

Interacties van cadmium met het ionentransport in de nier

Ann SWIJSEN

promotor :
dr. Danny JANS

Eindverhandeling voorgedragen tot het bekomen van de graad
Master in de biomedische wetenschappen afstudeerrichting
klinische en moleculaire wetenschappen



Inhoudsopgave

Lijst met afkortingen	ii
Lijst met figuren.....	iv
Lijst met tabellen.....	v
Dankwoord.....	vi
Samenvatting.....	vii
Inleiding	1
1 Cadmium: een algemeen beeld	1
1.1 Toxiciteit van cadmium	2
1.1.1 Blootstellings- of expositiefase	2
1.1.2 Toxicokinetische fase	2
1.1.3 Toxicodynamische fase	4
1.2 De nier: het belangrijkste doelwitorgaan van cadmium	4
1.2.1 Cadmiumopname door epitheliale tubuluscellen: de transportmechanismen	5
1.2.2 Mechanismen van cadmiumtoxiciteit in epitheliale tubuluscellen.....	5
2 SGLT: de Na ⁺ /glucose co-transporter	7
2.1 Fysiologische rol van SGLT in de nier	7
2.2 Structurele aspecten van SGLT	8
2.3 Functionele eigenschappen van SGLT	8
3 ENaC: het epitheliaal Na ⁺ kanaal	9
3.1 Fysiologische rol van ENaC in de nier	9
3.2 Structurele aspecten van ENaC	10
3.3 Functionele eigenschappen van ENaC	10
4 De <i>Xenopus laevis</i> oöcyt als expressiesysteem.....	12
4.1 Morfologie en ontwikkeling van de oöcyt.....	12
4.2 Bio-elektrische eigenschappen van de oöcyt.....	13
4.3 De oöcyt aan het werk	13
4.4 Endogene ionkanalen en transporters	14
5 Doel van het onderzoek.....	15
Materialen en methoden	16
1 Isolatie van de oöcyten.....	16
2 Behandeling en cRNA-injectie van geïsoleerde oöcyten.....	17
3 Elektrofysiologische metingen: ‘Two micro-electrode voltage clamp’	18
3.1 Basisprincipe van de TEVC	18
3.2 Toepassing van de TEVC.....	20
4 Oplossingen.....	21
5 RNA-isolatie en cDNA-synthese	22

6	PCR amplicatie van het compleet SGLT2 cDNA	23
7	Data-analyse	24
Resultaten.....		25
1	Optimalisatie van de TEVC opstelling.....	25
2	Eigenschappen van niet-geïnjecteerde oöcyten.....	27
2.1	Fundamentele elektrofysiologische eigenschappen van niet-geïnjecteerde oöcyten.....	27
2.2	Ca ²⁺ -geïnactiveerd Cl kanaal in Xenopus laevis oöcyten	28
3	Eigenschappen van rENaC-geïnjecteerde oöcyten	29
3.1	Fundamentele elektrofysiologische eigenschappen van rENaC-geïnjecteerde oöcyten..	29
3.2	Invloed van cadmium op rENaC	32
4	Amplificatie van compleet SGLT2: optimalisatie van de PCR voorwaarden	34
Discussie		37
Referenties		42
Appendices.....		45

Lijst met afkortingen

α -MDG	α -methyl-D-glucoside
CaIC	Ca ²⁺ -geïnactiveerd Cl ⁻ kanaal
cDNA	complementair DNA
C _m	capaciteit van de oöcytmembraan
cRNA	coderend RNA
DEG	degenerine
DMT1	<i>divalent metal transporter 1</i>
dNTP	deoxyribonucleotide trifosfaat
DSP	digital signal processor
ECaC	epitheliaal Ca ²⁺ kanaal
EGTA	ethylene glycol-bis-(b-amino-ethylether) N,N,N',N'-tetra-azijnzuur
ENaC	epitheliaal Na ⁺ kanaal
E _{rev}	omkeerpotentiaal
GITC	guanidine isothiocyanaat
GLUT	glucosetransporter
GSH	glutathion
hCG	humaan chorion gonadotrofine
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -ethanesulfonzuur
I	stroom
I _m	ionaire membraanstroom
K _{0.5}	affiniteitswaarde
K _m	Michaëlis-Menten constante
K _i	inhibitorconstante
mRNA	messenger RNA
MT	metallothioneïne
NMDG	<i>N</i> -methyl-D-glucamine
ORi	oöcyt Ringer oplossing
PCR	polymerase chain reaction
PHA-1	pseudohypoaldosteronisme type 1
PLC	fosfolipase C
rENaC	rat epitheliaal Na ⁺ kanaal

R	elektische weerstand
R_m	elektrische weerstand van de oöcytmembraan
ROMK	<i>renal outer medullary K⁺ channel</i>
ROS	reactieve zuurstofspecies
SCNN1A	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha
SCNN1B	sodium channel, nonvoltage-gated 1 beta
SCNN1G	sodium channel, nonvoltage-gated 1 gamma
SGLT1	Na ⁺ /glucose co-transporter type 1
SGLT2	Na ⁺ /glucose co-transporter type 2
SLCA1	solute carrier family 5 (Na ⁺ /glucose co-transporter), member 1
SLCA2	solute carrier family 5 (Na ⁺ /glucose co-transporter), member 2
TMH	transmembranaire α -helix
TEVC	two micro-electrode voltage clamp
V_c	clamppotentiaal
V_m	membraanpotentiaal

Lijst met figuren

<u><i>Figuur 1</i></u>	De aminozuursequentie en de secundaire structuur van humaan SGLT2	8
<u><i>Figuur 2</i></u>	Structuur van ENaC en situering in de celmembraan	10
<u><i>Figuur 3</i></u>	(a) Chemische structuur van amiloride (b) Structureel model voor de extracellulaire pre-M2 regio van α -ENaC	11
<u><i>Figuur 4</i></u>	Schematische voorstelling van de manieren waarop exogene membraanproteïnen tot expressie kunnen gebracht worden in <i>Xenopus laevis</i> oöcyten	14
<u><i>Figuur 5</i></u>	Schematische voorstelling van de TEVC opstelling en het equivalent elektrisch circuit	19
<u><i>Figuur 6</i></u>	Grafische weergave van de meting van potentiaalverschillen tussen de glazen capillairelektrode en de badelektrode	25
<u><i>Figuur 7</i></u>	Typisch verloop van de capaciteit (C_m), de stroom (I_m) en de conductantie (G_m) van niet-geïnjecteerde oöcyten	27
<u><i>Figuur 8</i></u>	Invloed van extracellulair Ca^{2+} op de capaciteit (C_m), de stroom (I_m) en de conductantie van niet-geïnjecteerde oöcyten	28
<u><i>Figuur 9</i></u>	Het verloop van de stroom (I_m) en de conductantie (G_m) van rENaC-geïnjecteerde Oöcyten op dag 1 (a), dag 2 (c) en dag 3 (e) na injectie. De IV curves op dag 1 (b), dag 2 (d) en dag 3 (f) na rENaC injectie	31
<u><i>Figuur 10</i></u>	Het effect van cadmium op rENaC	33
<u><i>Figuur 11</i></u>	IV curves van niet-geïnjecteerde oöcyten bij aan- en afwezigheid van 2.5 mM $CdCl_2$	33
<u><i>Figuur 12</i></u>	Resultaten van PCR's met primerset 1 bestaande uit een forward primer met sequentie (5'-ATAGAATTCGCCCATGGAGCAAC-3') en een reverse primer met sequentie (5'-GTAAGCTTTTATGCATAG-3')	36

Lijst met tabellen

<u>Tabel 1</u>	Instellingen van de puller bij het vervaardigen van injectietips/meetelektroden uit borosilicaat glascapillairen	17
<u>Tabel 2</u>	Samenstelling van de oplossingen die gebruikt werden bij experimenten met <i>Xenopus laevis</i> oöcyten	21
<u>Tabel 3</u>	Potentiaalverschillen (ΔV in mV) tussen de glazen capillairelektrode en de te evalueren elektrode, die ofwel vervaardigd is op basis van een agarbrug in 3 M KCl ofwel bestaat als een Ag/AgCl pellet	26
<u>Tabel 4</u>	Rustmembraanpotentialen van niet-geïnjecteerde en rENaC-geïnjecteerde oöcyten	29
<u>Tabel 5</u>	Omkeerpotentialen (E_{rev}) van de amiloride-gevoelige stromen	32
<u>Tabel 6</u>	PCR condities voor de amplificatie van het compleet SGLT2 cDNA	35

Dankwoord

Aan het einde van mijn stage zou ik graag enkele mensen bedanken die een belangrijke bijdrage leverden bij het tot stand komen van deze thesis.

Vooreerst wil ik mijn promotor, dr. Danny Jans, vermelden. Tijdens de stageperiode stond hij steeds klaar om mijn vragen te beantwoorden en mij te begeleiden bij het onderzoek. Daarnaast wil ik hem ook bedanken voor het kritisch nalezen van de verschillende versies van mijn thesis.

Vervolgens gaat mijn dank uit naar mijn tweede lezer, Prof. dr. Emmy Van Kerkhove, voor de tijd die ze besteed heeft aan het lezen en het beoordelen van mijn thesis.

Daniel Janssen dank ik voor zijn enthousiaste hulp bij de isolatie van de oöcyten en de PCR's.

Ook ben ik Prof. dr. Willy Van Driessche dankbaar voor zijn bereidwilligheid om delen van mijn thesis na te lezen.

Ik ben alle leden van de afdeling fysiologie dank verschuldigd voor de aangename werksfeer. Iedereen stond steeds klaar om mijn vragen te beantwoorden en hulp te bieden in geval van problemen.

Mijn medestudenten Debby, Kim, Mieke en Nick mag ik zeker niet vergeten. Zij zorgden voor ontspanning en een humoristische noot tussen het drukke labo- en schrijfwerk.

Tot slot ben ik mijn ouders dankbaar voor hun steun tijdens mijn stageperiode en mijn ganse opleiding. Ik dank hen dat ze deze studie mogelijk gemaakt hebben.

Samenvatting

Chronische blootstelling aan cadmium door inname van gecontamineerd voedsel en water of door inhalatie van cadmiumbevattend stof leidt uiteindelijk tot accumulatie van dit niet-essentiële zware metaal in de nier. Cadmium induceert nefropathie, die gepaard gaat met een verstoorde reabsorptie en secretie ter hoogte van de renale tubuli. Tubulaire schade manifesteert zich via glucosurie, aminoacidurie, fosfaturie, hypercalciurie en proteïnurie, vergelijkbaar met het Toni-Debré-Fanconi syndroom. De mechanismen van cadmiumtoxiciteit in de renale tubulaire epitheelcellen zijn nog niet volledig opgehelderd. Verscheidene studies suggereren het optreden van directe interacties tussen cadmium en renale ionentransportsystemen.

Dit stageproject beoogt de analyse van de directe invloed van cadmium op specifieke ionentransportsystemen in de apicale membraan van de distale en de proximale tubuli. In een eerste luik van het project wordt het epitheliaal Na^+ kanaal van de rat (rENaC) tot expressie gebracht in *Xenopus laevis* oöcyten. De functionaliteit en activiteit van rENaC wordt geëvalueerd met behulp van de ‘two micro-electrode voltage clamp’ (TEVC) techniek. De invloed van cadmium op rENaC wordt getest door toevoeging van CdCl_2 aan de extracellulaire oplossing in verschillende eindconcentraties. In een tweede deel van het project wordt er beoogd het volledig mRNA van de renale Na^+ /glucose cotransporter (SGLT2) van de muis te bekomen. Totaal RNA, geïsoleerd uit de corticale delen van muizenieren, fungeert als uitgangsmateriaal voor de cDNA synthese. Vervolgens wordt er met behulp van PCR en SGLT2-specifieke primers geprobeerd het volledige SGLT2 cDNA te amplificeren.

Elektrofysiologische metingen aan oöcyten die rENaC tot expressie brengen, tonen aan dat het kanaal gereguleerd wordt door zowel intracellulair natrium als extracellulair cadmium. Nochtans hebben lage CdCl_2 concentraties (0.010, 0.100 en 1 mM) geen invloed op rENaC, maar wordt een verhoogde activiteit van rENaC slechts geregistreerd vanaf een CdCl_2 concentratie van 2.5 mM. Toxicologische effecten van cadmium ter hoogte van ENaC zijn bijgevolg van ondergeschikt belang. Cadmium kan wel dienen om de structurele eigenschappen van ENaC te analyseren.

Inleiding

Dit stageproject maakt deel uit van een lopend onderzoek aan de UHasselt dat de effecten van cadmium op de nier bestudeert. Cadmium is een niet-essentieel zwaar metaal dat zowel voor mens als dier toxisch is. Humane en experimentele studies met dieren tonen aan dat de nadelige effecten van cadmium vooral ter hoogte van de nier tot uiting komen. Cadmium-geassocieerde nefropathie gaat gepaard met een verstoorde reabsorptie en secretie ter hoogte van de renale tubuli. Deze tubulaire schade komt klinisch tot uiting via glucosurie, aminoacidurie, fosfaturie, hypercalciurie en proteïnurie, vergelijkbaar met het Toni-Debré-Fanconi syndroom. De symptomen suggereren dat cadmium interageert met de transportsystemen in de apicale membraan van de niertubulus. Gedurende dit stageproject worden daarom de directe effecten van cadmium op ionenansportsystemen in de proximale en distale niertubulus bestudeerd. De *Xenopus laevis* oöcyt wordt hierbij gebruikt als heteroloog expressiesysteem voor de renale ionentransportsystemen.

In dit inleidend hoofdstuk wordt eerst een profiel van cadmium geschetst: hoe wordt het opgenomen in het lichaam en hoe kan het renale tubulaire dysfunctie veroorzaken. Voorts worden twee belangrijke ionentransportsystemen belicht, die een mogelijk doelwit van cadmium zijn. Het betreft hier de Na^+ /glucose co-transporter in de proximale tubulus en het epitheliaal Na^+ kanaal in de distale tubulus. Tot slot wordt de *Xenopus laevis* oöcyt, die als heteroloog expressiesysteem gebruikt wordt, uitgebreid toegelicht.

1 Cadmium: een algemeen beeld

Cadmium is een zwaar metaal met een atomair gewicht van 112.41 g/mol. In tegenstelling tot andere zware metalen zoals zink, ijzer en koper is cadmium geen essentieel micronutriënt, maar vertoont het metaal toxische karakteristieken (1,2). De uitgebreide verspreiding van cadmium in het milieu heeft de interesse in de toxiciteit en de biologische effecten ervan sterk doen toenemen. De aanwezigheid van cadmium in de leefomgeving is voornamelijk het gevolg van industriële en agriculturele activiteiten, zoals de verwerking van zinkertsen en het gebruik van fosfaatmeststoffen. Natuurlijke processen zoals bosbranden of vulkaanuitbarstingen dragen slechts voor een klein deel bij aan de cadmiumverspreiding. Meestal wordt cadmium in het milieu aangetroffen als tweewaardig kation in verbindingen met klassieke anionen en vormt aldus anorganische zouten, zoals cadmiumoxide (CdO), cadmiumchloride (CdCl_2) en cadmiumsulfaat (CdSO_4) (3).

1.1 Toxiciteit van cadmium

Op niveau van het doelorganisme kan de toxiciteit van zware metalen, zoals cadmium, weergegeven worden in drie fasen: de blootstellings- of expositiefase, de toxicokinetische fase en de toxicodynamische fase.

1.1.1 Blootstellings- of expositiefase

Na blootstelling kan cadmium worden opgenomen via het respiratoir of het gastro-intestinaal stelsel. CdCl_2 lost goed op in water en is de voornaamste vorm van cadmium geassocieerd met orale inname. CdO daarentegen is hoofdzakelijk geassocieerd met opname via de luchtwegen. Opname via de huid is verwaarloosbaar, hoewel kleine hoeveelheden cadmium na langdurige blootstelling percutaan kunnen opgenomen worden (2). Inhalatie komt hoofdzakelijk voor in de werkomgeving door inademing van cadmiumpartikels in de lucht. Sigarettenrook vormt de belangrijkste bron voor het inademen van cadmium. Verontreinigd voedsel en drinkwater zijn andere mogelijke bronnen van cadmium. Organisch vlees (lever en nieren), vis, granen en graanproducten bevatten de hoogste cadmiumconcentraties (2,3).

1.1.2 Toxicokinetische fase

Epitheelcellen van de respiratoire en de gastro-intestinale tractus kunnen cadmium absorberen. In het ademhalingsstelsel verloopt de absorptie van cadmium efficiënter dan in het maagdarmsstelsel (2). De efficiëntie van de pulmonale absorptie wordt beïnvloed door de oplosbaarheid en de grootte van de cadmium-bevattende deeltjes. Een fractie van de geïnhaleerde partikels wordt opnieuw uitgeademd; de rest wordt afgezet in de luchtwegen of longen. Grote partikels (>10 picometer, pm) worden afgezet in de bovenste luchtwegen, terwijl kleine partikels (~ 0.1 pm) kunnen doordringen tot in de alveoli en aldaar geabsorbeerd worden (3). Een significant deel van het geïnhaleerde cadmium wordt via mucociliaire klaring naar het maagdarmsstelsel getransporteerd (2). 40-60% van het geïnhaleerde cadmium migreert via het pulmonale epitheel naar de systeemcirculatie. Cadmiumabsorptie uit sigaretten blijkt hoger te zijn dan absorptie uit cadmiumaerosolen. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de kleine diameter van de cadmium-bevattende partikels in sigarettendamp en bijgevolg de hoge depositie ervan in de alveolen (3).

Absorptie van cadmium uit de darm verloopt in twee fasen: eerst een opname vanuit het darmlumen naar de mucosa en vervolgens een transfer vanuit de mucosa naar de circulatie. Een mogelijke kandidaat voor de intestinale opname van cadmium is de *divalent metal transporter 1* (DMT1), een proton-gekoppelde membraanpotentialgevoelige transporter,

aanwezig in de lumenale plasmamembraan van enterocyten. DMT1 kan het transport van een groot aantal metaalionen zoals Cd^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} en Pt^{2+} mediëren (2). De efficiëntie van cadmiumabsorptie uit de darm wordt beïnvloed door de interacties van Cd^{2+} met proteïnen en andere kationen. De aanwezigheid van divalente en trivalente kationen (calcium, chroom, magnesium, zink) verlaagt de absorptie van cadmium, waarschijnlijk door een niet-specifiek effect op de ladingsverdeling ter hoogte van de intestinale borstelzooommembraan. De absorptie van cadmium is toegenomen bij een deficiëntie aan ijzer en calcium alsook bij een verhoogd vetgehalte in de voeding. Het grootste deel van de opgenomen cadmium passeert de gastrointestinale tractus zonder geabsorbeerd te worden; slechts 5 % cadmium wordt daadwerkelijk geabsorbeerd (3).

