

Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. Sies

Verteilung von Ornithin und Citrullin
in Mitochondrien und Cytosol
der Rattenleber –
Implikationen für den mitochondrialen
Transport

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Gereon Böll

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. D. Häussinger
Dekan

Referentin: Prof. Dr. S. Soboll

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. S. vom Dahl

1	Einleitung	3
1.1	Transport durch biologische Membranen.....	3
1.2	Mitochondrien	6
1.2.1	Mitochondrienmembranen.....	7
1.2.2	Transport durch die innere Mitochondrienmembran.....	8
1.3	Transport von Ornithin und Citrullin durch die innere Mitochondrienmembran	10
1.4	Die „Stoffwechselumgebung“ des Ornithin/ Citrullin-Carriers	12
1.4.1	Ornithin und Citrullin in Stoffwechselwegen.....	12
1.4.2	Der Harnstoffzyklus	12
1.4.3	Die Ornithin-Aminotransferase-Reaktion und die Glutamatsynthese.....	17
1.4.4	Ornithin und Citrullin in weiteren Reaktionen	19
1.5	Problemstellung dieser Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Versuchstiere	21
2.2	Leberperfusion	21
2.2.1	Material	21
2.2.2	Operation der Versuchstiere	22
2.2.3	Hämoglobinfreie Leberperfusion im nicht rezirkulierenden System.....	22
2.3	Frierstopp und anschließende Aufbereitung	23
2.3.1	Material	23
2.3.2	Frierstopp.....	23
2.3.3	Weitere Aufbereitung des Lebergewebes.....	24
2.3.4	ATP/ADP-Verhältnis.....	24
2.4	Nichtwässrige Fraktionierung	25
2.4.1	Material	25
2.4.2	Fraktionierung des Lebergewebes in nichtwässrigen Medien	26
2.5	Proteinkonzentrationen	29
2.5.1	Material	29
2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen.....	29
2.6	Enzymaktivitäten	30
2.6.1	Material	30
2.6.2	Bestimmung der Enzymaktivitäten in den einzelnen Fraktionen.....	30
2.7	Metabolitkonzentrationen in den Proben	32
2.7.1	Material	32
2.7.2	Vorbereitung der Proben	33
2.7.3	Farbttests zur Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen	33
2.7.4	Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC	33
2.8	Berechnungen	36
2.8.1	Vorannahmen.....	36
2.8.2	Berechnungen.....	37

3	Ergebnisse	39
3.1	Leberperfusion.....	39
3.2	Oxygenierungszustand der Lebern.....	40
3.3	Auftrennung im Dichtegradienten	40
3.4	Proteinkonzentrationen der Proben	41
3.5	Enzymaktivitäten	42
3.6	Aminosäurenkonzentrationen der Proben, HPLC.....	44
3.7	Koordinatensysteme und lineare Regression	45
3.8	Proteinverteilung auf die Kompartimente	47
3.9	Verteilung und Konzentration von Ornithin.....	48
3.9.1	Gesamtornithin	48
3.9.2	Ornithinverteilung in den Kompartimenten.....	49
3.10	Verteilung und Konzentration von Citrullin.....	51
3.10.1	Gesamtcitrullin.....	51
3.10.2	Citrullinverteilung in den Kompartimenten.....	52
4	Diskussion	54
4.1	Methodendiskussion	54
4.1.1	Leberperfusion	54
4.1.2	Frierstopp und nichtwässrige Fraktionierung	55
4.2	Ergebnisdiskussion.....	58
4.2.1	Proteinverteilung	58
4.2.2	Verteilung und Konzentrationen von Ornithin.....	58
4.2.3	Verteilung und Konzentrationen von Citrullin.....	61
4.3	Der Ornithin- und Citrullintransport.....	63
4.3.1	Die Carriereigenschaften	63
4.3.2	Die Bedeutung der Konzentrationsgradienten für den Transport.....	66
4.3.3	Der Metabolitumsatz in den verschiedenen Stoffwechselwegen als Antrieb für den Austausch	69
4.3.4	Die treibenden Kräfte des Transportes	72
5	Zusammenfassung	73
	Literatur.....	74
	Abkürzungen	81
	Danksagungen.....	82
	Lebenslauf	83
	Abstract	

Literaturangaben sind im Text durch Ziffern in eckigen Klammern und Fußnoten durch hochgestellte Ziffern gekennzeichnet.

1 Einleitung

1.1 Transport durch biologische Membranen

Biologische Membranen bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht

Biologische Membranen bestehen aus amphiphilen Phospholipiden und Sphingolipiden, die durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Die Moleküle bilden eine Lipid-Doppelschicht, in der die hydrophoben Molekülanteile, die Kohlenwasserstoffketten der langkettigen Fettsäuren, ins Innere der Membran ragen [1]. Die hydrophilen geladenen Gruppen und polaren Kohlehydratreste bilden das zur wässrigen Umgebung hin ausgerichtete Äußere der Membran. Manche Lipide sind spezifisch für bestimmte Membranen, wie das Diphosphatidylglycerin (Cardiolipin), das einen hohen Anteil der Mitochondrienmembranen bildet. Cholesterin findet sich kaum in der inneren und äußeren Mitochondrienmembran (ca. 3 Gewichtsprozent), jedoch zu einem höheren Anteil in der Plasmamembran der meisten Zellen (Leberzellen 17 %, Erythrozytenmembran 23 %) [2].

Neben den jeweiligen Lipiden prägen auch an die Lipide angehängte Gruppen die Eigenschaften der Membran. Lipide und Nicht-Lipid-Gruppen verteilen sich oft sehr unterschiedlich auf beide Seiten der Membran und geben ihnen unterschiedliche Eigenschaften [3]. So finden sich beispielsweise Glykolipide nur auf Membranaußenseiten [4]. Die angehängten Gruppen übernehmen mannigfaltige Aufgaben, wie zum Beispiel das Phosphatidylinositol, das als Anker für Proteine dient und nach Spaltung den intrazellulären Messenger Inositoltrisphosphat (IP_3) liefert.

Membranen schließen die Zelle nach außen und die Zellkompartimente gegeneinander ab. Wegen des hydrophoben Inneren ist die Lipid-Doppelschicht für die meisten polaren Moleküle und für Ionen praktisch undurchlässig. Nur wenige kleine ungeladene Moleküle wie O_2 , CO_2 , NH_3 , Wasser und Harnstoff können die Membran passieren [5, 6]. Die Impermeabilität der Membranen befähigt die Zelle, chemische und elektrische Gradienten über den Membranen aufzubauen. Solche Gradienten sind für viele Lebensvorgänge existenziell wichtig.

Der Stoffaustausch durch Membranen benötigt meist spezielle Transportproteine

Der Austausch von Substanzen, die nicht die Lipid-Doppelschicht passieren können, geschieht mit Hilfe von Membranproteinen. Man kann zwischen Kanal- und Transportproteinen unterscheiden. Kanalproteine bilden hydrophile, die Membran durchspannende Poren, durch die anorganische Ionen diffundieren können, meist entlang eines elektrochemischen Gradienten. Diese Poren sind zum Teil offen, wie Gap junctions, zum Teil verschließbar, wie die spannungskontrollierten Kationenkanäle in Neuronen [7]. Transportproteine hingegen binden Substrate und transportieren sie mit Hilfe von Konformationsänderungen des Proteins durch die Membran.

Treibende Kräfte können ein Konzentrationsgefälle oder eine Potenzialdifferenz über der Membran sein. Bei einem aktiven Transport gegen einen Konzentrations- oder elektrischen Gradienten muss Energie aufgewandt werden, die die Zelle meist in Form von ATP bereitstellt oder die aus einem Membranpotenzial herrührt [6].

Es gibt verschiedene Arten des Transportes

Es existiert eine Fülle von Transportproteinen für die unterschiedlichsten Zwecke. Die Abbildung 1.1 zeigt drei verschiedene grundsätzliche Arten von Transportmechanismen durch Membranen.

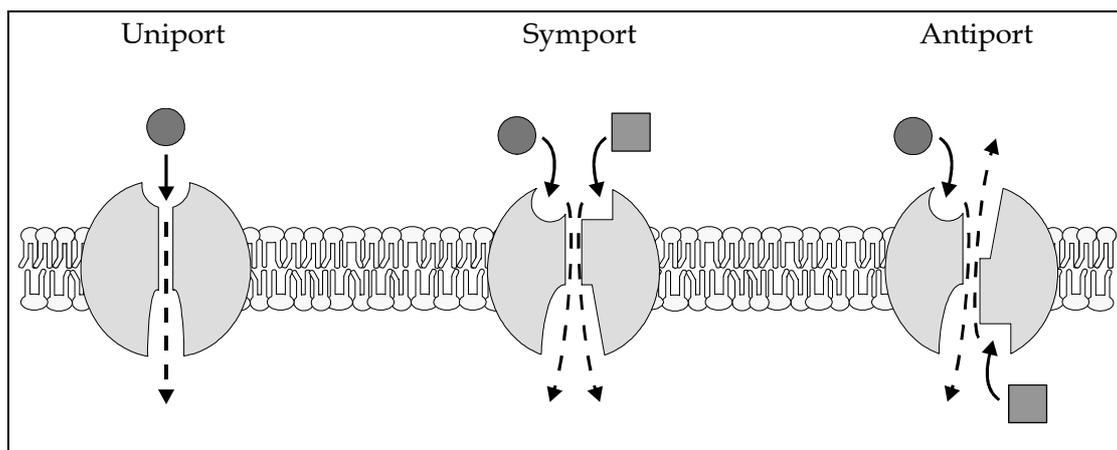


Abb. 1.1 Die prinzipiellen Möglichkeiten des durch Carrier vermittelten Transportes. Der Kreis stellt das zu transportierende Molekül dar, das Quadrat das co-transportierte Ion [8]. Die Carrier für den Sym- und Antiport können an eine Energiequelle gekoppelt sein. Die Transportproteine durchspannen die Membran und "schwimmen" in der Lipid-Doppelschicht.

Uniporter transportieren Moleküle nur eines bestimmten Typs auf die andere Membranseite. Sie werden im allgemeinen von elektrochemischen Gradienten angetrieben, weshalb man diesen Transport auch erleichterte Diffusion nennt.

Symporter transportieren zwei verschiedene Ionen unterschiedlicher Ladung in die gleiche Richtung. Die Glucoseaufnahme aus dem Darm beispielsweise erfolgt aktiv als Symport zusammen mit Na^+ .

Beim Antiport werden zwei Moleküle in entgegengesetzter Richtung meist elektro-neutral transportiert. So wird beispielsweise der steile Ca^+ -Gradient über der Zellmembran zum Teil aufrechterhalten, indem in die Zelle strömendes Na^+ im Antiport gegen Ca^+ hinausbefördert wird.

Der solche Prozesse antreibende Na^+ -Gradient wird durch die energieabhängige Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten, die drei Na^+ -Moleküle im Antiport gegen zwei K^+ -Moleküle aus der Zelle bringt. Der ATP-getriebene Transport wird als primär aktiv bezeichnet, während ionengetriebene Carrier¹ einen sekundär aktiven Transport vermitteln. Auch der intrazelluläre pH wird durch Co-Transporter geregelt.

Man geht allgemein davon aus, dass die Transportproteine nach Bindung des Substrates oder der Substrate eine reversible Konformationsänderung vollziehen und damit die zu transportierenden Substanzen auf der anderen Membranseite wieder freigeben.

Transportkinetiken gleichen Enzymkinetiken

Die Abbildung 1.2 zeigt die Kinetik eines Uniporters. Der intermediär gebildete Transportprotein-Substrat-Komplex ähnelt einem Enzym-Substrat-Komplex.

Die Sättigungskinetik der Transportproteine gleicht einer Enzymkinetik [9]. Wenn bei gesättigtem Transportprotein alle Bindungsstellen besetzt sind, erreicht die Transportgeschwindigkeit ihr Maximum (V_{\max}). Eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration steigert die Geschwindigkeit nicht mehr. Die Konzentration bei halbmaximaler Transportgeschwindigkeit (K_m) ist die spezifische Bindungskonstante des Carriers für das Substrat, entsprechend der Michaelis-Menten-Konstante bei Enzymen.

¹ Die Begriffe „Transportprotein“ und „Carrier“ werden hier synonym verwendet.

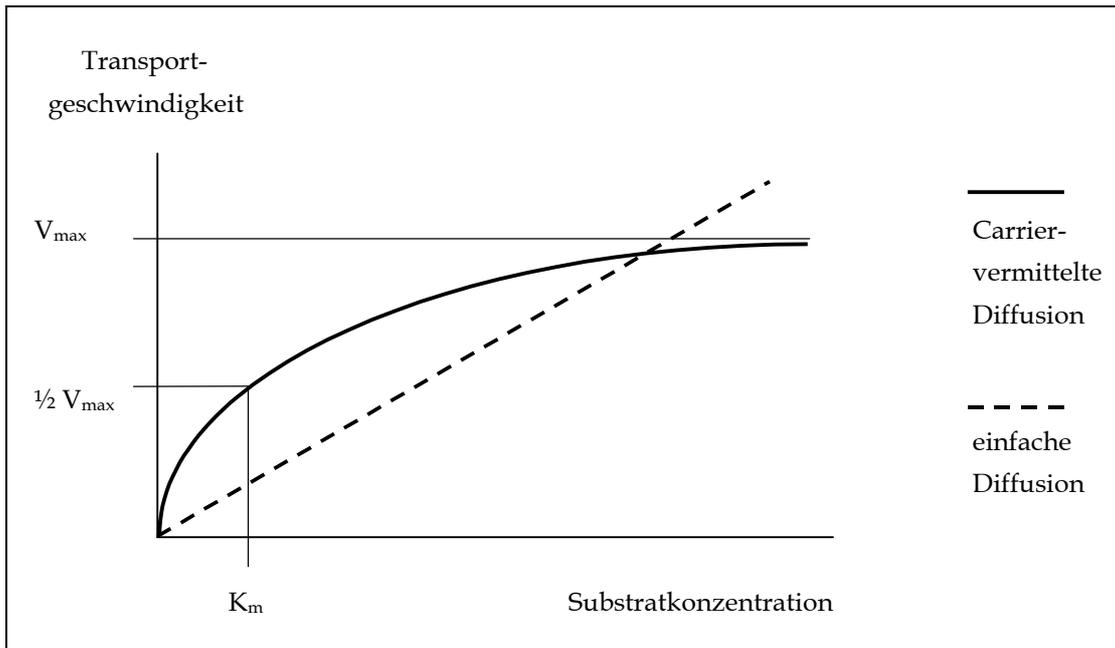


Abb. 1.2 Die Transportgeschwindigkeit bei einfacher Diffusion ist proportional zur Konzentration des zu transportierenden Stoffes. Bei durch Carrier vermitteltem Uniport ist die Geschwindigkeit hyperbolisch abhängig von der Substratkonzentration. Sym- und Antiport-Kinetiken sind komplexer, aber prinzipiell ähnlich. K_m ist Carrier-spezifisch.

1.2 Mitochondrien

Mitochondrien haben lebenswichtige Funktionen

Mitochondrien kommen in allen Sauerstoff verbrauchenden Geweben vor. Sie sind ellipsoide bis kugelförmige 0,5 bis 4 μm große bewegliche intrazelluläre Organellen. In einer Rattenleberzelle befinden sich ca. 1700 Mitochondrien, die etwa ein Fünftel des intrazellulären Volumens einnehmen [2, 10]. Sie sind der Ort mehrerer existenzieller Stoffwechselforgänge. Die oxidative Phosphorylierung, der Citratzyklus, die β -Oxidation der Fettsäuren und der Harnstoffzyklus vollziehen sich ganz oder teilweise innerhalb der mitochondrialen Matrix oder an der inneren Mitochondrienmembran. In unterschiedlichen Geweben nehmen die Mitochondrien teilweise unterschiedliche Funktionen wahr. Die ATP-Synthese beispielsweise findet in allen Mitochondrien statt, die Harnstoffsynthese dagegen nur in der Leber.

1.2.1 Mitochondrienmembranen

Die äußere Mitochondrienmembran ist durchlässig, während über der inneren Membran Gradienten aufgebaut werden

Mitochondrien sind vom Cytosol durch zwei unterschiedliche Membranen abgegrenzt. Die mitochondriale Außenmembran ist aufgrund porenbildender Proteine für die meisten niedermolekularen Substanzen und Ionen gut durchgängig [11]. In einem cm^3 Lebergewebe befinden sich $1,5 \text{ m}^2$ äußere Mitochondrienmembran [10].

Die innere Mitochondrienmembran ist nur für kleine ungeladene Moleküle durchlässig [5]. Die Oberflächen der inneren Mitochondrienmembranen werden durch die Cristae (Einstülpungen ins Innere des Mitochondriums) stark vergrößert. Sie haben mit ca. 6 m^2 pro ml Lebergewebe die vierfache Fläche der äußeren Membranen [10] und summieren sich zu ca. 36 m^2 in einer Rattenleber mit einem Durchschnittsvolumen von etwa 6 ml.

Die Membran ist mit einem Proteinanteil von 75 % bei 25 % Lipiden besonders reich an Proteinen [6], was der wichtigen Rolle der Mitochondrien im Stoffwechsel entspricht, denn ein Teil der Proteine sind Transportproteine.

Einen weiteren großen Anteil der Proteine stellen die Membrankomplexe der Atmungskette, die in der inneren Mitochondrienmembran angesiedelt sind. Im Energiestoffwechsel werden im Verlauf der oxidativen Phosphorylierung Wasserstoff und Elektronen vom NADH/H^+ über die Atmungskette in mehreren Stufen auf Sauerstoff übertragen. Die beim Elektronentransport auf den einzelnen Redoxstufen frei werdende Energie wird dazu genutzt, Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran zu bringen [12]. Dadurch bildet sich ein Protonen-Gradient über der inneren Mitochondrienmembran, die „protonenmotorische Kraft“ (protonmotive force). Es entstehen über der Membran ein pH-Gradient [13, 14] und ein Spannungsgradient, bei dem die Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran negativ geladen ist. Dieser elektrochemische Protonengradient kann bis zu 220 mV betragen [13, 15]. Er treibt Kationen zurück in die Matrix, wobei der elektrische Spannungsgradient für diese Kraft eine größere Rolle spielt als der pH-Anteil [13].

Durch die protonenmotorische Kraft werden die enzymatische ATP-Synthese und eine Fülle von „sekundären“ [16] Transportvorgängen [17] angetrieben, wie zum Beispiel der Antiport von ADP^{3-} gegen ATP^{4-} oder der Symport von Pyruvat mit Protonen.

1.2.2 Transport durch die innere Mitochondrienmembran

Die Carrier der inneren Mitochondrienmembran gehören einer Familie an

In der inneren Mitochondrienmembran befinden sich viele unterschiedliche Transportsysteme, von denen zwölf gut charakterisiert sind [18, 19]. Der ATP/ADP-Carrier und der Phosphatcarrier sind entsprechend ihrer Beteiligung an der ATP-Synthese in allen Mitochondrien vorhanden. Andere Carrier gibt es nur in bestimmten Geweben, wie zum Beispiel das hauptsächlich in Leber und Niere vorhandene Transportsystem für Ornithin und Citrullin.

Während der Erforschung von Carriersystemen in verschiedenen biologischen Membranen sind Carrierfamilien entdeckt worden [20–23]. Es wurde eine Großfamilie von Carrierproteinen postuliert, die meist zwölf transmembrane α -Helices besitzen [16, 19, 24]. Die Carrier bestehen entweder aus einem einzigen Protein oder sie sind Dimere [16, 25].

Auch die mitochondrialen Carrier haben trotz der Unterschiede in den transportierten Substraten² sowohl unter strukturellen als auch unter funktionellen Gesichtspunkten grundlegende Gemeinsamkeiten [18, 26–29]. Alle bisher gereinigten und rekonstituierten mitochondrialen Carrierproteine haben eine Molekularmasse von 30–34 kDa [29].

Die Primärstruktur eines Teiles dieser Proteine ist weitgehend aufgeklärt [19, 29]. Die Carrier bestehen aus drei ähnlichen Domänen mit je etwa 100 Aminosäuren³ [19, 21, 26, 30]. Wahrscheinlich bilden diese Proteine Dimere. Damit hätten auch

² Mitochondriale Carrier transportieren große Substrate wie ATP und sehr kleine wie Protonen.

³ Jede Domäne besteht aus zwei α -Helices, die eine mehr hydrophob, die andere amphipatisch. Als Sekundärstruktur finden sich somit sechs α -Helices, die die Membran durchspannen. Die amphipatischen Helices könnten, eventuell gemeinsam mit einem zweiten Protein, eine oder zwei Poren bilden, während die hydrophoben Helices sich zur Außenseite des Carriers orientieren [26]. Sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Region des Proteins ragen in das Cytosol. In der Matrix befinden sich lange Schleifen. Die Primärstruktur ist bisher für sieben Transportproteine charakterisiert worden: Für den Phosphat-, den ADP/ATP-, den Citrat-, den Carnitin-, den α -Ketoglutarat- und den Dicarboxylat-Carrier und für das mitochondriale Entkopplungsprotein des braunen Fettgewebes [29].

mitochondriale Carrier die Eigenschaften der erwähnten Zwölf-Helices-Carrier-Familie. Es gibt viele Hinweise auf diesen Dimerstatus [3, 19, 21] und einen gemeinsamen evolutionären Ursprung⁴ [22, 31].

Mitochondriale Carrier funktionieren zumeist nach dem Simultanprinzip

Auch in funktioneller Hinsicht existieren Gemeinsamkeiten. Es gibt zwei Arten von Antiportvorgängen: Den „Ping-pong-Mechanismus“ und den „Simultan-“ oder „Sequenz-Mechanismus“ [28, 21, 35].

Beim Ping-pong-Typ wird eine Bindungsstelle erst von Substrat A und nach Konformationsänderung und Abgabe auf der anderen Membranseite dort von Substrat B besetzt, das wiederum mit der nächsten Konformationsänderung durch die Membran transportiert und abgegeben wird. Es existiert abwechselnd eine Bindungsstelle auf der inneren und äußeren Membranseite.⁵

Der Simultanmechanismus dagegen arbeitet mit zwei Bindungsstellen, je einer auf jeder Membranseite, die gleichzeitig besetzt werden müssen, so dass sich ein Ternär-Komplex bildet, der dann die beiden Substrate auf der jeweils anderen Membranseite wieder frei gibt.⁶ In Untersuchungen mit gereinigten und rekonstituierten mitochondrialen Carriern ist, mit Ausnahme des Carnitincarriers [19], regelhaft der Simultanmechanismus anzutreffen [21, 28, 36]. Das gilt auch für den Ornithin/Citrullin-Carrier [37].

Die Bindungsstellen auf den beiden Membranseiten können unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Substraten haben und so Regulierungsfunktionen übernehmen.

⁴ In verschiedenen Spezies sind Transportproteine gefunden worden, die der genannten Familie zugerechnet werden können [19]. Möglicherweise hat im Verlauf der Evolution eine Gen-Verdreifachung eines Urgens mit nachfolgender Modifikation stattgefunden [26, 31].

Die Carrier sind Produkte nukleärer Gene. Sie müssen in einem komplizierten Prozess in die Mitochondrien importiert werden [32-34].

⁵ Der Transportweg liegt wahrscheinlich zwischen den beiden Monomeren.

⁶ Hier müssen zwei Transportwege vorhanden sein, möglicherweise einer in jedem Monomer [36].

Es gibt mehrere Klassen von Transportproteinen

Carrier der inneren Mitochondrienmembran lassen sich in vier Klassen einteilen. Die Klassifikation bezieht sich auf den Transportmechanismus [3, 15, 21].

Bei elektrogenen Carriern, wie der Adeninnucleotidtranslocase, die ADP^{3-} aus dem Cytosol im Antiport gegen ATP^{4-} austauscht, dem Aspartat/Glutamat-Antiporter und dem Entkopplungsprotein werden beim Transportvorgang Ladungen verschoben.

Elektroneutrale protonenkompensierte Carrier transportieren im Symport oder Antiport mit einem Proton ein Ion ins Innere des Mitochondriums. Der Phosphatcarrier, der Pyruvatcarrier, der Glutamatcarrier und der Tricarboxylat-Carrier fallen in diese Klasse. Auch der Ornithincarrier wird dieser Gruppe zugerechnet [15]. Außerdem gibt es Transportsysteme für Kationen wie Kalium-, Natrium- und Calciumcarrier [17].

Elektroneutrale Austauschcarrier bewerkstelligen den Austausch von Ionen mit gleicher Ladung. Es werden zum Beispiel Dicarboxylate wie Malat²⁻ und Succinat²⁻ im Austausch mit Phosphat²⁻ transportiert. Der Ketoglutarat²⁻/Malat²⁻-Carrier gehört ebenfalls hierher.

Zu den neutralen Carriern, die ungeladene Moleküle transportieren, gehören der Glutamincarrier und der Carnitin/Acylcarnitin-Austausch-Carrier.

1.3 Transport von Ornithin und Citrullin durch die innere Mitochondrienmembran

Ornithin und Citrullin tragen unterschiedliche Ladungen

Der Harnstoffzyklus vollzieht sich zum Teil im Cytosol und zum Teil in den Mitochondrien. Zwei Metabolite des Zyklus, nämlich Ornithin und Citrullin, müssen dafür über die innere Mitochondrienmembran gebracht werden (Kap. 1.4).

