

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß von Mastoparan- und Pertussis-Toxinsensitiven G-Proteinen auf die Regulation des renalen basolateralen Anionentransportsystems von weißen Neuseeland-Kaninchen zu untersuchen. Die Studien wurden ohne Verwendung von Enzymen an mikrodisssezierten S_2 -Segmenten des proximalen Tubulus durchgeführt.

Als Referenzsubstanz zur Untersuchung des organischen Anionentransporters (OAT) wurde radioaktiv markierte Paraaminohippursäure (^3H -PAH) verwendet. Die nur leicht an Proteine gebundene schwache Säure wird glomerulär filtriert und im größeren Stil tubulär sezerniert. Es findet weder eine starke tubuläre Resorption noch eine Metabolisierung statt. Als Markersubstanz des natriumabhängigen Dicarboxylattransporters wurde radioaktiv markierte Glutarsäure (^{14}C -Glutarat) eingesetzt. Die Tubuli zeigten unter den gewählten Versuchsbedingungen (Inkubation der Nierenkanälchen mit ^3H -PAH bzw. ^{14}C -Glutarat) eine gute Funktionsfähigkeit. Die Akkumulationsfaktoren (Verhältnis der ^3H -PAH- bzw. ^{14}C -Glutarat-Konzentration der Tubuli zur jeweiligen Badkonzentration) betragen für ^3H -PAH 19.6 ± 0.3 bzw. für ^{14}C -Glutarat 32.7 ± 4.3 .

Die ^3H -PAH-Aufnahme der S_2 -Segmente des proximalen Tubulus nahm mit zunehmender Konzentration an nicht markierter PAH in der Badlösung linear ab. Der Dicarboxylattransporter ist ebenfalls ein sättigbarer Carrier, dessen ^{14}C -Glutarat-Transportkapazität nach Zugabe von hohen Konzentrationen ($5 \times 10^{-3}\text{M}$; 10^{-2}M) von nicht markiertem Glutarat in die Badlösung deutlich sank.

Weiterhin wurde die Auswirkung von Mastoparan und Pertussis-Toxin auf den PAH-Transporter und den Dicarboxylattransporter untersucht. Mastoparan, ein Stimulator der inhibitorischen G-Protein-Familie, verminderte die tubuläre ^3H -PAH-Aufnahme in einer Konzentration von 10^{-5}M signifikant, wogegen die tubuläre Aufnahme des ^{14}C -Glutarats (Substrat des Dicarboxylattransporters) nicht signifikant beeinflusst wurde. Dies zeigt, daß der PAH-Transporter im Gegensatz zum Dicarboxylattransporter einer Mastoparan-vermittelten G-Protein-Wirkung unterliegt.

Hohe Mastoparan-Konzentrationen führten zu mikroskopisch sichtbaren Zelldegenerationen des Tubulusepithels. Bei diesen Konzentrationen wurde die tubuläre Aufnahme beider Testsubstanzen (^3H -PAH sowie ^{14}C -Glutarat) signifikant gehemmt. Diese Inhibition ist jedoch als unspezifischer Effekt zu betrachten, und nicht als Reaktion der Transportsysteme auf eine Einwirkung von G-Proteinen.

Zur Inhibition der G_i -Familie wurde Pertussis-Toxin, ein Gift von *Bordetella pertussis*, eingesetzt. Trotz der hochwirksamen Dosis von 100 ng/ml fand keine signifikante Beeinflussung des PAH-Transporters statt. Dies ist ein Indiz für die Wirkung von Mastoparan und Pertussis-Toxin über unterschiedliche G-Proteine, da Mastoparan in der Lage ist, auch PTX-insensitive G-Proteine zu stimulieren.

7. Summary

Ursula Allofs

The use of G proteins sensitive to mastoparan and pertussis toxin for the regulation of the renal basolateral organic anion transport system.

The aim of the present study was to examine the effect of G proteins sensitive to mastoparan and pertussis toxin on the regulation of the renal basolateral anion exchanger of the New Zealand white rabbit. The studies were carried out on microdissected, non-perfused S_2 segments of proximal tubules, without the use of enzymatic agents.

Radioactively labelled paraaminohippurate (^3H -PAH) was used as reference substance to investigate the organic anion transporter (OAT). The weak acid, which is only weakly bound to proteins is filtered in the glomerulum and secreted to a greater extent in the tubule. It is neither strongly reabsorbed nor metabolized. Radioactively labelled glutarate (^{14}C -Glutarate) was used as marker of the dicarboxylate transporter.

Under the selected test conditions (incubation with ^3H -PAH or ^{14}C -Glutarate for 30 seconds) the tubules displayed good functional ability.

The accumulation factors (the ratio of ^3H -PAH concentration in the tubular cells to the concentration of the solution) was found to be $19,6 \pm 0,3$ for ^3H -PAH and $32,7 \pm 4,3$ for the ^{14}C -Glutarate.

The uptake of ^3H -PAH by the S_2 segments of the proximal tubules showed a reduction in linear proportion to an increased concentration of unmarked PAH in the solution.

The glutarate transporter is also a carrier, whose capacity to transport ^{14}C -Glutarate fell with increasing amounts of unmarked glutarate in the solution.

In addition, the effect of mastoparan and pertussis-toxin on the PAH-transporter and the glutarate-transporter was investigated.

Mastoparan, a stimulator of the inhibiting G protein family, produced a significant reduction in the tubular uptake of ^3H -PAH at a concentration of 10^{-5}M , whereas the tubular uptake of ^{14}C -Glutarate (a substrate of the $\text{Na}^+/\text{DC}^{2-}$ cotransporter) was not influenced significantly. This demonstrates that, in contrast to the glutarate transporter, the PAH transporter is subject to an mastoparan-induced G protein-effect.

High concentrations of mastoparan led to microscopically visible cell degeneration of the tubule epithels. At these concentrations, the tubular uptake of both test substances (^3H -PAH as well as ^{14}C -Glutarate) was significantly inhibited. However, this inhibition should be regarded as a non-specific effect and not as a reaction of the transport systems to the influence of G-proteins.

The pertussis toxin (PTX), one toxin from bordatella pertussis was introduced to inhibit the G-family. Despite the highly effective dosage of 100 ng/ml, no significant influence on the PAH-transporter occurred. This is an indication of the effect of mastoparan and PTX on various G proteins, since mastoparan is also capable of stimulating PTX-insensitive G proteins.