.*, 1997; Sweet *et al.*, 1997, 2003; Koepsell und Endou, 2004). Ihre Substratspezifität ist breit und ähnelt derjenigen der OATPs (Russel *et al.*, 2002). Alle OATs kommen hauptsächlich entweder in der Niere oder in der Leber vor, jedoch wurden manche - wenn auch weniger stark exprimiert - im Gehirn gefunden (zur Übersicht siehe Sekine *et al.*, 2000; Koepsell und Endou, 2004). Ihre Membrantopologie ähnelt derjenigen der OATPs, sie besitzen ebenfalls 12 Transmembrandomänen (Koepsell und Endou, 2004). Die Funktion der OATs scheint hauptsächlich die Ausscheidung und Reabsorption organischer Anionen in der Niere zu sein (Koepsell und Endou, 2004).

2.3.3 Connexone

Connexone sind Halbkanäle, die zu zweit vollständige interzelluläre Kanäle, sog. *gap junctions*, *Nexus* oder *maculae communicantes*, bilden (Evans und Martin, 2002; Goodenough und Paul, 2003). In den meisten Fällen werden diese Kanäle zwischen verschiedenen Zellen ausgebildet, so dass jede der beiden benachbarten Zellen ein Connexon zur Bildung des Kanals beiträgt (Evans und Martin, 2002; Goodenough und Paul, 2003). *Nexus* können aber auch verschiedene Teile der selben Zelle verbinden, so zum Beispiel die Myelinisierungsschichten Schwannscher Zellen (Balice-Gordon *et al.*, 1998). Im allgemeinen können *Nexus* entweder homotyp (aus Connexonen gleicher Protomerzusammensetzung) oder heterotyp (aus Connexonen verschiedener Protomerzusammensetzung) sein (Evans und Martin, 2002). Die Connexone sind Homo- oder Heterohexamere aus Proteinen der Familie der Connexine (Cx) (Evans und Martin, 2002). Von letzteren gibt es mehr als 20, die den geformten Kanälen unterschiedliche Eigenschaften verleihen (Valiunas *et al.*, 1997; Lampe und Lau, 2000; Harris, 2001; Goodenough und Paul, 2003). Diese Eigenschaften betreffen z.B. die Selektivität der Durchlässigkeit bezüglich Ladung und Größe von Substanzen (Evans und Martin, 2002; Nicholson *et al.*, 2002). Größenselektivität wurde im Bereich zwischen 0.2 und 1.0 kDa festgestellt (Evans und Martin, 2002; Nicholson *et al.*, 2002).

Connexine (Cx) werden überall im Körper exprimiert (Goodenough und Paul, 2003). Das Gehirn im allgemeinen und Astrocyten im speziellen enthalten hauptsächlich Cx43 (Dermietzel *et al.*, 2000; Jacobas *et al.*, 2003; Sáez *et al.*, 2003). Jedoch kommen in Astrocyten auch Cx26 und Cx30 und in Oligodendrocyten Cx29, Cx32 und Cx47 vor, die miteinander heterotype *Nexus* bilden (Nagy *et al.*, 2003). Neuronale Connexine sind z.B. Cx36 und Cx45 (Evans und Martin, 2002). Der Austausch wichtiger Substanzen über *Nexus* ist essentiell und besonders bedeutend während der Entwicklung des Gehirns (Bruzzone und Dermietzel, 2006). Dieser Austausch kann auch der Signaltransduktion dienen. So bilden *Nexus* den häufigsten Typ von elektrischen Synapsen (Bennett und Zukin, 2004). Dieser Synapsentyp ist besonders während der Entwicklung verbreitet, verschwindet jedoch auch im adulten Stadium nicht vollständig (Bennett und Zukin, 2004; Connors und Long, 2004; Söhl *et al.*, 2005; Bruzzone und Dermietzel, 2006). Dann sind sie hauptsächlich interneuronal (zur Übersicht siehe Söhl *et al.*, 2005), jedoch wird auch die Möglichkeit einer elektrischen Kopplung von Neuronen mit Glia in Betracht gezogen (Alvarez-Maubecin *et al.*, 2000; Pakhotin und Verkhratsky, 2005; Söhl *et al.*, 2005).

Es gibt auch Hinweise auf Funktionalität ungepaarter Connexone, sog. Halbkanäle oder *hemichannels*, die unter bestimmten Bedingungen Substrate durch die Zellmembran transportieren können (Hofer und Dermietzel, 1998; Goodenough und Paul, 2003; Sáez *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003; Rana und Dringen, 2007; Malarkey und Parpura, 2008). Diese Funktionalität ist jedoch umstritten (Spray *et al.*, 2006), da gezeigt wurde, dass einige den Connexonen zugeschriebene Transportvorgänge auch von der purinaktivierten Rezeptorpore P2X₇ vermittelt werden können (Suadicani *et al.*, 2006) und Connexoninhibitoren auch andere Transportsysteme beeinflussen (Eskandari *et al.*, 2002; Suadicani *et al.*, 2006). Nichtsdestoweniger scheint Efflux von Glutamat, Aspartat und Glutathion aus Astrocyten durch Connexone möglich (Ye *et al.*, 2003; Spray *et al.*, 2006; Rana und Dringen, 2007; Malarkey und Parpura, 2008). Manche dieser Ergebnisse zeigten geöffnete Connexone nur unter wenig physiologischen Bedingungen (Sáez *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003). Jedoch scheinen bestimmte Umgebungsbedingungen wie metabolische Inhibition (Contreras *et al.*, 2002) und verringertes intrazelluläres Redoxpotenzial (Retamal *et al.*, 2007b) die Öffnungswahrscheinlichkeit zu erhöhen.

2.4 Knockout-Tiere

Knockout-Tiere sind eine Unterkategorie genveränderter Tiere, bei denen speziesspezifische Gene absichtlich so weit modifiziert wurden, dass das von ihnen kodierte Protein nicht mehr funktional exprimiert wird (Müller-Esterl, 2004). Weitere Kategorien sind Tiere, bei denen speziesspezifische Gene generell verändert wurden, um die Auswirkung dieser Modifikation zu untersuchen und sog. transgene Tiere, bei denen speziesspezifisches Genmaterial in das Genom eingebracht wurde (Müller-Esterl, 2004).

Sinnvolle Untersuchungen an genveränderten Tieren, insbesondere im Hinblick auf *Knockout*-Tiere, erforderten die Entwicklung von Strategien, Gene zielgerichtet verändern zu können (Koller und Smithies, 1992). Erste Untersuchungen zur Entwicklung solcher Strategien wurden in den 1970er und 1980er Jahren an Hefe durchgeführt (Melton, 1994). Grundlage der meisten Strategien ist die homologe Rekombination (Doetschman, 2002), die in kultivierten Säugetierzellen zum ersten Mal in den frühen 1980er Jahren gezeigt wurde (Melton, 1994). Die erste zielgerichtete Genveränderung in Säugetierzellen gelang Smithies *et al.* (1985). Dabei wurde das *neo*-Gen in zwei verschiedenen Zelltypen in den Genlocus von β -Globin eingesetzt (Smithies *et al.*, 1985). Mittlerweile gibt es verschiedenste Methoden zur zielgerichteten Genveränderung (Melton, 1994; Volarević *et al.*, 1999; Doetschman, 2002). Eine wichtige Verbesserung war die Entdeckung von Systemen zur Generierung konditioneller Genveränderungen, die auf dem Einsatz von Proteinen aus der Integrase-Familie beruhen (Rucker III *et al.*, 2002). Am verbreitetsten sind vier Rekombinationssysteme (Rucker III *et al.*, 2002): das Cre-loxP System (Austin *et al.*, 1981; Sauer, 1998), das FLP-FRT System (Andrews *et al.*, 1985), das R-RS System (Matsuzaki *et al.*, 1990) und das Gin-Gix System (Mertens *et al.*, 1986, 1988). Diese erlauben es durch die Wahl des Promotors der Rekombinase, Genveränderungen zelltypspezifisch oder manuell durch Zugabe eines Signalstoffs wie z.B. Tetracyclin auszulösen (Sauer, 1998; Gossen und Bujard, 1992, 2002; Gossen *et al.*, 1995).

Eine weitere Voraussetzung zur Erzeugung stabiler genveränderter Tierstämme war die Etablierung von Kulturen von Stammzellen aus Embryonen. Diese werden in drei Gruppen eingeteilt (Doetschman, 2002): 1. Embryonale Carcinomzellen (EC); 2. Embryonale Stammzellen (ES);

3. Keimzellvorläufer (PGC) oder embryonale Keimzellen (EG). Als erstes wurden embryonale Stammzellen von Evans und Kaufman (1981) aus Blastocysten erzeugt, deren Implantation verzögert wurde. In den folgenden Jahren wurden eine Vielzahl von Methoden zur Gewinnung von Stammzellen aus Embryonen publiziert (Übersicht: Doetschman, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden nur unkonditionelle *Knockouts* eingesetzt. *Mrp1(-/-)*-Mäuse sind vital und fortpflanzungsfähig, zeigen jedoch verminderte Reaktion bei Entzündung (Wijnholds *et al.*, 1997). Die *Mrp5(-/-)*-Mäuse (von J. Wijnholds und P. Borst gezüchtet, Herstellung unpubliziert; in Experimenten verwendet von Minich *et al.*, 2006) waren während der Durchführung vorliegender Arbeit ebenfalls vital und fortpflanzungsfähig. *Cx43(-/-)*-Mäuse sterben nach der Geburt auf Grund von Fehlbildungen des Herzens (Reaume *et al.*, 1995). Deshalb wurden die Mäuse dieses Stammes als heterozygote *Knockouts* gehalten und neugeborene Tiere wurden einzeln genotypisiert.

2.5 Aufgabenstellung

In vorliegender Arbeit sollten hauptsächlich zwei Ziele verfolgt werden: Zum einen sollten die bereits durch Inhibitorstudien bekannten Ergebnisse zum *Mrp1*-vermittelten Glutathionefflux in Astroglia anhand von Astrocytenkulturen aus *Mrp1(-/-)*-Mäusen im inhibitorfreien System verifiziert werden. Zum anderen sollten mittels dieses Systems andere Glutathiontransporter als *Mrp1* identifiziert und charakterisiert werden.

2 Einleitung

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung der Ergebnisse

Soweit nicht anders angegeben, wurden Ergebnisse in dieser Arbeit folgendermaßen präsentiert:

- Zahlenwerte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Einzelwerten (je drei) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen angegeben oder aufgetragen. Auch im Falle der Darstellung repräsentativer Einzelergebnisse wurden diese aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ausgewählt.
- Zur Normierung auf 100 % wurde der Mittelwert der Kontrolle des jeweiligen Einzelexperiments herangezogen. Auch die Einzelkontrollwerte wurden so behandelt, um die Standardabweichung der Kontrolle zu erhalten. Sofern auf den Proteingehalt normiert wurde, geschah dies mit dem Mittelwert aus drei oder sechs Replikakulturen.
- Die Konzentrationen, bei denen die Wendepunkte W liegen (IC50-Werte), wurden durch parametrische Minimierung der Fehlerquadrate der Daten entsprechend dem Hill-Slope-Modell gegen folgende Gleichung bestimmt:

$$f(x) = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{W}\right)^{\text{slope}}} \quad (1)$$

Die Variable *slope* stellt die Hillsteigung (auch Hillkoeffizient) dar. Die Gleichung entstammt den *Assay Operations for SAR Support* der Website des *NIH Chemical Genomics Center* (<http://www.ncgc.nih.gov/guidance/section3.html>).

3.2 Voruntersuchungen zum Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von NMRI-Mäusen

Da bisher in unserem Arbeitskreis Glutathioneffluxexperimente nur mit astrogliareichen Primärkulturen (APK) aus Ratten durchgeführt wurden (Hirrlinger, 2002), sollte zunächst deren prinzipielle Anwendbarkeit auf vergleichbare Maus-Kulturen überprüft werden. Diese Vorversuche wurden mit APK aus NMRI-Mäusen durchgeführt, dem verfügbaren Stamm, dessen Genotyp dem der erwarteten *Knockout*-Mäuse am nächsten kam.

Zunächst sollte überprüft werden, ob Mäuseastrogliazellen wie Rattenastrogliazellen Glutathion ausscheiden. Dies ist in der Tat der Fall (Abb. 7). Im Laufe von 6 h erschien Glutathion nahezu zeitproportional im Inkubationsmedium (Minimalmedium, Abschnitt 5.3.3.1) über astrogliareichen Primärkulturen aus NMRI-Mäusen.

3.2.1 Acivicin-Abhängigkeit

Von APK der Ratte war bekannt (Hirrlinger, 2002), dass extrazelluläres Glutathion durch das Ectoenzym γ GT zu Glutamat und Cys-Gly hydrolysiert wird. Dies wurde mit Hilfe des spezifischen γ GT-Inhibitors Acivicin (Abb. 1) gezeigt. Da nicht bekannt war, ob GSH auch in Maus-APK von γ GT hydrolysiert wird, wurde die Akkumulation von Glutathion im Inkubationsmedium über Maus-APK in Abwesenheit und Anwesenheit von Acivicin variiert Konzentration überprüft (Abb. 8). Zur Übersicht wurden die Steigungen der Ausgleichsgeraden in Abb. 8 bestimmt und als apparente spezifische GSx-Effluxgeschwindigkeiten gegen die Acivicinkonzentration aufgetragen (Abb. 9). Die apparente Effluxgeschwindigkeit nimmt bis zu einer Acivicinkonzentration von zwischen 20 und 50 μ M zu (Abb. 9). Um sicher zu gehen, dass die γ GT in allen folgenden Experimenten zum Glutathionefflux maximal inhibiert ist, wurde dem Inkubationsmedium immer Acivicin in einer Endkonzentration von 100 μ M zugesetzt.

3.2 Voruntersuchungen zum Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von NMRI-Mäusen

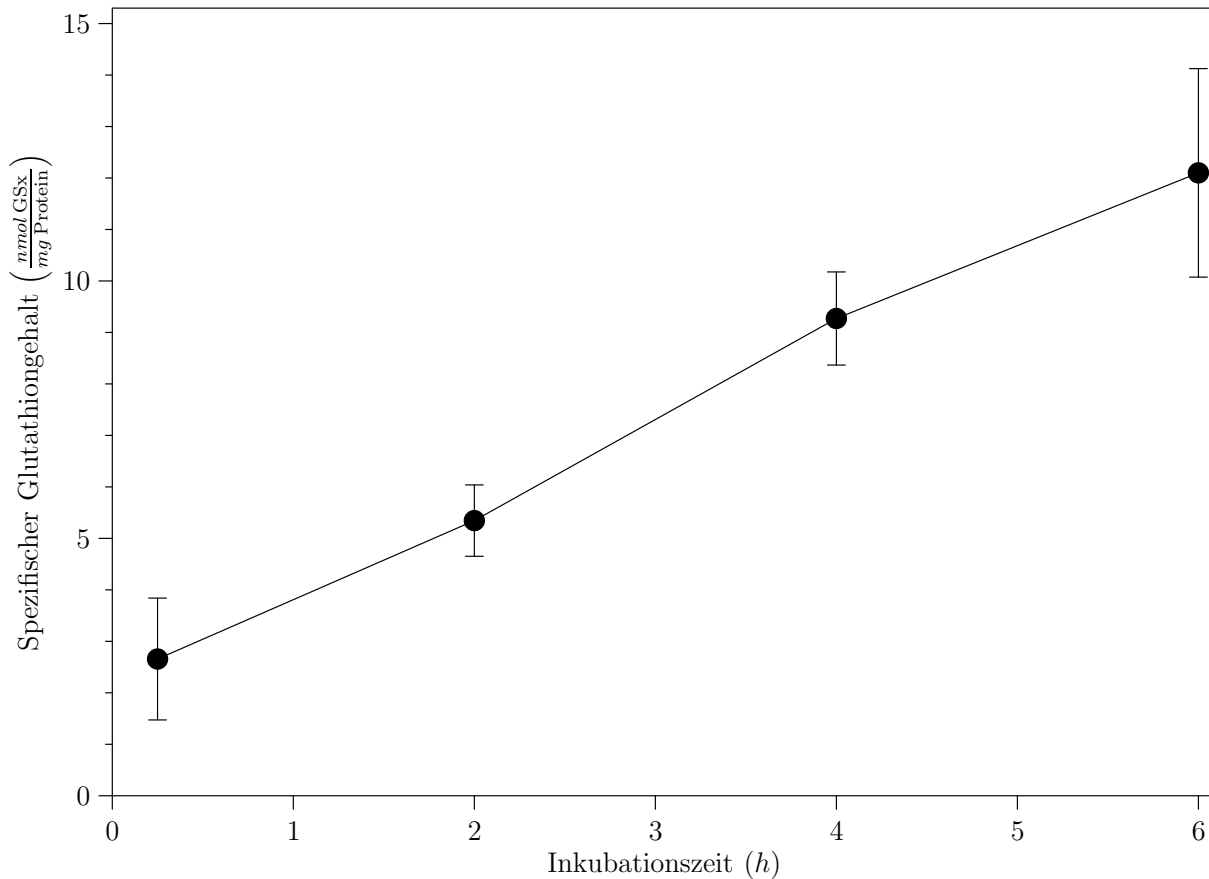


Abb. 7. Zeitabhängigkeit des Erscheinens von Glutathion in Form von GSx in Minimalmedium ohne Acivicin (Abschnitt 5.3.3.1) über astrogliareichen Primärkulturen aus NMRI-Mäusen.

3.2.2 Efflux von reduziertem und oxidiertem Glutathion

Um festzustellen, ob Acivicin in einer Konzentration von 100 μM ausreicht, den Abbau von Glutathion im Medium vollständig zu unterbinden, und um den Oxidationszustand des Glutathions kennen zu lernen, wurde die Menge an Gesamtglutathion sowie an oxidiertem Glutathion im Medium und den Zellen von APK aus NMRI-Mäusen über einen Zeitraum von 6 h bestimmt. Es zeigte sich, dass die Gesamtmenge an Glutathion im System über 6 h konstant blieb und dabei $39 \pm 8 \%$ ($n = 24$ Näpfe aus 4 Experimenten) des intrazellulären Glutathions exportiert wird (Abb. 10). Ferner war intra- und extrazellulär kaum oxidiertes Glutathion messbar (Abb. 10).

3 Ergebnisse

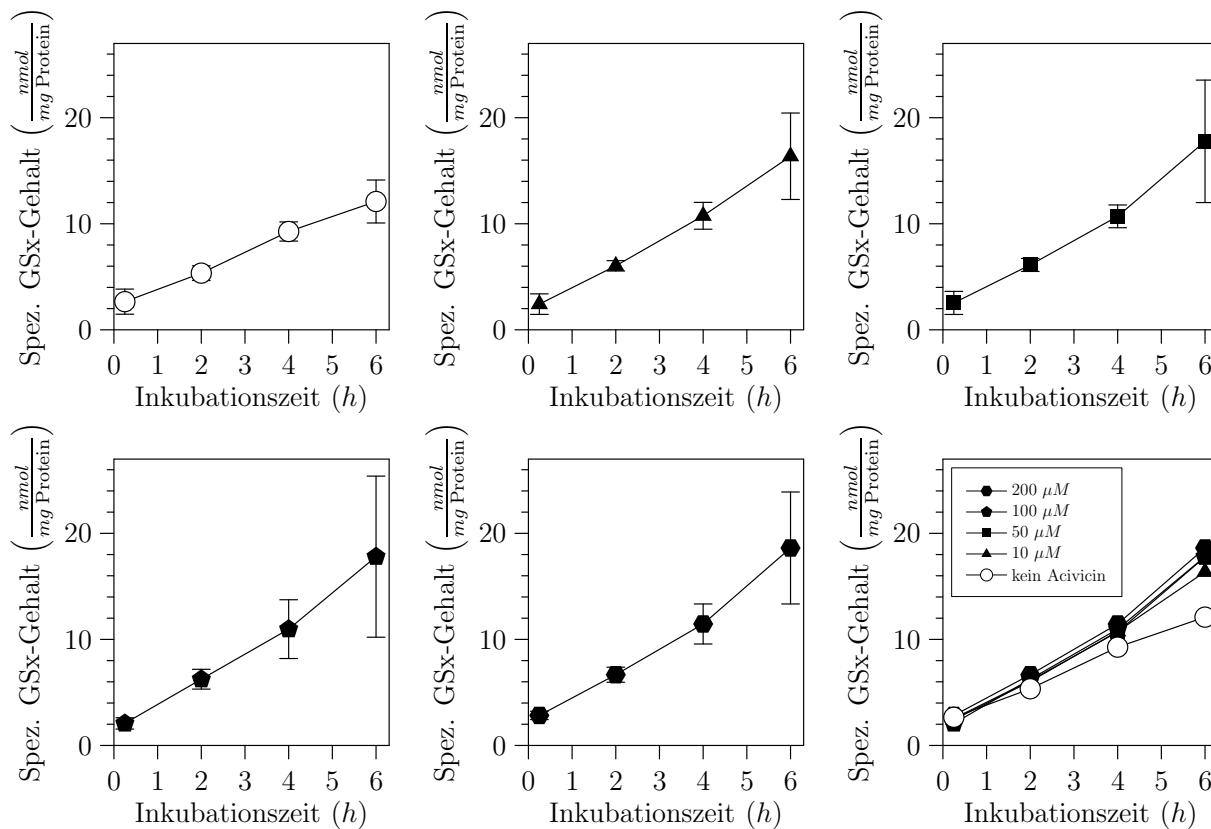


Abb. 8. Abhängigkeit des Erscheinens von Glutathion in Form von GSx in Minimalmedium (Abschnitt 5.3.3.1) von der Zeit bei variiertem Acivicinkonzentration über APK aus NMRI-Mäusen. Die Legende gilt für alle Teilabbildungen und gibt die Acivicinkonzentration im Inkubationsmedium an. Die letzte Teilabbildung dient der Übersicht und zeigt alle fünf Kurven ohne Standardabweichung.

Wie bei APK aus Ratten (Hirrlinger, 2002) ist die intrazelluläre GSx-Konzentration praktisch identisch mit der von GSH (Abb. 10). Im Medium ist etwa 25 % des vorhandenen GSx oxidiertes Glutathion (Abb. 10).

3.2 Voruntersuchungen zum Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von NMRI-Mäusen

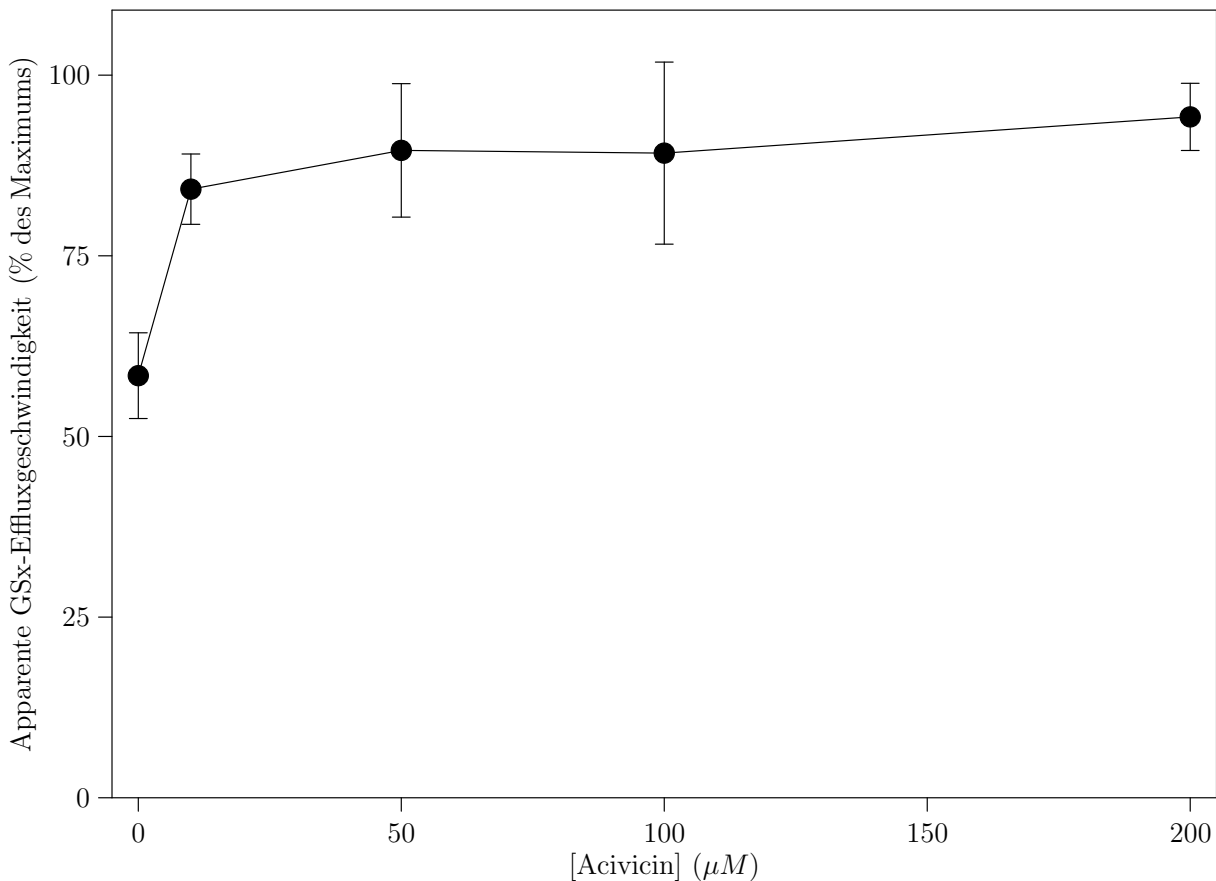


Abb. 9. Prozentuale apparente Geschwindigkeit des Effluxes von GSx aus APK aus NMRI-Mäusen in Abhängigkeit von der Acivicinkonzentration. Die Geschwindigkeiten wurden auf die Maximalgeschwindigkeit des jeweiligen Experiments ($n = 3$) bezogen.

3.2.3 Dauerstressmodell

Im Rattenmodell wurde festgestellt, dass Zellen von APK bei der Applikation von oxidativem Dauerstress (Abschnitt 5.3.3.2) große Mengen oxidierten Glutathions exportieren (Hirrlinger *et al.*, 1999; Hirrlinger, 2002). Um festzustellen, ob dies auch bei APK aus Mäusen der Fall ist, wurde das gleiche Experiment an APK aus NMRI-Mäusen durchgeführt. Es zeigte sich in der Tat, dass Zellen in APK aus NMRI-Mäusen unter oxidativem Dauerstress fast ausschließlich oxidiertes Glutathion exportierten (Abb. 11). Je nach eingesetzter Xanthinoxidaseaktivität wurde eine H_2O_2 -Konzentration von etwa 0, 50, 90 oder 125 μM erreicht (Abb. 11). In Abwe-

3 Ergebnisse

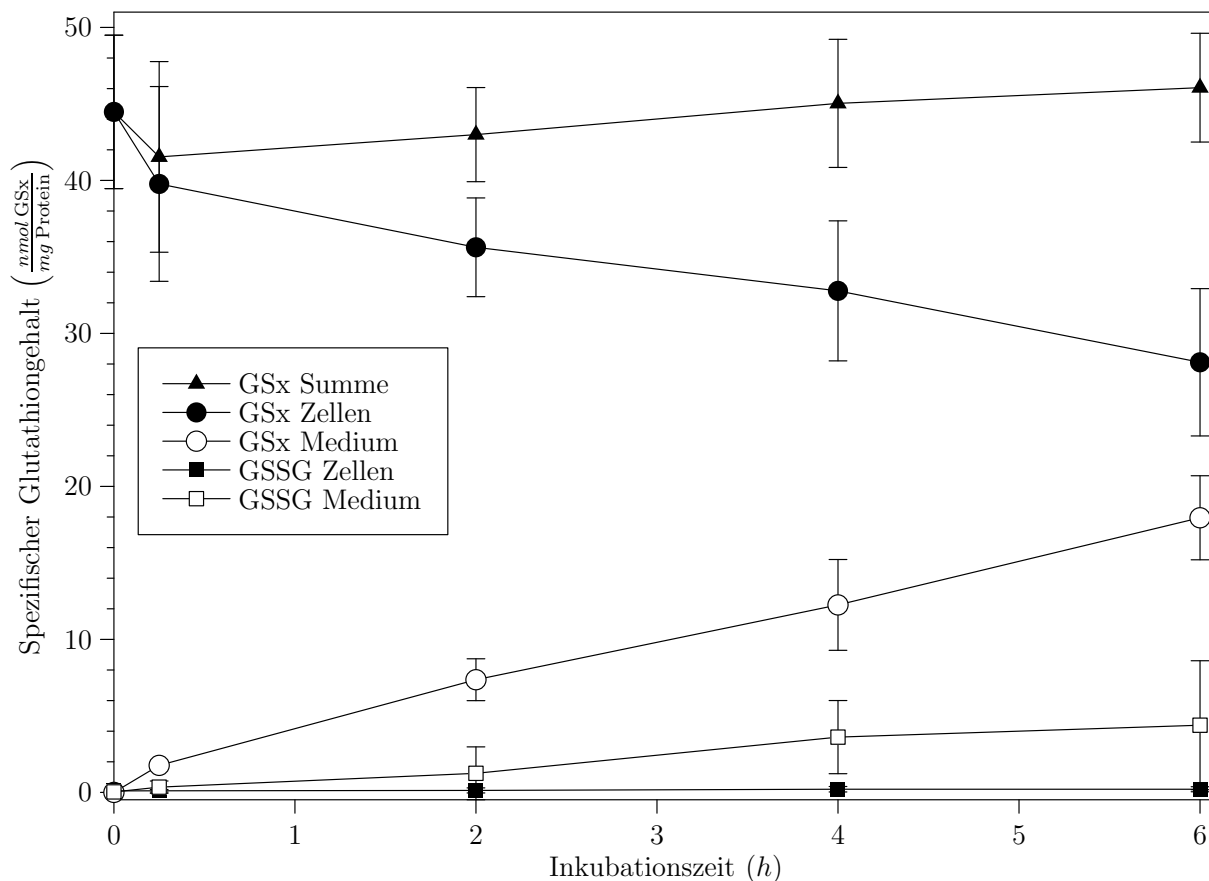


Abb. 10. Spezifischer Glutathiongehalt als nmol GSx pro mg Protein in Zellen und Medium von APK aus NMRI-Mäusen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

senheit von Stress wurde im Zeitraum des Experimentes kaum Glutathion exportiert (Abb. 11). Ab 15 Minuten nach Beginn des Experimentes blieb der intrazelluläre GSSG-Anteil konstant. Dieser betrug je nach Ausmaß des Stresses etwa 25 % bis 60 % des intrazellulären Gesamtglutathiongehaltes (Abb. 11). Die Gesamtmenge an Glutathion im System blieb dabei konstant (Abb. 11). Ferner zeigte das geringe Ausmaß der im Medium gemessenen LDH-Aktivität die Integrität der Zellen an (Abb. 11).

3.2 Voruntersuchungen zum Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von NMRI-Mäusen

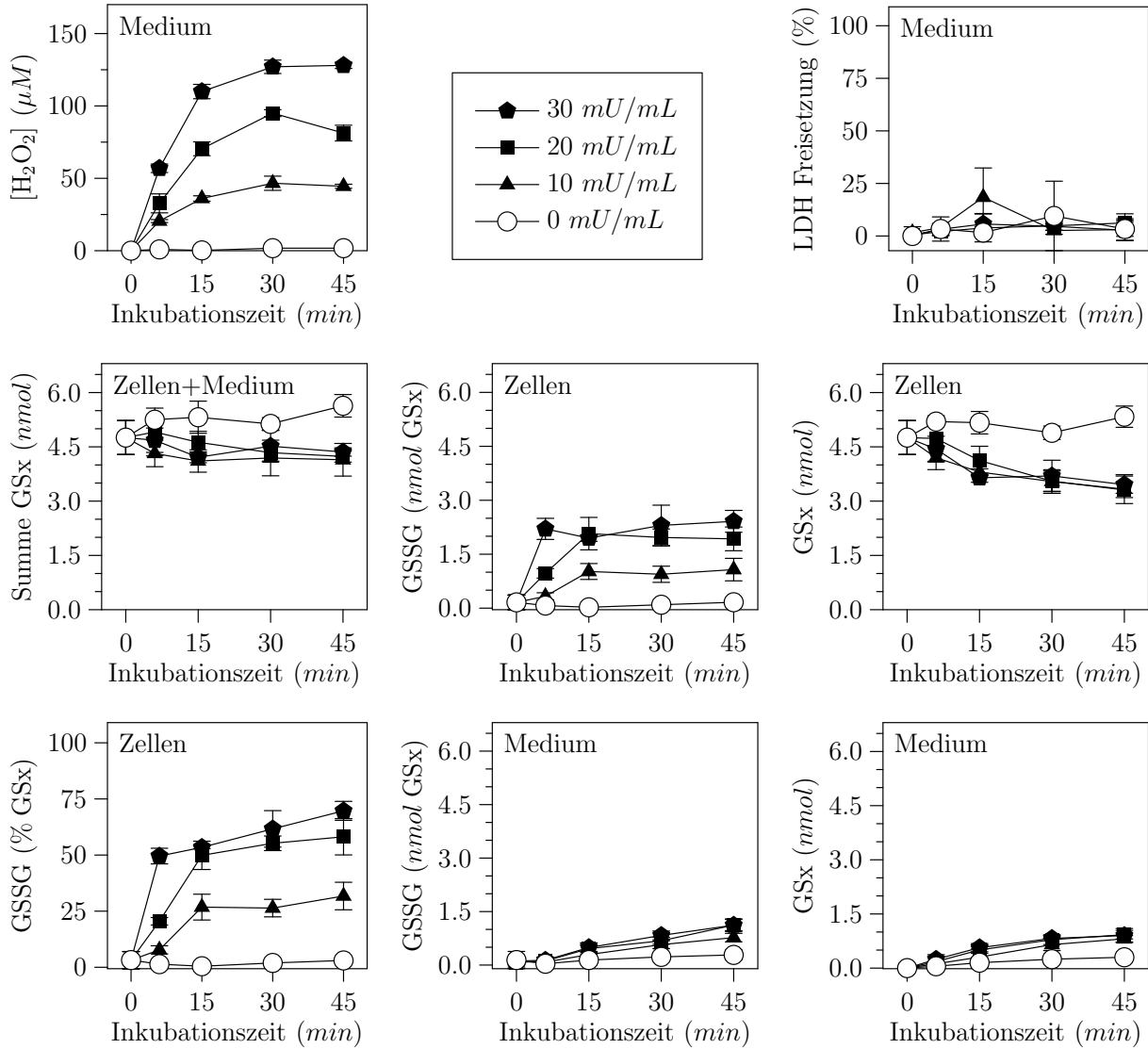


Abb. 11. Gehalt an oxidiertem, reduziertem und gesamtem Glutathion in Medium und Zellen sowie der H_2O_2 -Konzentration und LDH-Aktivität im Medium von APK aus NMRI-Mäusen pro Napf einer 24-Napf-Platte als Funktion der Zeit des Einwirkens unterschiedlich starken oxidativen Stresses. Der oxidative Stress wurde mittels eines Dauerstressmodells appliziert (Abschnitt 5.3.3.2). Die Legende gibt die Aktivität der Xanthinoxidase in der Inkubationslösung der entsprechenden Messreihe an. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten eines repräsentativen Einzelexperimentes.

3.2.4 Wirkung von Mk571

Es sollte untersucht werden, wie Glutathion (sowohl in reduziertem als auch in oxidiertem Zustand) durch die Plasmamembran transportiert wird. Aus früheren Publikationen (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c) war für Ratten-APK bekannt, dass Mrp1 bei diesem Prozess die Hauptrolle spielt und bei Applikation des in APK Mrp1-spezifischen Effektors Mk571 (Abb. 3) biphasisches Verhalten in Abhängigkeit von der Mk571-Konzentration zeigt. Bei geringen Konzentrationen wurde der GSH-Transport aktiviert, bei hohen Konzentrationen gehemmt (Hirrlinger, 2002). Nun sollte überprüft werden, ob Mrp1 auch in Maus-APK eine Rolle beim Glutathionefflux spielt. Dazu wurden APK aus NMRI-Mäusen mit Mk571 in variiertem Konzentration inkubiert und die Geschwindigkeit des Glutathioneffluxes bestimmt. Wie bei APK der Ratte wurde durch Mk571 in niedrigen Konzentrationen (ca. 5 μM) die Glutathioneffluxgeschwindigkeit erhöht (Abb. 12). Bei höheren Konzentrationen wirkte Mk571 hemmend (Abb. 12). Ab 20 μM Mk571 blieb die Effluxgeschwindigkeit bei etwa 50 % des Ausgangswertes und verringerte sich bei 50 μM Mk571 nicht weiter (Abb. 12). Doch muss hervorgehoben werden, dass Mk571 wie bei Ratten-APK auch in Maus-APK den Glutathionefflux nicht vollständig zu hemmen vermochte (Abb. 12).

3.3 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von *Knockout*-Mäusen

Nach Erhalt der Mrp1- und Mrp5-*Knockout*-Mäuse sowie des Wildtyp-Stammes, auf dessen Hintergrund jene gezüchtet wurden (FVB/N), war es möglich, die Beteiligung von Mrp1 und Mrp5 am Glutathionefflux zu ermitteln. Im Folgenden ist, so nicht anders angegeben, ausschließlich der Wildtyp des FVB/N-Stammes gemeint, wenn von „Wildtyp“ die Rede ist. Bei den NMRI-Mäusen handelte es sich auch um den Wildtyp des NMRI-Stammes, obwohl dies nachstehend nicht extra angegeben wird.

3.3 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Knockout-Mäusen

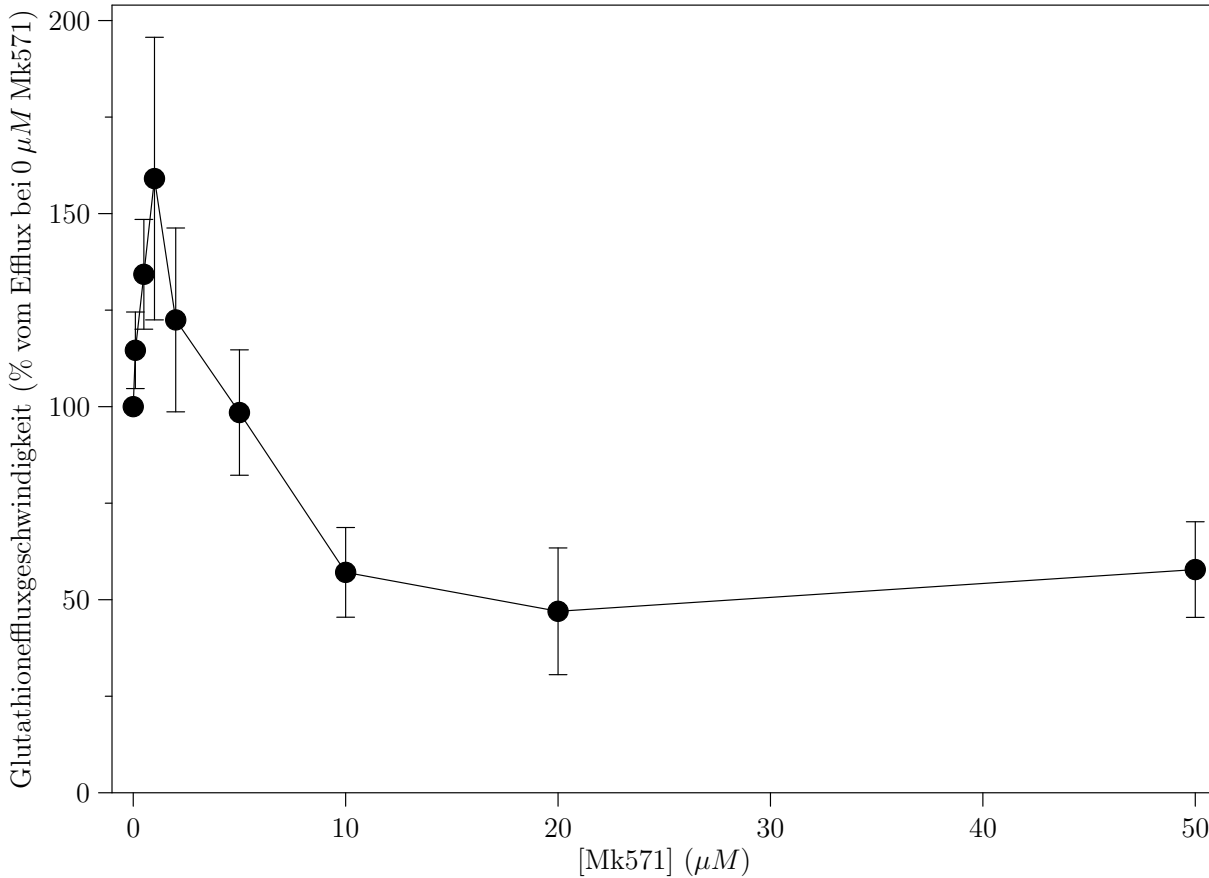


Abb. 12. Normalisierte Geschwindigkeit des Glutathioneffluxes bei APK aus NMRI-Mäusen in Abhängigkeit von der Mk571-Konzentration. Die in Prozent ausgedrückten Geschwindigkeiten wurden jeweils auf die Geschwindigkeit bei 0 μM Mk571 der drei unabhängigen Experimente bezogen (1.5 ± 0.4 nmol GSx/mg, 1.7 ± 0.1 nmol GSx/mg und 3.8 ± 0.7 nmol GSx/mg).

3.3.1 Charakterisierung astrogliareicher Primärkultur von *Knockout*-Mäusen

3.3.1.1 Zellbilder

Um die Vergleichbarkeit der APK aus Wildtyp sowie Mrp1- und Mrp5-*Knockout*-Mäusen zu klären, wurde in APK der selben Ansäichte und des selben Alters das astrocytenspezifische

3 Ergebnisse

GFAP immunocytochemisch angefärbt (Abb. 13). Offensichtliche Unterschiede waren nicht zu bemerken. Insbesondere erkennt man in allen dargestellten Ausschnitten eine vergleichbare Anzahl an Zellen, wobei in allen Fällen die GFAP-haltigen Zellen überwiegen (Abb. 13).

3.3.1.2 Polymerasekettenreaktion

Von den *Mrp1-Knockout*-Mäusen war bekannt, wie das *Mrp1*-Gen ausgeschaltet wurde (Wijnholds *et al.*, 1997). Deshalb konnten spezifische *Primerpaare* erstellt werden für genomische DNA aus Wildtyp-Mäusen und aus *Mrp1-Knockout*-Mäusen sowie ein *Kontrollprimerpaar*, das auf beide genomische DNAs passt (Abschnitt 5.3.5.4). Mit dem *Kontrollprimerpaar* ergab sich sowohl für genomische DNA aus Wildtyp-APK als auch für genomische DNA aus *Mrp1-Knockout*-APK eine Bande bei ca. 500 bp (Abb. 14, A; erwartet: 497 bp). Mit dem wildtypspezifischen *Primerpaar* war bei etwa 580 bp (erwartet: 540 bp) nur bei genomischer DNA aus Wildtyp-APK eine Bande zu sehen (Abb. 14, B). Mit dem *Mrp1-Knockout*-spezifischen *Primerpaar* erschien nur bei genomischer DNA aus *Mrp1-Knockout*-APK eine Bande bei etwa 600 bp (Abb. 14, C; erwartet: 580 bp). Somit konnte bestätigt werden, dass die untersuchten *Mrp1-Knockout*-Mäuse dem publizierten *Mrp1-Knockout*-Stamm entsprechen.

Von Ratten-APK war bekannt, dass nicht alle untersuchten *Mrps* exprimiert werden (Hirrlinger *et al.*, 2002a). In Leber sind jedoch die in APK fehlenden *Mrps* vorhanden (Hirrlinger *et al.*, 2002a). Deshalb wurde cDNA aus Wildtyp-Leber in einer RT-PCR mit *Mrp*-spezifischen *Primerpaaren* eingesetzt, um sicher zu gehen, dass alle eingesetzten spezifischen *Primerpaare* auch spezifisch mit der jeweiligen *Mrp*-cDNA reagieren. Zum Vergleich wurde auch cDNA aus Wildtyp-Hirn verwendet. Wie man erkennen kann enthielt Leber mRNAs aller untersuchter *Mrps* (Abb. 15, A). Im Vergleich mit Wildtyp-Hirn fielen jedoch die Banden für *Mrp7* und *Mrp9* etwas schwächer aus (Abb. 15), jedoch war dieser Unterschied nicht in jeder Reproduktion dieser RT-PCR zu sehen. Somit war gezeigt worden, dass alle eingesetzten *Mrp*-spezifischen *Primerpaare* funktionieren. Wildtyp-Hirn enthielt nur äußerst wenig bis gar keine mRNA von *Mrp2* und *Mrp6* (Abb. 15, B).

Um festzustellen, ob Wildtyp-APK und *Mrp1-Knockout*-APK auch andere *Mrps* enthalten, wur-

3.3 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Knockout-Mäusen

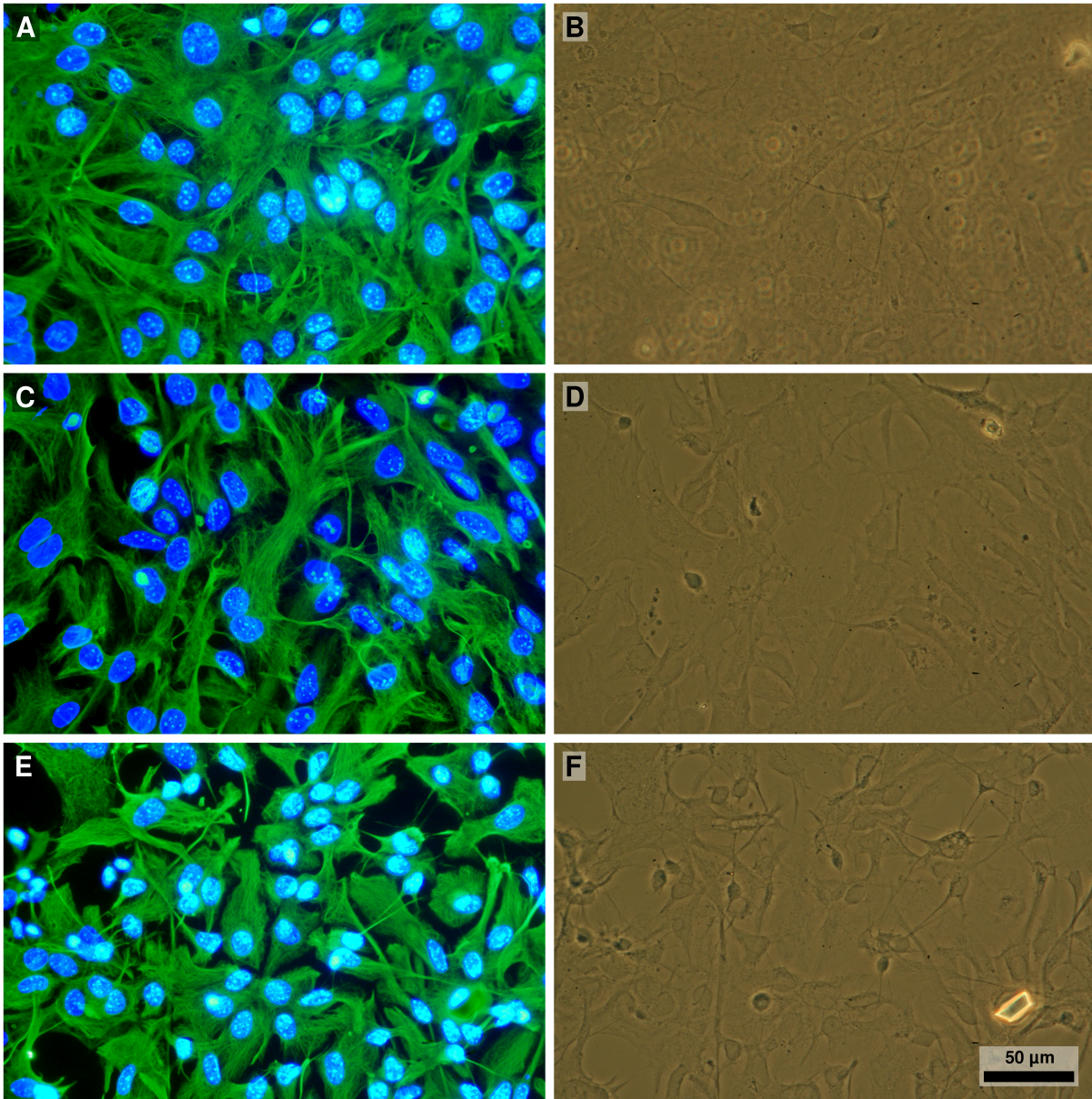


Abb. 13. Astrogliareiche Primärkulturen aus Wildtyp-Mäusen (A,B) sowie Mrp1- (C,D) und Mrp5-(E,F)-*Knockout*-Mäusen. Fluoreszenzdoppelmarkierung (A,C,E) aller Zellkerne (mit DAPI; blau) und der GFAP-haltigen Zellen (immuncytochemisch; grün) sowie Phasenkontrastaufnahmen des jeweiligen Ausschnitts (B,D,F).