Na absorptie door het long- of darmepitheel wordt cadmium in het bloed getransporteerd door rode bloedcellen en proteïnen zoals albumine (3). Een kleine fractie van het geabsorbeerde cadmium wordt niet gebonden en is in zijn vrije geïoniseerde vorm (Cd^{2+}) aanwezig in het plasma (4). Cadmium wordt wijd verspreid doorheen het lichaam; het grootste deel (~50-70%) wordt afgezet in de lever en de nieren. Weefselverdeling en -retentie kunnen significant verschillen met de leeftijd (3).

Cadmium ondergaat geen directe metabole omzettingen zoals oxidatie, reductie of alkylation. Het zware metaal heeft wel een hoge affiniteit voor anionische groepen (vooral sulfhydrylgroepen) in moleculen zoals albumine, metallothioneïne (MT) en glutathion (GSH) (3). De vrije geïoniseerde vorm van zware metalen stimuleert de synthese van MT en GSH in lever en nieren. MTs beschermen cellen tegen toxiciteit geassocieerd met zware metalen (1,5).

In de lever kan cadmium gebonden worden aan het cysteïne-bevattende tripeptide GSH en alzo geëxcreteerd worden via de gal (1). Voor de toxicokinetiek van cadmium zijn de interacties met MT van groter belang. MT, een proteïne van 61 aminozuren, kan door de aanwezigheid van 20 cysteïneresidues tot zeven cadmiumionen binden (3,5). Cadmium-metallothioneïne -complexen (Cd^{2+} -MT) kunnen gevormd worden in de lever. Deze complexen worden deels opgeslagen in de hepatocyten en deels vrijgegeven door de lever en via het bloed naar de nieren getransporteerd (1). Cd^{2+} -MT verdwijnt snel uit de bloedbaan via glomerulaire filtratie, maar wordt door de cellen van de proximale tubulus gereabsorbeerd vanuit het glomerulaire filtraat via receptor-gemedieerde endocytose (zie verder in de sectie 'Cadmiumopname door epitheliale tubuluscellen: de transportmechanismen') (6). In de tubulaire lysosomen wordt Cd^{2+} -MT gedissociëerd tot Cd^{2+} en MT. Het vrijgezette cadmium induceert in het cytosol van de proximale tubuluscellen de MT synthese, maar kan tevens gebonden worden aan

gereabsorbeerd MT. In de nier kunnen gevormde Cd^{2+} -MTs opgestapeld worden. Het MT metabolisme in de lever en de nier is relatief onafhankelijk van de blootstellingsroute (3).

Het merendeel cadmium, dat ingeslikt wordt of via mucociliaire klaring naar het gastrointestinaal stelsel getransporteerd wordt, wordt niet door het lichaam geresorbeerd, maar geëxcreteerd via de feces. Geabsorbeerde cadmium wordt zeer traag uitgescheiden; hierbij is de bijdrage van de urinaire en de fecale excretie ongeveer gelijk. Halfwaardetijden voor cadmium in muizen, ratten, konijnen en apen variëren van enkele maanden tot enkele jaren. In het menselijk lichaam wordt cadmium hoofdzakelijk teruggevonden in lever en nieren, maar er zijn ook kleinere hoeveelheden aanwezig in spier, huid en bot. De halfwaardetijd van cadmium in de menselijke nier bedraagt tussen 6 en 38 jaar en in de lever tussen 4 en 19 jaar (3).

1.1.3 Toxicodynamische fase

Epidemiologische studies associëren prostaat- en longkankers met blootstelling aan cadmium. Gebaseerd op deze epidemiologische studies en op experimentele studies bij dieren heeft het *International Agency for Research on Cancer* (IARC) cadmium geclassificeerd als een carcinogeen van categorie I. Naast carcinogene effecten induceert cadmium in verscheidene weefsels zoals nieren, lever, long, pancreas, testis, placenta en bot ook directe cytotoxische effecten, die kunnen leiden tot necrose en/of apoptose. Cadmium-geïnduceerde cellulaire schade is afhankelijk van de dosis, de blootstellingsroute en de blootstellingsduur. Zowel humane studies als experimentele studies bij dieren tonen aan dat de nadelige effecten van cadmium vooral ter hoogte van de nieren tot uiting komen (2,7).

1.2 De nier: het belangrijkste doelwitorgaan van cadmium

Nefrotoxiciteit ten gevolge van blootstelling aan cadmium komt voor bij 7 % van de bevolking (1). Cadmium-geassocieerde nierschade gaat gepaard met een verstoorde reabsorptie en secretie ter hoogte van de renale tubuli. Klinisch manifesteert deze tubulaire schade zich via glucosurie, aminoacidurie, fosfaturie, hypercalciurie en proteïnurie, vergelijkbaar met het Toni-Debré-Fanconi syndroom (1,4,8). Hoe cadmium de transportfunctie van de nier verstoort, is nog niet volledig opgehelderd. Het blijkt dat nefrotoxische effecten optreden wanneer de concentratie vrij cadmium (Cd^{2+}) in de niercortex de bindingscapaciteit van beschermende proteïnen zoals MT overschrijdt. De kritieke Cd^{2+} concentratie waarbij renale tubulaire dysfunctie optreedt, bedraagt 200 $\mu\text{g/g}$ nierweefsel ('wet tissue') (1). Epitheliale tubuluscellen beschikken over verschillende transportmechanismen

die kunnen instaan voor de opname van cadmium uit het lumen. Na opname zou cadmium via vorming van vrije radicalen het tubulair transport van ionen en nutriënten kunnen verstoren. Anderzijds is het ook mogelijk dat cadmium directe interacties aangaat met de transportsystemen van epitheliale tubuluscellen.

1.2.1 Cadmiumopname door epitheliale tubuluscellen: de transportmechanismen

Ter hoogte van de glomerulus worden zowel de cadmiumcomplexen (Cd^{2+} -MT, Cd^{2+} -GSH en Cd^{2+} -albumine) als de vrije geïoniseerde vorm van cadmium afgefilterd. De *zinc transporter 1* (ZnT1), de *stretch-activated cation channels* (SAC) en de *divalent metal transporter 1* (DMT1) worden vermeld als mogelijke kandidaten voor de opname van de vrije geïoniseerde vorm van cadmium (Cd^{2+}) in de proximale tubulus. Hoewel de proximale tubulus de voornaamste plaats van cadmiumreabsorptie is, vertonen lager gelegen delen van het nefron ook een hoge permeabiliteit voor essentiële en toxische metalen. Er is aangetoond dat Cd^{2+} ook geabsorbeerd wordt ter hoogte van de lus van Henle en het terminale segment van het nefron. Cd^{2+} zou in de lus van Henle paracellulair getransporteerd worden. Transcellulair transport via DMT1 is eveneens mogelijk (9).

Cd^{2+} -MT en waarschijnlijk ook Cd^{2+} -albumine worden via receptor-gemedieerde endocytose opgenomen door de proximale tubuluscellen (6). Cd^{2+} -MT bindt vermoedelijk aan megaline en cubiline, hetgeen gevolgd wordt door endocytose van het megaline- Cd^{2+} -MT complex. In de tubulaire lysosomen wordt het complex gedegradeerd zodat Cd^{2+} in het cytosol wordt vrijgezet (1). Recente bevindingen tonen aan dat renale opname en accumulatie van cadmium toeneemt na toediening in combinatie met cysteïne of GSH. Dit duidt aan dat naast endocytose nog een bijkomend mechanisme verantwoordelijk is voor de luminale absorptie van cadmium in het nefron. De Na^+ -aminozuur cotransporter is mogelijk betrokken (10).

1.2.2 Mechanismen van cadmiumtoxiciteit in epitheliale tubuluscellen

Oxidatieve stress

Cadmium-geïnduceerde renale dysfunctie zou kunnen veroorzaakt worden door oxidatieve stress. Cadmium is geen Fentonmetaal en kan bijgevolg niet alleen verantwoordelijk zijn voor de productie van reactieve zuurstofspecies (ROS). Cadmium geeft wel aanleiding tot de vorming van hydroxylradicalen in de aanwezigheid van MT dat wel Fentonmetalen (koper en ijzer) bevat. Dit suggereert dat de endogene redox-actieve metalen gebonden aan MT vervangen worden door cadmium. De vrijgezette Fentonmetalen zijn verantwoordelijk voor

de vorming van ROS. Een verlaagde beschikbaarheid van intracellulaire endogene antioxidantia zoals GSH kan ook leiden tot ROS productie (1).

Cd^{2+} -geïnduceerde ROS kunnen schade toebrengen aan belangrijke organellen zoals mitochondriën en aanleiding geven tot DNA-strengbreuken, lipidenperoxidatie en productie van oxidatief gemodificeerde proteïnen. Dit alles leidt tot een verstoord cellulair functioneren. Indien de cellulaire verdedigingsmechanismen tegen oxidatieve stress onvoldoende zijn, treedt celdood op via apoptose of via necrose. Onderzoek heeft uitgewezen dat lage micromolaire Cd^{2+} -concentraties apoptose van de proximale tubulaire cellen induceren, terwijl hoge Cd^{2+} -concentraties ook necrose induceren (1).

Cadmium kan indirect, via de vorming van ROS, interfereren met het ionentransport in de nier. ROS induceren structurele veranderingen van essentiële cellulaire proteïnen, ook van membraantransportproteïnen. Om toxische accumulatie te verhinderen, verhogen cellen de degradatie van oxidatief gemodificeerde proteïnen (1). In proximale tubuluscellen van ratten verhoogt Cd^{2+} -gedieerde oxidatieve stress de degradatie van de α -subunit van het Na^+ - K^+ -ATPase via het ubiquitine-proteasoom complex en via endo-lysosomale proteasen. Het Na^+ - K^+ -ATPase verwijderd Na^+ uit de cel via de basolaterale membraan en onderhoudt een gunstige elektrochemische gradiënt voor het binnentreden van Na^+ via de apicale membraan. Bijgevolg zullen transepitheliale fluxen van ionen, nutriënten, metabolieten en xenobiotica, getransporteerd via Na^+ -afhankelijke transporters, beïnvloed worden door onvoldoende activiteit van het Na^+ - K^+ -ATPase (11).

Naast de indirecte effecten van cadmium op het ionentransport, worden er ook directe interacties tussen cadmium en renale ionentransportsystemen waargenomen.

Acute interacties tussen cadmium en ionentransportsystemen

Studies tonen aan dat cadmium het transport van glucose, fosfaat en aminozuren ter hoogte van de proximale tubulus kan beïnvloeden via acute interacties tussen cadmium en de betreffende ionentransportsystemen. Er wordt gesuggereerd dat deze interacties het gevolg zijn van de hoge affiniteit van cadmium voor sulfhydrylgroepen (2,4). Experimenten waarbij geïsoleerde S2 segmenten van een konijnennefron geperfundeed worden met CdCl_2 en Cd^{2+} -MT wijzen uit dat het glucose- en aminozuurtransport geïnhibeerd worden. Er wordt aangenomen dat deze inhibitie het gevolg zijn van directe interacties tussen cadmium en sulfhydrylgroepen van de Na^+ /glucose- en de Na^+ /aminozuur-cotransporters (12). Een recente studie suggereert dat cadmiumbinding aan het CXXC motief van de Na^+ /glucose co-

transporter type 1 (SGLT1) conformationele veranderingen induceert, die een partiële inhibitie van het D-glucose transport tot gevolg hebben (13).

Naast de proximale effecten vertoont cadmium ook interacties met ionkanalen ter hoogte van het terminale segment van het nefron. Onderzoeken vermelden inhiberende effecten van cadmium op het epitheliale calciumkanaal (ECaC) en het *renal outer medullary K⁺ channel* (ROMK) (4,9).

In deze thesis ligt de nadruk enerzijds op de mogelijke interacties tussen cadmium en de Na⁺/glucose co-transporter type 2 (SGLT2) in de apicale membraan van de proximale tubulus; anderzijds wordt de invloed van cadmium op het epitheliaal Na⁺ kanaal (ENaC) in de apicale membraan van de verzamelbuis nagegaan.

2 SGLT: de Na⁺/glucose co-transporter

De Na⁺/glucose co-transporters (SGLT) maken deel uit van de SLC5 familie van cotransporters. Tot deze oude genfamilie van meer dan 220 leden behoren 11 leden van het humane genoom. De 11 humane genen komen tot expressie in weefsels zoals de dunne darm, nier, hersenen, spier en schildklier. Hun functies zijn zeer heterogeen. Twee genen, SLC5A1 en SLC5A2, coderen voor respectievelijk SGLT1 en SGLT2. Beide co-transporters koppelen het transport van glucose aan het transepitheliaal Na⁺ transport en komen tot expressie in de renale cortex (14).

2.1 Fysiologische rol van SGLT in de nier

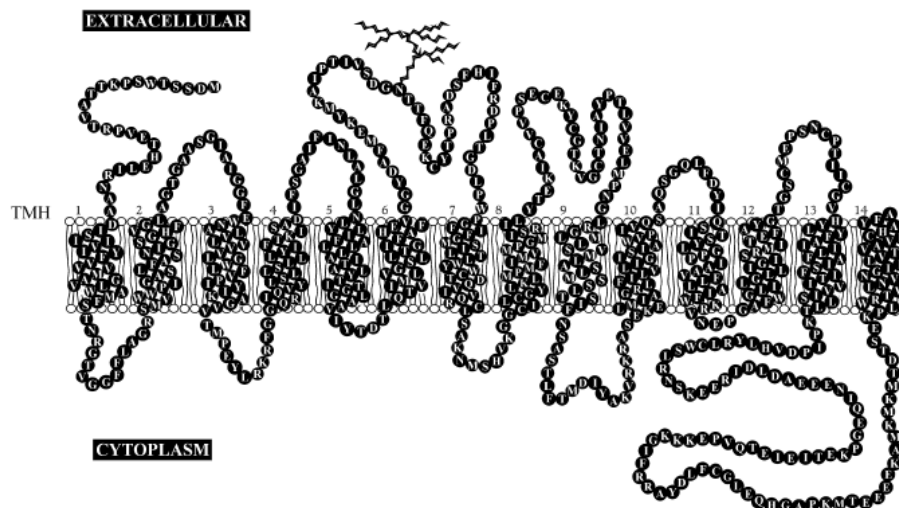
Dagelijks filteren de nieren ~180 g D-glucose uit het plasma. In normale omstandigheden wordt deze hoeveelheid D-glucose helemaal geresorbeerd in de proximale tubulus en is er geen glucose aanwezig in de urine (15).

De renale glucosereabsorptie kan gezien worden als een tweestapsproces. Het glucosetransport over de apicale membraan van de proximale tubuluscellen wordt verzorgd door SGLTs. De gunstige elektrochemische gradiënt van Na⁺, gecreëerd door de Na⁺/K⁺-ATPasen in de basolaterale membraan, doet dienst als drijvende kracht om glucose de cellen in te pompen tegen zijn concentratiegradiënt. In het eerste deel van de proximale tubulus (S1 segment) bevinden zich de SGLT2 co-transporters die door hun hoge capaciteit en lage affiniteit het glucose snel reabsorberen en de tubulaire glucoseconcentratie drastisch verlagen. De SGLT1 co-transporters in het later deel van de proximale tubulus (S3 segment) doen op basis van hun hogere affiniteit voor glucose de glucoseconcentratie in het tubulaire vocht verder dalen, maar trager omwille van hun lagere capaciteit. Gefaciliteerde

glucosetransporters (GLUTs) nemen het transport van D-glucose over de basolaterale membraan voor hun rekening. Zij transporteren glucose op een Na^+ onafhankelijke wijze de cel uit (16, 17).

2.2 Structurele aspecten van SGLT

Het humaan gen dat codeert voor SGLT1 (SLC5A1) is gelokaliseerd op chromosoom 22 q13.1, terwijl het gen coderend voor humaan SGLT2 (SLC5A2) gelegen is op chromosoom 16 p11.2. De SGLT genen coderen voor proteïnen met een gewicht van ~ 75 kDa. SGLT1 en SGLT2 bestaan respectievelijk uit 664 en 672 aminozuren. Beide proteïnen zijn voor 59 % identiek aan elkaar. SGLT1 is opgebouwd uit 14 transmembranaire α -helices (TMH) waarbij zowel de NH_2 - als de COOH -termini extracellulair gelegen zijn (figuur 1). Er wordt aangenomen dat SGLT2 dezelfde secundaire structuur heeft als SGLT1 (15).



Figuur 1: Aminozuursequentie en secundaire structuur van humaan SGLT1. Het proteïne bestaat uit 664 aminozuurresidues en omvat 14 transmembranaire helices (TMH) met extracellulaire NH_2 en COOH termini (15).

2.3 Functionele eigenschappen van SGLT

De kinetische eigenschappen en de selectiviteit van SGLT zijn bestudeerd door de transporter tot expressie te brengen in *Xenopus laevis* oöcyten. SGLT1 functioneert als een monomeer. De kinetische parameters van SGLT1 en SGLT2 zijn zeer overeenkomstig in verschillende species zoals mens, rat en konijn. Zowel SGLT1 als SGLT2 transporteren α -methyl-D-glucoside (α -MDG), een niet-gemetaboliseerd modelsubstraat, op een Na^+ afhankelijke wijze. SGLT1 en SGLT2 vertonen affiniteitswaarden ($K_{0.5}$) voor α -MDG van respectievelijk 0.4 en 2 mM. SGLT1 maakt geen onderscheid tussen het synthetische α -MDG en de natuurlijke

suikers, D-glucose en D-galactose. SGLT2 daarentegen is niet in staat om galactose efficiënt te transporteren. De Na^+ affiniteit van SGLT1 is potentiaalafhankelijk, maar bij een hyperpolariserende membraanpotentiaal (-150 mV) wordt $K_{0.5} \sim 3$ mM. SGLT2 vertoont een $K_{0.5}$ voor Na^+ van >100 mM (15). De koppelingscoëfficiënt voor Na^+ en glucose transport bedraagt 2:1 voor SGLT1 (18). Dit betekent dat er twee Na^+ ionen getransporteerd worden samen met één glucosemolecule. Voor SGLT2 bedraagt de Na^+ /glucose stoichiometrie waarschijnlijk 1:1 (15). Phlorizin is een competitieve inhibitor van beide transporters met een inhibitorconstante (K_i) van $0.2 \mu\text{M}$ voor SGLT1 en $1 \mu\text{M}$ voor SGLT2 (15).

3 ENaC: het epitheliaal Na^+ kanaal

Het epitheliaal Na^+ kanaal (ENaC) behoort tot de ENaC/degenerine (DEG) gen familie. Deze familie vertegenwoordigt een nieuwe klasse van ionkanalen, ontdekt aan het begin van jaren 1990. Leden van de ENaC/DEG familie vertonen een grote sequentiehomologie met evenwel zeer heterogene functies. De verdeling van ENaC/DEG familieleden over verscheidene weefsels, van transporterende epithelen tot exciteerbare neuronale weefsels, reflecteert de functionele verschillen (19). ENaC is gelokaliseerd in de apicale membraan van gepolariseerde epitheelcellen in de nier, het alveolair epitheel, het distaal colon en de zweetklieren. ENaC is verantwoordelijk voor vectorieel transcellulair Na^+ transport (19,20).