Ornithin ist eine nicht proteinogene Aminosäure. Der pK der δ -Aminogruppe beträgt 10,8. Deshalb ist das Molekül bei physiologischem pH positiv geladen [15]. Citrullin ist wie Ornithin nicht proteinogen. Bei physiologischem pH ist es elektroneutral. Die positive Ladung des Ornithins führte in früheren Arbeiten zu der Hypothese, dass Ornithin mit Hilfe des Membranpotenzials über der inneren Mitochondrienmembran im Uniport ins Mitochondrium gelangt [38]. Citrullin sollte elektroneutral in einem eigenen Carriersystemen über die Membran transportiert werden [38]. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen Ornithintransport nicht klar von Ornithinbindung an negative Membrangruppen der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran unterschieden, wie sich bei Versuchen mit Lysin zur Blockade der Membranbindungsstellen herausgestellt hat [39], wobei eine solche Bindung aber offenbar gering ist [40].

Es fanden sich viele Hinweise sowohl für einen Ornithin/ H^+ -Antiport über der inneren Mitochondrienmembran als auch für einen Ornithin/Citrullin-Antiport [37, 39, 41–44]. Beide Transportarten werden wahrscheinlich durch das gleiche Protein bewerkstelligt [37, 41]. Nachdem es gelungen war, das Transportprotein aus Rattenleber-Mitochondrien zu reinigen und in Membranen von Liposomen zu rekonstituieren [45, 46], konnten seine Eigenschaften gut studiert werden. Seine Molekularmasse von 33,5 kDa ähnelt der anderer mitochondrialer Transportproteine [29].

Heutige Vorstellungen sprechen gegen einen Transport mit Hilfe des Membranpotenzials

Inzwischen sind die Substrataktivität, die kinetischen Eigenschaften und die Reaktionen auf verschiedene Inhibitoren bekannt. Die Affinität des Carriers für externes Ornithin ist höher als für Citrullin [37, 39, 40, 45, 47], womit der Ornithinimport bevorzugt wird (Kap. 4.3.1).

In Rattenlebermitochondrien ist ein elektrophoretischer Transport des Ornithins weitgehend ausgeschlossen [39, 41, 50, 51].⁷ So hat der intramitochondrial negative Ladungsgradient über der inneren Mitochondrienmembran [13] keinen Einfluss auf den Import der positiv geladenen Ornithinmoleküle, was für einen elektroneutralen Ornithintransport im Austausch mit Protonen spricht [41].

⁷ In Rattennieren dagegen findet wahrscheinlich ein energieabhängiger Ornithin/Phosphataustausch durch die innere Mitochondrienmembran statt [48, 49].

1.4 Die „Stoffwechselumgebung“ des Ornithin/Citrullin-Carriers

1.4.1 Ornithin und Citrullin in Stoffwechselwegen

Ornithin und Citrullin nehmen als Metabolite an unterschiedlichen Stoffwechselwegen teil (Tab. 1.1).

Tabelle 1.1 Übersicht über das Vorkommen von Ornithin und Citrullin in Stoffwechselwegen (Abkürzungen siehe S. 81).

Stoffwechselweg	Metabolite	Enzyme
Harnstoffzyklus	Ornithin und Citrullin	Arginase, OCT
Glutamatsynthese	Ornithin	OAT
Prolinsynthese	Ornithin	OAT
Polyaminsynthese	Ornithin	ODC
Kreatinsynthese	Ornithin	
Intestinale AS-Synthese	Ornithin und Citrullin	
Argininab- und -aufbau	Citrullin	
NO-Synthese	Citrullin	NO-Synthetase

1.4.2 Der Harnstoffzyklus

Der Harnstoffzyklus entsorgt Ammoniak

Ammoniak entsteht beim Abbau von Aminosäuren, Purinen und Pyrimidinen im Organismus und durch Mikroorganismen im Magen-Darm-Kanal. Es liegt als schwache Base bei physiologischem pH zu 99 % als Ammoniumion vor [52]. Ammoniak ist essenziell für die Synthese von Aminosäuren und damit von Proteinen und anderen Stickstoff haltigen Molekülen wie Porphyrinen, Pyrimidinen und Kreatin.

Freies Ammoniak wirkt jedoch schon in geringen Mengen neurotoxisch und spielt in erhöhten Plasmakonzentrationen (> ca. 60 μM) eine wichtige Rolle bei der Entstehung der hepatischen Enzephalopathie [53, 54]. Deshalb wird Ammoniak beim Säugetier zum Teil durch die Glutaminsynthese gebunden und zum Teil durch den Harnstoffzyklus entsorgt. Dieser befindet sich in der Leber und ist das wichtigste Ammoniak entsorgende System des menschlichen Organismus.

Der Harnstoffzyklus (Abb. 1.3) wurde 1932 von Krebs und Henseleit entdeckt [55] und wird auch als Krebs-Henseleit-Zyklus bezeichnet.⁸ Krebs führte mit dem Harnstoffzyklus auch das Konzept des zyklischen Stoffwechselweges⁹ in die Biochemie ein [56–58].

Die Leber ist das einzige Organ mit dem kompletten Enzymsatz des Harnstoffzyklus [61]. Das die Lebersinusoiden durchströmende Blut kommt zuerst mit den Harnstoffzyklus-Enzymen in den Hepatozyten um die Portalfelder in Kontakt. Am Ende der Sinusoiden fehlen diese Enzyme [62, 63]. Dort wird der Stickstoff durch die Glutaminsynthese dem Stoffwechsel wieder zur Verfügung gestellt. Auch viele andere Gewebe wie die Muskulatur und das Gehirn sind mit den für die Glutaminsynthese nötigen Enzymen ausgestattet. Im Gehirn beispielsweise findet die Glutaminsynthese in den Astrozyten statt.

Das vom Organismus nicht benötigte Ammoniak gelangt zu 95 % in die Harnstoffsynthese. Die restlichen 5 % werden über die Nieren ausgeschieden [64]. Harnstoff als Endprodukt des Harnstoffzyklus ist die Ausscheidungsform des Ammoniaks. Der Mensch scheidet ca. 30 g Harnstoff am Tag aus, bei proteinreicher Ernährung mehr.

Von angeborenen, meist autosomal rezessiv vererbten Defekten können alle Enzyme des Harnstoffzyklus betroffen sein. Diese führen zu einem Substratstau und einer Hyperammonämie [67–69]. Das HHH-Syndrom (Hyperornithinämie-

⁸ Hans Adolf Krebs (1900-1981) war Arzt und Biochemiker. Die Arbeiten über den Harnstoffzyklus fielen in seine Zeit an der Universitätsklinik in Freiburg i. Br.. Er wurde kurz nach Beginn des III. Reiches entlassen (wobei die Entlassungsurkunde vom Rektor Martin Heidegger unterzeichnet war [65, 66]). Krebs emigrierte noch im Jahre 1933 nach Großbritannien, dessen Staatsbürgerschaft er 1939 annahm. 1953 erhielt er (geteilt mit Fritz Lipmann) den Nobelpreis für Physiologie und Medizin für die Entdeckung des Citratzyklus (Krebs-Zyklus) [56–58].

Kurt Henseleit (1908-1973) war Arzt. Er arbeitete mit Krebs als dessen Doktorand in Freiburg zusammen. Bei der Entdeckung des Harnstoffzyklus war er noch Student [57, 58]. Später war er als Internist tätig.

⁹ Zyklische Prozesse bieten Vorteile bei der Aufrechterhaltung bestimmter Stoffwechselwege. Die Zwischenprodukte oder „Trägermoleküle“ eines Zyklus müssen nur in geringen Mengen vorhanden sein, da sie sich regenerieren; dann können sie erneut eine Verbindung eingehen. Zyklen wirken somit katalytisch [59, 60]. Dagegen müssen in linearen Prozessen die Reaktionspartner in stöchiometrischen Verhältnissen vorliegen. In der Bilanz exergone Stoffwechselzyklen bieten bei gekoppelten Reaktionen die Möglichkeit zu endergonen Teilschritten. Außerdem erlauben sie eine metabolische Kontrolle an mehreren Punkten (Kap. 4.3.3).

Hyperammoniämie-Homocitrullinurie-Syndrom) ist auf einen gestörten Ornithintransport über die Mitochondrienmembran zurückzuführen [70, 71].

Neben der Ammoniakentsorgung hat der Harnstoffzyklus wichtige Funktionen im Kohlenstoffstoffwechsel und Säure-Basen-Haushalt¹⁰ [72–74], bei letzterem im Zusammenspiel mit der Glutaminsynthese¹¹ [63, 73].

Der Harnstoffzyklus findet in zwei Kompartimenten statt

Die Reaktionen des Harnstoffzyklus vollziehen sich zum Teil in den Mitochondrien und zum Teil im Cytosol (Abb. 1.3), was sich in der Verteilung der Enzyme auf die einzelnen Kompartimente widerspiegelt [38]. Die Bildung von HCO_3^- durch die mitochondriale Carboanhydrase ist eine Voraussetzung für die Harnstoffsynthese [75]. Die N-Acetylglutamat-Synthetase stellt aus Glutamat und Acetyl-CoA den Co-Faktor der mitochondrialen Carbamylphosphat-Synthetase I (CPS I) her, wobei sie Arginin als Aktivator benötigt [76, 77]. Die CPS I bildet Carbamylphosphat aus Ammoniak und HCO_3^- unter Verbrauch von zwei Molekülen ATP. Der Carbamylrest wird von der mitochondrialen Ornithin-Carbamyltransferase auf das Trägermolekül Ornithin übertragen. Es entstehen das als Citrullin bezeichnete Carbamylornithin [78], anorganisches Phosphat und ein Proton. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite der Citrullinbildung [80]. Das Citrullin wird aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert.

¹⁰ Bei der Harnstoffsynthese werden zu gleichen Teilen Ammoniak und Hydrogenkarbonat gebunden. Letzteres wird durch eine intramitochondriale Carboanhydrase aus membrangängigem CO_2 gebildet.

Hydrogencarbonat ist Endprodukt verschiedener Stoffwechselwege und Teil des Hydrogenkarbonat/ CO_2 -Puffersystems, des Hauptpuffersystems des Extrazellulärraumes. Die mangelnde Hydrogenkarbonat-Entsorgung spielt vielleicht eine Rolle bei der Alkalose-Entwicklung aufgrund von Lebererkrankungen [63].

¹¹ pH-induzierte Veränderungen der Harnstoffsynthese gehen einher mit veränderter Glutaminsynthese in den perivenösen Zellen und gegebenenfalls mit erhöhter periportaler Glutaminaseaktivität. Bei azidotischen Verhältnissen sinkt die Harnstoffbildung und die Glutaminsynthese steigt entsprechend der verringerten Bikarbonatausscheidung. In der Niere spaltet die renale Glutaminase das Ammoniumion ab, das anschließend ausgeschieden wird [73, 63].

In der Alkalose dagegen steigt die Bikarbonatausscheidung. Für die vermehrte Harnstoffproduktion werden mehr Ammoniumionen aus dem portalen Blut gezogen. Zusätzlich kann die periportale Glutaminase Ammoniumionen aus Glutamin zur Verfügung stellen. Es kommt zu einer hepatischen Glutamin-Nettoaufnahme.

Allerdings gibt es auch Experimente, in denen die Harnstoffsynthese weitgehend unabhängig vom pH ist und die gegen einen direkten Zusammenhang zwischen Harnstoffzyklus und Säure-Basen-Haushalt sprechen [79].

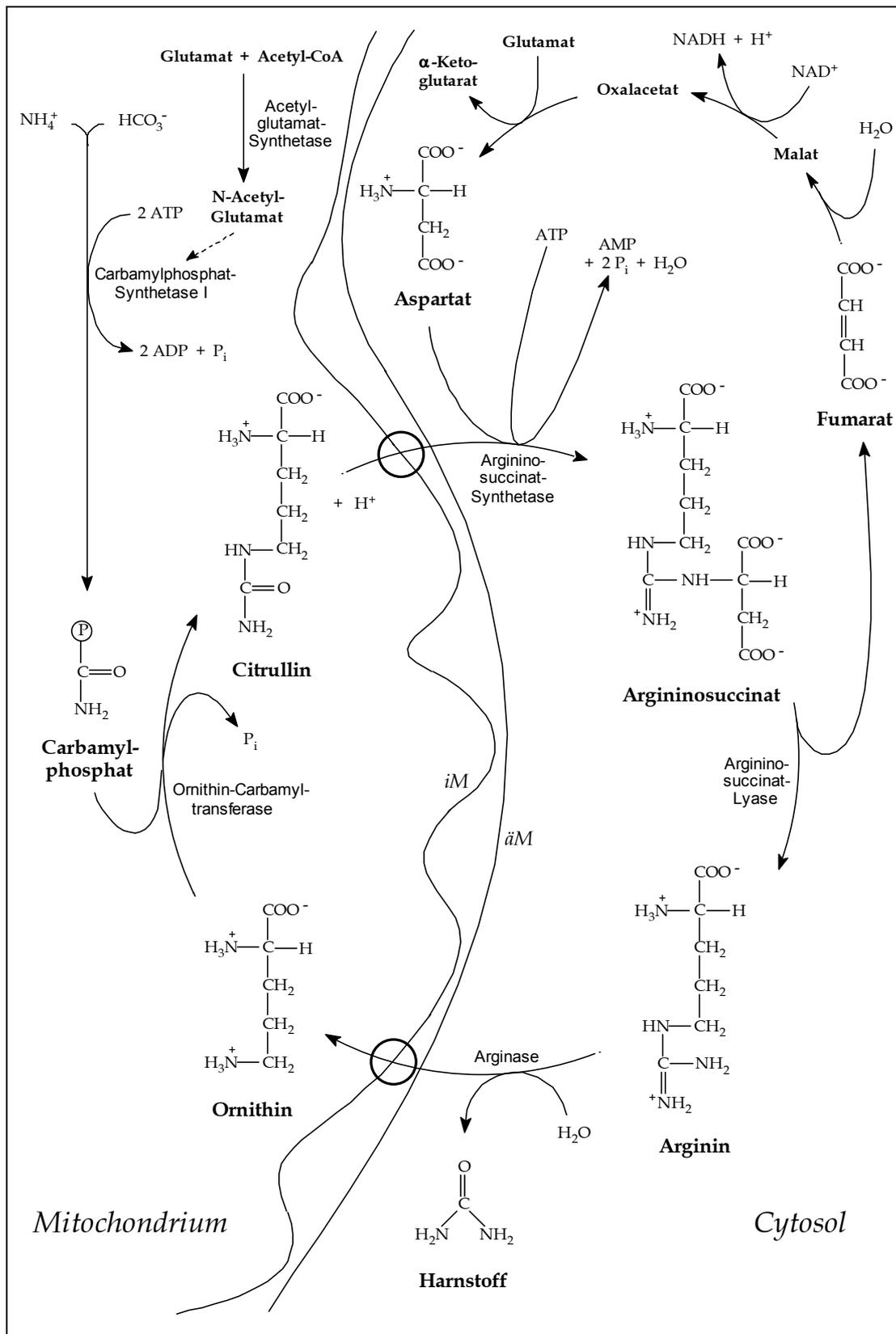


Abb. 1.3 Harnstoffzyklus [81]. Die Transportproteine der inneren Mitochondrienmembran sind durch Kreise angedeutet.

Dort verbindet die Argininosuccinat-Synthetase das α -Amino-N des Aspartats mit Citrullin. Das so entstehende Argininosuccinat wird von der Argininosuccinat-Lyase in Arginin und Fumarat gespalten. Die Arginase [82] trennt aus dem Arginin durch Hydrolyse die Guanidinogruppe, den Harnstoff ab. Das übriggebliebene Ornithin wird wieder in das Mitochondrium transportiert und steht dem Zyklus erneut zur Verfügung.¹²

Die Synthese eines Harnstoffmoleküls aus Ammoniak und Bikarbonat benötigt in der Bilanz etwa ein Molekül ATP. Dem Verbrauch von vier energiereichen Bindungen steht die Dehydrierung von Malat zu Oxalacetat gegenüber, die ein Reduktionsäquivalent und somit ungefähr drei Moleküle ATP erbringt.

¹² Die unten aufgeführten Zeilen stammen aus einem Liederbuch für Biochemiker [83]. Oxoglutarate entspricht α -Ketoglutarat, GDH bezeichnet die Glutamat-Dehydrogenase. Der in der sechsten Strophe angesprochene „elektrogene“ Ornithin/Citrullin-Austausch ist inzwischen widerlegt (Kap. 1.3). Man beachte auch die Definition von Freiheit in der letzten Strophe.

We're here because urea

The endogenous repletion of water in the sea
Lets nitrogenous excretion proceed quite easily
For ammonia though toxic is quickly washed away
So fish excrete the ammonotelic way.

But new terrestrial creatures to survive where it was dry
Developed metabolic features in order to detoxify,
Since urea is quite soluble and it doesn't make you sick
We each excrete as a ureotelic.

When protein breakdown is induced (to make new
glucose, say)
Amino acids thus produced give nitrogen away,
Keto acids are acceptors; and oxaloacetate
Transaminates... giving rise to aspartate.

Glutamate too may be produced from oxoglutarate
And now that it's been introduced deamination is its fate
For inside each mitochondrion of every liver cell
Is GDH... (reducing NAD as well).

Ammonia that's thus set free combined with CO₂
Utilising ATP (and an extra squiggle too)
The effector of the synthetase is acetyl glutamate,
The product formed... carbamoylphosphate.

Two amino acid oddities now enter on the scene,
The essential commodities, ornithine and citrulline;
Ornithine starts in the cytosol, citrulline in mitos, free
Then they exchange... electrogenically.

Carbamoylphosphate carbamylates the ornithine
So we get a kind of steady state generating citrulline;
Citrullin now is exported, then combined with aspartate
And generates... argininosuccinate.

That Schiff base condensation utilises ATP
But there is now elimination and fumarate's set free;
Fumarate through citric cycle yields oxaloacetate
That then in turn... gives another aspartate.

That cleavage mentioned just before also yielded arginine
And what this pathway's called a cycle for can now
readily be seen
For arginine is hydrolysed regenerating ornithine
Which can exchange... for another citrulline.

That arginase reaction then also yielded urea
(Aspartate gave one nitrogen, one from ammonia)
And we thus complete the cycle that let us leave the sea,
Sing urea... which set the people free.

1.4.3 Die Ornithin-Aminotransferase-Reaktion und die Glutamatsynthese

Die Ornithin-Aminotransferase ist wichtig für die Ammoniakentgiftung und die Ornithinhomöostase

Die Ornithin-Aminotransferase (OAT) ist das zweite mitochondriale Ornithin verarbeitende Enzym. Durch eine Transaminierung werden aus Ornithin und α -Ketoglutarat Glutamat- γ -semialdehyd und Glutamat gebildet (Abb. 1.4). Aus dem Semialdehyd kann durch die Glutamat-semialdehyd-Dehydrogenase ein weiteres Molekül Glutamat gebildet werden. Glutamat spielt eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel der Aminosäuren und des Stickstoffs [64].

Die OAT ist wie die Glutamin-Synthetase nur in den perivenösen Zellen lokalisiert. Die exklusive Gleichverteilung beider Enzyme auf eine bestimmte Zellgruppe ist leberspezifisch [84]. Die periportal stattfindende Harnstoffsynthese führt zu einer etwa 70%igen Ammoniak-Entgiftung. Am Ende der Lebersinusoiden haben die um die Zentralvene der Leberazini gelegenen 5 % der Hepatozyten [84] die Aufgabe, die restlichen 30 % des Ammoniaks durch die Glutaminsynthese abzufangen [64].¹³

Die Transaminierung dient dem Abbau überschüssigen Ornithins, das nicht für die Citrullinsynthese gebraucht wird. Bei proteinarmer Ernährung sinkt die OAT-Aktivität. Das Enzym sorgt somit für die Aufrechterhaltung einer relativ konstanten Ornithinkonzentration im Mitochondrium [39].

Durch die Verteilung auf unterschiedliche Zellgruppen konkurrieren Ornithin-Carbamyltransferase und Ornithin-Aminotransferase nicht um das Ornithin.

¹³ Die Verteilung des Harnstoffzyklus-Enzyms Carbamylphosphat-Synthetase I ist in der Leber reziprok zur Verteilung der OAT und der Glutamin-Synthetase [61]. Die CPS I hat mit einem K_m -Wert von 1–2 mM eine geringere Affinität zum Ammoniak als die GS mit einem K_m von 0,3 mM [62, 84]. Der pH im Cytosol ist etwas saurer als im Mitochondrium, deshalb akkumulieren die Ammonium-Ionen im Cytosol und begünstigen damit die Glutaminbildung [63]. Das Blut aus der Vena portae wird durch die Hintereinanderschaltung eines periportalen Systems geringer Affinität und hoher Kapazität und eines perivenösen Systems hoher Affinität verlässlich gereinigt. Die Glutaminase in den Mitochondrien der periportalen Hepatozyten katalysiert die Reaktion von Glutamin zu Glutamat unter Abspaltung des Ammoniaks, das in die Harnstoffsynthese geht. Es existiert ein „interzellulärer Glutaminzyklus“ [62, 63] zwischen periportalen Zellen, perivenösen Zellen und dem übrigen Kreislauf.

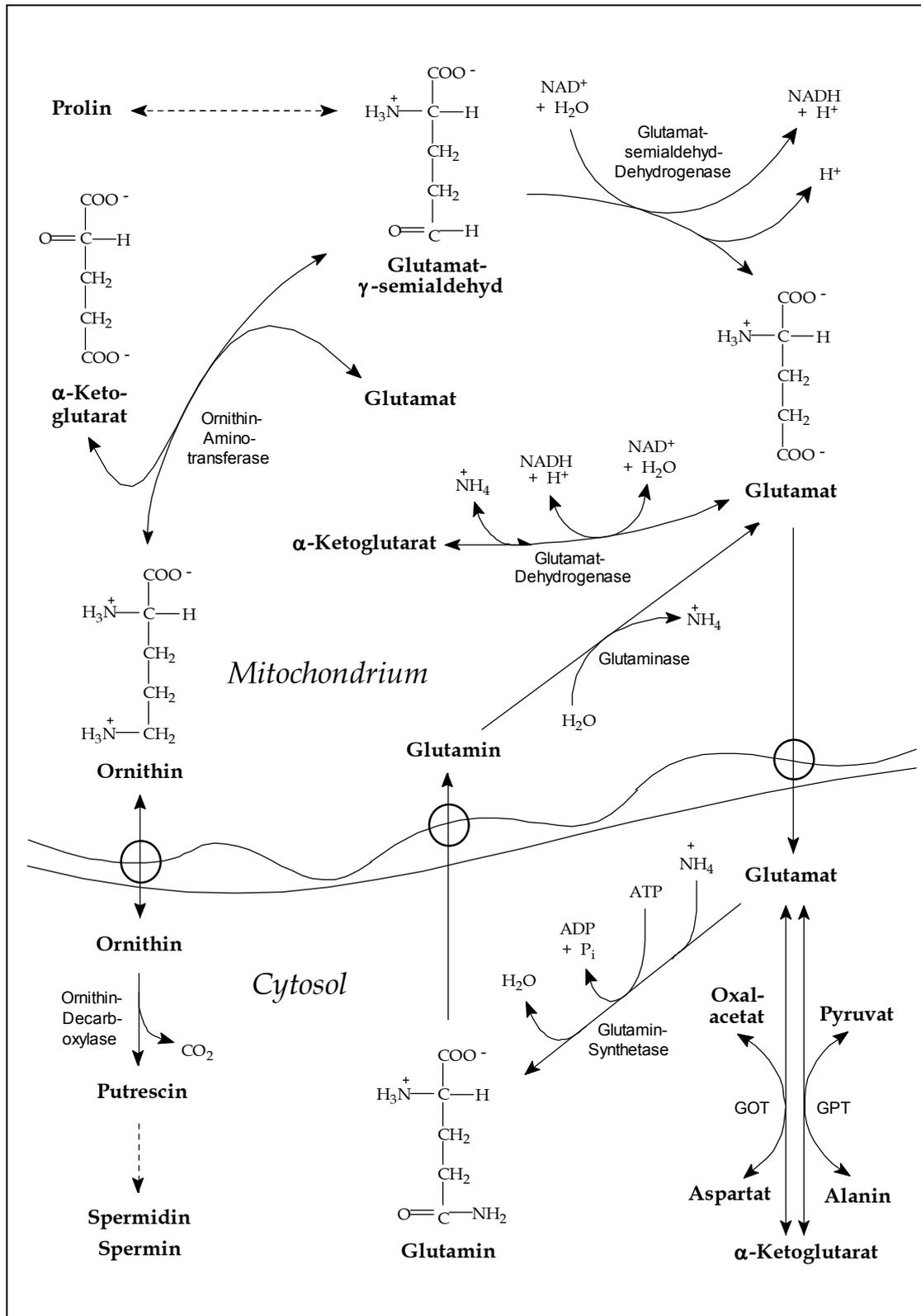


Abb. 1.4 Die Transaminierung der δ -Aminogruppe des Ornithins auf α -Ketoglutarat durch die mitochondriale Ornithin-Aminotransferase und die nachfolgende Dehydrierung ergeben zwei Moleküle Glutamat und ein H^+ .

1.4.4 Ornithin und Citrullin in weiteren Reaktionen

Der Glutamat- γ -semialdehyd ist als Vorstufe des Prolins und Hydroxyprolins wichtig für die Kollagensynthese (Abb. 1.4). Die Umkehrreaktion, also eine Ornithinsynthese aus Prolin, findet nicht in nennenswerten Maßen statt [39].