3 Ergebnisse

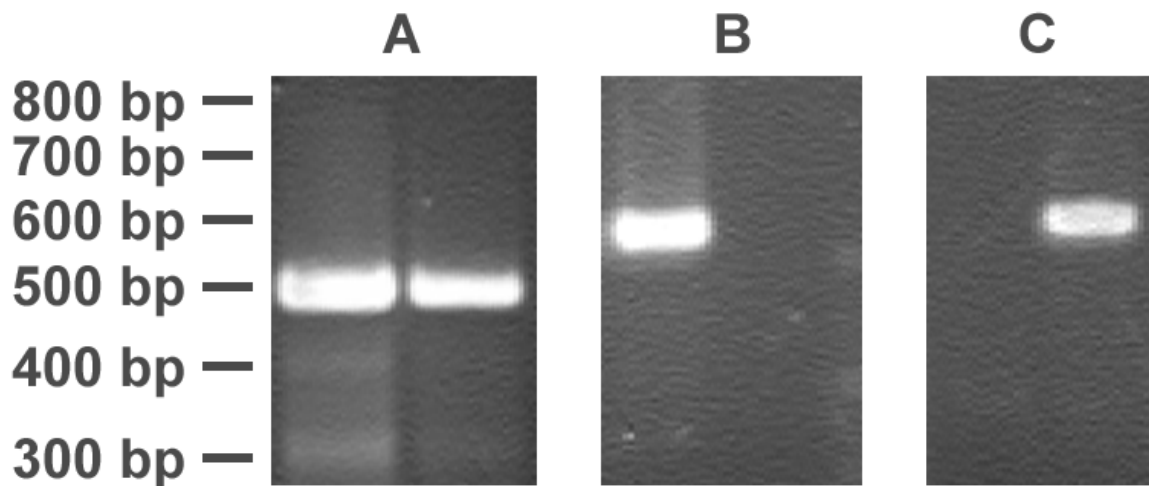


Abb. 14. Nachweis der Erzeugung von *Mrp1-Knockout*-Mäusen durch Genotypisierung mittels PCR. Die Darstellung zeigt Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele der PCR-Amplifikate mittels Kontrollprimerpaar (A), wildtypspezifischem Primerpaar (B) und *Mrp1-Knockout*-spezifischem Primerpaar (C). Die genomische DNA stammte aus Wildtyp-APK (jeweils linke Spur) oder aus *Mrp1-Knockout*-APK (jeweils rechte Spur).

den *Mrp*-spezifische Primerpaare in einer RT-PCR eingesetzt. Wie man in Abb. 16 (A) anhand der spezifischen Banden erkennt, enthielt Wildtyp-APK mRNAs für alle *Mrps* außer *Mrp2* (erwartet: 570 bp). Auch in *Mrp1-Knockout*-APK war keine spezifische *Mrp2*-Bande zu sehen (Abb. 16, B). Wie für einen *Knockout* erwartet, konnte dort auch keine spezifische *Mrp1*-Bande nachgewiesen werden (Abb. 16, B). Jedoch konnte eine schwache Bande bei etwa 340 bp beobachtet werden, die im Fall des Wildtyps nicht zu sehen war (Abb. 16). Im Gegensatz zu Wildtyp-APK (Abb. 16, A) war die *Mrp3*-Bande bei *Mrp1-Knockout*-APK nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 16, B). Die *Mrp6*-Bande war in beiden Fällen weit weniger stark als die anderen Banden (Abb. 16). Vergleicht man Wildtyp-Hirn (Abb. 15, B) mit Wildtyp-APK (Abb. 16, A), so zeigte sich, dass die schwache *Mrp6*-Bande bei Wildtyp-APK in Wildtyp-Hirn noch schwächer bis gar nicht mehr auftrat (Abb. 15, B).

3.3 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Knockout-Mäusen

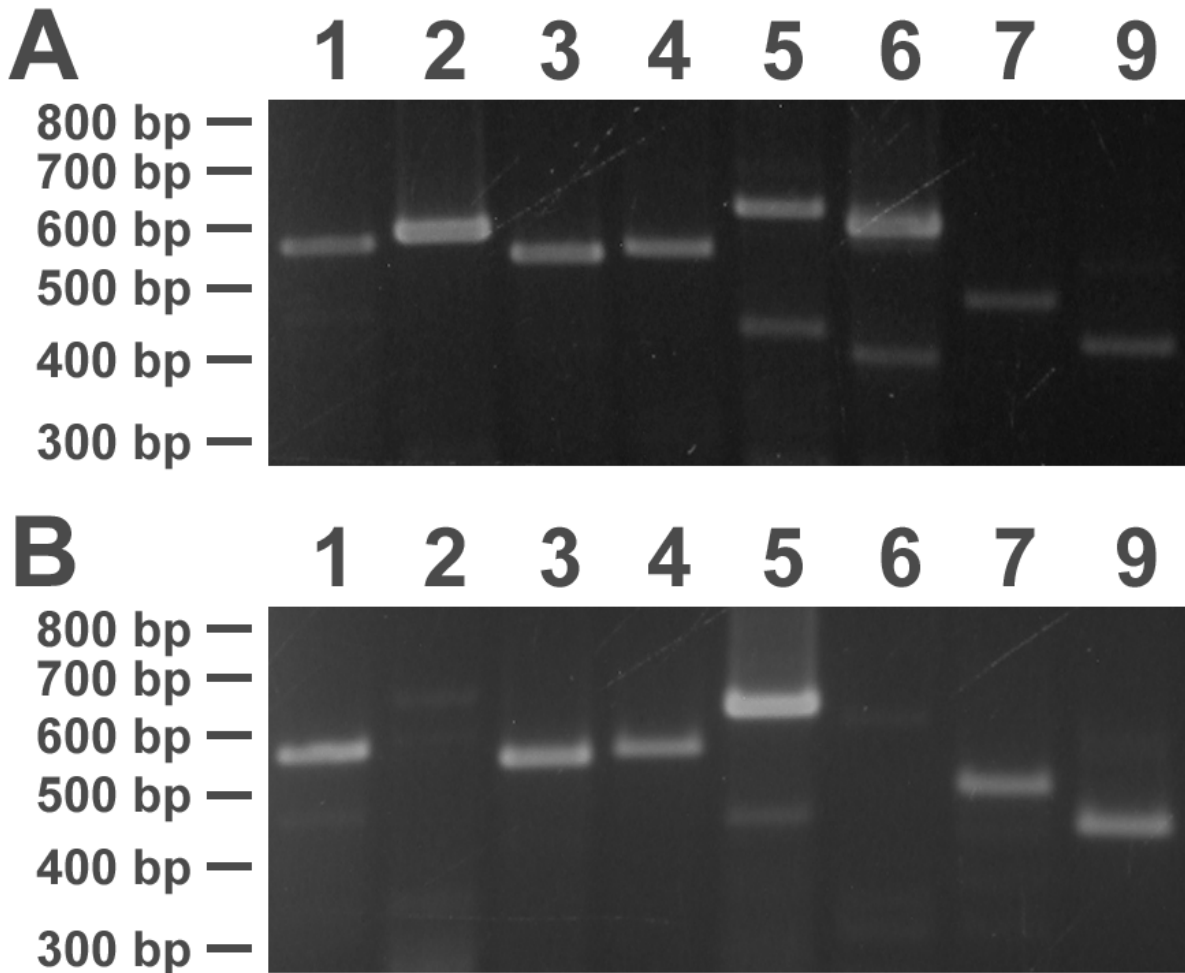


Abb. 15. Nachweis der mRNAs von Mrp1 bis Mrp7 sowie Mrp9 mittels RT-PCR. Die Darstellung zeigt Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele der RT-PCR-Amplifikate aus cDNA von Wildtyp-Leber (A) oder Wildtyp-Hirn (B). Die Zahlen über den Gelphotographien entsprechen den Nummern der Mrps 1-7 und 9.

3.3.2 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von FVB/N-Mäusen

Um Veränderungen im Glutathionefflux durch die Abwesenheit von Mrp1 oder Mrp5 erkennen zu können, wurden zunächst als Vergleichsgrundlage APK des Wildtyps untersucht. Wie man

3 Ergebnisse

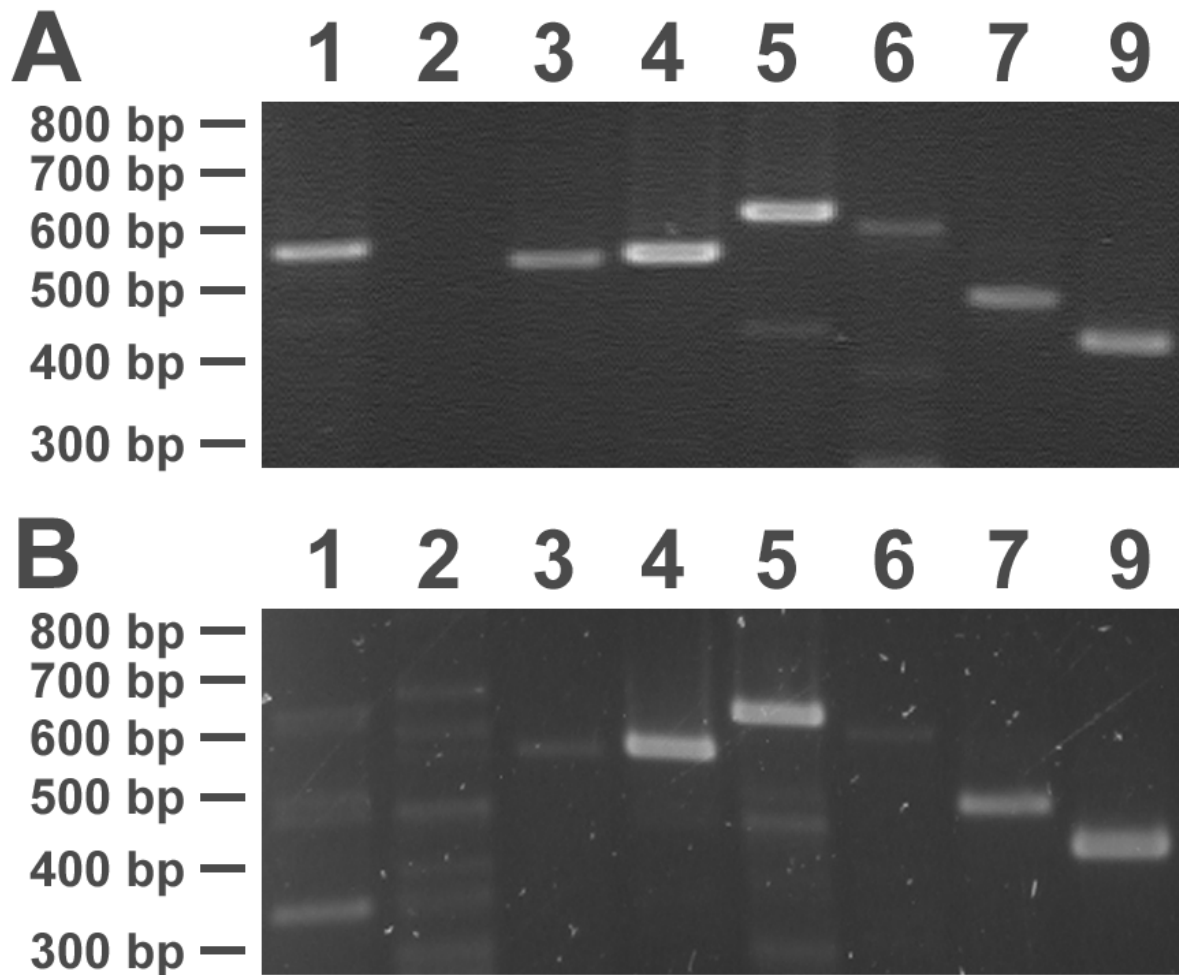


Abb. 16. Nachweis der mRNAs von Mrp1 bis Mrp7 sowie Mrp9 mittels RT-PCR. Die Darstellung zeigt Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele der RT-PCR-Amplifikate aus cDNA von Wildtyp-APK (A) oder Mrp1-Knockout-APK (B). Die Zahlen über den Gelphotographien entsprechen den Nummern der Mrps 1-7 und 9.

aus Abb. 17 erkennen kann, fand man im Medium über Wildtyp-APK sowohl oxidiertes als auch reduziertes Glutathion, ebenso wie bei APK aus NMRI-Mäusen. Der Verlauf des Erscheinens war fast identisch mit dem über APK aus NMRI-Mäusen. So änderte sich auch hier die Gesamtglutathionmenge im Verlauf des Experimentes nicht (Abb. 17). Ebenso fand man hier nach 6 h etwa 45 % des Gesamtglutathions im Medium und die exportierte GSSG-Menge war

3.3 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Knockout-Mäusen

wie bei NMRI-APK äußerst gering (Abb. 17).

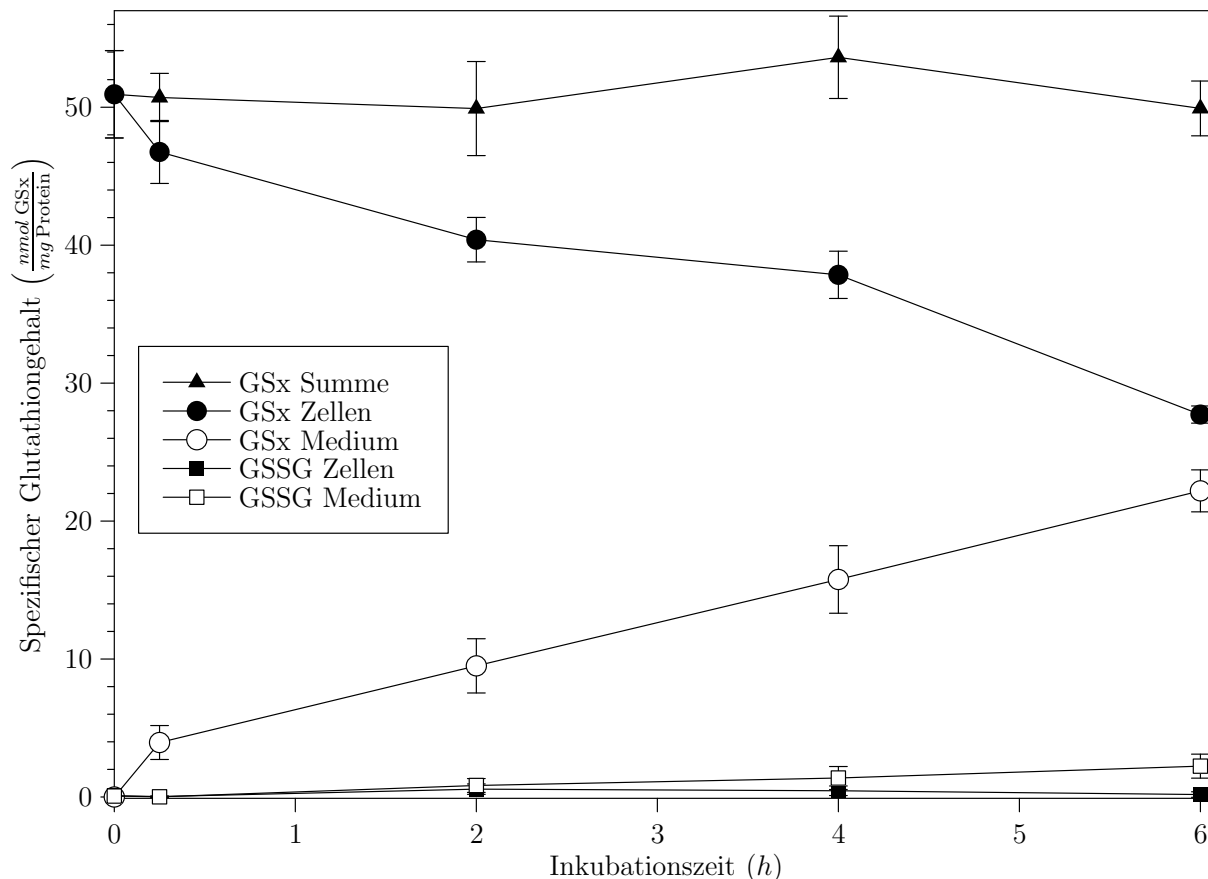


Abb. 17. Spezifischer Glutathiongehalt als nmol GSx pro mg Protein in Zellen und Medium von APK aus Wildtyp-Mäusen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten eines repräsentativen Einzelexperimentes.

Bei Applikation des Dauerstressmodells (Abschnitt 5.3.3.2) zeigte sich im Allgemeinen das gleiche Bild (Abb. 18) wie bei den NMRI-APK (Abb. 11). Die erreichten H_2O_2 -Konzentrationen von etwa 0, 45, 100 und 145 μM sind vergleichbar mit denen der NMRI-APK (Abb. 18). In Abwesenheit von Stress wurde - so wie bei NMRI-APK - kaum GSSG exportiert (Abb. 18). Der bei der geringsten Xanthinoxidase-Aktivität gefundene maximale intrazelluläre GSSG-Anteil von etwa 45 % ist etwas höher als bei NMRI-APK, die anderen XO-Aktivitäten führten zum

3 Ergebnisse

gleichen Anteil wie bei NMRI-APK (Abb. 18). Als größter Unterschied fällt auf, dass Wildtyp-APK innerhalb von 45 min etwa doppelt soviel GSSG exportieren wie NMRI-APK, insgesamt etwa 40 - 50 % des Gesamt-GSH-Gehaltes (Abb. 18). Ferner zeigte das geringe Ausmaß der im Medium gemessenen LDH-Aktivität die Integrität der Zellen an (Abb. 18).

Der Glutathionefflux bei Einwirkung des Mrp1-Inhibitors Mk571 zeigte bei Wildtyp-APK die gleiche biphasische Konzentrationsabhängigkeit wie bei NMRI-APK. Das Maximum von etwa 150 % des Ausgangswertes wurde ebenfalls bei 1 μM Mk571 erreicht und zwischen 5 und 10 μM Mk571 war die Glutathioneffluxgeschwindigkeit wieder auf dem Ursprungsniveau (Abb. 19). Bei 50 μM wurde im untersuchten Konzentrationsbereich die geringste Effluxgeschwindigkeit erreicht (Abb. 19).

3.3.3 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Mrp1-Knockout-Mäusen

Als nächstes wurde der Glutathionefflux bei APK aus Mrp1-Knockout-Mäusen untersucht. Aus Inhibitorstudien (s.o.) hatte sich ergeben, dass Mrp1 entscheidend am Glutathionefflux beteiligt ist. Deshalb sollte bei APK aus Mrp1-Knockout-Mäusen der Glutathionefflux stark beeinträchtigt sein.

Wie aus Abb. 20 zu ersehen, ist dies in der Tat der Fall. Innerhalb von 6 h wurde bei Kulturen aus Knockout-Tieren bedeutend weniger Glutathion exportiert als bei Wildtyp-APK, nämlich nur etwa 15 % des Gesamtglutathions. Bei Wildtyp-APK konnte noch ein geringer GSSG-Efflux festgestellt werden (Abb. 17). Dies war bei APK aus Mrp1-Knockout-Mäusen nicht mehr der Fall; im Medium konnte kein GSSG nachgewiesen werden (Abb. 20). Ebenso wie bei NMRI- und Wildtyp-APK blieb die Gesamtglutathionmenge im Verlauf des Experiments konstant (Abb. 20).

Die Anwendung des Dauerstressmodells bestätigte die Abwesenheit von GSSG-Export bei APK aus Mrp1-Knockout-Mäusen. Die erreichten H_2O_2 -Konzentrationen von etwa 0, 50, 100 und 140 μM (Abb. 21) sind mit denen bei APK aus Wildtyp-APK vergleichbar (Abb. 18). Trotz-

3.3 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Knockout-Mäusen

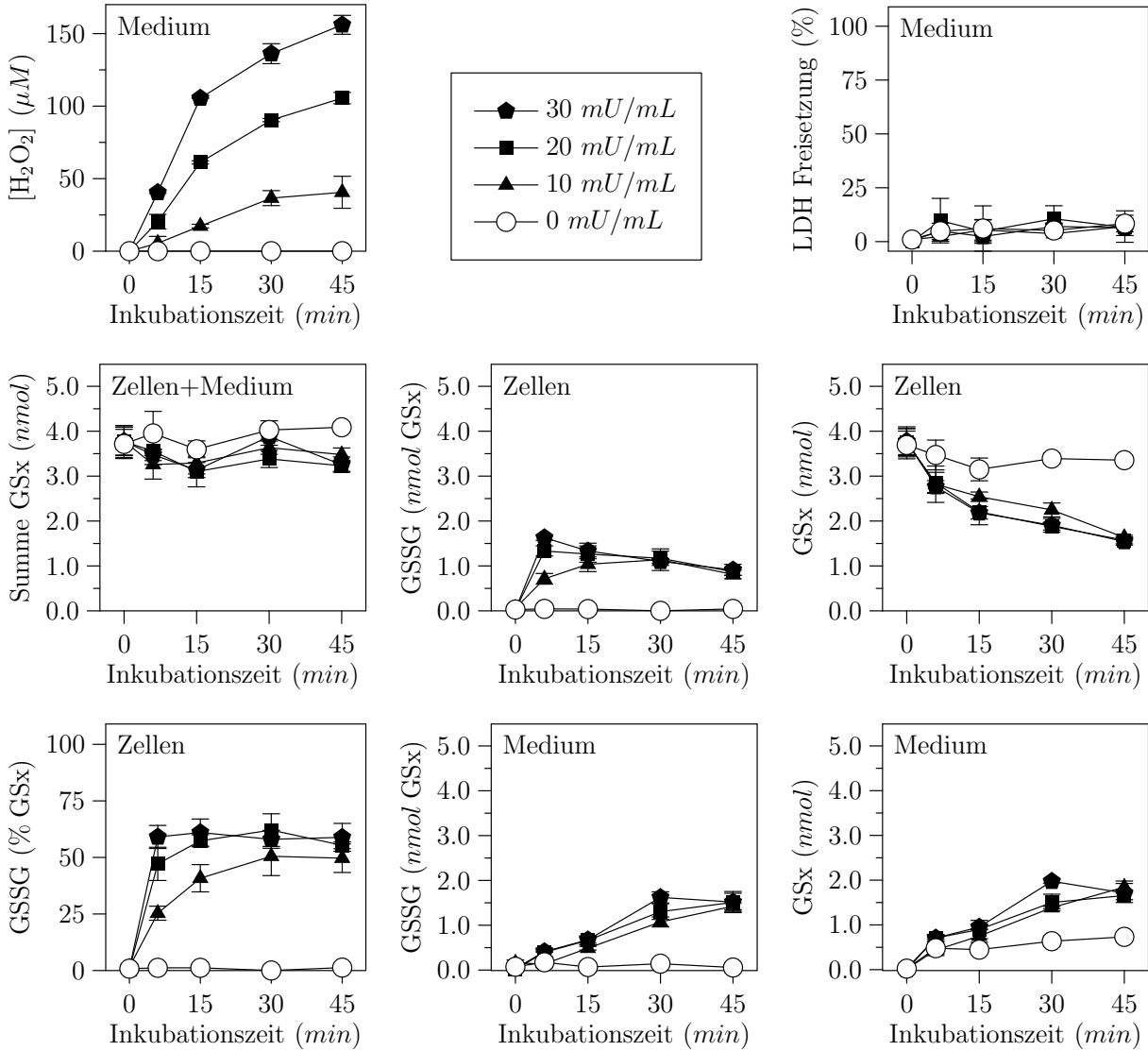


Abb. 18. Gehalt an oxidiertem, reduziertem und gesamtem Glutathion in Medium und Zellen sowie der H₂O₂-Konzentration und LDH-Aktivität im Medium von APK aus Wildtyp-Mäusen pro Napf einer 24-Napf-Platte als Funktion der Zeit des Einwirkens von unterschiedlich starkem oxidativem Stress. Der oxidative Stress wurde mittels eines Dauerstressmodells erzeugt (Abschnitt 5.3.3.2). Die Legende gibt die Aktivität der Xanthinoxidase in der Inkubationslösung der entsprechenden Messreihe an. Die Daten repräsentieren Mittelwert ± Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten eines repräsentativen Einzel-experiments.

3 Ergebnisse

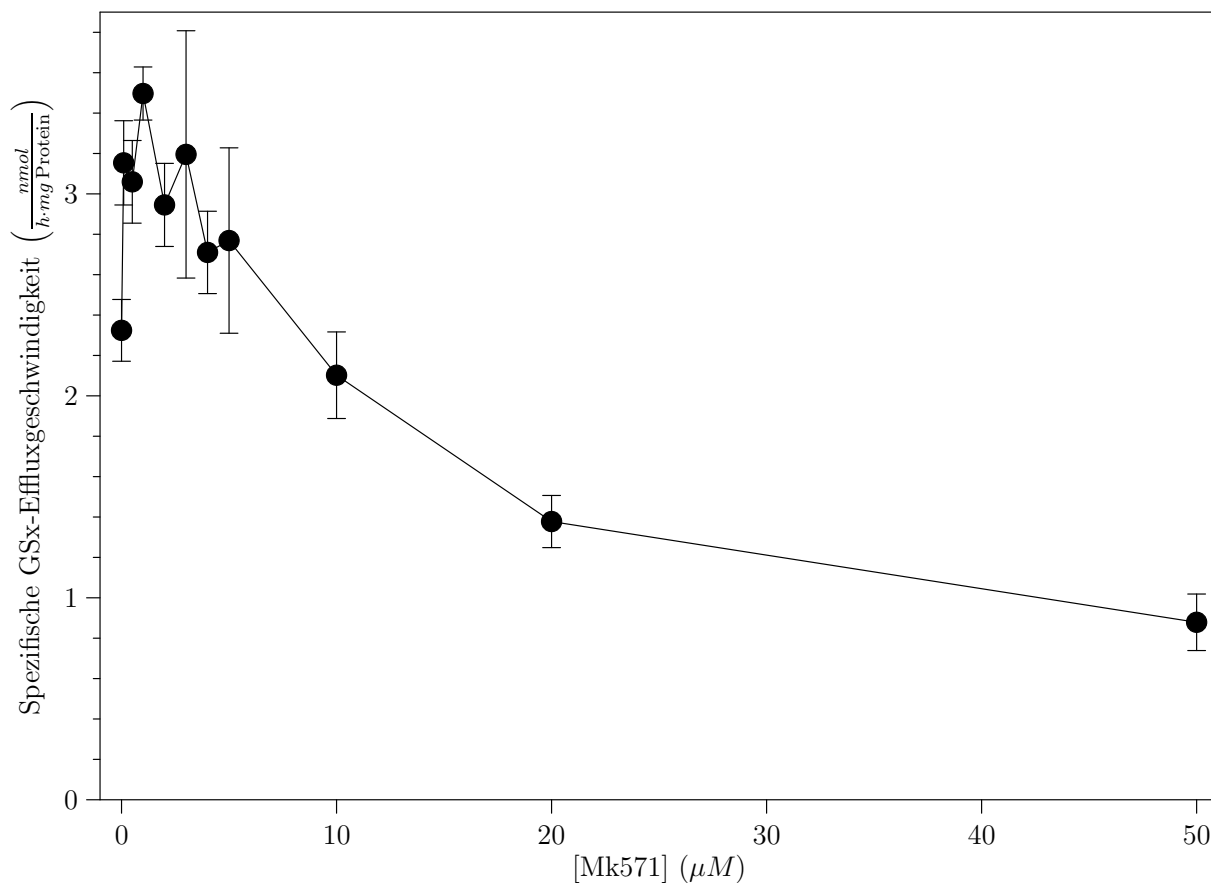


Abb. 19. Spezifische Glutathioneffluxgeschwindigkeit bei APK aus Wildtyp-Mäusen in Abhängigkeit von der Konzentration des Mrp1-Inhibitors Mk571. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten eines repräsentativen Einzelexperimentes.

dem wurde von Mrp1-*Knockout*-APK kein GSSG in das Medium ausgeschieden (Abb. 21). Der intrazelluläre GSSG-Gehalt war gegenüber dem Wildtyp noch weiter erhöht (Abb. 18, Abb. 21). Bei der geringsten XO-Aktivität war bei Mrp1-*Knockout*-APK 50 %, bei höheren XO-Aktivitäten sogar bis zu 75 % des intrazellulären Glutathions oxidiert (Abb. 21). Der Gesamtglutathiongehalt blieb innerhalb des Experiments konstant (Abb. 21). Ferner zeigte das geringe Ausmaß der im Medium gemessenen LDH-Aktivität die Integrität der Zellen an (Abb. 21).

3.3 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Knockout-Mäusen

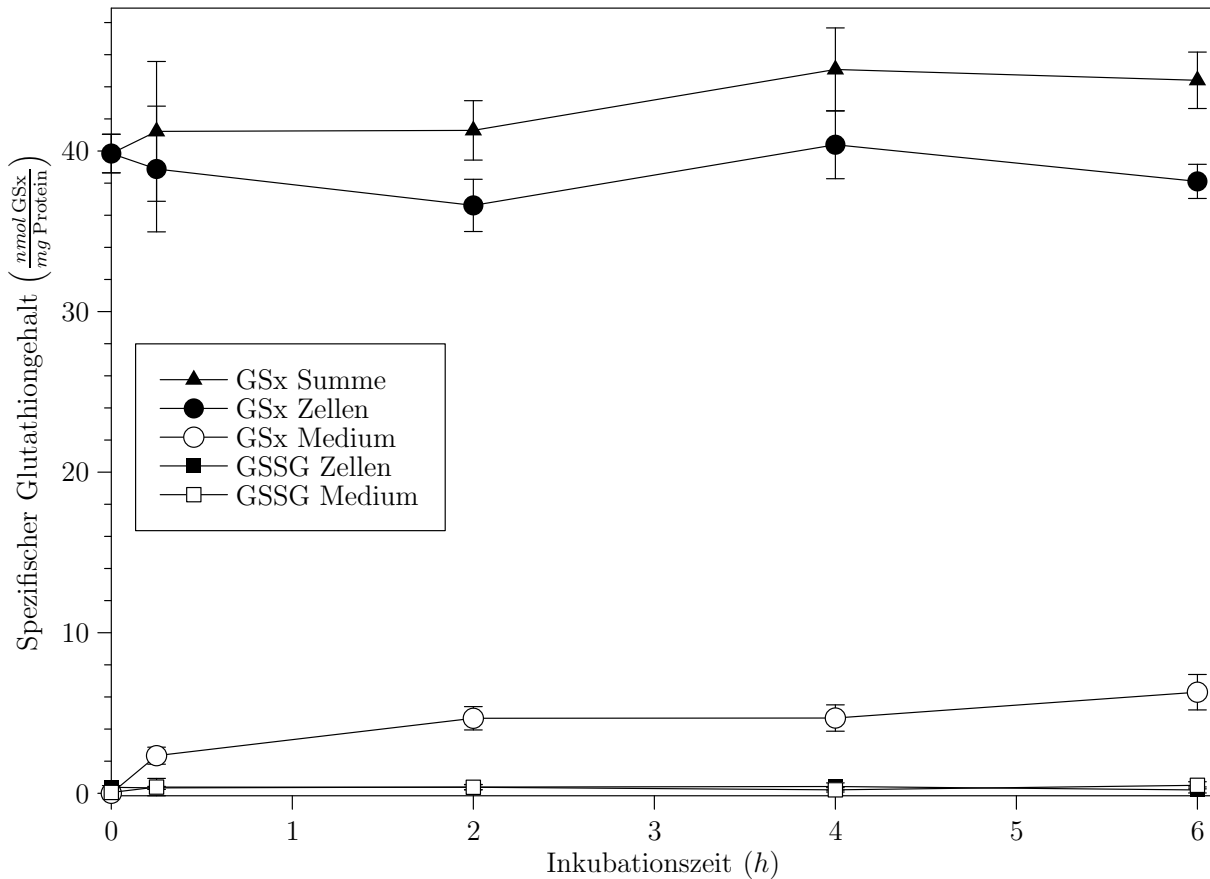


Abb. 20. Spezifischer Glutathiongehalt als nmol GSx pro mg Protein in Zellen und Medium von APK aus Mrp1-Knockout-Mäusen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten eines repräsentativen Einzelexperiments.

Um abschließend zu bestätigen, dass die Hemmung des Glutathioneffluxes bei Applikation von Mk571 (Abb. 3) auf eine Inhibition von Mrp1 zurückzuführen ist, wurden APK aus Mrp1-Knockout-Mäusen mit Mk571 variiert konzentriert inkubiert. Nicht nur fehlt bei APK aus Mrp1-Knockout-Mäusen die von NMRI und Wildtyp-APK her bekannte biphasische Konzentrationsabhängigkeit, sondern Mk571 beeinflusste die Geschwindigkeit des Glutathioneffluxes bei Mrp1-Knockout-APK überhaupt nicht (Abb. 22).

3 Ergebnisse

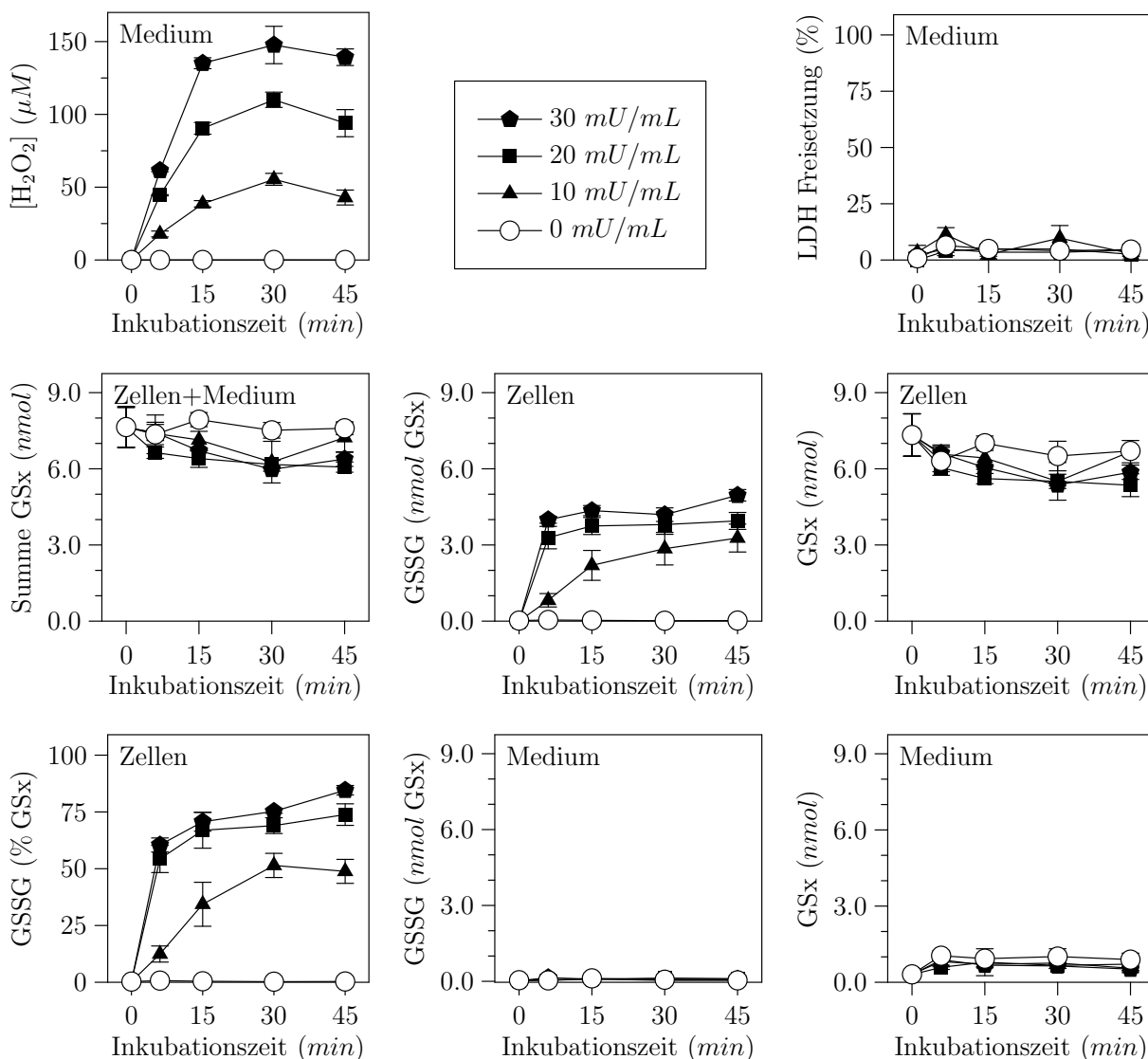


Abb. 21. Gehalt von oxidiertem, reduziertem und gesamtem Glutathion in Medium und Zellen von APK aus Mrp1-Knockout-Mäusen pro Napf einer 24-Napf-Platte als Funktion der Zeit des Einwirkens unterschiedlich starken oxidativen Stresses. Der oxidative Stress wurde mittels eines Dauerstressmodells erzeugt (Abschnitt 5.3.3.2). Die Legende gibt die Aktivität der Xanthinoxidase in der Inkubationslösung der entsprechenden Kurve an. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten eines repräsentativen Einzelversuchs.

3.3 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Knockout-Mäusen

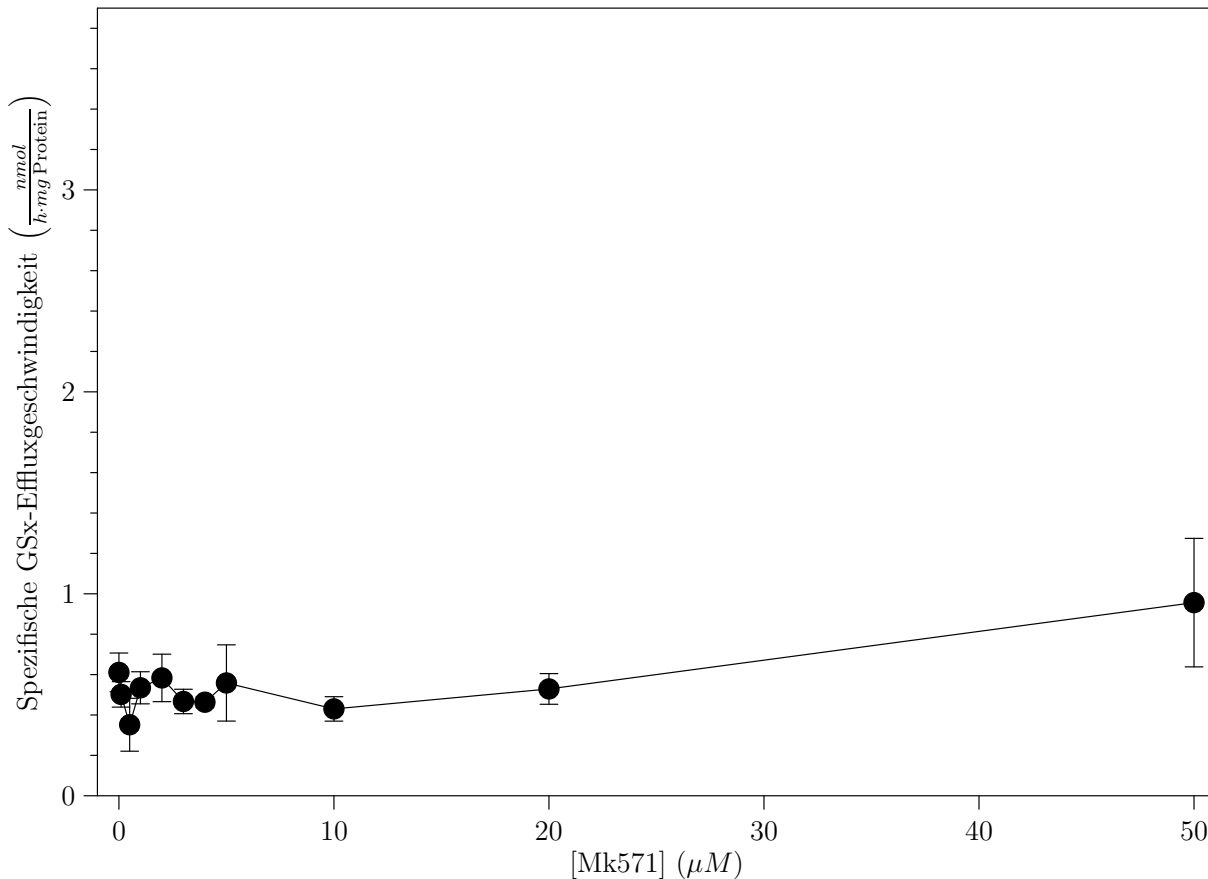


Abb. 22. Spezifische Glutathioneffluxgeschwindigkeit bei APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen in Abhängigkeit von der Mk571-Konzentration. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten eines repräsentativen Einzelerperiments.

3.3.4 Vergleich des Glutathioneffluxes aus astrogliareicher Primärkultur von Wildtyp-Mäusen und Mrp1- sowie Mrp5-*Knockout*-Mäusen

Zum direkten Vergleich wurden die Ergebnisse der Experimente zum Glutathionefflux des Wildtyps und die der Mrp1- und Mrp5-*Knockout*-Mäuse in gemeinsamen Abbildungen aufgetragen. Die Einzelabbildungen der Mrp5-*Knockout*-Mäuse wurden nicht dargestellt, da kein bedeutender Unterschied zum Wildtyp festzustellen war.

3 Ergebnisse

Im Vergleich des Glutathionexportes über 6 h zeigte sich klar, dass *Mrp1-Knockout*-APK wesentlich weniger Glutathion ausscheiden als Wildtyp oder *Mrp5-Knockout*-APK (Abb. 23). Selbst der bei Wildtyp und *Mrp5-Knockout*-APK zu beobachtende geringe GSSG-Efflux ist bei *Mrp1-Knockout*-APK nicht mehr sichtbar (Abb. 23).

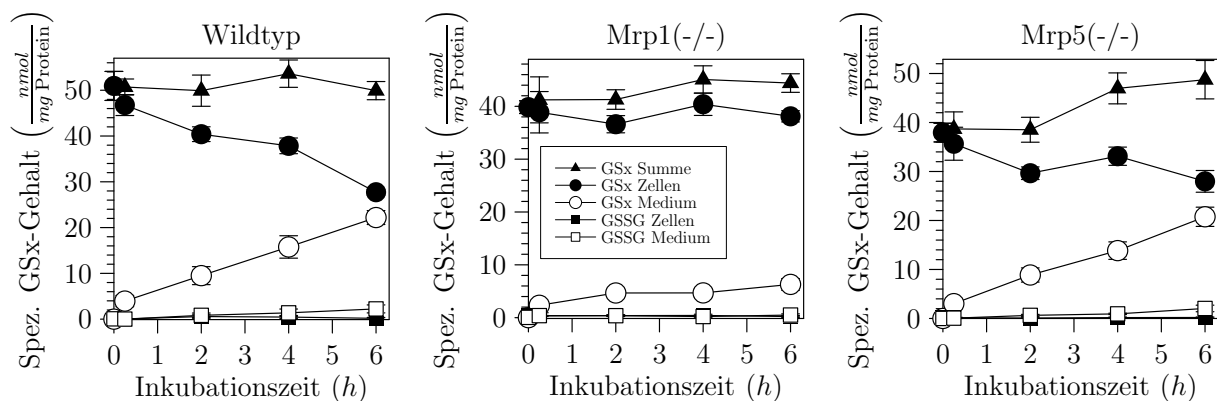


Abb. 23. Spezifischer Glutathiongehalt (nmol GSx pro mg Protein) in Zellen und Medium von APK aus Wildtyp- sowie *Mrp1*- und *Mrp5-Knockout*-Mäusen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten eines repräsentativen Einzelexperimentes.

Das Dauerstressmodell ließ wiederum erkennen, dass sich Wildtyp und *Mrp5-Knockout*-APK in Bezug auf den Glutathionexport sehr ähnlich verhielten. In beiden Fällen fand man nach 45 min 40 - 50 % des Gesamtglutathions als GSSG im Medium (Abb. 24). Der intrazelluläre GSSG-Anteil war bei *Mrp5-Knockout*-APK mit 25 - 40 % niedriger als bei Wildtyp-APK (Abb. 24). Zellen in *Mrp1-Knockout*-APK zeigten den höchsten prozentualen intrazellulären GSSG-Gehalt und sezernierten kein GSSG ins Medium (Abb. 24). Abb. 24 ist zu entnehmen, dass durch das Dauerstressmodell in allen drei Fällen vergleichbare H_2O_2 -Konzentrationen erzeugt wurden. Die Gesamtglutathionmenge war während der Experimente jeweils konstant (Abb. 24).

Vergleicht man die Abhängigkeiten der Glutathioneffluxgeschwindigkeit von der *Mk571*-Konzentration, dann sieht man, dass APK aus Wildtyp-Mäusen und *Mrp5-Knockout*-Mäusen sehr ähnliche biphasische Konzentrationsabhängigkeiten aufweisen (Abb. 25). Wie zuvor beschrie-

3.3 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Knockout-Mäusen

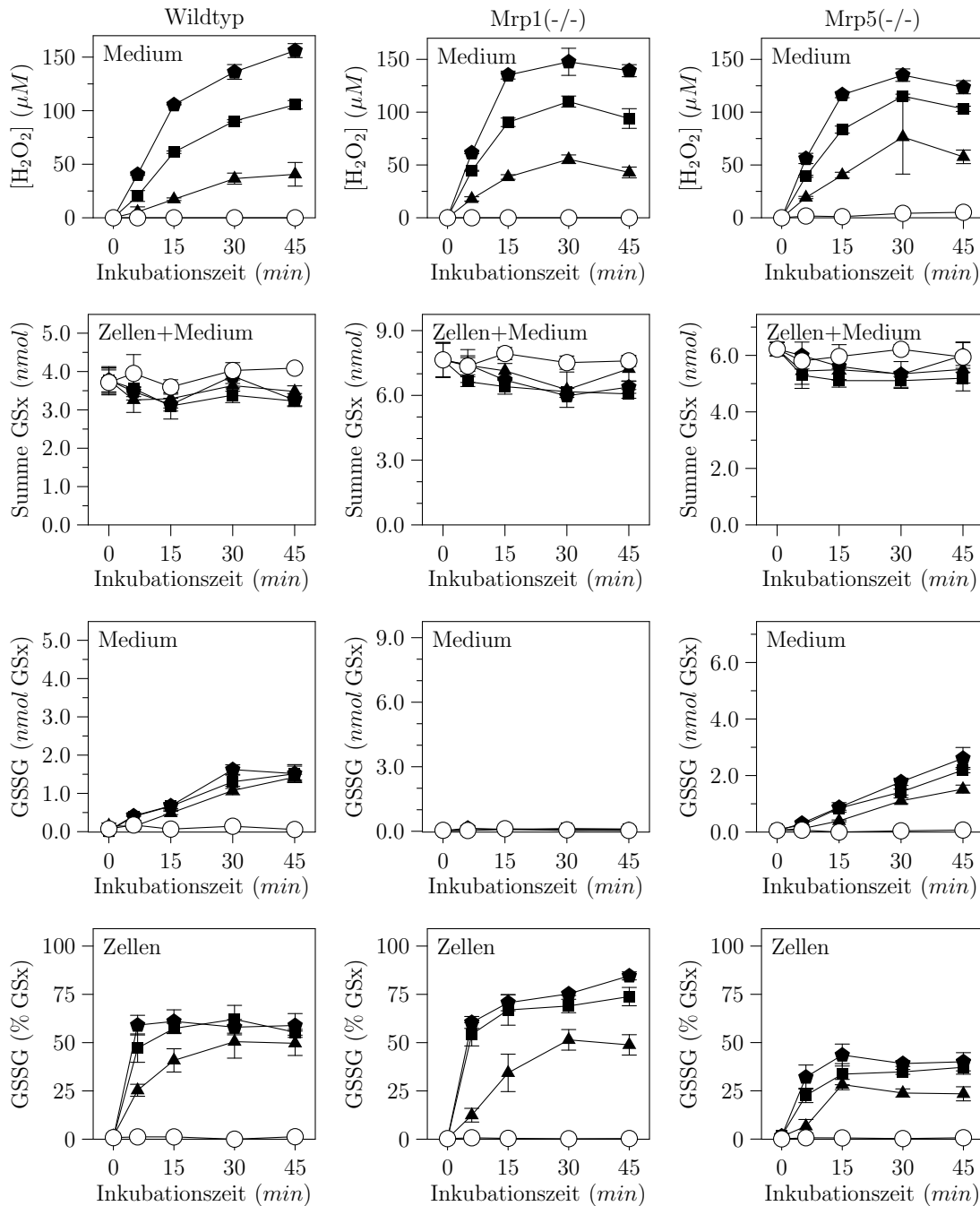


Abb. 24. Vergleich des Gehalts an Gesamtglutathion sowie oxidiertem Glutathion in Medium und Zellen von APK aus Wildtyp- sowie Mrp1-Knockout- und Mrp5-Knockout-Mäusen pro Napf einer 24-Napf-Platte als Funktion der Zeit des Einwirkens von unterschiedlich starkem oxidativem Stress. Der oxidative Stress wurde mittels eines Dauerstressmodells appliziert (Abschnitt 5.3.3.2). Die Kurven entsprechen einer Xanthinoxidaseaktivität von 0 uM/mL (offene Kreise), 10 uM/mL (Dreiecke), 20 uM/mL (Quadrate) oder 30 uM/mL (Fünfecke). Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten eines repräsentativen Einzelversuchs.