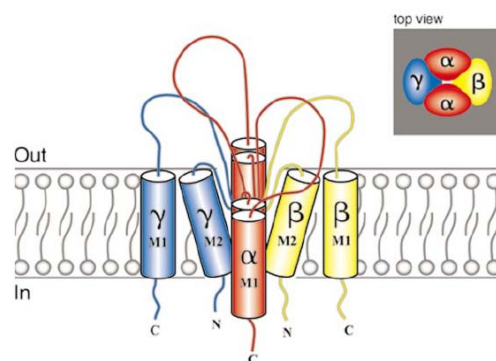
3.1 Fysiologische rol van ENaC in de nier

In de nieren komt ENaC tot expressie in de apicale membraan van de hoofdcellen van de verzamelbuis. De inwaartse elektrochemische gradiënt voor Na^+ verleent een grote drijfkracht voor het instromen van Na^+ via ENaC in de apicale membraan. De elektrochemische gradiënt wordt onderhouden door 1) de hoge K^+ permeabiliteit van de basolaterale membraan die de intracellulaire potentiaal negatief houdt en door 2) de activiteit van het Na^+ - K^+ -ATPase in de basolaterale membraan verantwoordelijk voor de actieve verwijdering van Na^+ uit de cel. ENaC-gemedieerde elektrogene Na^+ absorptie genereert een negatieve potentiaal in het tubuluslumen. Bijgevolg ontstaat er een gunstige elektrochemische drijfkracht voor K^+ secretie naar het lumen via K^+ kanalen in de apicale membraan. Bij een fysiologische vocht- en zoutbalans wordt slechts een klein deel ($<5\%$) van het gefilterde Na^+ geresorbeerd ter hoogte van het distale nefron. Na^+ reabsorptie in de distale tubulus neemt significant toe onder invloed van aldosteron en vasopressine, twee hormonen gesecreteerd in omstandigheden van dehydratie en/of zoutverlies (16,19,20). Geactiveerd transepitheliaal Na^+ transport in het distale nefron is dan essentieel voor het behoud van de zout- en vochtbalans. De hormonale

controle door aldosteron en vasopressine fungeert als een fijnregelaar van de Na^+ reabsorptie. De significantie van ENaC in de controle van de zout- en vochtbalans is aangetoond via humane genetische studies. Zeldzame genetische aandoeningen die de activiteit van ENaC verstoren, zoals pseudohypoaldosteronisme type 1 (PHA-1) en het syndroom van Liddle, gaan gepaard met een abnormale elektrolytenbalans en bloeddruk (19,20).

3.2 Structurele aspecten van ENaC

ENaC is samengesteld uit drie homologe subeenheden α , β en γ die in de membraan zijn ingebouwd met een stoichiometrie van $2\alpha:1\beta:1\gamma$. Elke subeenheid van ENaC is opgebouwd uit vier domeinen: een cytoplasmatische NH_2 -terminus, een grote extracellulaire loop, twee korte hydrofobe transmembranaire segmenten (M1 en M2) en een cytoplasmatische COOH -terminus. De drie ENaC subeenheden dragen allen bij aan de porievorming van het kanaal (figuur 2) (19,20). De aanwezigheid van de grote extracellulaire loop (~50 kDa) is een unieke eigenschap van ionkanalen die behoren tot de ENaC/DEG familie. Dit extracellulaire domein bevat een aantal glycosylatieplaatsen: 6 voor α , 12 voor β en 5 voor γ (19). De uitgebreidheid van glycosylatie bepaalt het moleculair gewicht van de ENaC subeenheden (20,21).



Figuur 2: Structuur van ENaC en situering in de celmembraan. ENaC is opgebouwd uit drie homologe subeenheden α , β , en γ die in de membraan zijn ingebouwd met een stoichiometrie van $2\alpha:1\beta:1\gamma$. Elke subeenheid bestaat uit een cytoplasmatische NH_2 -terminus, een grote extracellulaire loop, twee korte hydrofobe transmembranaire segmenten (M1 en M2) en een cytoplasmatische COOH -terminus (20).

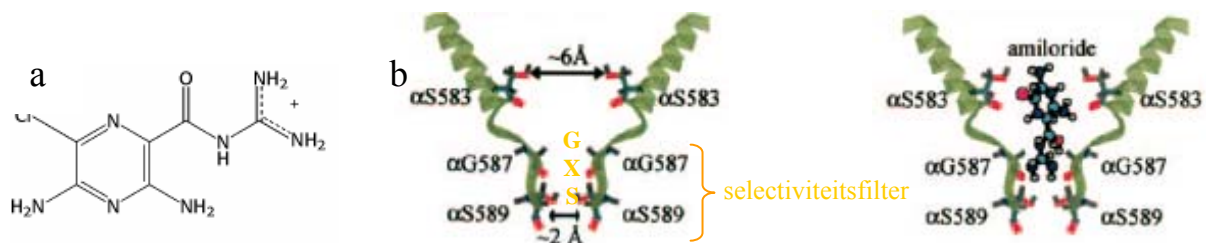
3.3 Functionele eigenschappen van ENaC

ENaC is constitutief actief in de apicale membraan van dichte epithelen. Metingen in de corticale verzamelbuis tonen aan dat ENaC gekarakteriseerd wordt door een trage kinetica met openings- en sluitingstijden van enkele seconden (19). De activering van ENaC blijkt niet potentiaalafhankelijk te zijn (21). De selectiviteitsfilter, het meest smalle deel van de kanaalporie, staat in voor de selectiviteit van ENaC voor Na^+ en Li^+ (1:2), maar weerhoudt

K^+ . Mutagenesestudies tonen aan dat de geconserveerde G/SxS sequentie gelegen in de extracellulaire pre-M2 regio van elke ENaC-subeenheid essentieel is voor ionherkenning en passage van het ion doorheen het kanaal. Recente ENaC modellen stellen voor dat de selectiviteitsfilter bestaat uit een ring gevormd door α G587, β G529, γ S541 en uit een ring van serineresidues (α S589 en homologe residues in β en γ) (19,22).

Studies tonen aan dat expressie van uitsluitend de α -subunit kleine amiloride-gevoelige stromen genereert, maar co-expressie met de β - en γ -subeenheid doet de stroom aanzienlijk toenemen (19,20,21).

ENaC stromen worden op specifieke wijze geïnhibeerd door amiloride (19,23). De K_i bij -60 mV bedraagt 0.19 μ M. Amiloride (N-amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazine-carboxamide) is opgebouwd uit een guanidine-geassocieerd met een pyrazinering (figuur 3a). Zowel de geladen guanidiumgroep als de pyrazinering blijken noodzakelijk te zijn voor de binding van amiloride aan ENaC. Recente studies tonen aan dat amiloride de externe kanaalporie van ENaC afsluit door binding aan een serineresidue van de α -subeenheid (α S583) (figuur 3b) en aan de corresponderende glycineresidues van de β - en γ -subeenheid (β G525 en γ G537). De diameter van de porie ter hoogte van positie α S583 wordt geschat op \sim 60 nm. Amiloride met een diameter van \sim 50 nm past juist in de buitenste kanaalporie (figuur 3b) (19,22).



Figuur 3: (a) Chemische structuur van amiloride; amiloride bestaat uit een guanidine geassocieerd met een pyrazinering (23). (b) Een structureel model voor de extracellulaire pre-M2 regio van de α -subeenheid van ENaC. Op het niveau van α S583 bedraagt de breedte van de porie \sim 60 nm, op het niveau van α S589 is de breedte van de porie \sim 20 nm. Amiloride bindt aan α S583 en α G587, maar niet aan α S589. Zowel de guanidinegroep als de pyrazinering zijn betrokken in de interactie tussen amiloride en ENaC (22).

ENaC inhibitie door amiloride is afhankelijk van de pH en van het transmembranair potentiaalverschil. Hyperpolarisatie blijkt amiloride-gemedieerde blokkade van ENaC te verhogen. Deze bevindingen suggereren dat de geïoniseerde vorm van amiloride actief is bij het blokkeren van ENaC (19).

4 De *Xenopus laevis* oöcyt als expressiesysteem

De *Xenopus laevis* oöcyt is een veel gebruikt heteroloog expressiesysteem voor de studie en karakterisatie van receptoren en iontransportsystemen. Gurdon *et al.* toonden als eersten aan dat de *Xenopus laevis* oöcyt kan gebruikt worden als expressiesysteem voor exogene proteïnen. Deze onderzoekers stelden vast dat microinjectie van het mRNA, dat codeert voor het humaan globine proteïne, in het cytoplasma van de oöcyten resulteerde in de synthese van humaan globine (24). Later werd aangetoond dat injectie van het corresponderend coderend DNA in de nucleus eveneens leidde tot de aanmaak van humaan globine.

4.1 Morfologie en ontwikkeling van de oöcyt

In natuurlijke omstandigheden leeft de Zuid-Afrikaanse klauwkikker, *Xenopus laevis*, in stilstaande wateren. De oöcyten worden gedeponereerd in een ongunstige omgeving en zijn waarschijnlijk omwille van deze reden zeer resistente cellen, die gemakkelijk kunnen gehanteerd worden in het laboratorium (25).

Oöcyten van de *Xenopus laevis* worden op basis van grootte en pigmentatie geclassificeerd in zes stadia. De oögenese, dit wil zeggen de ontwikkeling van stadium I naar stadium VI, duurt ongeveer 8 maanden en is asynchroon. De meest opvallende verschillen tussen stadium I en stadium VI oöcyten zijn hun grootte (respectievelijk 100 en 1300 μm) en hun pigmentatie die varieert van kleurloos tot een duidelijke polarisatie in een donkerbruine animale en een bleke roomkleurige vegetale hemisfeer. Voor de meeste elektrofysiologische, farmacologische en biochemische doeleinden worden stadium V en stadium VI oöcyten gebruikt. Stadium V oöcyten zijn 1000-1200 μm en bezitten reeds twee duidelijk afgelijnde hemisferen. Stadium VI oöcyten, zijn 1200-1300 μm en onderscheiden zich door hun niet-gepigmenteerde equatoriale band tussen beide hemisferen (25,26). De animale zijde heeft zijn kleur te danken aan de hoge melanineconcentraties onder de oppervlaktemembraan en bevat tevens de nucleus. De plasmamembraan van de oöcyt, die gevouwen is in macro- en microvilli, is omgeven door meerdere lagen cellulair en niet-cellulair materiaal. Het dichtst bij de plasmamembraan bevindt zich een niet-cellulaire fibreuze laag, de vitellinemembraan, die mechanische stabiliteit verleent aan de oöcyt. Rondom de vitellinemembraan bevinden zich een laag follicelcellen, die elektrisch in contact staat met de oöcyt via 'gap junctions', een bindweefsel laag en een epitheliale cellaag. De complete structuur, namelijk de oöcyt met de omliggende lagen, wordt de "follikel" genoemd (25,27).

Zoals bij de meeste vertebraten bevinden de meest mature oöcyten, de stadium VI oöcyten, zich aan het einde van de G₂ fase van de meiose. Zowel *in vivo* injectie met humaan chorion

gonadotrofine (hCG) als *in vitro* toediening van progesteron, induceren in *Xenopus laevis* follikels AMP-afhankelijke meiotische processen van profase I naar metafase II via een interactie met steroid receptoren ter hoogte van de plasmamembraan (25,26).

4.2 Bio-elektrische eigenschappen van de oöcyt

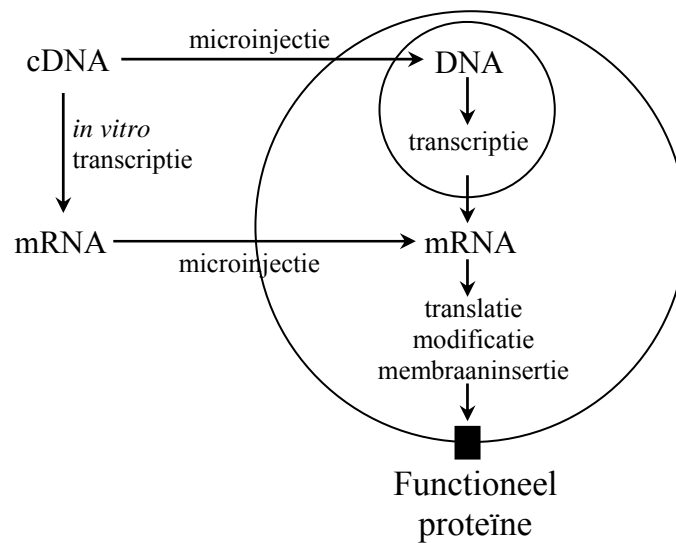
De membraan capaciteit is een directe maat voor de oppervakte van de oöcytmembraan. Capaciteitsmetingen geven waarden van 220-230 nF (26). De oöcytmembraan heeft een hoge ingangsweerstand, die verschilt tussen oöcyten van verschillende donoren en varieert van 100 k Ω tot 2 M Ω en soms zelfs meer (26). Membraanpotentialen zijn vergelijkbaar bij oöcyten van eenzelfde kikker. Bij oöcyten van verschillende donoren kunnen grote verschillen optreden, variërend van -30 tot -70 mV, zelden wordt -90 mV gezien (26). De membraanpotentiaal is meestal een K⁺ diffusiepotentiaal; toch draagt het Na⁺/K⁺-ATPase ook significant bij aan de membraanpotentiaal. Sommige onderzoeksgroepen vermelden seizoensgebonden variaties van de membraanpotentiaal (26).

Intracellulaire ionconcentraties blijken vergelijkbaar te zijn bij oöcyten van dezelfde donor, maar er zijn verschillen waarneembaar tussen oöcyten van verschillende vrouwtjes. Weber vermeldt intracellulaire Na⁺ concentraties variërend van 4 tot 23 mM, intracellulaire K⁺ concentraties van 76 tot 148 mM en intracellulaire Cl⁻ concentraties van 24 tot 62 mM (26). In een studie met Na⁺-selectieve micro-elektroden is een intracellulaire Na⁺ concentratie van 7.9 mM gemeten (28).

4.3 De oöcyt aan het werk

Tijdens de oögenese accumuleren *Xenopus laevis* oöcyten voedingsstoffen, enzymen, ribosomen, yolk, glycogeen, lipiden en maternel messenger RNA (mRNA). Elke oöcyt is volledig voorzien van alle substanties die vereist zijn tijdens het vroege ontwikkelingsstadium dat volgt op de bevruchting (25,27). Deze totale autonomie maakt van de oöcyt een onafhankelijk 'fabriekje' waarin nieuwe proteïnen kunnen gesynthetiseerd worden. De 'proteïnesynthese machine' van de oöcyt kan gestimuleerd worden door het inbrengen van vreemde genetische informatie in de cel, hetgeen leidt tot de productie van grote hoeveelheden van het vreemde proteïne. Meestal wordt coderend RNA (cRNA) *in vitro* gesynthetiseerd uit cDNA en geïnjecteerd in het cytoplasma van de oöcyt. Het is tevens mogelijk om cDNA rechtstreeks in te spuiten in de nucleus van de oöcyt. Het exogeen proteïne wordt in de oöcyt gesynthetiseerd en indien nodig geglycosyleerd, gefosforyleerd en getransporteerd naar de plasmamembraan van de oöcyt (29) (figuur 4). Indien de tot expressie

gebrachte transportsystemen een elektrogeen transport mediëren, kunnen elektrofysiologische technieken toegepast worden om de proteïnen te karakteriseren.



Figuur 4: Schematische voorstelling van de manieren waarop exogene membraanproteïnen tot expressie kunnen gebracht worden in Xenopus laevis oöcyten.

4.4 Endogene ionkanalen en transporters

In de plasmamembraan van *Xenopus laevis* oöcyten zijn slechts een kleine hoeveelheid endogene ionenkanalen en transporters aanwezig. De stromen geproduceerd door endogene transportsystemen zijn meestal klein in vergelijking met stromen voortgebracht door heteroloog tot expressie gebrachte transportsystemen. Bijgevolg kunnen exogene proteïnen duidelijk onderscheiden worden van endogene proteïnen. Dit maakt van de oöcyt een ideaal heteroloog expressiesysteem voor het onderzoek van een groot aantal transporteiwitten (26,30). Indien men gebruik maakt van het oöcyt expressiesysteem is het essentieel om te weten of de oöcyt endogeen het onderzochte transportsysteem tot expressie brengt. Kennis van de endogene ionenstromen is noodzakelijk om verkeerde interpretaties bij karakterisatie van tot expressie gebrachte transportsystemen te voorkomen. Anionkanalen zijn verantwoordelijk voor een groot deel van de ionenconductantie doorheen de plasmamembraan van de oöcyt. Hoewel anionkanalen ook permeabel zijn voor organische anionen, wordt het grootste deel van de anionenstroom gedragen door Cl^- ionen die in hoge concentraties aanwezig zijn in de cel (26). Er zijn verschillende klassen endogene K^+ kanalen beschreven in de plasmamembraan van de oöcyt. Een gemeenschappelijk kenmerk van alle endogene K^+ kanalen is hun gevoeligheid voor quinine, een specifieke blokker van ionkanalen (26). *Xenopus laevis* oöcyten zijn uitgerust met verschillende klassen Na^+ conductanties die

gelijkenissen vertonen met deze in zenuw- en spiercellen. Oöcyten bevatten Na^+ kanalen die geactiveerd worden bij depolarisatie (minimum -40 mV) van de oöcytoplasmamembraan. Naast Na^+ kanalen die gestimuleerd worden bij depolarisatie, bevat de oöcyt ook endogene Na^+ kanalen die actief zijn bij de rustmembraanpotentiaal. Deze Na^+ conductantie komt voor in de oöcyten van één op drie dieren en is zowel amiloride- als phenamil-gevoelig (26). De Na^+ /glucose cotransporter komt ook endogeen tot expressie in de plasmamembraan van *Xenopus laevis* oöcyten. Deze transporter genereert een netto transport van Na^+ en glucose naar het intracellulaire medium van de oöcyt. Dit elektrogeen transport is het meest efficiënt bij een extracellulaire glucoseconcentratie rond 3 mM en wordt geïnhibeerd door phloridzin. Het Na^+ afhankelijke glucosetransport in oöcyten vertoont grote gelijkenissen met de Na^+ /glucose cotransporter in epitheliale cellen. Net als in epitheliale cellen is de endogene Na^+ /glucose cotransporter afhankelijk van de externe concentratie van Na^+ , glucose, phlorizine en van pH. Zoals in epitheliale cellen kan de glucose-opname in oöcyten ook gestimuleerd worden door lanthanides. Zowel het elektrogeen cotransport als de inhibitie door phloridzin is afhankelijk van de membraanpotentiaal (31). Toediening van ouabaïne heeft een onmiddellijke depolarisatie van de membraanpotentiaal tot gevolg, wat wijst op een activiteit van de Na^+/K^+ ATPase (28).