Für die Synthese der Polyamine Spermidin und Spermin wird Ornithin im ersten Schritt durch die Ornithin-Decarboxylase in Putrescin umgewandelt. Da diese und weitere Reaktionen im Cytosol stattfinden, ist ein Export des Ornithins aus den Mitochondrien nur bei einer an Arginin armen Ernährung nötig [41].

Bei der Kreatinsynthese entsteht Ornithin beim Übertrag einer Guanidinogruppe von Arginin auf Glycin, vergleichbar der entsprechenden von der Arginase katalysierten Reaktion im Harnstoffzyklus.

Eine Ornithin- und Citrullinsynthese aus Glutamin erfolgt nur geringfügig in intestinalen Mitochondrien [85], die damit Metabolite für den Harnstoffzyklus liefern.

Citrullin ist neben dem Harnstoffzyklus nur an wenigen Stoffwechsellvorgängen beteiligt (Tab. 1.1). Beim Proteinabbau im Dünndarm werden einzelne Aminosäuren schon von den Mukosazellen weiterverarbeitet. Citrullin entsteht beim Abbau von Arginin.

In Endothelzellen spaltet die NO-Synthetase Arginin in Citrullin und NO, das der wichtigste Gefäß relaxierende Faktor ist.

1.5 Problemstellung dieser Arbeit

Die treibenden Kräfte des Ornithin- und Citrullintransportes über die innere Mitochondrienmembran sind bisher nicht klar. Für den Ornithinimport und Citrullinexport könnten Konzentrationsgradienten der Metabolite eine Rolle spielen [42]. Die verfügbaren Informationen über Ornithin- und Citrullinverteilungen sind unvollständig und widersprüchlich.

In dieser Arbeit haben wir die mitochondrialen und cytosolischen Ornithin- und Citrullinkonzentrationen und Konzentrationsgradienten bestimmt. Dazu wurde der metabolische Status von Lebern gefütterter Ratten durch hämoglobinfreie Perfusion und anschließenden Frierstopp konserviert. Mit der nichtwässrigen Fraktionierung wurde eine Auftrennung der Zellkompartimente vorgenommen und mit Hilfe verschiedener Enzymtests und der HPLC wurden die Metabolitgehalte bestimmt.

Aus der subzellulären Verteilung der Metabolite lassen sich Rückschlüsse auf den Transport dieser Substanzen über die innere Mitochondrienmembran ziehen, die im weiteren diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Es wurden männliche Albinoratten vom Stamm Wistar mit einem Gewicht von 200–250 g der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verwendet. Die Ratten wurden mit einer Standarddiät (Altromin, ALTROGGE, Lage) und Wasser nach Belieben versorgt.

2.2 Leberperfusion

2.2.1 Material

Die verwendeten Chemikalien der gesamten Arbeit stammen, wenn nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen:

MERCK (Darmstadt), ROCHE (Mannheim) und SIGMA (Deisenhofen).

Krebs-Henseleit-Lösung, pH 7,4 mit Glukosezusatz:

NaCl,	115	mM
NaHCO ₃ ,	25	mM
KCl,	5,9	mM
MgCl x 6 H ₂ O,	1,18	mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O,	1,24	mM
Na ₂ SO ₄ ,	1,2	mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O,	1,25	mM
Glukose,	5	mM

Carbogen:	O ₂ ,	95	% V/V,
	CO ₂ ,	5	% V/V, LINDE (Düsseldorf)
Pentobarbitalnatrium,	6 mg/100 ml (Nembutal®),	SANOFI (Hannover)	
Heparin-Na,	5000 iE/ml		

Vario-Pumpsystem, ISMATEC (Glattbrugg-Zürich)

Teflon-Oxygenator, nach Scholz & Schallweg

Thermobad, HAAKE FS (Karlsruhe)

Clarke-Sauerstoffelektrode, BACHOFER (Reutlingen)

Schreiber Servogor 320, BBC, GOERZ (Nürnberg)

2.2.2 Operation der Versuchstiere

Die Ratten wurden mit einer intraperitonealen Nembutalinjektion betäubt (10 mg/100 g Körpergewicht). Nach ca. 20 Minuten wurden die Tiere auf Schmerzfreiheit getestet. Als Antikoagulans wurden 100 µl Heparin in die V. femoralis injiziert.

Das Abdomen wurde mit einem Medianschnitt eröffnet. Durch eine Inzision in die V. portae wurde eine mit der Perfusionsanordnung verbundene Kanüle eingeschoben und eingebunden. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug zu diesem Zeitpunkt ca. 3 ml/min. Dann wurde die V. cava inferior abgebunden. Nach Eröffnung des Thorax wurde eine zweite mit dem Sauerstoffmesser verbundene Kanüle nach Inzision in die V. cava superior geschoben und dort eingebunden. Anschließend wurde die Leber komplett freipräpariert, auf ein Perfusionstischchen überführt und dann für die restliche Perfusionszeit in Ruhe gelassen. Der Fluss des Perfusionsmediums wurde auf ca. 30 ml/min entsprechend 4–6 ml/min · g Leber gesteigert.

2.2.3 Hämoglobinfreie Leberperfusion im nicht rezirkulierenden System

Die Perfusion von Lebern im nicht rezirkulierenden System [86] gewährleistet eine über 90%ige Aufsättigung der Leber mit Sauerstoff [87].

In der Perfusionsanordnung wurde die mit Glukose angereicherte Krebs-Henseleit-Lösung¹⁴ [52] durch einen Oxygenator gepumpt, dort mit Carbogen gesättigt und auf 37 °C erwärmt. Danach passierte das Perfusionsmedium einen Blasenfänger und durchströmte dann via V. portae die Rattenleber mit einem Fluss von ca. 30 ml/min. Nach Verlassen der Leber via V. cava superior wurde der Sauerstoffgehalt des ausfließenden Perfusionsmediums kontinuierlich mit einer Sauerstoffelektrode gemessen und aufgezeichnet. Die Leber wurde solange perfundiert, bis der Sauerstoffverbrauch konstant war.

¹⁴ Diese Lösung wurde von Krebs bei der Erforschung des Harnstoffzyklus entwickelt. Sie sollte die von Krebs verwendeten dünnen Gewebeschnitte mit einer möglichst physiologischen Ionenmischung umgeben.

2.3 Frierstopp und anschließende Aufbereitung

2.3.1 Material

HClO ₄ ,	0,6	M
Trap / KOH,	1	M / 6 M
GAP-DH + PGK,	480	U/ml + 2700 U/ml
PK,	1,5	U/ml

Testmix für ATP-Messung:

Trap, pH 7,6,	100	mM
MgCl ₂ ,	10	mM
Hydraziniumsulfat,	2,54	mM
3-Phospho-Glycerat,	3,72	g/l
EDTA,	2	mM
NADH,	0,03	mM

Testmix für ADP-Messung:

Trap, pH 7,6,	100	mM
MgCl ₂ ,	2,88	mM
KCl,	7	mM
PEP,	1,4	mM
NADH,	0,03	mM
LDH,	5,5	U/ml

Aluminiumzange, nach Wollenberger, modifiziert nach Elbers
 Lyophilisator, BKF
 Zweiwellenlängen-Spektralphotometer II, SIGMA (Hamburg)

2.3.2 Frierstopp

Der Frierstopp bedeutet eine plötzliche Unterbrechung und Fixierung der momentanen Stoffwechselfvorgänge.

In die Backenoberflächen der Aluminiumzange [88] sind konzentrische Ringe gefräst [89]. Die Zange wurde in flüssigem Stickstoff (minus 196 °C) gekühlt. Die perfundierte Leber wurde dann schnell zwischen den Backen der gekühlten Zange friergestoppt. Es entstand eine gefrorene maximal 2 mm dicke geriffelte Gewebescheibe.

2.3.3 Weitere Aufbereitung des Lebergewebes

Durch die folgenden Arbeitsschritte wurde der Stoffwechselstatus des Lebergewebes im Moment des Frierstopps konserviert.

Die Gewebescheibe wurde in einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten Porzellschale zermörsert. Der so entstandene Gewebepulver wurde dann in ein kleines Kunststoffgefäß gegossen und anschließend im Lyophilisator im Vakuum für ca. 72 Stunden bei minus 40 °C getrocknet. Das so gefriergetrocknete Leberpulver wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei minus 80 °C aufbewahrt.

2.3.4 ATP/ADP-Verhältnis

In dem frisch gemörserten Gewebepulver wurde das Verhältnis von ATP zu ADP bestimmt. Das ATP/ADP-Verhältnis ist ein sensibler Indikator für eine ausreichende Oxygenierung der Leber während der Aufarbeitung [90].

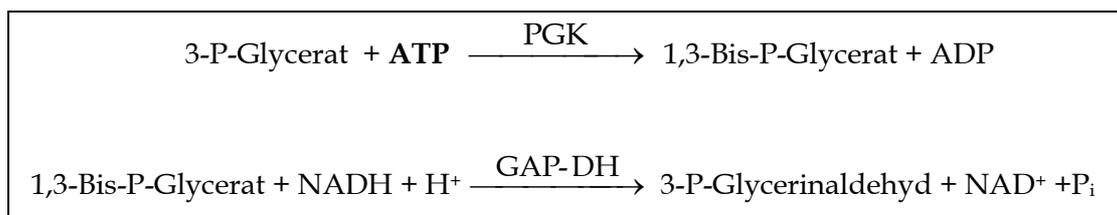
Eine Spatelspitze des Gewebepulvers wurde in ein Eppendorfcup mit 0,6 M HClO₄ zur Enteiweißung gegeben, gemischt, zentrifugiert und der Überstand mit Tris/KOH neutralisiert.

Zur Kontrolle wurde das ATP/ADP-Verhältnis im gefriergetrockneten Pulver noch einmal bestimmt.

ATP und ADP wurden mit optisch-enzymatischen Tests bestimmt [91]. Es wurde jeweils die NADH-Abnahme am Zweiwellenlängenphotometer bei den Wellenlängen 340/400 nm gemessen.

ATP-Messung

Testprinzip:



Ausführung:

ATP-Testmix 550 μ l

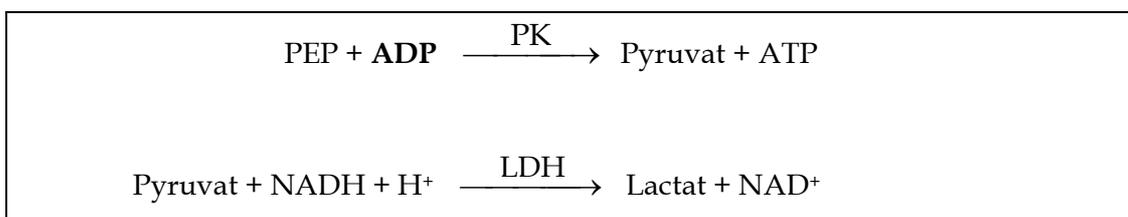
Probe 50 μ l

Reaktionsstart mit:

GAP-DH + PGK 2 μ l

ADP-Messung

Testprinzip:



Ausführung:

ADP-Testmix 550 μ l

Probe 50 μ l

Reaktionsstart mit:

PK 2 μ l

2.4 Nichtwässrige Fraktionierung

2.4.1 Material

Calciumchlorid, gekörnt, 5-15 mm

Molekularsieb, 0,4 nm

Tetrachlorkohlenstoff p.A. (CCl₄)

n-Heptan p.A. (C₇H₁₆)

Trockeneis (gefrorenes CO₂), AIR-LIQUID (Düsseldorf)

Glasperlensäule, ca. 12 cm, \varnothing ca. 1,5 cm, eigene Herstellung

Glasperlen, \varnothing 0,25-0,3 mm, ca. 3 cm,

\varnothing 0,45-0,5 mm, ca. 7 cm, BRAUN (Melsungen)

Quarzsand, MERCK (Darmstadt)
Spezial-Zentrifugenröhrchen, GREINER (Nürtingen)
Ultraschallgerät Sonifier B12, 150 W, BRANSON (Danbury, Connecticut, USA)
Gradientenmischer, eigene Herstellung
Zentrifuge RC-5B, DUPONT-SORVALL
Swing out Rotor HB 4, DUPONT-SORVALL
Tischzentrifuge 3200, EPPENDORFF (Hamburg)

2.4.2 Fraktionierung des Lebergewebes in nichtwässrigen Medien

Durch die völlig wasserfreie Weiterverarbeitung werden auch in den folgenden Arbeitsschritten Stoffwechselfvorgänge im Lebergewebe verhindert. In der nichtwässrigen Fraktionierung [89] wird nach dem Prinzip der Gleichgewichtssedimentation das Gewebepulver über einem Dichtegradienten aufgetrennt und anschließend in mehrere Fraktionen aufgeteilt (Abb. 2.1). Die extramitochondrialen Anteile sind dichter und sinken im allgemeinen im Gradienten tiefer als die mitochondrialen Anteile. Jede Fraktion (Schicht im Gradienten) hat also eine typische Verteilung von Zellanteilen beider Kompartimente, die anschließend in den einzelnen Fraktionen mit Hilfe von Leitenzymen gemessen werden kann [89] (Kap. 2.6).

Zur Vorbereitung wurden Heptan und Tetrachlorkohlenstoff zunächst mit Calciumchlorid getrocknet und anschließend bei 4 °C auf Molekularsieb gelagert. Für die Fraktionierung wurden Gemische verschiedener Dichte aus Tetrachlorkohlenstoff und Heptan hergestellt.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C ausgeführt. Etwa 300 mg des getrockneten Leberpulvers wurden in einem Kunststoffröhrchen in 11 ml eines Gemisches der Dichte 1,23 g/ml aufgenommen und anschließend mit einem Sonifier 4 Minuten lang mit einer einminütigen Unterbrechung in 5-Sekunden-Intervallen beschallt, wobei das Kunststoffröhrchen kontinuierlich in einem mit Trockeneis und Heptan gefüllten Gefäß gekühlt wurde.

Die so entstandene Suspension wurde zur Reinigung von gröberen Bindegewebsbestandteilen und nicht zerkleinertem Gewebe über eine mit Glastropfen und CCl₄-Heptan-Gemisch gefüllte Säule gegeben, in einem SORVALL-Röhrchen aufgefangen und 1 Sekunde bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde dann 10 Minuten bei 10 000 Umdrehungen pro Minute weiterzentrifugiert.

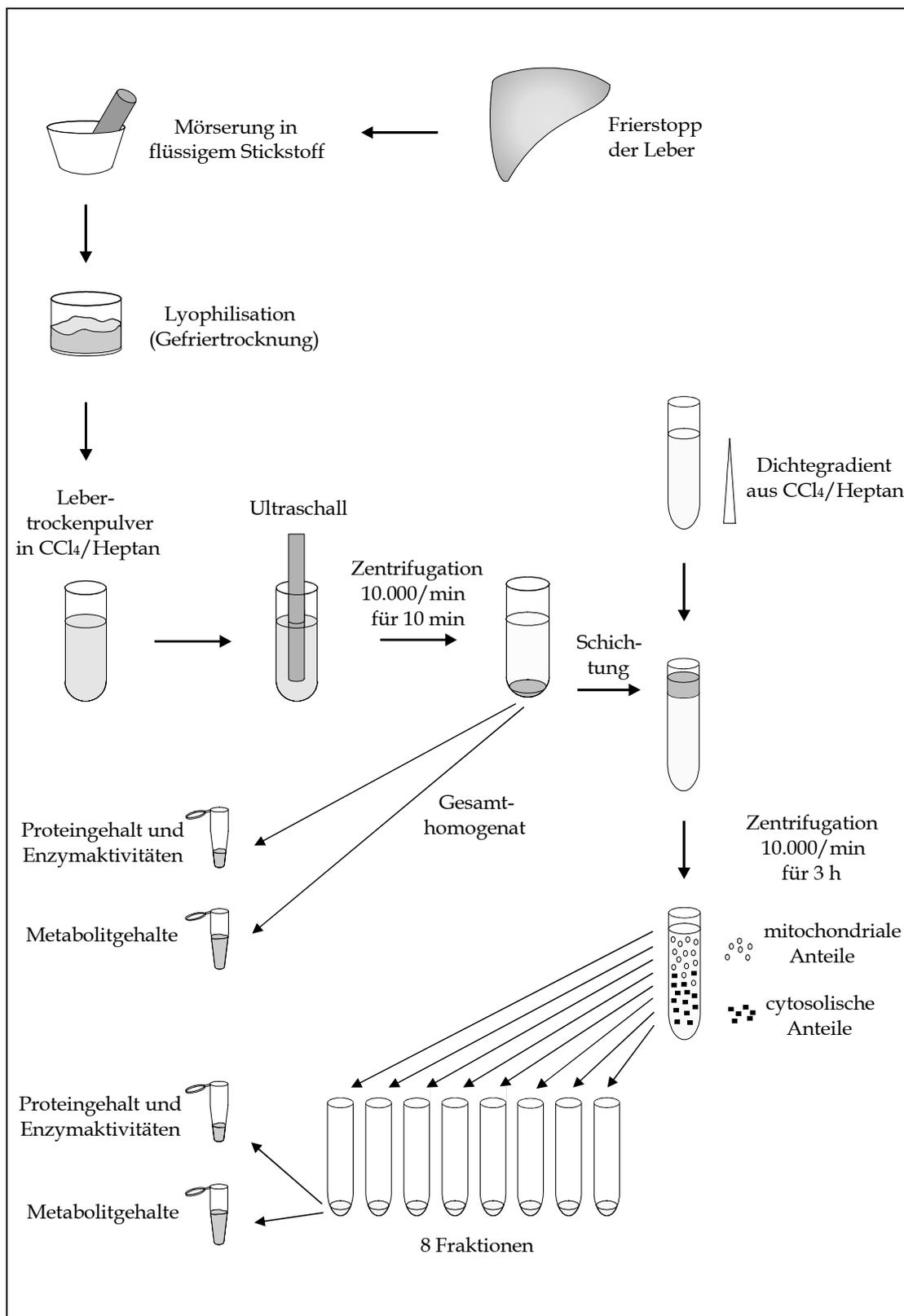


Abb. 2.1 Durch die hier schematisch dargestellte nichtwässrige Fraktionierung wird der Stoffwechselstatus des Lebergewebes im Moment des Frierstopps konserviert.

Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml eines CCl_4 -Heptan-Gemisches der Dichte 1,29 g/ml aufgenommen und resuspendiert. Von diesem Gesamt-Homogenat wurden 200 μl für die Metabolitenbestimmungen¹⁵ und 50 μl für die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten in jeweils mit einer Spatelspitze Quarzsand gefüllte Eppendorfcups gegeben.

Die logarithmischen Dichtegradienten wurden in Spezial-Zentrifugenröhrchen für hohe Umdrehungszahlen mit Hilfe eines Gradientenmischers aus zwei verschiedenen CCl_4 -Heptan-Gemischen der Dichten 1,29–1,3 g/ml und 1,345–1,355 g/ml auf 0,5 ml reinem CCl_4 aufgebaut. Die dafür am besten geeigneten Dichtegemische variierten etwas von Leber zu Leber.

Auf die Gradienten wurde je 1 ml des Gewebehomogenats geschichtet und die Gradienten dann für 3 Stunden bei 10 000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C zentrifugiert. Während der Zentrifugation verteilte sich das Homogenat über die Gradienten.

Aus den Gradienten wurden anschließend 8 Fraktionen vorsichtig abpipettiert. Für die weiteren Messungen wurden die entsprechenden Fraktionen je zweier gleichzeitig zentrifugierter Gradienten zusammengefasst.¹⁶ Von jeder Fraktion wurden dann Aliquots für die Metaboliten- und die Enzymbestimmungen in mit einer Spatelspitze Quarzsand gefüllte Eppendorfcups abgeteilt.

Die Cups wurden mit ca. 1 ml Heptan aufgefüllt, 2 Minuten mit der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment nach Aufschütteln im Exsikkator im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 °C gelagert.

Aus dem Pulver jeder Leber ließen sich so vier bis sieben Doppel-Gradienten herstellen.

¹⁵ Die Metabolite sind hier die Aminosäuren Citrullin und Ornithin.

¹⁶ Der Einfachheit halber werden diese zusammengefassten Doppel-Gradienten im folgenden ebenfalls als „Gradienten“ bezeichnet.

2.5 Proteinkonzentrationen

2.5.1 Material

KPO₄-Puffer, 0,25 mM, nach SÖRENSEN
KPO₄-Puffer, 100 mM, nach SÖRENSEN

Reagenzien für den Proteintest nach LOWRY:

A: Natriumcarbonat wasserfrei, 20 g/l
+ NaOH, 4 g/l
B: Kupfersulfat x 5 H₂O, 1 %
C: Kaliumnatriumtartrat, 2 %

Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, 1 N (verdünnt)

Zellhomogenisator MSK, modifiziert, BRAUN (Melsungen)

Spektrophotometer Ultrospec 3000, PHARMACIA BIOTEC (Freiburg)

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen

Vorbereitung der Proben

Die Proteinkonzentration wurde in den für die Enzymbestimmungen vorgesehenen Eppendorfcups bestimmt. Die getrockneten Proben wurden zur Resuspendierung zusammen mit je 0,5 ml 0,25 mM Phosphatpuffer im Homogenisator für 6 mal 30 Sekunden geschüttelt und in den Pausen mit Eis gekühlt. Nach 10 Minuten wurden je 0,5 ml 100 mM Phosphatpuffer zu den Proben gegeben.

Messungen der Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde nach dem Verfahren von Lowry [92] aus den Proben bestimmt. Vor jeder Messung wurde eine Lösung aus 99 Teilen A und je 0,5 Teilen B und C angesetzt. Zu 2 ml dieser Mischung wurden je 50 µl Probe pipettiert. Nach 15 Minuten wurde die Farbreaktion mit je 200 µl 1 M Folinreagenz gestartet. Nach weiteren 10 Minuten wurden die Extinktionen am Spektrophotometer bei 578 nm gemessen. Mit Hilfe einer zuvor erstellten Eichkurve aus Rinderserumalbumin wurden die Extinktionen direkt in Konzentrationen

umgerechnet. Die Proteinkonzentrationen in den für die Metabolitmessungen bestimmten Eppendorfcups wurden hochgerechnet aus dem Mengenverhältnis der in die Enzym- und Metabolit-Eppendorfcups einer jeden Fraktion abgeteilten Gradienten-Aliquots.

2.6 Enzymaktivitäten

2.6.1 Material

Testmix für CS-Bestimmung:

Trap, pH 8,5,	85	mM
L-Malat,	3	mM
APAD,	0,2	mM
MDH,	12.000	U/ml

Testmix für PGK-Bestimmung:

TRAP pH 7,6	90	mM
EDTA,	1	mM
MgSO ₄ ,	2	mM
NADH,	0,17	mM
GAP-DH,	9,3	U/ml
3-PGA,	12	mM

Acetyl-CoA,	8,4	mM
ATP,	200	mM

Photometer mit Quecksilberdampfampe 1101 M, EPPENDORF (Hamburg)

Schreiber L 6522, INSEIS

Küvetten

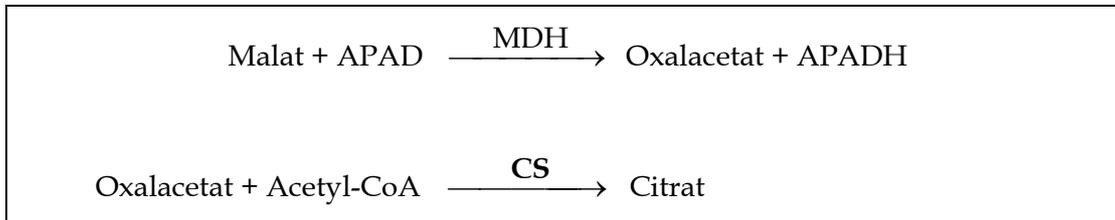
2.6.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten in den einzelnen Fraktionen

In jeder Probe, also in jeder Fraktion eines Gradienten, wurden photometrisch die Aktivitäten der Citrat-Synthetase als Markerenzym für den mitochondrialen und der Phosphoglycerat-Kinase als Markerenzym für den extramitochondrialen Raum bestimmt [89]. Die Messungen wurden bei 27 °C durchgeführt [91].

Messung der Citrat-Synthetase

Zur Messung der Citrat-Synthetase-Aktivität wurde am Photometer bei einer Wellenlänge von 366 nm die APADH-Zunahme gemessen und aufgezeichnet.

Testprinzip:



Ausführung:

CS-Testmix 800 µl

Probe 100 µl

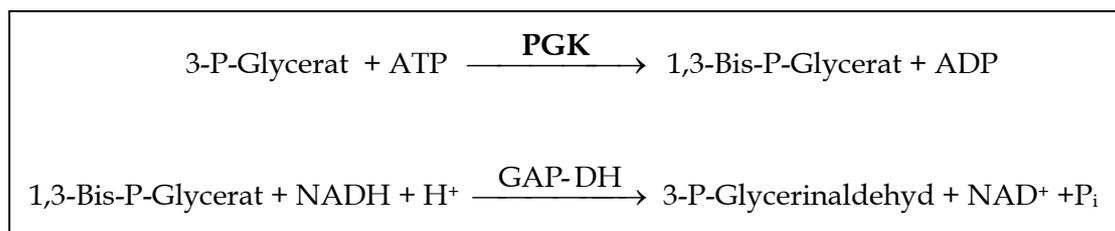
Zur Gleichgewichtseinstellung zwischen Malat und Oxalacetat wurde der Ansatz 5 Minuten stehengelassen. Dann Reaktionsstart mit:

Acetyl-CoA 20 µl

Messung der 3-Phosphoglycerat-Kinase

Zur Messung der 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität wurde am Photometer bei einer Wellenlänge von 334 nm die NADH-Abnahme gemessen und aufgezeichnet.