3 Ergebnisse

ben (Abschnitt 3.3.3) beeinflusste Mk571 die Glutathioneffluxgeschwindigkeit bei Mrp1-*Knockout*-APK nicht (Abb. 25). Bei 50 μM Mk571 war die Effluxgeschwindigkeit bei Wildtyp- und Mrp5-*Knockout*-Maus-APK gleich niedrig wie bei Mrp1-*Knockout*-Maus-APK in An- und Abwesenheit des Inhibitors (Abb. 25).

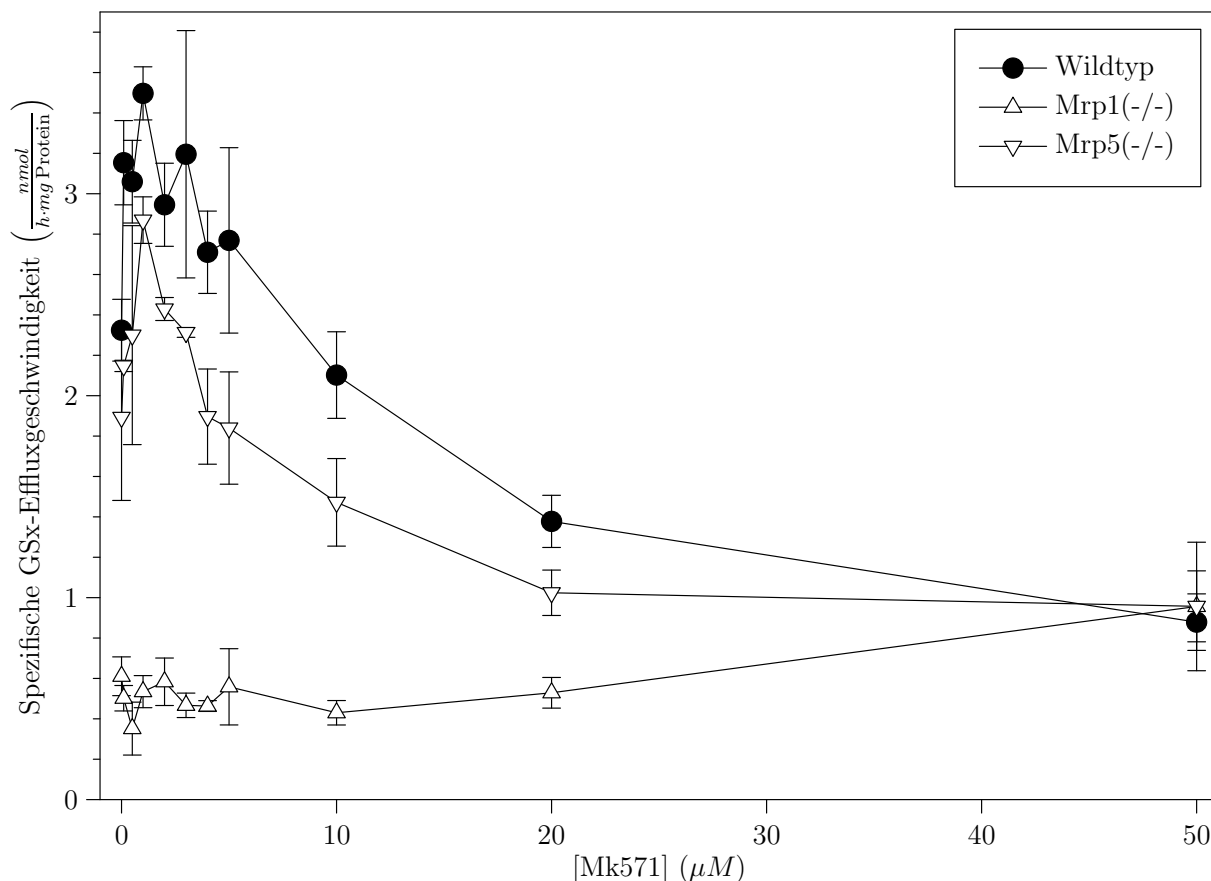


Abb. 25. Spezifische Glutathioneffluxgeschwindigkeit bei APK aus Wildtyp- sowie Mrp1-*Knockout*- und Mrp5-*Knockout*-Mäusen in Abhängigkeit von der Mk571-Konzentration. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten eines repräsentativen Einzelerperiments.

Somit stand fest, dass der Glutathionefflux in Mrp1-*Knockout*-Mäusen stark beeinträchtigt ist. Nun sollte festgestellt werden, ob die Abwesenheit von Mrp1 den Glutathiongehalt im Gehirn verändert. Dazu wurde im Gehirn neugeborener und adulter Wildtyp- sowie Mrp1-*Knockout*-

3.3 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Knockout-Mäusen

Mäuse der spezifische Glutathiongehalt bestimmt. Tabelle 2 zeigt, dass kein Unterschied im Glutathiongehalt neugeborener Wildtyp- und Mrp1-Knockout-Mäuse besteht. Im Gehirn adulter Tiere findet man hingegen weniger Glutathion. Dieser Unterschied ist im Falle der Wildtyp-Mäuse nicht ($P > 0.05$), bei den Mrp1-Knockout-Mäusen jedoch höchst ($P < 0.001$) signifikant (Tabelle 2).

Tabelle 2. Spezifischer Glutathiongehalt (nmol/mg Protein) der Gehirne neugeborener und adulter Wildtyp- und Mrp1-Knockout-Mäuse. Die Anzahl der zur Bestimmung benutzten Tiere ist jeweils in Klammern vermerkt.

	Wildtyp	Mrp1-Knockout
Neugeboren	24 ± 3 (6)	23 ± 2 (19)
Adult	20 ± 1 (5)	19 ± 3 (11)

Zusätzlich sollte festgestellt werden, ob die Aktivitäten glutathionabhängiger Enzyme im Gehirn der Mrp1-Knockout-Mäuse gegenüber dem Wildtyp verändert sind. Zu diesem Zweck wurde die spezifische Aktivität von GPx und GR in Homogenaten von Gehirnen adulter Wildtyp- sowie Mrp1-Knockout-Mäuse bestimmt. Es zeigte sich, dass die Aktivität der GPx im Gehirn von Mrp1-Knockout-Mäusen zwar geringer ist als beim Wildtyp (Tabelle 3), dieser Unterschied aber nicht signifikant ($P > 0.05$) ist. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität der GR im Gehirn von Mrp1-Knockout-Mäusen hoch signifikant ($P < 0.005$) höher als beim Wildtyp (Tabelle 3).

Tabelle 3. Spezifische Aktivitäten (mU/mg Protein) von Glutathionperoxidase und Glutathionreductase in Homogenaten von Gehirnen adulter Wildtyp- (5 Tiere) und Mrp1-Knockout-Mäuse (11 Tiere).

	Wildtyp	Mrp1-Knockout
Glutathionperoxidase (GPx)	19 ± 3	16 ± 4
Glutathionreductase (GR)	15 ± 3	19 ± 2

3.4 Restefflux

3.4.1 Transportproteine für organische Anionen, der Cystische-Fibrose-Transmembranleitfähigkeitsregulator und IP₃-Rezeptor

Aus der Literatur war bekannt, dass Transportproteine für organische Anionen (Oatps) (Li *et al.*, 1998, 2000) und der Cystische-Fibrose-Transmembranleitfähigkeitsregulator (CFTR) (Linsdell und Hanrahan, 1998; Kogan *et al.*, 2003) Glutathion transportieren können. Um festzustellen, ob die verwendeten APK überhaupt Oatps und CFTR enthalten können, wurden Oatp1-, Oatp2- und CFTR-spezifische *Primerpaare* in einer RT-PCR eingesetzt. Wie man in Abb. 26 erkennen kann, waren die mRNAs aller drei Transportproteine an Hand von Banden der erwarteten Größe nachweisbar.

Um Glutathiontransport durch diese Proteine nachzuweisen, wurden verschiedene Agenzien eingesetzt, die diese Transportsysteme hemmen oder stimulieren sollten. Unter den OATP-Agenzien konnte einzig bei 1 mM Taurocholat (Abb. 5; Reichel *et al.*, 1999) eine signifikante Erhöhung der Glutathioneffluxgeschwindigkeit festgestellt werden (sehr signifikant, $P < 0.005$), alle anderen Effluxgeschwindigkeiten wichen gegenüber der Kontrolle nicht signifikant ab (Tabelle 4). Der spezifische CFTR-Inhibitor Glibenclamid (Abb. 2; Yamazaki und Hume, 1997) veränderte die GSx-Effluxgeschwindigkeit nicht signifikant (Tabelle 4). Der unspezifische CFTR-Inhibitor NPPB (Abb. 3; Zhang *et al.*, 2000b) jedoch senkte die GSx-Effluxrate hoch signifikant ($P < 0.001$) (Tabelle 4).

Vorversuche hatten gezeigt, dass Ca^{2+} -freies Inkubationsmedium den GSx-Efflux sehr stark erhöht (T. Minich und J. Hirrlinger, Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde Thapsigargin (Abb. 5) als Aktivator des IP₃-Rezeptors eingesetzt, um festzustellen, ob eine Beeinflussung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels den GSx-Efflux verändert. In der Tat ist bei Inkubation mit Thapsigargin die GSx-Effluxrate hoch signifikant ($P < 0.001$) erhöht (Tabelle 4).

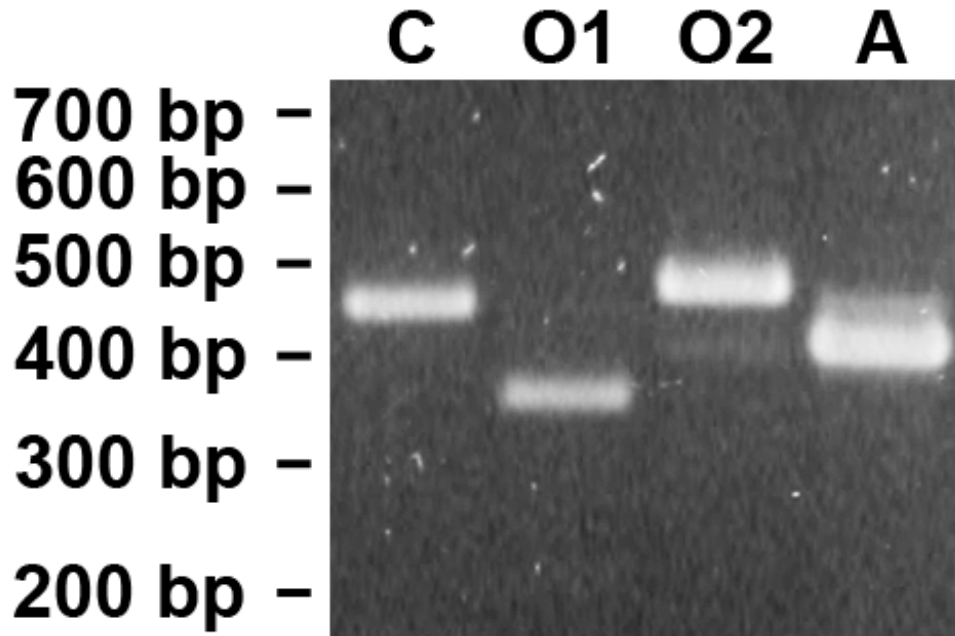


Abb. 26. Nachweis der mRNAs von CFTR (C), Oatp1 (O1) und Oatp2 (O2) in APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen. Die Integrität der cDNA wurde durch die Gegenwart von β -Actin-mRNA (A) nachgewiesen.

3.4.2 Untersuchung der Beteiligung von Connexinen/*Gap-Junction*-Halbkanälen am Glutathionefflux

Wie bereits oben gesagt war der GSx-Efflux in Ca^{2+} -freiem Inkubationsmedium stark erhöht (Abschnitt 3.4.1). Neue Literatur hatte gezeigt, dass *Gap-Junction*-Halbkanäle in Astrocyten sich unter Bedingungen wie Entzug von extrazellulärem Ca^{2+} öffnen und für niedermolekulare Stoffe durchlässig werden (Sáez *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003). Deshalb sollte untersucht werden, ob der Wegfall der Hemmung durch Ca^{2+} dem unter Ca^{2+} -Entzug gefundenen starken GSx-Efflux zugrunde lag.

3 Ergebnisse

Table 4. Untersuchung der Beteiligung diverser Transportsysteme und des IP₃-Rezeptors am GSx-Restefflux aus APK. Die Effluxgeschwindigkeiten wurden in Prozent auf die Kontrolle (Effluxgeschwindigkeit ohne zugesetztes Agens, siehe Abschnitt 3.1) normiert. Probenecid muss in Natronlauge gelöst und dann mit HCl neutralisiert werden. Deshalb wurden zusätzliche Kontrollen (K) mit entsprechender NaCl-Lösung durchgeführt. (#: Zahl der Experimente; v: spezifische GSx-Effluxgeschwindigkeit in % der Kontrolle; LDH: Freigesetzte LDH-Aktivität nach 6 h, in % der Gesamtaktivität)

Transportsystem	Agens	Konzentration [μM]	#	v	LDH	
OATPs	$\gamma\text{Glu-Glu}$	1000	1	112 \pm 26	7 \pm 2	
	$\gamma\text{Glu-Gly}$	1000	1	118 \pm 14	3 \pm 4	
	Gly-Glu	1000	1	101 \pm 5	5 \pm 5	
	DHEA (Abb. 1)		100	1	93 \pm 8	7 \pm 6
			1000	1	129 \pm 15	3 \pm 2
	Taurocholat (Abb. 5)		100	1	128 \pm 20	12 \pm 4
			1000	1	213 \pm 44	7 \pm 11
	Ouabain (Abb. 4)		200	1	79 \pm 40	11 \pm 3
			1000	2	82 \pm 26	5 \pm 4
	Indomethacin (Abb. 3)		10000	1	102 \pm 20	10 \pm 2
			50	2	93 \pm 25	11 \pm 5
	Prostaglandin E ₁ (Abb. 4)		20	2	99 \pm 17	12 \pm 6
	Probenecid (Abb. 4)		100 (K)	2	126 \pm 26	7 \pm 6
			100	2	108 \pm 16	12 \pm 7
		1000 (K)	2	113 \pm 20	7 \pm 8	
		1000	2	133 \pm 53	5 \pm 6	
CFTR	Glibenclamid (Abb. 2)	50	5	101 \pm 35	11 \pm 5	
	NPPB (Abb. 3)	100	4	60 \pm 18	14 \pm 5	
IP ₃ - Rezeptor	Thapsigargin (Abb. 5)	2	5	167 \pm 54	10 \pm 4	

3.4.2.1 Untersuchungen an Mrp1-Knockout-Mäusen

Von *Gap-Junction*-Halbkanälen war bekannt, dass ihre Öffnung nicht nur von Ca²⁺, sondern auch durch andere divalente Kationen verhindert wird (Sáez *et al.*, 2003). Deshalb wurde an APK aus Mrp1-Knockout-Mäusen die Abhängigkeit des GSx-Effluxes von den Konzentra-

tionen der Erdalkalitionen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} oder Ba^{2+} in MM untersucht, das keine anderen zweiwertigen Kationen enthielt. Es zeigte sich, dass die Geschwindigkeit des GSx-Effluxes am empfindlichsten auf Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration reagierte. Der IC50-Wert des durch zweiwertige Kationen hemmbaren Exports betrug für Ca^{2+} $75 \mu\text{M}$ (Abb. 27). Etwas weniger empfindlich reagierte das System auf Sr^{2+} und Ba^{2+} (IC50: $420 \mu\text{M}$ bzw. $475 \mu\text{M}$, Abb. 27). Die geringste Empfindlichkeit zeigte das System gegenüber Mg^{2+} (IC50: 1.2 mM , Abb. 27).

Um zu untersuchen, ob die bei Abwesenheit zweiwertiger Kationen beobachtbare enorm starke Erhöhung des GSx-Effluxes reversibel ist, wurde den in M^{2+} -freiem MM vorinkubierten APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen zu diversen Zeitpunkten Ca^{2+} -Ionen zugegeben. Die Endkonzentration war jeweils 1.8 mM . Wie man aus Abb. 28 erkennen kann, wurde in allen Fällen bei Zugabe von Ca^{2+} der Efflux sofort gestoppt.

Unglücklicherweise konnte dieses Experiment nur einmal durchgeführt werden, da ab diesem Zeitpunkt keine weiteren APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen mehr zur Verfügung standen. Deshalb wurde das Experiment mit APK aus Wildtyp-Mäusen unter Zusatz von Mk571 (Abb. 3) in einer Endkonzentration von $50 \mu\text{M}$ wiederholt. Die mit Wildtyp-Kulturen unter Einsatz des Inhibitors erhaltenen Ergebnisse (Abb. 29) unterschieden sich nicht von denen mit Mrp1-*Knockout*-Kulturen erhaltenen (Abb. 28).

Um weiter nachzuweisen, ob *Gap-Junction*-Halbkanäle für den hohen GSx-Efflux verantwortlich sind, wurden APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen mit diversen Connexininhibitoren (Spray *et al.*, 2002) inkubiert. Ca^{2+} und Mg^{2+} in physiologischen Konzentrationen (vgl. unmodifiziertes MM, Abschnitt 5.3.3.1) reduzierten den GSx-Efflux bedeutend (Tabelle 5). Der Effekt von FFA (Abb. 2) und AGA (Abb. 2) variierte stark zwischen einzelnen Experimenten. Der Efflux wurde im Durchschnitt durch beide auf etwa 60 % der Kontrolle reduziert (Tabelle 5). Am effizientesten war Carbenoxolon (Abb. 1). Durch diesen Inhibitor konnte der GSx-Efflux auf rund ein Fünftel der Kontrolle reduziert werden (Tabelle 5).

Um darzustellen, wie groß der Anteil des von *Gap-Junction*-Halbkanälen vermittelten GSx-Effluxes am Gesamtefflux ist, wurde die Abhängigkeit der Effluxgeschwindigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration in APK aus Wildtyp-Mäusen untersucht. Der Vergleich des Wildtyps mit dem

3 Ergebnisse

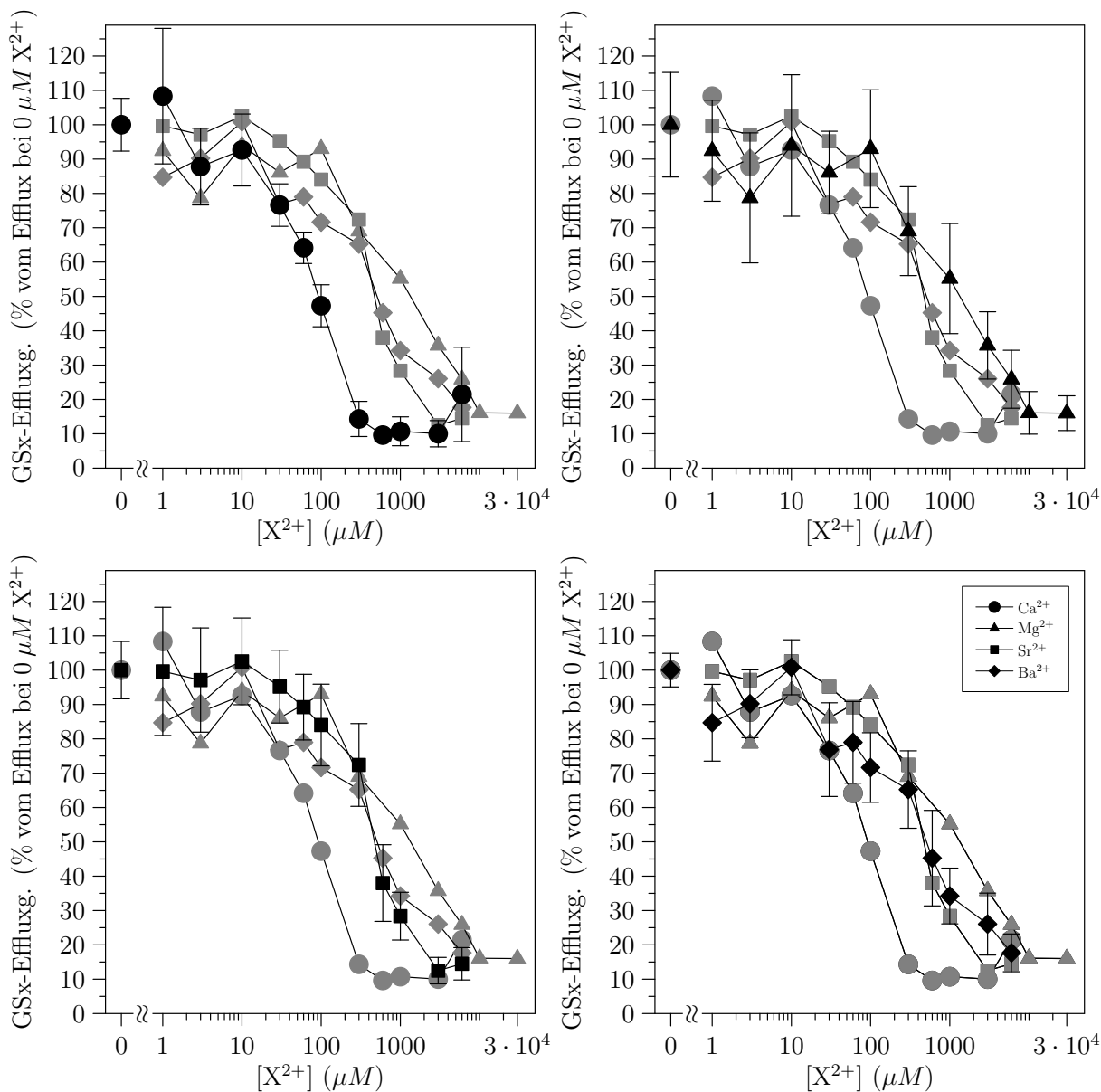


Abb. 27. GSx-Efflux aus APK in Abhängigkeit von den Konzentrationen divalenter Erdalkalitionen. Die logarithmische Skala der Abszisse ist zu beachten. Die Standardabweichung der Kontrollwerte (100 %, ohne zugesetztes divalentes Kation) für die jeweilige Messreihe war (in %): 7.7 (Ca²⁺), 15.2 (Mg²⁺), 8.3 (Sr²⁺) und 4.9 (Ba²⁺). Die IC₅₀-Werte der divalenten Kationen betragen: 75 μM (Ca²⁺), 1.2 mM (Mg²⁺), 420 μM (Sr²⁺) und 475 μM (Ba²⁺). Die Legende gilt für alle Teilabbildungen. Der Übersichtlichkeit halber wurden in jeder Teilabbildung jeweils eine Kurve mit Standardabweichungen mit schwarzen Symbolen und die anderen zum Vergleich ohne Standardabweichungen mit grauen Symbolen aufgetragen.

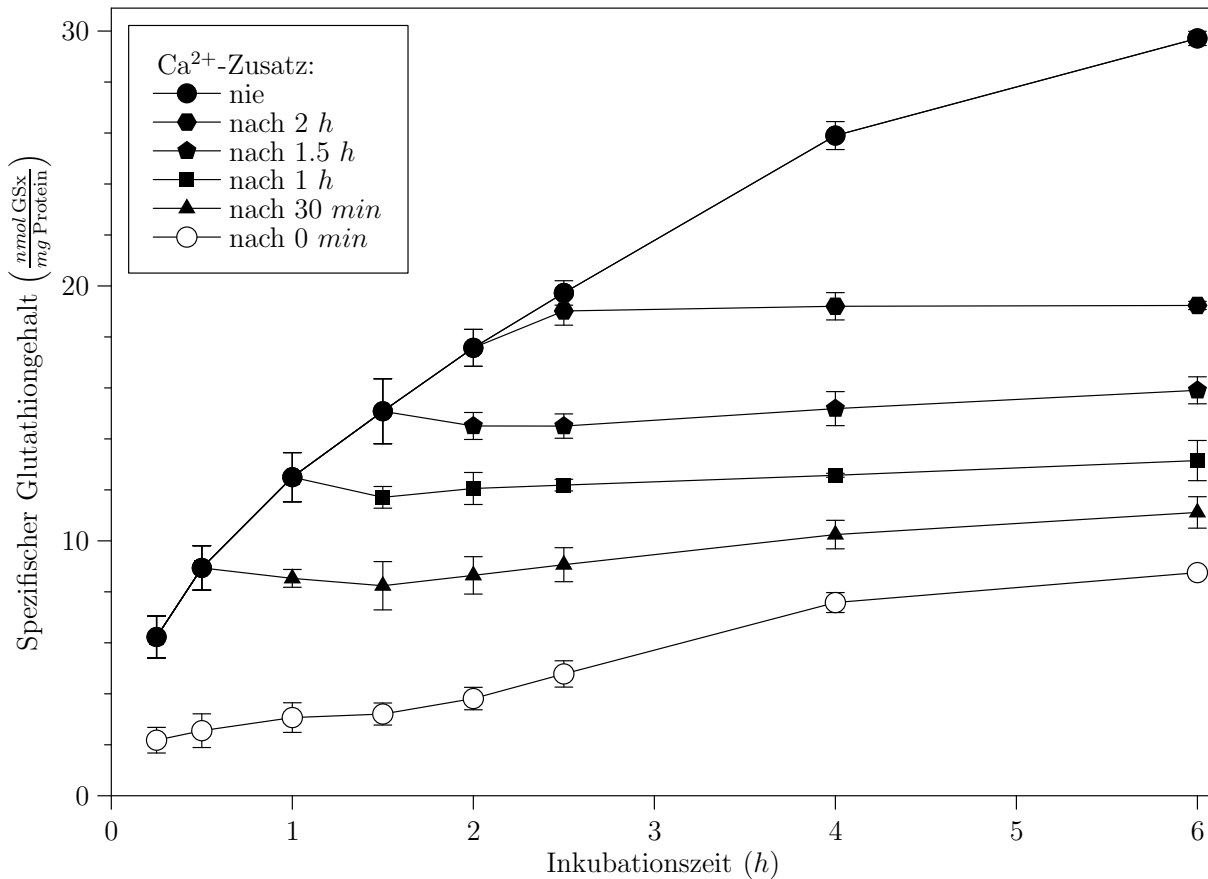


Abb. 28. Verlauf der Ausscheidung von GSx aus APK von *Mrp1-Knockout*-Mäusen ins Kulturmedium, das keine divalenten Kationen enthielt. Die Zugabe von Ca^{2+} (Endkonzentration 1.8 mM) zu diversen Zeitpunkten verhinderte den weiteren Efflux stets sofort. Die Abbildung stellt die Ergebnisse eines Einzelerperimentes dar. Aus der Versuchsanordnung ergab sich, dass zur Erstellung der Hauptkurve (ausgefüllte Kreise) für die einzelnen Kurvenpunkte Messwerte von 15, 15, 12, 9, 6, 3, 3 und 3 Replikakulturen verwendet wurden.

Mrp1-Knockout zeigte keine bedeutende Verschiebung des Wendepunktes der Kurve für die Abhängigkeit der Effluxgeschwindigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 30). Der Unterschied im hohen Konzentrationsbereich stellt den Anteil von *Mrp1* am GSx-Efflux dar (Abb. 30).

3 Ergebnisse

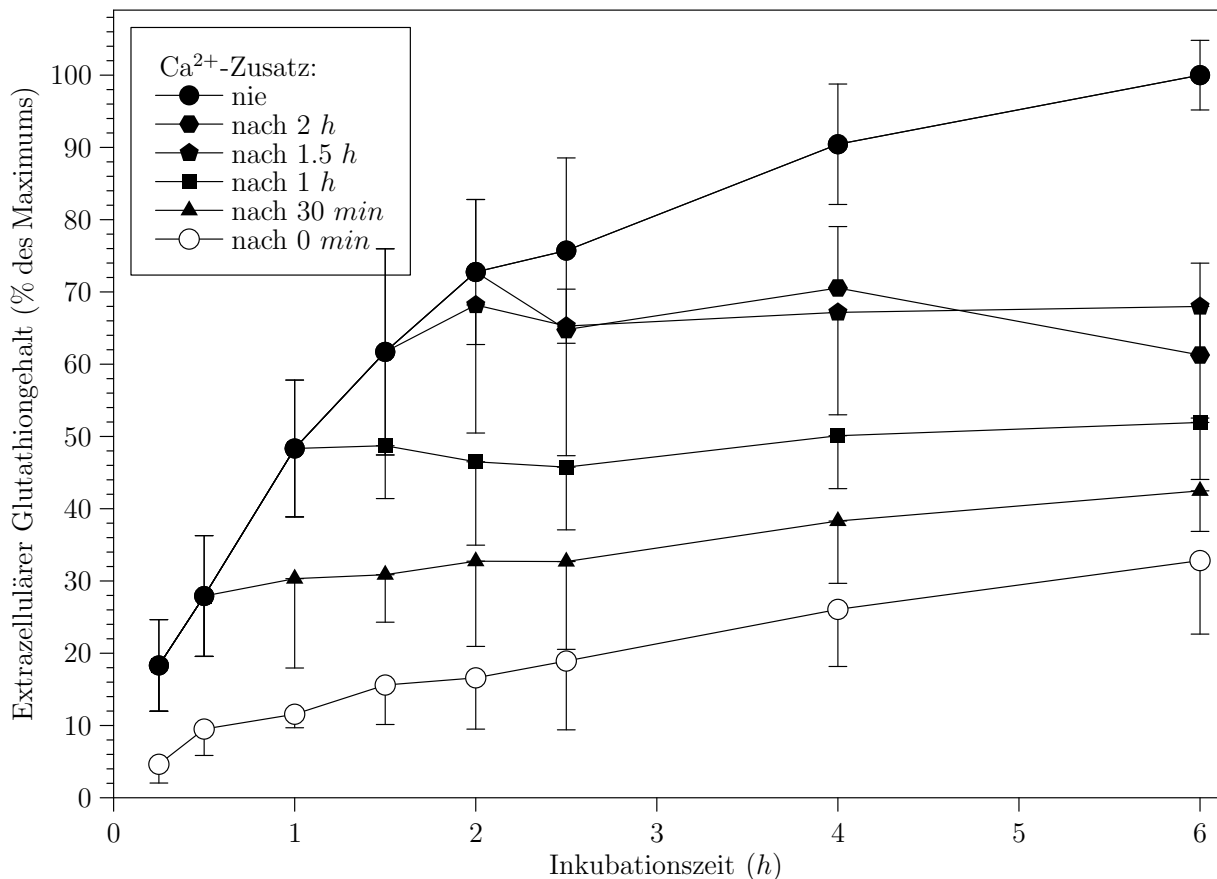


Abb. 29. Verlauf der Ausscheidung von GSx aus APK von Wildtyp-Mäusen ins Kulturmedium, das keine divalenten Kationen enthielt. Mrp1 war durch die Gegenwart des Inhibitors Mk571 in der Endkonzentration von $50 \mu\text{M}$ gehemmt. Die Zugabe von Ca^{2+} (Endkonzentration 1.8 mM) zu diversen Zeitpunkten verhinderte den weiteren Efflux stets sofort. Aus der Versuchsanordnung ergab sich, dass zur Erstellung der Hauptkurve (ausgefüllte Kreise) für die einzelnen Kurvenpunkte pro Experiment Messwerte von 15, 15, 12, 9, 6, 3, 3 und 3 Replikakulturen verwendet wurden.

3.4.2.2 Untersuchungen an Connexin 43-Knockout-Mäusen

Um weitere Untersuchungen durchführen zu können, wurde versucht, APK aus Connexin 43-Knockout-Mäusen zu kultivieren. Da der Connexin 43-Knockout kurz nach der Geburt lethal ist (Reaume *et al.*, 1995; Retamal *et al.*, 2007a), kann dieser Mausstamm nur heterozygot gehalten werden.

Tabelle 5. Einfluss einiger Connexininhibitoren auf den GSx-Efflux aus APK, die aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen hergestellt wurden. Die Inhibitoren wurden MM zugesetzt, das keine divalenten Kationen enthielt. Die Effluxgeschwindigkeiten wurden auf die Kontrolle (100 %, Effluxgeschwindigkeit ohne zugesetzten Inhibitor, siehe Abschnitt 3.1; Mittelwert: 16 ± 6 nmol/(h * mg Protein)) normiert. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten von fünf (DVC, FFA, AGA) oder drei (Carbenoxolon) unabhängigen Experimenten. *) 1.8 mM Ca^{2+} ; 0.8 mM Mg^{2+} .

Connexininhibitoren	Konzentration [μM]	Effluxgeschwindigkeit (in %)
DVC	*)	10 ± 5
FFA (Abb. 2)	100	60 ± 20
AGA (Abb. 2)	10	66 ± 31
Carbenoxolon (Abb. 1)	100	21 ± 13

ten werden. Da keine der gewonnenen Kulturen nach Genotypisierung als homozygote *Knockout*-Kultur identifiziert wurde, blieb nur der Vergleich von APK aus Wildtyp- (C57BL/6) und heterozygoten *Knockout*-Mäusen.

Zunächst wurde die Abhängigkeit des GSx-Effluxes von der Ca^{2+} -Konzentration untersucht. Es zeigten sich weder bei den IC50-Werten noch im allgemeinen Kurvenverlauf deutliche Unterschiede zwischen heterozygotem Connexin 43-*Knockout*, C57BL/6-Wildtyp und FVB/N-Wildtyp (Abb. 31).

APK aus Wildtyp- und heterozygoten *Knockout*-Mäusen unterschieden sich nicht im Einfluss der Ca^{2+} -Konzentration auf die Geschwindigkeit des GSx-Effluxes. Deshalb lag es nahe zu überprüfen, ob ein solcher Unterschied auch beim Einsatz unterschiedlicher Connexininhibitoren (vgl. Eskandari *et al.*, 2002; Spray *et al.*, 2002) fehlte. In der Tat unterscheiden sich die Zellen aus C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (+/+) und aus heterozygoten *Knockout*-Mäusen (+/-) nicht in ihrer Inhibitorempfindlichkeit (Tabelle 6). Zwar bestehen leichte Unterschiede zwischen den jeweiligen Effluxraten in Gegenwart der Inhibitoren bei C57BL/6-Wildtyp-APK und heterozygoter *Knockout*-APK, diese sind aber in keinem Fall signifikant (Tabelle 6). Im Vergleich

3 Ergebnisse

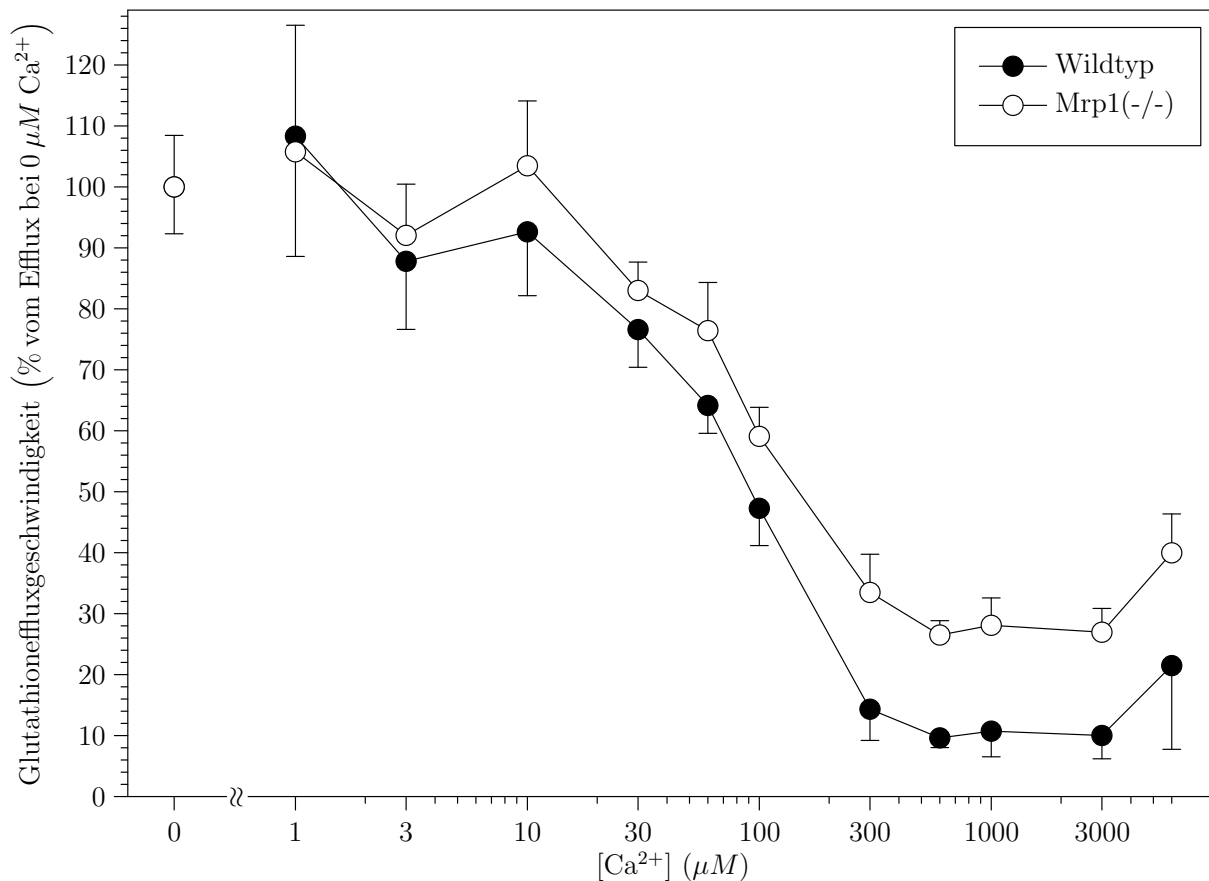


Abb. 30. GSx-Efflux aus APK von Wildtyp- sowie Mrp1-*Knockout*-Mäusen in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. Die logarithmische Skala der Abszisse ist zu beachten. Die Standardabweichungen der Kontrollwerte (100 %, ohne zugesetztes Ca^{2+}) für die jeweilige Messreihe waren (in %): 8.4 (Wildtyp) und 7.7 (Mrp1-*Knockout*). IC50-Werte: 80 μM (Wildtyp) und 75 μM (Mrp1-*Knockout*).

mit den Effluxraten bei APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen (Tabelle 5) zeigte sich, dass AGA in der C57BL/6-Mauslinie etwas weniger effektiv zu wirken scheint als in der Mrp1-*Knockout*-Mauslinie (Tabelle 6). Alle anderen Inhibitoren wirkten ähnlich effektiv (Tabelle 5, Tabelle 6).

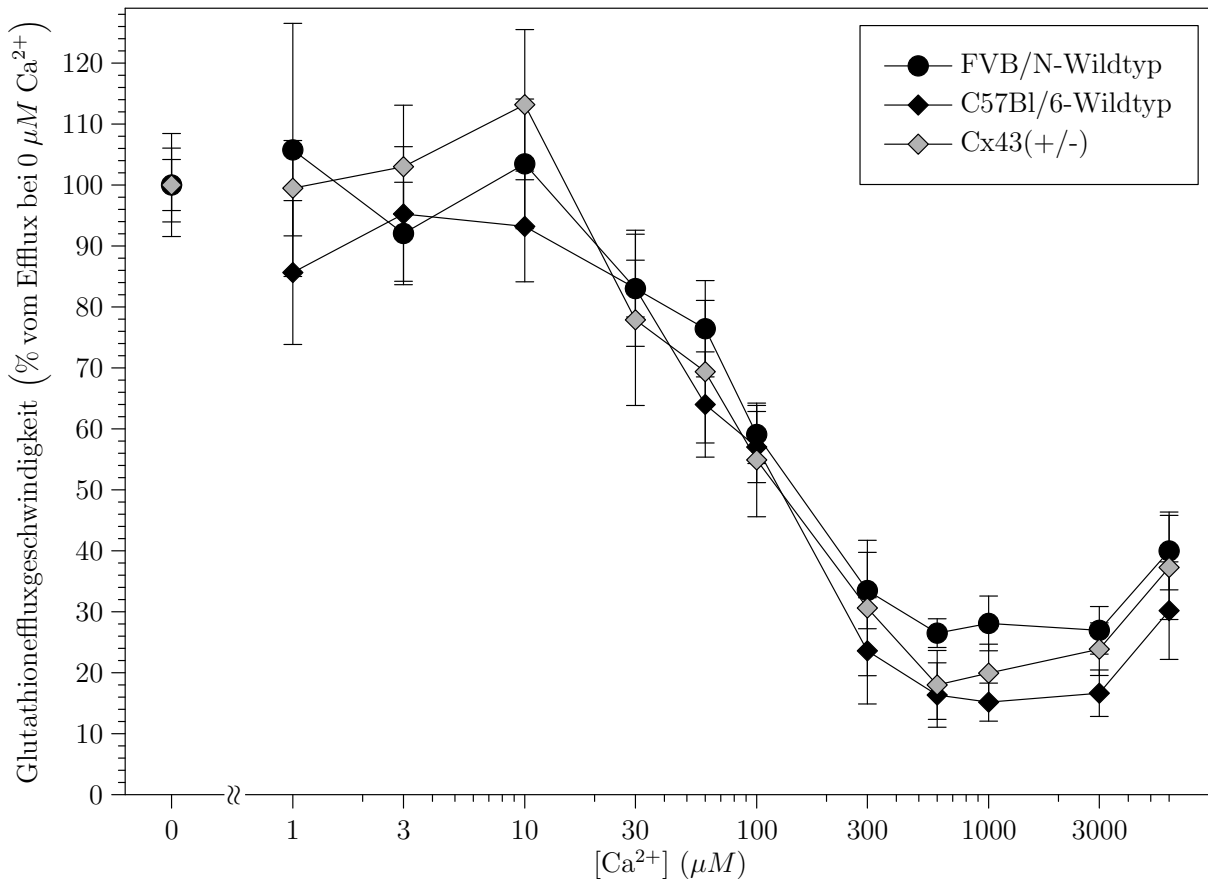


Abb. 31. GSx-Efflux aus APK von FVB/N-Wildtypmäusen, C57BL/6-Wildtypmäusen und heterozygoten Connexin 43-*Knockout*-Mäusen in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration. Die logarithmische Skala der Abszisse ist zu beachten. Die Standardabweichungen der Kontrollwerte (100 %, ohne zugesetztes Ca²⁺) für die jeweilige Messreihe waren (in %): 8.4 (FVB/N Wildtyp), 4.2 (C57BL/6 Wildtyp) und 6.1 (heterozygoter Connexin 43-*Knockout*). IC50-Werte: 80 μM (FVB/N Wildtyp), 91 μM (C57BL/6 Wildtyp) und 65 μM (heterozygoter Connexin 43-*Knockout*). Die Daten repräsentieren Mittelwert ± Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten von jeweils zwei (Connexin 43-*Knockout*) oder drei (Wildtyp-Stämme) unabhängigen Experimenten.

Tabelle 6. Einfluss einiger Connexininhibitoren auf den GSx-Efflux aus APK von C57BL/6-Wildtypmäusen und heterozygoten Connexin 43-*Knockout*-Mäusen. Die Inhibitoren wurden MM zugesetzt, das keine divalenten Kationen enthält. Die Effluxgeschwindigkeiten wurden auf die Kontrolle (100 %, Effluxgeschwindigkeit ohne zugesetzten Inhibitor, siehe Abschnitt 3.1; Mittelwert Wildtyp: 13 ± 2 nmol/(h * mg Protein); Mittelwert heterozygoter *Knockout*: 11 ± 2 nmol/(h * mg Protein)) normiert. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus den je drei Einzelwerten von jeweils zwei unabhängigen Experimenten. *) 1.8 mM Ca^{2+} ; 0.8 mM Mg^{2+} .

Connexininhibitoren	Konzentration [μM]	Wildtyp (in %)	Heterozygot (in %)
DVC	*)	16 ± 3	16 ± 3
FFA (Abb. 2)	100	64 ± 19	55 ± 9
AGA (Abb. 2)	10	81 ± 22	97 ± 11
Carbenoxolon (Abb. 1)	100	33 ± 11	23 ± 3

4 Diskussion

4.1 Glutathionefflux aus astrogliareichen Mäuse-Primärkulturen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Beteiligung verschiedener Transportsysteme am Export von oxidiertem und reduziertem Glutathion aus astrogliareichen Primärkulturen (APK) untersucht werden. Aus früheren Experimenten an APK aus Ratten (Hirrlinger, 2002) war bekannt, dass das *Multidrug-resistance-protein 1* (Mrp1) eine bedeutende Rolle beim Glutathionefflux spielt. Zur Untersuchung weiterer Glutathiontransportsysteme war die Verfügbarkeit von Mrp1-*Knockout*-Mäusen ein großer Vorteil. Um festzustellen, ob Experimente mit Kulturen aus *Knockout*-Tieren erfolgversprechend sein würden, musste jedoch zunächst überprüft werden, ob Mäuse-APK überhaupt Glutathion exportieren und gegebenenfalls in einer Weise, wie sie von Ratten-APK her bekannt war.

In der Tat stellte sich heraus, dass auch Mäuse-APK oxidiertes und reduziertes Glutathion exportieren. Im Vergleich mit Ratten-APK (Hirrlinger, 2002) war qualitativ kein Unterschied festzustellen, jedoch unterschieden sich manche Parameter quantitativ.

Zunächst stellte sich die Frage nach der Hemmbarkeit der γ -Glutamyltranspeptidase (γ GT). Dieses Enzym baut extrazelluläres Glutathion ab (Meister *et al.*, 1981), beeinträchtigt somit die Bestimmung der Gesamtmenge des exportierten Glutathions. In Rattenastrocyten wird die γ GT ab einer Konzentration von 20 μ M des γ GT-Inhibitors Acivicin (Abb. 1) praktisch vollständig gehemmt (Dringen *et al.*, 1997a). In Mäuse-APK zeigte sich ein identisches Bild: Bei Konzen-

4 Diskussion

trationen zwischen 20 μM und 100 μM Acivicin wurde hier bei einer Inkubationszeit von 6 h nahezu vollständige Hemmung erreicht. Somit besteht zwischen Ratten- und Mäuse-APK kein Unterschied in der Hemmbarkeit der γGT .