5 Doel van het onderzoek

Het is gekend dat cadmium nefrotoxische effecten heeft. Toch zijn de mechanismen van cadmiumtoxiciteit in de renale tubulaire epitheelcellen nog niet volledig opgehelderd. In dit project worden de directe toxische effecten van cadmium op renale ionentransportsystemen geanalyseerd.

In een eerste luik van het project wordt de invloed van cadmium op ENaC geanalyseerd. Hierbij wordt rENaC tot expressie gebracht in *Xenopus laevis* oöcyten. Vervolgens worden functionaliteit en activiteit van rENaC geëvalueerd met behulp van de TEVC techniek, die ons toelaat veranderingen in geleidbaarheid en expressie van het ionenkanaal continu op te volgen in functie van de tijd in controle omstandigheden en tijdens blootstelling aan CdCl_2 (10 μM , 100 μM , 1 mM en 2.5 mM).

In een tweede luik van het project beogen we het bekomen van het mRNA van SGLT2. Hiervoor fungeren de corticale delen van een muizennier als uitgangsmateriaal. In een later stadium zal het de bedoeling zijn om het SGLT2 tot expressie te brengen in *Xenopus laevis* oöcyten en te analyseren met behulp van de TEVC techniek in af- en aanwezigheid van CdCl_2 .

Materialen en methoden

1 Isolatie van de oöcyten

Oöcyten worden bekomen van de Zuid-Afrikaanse klauwkikker *Xenopus laevis* (Knysna, Republic of South Africa). De dieren worden geanestheseerd door onderdompeling in een waterige benzocaïne-oplossing van 0.024 % totdat alle reflexen uitblijven (~10-15 min). De kikker wordt met de ventrale zijde naar boven gepositioneerd op een ijsbed, bedekt met bevochtigde doekjes. Via een kleine abdominale incisie (~1 cm) doorheen de huid en de spierlaag wordt een klein deel van het ovarium verwijderd en overgebracht in oöcyt Ringer oplossing (ORi; samenstelling: zie verder) (32,33). Om regeneratie van de oöcyten te verzekeren, mogen niet alle ovariumlobben verwijderd worden (27). Tijdens de ingreep wordt de kikker herhaaldelijk besprenkeld met ORi om uitdroging te verhinderen. Spierlaag en huid worden afzonderlijk gehecht met resorbeerbare Ethicon Vicryl 3-0 RB-1 plus 17.0mm 1/2c (Johnson-Johnson Intl). Na afloop van de operatie worden de kikkers zorgvuldig afgespoeld om sporen van benzocaïne te verwijderen en vervolgens worden de dieren in een waterbak geplaatst. Om verdrinking te voorkomen worden de kikkers aan de bovenzijde ondersteund, zodat de neus boven het wateroppervlak blijft en dit totdat het bewustzijn is teruggekeerd. Ter preventie van infectie verblijven de dieren de eerste vier dagen postoperatief in een aparte bak en wordt het water gedurende de eerste 24u gesupplementeerd met 20 mM NaCl en 5 µg/ml gentamycinesulfaat (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) (33). Een overzicht van de operatieve verwijdering van oöcyten bij de *Xenopus laevis* is weergegeven in appendix A1.

Tijdens de stageperiode is een alternatieve methode uitgetest om eitjes van de *Xenopus laevis* te bekomen. Kikkers werden gestimuleerd met hCG om ovulatie te induceren. Injectie van 350 eenheden hCG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in de dorsale lymfezak is voldoende om ovulatie uit te lokken (zie appendix A2). De kikkers leggen ongeveer 20 u na injectie spontaan een grote massa eitjes. Om infectie te voorkomen worden de hCG behandelde kikkers in water met 20 mM NaCl en 5 µg/ml gentamycinesulfaat gezet. Deze methode werd niet verder toegepast aangezien de hoeveelheid geproduceerde eitjes veel te groot was en dosering niet mogelijk bleek.

2 Behandeling en cRNA-injectie van geïsoleerde oöcyten

De geïsoleerde ovariumlobben worden geïncubeerd in ORi met 1 mg/ml collagenase (Serva, Heidelberg, Duitsland) op een roerplaat aan 170 toeren/min bij 21°C. Na 2 u worden de oöcyten gedurende 10 min gewassen in Ca²⁺-vrije ORi (samenstelling: zie verder) en op een roerplaat geplaatst aan 170 toeren/min bij 21°C. Deze behandeling verzekert de verwijdering van het ovariumweefsel, de folliculaire laag en de bindweefsellaag. Vervolgens worden de oöcyten 4 maal gespoeld met ORi om collagenaseresten te verwijderen. Onder een stereomicroscop (Leitz, Wetzlar, Duitsland) worden gezond uitzijende stadium V en VI oöcyten geselecteerd voor elektrofysiologische experimenten.

De cRNA-injectie van de oöcyten vindt plaats met behulp van een nanoliter pomp (Drummond Nanoject II, Broomall, PA, USA) (appendix B1). Gedurende de gehele injectieprocedure wordt met handschoenen gewerkt ter bescherming van het cRNA om RNase-contaminatie te voorkomen. Injectietips worden getrokken uit borosilicaat glascapillairen zonder binnenfilament (7^{''}Drummond #3-00-203-G/XL; Drummond Scientific company, Broomall, PA, USA) met een DMZ-Universal Puller (Zeitz-Instrumente, Martinsried (München), Duitsland; zie appendix B2). De gebruikte pullerinstellingen zijn weergegeven in tabel 1.

Tabel 1 Instellingen van de puller gebruikt bij het vervaardigen van injectietips/meetelektroden uit borosilicaat glascapillairen zonder filament.

Instelling		P(A)	P(B)
Hitte	H	500	400
Kracht primaire trek	F(tH)	040	020
Maximale trekafstand primaire trek	s(tH)	030	010
Duur verhitting na stoppen van primaire trek (niet in combinatie met s(H))	t(H)	025	100
Afstand die de puller nog onder verhitting trekt na primaire trek	s(H)	---	000
Tijd tussen einde primaire trek en start trek 1	t(F1)	---	265
Kracht van trek 1	F1	---	180
Afstand tussen startpunt trek 1 en startpunt trek 2 (overgang zonder pauze)	s(F2)	---	004
Kracht trek 2	F2	---	070
	AD	010	000

De injectietips worden langs achter met behulp van een spuit en een spinale naald (BD Spinal Needle 26 GA 3.5 IN 0.45 x 90 mm) gevuld met RNase-vrije minerale olie (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA). Een klein deel van het smalle uiteinde van het injectiecapillair wordt met een afgevlamde pincet onder de stereomicroscop verwijderd om vloeistofbeweging onder druk van de nanoliterpomp te vergemakkelijken. Empirisch is aangetoond dat het injecteren van 46 nl rENaC-cRNA met een concentratie van 0.25 µg/µl voldoende is (28). De

nanoliterpomp wordt dan ook ingesteld op een injectievolume van 46 nl. Een berekende hoeveelheid cRNA (aantal oöcyten x 46 nl cRNA/oöcyt = x nl cRNA) wordt steriel overgebracht onder een vijftal druppels RNase-vrije minerale olie in het omgekeerd dekseltje van een gesteriliseerd Eppendorf buisje. Onder invloed van de zuigkracht, uitgeoefend door de Drummond nanoliterpomp, worden de capillairen gevuld met het cRNA vanuit het dekseltje. De oöcyten worden met de vegetale zijde naar boven gepositioneerd in een 35 mm petrischaaltje met op de bodem een plexiglazen oöcyteninjectiekamer die de cellen op hun plaats houdt. De cRNA-injectie gebeurt ter hoogte van de vegetale zijde aangezien aan de animale zijde het risico bestaat dat er in de kern geïnjecteerd wordt. Initieel zijn oöcyten geïnjecteerd met 46 nl oplossing die α -rENaC, β -rENaC, γ -rENaC (een schenking van het laboratorium van Prof. Willy Van Driessche, K. U. Leuven) en RNase-vrij water bevatte in een 1:1:1:9 ratio (uiteindelijke cRNA-concentratie = 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). In een later stadium zijn de oöcyten geïnjecteerd met 46 nl oplossing waarin α -rENaC, β -rENaC, γ -rENaC en RNase-vrij water aanwezig waren in een 1:1:1:18 ratio (uiteindelijke cRNA concentratie = 0.14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Na cRNA-injectie worden de oöcyten geïncubeerd bij 16°C in een oplossing met lage Na^+ -concentratie (ORi met lage $[\text{Na}^+]$, samenstelling: zie verder) om Na^+ opname door de oöcyt te minimaliseren. rENaC komt 24 u na injectie tot expressie en gedurende 3 à 4 dagen kunnen elektrofysiologische metingen met deze oöcyten uitgevoerd worden. Niet-geïnjecteerde oöcyten worden bewaard in ORi bij 16°C. Elke dag wordt de helderheid van de oplossing gecontroleerd en indien nodig vervangen, terwijl beschadigde oöcyten worden verwijderd.

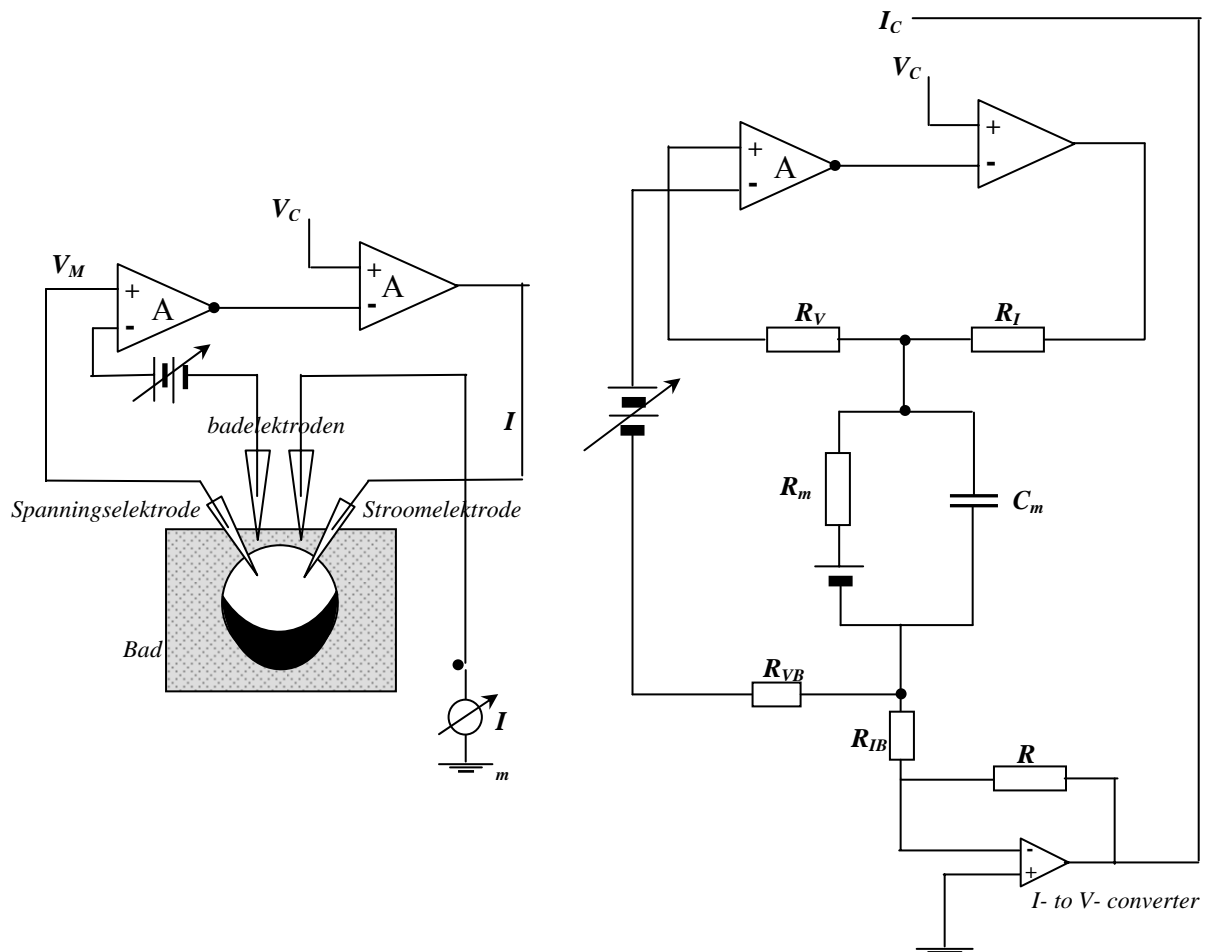
3 Elektrofysiologische metingen: ‘Two micro-electrode voltage clamp’

Wereldwijd is de ‘two micro-electrode voltage clamp’ (TEVC) techniek de meest gebruikte techniek voor de meting van stromen doorheen ionkanalen en elektrogene transporters tot expressie gebracht in *Xenopus* oöcyten.

3.1 Basisprincipe van de TEVC

De oöcyt kan voorgesteld worden door een equivalent elektrisch circuit waarin de membraanweerstand (R_M) en de membraancapaciteit (C_M) parallel ten opzichte van elkaar geschakeld zijn (figuur 5). C_M is een reflectie van de diëlektrische eigenschappen van de lipidenmembraan. R_M reflecteert de conductieve eigenschappen van de oöcytmembraan die geassocieerd zijn met de ionentransportsystemen. Ionenstromen kunnen gemeten worden met behulp van TEVC. Bij de TEVC techniek wordt er gewerkt met twee glazen micro-elektroden

die doorheen de celmembraan van de oöcyt geprikt worden. Eén elektrode meet de membraanpotentiaal (V_M), terwijl de andere elektrode stroom (I) stuurt. In de micro-elektroden bevindt zich een geconcentreerde zoutoplossing (KCl) en een gechlloreerde Ag draad, die een connectie maakt tussen het elektrisch circuit en de cel. In het elektrisch circuit wordt de stroom gedragen door elektronen, in de cel door ionen. In appendix C is een elektrochemische benadering gegeven van de elektrodeprocessen.



Figuur 5: Schematische voorstelling van de TEVC opstelling (links) en het equivalent elektrisch circuit (rechts). Het TEVC circuit bestaat uit 1) operationele versterkers voor de bepaling van de membraanpotentiaal en het vastklemmen van de membraan bij een welbepaalde potentiaal, 2) twee intracellulaire micro-elektroden voor stroom en spanning en 3) twee badelektroden bestaande uit 3 % agar en 3 M KCl. Eén badelektrode fungeert als referentie voor de spanning, de andere als referentie voor de stroom. De badelektrode voor de stroom maakt deel uit van het virtueel aardingscircuit. V_M , gemeten membraanpotentiaal; V_C , clamppotential; I_C , clampstroom; A , versterkingsfactor van de differentiële versterker; I , stroom die gestuurd wordt via de stroomelektrode; I_m , gemeten stroom doorheen de membraan; R_V , weerstand van de spanningselektrode; R_I , weerstand van de stroomelektrode; C_m , capaciteit van de oöcytmembraan; R_m , weerstand van de oöcytmembraan; R_{VB} , weerstand van de badelektrode voor de spanning; R_{IB} , weerstand van de badelektrode voor de stroom; R , interne weerstand van het virtuele aardingscircuit.

Bij de 'voltage clamp' techniek wordt een bepaalde membraanpotentiaal (V_C) opgelegd aan de cel. De werkelijke membraanpotentiaal (V_M) wordt geregistreerd door de spanningselektrode en via een differentieel versterker (operationele versterker) vergeleken met de opgelegde membraanpotentiaal. Indien V_M verschilt van V_C , d.w.z. indien ionen stroom leveren doorheen het celmembraan, die V_M doen afwijken van de opgelegde V_C , wordt via de stroomelektrode een stroom (I) gestuurd, die de celpotential gelijk aan V_C houdt, en geregistreerd wordt (figuur 5).

3.2 Toepassing van de TEVC

Goed uitzijende oöcyten worden in een kleine plexiglazen kamer (~0.3 ml) geplaatst en continu geperfundeed. Initieel werden Ag/AgCl pellets gebruikt als badelektroden, die rechtstreeks in de perfusiekamer waren aangebracht. In een later stadium werden beide badelektroden vervaardigd uit 3 % Agar en 3 M KCl. Met behulp van een DMZ-Universal Puller (Zeitz-Instrumente, Martinsried, Duitsland, zie appendix B2) worden meetelektroden getrokken uit borosilicaat glascapillairen met een dun filament (GC120F-10, 1.2 mm O.D. x 0.69 mm I.D.; Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus Ltd, Kent, UK). De gehanteerde instellingen van de puller zijn identiek aan deze gebruikt voor het vervaardigen van de injectietips (tabel 1). De pipetten worden met behulp van een spinale naald (BD Spinal Needle 26GA 3.5IN 0.45 x 90 mm) gevuld met 3 M KCl en hierin wordt een gechloteerde Ag-draad ingebracht. De micro-elektroden worden gemonteerd op metalen houders. De spanningselektrode wordt verbonden met de 'Voltage Probe' ingang van het voltage clamp device' (OC-725, Warner Instruments, Hamden, USA, zie appendix B3), terwijl de stroomelektrode verbonden is aan de 'I elektrode' ingang. Bij alle experimenten bedroeg de weerstand van de meetelektroden, bepaald met de Ω -meter ingebouwd in de voltage clamp, tussen 1 en 4 M Ω . Gebruik makende van micromanipulators wordt de oöcyt aan tegengestelde polen geïmpaleerd met de micro-elektroden. Deze handeling kan visueel gecontroleerd worden via een stereomicroscop met een relatief geringe vergroting (5-20x).

De 'oocyte voltage clamp amplifier' is via een interface verbonden met twee digital signal processor (DSP) boards (model 310B, Dalanco Spry, Rochester, NY, VS) in de personal computer. De interface is samengesteld uit een serie filters, die storingen bij bepaalde frequenties wegwerken. De DSP boards zijn elk uitgerust met twee high speed A/D converters (14 bit) en twee D/A converters (12 bit). De DSP boards genereren de clamp potentiaal, digitaliseren de ruwe data en doen een eerste verwerking van de ruwe data. De DSP boards zijn gelinkt aan de gastcomputer die zorgt voor de visualisatie en opslag van de data. Eén

DSP board wordt gebruikt om de conductantie en de stroom door de oöcytmembraan te registreren. Daartoe wordt er een sinusgolf met een frequentie van 1 Hz opgelegd aan de membraan. Stroom en potentiaalveranderingen uitgelokt door deze sinusgolf worden gemeten en in het DSP board wordt de conductantie berekend uit de amplitudes van de sinusgolven van stroom en spanning. Het tweede DSP board wordt gebruikt om de capaciteit van de oöcytmembraan te bepalen. De meting van de capaciteit is gebaseerd op de stroom over de oöcytmembraan die uitgelokt wordt door vijf opgelegde sinusgolven met hogere frequenties (55, 73, 110, 147 en 220 Hz). Weber *et al.* geven een gedetailleerde beschrijving van de bepaling van de elektrofysiologische parameters van de oöcytmembraan (34).