Testprinzip:



Ausführung:

PGK-Testmix 880 µl

Probe 20 µl

Reaktionsstart mit:

ATP 20 µl

Berechnung der Enzymaktivitäten

Durch die Zu- bzw. Abnahme des jeweiligen Coenzym ergibt sich die Registriergerade, deren Steigungswinkel α gemessen wird. Die Enzymaktivität lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$A = \frac{U}{l} = \tan \alpha \cdot F \cdot \frac{V \cdot 1000 \cdot Pv}{\varepsilon \cdot v \cdot d \cdot Pb} \quad (1)$$

A = Enzymaktivität [$\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]

U = Substratumsatz pro Minute [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$]

F = Verdünnungsfaktor

V = Gesamtvolumen in der Küvette [ml]

Pv = Papiervorschub: $1 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$

v = Probenvolumen [ml]

d = Schichtdicke der Küvette: 1 cm

Pb = Papierbreite: 20 cm

ε = Extinktionskoeffizienten: NADH : $\varepsilon_{334} = 6,18 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

APAD : $\varepsilon_{366} = 9,2 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

2.7 Metabolitkonzentrationen in den Proben

2.7.1 Material

Methanol p.A.

Natriumacetat, 100 mM, pH 7,2

+ NaN_3 (Azid), 0,06 %

Derivatisierungsreagenzien, pH 10, PIERCE (Rockford, Illinois, USA):

o-Phthalaldehyd, 0,8 mg/ml,

+ 2-Mercaptoethanol

Chromatograph mit automatischer Probenaufnahme, Autoinjektion und beheiztem

Säulenkompartiment, HP 1090, Serie M, HEWLETT-PACKARD (Waldbronn)

Trennsäule: Hypersil ODS 5, 5 μm , 125mm x 4mm I.D., HEWLETT-PACKARD

Fluoreszenzdetektor HP 1046 A, HEWLETT-PACKARD

Workstation HP, HEWLETT-PACKARD

Sterilfilter, Porengröße 0,22 µm, Ø 25 mm
Ultraschallgerät Sonifier 250, BRANSON (Danbury, Connecticut, USA)

2.7.2 Vorbereitung der Proben

Zur Ausfällung der Proteine wurden die getrockneten Proben zusammen mit je 0,5 ml 0,6 M Perchlorsäure im Homogenisator für 4 mal 30 sec geschüttelt und in den Pausen mit Eis gekühlt [89]. Nach 3maliger Beschallung wurden die Proben 2 Minuten zentrifugiert, 460 µl des Überstandes abpipettiert und mit 55 µl 6 M TRAP/KOH neutralisiert. Nach 10 Minuten wurden die Proben für weitere 2 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei minus 80 °C gelagert.

Aus den einzelnen Arbeitsschritten ergibt sich folgender Verdünnungsfaktor für die Berechnung der realen Aminosäurekonzentrationen in den Fraktionen:

$$D = 0,5 \cdot \frac{460 \mu\text{l} + 55 \mu\text{l}}{460 \mu\text{l}} = 0,56 \quad (2)$$

2.7.3 Farbtests zur Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen

Auf der Ninhydrinreaktion [93] und der FEARON-Reaktion [94–96] beruhende Farbttests stellten sich bei oben beschriebener Probenaufbereitung als nicht geeignet für die Bestimmung der Konzentrationen von Citrullin und Ornithin heraus. Die Mengen beider Aminosäuren waren in den Proben zu gering, um reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten.

2.7.4 Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC

Als besser geeignet zur Aminosäurenbestimmung erwies sich die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography).

Vorsäulenderivatisierung der Aminosäuren mit OPA/MCE zu fluoreszierenden Verbindungen

In der klassischen Methode zur Aminosäurendetektion [97, 98] wurden die Aminosäuren durch Ionen-Austauschchromatographie getrennt und dann nach Derivatisierung mit Ninhydrin im sichtbaren Bereich gemessen. Nach der Entdeckung, dass primäre Aminosäuren mit *o*-Phthalaldehyd (OPA) in der Gegenwart von Mercaptoethanol (MCE) zu fluoreszierenden Verbindungen reagieren [99], setzte man OPA/MCE zur Derivatisierung der Aminosäuren im Anschluss an die Säulenchromatographie ein. Dieses Verfahren war den bis dahin gängigen Derivatisierungen mit Ninhydrin und Fluorescamin in Sensibilität und Stabilität der Reagenzien (und im Preis) überlegen [100]. Die zunächst unbekanntenen Reaktionsmechanismen [99] bei der Bildung der fluoreszierenden Isoindole (Abb. 2.2) wurden aufgeklärt [101, 102, 103].

Mit dem Einsatz der hier verwendeten Umkehrphasen-HPLC zur Auftrennung der vorher mit OPA/MCE derivatisierten Aminosäuren [104, 105] entstand eine sensitive, schnelle und gut reproduzierbare Methode zur Messung von Aminosäurekonzentrationen [106, 107]. Bei der Umkehrphasen-HPLC ist die mobile Phase polarer als die stationäre Phase. Je größer die Polarität einer Aminosäure ist, desto kürzer ist die Retentionszeit. Hydrophile Stoffe eluieren also zuerst. Die Messdauer und die Genauigkeit der Auftrennung werden verbessert durch eine mobile Phase, die aus einem polaren und einem wenig polaren Lösungsmittel besteht, deren Mischungsverhältnisse sich während der Auftrennungszeit verändern.

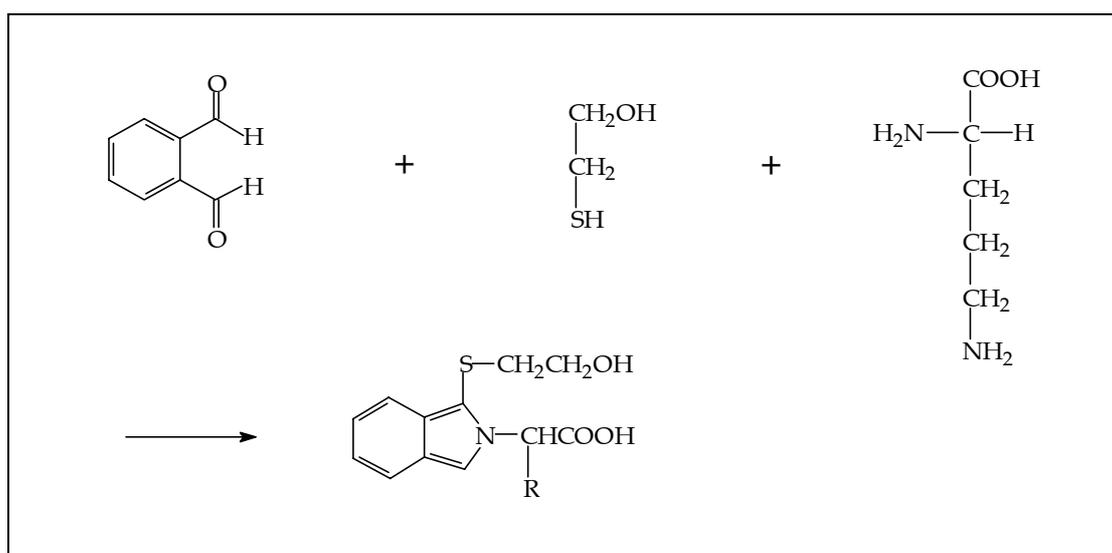


Abb. 2.2 Derivatisierung: *o*-Phthalaldehyd und 2-Mercaptoethanol reagieren mit primären Aminosäuren (hier mit Ornithin) zu fluoreszierenden Isoindolen.

In verschiedenen Untersuchungen stellte man eine Instabilität der Aminosäuren-OPA/MCE-Derivate fest, unter anderem auch von Ornithinderivaten [104, 108, 109]. Diese Instabilitäten bedeuten einen Verlust an Fluoreszenz. Die Verluste können weitgehend vermieden werden, indem die Mischung von OPA/MCE mit der Probe erst kurz vor dem Lauf über die Säule stattfindet, denn in den ersten 20 Minuten verlieren die Derivate kaum Fluoreszenz [99, 110]. Zusätzlich hat der Aufenthalt der Derivate in der Säule eine stabilisierende Wirkung [111].

Da Standards und Proben unter gleichen Bedingungen gemessen wurden und in Anbetracht der Standardabweichungen der Peak-Flächen von 6,2 % bei Ornithin und 1,9 % bei Citrullin [107] ist demzufolge ein eventueller Fluoreszenzverlust zu tolerieren.

Probenvorbereitung und Messungen

Vor den Messungen wurden die aufgeschüttelten Proben zur Reinigung von möglicherweise noch vorhandenen Geweberesten und Partikeln durch einen Sterilfilter in die HPLC- Probenbehälter gepresst.

Zur Fluoreszenzdetektion wurde die oben beschriebene Vorsäulenderivatisierung der Aminosäuren mit OPA/MCE [107] durchgeführt. Die automatische Aufnahme der Proben und der Derivatisierungsreagenzien erfolgte entsprechend einem einprogrammierten Injektionsplan. Es wurden 6 µl Probe mit 8 µl OPA/MCE gemischt. In Zwischenschritten wurde die Injektionsnadel zur Reinigung in Wasser getaucht. Durch eine Vor- und Rückwärtsbewegung innerhalb der Injektionskapillare wurden Probe und Reagenzien gemischt und nach einer Minute Reaktionszeit auf die Säule gespritzt.

Die mobile Phase bestand aus einem Natriumacetat/Methanol-Gemisch. Es wurde ein zeitlicher Gradient einprogrammiert, demzufolge der Natriumacetat-Anteil zu Beginn 75 % betrug und in mehreren Schritten bis auf 27 % abfiel. Der pH betrug 7,2. Die Auftrennung der Derivate erfolgte bei 40 °C, einem Fluss von 0,5 ml/min über eine Dauer von 14,5 Minuten.

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm [107]. Für die weiteren Berechnungen wurden die Flächen unter den peaks im Chromatogramm gemessen.

Es wurde ein externer Standard, bestehend aus Citrullin und Ornithin in aufsteigenden Konzentrationen (1, 2, 5, 10, 20 und 50 µM) verwendet. Der Standard wurde

nach dem Durchlauf eines Gradienten (je 8 Fraktionen + Gesamthomogenat) jeweils neu bestimmt, um möglicherweise veränderte Messbedingungen auszugleichen. Mit Hilfe einer aus den Standard-Messergebnissen errechneten Gerade ließ sich die Aminosäurekonzentration C in den Proben nach folgender Formel bestimmen:

$$C_{\text{Probe}} = \text{peak}_{\text{Probe}} \cdot F \quad \text{mit } F = C_{\text{Standard}} / \text{peak}_{\text{Standard}} \quad (3)$$

Es wurden Doppelmessungen durchgeführt und die so erhaltenen Werte mit dem Verdünnungsfaktor D nach Gleichung (2) multipliziert.

2.8 Berechnungen

2.8.1 Vorannahmen

Für die weiteren Überlegungen wurde die Zelle vereinfachend in das mitochondriale und cytosolische¹⁷ Kompartiment aufgeteilt. Die extramitochondrialen Kompartimente können für unsere Fragestellung wie ein einziges Kompartiment behandelt werden. Die Aktivität der Citrat-Synthetase (CS) als rein mitochondriales Enzym repräsentiert den mitochondrialen Raum und die Aktivität der Phosphoglycerat-Kinase (PGK) den cytosolischen Raum. Diese beiden Enzyme haben sich als geeignete Repräsentanten für die beiden Zellkompartimente erwiesen [112].

Enzyme und Metabolite sind aufgrund ihrer polaren Eigenschaften in den organischen Lösungsmitteln fest assoziiert. Diese Assoziation wurde unter den gegebenen Bedingungen als nicht lösbar angesehen. Eine Extraktion von Enzymen oder polaren Stoffwechselprodukten durch die organischen Lösungsmittel findet nicht statt [87] (Kap. 4.1.2).

¹⁷ Der Begriff „cytosolisch“ und die Abkürzung „cyt“ sind als Synonym für „extramitochondrial“ zu verstehen.

2.8.2 Berechnungen

Proteinkonzentrationen und Metabolitgehalte

Unter den obigen Vorannahmen befinden sich die Metabolite und Enzyme eines Kompartimentes in einem bestimmten Verhältnis zueinander. Der Quotient aus jeweiligem Metabolit und jeweiliger Enzymaktivität ist somit konstant.

$$\frac{\text{Metabolit}_{\text{mit}}}{\text{CS}} = a \quad \Leftrightarrow \quad \text{Metabolit}_{\text{mit}} = a \cdot \text{CS} \quad (4)$$

$$\frac{\text{Metabolit}_{\text{cyt}}}{\text{PGK}} = b \quad \Leftrightarrow \quad \text{Metabolit}_{\text{cyt}} = b \cdot \text{PGK} \quad (5)$$

In jeder Fraktion gilt folgende Gleichung:

$$\text{Metabolit}_{\text{tot}} = \text{Metabolit}_{\text{mit}} + \text{Metabolit}_{\text{cyt}} \quad (6)$$

Durch Einsetzen von (4) und (5) in (6) erhält man:

$$\text{Metabolit}_{\text{tot}} = a \cdot \text{CS} + b \cdot \text{PGK} \quad : \text{CS} \quad (7)$$

$$\frac{\text{Metabolit}_{\text{tot}}}{\text{CS}} = a + b \cdot \frac{\text{PGK}}{\text{CS}} \quad (8)$$

Die Gleichung (8) hat die Form einer Geradengleichung mit der Steigung b und dem Ordinatenabschnitt a .

Für Protein, das gewissermaßen ein spezieller Metabolit ist, gelten die obigen Gleichungen ebenso:

$$\text{Protein}_{\text{mit}} = a' \cdot \text{CS} \quad (4)'$$

$$\text{Protein}_{\text{cyt}} = b' \cdot \text{PGK} \quad (5)'$$

$$\text{Protein}_{\text{tot}} = \text{Protein}_{\text{mit}} + \text{Protein}_{\text{cyt}} \quad (6)'$$

Man kann dann ein Koordinatensystem mit der Ordinate $\text{Metabolit}_{\text{tot}}/\text{CS}$ bzw. $\text{Protein}_{\text{tot}}/\text{CS}$ und der Abszisse PGK/CS bilden. Bei Einsetzen der Messwerte aus den einzelnen Fraktionen in Gleichung (8) und Eintragung in das Koordinatensystem ergibt sich eine langgestreckte Punktwolke. Unter den Vorannahmen sollten im

Idealfall die Punkte auf einer der Geraden liegen. Das gilt auch für das analoge Koordinatensystem mit der Ordinate $\text{Metabolit}_{\text{tot}}/\text{PGK}$ bzw. $\text{Protein}_{\text{tot}}/\text{PGK}$ und der Abszisse CS/PGK .

Durch die sich aus den Messwerten ergebenden Punkte werden durch lineare Regression Geradengleichungen mit a und b berechnet.

Mit a und b lassen sich dann nach den Gleichungen (4) bis (6) mit den zu einer Gesamtaktivität summierten Enzymaktivitäten die Konzentrationen von Protein und Metaboliten und ihre Verteilung auf Mitochondrien und Cytosol ermitteln.

Durch Division der Gleichungen (4) durch (4)' und (5) durch (5)' erhält man:

$$\frac{(4)}{(4)'} : \frac{\text{Metabolit}_{\text{mit}}}{\text{Protein}_{\text{mit}}} = \frac{a}{a'} \quad (9)$$

$$\frac{(5)}{(5)'} : \frac{\text{Metabolit}_{\text{cyt}}}{\text{Protein}_{\text{cyt}}} = \frac{b}{b'} \quad (10)$$

Man gelangt so zum mitochondrialen bzw. cytosolischen Gehalt eines Metaboliten in nmol bezogen auf das mitochondriale bzw. cytosolische Protein in mg.

Metabolitkonzentrationen

Für die Umrechnung der so erhaltenen Werte in Metabolitkonzentrationen bezogen auf das jeweilige Zellkompartiment wurde ein Wasserraum von $0,8 \mu\text{l}/\text{mg}$ mitochondriales Protein und von $3,8 \mu\text{l}/\text{mg}$ cytosolisches Protein angenommen [11, 90, 113, 114].

Die aus den Doppelmessungen der einzelnen Gradienten erhaltenen Werte wurden gemittelt. Aus dem Gewebe jeder Leber konnten 4 bis 7 Gradienten hergestellt werden.

Die Berechnungen der Protein- und Metabolitkonzentrationen wurden für jeden Gradienten sowohl auf CS als auch auf PGK bezogen angestellt. So ließen sich für Protein und jeden Metaboliten bei jeder Leber zwei Mittelwerte bilden und diese wiederum mitteln. Die Genauigkeit der Werte aus den Einzelregressionen konnte so verbessert werden. Aus diesen Mittelwerten wurde schließlich das jeweilige arithmetische Mittel aus **allen** Lebern berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Leberperfusion

Durch die Operation der Versuchstiere wurde die Blutzufuhr zur Leber kurzfristig gestört. In der nachfolgenden Perfusion hatte die Leber ausreichend Zeit, wieder einen stabilen Stoffwechszustand einzustellen.

Zu Beginn der Perfusion war der Sauerstoffverbrauch durch die vorangegangene Unterversorgung hoch. Der Sauerstoffverbrauch fiel im Laufe mehrerer Minuten ab, um sich dann auf einem konstanten Niveau einzupendeln.

Ein stabiler Stoffwechszustand (steady state) wurde angenommen, wenn sich der Sauerstoffverbrauch über mindestens 10 Minuten nicht mehr verändert hatte.

Eine hellbraune Farbe der perfundierten Leber gab einen zusätzlichen Hinweis auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung, während eine dunkle braun-rote Färbung ein Anzeichen für Sauerstoffmangel war. Eine dunklere Färbung nur eines Leberlappens wies auf eine Minderperfusion eines Portalastes durch ungünstige Strömungsverhältnisse hin. Solche partiellen Minderperfusionsen konnten meist durch ein leichtes Verschieben der zuführenden Kanüle behoben werden.

Die Perfusionszeit der Lebern betrug jeweils 20 bis 30 Minuten.

Der anschließende Frierstopp wurde so durchgeführt, dass die Perfusion nicht unterbrochen wurde. Gewebeanteile, die sich nicht zwischen den Zangenbacken befanden, wurden verworfen.

Durch die Kühlung des Lebergewebes mit flüssigem Stickstoff während der folgenden Arbeitsschritte bis zum Einsetzen in den Lyophilisator wurde ein Wiederaanlaufen der Stoffwechszvorgänge im Gewebe verhindert.

3.2 Oxygenierungszustand der Lebern

Zur Bewertung des Oxygenierungszustandes der Lebern wurde das ATP/ADP-Verhältnis bestimmt (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1 ATP/ADP im gefriergetrockneten Pulver.

Leber	ATP/ADP
2	4,81
3	3,46
4	2,86
5	2,90
6	2,03
7	2,81
8	3,77
9	1,93

Die Werte der Lebern 6 und 9 lassen auf eine mangelhafte Oxygenierung während der Perfusion schließen. Diese Lebern wurden von den weiteren Untersuchungen ausgenommen.

Der Mittelwert der ATP/ADP-Verhältnisse der weiter verwendeten Lebern (2-5, 7 und 8) beträgt $3,44 \pm 0,78$ (SD).

3.3 Auftrennung im Dichtegradienten

Die Gewebedichten der einzelnen Lebern und damit auch das Verhalten des Trockenpulvers in den Gradienten waren etwas unterschiedlich. Um eine akzeptable Auftrennung zu erreichen, mussten deshalb die Verhältnisse der CCl₄-Heptan-Gemische für die Dichtegradienten bei jeder Leber neu angepasst werden.

3.4 Proteinkonzentrationen der Proben

Wie sich bei Voruntersuchungen von Leberhomogenat herausstellte, waren die Konzentrationen von Ornithin und Citrullin in der Leber so niedrig, dass sie zunächst bei den uns zur Verfügung stehenden Messmethoden an der Nachweisgrenze lagen.

Es war deshalb nötig, möglichst viel Gewebepulver auf die Dichtegradienten zu schichten, um für die einzelnen Fraktionen höhere Protein- und Metabolitkonzentrationen zu erreichen. Die aufzuschichtende Menge war allerdings dadurch begrenzt, dass ein Zuviel an Gewebepulver sich nicht mehr sauber auftrennen ließ. Als guter Kompromiss stellte sich ein Menge von 300 bis 400 mg Gewebepulver pro Gradient¹⁸ heraus.

Die Proteinkonzentrationen der Proben waren also einmal abhängig von der Menge des aufgeschichteten Gewebepulvers. Zum anderen enthielten die beim Schneiden¹⁹ des Gradienten gewonnenen Aliquots unterschiedliche Mengen an Protein.

Der Konzentration des Proteins betrug meist zwischen 1 und 3 bis maximal 5 mg pro Aliquot.

¹⁸ siehe Fußnote 16, S. 28

¹⁹ Als „Schneiden“ wird das Auftrennen in mehrere Aliquots durch Abpipettieren bezeichnet.

3.5 Enzymaktivitäten

Die spezifischen Aktivitäten der Leitenzyme CS und PGK in den einzelnen Fraktionen spiegeln die Auftrennung der dem mitochondrialen und cytosolischen Zellkompartiment angehörenden Proteine und Metabolite in dem Gradienten wider. Die Tabelle 3.2 zeigt eine typische Auftrennung.

Die Errechnung der Enzymaktivitäten erfolgte nach der in Kapitel 2.6 beschriebenen Formel. Mit den Werten konnte dann die auf den Proteingehalt des Aliquots bezogene Enzymaktivität ausgerechnet werden.

Tabelle 3.2 Enzymaktivitäten, Leber 3, Gradient F. In Zeile G befinden sich die Messwerte des Gesamthomogenates. α ist der Steigungswinkel der Schreiberaufzeichnung ($\Delta E/\Delta T$). In den Spalten 3 und 6 bezieht sich die Enzymaktivitäten auf das Volumen und in den Spalten 4 und 7 auf den Proteingehalt in der Fraktion.

3F1	CS			PGK		
Fraktion	α [°]	[mU/ml]	[mU/mg]	α [°]	[mU/ml]	[mU/mg]
1	16,0	14,34	29,08	19,8	267,20	541,98
2	20,3	18,45	28,12	25,8	359,06	547,34
3	26,4	24,78	26,76	36,0	540,69	583,90
4	37,0	37,68	25,53	49,5	871,35	590,34
5	37,5	38,37	22,62	54,0	1024,30	603,95
6	33,0	32,47	23,48	51,0	919,01	664,51
7	22,8	20,97	20,16	48,0	826,52	794,73
8	30,5	29,45	19,24	57,0	1145,97	748,51
G	25,3	23,58	24,06	40,5	635,61	648,58

Die Citrat-Synthetase-Aktivität nimmt entsprechend dem abnehmenden Anteil an mitochondrialen Proteinen zu den unteren Fraktionen hin ab (Abb. 3.1a, Kap. 4.1.2). Die umgekehrte Tendenz der Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität entspricht dem im Gradienten nach unten zunehmenden Anteil an cytosolischen Proteinen (Abb. 3.1b).

Die Aktivitätsänderungen über die Fraktionen sind mithin auch ein Maß für die Qualität der Auftrennung.

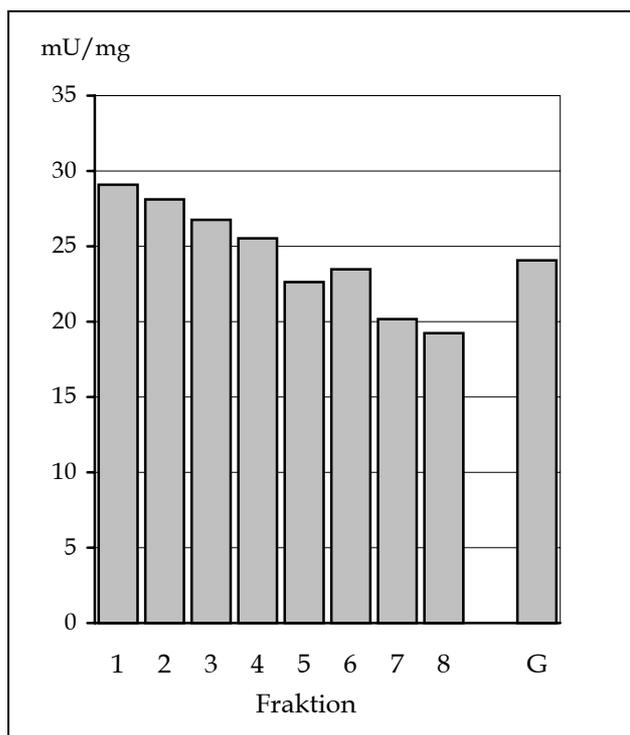


Abb. 3.1a Citrat-Synthetase-Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen (Leber 3, Gradient F).