Nach 6 h findet man im Medium über Ratten-APK $50 \pm 8 \%$ des Gesamtglutathions (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c). Im Medium über Mäuse-APK ist nach der gleichen Inkubationszeit mit $39 \pm 8 \%$ ein geringerer Anteil des Gesamtglutathions messbar. Wie bei Ratten-APK (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c) lässt sich auch in Mäuse-APK kein intrazelluläres oxidiertes Glutathion (GSSG) nachweisen. Da extrazelluläres GSSG messbar war und ähnlich wie bei Ratten-APK (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c) maximal 20 % bis 25 % des extrazellulären GSx betrug, muss davon ausgegangen werden, dass entweder sämtliches GSSG exportiert oder reduziertes Glutathion nur extrazellulär oxidiert wurde. Letztere Annahme würde voraussetzen, dass die Zellen während der Inkubationszeit Glutathionperoxidase und reaktive Sauerstoffspezies als Cosubstrat ausscheiden oder dass im extrazellulären Raum Substanzen vorhanden sind, die Glutathion nicht-enzymatisch oxidieren können. Die Ausscheidung von Glutathionperoxidase wurde bisher nicht direkt gezeigt, jedoch wurde zumindest unter pathologischen Bedingungen extrazelluläre Glutathionperoxidase gefunden (Macdonald *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1995). Ausscheidung reaktiver Sauerstoffspezies ist zumindest von aktivierten Microgliazellen bekannt (Colton und Gilbert, 1987; Sonderer *et al.*, 1987; Sankarapandi *et al.*, 1998), so dass diese Möglichkeit nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Auch Autoxidation des Glutathions kommt in Frage, jedoch sollte diese unter physiologischen Bedingungen nur schwach sein (B. Hamprecht, persönliche Mitteilung). Andererseits wurde gezeigt, dass ein von kultivierten Astrogliazellen sezernierter Faktor reduziertes Glutathion im Medium vor Oxidation schützt (Stewart *et al.*, 2002).

Zur Untersuchung der Auswirkung von oxidativem Stress auf den Oxidationszustand von Glutathion wurde ein an Ratten-APK entwickeltes Dauerstressmodell (Hirrlinger *et al.*, 1999, 2001; Hirrlinger, 2002) auch bei Mäuse-APK angewendet. Die erzeugten H_2O_2 -Konzentrationen im Fließgleichgewicht entsprachen denen über Ratten-APK (Hirrlinger *et al.*, 2001; Hirrlinger, 2002). Nach Beginn der Phase des oxidativen Stresses stieg der intrazelluläre Anteil von GSSG in Mäuse-APK von einem verschwindend geringen Wert bis hin zu einem bedeutenden von ca. 25 % bis 60 % je nach Ausmaß des Stresses an, etwas weniger als bei Ratten-APK (Hirrlinger

4.1 Glutathionefflux aus astrogliareichen Mäuse-Primärkulturen

et al., 2001; Hirrlinger, 2002). Nach Erreichen der Fließgleichgewichtskonzentration für Hydroperoxid stieg bei APK aus NMRI-Mäusen der intrazelluläre GSSG-Anteil nur noch wenig an und der absolute zelluläre GSSG-Gehalt blieb fast konstant. Im Gegensatz dazu durchlief der intrazelluläre GSSG-Anteil bei Ratten-APK ein Maximum bei Erreichen der Peroxidgleichgewichtskonzentration und fiel dann sanft ab (Hirrlinger *et al.*, 2001; Hirrlinger, 2002), ebenso sank der absolute intrazelluläre GSSG-Gehalt (Hirrlinger *et al.*, 2001; Hirrlinger, 2002). Extrazellulär besteht qualitativ im Hinblick auf exportiertes reduziertes und oxidiertes Glutathion zwischen Ratten-APK (Hirrlinger *et al.*, 2001; Hirrlinger, 2002) und APK aus NMRI-Mäusen kein Unterschied. Im beobachteten Zeitraum wurde praktisch sämtliches exportiertes Glutathion in der oxidierten Form gefunden, der kurze Zeitraum reicht für einen messbaren Export an reduziertem Glutathion nicht aus (vgl. Abb. 10). Jedoch wurde bei Ratten-APK innerhalb von 45 min weitaus mehr GSSG exportiert als bei APK aus NMRI-Mäusen. Bei Ratten-APK war dann im Extremfall etwa 50 % des Gesamtglutathions als GSSG im Medium zu finden (Hirrlinger *et al.*, 2001; Hirrlinger, 2002), bei APK aus NMRI-Mäusen nur halb so viel. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Glutathiontransportkapazität von APK aus NMRI-Mäusen geringer ist als die von APK aus Ratten und das Transportsystem möglicherweise eine geringere Affinität für oxidiertes Glutathion hat. Da jedoch der intrazelluläre GSSG-Anteil bei NMRI-Mäusen geringer war als bei Ratten, kann letzteres allerdings nicht mit Sicherheit behauptet werden. Umgekehrt kann der im Vergleich zu Ratten-APK geringere GSSG-Export aber auch nicht der Grund für den geringeren Anteil des GSSG am intrazellulären GSx sein. Als Erklärung kommen noch in Frage verminderte Produktion durch die Glutathionperoxidase (GPx) oder verstärkte Reduktion durch Glutathionreductase (GR) oder Sulfidaustauschreaktionen. Da - wie oben bemerkt - die Peroxidgleichgewichtskonzentration im Medium über NMRI-Mäuse- und Ratten-APK ähnlich war, erscheint verminderte Produktion von GSSG durch die GPx fraglich. Es ist somit zu vermuten, dass die Reduktion von GSSG in NMRI-Mäuse-APK gegenüber Ratten-APK verstärkt ist. Im Vergleich zu APK aus Ratten können somit APK aus NMRI-Mäusen bei gleichem oxidativem Stress ein für den Erhalt von Proteinthiolgruppen günstigeres Thiol-Redoxpotential aufrecht erhalten und der GSSG-Export spielt für diese Aufrechterhaltung eine geringere Rolle als für Ratten-APK postuliert (Hirrlinger *et al.*, 2001; Hirrlinger, 2002).

Bei der Abhängigkeit des Glutathionexportes von der Konzentration des kompetitiven Mrp1-Inhibitors Mk571 (Abb. 3) (Leier *et al.*, 1994) zeigte sich wie bei Ratten-APK (Hirrlinger,

4 Diskussion

2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c) ein paradoxes biphasisches Verhalten. Bei niedrigen Konzentrationen von weniger als 5 μM aktivierte Mk571 den Glutathionefflux bis zu einem Maximum von 150 % des Ausgangswertes bei 1 μM Mk571. Bei höheren Konzentrationen ab 20 μM ergab sich eine Verringerung des Exports bis zu einem Minimum von 50 %. Bei Ratten-APK war der Glutathionefflux bei 1 μM Mk571 verdoppelt, jedoch erreichte er erst bei 10 μM wieder den Ausgangswert (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c). Bei Berücksichtigung der Standardabweichungen ist dieser Unterschied zwischen Mäuse- und Ratten-APK aber wohl kein realer.

Auch von anderen Substanzen ist bekannt, dass sie in geringen Konzentrationen Mrp1-vermittelten Transport aktivieren und in höheren Konzentrationen inhibieren können (Evers *et al.*, 2000; Loe *et al.*, 2000; Cullen *et al.*, 2001). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde von Hirrlinger *et al.* (2002c, Abb. 37) ein Modell des Mrp1-vermittelten Transports entwickelt. Dieses Modell postuliert zwei Bindungstaschen unterschiedlicher Affinität, von denen im Falle geringer Mk571-Konzentration eine mit Mk571 besetzt ist und den Transport des in der anderen Tasche gebundenen GSH beschleunigt. Im Falle hoher Mk571-Konzentration sind beide Taschen mit Mk571 besetzt und der Transport von Glutathion wird blockiert (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c).

Diese Ergebnisse lassen bei einem *Knockout* des Mrp1-Gens erwarten, dass die Geschwindigkeit des Glutathiontransports derjenigen der zweiten (inhibitorischen) Phase der Kurve für die Abhängigkeit der Exportgeschwindigkeit von der Mk571-Konzentration entspricht. Ebenso sollte Mk571 bei einem *Knockout* des Mrp1-Gens die Geschwindigkeit des Glutathionexports nicht mehr beeinflussen. Wie im Ergebnisteil gezeigt (Abb. 22) und im Folgenden diskutiert, ist dies tatsächlich der Fall.

4.2 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von *Knockout*-Mäusen

Nachdem geklärt war, dass Mäuse-APK prinzipiell ähnliche Ergebnisse liefert wie Ratten-APK, stand fest, dass APK aus *Knockout*-Mäusen geeignet waren, auf den Experimenten mit Ratten-APK von Hirrlinger (2002) aufzubauen und weitergehende Untersuchungen zum Glutathionexport durchzuführen.

Dank der freundlichen Unterstützung von Piet Borst (Amsterdam) erhielten wir aus seinem Labor Mrp1- und Mrp5-*Knockout*-Mäuse sowie den Wildtyp des Mausstammes, auf dem diese basieren (FVB/N). Nach Erhalt der Tiere war es zunächst notwendig, deren Genotyp zu überprüfen und die aus den Tieren gewonnenen APK zu charakterisieren.

Immuncytochemische Anfärbungen auf das Astrocyten-spezifische gliale fibrilläre saure Protein (GFAP; Bignami *et al.*, 1972) zeigten einen nahezu identischen Anteil an Astrocyten in APK aus Wildtyp-, Mrp1-*Knockout*- und Mrp5-*Knockout*-Mäusen. Das Fehlen des Mrp1- bzw. Mrp5-Proteins hatte also keinen Einfluss auf den Astrocytenanteil der Kulturen. Da fast alle Zellen GFAP-positiv waren, konnten die gewonnenen Kulturen als APK im Sinne von Hamprecht und Löffler (1985) betrachtet werden.

Die Genotypisierung der Mrp1-*Knockout*-Mäuse anhand der publizierten Beschreibung (Wijnholds *et al.*, 1997) zeigte klar, dass die erhaltenen Mäuse tatsächlich dem beschriebenen Genotyp entsprachen. Die PCR mit genomischer DNA aus APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen ergab mit Wildtyp-spezifischen *Primern* kein Amplifikat. Mit Mrp1-*Knockout*-spezifischen *Primern* oder Kontroll*primern* jedoch war ein Amplifikat festzustellen. Zusätzlich konnte auch mittels RT-PCR mit Mrp1-spezifischen *Primern* in APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen keine Mrp1-mRNA nachgewiesen werden. Die APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen war somit zweifelsfrei Mrp1-defizient. Dies wurde auch von Riemer (2003) mittels *Westernblot*-Analyse der Membranfraktion von APK aus dem gleichen Mrp1-*Knockout*-Stamm bestätigt.

Auf Grund mangelnder Sequenzinformationen war es nicht möglich, entsprechende Unter-

4 Diskussion

suchungen für den Genotyp der *Mrp5-Knockout*-Mäuse durchzuführen. Mit den verfügbaren *Mrp5*-spezifischen *Primern* konnte mittels RT-PCR auch in APK aus *Mrp5-Knockout*-Mäusen ein Amplifikat der eigentlich beim Wildtyp erwarteten Länge gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte der *Mrp5-Knockout* im Rahmen vorliegender Arbeit nicht mittels RT-PCR überprüft werden. Laut persönlicher Mitteilung von Piet Borst und Peter Wielinga beruht der *Mrp5-Knockout* auf Fehlfaltung und schnellem Abbau mutierten *Mrp5*-Proteins. Der Nachweis der *Mrp5*-Defizienz konnte deshalb nur durch *Westernblot* mit *Mrp5*-spezifischen Antikörpern erbracht werden (Riemer, 2003).

Um zu überprüfen, welche *Mrps* in APK aus Mäusen vorkommen, wurde versucht, mittels RT-PCR mit spezifischen *Primern* für *Mrp1-7* und *Mrp9* deren mRNA nachzuweisen. Die Ergebnisse, die in vorliegender Arbeit für *Mrp1-6* an FVB/N Mäuse gewonnen wurden, decken sich vollständig mit den für NMRI-Mäuse (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002a) erhaltenen. Maus-APK enthält mRNA von *Mrp1* sowie *Mrp3* bis *Mrp6*, wobei die Banden von *Mrp3* und *Mrp6* schwach ausfallen. *Mrp7* und *Mrp9* wurden von Hirrlinger *et al.* (2002a) nicht untersucht, die mRNA beider ist aber in APK aus FVB/N-Mäusen nachweisbar (s.o.). Die mRNA beider Proteine kommt nach den Untersuchungen in dieser Arbeit sowohl im Gesamthirn als auch in der Leber vor, jedoch waren die spezifischen Banden nach RT-PCR im Falle der Leber deutlich schwächer. Dies deckt sich bei *Mrp9* teilweise mit den Untersuchungen von Shimizu *et al.* (2003), die mittels RT-PCR die mRNA von *Mrp9* zwar im Gehirn aber nicht in der Leber nachweisen konnten. *Mrp2*-mRNA, die mRNA des zweiten potenziellen Glutathiontransporters aus der MRP-Familie (Fernández-Checa *et al.*, 1992; Nishida *et al.*, 1992; Paulusma *et al.*, 1999), konnte mittels RT-PCR weder in APK noch im Gesamthirn nachgewiesen werden, was sich mit Berichten anderer Autoren deckt (Kool *et al.*, 1997, 1999b; Kuo *et al.*, 1998; Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002a). Da die verwendeten spezifischen *Primer* für *Mrp2* und *Mrp6* nach RT-PCR deutliche Amplifikate mit cDNA aus Mausleber ergeben hatten, konnte davon ausgegangen werden, dass der fehlende bzw. schwache Nachweis dieser beiden *Mrps* in APK und Gehirn nicht auf mangelhafte *Primer* zurückzuführen war, sondern auf vollständige bzw. nahezu vollständige Abwesenheit der entsprechenden mRNAs. Riemer (2003) konnte bei APK aus FVB/N-Mäusen mittels RT-PCR das gleiche mRNA-Profil für *Mrp1-7* und 9 zeigen und mittels semiquantitativer RT-PCR mit dem *LightCycler*-System mRNA von *Mrp1*, *Mrp4* und *Mrp5* nachweisen.

4.2 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Knockout-Mäusen

Der Vergleich der Ergebnisse der RT-PCR mit cDNA aus Mrp1-*Knockout*-Maus-APK auf alle acht Mrps mit den entsprechenden Ergebnissen der RT-PCR aus Wildtyp-APK zeigte das erwartete Verschwinden der spezifischen Mrp1-Bande beim *Knockout*. Stattdessen war eine neue Bande bei etwa 350 bp zu erkennen, deren Ursache unbekannt ist. Möglicherweise kann auch beim *Knockout* eine kürzere defekte Mrp1-mRNA transkribiert werden, die dieses verkürzte Amplifikat verursacht; oder die Abwesenheit des spezifischen Ziels der *Primer* führt zur Amplifikation eines unspezifischen Produktes. Auch Riemer (2003) konnte mittels RT-PCR in mRNA aus APK von Mrp1-*Knockout*-Mäusen keine Mrp1-mRNA nachweisen. Mittels semi-quantitativer RT-PCR mit dem *LightCycler*-System konnte eine geringe mRNA-Konzentration mit den eigentlich Mrp1-spezifischen Primern gemessen werden (Riemer, 2003), jedoch war diese wie die in vorliegender Arbeit gefundene Bande nicht spezifisch. Die Bande von Mrp3 war nach RT-PCR aus Mrp1-*Knockout*-Maus-APK im Vergleich zum Wildtyp schwächer ausgeprägt. Da Einzelzell-PCR-Experimente gezeigt haben, dass kortikale Astrocyten kein Mrp3 enthalten (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2005), ist der wahrscheinlichste Grund für die unterschiedlich starke Ausprägung, dass Astrocyten kein Mrp3 enthalten und der Nachweis auf unterschiedlich starke Kontamination der APK mit anderen, Mrp3-enthaltenden Zellen zurückzuführen ist. Für die Anwesenheit von Mrp3-mRNA im Gehirn spricht deren deutlicher Nachweis mittels RT-PCR in cDNA aus Gesamthirn, so dass potenziell APK-kontaminierende Zelltypen, die Mrp3 enthalten, mit hoher Wahrscheinlichkeit im Gehirn vorkommen.

Aufbauend auf den Vorexperimenten zum Glutathionefflux an APK aus NMRI-Mäusen wurden nun APK aus FVB/N-Mäusen als Referenz für Ergebnisse aus APK der beiden *Knockout*-Stämme untersucht und bezüglich des Glutathioneffluxes charakterisiert. Wie auch schon bei APK aus NMRI-Mäusen war qualitativ kein Unterschied zu den von Hirrlinger *et al.* (2002c) an Ratten gewonnenen Daten zu erkennen. Im Vergleich zu APK aus NMRI-Mäusen überraschte jedoch, dass die Ergebnisse sogar besser mit denen aus Ratten-APK (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c) übereinstimmten. Im Verlauf von 6 h wurde etwas mehr GSx exportiert, fast 50 % des Gesamtglutathions - so wie bei Ratten-APK (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c). Dies ist etwas weniger als die von Riemer (2003) gemessenen 58 %, jedoch ist die Abweichung innerhalb der Standardabweichung. Ebenso wie bei Ratten-APK (Hirrlinger *et al.*, 2001; Hirrlinger, 2002) wurde bei Anwendung des Dauerstressmodells innerhalb von 45 min etwa 50 % des Gesamtglutathions als GSSG ins Medium exportiert, doppelt so viel wie

4 Diskussion

bei APK aus NMRI-Mäusen (vorliegende Arbeit) und dreimal so viel wie von Riemer (2003) an APK aus dem selben Mausstamm gefunden. Im Gegensatz zu APK aus NMRI-Mäusen war nach Erreichen der Peroxidgleichgewichtskonzentration ein leichter Abfall der intrazellulären Konzentration oxidierten Glutathions festzustellen, jedoch nicht so stark wie bei Ratten-APK (Hirrlinger *et al.*, 2001; Hirrlinger, 2002). Diese Beobachtung war auch im Falle des prozentualen intrazellulären GSSG-Anteils zu machen. Dieser blieb bei APK aus FVB/N-Mäusen nach Erreichen der Peroxidgleichgewichtskonzentration in etwa konstant, nahm also wiederum eine Mittelposition zwischen APK aus NMRI-Mäusen (leichter Anstieg) und Ratten-APK (leichter Abfall; Hirrlinger *et al.*, 2001; Hirrlinger, 2002) ein. Riemer (2003) stellte in vergleichbaren Experimenten an APK aus FVB/N-Mäusen ebenfalls einen leichten Abfall der intrazellulären GSSG-Konzentration nach Erreichen der Peroxidgleichgewichtskonzentration fest, jedoch stieg der prozentuale intrazelluläre GSSG-Anteil etwas an.

Unter Beachtung der Standardabweichungen ähnelt die Kurve der Abhängigkeit des Glutathioneffluxes von der Mk571-Konzentration bei APK aus FVB/N-Mäusen jedoch eher der von APK aus NMRI-Mäusen als der aus Ratten. So ist in beiden Fällen die maximale Effluxgeschwindigkeit im Verhältnis zur Kontrolle geringer als bei Ratten-APK (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c), ebenso wie die Mk571-Konzentration, bei der wieder die in Abwesenheit von Mk571 (Abb. 3) erreichte Geschwindigkeit gemessen wird. Auf Grund der qualitativen Übereinstimmung der präsentierten Ergebnisse mit den von Hirrlinger *et al.* (2002c) an Ratten-APK gewonnenen war sichergestellt, dass die in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Methoden auch an Maus-APK vergleichbare Ergebnisse liefern. Somit war es möglich, die Resultate von Hirrlinger *et al.* (2002c) mit Hilfe von APK aus *Knockout*-Mäusen sinnvoll zu ergänzen. Die Abhängigkeit der Glutathioneffluxgeschwindigkeit von der Mk571-Konzentration bei APK aus FVB/N-Mäusen wurde auch von Riemer (2003) untersucht und stimmt gut mit der in vorliegender Arbeit gefundenen überein.

Die Ergebnisse an APK aus *Mrp1-Knockout*-Mäusen bestätigten klar die Beteiligung von *Mrp1* am Glutathionefflux im von Hirrlinger *et al.* (2001) und Hirrlinger *et al.* (2002c) für Ratten-APK beschriebenen Ausmaß und stimmen mit den von Riemer (2003) gewonnenen überein. Nach 6 h war wesentlich weniger GSx im Medium über APK aus *Mrp1-Knockout*-Mäusen messbar als bei Medium über APK aus Wildtyp-Mäusen. Auch konnte nach 6 h keinerlei oxi-

4.2 Glutathionefflux aus astrogliareicher Primärkultur von Knockout-Mäusen

diertes Glutathion im Medium nachgewiesen werden. Bei Anwendung des Dauerstressmodells zeigte sich, dass APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen kein oxidiertes Glutathion exportieren können. Somit liegt die Vermutung nahe, dass oxidiertes Glutathion, das im Medium über APK aus NMRI- oder FVB/N-Wildtyp-Mäusen gefunden wurde, exportiert und nicht, wie oben alternativ diskutiert, extrazellulär oxidiert wurde. Dieser Schluss könnte jedoch voreilig sein. Die im Falle von APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen exportierte Gesamtglutathionmenge ist nämlich so gering, dass bei zum Wildtyp identischem Anteil an oxidiertem Glutathion dessen absolute Menge sehr wohl unterhalb der Messgrenze liegen könnte. Der fehlende GSSG-Export bei APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen führt außerdem zu einem gegenüber dem Wildtyp erhöhten intrazellulären GSSG-Anteil von bis zu über 70 % im Dauerstressmodell. Dies ergibt ein für die Aufrechterhaltung von Proteinthiolgruppen deutlich ungünstigeres Thioredoxpotenzial als beim Wildtyp, jedoch konnte im Rahmen vorliegender Arbeit eine erhöhte Empfindlichkeit von APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen gegenüber oxidativem Stress und damit die Schädlichkeit dieses ungünstigen Thioredoxpotenzials nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Konzentration des Mrp1-Inhibitors Mk571 hatte in Mrp1-*Knockout*-APK keinerlei Einfluss auf die Glutathionexportgeschwindigkeit. Dies zeigte eindeutig, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen Mrp1 der einzige von Mk571 beeinflusste Glutathiontransporter ist und Mrp1 vollständig durch Mk571 hemmbar ist. APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen waren somit perfekt geeignet, weitere Untersuchungen zu potenziellen anderen Glutathiontransportern durchzuführen.

Die Untersuchungen an APK aus Mrp5-*Knockout*-Mäusen zeigten ebenso wie bei Riemer (2003) keinen qualitativen Unterschied zum Wildtyp in den drei durchgeführten Experimenttypen. Alle quantitativen Unterschiede lagen innerhalb der Standardabweichungen oder der natürlichen Variabilität des entsprechenden Experimenttyps. Innerhalb von 6 h wurde in etwa der gleiche Prozentsatz an GSx exportiert. Die Anwendung des Dauerstressmodells zeigte identische Anteile von GSSG am Gesamtglutathion im Medium nach 45 min; in beiden Fällen war kaum extrazelluläres reduziertes Glutathion nachzuweisen. Die Glutathioneffluxgeschwindigkeiten unter Einfluss von Mk571 (50 μ M) waren bei Wildtyp und den beiden *Knockouts* praktisch identisch, so dass Mrp5 unter den gewählten experimentellen Bedingungen wahrscheinlich keine Rolle beim Glutathionefflux spielt. Dies widerspricht einer Publikation, in der Transport von reduziertem Glutathion durch Mrp5 an *inside-out*-Vesikeln gezeigt wurde (Ballatori *et al.*, 2005).

4 Diskussion

Da die hier gezeigten Versuche an Primärkulturen aber sicherlich näher an der *in vivo*-Situation sind, spielt Mrp5 vermutlich im Gewebe keine oder nur eine äußerst geringe Rolle beim Glutathionefflux.

4.3 Weitere potenzielle Glutathiontransporter

Aus der Literatur war bekannt, dass auch organische Anionentransportproteine (OATPs) Glutathion transportieren können (Li *et al.*, 1998, 2000). Die mRNAs von Oatp1 und Oatp2 konnten mittels RT-PCR (vorliegende Arbeit) und semiquantitativer RT-PCR mit dem *LightCycler*-System (Riemer, 2003) in Maus-APK nachgewiesen werden. Da es sich bei einigen OATPs um Antiporter handelt (Li *et al.*, 2000), sollte - falls OATPs unter den gewählten Versuchsbedingungen Glutathion transportieren können - die Zugabe bekannter OATP-Substrate ins Medium den Glutathionefflux verstärken. Deshalb wurden mehrere dieser bekannten OATP-Substrate (Reichel *et al.*, 1999; Russel *et al.*, 2002) in dieser Arbeit auf eine Beeinflussung der Glutathionexportgeschwindigkeit überprüft. Jedoch beeinflusste, mit Ausnahme von 1 mM Taurocholat (Abb. 5), keines dieser Substrate den Glutathionefflux signifikant. Die Bedeutung des Effektes des Taurocholats ist allerdings fragwürdig, da es sich um eine unphysiologisch hohe Konzentration handelt (Kramer *et al.*, 1979), bei der die konjugierte Gallensäure wahrscheinlich bereits als Detergenz wirkt und die Membrandurchlässigkeit erhöht. In einer Konzentration von 10 mM lysierte Taurocholat APK nämlich vollständig (Daten nicht gezeigt). Somit ist zu bezweifeln, dass der verstärkte Glutathionefflux bei Einsatz von 1 mM Taurocholat Oatp-vermittelt ist. Als OATP-Inhibitor wurde Probenecid (Abb. 4) eingesetzt. Probenecid ist ein recht unspezifischer Transportinhibitor, der viele verschiedene Transporter beeinflusst, unter anderem auch OATPs (Russel *et al.*, 2002), Mrp4 (van Aabel *et al.*, 2005) und Mrp5 (Wielinga *et al.*, 2003). Probenecid beeinflusste aber in den hier durchgeführten Experimenten die Glutathioneffluxgeschwindigkeit nicht. Andere OATPs wurden als Cotransporter beschrieben (Briz *et al.*, 2006), jedoch konnte kein Transport von Glutathion mit Gallensäuren nachgewiesen werden (Mahagita *et al.*, 2007). Aus diesen Gründen ist sehr unwahrscheinlich, dass Oatps unter den gewählten Versuchsbedingungen am Glutathionefflux beteiligt sind.

4.3 Weitere potenzielle Glutathiontransporter

Auch der Cystische-Fibrose-Transmembranleitfähigkeitsregulator (CFTR) wurde als Glutathiontransporter beschrieben (Linsdell und Hanrahan, 1998; Kogan *et al.*, 2003). Er gehört zusammen mit den Mrps in die C-Klasse der ATP-Bindungskassettenproteine (Übersicht siehe Dean, 2002). Glibenclamid (Abb. 2), ein als CFTR-Inhibitor wirkendes Sulfonylharnstoffderivat (Yamazaki und Hume, 1997), beeinflusste die Glutathioneffluxgeschwindigkeit nicht, so dass auch CFTR mit hoher Wahrscheinlichkeit unter den gewählten Bedingungen kein Glutathion exportiert. CFTR wird auch von 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat (NPPB, Abb. 3) inhibiert (Zhang *et al.*, 2000b), jedoch blockiert diese Substanz auch andere Transporter und Poren (Schultheiss und Diener, 1998; Eskandari *et al.*, 2002). Da NPPB die Glutathioneffluxgeschwindigkeit signifikant reduzierte, Glibenclamid aber nicht, ist möglicherweise ein anderer Transporter, der ebenfalls von NPPB gehemmt wird, am Glutathionefflux beteiligt (s.u.: Connexone).

Unter den von Astrocyten freigesetzten niedermolekularen Stoffen befindet sich auch der Neurotransmitter Glutamat (Vesce *et al.*, 2007). Da dieser excitotoxische Wirkung hat, ist seine Freisetzung von besonderem Interesse. Von Ye *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass sowohl Glutamat als auch Aspartat von Astrocyten über *Gap-Junction*-Halbkanäle (Connexone) freigesetzt werden können. Da auch Glutathion ein Kleinmolekül ist und zu vermuten war, dass der Connexonvermittelte Transport sehr unspezifisch ist, war es wahrscheinlich, dass über diesen Transportweg auch Glutathion exportiert werden kann. Connexone sind Hexamere (Goodenough und Paul, 2003), deren Protomere der Connexin-Familie angehören (Goodenough und Paul, 2003). Das häufigste Connexin in Astrocyten ist Connexin 43 (Sáez *et al.*, 2003).

Von Halbkanälen war bekannt, dass ihre Öffnungswahrscheinlichkeit von der extrazellulären Konzentration divalenter Kationen abhängt (Sáez *et al.*, 2003): Je niedriger die Konzentration, desto höher die Öffnungswahrscheinlichkeit und damit der Anteil der offenen Halbkanäle (Sáez *et al.*, 2003). Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde festgestellt, dass APK bei Inkubation ohne divalente Kationen oder mit divalenten Kationen in geringen Konzentrationen schnell große Mengen Glutathion exportiert. Dieser schnelle Export ließ sich durch Einstellung einer ausreichenden Konzentration an Ca^{2+} sofort unterbinden. Auch mittels Zugabe von Ba^{2+} , Sr^{2+} oder Mg^{2+} ließ sich die Exportgeschwindigkeit drastisch reduzieren, jedoch waren höhere Konzentrationen notwendig als bei Ca^{2+} . Dies deckt sich mit den von Ye *et al.* (2003) (für Glutamat

4 Diskussion

und Aspartat) und Rana und Dringen (2007) (für Glutathion an Rattenastrogliazellen) publizierten Transportcharakteristiken von Connexonen unter Einfluss von Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} oder Mg^{2+} . Die gefundenen Konzentrationen an den Wendepunkten der Konzentrationsabhängigkeiten der Glutamatfreisetzung stimmten mit ca. $40 \mu\text{M}$, 0.9 mM , $300 \mu\text{M}$ und $400 \mu\text{M}$ für Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} bzw. Ba^{2+} (geschätzt aus Abb. 2c, Ye *et al.*, 2003) im Rahmen der Mess- und Abschätzgenauigkeit mit denen in dieser Arbeit für die Freisetzung von Glutathion gefundenen ($75 \mu\text{M}$, 1.2 mM , $420 \mu\text{M}$ und $475 \mu\text{M}$ für Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} bzw. Ba^{2+} , Abb. 27) sehr gut überein. Auch der von Rana und Dringen (2007) berichtete Wert von $107 \mu\text{M}$ für Ca^{2+} ist nahezu identisch. Diese Übereinstimmung legt den Schluss nahe, dass für den in vorliegender Arbeit gefundenen Glutathionefflux bei Abwesenheit divalenter Kationen dasselbe Transportsystem verantwortlich ist wie bei Ye *et al.* (2003) für Glutamat bzw. bei Rana und Dringen (2007) für Glutathion an Rattenastrocyten. Mit hoher Wahrscheinlichkeit bilden Connexone dieses Transportsystem (Rana und Dringen, 2007).

Für *Gap-Junctions* und Connexone sind mehrere Klassen von Inhibitoren bekannt. Chinin inhibiert manche Connexine, jedoch nicht alle (Malchow *et al.*, 1994; White *et al.*, 1999; Spray *et al.*, 2002). Chinin und Chinidin blockierten die spannungssensitive Kalium- und Natriumleitfähigkeit in Horizontalzellen aus Rochen (Malchow *et al.*, 1994), jedoch induzierten diese Stoffe einen großen, langsamen, auswärtsgerichteten Stromfluss bei Depolarisation der Zellen über 0 mV , der Connexonen zugeschrieben wird (Malchow *et al.*, 1994). Connexin 43 wird von Chinin nicht beeinflusst (White *et al.*, 1999). Bei einem Vorversuch im Rahmen vorliegender Arbeit konnte auch kein Einfluss von Chinin auf die Geschwindigkeit des Glutathioneffluxes festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Auch Fenamate können den Transport durch *Gap-Junctions* und Connexone blockieren (Gögelein *et al.*, 1990; Harks *et al.*, 2001; Eskandari *et al.*, 2002). Flufensäure, Niflumsäure und Meclofensäure unterbinden in normalen Rattennierenfibroblasten die *Gap-Junction*-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation (Harks *et al.*, 2001). In vorliegender Arbeit wurde Flufensäure (FFA, Abb. 2) als Vertreter dieser Gruppe eingesetzt. Allerdings variierte der Einfluss dieses Inhibitors zwischen einzelnen Experimenten sehr; im Durchschnitt wurde die Glutathionexportgeschwindigkeit auf 60% der Kontrolle reduziert. Deshalb kann aus den Ergebnissen vorliegender Arbeit keine definitive Aussage über das Ausmaß der Inhibition durch FFA getroffen werden. Bei Ye

4.3 Weitere potenzielle Glutathiontransporter

et al. (2003) konnte FFA den Glutamatefflux auf ca. 30 % der Kontrolle reduzieren, bei Rana und Dringen (2007) war die Inhibition mit FFA genauso stark wie mit 1.8 mM Ca^{2+} . Der variable Einfluss von FFA im Rahmen vorliegender Arbeit könnte auf Variabilität unbekannter Ursache in der Connexinausstattung der benutzten Zellkulturen beruhen. Jedoch weist die Tatsache, dass Inhibition zu beobachten war, auf eine Beteiligung von einem durch Flufensäure blockierbaren Transporter hin, vermutlich einem Connexon. Auch NPPB ist ein Fenamatderivat und inhibiert *Gap-Junctions* und Connexone (Eskandari *et al.*, 2002; Spray *et al.*, 2002); es wurde im Rahmen vorliegender Arbeit jedoch nicht als Connexoninhibitor eingesetzt.

Eine weitere Inhibitorklasse stellen höhere Alkohole dar (Johnston *et al.*, 1980; Spray *et al.*, 2002). Elektrische (*Gap-Junction*-vermittelte) Synapsen an Flusskrebbsriesenaxonen konnten durch verschiedene höherwertige Alkohole (z.B. Hexanol, Heptanol und Octanol) entkoppelt werden (Johnston *et al.*, 1980). Ye *et al.* (2003) stellten fest, dass der von ihnen beobachtete Glutamatefflux durch Hexanol schwach und durch Heptanol oder Octanol stark hemmbar war. Im Rahmen vorliegender Arbeit gelang es auf Grund stark variierender Ergebnisse zwischen einzelnen Versuchen jedoch nicht, schlüssige Aussagen zum Einfluss dieser Alkohole auf den beobachteten Glutathionefflux zu treffen.

Eine in der Literatur oft beschriebene Klasse von *Gap-Junction*- und Connexon-Inhibitoren sind Metabolite und Derivate der Glycyrrhizinsäure, z.B. Glycyrrhetinsäuren und deren synthetisches Analogon Carbenoxolon (Abb. 1) (Davidson *et al.*, 1986; Eskandari *et al.*, 2002; Spray *et al.*, 2002). In einem System zur Bestimmung der *Gap-Junction*-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation durch Einbau von ^{14}C -Citrullin als ^{14}C -Arginin in Proteine in einer Cokultur von Argininosuccinatsynthetase-defizienten Fibroblasten und Argininosuccinatyase-defizienten Fibroblasten wurde gezeigt, dass 18α -Glycyrrhetinsäure (AGA, Abb. 2), 18β -Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon die Kommunikation nahezu vollständig unterbinden (Davidson *et al.*, 1986). In vorliegender Arbeit wurden AGA und Carbenoxolon als Vertreter dieser Inhibitorklasse eingesetzt. AGA reduzierte die Glutathioneffluxgeschwindigkeit in ähnlichem Umfang wie Flufensäure, die drastische Reduktion bis auf 20 % der Kontrolle, die Ye *et al.* (2003) für den Glutamatexport fanden, konnte allerdings nicht erreicht werden. Mit Carbenoxolon gelang es in vorliegender Arbeit, die Glutathioneffluxgeschwindigkeit auf ca. 20 % zu reduzieren, was gut mit den von Ye *et al.* (2003) gefundenen 30 % für Glutamat übereinstimmt. Auch Rana und

4 Diskussion

Dringen (2007) konnten starke Inhibition durch Carbenoxolon beobachten, ebenso stark wie mit 1.8 mM Ca^{2+} . Dies sind weitere Hinweise darauf, dass dasselbe Transportsystem für den Glutathionefflux und den von Ye *et al.* (2003) gefundenen Glutamatefflux verantwortlich ist, wie nachfolgend diskutiert wird.

Um die durch die Abhängigkeit der Glutathioneffluxgeschwindigkeit von der Konzentration divalenter Kationen und die Inhibitorstudien gewonnenen Erkenntnisse weiter zu untermauern, sollten im Rahmen vorliegender Arbeit Kulturen aus Connexin 43-*Knockout*-Mäusen untersucht werden. Wie im Ergebnisteil ausgeführt (Abschnitt 3.4.2.2) konnten jedoch keine Kulturen homozygoter *Knockout*-Mäuse gewonnen werden. Wildtyp und heterozygoter *Knockout* zeigten keinen Unterschied in der Empfindlichkeit der Geschwindigkeit des Glutathioneffluxes gegenüber Ca^{2+} oder Connexininhibitoren. Somit kann ein dominant negativer Einfluss des Ausschaltens von Connexin 43 auf den untersuchten schnellen Glutathionefflux in Abwesenheit divalenter Kationen ausgeschlossen werden. Über rezessive Phänomene können mangels Resultaten aus homozygoten *Knockout*tieren keine Aussagen getroffen werden.

Zieht man jedoch die Möglichkeit eines Gen-Dosis-Effektes in Betracht, gibt es drei Erklärungsmöglichkeiten für den fehlenden Unterschied in der Glutathioneffluxgeschwindigkeit zwischen Wildtyp-Mäusen und heterozygoten *Knockout*-Tieren. Die erste Möglichkeit besteht darin, dass Connexin 43 nicht am schnellen Glutathionefflux in Abwesenheit divalenter Kationen beteiligt ist. Die zweite Möglichkeit ist, dass eine geringere Connexin 43-Konzentration durch Hochregulation anderer Connexine ausgeglichen wird. Die dritte Möglichkeit ist, dass die Expression von Connexin 43 keinem Gen-Dosis-Effekt unterliegt. Da die meisten Connexininhibitoren nicht spezifisch bezüglich eines einzigen Connexins sind (persönliche Mitteilung von C. Giaume an B. Hamprecht), ist es anhand der in vorliegender Arbeit gewonnenen Erkenntnisse schwer, diese Möglichkeiten gegeneinander abzuwägen.

Im Rahmen vorliegender Arbeit wurden gute Hinweise dafür gefunden, dass dem schnellen Glutathionefflux bei Abwesenheit divalenter Kationen und dem von Ye *et al.* (2003) gefundenen Glutamat- und Aspartatefflux derselbe Transportprozess zu Grunde liegt. Ye *et al.* (2003) postulierten, dass Connexone die molekulare Grundlage für diesen Transportprozess bilden. Jedoch ist die Präsenz funktionaler Connexone *in vivo* umstritten (Spray *et al.*, 2006). So zeigt

4.4 Nicht von Mrp1 vermittelter Glutathionefflux

auch der Transport durch eine vom purinaktivierten P2X₇-Rezeptor vermittelte Pore das gleiche Inhibitionsprofil (Suadicani *et al.*, 2006) und dieser Transport wird für die Freisetzung von ATP (Suadicani *et al.*, 2006) bzw. Glutamat und Aspartat (Duan *et al.*, 2003) aus Astrocyten verantwortlich gemacht. Die Anwesenheit des P2X₇-Rezeptors bzw. seiner mRNA in Astrocyten wurde schon früher mittels RT-PCR (Kukley *et al.*, 2001; Fumagalli *et al.*, 2003), Immunfluoreszenz (Kukley *et al.*, 2001) und *Westernblot* (Fumagalli *et al.*, 2003) gezeigt. Somit kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die von diesem Rezeptor vermittelte Pore für den hier beobachteten Glutathionefflux verantwortlich ist. Allerdings haben Rana und Dringen (2007) unter ähnlichen Versuchsbedingungen an Rattenastrogliazellen gezeigt, dass der P2X₇-Rezeptor-Inhibitor Brilliantblau G (Jiang *et al.*, 2000) den Glutathionefflux bei Entzug divalenter Kationen nicht beeinflusst. Es gibt Hinweise darauf, dass auch andere nicht durch Brilliantblau G beeinträchtigte purinaktivierte Rezeptoren Poren bilden können, die Glutamatefflux erlauben (Fellin *et al.*, 2006). Jedoch ist unbekannt, ob diese durch *Gap-Junction*- oder Connexoninhibitoren beeinflusst werden. Auf Grund dieser Belege ist es sehr wahrscheinlich, dass der in dieser Arbeit gefundene schnelle Glutathionefflux in Abwesenheit divalenter Kationen durch Connexone vermittelt wird - wenn auch nicht notwendigerweise durch Connexin 43-Connexone.

4.4 Nicht von Mrp1 vermittelter Glutathionefflux

Vor Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass verschiedene Zelltypen und Gewebe Glutathion freisetzen (Ballatori *et al.*, 2005), unter anderem auch Astrocyten (Yudkoff *et al.*, 1990; Sagara *et al.*, 1996; Dringen *et al.*, 1997a; Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c). Außerdem war durch Studien mit dem Inhibitor Mk571 (Abb. 3) bekannt, dass etwa 60 % dieses Transports vom ABC-Transporter Mrp1 vermittelt wird (Hirrlinger, 2002; Hirrlinger *et al.*, 2002c). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Resultate an Hand von APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen. Sie ermöglichten es, Transporter auf eine Beteiligung an den restlichen ca. 40 % des Glutathioneffluxes zu untersuchen, ohne eine Verfälschung der Ergebnisse durch den von Hirrlinger (2002) und Hirrlinger *et al.* (2002c) eingesetzten Mrp-Inhibitor Mk571 in Betracht ziehen zu müssen.

4 Diskussion

Im Bereich der Mrps wurde außer Mrp1 auch Mrp2, 3, 4 und 5 eine Beteiligung am Glutathiontransport zugeschrieben (zur Übersicht siehe Ballatori *et al.*, 2005). Maushirn und einzelne Mausastrocyten enthalten keine mRNA von Mrp2 (Hirrlinger *et al.*, 2005) und auf immunocytochemischem Weg konnte im menschlichem Gehirn kein Mrp2 nachgewiesen werden (Nies *et al.*, 2004). Dies legt nahe, dass Mrp2 im Gehirn nicht exprimiert wird und somit eine Beteiligung von Mrp2 am Glutathionexport aus Astrocyten mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann. Mrp3 und Mrp4 werden durch Mk571 beeinflusst (Bodó *et al.*, 2003; Rius *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mk571 bei APK aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen die Glutathioneffluxgeschwindigkeit nicht beeinflusst. Deshalb kann auch eine Beteiligung dieser beiden Transporter am Glutathionefflux mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass der Glutathionefflux in APK aus Mrp5-*Knockout*-Mäusen sich nicht von dem in APK aus Wildtypmäusen unterscheidet, so dass auch eine Beteiligung von Mrp5 am restlichen Glutathionefflux unwahrscheinlich ist.

Menschliches MRP6 ist hochgradig homolog zu MRP1 (Kool *et al.*, 1999b) und transportiert Glutathionkonjugate wie LTC₄ (Belinsky *et al.*, 2002; Iliás *et al.*, 2002). Transport von Glutathion konnte nicht nachgewiesen werden, was jedoch möglicherweise auf mangelnde Empfindlichkeit der Nachweismethode zurückzuführen war (Iliás *et al.*, 2002). In Mäusen wurden bisher keine Untersuchungen zu Substraten von Mrp6 durchgeführt (Bergen *et al.*, 2007), jedoch transportiert Mrp6 aus Ratte kein LTC₄ (Madon *et al.*, 2000). Im Rahmen vorliegender Arbeit konnte mittels RT-PCR nur eine schwache Bande für Mrp6 in APK oder Gesamthirn nachgewiesen werden, Nies *et al.* (2004) fanden im Rahmen der Detektionsempfindlichkeit keine MRP6-mRNA in Proben aus verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns. Im Lichte dieser Ergebnisse erscheint eine Beteiligung von Mrp6 am Glutathionefflux aus Astrocyten eher unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Zu den Transportcharakteristika von Mrp7-9 ist wenig bekannt. Mrp7 nimmt strukturell eine Zwischenposition ein zwischen den anderen Mrps mit drei Transmembrandomänen (Mrp1-3 und 6) und den Mitgliedern der Abcc-Familie, die nicht den Mrps zugeordnet werden (CFTR und die Sulfonylharnstoffrezeptoren) (Chen *et al.*, 2003; Kruh *et al.*, 2007). Transport von unkonjugiertem Glutathion durch Mrp7 wurde bisher nicht beschrieben, langsamer Transport von LTC₄ durch menschliches MRP7 jedoch wurde gezeigt (Chen *et al.*, 2003). Im Rahmen vorlie-

4.4 Nicht von *Mrp1* vermittelter Glutathionefflux

gender Arbeit wurde die mRNA von *Mrp7* in APK und Gesamthirn nachgewiesen, was sich mit den Ergebnissen von Hopper *et al.* (2001) für menschliches MRP7 im Gesamthirn deckt. Deshalb ist es auf Grund der Ähnlichkeit zu bekannten Glutathiontransportern durchaus möglich, dass *Mrp7* am Glutathionefflux beteiligt ist. Die Transportcharakteristika von MRP8 im Menschen ähneln denen von MRP4 und MRP5, mit denen es strukturell die größten Ähnlichkeiten aufweist (zur Übersicht siehe Kruh *et al.*, 2007). Jedoch kann eine Beteiligung am Glutathionexport in Maus-APK ausgeschlossen werden, da es kein Ortholog zu MRP8 im Mausgenom gibt (Shimizu *et al.*, 2003). In anderen Spezies kann eine Beteiligung von MRP8 am Glutathionefflux gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden. MRP9 und MRP8 ähneln sich stark und sind vermutlich aus einer Genverdopplung hervorgegangen (Yabuuchi *et al.*, 2001; Kruh *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu MRP8 existiert jedoch ein Mausortholog zu MRP9 (Shimizu *et al.*, 2003), dessen mRNA im Gehirn nachgewiesen werden konnte (vorliegende Arbeit; Shimizu *et al.*, 2003). Da bisher keine Untersuchungen zu Transportsubstraten von *Mrp9* publiziert wurden - ähnlich wie bei *Mrp7* - kann derzeit eine Beteiligung am Glutathiontransport nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Gen, das der ABCC-Familie zugeordnet werden kann, ABCC13, wurde im menschlichen Genom identifiziert (Yabuuchi *et al.*, 2002) und hat ein Ortholog in Maus und Ratte (Annilo und Dean, 2004). Trotz der Ähnlichkeiten zu anderen Mrps (Annilo und Dean, 2004) wurde bisher kein als Transporter funktionales Genprodukt von *Abcc13* publiziert. Potenzielle Translationsprodukte gefundener mRNAs ergeben nur sehr kurze Proteine, so dass *Abcc13* gegenwärtig als degeneriertes Pseudogen klassifiziert wird (Annilo und Dean, 2004). Somit ist nahezu mit Sicherheit auszuschließen, dass ABCC13 am Glutathionexport beteiligt ist.

Ebenfalls zur C-Familie der ABC-Transporter gehören der Cystische-Fibrose-Transmembranleitfähigkeitsregulator (CFTR, ABCC7) und die Sulfonylharnstoffrezeptoren SUR1 und SUR2 (ABCC8 und ABCC9). Wie bereits oben diskutiert, kann CFTR laut Literatur auch Glutathion transportieren (Linsdell und Hanrahan, 1998; Kogan *et al.*, 2003). Für SUR1 und SUR2 konnte keine Literatur zum Transport von Glutathion gefunden werden. Neben CFTR (Yamazaki und Hume, 1997) werden auch SUR1 (Gribble *et al.*, 1997) und (schwach) SUR2 (Inagaki *et al.*, 1996) von Glibenclamid (Abb. 2) beeinflusst. Da in vorliegender Arbeit gezeigt wurde, dass Glibenclamid die Glutathionexportgeschwindigkeit nicht beeinflusst, kann somit zumindest SUR1

4 Diskussion

mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht am restlichen Glutathionefflux beteiligt sein. Bei SUR2 ist - falls die Sulfonylharnstoffrezeptoren überhaupt Glutathion transportieren - eine Beteiligung nicht ganz auszuschließen, da eine geringe Beeinflussung durch Glibenclamid unterhalb der Detektionsgrenze gelegen haben könnte.