IV curves worden bekomen door de oöcytmembraan vanuit de clamp potentiaal te onderwerpen aan verschillende potentiaalstappen van 300 ms. Het interval tussen de potentiaalstappen bedraagt 1500 ms. Bij niet-geïnjecteerde oöcyten wordt er gebruik gemaakt van 8 potentiaalstappen (van -80 tot +60 mV) en bij rENaC geïnjecteerde oöcyten worden 10 potentiaalstappen (van -100 tot +80 mV) toegepast.

De elektrofysiologische experimenten worden gevisualiseerd met het computerprogramma Dspoc 2.8 (Digital signal processor based impedance analysis). Een stroom gedragen door positieve ladingen die bewegen van het bad naar het inwendige van de cel wordt gedefinieerd als een inwaartse stroom en als een negatieve stroom gemeten.

4 Oplossingen

De samenstelling van de oplossingen wordt weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2 Samenstelling van de oplossingen die gebruikt werden bij experimenten met *Xenopus laevis* oöcyten. De concentraties zijn uitgedrukt in mM, de osmolaliteit is weergegeven in mOsm/kg H₂O.

	NaCl	KCl	CaCl ₂	HEPES ^b	NMDG ^c	EGTA	pH	Osmolaliteit
ORi^a	90	3	2	5	-	-	7.4	190
ORi met lage [Na⁺]	10	3	2	5	80	-	7.4	190
Ca²⁺ vrije ORi	90	3	-	5	-	2	7.4	190

^aORi: basis Oöcyt Ringer

^bHEPES: *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-ethaansulfonzuur

^cNMDG: *N*-methyl-D-glucamine

De pH van de oplossingen werd gemeten met een inoLab pH 730-meter (WTW, Weilheim, Duitsland) en op pH 7.4 gebracht met NaOH. De osmolaliteit werd bepaald met een halbmikro-osmometer (Knauer, Berlijn, Duitsland) en bedroeg 190 mOsm/kg H₂O voor alle oplossingen (tabel 2).

Benzocaïne (Sigma-Aldrich, Steinheim, Duitsland), gebruikt voor het anestheseren van de kikkers, is slecht oplosbaar in water. Daarom wordt eerst een 6 % benzocaïne-stockoplossing in 100 % ethanol gemaakt. Vervolgens wordt 4 ml van deze stockoplossing toegevoegd aan 1 liter gedechloriseerd leidingwater zodat uiteindelijk een benzocaïne-werkoplossing van 0.024% bekomen wordt.

De macroscopische ENaC stroom (I_{Na}) en conductantie (G_{Na}) is geëvalueerd aan de hand van het verschil voor en na toediening van 50 μ M amiloride. Om het mogelijk effect van CdCl₂ op de activiteit van ENaC na te gaan, zijn CdCl₂ oplossingen getest met een eindconcentratie van 10 en 100 μ M, en 1 en 2.5 mM in ORi met lage [Na⁺].

5 RNA-isolatie en cDNA-synthese

Totaal RNA werd geïsoleerd uit C57Bl6 muizennieren. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de corticale delen van de nier. Na excisie wordt het nierweefsel onmiddellijk ondergedompeld in vloeibare N₂ en verpulverd met mortier en stamper. Totaal RNA werd geëxtraheerd met de *RNeasy[®] Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Duitsland). Deze kit maakt gebruik van een gespecialiseerde kolom met een membraan van silicagel in combinatie met een buffersysteem met hoge zoutconcentraties. Het systeem zorgt ervoor dat 100 μ g RNA met een lengte van meer dan 200 nucleotiden kan binden aan de RNeasy silicagelmembraan. Toepassing van de procedure zorgt voor een aanrijking van mRNA aangezien de meeste RNA's, zoals rRNA en tRNA, korter zijn dan 200 nucleotiden. Eerst wordt het verpulverd nierweefsel gelyseerd en gehomogeniseerd met een steriele plastic spuit en een 20-gauge naald in aanwezigheid van 600 μ l guanidine isothiocyanaat (GITC)-bevattende buffer. Deze lysisbuffer heeft een denaturerende werking en inactieveert RNase onmiddellijk, hetgeen de isolatie van intact RNA verzekert. Toevoeging van 70 % ethanol aan het lysaat creëert condities, die een selectieve binding van RNA aan de silicamembraan van de RNeasy minikolom promoot. Om een verwijdering van mogelijke DNA-resten te verzekeren, wordt bijkomend de 'on-the-column' *DNase I* – behandeling (QIAGEN, Hilden, Duitsland) toegepast. Uiteindelijk wordt totaal RNA gebonden aan de silicamembraan en worden contaminanten verwijderd door gebruik te maken van twee wasbuffers, RW1 en RPE. Elutie van totaal RNA gebeurt met RNase-vrij water (35). Met de NanoDrop[®] ND-1000 spectrofotometer (NanoDrop Technologies Inc,

Wilmington, USA) wordt het geïsoleerde RNA gekwantificeerd en de zuiverheid ervan bepaald. Met behulp van een gelelectroforese wordt de integriteit van het geïsoleerde RNA beoordeeld. De RNA fragmenten worden gescheiden op een 1% agarosegel en gevisualiseerd met ethidium bromide onder UV licht.

Voor de synthese van cDNA uit het geïsoleerde totaal RNA werd het *Reverse Transcription System* (Promega, Madison, USA) gebruikt. Om het RNA te denatureren en de vorming van secundaire structuren te voorkomen, wordt voor het starten van de omgekeerde transcriptiereactie 6 µl totaal RNA gedurende 10 min geïncubeerd bij 70°C. Het RNA wordt geprimed met 0.25 µg oligo (dT)₁₅ primers en 0.25 µg hexameren en vervolgens omgekeerd overgeschreven met 15 eenheden AMV Reverse Transcriptase bij 42 °C in de aanwezigheid van 5 mM MgCl₂, 1x Reverse Transcription Buffer (10 mM Tris-HCl [pH 9.0 bij 25°C], 50 mM KCl, 0.1% Triton[®] X-100), 1 mM van elk dNTP en 20 eenheden Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor in een totaal volume van 20 µl. Na 60 min wordt het staal verhit tot 95 °C gedurende 5 min en geïncubeerd bij 0-5 °C gedurende 5 min. Beide stappen zorgen voor de inactivering van AMV Reverse Transcriptase en voorkomen de binding ervan aan cDNA (36). De hoeveelheid cDNA wordt eveneens met de NanoDrop[®] ND-1000 spectrofotometer bepaald.

6 PCR amplificatie van het compleet SGLT2 cDNA

In de muis is het gen *Slc5a2* dat codeert voor SGLT2 gelokaliseerd op chromosoom 7. De coderende sequentie heeft een lengte van 2013 bp. Er wordt beoogd om de totale lengte van het SGLT2 cDNA te amplificeren met polymerase chain reaction (PCR). De primers zijn ontwikkeld op basis van de mRNA sequentie van muis-SGLT2 (GenBank accession number NM_1133254). De forward primer (5'-ATAGAATTCGCCGCCATGGAGCAAC-3') met een smelttemperatuur van 74.5°C is zo geconstrueerd dat het laatste 3' nucleotide zich 10 nucleotiden downstream van het startcodon bevindt. Aan het 5' uiteinde is de primer samengesteld uit 3 willekeurige basen, een EcoRI knipplaats en een Kozak sequentie.

In eerste instantie wordt gebruik gemaakt van een reverse primer met een smelttemperatuur van 52.8°C en als sequentie 5'-GTAAGCTTTTATGCATAG-3'. Het laatste 3' nucleotide van de reverse primer bevindt zich 10 nucleotiden upstream van het stopcodon. Tijdens een tweede fase van moleculair onderzoek wordt een andere reverse primer gebruikt met als samenstelling (5'-CGTAAGCTTTTATGCATAGAAGCCCC-3'), die met een smelttemperatuur van 76°C de smelttemperatuur van de forward primer benadert. Deze primer is zo geconstrueerd dat het laatste nucleotide aan het 3' uiteinde 17 nucleotiden

upstream van het stopcodon gelegen is. Beide reverse primers zijn aan het 5' uiteinde samengesteld uit 3 willekeurige basen en een HindIII knipplaats.

Het cDNA, gesynthetiseerd uit muizennieren, doet dienst als template voor de PCR reacties. De PCR mix is samengesteld uit 1 of 1.5 µl cDNA-staal, 1 µl forward primer (10 µM), 1 µl reverse primer (10 µM), 2.5 µl 10x PCR buffer (Roche diagnostics, Mannheim, Duitsland), 0.25 µl dNTP's (10 mM; Roche diagnostics, Mannheim, Duitsland) en 0.15 µl Taq polymerase in een totaal volume van 25 µl. Het amplificatieprogramma wordt in detail besproken in de sectie resultaten bij de optimalisatie van de PCR reactie. De bekomen PCR producten worden gescheiden op een 1 % agarose-gel en onder UV licht gevisualiseerd met behulp van ethidium bromide (Invitrogen). Het gewenste PCR product heeft een lengte van 2 kb.

7 Data-analyse

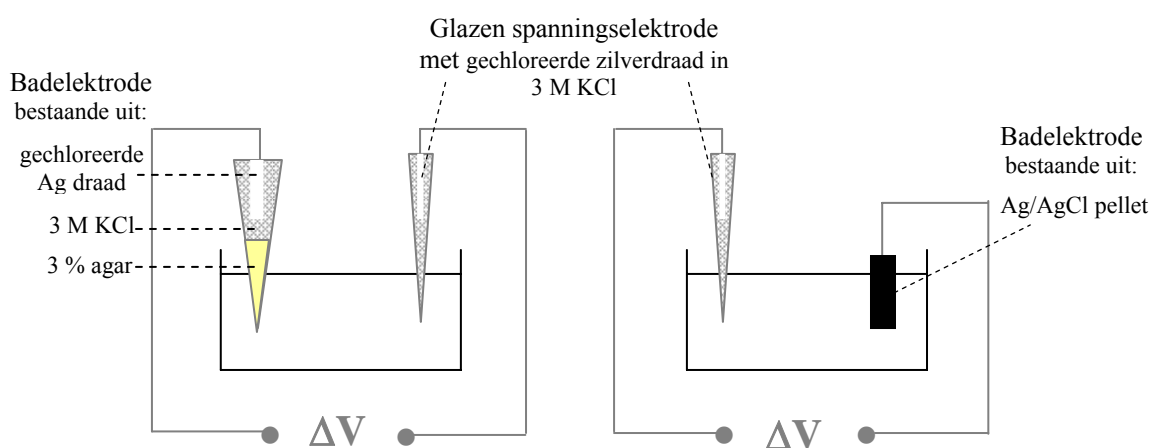
De data zijn statistisch verwerkt met Origin 6.0 professional (licentie UHasselt). Indien nodig worden de resultaten geanalyseerd met een One-way ANOVA gevolgd door een Bonferroni's multiple comparison test of een Student t-test. Een p-waarde < 0.05 wordt als statistisch significant beschouwd. De weergegeven resultaten zijn uitgedrukt in het gemiddelde ± SEM (standard error of the mean). N geeft het aantal oöcyten weer.

Resultaten

1 Optimalisatie van de TEVC opstelling

Aanvankelijk fungeerden twee Ag/AgCl pellets, die rechtstreeks in de perfusiekamer waren aangebracht, als referentie-elektroden. Zulke elektroden zijn gevoelig aan een wijziging in de Cl^- concentraties van de perfusievloeistof. Bovendien zijn deze pellets zeer fragiel en kunnen artefacten gemakkelijk geïnduceerd worden door het contact van de niet-gechloreerde delen met de doorstromende oplossing. De verstoorde ionen- en elektronenuitwisselingen ter hoogte van de badelektroden kunnen dan tot onnauwkeurige metingen leiden. Omwille van de voornoemde beperkingen van de Ag/AgCl pellets is er geopteerd om over te schakelen op badelektroden vervaardigd uit een tussenstuk van 3 % agar in 3 M KCl, terwijl de gechloreerde zilverdraad aanwezig is in 3 M KCl.

De nieuwe badelektroden worden getest door meting van het potentiaalverschil ten opzichte van een glazen capillairelektrode gevuld met 3 M KCl. Ter vergelijking wordt tevens het potentiaalverschil tussen de glazen capillairelektrode en de Ag/AgCl pellet bepaald. In figuur 6 is de meetsituatie grafisch weergegeven. De potentiaalverschillen worden gemeten in badoplossingen met diverse Cl^- concentraties, namelijk 3 mM, 135 mM en 3 M KCl. De resultaten van de individuele metingen en de gemiddelden zijn weergegeven in tabel 3.



Figuur 6: Grafische weergave van de meting van de potentiaalverschillen (ΔV) tussen de glazen capillairelektrode en de badelektrode. Het linkerdeel van de figuur illustreert de nieuwe situatie waarbij de badelektrode vervaardigd is op basis van een agarbrug. Het rechterdeel van de figuur illustreert de oorspronkelijke situatie, waarbij de badelektrode bestaat uit een Ag/AgCl pellet. ΔV wordt gemeten met de 'oocyte voltage clamp amplifier'.

Bij de start van het experiment bestaat de badoplossing uit 3 mM KCl en wordt het potentiaalverschil tussen de agarbrug-elektrode en de glazen capillair-elektrode ingesteld op 0 mV. Overschakeling naar een oplossing van 135 mM KCl of naar 3 M KCl leverde geen wijziging in potentiaal op (Tabel 3). Vervolgens wordt de badelektrode op basis van een agarbrug vervangen door een Ag/AgCl pellet. Dit resulteerde in een beduidende verschuiving van de gemeten potentiaal (Tabel 3). Deze data tonen aan dat tussen de agarbrug-badelektrode en de glazen capillair-elektrode geen potentiaalverschillen optreden bij verschillende Cl⁻ concentraties, terwijl er met de Ag/AgCl pellet-badelektrode wel noemenswaardige potentiaalverschillen optreden.

Tabel 3: Potentiaalverschillen (ΔV in mV) tussen de glazen capillairelektrode en de te evalueren elektrode, die ofwel vervaardigd is op basis van een agarbrug in 3 M KCl ofwel bestaat als een Ag/AgCl pellet. De metingen zijn uitgevoerd in badoplossingen met verschillende Cl⁻ concentraties: 3 mM, 135 mM en 3 M KCl.

	<i>Agarbruggen</i>			<i>Ag/AgCl pellets</i>		
	3 mM KCl	135 mM KCl^f	3 M KCl^f	3 mM KCl^a	135 mM KCl^{b,d}	3 M KCl^{c,e}
ΔV (mV)						
1	0	-1,20	0,10	-82,60	-75,70	-1,70
2	0	0	0	-81,20	-73,60	-1,10
3	0	0	0	-80,60	-72,00	-0,70
4	0	0,10	0	-81,00	-73,10	-0,50
5	0	-1,50	0	-80,60	-70,50	0,00
gemiddelde	0	-0,52 ± 0,38	0,02 ± 0,02	-81,20 ± 0,41	-72,98 ± 0,97	-0,80 ± 0,32

^a significant verschillend van ΔV gemeten met agarbrug in 3 mM KCl ($p < 0.05$)

^b significant verschillend van ΔV gemeten met agarbrug in 135 mM KCl ($p < 0.05$)

^c significant verschillend van ΔV gemeten met agarbrug in 3 M KCl ($p < 0.05$)

^d significant verschillend van ΔV gemeten met Ag/AgCl pellet in 3 mM KCl ($p < 0.05$)

^e significant verschillend van ΔV gemeten met Ag/AgCl pellet in 3 mM KCl ($p < 0.05$)

^f niet significant verschillend van ΔV gemeten met Ag/AgCl pellet in 3 mM KCl ($p > 0.05$)

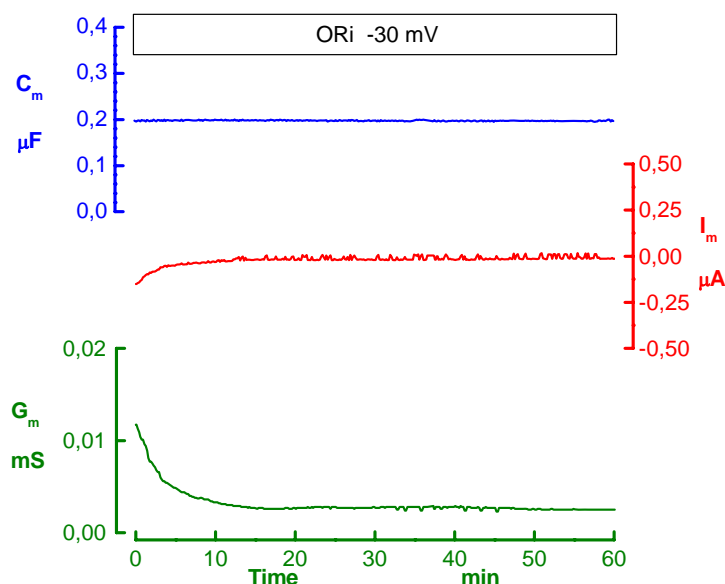
Een theoretische benadering van de elektrochemische processen ter hoogte van de elektroden wordt gegeven in appendix C.

2 Eigenschappen van niet-geïnjecteerde oöcyten

Niet-geïnjecteerde *Xenopus laevis* oöcyten zijn uitgerust met een aantal endogene transportsystemen. Deze systemen genereren slechts kleine stromen, die verwaarloosbaar zijn in vergelijking met de grotere stromen voortgebracht door transportsystemen, die heteroloog tot expressie gebracht worden in oöcyten (26).

2.1 Fundamentele elektrofysiologische eigenschappen van niet-geïnjecteerde oöcyten

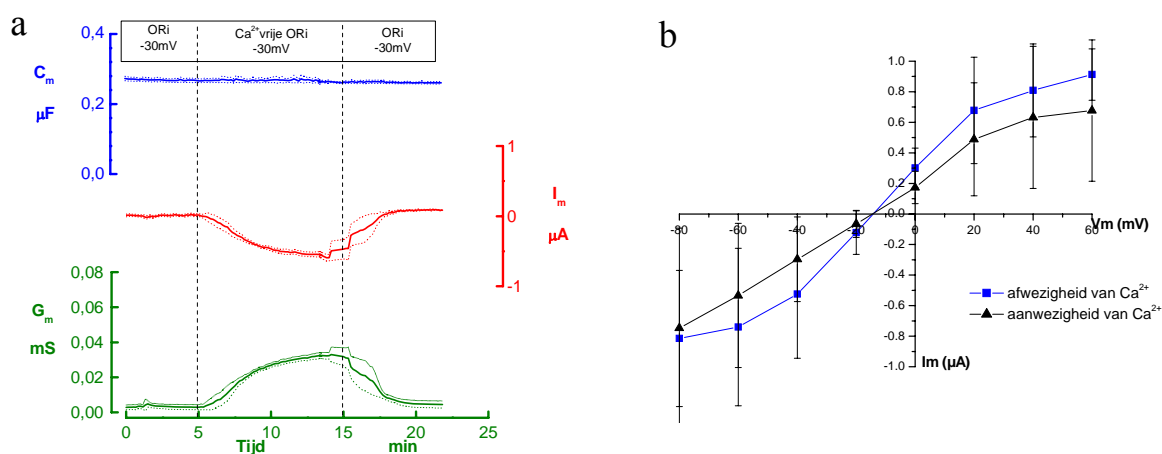
Het typische verloop van de stroom, de conductantie en de capaciteit van niet-geïnjecteerde oöcyten is weergegeven in figuur 7. Er zijn geen verschillen waargenomen tussen niet-geïnjecteerde en H₂O-geïnjecteerde oöcyten wat betreft de membraanpotentiaal, de stroom, de conductantie en de capaciteit. Tijdens dit project worden dan ook steeds niet-geïnjecteerde oöcyten gebruikt in de controle-experimenten. Niet-geïnjecteerde oöcyten hebben een negatieve rustmembraanpotentiaal van -28.91 ± 2.29 mV (tabel 2). Onmiddellijk na penetreren van de oöcyt met de glazen micro-elektroden wordt een daling van zowel de stroom als de conductantie waargenomen. Na een tiental minuten zijn beide parameters gestabiliseerd. Bij een klempotentiaal van -30 mV in ORi bedraagt de stroom -0.020 ± 0.012 μ A, de conductantie 0.003 ± 0.001 mS en de capaciteit 0.262 ± 0.102 μ F (N = 11).