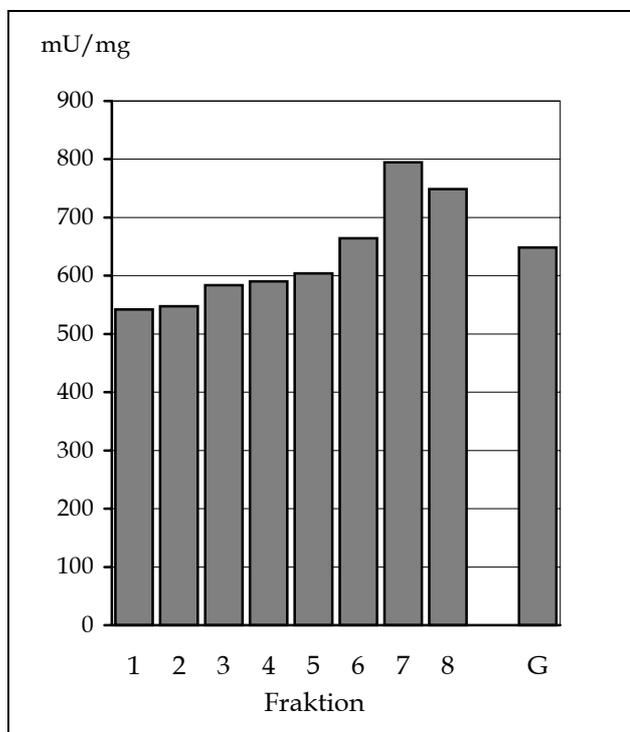


Abb. 3.1b Phosphoglycerat-Kinase-Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen (Leber 3, Gradient F).

3.6 Aminosäurekonzentrationen der Proben, HPLC

Nach Erhöhung der Proteinkonzentration der Proben (Kap. 3.4) erbrachten die HPLC-Chromatogramme ausreichend große Peaks, so dass sich jetzt die Konzentrationen von Citrullin und Ornithin in den Fraktionen bestimmen ließen. Insbesondere die Ornithinpeaks waren zuvor nicht immer messbar gewesen.

Die Retentionszeiten lagen bei ca. 6,6 Minuten für Citrullin und ca. 12,3 Minuten für Ornithin. Die Abbildung 3.2 zeigt das Chromatogramm einer Gradientenfraktion.

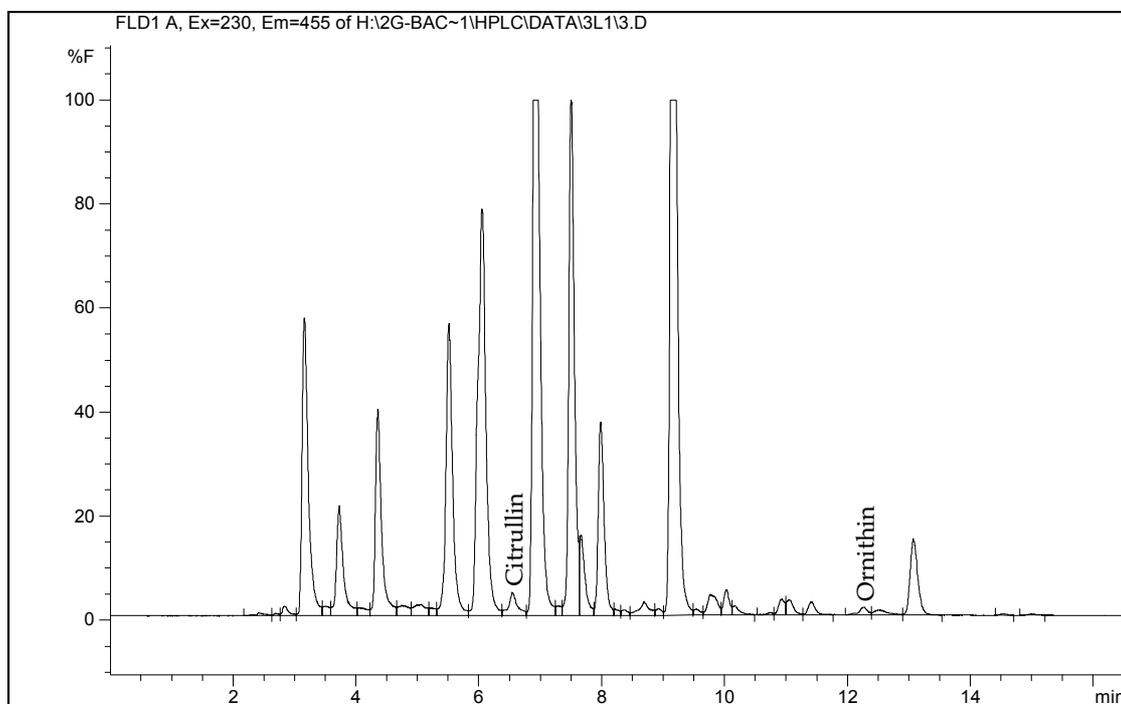


Abb. 3.2 Chromatogramm, Leber 3, Gradient L, Fraktion 3. Auf der Abszisse ist die Retentionszeit in min abgetragen und auf der Ordinate die Absorption in Prozent. Die Peaks von Citrullin und Ornithin sind gekennzeichnet.

Die Metabolitkonzentrationen C in den Proben ergeben sich nach Gleichung (3) aus den Flächen unter den Peaks im Chromatogramm. Die so erhaltenen Werte gingen dann in die weiteren Berechnungen ein. Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor D nach Gleichung (2) und Division durch den Proteingehalt ergeben sich die auf das Protein bezogenen Aminosäuregehalte der einzelnen Fraktionen.

In der Tabelle 3.3 sind beispielhaft die Aminosäurekonzentrationen und die auf das Protein bezogenen Aminosäuregehalte eines Gradienten angegeben.

Tabelle 3.3 Metabolitgehalte, Leber 7, Gradient D, Messung 1.

C bezeichnet die Aminosäurekonzentrationen in den Proben und C_p die auf das Protein bezogenen Aminosäuregehalte.

7D1	Citrullin		Ornithin	
Fraktion	C [μ M]	C_p [nmol/mg]	C [μ M]	C_p [nmol/mg]
1	3,58	0,56	2,64	0,41
2	6,17	0,43	5,01	0,35
3	7,87	0,42	7,29	0,39
4	9,09	0,42	6,73	0,31
5	9,58	0,51	7,31	0,39
6	9,01	0,51	7,12	0,41
7	8,87	0,51	7,78	0,45
8	7,83	0,49	7,66	0,48
G	8,58	0,39	7,97	0,36

3.7 Koordinatensysteme und lineare Regression

Die Abbildungen 3.3a und b zeigen Plots mit Regressionsgeraden. Diese ergeben sich aus Eintragungen der Werte eines Gradienten in die in Kapitel 2.8.2 beschriebenen Koordinatensysteme.

Für jeden Gradienten wurden die einzelnen Regressionsgeraden ermittelt. Mit Hilfe der Geradensteigung und des Schnittpunktes mit der Ordinate ließen sich dann die jeweiligen Protein- und Metabolitkonzentrationen errechnen (Kap. 3.8 bis 3.10).

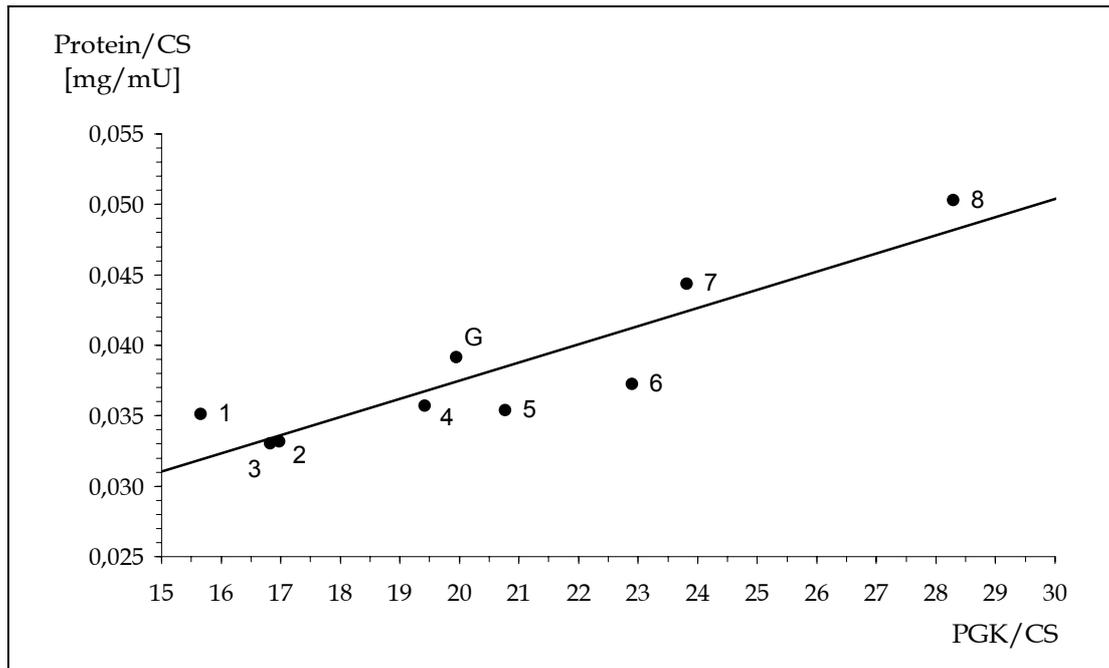


Abb. 3.3a Leber 7, Gradient D1. Regressionsgerade $y = bx + a$ mit $a = 0,0117$ mg/mU und $b = 0,00129$ mg/mU. $r = 0,90$, $r^2 = 0,82$. Nach Multiplikation von a und b mit den Gesamt-Enzymaktivitäten (CS: 645 mU/ml und PGK: 13141 mU/ml) ergeben sich: $\text{Protein}_{\text{mit}} = 7,54$ mg/ml (30,77 %) und $\text{Protein}_{\text{cyt}} = 16,96$ mg/ml (69,23 %).

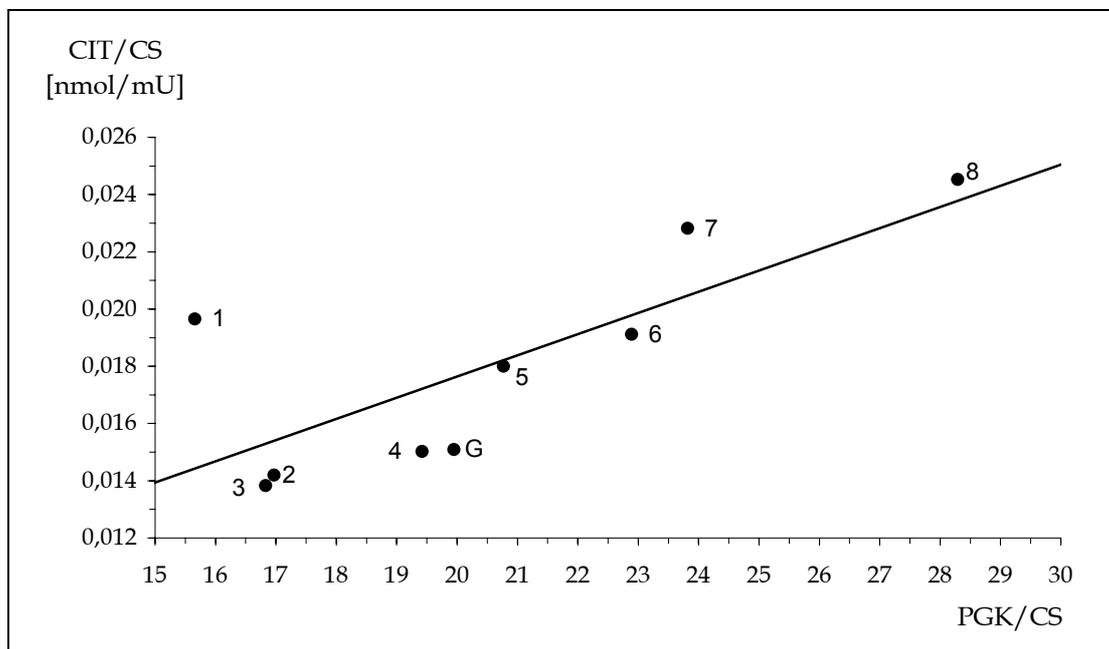


Abb. 3.3b Leber 7, Gradient D1. Regressionsgerade mit $a = 0,0028$ nmol/mU und $b = 0,0007$ nmol/mU. $r = 0,77$, $r^2 = 0,59$. Nach Multiplikation von a und b mit den Gesamt-Enzymaktivitäten ergeben sich: $\text{Cit}_{\text{mit}} = 1,82$ nmol/ml (15,77 %) und $\text{Cit}_{\text{cyt}} = 9,73$ nmol/ml (84,23 %). Nach Division durch die entsprechenden Proteinkonzentrationen (Kap. 3.8) erhält man: $\text{Cit}_{\text{mit}} = 0,242$ nmol/mg und $\text{Cit}_{\text{cyt}} = 0,574$ nmol/mg. Die Metabolitkonzentrationen ergeben sich nach Division durch den Wassergehalt der Zellkompartimente (Kap. 3.9): $\text{Cit}_{\text{mit}} = 0,302$ mM und $\text{Cit}_{\text{cyt}} = 0,151$ mM.

3.8 Proteinverteilung auf die Kompartimente

Mit Hilfe der aus der linearen Regression erhaltenen Werte a und b und den Gesamtaktivitäten der Enzyme wurden nach den Gleichungen (4)' bis (6)' die Proteinverteilungen auf Mitochondrien und extramitochondrialen Raum (in Prozent) für jeden Gradienten errechnet. Die Werte aus den linearen Regressionen einer Leber wurden zusammengefasst (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 Proteinverteilung auf die Kompartimente. $\text{Protein}_{\text{mit}}$ ist der Mittelwert der jeweils auf CS und auf PGK bezogenen Werte, berechnet nach Gleichung (4)' bis (6)'. $\text{Protein}_{\text{cyt}}$ wird durch Subtraktion berechnet.

Leber	$\text{Protein}_{\text{mit}}$ [%]	$\text{Protein}_{\text{cyt}}$ [%]
2	37,66	62,34
3	40,19	59,81
4	38,44	61,56
5	37,93	62,07
7	46,76	53,24
8	41,48	58,52
MW	40,41	59,59
SEM	1,28	

3.9 Verteilung und Konzentration von Ornithin

3.9.1 Gesamtornithin

Der Gesamtgehalt eines Metaboliten in der Zelle lässt sich auf zwei verschiedenen Wegen ermitteln.

Zum einen kann man ihn aus dem Homogenat bestimmen. Zum anderen kann man die einzelnen Fraktionen eines Gradienten nach ihrem Proteinanteil gewichten und dann die Metabolitgehalte der Fraktionen aufsummieren. Diese Berechnung zeigt, ob während der Fraktionierung selektiv Material verlorengegangen ist, was die Berechnung der Verteilung der Metabolitgehalte verfälschen würde.

Die aus dem Homogenat ermittelten Ornithingehalte ($\text{Orn}_{\text{tot G}}$) unterlagen ähnlichen Schwankungen wie Gehalte in den einzelnen Fraktionen. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Berechnungsverfahren (Tab. 3.5).

Tabelle 3.5 Ornithingehalte in der Gesamtzelle, ermittelt aus dem Gesamthomogenat ($\text{Orn}_{\text{tot G}}$) und als Bilanz-Summe der nach Proteinanteilen gewichteten Gehalte in den Einzelfraktionen eines jeden Gradienten ($\text{Orn}_{\text{tot B}}$). Angegeben sind die Mittelwerte aus allen Gradienten einer Leber.

Leber	$\text{Orn}_{\text{tot G}}$ [nmol/mg]	SEM [nmol/mg]	$\text{Orn}_{\text{tot B}}$ [nmol/mg]	SEM [nmol/mg]
2	0,599	0,023	0,652	0,026
3	0,615	0,077	0,718	0,090
4	0,655	0,029	0,725	0,013
5	0,648	0,036	0,668	0,021
7	0,378	0,013	0,393	0,016
8	0,818	0,242	0,732	0,152
MW	0,619	0,053	0,648	0,048
SEM	0,053		0,048	

3.9.2 Ornithinverteilung in den Kompartimenten

Ornithingehalte

Die Ergebnisse der linearen Regressionen wurden entsprechend der Gleichungen (9) und (10) durch die Proteinkonzentrationen in dem entsprechenden Zellkompartiment dividiert. So erhielt man den auf das Protein im jeweiligen Kompartiment bezogenen Metabolitgehalt (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6 Ornithinverteilung auf die Kompartimente in Prozent und subzelluläre Ornithingehalte.

Leber	Orn _{mit}		Orn _{cyt}	
	[%]	[nmol/mg]	[%]	[nmol/mg]
2	26,15	0,452	73,85	0,768
3	34,26	0,707	65,74	0,749
4	37,28	0,703	62,72	0,741
5	29,01	0,499	70,99	0,762
7	37,56	0,299	62,44	0,447
8	41,11	0,837	58,89	0,765
MW	34,23	0,583	65,77	0,705
SEM	2,11	0,074		0,047

Subzelluläre Ornithinkonzentrationen und mitochondrial/cytosolische Verteilung

Die Ornithinkonzentrationen in den Kompartimenten ergeben sich, wenn man die Ornithingehalte (Tabelle 3.6) durch die Wasserräume dividiert (Kap. 2.8.2). Die subzellulären Ornithinkonzentrationen und das Verhältnis von mitochondrialem zu extramitochondrialem Ornithin sind in Tabelle 3.7 und Abbildung 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.7 Ornithinkonzentration in den Kompartimenten und Verhältnis von mitochondrialem zu cytosolischem Ornithin.

Leber	Orn _{mit} [mM]	Orn _{cyt} [mM]	Orn _{mit} /Orn _{cyt}
2	0,564	0,202	2,79
3	0,884	0,197	4,48
4	0,879	0,195	4,51
5	0,624	0,200	3,11
7	0,374	0,118	3,18
8	1,046	0,201	5,20
MW	0,729	0,186	3,92
SEM	0,093	0,012	0,40

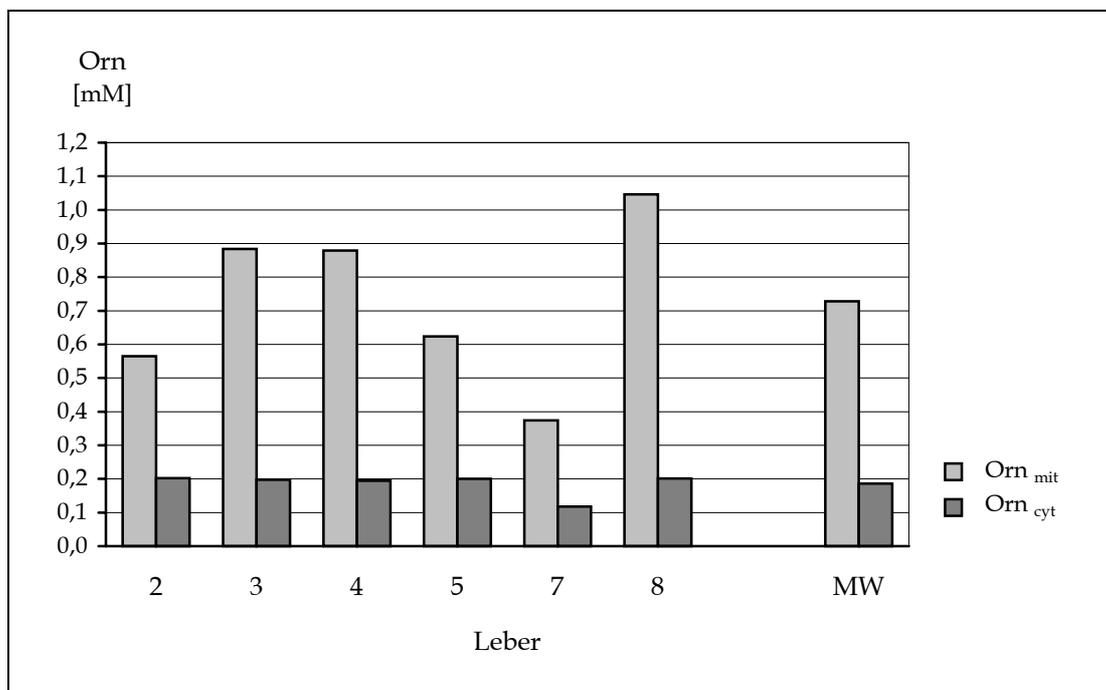


Abb. 3.5 Subzelluläre Ornithinkonzentrationen.

3.10 Verteilung und Konzentration von Citrullin

3.10.1 Gesamtcitrullin

Die Werte für Citrullin wurden nach den gleichen Verfahren wie die Ornithinwerte ermittelt. Tabelle 3.8 zeigt die aus dem Gesamthomogenat ermittelten und die bilanzierten Citrullinkonzentrationen. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Berechnungsarten.

Tabelle 3.8 Citrullingehalte in der Gesamtzelle, ermittelt aus dem Gesamthomogenat ($\text{Cit}_{\text{tot G}}$) und als Bilanz-Summe der nach Proteinanteilen gewichteten Gehalte in den Einzelfractionen eines jeden Gradienten ($\text{Cit}_{\text{tot B}}$). Angegeben sind die Mittelwerte aus allen Gradienten einer Leber.

Leber	$\text{Cit}_{\text{tot G}}$ [nmol/mg]	SEM [nmol/mg]	$\text{Cit}_{\text{tot B}}$ [nmol/mg]	SEM [nmol/mg]
2	0,519	0,018	0,558	0,017
3	0,569	0,034	0,581	0,041
4	0,881	0,032	0,906	0,020
5	0,499	0,035	0,496	0,010
7	0,444	0,013	0,482	0,013
8	0,747	0,173	0,718	0,128
MW	0,610		0,623	
SEM	0,063		0,060	

3.10.2 Citrullinverteilung in den Kompartimenten

Citrullingehalte

Die auf das Protein bezogenen Citrullingehalte im mitochondrialen und cytosolischen Kompartiment sind in der Tabelle 3.9 dargestellt.

Die Berechnung erfolgte wie bei Ornithin.

Tabelle 3.9 Citrullinverteilung auf die Kompartimente in Prozent und subzelluläre Citrullingehalte.

Leber	Cit _{mit}		Cit _{cyt}	
	[%]	[nmol/mg]	[%]	[nmol/mg]
2	24,94	0,381	75,06	0,668
3	34,05	0,477	65,95	0,655
4	36,33	0,878	63,67	0,948
5	23,37	0,303	76,63	0,612
7	35,73	0,370	64,27	0,611
8	24,95	0,561	75,05	0,897
MW	29,89	0,495	70,11	0,732
SEM	2,26	0,078		0,056

Subzelluläre Citrullinkonzentrationen und mitochondrial/cytosolische Verteilung

Nach Division durch die Wasserräume ergaben sich die in Tabelle 3.10 und Abbildung 3.6 dargestellten Citrullinkonzentrationen und -verteilungen.

Tabelle 3.10 Citrullinkonzentration in den Kompartimenten und Verhältnis von mitochondrialem zu cytosolischem Citrullin.

Leber	Cit _{mit} [mM]	Cit _{cyt} [mM]	Cit _{mit} /Cit _{cyt}
2	0,476	0,176	2,71
3	0,597	0,172	3,46
4	1,097	0,250	4,40
5	0,379	0,161	2,35
7	0,463	0,161	2,88
8	0,701	0,236	2,97
MW	0,619	0,193	3,21
SEM	0,097	0,015	0,29

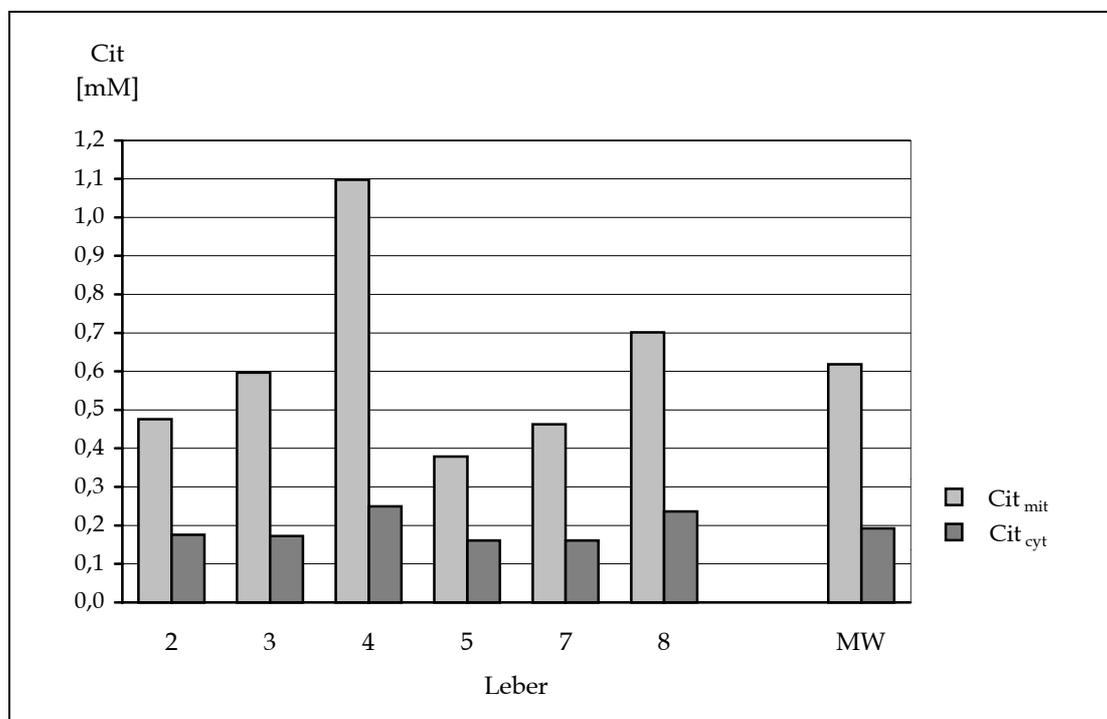


Abb. 3.6 Subzelluläre Citrullinkonzentrationen.

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Leberperfusion

Die hämoglobinfreie Leberperfusion im nicht rezirkulierenden System ist ein gutes Modell für die Leber in situ

Das Ziel dieser Arbeit war es, möglichst gut die in-vivo-Situation zu erfassen. Die Perfusion der Rattenlebern im nicht rezirkulierenden System hat sich als ein valides Modell für die Leber in situ erwiesen [86, 115, 116]. Die Organstruktur wird während der Perfusion nicht verändert.

Durch die hier angewandte Operationstechnik gibt es nur eine kurze Ischämiezeit, von der sich die Leber innerhalb von 10 Minuten wieder erholt. Sowohl die Energiebilanz, verschiedene Parameter des Redoxsystems [117] als auch Gluconeogenese, Ketogenese, Harnstoffbildung [118] und Aminosäuresynthese [119] der perfundierten Leber entsprechen denen der Leber in situ.

Bei einer Perfusion der Leber mit 4–6 ml/min · g kann davon ausgegangen werden, dass die Leber ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird [86]. Um die Oxygenierung der Leber verlässlich beurteilen zu können, wurde im Anschluss an den Frierstopp im zermörserten Gewebepulver das ATP/ADP-Verhältnis bestimmt. Dieser Quotient hat sich als zur Beurteilung der Energiebilanz des Organs geeignet herausgestellt [119, 120]. Der Mittelwert der verwendeten Lebern von 3,44 (Kap. 3.2) stimmt gut mit den Literaturwerten [14, 112, 120, 121] zwischen 3 und 4,2 überein.

4.1.2 Frierstopp und nichtwässrige Fraktionierung

Der Frierstopp unterbricht schlagartig den Metabolismus

Der Frierstopp soll den Stoffwechsel der perfundierten Leber schlagartig anhalten. Durch die spezielle Form der Oberfläche der Zangenbacken [89, 112] und durch ein möglichst zügiges Schließen der gekühlten Zange wird erreicht, dass eine gefrorene maximal 2 mm dicke geriffelte Gewebescheibe entsteht. Kein Bereich im Inneren der Scheibe ist weiter als 1 mm von den Zangenoberflächen entfernt. Damit wird ein schnelles und gleichmäßiges Einfrieren des Gewebes und ein sauberer metabolischer Stopp gewährleistet [87].

Die weitere Verarbeitung konserviert den Stoffwechselstatus des Lebergewebes im Moment des Frierstopps

Die nachfolgende kontinuierliche Kühlung des Gewebes in flüssigem Stickstoff bis zum Einsetzen in den Lyophilisator, die vollständige Entwässerung und die anschließende Lagerung des getrockneten Pulvers bei minus 80 °C verhindern ein Wiederanlaufen des Metabolismus in dem Gewebepulver.

Für die Wasserfreiheit in der weiteren Verarbeitung ist es wichtig, einen Kontakt des kalten Gewebepulvers mit Luft in Raumtemperatur zu vermeiden. Ein solcher Kontakt würde erstens durch kondensierende Feuchtigkeit Stoffwechselvorgänge ermöglichen und zweitens wird feuchtes Gewebepulver aufgrund von Verklumpungen nur unvollkommen über den Dichtegradienten aufgetrennt.

Die nichtwässrige Fraktionierung trennt die mitochondrialen und extramitochondrialen Zellanteile

Zur Auftrennung der Zellen in ihre Kompartimente gibt es verschiedene Methoden. Bei der Digitoninmethode [122, 123] wird der unterschiedliche Cholesteringehalt von Zellmembran und Mitochondrienmembran (Kap. 1.1.1) ausgenutzt. Digitonin bildet Komplexe mit dem Cholesterin der Leberzellmembran. Diese werden dadurch für das Cytosol durchlässig, so dass die Mitochondrien zusammen mit Zellmembranen und sonstigen Partikeln durch eine Silikonölschicht in Perchlorsäure zentrifugiert werden können. Das Cytosol bleibt im Überstand, so dass nach einem metabolischen Stopp mit Perchlorsäure die Fraktionen getrennt untersucht werden können. Die Digitoninmethode ist nur auf isolierte Zellen anwendbar. Außerdem ist die Zeit bis zum metabolischen Stopp nicht klar definiert.

Für die Untersuchung von Gewebe oder Organen ist die von uns verwendete nichtwässrige Fraktionierung geeignet. Auch hier wird eine Auftrennung der Zellen in ihre Kompartimente erreicht [89, 90, 112, 121]. Es werden mehrere Fraktionen mit unterschiedlichen Anreicherungen von mitochondrialen und extramitochondrialen Anteilen gewonnen (Kap. 2.4 und 3.5).

Die bei der Berechnung der Metabolitverteilung vorgenommene Einteilung der Zelle in ein mitochondriales und ein extramitochondriales Kompartiment stellt allerdings eine Vereinfachung dar. Die Mitochondrien nehmen etwa 22 % des Volumens eines Hepatozyten ein und das Cytosol ca. 54 % [10].

Zum extramitochondrialen Kompartiment gehören neben dem Cytosol der Kernraum und alle Organellen bis auf die Mitochondrien. Der Kernraum mit 6 % des Zellvolumens ist bei unserer Fragestellung topologisch dem Cytosol zuzuordnen, da die Kernmembran Porenkomplexe und offene Kanäle enthält, durch die Moleküle bis 5 kDa frei hindurchdiffundieren können [2]. Das endoplasmatische Retikulum macht zwar ca. 15 % einer Leberzelle aus, verhält sich im Gradienten aber wie das cytosolische Material [112] und ist als Verteilungsraum für Citrullin und Ornithin nicht relevant. Lysosomen und Peroxysomen tragen zusammen weniger als 5 % zum Zellvolumen [10, 87] und zum Protein der Zelle [112] bei. Außerdem verteilen sie sich im Dichtegradienten relativ gleichmäßig über die Fraktionen [112]. Die Zusammenfassung des extramitochondrialen Kompartimentes ist also für unsere Fragestellung sinnvoll.

Die mitochondrialen Anteile sinken im Dichtegradienten aufgrund des höheren Lipidgehaltes weniger tief als die dichteren extramitochondrialen Anteile [112, 89] (Abb. 2.1 und 3.1). In den schwersten Fraktionen finden sich auch die Kernanteile [112].

Eine Bewegung der Metabolite zwischen den Zellkompartimenten während der Fraktionierung würde das Ergebnis verfälschen. Eine solche Bewegung kann durch die von uns angewandte Wasserextraktion und den Einsatz unpolarer Medien ausgeschlossen werden [124].

Aufgrund der Polarität der untersuchten Metabolite kann angenommen werden, dass diese sich in der unpolaren Umgebung der organischen Lösungsmittel mit den geladenen Proteinen assoziieren und dass diese Assoziation auch während der einzelnen Arbeitsschritte der nichtwässrigen Fraktionierung bestehen bleibt [112].

Verantwortlich für diese Assoziation sind die nichtkovalenten intermolekularen Anziehungskräfte: van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und Ionenbindungen.

Eine Lösung von polaren Metaboliten im nichtwässrigen Überstand des Gesamthomogenates ist vernachlässigbar [87, 113]. Das gleiche gilt für eine Extraktion von Enzymen und Metaboliten oder eine Veränderung der Aktivitäten löslicher Enzyme durch die organischen Lösungsmittel [112].

Insgesamt kann man davon ausgehen, dass die auf den Frierstopp folgenden Arbeitsschritte und die Fraktionierung sowohl Verteilung als auch Konzentration der Metabolite nicht mehr verändern.

Die Anteile der Zellkompartimente in den einzelnen Fraktionen lassen sich mit Hilfe der Markerenzyme bestimmen

Die Glutamatdehydrogenase und die in dieser Arbeit verwendete Citrat-Synthetase haben sich in der Leber als gleich gut geeignete Markerenzyme für den mitochondrialen Raum erwiesen [112]. Der extramitochondriale Gesamtraum wird am besten durch die Aktivität der Phosphoglycerat-Kinase repräsentiert [112, 121, 125].

Eine typische Verteilung der beiden Enzyme in den Fraktionen eines Dichtegradienten ist in der Tabelle 3.2 und den Abbildungen 3.1a und b dargestellt. Es zeigt sich eine Verteilung der Markerenzymaktivitäten, die der Verteilung der Zellkompartimente im Dichtegradienten entspricht und vice versa.

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Proteinverteilung

Gut ein Drittel des Zellproteins der Leber befindet sich in den Mitochondrien

Die von uns ermittelte Verteilung des Proteins auf die Zellkompartimente mit einem mitochondrialen Proteinanteil von ca. 40 % stimmt in etwa mit den in der Literatur angegebenen Werten von ca. 37 % [87, 112] überein.

4.2.2 Verteilung und Konzentrationen von Ornithin

Es finden sich in der Literatur mehrere Arbeiten mit allerdings widersprüchlichen Angaben über zelluläre Ornithin- und Citrullinkonzentrationen und deren subzelluläre Verteilung (Tab. 4.1 und 4.2). Die Ergebnisse dieser Arbeiten beruhen zum größten Teil auf Versuchen mit Mitochondriensuspensionen, deren Ornithin- und Citrullinaufnahme in verschiedenen Medien mit verschiedenen extramitochondrialen Ornithin- und Citrullinkonzentrationen bestimmt wurden.

In unserer Arbeit wurde zum ersten Mal *in vivo* die Verteilung beider Metabolite zwischen Mitochondrien und Cytosol bestimmt. Ein direkter Vergleich mit Werten aus isolierten Mitochondrien ist deshalb nur bedingt möglich. Zum Vergleich sind Ergebnisse aus solchen Versuchen herangezogen worden, bei denen die extramitochondriale Metabolitkonzentration in der Größenordnung der von uns ermittelten cytosolischen Werten lag.

Der Ornithingehalt der Gesamtleber

Der von uns ermittelte Ornithingehalt im Leberhomogenat beträgt $0,619 \pm 0,053$ nmol/mg Protein (Tab. 3.5).

An anderer Stelle wurde ein Ornithingehalt im Lebergewebe von $0,140 \pm 0,70$ nmol/mg gemessen [126]. Bei einem Proteinanteil von 135 mg/g Frischgewicht [113] ergibt das einen auf das Protein bezogenen Ornithingehalt von $1,037 \pm 0,518$ nmol/mg, der sich mit unseren Messergebnissen vereinbaren lässt. Weitere Literaturwerte liegen noch etwas höher, bewegen sich jedoch in der gleichen Größenordnung [40, 127, 128].

Tabelle 4.1 Literaturangaben zu Ornithinkonzentrationen in der Rattenleber und in Mitochondriensuspensionen. Orn_{ext} bezeichnet die jeweils vorgegebene externe Ornithinkonzentration in den Versuchsmedien. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in der Literatur angegebene [Gesamtmetabolitgehalte/g Leber] in [nmol/mg Protein] und Metabolitgehalte in den Kompartimenten unter Berücksichtigung der Wasserräume in Konzentrationen umgerechnet worden.

Referenz	Orn _{tot} [nmol/mg Protein]	Orn _{mit} [mM]	Orn _{cyt} [mM]	Orn _{ext} [mM]	Orn _{mit} /Orn _{cyt} Orn _{mit} /Orn _{ext}	Versuchsbedingungen
unserer Arbeit	0,619 ± 0,053	0,729	0,186		3,92	Lebergewebe
[126]	1,037 ± 0,518					Lebergewebe
[127]	1,36 ± 0,39					Lebergewebe
[128]	0,814 - 0,881	<0,57				Lebergewebe
[39]		0,45		0,5	0,9	Mitochondrien, OAT-Hemmung
[51]		0,3		0,21	1,43	Mitochondrien, abzgl. „osmotisch inaktivem Ornithin“
[50]		0,30 - 0,34		0,1	„2 bis 3“	Mitochondrien
[129]		5,95		2,2	2,7	Mitochondrien
[40]	0,941 ± 0,014	1,6	0,57		2,81	Zellsuspension, OAT-Hemmung
[51]		0,76		0,21	3,62	Mitochondrien
[51]		1,91 ± 0,14		0,5	3,8	Mitochondrien
[39]				0,1	ca. 4	Mitochondrien
[50]		0,64		0,1	6,4	Mitochondrien, Cit _{ext} 0,1 mM
[40]	0,941 ± 0,014	1,5	0,2		7,5	Zellsuspension
[38]		80		5	16	Mitochondrien
[38]				5 µM	>200	Mitochondrien

Die Ornithinkonzentration in den Mitochondrien ist 3,9-mal höher als im Cytosol

Neben den Absolutwerten ist das Verhältnis von mitochondrialem zu cytosolischem Ornithin interessant. Mit $0,729 \pm 0,093$ mM ist die Ornithinkonzentration in den Mitochondrien 3,9-mal höher als im extramitochondrialen Raum mit $0,186 \pm 0,012$ mM (Tab. 3.7).

In einer frühen Arbeit mit Mitochondrien finden sich mitochondriale Ornithinwerte von 0,24–0,27 nmol/mg Protein (= 0,30–0,34 mM) bei einer versuchsbedingten externen Ornithinkonzentration von 0,1 mM [50] (Tab. 4.1). Diese externe Konzentration entspricht etwa der Hälfte der von uns ermittelten cytosolischen Ornithinkonzentration von 0,19 mM. Das Verhältnis von mitochondrialem zu cytosolischem Ornithin wird mit „2 bis 3“ angegeben. Bei einer externen Citrullinkonzentration von 0,1 mM [50], die in der Nähe der von uns ermittelten physiologischen Citrullinkonzentration liegt, betrug der mitochondriale Ornithingehalt 0,51 nmol/mg Protein (= 0,64 mM) und ist damit unserem Wert vergleichbar. Daraus errechnet sich hier ein Gradient von 6,4.

An anderer Stelle wurden mitochondriale Ornithinkonzentrationen von 1,91 und 0,76 mM bei externen Ornithinkonzentrationen von 0,5 und 0,21 mM gemessen, womit die Gradienten (3,62 und 3,8) weitgehend unseren Ergebnissen entsprachen [51]. Ein Teil des Ornithins wurde als „osmotisch insensitiv“ angesehen, weil es an intramitochondriale Strukturen gebunden ist [51]. Die um das gebundene Ornithin korrigierte mitochondriale Ornithinkonzentration betrug 0,3 mM, was einem Gradienten von ca. 1,4 entspräche (siehe auch Kap. 4.3.2).

Bei Mitochondrien, in denen die Ornithin-Aminotransferase durch Aminooxyacetat gehemmt wurde [39], stellte sich unter verschiedenen externen Ornithinkonzentrationen eine weitgehende Equilibrierung der Ornithingradienten über der inneren Mitochondrienmembran ein. Bei fehlender OAT-Hemmung betrug der Gradient ca. 4 [39].

Die einzige Arbeit, in der die subzelluläre Ornithinverteilung in Hepatozyten gemessen wurde [40], erbrachte (in der Kontrollgruppe der Versuchsreihe) mitochondriale und cytosolische Ornithinkonzentration von 1,5 mM und 0,2 mM und damit einen Quotienten von 7,5. Bei Verwendung von Aminooxyacetat betrugen die Konzentrationen in Mitochondrien und Cytosol 1,6 mM und 0,57 mM und der Quotient somit 2,81. Unter verschiedenen anderen Versuchsbedingungen reichte der Gradient bis 16 bei mitochondrialen Ornithinkonzentrationen von 0,8 bis 4,6 mM und

cytosolischen Konzentrationen von 0,05 bis 1,3 mM. Bei diesen Untersuchungen wurde eine Suspension aus Rattenleberzellen mit der Digitoninmethode [122, 123] (Kap. 4.1.2) fraktioniert und die subzelluläre Ornithinverteilung ermittelt. Es wurden etwas andere Wasserräume für die Berechnung zugrunde gelegt: 2 ml/g Trockengewicht für das Cytosol (= 4,6 ml/g Protein_{cyt})²⁰ und 0,21 ml/g Trockengewicht für die mitochondriale Matrix (= 0,77 ml/g Protein_{mit}) [40, 130].

In einer weiteren Arbeit liegen sowohl die versuchsbedingte extra- als auch die gemessene intramitochondriale Ornithinkonzentration etwa eine Größenordnung über unseren Werten bei einem Konzentrationsgradienten von 2,7 [129]. Bei sehr hohen und sehr niedrigen extramitochondrialen Ornithinkonzentrationen finden sich Gradienten zwischen 16 und über 200 [38].

4.2.3 Verteilung und Konzentrationen von Citrullin

Der Citrullingehalt der Gesamtleber

Im Gesamthomogenat haben wir einen Citrullingehalt von $0,610 \pm 0,063$ nmol/mg Protein gemessen (Tab. 3.8). Ein in der Literatur angegebener Gehalt von 40 ± 20 nmol/g Lebergewebe [126] entspricht $0,296 \pm 0,148$ nmol/mg Protein und liegt damit unter unserem Wert. Ein anderer Wert von $0,630 \pm 0,02$ nmol/mg Protein stimmt gut mit unserem Ergebnis überein [127] (Tab. 4.2).

Beim Citrullin liegt das mitochondrial/cytosolische Verhältnis etwas niedriger als beim Ornithin

Die Citrullinkonzentration beträgt in den Mitochondrien $0,619 \pm 0,097$ mM und damit das 3,2fache der Konzentration im extramitochondrialen Raum von $0,193 \pm 0,015$ mM (Tab. 3.10 und 4.2).

Ein Literaturwert von $1,24 \pm 0,11$ nmol/mg Protein (= $1,55 \pm 0,14$ mM) in den Mitochondrien [44] übersteigt unser Messergebnis um fast das dreifache. Die Citrullinkonzentration außerhalb der Mitochondrien betrug mit 1 mM das fünffache

²⁰ Umrechnungen nach den Angaben in [113].

Tabelle 4.2 Literaturangaben zur Citrullinverteilung in der Rattenleber (siehe auch Legende zu Tabelle 4.1).

Referenz	Cit _{tot} [nmol/mg Protein]	Cit _{mit} [mM]	Cit _{cyt} [mM]	Cit _{ext} [mM]	Cit _{mit} /Cit _{cyt} Cit _{mit} /Cit _{ext}	Versuchsbedingungen
unsere Arbeit	0,610 ± 0,063	0,619	0,193		3,21	Lebergewebe
[126]	0,296 ± 0,148					Lebergewebe
[127]	0,630 ± 0,02					Lebergewebe
[44]		1,55 ± 0,14		1	1,55	Mitochondrien
[129]		1,62 ± 0,14				Mitochondr., Orn _{ext} 0,2 mM
[50]		3,75 – 5		0,3	12,5 – 16,7	Mitochondr., Orn _{ext} 5 mM

der von uns ermittelten cytosolischen Citrullinkonzentration, was den hohen intramitochondrialen Wert erklärt.

Literaturwerte von 3,75–5 mM [50] liegen ebenfalls deutlich über unseren Messergebnissen. Hier betrug die extramitochondriale Ornithinkonzentration 5 mM, so dass wahrscheinlich in den Mitochondrien eine erhöhte Citrullinproduktion stattfand.

Andere bei physiologischer externer Ornithinkonzentration durchgeführten Citrullinmessungen [129] erbrachten höhere Werte als unsere Messungen. Der Grund dürfte zum Teil in der Messung durch Szintillationszählung radioaktiv markierten Citrullins liegen, denn Citrullinbestimmungen durch HPLC erbrachten niedrigere Werte.²¹ Die gemessenen Citrullinkonzentrationen in isolierten Mitochondrien sind in allen oben zitierten Arbeiten höher als in unserer Arbeit. Möglicherweise akkumuliert Citrullin in den isolierten Mitochondrien bei fehlendem Austausch mit extramitochondrialem Ornithin. Zum Citrullingehalt des extramitochondrialen Kompartimentes und zum mitochondrial/cytosolischen Verhältnis finden sich keine Literaturangaben.

²¹ Es wurden keine HPLC-Messungen bei physiologischer extramitochondrialer Ornithinkonzentration durchgeführt.

4.3 Der Ornithin- und Citrullintransport

4.3.1 Die Carriereigenschaften

Der Ornithin/H⁺-Antiport entsorgt Protonen aus der Matrix

Eine Ansäuerung der Mitochondrien-Matrix isolierter Mitochondrien führt zu einer Ornithinakkumulation. Die Ornithinverteilung ist also pH-abhängig [39, 41, 42]. Der deshalb postulierte Ornithin/H⁺-Antiport über die innere Mitochondrienmembran [39, 43] ist physiologisch sinnvoll, denn sowohl im Harnstoffzyklus (Abb. 1.3) als auch bei der intramitochondrialen Glutamatsynthese (Abb. 1.4) fällt ein Proton an, das metabolisiert oder exportiert werden muss, um eine Ansäuerung der Matrix zu verhindern [41].

Der Ornithin/Citrullin-Antiport sorgt für einen Ladungsausgleich durch einen Cotransport von Citrullin und H⁺

Mit Citrullin beladene Lebermitochondrien nehmen Ornithin im Austausch gegen Citrullin auf, was zu der Postulierung des Ornithin/Citrullin-Antiportes führte [42, 44]. Der Ornithin/Citrullin-Austausch findet in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 statt [42], was auch bei den meisten anderen mitochondrialen Carriern der Fall ist [15]. Aufgrund des positiv geladenen Ornithinmoleküls würde dieser Antiport entweder einen Nettoeinstrom positiver Ladungen in das Mitochondrium bedeuten oder einen elektroneutralen Abfluss von Protonen mit dem Citrullin erfordern [44].

Der Ornithintransport ist optimal aus einem alkalischen in ein saures Kompartiment, während beim Citrullintransport die Verhältnisse umgekehrt liegen [39, 42]. Daraus lässt sich schließen, dass der Carrier den elektroneutralen Austausch von Ornithin gegen Citrullin und ein Proton katalysiert. Den durch den Ornithinimport nötigen Ladungsausgleich besorgt das mit dem Citrullin exportierte Proton [41].

Es gibt nur einen Carrier für beide Arten des Transportes

Zunächst wurde von der Existenz zweier Transportsysteme ausgegangen: eines Ornithin/Citrullin-Antiports für den Harnstoffzyklus und eines elektroneutralen Ornithin/H⁺-Austausches, der unabhängig vom Citrullin für den Ornithinimport sorgt [44]. Andere Studien konnten einen strikten Ornithin/Citrullin-Antiport allerdings nicht bestätigen [43, 50, 129].

In jüngerer Zeit fanden sich Ergebnisse, die zeigen, dass sowohl der Antiport von Ornithin/ H^+ als auch der von Ornithin/(Citrullin + H^+) vom selben Transportprotein durchgeführt werden [37, 41].

Wahrscheinlich wird in den periportalen Hepatozyten Ornithin für den Harnstoffzyklus im Austausch gegen Citrullin und ein Proton importiert. In den perivenösen Hepatozyten transportiert der gleiche Carrier das Ornithin für die Glutaminsynthese im Antiport mit einem Proton (Kap. 1.4.3).

Der Carrier verhält sich unterschiedlich gegenüber Ornithin und Citrullin

Der Carrier ist sehr spezifisch. Neben Ornithin, Citrullin und Protonen werden nur noch die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin transportiert [47].

In verschiedenen Arbeiten wurden die K_m - und V_{max} -Werte des Ornithin- und Citrullintransportes über die innere Mitochondrienmembran ermittelt (Tab. 4.3). Die V_{max} -Werte differieren um maximal eine Größenordnung. Die K_m -Werte liegen in ähnlichen Bereichen wie die K_m -Werte anderer Carrier für ihre jeweiligen Substrate [36].

Die intramitochondriale Halbsättigungskonstante des Carriers für Ornithin beträgt ca. 4 mM, während der cytosolische K_m -Wert den jüngsten Arbeiten zufolge um mehr als eine Größenordnung geringer ist [37]. Die Affinität des Carriers zu externem Ornithin ist also wesentlich höher als die zu Citrullin. Ein Citrullintransport ins Mitochondrium wird damit in erster Linie durch Ornithin gehemmt. Die cytosolischen Bindungsstellen spielen durch die Bevorzugung des Ornithinimportes eine die Transportrichtung bestimmende Rolle.

Die Konstanten für Citrullin sind auf beiden Membranseiten ähnlich mit einer etwas höheren Affinität auf der Matrixseite mit einem K_m von ca. 2 mM. Somit bevorzugt der Carrier auch hier leicht den Transport in physiologischer Richtung. Citrullin und H^+ binden separat an den Carrier und werden gemeinsam transportiert.

Protonen werden auf beiden Membranseiten mit ähnlicher Affinität gebunden, unabhängig davon, ob das Proton allein oder mit Citrullin transportiert wird [37].

Tabelle 4.3 Der Ornithin- und Citrullintransport über die innere Mitochondrienmembran. Die $K_{m\text{ mit}}$ -Werte beziehen sich auf die Matrixseite des Carriers und die $K_{m\text{ cyt}}$ -Werte auf die cytosolische Seite.

Referenz	$K_{m\text{ mit}}$ [mM]	$K_{m\text{ cyt}}$ [mM]	V_{max} [mmol/min · g Protein]	Bemerkungen
Ornithin				
[37]	3,9	0,14		konzentrationsunabhängiges K_m
[19]	4			
[47]		0,16 ± 0,02	3,2 ± 0,7	25 °C
[39]		1,0	8,3	20 °C
[39]		1,25 ± 0,13	6,2 ± 0,26	30 °C
[40]		1,3	0,867 ± 0,17 (= 0,117 ± 0,02 mmol/min · g Leber)	37 °C, zusätzlicher nicht sättigbarer Ornithin-Transport
[43]		1,3	38,5 ± 6,1	22 °C
[45]		4,9	7,1	Liposomen
Citrullin				
[37]	1,9 ± 0,35	3,1 ± 0,42		pH 7
[47]		3,6 ± 0,7	2,9 ± 1,2	25 °C

Der Ornithin/Citrullin-Carrier arbeitet im Simultanmechanismus

Der Transport erfolgt nach einer Kinetik erster Ordnung [47]. Maximale Transportraten und Halbsättigungskonstanten der Substrate sind unabhängig von der Anwesenheit und Art der anderen transportierten Metabolite [37, 42]. Die Substrate binden schnell, unabhängig voneinander und in beliebiger Reihenfolge an den Carrier ohne dabei die K_m -Werte für die jeweils anderen Substrate deutlich zu verändern. Dieses Verhalten ist typisch für einen "Zufalls-Reaktionsmechanismus" mit schneller Gleichgewichtseinstellung (rapid-equilibrium random mechanism) [37].

Vor dem Transport müssen die Bindungsstellen auf beiden Membranseiten besetzt sein. Der Mechanismus ist somit ein Simultanmechanismus [37] (Kap. 1.2.2). Im Falle des Ornithin/(Citrullin + H⁺)-Austausches, einer Drei-Substrat-Transportreaktion, wird ein intermediärer Quartärkomplex gebildet.

Die Metabolitkonzentrationen limitieren den Transport

Ein Vergleich der Halbsättigungskonstanten mit den Metabolitkonzentrationen zeigt, dass die cytosolische Ornithinkonzentration im Bereich des $K_{m\text{ cyt}}$ -Wertes liegt. Eine Limitierung des Ornithinimportes durch die Carrierkapazität ist deshalb unter physiologischen Bedingungen unwahrscheinlich.

Die mitochondriale Ornithinkonzentration liegt unter der entsprechenden Halbsättigungskonstante. Somit kontrollieren und limitieren in vivo die Ornithinkonzentrationen im Cytosol und Mitochondrium den Ornithinimport und -export. Es hat sich in einigen Experimenten eine Begrenzung des Ornithinmetabolismus durch den Ornithincarrier gefunden [39]. Eine Ähnlichkeit zwischen der Kinetik des intramitochondrialen Ornithinabbaus durch die Ornithin-Aminotransferase und der Ornithintransportkinetik über die innere Mitochondrienmembran führte zum Schluss auf die Limitierung durch den Transport. Bei diesen Experimenten wurde allerdings mit extramitochondrialen Ornithinkonzentrationen gearbeitet, die ein Vielfaches der in-vivo-Konzentration betragen.

Auch die cytosolische Citrullinkonzentration ist deutlich geringer als der angegebene $K_{m\text{ cyt}}$ -Wert ebenso wie die Citrullinkonzentration im Mitochondrium unter dem $K_{m\text{ mit}}$ -Wert liegt. Somit wird auch der Citrullintransport in vivo durch die Citrullinkonzentrationen auf den beiden Seiten der Membran kontrolliert.

4.3.2 Die Bedeutung der Konzentrationsgradienten für den Transport

Der Citrullingradient genügt als Antrieb für einen Citrullinexport

Aus den Metabolitkonzentrationen und aus den Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran lassen sich Rückschlüsse auf die Transportmechanismen ziehen.

Der Transport von Citrullin alleine aus dem Mitochondrium ist aufgrund des Konzentrations-Gradienten gut ohne einen weiteren Antrieb vorstellbar. Der Transport wäre elektroneutral und erforderte keine Kompensationsmechanismen.

Für einen Ornithin/Citrullin-Antiport reichen die gemessenen Konzentrationsgradienten nicht

Unter der Annahme eines Austausches von Ornithin gegen Citrullin + H⁺ ergäbe sich bei einem Gleichgewicht der Metabolite folgende Konzentrationsverteilung:

$$\frac{[\text{Cit}]_{\text{mit}}}{[\text{Cit}]_{\text{cyt}}} \cdot \frac{[\text{H}^+]_{\text{mit}}}{[\text{H}^+]_{\text{cyt}}} = \frac{[\text{Orn}^+]_{\text{mit}}}{[\text{Orn}^+]_{\text{cyt}}} \quad (11)$$

Der pH-Gradient über der Mitochondrienmembran beträgt bei gefütterten Ratten ca. 0,3 [13], wobei das mitochondriale Milieu alkalischer ist. Das entspricht einem cytosolisch-mitochondrialen Protonenverhältnis von etwa zwei.

$$\frac{[\text{Cit}]_{\text{mit}}}{[\text{Cit}]_{\text{cyt}}} \approx 2 \cdot \frac{[\text{Orn}^+]_{\text{mit}}}{[\text{Orn}^+]_{\text{cyt}}} \quad (12)$$

Der Citrullingradient müsste also mindestens etwa das Doppelte des Ornithingradienten betragen, um den Austausch antreiben zu können [42]. Somit reicht der von uns gemessene mitochondrial-cytosolische Citrullingradient nicht als Antrieb für einen Ornithin/(Citrullin + H⁺)-Antiport aus.

Eine Ornithinbindung an intramitochondriale Strukturen könnte den Antiport ermöglichen

Eine mögliche Bindung des positiv geladenen Ornithins an intramitochondriale Strukturen [51], insbesondere an (negativ geladene) Strukturproteine, würde einen gewissen nur schwer zu mobilisierenden Ornithinpool bilden. Das Vorhandensein eines „osmotisch insensitiven“ Ornithins hat sich allerdings nicht in allen Experimenten bestätigt: so nahm der Ornithingehalt in Versuchen mit isolierten Mitochondrien linear mit dem Matrixvolumen ab [39].

Unter der Annahme, dass „osmotisch unempfindliches“ Ornithin von 0,31 nmol/mg Protein [51] an Strukturproteine gebunden sei, würden ca. 53 % des von uns gemessenen Ornithins für Stoffwechsel und Transport ausfallen.

Würde man weiterhin annehmen, dass Citrullin nicht an intramitochondriale Strukturen gebunden sei, betrüge der Konzentrationsgradient des Citrullins ca. das

1,76fache des Ornithinkonzentrationsgradienten.²² Damit läge er nah bei dem Wert, der zum Antrieb des Antiportes ausreicht.

Osmotisch insensitive Ornithin wäre nicht notwendigerweise inaktiviertes Ornithin. Bei Bindung an Struktur- und Enzymproteine ist es nicht dem Stoffwechsel entzogen, sondern steht im Dissoziationsgleichgewicht mit dem Ornithin des Lösungsraumes.

Enzymkomplexe können die Stoffumwandlung fördern

Es wird diskutiert, dass die Ornithinverstoffwechslung durch eine enge Gruppierung der intramitochondrialen Ornithin-Carbamyltransferase und Carbamylphosphat-Synthetase an die innere Mitochondrienmembran [131, 132] und den Ornithincarrier kanalisiert wird [129, 133]. Das Ornithin würde nicht durch Diffusion sondern innerhalb des Enzymkomplexes direkt auf das nächste Enzym übertragen.

Eine solche Kompartimentierung mehrerer Stoffwechselschritte könnte auch auf extramitochondriale Enzyme des Harnstoffzyklus zutreffen [134], die so das aus dem Mitochondrium transportierte Citrullin leicht abnehmen und verstoffwechseln können.

Auf diese Weise ist eine effiziente Verstoffwechslung beider Metabolite selbst bei suboptimalen Konzentrationsgradienten denkbar. Unter Berücksichtigung des osmotisch insensitive Ornithins und einer Assoziation der Metabolite an Enzym-Carrier-Komplexe ist es daher vorstellbar, dass der Citrullingradient ausreicht, um den Antiport anzutreiben.

²² Orn_{mit} : 0,58 nmol/mg Protein (Tab. 3.6).
 Orn_{cyt} : 0,705 nmol/mg Protein (Tab. 3.6), entsprechend 0,186 mM (Tab. 3.7).
 Gebundener Anteil des Orn_{mit} : 0,31 nmol/mg / 0,58 nmol/mg = 0,53.
 „Freies“ Orn_{mit} : 0,58 nmol/mg - 0,31 nmol/mg = 0,27 nmol/mg, entspricht 0,338 mM.
 „Freies“ Orn_{mit} / Orn_{cyt} : 0,338 mM / 0,186 mM = 1,82 (GradOrn).
 Cit_{mit} / Cit_{cyt} : 3,21 (Tab. 3.10) (GradCit).
 GradCit/GradOrn = 3,21/1,82 = 1,76.

4.3.3 Der Metabolitumsatz in den verschiedenen Stoffwechselwegen als Antrieb für den Austausch

Die Ornithin-Aminotransferase-Reaktion ist hauptverantwortlich für die intrazelluläre Ornithinkonzentration

Die Eigenschaften der am Ornithin- und Citrullinstoffwechsel beteiligten Enzyme sind sehr unterschiedlich (Tab. 4.4) und lassen Rückschlüsse auf die Geschwin-

Tabelle 4.4 Kinetische Eigenschaften verschiedener am Ornithin- und Citrullinstoffwechsel beteiligter Enzyme. Die Werte stammen aus unterschiedlichen Versuchsanordnungen und Laboren (siehe auch Abb. 1.3 und 1.4, Abkürzungen siehe S. 81).

Referenz	Enzym	Substrat	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}^*$]	Bemerkungen
Glutamatsynthese und -abbau					
[39]	OAT	Ornithin	1,25	6,2	intakte Mitochon.
[39]	OAT	Ornithin	4		zerstörte Mitochon.
[39]	OAT	α -Ketoglutarat	0,15		zerstörte Mitochon.
[75]	Glutaminase	Glutamin	15–27		
[63]	GS	NH_4^+	0,3		
Carbamylphosphatsynthese					
[80]	AGS	Glutamat	3	0,2	
[80]	AGS	Acetyl-CoA	0,7		
[80]	CPS	N-Acetylglutamat	0,1		
[73]	CPS	HCO_3^-	5,3		
[135]	CPS	HCO_3^-	3–5		
[80]	CPS	NH_4^+	1–2	21	
[135]	CPS	MgATP^{2-}	0,5–0,8		
Harnstoffzyklus					
[133]	OCT	Ornithin	0,98		
[136]	OCT	Ornithin	1,4		
[80]	OCT	Ornithin	0,2–1,8	799	
[128]	OCT	Ornithin	1,82		pH 7,5
[128]	OCT	Carbamylphosphat	0,02		pH 7,5
[133]	OCT	Carbamylphosphat	0,4		
[80]	ASS	Citrullin	0,04	7,4	
[80]	ASS	Aspartat	0,02		
[80]	ASL	Argininosuccinat	0,04–0,13	13,3	
[80]	Arginase	Arginin	3,5	5134	pH 7,5

* g Trockengewicht

digkeit einzelner Reaktionen zu. Aufgrund seiner Rolle in der pH-Homöostase kann sich der Harnstoffzyklus nur in Grenzen an wechselnde Notwendigkeiten der Ornithinverstoffwechslung anpassen. Mit der Ornithin-Aminotransferase (OAT) kann die Zelle wesentlich flexibler auf Ornithinschwankungen reagieren.

Die OAT übernimmt die Verstoffwechslung überschüssigen Ornithins (Abb. 1.4 und 4.1) und somit die Aufrechterhaltung einer relativ konstanten intrazellulären Ornithinkonzentration. Das ist zum Beispiel bei hohem Argininangebot durch proteinreiche Nahrung wichtig [39], denn die Arginase wandelt durch ihre hohe Aktivität das Arginin im Cytosol praktisch komplett in Harnstoff und Ornithin um [46].²³

Die Ornithin-Aminotransferase-Reaktion hat einen höheren Anteil am intramitochondrialen Ornithinstoffwechsel als der Harnstoffzyklus [39]. So beträgt die Citrullinsynthese aus Ornithin *in vitro* nur ca. 13–28 % der Glutamatsynthese [39]. Als Folge sinkt die intramitochondriale Ornithinkonzentration selbst dann, wenn die Ornithinaufnahme in das Mitochondrium die Citrullinakkumulation und damit die Aktivität der Ornithin-Carbamyltransferase (OCT) übersteigt [40].

Bei hohem intramitochondrialen Ornithinbedarf wird daher Ornithin nicht nur im 1:1-Austausch gegen Citrullin sondern auch im Antiport mit Protonen importiert. Die Aktivität des Ornithin/Citrullin-Austausches über die innere Mitochondrienmembran beträgt *in vitro* etwa das dreifache des Ornithin/H⁺-Austausches [41]. Die OAT unterstützt somit den energetisch ungünstigen Ornithinimport in die Mitochondrien, indem sie das Ornithin aus der Reaktion entfernt. Dies hat jedoch Konsequenzen für die Umsatzgeschwindigkeit des Harnstoffzyklus.

Die intramitochondriale Ornithinkonzentration limitiert den Harnstoffzyklus

Die mitochondriale Ornithinkonzentration der Leber bei gefütterten Ratten liegt unter dem K_m -Wert der mitochondrialen Ornithin-Carbamyltransferase von ca. 1–1,8 mM [128, 133]. Daher findet hier eine Limitierung des Harnstoffzyklus durch die Ornithinkonzentration statt.

Der Harnstoffzyklus ist daneben auch noch anderen Restriktionen unterworfen. Die Citrullinsynthese ist außer durch die Ornithinzufuhr [43] auch durch die

²³ Ein erhöhter Arginingehalt der Nahrung fördert die Enzymexpression [137].

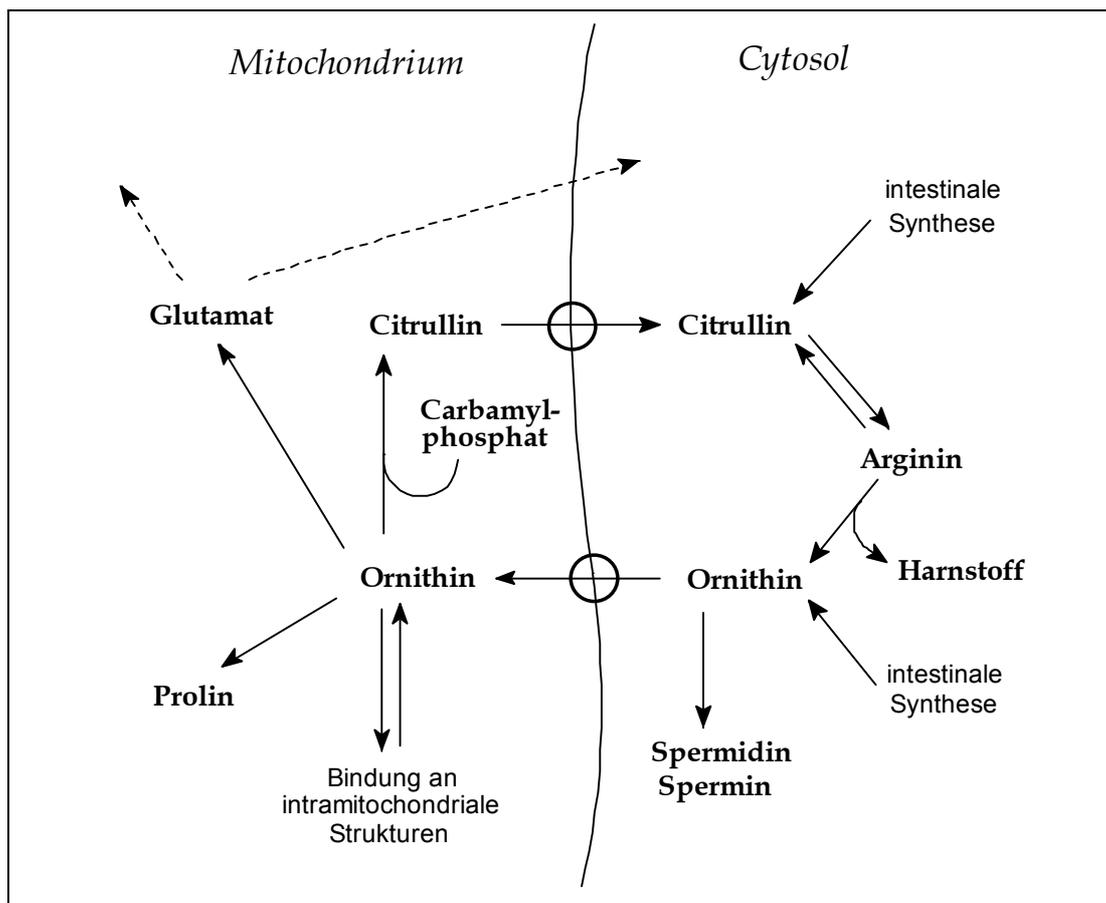


Abb. 4.1 Verschiedene Faktoren beeinflussen die Metabolitkonzentrationen in den Kompartimenten. Die intramitochondriale Glutamatsynthese aus Ornithin hat den größten Einfluss auf Orn_{mit} . Die Citrullinsynthese beträgt weniger als ein Drittel der Glutamatsynthese. Intramitochondriale Strukturen binden einen relativ konstanten Anteil des Ornithins.

Carbamylphosphatsynthese limitiert [77], welche wiederum von mehreren Faktoren abhängt (Kap. 1.4.2 und Abb. 1.3).²⁴ Der K_m -Wert der Ornithin-Carbamyltransferase (OCT) für Carbamylphosphat liegt mit 0,02–0,4 mM [128, 133] unter der geschätzten Carbamylphosphatkonzentration von 0,5 mM [128], so dass hier durch die Carbamylphosphatkonzentration oder gar durch eine begrenzte Verstoffwechslung bei vermehrtem Carbamylphosphatanfall ein weiterer limitierender Faktor des Harnstoffzyklus vorliegt.

Eine intramitochondriale Ornithinproduktion in nennenswertem Maße, zum Beispiel in Umkehrung der Prolinsynthese (Abb. 1.4), ist nicht bekannt [39].

²⁴ Die CPS I konkurriert außerdem mit anderen endergonen Prozessen um ATP [135].

4.3.4 Die treibenden Kräfte des Transportes

Die vorgefundene Verteilung lässt drei sich ergänzende Hypothesen über die treibenden Kräfte des Ornithin- und Citrullintransportes über die innere Mitochondrienmembran zu.

1. Ein Teil des Ornithins ist osmotisch inaktiv und damit dem Stoffwechsel entzogen. Der mitochondrial-cytosolische Gradient des freien Ornithins ist also geringer als in unseren Messungen. Dadurch reicht der Citrullingradient aus, um den Antiport von Ornithin gegen Citrullin anzutreiben.
2. Unterschiedliche Affinitäten des Carriers für Ornithin und Citrullin unterstützen den Transport in physiologischer Richtung. Eine Kanalisierung der Metabolite durch Enzymkomplexe könnte den Transport zusätzlich erleichtern.
3. Ornithin wird in den Mitochondrien relativ schnell durch die Ornithin-Aminotransferase metabolisiert. Es wird eine mitochondriale Akkumulation verhindert und ein weiterer Import ermöglicht.

Letzteres bedeutet auch, dass die Ornithinzufuhr und der Ornithin/Citrullin-Austausch limitierend für die Citrullinsynthese sind, was die im Vergleich zur Ornithin-Aminotransferase niedrige Rate der Harnstoffsynthese erklärt. Durch die schnelle Verstoffwechslung des Ornithins kann der Organismus schnell auf unterschiedliche metabolische Notwendigkeiten reagieren.

5 Zusammenfassung

Der Transport von Ornithin und Citrullin über die innere Mitochondrienmembran spielt eine wichtige Rolle in mehreren Stoffwechselwegen, insbesondere im Harnstoffzyklus und bei der Ornithin-Aminotransferase-Reaktion. Die subzelluläre Verteilung der Metabolite kann Hinweise auf die Transportmodalitäten liefern.

In dieser Arbeit wurde daher die mitochondrial-cytosolische Verteilung von Ornithin und Citrullin in der isoliert perfundierten Rattenleber ermittelt. Der metabolische Status von Lebern gefütterter Ratten wurde durch hämoglobinfreie Perfusion und anschließenden Frierstopp konserviert. Mit der nichtwässrigen Fraktionierung wurde eine Auftrennung der Zellkompartimente vorgenommen. Mit verschiedenen Enzymtests und der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) wurden die Gehalte von Protein, Ornithin und Citrullin im Cytosol und in den Mitochondrien bestimmt und deren Konzentrationen und Gradienten berechnet.

In den Lebern gefütterter Ratten beträgt die intramitochondriale Ornithinkonzentration 0,73 mM und die intramitochondriale Citrullinkonzentration 0,62 mM. Im Cytosol liegen sowohl Ornithin als auch Citrullin in einer Konzentration von ca. 0,19 mM vor. Damit ergibt sich für beide Metabolite ein mitochondrial-cytosolischer Konzentrationsgradient zwischen 3,2 und 3,9.

Der Konzentrationsgradient des Citrullins reicht aus, um einen separaten Citrullin-export anzutreiben. Der Ornithingradient steht jedoch dem geforderten Ornithinimport entgegen. Auch der H^+ -Export verläuft gegen den Protonengradienten. Die vorgefundene Verteilung liefert also keine treibende Kraft für den zuvor postulierten Ornithin/(Citrullin + H^+)-Austausch.

Es ergeben sich drei Hypothesen über den Antrieb des Transportes: Erstens ist aufgrund einer Bindung des Ornithins an intramitochondriale Strukturen der Ornithingradient in Wirklichkeit flacher als gemessen, so dass der Citrullingradient zum Antrieb des Antiportes ausreicht. Zweitens unterstützen unterschiedliche Metabolitaffinitäten des Carriers den Transport in physiologischer Richtung. Hinzu kommt drittens eine schnelle Metabolisierung des mitochondrialen Ornithins durch die Ornithin-Aminotransferase, was einen entsprechenden Import fördert.

Literatur

- 1 Chapman D (1975) Lipid dynamics in cell membranes. In: Weissman G, Claiborne R (eds) *Cell membranes, biochemistry, cell biology and pathology*. HP Publishing; New York: 13-22
- 2 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995) *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Aufl. VCH; Weinheim
- 3 Klingenberg M (1981) Membrane protein oligomeric structure and transport function. *Nature* **290**: 449-454
- 4 Löffler G (1997) Lipide. In: Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Aufl. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York: 135-147
- 5 Chappel JB, Haarhoff KN (1967) The penetration of the mitochondrial membrane by anions and cations. In: Slater EC, Kaniuga Z, Wojtczak L (eds) *Biochemistry of the mitochondria*. Academic Press; New York: 75-91
- 6 Löffler G (1997) Zelluläre Organellen und Strukturen. In: Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Aufl. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York: 175-201
- 7 Petrides PE (1997) Nervengewebe. In: Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Aufl. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York: 970-993
- 8 modifiziert nach: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995) *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Aufl. VCH; Weinheim: 606
- 9 Quagliariello E, Palmieri F, Prezioso G, Klingenberg M (1969) Kinetics of succinate uptake by rat-liver mitochondria. *FEBS Lett* **4**: 251-254
- 10 Weibel ER, Stäubli W, Gnägi HR, Hess FA (1969) Corrolated morphometric and biochemical studies on the liver cell. *J Cell Biol* **42**: 68-91
- 11 Pfaff E, Klingenberg M, Ritt E, Vogell W (1968) Korrelation des unspezifisch permeablen mitochondrialen Raumes mit dem "Intermembran-Raum". *Eur J Biochem* **5**: 222-232
- 12 Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature (London)* **191**: 144-148
- 13 Soboll S, Elbers R, Scholz R, Heldt HW (1980) Subcellular distribution of di- and tricarb-oxylates and pH gradients in perfused rat liver. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **361**: 69-76
- 14 Soboll S, Scholz R (1986) Control of energy metabolism by glucagon and adrenaline in perfused rat liver. *FEBS Lett* **205**: 109-112
- 15 LaNoue KF, Schoolwerth AC (1979) Metabolite transport in mitochondria. *Ann Rev Biochem* **48**: 871-922
- 16 Maloney PC (1989) Resolution and reconstitution of anion exchange reactions. *Philos Trans R Soc London Ser B* **326**: 437-454
- 17 Löffler G (1997) Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung. In: Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Aufl. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York: 495-518
- 18 Krämer R, Palmieri F (1989) Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **974**: 1-23
- 19 Palmieri F (1994) Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett* **346**: 48-54
- 20 Wu LF, Saier MH jr (1990) On the evolutionary origins of the bacterial phosphoenol-pyruvate: sugar phosphotransferase system. *Mol Microbiol* **4**: 1219-1222

- 21 Krämer R, Palmieri F (1992) Metabolite carriers in mitochondria. In: Ernster L (ed) *Molecular Mechanisms in Bioenergetics*. New comprehensive biochemistry, Vol 23. Elsevier; Amsterdam, London, New York: 359–384
- 22 Saier MH jr (1994) Convergence and divergence in the evolution of transport proteins. *BioEssays* **16** (1): 23–29
- 23 Saier MH jr (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Bio Rev* **64** (2): 354–411
- 24 Henderson PJF (1993) The 12-transmembrane helix transporters. *Curr Opin Cell Biol* **5**: 708–721
- 25 Maiden MCJ, Davis EO, Baldwin SA, Moore DCM, Henderson PJF (1987) Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* **325**: 641–643
- 26 Aquila H, Link TA, Klingenberg M (1987) Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family. *FEBS Lett* **212**: 1–9
- 27 Runswick MJ, Walker JE, Bisaccia F, Iacobazzi V, Palmieri F (1990) Sequence of the bovine 2-oxoglutarate/malate carrier protein: structural relationship to other mitochondrial transport proteins. *Biochemistry* **29**: 11033–11040
- 28 Indiveri C, Dierks T, Krämer R, Palmieri F (1991) Reaction mechanism of the reconstituted oxoglutarate carrier from bovine heart mitochondria. *Eur J Biochem* **198**: 339–347
- 29 Palmieri F, van Ommen B (1999) The mitochondrial carrier protein family. In: Papa S, Guerrieri F, Tager JM (eds) *Frontiers of Cellular Bioenergetics*. Kluwer Academic/Plenum Publishers; New York: 489–519
- 30 Saraste M, Walker JE (1982) Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett* **144**: 250–254
- 31 Klingenberg M (1990) Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends Biochem Sci* **15**: 108–112
- 32 Pfanner N (1998) Mitochondrial import: crossing the aqueous intermembrane space. *Curr Biol* **8**: R262–R265
- 33 Koehler CM, Merchant S, Schatz G (1999) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci* **24**: 428–432
- 34 Bauer MF, Hofman S, Neupert W, Brunner M (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol* **10**: 25–31
- 35 Palmieri F, Bisaccia F, Capobianco L, Iacobazzi V, Indiveri C, Zara V (1990) Structural and functional properties of mitochondrial anion carriers. *Biochim Biophys Acta* **1018**: 147–150
- 36 Palmieri F, Indiveri C, Bisaccia F, Krämer R (1993) Functional properties of purified and reconstituted mitochondrial metabolite carriers. *J Bioenerg Biomembr* **25**: 525–535
- 37 Indiveri C, Tonazzi A, DePalma A, Palmieri F (2001) Kinetic mechanism of antiports catalyzed by reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1503**: 303–313
- 38 Gamble JG, Lehninger AL (1973) Transport of ornithine and citrulline across the mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **248**: 610–618
- 39 McGivan JD, Bradford NM, Beavis AD (1977) Factors influencing the activity of ornithine aminotransferase in isolated rat liver mitochondria. *Biochem J* **162**: 147–156
- 40 Zollner H (1984) Ornithine uptake by isolated hepatocytes and distribution within the cell. *Int J Biochem* **16**: 681–685

- 41 Indiveri C, Tonazzi A, Stipani I, Palmieri F (1999) The purified and reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria catalyses a second transport mode: ornithine⁺/H⁺ exchange. *Biochem J* **341**: 705–711
- 42 Indiveri C, Tonazzi A, Stipani I, Palmieri F (1997) The purified and reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria: electrical nature and coupling of the exchange reaction with H⁺ translocation. *Biochem J* **327**: 349–356
- 43 Hommes FA, Kitchings L, Eller AG (1983) The uptake of ornithine and lysine by rat liver mitochondria. *Biochem Med* **30**: 313–321
- 44 Bradford NM, McGivan JD (1980) Evidence for the existence of an ornithine/citrulline antiporter in rat liver mitochondria. *FEBS Lett* **113**: 294–298
- 45 Hommes FA, Eller AG, Evans BA, Carter AL (1984) Reconstitution of ornithine transport in liposomes with lubrol extracts of mitochondria. *FEBS Lett* **170**: 131–134
- 46 Indiveri C, Tonazzi A, Palmieri F (1992) Identification and purification of the ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* **207**: 449–454
- 47 Indiveri C, Palmieri L, Palmieri F (1994) Kinetic characterization of the reconstituted ornithine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1188**: 293–301
- 48 Passarella S, Atlante A, Quagliariello E (1989) Metabolite transport in rat kidney mitochondria: ornithine/phosphate translocator. *Biochem Biophys Res Commun* **158**: 870–878
- 49 Passarella S, Atlante A, Quagliariello E (1990) Ornithine/phosphate antiport in rat kidney mitochondria. *Eur J Biochem* **193**: 221–227
- 50 Bryla J, Harris EJ (1976) Accumulation of ornithine and citrulline in rat liver mitochondria in relation to citrulline formation. *FEBS Lett* **72**: 331–336
- 51 Aronson DL, Diwan JJ (1981) Uptake of ornithine by rat liver mitochondria. *Biochemistry* **20**: 7064–7068
- 52 Kleiner D (1981) The transport of NH₃ und NH₄⁺ across biological membranes. *Biochim Biophys Acta* **639**: 41–52
- 53 Häussinger D, Maier KP (Hrsg) (1996) *Hepatische Enzephalopathie*. Thieme Verlag; Stuttgart, New York
- 54 Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S (2000) Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* **32**: 1035–1038
- 55 Krebs HA, Henseleit K (1932) Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chemie* **210**: 33–66
- 56 Nachmansohn D (1988) *Die große Ära der Wissenschaft in Deutschland 1900 bis 1933. Jüdische und nichtjüdische Pioniere in der Atomphysik, Chemie und Biochemie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; Stuttgart
- 57 Krebs HA (1981) *Reminiscences and Reflections*. Clarendon Press; Oxford (eine – auch historisch – sehr interessante Autobiografie)
- 58 Holmes FL (1991) *Hans Krebs. The Formation of a Scientific Life 1900-1933*. Vol I. Holmes FL (1993) *Hans Krebs. Architect of Intermediary Metabolism 1933-1937*. Vol II. Oxford University Press; New York, Oxford (eine Biografie mit detaillierter Darstellung der wissenschaftlichen Aspekte)
- 59 Baldwin JE, Krebs HA (1981) The evolution of metabolic cycles. *Nature (London)* **291**: 381–382
- 60 Krebs HA (1982) Zur Evolution des Citronensäurezyklus. *Naturwissenschaftl Rundschau*, **35**. Jg. **6**: 225–228

- 61 Gaasbeck Janzen JW, Lamers WH, Moorman AFM, de Graaf A, Los JA, Charles R (1984) Immunohistochemical localization of carbamoyl-phosphate synthetase (ammonia) in adult rat liver. *J Histochem Cytochem* **32**: 557–564
- 62 Häussinger D (1983) Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. *Eur J Biochem* **133**: 269
- 63 Häussinger D (1986) Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular glutamine cycle. *Adv Enzyme Regul* **25**: 159–180
- 64 Petrides PE (1997) Stoffwechsel der Aminosäuren. In: Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Aufl. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York: 521–579
- 65 Martin B (Hrsg) (1989) *Martin Heidegger und das ‚Dritte Reich‘ : ein Kompendium*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft; Darmstadt
- 66 Farías V (1989) *Heidegger und der Nationalsozialismus*. S. Fischer Verlag; Frankfurt am Main
- 67 Shih VE, Efron ML, Moser HW (1969) Hyperornithinemia, hyperammonemia, and homocitrullinuria. *Am J Dis Child* **117**: 83–92
(eine interessante Beschreibung der Klinik und eines Verlaufs)
- 68 Fell V, Pollit RJ, Sampson GA, Wright T (1974) Ornithinemia, hyperammonemia and homocitrullinuria. *Am J Dis Child* **127**: 752–756
- 69 Gatfield PD, Taller E, Wolfe DM, Haust MD (1975) Hyperornithinemia, hyperammonemia, and homocitrullinuria associated with decreased carbamyl phosphate synthetase I activity. *Pediatr Res* **9**: 488–497
- 70 Inoue I, Saheki T, Kayanuma K, Uono M, Nakajima M, Takeshita K, Koike R, Yuasa T, Miyatake T, Sakoda K (1988) Biochemical analysis of decreased ornithine transport activity in the liver mitochondria from patients with hyperornithinemia, hyperammonemia and homocitrullinuria. *Biochim Biophys Acta* **964**: 90–95
- 71 Camacho JA, Obie C, Biery B, Goodman BK, Hu C, Almashanu S, Steel G, Casey R, Lambert M, Mitchell GA, Valle D (1999) Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nat Genet* **22**: 151–158
- 72 Atkinson DE, Bourke E (1984) The role of ureagenesis in pH homeostasis. *Trends Biochem Sci* **9**: 297–300
- 73 Häussinger D, Gerok W, Sies H (1984) Hepatic role in pH regulation: role of the intercellular glutamine cycle. *Trends Biochem Sci* **9**: 300–302
- 74 Häussinger D, Gerok W, Sies H (1986) The effect of urea-synthesis on extracellular pH in isolated rat liver. *Biochem J* **236**: 261–265
- 75 Kaiser S, Gerok W, Häussinger D (1988) Ammonia and glutamine metabolism in human liver slices: new aspects on the pathogenesis of hyperammonemia in chronic liver disease. *Eur J Clin Invest* **18**: 535–542
- 76 Grisolia S, Cohen PP (1953) Catalytic rôle of glutamate derivatives in citrulline biosynthesis. *J Biol Chem* **204**: 753–757
- 77 Meijer AJ, van Woerkom GM (1978) Control of the rate of citrulline synthesis by shortterm changes in N-acetylglutamate levels in isolated rat-liver mitochondria. *FEBS Lett* **86**: 117–121
- 78 Wada M (1930) Über Citrullin, eine neue Aminosäure im Preßsaft der Wassermelone, *Citrullus vulgaris* schrad. *Biochem Z* **224**: 420–429

- 79 Halperin ML, Chen CB, Cheema-Dhadli S, West ML, Jungas RL (1986) Is urea formation regulated primarily by acid-base balance in vivo? *Am J Physiol* **250**: F605-F612
- 80 Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RAFM (1990) Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol Rev* **70**: 701-748
- 81 modifiziert nach: Petrides PE (1997) Stoffwechsel der Aminosäuren. In: Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Aufl. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York: 537
- 82 Kossel A, Dakin HD (1904) Über die Arginase. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chemie* **41**: 321-331
- 83 Baum H (1995) *The Biochemist's Songbook*. 2nd ed. Taylor & Francis; London: 51-52
- 84 Kuo FC, Hwu WL, Valle D, Darnell jr. JE (1991) Colocalization in pericentral hepatocytes in adult mice and similarity in developmental expression pattern of ornithine amino-transferase and glutamine synthetase mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9468-9472
- 85 Windmueller HG, Spaeth AE (1978) Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. *J Biol Chem* **253**: 69-76
- 86 Scholz R, Hansen W, Thurman RG (1973) Interaction of mixed-function oxidation with biosynthetic processes. *Eur J Biochem* **38**: 64-72
- 87 Soboll S (1977) *Metabolitenkonzentration im mitochondrialen und cytosolischen Kompartiment der Leber als Funktion des Stoffwechszustandes*. Dissertation; Technische Universität München
- 88 Wollenberger A, Ristau O, Schoffa G (1960) Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. *Pflüger's Arch* **270**: 399-412
- 89 Soboll S, Elbers R, Heldt W (1979) Metabolite measurements in mitochondria and in the extramitochondrial compartment by fractionation of freeze-stopped liver tissue in nonaqueous media. *Methods Enzymol* **56**: 201-206
- 90 Soboll S, Scholz R, Heldt HW (1978) Subcellular metabolite concentrations. *Eur J Biochem* **87**: 377-390
- 91 Bergmeyer HU (Hrsg) (1974) *Methoden der enzymatischen Analyse*. 3. Aufl, Bd 1 und 2. Verlag Chemie; Weinheim/Bergstraße
- 92 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275
- 93 Chinard FP (1952) Photometric estimation of proline and ornithine. *J Biol Chem* **199**: 91-95
- 94 Archibald RM (1944) Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *J Biol Chem* **156**: 121-142
- 95 Ceriotti G (1974) Ornithin-Carbamyl-Transferase. In: Bergmeyer HU (Hrsg) *Methoden der enzymatischen Analyse*. 3. Aufl, Bd 1. Verlag Chemie; Weinheim/Bergstraße: 732-739
- 96 Lorentz K, Koch H (1971) Bestimmung von Ornithin-Carbamyl-Transferase mittels FEARON-Reaktion. *Z klin Chem u klin Biochem*, **9**, Jg, **3**: 215-219
- 97 Moore S, Stein WH (1951) Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J Biol Chem* **192**: 663-681
- 98 Moore S, Spackman DH, Stein WH (1958) Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Anal Chem* **30**: 1185-1190
- 99 Roth M (1971) Fluorescence reaction for amino acids. *Anal Chem* **43**: 880-882
- 100 Benson JR, Hare PE (1975) o-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proc Nat Acad Sci USA* **72**: 619-622

- 101 Simons SS jr., Johnson DF (1978) Reaction of o-phthalaldehyde and thiols with primary amines: formation of 1-alkyl (and aryl) thio-2-alkylisoindoles. *J Org Chem* **43**: 2886–2891
- 102 Sternson LA, Stobaugh JF, Repta AJ (1985) Rational design and evaluation of improved o-phthalaldehyde-like fluorogenic reagents. *Anal Biochem* **144**: 233–246
- 103 Garcia Alvarez-Coque MC, Medina Hernandez MJ, Villanueva Camanas RM, Mongay Fernandez C (1989) Formation and instability of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids. *Anal Biochem* **178**: 1–7
- 104 Lindroth P, Mopper K (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal Chem* **51**: 1667–1674
- 105 Gardner WS, Miller WH (1980) Reverse-phase liquid chromatographic analysis of amino acids after reaction with o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* **101**: 61–65
- 106 Jones BN, Pääbo P, Stein S (1981) Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved o-phthalaldehyde precolumn labeling procedure. *J Liq Chromatogr* **4**: 565–586
- 107 Schuster R (1988) Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **431**: 271–284
- 108 Chen RF, Scott C, Trepman E (1979) Fluorescence properties of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids. *Biochim Biophys Acta* **576**: 440–455
- 109 Godel H, Graser T, Földi P, Pfaender P, Fürst P (1984) Measurement of free amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **297**: 49–61
- 110 Buteau C, Duitschaever CL, Ashton GC (1981) Stability of the o-phthalaldehyde-histamine complex. *J Chromatogr* **212**: 23–27
- 111 Cooper JDH, Ogden G, McIntosh J, Turnell DC (1984) The stability of the o-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids: an investigation using high-pressure liquid chromatography with a precolumn derivatization technique. *Anal Biochem* **142**: 98–102
- 112 Elbers R, Heldt HW, Schmucker P, Soboll S, Wiese H (1974) Measurement of the ATP/ADP ratio in mitochondria and in the extramitochondrial compartment by fractionation of freeze-stopped liver tissue in non-aqueous media. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **355**: 378–393
- 113 Soboll S (1981) *Kompartimentierung im Energiestoffwechsel; Beziehung zwischen mitochondrialem und zytosolischem ATP-System*. Habilitationsschrift, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 114 LaNoue KF, Walajtys EL, Williamson JR (1973) Regulation of glutamate metabolism and interactions with the citric acid cycle in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* **248**: 7171–7183
- 115 Scholz R (1968) Untersuchung zur Redoxkompartimentierung bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber. In: Staib W, Scholz R (Hrsg) *Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber*. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York: 25–47
- 116 Kessler M, Schubotz R (1968) Die O₂-Versorgung der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber. In: Staib W, Scholz R (Hrsg) *Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber*. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York: 12–24
- 117 Schimassek H (1963) Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isolierten perfundierten Rattenleber. *Biochem Z* **336**: 460–467
- 118 Staib WW, Scholz R (1968) (Hrsg) *Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber*. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York

- 119 Schimassek H, Gerok W (1965) Control of the levels of free amino acids in plasma by the liver. *Biochem Z* **343**: 407–415
- 120 Soboll S, Scholz R, Heldt HW (1978) Subcellular metabolite concentrations. *Eur J Biochem* **87**: 377–90
- 121 Soboll S, Akerboom TPM, Schwenke WD, Haase, Sies H (1980) Mitochondrial and cytosolic ATP/ADP ratios in isolated hepatocytes. A comparison of the digitonin method and the non-aqueous fractionation procedure. *Biochem J* **192**: 951–954
- 122 Zuurendonk PF, Tager JM (1974) Rapid separation of particulate components and soluble cytoplasm of isolated rat-liver cells. *Biochim Biophys Acta* **333**: 378–393
- 123 Zuurendonk PF, Tischler ME, Akerboom TPM, van der Meer R, Williamson JR, Tager JM (1979) Rapid separation of particulate and soluble fractions from isolated cell preparations (digitonin and cell cavitation procedures). *Methods Enzymol* **56**: 207–223
- 124 Siebert G, Humphrey GB, Themann H, Kersten W (1965) Neue Kriterien zur Beurteilung isolierter Zellkerne. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chemie* **340**: 51–72
- 125 Beaufay H, Bendall DS, Baudhuin P, Wattiaux R, de Duve C (1959) Tissue fractionation studies. Analysis of mitochondrial fractions from rat liver by density gradient centrifuging. *Biochem J* **73**: 628–637
- 126 Brosnan JT, Man KC, Hall DE, Colbourne SA, Brosnan ME (1983) Interorgan metabolism of amino acids in streptozotocin-diabetic ketoacidotic rat. *Am J Physiol* **244**: E 151– E 158
- 127 Saheki T, Hosoya M, Fujinami S, Katsunuma T (1981) Regulation of urea synthesis: Changes in the concentration of ornithine in the liver corresponding to changes in urea synthesis. *Adv Exp Med Biol* **153**: 255–263
- 128 Rajman L (1974) Citrulline synthesis in rat tissues and liver content of carbamoyl phosphate and ornithine. *Biochem J* **138**: 225–232
- 129 Cohen NS, Cheung CW, Rajjman L (1987) Channeling of extramitochondrial ornithine to matrix ornithine transcarbamylase. *J Biol Chem* **262**: 203–208
- 130 Williamson JR, Scholz R, Browning ET (1969) Control mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis. *J Biol Chem* **244**: 4617–4627
- 131 Yokota S, Mori M (1986) Immunoelectron microscopical localization of ornithine transcarbamylase in hepatic parenchymal cells of the rat. *Histochem J* **18**: 451–457
- 132 Powers-Lee SG, Mastico RA, Bodayan M (1987) The interaction of rat liver carbamoyl phosphate synthetase and ornithine transcarbamoylase with inner mitochondrial membranes. *J Biol Chem* **262**: 15683–15688
- 133 Cohen NS, Cheung CW, Sijuwade E, Rajjman L (1992) Kinetic properties of carbamoyl-phosphate synthase (ammonia) and ornithine carbamoyltransferase in permeabilized mitochondria. *Biochem J* **282**: 173–180
- 134 Cheung CW, Cohen NS, Rajjman L (1989) Channeling of urea cycle intermediates in situ in permeabilized hepatocytes. *J Biol Chem* **264**: 4038–4044
- 135 Williamson JR, Steinman R, Coll K, Rich TL (1981) Energetics of citrulline synthesis by rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **256**: 7287–97
- 136 Krebs HA, Hems R, Lund P (1973) Some regulatory mechanisms in the synthesis of urea in the mammalian liver. *Adv Enzyme Regul* **11**: 361–377
- 137 Peraino C, Blake RL, Pitot HC (1965) Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. *J Biol Chem* **240**: 3039–3043

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AGS	Acetylglutamat-Synthetase
äm	äußere Mitochondrienmembran
AMP	Adenosinmonophosphat
APAD	Acetylpyridiniumadenindinucleotid
AS	Aminosäure
ASL	Argininosuccinat-Lyase
ASS	Argininosuccinat-Synthetase
ATP	Adenosintriphosphat
Cit	Citrullin
CPS	Carbamyolphosphat-Synthetase I
CS	Citrat-Synthetase
cyt	cytosolisch
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	Glutamatoxalacetat-Transaminase (AST, Aspartat-Aminotransferase)
GPT	Glutamatpyruvat-Transaminase (ALT, Alanin-Aminotransferase)
GS	Glutamin-Synthetase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
iM	innere Mitochondrienmembran
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MCE	Mercaptoethanol
MDH	Malat-Dehydrogenase
mit	mitochondrial
MW	arithmetischer Mittelwert
NAD ⁺	Nikotinsäureamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nikotinsäureamidadenindinukleotid
OAT	Ornithin-Aminotransferase
OCT	Ornithin-Carbamyltransferase
ODC	Ornithin-Decarboxylase
OPA	ortho-Phthalaldehyd
Orn	Ornithin
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGK	3-Phosphoglycerat-Kinase
P _i	anorganisches Phosphat
PK	Pyruvat-Kinase
r	empirischer Korrelationskoeffizient nach PEARSON
r ²	empirisches Bestimmtheitsmaß
SD	empirische Standardabweichung der Einzelwerte
SEM	empirische Standardabweichung des arithmetischen Mittelwertes
Trap	Triethanolaminhydrochlorid-Puffer

Danksagungen

Diese Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Sies möchte ich für die Möglichkeit meinen Dank aussprechen, am Institut für Physiologische Chemie I zu promovieren.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. S. Soboll für die Bereitstellung des Themas, für das stets offene Ohr bei Problemen und Fragen und für ihre Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Bei Prof. Dr. S. vom Dahl, Klinik für Gastroenterologie am Uniklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

Prof. Dr. R. Krämer, Institut für Biochemie der Universität zu Köln, bin ich sehr dankbar für die Möglichkeit, am Institut für Biochemie der Universität zu Köln die HPLC-Messungen durchführen zu können.

Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Labisch, MA, danke ich für seine Anregung zur Beschäftigung mit der Geschichte der Entdecker des Harnstoffzyklus.

Ich bedanke mich auch bei Daniela Kruse für ihre Hilfestellungen bei der Durchführung der HPLC-Messungen.

Sonja Gründel möchte ich für ihre Anleitungen, für ihre vielen Anregungen und unzähligen praktischen Tipps bei der Durchführung des experimentellen Teils und für die nette Atmosphäre im Labor danken.

Beate Kallus und Dietmar Jahnke danke ich für die Durchführung der Leberperfusionen.

Außerdem danke ich ganz herzlich Bettina und Magdalena, die viel Familienzeit abgegeben und mich in den Frustrationsphasen aufgemuntert haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Gereon Böll
Geburtstag und -ort 25.04.1960 in Krefeld

Schulbildung

1966 - 1970 Grundschule
1970 - 1979 Fichte-Gymnasium in Krefeld, Abitur

Beruflicher Werdegang

1979 - April 1981 Tätigkeit als freier Mitarbeiter der Rheinischen Post Krefeld
1981 - 1985 Studium der Philosophie an der Freien Universität Berlin
Okt. 1985 - März 1988 Schreinerlehre, Gesellenprüfung
April 1988 - Feb. 1993 Tätigkeit als Schreiner Geselle
Okt. 1991 - Jan. 1992 Zwischenzeitliche Tätigkeit in rumänischen Kinderheimen im Rahmen eines Hilfsprogrammes des Arbeiter-Samariter-Bundes
April 1993 Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Okt. 1997 Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Dr. S. Soboll, Institut für Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Okt. 1998 - Sep. 1999 Praktisches Jahr
Nov. 1999 3. Staatsexamen
April - Okt. 2000 Arzt im Praktikum, Medizinische Klinik, Kreiskrankenhaus Grevenbroich
Nov. 2000 - Okt. 2001 Arzt im Praktikum, Innere Medizin, Martinus-Krankenhaus Langenfeld
Nov. 2001 - Jan. 2002 Fertigstellung der Dissertation
seit Feb. 2002 Assistenzarzt, Medizinische Klinik, EN-Süd-Klinikum Schwelm

Verteilung von Ornithin und Citrullin in Mitochondrien und Cytosol der Rattenleber – Implikationen für den mitochondrialen Transport

Gereon Böll

Der Transport von Ornithin und Citrullin über die innere Mitochondrienmembran spielt eine wichtige Rolle in mehreren Stoffwechselwegen, insbesondere im Harnstoffzyklus und bei der Ornithin-Aminotransferase-Reaktion. Die subzelluläre Verteilung der Metabolite kann Hinweise auf die Transportmodalitäten liefern.

In dieser Arbeit wurde daher die mitochondrial-cytosolische Verteilung von Ornithin und Citrullin in der isoliert perfundierten Rattenleber ermittelt. Der metabolische Status von Lebern gefütterter Ratten wurde durch hämoglobinfreie Perfusion und anschließenden Frierstopp konserviert. Mit der nichtwässrigen Fraktionierung wurde eine Auftrennung der Zellkompartimente vorgenommen. Mit verschiedenen Enzymtests und der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) wurden die Gehalte von Protein, Ornithin und Citrullin im Cytosol und in den Mitochondrien bestimmt und deren Konzentrationen und Gradienten berechnet.

In den Lebern gefütterter Ratten beträgt die intramitochondriale Ornithinkonzentration 0,73 mM und die intramitochondriale Citrullinkonzentration 0,62 mM. Im Cytosol liegen sowohl Ornithin als auch Citrullin in einer Konzentration von ca. 0,19 mM vor. Damit ergibt sich für beide Metabolite ein mitochondrial-cytosolischer Konzentrationsgradient zwischen 3,2 und 3,9.

Der Konzentrationsgradient des Citrullins reicht aus, um einen separaten Citrullinexport anzutreiben. Der Ornithingradient steht jedoch dem geforderten Ornithinimport entgegen. Auch der H^+ -Export verläuft gegen den Protonengradienten. Die vorgefundene Verteilung liefert also keine treibende Kraft für den zuvor postulierten Ornithin/(Citrullin + H^+)-Austausch.

Es ergeben sich drei Hypothesen über den Antrieb des Transportes: Erstens ist aufgrund einer Bindung des Ornithins an intramitochondriale Strukturen der Ornithingradient in Wirklichkeit flacher als gemessen, so dass der Citrullingradient zum Antrieb des Antiportes ausreicht. Zweitens unterstützen unterschiedliche Metabolitaffinitäten des Carriers den Transport in physiologischer Richtung. Hinzu kommt drittens eine schnelle Metabolisierung des mitochondrialen Ornithins durch die Ornithin-Aminotransferase, was einen entsprechenden Import fördert.