Wie bereits oben diskutiert ist es sehr unwahrscheinlich, dass OATPs am Glutathionefflux beteiligt sind. Verwandt mit der Familie der OATPs (Slc21 bzw. SLCO) ist die der OATs (Slc22), die sich durch ein zu OATPs und MRPs ähnliches Substratspektrum auszeichnet (Übersicht: Russel *et al.*, 2002). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnte keine Publikation zu OAT-vermitteltem Glutathiontransport gefunden werden. Da jedoch die meisten OATs durch Probenecid (Abb. 4) gehemmt werden (Übersicht Russel *et al.*, 2002), kann eine Beteiligung am Glutathiontransport nahezu sicher ausgeschlossen werden.

Die mögliche Funktion der Connexone im Bezug auf den Glutathionefflux in Abwesenheit divalenter Kationen wurde bereits ausführlich diskutiert (s.o.). In physiologischer Umgebung dürfte die extrazelluläre Konzentration divalenter Kationen ausreichen, die Connexone geschlossen zu halten. Keiner der in vorliegender Arbeit eingesetzten Connexoninhibitoren konnte die Glutathioneffluxgeschwindigkeit in Abwesenheit divalenter Kationen unter die bei physiologischer Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration drücken. Unglücklicherweise wurde versäumt, diese Inhibitoren in Anwesenheit divalenter Kationen zu testen, so dass ein additiver Effekt divalenter Kationen und organisch-chemischer Inhibitoren nicht ausgeschlossen werden kann. Ein möglicher Hinweis auf einen solchen additiven Effekt wurde jedoch gefunden, da die potenzielle Beteiligung von CFTR auch mittels NPPB (Abb. 3) untersucht wurde, einem Fenamatderivat, das auch Connexone hemmt (Eskandari *et al.*, 2002). Wie bereits angesprochen, reduzierte NPPB die Glutathioneffluxgeschwindigkeit signifikant, ein möglicher Hinweis auf einen additiven Effekt. Damit ist eine Beteiligung von Connexonen am Restefflux keinesfalls auszuschließen.

Auch kann es möglich sein, dass sich die Mikroumgebung bei pathologischen Vorgängen ändert und die Ca^{2+} -Konzentration soweit absinkt, dass sich Connexone öffnen. Dies würde zum Verlust von Glutathion und anderer wichtiger niedermolekularer Stoffe führen und damit zu einer möglichen Potenzierung der Schädlichkeit der pathologischen Vorgänge.

4.4 Nicht von Mrp1 vermittelter Glutathionefflux

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Connexone unter physiologischen Bedingungen allenfalls geringfügig am Glutathionefflux beteiligt sind; am nicht-Mrp1-vermittelten Restefflux könnte die Beteiligung jedoch erheblich sein.

Eine weitere in Betracht zu ziehende Möglichkeit des Glutathioneffluxes ist die Ausschüttung durch Vesikel. Es ist bekannt, dass Astrocyten Glutamat durch Exocytose ausscheiden können (Malarkey und Parpura, 2008). Für eine exocytotische Ausschüttung von Glutathion konnten zum gegenwärtigen Zeitpunkt in der Literatur nur indirekte Hinweise gefunden werden. So wird in Hefe reduziertes Glutathion (Rebbeer *et al.*, 1998) und werden in Zellen einer menschlichen Lungentumorzelllinie Glutathionkonjugate (van Luyn *et al.*, 1998) in sekretorische Vesikel hineintransportiert. In diesen Publikationen wurde gezeigt, dass Glutathion bzw. die Glutathionkonjugate jedoch von Mrps (bzw. von Yfc1p, dem Hefe-Ortholog zu Mrp1/2) transportiert wurden, was den vesikulären Efflux zu einem indirekten Mrp-vermittelten Efflux machen würde.

Exocytose ist von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig (Katz und Miledi, 1965). Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration mittels Thapsigargin (Abb. 5) und A23187 erhöht. Thapsigargin inhibiert die Ca^{2+} -ATPase des Endoplasmatischen Reticulums und führt dadurch zur Freisetzung von Ca^{2+} ins Cytosol (Thastrup *et al.*, 1987, 1990; Jackson *et al.*, 1988). Das Antibioticum A23187 ist ein Ionophor für divalente Kationen und ermöglicht den Durchtritt von Ca^{2+} und Mg^{2+} durch biologische Membranen (Reed und Lardy, 1972). Sowohl Thapsigargin (siehe Tabelle 4) als auch A23187 (Daten nicht gezeigt) erhöhten die Glutathionfreisetzung aus Maus-APK. Dies lässt es möglich erscheinen, dass Glutathion in Astrocyten auch durch Exocytose freigesetzt wird. Allerdings muss dann ein System existieren, welches Glutathion in exocytotische Vesikel hineintransportiert. Für die in dieser Arbeit diesbezüglich gewonnenen Ergebnisse kann Mrp1 jedoch nicht verantwortlich sein, da die zugehörigen Experimente in Zellkulturen aus Mrp1-defizienten Mäusen durchgeführt wurden. Alle anderen untersuchten Transporter kommen allerdings in Frage, da nicht geklärt ist, ob die verwendeten Inhibitoren den jeweiligen Transporter auch in der Membran intrazellulärer Vesikel beeinträchtigen würden. Somit könnte eine exocytotische Freisetzung von Glutathion durchaus zum Mrp1-unabhängigen Restefflux beitragen.

4 Diskussion

Einen letzten Beitrag zur Glutathionfreisetzung im experimentellen System könnte das nekrotische Absterben einiger weniger Zellen leisten. In vorliegender Arbeit wurde in sämtlichen Experimenten die Zellvitalität mit Hilfe der Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) überprüft (Abschnitt 5.3.4.4). In der Regel war nach 1 bis 6 h Inkubation ein variabler Prozentsatz von 5 - 15 % der gesamten LDH im Medium nachweisbar. Nach 6 h Inkubation von Mrp1-*Knockout*-APK ohne Zusatzstoffe, die den Glutathionefflux beeinflussen könnten, war etwa 10 - 20 % des Gesamtglutathions im Medium nachzuweisen. Auf Grund der hohen Variabilität der LDH-Freisetzung über verschiedene Inkubationszeiten ist es schwer, direkte Vergleiche zwischen den Ausmaßen von LDH- und GSH-Freisetzung zu ziehen. Die Tatsache, dass LDH freigesetzt wird, zeigt jedoch klar, dass einige Zellen nekrotisch sterben. Somit muss eine gewisse Beteiligung nekrotischer Glutathionfreisetzung am Restefflux in Betracht gezogen werden.

Eine Übersicht über die Wege, auf denen Glutathion aus Astrocyten in den Extrazellulärraum gelangen kann, wird in Abb. 32 gegeben. In der Abbildung wird zwischen verschiedenen Kategorien des Austritts von Glutathion unterschieden. Besonders markant dargestellt sind die in vorliegender Arbeit überprüften Wege der Freisetzung.

4.4 Nicht von Mrp1 vermittelter Glutathionefflux

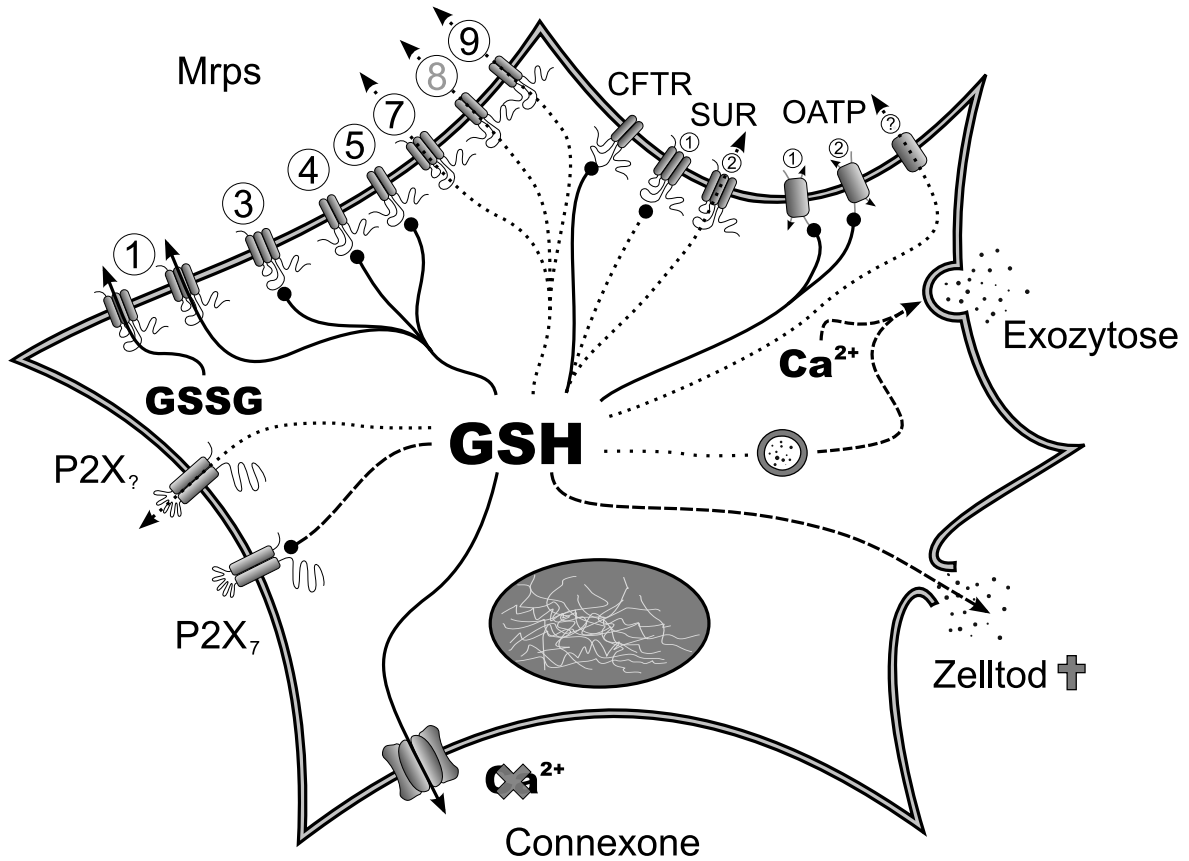


Abb. 32. Zusammenfassung über in Astrocyten realisierte (Linien mit Pfeilenden) und nicht realisierte (Linien mit Punktenden) Glutathioneffluxwege. Dabei wurden die in vorliegender Arbeit überprüften Wege durchgezogen, von anderen Arbeitsgruppen überprüfte Wege oder triviale Wege gestrichelt und spekulative Wege gepunktet dargestellt. Detaillierte Ausführungen finden sich im Text dieses Kapitels (s.o.).

4.5 Ausblick

In diesem Kapitel soll kurz aufgezeigt werden, welche relevanten Ansatzpunkte für eine sinnvolle Fortsetzung der in vorliegender Arbeit durchgeführten Experimente existieren.

Durch die hier vorgestellten Inhibitorstudien konnte kein einzelner Transporter als für den nicht-Mrp1-vermittelten Glutathiontransport in astrogliareicher Primärkultur verantwortlich identifiziert werden. In den vorangegangenen Abschnitten der Diskussion wurden einige Transporter genannt, die aus Mangel an Zeit oder ausreichender Charakterisierung nicht näher untersucht werden konnten. Diese Untersuchung sollte wenn möglich durchgeführt werden. Aus der Familie der Abcc-Transporter wäre eine mögliche Rolle von Mrp6, 7 und 9 sowie von SUR2 zu überprüfen. Auch sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt einige Mitglieder der OATP-Familie nur unzureichend charakterisiert und es ist nicht bekannt, ob es sich bei diesen Transportern um Antiporter handelt. Deshalb könnte es sein, dass die in vorliegender Arbeit gewählte Untersuchungsmethode diese anderen OATPs nicht erfasst hat. Sobald mehr über die Transporteigenschaften dieser Proteine bekannt wird, könnte sich eine Untersuchung lohnen.

Die Identität der am Glutathionefflux aus APK unter Entzug divalenter Kationen beteiligten Connexinisoformen sollte festgestellt werden. Laut Literatur ist in kultivierten Astrogliazellen hauptsächlich Connexin 43 vorhanden, jedoch wurden auch geringe Mengen an Connexin 26, 30, 40, 45 und 46 oder deren mRNAs gefunden (zur Übersicht siehe Rouach *et al.*, 2002). So wäre es von Vorteil herauszufinden, welches Connexin genau für den Efflux verantwortlich ist, nicht zuletzt um eine Beteiligung von P2X-Rezeptor-Poren mit Sicherheit auszuschließen.

Sowohl für weitere Transporter als auch zur Etablierung der Identität des Connexins könnte es sinnvoll sein, experimentelle Strategien ohne Inhibitoren zu wählen. Eine Möglichkeit wäre, Experimente in anderen Primärkulturtypen oder Zelllinien vorzunehmen, die das zu untersuchende Protein nicht enthalten. Auch Kulturen aus geeigneten *Knockout*-Tieren könnten eingesetzt werden. Im Speziellen könnte zur Untersuchung von Connexin 43 ein konditioneller *Knockout* von Vorteil sein (z. B. Theis *et al.*, 2004), um das in vorliegender Arbeit aufgetretene Problem der Lethalität homozygoter *Knockout*-Tiere zu vermeiden. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Expression zu untersuchender Transporter oder Connexine mittels *Knockdown* durch

siRNA zu reduzieren.

Die zum gegenwärtigen Zeitpunkt gefundene Literatur zu einem möglichen exocytotischen Export von Glutathion ist, zumindest für Zellen aus höheren Tieren, äußerst dürftig. Um die hier durchgeführten Untersuchungen abzurunden, sollte versucht werden, diesen Exportweg zu belegen oder auszuschließen.

Weiterhin sollte der Zweck des Glutathioneffluxes untersucht werden. Es wurde schon vor einiger Zeit postuliert, dass der Export oxidierten Glutathions zur Aufrechterhaltung des Thiolredoxpotentials unter oxidativem Stress dient (Akerboom und Sies, 1990). In vorliegender Arbeit wurde vergeblich versucht, Belege für eine solche Protektion an Astrocyten zu finden. Vielleicht könnten neue experimentelle Ansätze dies eindeutig be- oder widerlegen. Ferner sollte untersucht werden, ob exportiertes reduziertes Glutathion außer dem Abbau durch γ GT noch weitere Schicksale hat, z. B., ob es von anderen intakten Zellen als Ganzes aufgenommen werden kann.

4 Diskussion

5 Material und Methoden

5.1 Material und Geräte

5.1.1 Material

Deckgläschen	Roth (Karlsruhe); Langenbrinck (Emmendingen)
Einmal-Sterilfilter	Renner (Darmstadt)
Filterpipettenspitzen	Peqlab (Erlangen); Gilson (Middleton, WI, USA)
Filtriereinheiten	Microcon YM-10, Millipore (Schwalbach)
Nitrocellulosemembran	Millipore Corp. (Bedford, USA)
Nylonnetze	Scrynell, 20, 135 und 250 μm Maschenweite, Züricher Beuteltuchfabrik (Rüschlikon, Schweiz); 132 und 211 μm Maschenweite, Sefar GmbH (Wasserburg)
Objektträger	Neolab (Heidelberg)
PCR-Reaktionsgefäße	Peqlab (Erlangen)
Plastikwaren	Brand (Wertheim), Multimed (Kirchheim), Nunc (Wiesbaden) und BD biosciences (Heidelberg)
Sterile Zellkulturartikel	Nunc (Wiesbaden) und Greiner (Frickenhausen)

5.1.2 Geräte

Agarosegelkammern	PerfectBlue Mini M und L, Peqlab (Erlangen)
-------------------	---

5 Material und Methoden

Autoklav	Typ 669, Aigner (München)
Elektrophoreseapparatur	Mini Trans-Blot Cell, BioRad (München)
ELISA-Reader	MRX TC Revelation, Dynex Technologies (Denkendorf)
Folienschweißgerät	Super Poly 281, Audion Elektro (AJ Weesp, Niederlande)
Haemocytometer	nach Neubauer, Bachofer (Reutlingen)
Mikroskope	Phasenkontrastmikroskop IM, Fluoreszenzmikroskope IM 35, Axiovert 200 und Axiovert 25, Zeiss (Oberkochen)
Ölpumpe	Drehschieberölpumpe Typ 317, Dürr-Dental (Bietigheim)
Osmometer	Osmometer Automatic, Knauer (Eppelheim)
pH-Meter	PHM 92 Lab-pH-Meter, Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Photoapparat	EOS 350D, Canon (Krefeld)
Photometer	Shimadzu UV-120-02, Shimadzu (Kyoto, Japan); UVIKON 80, Kontron Instruments (Watford Herts, UK)
Pipettoren	Finnpipetten Labsystem Oy (Helsinki, Finnland); Vielkanaldispenser Biohit Proline 1200, Biohit Oy (Helsinki, Finnland); Multipette Research Pro 12 Kanal und Reference, Eppendorf (Hamburg)
Schüttler	Vortex Genie, Bender & Hobein (München); Typ TMR, Infors (Bottmingen, Schweiz); Unimax 1010 und Inkubator 1000, Heidolph (Kelheim)
Spannungsquellen	Consort E861, Fisher Bioblock Scientific (Tournai, Belgien); 2301 Makrodrive 1, LKB (Bromma, Schweden)
Sterile Werkbank	LaminAir HLB 2448 und TL 2448, Heraeus (Hanau)
Szintillationszähler	LKB Wallac 1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, Phoenix Equipment, Inc. (Rochester, NY, USA)
Thermocycler	Mastercycler Gradient, Eppendorf (Hamburg)
Waagen	1205 und 1712, Sartorius (Göttingen); Typ P 1200, Mettler (Albstadt) und Typ 0, 152-156 Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe)

5.2 Reagenzien, Chemikalien und Knockout-Tiere

Wasserbad	Typ 20-0 Julabo, Juchheim Labortechnik (Seelbach über Lahr); GFL 1083, Hilab (Düsseldorf)
Wasserreinigungsanlage	Purelab Plus, USF Elga (Ramsbach-Baumbach)
Zellinkubator	Typ B 5060EK CO ₂ und Function Line Model BB16, Heraeus (Hanau)
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5415C, Eppendorf (Hamburg); Zellzentrifuge Varifuge K, Biofuge pico und Biofuge fresco, Heraeus (Hanau)

5.2 Reagenzien, Chemikalien und *Knockout*-Tiere

NADH und NADPH waren von Appllichem (Darmstadt). Acivicin (Abb. 1), Ammoniumcitrat (dibasisch), Probenecid (Abb. 4), Rinderserumalbumin (BSA), D- und L-Cystin, 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Abb. 1), Schafnormalserum, 5-Sulfosalicylsäure (SSS, Abb. 4), Dehydroepiandrosteron (DHEA, Abb. 1), γ Glu-Glu, γ Glu-Gly, Gly-Glu, Taurocholat (Abb. 5), Ouabain (Abb. 4), Indomethacin (Abb. 3), Prostaglandin E₁ (Abb. 4), Thapsigargin (Abb. 5), 5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)-Benzoat (NPPB, Abb. 3), Flufensäure (FFA, Abb. 2) und Xylenolorange wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Carbenoxolon (Abb. 1) und 18 α -Glycyrrhetinsäure (AGA, Abb. 2) waren von MP Biomedicals (MP Germany, Heidelberg). Glibenclamid (Abb. 2) wurde von Alexis (Lausen, Schweiz) bezogen. 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), Glutathion, Glutathiondisulfid, Glutathionreductase (GR) und High Pure PCR Product Purification Kit waren von Roche Diagnostics (Mannheim). Glycylglycin, Natriumselenit und Paraformaldehyd wurden von Fluka (Ulm) bezogen. Der „QIAprep Spin Miniprep Kit“, „QIAquick Gel Extraction Kit“, „QIAquick PCR Purification Kit“ und „HiSpeed Plasmid Midi Kit“ waren von Qiagen (Hilden). Penicillin G, Streptomycinsulfat und Triton X-100 waren von Serva (Heidelberg). (Cysteinylglycin)₂ und (Glycylcystein)₂ waren von Bachem (Bubendorf, Schweiz). RNAsin und Random-Hexamer-Primer waren von Promega (Mannheim). Der DNA-Längenstandard „Gene Ruler 100 bp ladder plus“, Alkalische Phosphatase (Kälberintestinum), Reverse Transkriptase und die jeweils zugehörigen Puffer, rekombinante Taq-Polymerase mit zugehörigem Puffer und MgCl₂-Lösung und dNTP wurden von Ferment

5 Material und Methoden

tas (St. Leon-Rot) bezogen. Die Taq-Polymerase „TripleMaster PCR-System“ mit zugehörigem Puffer und Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP) waren von Eppendorf (Hamburg), Agarose und der DNA-Längenstandard „PeqGold 1 kb DNA-Leiter“ von Peqlab (Erlangen). Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) und Rindertransferrin wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Acetonitril, Ameisensäure, 2-Vinylpyridin (2VP, Abb. 5), Ammoniumeisen-sulfat und Sorbitol waren von E. Merck (Darmstadt), SOC-Medium war von Novagen (EMD Biosciences, San Diego, USA). Die PCR-Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt. Ziegennormalserum war von Life Technologies (Eggenstein) und Immu-Mount® von Shandon (Pittsburgh, PA, USA). Der polyklonale anti-GFAP Antikörper aus Kaninchen war von Deko (Hamburg) und der anti-Kaninchen-IgG Alexa Flour 488 Sekundärantikörper aus Ziege war von Molecular Probes (Leiden).

Mrp1(-/-)-Mäuse (Wijnholds *et al.*, 1997) und Mrp5(-/-)-Mäuse (J. Wijnholds und P. Borst, unpubliziert) wurden freundlicherweise von P. Borst (Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Cx43(+/-)-Mäuse (Reaume *et al.*, 1995) wurden freundlicherweise von J. Hirrlinger (Göttingen) zur Verfügung gestellt.

5.3 Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden Lösungen mit hochreinem Wasser (Wasserreinigungsanlage) als Lösungsmittel hergestellt.

5.3.1 Zellkulturen

Alle Medien und Lösungen, die in der Zellkultur Verwendung fanden, wurden von den technischen Assistentinnen des Arbeitskreises von Prof. Hamprecht routinemäßig auf Sterilität überprüft und auf Mycoplasmenfreiheit untersucht (Hamprecht *et al.*, 1985; Möller, 1989). Zellzahl und Lebensfähigkeit der Zellen nach der Methode des Nigrosinausschlusses (Kaltenbach *et al.*, 1958) wurden vor dem Ansäen bestimmt. Die Zellen wurden für spätere immunocytochemische

Anfärbungen entweder auf sterile quadratische (18 x 18 mm) oder runde Deckgläschen (12 mm Durchmesser) in Plastikkulturshalen (50 mm Durchmesser) bzw. 24-Napf-Platten angesät.

Astrogliareiche Primärkulturen (APK) wurden aus den Gehirnen neugeborener Mäuse unterschiedlicher Mauslinien nach Hamprecht und Löffler (1985) angelegt und kultiviert. Pro 50 mm-Zellkulturshale wurden drei Millionen lebende Zellen in 5 ml Kulturmedium (90 % DMEM, 10 % FCS, 20 U/ml Penicillin G, 20 µg/ml Streptomycinsulfat) oder pro Napf einer 24-Napf-Zellkulturplatte 300.000 lebende Zellen in 2 ml Kulturmedium angesät. Die Kulturen wurden in einem Kulturalter von 14 d bis 21 d für Experimente verwendet. Für immuncytochemische Anfärbungen wurden Kulturen in einem Kulturalter von 8 d bis 14 d eingesetzt.

Bei der Connexin 43-Mauslinie war eine Genotypisierung erst nach Erstellung der Kultur möglich. Deshalb wurden die entsprechenden Kulturen einzeln für jedes Tier angelegt.

5.3.2 Immuncytochemische Anfärbungen und Chromatinanfärbungen

Die anzufärbenden Zellen wurden wie oben (Abschnitt 5.3.1) beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden mit -20 °C kaltem Methanol 5 min lang im Gefrierschrank fixiert und sofort 10 s lang mit -20 °C kaltem Aceton permeabilisiert. Das Aceton wurde entfernt und die Zellen wurden zweimal 5 min lang mit PBS (10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.4 mit 150 mM NaCl) bei Raumtemperatur gewaschen.

Alle folgenden Schritte wurden ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach jedem Inkubationsschritt wurde zweimal 5 min lang mit PBS gewaschen. Primär- und Sekundärantikörper wurden in PBS mit 10 % Ziegennormalserum verdünnt.

Nach der Fixierung der Zellen wurde mit anti-GFAP aus Kaninchen in einer Verdünnung von 1:200 als Primärantikörper 2 h lang inkubiert, anschließend mit dem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-IgG Alexa Fluor 488 aus Ziege, Verdünnung 1:1000) 30 min lang unter Lichtabschluss.

5 Material und Methoden

Um die Zellkerne der Zellen sichtbar zu machen, wurde das Chromatin mit Hilfe von 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Lin *et al.*, 1976) angefärbt. Dazu wurden die Zellen nach Abschluss der Sekundärantikörperinkubation 5 min lang mit 1 µg/ml DAPI in PBS inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Deckgläschen in Immu-Mount® eingebettet und am nächsten Tag im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

5.3.3 Experimentelle Inkubation von Zellkulturen

5.3.3.1 Experimente zur Freisetzung von Glutathion und Glutathiondisulfid

Experimente zur Freisetzung von Glutathion und Glutathiondisulfid wurden durchgeführt wie in Minich *et al.* (2006) beschrieben. Dazu wurden Zellen in Näpfen von 24-Napf-Zellkulturplatten zunächst mit 2 ml auf 37 °C vorgewärmtem Minimalmedium (MM; 44 mM NaHCO₃, 110 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 0.9 mM NaH₂PO₄, 5 mM Glucose, mit CO₂ auf pH 7.4 eingestellt) gewaschen und dann in 0.5 ml MM in Anwesenheit und Abwesenheit des γGT-Inhibitors Acivicin (100 µM, wenn nicht anders vermerkt, Struktur: Abb. 1) inkubiert. Gegebenenfalls wurden andere Effektoren in den im Ergebnisteil (Kapitel 3) angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Um den GSx-Gehalt des Mediums zu bestimmen, wurden 10 µl des Mediums entnommen und im Napf einer Microtiterplatte mit 90 µl 0.11 % (w/v) SSS (Abb. 4) gemischt. Der GSSG-Gehalt des Mediums wurde bestimmt, indem entnommene Proben des Mediums 1:1 mit 1 % (w/v) SSS gemischt wurden. 130 µl dieser Mischung wurden mit 2-Vinylpyridin (2VP, Abb. 5) derivatisiert (Griffith, 1980; Dringen und Hamprecht, 1996).

Zur Bestimmung des zellulären GSx-Gehaltes wurde das Medium entfernt, bevor die Zellen in 500 µl 1 % (w/v) SSS lysiert wurden. 10 µl des Lysats wurden mit 90 µl deionisiertem Wasser in einer Microtiterplatte gemischt. Der zelluläre GSSG-Gehalt wurde durch Derivatisierung von 130 µl des SSS-Zelllysates mit 2VP bestimmt (Griffith, 1980; Dringen und Hamprecht, 1996).

Zur Messung der Vitalität der Zellen wurden 10 µl des Mediums entnommen, um die LDH-Aktivität im Medium zu bestimmen wie in Abschnitt 5.3.4.4 beschrieben.

5.3.3.2 Dauerstressmodell

Experimente zur Freisetzung von GSH und GSSG bei Applikation des Dauerstressmodells wurden nach Minich *et al.* (2006) durchgeführt. Hierfür wurden Zellen in Näpfen von 24-Napf-Zellkulturplatten einmal mit 2 ml auf 37 °C temperiertem Inkubationspuffer (IP; 20 mM HEPES, 5 mM Glucose, 145 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.8 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) gewaschen und 500 µl der Inkubationslösung (IP mit XO in verschiedenen Aktivitäten und 100 U SOD) zugegeben. Um abschließend die gewünschte XO-Aktivität zu erhalten, war selbige in dieser Lösung verdoppelt. Da die XO als Ammoniumsulfatpräzipitat vorlag, wurde in Ansätzen mit niedrigerer XO-Aktivität die Ammoniumsulfatkonzentration durch Zugabe einer 3.2 M (NH₄)₂SO₄-Lösung ausgeglichen. Um die Temperatur während des Experimentes konstant zu halten, wurden die 24-Napf-Zellkulturplatten auf ein Metallgitter überführt, das durch ein 37 °C-warmes Wasserbad temperiert wurde. Die Reaktion wurde daraufhin durch Zugabe von 500 µl einer 2 mM HX-Lösung (Abb. 2) in IP gestartet. Die 2 mM HX-Lösung wurde durch Verdünnen eines Teils einer 10 mM HX-Lösung in 7.5 mM NaOH mit einem Teil doppelt-konzentriertem IP und drei Teilen IP hergestellt und vor Verwendung auf 37 °C temperiert. Um die H₂O₂-Konzentration bestimmen zu können (Abschnitt 5.3.4.3), wurden zu definierten Zeitpunkten je 10 µl des Inkubationsmediums entnommen.

5.3.4 Bestimmungsmethoden

5.3.4.1 Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden Zellen auf Kulturschalen (50 mm Durchmesser) verwendet. Diese wurden zunächst mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und 10 min lang in 400 µl 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 auf Eis lysiert. Das Lysat wurde von der Kulturschale abgeschabt und zentrifugiert (15000 g, 10 min, 4 °C). Die Überstände wurden abgenommen und auf Eis gelagert. Die Niederschläge wurden in 100 µl 1 % (w/v) Triton X-100 in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 resuspendiert, mindestens 20 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (15000 g, 10 min, 4 °C). Die Überstände der zweiten Zentrifugation wurden

5 Material und Methoden

zur Messung der Aktivität der Catalase verwendet. Zur Messung der Aktivitäten von GR und GPx wurden die Überstände der ersten Zentrifugation verwendet. Der Gesamtproteingehalt der Zellkulturschalen wurde durch Messung an Replikplatten nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) bestimmt (Abschnitt 5.3.4.5) und zur Normierung der Enzymaktivitäten verwendet.

5.3.4.1.1 Glutathionreductase Die Aktivität der GR wurde bestimmt wie von Gutterer *et al.* (1999) beschrieben. Dazu wurde ein aliquoter Teil der zu messenden Probe mit einer Reaktionsmischung auf ein Gesamtvolumen von 1 ml in einer Küvette aufgefüllt (Endkonzentrationen der Reagenzien: 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.2 mM NADPH und 1 mM GSSG). Die Enzymaktivität wurde aus der Abnahme der Extinktion bei 340 nm bei einer Messtemperatur von 30 °C mittels des Extinktionskoeffizienten für NADPH ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) berechnet.

5.3.4.1.2 Glutathionperoxidase Die Aktivität der GPx wurde nach Flohé und Günzler (1984) bestimmt. Dazu wurde ein aliquoter Teil der zu messenden Probe mit einer Reaktionsmischung auf ein Gesamtvolumen von 1 ml in einer Küvette aufgefüllt (Endkonzentrationen der Reagenzien: 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 1 mM GSH, 0.2 mM NADPH, 1 mM Natriumazid, 0.5 U/ml GR und 150 μM H_2O_2). Die Enzymaktivität wurde aus der Abnahme der Extinktion bei 340 nm bei einer Messtemperatur von 30 °C mittels des Extinktionskoeffizienten für NADPH (s.o.) berechnet.

5.3.4.1.3 Catalase Die Catalaseaktivität wurde nach der Methode von Aebi (1984) bestimmt. Dazu wurden 20 μl bis 80 μl des Triton X-100-Überstandes (s.o.) in einem Gesamtvolumen von 1 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 mit 10 mM H_2O_2 bei 30 °C inkubiert. Die Abnahme der Konzentration an H_2O_2 wurde aus der Extinktionsabnahme bei 240 nm innerhalb eines Zeitraumes von 1 min mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 0.0394 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnet. Wie empfohlen (Aebi, 1984) wurde die spezifische Aktivität der Catalase als Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung ausgedrückt.

5.3.4.2 Glutathion und Glutathiondisulfid

Die Konzentration an GSx (Menge an GSH plus zweifache Menge an GSSG) von Lysaten und Medien wurde wie in Minich *et al.* (2006) beschrieben nach Dringen und Hamprecht (1996) in einer Modifikation der Methode von Tietze (1969) in Nöpfen von Microtiterplatten bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der photometrischen Verfolgung der Entstehung von 5-Thio-2-nitrobenzoat bei 405 nm, welches durch Reduktion von DTNB (Abb. 1) durch GSH entsteht. Der Reaktionsmischung wurden NADPH und GR zugesetzt, um entstandenes GSSG wieder zu GSH zu reduzieren und dadurch die Nachweisreaktion spezifisch für GSH zu machen. Dabei wurden die Bedingungen so gewählt, dass einzig die Menge an GSx im Testansatz limitierend für die Reaktionsgeschwindigkeit ist. Mittels einer Kalibrierungskurve (s. u.) konnte somit aus dem Extinktionsanstieg pro Zeiteinheit der Glutathiongehalt einer Probe berechnet werden.

Um den Glutathiongehalt von Zelllysaten oder Medien bestimmen zu können, wurden Proben in Nöpfen einer Microtiterplatte mit H₂O oder SSS (Abb. 4) auf 100 µl Volumen mit einer SSS-Endkonzentration von 0.1 % (w/v) verdünnt. Nach Zugabe von 100 µl Reaktionsmischung (0.3 mM DTNB, 0.4 mM NADPH, 192 mU GR, 1 mM EDTA in 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7.5) wurde mit dem ELISA-Reader der Anstieg der Extinktion bei 405 nm verfolgt. Die Messdaten wurden mit Hilfe der Kalibrierungskurve ausgewertet.

Zur Bestimmung des GSSG-Gehaltes in den Proben wurde zunächst GSH mit 2VP (Abb. 5) nach Griffith (1980) derivatisiert. Dazu wurden die Proben, wie oben beschrieben, vorbereitet (Abschnitt 5.3.3.1) und mit 0.2 M Tris ein pH-Wert zwischen 5 und 7 eingestellt (Griffith, 1980). Das zur pH-Einstellung notwendige Volumen an Tris-Lösung wurde mittels geeignetem pH-Papier an einer Replikalösung bestimmt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 10 µl zur GSx-Bestimmung nach dem oben beschriebenen Verfahren eingesetzt.

Mit Hilfe des Auswerteprogrammes Revelation (Dynex Technologies, Denkendorf) des ELISA-Readers wurde aus den Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit der Ansätze mit GSx-Standards eine Kalibrierungsgerade erstellt und diese zur Auswertung der Proben herangezogen. Standardlösungen wurden aus GSSG-Lösungen definierter Konzentrationen in 0.1 % (w/v) SSS

5 Material und Methoden

hergestellt und identisch zu den zugehörigen Proben vorbehandelt.

5.3.4.3 Wasserstoffperoxid

Der H_2O_2 -Gehalt von Inkubationsmedien wurde nach Dringen und Hamprecht (1997) und (Dringen *et al.*, 1998b) in einer Adaption des Testes von Jiang *et al.* (1990) im Microtiterplattenmaßstab bestimmt. Dazu wurden in einem Napf einer Microtiterplatte 10 μl der peroxidhaltigen Lösungen oder der Lösungen des Peroxidstandards mit 170 μl 25 mM H_2SO_4 verdünnt. Nach Zugabe von 180 μl Reaktionsmischung (0.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, 200 μM Xylenolorange, 200 mM Sorbitol in 25 mM H_2SO_4) wurde 45 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bildet sich ein Komplex aus Xylenolorange und Fe^{3+} , der ein breites Absorptionsmaximum zwischen 500 nm und 575 nm besitzt (Michaels und Hunt, 1978). Die Extinktion der Proben und Standards wurde bei 550 nm im ELISA-Reader gemessen. Da die Absorption des gebildeten Komplexes aus Fe^{3+} und Xylenolorange im Bereich von 0 nmol bis 2.5 nmol Peroxid pro Napf oder 0 bis 250 μM H_2O_2 in der Lösung proportional zur Konzentration von H_2O_2 ist (Dringen *et al.*, 1998b), konnten durch Vergleich der Absorption von Standards und Proben die H_2O_2 -Konzentrationen der Proben bestimmt werden.

5.3.4.4 Zellvitalität

Die Vitalität der Zellen wurde anhand der Aktivität der LDH im Inkubationsmedium nach Dringen *et al.* (1998b) in einer Modifikation des Tests von Vassault (1983) im Microtiterplattenmaßstab bestimmt. Dazu wurde ein aliquoter Teil des Inkubationsmediums (10 μl) mit 80 mM Tris-HCl-Puffer, 200 mM NaCl, pH 7.2 in einem Napf einer Microtiterplatte auf ein Volumen von 180 μl verdünnt. Nach Zugabe von 180 μl Reaktionsmischung (0.7 mM Natriumpyruvat, 0.4 mM NADH, 200 mM NaCl in 80 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.2 bei Raumtemperatur) wurde die Abnahme der Absorption bei 340 nm mit dem ELISA-Reader aufgezeichnet. Zur Bestimmung der Vitalität wurde die LDH-Aktivität des aliquoten Teils des Inkubationsmediums mit der Aktivität im Inkubationsmedium nach völliger Lyse der Zellen (gewonnen durch 30 min Inkubation bei Raumtemperatur nach Zugabe von Triton X-100 zu einer Endkonzentration von

1 % (w/v)) verglichen. Dabei entspricht null Prozent Lebensfähigkeit 100 % LDH-Aktivität im Inkubationsmedium.

5.3.4.5 Proteingehalt

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Zellkulturen wurde die Methode von Lowry *et al.* (1951) unter Verwendung von BSA als Standardprotein benutzt. Zur Solubilisierung des Gesamtproteins von Zellen wurden diese - wie von Hirrlinger *et al.* (1999) beschrieben - zunächst gewaschen und dann mit 0.2 ml (Näpfe von 24-Napf-Zellkulturplatten) oder 2 ml (Zellkultur-schalen von 50 mm Durchmesser) 0.5 M NaOH versetzt.

5.3.5 Molekularbiologische Methoden

5.3.5.1 Sequenzanalyse und *Primerdesign*

Die meisten cDNA-Sequenzen, die zur Entwicklung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Primer* dienten, stammten aus der *Gene bank*-Datenbank der *National Institutes of Health* oder des EMBL. Zum Vergleich der Sequenzen untereinander und mit der Datenbank wurde das Blast-Programmpaket (Altschul *et al.*, 1997; Tatusova und Madden, 1999) verwendet.

Die *Primer* für Mrp1-2 und Mrp4-6 wurden freundlicherweise von Dr. Johannes Hirrlinger zur Verfügung gestellt (Hirrlinger *et al.*, 2002a). Zum Design von PCR-*Primern* für Mrp3, Mrp7, Oatp1 und 2 sowie CFTR wurden die bekannten Maus-cDNA-Sequenzen verwendet (*Accession number* siehe Tabelle 7). Die Mrp9-Sequenz wurde aus dem Mausgenom hergeleitet, wie in Abschnitt 5.3.5.3 beschrieben. Aus diesen Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „*primer3*“ (Rozen und Skaletsky, 2000) *Primer* gesucht, die zumindest Teile des offenen Leserahmens (ORF) des Gens einschlossen und Amplifikationsprodukte von ca. 400 bis 600 bp Länge ergaben. Sämtliche verwendeten PCR-*Primer* wurden durch Vergleich mit der *Gene bank*-Datenbank auf Komplementarität zu anderen bekannten Sequenzen überprüft, um die Amplifi-

5 Material und Methoden

kation anderer Genprodukte so gering wie möglich zu halten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 7 aufgeführten PCR-Primer verwendet.

Tabelle 7. Sequenzen und Produktgrößen der PCR-Primer für die Amplifikation von Mrps, Oatps, CFTR und β -Actin sowie die *accession numbers* der cDNA-Sequenzen, mit deren Hilfe sie entworfen wurden.

cDNA <i>Accession number</i>	Name des <i>Primers</i>	Sequenz 5' → 3'	Produkt- größe (bp)
Mrp1 <i>AF022908</i>	mMRP1.for mMRP1.rev	TGCGCTTCCCCTCAACATCC CGGGCCAGGCTCACACG	562
Mrp2 <i>AF227274</i>	mMRP2.for mMRP2.rev	CTTGCGGTGGTCCAGTGTTTTAC ATGGCGAATGGCAGACAA	571
Mrp3 <i>XM_126648</i>	mMRP3.for mMRP3.rev	GCAGAACAAGACCTCCGTAA TTCTGGTTGTTGTCCACCTT	537
Mrp4 <i>AF071202</i>	mMRP4.for mMRP4.rev	AACTGCGGCTTTCACGGATGC CCAACCACGGCTAACAACCTCAC	546
Mrp5 <i>AB019003</i>	mMRP5.for mMRP5.rev	GTCTCCTTTCTCTCCCACATCAC CTTGATGCAGCCTCCAGATAGC	616
Mrp6 <i>AB028737</i>	mMRP6.for mMRP6.rev	AGTCGGGAACCTGCTGAACC CACGCGCTCCACGGCTACCAT	589
Mrp7 <i>AF4066421</i>	mMRP7.for mMRP7.rev	CTATTCGGGAGAACCTGGAC AGGCTCAGCACCTGAAG	477
Mrp9 <i>s. 5.3.5.3</i>	mMRP9.for mMRP9.rev	GAGATGCTCTGGCATGTTTT GGACCTTTACAGTCCAACCTC	417
Oatp1 <i>AF223067</i>	mOATP1.for mOATP1.rev	CATTCGGCACCTGTTTACT CAGGCCAGTTGAAAATCATT	353
Oatp2 <i>AB031814</i>	mOATP2.for mOATP2.rev	TTGGCTGTTTCATCTTCTCG CCTCATCACAGCTTAGTTTTCC	463
CFTR <i>NM_021050</i>	mCFTR.for mCFTR.rev	ACAGTCATCAACGGAATCGT CCCAAATCAACATCAGGAG	443
β -Actin <i>M12481</i>	mActin.for mActin.rev	CTCTAGGCACCAAGGTGTGA GGAGAGCATAGCCCTCGTAG	404

5.3.5.2 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion zum Nachweis der MRP-mRNAs sowie der mRNAs anderer möglicher Glutathiontransporter

RNA aus APK von Wildtypmäusen sowie *Mrp1-Knockout*-Mäusen wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits aus Kulturschalen von 50 mm Durchmesser isoliert, entsprechend den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde das Lysat zur Homogenisierung 10mal durch die 20 G-Kanüle einer Spritze gezogen.

Ein μg Gesamt-RNA in 11.5 μl H_2O wurde mit 1 μg *Random-Hexamer-Primer* 5 min lang bei 70 °C inkubiert und sofort auf Eis überführt. Zur RT-Reaktion wurden 4 μl 5fach RT-Puffer vom Hersteller der Reversen Transkriptase, 2 μl dNTPs (je 10 mM) und 0.5 μl RNAsin auf ein Volumen von 19 μl gebracht und 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurden 200 U Reverser Transkriptase zugegeben und die Lösung auf ein Gesamtvolumen von 20 μl aufgefüllt. Nach 10minütiger Inkubation bei 25 °C wurde 1 h lang bei 37 °C revers transkribiert. Die Reaktion wurde anschließend durch 10minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt. Die erhaltene einzelsträngige cDNA wurde mit dem 'High Pure PCR Product Purification Kit' nach der Anleitung des Herstellers gereinigt und in 50 μl Elutionspuffer (1 mM Tris-HCl, pH 8.5) aufgenommen.

Die PCR wurden in einem Ansatz aus 1.5 mM MgCl_2 , 1.25 U Taq-DNA-Polymerase, 0,2 μM *Primern*, je 0.2 mM dNTPs und 2 μl der gereinigten cDNA in 50 μl PCR-Puffer (vom Hersteller der Polymerase als 10fach konzentrierte Stammlösung geliefert) durchgeführt. Nach 3 min Denaturierung bei 94 °C und 35 Zyklen mit je 1 min Denaturierung (94 °C), 30 s Anlagerung (52 °C) und 1.5 min DNA-Synthese (72 °C) gefolgt von einer abschließenden Synthesephase von 15 min bei 72 °C wurden die PCR-Produkte auf einem Gel aus 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) analysiert.

In jeder dargestellten PCR-Reaktion wurde die Integrität der cDNA durch Nachweis von β -Actin-cDNA überprüft.

5 Material und Methoden

5.3.5.3 Generierung der Maus-Mrp9-Sequenz aus dem Genom

Zu Beginn der Untersuchungen waren MRP8 und MRP9 nur aus dem menschlichen Genom bekannt. Um einen besseren Ausgangspunkt für Untersuchungen an Mauskulturen zu erhalten, wurde nach homologen Sequenzen im Mausgenom gesucht (NCBI Genom Blast). Für humanen MRP8 konnte keine homologe Genregion gefunden werden. Auf dem zum humanen MRP9 homologen Genomabschnitt wurden mittels des Programms „blast2seq“ (Teil des NCBI Toolbox Programmpakets; Tatusova und Madden, 1999) Teilabschnitte hoher Homologie identifiziert und analog zur humanen Sequenz (*Accession Number* AY040220) zusammengesetzt. Mit Hilfe dieser potenziellen Maus-Mrp9-Sequenz wurden - wie oben (Abschnitt 5.3.5.1) beschrieben - *Primer* erstellt. Ein Jahr später wurden die mRNAs der Hauptform und zweier *Splicevarianten* von Maus-Abcc12 (Mrp9) identifiziert (Shimizu *et al.*, 2003), die alle hohe Homologie zur in dieser Arbeit entwickelten potenziellen Sequenz zeigten (Anhang A).

5.3.5.4 Genotypisierung der Mrp1-Knockout-Mäuse

Aus Wijnholds *et al.* (1997) war bekannt, welche Region des Mrp1-Gens entfernt und durch ein Hygromycinresistenz-Gen mit Maus-Phosphoglyceratkinasepromotor ersetzt worden war. Entsprechend dieser Angaben wurde die genomische Sequenz von Mrp1 (*Accession Number* NT_039624, Region 10920679-11032511) modifiziert und eine potenzielle genomische Sequenz im Bereich des Mrp1-Gens bei Mrp1-Knockout-Mäusen erstellt. Unglücklicherweise war unbekannt, welche Hygromycinresistenzsequenz verwendet wurde. Versuche mit *Primern* zur Amplifikation bekannter Hygromycinresistenzsequenzen schlugen fehl (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde der *Knockout*-spezifische Vorwärts*primer* im Bereich des Mausphosphoglyceratkinasepromotors (aus *Accession Number* X76683) und der entsprechende Rückwärts*primer* im 3'-Bereich jenseits der entfernten Region gewählt (Tabelle 8). Das Amplifikat wurde kommerziell sequenziert (SEQLAB Sequence Laboratories, Göttingen) und die erhaltene Sequenz wurde mit der erstellten potenziellen verglichen. Da die Sequenzen fast identisch waren, konnte davon ausgegangen werden, dass die potenzielle Sequenz in diesem Bereich methodisch richtig erstellt worden war.

Die Kontrollprimer (Amplifikat sowohl beim Wildtyp als auch beim *Knockout*) wurden im 5'-Bereich vor der entfernten Region, die Wildtyp-spezifischen Primer beide innerhalb der entfernten Region gewählt (Tabelle 8). Die Positionen aller Primer sowie die Sequenzen eines Ausschnitts des Mauschromosoms 16 sowie der potenziellen entsprechenden Region im *Mrp1-Knockout* und das sequenzierte Amplifikat wurden in Anhang B dargestellt.

Tabelle 8. Sequenzen und Produktgrößen der PCR-Primer für die Genotypisierung der *Mrp1-Knockout*-Mäuse.