Figuur 7: Typisch tijdsverloop van de capaciteit (C_m), de stroom (I_m) en de conductantie (G_m) van niet-geïnjecteerde oöcyten. De potentiaal over de celmembraan wordt gedurende 60 min vastgehouden op -30 mV, terwijl de oöcyten overspoeld worden met ORi oplossing. De grafiek geeft een representatieve meting weer.

2.2 Ca^{2+} -geïnactiveerd Cl^- kanaal in *Xenopus laevis* oöcyten

In de literatuur beschrijft men in de oöcytmembraan een Cl^- kanaal dat in aanwezigheid van extracellulair Ca^{2+} niet actief is (26,37). In de optimalisatiefase van de TEVC opstelling zijn, tijdens het testen van de apparatuur, de basisparameters van dit Ca^{2+} -geïnactiveerd Cl^- kanaal bepaald. Bovendien is de aanwezigheid van het Ca^{2+} -geïnactiveerd Cl^- kanaal een indicatie van de kwaliteit van de oöcyten. Het effect van de afwezigheid van extracellulair Ca^{2+} op de capaciteit, de stroom en de conductantie van niet-geïnjecteerde oöcyten bij een membraanpotentiaal van -30 mV wordt getoond in figuur 8a.



Figuur 8: Invloed van extracellulair Ca^{2+} op de capaciteit (C_m), de stroom (I_m) en de conductantie (G_m) van niet-geïnjecteerde oöcyten. (a) De membraanpotentiaal wordt vastgehouden op -30 mV. Na een periode van stabilisatie (5 min) wordt de oocyt gedurende 10 minuten overspoeld met een oplossing waaruit calcium verwijderd wordt en EGTA wordt aan toegevoegd. Vervolgens wordt de oorspronkelijke Ca^{2+} -bevattende oplossing opnieuw aangeboden. (b) Verband tussen de stroom en de membraanpotentiaal (IV curve) in de aanwezigheid (zwarte lijn) en afwezigheid (blauwe lijn) van 2 mM extracellulair Ca^{2+} .

Omschakeling naar een perfusievloeistof bestaande uit Ca^{2+} -vrije ORi doet de stroom geleidelijk toenemen van 0.017 ± 0.019 tot 0.470 ± 0.138 μA over een tijdsspanne van 10 minuten. De membraanconductantie stijgt van 0.003 ± 0.001 tot 0.032 ± 0.005 mS ($N = 3$). Het toevoegen van Ca^{2+} aan de badoplossing doet de stroom en de conductantie opnieuw dalen tot de beginwaarden. Het al dan niet aanwezig zijn van Ca^{2+} in de perfusievloeistof heeft geen invloed op de membraan capaciteit, die constant blijft op 0.260 ± 0.003 μF .

Figuur 8b toont de relatie tussen de membraanpotentiaal en de stroom (IV curves) in aanwezigheid en afwezigheid van 2 mM Ca^{2+} . Bij aanwezigheid van Ca^{2+} bedraagt de omkeerpotentiaal -30.33 ± 3.04 mV ($N = 4$), terwijl bij afwezigheid van Ca^{2+} een omkeerpotentiaal van -12.29 ± 0.21 mV wordt waargenomen ($N = 3$).

3 Eigenschappen van rENaC-geïnjecteerde oöcyten

Voordat de invloed van cadmium op rENaC getest wordt, zijn de fundamentele elektrofysiologische parameters van de rENaC-geïnjecteerde oöcyt geanalyseerd. De rustmembraanpotentiaal en het verloop van de conductantie, de stroom en de capaciteit zijn gekarakteriseerd op dag 1, 2 en 3 na de rENaC injectie.

3.1 Fundamentele elektrofysiologische eigenschappen van rENaC-geïnjecteerde oöcyten

De rustmembraanpotentiaal van oöcyten, die rENaC tot expressie brengen, bedraagt -6.33 ± 2.40 mV (N = 6) op dag 1 na injectie, -13.08 ± 4.12 mV (N = 6) op dag 2 en -5.00 ± 3.87 mV (N = 6) op dag 3. De gemiddelde rustmembraanpotentiaal is -8.14 ± 2.63 mV (N = 18) (tabel 4). Dit is beduidend minder negatief dan de rustmembraanpotentiaal van niet-geïnjecteerde oöcyten.

Tabel 4: Rustmembraanpotentialen van niet-geïnjecteerde en rENaC-geïnjecteerde oöcyten. Voor de rENaC-geïnjecteerde oöcyten zijn de membraanpotentialen op dag 1, dag 2 en dag 3 na injectie en een gemiddelde waarde over de 3 dagen weergegeven. De asterisk duidt op een significant verschil met de membraanpotentiaal van niet-geïnjecteerde oöcyten ($p < 0.05$). De rustmembraanpotentialen van ENaC-geïnjecteerde oöcyten op dag 1, 2 en 3 na injectie zijn onderling niet significant verschillend van elkaar.

	rustmembraanpotentiaal (mV)
niet-geïnjecteerde oöcyten (n = 11)	-28.91 ± 2.29
ENaC-geïnjecteerde oöcyten	
dag 1 na injectie (n = 6)	-6.33 ± 2.40 *
dag 2 na injectie (n = 6)	-13.08 ± 4.12 *
dag 3 na injectie (n = 6)	-5.00 ± 3.87 *
Gemiddelde (n = 18)	-8.14 ± 2.63

Het verloop van de stroom, de conductantie en de capaciteit wordt gedurende 5 minuten gevolgd bij een membraanpotentiaal van 0 mV en vervolgens gedurende 10 minuten bij een membraanpotentiaal van -60 mV. Het linkerdeel van figuur 9 toont de data op dag 1, dag 2 en dag 3 na rENaC-injectie. Om intracellulaire Na^+ accumulatie te voorkomen, wordt er tijdens de experimenten met rENaC-geïnjecteerde oöcyten gebruik gemaakt van ORi met een lage Na^+ concentratie (10 mM Na^+). Deze extracellulaire Na^+ concentratie komt ongeveer overeen met de gemiddelde intracellulaire Na^+ concentratie in oöcyten (26,28). Amiloride-gevoelige stromen kunnen reeds 24u na de rENaC injectie gemeten worden, zowel bij oöcyten

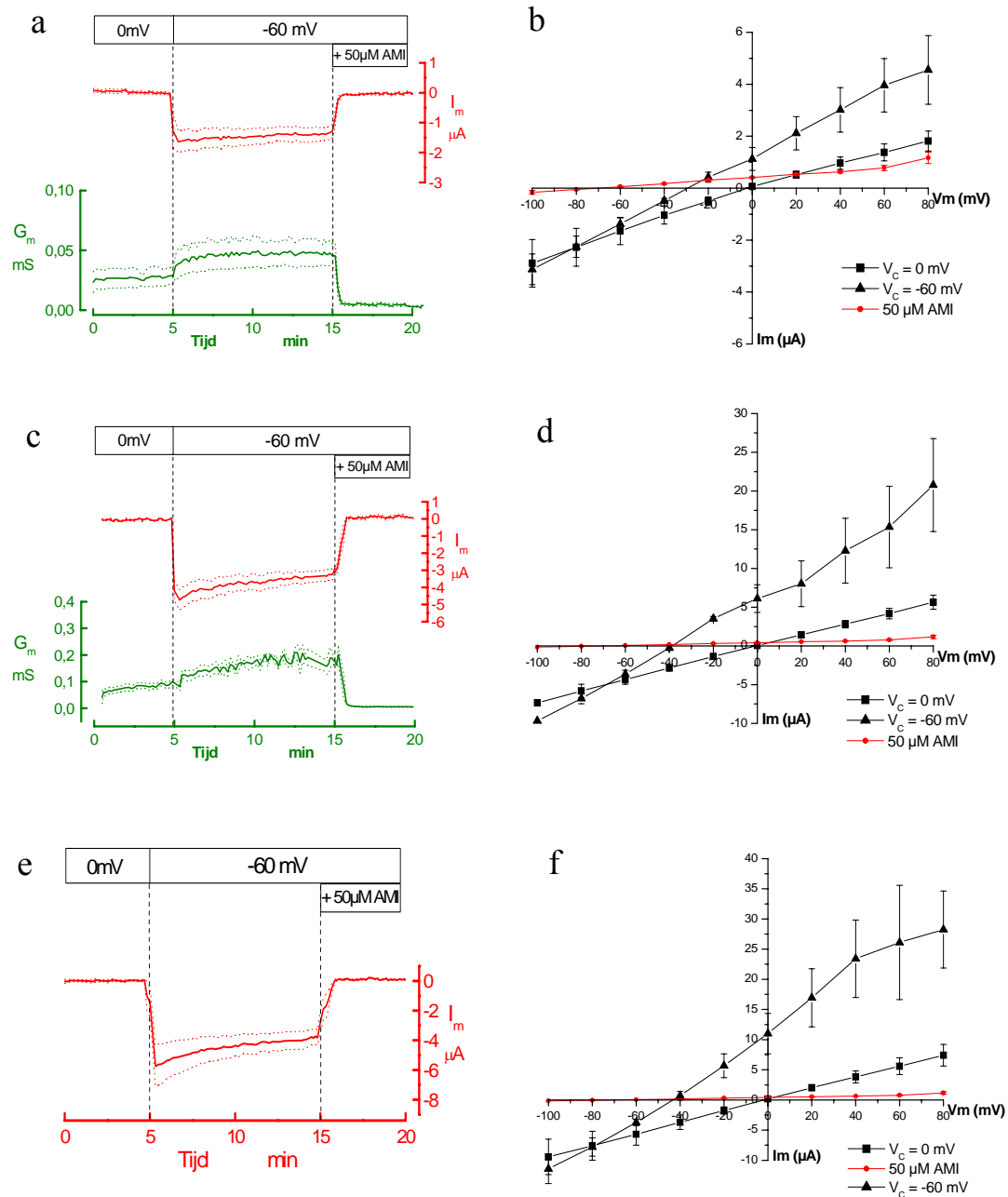
geïnjecteerd met de 1:1:1:9 rENaC-mix als bij oöcyten geïnjecteerd met de 1:1:1:18 rENaC-mix. In rENaC-geïnjecteerde oöcyten bedraagt de stroom bij 0 mV $-0.017 \pm 0.047 \mu\text{A}$ (N = 6) op dag 1 (figuur 9a), $-0.030 \pm 0.064 \mu\text{A}$ (N = 4) op dag 2 (figuur 9c) en $0.035 \pm 0.038 \mu\text{A}$ (N = 4) op dag 3 (figuur 9e). Een switch van de membraanpotential naar -60 mV leidt tot een grote negatieve stroom, die reeds na 30 sec bij -60 mV een piekwaarde bereikt. Deze piekwaarde is op dag 1 na rENaC injectie $-1.642 \pm 0.353 \mu\text{A}$, op dag 2 na injectie $-4.740 \pm 0.594 \mu\text{A}$ en op dag 3 na injectie $-5.748 \pm 1.370 \mu\text{A}$. Na een periode van 8 minuten bij -60 mV is de stroom minder negatief geworden tot $-1.575 \pm 0.300 \mu\text{A}$ op dag 1, tot $-3.930 \pm 0.512 \mu\text{A}$ op dag 2 en tot $-4.640 \pm 0.889 \mu\text{A}$ op dag 3.

De initiële membraanconductantie bij een membraanpotential van 0 mV bedraagt op dag 1 na rENaC injectie $0.028 \pm 0.008 \text{ mS}$ (N = 6), bij omschakeling naar een membraanpotential van -60 mV stijgt de membraanconductantie tot maximaal $0.046 \pm 0.010 \text{ mS}$ (figuur 9a). Op dag 2 na rENaC injectie vertoont de oöcyt bij 0 mV een membraanconductantie van $0.086 \pm 0.011 \text{ mS}$ die toeneemt tot $0.178 \pm 0.010 \text{ mS}$ bij -60 mV (N = 4) (figuur 9c). Na drie dagen vertonen de rENaC geïnjecteerde oöcyten bij 0 mV een membraanconductantie van $0.176 \pm 0.057 \text{ mS}$ en bij -60 mV wordt een maximale waarde van $0.355 \pm 0.141 \text{ mS}$ bereikt (N = 4) (figuur 9e).

De figuren 9b, 9d en 9f tonen de IV-curves van rENaC-geïnjecteerde oöcyten op respectievelijk dag 1, dag 2 en dag 3 na injectie. De IV-curven tonen het verband tussen de membraanpotential en de stroom, ofwel tijdens de periode dat de membraanpotential werd vastgehouden op 0 mV, ofwel op het ogenblik dat de membraanpotential reeds 8 minuten werd aangehouden bij -60 mV. Tijdens de periode dat de clamp potential 0 mV bedraagt is de omkeerpotential in de buurt van 0 mV gelegen: $-2.39 \pm 1.25 \text{ mV}$ op dag 1 na injectie, $-1.19 \pm 1.11 \text{ mV}$ op dag 2 en $-2.46 \pm 0.96 \text{ mV}$ op dag 3. Op het moment dat de clamppotential reeds 8 minuten -60 mV bedraagt, is de omkeerpotential $-28.26 \pm 1.69 \text{ mV}$ op dag 1, $-38.90 \pm 1.60 \text{ mV}$ op dag 2 en $-41.54 \pm 2.37 \text{ mV}$ op dag 3. Hierbij zijn de omkeerpotentialen op dag 2 en dag 3 significant verschillend van de omkeerpotential op dag 1 ($p < 0.001$) (tabel 5).

Toediening van 50 μM amiloride leidt tot een onmiddellijke daling van de stroom en de conductantie tot waarden die vergelijkbaar zijn met niet-geïnjecteerde oöcyten (figuur 9a,c,e). De omkeerpotential bedraagt $-70.79 \pm 6.41 \text{ mV}$ in aanwezigheid van 50 μM amiloride. Inhibitie van de stroom door amiloride blijkt afhankelijk te zijn van het potentialverschil over de membraan. De amplitude van de uitwaartse stroom is groter dan de amplitude van de inwaartse stroom (figuur 9b, d, f). Eerder onderzoek heeft immers uitgewezen dat het positief

geladen amiloride een hogere affiniteit voor ENaC heeft bij een hyperpolariserende membraanpotentiaal (38).



Figuur 9: Het linkerdeel illustreert het verloop van de stroom (I_m) en de conductantie (G_m) van rENaC-geïnjecteerde oöcyten op dag 1 (a), dag 2 (c) en dag 3 (e) na injectie. De potentiaal van de oöcyten werden gedurende 5 min vastgehouden bij 0 mV, vervolgens werd er gedurende 10 min overgeschakeld naar -60 mV. Op het einde van het experiment werd 50 μ M amiloride (AMI) toegevoegd aan de perfusievloeistof die gedurende het ganse experiment bestond uit ORi met een lage Na^+ concentratie (10 mM). Het rechterdeel van de figuur illustreert de IV curves op dag 1 (b), dag 2 (d) en dag 3 (f) na rENaC injectie. IV curves tonen het verband tussen de membraanpotentiaal en de stroom ■ tijdens de periode dat de clamppotential (V_C) 0 mV bedraagt, ▲ na een periode van 8 minuten bij een V_C van -60 mV en ● tijdens de toediening van 50 μ M amiloride (AMI).

De membraancapaciteit van rENaC-geïnjecteerde oöcyten bedraagt $0.242 \pm 0.012 \mu\text{F}$ op dag 1 na rENaC-injectie, $0.259 \pm 0.015 \mu\text{F}$ op dag 2 en $0.295 \pm 0.130 \mu\text{F}$ op dag 3. Een hyperpolariserende membraanpotentiaal blijkt geen invloed te hebben op de membraancapaciteit.

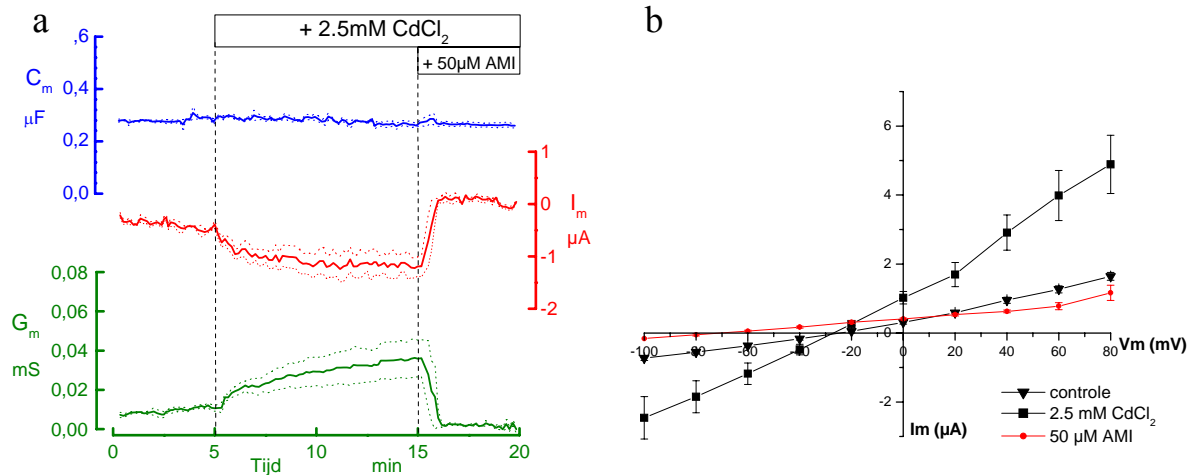
Tabel 5: Omkeerpotentialen (E_{rev}) van de amiloride-gevoelige stromen waargenomen (I) tijdens de periode dat de clamp potentiaal (V_C) 0 mV bedraagt en 2) na een periode van 8 minuten bij een V_C van -60 mV. De metingen zijn uitgevoerd op dag 1 (N = 4), dag 2 (N = 4) en dag 3 (N = 4) na de rENaC injectie. De asterisk duidt op significante verschillen met $p < 0.001$. De niet-significante verschillen worden aangeduid door n.s..

Aantal dagen na rENaC injectie	V_{rev} bij $V_C = 0 \text{ mV}$	V_{rev} na 8 min bij $V_C = -60 \text{ mV}$
dag 1	$-2,39 \pm 1.25$	$-28,26 \pm 1.69$
dag 2	$-1,19 \pm 1.11$	$-38,90 \pm 1.60$
dag 3	$-2,46 \pm 0.96$	$-41,54 \pm 2.37$

} n.s. } * } *

3.2 Invloed van cadmium op rENaC

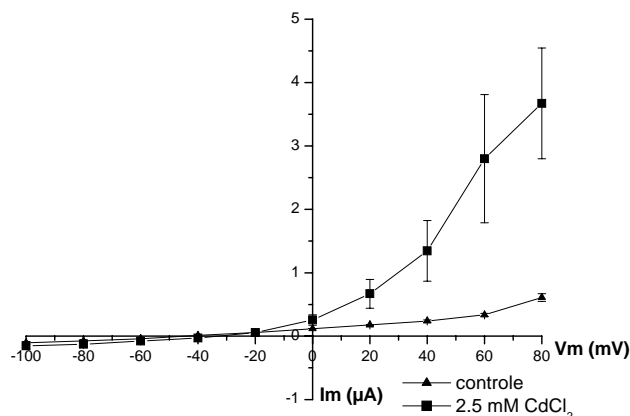
Cadmium induceert nefropathie, die gekenmerkt wordt door een verstoorde reabsorptie en secretie ter hoogte van de renale tubuli. Nefrotoxiciteit zou het gevolg kunnen zijn van interacties van cadmium met ionentransportsystemen in de renale tubuli (2). In dit onderdeel wordt het directe effect van cadmium op ENaC onderzocht. Aan de oöcyten worden perfusievloeistoffen (ORi met lage Na^+ concentratie) aangeboden waarin CdCl_2 aanwezig is in verschillende concentraties (10 μM , 100 μM , 1 mM en 2.5 mM), terwijl de membraanpotentiaal wordt vastgehouden op -60 mV. CdCl_2 oplossingen met een concentratie van 10 μM , 100 μM en 1 mM hebben geen invloed op de stroom, de conductantie of de capaciteit van rENaC-geïnjecteerde oöcyten. Slechts bij een toediening van 2.5 mM CdCl_2 gedurende 10 minuten treedt er een geleidelijke toename van de amiloride-gevoelige stroom op van -0.390 ± 0.076 naar $-1.222 \pm 0.192 \mu\text{A}$, terwijl de conductantie stijgt van 0.011 ± 0.002 naar $0.036 \pm 0.010 \text{ mS}$ (N = 3). De capaciteit wordt niet beïnvloed door de aanwezigheid van CdCl_2 . Toevoeging van 50 μM amiloride inhibeert de stroom en conductantie onmiddellijk (figuur 10a). Dit wijst erop dat CdCl_2 de activiteit van rENaC vergroot. De omkeerpotentiaal bedraagt bij afwezigheid van CdCl_2 $-24.53 \pm 3.91 \text{ mV}$ en bij aanwezigheid van CdCl_2 $-27.83 \pm 2.04 \text{ mV}$ (N = 3) (figuur 10b).



Figuur 10: Het effect van cadmium op rENaC.

(a) De membraanpotential van rENaC-geïnjecteerde oöcyten wordt vastgehouden op -60 mV. Gedurende het ganse experiment bevinden de oöcyten zich in ORi met een lage Na^+ concentratie. Na 5 minuten worden de oöcyten overspoeld met CdCl_2 -bevattende oplossing (2.5 mM). 10 minuten later wordt $50 \mu\text{M}$ amiloride (AMI) toegevoegd aan de perfusievloeistof. (b) IV curves van rENaC-geïnjecteerde oöcyten bij aan- en afwezigheid van 2.5 mM CdCl_2 . In afwezigheid van 2.5 mM CdCl_2 bedraagt de omkeerpotential -24.53 ± 3.91 mV, in aanwezigheid van 2.5 mM CdCl_2 is de omkeerpotential -27.83 ± 2.04 mV. Na toediening van $50 \mu\text{M}$ amiloride (AMI) wordt een omkeerpotential van -70.8 ± 6.4 mV vastgesteld.

Controle-experimenten waarbij 2.5 mM CdCl_2 wordt toegediend aan niet-geïnjecteerde oöcyten duiden aan dat CdCl_2 geen invloed heeft op de endogene transportsystemen van de *Xenopus laevis* oöcyt bij een clamp potential van -60 mV. Uit de IV curves van niet-geïnjecteerde oöcyten kan afgeleid worden dat 2.5 mM CdCl_2 de uitwaartse stroom activeert bij meer positieve membraanpotentialen (figuur 11). Niet-geïnjecteerde oöcyten vertonen een omkeerpotential van -42.84 ± 3.72 mV bij afwezigheid van 2.5 mM CdCl_2 , na toevoeging van CdCl_2 bedraagt de omkeerpotential -34.29 ± 1.38 mV ($N = 4$).



Figuur 11: IV curves van niet-geïnjecteerde oöcyten bij aan- en afwezigheid van 2.5 mM CdCl_2 ($N = 4$). 2.5 mM CdCl_2 induceert een toename van de uitwaartse stroom bij positieve membraanpotentialen. De omkeerpotential bedraagt -42.84 ± 3.72 mV bij afwezigheid van 2.5 mM CdCl_2 en -34.29 ± 1.38 mV bij aanwezigheid van 2.5 mM CdCl_2 .

4 Amplificatie van compleet SGLT2: optimalisatie van de PCR voorwaarden

In het tweede luik van het project wordt ernaar gestreefd het complete SGLT2 cDNA te amplificeren. Totaal RNA, geïsoleerd uit muizennieren, fungeert hierbij als uitgangsmateriaal. Het geïsoleerde RNA heeft een concentratie van 165.3 ng/μl. Optische dichtheits (OD)-metingen met de NanoDrop[®] ND-1000 spectrofotometer geven een OD 260/280 gelijk aan 2.15 en een OD 260/230 gelijk aan 1.74. Bij gelelektroforese van het totale RNA is een duidelijke 28S en 18S rRNA band zichtbaar waarbij de 28S band intenser is dan de 18S band. Het totale RNA is omgezet naar cDNA dat een concentratie van 2017 ng/μl heeft. Dit cDNA doet dienst als template voor de specifieke amplificatie van SGLT2 cDNA.

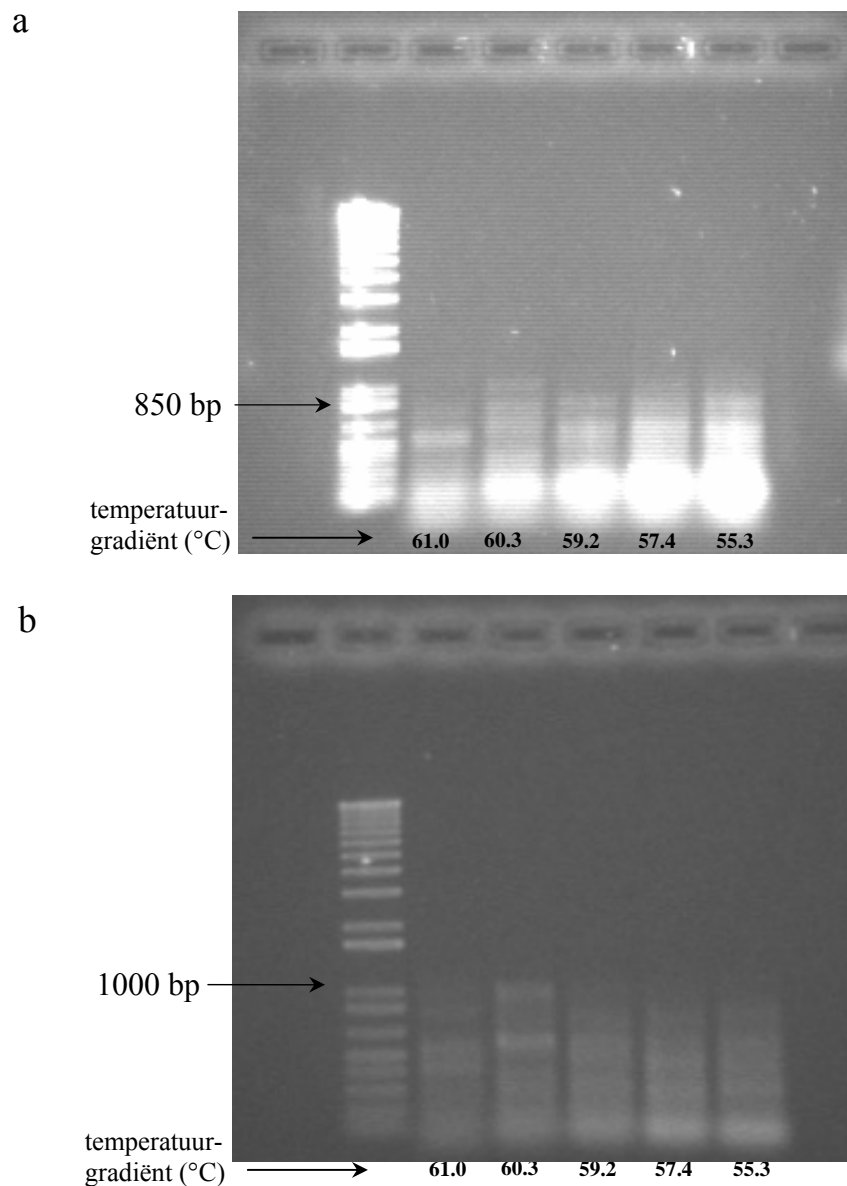
Tijdens een eerste reeks PCR's wordt 5'-ATAGAATTCGCCGCCATGGAGCAAC-3' gebruikt als forward primer en 5'-GTAAGCTTTTATGCATAG-3' als reverse primer. De forward en reverse primers hebben een smelttemperatuur van respectievelijk 74.5 en 52.8 °C. Vooreerst dient de optimale annealing temperatuur bepaald te worden met een gradiënt PCR. De annealing temperaturen van primers liggen gemiddeld 6 tot 10 °C lager dan de smelttemperaturen. Daarom wordt er geopteerd voor de toepassing van een temperatuurgradiënt van 52 tot 61°C. Voor de start van de eigenlijke amplificatiereactie worden de PCR reactiemengsels (met 1 μl cDNA staal) gedurende 5 min opgewarmd tot 94 °C. De amplificatie verloopt in 35 cycli volgens het volgende schema: denaturatie gedurende 30 s bij 94°C, annealing gedurende 45 s bij een temperatuurgradiënt van 52 tot 61 °C en elongatie gedurende 45 s bij 72 °C (tabel 6). Volgend op de amplificatie worden de PCR producten gedurende 5 min opgewarmd tot 72 °C. Het resultaat van deze PCR reactie wordt getoond in figuur 12a. Bij 60.3, 59.2, 57.4 en 55.3 °C is er een signaal zichtbaar ter hoogte van 850 bp. Er wordt echter een PCR product van 2 kb verwacht. Aangezien dit een relatief lange sequentie is, wordt de elongatieduur in het hierboven beschreven PCR protocol verlengd tot 2 min (tabel 6). In figuur 12b is het resultaat van deze PCR reactie weergegeven. Bij 60.3 °C is ter hoogte van 1000 bp een signaal zichtbaar. Er wordt nu getracht het amplificatieprotocol te optimaliseren bij de annealing temperatuur van 60.3 °C. Omwille van de lengte van het beoogde product wordt de denaturatieduur verlengd tot 1 min 20 s en de annealing tijd tot 2 min. Tevens wordt de hoeveelheid van cDNA staal verhoogd van 1 tot 1.5 μl (tabel 6). Deze aanpassingen leveren echter geen product met de gewenste lengte.

Tabel 6: PCR condities voor amplificatie van het compleet SGLT2 cDNA. In een eerste reeks PCR's wordt gebruik gemaakt van primerset 1: de forward primer (5'- ATAGAATTCGCCGCCATGGAGCAAC-3') heeft een smelttemperatuur (T_m) van 74.5 °C en de reverse primer (5'-GTAAGCTTTTATGCATAG-3') heeft een T_m van 52.8 °C. In een latere fase wordt primerset 2 gebruikt: de forward primer is identiek aan de de forward primer van primerset 1, de reverse primer (5'-CGTAAGCTTTTATGCATAGAAGCCCC-3') heeft een T_m van 76 °C. cDNA gesynthetiseerd uit totaal RNA van muizennieren wordt gebruikt als template. Voorafgaand aan de eigenlijke amplificatiereactie worden de reactiemengsels gedurende 2 min opgewarmd tot 94 °C. Na amplificatie worden de PCR producten gedurende 5 min opgewarmd tot 72 °C.

	<i>PRIMERSET 1</i>			<i>PRIMERSET 2</i>
	<i>PCR 1</i>	<i>PCR 2</i>	<i>PCR 3</i>	<i>PCR 1</i>
µL cDNA staal	1	1	1.5	1.5
Denaturatie tijdsduur (s)	30	30	80	80
T (°C)	94	94	94	94
Annealing tijdsduur (s)	45	45	120	120
T (°C)	52 → 61	52 → 61	60.3	60 → 70
Elongatie tijdsduur (s)	45	120	120	150
T (°C)	72	72	72	72
Aantal cycli	35	35	35	40

Er wordt verondersteld dat amplificatie van het compleet SGLT2 cDNA niet lukt omwille van het grote verschil tussen de annealing temperaturen van de forward en de reverse primer. Daarom wordt in een tweede fase van PCR's gebruik gemaakt van een nieuwe reverse primer met een annealing temperatuur van 76 °C. De optimale annealing temperatuur wordt bepaald via PCR met een temperatuurgradiënt van 60 tot 70 °C. Aangezien er een relatief lange sequentie (2 kb) moet geamplificeerd worden, wordt de elongatieduur nogmaals verlengd met 30 seconden. De PCR mengsels worden eerst opgewarmd tot 94 °C gedurende 5 minuten. De amplificatie verloopt in 35 cycli volgens het volgende protocol: 30 seconden bij 94 °C, 2 min bij een temperatuurgradiënt van 60 tot 70 °C en 2 min 30 seconden op 72 °C (tabel 6). Afsluitend worden de PCR producten gedurende 5 min opgewarmd tot 72 °C. Met dit PCR protocol wordt geen product met de gewenste lengte bekomen. Vervolgens wordt er geprobeerd om de opbrengst en de specificiteit te vergroten door toevoeging van 1 M betaine en 5 % DMSO aan de PCR reactiemix. Betaine zorgt ervoor dat de GC- en de AT-baseparen in dezelfde mate bijdragen aan de stabiliteit van de DNA duplex, terwijl DMSO de baseparing verstoort. Beide producten bevorderen dus de denaturatie. Toevoeging van betaine en DMSO zorgt echter niet voor een verbetering van het resultaat.

Doordat het project ten einde liep, konden geen alternatieve proeven gebeuren. Enkele mogelijke experimenten voor de toekomst worden in de discussie besproken.



Figuur 12: Resultaten van de PCR's met primerset 1 bestaande uit een forward primer met sequentie (5'-ATAGAATTCGCCGCCATGGAGCAAC-3') en een reverse primer met sequentie (5'-GTAAGCTTTTATGCATAG-3'). cDNA gesynthetiseerd uit totaal RNA van muizennieren wordt gebruikt als template. Voorafgaand aan de eigenlijke amplificatiereactie worden de reactiemengsels gedurende 2 min opgewarmd tot 94 °C. Na amplificatie worden de PCR producten gedurende 5 min opgewarmd tot 72 °C. (a) Amplificatie gebeurt in 35 cycli: 30 s bij 94 °C, 45 s bij een temperatuurgradiënt van 52 tot 61 °C en 45 s bij 72 °C. (b) Amplificatie gebeurt in 35 cycli: 30 s bij 94 °C, 45 s bij een temperatuurgradiënt van 52 tot 61°C en 2 min bij 72 °C.

Discussie

In een eerste luik van dit project is het *Xenopus laevis* oöcyt expressiesysteem gebruikt om de elektrofysiologische eigenschappen van rENaC te evalueren. Het effect van cadmium op de activiteit van rENaC is onderzocht met behulp van de ‘two micro-electrode voltage clamp’ (TEVC) techniek. Dit onderzoek was slechts mogelijk na een aanpassing van de meetopstelling. In de oorspronkelijke schikking was de meetkamer voorzien van twee Ag/AgCl pellets die gebruikt werden als badelektroden. In een later stadium werden deze Ag/AgCl pellets vervangen door badelektroden samengesteld uit 3 % agar en 3 M KCl. Tussen een Ag/AgCl pellet-badelektrode en een glazen capillairelektrode worden noemenswaardige potentiaalverschillen gedetecteerd in oplossingen met verschillende Cl⁻ concentraties, terwijl er bij de agarbruggen geen grote potentiaalverschillen optreden. De agarbruggen zijn dus geschikt voor experimenten in oplossingen met variërende Cl⁻ concentraties. Tevens wijst de afwezigheid van potentiaalverschillen erop dat Cl⁻ en K⁺ met ongeveer gelijke snelheid doorheen de agar bewegen. De agarbruggen worden voor elke reeks experimenten opnieuw vervaardigd. Dit verzekert een goede chlorering van de Ag-draad en een efficiënte ionen- en elektronenuitwisseling ter hoogte van de badelektrode waardoor de nauwkeurigheid van de metingen bevorderd wordt. In appendix C wordt een theoretische uiteenzetting van de elektrochemische processen ter hoogte van de elektroden gegeven.

De geobserveerde elektrofysiologische parameters bij niet-geïnjecteerde oöcyten, stromen in de orde van grootte van 20 nA en conductanties rond 3 μ S, komen overeen met eerdere bevindingen (28). De kleine stromen en conductanties duiden aan dat de oöcyt een dichte celmembraan heeft die weinig ionen doorlaat. De oöcyt genereert endogene stromen die verwaarloosbaar zijn in vergelijking met heteroloog tot expressie gebrachte transportsystemen zoals ENaC. Bijgevolg is de oöcyt een expressiesysteem waarin rENaC ‘geïsoleerd’ kan bestudeerd worden (27). De oöcyt staat bekend om zijn stevige membraan die goed herstelt na impalatie met injectie- en meetelektroden. Dit is tevens af te leiden uit de geobserveerde stroom- en conductantiedaling die optreedt onmiddellijk na het inbrengen van de micro-elektroden.