	Name des Primers	Sequenz 5' → 3'	Produktgröße (bp)
Kontrollprimer	mmMRP1ko.for	GCCACCCCAAGTATACACAC	497
	mmMRP1ko.rev	GGCTGACAGCAGAGATGACT	
Wildtyp-spezifisch	mmMRP1g.for	GCTTCCTCCTCTTTCTGTGG	540
	mmMRP1g.rev	AAGGCCACACTGTCAATCAA	
<i>Knockout</i> -spezifisch	mmMRPPro.for	CTTCCTGACTAGGGGAGGAG	579
	mmMRPPro.rev	CAAAACCTGACCCTGTGAAC	

5 Material und Methoden

6 Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass astrogliareiche Primärkulturen aus Mäusen sowohl reduziertes als auch oxidiertes Glutathion exportieren. Die Transportcharakteristika bezüglich Geschwindigkeit und Beeinflussbarkeit durch den *Multidrug-resistance-protein 1* (Mrp1)-Inhibitor Mk571 (Abb. 3, Seite 9) unterschieden sich quantitativ zwischen den beiden untersuchten Wildtypmauslinien. In astrogliareicher Primärkultur aus FVB/N-Mäusen, dem Wildtyp der Mrp1-*Knockout*- und Mrp5-*Knockout*-Stämme, waren jedoch die Transportcharakteristika denen in astrogliareicher Primärkultur aus Ratte sehr ähnlich.
2. Der Mrp1-vermittelte Efflux von reduziertem und oxidiertem Glutathion war vor Beginn vorliegender Arbeit anhand von Inhibitorstudien an Rattenastrogliazellen charakterisiert worden. Diese Ergebnisse konnten mit Astrogliakulturen aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen im inhibitorfreien System bestätigt werden. Der Efflux von reduziertem Glutathion aus Astrogliazellen, die aus Mrp1-*Knockout*-Mäusen gewonnen waren, wurde von Mk571 nicht beeinflusst, oxidiertes Glutathion konnte gar nicht exportiert werden. Dies zeigt klar, dass Mrp1 in Astrocyten einerseits der einzige Transporter für oxidiertes Glutathion ist und andererseits der einzige Glutathiontransporter ist, der von Mk571 beeinflusst wird.
3. Mäuseastrogliazellen zeigten ebenso wie Rattenastrogliazellen einen Mrp1-unabhängigen Glutathionrestefflux. Ziel dieser Arbeit war es, Transporter zu finden, die an diesem Restefflux von Glutathion beteiligt sind. Untersucht wurden weitere Mitglieder der C-Familie der ATP-Bindungskassettentransporter (ABCC), zwei Mitglieder der Familie der Transportproteine für organische Anionen (OATP), sowie Connexone (auch *Nexus*-Halbkäle oder *gap-junction hemichannels*). Von diesen waren einzig letztere in der Lage,

6 Zusammenfassung

Glutathion zu transportieren, jedoch nicht unter physiologischen Bedingungen. Verbleibende Kandidaten sind ausführlich in der Diskussion besprochen.

4. Mittels Connexin(Cx)43-*Knockout*-Mäusen wurde versucht, den Connexon-vermittelten Glutathionefflux zu charakterisieren. Jedoch gelang es auf Grund des rasch eintretenden postnatalen Todes der *Knockout*-Tiere nicht, Cx43-*Knockout*-Kulturen zu gewinnen. Heterozygote Kulturen wurden untersucht, zeigten allerdings bezüglich des Connexon-vermittelten Glutathiontransportes keinen Unterschied zum Wildtyp.

Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde also kein einzelner am Glutathionrestefflux beteiligter Transporter identifiziert, jedoch konnten mehrere Kandidaten (weitere ABCC-Transporter, OATPs und Connexone unter physiologischen Bedingungen) ausgeschlossen werden.

7 Literatur

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121–126.
- Aguilar-Bryan L und Bryan J (1999) Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev* 20: 101–135.
- Akerboom T und Sies H (1990) Glutathione transport and its significance in oxidative stress. In Vina J (Hrsg.), *Glutathione: Metabolism and physiological functions*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, S. 45–55.
- Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H und Sugiyama Y (2001) Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* 1511: 7–16.
- Albrecht C und Viturro E (2007) The ABCA subfamily–gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflügers Arch* 453: 581–589.
- Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang XB und Riordan JR (2002) The first nucleotide binding domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a site of stable nucleotide interaction, whereas the second is a site of rapid turnover. *J Biol Chem* 277: 15419–15425.
- Aleksandrov AA, Aleksandrov LA und Riordan JR (2007) CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel. *Pflügers Arch* 453: 693–702.
- Allikmets R und Dean M (1998) Cloning of novel ABC transporter genes. *Methods Enzymol* 292: 116–130.
- Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson A und Dean M (1996) Characterization of the human

7 Literatur

- ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet* 5: 1649–1655.
- Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M und Koeller DM (1999) Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* 8: 743–749.
- Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W und Lipman D (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
- Alvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT und Bockstaele EJV (2000) Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci* 20: 4091–4098.
- Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl: S18–S25.
- Anderson ME, Allison RD und Meister A (1982) Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified γ -glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D4 and γ -glutamyl amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 1088–1091.
- Anderson ME, Underwood M, Bridges RJ und Meister A (1989) Glutathione metabolism at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *FASEB J* 3: 2527–2531.
- Andrews BJ, Proteau GA, Beatty LG und Sadowski PD (1985) The FLP recombinase of the 2μ circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. *Cell* 40: 795–803.
- Annilo T und Dean M (2004) Degeneration of an ATP-binding cassette transporter gene, ABC13, in different mammalian lineages. *Genomics* 84: 34–46.
- Armstrong RN (2000) Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry* 39: 13625–13632.
- Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ und Ogawa N (2004) Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism. *Acta Med Okayama* 58: 221–233.
- Astuya A, Caprile T, Castro M, Salazar K, de los Angeles García M, Reinicke K, Rodríguez F, Vera JC, Millán C, Ulloa V, Low M, Martínez F und Nualart F (2005) Vitamin C uptake and

- recycling among normal and tumor cells from the central nervous system. *J Neurosci Res* 79: 146–156.
- Augustine LM, Markelewicz RJ, Boekelheide K und Cherrington NJ (2005) Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier. *Drug Metab Dispos* 33: 182–189.
- Austin S, Ziese M und Sternberg N (1981) A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25: 729–736.
- Bakos E und Homolya L (2007) Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflügers Arch* 453: 621–641.
- Balcerczyk A, Rychlik B, Kruszewski M, Burchell B und Bartosz G (2003) MRP1-transfected cells do not show increased resistance against oxidative stress. *Free Radic Res* 37: 189–195.
- Balice-Gordon RJ, Bone LJ und Scherer SS (1998) Functional gap junctions in the Schwann cell myelin sheath. *J Cell Biol* 142: 1095–1104.
- Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM und Marchan R (2005) Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 204: 238–255.
- Bandopadhyay R, Kingsbury AE, Cookson MR, Reid AR, Evans IM, Hope AD, Pittman AM, Lashley T, Canet-Aviles R, Miller DW, McLendon C, Strand C, Leonard AJ, Abou-Sleiman PM, Healy DG, Ariga H, Wood NW, de Silva R, Revesz T, Hardy JA und Lees AJ (2004) The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain* 127: 420–430.
- Banizs B, Pike MM, Millican CL, Ferguson WB, Komlosi P, Sheetz J, Bell PD, Schwiebert EM und Yoder BK (2005) Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development* 132: 5329–5339.
- Barja G (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 27: 595–600.
- Barthelme D, Scheele U, Dinkelaker S, Janoschka A, Macmillan F, Albers SV, Driessen AJM, Stagni MS, Bill E, Meyer-Klaucke W, Schünemann V und Tampé R (2007) Structural organization of essential iron-sulfur clusters in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1. *J Biol Chem* 282: 14598–14607.

7 Literatur

- Basso C, Vergani P, Nairn AC und Gadsby DC (2003) Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH₂-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating. *J Gen Physiol* 122: 333–348.
- Baumann N und Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81: 871–927.
- Beck K, Hayashi K, Dang K, Hayashi M und Boyd CD (2005) Analysis of ABCC6 (MRP6) in normal human tissues. *Histochem Cell Biol* 123: 517–528.
- Belinsky MG, Bain LJ, Balsara BB, Testa JR und Kruh GD (1998) Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J Natl Cancer Inst* 90: 1735–1741.
- Belinsky MG, Chen ZS, Shchaveleva I, Zeng H und Kruh GD (2002) Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res* 62: 6172–6177.
- Belinsky MG, Dawson PA, Shchaveleva I, Bain LJ, Wang R, Ling V, Chen ZS, Grinberg A, Westphal H, Klein-Szanto A, Lerro A und Kruh GD (2005) Analysis of the in vivo functions of Mrp3. *Mol Pharmacol* 68: 160–168.
- Bennett MVL und Zukin RS (2004) Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain. *Neuron* 41: 495–511.
- Benzi G und Moretti A (1995) Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med* 19: 77–101.
- Bera TK, Lee S, Salvatore G, Lee B und Pastan I (2001) MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol Med* 7: 509–516.
- Bera TK, Iavarone C, Kumar V, Lee S, Lee B und Pastan I (2002) MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6997–7002.
- Bergbauer K, Dringen R, Verleysdonk S, Gebhardt R, Hamprecht B und Wiesinger H (1996)

- Studies on fructose metabolism in cultured astroglial cells and control hepatocytes: lack of fructokinase activity and immunoreactivity in astrocytes. *Dev Neurosci* 18: 371–379.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R und Hobbs HH (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290: 1771–1775.
- Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brink JB und de Jong PT (2000) Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 25: 228–231.
- Bergen AAB, Plomp AS, Gorgels TGMF und de Jong PTVM (2004) From gene to disease; pseudoxanthoma elasticum and the ABCC6 gene. *Ned Tijdschr Geneesk* 148: 1586–1589.
- Bergen AAB, Plomp AS, Hu X, de Jong PTVM und Gorgels TGMF (2007) ABCC6 and pseudoxanthoma elasticum. *Pflügers Arch* 453: 685–691.
- Bessis A, Béchade C, Bernard D und Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55: 233–238.
- Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O’Cochlain F, Gao F, Karger AB, Ballew JD, Hodgson DM, Zingman LV, Pang YP, Alekseev AE und Terzic A (2004) ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic K_{ATP} channel gating. *Nat Genet* 36: 382–387.
- Bignami A, Eng LF, Dahl D und Uyeda CT (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43: 429–435.
- Bisbal C, Martinand C, Silhol M, Lebleu B und Salehzada T (1995) Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J Biol Chem* 270: 13308–13317.
- Bissel SJ und Wiley CA (2004) Human immunodeficiency virus infection of the brain: pitfalls in evaluating infected/affected cell populations. *Brain Pathol* 14: 97–108.
- Bodó A, Bakos E, Szeri F, Váradi A und Sarkadi B (2003) The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicol Lett* 140-141: 133–143.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MCJ, Squitieri F, Ibanez P, Joesse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van

7 Literatur

- Duijn CM, Oostra BA und Heutink P (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299: 256–259.
- Borst P, Evers R, Kool M und Wijnholds J (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1461: 347–357.
- Borst P, de Wolf C und van de Wetering K (2007) Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflügers Arch* 453: 661–673.
- Bortfeld M, Rius M, König J, Herold-Mende C, Nies AT und Keppler D (2006) Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system. *Neuroscience* 137: 1247–1257.
- Bossuyt X, Müller M, Hagenbuch B und Meier PJ (1996) Polyspecific drug and steroid clearance by an organic anion transporter of mammalian liver. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 891–896.
- Brand A, Leibfritz D, Hamprecht B und Dringen R (1998) Metabolism of cysteine in astroglial cells: synthesis of hypotaurine and taurine. *J Neurochem* 71: 827–832.
- Briz O, Romero MR, Martinez-Becerra P, Macias RIR, Perez MJ, Jimenez F, Martin FGS und Marin JJG (2006) OATP8/1B3-mediated cotransport of bile acids and glutathione: an export pathway for organic anions from hepatocytes? *J Biol Chem* 281: 30326–30335.
- Bronger H, König J, Kopplow K, Steiner HH, Ahmadi R, Herold-Mende C, Keppler D und Nies AT (2005) ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res* 65: 11419–11428.
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J und Hayden MR (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 22: 336–345.
- Bruni JE (1998) Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech* 41: 2–13.
- Bruzzone R und Dermietzel R (2006) Structure and function of gap junctions in the developing brain. *Cell Tissue Res* 326: 239–248.

- Bryan J, Muñoz A, Zhang X, Düfer M, Drews G, Krippeit-Drews P und Aguilar-Bryan L (2007) ABCC8 and ABCC9: ABC transporters that regulate K⁺ channels. *Pflügers Arch* 453: 703–718.
- Budka H, Costanzi G, Cristina S, Lechi A, Parravicini C, Trabattoni R und Vago L (1987) Brain pathology induced by infection with the human immunodeficiency virus (HIV). A histological, immunocytochemical, and electron microscopical study of 100 autopsy cases. *Acta Neuropathol* 75: 185–198.
- Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T und Keppler D (1996) 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* 271: 15091–15098.
- Burke MA und Ardehali H (2007) Mitochondrial ATP-binding cassette proteins. *Transl Res* 150: 73–80.
- Butt AM (2005) Structure and function of oligodendrocytes. In Kettenmann H und Ransom B (Hrsg.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, S. 36–47.
- Cagen LM, Fales HM und Pisano JJ (1976) Formation of glutathione conjugates of prostaglandin A1 in human red blood cells. *J Biol Chem* 251: 6550–6554.
- Cai L, Lumsden A, Guenther UP, Neldner SA, Zäch S, Knoblauch H, Ramesar R, Hohl D, Callen DF, Neldner KH, Lindpaintner K, Richards RI und Struk B (2001) A novel Q378X mutation exists in the transmembrane transporter protein ABCC6 and its pseudogene: implications for mutation analysis in pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Med* 79: 536–546.
- Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA und Cookson MR (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9103–9108.
- Cartier EA, Conti LR, Vandenberg CA und Shyng SL (2001) Defective trafficking and function of K_{ATP} channels caused by a sulfonylurea receptor 1 mutation associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2882–2887.

7 Literatur

- Chance B, Sies H und Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527–605.
- Changeux JP (1986) Coexistence of neuronal messengers and molecular selection. *Prog Brain Res* 68: 373–403.
- Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL und Lesnefsky EJ (2008) Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C460–C466.
- Chen ZS, Lee K und Kruh GD (2001) Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17- β -D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* 276: 33747–33754.
- Chen ZS, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Shchavaleva I, Kotova E und Kruh GD (2003) Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCB10). *Mol Pharmacol* 63: 351–358.
- Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, Gearing M, Levey AI, Chin LS und Li L (2006) Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J Biol Chem* 281: 10816–10824.
- Clarke DD und Sokoloff L (1999) Circulation and Energy Metabolism. In Siegel G, Agranoff B, Albers R, Fisher S und Uhler M (Hrsg.), *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA, S. 637–670.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM und Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650–1654.
- Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM und Deeley RG (1994) Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 54: 5902–5910.
- Coles JA und Deitmer JW (2005) Extracellular potassium and pH: homeostasis and signalling. In Kettenmann H und Ransom B (Hrsg.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, S. 334–345.

- Colton CA und Gilbert DL (1987) Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 223: 284–288.
- Connor PJ, Juergens JL, Perry HO, Hollenhorst RW und Edwards JE (1961) Pseudoxanthoma elasticum and angioid streaks. A review of 106 cases. *Am J Med* 30: 537–543.
- Connors BW und Long MA (2004) Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 27: 393–418.
- Contreras JE, Sánchez HA, Eugenín EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MVL und Sáez JC (2002) Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 495–500.
- Cooper AJL (1997) Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In Rosenberg RN, Prusiner S, DiMauro S, Barchi RL und Kunk LM (Hrsg.), *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease.*, Butterworth-Heinemann, Boston, S. 1195–1230.
- Cotgreave IA und Gerdes RG (1998) Recent trends in glutathione biochemistry – glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* 242: 1–9.
- Cullen K, Davey R und Davey M (2001) Verapamil-stimulated glutathione transport by the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in leukaemia cells. *Biochem Pharmacol* 62: 417–424.
- Dagnino-Subiabre A, Cassels BK, Baez S, Johansson AS, Mannervik B und Segura-Aguilar J (2000) Glutathione transferase M2-2 catalyzes conjugation of dopamine and dopa *o*-quinones. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 32–36.
- Davidson JS, Baumgarten IM und Harley EH (1986) Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 134: 29–36.
- Dean M (2002) *The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily*. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD).
- Dean M und Annilo T (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: 123–142.

7 Literatur

- Del Bigio MR (1995) The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 14: 1–13.
- Deleuze JF, Jacquemin E, Dubuisson C, Cresteil D, Dumont M, Erlinger S, Bernard O und Hadchouel M (1996) Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 23: 904–908.
- Dempsey LC und Nielsen SL (1976) Surface ultrastructure of human ependyma. *J Neurosurg* 45: 52–55.
- Denis-Donini S, Glowinski J und Prochiantz A (1984) Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones. *Nature* 307: 641–643.
- Dermietzel R, Gao Y, Scemes E, Vieira D, Urban M, Kremer M, Bennett MV und Spray DC (2000) Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 45–56.
- de Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, Desrochers M, Burdelski M, Bernard O, Elferink RPO und Hadchouel M (1998) Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 282–287.
- Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ und Schapira AH (1994) Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* 35: 38–44.
- Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Krüger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, Holsboer F, Boesiger P und Cuénod M (2000) Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci* 12: 3721–3728.
- Doetschman T (2002) Gene targeting in embryonic stem cells: I. History and methodology. In Pinkert CA (Hrsg.), *Transgenic Animal Technology*, Academic Press, London, 2. Aufl., Kap. 4, S. 113–143.
- Domínguez-Pinos MD, Páez P, Jiménez AJ, Weil B, Arráez MA, Pérez-Fígares JM und Rodríguez EM (2005) Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 595–604.

- Dong J, Lai R, Nielsen K, Fekete CA, Qiu H und Hinnebusch AG (2004) The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J Biol Chem* 279: 42157–42168.
- Donner MG und Keppler D (2001) Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* 34: 351–359.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK und Ross DD (1998) A multi-drug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15665–15670.
- Dringen R und Hamprecht B (1992) Glucose, insulin, and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem* 58: 511–517.
- Dringen R und Hamprecht B (1996) Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures. *J Neurochem* 67: 1375–1382.
- Dringen R und Hamprecht B (1997) Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res* 759: 67–75.
- Dringen R und Hirrlinger J (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem* 384: 505–516.
- Dringen R, Gebhardt R und Hamprecht B (1993a) Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res* 623: 208–214.
- Dringen R, Schmoll D, Cesar M und Hamprecht B (1993b) Incorporation of radioactivity from [¹⁴C]lactate into the glycogen of cultured mouse astroglial cells. Evidence for gluconeogenesis in brain cells. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374: 343–347.
- Dringen R, Bergbauer K, Wiesinger H und Hamprecht B (1994) Utilization of mannose by astroglial cells. *Neurochem Res* 19: 23–30.
- Dringen R, Kranich O und Hamprecht B (1997a) The γ -glutamyl transpeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial cells in culture. *Neurochem Res* 22: 727–733.
- Dringen R, Kranich O, Löschmann PA und Hamprecht B (1997b) Use of dipeptides for the synthesis of glutathione by astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem* 69: 868–874.
- Dringen R, Hamprecht B und Bröer S (1998a) The peptide transporter PepT2 mediates the uptake of the glutathione precursor CysGly in astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem* 71: 388–393.

7 Literatur

- Dringen R, Kussmaul L und Hamprecht B (1998b) Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay. *Brain Res Brain Res Protoc* 2: 223–228.
- Dringen R, Kussmaul L, Gutterer JM, Hirrlinger J und Hamprecht B (1999) The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem* 72: 2523–2530.
- Dringen R, Gutterer JM und Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267: 4912–4916.
- Dringen R, Gutterer JM, Gros C und Hirrlinger J (2001) Aminopeptidase N mediates the utilization of the GSH precursor CysGly by cultured neurons. *J Neurosci Res* 66: 1003–1008.
- Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y und Swanson RA (2003) P2X₇ receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci* 23: 1320–1328.
- Dubin IN und Johnson FB (1954) Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore)* 33: 155–197.
- Elferink RPJO und Paulusma CC (2007) Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflügers Arch* 453: 601–610.
- Emerit J, Edeas M und Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Bio-med Pharmacother* 58: 39–46.
- Eskandari S, Zampighi GA, Leung DW, Wright EM und Loo DDF (2002) Inhibition of gap junction hemichannels by chloride channel blockers. *J Membr Biol* 185: 93–102.
- Evans MJ und Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154–156.
- Evans WH und Martin PEM (2002) Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 19: 121–136.
- Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga P, Lankelma J und Borst P (2000) Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione transport. *Br J Cancer* 83: 375–383.

- Fellin T, Pozzan T und Carmignoto G (2006) Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J Biol Chem* 281: 4274–4284.
- Fernández-Checa JC, Takikawa H, Horie T, Ookhtens M und Kaplowitz N (1992) Canalicular transport of reduced glutathione in normal and mutant Eisai hyperbilirubinemic rats. *J Biol Chem* 267: 1667–1673.
- Flohé L und Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114–121.
- Frey A (1993) γ -Glutamyl transpeptidase: molecular cloning and structural and functional features of a blood-brain barrier marker protein. In Pardridge W (Hrsg.), *The Blood-Brain Barrier*, Raven Press, New York, S. 339–368.
- Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonté C, Matteoli M, Verderio C und Abbracchio MP (2003) Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43: 218–230.
- Gadola SD, Moins-Teisserenc HT, Trowsdale J, Gross WL und Cerundolo V (2000) TAP deficiency syndrome. *Clin Exp Immunol* 121: 173–178.
- Galvin JE (2006) Interaction of alpha-synuclein and dopamine metabolites in the pathogenesis of Parkinson's disease: a case for the selective vulnerability of the substantia nigra. *Acta Neuropathol* 112: 115–126.
- Gandhi S und Wood NW (2005) Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14: 2749–2755.
- Gao B und Meier PJ (2001) Organic anion transport across the choroid plexus. *Microsc Res Tech* 52: 60–64.
- Gardner JL und Gallagher EP (2001) Development of a peptide antibody specific to human glutathione S-transferase alpha 4-4 (hGSTA4-4) reveals preferential localization in human liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 390: 19–27.
- Gegg ME, Clark JB und Heales SJR (2005) Co-culture of neurones with glutathione deficient astrocytes leads to increased neuronal susceptibility to nitric oxide and increased glutamate-cysteine ligase activity. *Brain Res* 1036: 1–6.

7 Literatur

- Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P und Youdim MB (1994) Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem* 63: 793–807.
- Germain DP (2001) Pseudoxanthoma elasticum: evidence for the existence of a pseudogene highly homologous to the ABCC6 gene. *J Med Genet* 38: 457–461.
- Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G, Lafavia E, Coppola S, Colussi C, Civitareale P und Ciriolo MR (1998) Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J* 12: 479–486.
- Giulian D (1987) Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res* 18: 155–171, 132–133.
- Gögelein H, Dahlem D, Englert HC und Lang HJ (1990) Flufenamic acid, mefenamic acid and niflumic acid inhibit single nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas. *FEBS Lett* 268: 79–82.
- Goodenough DA und Paul DL (2003) Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 285–294.
- Gossen M und Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5547–5551.
- Gossen M und Bujard H (2002) Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu Rev Genet* 36: 153–173.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W und Bujard H (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766–1769.
- Graham DG (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 14: 633–643.
- Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP und Deeley RG (1994) Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* 54: 357–361.
- Gribble FM, Ashfield R, Ammälä C und Ashcroft FM (1997) Properties of cloned ATP-sensitive K^+ currents expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 498 (Pt 1): 87–98.
- Griffith O (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106: 207–212.

- Grune T, Jung T, Merker K und Davies KJA (2004) Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2519–2530.
- Guo N, McIntosh C und Shaw C (1992) Glutathione: new candidate neuropeptide in the central nervous system. *Neuroscience* 51: 835–842.
- Gutterer JM, Dringen R, Hirrlinger J und Hamprecht B (1999) Purification of glutathione reductase from bovine brain, generation of an antiserum, and immunocytochemical localization of the enzyme in neural cells. *J Neurochem* 73: 1422–1430.
- Hagenbuch B und Meier PJ (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1609: 1–18.
- Hagenbuch B und Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Arch* 447: 653–665.
- Hall AG (1999) Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest* 29: 238–245.
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59: 1609–1623.
- Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18: 685–716.
- Halliwell B (2006a) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97: 1634–1658.
- Halliwell B (2006b) Proteasomal dysfunction: a common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 8: 2007–2019.
- Halliwell B und Gutteridge J (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
- Hamprecht B und Dringen R (1995) Energy Metabolism. In Kettenmann H und Ransom B (Hrsg.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, S. 473–487.

7 Literatur

- Hamprecht B, Glaser T, Reiser G, Bayer E und Probst F (1985) Culture and characteristics of hormone-responsive neuroblastoma × glioma hybrid cells. *Methods Enzymol* 109: 316–341.
- Hamprecht B und Löffler F (1985) Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol* 109: 341–345.
- Han J, Cheng FC, Yang Z und Dryhurst G (1999) Inhibitors of mitochondrial respiration, iron (II), and hydroxyl radical evoke release and extracellular hydrolysis of glutathione in rat striatum and substantia nigra: potential implications to Parkinson's disease. *J Neurochem* 73: 1683–1695.
- Harks EG, de Roos AD, Peters PH, de Haan LH, Brouwer A, Ypey DL, van Zoelen EJ und Theuvenet AP (2001) Fenamates: a novel class of reversible gap junction blockers. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 1033–1041.
- Harris AL (2001) Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* 34: 325–472.
- Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, Yamamoto M und Sugiyama Y (2003) Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 824–829.
- Hayes JD und McLellan LI (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 31: 273–300.
- Hayes JD und Pulford DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30: 445–600.
- Hayes JD, Flanagan JU und Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 51–88.
- Heales SJR, Lam AAJ, Duncan AJ und Land JM (2004) Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res* 29: 513–519.
- Herget M und Tampé R (2007) Intracellular peptide transporters in human-compartmentalization of the "peptidome". *Pflügers Arch* 453: 591–600.
- Hermann A, Varga V, Oja SS, Saransaari P und Janáky R (2002) Involvement of amino-acid side

- chains of membrane proteins in the binding of glutathione to pig cerebral cortical membranes. *Neurochem Res* 27: 389–394.
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67–113.
- Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD und Bell AW (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323: 448–450.
- Hiratsuka A, Hirose K, Saito H und Watabe T (2000) 4-Hydroxy-2(*E*)-nonenal enantiomers: (*S*)-selective inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and detoxification by rat glutathione S-transferase A4-4. *Biochem J* 349: 729–735.
- Hirohashi T, Suzuki H und Sugiyama Y (1999) Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem* 274: 15181–15185.
- Hirrlinger J (2002) *Beiträge zur Kenntnis antioxidativer Mechanismen von Gehirnzellen: Peroxidgiftung, Glutathiontransport und Multidrug-resistance-Proteine*. Dissertation, Universität Tübingen.
- Hirrlinger J und Dringen R (2005) Multidrug resistance protein 1-mediated export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *Methods Enzymol* 400: 395–409.
- Hirrlinger J, Hamprecht B und Dringen R (1999) Application and modulation of a permanent hydrogen peroxide-induced oxidative stress to cultured astroglial cells. *Brain Res Brain Res Protoc* 4: 223–229.
- Hirrlinger J, König J, Keppler D, Lindenau J, Schulz JB und Dringen R (2001) The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J Neurochem* 76: 627–636.
- Hirrlinger J, König J und Dringen R (2002a) Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J Neurochem* 82: 716–719.
- Hirrlinger J, Schulz JB und Dringen R (2002b) Effects of dopamine on the glutathione me-

7 Literatur

- tabolism of cultured astroglial cells: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 82: 458–467.
- Hirrlinger J, Schulz JB und Dringen R (2002c) Glutathione release from cultured brain cells: multidrug resistance protein 1 mediates the release of GSH from rat astroglial cells. *J Neurosci Res* 69: 318–326.
- Hirrlinger J, Moeller H, Kirchhoff F und Dringen R (2005) Expression of multidrug resistance proteins (Mrps) in astrocytes of the mouse brain: a single cell RT-PCR study. *Neurochem Res* 30: 1237–1244.
- Hirsch EC, Hunot S, Damier P und Faucheux B (1998) Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann Neurol* 44: S115–S120.
- Hjelle OP, Chaudhry FA und Ottersen OP (1994) Antisera to glutathione: characterization and immunocytochemical application to the rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 6: 793–804.
- Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M und Funk CD (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 272: 16644–16651.
- Hököfelt T, Holets VR, Staines W, Meister B, Melander T, Schalling M, Schultzberg M, Freedman J, Björklund H und Olson L (1986) Coexistence of neuronal messengers – an overview. *Prog Brain Res* 68: 33–70.
- Hofer A und Dermietzel R (1998) Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes. *Glia* 24: 141–154.
- Holm PJ, Morgenstern R und Hebert H (2002) The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22₁2₁ crystals. *Biochim Biophys Acta* 1594: 276–285.
- Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR und Kruh GD (2001) Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett* 162: 181–191.
- Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchavaleva I, Belinsky MG und Kruh GD (2004) Analysis of the

- drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res* 64: 4927–4930.
- Hubatsch I, Ridderström M und Mannervik B (1998) Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem J* 330 (Pt 1): 175–179.
- Hurst R, Bao Y, Jemth P, Mannervik B und Williamson G (1998) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochem J* 332 (Pt 1): 97–100.
- Hyun DH, Gray DA, Halliwell B und Jenner P (2004) Interference with ubiquitination causes oxidative damage and increased protein nitration: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 90: 422–430.
- Iacobas DA, Urban-Maldonado M, Iacobas S, Scemes E und Spray DC (2003) Array analysis of gene expression in connexin-43 null astrocytes. *Physiol Genomics* 15: 177–190.
- Iliás A, Urbán Z, Seidl TL, Saux OL, Sinkó E, Boyd CD, Sarkadi B und Váradi A (2002) Loss of ATP-dependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6). *J Biol Chem* 277: 16860–16867.
- Inagaki N, Gono T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J und Seino S (1996) A family of sulfonyleurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 16: 1011–1017.
- Jackson TR, Patterson SI, Thastrup O und Hanley MR (1988) A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca²⁺ without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. *Biochem J* 253: 81–86.
- Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW und Meier PJ (1994) Expression cloning of a rat liver Na⁺-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 133–137.
- Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A und Persson B (1999) Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci* 8: 689–692.

7 Literatur

- Janáky R, Ogita K, Pasqualotto BA, Bains JS, Oja SS, Yoneda Y und Shaw CA (1999) Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J Neurochem* 73: 889–902.
- Jedlitschky G und Keppler D (2002) Transport of leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *Vitam Horm* 64: 153–184.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G und Keppler D (1996) Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* 56: 988–994.
- Jedlitschky G, Burchell B und Keppler D (2000) The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 275: 30069–30074.
- Jenner P (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3: S26–36; discussion S36–38.
- Jenner P und Olanow CW (1998) Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44: S72–S84.
- Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH und Marsden CD (1992) Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* 32 Suppl: S82–S87.
- Jessup W, Gelissen IC, Gaus K und Kritharides L (2006) Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr Opin Lipidol* 17: 247–257.
- Jiang LH, Mackenzie AB, North RA und Surprenant A (2000) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X₇ receptors. *Mol Pharmacol* 58: 82–88.
- Jiang ZY, Woollard AC und Wolff SP (1990) Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett* 268: 69–71.
- Johnson R und McArthur J (1986) AIDS and the brain. *Trends Neurosci* 9: 91–94.
- Johnston MF, Simon SA und Ramón F (1980) Interaction of anaesthetics with electrical synapses. *Nature* 286: 498–500.
- Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Valk MAVD, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RPJO, Rosing H, Beijnen JH und Schinkel AH (2002) The breast cancer resistance

- protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15649–15654.
- Jowsey IR, Thomson RE, Orton TC, Elcombe CR und Hayes JD (2003) Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase. *Biochem J* 373: 559–569.
- Juliano RL und Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455: 152–162.
- Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL und Deucher GP (2004) Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med* 25: 5–16.
- Kakimoto Y, Nakajima T, Kanazawa A, Takesada M und Sano I (1964) Isolation of γ -L-glutamyl-L-glutamic acid and γ -L-glutamyl-L-glutamine from bovine brain. *Biochim Biophys Acta* 93: 333–338.
- Kaltenbach J, Kaltenbach M und Lyons W (1958) Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp Cell Res* 15: 112–117.
- Kamijo K, Taketani S, Yokota S, Osumi T und Hashimoto T (1990) The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J Biol Chem* 265: 4534–4540.
- Kanazawa A, Kakimoto Y, Nakajima T und Sano I (1965) Identification of γ -glutamylserine, γ -glutamylalanine, γ -glutamylvaline and S-methylglutathione of bovine brain. *Biochim Biophys Acta* 111: 90–95.
- Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R und Keppler D (1996) Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 23: 1061–1066.
- Katz B und Miledi R (1965) The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 161: 496–503.
- Kaur D, Peng J, Chinta SJ, Rajagopalan S, Monte DAD, Cherny RA und Andersen JK (2007) Increased murine neonatal iron intake results in Parkinson-like neurodegeneration with age. *Neurobiol Aging* 28: 907–913.
- Keegan BM und Noseworthy JH (2002) Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 53: 285–302.

7 Literatur

- Kelsell DP, Norgett EE, Unsworth H, Teh MT, Cullup T, Mein CA, Dopping-Hepenstal PJ, Dale BA, Tadini G, Fleckman P, Stephens KG, Sybert VP, Mallory SB, North BV, Witt DR, Sprecher E, Taylor AEM, Ilchyshyn A, Kennedy CT, Goodyear H, Moss C, Paige D, Harper JJ, Young BD, Leigh IM, Eady RAJ und O'Toole EA (2005) Mutations in ABCA12 underlie the severe congenital skin disease harlequin ichthyosis. *Am J Hum Genet* 76: 794–803.
- Keppler D und Kartenbeck J (1996) The canalicular conjugate export pump encoded by the cMRP/cMOAT gene. In Boyer J und Ockner R (Hrsg.), *Progress in Liver Diseases*, Saunders, Philadelphia, S. 55–67.
- Keppler D und König J (1997) Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J* 11: 509–516.
- Kettenmann H und Ransom B (Hrsg.) (1995) *Neuroglia*. Oxford University Press, New York.
- Kim WS, Weickert CS und Garner B (2008) Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *J Neurochem* 104: 1145–1166.
- Kinumi T, Kimata J, Taira T, Ariga H und Niki E (2004) Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 722–728.
- Kirchhoff F, Dringen R und Giaume C (2001) Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251: 159–169.
- Kispal G, Csere P, Guiard B und Lill R (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett* 418: 346–350.
- König J, Nies AT, Cui Y, Leier I und Keppler D (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461: 377–394.
- König J, Nies AT, Cui Y und Keppler D (2003) MRP2, the apical export pump for anionic conjugates. In Holland IB, Kuchler K, Higgins C und Cole SPC (Hrsg.), *ABC proteins: from bacteria to man.*, Academic, London, S. 423–443.
- Koepsell H und Endou H (2004) The SLC22 drug transporter family. *Pflügers Arch* 447: 666–676.

- Kogan I, Ramjeesingh M, Li C, Kidd JF, Wang Y, Leslie EM, Cole SPC und Bear CE (2003) CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J* 22: 1981–1989.
- Koller BH und Smithies O (1992) Altering genes in animals by gene targeting. *Annu Rev Immunol* 10: 705–730.
- Kondo T und Raff M (2000) Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289: 1754–1757.
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F und Borst P (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57: 3537–3547.
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F und Borst P (1999a) Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res* 59: 175–182.
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F und Borst P (1999b) MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6914–6919.
- Kopito RR (1999) Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* 79: S167–S173.
- Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JCH, Vaalburg W, Bart J, Willemsen ATM und Hendrikse NH (2005) Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol* 57: 176–179.
- Koster JC, Marshall BA, Ensor N, Corbett JA und Nichols CG (2000) Targeted overactivity of β cell K_{ATP} channels induces profound neonatal diabetes. *Cell* 100: 645–654.
- Kramer W, Buscher HP, Gerok W und Kurz G (1979) Bile salt binding to serum components. Taurocholate incorporation into high-density lipoprotein revealed by photoaffinity labelling. *Eur J Biochem* 102: 1–9.
- Kranich O, Hamprecht B und Dringen R (1996) Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain. *Neurosci Lett* 219: 211–214.

7 Literatur

- Kranich O, Dringen R, Sandberg M und Hamprecht B (1998) Utilization of cysteine and cysteine precursors for the synthesis of glutathione in astroglial cultures: preference for cystine. *Glia* 22: 11–18.
- Krishnamurthy PC, Du G, Fukuda Y, Sun D, Sampath J, Mercer KE, Wang J, Sosa-Pineda B, Murti KG und Schuetz JD (2006) Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* 443: 586–589.
- Kruh GD, Guo Y, Hopper-Borge E, Belinsky MG und Chen ZS (2007) ABCC10, ABCC11, and ABCC12. *Pflügers Arch* 453: 675–684.
- Kuffler SW und Nicholls JG (1966) The physiology of neuroglial cells. *Ergebn Physiol* 57: 1–90.
- Kukley M, Barden JA, Steinhäuser C und Jabs R (2001) Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* 36: 11–21.
- Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Scheingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW und Meier PJ (1995) Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 109: 1274–1282.
- Kuo MT, Bao J, Furuichi M, Yamane Y, Gomi A, Savaraj N, Masuzawa T und Ishikawa T (1998) Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and γ -glutamylcysteine synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues. *Biochem Pharmacol* 55: 605–615.
- Kusuhara H und Sugiyama Y (2007) ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflügers Arch* 453: 735–744.
- Lada MW und Kennedy RT (1997) In vivo monitoring of glutathione and cysteine in rat caudate nucleus using microdialysis on-line with capillary zone electrophoresis-laser induced fluorescence detection. *J Neurosci Methods* 72: 153–159.
- Ladner JE, Parsons JF, Rife CL, Gilliland GL und Armstrong RN (2004) Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry* 43: 352–361.
- Lai L und Tan TMC (2002) Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4

- (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. *Biochem J* 361: 497–503.
- Lampe PD und Lau AF (2000) Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384: 205–215.
- Lan J und Jiang DH (1997) Excessive iron accumulation in the brain: a possible potential risk of neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 104: 649–660.
- Lanius RA, Shaw CA, Wagey R und Krieger C (1994) Characterization, distribution, and protein kinase C-mediated regulation of [³⁵S]glutathione binding sites in mouse and human spinal cord. *J Neurochem* 63: 155–160.
- Lee K, Belinsky MG, Bell DW, Testa JR und Kruh GD (1998) Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res* 58: 2741–2747.
- Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, Kojima H, Allikmets R, Sakuma N, Pegoraro R, Srivastava AK, Salen G, Dean M und Patel SB (2001) Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 27: 79–83.
- Lefèvre C, Audebert S, Jobard F, Bouadjar B, Lakhdar H, Boughdene-Stambouli O, Blanchet-Bardon C, Heilig R, Foglio M, Weissenbach J, Lathrop M, Prud'homme JF und Fischer J (2003) Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2. *Hum Mol Genet* 12: 2369–2378.
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholtz U, Cole S, Deeley R und Keppler D (1994) The *MRP* gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *J Biol Chem* 269: 27807–27810.
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SP, Deeley RG und Keppler D (1996) ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the *MRP* gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J* 314 (Pt 2): 433–437.
- Le Saux O, Urban Z, Göring HH, Csiszar K, Pope FM, Richards A, Pasquali-Ronchetti I, Terry S, Bercovitch L, Lebowitz MG, Breuning M, van den Berg P, Kornet L, Doggett N, Ott J, de Jong PT, Bergen AA und Boyd CD (1999) Pseudoxanthoma elasticum maps to an 820-kb region of the p13.1 region of chromosome 16. *Genomics* 62: 1–10.

7 Literatur

- Le Saux O, Urban Z, Tschuch C, Csiszar K, Bacchelli B, Quaglino D, Pasquali-Ronchetti I, Pope FM, Richards A, Terry S, Bercovitch L, de Paepe A und Boyd CD (2000) Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 25: 223–227.
- Leslie EM, Deeley RG und Cole SPC (2003) Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Drug Metab Dispos* 31: 11–15.
- Li L, Lee TK, Meier PJ und Ballatori N (1998) Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C₄ as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* 273: 16184–16191.
- Li L, Meier PJ und Ballatori N (2000) Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol* 58: 335–340.
- Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GI und Gage FH (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 399–421.
- Lin M, Alfi O und Donnell G (1976) Differential fluorescence of sister chromatids with 4'-6-diamidino-2-phenylindole. *Can J Genet Cytol* 18: 545–547.
- Lingappa JR, Dooher JE, Newman MA, Kiser PK und Klein KC (2006) Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABCE1 (HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly. *J Biol Chem* 281: 3773–3784.
- Linsdell P und Hanrahan JW (1998) Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 275: C323–C326.
- Linton KJ und Higgins CF (2007) Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflügers Arch* 453: 555–567.
- Litvan I, Chesselet MF, Gasser T, Monte DAD, Parker D, Hagg T, Hardy J, Jenner P, Myers RH, Price D, Hallett M, Langston WJ, Lang AE, Halliday G, Rocca W, Duyckaerts C, Dickson DW, Ben-Shlomo Y, Goetz CG und Melamed E (2007) The etiopathogenesis of Parkinson disease and suggestions for future research. Part II. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 329–336.
- Loe DW, Deeley RG und Cole SP (1998) Characterization of vincristine transport by the M_r

- 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res* 58: 5130–5136.
- Loe DW, Deeley RG und Cole SP (2000) Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *J Pharmacol Exp Ther* 293: 530–538.
- Loh KP, Huang SH, Silva RD, Tan BKH und Zhu YZ (2006) Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Curr Alzheimer Res* 3: 327–337.
- Lopez-Barea J, Barcena J, Bocanegra J, Florindo J, Garcia-Alfonso C, Lopez-Ruiz A, Martinez-Galisteo E und Peinado J (1990) Structure, mechanism, functions, and regulatory properties of glutathione reductase. In Vina J (Hrsg.), *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, S. 105–116.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A und Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- Lu K, Lee MH, Hazard S, Brooks-Wilson A, Hidaka H, Kojima H, Ose L, Stalenhoef AF, Mietinnen T, Bjorkhem I, Bruckert E, Pandya A, Brewer HB, Salen G, Dean M, Srivastava A und Patel SB (2001) Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet* 69: 278–290.
- Lundberg JM und Hökfelt T (1983) Coexistence of peptide and classical neurotransmitters. *Trends Neurosci* 6: 325–333.
- Lundberg JM, Anggård A, Fahrenkrug J, Hökfelt T und Mutt V (1980) Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1651–1655.
- Macdonald RL, Weir BK, Runzer TD und Grace MG (1992) Malondialdehyde, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in cerebrospinal fluid during cerebral vasospasm in monkeys. *Can J Neurol Sci* 19: 326–332.
- Madon J, Hagenbuch B, Landmann L, Meier PJ und Stieger B (2000) Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol Pharmacol* 57: 634–641.
- Mahagita C, Grassl SM, Piyachaturawat P und Ballatori N (2007) Human organic anion trans-

7 Literatur

- porter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G271–G278.
- Maher JM, Slitt AL, Cherrington NJ, Cheng X und Klaassen CD (2005) Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice. *Drug Metab Dispos* 33: 947–955.
- Malarkey EB und Parpura V (2006) Glutamate release from astrocytes: impact on neuronal function. In Häussinger D, Kircheis G und Schliess F (Hrsg.), *Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism.*, Springer, London-Heidelberg, S. 60–86.
- Malarkey EB und Parpura V (2008) Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int* 52: 142–154.
- Malchow RP, Qian H und Ripps H (1994) A novel action of quinine and quinidine on the membrane conductance of neurons from the vertebrate retina. *J Gen Physiol* 104: 1039–1055.
- Mandal AK, Skoch J, Bacskai BJ, Hyman BT, Christmas P, Miller D, Yamin TtD, Xu S, Wisniewski D, Evans JF und Soberman RJ (2004) The membrane organization of leukotriene synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6587–6592.
- Manevich Y, Feinstein SI und Fisher AB (2004) Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with π GST. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3780–3785.
- Marnett LJ, Riggins JN und West JD (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 111: 583–593.
- Marton MJ, de Aldana CRV, Qiu H, Chakraborty K und Hinnebusch AG (1997) Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2 α kinase GCN2. *Mol Cell Biol* 17: 4474–4489.
- Matsuzaki H, Nakajima R, Nishiyama J, Araki H und Oshima Y (1990) Chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid. *J Bacteriol* 172: 610–618.
- Mayer R, Kartenbeck J, Büchler M, Jedlitschky G, Leier I und Keppler D (1995) Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J Cell Biol* 131: 137–150.

- Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Baron P, Villalba M, Ferrari D und Rossi F (1995) Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ . *Nature* 374: 647–650.
- Meister A (1974) Glutathione synthesis. *The Enzymes* 10: 671–697.
- Meister A und Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711–760.
- Meister A, Tate SS und Griffith OW (1981) γ -Glutamyl transpeptidase. *Methods Enzymol* 77: 237–253.
- Melton DW (1994) Gene targeting in the mouse. *Bioessays* 16: 633–638.
- Mertens G, Fuss H und Kahmann R (1986) Purification and properties of the DNA invertase gin encoded by bacteriophage Mu. *J Biol Chem* 261: 15668–15672.
- Mertens G, Klippel A, Fuss H, Blöcker H, Frank R und Kahmann R (1988) Site-specific recombination in bacteriophage Mu: characterization of binding sites for the DNA invertase Gin. *EMBO J* 7: 1219–1227.
- Meulener MC, Xu K, Thomson L, Thompson L, Ischiropoulos H und Bonini NM (2006) Mutational analysis of DJ-1 in *Drosophila* implicates functional inactivation by oxidative damage and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12517–12522.
- Michaels HB und Hunt JW (1978) Determination of peroxides and hydroperoxides in irradiated solutions of nucleic acid constituents and DNA. *Anal Biochem* 87: 135–140.
- Minich T, Riemer J, Schulz JB, Wielinga P, Wijnholds J und Dringen R (2006) The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *J Neurochem* 97: 373–384.
- Misra I und Griffith OW (1998) Expression and purification of human γ -glutamylcysteine synthetase. *Protein Expr Purif* 13: 268–276.
- Möller A (1989) *Untersuchungen über das Enzym Creatinkinase und sein Substrat Creatin an glialen und neuronalen Zellkulturen des Gehirns*. Dissertation, Universität Frankfurt am Main.
- Morel F, Rauch C, Petit E, Piton A, Theret N, Coles B und Guillouzo A (2004) Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J Biol Chem* 279: 16246–16253.

7 Literatur

- Morrison BM und Morrison JH (1999) Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in superoxide dismutase: a putative mechanism of degeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 29: 121–135.
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL und Aubourg P (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361: 726–730.
- Müller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EG und Jansen PL (1994) Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione *S*-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 13033–13037.
- Mueller CFH, Widder JD, McNally JS, McCann L, Jones DP und Harrison DG (2005) The role of the multidrug resistance protein-1 in modulation of endothelial cell oxidative stress. *Circ Res* 97: 637–644.
- Müller-Esterl W (2004) *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier, München, 1. Aufl., Kap. 23.10, S. 328–330.
- Nagy JI, Ionescu AV, Lynn BD und Rash JE (2003) Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia* 44: 205–218.
- Nakamura K, Wang W und Kang UJ (1997) The role of glutathione in dopaminergic neuronal survival. *J Neurochem* 69: 1850–1858.
- Naramoto H, Uematsu T, Uchihashi T, Doto R, Matsuura T, Usui Y, Uematsu S, Li X, Takahashi M, Yamaoka M und Furusawa K (2007) Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines. *Int J Oncol* 30: 393–401.
- Nedergaard M, Ransom B und Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26: 523–530.
- Neldner KH (1988) Pseudoxanthoma elasticum. *Clin Dermatol* 6: 1–159.
- Newman EA (2005) Glia and synaptic transmission. In Kettenmann H und Ransom B (Hrsg.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, S. 355–366.

- Nicholson BJ, Weber PA, Cao F, Chang HC, Lampe P und Goldberg G (2002) The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz J Med Biol Res* 33: 369–398.
- Nies AT und Keppler D (2007) The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflügers Arch* 453: 643–659.
- Nies AT, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP und Keppler D (2004) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* 129: 349–360.
- Nishida T, Gatmaitan Z, Roy-Chowdhry J und Arias IM (1992) Two distinct mechanisms for bilirubin glucuronide transport by rat bile canalicular membrane vesicles. Demonstration of defective ATP-dependent transport in rats (TR-) with inherited conjugated hyperbilirubinaemia. *J Clin Invest* 90: 2130–2135.
- Nishimura M und Naito S (2005) Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 20: 452–477.
- Noé B, Hagenbuch B, Stieger B und Meier PJ (1997) Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10346–10350.
- Ogita K, Enomoto R, Nakahara F, Ishitsubo N und Yoneda Y (1995) A possible role of glutathione as an endogenous agonist at the N-methyl-D-aspartate recognition domain in rat brain. *J Neurochem* 64: 1088–1096.
- Oguri T, Bessho Y, Achiwa H, Ozasa H, Maeno K, Maeda H, Sato S und Ueda R (2007) MRP8/ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. *Mol Cancer Ther* 6: 122–127.
- Okonkwo PO, Orłowski M und Green JP (1974) Enzymes of the γ -glutamyl cycle in the choroid plexus and brain. *J Neurochem* 22: 1053–1058.
- Ono N, der Heijden IV, Scheffer GL, de Wetering KV, Deemter EV, Haas MD, Boerke A, Gadella BM, Rooij DGD, Neefjes JJ, Groothuis TAM, Oomen L, Brocks L, Ishikawa T und Borst P (2007) Multidrug resistance-associated protein 9 (ABCC12) is present in mouse and boar sperm. *Biochem J* 406: 31–40.

7 Literatur

- Oppenheimer L, Wellner VP, Griffith OW und Meister A (1979) Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites. *J Biol Chem* 254: 5184–5190.
- Orwar O, Li X, Andiné P, Bergström CM, Hagberg H, Folestad S und Sandberg M (1994) Increased intra- and extracellular concentrations of γ -glutamylglutamate and related dipeptides in the ischemic rat striatum: involvement of glutamyl transpeptidase. *J Neurochem* 63: 1371–1376.
- Pakhotin P und Verkhatsky A (2005) Electrical synapses between Bergmann glial cells and Purkinje neurones in rat cerebellar slices. *Mol Cell Neurosci* 28: 79–84.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S und Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369: 744–747.
- Pasquali-Ronchetti I, Volpin D, Baccarani-Contri M, Castellani I und Peserico A (1981) Pseudoxanthoma elasticum. Biochemical and ultrastructural studies. *Dermatologica* 163: 307–325.
- Pasquali-Ronchetti I, Baccarani-Contri M, Pincelli C und Bertazzoni GM (1986) Effect of selective enzymatic digestions on skin biopsies from pseudoxanthoma elasticum: an ultrastructural study. *Arch Dermatol Res* 278: 386–392.
- Passi A, Albertini R, Contri MB, de Luca G, de Paepe A, Pallavicini G, Ronchetti IP und Tiozzo R (1996) Proteoglycan alterations in skin fibroblast cultures from patients affected with pseudoxanthoma elasticum. *Cell Biochem Funct* 14: 111–120.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T und Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17: 7817–7830.
- Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P und Elferink RPO (1999) Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J* 338 (Pt 2): 393–401.
- Pearce RK, Owen A, Daniel S, Jenner P und Marsden CD (1997) Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 104: 661–677.

- Perry VH und Gordon S (1987) Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. *J Exp Med* 166: 1138–1143.
- Pfeiffer-Guglielmi B, Fleckenstein B, Jung G und Hamprecht B (2003) Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *J Neurochem* 85: 73–81.
- Pfriegeer FW (2003a) Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 60: 1158–1171.
- Pfriegeer FW (2003b) Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochim Biophys Acta* 1610: 271–280.
- Plomp AS, Hu X, de Jong PTVM und Bergen AAB (2004) Does autosomal dominant pseudoxanthoma elasticum exist? *Am J Med Genet A* 126: 403–412.
- Pohl A, Lage H, Müller P, Pomorski T und Herrmann A (2002) Transport of phosphatidylserine via MDR1 (multidrug resistance 1) P-glycoprotein in a human gastric carcinoma cell line. *Biochem J* 365: 259–268.
- Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G und Butterfield DA (2004) Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med* 20: 329–359.
- Poot M, Teubert H, Rabinovitch PS und Kavanagh TJ (1995) De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J Cell Physiol* 163: 555–560.
- Pope FM (1975) Historical evidence for the genetic heterogeneity of pseudoxanthoma elasticum. *Br J Dermatol* 92: 493–509.
- Porter NA (1984) Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105: 273–282.
- Prabhu KS, Reddy PV, Jones EC, Liken AD und Reddy CC (2004) Characterization of a class α glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 424: 72–80.
- Prades C, Arnould I, Annilo T, Shulenin S, Chen ZQ, Orosco L, Triunfol M, Devaud C, Maintoux-Larois C, Lafargue C, Lemoine C, Denèfle P, Rosier M und Dean M (2002) The human ATP binding cassette gene ABCA13, located on chromosome 7p12.3, encodes a 5058

7 Literatur

- amino acid protein with an extracellular domain encoded in part by a 4.8-kb conserved exon. *Cytogenet Genome Res* 98: 160–168.
- Prochiantz A und Mallat M (1988) Astrocyte diversity. *Ann N Y Acad Sci* 540: 52–63.
- Purkinje J (1836) Über Flimmerbewegungen im Gehirn. *Archiv Anat Physiol Wiss Med (Berlin-Leipzig)* 1: 289–290.
- Quaglino D, Boraldi F, Barbieri D, Croce A, Tiozzo R und Ronchetti IP (2000) Abnormal phenotype of in vitro dermal fibroblasts from patients with Pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Biochim Biophys Acta* 1501: 51–62.
- Raine C (1999) Neurocellular anatomy. In Siegel G, Agranoff B, Albers R, Fisher S und Uhler M (Hrsg.), *Basic Neurochemistry, Molecular, cellular and medical aspects*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA, S. 3–30.
- Rana S und Dringen R (2007) Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 415: 45–48.
- Raza H, Robin MA, Fang JK und Avadhani NG (2002) Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* 366: 45–55.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM und Rossant J (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267: 1831–1834.
- Rebbeor JF, Connolly GC, Dumont ME und Ballatori N (1998) ATP-dependent transport of reduced glutathione in yeast secretory vesicles. *Biochem J* 334 (Pt 3): 723–729.
- Reed PW und Lardy HA (1972) A23187: a divalent cation ionophore. *J Biol Chem* 247: 6970–6977.
- Reichel C, Gao B, Montfoort JV, Cattori V, Rahner C, Hagenbuch B, Stieger B, Kamisako T und Meier PJ (1999) Localization and function of the organic anion-transporting polypeptide Oatp2 in rat liver. *Gastroenterology* 117: 688–695.
- Reichelt KL (1970) The isolation of γ -glutamyl peptides from monkey brain. *J Neurochem* 17: 19–25.

- Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Sáez PJ, Sáez JC und Giaume C (2007a) Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by pro-inflammatory cytokines released from activated microglia. *J Neurosci* 27: 13781–13792.
- Retamal MA, Schalper KA, Shoji KF, Bennett MVL und Sáez JC (2007b) Opening of connexin 43 hemichannels is increased by lowering intracellular redox potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 8322–8327.
- Richard M, Drouin R und Beaulieu AD (1998) ABC50, a novel human ATP-binding cassette protein found in tumor necrosis factor-alpha-stimulated synoviocytes. *Genomics* 53: 137–145.
- Richman PG und Meister A (1975) Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 250: 1422–1426.
- Riemer J (2003) *Freisetzung von Glutathion und von Glutathiondisulfid aus Astroglia-kulturen von Wildtyp-, Mrp1- und Mrp5-defizienten Mäusen*. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Riordan JR (2005) Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67: 701–718.
- Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G und Keppler D (2003) Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 38: 374–384.
- Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF und Keppler D (2006) Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G640–G649.
- Robin MA, Prabu SK, Raza H, Anandatheerthavarada HK und Avadhani NG (2003) Phosphorylation enhances mitochondrial targeting of GSTA4-4 through increased affinity for binding to cytoplasmic Hsp70. *J Biol Chem* 278: 18960–18970.
- Robinson A, Huttley GA, Booth HS und Board PG (2004) Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *Biochem J* 379: 541–552.

7 Literatur

- Rouach N, Avignone E, Mème W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F und Giaume C (2002) Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94: 457–475.
- Rozen S und Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365–386.
- Rucker III EB, Thomson JG und Piedrahita JA (2002) Gene targeting in embryonic stem cells: II. Conditional technologies. In Pinkert CA (Hrsg.), *Transgenic Animal Technology*, Academic Press, London, 2. Aufl., Kap. 5, S. 144–172.
- Russel FGM, Masereeuw R und van Aubel RAMH (2002) Molecular aspects of renal anionic drug transport. *Annu Rev Physiol* 64: 563–594.
- Sáez JC, Contreras JE, Bukauskas FF, Retamal MA und Bennett MVL (2003) Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. *Acta Physiol Scand* 179: 9–22.
- Sagara Ji, Miura K und Bannai S (1993a) Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J Neurochem* 61: 1667–1671.
- Sagara Ji, Miura K und Bannai S (1993b) Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem* 61: 1672–1676.
- Sagara Ji, Makino N und Bannai S (1996) Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J Neurochem* 66: 1876–1881.
- Sandberg M, Li X, Folestad S, Weber SG und Orwar O (1994) Liquid chromatographic determination of acidic β -aspartyl and γ -glutamyl peptides in extracts of rat brain. *Anal Biochem* 217: 48–61.
- Sankarapandi S, Zweier JL, Mukherjee G, Quinn MT und Huso DL (1998) Measurement and characterization of superoxide generation in microglial cells: evidence for an NADPH oxidase-dependent pathway. *Arch Biochem Biophys* 353: 312–321.
- Satlin LM, Amin V und Wolkoff AW (1997) Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/ HCO_3^- exchange. *J Biol Chem* 272: 26340–26345.
- Sauer B (1998) Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14: 381–392.

- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JLR, Tessier-Lavigne M, Okano H und Alvarez-Buylla A (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311: 629–632.
- Scheffer GL, Hu X, Pijnenborg ACLM, Wijnholds J, Bergen AAB und Scheper RJ (2002a) MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors. *Lab Invest* 82: 515–518.
- Scheffer GL, Kool M, de Haas M, de Vree JML, Pijnenborg ACLM, Bosman DK, Elferink RPJO, van der Valk P, Borst P und Scheper RJ (2002b) Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab Invest* 82: 193–201.
- Schirmer R, Krauth-Siegel R, und Schulz G (1989) Glutathione reductase. In Dolphin B, Avramovic O und Poulson R (Hrsg.), *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects - Part A*, John Wiley, New York, USA, S. 553–596.
- Schmoll D, Cesar M, Führmann E und Hamprecht B (1995) Colocalization of fructose-1,6-bisphosphatase and glial fibrillary acidic protein in rat brain. *Brain Res* 677: 341–344.
- Schriml LM und Dean M (2000) Identification of 18 mouse ABC genes and characterization of the ABC superfamily in *Mus musculus*. *Genomics* 64: 24–31.
- Schultheiss G und Diener M (1998) K^+ and Cl^- conductances in the distal colon of the rat. *Gen Pharmacol* 31: 337–342.
- Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y und Endou H (1997) Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem* 272: 18526–18529.
- Sekine T, Cha SH und Endou H (2000) The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pflügers Arch* 440: 337–350.
- Sekura R und Meister A (1977) γ -Glutamylcysteine synthetase. Further purification, "half of the sites" reactivity, subunits, and specificity. *J Biol Chem* 252: 2599–2605.
- Shani N und Valle D (1998) Peroxisomal ABC transporters. *Methods Enzymol* 292: 753–776.
- Sheps JA und Ling V (2007) Preface: the concept and consequences of multidrug resistance. *Pflügers Arch* 453: 545–553.

7 Literatur

- Shi X, Bai S, Ford AC, Burk RD, Jacquemin E, Hagenbuch B, Meier PJ und Wolkoff AW (1995) Stable inducible expression of a functional rat liver organic anion transport protein in HeLa cells. *J Biol Chem* 270: 25591–25595.
- Shimizu H, Taniguchi H, Hippo Y, Hayashizaki Y, Aburatani H und Ishikawa T (2003) Characterization of the mouse *Abcc12* gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue of human *ABCC12*. *Gene* 310: 17–28.
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P und Marsden CD (1994) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 36: 348–355.
- Singh SP, Janecki AJ, Srivastava SK, Awasthi S, Awasthi YC, Xia SJ und Zimniak P (2002) Membrane association of glutathione S-transferase mGSTA4-4, an enzyme that metabolizes lipid peroxidation products. *J Biol Chem* 277: 4232–4239.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA und Kucherlapati RS (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature* 317: 230–234.
- Söhl G, Maxeiner S und Willecke K (2005) Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 6: 191–200.
- Sofic E, Lange KW, Jellinger K und Riederer P (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 142: 128–130.
- Somjen GG (1988) Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* 1: 2–9.
- Sonderer B, Wild P, Wyler R, Fontana A, Peterhans E und Schwyzer M (1987) Murine glia cells in culture can be stimulated to generate reactive oxygen. *J Leukoc Biol* 42: 463–473.
- Spencer JPE, Jenner P und Halliwell B (1995) Superoxide-dependent depletion of reduced glutathione by L-DOPA and dopamine. Relevance to Parkinson's disease. *Neuroreport* 6: 1480–1484.
- Spencer JPE, Jenner P, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC und Halliwell B (1998) Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J Neurochem* 71: 2112–2122.

- Spencer JPE, Whiteman M, Jenner P und Halliwell B (2002) 5-S-Cysteiny-conjugates of catecholamines induce cell damage, extensive DNA base modification and increases in caspase-3 activity in neurons. *J Neurochem* 81: 122–129.
- Spray DC, Rozental R und Srinivas M (2002) Prospects for rational development of pharmacological gap junction channel blockers. *Curr Drug Targets* 3: 455–464.
- Spray DC, Ye ZC und Ransom BR (2006) Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia* 54: 758–773.
- Stefková J, Poledne R und Hubáček JA (2004) ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* 53: 235–243.
- Stewart VC, Stone R, Gegg ME, Sharpe MA, Hurst RD, Clark JB und Heales SJR (2002) Preservation of extracellular glutathione by an astrocyte derived factor with properties comparable to extracellular superoxide dismutase. *J Neurochem* 83: 984–991.
- Stieger B, Meier Y und Meier PJ (2007) The bile salt export pump. *Pflügers Arch* 453: 611–620.
- Stolzing A und Grune T (2004) Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. *FASEB J* 18: 743–745.
- Storch M und Lassmann H (1997) Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr Opin Neurol* 10: 186–192.
- Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM und Thompson RJ (1998) A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 20: 233–238.
- Streit WJ (2005) Microglial cells. In Kettenmann H und Ransom B (Hrsg.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, S. 60–71.
- Suadicani SO, Brosnan CF und Scemes E (2006) P2X₇ receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci* 26: 1378–1385.
- Sun X, Erb H und Murphy TH (2005) Coordinate regulation of glutathione metabolism in astrocytes by Nrf2. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 371–377.
- Swanson RA (2005) Astrocyte neurotransmitter uptake. In Kettenmann H und Ransom B (Hrsg.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, S. 346–354.

7 Literatur

- Sweet DH, Wolff NA und Pritchard JB (1997) Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney. *J Biol Chem* 272: 30088–30095.
- Sweet DH, Chan LMS, Walden R, Yang XP, Miller DS und Pritchard JB (2003) Organic anion transporter 3 (Slc22a8) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na⁺ gradient. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F763–F769.
- Takayanagi SI, Kataoka T, Ohara O, Oishi M, Kuo MT und Ishikawa T (2004) Human ATP-binding cassette transporter ABCC10: expression profile and p53-dependent upregulation. *J Exp Ther Oncol* 4: 239–246.
- Tammur J, Prades C, Arnould I, Rzhetsky A, Hutchinson A, Adachi M, Schuetz JD, Swoboda KJ, Ptáček LJ, Rosier M, Dean M und Allikmets R (2001) Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene* 273: 89–96.
- Taniguchi N und Ikeda Y (1998) γ -Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 72: 239–278.
- Tate SS (1985) Microvillus membrane peptidases that catalyze hydrolysis of cysteinylglycine and its derivatives. *Methods Enzymol* 113: 471–484.
- Tate SS und Meister A (1981) γ -Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Mol Cell Biochem* 39: 357–368.
- Tate SS, Ross LL und Meister A (1973) The γ -glutamyl cycle in the choroid plexus: its possible function in amino acid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 1447–1449.
- Tatebe S, Sinicrope FA und Kuo MT (2002) Induction of multidrug resistance proteins MRP1 and MRP3 and γ -glutamylcysteine synthetase gene expression by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1427–1433.
- Tatusova T und Madden T (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 174: 247–250.
- Thastrup O, Linnebjerg H, Bjerrum PJ, Knudsen JB und Christensen SB (1987) The inflammatory and tumor-promoting sesquiterpene lactone, thapsigargin, activates platelets by selective

- mobilization of calcium as shown by protein phosphorylations. *Biochim Biophys Acta* 927: 65–73.
- Thastrup O, Cullen PJ, Drøbak BK, Hanley MR und Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2466–2470.
- Theis M, Speidel D und Willecke K (2004) Astrocyte cultures from conditional connexin43-deficient mice. *Glia* 46: 130–141.
- Theodoulou FL, Holdsworth M und Baker A (2006) Peroxisomal ABC transporters. *FEBS Lett* 580: 1139–1155.
- Thompson R (2000) *The brain. A Neuroscience Primer*. Worth, New York.
- Thorén S, Weinander R, Saha S, Jegerschöld C, Pettersson PL, Samuelsson B, Hebert H, Hamberg M, Morgenstern R und Jakobsson PJ (2003) Human microsomal prostaglandin E synthase-1: purification, functional characterization, and projection structure determination. *J Biol Chem* 278: 22199–22209.
- Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27: 502–522.
- Todorich BM und Connor JR (2004) Redox metals in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1012: 171–178.
- Tusnády GE, Sarkadi B, Simon I und Váradi A (2006) Membrane topology of human ABC proteins. *FEBS Lett* 580: 1017–1022.
- Tyzack JK, Wang X, Belsham GJ und Proud CG (2000) ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner. *J Biol Chem* 275: 34131–34139.
- Uitto J (2004) Pseudoxanthoma elasticum—a connective tissue disease or a metabolic disorder at the genome/environment interface? *J Invest Dermatol* 122: ix.
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D und Flohé L (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252: 38–53.

7 Literatur

- Valentin G (1836) Fortgesetzte Untersuchungen über die Flimmerbewegung. *Repertorium Anat Physiol Berlin* 1: 148–159.
- Valiunas V, Bukauskas FF und Weingart R (1997) Conductances and selective permeability of connexin43 gap junction channels examined in neonatal rat heart cells. *Circ Res* 80: 708–719.
- van Aubel RAMH, Smeets PHE, van den Heuvel JJMW und Russel FGM (2005) Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F327–F333.
- van den Dobbelsteen DJ, Nobel CS, Schlegel J, Cotgreave IA, Orrenius S und Slater AF (1996) Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J Biol Chem* 271: 15420–15427.
- van Luyn MJ, Müller M, Renes J, Meijer C, Scheper RJ, Nienhuis EF, Mulder NH, Jansen PL und Vries EGD (1998) Transport of glutathione conjugates into secretory vesicles is mediated by the multidrug-resistance protein 1. *Int J Cancer* 76: 55–62.
- Varga V, Janáky R, Saransaari P und Oja SS (1994) Endogenous γ -L-glutamyl and β -L-aspartyl peptides and excitatory aminoacidergic neurotransmission in the brain. *Neuropeptides* 27: 19–26.
- Varga V, Jenei Z, Janáky R, Saransaari P und Oja SS (1997) Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors. *Neurochem Res* 22: 1165–1171.
- Vassault A (1983) Lactate dehydrogenase: UV-method with pyruvate and NADH. In Bergmeyer H (Hrsg.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, S. 118–126.
- Verani A, Gras G und Pancino G (2005) Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. *Mol Immunol* 42: 195–212.
- Verleysdonk S (2006) *The ependyma: Biochemical and molecular characterisation*. Habilitationsschrift, Universität Tübingen.
- Vesce S, Rossi D, Brambilla L und Volterra A (2007) Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol* 82: 57–71.

- Vila M, Jackson-Lewis V, Guégan C, Wu DC, Teismann P, Choi DK, Tieu K und Przedborski S (2001) The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14: 483–489.
- Volarević S, Pende M und Pullen N (1999) Manipulating mammalian genome by gene targeting. *Croat Med J* 40: 368–374.
- Walters HC, Craddock AL, Fusegawa H, Willingham MC und Dawson PA (2000) Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G1188–G1200.
- Wanders RJA, Visser WF, van Roermund CWT, Kemp S und Waterham HR (2007) The peroxisomal ABC transporter family. *Pflügers Arch* 453: 719–734.
- Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F und Tall AR (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9774–9779.
- Wang W und Ballatori N (1998) Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* 50: 335–356.
- Ward CL, Omura S und Kopito RR (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83: 121–127.
- White TW, Deans MR, O'Brien J, Al-Ubaidi MR, Goodenough DA, Ripps H und Bruzzone R (1999) Functional characteristics of skate connexin35, a member of the gamma subfamily of connexins expressed in the vertebrate retina. *Eur J Neurosci* 11: 1883–1890.
- Wielinga PR, van der Heijden I, Reid G, Beijnen JH, Wijnholds J und Borst P (2003) Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *J Biol Chem* 278: 17664–17671.
- Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CA, Zaman GJ, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P und Borst P (1997) Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med* 3: 1275–1279.
- Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, Clercq ED, Balzarini J und Borst P (2000) Multidrug-resistance protein 5 is a

7 Literatur

- multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7476–7481.
- Wilkinson B und Gilbert HF (2004) Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1699: 35–44.
- Wilson MA, Collins JL, Hod Y, Ringe D und Petsko GA (2003) The 1.1-Å resolution crystal structure of DJ-1, the protein mutated in autosomal recessive early onset Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9256–9261.
- Winterbourn CC und Metodiewa D (1994) The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* 314: 284–290.
- Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W und Frommer WB (2002) Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem Sci* 27: 139–147.
- Wooden SL, Kalb SR, Cotter RJ und Soloski MJ (2005) Cutting edge: HLA-E binds a peptide derived from the ATP-binding cassette transporter multidrug resistance-associated protein 7 and inhibits NK cell-mediated lysis. *J Immunol* 175: 1383–1387.
- Wu DC, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Vila M, Jackson-Lewis V, Teismann P und Przedborski S (2002) Glial cell response: A pathogenic factor in Parkinson's disease. *J Neurovirol* 8: 551–558.
- Yabuuchi H, Shimizu H, Takayanagi Si und Ishikawa T (2001) Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 933–939.
- Yabuuchi H, Takayanagi Si, Yoshinaga K, Taniguchi N, Aburatani H und Ishikawa T (2002) ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 410–417.
- Yamamoto Y, Takekoshi Y, Itami N, Honjo T, Kojima H, Yano S, Takahashi H, Saito I und Takahashi K (1995) Enzyme-linked immunosorbent assay for extracellular glutathione peroxidase in serum of normal individuals and patients with renal failure on hemodialysis. *Clin Chim Acta* 236: 93–99.
- Yamane Y, Furuichi M, Song R, Van NT, Mulcahy RT, Ishikawa T und Kuo MT (1998) Expres-

- sion of multidrug resistance protein/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase genes is regulated by oxidative stress. *J Biol Chem* 273: 31075–31085.
- Yamazaki J und Hume JR (1997) Inhibitory effects of glibenclamide on cystic fibrosis transmembrane regulator, swelling-activated, and Ca^{2+} -activated Cl^- channels in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res* 81: 101–109.
- Yang CS, Chou ST, Lin NN, Liu L, Tsai PJ, Kuo JS und Lai JS (1994) Determination of extracellular glutathione in rat brain by microdialysis and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 661: 231–235.
- Yang Y, Sharma R, Zimniak P und Awasthi YC (2002) Role of α class glutathione S-transferases as antioxidant enzymes in rodent tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 182: 105–115.
- Yang Y, Gehrke S, Haque ME, Imai Y, Kosek J, Yang L, Beal MF, Nishimura I, Wakamatsu K, Ito S, Takahashi R und Lu B (2005) Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13670–13675.
- Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S und Ransom BR (2003) Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci* 23: 3588–3596.
- Yoshiura Ki, Kinoshita A, Ishida T, Ninokata A, Ishikawa T, Kaname T, Bannai M, Tokunaga K, Sonoda S, Komaki R, Ihara M, Saenko VA, Alipov GK, Sekine I, Komatsu K, Takahashi H, Nakashima M, Sosonkina N, Mapendano CK, Ghadami M, Nomura M, Liang DS, Miwa N, Kim DK, Garidkhuu A, Natsume N, Ohta T, Tomita H, Kaneko A, Kikuchi M, Russomando G, Hirayama K, Ishibashi M, Takahashi A, Saitou N, Murray JC, Saito S, Nakamura Y und Niikawa N (2006) A SNP in the ABCC11 gene is the determinant of human earwax type. *Nat Genet* 38: 324–330.
- Youdim MB und Riederer P (1993) The role of iron in senescence of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 40: 57–67.
- Yudkoff M, Pleasure D, Cregar L, Lin ZP, Nissim I, Stern J und Nissim I (1990) Glutathione turnover in cultured astrocytes: studies with [^{15}N]glutamate. *J Neurochem* 55: 137–145.
- Zängerle L, Cuénod M, Winterhalter KH und Do KQ (1992) Screening of thiol compounds:

7 Literatur

- depolarization-induced release of glutathione and cysteine from rat brain slices. *J Neurochem* 59: 181–189.
- Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mülder HS, Lankelma J, Pinedo HM, Scheper RJ, Baas F und Broxterman HJ (1994) The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8822–8826.
- Zarubica A, Trompier D und Chimini G (2007) ABCA1, from pathology to membrane function. *Pflügers Arch* 453: 569–579.
- Zecca L, Youdim MBH, Riederer P, Connor JR und Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5: 863–873.
- Zelcer N, Saeki T, Reid G, Beijnen JH und Borst P (2001) Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3). *J Biol Chem* 276: 46400–46407.
- Zelcer N, van de Wetering K, Hillebrand M, Sarton E, Kuil A, Wielinga PR, Tephly T, Dahan A, Beijnen JH und Borst P (2005) Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7274–7279.
- Zhang J, Kravtsov V, Amarnath V, Picklo MJ, Graham DG und Montine TJ (2000a) Enhancement of dopaminergic neurotoxicity by the mercapturate of dopamine: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 74: 970–978.
- Zhang ZR, Zeltwanger S und McCarty NA (2000b) Direct comparison of NPPB and DPC as probes of CFTR expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 175: 35–52.
- Zhu Q und Center MS (1994) Cloning and sequence analysis of the promoter region of the MRP gene of HL60 cells isolated for resistance to adriamycin. *Cancer Res* 54: 4488–4492.
- Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, Singh AR, Firestein BL, Riba SC und Lingappa JR (2002) Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* 415: 88–92.

A Mrp9-Sequenz



Abb. 33. Übersicht über die potenzielle Maus-Mrp9 Sequenz (pmmMrp9), die humane Sequenz (hsMRP9, AY040220) und die publizierte Mausequenz (mmMRP9, AF502146).

hsMRP9	AGAGTGAAAGTGTCCCCAGGCCAAAAGCCAGGGCTCCAG	334
pmmMrp9	AGAGTGAAAGTGTCCCCGAGGCCAAGAGTCGAGGGCTCCAG	40
mmMrp9GCCAAAAGTCGAGGGCTCCAA	21

	<i>ORF</i>	
hsMRP9	GCTGCCATCAGGATGGTGGGTGAAGGACCCCTACCTTATCT	374
pmmMrp9	AACACCATCAAGATGGTGGGTGAAGGCCCGTACCTTATCT	80
mmMrp9	AACACCATCAAGATGGTGGGTGAAGGCCCGTACCTTATCT	61

	<i>ORF</i>	
hsMRP9	CAGATCTGGAACAGCGAGGCCGGCGGAGATCCTTTGCAGA	414
pmmMrp9	CAGACCTGGATCGCAGAGGCCATCGGAGATCCTTTGCCGA	120
mmMrp9	CAGACCTGGATCGCAGAGGCCATCGGAGATCCTTTGCCGA	101

	<i>ORF</i>	
hsMRP9	AAGATATGACCCCAGCCTGAAAGACCATGATCCCAGTGCGA	454
pmmMrp9	GAGATATGACCCCAGCCTGAAAACCATGATCCCAGTGCGA	160
mmMrp9	GAGATATGACCCCAGCCTGAAAACCATGATCCCAGTGCGA	141

A Mrp9-Sequenz

	<i>ORF</i>	
hsMRP9	CCC TGTGCAAGGTTA GCACCCAA CCC GGTGGATGATGCCG	494
pmmMrp9	CCCCGTGCAAGGTTGGCACCCAATCCTGTGGATGATGCTG	200
mmMrp9	CCCCGTGCAAGGTTGGCACCCAATCCTGTGGATGATGCTG	181
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	GGCTA CTC TCCTTCGCCACA TTTTCCTGGCTCAC GCCGGT	534
pmmMrp9	GGCTGCTGTTCCTTCGCCACGTTTTCCTGGCTCACACCGGT	240
mmMrp9	GGCTGCTGTTCCTTCGCCACGTTTTCCTGGCTCACACCGGT	221
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	GATGG TGAAAGGC TACC GGCAAG GCTGACC GTA GACACC	574
pmmMrp9	GATGATTCGAAGTTACAAGCACACGCTGACTGTGGACACC	280
mmMrp9	GATGATTCGAAGTTACAAGCACACGCTGACTGTGGACACC	261
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	CTGCCCCCAT TGTGCA CA TATGACTCATC TGACA CCAATG	614
pmmMrp9	CTGCCCCCACTGTCTCCTTATGACTCATCGGACATCAACG	320
mmMrp9	CTGCCCCCACTGTCTCCTTATGACTCATCGGACATCAACG	301
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	CCAAA AGATT TCGAG TCCTTTGGGAT GAAGA GG TAGCAA G	654
pmmMrp9	CCAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	360
mmMrp9	CCAAGAGATTTCAGATCCTTTGGGAA GAAGA AAT AAAGAG	341
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	GGT GGGT CCTGAGAAGGCCTC TCTGA GCC ACGTGGT GTGG	694
pmmMrp9	NN	400
mmMrp9	GGT AGGG CCTGAGAAGGCCTC CCTGG GCC GCGTGGT CTGG	381
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	AAATTCCAGAG GACA CGC GTGT TGATGGACA TC GTG GCCA	734
pmmMrp9	NN	440
mmMrp9	AAATTCCAGAGA ACC CGA GT TCTGATGGACGT TGTAGCCA	421
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	ACATCCTGTGCATCA TCATGGCAGCC ATA GGGCCGGTGA T	774
pmmMrp9	NN	480
mmMrp9	ACATCCTGTGCATCG TCATGGCAGCC TTG GGGCCGACAG T	461

————— *ORF* —————

hsMRP9	TCTCATTACCAAATCCTCCAGCAGACTGAGAGGA...CC	811
pmmMrp9	TCTCATTACCAAATCCTCCAGCACATTACCAGCATCTCC	520
mmMrp9	TCTCATTACCAAATCCTCCAGCACATTACCAGCATCTCC	501

————— *ORF* —————

hsMRP9	TC TGGGAAAGTCTGGGTGGCATTGGACTGTGCATAGCCC	851
pmmMrp9	TCCGGACACATCGGGATCGGCATCTGCTTGTGTCTGGCCC	560
mmMrp9	TCCGGACACATCGGGATCGGCATCTGCTTGTGTCTGGCCC	541

————— *ORF* —————

hsMRP9	TT TTTGCCACCGAGTTTACCAAAGTCTTCTTTTGGGCCCT	891
pmmMrp9	TCTTTACCAACCGAGTTCACCAAAGTCTTCTTTTGGGCCCT	600
mmMrp9	TCTTTACCAACCGAGTTCACCAAAGTCTTCTTTTGGGCCCT	581

————— *ORF* —————

hsMRP9	TGCCTGGGCCATCAACTACCGCACGGCCATCCG GTTGAAG	931
pmmMrp9	TGCCTGGGCCATAAAATTACCGCACAGCGATCCGACTGAAG	640
mmMrp9	TGCCTGGGCCATAAAATTACCGCACAGCGATCCGACTGAAG	621

————— *ORF* —————

hsMRP9	GTGGCGCTCTCCACCTTGGTTT TGGAAAACCTAGTGTCCCT	971
pmmMrp9	GTGGCCCTCTCCACGCTAATCTTCGAAAACCTGTCTGTCCCT	680
mmMrp9	GTGGCCCTCTCCACGCTAATCTTCGAAAACCTGTCTGTCCCT	661

————— *ORF* —————

hsMRP9	TC AAGACATTGACCACATCTCTGTTGGCGAGGTGCTCAA	1011
pmmMrp9	TTAAGACGTTAACTCACATCTCTGCAGGCGAGGTACTCAA	720
mmMrp9	TTAAGACGTTAACTCACATCTCTGCAGGCGAGGTACTAAA	701

————— *ORF* —————

hsMRP9	TATACTGTCAAGTGATAGCTATTCTTTGTTTGAAGCTGCC	1051
pmmMrp9	TATACTATCAAGTGATAGCTATTCTTTGTTTGAAGGCTGCC	760
mmMrp9	TATACTATCAAGTGATAGCTATTCTTTGTTTGAAGGCTGCC	741

————— *ORF* —————

hsMRP9	TTGTTTTGTCCCTTTGCCAGCCACCATCCCGATCCTAATGG	1091
pmmMrp9	TTGTTTTGTCCCTTTGCCAGCCACCATCCCGATCCTAATGG	800
mmMrp9	TTGTTTTGTCCCTTTGCCAGCCACCATCCCGATCCTAATGG	781

A *Mrp9*-Sequenz

	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	TCTTTTGTGCGGC GTACGCCTTTTTCATTCTGGGGCCAC	1131
pmmMrp9	TCGTTTGTGCAGTGTACGCCTTTTTCATTCTGGGGTCCAC	840
mmMrp9	TCGTTTGTGCAGTGTACGCCTTTTTCATTCTGGGGTCCAC	821
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	AGCTCTCATCGGGATA TCAGTGTATGTCATATTCATAACC	1171
pmmMrp9	AGCTCTTGTTCGGGATAAAGTGTGTATCTCATATTCATCCCG	880
mmMrp9	AGCTCTTGTTCGGGATAAAGTGTGTATCTCATATTCATCCCG	861
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	G TCCAGATGTTTATGGCCAA GCTCAA TTCAGCTTTCCGAA	1211
pmmMrp9	ATCCAGATGTTTATGGCCAAACTCAACTCAACTTTCCGAA	920
mmMrp9	ATCCAGATGTTTATGGCCAAACTCAACTCAACTTTCCGAA	901
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GGTCAGCAATTTTGGTGACAGACAAGCGA GTTCAGACAAT	1251
pmmMrp9	GGTCAGCAATTTTTCAGTGACAGACAACGGGTTTCAGACAAT	960
mmMrp9	GGTCAGCAATTTTTCAGTGACAGACAACGGGTTTCAGACAAT	941
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GAATGAGTTTCTGACCTGCATCA GGCTGATCAAAATGTAT	1291
pmmMrp9	GAATGAGTTTCTGACCTGCATCAAGCTGATTAATAATGTAC	1000
mmMrp9	GAATGAGTTTCTGACCTGCATCAAGCTGATTAATAATGTAC	981
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GCCTGGGAGAAATCTTTTACC AACAC TATCCAA GATATAA	1331
pmmMrp9	GCCTGGGAGGAATCTTTTATAAACACCATTACGACATAA	1040
mmMrp9	GCCTGGGAGGAATCTTTTATAAACACCATTACGACATAA	1021
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GAA GGAGG GAAAG AAAATTACTGGAAAA AGCTGGATT TGT	1371
pmmMrp9	GAAAGAGAGAGAAAAAATTACTGGAAAAAGGCTGGCTATGT	1080
mmMrp9	GAAAGAGAGAGAAAAAATTACTGGAAAAAGGCTGGCTATGT	1061
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	CCAAAGTGGAAACTCTGCCCTGGCC CCCATC GTGTCCACC	1411
pmmMrp9	CCAAAGTGGAAACTCAGCCCTGGCTCCCATTGTGTCCACC	1120
mmMrp9	CCAAAGTGGAAACTCAGCCCTGGCTCCCATTGTGTCCACC	1101

————— *ORF* —————

hsMRP9	ATAGCCATC	GTG	CTG	ACA	TTAT	CCTGCCACATCCTCCTGA	1451
pmmMrp9	ATAGCCATT	TGTCTACTTT	CACCTGCCACATTTTCCTGA	1160			
mmMrp9	ATAGCCATT	TGTCTACTTT	CACCTGCCACATTTTCCTGA	1141			

————— *ORF* —————

hsMRP9	GACGCAA	ACTCAC	C	GCA	CCC	GTGGCATT	TAGTGTGATTGC	1491
pmmMrp9	AACGCAAGCT	CACTGCCCT	GTGGCATT	TAGTGTGATTGC	1200			
mmMrp9	AACGCAAGCT	CACTGCCCT	GTGGCATT	TAGTGTGATTGC	1181			

————— *ORF* —————

hsMRP9	CATGTTT	AATGTAAT	GAAGTTTT	TCCATTGCAATC	TGCCC	1531
pmmMrp9	CATGTTT	AATGTAAT	GAAGTTTT	TCCATTGCAATC	TGCCT	1240
mmMrp9	CATGTTT	AATGTAAT	GAAGTTTT	TCCATTGCAATC	TGCCT	1221

————— *ORF* —————

hsMRP9	TTCTC	CA	TCAAAGCA	ATGGC	TGAAGC	GAA	TGTCTCTCTAA	1571
pmmMrp9	TTCTCGGT	CAAAGCAGT	GGCCGAAGCCAGT	TGTCTCTCTAA	1280			
mmMrp9	TTCTCGGT	CAAAGCAGT	GGCCGAAGCCAGT	TGTCTCTCTAA	1261			

————— *ORF* —————

hsMRP9	GGAGAAT	GAAGAAAAT	T	CTCATAGA	TAAAAG	CCCCCATC	1611
pmmMrp9	GGAGAAT	GAAGAAAAT	C	CTCATAGCTAAAAG	TCCCCATC	1320	
mmMrp9	GGAGAAT	GAAGAAAAT	C	CTCATAGCTAAAAG	TCCCCATC	1301	

————— *ORF* —————

hsMRP9	T	TACATCAC	C	CAACC	A	GAAGACCCAGATACT	GTCTTGCTT	1651
pmmMrp9	CTACATCACT	CAACCTGAAGACCCAGATACT	TATCTTGCTT	1360				
mmMrp9	CTACATCACT	CAACCTGAAGACCCAGATACT	TATCTTGCTT	1341				

————— *ORF* —————

hsMRP9	TTAGCAAAT	GCCACCTT	GACATGGGA	G	CAT	GAA	GC	CAG	CA	1691
pmmMrp9	TTAGCAAAT	GCCACCTT	GACATGGGA	A	CAAGAAAT	CAACA	1400			
mmMrp9	TTAGCAAAT	GCCACCTT	GACATGGGA	A	CAAGAAAT	CAACA	1381			

————— *ORF* —————

hsMRP9	GGAAAAGT	A	C	CC	AAAGAAAT	T	G	C	A	G	A	A	C	C	A	G	A	A	A	G	G	C	A	1731					
pmmMrp9	GGAAAAGT	G	A	C	C	C	G	A	A	G	G	C	A	C	A	A	A	T	C	A	G	A	A	A	G	G	C	A	1440
mmMrp9	GGAAAAGT	G	A	C	C	G	A	A	G	G	C	A	C	A	A	A	T	C	A	G	A	A	A	G	G	C	A	1421	

A Mrp9-Sequenz

	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	TTTATGCAAGAAACAGAGGT CAGAGGCATACAGT GAGAGG	1771
pmmMrp9	CGTTTTCAAGAAACAGAGGCCAGAGCTATACAGCGAGCAA	1480
mmMrp9	CGTTTTCAAGAAACAGAGGCCAGAGCTATACAGCGAGCAA	1461
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	AGTCCAC CAGCCAAGGGAGCCACTG GCCCAGAGGAGCAAA	1811
pmmMrp9	AGTCGATCAGATCAGGGAGTTGCTAGCCC GGAGTGGCAAA	1520
mmMrp9	AGTCGATCAGATCAGGGAGTTGCTAGCCC GGAGTGGCAAA	1501
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GTGACAGCCTCAAATCGGTTCTG CACAGCAT AAGCTTTGT	1851
pmmMrp9	GTGGCAGCCCCAAGTCAGTGCTACACAACATCAGTTTTGT	1560
mmMrp9	GTGGCAGCCCCAAGTCAGTGCTACACAACATCAGTTTTGT	1541
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GGTGAGAAAGGGGAAGATCTTGGGAATATGT GGGAAATGTG	1891
pmmMrp9	GGTGAGAAAGGGGAAGGTCTTGGGAATATGCGGGAAATGTT	1600
mmMrp9	GGTGAGAAAGGGGAAGGTCTTGGGAATATGCGGGAAATGTT	1581
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GGAAGTGGAAAGAGCTCCCTCCTTG CAGCTCTCCTAGGAC	1931
pmmMrp9	GGAAGCGGGAAGAGTTCCCTCATTT CAGCTCTCCTAGGAC	1640
mmMrp9	GGAAGCGGGAAGAGTTCCCTCATTT CAGCTCTCCTAGGAC	1621
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	AGATGCAGCTGCAGAAAGGGGTG GTGGCA GTCAATGGAA C	1971
pmmMrp9	AGATGCAGTTACAGAAAGGGGTCTGTGGCTGTCAATGGACC	1680
mmMrp9	AGATGCAGTTACAGAAAGGGGTCTGTGGCTGTCAATGGACC	1661
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	TTTGGCC TACGTTTCA CAGCA GGCATGGATCTTT CATGGA	2011
pmmMrp9	TTTGGCTTACGTTTCC CAGCAAGCATGGATCTTCCATGGA	1720
mmMrp9	TTTGGCTTACGTTTCC CAGCAAGCATGGATCTTCCATGGA	1701
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	AATGTGAGAGAA AACA TACTCTTTGGAGAA AAGTATGATC	2051
pmmMrp9	AATGTGAGGGGAGAAACA TACTGTTTGGAGAGAAATACAACC	1760
mmMrp9	AATGTGAGGGGAGAAACA TACTGTTTGGAGAGAAATACAACC	1741

————— *ORF* —————

hsMRP9	ACCAAAGGTA T C A G C A C A C A G T C C G C G T C T G T G G C T C C A	2091
pmmMrp9	ACCAAAGGTACCAACACACAGTTTCATGTCTGTGGTCTCCA	1800
mmMrp9	ACCAAAGGTACCAACACACAGTTTCATGTCTGTGGTCTCCA	1781

————— *ORF* —————

hsMRP9	GAAGGAC C T G A G C A A C C T C C C C T A T G G A G A C T G A C T G A G	2131
pmmMrp9	GAAGGACTTGAACAGCCTCCCTTATGGAGACCTGACTGAG	1840
mmMrp9	GAAGGACTTGAACAGCCTCCCTTATGGAGACCTGACTGAG	1821

————— *ORF* —————

hsMRP9	ATTGG G G A G C G G G C C T C A A C C T C T C T G G G G G C A G A G G C	2171
pmmMrp9	ATTGGAGAGCGGGGTGTCAACCTCTCTGGGGGACAGAGGC	1880
mmMrp9	ATTGGAGAGCGGGGTGTCAACCTCTCTGGGGGACAGAGGC	1861

————— *ORF* —————

hsMRP9	AGAGGAT T A G C C T G G C C C G C G C T G T C T A C T C C G A C C G T C A	2211
pmmMrp9	AGAGGATCAGCCTGGCCCGTGCTGTGTATGCTAATCGTCA	1920
mmMrp9	AGAGGATCAGCCTGGCCCGTGCTGTGTATGCTAATCGTCA	1901

————— *ORF* —————

hsMRP9	GCTCTACCTGCTGGA C G A C C C C C T G T C G G C C G T G G A C G C C	2251
pmmMrp9	GCTCTACCTGCTGGATGACCCGCTCTCGGCTGTGGATGCC	1960
mmMrp9	GCTCTACCTGCTGGATGACCCGCTCTCGGCTGTGGATGCC	1941

————— *ORF* —————

hsMRP9	CACGTGGGGAAGCAC G T C T T T G A G G A G T G C A T T A G A G A G A	2291
pmmMrp9	CACGTGGGGAAGCATGTCTTTGAAGAATGCATTAAGAAGA	2000
mmMrp9	CACGTGGGGAAGCATGTCTTTGAAGAATGCATTAAGAAGA	1981

————— *ORF* —————

hsMRP9	C G C T C A G G G A A G A C A G T C G T C T G G T G A C C C A C C A G C T	2331
pmmMrp9	CACTCAAAGGGAAGACAGTTGTGCTGGTTACCCACCAGTT	2040
mmMrp9	CACTCAAAGGGAAGACAGTTGTGCTGGTTACCCACCAGTT	2021

————— *ORF* —————

hsMRP9	ACAGTTC T T A G A G T C T T G T G A T G A A G T A T T T A T T A T T A G A A	2371
pmmMrp9	GCAGTTCCTGGAGTCTTGTGATGAGGTCATTCTGTTAGAA	2080
mmMrp9	GCAGTTCCTGGAGTCTTGTGATGAGGTCATTCTGTTAGAA	2061

A Mrp9-Sequenz

	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GATGGAGAGATTTGTGAAAAGGGAAACCCACAAGGAGTTAA	2411
pmmMrp9	GATGGAGAGATCTGTGAAAAGGGCACCCACAAGGAGTTGA	2120
mmMrp9	GATGGAGAGATCTGTGAAAAGGGCACCCACAAGGAGTTGA	2101
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	TGGAGGAGAGAGGGGCGCTATGCAAAAAGCTGATTCACAACCT	2451
pmmMrp9	TGGAAGAGAGGGGGCGCTATGCAAAGCTTATCCACAACCT	2160
mmMrp9	TGGAAGAGAGGGGGCGCTATGCAAAGCTTATCCACAACCT	2141
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GCGAGGATTGCAGTTCAAGGATCCTGAAACACCTTTACAAT	2491
pmmMrp9	CCGGGGACTGCAATTCAAGGATCCAGAGCACATTTACAAT	2200
mmMrp9	CCGGGGACTGCAATTCAAGGATCCAGAGCACATTTACAAT	2181
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GCAGCAATGGTGGAAAGCCTTCAAGGAGAGCCCTGCTGAGA	2531
pmmMrp9	GTAGCCATGGTGGAGACCCTGAAGGAGAGCCCAGCTCAGA	2240
mmMrp9	GTAGCCATGGTGGAGACCCTGAAGGAGAGCCCAGCTCAGA	2221
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GAGAGGAAGATGCTGGTAAATCGTTTGGCTCCAGGAAA	2571
pmmMrp9	GGGATGAAGACGCTGGTACAGTCAGCTTGGCTTCAGGAGA	2280
mmMrp9	GGGATGAAGACGCTGT.....CTTGGCTTCAGGAGA	2252
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	TGAGAAAATGATGAAGGAAAAGAATCTGAAACAGGCTCAGAA	2611
pmmMrp9	TGAGAAAGGACGAAGGAAAAGAACCTGAAACAGN...NNNN	2317
mmMrp9	TGAGAAAGGACGAAGGAAAAGAACCTGAAACAGA...AGAA	2289
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	TTTGTAGACACAAAAGTTCCCTGAG...CACCAGCTCATCC	2648
pmmMrp9	NN	2357
mmMrp9	TTTGTGGACACAAACGCTCCCGCT...CACCAGCTCATCC	2326
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	AGACTGAATCCCCCAAGGAAGGAACCGTGACCTGGAAAAC	2688
pmmMrp9	AGACTGAATCCCCCAAGGAAGGAATCGTGACCTGGAAAAC	2397
mmMrp9	AGACTGAATCCCCCAAGGAAGGAATCGTGACCTGGAAAAC	2366

ORF

hsMRP9	ATATCACACGTACATTAAGGCTTCTGGAGGGTACCTCCTT	2728
pmmMrp9	ATATCACACGTATATCAAGGCTTCTGGAGGGTACCTGGTC	2437
mmMrp9	ATATCACACGTATATCAAGGCTTCTGGAGGGTACCTGGTC	2406

ORF

hsMRP9	TCCTCTCTTCACTGTGTTCTCTTCTCCTGATGATTGGCA	2768
pmmMrp9	TCCTTCTTGGTTTTGTGTCTCTTCTTCTGATGATGGGCA	2477
mmMrp9	TCCTTCTTGGTTTTGTGTCTCTTCTTCTGATGATGGGCA	2446

ORF

hsMRP9	GCCTGCTTTCAGCAACTGGTGGCTGGGTCCTCTGGTTGGA	2808
pmmMrp9	GCTCTGCTTTCAGCACCTGGTGGCTGGGGATCTGGTTAGA	2517
mmMrp9	GCTCTGCTTTCAGCACCTGGTGGCTGGGGATCTGGTTAGA	2486

ORF

hsMRP9	CAAGGGCTCAAGGATGACCTGTGGCCCCAGGGCAACAGG	2848
pmmMrp9	CAGGGGTTCACAGGTCGTCTGTGCATCCAGAACAAATAAG	2557
mmMrp9	CAGGGGTTCACAGGTCGTCTGTGCATCCAGAACAAATAAG	2526

ORF

hsMRP9	ACCATGTGTGAGGTCGGCGCGGTGCTGGCAGACATCGGTC	2888
pmmMrp9	ACAGCCTGCAACGTCGACCAGACCCTGCAAGACACCAAAC	2597
mmMrp9	ACAGCCTGCAACGTCGACCAGACCCTGCAAGACACCAAAC	2566

ORF

hsMRP9	AGCATGTGTACCAGTGGGTGTACACTGCAAGCATGGTGT	2928
pmmMrp9	ACCACATGTACCAGTTGGTTTACATAGCAAGCATGGTGT	2637
mmMrp9	ACCACATGTACCAGTTGGTTTACATAGCAAGCATGGTGT	2606

ORF

hsMRP9	CATGCTGTGTGTTTGGCGTCAACAAAGGCTTCGTCTTCACC	2968
pmmMrp9	TGTGTTGATGTTTGGCATCATCAAAGGCTTTACCTTCACC	2677
mmMrp9	TGTGTTGATGTTTGGCATCATCAAAGGCTTTACCTTCACC	2646

ORF

hsMRP9	AAGACCACTGATGGCAATCCTCCTCTCTGCATGACACGG	3008
pmmMrp9	AACACTACACTGATGGCGTCTTCTCCTCTCCACAACAGAG	2717
mmMrp9	AACACTACACTGATGGCGTCTTCTCCTCTCTCCACAACAGAG	2686

A *Mrp9*-Sequenz

	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	TGTTT G ATAAGATCTTAAAGAGCCCAATGAGTTTCTTTGA	3048
pmmMrp9	TATTTAA C AAGATCGTCAGGAGCCCAATGAGCTTCTTCGA	2757
mmMrp9	TATTTAATAAGATCGTCAGGAGCCCAATGAGCTTCTTCGA	2726
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	CAC G ACTCCCACTGGCAGGCTAATGAACCGTTTTC C AA G	3088
pmmMrp9	CACA A CTCCCA C AGGCCGGCTAATGAACCGCTTCTCTAAA	2797
mmMrp9	CACA A CTCCCA C AGGCCGGCTAATGAACCGCTTCTCTAAA	2766
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	G ATATGGACGAGCTGGATGTGAGGCTGCCGTTTCACGCA G	3128
pmmMrp9	GACATGGACGAGCTGGACGTGAGGCTGCCGTTTCACGCCG	2837
mmMrp9	GACATGGACGAGCTGGACGTGAGGCTGCCGTTTCACGCCG	2806
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	AGA A CTTTCTGCAGCAGTTTTTTATGGTGGTGTTTATTCT	3168
pmmMrp9	AGA A CTTTCTGCAGCAGTTTTTTATGGTGGTGTTTATTCT	2877
mmMrp9	AGA A CTTTCTGCAGCAGTTTTTTATGGTGGTGTTTATTCT	2846
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	CGTGATCT T TGGCTGCTGTGTTTCCTGCTGTCCTT T TAGT C	3208
pmmMrp9	GGTGATCATGGCTGCCGTGTTTCCTGTTGTCCTTGTGGTG	2917
mmMrp9	GGTGATCATGGCTGCCGTGTTTCCTGTTGTCCTTGTGGTG	2886
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GTGGC C A G CCCTTGCTGTA G GCCTTCTTCATTCTGTTACGCA	3248
pmmMrp9	CTGGCTGGCCTGGCTGTAATCTTCCTCATTCTTTTACGCA	2957
mmMrp9	CTGGCTGGCCTGGCTGTAATCTTCCTCATTCTTTTACGCA	2926
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	T TTTCCAC A GAGGAGTCCAGGAGCTCAAG A AGGTGGAGAA	3288
pmmMrp9	TCTTCCATCGAGGAGT T CAGGAGCTCAAGCAGGTGGAGAA	2997
mmMrp9	TCTTCCATCGAGGAGTCCAGGAGCTCAAGCAGGTGGAGAA	2966
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	TGTCAGCCGGTCACCC C TGGTTCA C CCACATCACCTCCTCC	3328
pmmMrp9	CATCAGCCGGTCACCTTGGTTCTCTCACATCACCTCCTCC	3037
mmMrp9	CATCAGCA A GGTCACCTTGGTTCTCTCACATCACCTCCTCC	3006

————— *ORF* —————

hsMRP9	ATGCAGGGCCTGGGCATCATTCACGCCTATGCAAGAAGG	3368
pmmMrp9	ATACAGGGTCTGGGCGTCATCCACGCCTACGACAAAAAGG	3077
mmMrp9	ATACAGGGTCTGGGCGTCATCCAATGCCTACGACAAAAAGG	3046

————— *ORF* —————

hsMRP9	AGAGCTGCATCACCTA.....	3384
pmmMrp9	ACGACTGCATCAGCAA.....	3093
mmMrp9	ACGACTGCATCAGCAAGTTTAAGACACTCAACGACGAAAA	3086

————— *ORF* —————

hsMRP9TACACCTCCTCTACTTTAACTGTGCTCTCAGGTGG	3418
pmmMrp9CCACCTCCTGTACTTTCAACTGCGCGCTCAGGTGG	3127
mmMrp9	CTCCAGCCACCTCCTGTACTTTCAACTGCGCGCTCAGGTGG	3126

————— *ORF* —————

hsMRP9	TTTGCCTGAGAATGGATGTCCTCATGAACATCCTTACCT	3458
pmmMrp9	TTTGTCTCAGAATGGACATTTCTCATGAACATTGTCACCT	3167
mmMrp9	TTTGTCTCAGAATGGACATTTCTCATGAACATTGTCACCT	3166

————— *ORF* —————

hsMRP9	TCACGTGTGGCCTTGTGGTGACCCTGAGTTTCTCCTCCAT	3498
pmmMrp9	TTGTTGTGGCCTTGTGGTGACCCTTAGTTTTTCTTCAAT	3207
mmMrp9	TTGTTGTGGCCTTGTGGTGACCCTGAGTTTTTCTTCAAT	3206

————— *ORF* —————

hsMRP9	CAGTACTTCATCCAAAGGCCGTGTCATTGTCAATACATCATC	3538
pmmMrp9	CAGCGCTTCATCCAAAGGCTTGTGTCATTGTCTTACATCATC	3247
mmMrp9	CAGCGCTTCATCCAAAGGCTTGTGTCATTGTCTTACATCATC	3246

————— *ORF* —————

hsMRP9	CAGCTGAGCGGACGTGCTTCAAGTGTGTGTGCGAACGGAA	3578
pmmMrp9	CAGCTCAGTGGATTGCTTCAAGTGTGTGTGCGAACAGGAA	3287
mmMrp9	CAGCTCAGTGGATTGCTTCAAGTGTGTGTGCGAACAGGAA	3286

————— *ORF* —————

hsMRP9	CAGAGACGCAAGCCAAATTCACCTCCGTGGAGCTGCTCAG	3618
pmmMrp9	CAGAGACCCAAGCCAAAGTTACACCTCCGCAGAGCTACTGAG	3327
mmMrp9	CAGAGACCCAAGCCAAAGTTACACCTCCGCAGAGCTACTGAG	3326

A Mrp9-Sequenz

	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GGAATACATTTCTGACCTGTGTTTCTGAAATGCACTCATCCC	3658
pmmMrp9	GGAGTACATTTTGGACCTGTGTTTCTGAAACACACTCACCCC	3367
mmMrp9	GGAGTACATTTTGGACCTGTGTTTCTGAAACACACTCACCCC	3366
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	CTCAAAGTGGGGACCTGTCCCAAGGACTGGCCAGCTGTG	3698
pmmMrp9	TTCAAAGTGGGGACCTGTCCCAAGACTGGCCGAGCCGAG	3407
mmMrp9	TTCAAAGTGGGGACCTGTCCCAAGACTGGCCGAGCCGAG	3406
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GGGAGATCACCTTTCAGAGACTATCAGATGAGATACAGAGA	3738
pmmMrp9	GGGAGATAACGTTCAAGGACTATCGGATGAGATACAGAGA	3447
mmMrp9	GGGAGATAACGTTCAAGGACTATCGGATGAGATACAGAGA	3446
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	CAACACCCCTCTTGTCTCGACAGCCTGAACTTGAACATA	3778
pmmMrp9	CAACACCCCTCTCGTCTTGTATGGCCTGAACTTGAACATC	3487
mmMrp9	CAACACCCCTCTCGTCTTGTATGGCCTGAACTTGAACATC	3486
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	CAAAGTGGGCAGACAGTCTGGGATTGTGGGAAGACAAGGT	3818
pmmMrp9	CAAAGCGGGCAGACAGTGGGATTGTGGGAAGGACGGGCT	3527
mmMrp9	CAAAGCGGGCAGACAGTGGGATTGTGGGAAGGACGGGCT	3526
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	CCGGAAAATCATCGTTAGGAATGGCTTTGTTTCGTCTGGT	3858
pmmMrp9	CCGGAAAATCATCCCTGGGCATGGCCCTGTTTCGTCTGGT	3567
mmMrp9	CCGGAAAATCATCCCTGGGCATGGCCCTGTTTCGTCTGGT	3566
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GGA GCCAGCCAGTGGCACAAATCTTTATTGATGAGGTGGA	3898
pmmMrp9	GGAACCAGCCTCTGGTACCATCATCATTGACGAGGTGGAC	3607
mmMrp9	GGAACCAGCCTCTGGTACCATCATCATTGACGAGGTGGAC	3606
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	ATCTGCATTCCTCAGCTTGGAAAGACCTCAGAACCAAGCTGA	3938
pmmMrp9	ATCTGCACCTGTGGGTCTGGAAAGACCTCCGAACCAAGCTGA	3647
mmMrp9	ATCTGCACCTGTGGGTCTGGAAAGACCTCCGAACCAAGCTGA	3646

	<i>ORF</i>	
hsMRP9	CTGTGATCCCACAGGATCCTGTCCTGTTTGTAGGTACAGT	3978
pmmMrp9	CCATGATCCCCCAGGATCCTGTCCTGTTTGTAGGTACAGT	3687
mmMrp9	CCATGATCCCCCAGGATCCTGTCCTGTTTGTAGGTACAGT	3686
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	AAGGTACAACCTTGGATCCCTTGGAGAGT CACACCGATGAG	4018
pmmMrp9	AAGGTACAACCTTGGACCCCTTGGGGAGCCACACCGACGAG	3727
mmMrp9	AAGGTACAACCTTGGACCCCTTGGGGAGCCACACCGACGAG	3726
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	ATGCTCTGGCAGGTTCTGGAGAGAACAATTCATGAGAGACA	4058
pmmMrp9	ATGCTCTGGCAGGTTTTGGAAAGAACGTTTCATGAGAGACA	3767
mmMrp9	ATGCTCTGGCATGTTTTGGAAAGAACGTTTCATGAGAGACA	3766
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	CAATAATGAAACTCCAGAAAAATTACAGGCAGAAGTCAC	4098
pmmMrp9	CAATAATGAAACTCCAGAGAAATTACAGGCAGAAGTCAC	3807
mmMrp9	CAATAATGAAACTCCAGAGAAATTACAGGCAGAAGTCAC	3806
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	AGAAAATGGAAGAAAACCTTCTCAGTAGGGGAACGTCAGCTG	4138
pmmMrp9	AGAAAATGGGAGAAAACCTTCTCAGTAGGAGAACGCCAGCTG	3847
mmMrp9	AGAAAATGGGAGAAAACCTTCTCAGTAGGAGAACGCCAGCTG	3846
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	CTTTGTGTGGCCCGAGGCTCTTCTCCGTAATTCAAAGATCA	4178
pmmMrp9	CTTTGTATGGCCCGGGCACTTCTCCGTAATTCAAAAATCA	3887
mmMrp9	CTTTGTATGGCCCGGGCACTTCTCCGTAATTCAAAAATCA	3886
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	TTCTCCTTGATGAAGCCACC GCCTCTATGGA CTCCAAGAC	4218
pmmMrp9	TTCTCCTTGATGAAGCTACTGCCTCCATGGATTCCAAGAC	3927
mmMrp9	TTCTCCTTGATGAAGCTACTGCCTCCATGGATTCCAAGAC	3926
	<i>ORF</i>	
hsMRP9	TGACACCCTGGTTCAGAACACCATCAAAGATGCCTTCAAG	4258
pmmMrp9	AGACACCCTTGTTCAGAGCACCATAAAGGAGGCCTTCAAA	3967
mmMrp9	AGACACCCTTGTTCAGAGCACCATAAAGGAGGCCTTCAAA	3966

A Mrp9-Sequenz

	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GGCTGCAC TGTGC TGACCATCGC CCA CCGCCTC AACACA G	4298
pmmMrp9	AGCTGCACAGTGT TGACCATCGCTCATCGCCTGAACACCG	4007
mmMrp9	AGCTGCACAGTGT TGACCATCGCTCATCGCCTGAACACCG	4006
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	TTCTCAACTG C GAT CACGTCCTGGT TATGGAAAATGGGAA	4338
pmmMrp9	TTCTCAACTGTGACCTTGTCTTGGTGTATGGAAAATGGGAA	4047
mmMrp9	TTCTCAACTGTGACCTTGTCTTGGTGTATGGAAAATGGGAA	4046
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	GGTGATTGAGTTTGACAAGCCTGAAGTCCTT GCA GAGAAG	4378
pmmMrp9	GGTGATTGAGTTTGACAAGCCTGAAGTCCTCGCTGAGAAG	4087
mmMrp9	GGTGATTGAGTTTGACAAGCCTGAAGTCCTCGCTGAGAAG	4086
	————— <i>ORF</i> —————	
hsMRP9	CCAGAT TCTGCATTTGCGATGTTACTAGC AGCAGAA GTCA	4418
pmmMrp9	CCC GACTCTGCATTTGCGATGTTACTAGCTGCA GAGGTTG	4127
mmMrp9	CCT GACTCTGCATTTGCGATGTTACTAGCTGCAGAGGTTG	4126
	—— <i>ORF</i> →	
hsMRP9	GAT TGTAGAGGTCCTG	4434
pmmMrp9	GACTGTAAAGGTCCTG	4143
mmMrp9	GACTGTAAAGGTCCTG	4142

Abb. 34. Vergleich der potenziellen Maus-Mrp9 Sequenz (pmmMrp9) mit der humanen Sequenz (hsMRP9, AY040220) und der publizierten Mausequenz (mmMRP9, AF502146). Zwischen Sequenzen übereinstimmende Basen wurden dunkel schattiert dargestellt. In der potenziellen Maus-Mrp9 Sequenz wurden die für die RT-PCR verwendeten *Primer* hell schattiert dargestellt.

B Genotypisierung

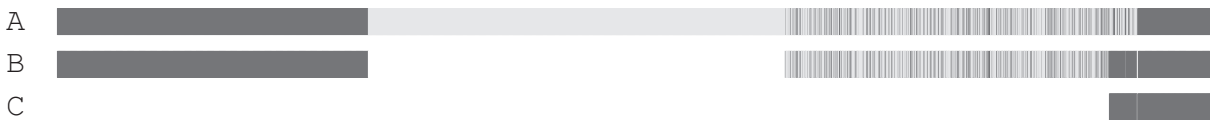


Abb. 35. Übersicht über einen Teil des Maus-Chromosoms 16 (A), die potenzielle im *Mrp1-Knockout* veränderte Sequenz (B) und den sequenzierten Teil aus dem *Mrp1-Knockout*-Genom (C).

	<i>mmMRP1ko.for</i>	
A	CTGAGGATTAGTGTTGACCTCTGGCCACCCCAAGTATACACACAT	49
B	CTGAGGATTAGTGTTGACCTCTGGCCACCCCAAGTATACACACAT	49
C	0
A	GTACACAAACATAAAGACAACAGTTGATAAGGCCATTCTGGAACT	94
B	GTACACAAACATAAAGACAACAGTTGATAAGGCCATTCTGGAACT	94
C	0
A	CAGCTCTGGTCTCTCTGCGCAGCCCCTCAGTGTTTTGAATCTTTT	139
B	CAGCTCTGGTCTCTCTGCGCAGCCCCTCAGTGTTTTGAATCTTTT	139
C	0
A	TCCAGACCTGGCCTGTTACCCTGGTCTTCTGTCTTCTGAATTTTC	184
B	TCCAGACCTGGCCTGTTACCCTGGTCTTCTGTCTTCTGAATTTTC	184
C	0
A	TCAGCCAAGTTGTCACTGGGGACAAAGTGTTGTGGTGTTCAGATAG	229
B	TCAGCCAAGTTGTCACTGGGGACAAAGTGTTGTGGTGTTCAGATAG	229
C	0

B Genotypisierung

A	GCGAATACCCTCTATCAGTTCTCTTGGGTGACATGTAGCAAGCCC	274
B	GCGAATACCCTCTATCAGTTCTCTTGGGTGACATGTAGCAAGCCC	274
C	0
A	CTGGGCTCTGTGTTGCCTGGGCTTTGTAATACATTTACATTGGGC	319
B	CTGGGCTCTGTGTTGCCTGGGCTTTGTAATACATTTACATTGGGC	319
C	0
A	CCCTGAGGCCATGGCCCTCCTTGCCCCACACTCTTGGAGGTCTTC	364
B	CCCTGAGGCCATGGCCCTCCTTGCCCCACACTCTTGGAGGTCTTC	364
C	0
A	AGGTGTTGACCAGCACACCCTTGGCAGGGAGGGTATAGGACATTG	409
B	AGGTGTTGACCAGCACACCCTTGGCAGGGAGGGTATAGGACATTG	409
C	0
A	TGTTATTTTCAGGCTCCTCATTGTGTCCTTGCAGCATCACCTTCTC	454
B	TGTTATTTTCAGGCTCCTCATTGTGTCCTTGCAGCATCACCTTCTC	454
C	0
A	CATTCCTGAAGGAGCCCTTGTGGCCGTGGTGGGCCAGGTAGGCTG	499
B	CATTCCTGAAGGAGCCCTTGTGGCCGTGGTGGGCCAGGTAGGCTG	499
C	0
<i>mmMRP1ko.rev</i>		
A	CGGGAAGTCATCTCTGCTGTCAGCCCTGCTGGCTGAGATGGACAA	544
B	CGGGAAGTCATCTCTGCTGTCAGCCCTGCTGGCTGAGATGGACAA	544
C	0
A	GGTGGAGGGACATGTGACTCTCAAGGTAGGATGGGGACCAGGATG	589
B	GGTGGAGGGACATGTGACTCTCAAGGTAGGATGGGGACCAGGATG	589
C	0
A	GGGAGAGATGGTCTGGGAGGAAGGCTCAGCCCAGTGTCTCTTACA	634
B	GGGAGAGATGGTCTGGGAGGAAGGCTCAGCCCAGTGTCTCTTACA	634
C	0
A	AACTGTCAAAGAAGCAGCCATCTCGGCTCATCTAGGAAAGCAAG	679
B	AACTGTCAAAGAAGCAGCCATCTCGGCTCATCTAGGAAAGCAAG	679
C	0

A	GTTTCAGTGACAGCCACTTCTTTCTTTGCTCAGTGCCTTGGCCAG	724
B	GTTTCAGTGACAGCCACTTCTTTCTTTGCTCAGTGCCTTGGCCAG	724
C	0
A	TGTGACATGTGATAGCTGCTCAGTCAACAGGCCGTGAATGCTTAG	769
B	TGTGACATGTGATAGCTGCTCAGTCAACAGGCCGTGAATGCTTAG	769
C	0
A	ATGTACTGCCGAGGAGTGCTTGTTCATGGCTCTTGCCTTCCTTCT	814
B	ATGTACTGCCGAGGAGTGCTTGTTCATGGCTCTTGCCTTCCTTCT	814
C	0
A	GAATTTGTTTTATTTCACTTCACATGATCTCCAGCCCCAACCAT	859
B	GAATTTGTTTTATTTCACTTCACATGATCTCCAGCCCCAACCAT	859
C	0
A	TTCCTGTTTTCTGGCTGAATAATACACGAGGGTGTGTGTGTGTG	904
B	TTCCTGTTTTCTGGCTGAATAATACACGAGGGTGTGTGTGTGTG	904
C	0
A	TGTGCGTGTGCGTGTGCGTGTGCGTGTGTTGAAAGCAGAAAGGGC	949
B	TGTGCGTGTGCGTGTGCGTGTGCGTGTGTTGAAAGCAGAAAGGGC	949
C	0
A	TGTTTGAGGGAGGAAGAAACCAAGAAAGGGAGAGGCACAATGGTG	994
B	TGTTTGAGGGAGGAAGAAACCAAGAAAGGGAGAGGCACAATGGTG	994
C	0
A	AATATGACC AAAATACAATGATGTATCTGCCTGAAAATGTCGGAC	1039
B	AATATGACC AAAATACAATGATGTATCTGCCTGAAAATGTCGGAC	1039
C	0
A	AGAGGGAAGGAGGGGTAAAGACTCTGGAGGATCTCCAGCATCCT	1084
B	AGAGGGAAGGAGGGGTAAAGACTCTGGAGGATCTCCAGCATCCT	1084
C	0
A	GTCAGGGAAGGCTCCCCAACCCCGCTCTCACTTCATCCTGTGG	1129
B	GTCAGGGAAGGCTCCCCAACCCCGCTCTCACTTCATCCTGTGG	1129
C	0

B Genotypisierung

A	TCTCTGGATAGAACCTTCTGGCTTCTTCTTTCTTTTGAATCTTGT	1174
B	TCTCTGGATAGAACCTTCTGGCTTCTTCTTTCTTTTGAATCTTGT	1174
C	0
A	AAATAGGGCATAACTTCAGTACTGATTGATGTGGCTGGAATAATC	1219
B	AAATAGGGCATAACTTCAGTACTGATTGATGTGGCTGGAATAATC	1219
C	0
A	TCAGAACCTGGTGTAAGAAACACATTTTAAATCTTTAGTGTTACT	1264
B	TCAGAACCTGGTGTAAGAAACACATTTTAAATCTTTAGTGTTACT	1264
C	0
A	TGAATTCTTAATACGGGCCTGGAGGGAAAGCGTGTGGCTTTAGCA	1309
B	TGAATTCTTAATACGGGCCTGGAGGGAAAGCGTGTGGCTTTAGCA	1309
C	0
A	ATTCAAGGCCCAGCATGCTCTGAGCTGAGCTAAACTTTCTGTGAG	1354
B	ATTCAAGGCCCAGCATGCTCTGAGCTGAGCTAAACTTTCTGTGAG	1354
C	0
A	TTGACGGCTGCTGTGAAAATGAGTCTCTTGGGACTTTTCTACAAG	1399
B	TTGACGGCTGCTGTGAAAATGAGTCTCTTGGGACTTTTCTACAAG	1399
C	0
A	TGCTTTATTCCCTTGGAGGCCTTTGCCTGCTATGTAAATAAGATC	1444
B	TGCTTTATTCCCTTGGAGGCCTTTGCCTGCTATGTAAATAAGATC	1444
C	0
A	CAGAGTATCACCAGCAGCCTCTGGAGCAGCTGGGGATAAAAAAAC	1489
B	CAGAGTATCACCAGCAGCCTCTGGAGCAGCTGGGGATAAAAAAAC	1489
C	0
A	ACAATACAACCCCAGCTATTTTGCTTGAGCCAGCTTGTGCCAGAT	1534
B	ACAATACAACCCCAGCTATTTTGCTTGAGCCAGCTTGTGCCAGAT	1534
C	0
A	GTGTTTGCCTGTACCTGCCTGTCATCTGCATCCCCTTCCCCTGAG	1579
B	GTGTTTGCCTGTACCTGCCTGTCATCTGCATCCCCTTCCCCTGAG	1579
C	0

A	AACTCGAGTGTGGGGATGTGGTCTTACGTCACTGTTTGATTTCAA	1624
B	AACTCGAGTGTGGGGATGTGGTCTTACGTCACTGTTTGATTTCAA	1582
C	0
A	TCCAGATCTTCCCCTTGCTGGTTCAGTGCTCTTTGGAAGTAAGTG	1669
B	TCCAGATCTTCCCCTTGCTGGTTCAGTGCTCTTTGGAAGTAAGTG	1582
C	0
A	AGCAGCATCTGGGTCCAGGCAGATAGCTGCTGCTTCTGGATGTGC	1714
B	AGCAGCATCTGGGTCCAGGCAGATAGCTGCTGCTTCTGGATGTGC	1582
C	0
A	TCGCTTGTTTCTTCCAACATGCCCAAGGTTGACAAAGGGAAATTG	1759
B	TCGCTTGTTTCTTCCAACATGCCCAAGGTTGACAAAGGGAAATTG	1582
C	0
A	TTTGTCATTAGATCCATGCTGCAGTCTGTTTCATAGTTCCTGGGT	1804
B	TTTGTCATTAGATCCATGCTGCAGTCTGTTTCATAGTTCCTGGGT	1582
C	0
A	TCCTGCCATCCCAGGCACTGGTGCCCTGTGTCCAAGAACTATTTA	1849
B	TCCTGCCATCCCAGGCACTGGTGCCCTGTGTCCAAGAACTATTTA	1582
C	0
A	TAGCTGGTGATTTTCAGAAAGTATATTGAAAGTGTTAGTTTTCCC	1894
B	TAGCTGGTGATTTTCAGAAAGTATATTGAAAGTGTTAGTTTTCCC	1582
C	0
A	AGTGTCTTGGTAGACATGGCCTATGGCTGAGTATTTTTTGAGCTG	1939
B	AGTGTCTTGGTAGACATGGCCTATGGCTGAGTATTTTTTGAGCTG	1582
C	0
A	TACAATTGAGGGGTCCTGACACTTGAGGCTCATAGAAACTGGAAT	1984
B	TACAATTGAGGGGTCCTGACACTTGAGGCTCATAGAAACTGGAAT	1582
C	0
A	GTTTAAATAGCAATTTGGTCTTTTTTTTTTCTGAGATTTTAGATA	2029
B	GTTTAAATAGCAATTTGGTCTTTTTTTTTTCTGAGATTTTAGATA	1582
C	0

B Genotypisierung

A	CAGATTTAGGTCATTGATTTCTATTCCTGTAGTTTAGAATCCTTT	2074
B	1582
C	0
A	GTGACTTTCTATCACCTTTTTTTTTTTTGGATAAAGGTGGGCATGA	2119
B	1582
C	0
A	CACTAGCCATGTGTGAACTAATCCCTGACACCTGCTTTCCTGCTG	2164
B	1582
C	0
A	TCCTGCTGTCCCATGAGTTGTCCTTGACCAGTCAAGCTGGCCTTT	2209
B	1582
C	0
A	CTGTCCCTTAAAGGAGTTGGATTCTTTTGTTTCCTTGTCTGTTGTT	2254
B	1582
C	0
A	CCAGTGGATCAGTGCCCTCCTTTCTTCTTATCCTGGCTGTGTGTG	2299
B	1582
C	0
A	TTTTGGGAAGTTGGTTCTTTTCACAGGCAGGTGTCTGCTGTTGTC	2344
B	1582
C	0
A	TTTTTATCAAGTCTGTCTGTCTTTTCCACTGCCTGCCACACAGGG	2389
B	1582
C	0
A	CTCCGTGGCCTACGTGCCCCAGCAGGCCTGGATTCAGAATGACTC	2434
B	1582
C	0
A	TCTCCGAGAGAACATACTGTTTGGGCACCCCCTGCAGGAAAATTA	2479
B	1582
C	0

A	CTACAAGGCAGTTATGGAAGCCTGTGCCCTTCTTCCAGATTTGGA	2524
B	1582
C	0
A	AATCCTGCCCAGTGGGGACCGCACAGAGATCGGTGAGAAGGTGAG	2569
B	1582
C	0
A	TGTGACATGGGTACAGCTGGCAGCATCAGCTGCTGCTGTGTGACA	2614
B	1582
C	0
A	AACTTTGTTGGGACCGCCTGTGAGTGGATTGTCAGGGACCTGCTG	2659
B	1582
C	0
A	TCTCTAGCCTGTGGCTAAGCTCCTTTTGCCATGCTATGTAAGTCT	2704
B	1582
C	0
A	GGCCAGGGTATCCACCATATGGCTCTTGGTGCTGTGGTCTTAGTT	2749
B	1582
C	0
A	GAGGTGTCAGTCGCCATCTAAGTGGGAGCCTCTCACGTGGTGATG	2794
B	1582
C	0
A	TAGAGTAAGAGAATAAAAAGCCAAAGGTATGCTGTGCTTTGCCACA	2839
B	1582
C	0
A	TACTGTGCCACCCGCAGGACAAGACAAGGTCACAGTGTACCTAGG	2884
B	1582
C	0
A	GGATGTGCATACGAGTGATGATGGGGACTGATGATGGGGACGGCT	2929
B	1582
C	0

B Genotypisierung

A	CTAGACTAGCTGGTACCCACTTCTCTCTGCTGCCATACTAACATT	2974
B	1582
C	0
A	TTTAACCTAAGTCATCTGCATGGTAGCTCATGAGAGGGGTTTGCT	3019
B	1582
C	0
A	CTGATCCCTAATGCACTGCTGAGGAAAGGGAGGCTCAGGGAGGCC	3064
B	1582
C	0
A	AGCAGACTTGCCTGATGCCGAGTCCCAGGGAAAGAGATTCTTAAG	3109
B	1582
C	0
A	TCCCTCCTGTCCCCTGTTCTGCTGCCACTTTGGAAGAGGGACGAG	3154
B	1582
C	0
A	ACTCCCAGCCCATTTGCTGTGGGGCAAGTGATTGTCTTGTGTGTG	3199
B	1582
C	0
A	TGCTGGAAGTGCAGCCACCTCCAGTGTGAGGGACCTCTTGGGAGA	3244
B	1582
C	0
A	GCTGAGTTTGTCTGTTCCCTAGTCTCCAGCCAAGGATCTTCTCCCC	3289
B	1582
C	0
A	AGCTTGCTTATTTGATGCATGGTGTCTTTACTTGGCATGGACCTG	3334
B	1582
C	0
A	GAGATCCTTTGGGTTGCCTAGGACCCTTGTTTAAATAGGTTGGAG	3379
B	1582
C	0

A	GTGCCAAGCAAACCGAAGGGTCTAAGTATTATGTGGGATCCAAGG	3424
B	1582
C	0
A	CAGGATTGCCAGGGTCTTCGAAACAGGCTGGGGGTGGTTGGCAG	3469
B	1582
C	0
A	CCTGCTTATCAGCCTTTCCCGTTTTGTTAATGCTGGGATCTCGCA	3514
B	1582
C	0
A	CTTGGAGATACCTGACTGTCCCTTCTAGTCTCAGTGCCAGAGTT	3559
B	1582
C	0
A	TGAAGGGAGTCAAGGGTTGACTGATTTTGTCTACTTCAGTTCAAT	3604
B	1582
C	0
A	ATGCAGGGACTAAAGGGATCTTCTTTAACTGGGCCTATCATCCCA	3649
B	1582
C	0
A	GAATGCAGGAAGCTGAGGCAGGAGAATAGGTAACCAGCAAGATCC	3694
B	1582
C	0
A	CATCTCAAATAA C ATACTAAAAT G GATAG G CAAT G TGGCTTAAT	3739
BGCGGGG C TCCGGGCGGCC G CCGG G GGCC G GGGCGGGCG	1620
C	0
A	GGTAG A AATA C TT G TTTAGT A TGG G CAA A GG C CCCGAG C CCCAT C C	3784
B	CCGG G CGGC C CG G GGCGT C AG G CG G CGGG G CGGTGT C CGGC G C	1665
C	0
A	C TAGCTCT G CCTATATATGT G T C T ATGTATATCA T ATGTATATGT	3829
B	C CCCAGAG G AACTGCGCCAGT T C T CTCCGGATCGG T GAAGCCGGAG	1710
C	0

B Genotypisierung

A	ATATC	ATATG	TATATG	TATATG	TATTAT	ATATG	TATATG	TATATG	TATATG	ATA	3874		
B	AGATC	CAGCG	GGGTCT	CTCGA	ACACCT	TCGA	AGT	CGTGC	AGG	AAG	1755		
C										0		
A	TGG	GAGCT	GGCTA	CTAGG	ATCAGT	CTTGG	CA	CAGATT	GGGTC	CAGT	3919		
B	GTG	AAGGC	GAGCAG	TTCG	CGGGC	GAAGTC	CT	CGGTCC	GCTTC	CAC	1800		
C										0		
A	TTACT	CAGTAG	GTGTC	AC	TGGGC	ATTTGAG	CTGTAC	ATGG	CCACA	3964			
B	TGCGC	CCCGTC	GAGCAG	CG	GGC	CAGGATCT	CGCGGTC	G	CCCGG	1845			
C										0		
A	GTG	TGGT	CCCTC	ATT	GTTGG	AAGTT	GGT	TGCTG	CTCAGT	GC	4009		
B	AA	GGC	GT	TGAGAT	GCA	GTTGC	ACCAG	GCT	GTAGCGG	GAGTCTCC	1890		
C										0		
A	TGA	ACCCTTC	CTCTG	TGAGT	GAA	GTGCC	TGG	TGC	CGCCAG	CTT	4054		
B	GC	ATAGACGT	CGGT	GAAGTC	GAC	GAT	CCCGG	TGAC	CTCGGT	CGCG	1935		
C										0		
A	CA	CTCTGTG	ACTTTA	ATAGGAA	TGGTAG	CTCAT	GGTGA	AAGCT	CAC	4099			
B	GC	CAGGTCC	ACGAAG	AIGTTGG	TCCCGT	GCAGGT	CGCCGT	GGACG	1980				
C										0		
A	CAC	AGA	AACACT	TAAACAG	CAA	CAGT	AGGTGT	GT	CAGCT	ACTTGC	CTA	4144	
B	AAC	CGGGG	TTCGCG	CCGGC	GGC	CAGC	AGCGT	GT	CACG	TCCGGC	AGC	2025	
C										0		
A	ATAATA	TAATA	GGTA	TACA	AAATA	ACTAT	C	TTT	GTC	ATCCA	CAC	4189	
B	CAGTCC	TCCAG	GCGGT	TC	CAGC	AGCCGGG	CGAGA	GGT	AG	CCCC	CAC	2070	
C										0		
A	TGTGTC	TTCT	TATAG	ACTCT	TC	TATAG	GCT	GATG	AGTTT	AAG	ATA	4234	
B	CCGCGG	TGGT	CTCG	ACGG	TC	GCCGC	GCG	GCGT	TCCG	CA	AGC	AGT	2115
C										0		
<i>mmMRP1g.for</i>													
A	CC	ATTAGCTG	CCG	CTTCC	TCCTCTT	CT	GTTGG	CACTAC	AGACCC	CC	4279		
B	T	CCGGGAAGA	CC	TCCGGA	TGGGGG	TGAG	CACGGT	GTTCC	CGGT	CC	2160		
C										0		

A	GGGACAGGCTGGGCTCATGTTCTGTAACTGAGCTGCACCCGCAGC	4324
B	AGCGGCACCCCTGTGCAGCCGGCCGAGCACCCGGCCGAGTTCGC	2205
C	0
A	CTTCTTTTACTTTTCAGTTGAGATGTTGCCAGGCCTACTTTGA	4369
B	GCAGGGCGAGCAGCGCGTTCCGGTTCGGTCTGTGCCGTCATCGCG	2250
C	0
A	ACTTGCCGTCCTCCTGCTCTCAGGCTCTGAGCAGCTGGACTGA	4414
B	GACCGCCAGGTGGTGCCTGGTCAATCCGGCTCATCACCAGGTAGG	2295
C	0
A	TAGACGTGCCAGCAGGCCTGACTGTCTACTTCCCTCCCTGAGTA	4459
B	CACGGCCAGGCTCCGGTGCCGGGCCGCAAGCTCGCCGCGGCCGAGG	2340
C	0
A	TGTGCTGGGGGCAGGTGCCCAAGTCAAGCAGCTCTTCTGTCCCA	4504
B	AGGCGGGGCACCGGCACCGGGGCCTCGCCAGGACCGCGTACGCC	2385
C	0
A	TTCTTGTTTTGTATGGTTCTGGGGTCTGCGGATCCCAAGAAA	4549
B	TCGACTCCGACGCGAGGCTCTCCGGACCACACCAGTGCTCGCC	2430
C	0
A	CACTCTTCCCACTGTCTTCTAGGGTGTGAACCTGTCAGGGGGCC	4594
B	AACAGCTTIGATCACCGGGTCCGGCTCGCCGACCAGTACGGGGTTG	2475
C	0
A	AGAAGCAGCGTGTGAGCCTGGCCCGGGCTGTGTACTCTAACTCTG	4639
B	GTGCTCTCGCCGGGCAACCAGCAGCACCGGCGGCACCGGCAGCCCG	2520
C	0
A	ACATCTACCTCTTTGATGACCCCTCTCGGCTGTGGATGCAATG	4684
B	AGCTCCTCCAGGGCTCGCGGGCCAGCGGCTCCAAGAAATTCCTGG	2565
C	0
A	TTGGGAAGCACATCTTTGAGAAGGTGGTTGGTCCATGGGCCCTAC	4729
B	TCGTTCCGCAAGGCTCGCGTAGGAATCATCCGAATCAATACGGTCG	2610
C	0

B Genotypisierung

		<i>mmMRP1g.rev</i>	
A	TGAAGAACAAGGTATTCTCCCAGGGCCAGGACTTCAGTTGATTGA		4774
B	AGAAGTAAACAGGGATTCTTGTGTACAGCGGACCTCTATTTCACAG		2655
C		0
		<i>mmMRP1g.rev</i>	
A	CAGTGTGGCCTTGGACAAGTCTTTGATCCTTGGGCTTGCTTTCAT		4819
B	GGTACGGGCCGGCTTAATTCGACACGGCCGGTCGCGACACGGCCT		2700
C		0
A	GCGTCCCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT		4864
B	GTCCGCAACGCGGGTTCAGGCGTGTGACGATGACGGGCTGTGCGGCCA		2745
C		0
A	GTGTGTGTTAGCCAGCACTGAGGAGGCTGAGATGGAAGAGTTAG		4909
B	CGTCCGGGACGTTCTCGGTGGTGTCTGCGGTCGGGATCGCCAAICT		2790
C		0
A	GCTAGCCTGGCCTATACAGCAAGAACTTACCCTTAAAAGACAAGGG		4954
B	CTACGGGCCGACCGAGGCACGGTGTACGCCACCGCCTGGTTCTG		2835
C		0
A	CTTGGGATGCAGCCTTGTGTAGGGTGCCTGCCTAGTGTGCAAGAG		4999
B	CGACGGCGAGGCGCCGCCAGGCCCCGCGATCAGGTCGAAAGGCC		2880
C		0
A	GCTTTGAATTTAGTCCCAGTACTGCAAAACACACAATGGCTCTTA		5044
B	CGGAGATGAGGAAGAGGAGAACAGCGCGGCAGACGTGCGCTTTTG		2925
C		0
A	ATGCAGGTAGTGTGGTGGCCTTACTATCCCTTCGTCCACACTCTT		5089
B	AAGCGTGCAGAAATGCCGGGCTCCGGAAGGACCTTCGCGCCCGCC		2970
C		0
A	GGTAGTTTCTGTCTCCCTCTTAGAGGTTCCCTCCCAAATAGTCTT		5134
B	GCCCCTGAGCCCGCCCTGAGCCCAGCCCGGACCCACCCCTTCC		3015
C		0
A	CTCAACTCTGCATTAGCATTCTCTCTACACTGTCTTCCCCTATCC		5179
B	CAGCCTCTGAGCCCAGAAAGCGAAGGAGCAAAGCTGCTATTTGGCC		3060
C		0

A	CAATACTACTTCCATGCTGTGGTTT CATT TTGTCTTTAT CC CTGG	5224
B	GCTGC CCCAAAGGCCTAC CCGCT TC CATTGCTCAGCGG TG CTGTC	3105
C	0
A	AGAC CAGG CAGG CT CTGCTCT CT TTGT CC CCTGCT GCTC CTGCC	5269
B	CAT CTGCA CGAG ACT AGTGAGAC GT GT TA CTTCCA TT GT CA CGT	3150
C	0
	<i>mmMRPPro.for</i>	
A	TGATACA GGGTG GGT CCTGT GGAGA GAGT GAGA GAGGG TGTGGG G	5314
B	CCTGCAC GACGC GAG CTGCG GGGCG GGG GG GAA CTTCC TGACTAG	3195
C	0
	<i>mmMRPPro.for</i>	
A	GGTGG GGTGG GGG GAA GG GAG GG AGA GAGG AG AGG GAG GAG GG	5359
B	GGGA GGAGTA GAA GGT GG CGC GA AG GG CC ACC AAA GAA CGG GAGC	3240
C ACGGAGC	7
A	AATA TATGAA TGGGT GTG CGTGT GCCACA G CCTTT GGA CCTGAA	5404
B	CGGTTGGCGCTACCGGTGGATGTGGAATGTGTGCGAGGCCAGAGG	3285
C	CGGTTGGCGCTACCGGTGGATGTGGAATGTGTGCGAGGCCAGAGG	52
A	CCATGCCCTGAGATA CTCCT AATCT CAAC GGT GC TGTGA CAGTGT	5449
B	CCACTTGTGTAGCGCCAAGTGCCAGCGGGGCTGCS SAAAGCGCATG	3330
C	CCACTTGTGTAGCGCCAAGTGCCAGCGGGGCTGCTAAAGCGCATG	97
A	CTCCTCCATG GTGCT GATGGG GC CAGGT CTA TGTTTT TACCC ATAG	5494
B	CTCCAGACTGCCTTGGGAAAAGCGCCTCCCTACCCGGT TAGAATT	3375
C	CTCCAGACTGCCTTGGGAAAAGCGCCTCCCTACCCGGT TAGAATT	142
A	ACA CGGATCCTGGTCACCCATGGTATCAGCTACCTGCCCCAAGTG	5539
B GATCCTGGTCACCCATGGTATCAGCTACCTGCCCCAAGTG	3415
C	CAT CGGATCCTGGTCACCCATGGTATCAGCTACCTGCCCCAAGTG	187
A	GATGTCATCATTGTCATGAGTGGCGGCAAGATCTCAGAGATGGGT	5584
B	GATGTCATCATTGTCATGAGTGGCGGCAAGATCTCAGAGATGGGT	3460
C	GATGTCATCATTGTCATGAGTGGCGGCAAGATCTCAGAGATGGGT	232
A	TCTTATCAGGAGCTGCTAGACCGGGATGGGGCCTTCGCTGAGTTC	5629
B	TCTTATCAGGAGCTGCTAGACCGGGATGGGGCCTTCGCTGAGTTC	3505
C	TCTTATCAGGAGCTGCTAGACCGGGATGGGGCCTTCGCTGAGTTC	277

B Genotypisierung

A	CTGCGCACCTATGCCAACGCTGAGCAGGACCTGGCCTCGGAGGAT	5674
B	CTGCGCACCTATGCCAACGCTGAGCAGGACCTGGCCTCGGAGGAT	3550
C	CTGCGCACCTATGCCAACGCTGAGCAGGACCTGGCCTCGGAGGAT	322
A	GACAGTAAGAATGGCAGGGAACTACAGGAGCTGGCTCTGATCATC	5719
B	GACAGTAAGAATGGCAGGGAACTACAGGAGCTGGCTCTGATCATC	3595
C	GACAGTAAGAATGGCAGGGAACTACAGGAGCTGGCTCTGATCATC	367
A	ATAGCTGCTTATGGGAGGGTCTTACCTGGGCTCTAGGGGTGCAAT	5764
B	ATAGCTGCTTATGGGAGGGTCTTACCTGGGCTCTAGGGGTGCAAT	3640
C	ATAGCTGCTTATGGGAGGGTCTTACCTGGGCTCTAGGGGTGCAAT	412
A	TCATGAGGGTATTGGGTAGGAGCACATTGGGCTTCTGGAGACCAA	5809
B	TCATGAGGGTATTGGGTAGGAGCACATTGGGCTTCTGGAGACCAA	3685
C	TCATGAGGGTATTGGGTAGGAGCACATTGGGCTTCTGGAGACCAA	457
A	TAGGTCAGTTTAAACCTTGCAGGTCAGGTAGAGAGGGTTCTCGGCA	5854
B	TAGGTCAGTTTAAACCTTGCAGGTCAGGTAGAGAGGGTTCTCGGCA	3730
C	TAGGTCAGTTTAAACCTTGCAGGTCAGGTAGAGAGGGTTCTCGGCA	502
<i>mmMRPPro.rev</i>		
A	CTTGGCACCCAGGTTTCACAGGGTCAGGTTTTTGTTT	5890
B	CTTGGCACCCAGGTTTCACAGGGTCAGGTTTTTGTTT	3766
C	CTTGGCACCCAGGTTTCACAGGGT.....	525

Abb. 36. Vergleich eines Teils des Maus-Chromosoms 16 (A), der potenziellen im *Mrp1-Knockout* veränderten Sequenz (B) und des sequenzierten Teils aus dem *Mrp1-Knockout*-Genom (C). Die Positionen der Kontrollprimer (*mmMRP1ko*), der wildtypspezifischen Primer (*mmMRP1g*) und *Mrp1-Knockout*-spezifischen Primer (*mmMRPPro*) sind markiert und betroffene Sequenzen in diesen Bereichen heller dargestellt. Die dunkle Schattierung markiert zwischen Sequenzen übereinstimmende Basen.

Meine Akademischen Lehrer

Prof. Dr. K. Albert (Organische Chemie)
Prof. Dr. H.-A. Bisswanger (Biochemie)
Prof. Dr. K.W. Bock (Toxikologie)
Prof. Dr. P. Bohley (Biochemie)
Prof. Dr. R. Dringen (Biochemie)
Prof. Dr. M. Duszenko (Biochemie)
Prof. Dr. K. Eisele (Biochemie)
Prof. Dr. K.-U. Fröhlich (Biochemie)
Dr. H. Günzl (Zoologie)
Priv. Doz. Dr. P. Grabmayr (Physik)
Prof. Dr. H.-P. Hagenmaier (Organische Chemie)
Prof. Dr. B. Hamprecht (Biochemie)
Prof. Dr. Dr. h.c. M. Hanack (Organische Chemie)
Prof. Dr. G. Jung (Organische Chemie)
Prof. Dr. D. Krug (Anorganische Chemie)
Prof. Dr. E. Lindner (Anorganische Chemie)
Priv. Doz. Dr. J. Maier (Pflanzenbiochemie)
Prof. Dr. D. Mecke (Biochemie)
Prof. Dr. W. Nakel (Physik)

Meine Akademischen Lehrer

Prof. Dr. H. Ninnemann (Pflanzenbiochemie)
Prof. Dr. H. Oberhammer (Physikalische Chemie)
Prof. Dr. D. Oelkrug (Physikalische Chemie)
Prof. Dr. W. Pfeiffer (Zoologie)
Priv. Doz. Dr. H. Pommer (Mathematik)
Prof. Dr. K. Poralla (Mikrobiologie)
Prof. Dr. H. Probst (Biochemie)
Akad. Dir. Dr. H.-J. Reinecke (Strahlenschutz)
Prof. Dr. K. Reutter (Anatomie)
Prof. Dr. Dr. h.c. J. Strähle (Anorganische Chemie)
Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Voelter (Physikalische Biochemie)
Prof. Dr. Dr. h.c. K. Wegmann (Pflanzenbiochemie)
Prof. Dr. U. Weser (Anorganische Biochemie)
Prof. Dr. H. Wiesinger (Biochemie)
Prof. Dr. W. Wohlleben (Mikrobiologie)