Ondanks de lage endogene stromen en conductanties is de oöcyt toch uitgerust met een aantal endogene transportsystemen. Na verwijdering van Ca²⁺ uit de perfusievloeistof wordt een toename van de stroom en de conductantie waargenomen. Bij een clamp potentiaal van -30 mV worden stromen tot 500 nA gemeten. Het betreft een negatieve, inwaartse stroom met

een omkeerpotentiaal van ca. -12 mV. Weber *et al.* hebben aangetoond dat deze stroom gemedieerd wordt door een Ca^{2+} -geïnactiveerd Cl^- kanaal dat gekenmerkt wordt door een omkeerpotentiaal kort bij de evenwichtspotentiaal van Cl^- (-12 tot -15 mV) (37). Naast deze Ca^{2+} -geïnactiveerde Cl^- kanalen brengt de oöcyt endogene K^+ kanalen en Na^+/K^+ ATPasen tot expressie. Beide transportsystemen hyperpolariseren de celmembraan en houden de rustmembraanpotentiaal in stand. Tijdens dit project bedraagt de rustmembraanpotentiaal van niet-geïnjecteerde oöcyten gemiddeld -28.91 ± 2.29 mV. Eerdere studies vermelden rustmembraanpotentialen variërend van -27 tot -59 mV (26). Aangezien de membraanpotentiaal gemeten is met relatief grote meetelektroden heeft de absolute waarde van de rustmembraanpotentiaal geen grote waarde. Toch geeft deze membraanpotentiaal een indicatie over de gezondheid van de oöcyt. Tevens is een vergelijking tussen de basale membraanpotentiaal en de membraanpotentiaal van oöcyten die exogene transportsystemen tot expressie brengen een eerste aanwijzing over het niveau waarbij het heteroloog proteïne tot expressie komt (28).

Bij niet-geïnjecteerde oöcyten worden membraanopervlakten van gemiddeld 260 nF waargenomen. De membraanopervlakte van de oöcyt kan beschouwd worden als een directe maat voor de oppervlakte van de membraan. Universeel wordt voor biologische membranen een capaciteit van $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ aangenomen (39). Bijgevolg hebben de oöcyten in dit project een membraanopervlakte van ongeveer 26 mm^2 . Eerdere studies vermelden voor oöcyten membraanopervlakten variërend van 19 tot 23 mm^2 (26,28). De grote membraanopervlakte (C_m) in samenhang met de grote elektrische membraanweerstand (R_m) heeft tot gevolg dat de tijd nodig om de membraan op te laden groot is. Dit bepaalt immers de tijdsconstante van de membraan ($\tau_m = R_m \times C_m$). Voor een niet-geïnjecteerde oöcyt met een R_m van $\sim 0.333 \mu\Omega$ en een C_m van ~ 260 nF heeft τ een waarde van 86.67×10^{-15} s. Voor een rENaC-geïnjecteerde oöcyt met een R_m van $\sim 0.0357 \mu\Omega$ en een C_m van ~ 260 nF is τ ongeveer 10x kleiner, met name 9.29×10^{-15} s. Na 5τ is de gewenste membraanpotentiaal voor 99.99 % ingesteld. Hieruit volgt dat een niet-geïnjecteerde oöcyt langere tijd nodig heeft om de gewenste membraanpotentiaal aan te nemen. Een rENaC geïnjecteerde oöcyt bereikt dus sneller de opgelegde membraanpotentiaal voornamelijk omwille van zijn lagere membraanweerstand. Bij elektrofysiologische studie van rENaC vormt de hoge capaciteit van de membraan dus een kleiner probleem dan bij niet-geïnjecteerde oöcyten. Bij onderzoek van potentiaalgevoelige kanalen kan het aangewezen zijn om de celcapaciteit te reduceren door gebruik te maken van kleinere (stadium III) oöcyten (25).

Het feit dat de fundamentele bio-elektrische eigenschappen van de niet-geïnjecteerde oöcyten overeenkomen met eerdere studies wijst op een goede kwaliteit van de gebruikte oöcyten. Tevens is het een aanduiding dat de TEVC opstelling naar behoren functioneert.

rENaC-geïnjecteerde oöcyten vertonen een rustmembraanpotentiaal van gemiddeld -8 mV. In een eerdere studie van Segal worden nog positievere membraanpotentialen (rond 6 mV) gerapporteerd (28). De rustmembraanpotentiaal van rENaC-geïnjecteerde oöcyten is positiever dan de rustmembraanpotentiaal van niet-geïnjecteerde oöcyten en wordt bepaald door het binnenstromen van Na^+ ionen. Omdat verschillende onderzoeken aantonen dat Na^+ inhibitorische effecten kan hebben op ENaC stromen, worden de rENaC geïnjecteerde oöcyten bewaard in ORi met lage Na^+ concentratie (10 mM) om de instroom van Na^+ te minimaliseren. Omwille van dezelfde reden verlopen ook alle experimenten met rENaC-geïnjecteerde oöcyten in ORi oplossingen met lage Na^+ concentratie.

Wanneer de membraan van de oöcyt geklemd wordt bij 0 mV bedraagt de stroom bij benadering 0 μA op dag 1, 2 en 3 na rENaC injectie. De omschakeling van een clamp potentiaal van 0 naar -60 mV bij rENaC-geïnjecteerde oöcyten veroorzaakt een grote inwaartse stroom die snel zijn piekwaarde bereikt en vervolgens geleidelijk afneemt tot een constant niveau. Dit patroon wordt zowel op dag 1 als dag 2 en 3 na injectie waargenomen. Hetzelfde stroomverloop is vastgesteld bij eerdere experimenten (28). Gedurende de periode dat de clamp potentiaal 0 mV bedraagt, is de omkeerpotentiaal van de rENaC-gemedieerde stroom kort bij 0 mV gelegen. Na een periode van 8 min bij een clamp potentiaal van -60 mV is de omkeerpotentiaal op dag 1 rond -28 mV en op dag 2 en 3 rond -40 mV gelegen. De omkeerpotentialen duiden aan dat de intracellulaire Na^+ concentratie toeneemt wanneer de oöcytmembraan 8 min bij -60 mV wordt vastgeklemd. Bij -60 mV is de elektrische drijfkracht voor Na^+ immers groter dan bij 0 mV. Op dag 2 en 3 worden grotere intracellulaire Na^+ concentraties bereikt dan op dag 1 na rENaC injectie ($p < 0.001$), waarschijnlijk ten gevolge van de hogere expressie van rENaC op dag 2 en 3. Verondersteld wordt dat de geobserveerde stroomafname tijdens de periode dat de clamp potentiaal -60 mV bedraagt, veroorzaakt wordt door een verhoogde intracellulaire Na^+ concentratie. Eerdere onderzoeken hebben reeds aangetoond dat Na^+ de activiteit van de amiloride-gevoelige stroom kan inhiberen (40). Na^+ zou op twee manieren de ENaC activiteit beïnvloeden: via 'zelf-inhibitie' en via 'feedback-inhibitie'. 'Zelf-inhibitie' is niet afhankelijk van de Na^+ influx en de intracellulaire Na^+ concentratie. Er wordt gesuggereerd dat het mechanisme van 'zelf-inhibitie' een directe interactie tussen extracellulair Na^+ en ENaC inhoudt (41). Een stijging van de intracellulaire Na^+ concentratie resulteert in 'feedback inhibitie' van ENaC (42). Onderzoeken suggereren

dat dit te wijten is aan een reductie van de kanaaldensiteit ter hoogte van de plasmamembraan (41). De negatieve feedback regulatie van ENaC door Na^+ is mogelijk een belangrijk mechanisme om Na^+ overlading van Na^+ transporterende epithelen te voorkomen (43).

Cadmium stimuleert de stroom bij rENaC geïnjecteerde oöcyten die vastgeklemd zijn bij -60 mV. Een recent onderzoek heeft het effect van cadmium op het Na^+ transport in de geïsoleerde huid van de *Pleurodema thaul* kikker bestudeerd. Deze geïsoleerde kikkerhuid kan beschouwd worden als een model voor transepitheliaal Na^+ transport waarin de apicale opname van Na^+ gemedieerd wordt door een amiloride-gevoelig Na^+ kanaal en de basolaterale verwijdering van Na^+ door het Na^+/K^+ ATPase uitgevoerd wordt. De data van deze studie suggereren dat apicale toediening van 0.07 tot 0.50 mM cadmium het Na^+ transport over het epitheel stimuleert (44). Eerdere studies waarbij de geïsoleerde huid van de *Xenopus laevis* en *Rana temporaria* gebruikt is als model vermelden eveneens een activering van het transepitheliaal iontransport na apicale toediening van cadmium (45). Studies met geïsoleerde kikkerhuid suggereren dus dat apicaal toegediende cadmium het ENaC activeert. Toch is het model te complex om het effect van cadmium op andere transportsystemen uit te sluiten. Het oöcytsysteem is ideaal om de directe interacties van cadmium met rENaC te bestuderen. De resultaten van dit project tonen aan dat cadmium rENaC activeert, maar enkel bij hoge, toxicologische irrelevante concentraties. Toediening van 2.5 mM CdCl_2 doet de amiloride-gevoelige stroom en conductantie toenemen, terwijl de capaciteit van de membraan niet verandert. Mogelijk verhoogt cadmium niet de inbouw van ENaC in de membraan, maar beïnvloedt het metaal rechtstreeks de conductieve eigenschappen van het kanaal. Verdere experimenten omtrent het activeringsmechanisme zijn noodzakelijk. De eigenschap van zware metalen om rechtstreeks met rENaC te interageren is reeds aangetoond in oöcyten. 2.5 mM Ni^{2+} inhibeert 60% van de rENaC-gemedieerde stroom en conductantie, terwijl de capaciteit van de membraan constant blijft. In deze studie wordt gesuggereerd dat Ni^{2+} rENaC inhibeert via effecten op de kinetica van het kanaal (46).

Toediening van 2.5 mM CdCl_2 blijkt tevens effect te hebben op endogene transportsystemen van de *Xenopus laevis* oöcyt. Bij positieve membraanpotentialen wordt een verhoogde activiteit van de uitwaartse stroom waargenomen. Het kan hier gaan om een uitstroom van K^+ ionen of een instroom van Cl^- ionen via endogene transporters.

In een tweede luik van het project was het oogmerk de isolatie van het mRNA van SGLT2 om dit tot expressie te brengen in *Xenopus laevis* oöcyten en het effect van cadmium te bestuderen met behulp van de TEVC techniek. De amplificatie van het compleet SGLT2 is

echter niet succesvol verlopen. Bijkomende experimenten zijn noodzakelijk om de bron van de problemen bij de amplificatie op te helderen.

Vertrekkend van de corticale delen van een muizennier wordt totaal RNA bekomen, dat dient als template voor de synthese van cDNA. mRNA komt niet altijd in dezelfde mate tot expressie in de cel. Het is mogelijk dat het mRNA van het beoogde proteïne (SGLT2) niet of onvoldoende tot expressie komt in de muizennieren waaruit het totaal RNA geïsoleerd is. In volgende experimenten zal gebruik gemaakt worden van SGLT2 primers die zorgen voor de amplificatie van slechts een kort fragment van het SGLT2. Op deze manier wordt er getest of het SGLT2 cDNA aanwezig is. Het is tevens mogelijk dat het geïsoleerde RNA van slechte kwaliteit is. Daarom zullen bij een volgende PCR primers voor het huishoudgen actine gebruikt worden. Dit experiment zal uitsluitsel geven over de kwaliteit van het RNA.

Er kan geconcludeerd worden dat de *Xenopus laevis* oöcyt een goed expressiesysteem is om de karakteristieken van rENaC te bestuderen. De experimenten tonen aan dat rENaC activiteit gereguleerd wordt door zowel natrium als cadmium. Verhoogde intracellulaire Na^+ concentraties inhiberen de activiteit van rENaC, terwijl cadmium de rENaC activiteit stimuleert. Cadmium blijkt enkel effect te hebben in hoge concentraties (2.5 mM) die een te hoge toxiciteit hebben. Het nefrotoxisch effect van cadmium ter hoogte van ENaC in de distale tubulus is dus van ondergeschikt belang. Door gebruik te maken van de grote affiniteit van cadmium voor SH groepen kan het zware metaal wel gebruikt worden om structurele eigenschappen van ENaC te analyseren.

Referenties

- 1 Thévenod F. Nephrotoxicity and the proximal tubule. *Nephron Physiol* 2003;93:87-93.
- 2 Zalups RK, Ahmad S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003;186:163-88.
- 3 ATSDR, 1999. Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.html>
- 4 Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Cougnon M, Poujeol P. Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol* 2005;99:105-10.
- 5 Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology* 1999;39:267-94
- 6 Erfurt C, Roussa E, Thévenod F. Apoptosis by Cd²⁺ or CdMT in proximal tubule cells: different uptake routes and permissive role of endo/lysosomal CdMT uptake. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:1367-76.
- 7 Satoh M, Koyama H, Kaji T, Kito H, Tohyama C. Perspectives on cadmium toxicity research. *Tohoku J Exp Med* 2002;196:23-32.
- 8 Blumenthal SS, Lewand DL, Buday MA, Kleinman JG, Krezoski K, Petering DH. Cadmium inhibits glucose uptake in primary cultures of mouse cortical tubule cells. *Am J Physiol* 1990;258:1625-33.
- 9 Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Poujeol P, Cougnon M. Acute study of interaction between cadmium, calcium and zinc transport along the rat nephron in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:1067-75.
- 10 Felley-Bosco E, Diezi J. Fate of cadmium in rat renal tubules: A microinjection study. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;91:204-11.
- 11 Thévenod F, Friedmann JM. Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na⁺-K⁺-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *The FASEB Journal* 1999;13:1751-61.
- 12 Tsuruoka S, Sugimoto KI, Muto S, Nomiyama K, Fujimura A, Imai M. Acute effect of cadmium-metallothionein on glucose and amino acid transport across the apical membrane of the rabbit proximal tubule perfused in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2000;292:769-77.
- 13 Xia X, Wang G, Peng Y, Tu MG, Jen J, Fang H. The endogenous CXXC motif governs the cadmium sensitivity of the renal Na⁺/glucose co-transporter. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1257-65.
- 14 Wright EM, Turk E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 2004;447:510-518.
- 15 Wright EM. Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:10-8.
- 16 Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology*. Philadelphia: Saunders;2003.
- 17 Wright EM, Loo DDF, Hirayama BA, Turk E. Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology* 2004;19:370-6.
- 18 Mackenzie B, Loo DDF, Wright EM. Relationships between Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. *J Membrane Biol* 1998;162:101-6.
- 19 Kellenberger S, Schild L. Epithelial Sodium Channel/Degenerin Family of ion channels: A variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 2002;82:735-67.

-
- 20 Gormley K, Dong Y, Sagnella GA. Regulation of the epithelial sodium channel by accessory proteins. *Biochem J* 2003;371:1-14.
 - 21 Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ is made of three homologous subunits. *Nature* 1994;367:463-467.
 - 22 Sheng S, Perry CJ, Kashlan OB, Kleyman TR. Side chain orientation of residues lining the selectivity filter of epithelial Na⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280:8513-22.
 - 23 Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and company;2002.
 - 24 Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 1971;233:177-82.
 - 25 Rudy B, Iverson LE. *Methods in Enzymology Volume 207 Ion Channels*. San Diego: Academic Press, Inc;1995.
 - 26 Weber WM. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999;1421:213-33.
 - 27 Sigel E, Minier F. The *Xenopus* oocyte: System for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:228-34.
 - 28 Segal A. Characterization of ion transport systems heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes. Doctoraatsthesis K.U.Leuven, Faculteit geneeskunde, departement moleculaire celbiologie, laboratorium voor fysiologie; 2004-2005.
 - 29 Miller AJ, Zhou JJ. *Xenopus* oocytes as an expression system for plant transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;1465:343-58.
 - 30 Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Bröer S. The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cellular Physiol Biochem* 2000;10:1-12.
 - 31 Weber WM, Schwarz W, Passow H. Endogenous D-glucose transport in oocytes of *Xenopus laevis*. *J Membrane Biol* 1989;111:93-102.
 - 32 Reed TB. Guidance on the housing and care of the African clawed frog *Xenopus laevis*. Research Animals Department – RSPCA, 2005.
URL: <http://www.rspca.org.uk/>
 - 33 Sive HL, Grainger R, Harlard R. *Early development of Xenopus laevis: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000.
 - 34 Weber WM, Cuppens H, Cassiman JJ, Clauss W, Van driessche W. Capacitance measurements reveal different pathways for the activation of CFTR. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 1999; 438: 561-9.
 - 35 RNeasy® Mini Handbook, Qiagen, 2006.
URL: <http://www1.qiagen.com/literature/protocols/RNeasyMini.aspx>
 - 36 Reverse transcription system technical bulletin No.099, Promega corporation, 2002.
URL: <http://www.promega.com/tbs/tb099/tb099.pdf>
 - 37 Weber WM, Liebold KM, Reifarth FW, Clauss W. The Ca²⁺-induced leak current in *Xenopus* oocytes is indeed mediated through a Cl⁻ channel. *J Membrane Biol* 1995;148:263-75.

-
- 38 Segal A, Awayda MS, Eggermont J, Van Driessche W, Weber WM. Influence of voltage and extracellular Na⁺ on amiloride block and transport kinetics of rat epithelial Na⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 2002;443:882-891.
 - 39 Hille B. Ion channels of excitable membranes. Sunderland: Sinauer Associate, Inc;2001.
 - 40 Kroll B, Bremer S, Tümmler B, Kottra G, Frömter E. Sodium dependence of the epithelial sodium conductance expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch* 1991;419:101-7.
 - 41 Sheng S, Bruns JB, Kleyman TR. Extracellular histidine residues crucial for Na⁺ self-inhibition of epithelial Na⁺ channels. *The journal of biological chemistry* 2004; 279: 9743-9.
 - 42 Awayda MS. Regulation of the epithelial Na⁺ channel by intracellular Na⁺. *Am J Physiol Cell Physiol* 1999;277:216-24.
 - 43 Volk T, Konstas A-A, Bassalay P, Ehmke H, Korbmacher C. Extracellular Na⁺ removal attenuates rundown of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by reducing the rate of channel retrieval. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 2004; 447:884-94.
 - 44 Suwalsky M, Norris B, Cardenas H. Effects of cadmium on Na⁺ transport in the isolated skin of the toad *Pleurodema thaul*. *Journal of Inorganic biochemistry* 2005;99:2362-71.
 - 45 Natochin YV, Jones MM. Chelating agent reversal of cadmium effects on ionic transport in the isolated frog skin (*Rana temporaria*). *Comp Biochem Physiol C* 1992;101(3):531-5.
 - 46 Segal A, Cucu D, Van Driessche W, Weber WM. Rat ENaC expressed in *Xenopus laevis* oocytes is activated by cAMP and blocked by Ni²⁺. *FEBS Letters* 2002;515:177-83.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen en uw akkoord te verlenen.

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Interacties van cadmium met het ionentransport in de nier

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2006**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt houdt in dat ik/wij als auteur de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij kan reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

U bevestigt dat de eindverhandeling uw origineel werk is, en dat u het recht heeft om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. U verklaart tevens dat de eindverhandeling, naar uw weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

U verklaart tevens dat u voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen hebt verkregen zodat u deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal u als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze licentie

Ik ga akkoord,

Ann SWIJSEN

Datum: