

Aus der Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie

(Prof. Dr. med. G. Burckhardt)

im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchungen zur Chloridabhängigkeit des
Sulfat-Anionen-Transporters 1**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Lotte Thöne

aus

Köln

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. phil. nat. B. C. Burckhardt

II. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Stühmer

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2013

Inhaltsverzeichnis

<u>1 EINLEITUNG</u>	1
1.1 Die Funktion von Sulfat im Organismus	1
1.2 Transport des Sulfats	3
1.3 Die <i>SLC13</i> -Genfamilie	5
1.4 Der natriumabhängige Sulfattransporter NaSi-1	5
1.5 Die <i>SLC26</i> -Genfamilie	6
1.6 Der humane Sulfat-Anionen-Transporter 1	9
1.7 Lokalisation des Sulfat-Anionen-Transporters 1	11
1.8 Transporteigenschaften des Sulfat-Anionen-Transporters 1	12
1.9 Regulation des Sulfat-Anionen-Transporters 1	14
1.10 Darstellung der Relevanz von sat-1 im Organismus anhand der sat-1- <i>knockout</i> -Maus	15
1.11 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	16
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	17
2.1 Chemikalien und Lösungen	17
2.1.1 Chemikalien für die elektrophysiologischen und radiochemischen Messungen	17
2.1.2 Kontrolllösungen für die elektrophysiologischen und radiochemischen Messungen	18
2.1.3 Testlösungen der elektrophysiologischen und radiochemischen Messungen ...	19
2.2 Verwendung von <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten als Expressionssystem	20
2.3 Elektrophysiologische Messungen	25
2.3.1 <i>Two-Electrode-Voltage-Clamp</i> : Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	25
2.3.2 Aufbau der Messapparatur	25
2.3.3 Vorgehensweise bei den elektrophysiologischen Messungen	28
2.4 Aufnahme von [³⁵ S]-markiertem Sulfat	28
<u>3 ERGEBNISSE</u>	31
3.1 Elektrophysiologische Versuche	31

3.1.1 Sulfatapplikation	31
3.1.2 Chloridersatz durch Gluconat, Thiocyanat und Nitrat	33
3.1.3 Reduktion der intrazellulären Chloridkonzentration der Oozyten durch Inkubation in chloridreduzierter ORi ₁	38
3.1.4 pH-Abhängigkeit der Aufnahme von Sulfat: Ansäuerung der Oozyten mit Ammoniumchlorid.....	42
3.1.5 Abhängigkeit der Sulfataufnahme von der extrazellulären Calciumchloridkonzentration.....	44
3.2 Radiochemische Aufnahmeversuche	47
3.2.1 Sat-1-Zeitreihe	47
3.2.2 Chloridabhängigkeit der Aufnahme von [³⁵ S]Sulfat	49
3.2.2.1 Chloridersatz durch Gluconat, Thiocyanat und Nitrat.....	49
3.2.2.2 Natriumchloridersatz durch Mannit	51
3.2.2.3 Aufnahme von Sulfat nach Inkubation der Oozyten in chloridreduzierter ORi ₁	52
3.2.3 pH-Abhängigkeit der Aufnahme von [³⁵ S]Sulfat: Ansäuerung der Oozyten mit Ammoniumchlorid.....	54
 <u>4 DISKUSSION</u>	 56
4.1 Oozyten des Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i>	56
4.2 Endogene Ionenkanäle der <i>Xenopus-laevis</i>-Oozyten	58
4.2.1 Die endogenen Chloridkanäle der <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten	58
4.3 Substrattransport durch sat-1: aktueller Stand	60
4.4 Einfluss des Chlorids auf den Sulfattransport durch sat-1	61
4.5 Einfluss des intrazellulären pH-Wertes auf den Sulfattransport durch sat-1	67
4.6 Einfluss des Calciums auf den Sulfattransport durch sat-1.....	70
 <u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>.....	 73
 <u>6 LITERATURVERZEICHNIS</u>.....	 75
 <u>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>.....	 82

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Abbildung</u>	<u>Seite</u>	<u>Abbildung</u>	<u>Seite</u>
Abbildung 1	1	Abbildung 14 B	36
Abbildung 2	4	Abbildung 15 A	37
Abbildung 3	11	Abbildung 15 B	37
Abbildung 4	21	Abbildung 16 A	37
Abbildung 5	22	Abbildung 16 B	37
Abbildung 6	22	Abbildung 17 A	38
Abbildung 7	23	Abbildung 17 B	38
Abbildung 8	25	Abbildung 18	42
Abbildung 9	27	Abbildung 19	44
Abbildung 10	27	Abbildung 20	47
Abbildung 11	29	Abbildung 21	49
Abbildung 12 A	33	Abbildung 22	51
Abbildung 12 B	33	Abbildung 23	52
Abbildung 12 C	33	Abbildung 24	54
Abbildung 13	36	Abbildung 25	55
Abbildung 14 A	36		

<u>Tabelle</u>	<u>Seite</u>
Tabelle 1	8
Tabelle 2	13
Tabelle 3	17
Tabelle 4	17
Tabelle 5	18
Tabelle 6	19
Tabelle 7	19
Tabelle 8	31
Tabelle 9	34
Tabelle 10	39
Tabelle 11	42
Tabelle 12	44
Tabelle 13	48
Tabelle 14	50
Tabelle 15	51
Tabelle 16	53
Tabelle 17	55

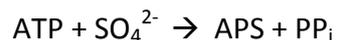
1 Einleitung

1.1 Die Funktion von Sulfat im Organismus

Sulfat ist das Salz der Schwefelsäure und beim Menschen mit einer Plasmakonzentration von 0,3 bis 0,5 mM das vierthäufigste Anion im Blut (BECKER et al. 1960). Es kann direkt durch die Nahrung aufgenommen werden oder durch Oxidation schwefelhaltiger Aminosäuren wie Cystein und Methionin im Körper selbst entstehen (MARKOVICH 2001).

Im menschlichen Organismus besitzt Sulfat zahlreiche physiologische und biosynthetische Funktionen und ist maßgeblich an Aktivierungs- und Detoxifikationsprozessen vieler endo- und exogener Substanzen beteiligt (FALANY 1997; MARKOVICH 2001). Sulfat liegt in wässrigen Medien fast ausschließlich als divalentes Anion, SO_4^{2-} , vor, lediglich im sauren Milieu des Magensaftes überwiegt das monovalente Anion HSO_4^- (COLE und EVROVSKI 2000). Die Konjugation, für die Sulfat mit Hilfe von ATP zu 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat, PAPS, aktiviert werden muss, stellt einen wichtigen Schritt in Hinblick auf die Detoxifikation von Pharmaka durch Sulfatierung im menschlichen Organismus dar (Abbildung 1). PAPS wird von vielen Sulfotransferasen benötigt (LOHR et al. 1998).

ATP-Sulfurase



APS-Phosphokinase



Abbildung 1: Syntheseweg von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS). Die Synthese von PAPS läuft in zwei Schritten ab, wobei im ersten Schritt Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) entsteht, das in einem zweiten Schritt über die APS-Phosphokinase in PAPS umgewandelt wird (Schema nach LOHR et al. 1998, S. 124).

Durch verschiedene Sulfotransferasen, die hauptsächlich in der Leber, aber auch in den Nieren vorkommen, wird im Rahmen der Biotransformation und Detoxifikation von

Xenobiotica, Steroiden, Katecholaminen und Gallensäuren Sulfat übertragen (FALANY 1997). Die Synthese zahlreicher aktiver biologischer Substrate ist sulfatabhängig: Die größte Gruppe in Säugetieren sind hier die sulfatierten Proteoglykane, die bezüglich ihrer Struktur und Funktion eine Hauptkomponente des Knochens und Knorpels darstellen (MARKOVICH 2001). In der Leber wird das Sulfat zur Aktivierung des Heparins benötigt (MARKOVICH und MURER 2004). Durch die Sulfatierung können verschiedene physiologische Aktivitäten beeinflusst werden, so führt zum Beispiel eine gesteigerte Sulfatierung von Heparansulfat und Dermatansulfat zu einer Verstärkung der antikoagulatorischen Wirkung (OFOSU et al. 1987). Bei Schwangeren ist eine deutliche Erhöhung des Sulfatspiegels messbar (COLE et al. 1985). Dies ist insbesondere auffällig, da der messbare Serumspiegel der meisten anderen im Blut gelösten Substanzen im Rahmen der physiologischen Hämodilution während der Schwangerschaft sinkt (LIND 1980). Die erhöhte Sulfatkonzentration im Serum von Feten verdeutlicht die wichtige Rolle des Sulfats im Hinblick auf Wachstum und Entwicklung (COLE et al. 1984). Es sind altersabhängige Änderungen der Sulfatkonzentration im Serum beobachtet worden, jedoch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (COLE und EVROVSKI 2000).

Sulfat als hydrophiles Anion ist im Blut nur geringfügig an Serumproteine gebunden (MARKOVICH 2001; MARKOVICH und ARONSON 2007). Durch renale Elimination wird der Sulfatspiegel konstant gehalten: Zunächst erfolgt die freie Filtration des Sulfats, gefolgt von einer starken Rückresorption im proximalen Tubulus. Die Rückresorption liegt dabei schon unter normalen Bedingungen fast bei der maximalen Rückresorptionsrate und führt zur Wiederaufnahme von 70 bis 90 % des frei filtrierte Sulfats (GOUDSMIT et al. 1939). Durch verstärkte Aufnahme von Sulfat kann es zu einem Anstieg des Plasmasulfatspiegels um das Zweifache kommen. Eine kompensatorisch erhöhte Ausscheidung von Sulfat im Urin ermöglicht in diesem Fall das Erreichen des normalen Spiegels innerhalb von zwölf Stunden (MARKOVICH 2001; MARKOVICH und ARONSON 2007). Bei akutem Nierenversagen steigt die Konzentration des Sulfats im Serum auf 2 bis 8 mM an (COLE und EVROVSKI 2000).

Störungen des Sulfathaushalts und des Sulfattransports können zahlreiche schwerwiegende Folgen für den menschlichen Organismus mit sich bringen. Einige dieser Störungen werden als Beispiele in Kapitel 1.5 beschrieben.

1.2 Transport des Sulfats

Die intrazelluläre Sulfatkonzentration kann durch die intrazelluläre Hydrolyse von Sulfokonjugaten, die Oxidation schwefelhaltiger Aminosäuren oder aber durch den Transport von Sulfat über die Zellmembran konstant gehalten werden, wobei letzteres der entscheidende Prozess ist (MARKOVICH 2001). Da in jeder Zelle Sulfotransferasen vorhanden sind und das Anion hydrophil ist, sind spezielle Transportproteine für den Transport über die lipophilen Membranen notwendig (MARKOVICH 2001; MARKOVICH und ARONSON 2007).

Im Darm erfolgt die Aufnahme des mit der Nahrung aufgenommenen Sulfats vor allem im Ileum und Jejunum durch den luminal lokalisierten natriumabhängigen Transporter für Sulfat, NaSi-1 (MARKOVICH 2001; MURER und BURCKHARDT 1983). Dieser transportiert elektrogen drei Natrium-Ionen und ein Sulfat-Anion und wird sekundär aktiv angetrieben durch den Gradienten für Natrium, der durch die basolateral lokalisierte Natrium-Kalium-ATPase aufgebaut wird (BUSCH et al. 1994; MURER und BURCKHARDT 1983).

Das im Darm aufgenommene Sulfat wird im Blut nicht an Protein gebunden transportiert. Die wichtigsten Organe bezüglich der Aufgaben des Sulfats im menschlichen Organismus und der Konstanthaltung des Sulfatspiegels sind Niere und Leber (COLE und EVROVSKI 2000). Abbildung 2 stellt den Sulfattransport in den proximalen Tubuluszellen und in den Hepatozyten dar.

Die Niere ist das am besten erforschte Organ im Hinblick auf die vorhandenen Sulfattransporter (MARKOVICH und ARONSON 2007). Die freie Filtration, der aber nur eine fraktionelle Exkretion von ungefähr 10 % folgt, setzt eine suffiziente Reabsorption durch Transportproteine voraus, die im proximalen Tubulus stattfindet (GOUDSMIT et al. 1939; HIERHOLZER et al. 1960). Dort wird das Sulfat zunächst über den in der Bürstensaummembran lokalisierten natriumabhängigen Sulfattransporter 1, NaSi-1 (Genname: *SLC13A1*), aus dem Urin in die Zelle aufgenommen. An der basolateralen Membran wird das Sulfat durch den Sulfat-Anionen-Transporter 1, sat-1 (Genname: *SLC26A1*), aus der Zelle des proximalen Tubulus ins Blut abgegeben. sat-1 arbeitet dabei als Sulfat-Oxalat- beziehungsweise Sulfat-Bicarbonat-Austauscher (KRICK et al. 2009). Das im Austausch gegen Sulfat aufgenommene Bicarbonat wird an der basolateralen Membran über

den Natrium-Bicarbonat/Carbonat-Cotransporter, NBC1 (Genname: *SLC4A4*), aus der Zelle transportiert, um den pH-Wert in der Zelle und im Blut konstant zu halten (ROMERO und BORON 1999; ROMERO et al. 1997). Der Formiat-Anionen-Antiporter CFEX (Genname: *SLC26A6*) ist unter anderem in der Bürstensaummembran proximaler Tubuli lokalisiert (KNAUF et al. 2001). Eine Funktion von CFEX ist die Ausscheidung des Oxalats, das ein metabolisches Endprodukt darstellt (JIANG et al. 2002).

In den Hepatozyten ist die Aufnahme des Sulfats aufgrund der zahlreichen dort stattfindenden Sulfatierungsprozesse erforderlich. Das Sulfat wird über den in der sinusoidalen Membran lokalisierten *sat-1* aufgenommen. Im Austausch gegen Sulfat erfolgt die Ausscheidung des Stoffwechselmetaboliten Oxalat (KRICK et al. 2009). *Sat-1* kommt somit sowohl im hepatischen als auch im renalen Sulfatmetabolismus eine entscheidende Rolle zu.

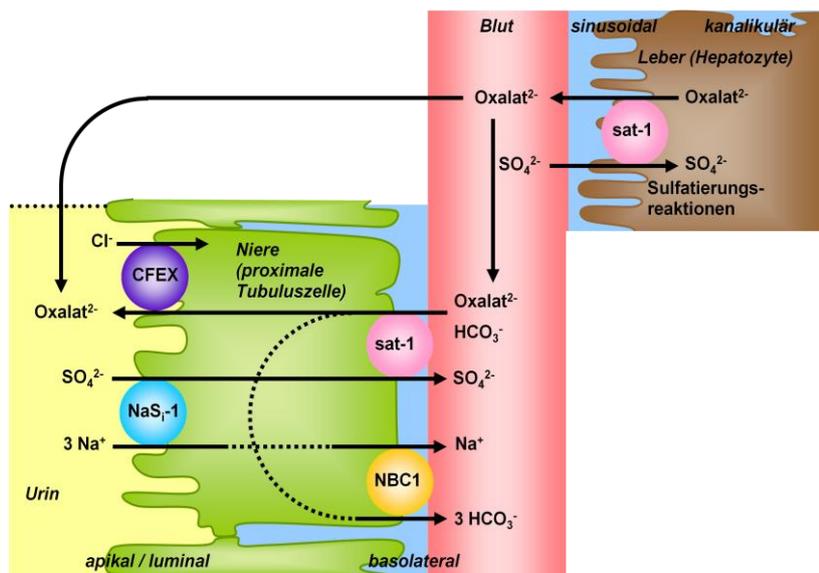


Abbildung 2: Mechanismus der Aufnahme von Sulfat in proximale Tubuluszellen und Hepatozyten. Die Resorption von Sulfat aus dem Ultrafiltrat erfolgt in den proximalen Tubuluszellen über den natriumabhängigen Sulfattransporter 1 (*NaSi-1*). Aus den Tubuluszellen wird Sulfat über einen Sulfataustauscher (*sat-1*) in das Blut abgegeben. Über die sinusoidale Membran der Hepatozyten wird Sulfat über *sat-1* im Austausch gegen in den Hepatozyten gebildetes Oxalat aufgenommen. Dieses Oxalat wird im Blut wieder zu den Nieren transportiert und dort entweder frei filtriert oder über *sat-1* im Austausch gegen Sulfat aufgenommen und über den CFEX, einen Chlorid-Formiat-Austauscher, in den Urin abgegeben. NBC1, der Natrium-Bicarbonat/Carbonat-Cotransporter 1, transportiert Natrium und Bicarbonat aus den Zellen des proximalen Tubulus ins Blut (Abbildung modifiziert aus KRICK et al. 2009, S. F152).

1.3 Die SLC13-Genfamilie

Die Mitglieder der Genfamilie der *Solute Linked Carrier 13 (SLC13)* lassen sich in zwei funktionell nicht verwandte Gruppen einteilen. Es wird unterschieden zwischen den Natrium-Sulfat-Cotransportern sowie den Natrium-Carboxylat-Cotransportern (MARKOVICH und MURER 2004). Zu den Natrium-Sulfat-Cotransportern gehören der natriumabhängige Sulfattransporter 1, NaSi-1 oder NaS1, und ein weiterer natriumabhängiger Sulfattransporter, SUT-1 oder auch NaS2, auf den in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird (GIRARD et al. 1999; MARKOVICH und MURER 2004; MARKOVICH et al. 1993; PAJOR 2006). Die natriumabhängigen Dicarboxylattransporter, NaDC-1 und NaDC-3, und der natriumgekoppelte Citrattransporter, NaCT, bilden die Gruppe der Natrium-Carboxylat-Cotransporter (MARKOVICH und MURER 2004; PAJOR 2006). Tetraoxyanionen werden hauptsächlich über den natriumabhängigen Sulfattransporter 1 transportiert, Substrate der natriumabhängigen Dicarboxylattransporter und des natriumgekoppelten Citrattransporters sind Produkte des Citratzyklus (MARKOVICH und MURER 2004; PAJOR 2000). Die Transporter arbeiten elektrogen, das heißt sie transportieren eine Überschussladung (PAJOR 2000). In vielen Spezies ist die Funktion der Transporter noch nicht geklärt. Die Transporter sind in vielen Geweben nachweisbar, vor allem jedoch in der Niere und im Gastrointestinaltrakt (MARKOVICH und MURER 2004).

1.4 Der natriumabhängige Sulfattransporter NaSi-1

Der natriumabhängige Sulfattransporter, NaSi-1, ist ein Vertreter der *SLC13*-Genfamilie. Bislang konnten drei NaSi-1 entdeckt werden: hNaSi-1, der mit Northern Blot und RT-PCR nur in der Niere nachgewiesen wurde (LEE A et al. 2000), rNaSi-1, der mittels Northern Blot in Niere und Dünndarm gefunden wurde (MARKOVICH et al. 1993), und mNaSi-1, der mit Hilfe von Northern Blot und RT-PCR in Niere, Dünndarm, Colon und mit schwachen Signalen in Fettgewebe, Hoden, Nebenniere und Caecum detektiert wurde (BECK und MARKOVICH 2000). Die Differenzen bezüglich der nachgewiesenen Lokalisationen von NaSi-1 in den genannten Spezies sind gegebenenfalls mit auf die unterschiedlichen zum Nachweis benutzten Methoden zurückzuführen. Aufgrund seines Vorkommens im Darm und in der Niere ist NaSi-1 ein für die Sulfathomöostase essentieller Transporter.

NaSi-1 ist ein elektrogener Transporter, der natriumabhängig Sulfat, Thiosulfat und Selenat transportiert (BUSCH et al. 1994). Eine *cis*-Inhibition der Aufnahme von Sulfat konnte bei allen NaSi-1 Transportern durch Thiosulfat, Selenat, Tungstat und Molybdat, sowie bei hNaSi-1 zusätzlich durch Succinat und Citrat beobachtet werden (LEE A et al. 2000; MARKOVICH und ARONSON 2007).

Regulierend auf die Konzentration der NaSi-1-mRNA sowie die Expression des Proteins wirken *in vivo* unter anderem die Sulfataufnahme mit der Nahrung, Glukokortikoide, der Kaliumspiegel, die metabolische pH-Regulation sowie Vitamin D und Schilddrüsenhormone (FERNANDES et al. 1997; LEE HJ et al. 2000; MARKOVICH et al. 1998; MARKOVICH et al. 1999; PUTTAPARTHI et al. 1999; SAGAWA et al. 1999; TALLGREN 1980).

Das Fehlen von NaSi-1 in NaSi-1-*knockout*-Mäusen führt durch verminderte renale Reabsorption und damit vermehrte renale Ausscheidung zu Hyposulfatämien mit um 75 % reduzierten Sulfatkonzentrationen im Serum (DAWSON et al. 2003). Des Weiteren wurden bei NaSi-1-*knockout*-Mäusen unter anderem Wachstumsretardierung und Reduktion der Fertilität bei Weibchen sowie ein verstärktes Tumorstadium nachgewiesen (DAWSON et al. 2003; DAWSON et al. 2010b).

1.5 Die SLC26-Genfamilie

Die Gruppe der *Solute Linked Carrier 26* (SLC26) umfasst Anionentransporter mit unterschiedlichen Substratspezifitäten, die bei vielen Spezies vorhanden sind (Tabelle 1). Die zahlreichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser Genfamilie sind bisher nur unzureichend erforscht (OHANA et al. 2009). In einigen Geweben konnten Coexpressionen verschiedener Transporter nachgewiesen werden (CHANG et al. 2009)

Die Transporter der SLC26-Genfamilie werden durch elf Gene kodiert, von denen eines, SLC26A10, jedoch wahrscheinlich ein Pseudogen darstellt (OHANA et al. 2009). Es kann eine grobe Einteilung der Transporter in drei Hauptkategorien vorgenommen werden: Die Sulfattransporter, die Chlorid-Bicarbonat-Austauscher und die Anionenkanäle (DORWART et al. 2008; OHANA et al. 2009). Zu den Sulfattransportern gehören SLC26A1 und SLC26A2. SLC26A3, SLC26A4 und SLC26A6 stellen die Chlorid-Bicarbonat-Austauscher dar, SLC26A7

und *SLC26A9* die chloridtransportierenden Ionenkanäle (OHANA et al. 2009). Einzigartig ist dabei die Funktion von *SLC26A3* und *SLC26A6*, über die sowohl ein obligat gekoppelter Chlorid-Bicarbonat-Austausch als auch ein ungekoppelter Ionentransport stattfinden kann (OHANA et al. 2011). *SLC26A9* ist neben seiner Funktion als Chloridkanal ein Anionenaustauscher sowie ein Natrium-Anionen-Cotransporter und besitzt als einziges Mitglied der *SLC26*-Genfamilie die Fähigkeit der Kationenkoppelung (CHANG et al. 2009). Die Transportfunktion von *SLC26A8* und *SLC26A11* ist unbekannt (OHANA et al. 2009). Vorkommen und Transporteigenschaften der verschiedenen Transporter sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Der bei Säugetieren vorhandene *SLC26A5* funktioniert im Gegensatz zum dem bei Wirbellosen vorkommenden *SLC26A5* nicht als Transporter (OHANA et al. 2009). *SLC26A5*, oder auch Prestin, kodiert bei Säugern für ein membrangebundenes Motorprotein der äußeren Haarzelle im Innenohr. Spannungsabhängige Konformationsänderungen des Prestins führen zu Oszillationen der äußeren Haarzellen (ZHENG et al. 2000). Diese könnten durch einen inkompletten Transport von Chlorid und einen defekten Sulfattransport bei Säugern entstehen (SCHAECHINGER und OLIVER 2007). SCHAECHINGER und OLIVER (2007) wiesen neben einem Sulfat-Chlorid-Austausch durch *SLC26A5* in Zebrafischen einen Oxalat-Chlorid-Austausch durch *SLC26A5* in Hühnern nach. Des Weiteren wird angenommen, dass *SLC26A5* auch ein Chlorid-Formiat-Austauscher ist (OHANA et al. 2008).

Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Mitglieder der *SLC26*-Genfamilie und ihre transportierten Substrate sowie über die bislang nachgewiesenen Lokalisationen des mRNA-Nachweises.

Gen	Name	Transportierte Substrate	Nachweis von mRNA	Literaturstelle
SLC26A1	sat-1	Sulfat, Bicarbonat, Oxalat, Glyoxylat	Niere, Leber, Dünndarm, Skelettmuskel, Gehirn, Plazenta (siehe Kapitel 1.7)	BISSIG et al. 1994; LEE A et al. 2003; REGEER et al. 2003; SCHNEDLER et al. 2011
SLC26A2	DTDST*	Sulfat, Protonen, Hydroxylionen, Oxalat, Chlorid, Thiosulfat	ubiquitär, Chondrozyten, Fibroblasten, Osteoblasten	FORLINO et al. 2005; HÄSTBACKA et al. 1994; HÄSTBACKA et al. 1996; HENEGHAN et al. 2010
SLC26A3	DRA*	Sulfat, Chlorid, Bicarbonat	Dünndarm, Colon	MOSELEY et al. 1999; SILBERG et al. 1995
SLC26A4	Pendrin	Iodid, Chlorid, Bicarbonat	Schilddrüse, Speicheldrüse, Niere, Innenohr	EVERETT et al. 1997; ROYAUX et al. 2000; SHCHEYNIKOV et al. 2008
SLC26A5	Prestin	Kein Substrattransport bei Säugern, Motorprotein	Innenohr	DETRO-DASSEN et al. 2008; ZHENG et al. 2000
SLC26A6	CFEX*	Chlorid, Bicarbonat, Sulfat, Formiat, Oxalat, Hydroxylionen, Laktat, Fettsäuren	Dünndarm, Pankreas, Magen, Herz, Plazenta, Leber, Niere, Hoden, Gehirn, Lunge, Skelettmuskel	CHERNOVA et al. 2005; CLARK et al. 2008; JIANG et al. 2002; KNAUF et al. 2001; NOZAWA et al. 2004; WALDEGGER et al. 2001; WANG et al. 2002
SLC26A7		Chlorid	Magen, Niere	KIM et al. 2005; PETROVIC et al. 2003
SLC26A8	TAT1*	Sulfat	männliche Keimzellen	TOURE et al. 2007
SLC26A9		Chlorid, geringe Leitfähigkeit für Bicarbonat	Lunge, Magen, Niere, Gehirn, Herz, Dünndarm, Thymus, Milz, Ovar	DORWART et al. 2007; CHANG et al. 2009
SLC26A10		unbekannt, wahrscheinlich Pseudogen		OHANA et al. 2009
SLC26A11		unbekannt		OHANA et al. 2009

Tabelle 1: Mitglieder der SLC26-Genfamilie, *DTDST=Diatrophic dysplasia sulphate transporter, *DRA=Diarrhea anion transporter, *CFEX=Chloride-formate-exchanger, *TAT1=Testis anion transporter.

Defekte in den Genen der *SLC26*-Familie können zu zahlreichen schwerwiegenden Folgen im Organismus führen. Als Beispiele werde hier Mutationen in *SLC26A2*, *SLC26A3* und *SLC26A4* genannt.

DTDST, *SLC26A2*, ist der Transporter der *SLC26A6*-Familie, der am nächsten mit *sat-1* verwandt ist. Mutationen im Sulfat-2-Protonen-Cotransporter und Sulfat-Oxalat-beziehungsweise Sulfat-2-Hydroxidionen-Austauscher, der für die Sulfatierung von Proteoglykanen notwendig ist, können die letale Achondrogenese und Atelosteogenese sowie die diastrophe Dysplasie zur Folge haben (HÄSTBACKA et al. 1994; HÄSTBACKA et al. 1996; HENEGHAN et al. 2010; OHANA et al. 2009; SUPERTI-FURGA et al. 1996).

DRA, *SLC26A3*, ist ein DIDS-sensitiver natriumunabhängiger Sulfat-Oxalat-Transporter (SILBERG et al. 1995). Defekte in diesem Transporter führen zum Krankheitsbild der kongenitalen Chlorid-Diarrhoe (MOSELEY et al. 1999). Pränatal einsetzende Durchfälle führen zur Bildung eines Polyhydramnions, welches zu einer Frühgeburt führen kann (KERE et al. 1999). Außerdem liegen eine metabolische Alkalose, Dehydratation und Hyperbilirubinämie vor; letale Verläufe sind möglich (HOLMBERG 1986).

Pendrin, *SLC26A4*, arbeitet als Chlorid-Bicarbonat-, Chlorid-Iodid- und Iodid-Bicarbonat-Austauscher (SHCHEYNIKOV et al. 2008). Das Pendred-Syndrom wird durch Mutationen im *SLC26A4*-Gen verursacht. Die Iodidaufnahme in die Schilddrüse ist dabei gestört, es kommt zur Bildung einer Struma (SCOTT et al. 1999). Beeinträchtigungen des Gehörs sind ein weiteres auftretendes Merkmal (EVERETT et al. 1997).

1.6 Der humane Sulfat-Anionen-Transporter 1

Das humane Transportprotein *hsat-1* besteht aus 701 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von ungefähr 75 kDa (MARKOVICH 2001; REGEER et al. 2003). Das strukturell sehr ähnliche *rsat-1*-Protein der Ratte ist 703 Aminosäuren, das *msat-1*-Protein der Maus 704 Aminosäuren groß (MARKOVICH 2001). *hsat-1* weist deutliche Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz mit anderen Proteinen der *SLC26*-Genfamilie auf, unter anderem eine Übereinstimmung von 78 % mit *rsat-1* und 77 % mit *msat-1* sowie 44 % mit DTDST, *SLC26A2* (MARKOVICH 2001; MARKOVICH und ARONSON 2007; REGEER et al. 2003).

Das humane *hsat-1* kodierende Gen SAT1 liegt auf dem Chromosom 4 p 16.3 im Intron 2 des α -L-Iduronidase-Gens IDUA (CLARKE et al. 1994; REGEER et al. 2003). Mutationen des von IDUA kodierten Enzyms können zur Mukopolysaccharidose Typ I führen (REGEER et al. 2003).

SAT1 ist ungefähr 5,8 kb groß, die cDNA ist 3673 bp lang und enthält eine 5'-untranslatierte Region, die 378 bp lang ist, sowie eine 1189 bp lange 3'-untranslatierte Region. SAT1 umfasst vier Exons. Exon II ist ein optionales Exon, das eine zusätzlich mögliche „*Splice*“-Stelle darstellt und so die Voraussetzung für zwei unterschiedliche *hsat-1*-Transkripte ist. Die Lokalisation in der 5'-untranslatierten Region und die bislang unbekannte Auswirkung dieser verschiedenen „*Splice*“-Varianten lassen vermuten, dass die Aktivität des kodierten Proteins nicht beeinflusst wird (REGEER et al. 2003).

Das Startcodon befindet sich auf dem Exon III. Als für die Transkription von SAT1 ausreichend haben sich 135 bp des SAT1-Promotors herausgestellt. Die 135 bp enthalten zwei AP-4-Stellen und eine AP-1-Stelle. Bei einer Mutation im Bereich der AP-1 Stelle kommt es nahezu zum kompletten Verlust der Transkription. In dem kodierenden Promotor von SAT1 ist keine AP-1-Stelle vorhanden (REGEER et al. 2003).

Das *hsat-1*-Protein hat zwölf Transmembrandomänen sowie ein intrazellulär gelegenes COOH- beziehungsweise NH₂-Ende und ähnelt damit strukturell einigen anderen *SLC26*-Familienmitgliedern. Starke Ähnlichkeit besteht im Vergleich zu *msat-1* und *rsat-1* (Abbildung 3).

Das *hsat-1*-Protein enthält mehrere Sequenzabschnitte, die in allen *SLC26*-Mitgliedern vorhanden sind. Die funktionelle Bedeutung dieser Sequenzen, wie unter anderem der Sulfattransportersignatur PROSITE PS01130 und der Phosphopantetheinbindungsstelle PROSITE PS00012, ist allerdings noch nicht bekannt (REGEER et al. 2003).

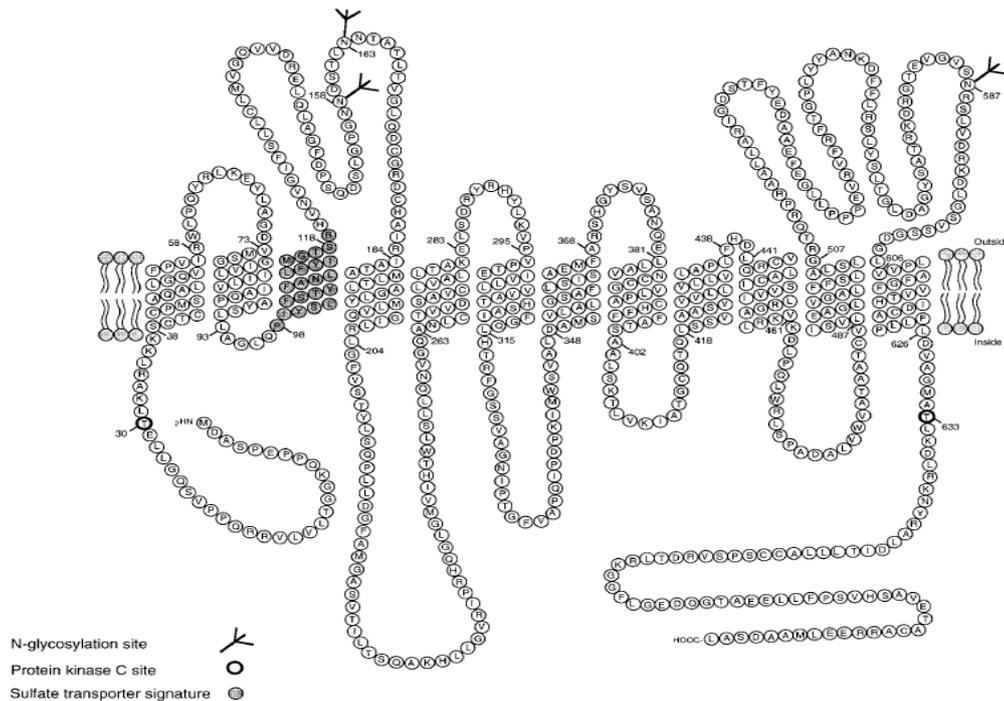


Abbildung 3: Das dem *hsat-1*-Protein strukturell sehr ähnliche *rsat-1*-Protein der Ratte mit Darstellung der zwölf Transmembrandomänen mit drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen und putativen Phosphorylierungsstellen, sowie intrazellulär liegendem C- und N-Terminus (Abbildung aus MARKOVICH 2001, S. 1514).

1.7 Lokalisation des Sulfat-Anionen-Transporters 1

Eine *hsat-1*-mRNA-Expression konnte mit Hilfe der PCR in Niere und Leber, sowie in Pankreas, Hoden, Prostata, Gehirn, Dünndarm, Dickdarm, Thymus, Milz und Leukozyten nachgewiesen werden (REGEEER et al. 2003).

Sat-1-mRNA der Ratte konnte mit Northern Blot nur in Niere, Leber, Gehirn und Skelettmuskel nachgewiesen werden, wobei Gehirn und Skelettmuskel einen geringeren *sat-1*-mRNA-Gehalt aufwiesen (BISSIG et al. 1994; REGEEER et al. 2003).

Die Expression von *msat-1*-mRNA war am stärksten in Niere und Leber. Eine geringe Anzahl von Transkripten konnte mit Hilfe der PCR in Caecum, Gehirn, Kalotte, Skelettmuskel und Herz (LEE A et al. 2003) sowie in der Plazenta nachgewiesen werden (DAWSON et al. 2012).

Die unterschiedlichen mRNA-Expressionsmuster können gegebenenfalls auf die verschiedenen Nachweismethoden zurückzuführen sein.

1.8 Transporteigenschaften des Sulfat-Anionen-Transporters 1

Bezüglich des Transports durch den Sulfat-Anionen-Transporter 1 muss zwischen *hsat-1*, *rsat-1* und *msat-1* unterschieden werden.

Der *hsat-1* transportiert Sulfat, Oxalat und Chlorid, aber kein Formiat. Der Sulfattransport, der eine K_m von $0,19 \pm 0,066$ mM im Experiment mit *Xenopus-laevis*-Oozyten aufweist, wird durch strukturell verwandte Tetraoxyanionen wie Molybdat, Selenat und Tungstat sowie durch Thiosulfat, Stilbenderivate und Phenolrot gehemmt. Glucose und Citrat zeigten keinen Einfluss auf die Aufnahme von Sulfat. Die Injektion von *hsat-1*-mRNA in Oozyten von *Xenopus laevis* führt zu einer 40-fachen Steigerung der Aufnahme von Sulfat in die Oozyten, einer sechsfachen Steigerung der Oxalataufnahme und einer fünffachen Steigerung der Chloridaufnahme im Vergleich zu wasserinjizierten Oozyten (REGGER et al. 2003).

Rsat-1 transportiert Sulfat mit einer K_m von 0,14 mM (BISSIG et al. 1994). Weitere transportierte Substrate sind Bicarbonat, Oxalat und Glyoxylat (KARNISKI et al. 1998; KRICK et al. 2009; SCHNEDLER et al. 2011). Ob Chlorid durch *rsat-1* transportiert wird oder allosterisch moduliert, ist weiterhin unklar (KRICK et al. 2009). DIDS, SITS, Probenecid und Phenolrot sowie Acetazolamid, Thiosulfat und Sulfit wirken hemmend auf die Aufnahme von Sulfat über *rsat-1* (KRICK et al. 2009; MARKOVICH et al. 1994; QUONDAMATTEO et al. 2006). Durch Cholat und Succinat sowie Sulfid und Sulfamat konnte keine Hemmung nachgewiesen werden (BISSIG et al. 1994; KRICK et al. 2009; MARKOVICH et al. 1994).

Im Versuch mit *Xenopus-laevis*-Oozyten transportiert *msat-1* Sulfat chloridabhängig mit einer K_m von $0,31 \pm 0,05$ mM. Weitere transportierte Substrate sind Oxalat und Chlorid, aber kein Formiat, L-Leucin und Succinat. Auf die Sulfataufnahme über *msat-1* hemmend wirken Molybdat, Selenat, Tungstat, DIDS, Thiosulfat, Phenolrot und Probenecid. Ohne Einfluss auf die Sulfataufnahme blieben Citrat und Glucose. In Abwesenheit von extrazellulärem Chlorid findet kein Sulfattransport statt. Die Injektion von *msat-1* in *Xenopus-laevis*-Oozyten führt zu einer 20-fachen Steigerung der Aufnahme von Sulfat im Vergleich zu wasserinjizierten Oozyten, sowie zu einer Steigerung der Chlorid- und Oxalataufnahme um das Sechsfache (LEE A et al. 2003).

Tabelle 2 stellt eine Übersicht über die Transporteigenschaften von *hsat-1*, *msat-1* und *rsat-1* dar.

	hsat-1	rsat-1	msat-1
Transport radioaktiv markierter Substrate durch sat-1			
Sulfat	+	+	+
Oxalat	+	+	+
Bicarbonat			
Glyoxylat		+	
Chlorid	+		+
L-Leucin			-
Formiat	-	-	-
Hemmung der Aufnahme von [³⁵S] Sulfat			
Thiosulfat	+	+	+
Sulfit		+	
Sulfid		-	
Sulfamat		-	
DIDS	+	+	+
SITS		+	
Probenecid		+	+
Molybdat	+		+
Selenat	+		+
Tungstat	+		+
Phenolrot	+	+	+
Citrat	-		-
Glucose	-		-
Succinat		-	
Cholat		-	
Acetazolamid		-	
Abhängigkeit der Sulfataufnahme			
Chlorid			+
pH		+	+

Tabelle 2: Transporteigenschaften von *hsat-1*, *rsat-1* und *msat-1* (BISSIG et al. 1994; KRICK et al. 2009; LEE A et al. 2003; MARKOVICH et al. 1994; REGEER et al. 2003; QUONDAMATTEO et al. 2006; SCHNEDLER et al. 2011; XIE et al. 2002).

1.9 Regulation des Sulfat-Anionen-Transporters 1

In der SAT1 Promotorregion sind zahlreiche potentielle *cis-acting elements* vorhanden, die für die Regulation von SAT1 bedeutsam sein können. Des Weiteren befinden sich in dieser Region Elemente, die durch Vitamin D sowie das Schilddrüsenhormon Triiodthyronin stimulierbaren Elementen strukturell sehr ähnlich sind (REGGEER et al. 2003). Es konnte jedoch kein direkter Einfluss von Vitamin D und Schilddrüsenhormonen auf das *hsat-1* kodierende Gen, wohl aber eine Aktivierung des *msat-1* Promotors durch Schilddrüsenhormone nachgewiesen werden (LEE A et al. 2003; REGGEER et al. 2003).

Im SAT1 Gen sind zwei *N*-Glykosylierungsstellen vorhanden, in dem für *rsat-1* kodierenden Gen finden sich drei (BISSIG et al. 1994; REGGEER et al. 2003). Die Möglichkeit der Phosphorylierung ist bei *hsat-1* an sieben Stellen durch Vorhandensein der Proteinkinase C, an sieben weiteren Stellen durch die Caseinkinase II sowie an einer Thyrosin-Phosphorylierungsstelle gegeben (REGGEER et al. 2003).

Da SAT1 im IDUA Gen lokalisiert ist (CLARKE et al. 1994), wurde zunächst von wechselseitigen Effekten von SAT1 und IDUA ausgegangen. Eine selektive Unterbrechung im IDUA Gen von Mäusen führte jedoch nicht zu Veränderungen der *sat-1*-mRNA-Level, ebenso hatte das Fehlen von *sat-1* in *sat-1-knockout*-Mäusen keinen Einfluss auf die funktionelle Aktivität des IDUA Gens (DAWSON et al. 2010a).

Es konnten klare Geschlechtsunterschiede bezüglich der Expression von *sat-1* festgestellt werden. Bei männlichen Ratten war die *sat-1*-Expression im Vergleich zu den weiblichen Tieren deutlich verstärkt, bei denen die Expression in der Leber durch Estradiol und Progesteron herunterreguliert ist (BRZICA et al. 2009). In Versuchen mit trächtigen Mäusen konnte zudem in der frühen Schwangerschaft eine verstärkte renale Expression von *msat-1* nachgewiesen werden, die Expression im Darm blieb unbeeinträchtigt (DAWSON et al. 2012).

Bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz konnte eine erhöhte Serumkonzentration von Sulfat gemessen werden (MICHALK et al. 1981). In Versuchen mit Ratten, die an einer chronischen Niereninsuffizienz litten, konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der *sat-1*-mRNA-Konzentration und der Proteinexpression nachgewiesen werden (FERNANDES et al. 2001; FREEL und HATCH 2012). Ratten, bei denen eine Hyperoxalurie ohne

Niereninsuffizienz vorlag, wiesen jedoch keine Veränderung der Expression von sat-1 auf (FREEL und HATCH 2012).

SCHNEDLER et al. (2011) wiesen eine erhöhte sat-1-mRNA-Konzentration und Proteinexpression in Zellen der humanen hepatozellulären Leberkarzinom Zelllinie, HepG2, nach Behandlung mit Glyoxylat nach.

1.10 Darstellung der Relevanz von sat-1 im Organismus anhand der sat-1-knockout-Maus

Um eine Darstellung der physiologischen Aufgaben von sat-1 *in vivo* zu ermöglichen, wurden mit Hilfe der Gen-Disruption sat-1-*knockout*-Mäuse gezüchtet (DAWSON et al. 2010a).

In den sat-1-*knockout*-Mäusen wurde im Vergleich zu Mäusen vom Wildttyp kein Unterschied bezüglich des Gewichts der Tiere oder der Histologie der Leber und des Gehirn festgestellt. In Niere, Leber, distalem Ileum, Caecum und proximalem Colon wurde jedoch eine starke Reduktion der Sulfat- und Oxalataufnahme nachgewiesen.

Die Oxalatkonzentration im Plasma von sat-1-*knockout*-Mäusen stieg im Vergleich zu den physiologischen Werten der Mäuse vom Wildttyp um ungefähr 60 % an, die Hyperoxalämie führte eine Hyperoxalurie mit sich. Die Sulfatkonzentration im Plasma war um 60 % reduziert, somit war eine deutliche Hyposulfatämie feststellbar. Im Urin war die Konzentration des Sulfats erhöht.

Die sulfatabhängige Detoxifikation in der Leber erwies sich in den sat-1-*knockout*-Mäusen als stark eingeschränkt. Die Gabe von einer unter physiologischen Bedingungen problemlos mit Sulfat detoxifizierten Dosis Acetamionophen führte zu einer deutlichen Leberzellnekrose in den sat-1-*knockout*-Mäusen.

In den Rinden- und äußeren Markbereichen der Niere sowie in der Harnblase der sat-1-*knockout*-Mäuse entstanden kristalline Ablagerungen aus Calciumoxalat (DAWSON et al. 2010a). Eine die Löslichkeit von Calciumsalzen steigernde Wirkung von Sulfat im Urin ist bekannt (COLE und EVROVSKI 2000).

Das Entstehen der Calciumoxalatsteine in den ableitenden Harnwegen der sat-1-*knockout*-Mäuse lässt auf eine bedeutsame Rolle des Oxalattransports durch sat-1

schließen. Als Ursache der Hyperoxalämie wurde zunächst eine reduzierte intestinale Sekretion des Oxalats durch sat-1 vermutet, neuere Versuche zeigten jedoch, dass die Oxalatsekretion in sat-1-*knockout*-Mäusen nicht reduziert ist (DAWSON et al. 2010a; KO et al. 2012). Die Sekretion des Oxalats zeigte sich in diesen Versuchen als unabhängig von der Sulfat- und Bicarbonatkonzentration (KO et al. 2012).

1.11 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Chlorid auf den Sulfat-Anionen-Transporter 1 der Ratte durch die Untersuchung des Transportverhaltens von sat-1 in chloridreichen und chloridarmen Lösungen zu untersuchen. Weiterhin wurde in dieser Arbeit untersucht, wie der Sulfattransport über sat-1 durch eine Veränderung des intrazellulären pH-Wertes der Oozyte durch Ansäuerung mit Ammoniumchlorid beeinflusst wird und wie eine erhöhte extrazelluläre Calciumchloridkonzentration das Membranpotential der Oozyten beeinflusst.

Bislang ist nicht vollständig geklärt, welches intrazelluläre Anion sat-1 gegen Sulfat austauscht. Substrate von sat-1 sind Sulfat, Bicarbonat, Oxalat und Glyoxylat. Die Wirkung von Chlorid auf sat-1 scheint speziesabhängig zu sein (KRICK et al. 2009). In Versuchen mit hsat-1 und msat-1 konnte eine deutlich gesteigerte Chloridaufnahme in sat-1-exprimierenden Oozyten im Vergleich zu wasserinjizierten Oozyten nachgewiesen werden (LEE A et al. 2003; REGEER et al. 2003). KRICK et al. (2009) wiesen in rsat-1-exprimierenden Oozyten in chloridhaltigen Medien einen höheren Sulfatefflux als in chloridfreien Medien nach. Unklar ist jedoch, wie Chlorid genau auf den Sulfat-Anionen-Transporter 1 der Ratte wirkt. Möglich wären ein Symport, ein Antiport oder eine allosterische Modulation durch Chlorid.

Für die Versuche wurde rsat-1-cRNA in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* injiziert. Wasserinjizierte Oozyten dienten als Kontrolle. Zunächst wurden elektrophysiologische Versuche im „*Current-Clamp-Modus*“ durchgeführt. Nach einer festgelegten Inkubationszeit ließ die Messung des elektrophysiologischen Potentials der Oozyten während der Perfusion mit Kontroll- und Testlösungen Rückschlüsse auf den Transport von Ionen über die Zellmembran zu. In den durchgeführten radiochemischen Versuchen wurde die Aufnahme radioaktiv markierten Sulfats gemessen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

2.1.1 Chemikalien für die elektrophysiologischen und radiochemischen Messungen

	Molekulargewicht [g/mol]	Bezugsfirma
NaCl (Natriumchlorid)	58,44	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaC ₆ H ₁₁ O ₇ (Natriumgluconat)	218,13	Merck, Darmstadt
NaSCN (Natriumthiocyanat)	81,07	Fluka Chemika AG, Buchs
NaNO ₃ (Natriumnitrat)	84,99	Merck, Darmstadt
Na ₂ SO ₄ (Natriumsulfat)	142,04	Merck, Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid)	74,56	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
KC ₆ H ₁₁ O ₇ (Kaliumgluconat)	234,25	AppliChem GmbH, Darmstadt
KSCN (Kaliumthiocyanat)	97,18	Merck, Darmstadt
KNO ₃ (Kaliumnitrat)	101,11	Merck, Darmstadt
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	147,02	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES*	238,31	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid)	53,49	Merck, Darmstadt
C ₆ H ₁₄ O ₆ (Mannit)	182,17	AppliChem GmbH, Darmstadt

Tabelle 3: Angabe des Molekulargewichtes und der Bezugsfirmen der verwendeten Substrate; * HEPES: N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(Ethansulfonsäure).

	Spezifische Aktivität [Ci/mmol]	Bezugsfirma
[³⁵ S]-markiertes H ₂ SO ₄	1,200	Hartmann, Braunschweig

Tabelle 4: Angabe der spezifischen Aktivität und der Bezugsfirma des verwendeten [³⁵S]-markierten H₂SO₄.

2.1.2 Kontrolllösungen für die elektrophysiologischen und radiochemischen Messungen

Die Lagerung der für die Versuche verwendeten Oozyten erfolgte in Oozytenringerlösung, die im Folgenden als OR_i bezeichnet wird (Tabelle 5). Alle verwendeten Lösungen wurden mit Trishydroxymethylaminomethan, Tris, auf einen pH-Wert von 7,5 titriert.

Variationen der extrazellulären Anionen

In der chloridreduzierten Kontrolllösung OR_i wurden Natriumchlorid (NaCl) und Kaliumchlorid (KCl) durch eine äquimolare Menge Natriumgluconat (NaC₆H₁₁O₇) und Kaliumgluconat (KC₆H₁₁O₇) ersetzt. In der chloridreduzierten OR_{i2} wurden statt Natriumchlorid und Kaliumchlorid Natriumthiocyanat (NaSCN) und Kaliumthiocyanat (KSCN) verwendet, die chloridreduzierte OR_{i3} enthielt statt Natriumchlorid und Kaliumchlorid äquimolare Mengen Natriumnitrat (NaNO₃) und Kaliumnitrat (KNO₃).

	OR _i (mM)	OR _{i1} (mM)	OR _{i2} (mM)	OR _{i3} (mM)
NaCl	110	-	-	-
NaC ₆ H ₁₁ O ₇	-	110	-	-
NaSCN	-	-	110	-
NaNO ₃	-	-	-	110
KCl	3	-	-	-
KC ₆ H ₁₁ O ₇	-	3	-	-
KSCN	-	-	3	-
KNO ₃	-	-	-	3
CaCl ₂	2	2	2	2
HEPES	5	5	5	5

Tabelle 5: Zusammensetzung der Kontrolllösungen OR_i, OR_{i1}, OR_{i2} und OR_{i3} mit Variationen der extrazellulären Anionen; OR_i= Oozytenringerlösung.

Variation des extrazellulären Calciumchloridgehaltes

Die Kontrolllösung ORi_4 enthielt eine im Vergleich zu den anderen Kontrolllösungen erhöhte Calciumchloridkonzentration von 4 mM. ORi_5 enthielt 6 mM Calciumchlorid.

	ORi_4 (mM)	ORi_5 (mM)
$NaC_6H_{11}O_7$	110	110
$KC_6H_{11}O_7$	3	3
$CaCl_2$	4	6
HEPES	5	5

Tabelle 6: Variation der extrazellulären Calciumchloridkonzentration in den Lösungen ORi_4 und ORi_5 . Als Kontrolle diente ORi (siehe Tabelle 5, Calciumkonzentration 2 mM).

Veränderung des intraozytären pH-Wertes

Die ammoniumchloridhaltige Kontrolllösung ORi_{NH_4Cl} enthielt neben Natrium-, Kalium- und Calciumchlorid und HEPES zusätzlich 10 mM NH_4Cl .

	ORi_{NH_4Cl} (mM)
NaCl	110
KCl	3
$CaCl_2$	2
HEPES	5
NH_4Cl	10

Tabelle 7: Zusammensetzung der zur Ansäuerung der Oozyten verwendeten ORi_{NH_4Cl} , die mittels Zugabe von 10 mM Ammoniumchlorid zu ORi hergestellt wurde. Der pH-Wert der Lösung wurde mittels Titration mit Tris auf 7,5 eingestellt.

2.1.3 Testlösungen der elektrophysiologischen und radiochemischen Messungen

Zur Herstellung der Testlösungen wurde den oben beschriebenen Kontrolllösungen Natriumsulfat hinzugefügt. Die in den elektrophysiologischen Messungen verwendeten Testlösungen enthielten jeweils 1 mM Na_2SO_4 und sind im Folgenden stets mit „s“ gekennzeichnet. Den radiochemischen Testlösungen wurde 20 μ M unmarkiertes Na_2SO_4

sowie 0,01 µM markiertes [³⁵S]H₂SO₄ hinzugefügt. Die Kennzeichnung dieser Lösungen erfolgt durch „s*“.

Die eingesetzten Sulfatkonzentrationen basierten auf Erfahrungswerten früherer Publikationen (KRICK et al. 2009).

2.2 Verwendung von *Xenopus-laevis*-Oozyten als Expressionssystem

Für die gesamten Versuche wurden Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* als Expressionssystem verwendet. Die im Institut verwendeten Frösche sind speziell für wissenschaftliche Zwecke gezüchtet und stammen von der Firma Nasco, Fort Atkinson, USA.

Zur Entnahme der Oozyten war eine Ausnahmegenehmigung nach §9 Abs.1 des Tierschutzgesetzes notwendig, die einige Mitarbeiterinnen des Instituts besaßen. Da das Ovar eines *Xenopus-laevis*-Weibchens über 30.000 reife Oozyten enthält, wurden nur Teile des Ovars entnommen. Vor der Entnahme der Oozyten wurde der Frosch ungefähr 30 Minuten in einem Becken mit Eiswasser, dem 0,2 % Tricain zugesetzt war, gelagert. Nachdem keine Bewegung des Tieres mehr feststellbar war, konnten unter der Lagerung auf Eis anschließend je ein separater Haut- und Muskelschnitt in der inguinalen Region gesetzt werden, durch den die Oozyten entnommen wurden (Abbildung 4). Die Operation konnte unter aseptischen Bedingungen durchgeführt werden, da die Haut der Krallenfrösche Peptide mit antimikrobieller Aktivität absondert, die eine Wundinfektion verhindern.

Die einzelnen Oozyten sind durch bindegewebige Strukturen miteinander zu kleinen Läppchen verbunden, so dass zunächst eine Trennung der Oozyten erfolgen musste. Zuerst wurde eine grobe Trennung mit Hilfe von Pinzetten durchgeführt, um die anschließende chemische Trennung mittels Abbau des Bindegewebes durch Inkubation in Kollagenase (Typ CLS II, Biochrom AG, Berlin, 7 µg/20 ml ORi) bei 16 bis 18 °C über Nacht zu verbessern. Am folgenden Tag fand zunächst eine zehnminütige Inkubation in calciumfreier Oozytenringerlösung statt. Im Anschluss daran wurden die Oozyten mehrmals in ORi gewaschen, um Reste zerstörter Oozyten und des Bindegewebes zu entfernen. Die so erhaltenen einzelnen Oozyten ermöglichten eine einfache Selektion der zur Injektion von

cRNA benötigten Oozyten. Diese ist notwendig, da im Ovar stets Oozyten aller Reifestufen gleichzeitig nebeneinander vorhanden sind. Für die Durchführung der elektrophysiologischen und radiochemischen Versuche sind jedoch lediglich die Stadien V und VI nach Dumont (DUMONT 1972) geeignet, die leicht erkennbar sind an einem klar abgrenzbaren animalischen und vegetativen Pol (Abbildung 5). Nur Oozyten dieser Stadien können artfremde cRNA transkribieren und translatieren.

Anschließend folgte die Injektion der sat-1-cRNA mit einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, die mit dem Testkit T7 (T7 mMMESSAGE mMACHINE, Ambion) im Institut hergestellt wurde. Um eine Kontamination mit RNAsen, die einen Abbau der cRNA mit sich geführt hätte, zu verhindern, wurden die folgenden Arbeitsschritte ausschließlich unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Unter stereomikroskopischer Kontrolle (M3C, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) wurde mit einer Mikroinjektionspumpe (Nanoliter 2000, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) und einem in drei Ebenen beweglichen Mikromanipulator (Leitz, Wetzlar) durch eine Glasmikrokapillare die cRNA injiziert. Die Herstellung der Glasmikroinjektionskanüle aus Sodaklarglas (World Precision Instruments) erfolgte unter Verwendung des Kapillarschlingenziehgerätes „Puller“ (Typ PE-2, Narishige, Tokio, Japan) (Abbildung 6) im Institut.



Abbildung 4: Ansicht der rechten Inguinalregion eines *Xenopus-laevis*-Weibchens nach erfolgtem Haut- und Muskelschnitt während der Entnahme eines Ovarlappchens, das hier bereits sichtbar ist.

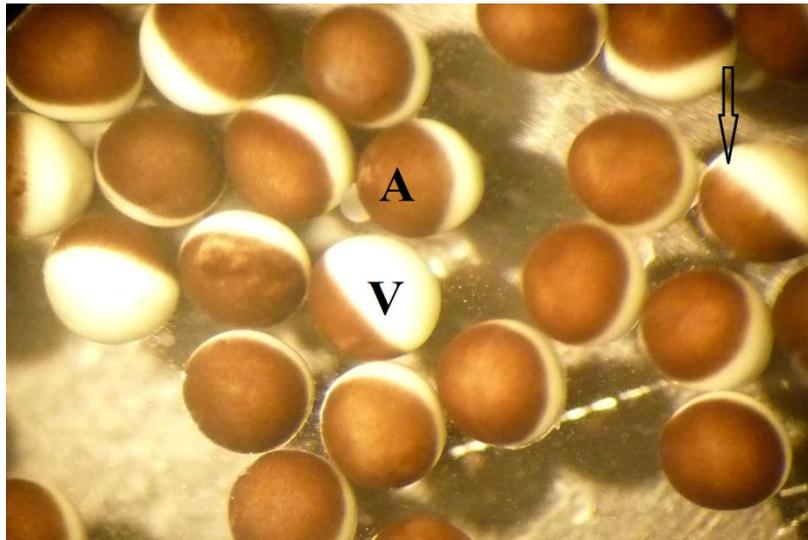


Abbildung 5: Oozyten des Stadiums V und VI nach Dumont (DUMONT 1972) mit deutlich voneinander abgrenzbaren animalischen und vegetativen Polen. A: Animalischer Pol; V: Vegetativer Pol. Der Pfeil kennzeichnet das unpigmentierte äquatoriale Band.



Abbildung 6: Das Kapillarschlingenziehgerät „Puller“ zur Herstellung von Glasmikroinjektionskanülen und Glasmikroelektroden. Eine dünne, unter Zugspannung stehende Glaskapillare wird in der Mitte von einer Heizspirale erhitzt und die beiden Enden werden mit hoher Geschwindigkeit durch einen Elektromagneten auseinandergezogen. So entstehen Glaskapillaren mit konisch zulaufenden Spitzen. Der offene Pfeil kennzeichnet das Steuerungsgerät, die Fixierung der Glaskapillare erfolgt an den mit schwarzen Pfeilen gekennzeichneten Stellen.

Vor der Injektion wurde die Nadelspitze manuell unter dem Stereomikroskop mit einer Schere gekürzt, so dass eine Öffnung mit einem Durchmesser zwischen 10 und 20 μm entstand. Zunächst wurde vom Kanülenende her RNase-freies Mineralöl (Mineral Oil for Molecular Biology, Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, USA) in die Kanüle gefüllt. Anschließend konnte mit Hilfe der Mikroinjektionspumpe eine bestimmte Menge der aufgetauten cRNA in die Glasmikroinjektionskanüle gesaugt werden. Zur nun folgenden Injektion wurden die Oozyten auf ein spezielles Injektionsbänkchen aus Plexiglas gelegt, in dessen Vertiefungen die Oozyten platziert wurden. Dies ermöglichte eine Fixierung der Oozyten, so dass diese leichter mit der Mikroinjektionskanüle angestochen werden konnten (Abbildung 7). Pro Oozyte wurden 23 μl cRNA mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ injiziert. Die Injektion erfolgte zwischen vegetativem und animalischem Pol, da im Bereich des animalischen Pols der Zellkern der Oozyte vermutet wird (DUMONT 1972). Da neben den Versuchen mit rsat-1-injizierten Oozyten auch immer eine Darstellung der endogenen Transporter notwendig war, wurde auch immer in einige Oozyten als Kontrolle 23 μl nucleasefreies Goldwasser (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) injiziert. Diese Oozyten werden im Folgenden als „Mocks“ bezeichnet.

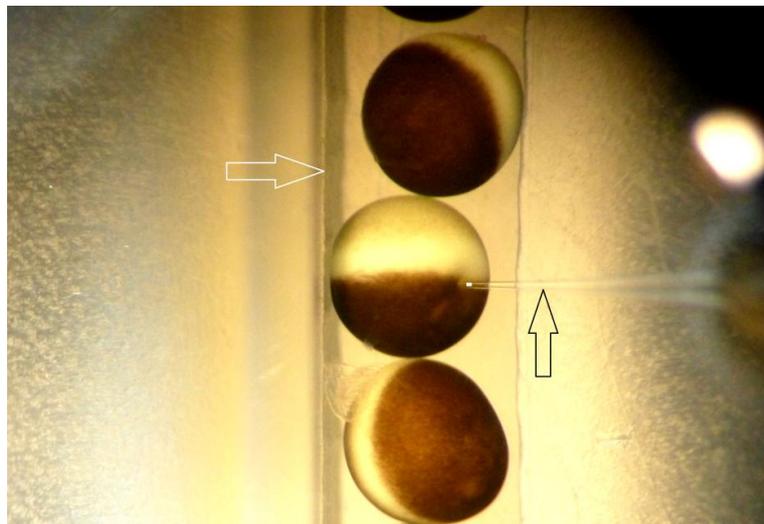


Abbildung 7: Injektion der Oozyten mit Hilfe einer Mikroinjektionspumpe, die 23 μl cRNA über eine Glasmikroinjektionskanüle injiziert. In die wasserinjizierten Oozyten werden 23 μl nucleasefreies Goldwasser injiziert. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die Glasmikroinjektionskanüle. Die Eindellung der Oozyte durch die eingestochene Glasmikroinjektionskanüle ist zur besseren Sichtbarkeit markiert. Das die Fixierung der Oozyte ermöglichende Plexiglasbänkchen ist mit dem weißen Pfeil markiert.

Alle Oozyten wurden nach der Injektion in „24-Well“-Platten (Sarstedt, Nümbrecht) aufbewahrt. Um eine bakterielle Besiedlung zu verhindern, wurden der ORi 50 mg/l Gentamycin (AppliChem GmbH, Darmstadt) sowie 2,5 mM Natriumpyruvat (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, USA) als Nährstoff für die Oozyten hinzugefügt. Es folgte eine zwei- bis dreitägige Inkubation bei 16 °C in einem Inkubator (Liebherr AG, Kirchdorf, Umbau auf 16°C durch die Institutswerkstatt). Diese war notwendig, um einen ausreichenden Proteineinbau des zu untersuchenden Transporters in die Membran der Oozyten zu gewährleisten. Wäre die Messung zu einem früheren Zeitpunkt erfolgt, wäre das Signal der induzierten Ströme beziehungsweise die Aufnahme von Sulfat zu gering gewesen. Diese Expressionszeit hatte sich in Versuchen von BISSIG et al. (1994) als optimal herausgestellt. Um während der Inkubationszeit eine Verunreinigung des Nährmediums durch abgestorbene und beschädigte Oozyten zu vermeiden, wurden diese täglich sorgfältig unter mikroskopischer Kontrolle während einer Erneuerung des Nährmediums, dem sogenannten Umsetzen der Oozyten, entfernt.

Die ausführliche Diskussion der Eignung der Oozyten von *Xenopus laevis* für diese Versuche folgt in Kapitel 4.1.

2.3 Elektrophysiologische Messungen

2.3.1 Two-Electrode-Voltage-Clamp: Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die elektrophysiologischen Messungen wurden an einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme im „Current-Clamp-Modus“ durchgeführt, die zur Messung von Änderungen des Membranpotentials über die Zellmembran und damit zur Erforschung von elektrogenen Transportproteinen genutzt werden kann. Die zwei Mikroelektroden sind für die Messung des Membranpotentials und die Einspeisung von Strom erforderlich (Abbildung 8). Das von den Ionenströmen abhängige Membranpotential kann sich im „Current-Clamp-Modus“ frei verändern, das Potential wird also von der Zelle selbst generiert.

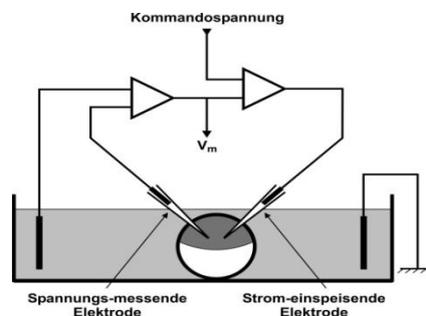


Abbildung 8: Schema des Versuchsaufbaus zur Messung des Membranpotentials der Oozyte im „Current-Clamp-Modus“. Dargestellt ist die im Bad platzierte Oozyte, in die die Spannungsmessende und die Strom-einspeisende Elektrode eingesteckt sind.

2.3.2 Aufbau der Messapparatur

Da die Messung der Membranspannung der Oozyte einen Schutz gegen äußere elektrische und mechanische Einflüsse unbedingt notwendig machte, fanden die gesamten elektrophysiologischen Messungen in einem Faradayschen Käfig statt (Eigenbau der Institutswerkstatt) (Abbildung 9, A). Um zu gewährleisten, dass externe Erschütterungen die Messergebnisse nicht verfälschen, war die Tischplatte mit einem stoßdämpfenden Unterbau (Eigenbau der Institutswerkstatt) versehen. Zentral im Versuchsaufbau lag eine Perfusionskammer, die im Wesentlichen aus einer ca. 1,5 cm dicken Plexiglasscheibe bestand (Abbildung 9, C). Vertiefungen in dieser Platte ermöglichten die genaue Positionierung der Oozyte auf dieser Platte, ein zusätzlich mittig gelegener Steg diente während des Einstechens der Mikroelektroden in die Oozyte als Widerlager (Abbildung 10).

Auf der schmalen Seite der Vertiefung führten zwei Polyäthylenschläuche die Testlösungen zu, die an der Oozyte vorbei auf der anderen Seite der Plexiglasscheibe durch eine Öffnung und einen daran angeschlossenen Schlauch direkt in einen Sammelbehälter abfließen (Abbildung 9, B und G). Die Perfusionsgeschwindigkeit war manuell einstellbar. Die Perfusionskammer war über eine Agarbrücke und ein mit 3 M KCl gefülltes Gefäß mit zwei Silberchloridelektroden verbunden. Diese dienten als Erdung und Referenzpunkt, sobald beide Mikroelektroden in die Oozyte eingestochen wurden. Aus Borosilikatglaskapillaren (Biomedical Instruments, Zöllnitz) wurden hierzu mit Hilfe des Pullers dünne Kapillaren gezogen, die mit 3 M KCl gefüllt wurden. Die Füllung mit KCl ermöglichte die Herstellung des elektrischen Kontaktes mit den chlorierten Silberdrahtelektroden (A-MSystems Inc., Carlsborg WA, USA), die in die Borosilikatglaskapillare eingeführt wurden (Abbildung 9, D). Das gegenüberliegende Einstechen der Mikroelektroden in die Oozyte erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle (Wild M3 Mikroskop, Herburg, Schweiz) (Abbildung 9, E; Abbildung 10). Die Spannungselektrode maß das Membranpotential der Zelle und war an einen Verstärker (Oocyte clamp OC-725C, Warner Instruments Corp., Hamden, USA) angeschlossen, der mit der Strom-einspeisenden Elektrode verbunden war. Da nur im „*Current-Clamp-Modus*“ gemessen wurde, diente die Strom-einspeisende Elektrode nur zur zusätzlichen Fixierung der Oozyte im Bad.

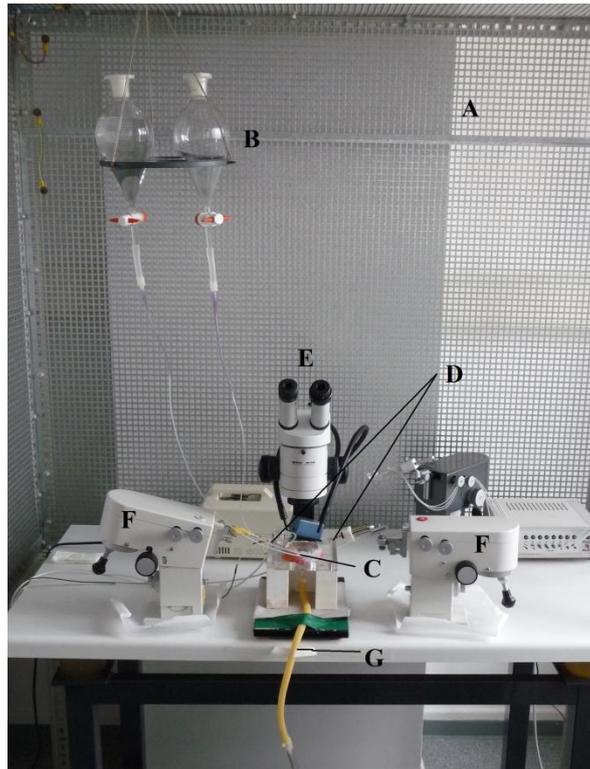


Abbildung 9: Aufbau der Versuchsanordnung **A** Faradayscher Käfig **B** Gefäße für Kontroll- und Testlösungen **C** Perfusionskammer **D** Position der Borosilikatglaskapillaren mit enthaltenen Silberdrahtelektroden **E** Mikroskop **F** Manipulatoren mit den KCl-gefüllten Mikroelektroden **G** Schlauch für ablaufende Perfusionslösungen

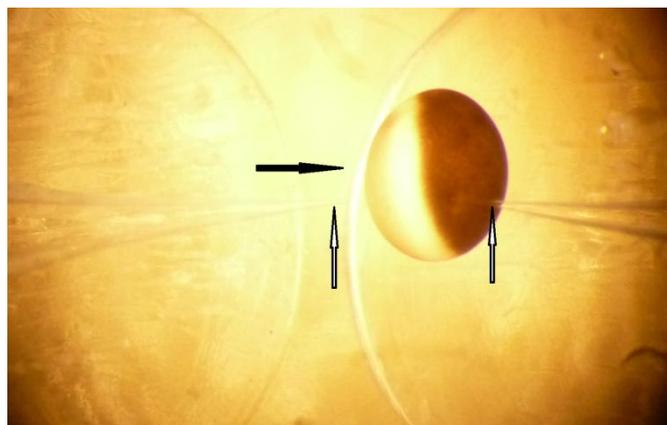


Abbildung 10: Oozyte während der Messung des Membranpotentials. Sichtbar sind die KCl-gefüllten Mikroelektroden aus Borosilikatglas (weiße Pfeile), in denen die Silberdrahtelektroden platziert sind. Zur besseren Handhabung des Anstechens der Oozyte liegt diese vor einem Steg, der jedoch die Perfusion der Kammer nicht beeinträchtigt (schwarzer Pfeil).

2.3.3 Vorgehensweise bei den elektrophysiologischen Messungen

Nach dem Einstechen der beiden Mikroelektroden erfolgte die Perfusion der Oozyte mit ORi, bis sich ein stabiles Membranpotential einstellte. Nach Erreichen dieses konstanten Potentials erfolgte jeweils zunächst die Perfusion mit Kontroll- und anschließend mit Testlösungen, unter denen sich wieder ein stabiles Potential einstellen sollte. Das Membranpotential, das von einem Verstärker gemessen wurde, wurde dabei kontinuierlich von einem Schreiber (Kipp & Zonen Schreibgerät, Delft, Niederlande) notiert. Nach dieser Methode wurde bei allen Untersuchungen verfahren, wobei zwischen der Messung mit unterschiedlichen Kontroll- oder Testlösungen stets die Perfusion mit ORi erfolgte, bis sich wieder ein konstantes Potential eingestellt hatte, das im Idealfall dem Potential zu Beginn der Messung entsprach. Dieses Vorgehen wurde gewählt um Wechselwirkungen der verschiedenen Lösungen zu vermeiden. Nach der Messung wurden die Oozyten verworfen.

2.4 Aufnahme von [³⁵S]-markiertem Sulfat

Ziel der radiochemischen Versuche war die Messung der Aufnahme von [³⁵S]H₂SO₄ durch rsat-1 pro Zeiteinheit. Die Versuche fanden im Isotopenlabor des Instituts unter Plexiglasabschirmung (Eigenbau der Institutswerkstatt) statt. Zunächst wurden die Oozyten in ORi gewaschen, um Gentamycin- und Natriumpyruvatreste zu entfernen. In einem Schnappdeckelglas wurden die Oozyten über eine definierte Zeit in 1 ml einer [³⁵S]H₂SO₄-haltigen Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Aufnahme von [³⁵S]-markiertem Sulfat durch den untersuchten Sulfattransporter sat-1 zu beenden und nicht aufgenommenes [³⁵S]H₂SO₄ von der äußeren Membran der Oozyte zu entfernen, wurden die Oozyten anschließend dreimal in auf Eis gekühlter ORi gewaschen. Jede Oozyte wurde in ein Szintillationsgefäß (Mini-Vial 6 ml, Sarstedt, Nümbrecht) gegeben und mit 250 µl 1 N NaOH (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) lysiert. Dieser Vorgang wurde mechanisch durch eine Schüttelplatte beschleunigt (Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen), auf der die Oozyten zwei Stunden mit einer Frequenz von 150/min geschüttelt wurden. Die Neutralisation wurde anschließend mit 250 µl 1 N HCl durchgeführt. Unter einem Abzug wurden pro Szintillationsgefäß 2,5 ml Szintillationslösung (Lumasafe, Lumac LSC, Groningen, Niederlande) hinzugefügt. Danach wurden die Gefäße von Hand verschlossen und

geschüttelt. Zur Ermittlung der Standardwerte wurden jeweils 5 µl jedes $[^{35}\text{S}]\text{H}_2\text{SO}_4$ -haltigen Inkubationsmediums in vier Szintillationsgefäße gefüllt und ebenfalls mit 2,5 ml Szintillationslösung aufgefüllt. Die Auszählung erfolgte im Flüssigkeits-Szintillations-Zähler (TRI-CARB 1500, Packard, Meriden, CT, USA), in dem die Messung pro Probe fünf Minuten dauerte und eine Angabe der Aktivität in *decays per minute (dpm)* erfolgte. Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung des Ablaufs.

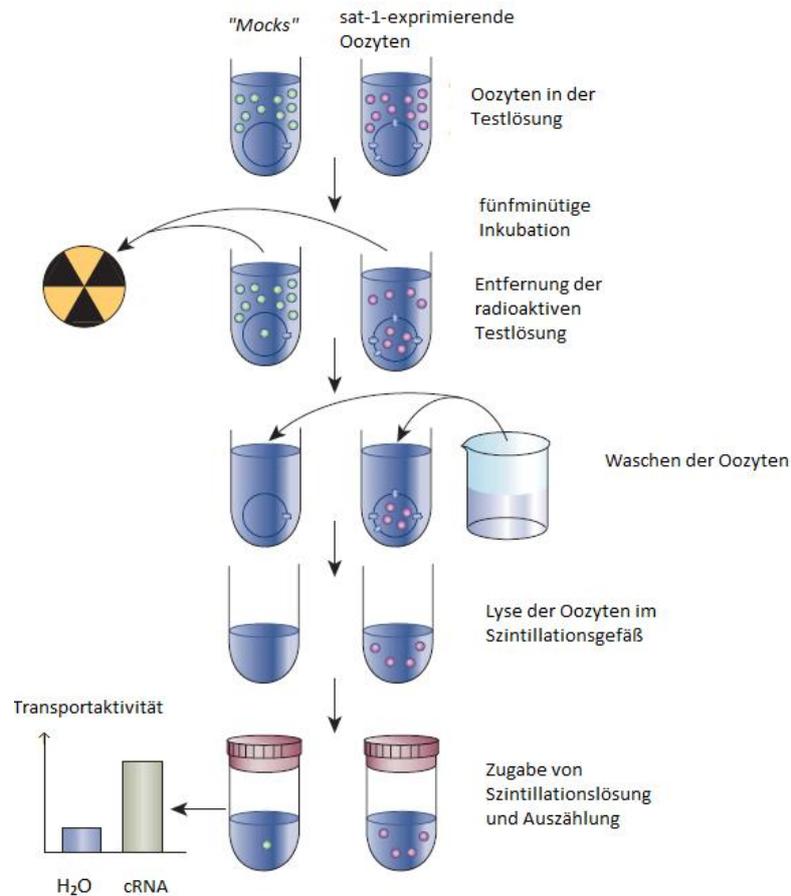


Abbildung 11: Schema der radiochemischen Versuche. Die genaue Beschreibung des Ablaufs ist Kapitel 2.4 entnehmbar (Abbildung modifiziert aus MARKOVICH 2008, S. 1979).

Anhand der gemessenen Aktivität der Standardwerte konnte nun die spezifische Aktivität ($A_{spez}[dpm/pmol]$) der einzelnen Inkubationsmedien errechnet werden:

$$A_{spez} = (A_{stand} / C_{sulf}) \cdot V_{stand}$$

Die Konzentration des radioaktiv markiertes Sulfats im Inkubationsmedium, [^{35}S] H_2SO_4 , hier als C_{sulf} bezeichnet, betrug bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen $0,01 \mu mol/l$, wobei zusätzlich jeweils $20 \mu mol/l$ Na_2SO_4 enthalten waren. Das Standardvolumen V_{stand} betrug $5 \mu l$ pro Gefäß. Die Ermittlung des Quotienten aus der gemessenen Aktivität jeder einzelnen Oozyte ($A_{Oozyte}[dpm]$) und der errechneten spezifischen Aktivität des entsprechenden Inkubationsmediums (A_{spez}) sowie die Kenntnis der Inkubationszeit ($T_{Transport}$), erlaubten die Bestimmung der Aufnahme von Sulfat ($T_{sulf}[pmol/min]$).

$$T_{sulf} = (A_{Oozyte} / A_{spez}) \cdot T_{Transport}$$

Die Inkubationszeit für die Aufnahme des radioaktiv-markierten Substrates, $T_{Transport}$, variierte bei den einzelnen Versuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Versuche

Die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen erfolgte im „Current-Clamp-Modus“, der in Kapitel 2.3.1 beschrieben ist. Zur Untersuchung des Einflusses von Sulfat auf sat-1 wurde den Testlösungen jeweils 1 mM Na₂SO₄ hinzugefügt. Die genaue Zusammensetzung der Perfusionslösungen ist in Kapitel 2.1.2 und 2.1.3 beschrieben.

Die im Weiteren genannten Werte sind allesamt Mittelwerte der gemessenen Membranpotentiale, die jeweils abgelesen wurden, wenn das Membranpotential fünf Minuten konstant war. Teilweise wurden sehr starke Variationen zwischen den Membranpotentialen der einzelnen untersuchten Oozyten beobachtet. Im Falle sehr starker Abweichungen der Membranpotentiale beziehungsweise der Änderung der Membranpotentiale einzelner Oozyten sind diese explizit erwähnt.

3.1.1 Sulfatapplikation

Um die Reaktion des Membranpotentials der Oozyten auf die Perfusion mit Sulfat zu testen, wurden die rsat-1-exprimierenden Oozyten sowie die wasserinjizierten Oozyten „Mocks“ zunächst mit ORi und anschließend mit 1 mM Na₂SO₄-haltiger ORis perfundiert. Die Anzahl der für diesen Versuch verwendeten Oozyten und Spendertiere ist in Tabelle 8 aufgeführt.

	sat-1-exprimierende Oozyten	„Mocks“
Oozyten	31	19
Spendertiere	13	10

Tabelle 8: Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere zur Untersuchung der Änderung des Membranpotentials der Oozyten unter Zusatz von Sulfat zu ORi.

Das Ruhemembranpotential aller in dieser Arbeit untersuchten sat-1-exprimierenden Oozyten lag während der Perfusion mit ORi bei $-32,7 \pm 10,6$ mV. Die Perfusion mit sulfathaltiger ORis führte zu einer minimalen Hyperpolarisation auf $-33,2 \pm 10,9$ mV

(Abbildung 12 A und B). Bei den wasserinjizierten Oozyten „Mocks“ betrug das Membranpotential unter der Perfusion mit ORI $-37,8 \pm 9,5$ mV und blieb während der Perfusion mit ORIs mit der Einstellung eines Potentials von $-37,9 \pm 9,2$ mV nahezu konstant (Abbildung 12 A und C). Um die Änderungen des Potentials der einzelnen Oozyten auf die Applikation von Sulfat besser erfassen zu können, wurden in Abbildung 12 B und C die Einzelwerte separat dargestellt. Bei den sat-1-exprimierenden Oozyten änderte sich das Membranpotential auf Gabe von Sulfat nicht; einige Oozyten hyperpolarisierten und nur wenige Oozyten depolarisierten auf Gabe von 1 mM Sulfat. In der Summe resultierte eine geringfügige, doch nicht signifikante Hyperpolarisation (Abb. 12 A). Auch die „Mocks“ zeigten entweder keine Änderung des Membranpotentials, hyperpolarisierten leicht oder depolarisierten unter Perfusion mit sulfathaltiger ORIs.

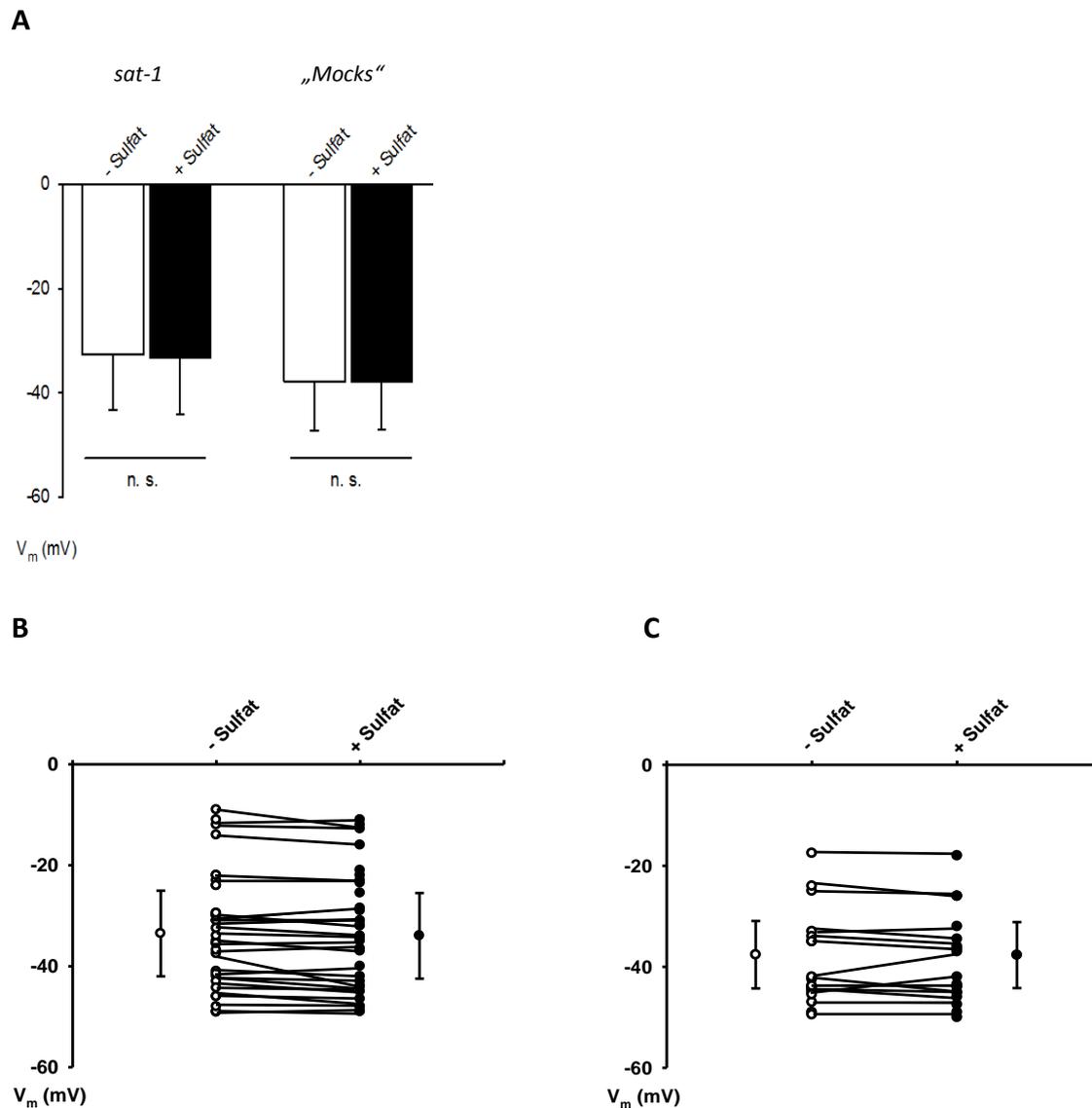


Abbildung 12: Reaktion der *sat-1*-exprimierenden Oozyten und der wasserinjizierten Kontrolloozyten „Mocks“ unter Perfusion mit ORI und sulfathaltiger ORIs. Dargestellt sind sowohl die Mittelwerte der Messungen (A) als auch die Einzelmessungen (B, C) um das Ausmaß der Schwankungen der einzelnen Messungen zu verdeutlichen. Die entsprechenden Mittelwerte sind jeweils noch einmal rechts und links der Einzelmessungen zu sehen.

3.1.2 Chloridersatz durch Gluconat, Thiocyanat und Nitrat

Um den Chloridgehalt der Perfusionslösungen zu verändern wurden Lösungen verwendet, in denen sowohl Natriumchlorid als auch Kaliumchlorid durch das Natrium- oder Kaliumsalz eines anderen Anions ersetzt wurden. In der Kontrolllösung ORi_1 wurden Natrium- und Kaliumchlorid durch äquimolare Mengen an Natrium- und Kaliumgluconat, in ORi_2 durch

Natrium- und Kaliumthiocyanat und in ORi₃ durch Natrium- und Kaliumnitrat, das heißt Zugabe von 110 mM des entsprechenden Natrium- und 3 mM des entsprechenden Kaliumsalzes, ersetzt. Untersucht wurde auch die Veränderung des Membranpotentials der Oozyten unter Zugabe von Sulfat zu den jeweiligen Lösungen. Die Tabelle 9 gibt Auskunft über die Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere.

	sat-1-exprimierende Oozyten	„Mocks“
Oozyten	10	5
Spendertiere	4	3

Tabelle 9: Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere beim Versuch des Chloridersatzes in den perfundierenden Lösungen durch Gluconat, Thiocyanat und Nitrat.

Der Abbildung 13 ist der gesamte Verlauf der Änderungen des Membranpotentials unter der Perfusion mit den verschiedenen Lösungen entnehmbar. Aufgrund der geringen Änderungen des Membranpotentials der sat-1-exprimierenden Oozyten und der „Mocks“ unter Perfusion mit den sulfathaltigen Testlösungen sind zusätzlich in den Abbildungen 14 bis 17 alle Einzelwerte dargestellt.

Bei den sat-1-exprimierenden Oozyten lag das Ruhemembranpotential in diesen Messreihen unter Perfusion mit ORi bei durchschnittlich $-26,8 \pm 12,5$ mV. Auf Sulfatapplikation reagierten nahezu alle sat-1-exprimierenden Oozyten mit einer Hyperpolarisation von im Mittelwert $-1,4 \pm 2,1$ mV auf $-28,2 \pm 13,2$ mV, wobei Veränderungen des Membranpotentials zwischen $-6,5$ mV und $+1$ mV zu beobachten waren (Abbildung 14 A). Nach der erneuten Perfusion mit ORi und der Einstellung eines Ruhemembranpotentials von $-29,9 \pm 13,3$ mV, das durch eine Hyperpolarisation um $-1,8 \pm 2$ mV verursacht wurde, fand unter Perfusion mit gluconathaltiger ORi₁ eine deutliche Depolarisation um $8,2 \pm 10,1$ mV auf $-21,7 \pm 18,6$ mV statt. Zwei Oozyten hyperpolarisierten bei dieser Messung jedoch um -5 mV beziehungsweise -12 mV. Während der Perfusion mit ORi_{1s} hyperpolarisierten die Oozyten schwach um durchschnittlich $-1,8 \pm 4,5$ mV auf $-23,5 \pm 20$ mV, wobei der Wert einer Oozyte sich mit einer Hyperpolarisation von $-11,5$ mV stark von den anderen Oozyten unterschied (Abbildung 15 A). Die Perfusion mit thiocyanathaltiger ORi₂ führte nach einer Perfusion mit ORi und einer Hyperpolarisation um $-11,6 \pm 9,7$ mV auf $-35,1 \pm 15,4$ mV zu einer

Hyperpolarisation um $-15,1 \pm 7$ mV auf $-50,1 \pm 11,7$ mV, die Perfusion mit ORI_{2s} führte zu einer leichten Depolarisation um $2,3 \pm 0,9$ mV auf $-47,8 \pm 11,5$ mV (Abbildung 16 A). Nach der erneuten Perfusion mit ORi , die zur Depolarisation und Einstellung eines Ruhepotentials von $-31 \pm 15,7$ mV führte, folgte die Perfusion mit nitrathaltiger ORi_3 , unter der eine Hyperpolarisation um $-10,3 \pm 9$ mV auf $-41,3 \pm 13,4$ mV gemessen werden konnte. Drei Oozyten hyperpolarisierten dabei mit Membranpotentialänderungen von -21 bis -23 mV wesentlich stärker als die anderen untersuchten Oozyten, bei denen Hyperpolarisationen im Wert von -2 bis -8 mV detektiert wurden. Unter Zugabe von Sulfat zu ORi_3 depolarisierten die Oozyten um $0,8 \pm 2,1$ mV auf $-40,3 \pm 13,7$ mV (Abbildung 17 A).

Die wasserinjizierten Oozyten „Mocks“ besaßen unter Perfusion mit ORi in diesen Messreihen ein Membranpotential von $-33,7 \pm 13$ mV. Bei der Zugabe von Sulfat zu ORi wurde eine Hyperpolarisation von $-0,5 \pm 1,1$ mV auf $-34,2 \pm 13,2$ mV beobachtet (Abbildung 14 B). Nach der erneuten Perfusion mit ORi und einer leichten Repolarisation auf $-34,0 \pm 12,9$ mV führte die Perfusion mit gluconathaltiger ORi_1 zur Depolarisation um $6,5 \pm 13,4$ mV auf $-27,5 \pm 19,2$ mV. Zu beachten ist, dass lediglich zwei der Oozyten um -29 beziehungsweise -9 mV depolarisierten, drei Oozyten hyperpolarisierten hingegen sehr leicht. Die Zugabe von Sulfat zu ORi_1 führte zu einer marginalen Änderung des Potentials, dieses befand sich nun um $0,1 \pm 0,9$ mV reduziert bei $-27,4 \pm 19,7$ mV (Abbildung 15 B). Unter der erneuten Perfusion mit ORi hyperpolarisierten die Oozyten um $-10,6 \pm 5$ mV auf $-38 \pm 12,9$ mV. Die Perfusion mit thiocyanathaltiger ORi_2 führte zu einer Hyperpolarisation um $-11,2 \pm 2,5$ mV auf $-49,2 \pm 11$ mV, unter Zugabe von Sulfat depolarisierten die Oozyten um $2,7 \pm 1$ mV auf $-46,5 \pm 11,8$ mV (Abbildung 16 B). Nach der Perfusion mit ORi und der Einstellung des Potentials bei $-40 \pm 11,6$ mV, konnte während der Perfusion mit nitrathaltiger ORi_3 eine Hyperpolarisation um $-2,7 \pm 1,9$ mV auf $-42,7 \pm 12,8$ mV gemessen werden. Unter der Perfusion mit sulfathaltiger ORi_{3s} war eine leichte Depolarisation um $1,5 \pm 1,4$ mV auf $-41,2 \pm 12,6$ mV feststellbar (Abbildung 17 B).

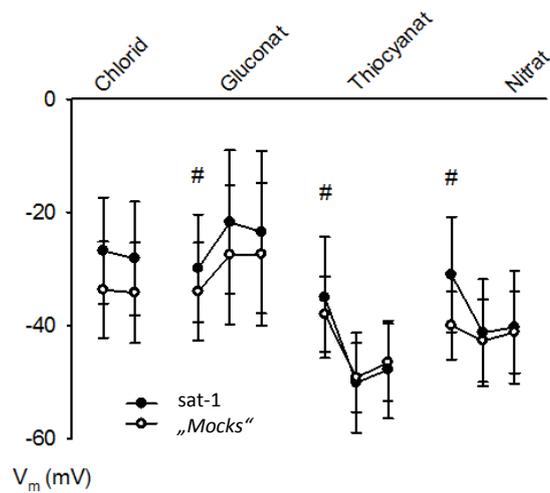


Abbildung 13: Reaktion der sat-1-exprimierenden Oozyten und der wasserinjizierten Kontrolloozyten „Mocks“ unter Perfusion mit Lösungen verschiedener Anionen in Ab- und Anwesenheit von Sulfat (1 mM). Es wurden die Lösungen OR_i, OR_{i1}, OR_{i2} und OR_{i3} verwendet, um das Verhalten der Oozyten in An- und Abwesenheit von Chlorid, Gluconat, Thiocyanat und Nitrat zu untersuchen, sowie die Lösungen OR_{is}, OR_{i1s}, OR_{i2s} und OR_{i3s} um die Änderung des Membranpotentials unter der Zugabe von Sulfat darzustellen. Die mit „#“ gekennzeichneten Punkte zeigen das Membranpotential der Oozyten unter der Perfusion mit OR_i: Die Perfusionsreihenfolge der verwendeten Lösungen ist somit OR_i, OR_{is}, OR_i, OR_{i1}, OR_{i1s}, OR_i, OR_{i2}, OR_{i2s}, OR_i, OR_{i3} und OR_{i3s}. Die Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere zeigt die Tabelle 10.

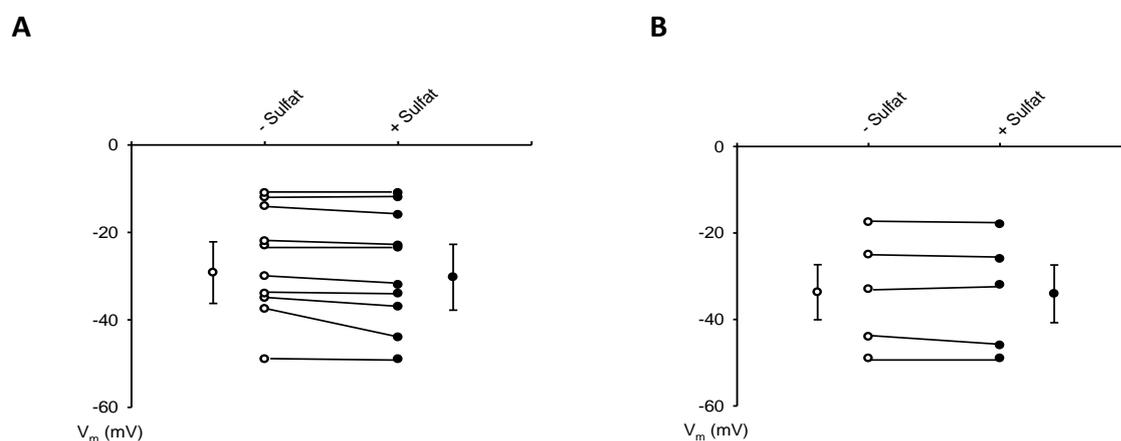


Abbildung 14: Darstellung der Einzelwerte des Membranpotentials der sat-1-exprimierenden Oozyten (A) und der „Mocks“ (B) unter Perfusion mit chloridhaltiger OR_i und OR_{is}. Die Oozyten hyperpolarisierten oder hatten ein unverändertes Membranpotential, es fand sich jedoch nur bei den „Mocks“ eine Depolarisation auf Sulfatapplikation.

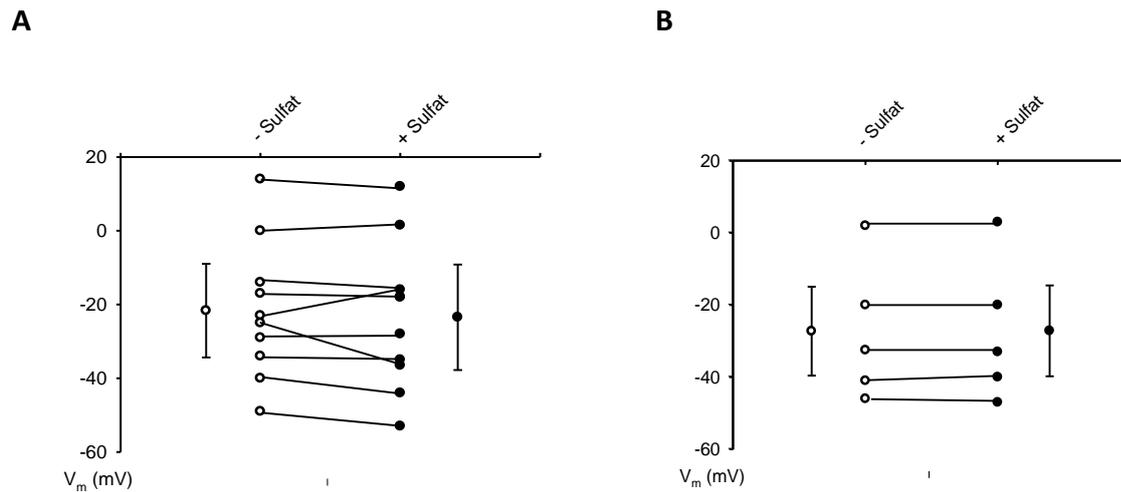


Abbildung 15: Einzelwerte des Membranpotentials der sat-1-exprimierenden Oozyten (A) und der „Mocks“ (B) unter Perfusion mit natrium- und kaliumgluconathaltiger ORi_1 in An- und Abwesenheit von Sulfat (ORi_{1s}). Auffällig war ein breit gestreutes Ruhemembranpotential bei Ersatz des Chlorids durch Gluconat.

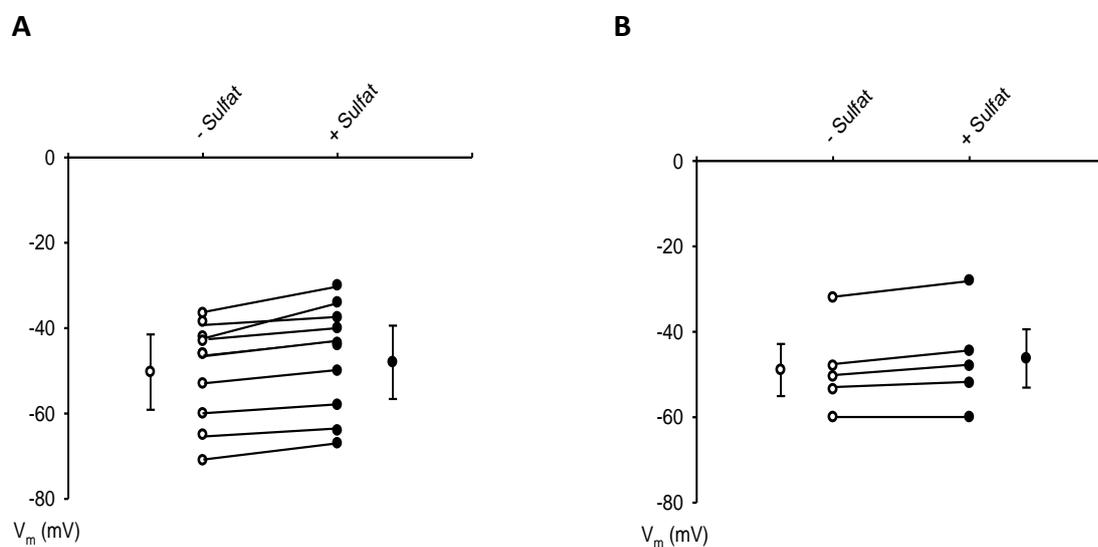


Abbildung 16: Einzeldarstellung des Membranpotentials der sat-1-exprimierenden Oozyten (A) und der „Mocks“ (B) während der Perfusion mit thiocyanathaltiger ORi_2 und thiocyanat- sowie sulfathaltiger ORi_{2s} . Die Sulfatapplikation führte zur Depolarisation aller Oozyten, unabhängig davon, ob es sich um sat-1-exprimierende oder wasserinjizierte Oozyten handelte.

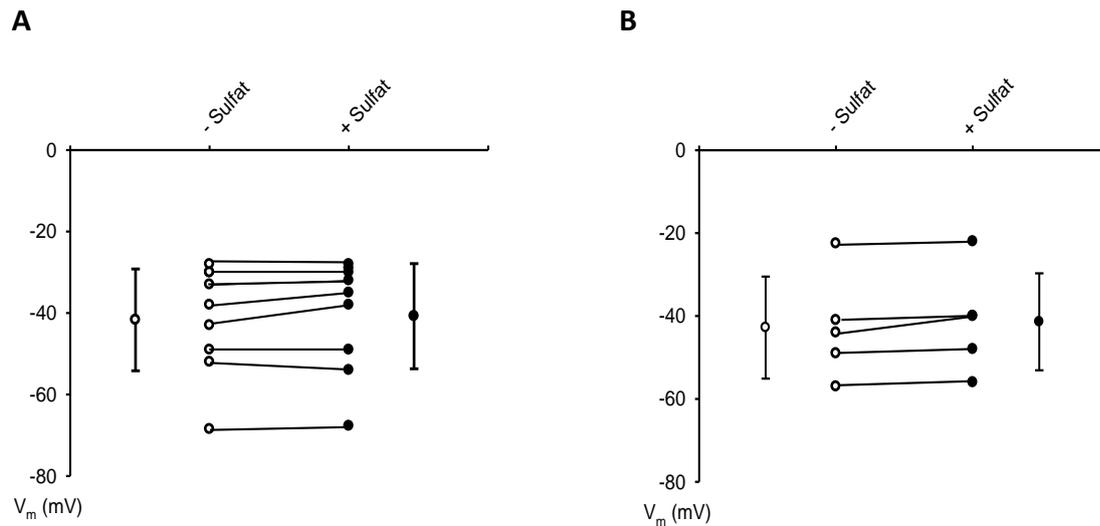


Abbildung 17: Einzelwerte des Membranpotentials der *sat-1*-exprimierenden (A) und der wasserinjizierten Oozyten (B) unter der Perfusion mit nitrathaltiger ORi_3 und nitrat- sowie sulfathaltiger ORi_3 s.

3.1.3 Reduktion der intrazellulären Chloridkonzentration der Oozyten durch Inkubation in chloridreduzierter ORi_1

Um die Abhängigkeit der Sulfataufnahme durch *sat-1* von dem intrazellulären Chloridgehalt der Oozyte zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Messungen nach einer Inkubation in chloridreduzierter ORi_1 durchgeführt. Dabei wurden die *sat-1*-exprimierenden Oozyten sowie die „Mocks“ nach der Dauer der Inkubation in jeweils fünf Gruppen aufgeteilt. Der Tabelle 10 sind die Oozytenzahl und die Anzahl der Spendertiere sowie die Inkubationszeiten der einzelnen Gruppen zu entnehmen.

Gruppe	Inkubationszeit (h)	Spendertiere	Oozyten
sat-1-exprimierende Oozyten			
I	0	6	9
II	<3	2	3
III	<6	3	5
IV	<9	3	6
V	<20	3	4
„Mocks“			
VI	0	7	12
VII	<3	2	2
VIII	<6	3	6
IX	<9	2	4
X	<20	3	3

Table 10: Einteilung der sat-1-exprimierenden Oozyten sowie der „Mocks“ in Gruppen nach Dauer der Inkubation in chloridreduzierter OR_i, mit Angabe der Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere.

Die in chloridreicher OR_i inkubierten sat-1-exprimierenden Oozyten (Zeitpunkt 0) besaßen unter Perfusion mit gluconathaltiger OR_i ein Membranpotential von $-18,4 \pm 7,9$ mV. Die Perfusion mit OR_is führte zu einer leichten Hyperpolarisation um $-2,5 \pm 4,8$ mV auf $-20,9 \pm 9,1$ mV. Nach der erneuten Perfusion der Oozyten mit OR_i hyperpolarisierten die Oozyten um $-1,7 \pm 3$ mV, es stellte sich ein Membranpotential von $-22,6 \pm 10,6$ mV ein. Während der Perfusion der Oozyten mit sulfathaltiger OR_is konnte eine Hyperpolarisation von im Mittel $-5,4 \pm 7,6$ mV auf $-28,1 \pm 5,9$ mV beobachtet werden.

Nach zwei- bis dreistündiger Inkubation in chloridreduzierter und gluconathaltiger OR_i betrug das mittlere Membranpotential der sat-1-exprimierenden Oozyten in Gruppe II während der Perfusion mit OR_i $-31 \pm 18,3$ mV. Die Zugabe von Sulfat veränderte das Potential nur marginal um $-1,2 \pm 2$ mV auf $-32,2 \pm 20,1$ mV, jedoch sind generell in dieser Gruppe sehr große Schwankungen der Potentiale zu beobachten gewesen. Es erfolgte keine Änderung des Membranpotentials nach erneuter Perfusion mit OR_i, unter Perfusion mit

sulfathaltiger ORi_s verringerte sich das Membranpotential um $-0,8 \pm 4,6$ mV auf $-33 \pm 14,7$ mV.

Bei den sat-1-exprimierenden Oozyten der Gruppe III konnte nach vier- bis sechsstündiger Inkubation in ORi_i unter der Perfusion mit ORi_i die Einstellung eines Membranpotentials von $-11,4 \pm 7,1$ mV beobachtet werden. Die Perfusion mit ORi_s führte zu einer leichten Hyperpolarisation der Oozyten um $-1,2 \pm 1,4$ mV auf $12,6 \pm 8,4$ mV. Unter erneuter Perfusion mit ORi_i änderte sich das Membranpotential um $0,3 \pm 0,9$ mV und betrug $-12,3 \pm 8,6$ mV. Während der anschließenden Perfusion mit sulfathaltiger ORi_s wurde eine Hyperpolarisation von $-7,1 \pm 2,8$ mV auf $-19,4 \pm 10,8$ mV detektiert. Abbildung 18 stellt das Membranpotential dieser Gruppe dar.

Die sechs- bis achtstündige Inkubation in ORi_i der in Gruppe IV untersuchten sat-1-exprimierenden Oozyten führte zur Einstellung eines Membranpotentials von $-16,3 \pm 10$ mV unter der Perfusion mit ORi_i . In sulfathaltiger ORi_s wurde ein um $-0,3 \pm 1,3$ mV reduziertes Membranpotential von $-16,6 \pm 10,1$ mV registriert. Nach der wiederholten Perfusion mit ORi_i , unter der nach einer Depolarisation um $1,5 \pm 1,9$ mV ein Membranpotential von $-15,1 \pm 10,6$ mV detektiert wurde, hyperpolarisierten die Oozyten während der Perfusion mit sulfathaltiger ORi_s um durchschnittlich $-4,8 \pm 4,8$ mV auf $-19,8 \pm 12,7$ mV.

In der Gruppe V der sat-1-exprimierenden Oozyten wurde nach neun- bis zwanzigstündiger Inkubation unter der Perfusion mit ORi_i ein Membranpotential von im Mittelwert $-21,3 \pm 9,8$ mV gemessen, das nach Zugabe von Sulfat eine Depolarisation um $2,1 \pm 6$ mV auf $-19,1 \pm 11,5$ mV zeigte. Die Perfusion mit ORi_i führte zu einer leichten Hyperpolarisation der Oozyten um $-2,8 \pm 4,1$ mV auf $-21,9 \pm 11,9$ mV. Nach der folgenden Perfusion mit sulfathaltiger ORi_s , die zu einer Hyperpolarisation um $-4,3 \pm 5,5$ mV führte, wurde ein Membranpotential von $-26,3 \pm 8,6$ mV detektiert.

Bei den in chloridreicher ORi inkubierten „Mocks“ der Gruppe VI wurde unter Perfusion mit ORi_i ein Membranpotential von $-28 \pm 20,4$ mV gemessen, das nach Zugabe von Sulfat leicht um $-1,3 \pm 2,2$ mV auf $-29,3 \pm 21,4$ mV hyperpolarisierte. Der erneuten Perfusion mit ORi_i , bei der ein Membranpotential von $-29,5 \pm 21,8$ mV detektiert wurde, folgte unter Perfusion mit ORi_s eine marginale Hyperpolarisation um $-1,1 \pm 5,2$ mV auf $-30,6 \pm 21,6$ mV.

Die „Mocks“ der Gruppe VII wiesen nach zwei- bis dreistündiger Inkubation in chloridarmer ORi_1 unter Perfusion mit ORi_1 ein Membranpotential von $-10,3 \pm 3,2$ mV auf, das während der Perfusion mit ORi_{1s} um $7,5 \pm 7,1$ mV auf $-2,8 \pm 10,3$ mV depolarisierte. Nach erneuter Perfusion mit ORi_1 hyperpolarisierte das Membranpotential der Oozyten um $-23,5 \pm 14,8$ mV auf $-26,3 \pm 25,1$ mV. Unter der Perfusion mit sulfathaltiger ORi_s hyperpolarisierten die Oozyten um $-4 \pm 7,1$ mV auf $-30,3 \pm 18$ mV.

Das in der Gruppe VIII der vier bis sechs Stunden in ORi_1 inkubierten „Mocks“ gemessene Membranpotential, das in Abbildung 18 dargestellt ist, betrug unter der Perfusion mit ORi_1 $-28,6 \pm 10,6$ mV. In ORi_{1s} änderte sich das Membranpotential um $-0,4 \pm 4,6$ mV auf -29 ± 12 mV. In ORi_1 wurde nach erneuter Perfusion ein Membranpotential von $-37 \pm 15,1$ mV beobachtet. Es depolarisierten jedoch nur zwei Oozyten um $-39,5$ beziehungsweise $-8,5$ mV, bei allen anderen Oozyten war keine Änderung des Membranpotentials messbar. Während der Perfusion mit ORi_s hyperpolarisierten die Oozyten abschließend um $-5,9 \pm 16$ mV auf $-42,9 \pm 6,5$ mV. Hier waren erneut starke Schwankungen zwischen den einzelnen Oozyten messbar. Drei Oozyten hyperpolarisierten um $-37,5$ bis $-2,5$ mV, drei depolarisierten hingegen um $1,5$ bis 6 mV.

Nach einer sechs- bis achtstündigen Inkubation in ORi_1 wiesen die „Mocks“ der Gruppe IX unter Perfusion mit ORi_1 ein Membranpotential von $-25,1 \pm 8,1$ mV auf, das unter Zugabe von Sulfat zu ORi_1 um $0,9 \pm 1,5$ mV auf $-24,2 \pm 8,5$ mV depolarisierte. Unter der wiederholten Perfusion mit ORi_1 hyperpolarisierten die Oozyten wieder marginal um $-1 \pm 1,1$ mV auf $-25,1 \pm 9,5$ mV. Unter der anschließenden Perfusion mit ORi_s war eine Hyperpolarisation um $-10,9 \pm 7,1$ mV auf $-36 \pm 5,6$ mV messbar.

Die Gruppe X der neun bis zwanzig Stunden in ORi_1 inkubierten „Mocks“ wies unter Perfusion mit ORi_1 ein Membranpotential von $-14 \pm 12,3$ mV auf. Unter Zugabe von Sulfat zu ORi_1 depolarisierten die Oozyten marginal um $0,4 \pm 2,9$ mV auf $-13,6 \pm 10,8$ mV. Die anschließende Perfusion mit ORi_1 ließ die Oozyten auf $-21,3 \pm 11$ mV hyperpolarisieren. In ORi_s verstärkte sich dieser Effekt um $-12,5 \pm 19,8$ mV, es wurde ein Membranpotential von $-33,8 \pm 8,8$ mV gemessen.

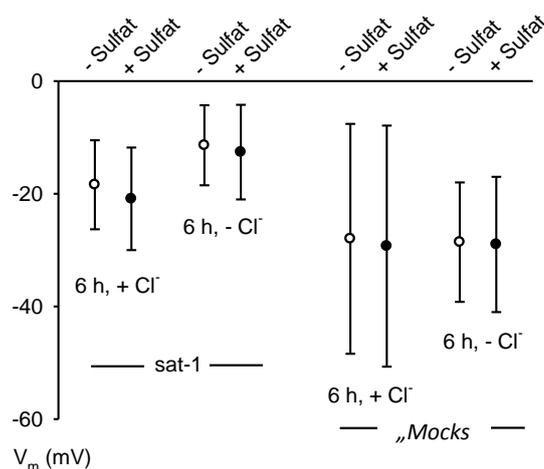


Abbildung 18: Membranpotential sat-1-exprimierender Oozyten und „Mocks“ nach Inkubation in chloridreicher ORI und chloridreduzierter ORI, während der Perfusion mit ORI, und anschließender Zugabe von Sulfat. Die Abbildung zeigt Mittelwerte von jeweils zwei bis drei Oozyten aus zwei Spendertieren. Die Oozyten wurden für vier bis sechs Stunden in den jeweiligen Lösungen inkubiert bevor die Applikation von Sulfat erfolgte. Die sat-1-exprimierenden Oozyten depolarisierten durch Inkubation in chloridreduzierter ORI, das Membranpotential der „Mocks“ blieb von diesem Manöver weitgehend unbeeinflusst.

3.1.4 pH-Abhängigkeit der Aufnahme von Sulfat: Ansäuerung der Oozyten mit Ammoniumchlorid

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Sulfattransports durch sat-1 wurden die Oozyten bei diesem Versuch 15 Minuten mit ORi_{NH_4Cl} , die 10 mM Ammoniumchlorid enthielt, perfundiert. Auf den Mechanismus der Ansäuerung der *Xenopus-laevis*-Oozyten durch Ammoniumchlorid wird im Kapitel 4.5 näher eingegangen. Die Anzahl der für diesen Versuch verwendeten Oozyten und Spendertiere ist in Tabelle 11 aufgeführt.

	sat-1-exprimierende Oozyten	„Mocks“
Oozyten	11	6
Spendertiere	3	3

Tabelle 11: Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere bei dem Versuch der Ansäuerung der Oozyten mit Ammoniumchlorid.

Die Abbildung 19 gibt den Verlauf des Membranpotentials der sat-1-exprimierenden Oozyten und der „Mocks“ wieder.

Bei den sat-1-exprimierenden Oozyten stellte sich unter Perfusion mit ORi zunächst ein Membranpotential von $-38,3 \pm 7,5$ mV ein. Nach der Zugabe von Sulfat zu ORi änderte sich das Potential marginal um $-0,3 \pm 1,3$ mV und betrug $-38,6 \pm 8,3$ mV, unter erneuter Perfusion mit ORi konnte ein Abfall des Potentials um $-0,8 \pm 1,7$ mV auf $-39,3 \pm 9,1$ mV detektiert werden. Die Zugabe von 10 mM Ammoniumchlorid zu ORi führte zu einer signifikanten Depolarisation um $24,2 \pm 6$ mV auf $-15,1 \pm 5,8$ mV. Nach 15-minütiger Perfusion mit dieser Lösung kam es unter der Perfusion mit sulfathaltiger ORis zur Hyperpolarisation um $26,8 \pm 10,2$ mV und Einstellung eines Potentials von -42 ± 14 mV. Die anschließende Perfusion mit ORi führte zu einer leichten Hyperpolarisation um $-0,6 \pm 1,8$ mV auf $-42,5 \pm 14$ mV.

Bei den wasserinjizierten Oozyten betrug das Membranpotential bei Perfusion mit ORi $-43,5 \pm 4,8$ mV, bei Perfusion mit sulfathaltiger ORis verschob sich das Potential um $1,4 \pm 2$ mV auf $-42,1 \pm 5,6$ mV. Unter erneuter Perfusion mit ORi konnte eine Potentialänderung von $0,4 \pm 2,1$ mV auf $-41,7 \pm 7,4$ mV detektiert werden. Während der Perfusion mit ammoniumchloridhaltiger ORiNH₄Cl depolarisierten die Oozyten um $31,9 \pm 7$ mV auf $-9,8 \pm 10,7$ mV. Eine starke Hyperpolarisation um $-35,6 \pm 11,5$ mV auf $-47 \pm 7,9$ mV konnte unter der folgenden Perfusion mit sulfathaltiger ORis beobachtet werden. Die anschließende Perfusion mit ORi führte zu einer Hyperpolarisation um $-2,1 \pm 0,9$ mV auf $-49,1 \pm 7,3$ mV.

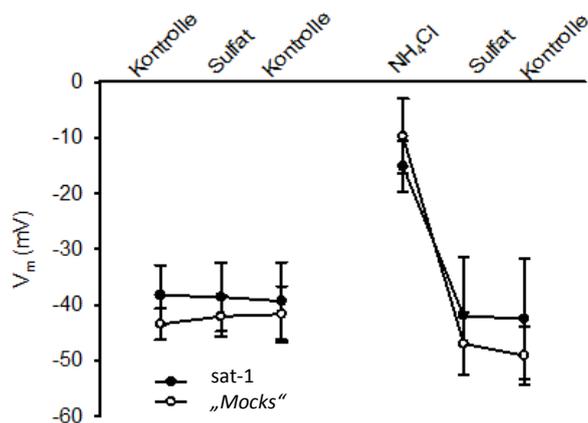


Abbildung 19: Reaktion der sat-1-exprimierenden und wasserinjizierten Oozyten auf eine 15-minütige Inkubation mit Ammoniumchlorid. Als Kontrolle erfolgte die Perfusion mit ORI. Deutlich zu erkennen ist die starke Depolarisation während der Perfusion mit ammoniumchloridhaltiger OR_{NH_4Cl} , die bei den wasserinjizierten Oozyten stärker ausgeprägt zu sein scheint als bei den sat-1-exprimierenden Oozyten.

3.1.5 Abhängigkeit der Sulfataufnahme von der extrazellulären Calciumchloridkonzentration

Um den Einfluss von Calcium auf die sat-1-exprimierenden Oozyten genauer zu untersuchen, wurden die Potentialänderungen bei unterschiedlichen Calciumchloridkonzentrationen gemessen. Die Oozyten wurden zunächst mit ORI und anschließend mit chloridreduzierter OR_i perfundiert, in der Natrium- und Kaliumchlorid durch äquimolare Mengen Natrium- und Kaliumgluconat ersetzt wurden. Weiterhin enthielten die chloridreduzierten Lösungen steigende Mengen Calciumchlorid: OR_{i_1} enthielt 2 mM, OR_{i_4} 4 mM und OR_{i_5} 6 mM Calciumchlorid. Untersucht wurde die Änderung des Potentials sat-1-exprimierender Oozyten und „Mocks“ in An- und Abwesenheit von Sulfat. Die Tabelle 12 zeigt die Anzahl der verwendeten Oozyten und der Spendertiere.

	sat-1-exprimierende Oozyten	„Mocks“
Oozyten	11	6
Spendertiere	4	4

Tabelle 12: Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere im Versuch der Variation der extrazellulären Calciumkonzentration in chloridreduzierter OR_{i_1} , OR_{i_4} und OR_{i_5} .

Die Änderungen des Membranpotentials der sat-1-exprimierenden Oozyten sowie der „Mocks“ während der Perfusion mit den Lösungen mit steigenden Calciumchloridkonzentrationen ist in Abbildung 20 dargestellt.

Die sat-1-exprimierenden Oozyten zeigten unter Perfusion mit ORi zunächst eine Einstellung des Membranpotentials von $-32,6 \pm 8,4$ mV. Bei einigen Oozyten wurde die Reaktion unter der Zugabe von Sulfat zu ORi gemessen, die zu einer geringen Depolarisation um $+0,4 \pm 1,3$ mV auf $-32,3 \pm 8,2$ mV führte. Nach erneuter Perfusion mit ORi wurde die Einstellung eines Potentials von $-34,4 \pm 8,8$ mV beobachtet. Alle sat-1-exprimierenden Oozyten wurden anschließend mit ORi₁ perfundiert, dabei war eine starke Depolarisation auf $-20,7 \pm 10,9$ mV detektierbar. Bei drei der gemessenen Oozyten fand nur eine sehr geringe Depolarisation um 1,5 bis 2 mV statt, zwei Oozyten depolarisierten stark um 20 bis 24 mV. Der Zusatz von Sulfat zu ORi₁ verstärkte die Depolarisation um $2,1 \pm 5,5$ mV auf $-18,6 \pm 12,7$ mV. Durch erneute Perfusion mit ORi kam es zur Hyperpolarisation von $-16 \pm 11,8$ mV und Einstellung eines Membranpotentials von $-34,6 \pm 8,6$ mV. Bei vier der untersuchten Oozyten konnte eine starke Hyperpolarisation im Bereich von -27 bis -33 mV registriert werden, drei weitere hyperpolarisierten im Bereich von -3,5 bis -14,5 mV, eine Oozyte depolarisierte hingegen um 3 mV. Unter der Perfusion mit ORi₄ fand eine Depolarisation um $5,4 \pm 5,2$ mV auf $-29,3 \pm 12,6$ mV statt, die unter der Zugabe von Sulfat noch um $4,3 \pm 8,6$ mV auf $-25 \pm 13,7$ mV gesteigert werden konnte. Eine Oozyte hyperpolarisierte während der Applikation von ORi₄ um -4 mV. Die Perfusion der Oozyten mit sulfathaltiger ORi_{4s} zeigte bei zwei Oozyten starke Reaktionen im Sinne einer Depolarisation um 12 beziehungsweise 28 mV. Alle anderen Oozyten zeigten nahezu keine Veränderungen. Eine erneute Hyperpolarisation um $-6 \pm 9,2$ mV auf $-31 \pm 9,6$ mV konnte unter der Perfusion mit ORi beobachtet werden. Zwei Oozyten hyperpolarisierten sehr stark. Diese Oozyten hatten sich bereits unter Perfusion mit ORi_{4s} in ihrem Verhalten von den anderen Oozyten unterschieden. Es wurde keine Änderung des mittleren Potentials der Oozyten unter der Perfusion mit ORi₅ registriert, das weiterhin $31 \pm 9,7$ mV betrug. Die zwei erwähnten Oozyten unterschieden sich jedoch auch hier deutlich, da sie um 6 beziehungsweise 11 mV depolarisierten, nahezu alle anderen Oozyten jedoch nur marginale, eher hyperpolarisierende Änderungen des Potentials aufwiesen. Auch unter

Zugabe von Sulfat zu ORi₅ änderte sich das Potential nur unwesentlich um $0,7 \pm 3$ mV auf $-30,3 \pm 11,3$ mV.

Bei den „Mocks“ stellte sich unter Perfusion mit ORi ein Potential von $-35,4 \pm 8,3$ mV ein. Während der Perfusion mit sulfathaltiger ORi₅ hyperpolarisierten die Oozyten leicht um $-1,3 \pm 0,8$ mV auf $-36,8 \pm 7,9$ mV. Nach der erneuten Perfusion mit ORi und Einstellung eines um $-0,4 \pm 1,2$ mV reduzierten Potentials von $-37,2 \pm 8,2$ mV führte die Perfusion mit ORi₁ zu einer Depolarisation um $12,8 \pm 8,9$ mV auf $-24,4 \pm 12,9$ mV, die sich unter der Zugabe von Sulfat leicht um $1,1 \pm 1,7$ mV auf $-23,3 \pm 13,7$ mV erhöhte. Nach der erneuten Perfusion mit ORi war eine Hyperpolarisation um $17,8 \pm 15,1$ mV auf $-41,2 \pm 13,9$ mV messbar. Unter ORi₄ hyperpolarisierten die Oozyten um $-5,6 \pm 7,6$ mV auf $-46,8 \pm 12$ mV. Drei Oozyten zeigten lediglich marginale Hyperpolarisationen von $-0,5$ mV, zwei hyperpolarisierten um -5 beziehungsweise -7 mV und eine Oozyte hyperpolarisierte um -20 mV. Die Zugabe von Sulfat änderte das Potential mit einer Verschiebung von $0,2 \pm 1,4$ mV auf $-46,6 \pm 11,1$ mV nur marginal. Einer Depolarisation von $2,2 \pm 2,2$ mV auf $-44,4 \pm 10,1$ mV während der Perfusion mit ORi folgte unter Perfusion mit ORi₅ die Einstellung eines Potentials von $-43,2 \pm 8,3$ mV. Nur eine Oozyte depolarisierte stark um 29 mV, alle anderen hyperpolarisierten hingegen leicht. Nach der Zugabe von Sulfat zu ORi₅ konnte eine Depolarisation um $7,1 \pm 16,1$ mV auf $-36,1 \pm 15,5$ mV gemessen werden.

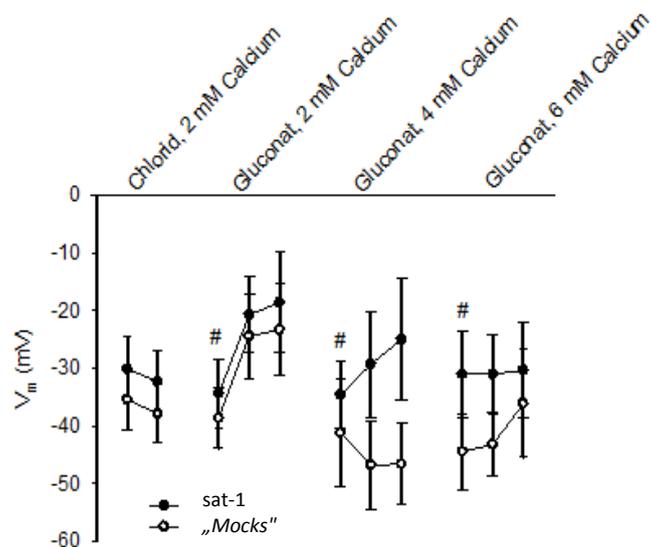


Abbildung 20: Änderung des Membranpotentials der sat-1-exprimierenden Oozyten und der „Mocks“ unter Perfusion mit ORi und den chloridreduzierten Oozytenringerlösungen ORi, ORi₄ und ORi₅ mit steigender Calciumchloridkonzentration. Die mit „#“ gekennzeichneten Punkte stellen das Membranpotential unter der Perfusion mit ORi dar: Reihenfolge der verwendeten Perfusionslösungen ist somit ORi, ORi₅, ORi, ORi₄, ORi₅, ORi, ORi₄, ORi₅, ORi, ORi₅ und ORi₅.

3.2 Radiochemische Aufnahmeversuche

In den radiochemischen Versuchen wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem Sulfat in sat-1-exprimierende Oozyten sowie in „Mocks“, das heißt wasserinjizierten Oozyten, gemessen. Die genannten Werte sind Mittelwerte der Versuchsergebnisse.

3.2.1 Sat-1-Zeitreihe

Um die Aufnahme von Sulfat über sat-1 genauer zu bestimmen, wurde eine Zeitreihe aufgenommen. Dabei wurde die Sulfataufnahme sat-1-exprimierender Oozyten nach jeweils ein-, zwei-, fünf-, zehn- und 20-minütiger Inkubation in 20 μM Na_2SO_4 sowie 0,01 μM ^{35}S -haltiger ORi* gemessen. Somit konnte das zeitliche Verhalten der Sulfataufnahme zu definierten Zeitpunkten bestimmt werden. Tabelle 13 führt die Anzahl der in diesem Versuch verwendeten Oozyten und Spendertiere auf.

	sat-1-exprimierende Oozyten	„Mocks“
Oozyten, eine Minute Inkubiert	10	9
Oozyten, zwei Minuten inkubiert	11	11
Oozyten, fünf Minuten inkubiert	11	8
Oozyten, zehn Minuten inkubiert	8	8
Oozyten, 20 Minuten inkubiert	10	11
Spendertiere	1	1

Tabelle 13: Anzahl der pro Inkubationszeit verwendeten Oozyten und Spendertiere bei dem Versuch zur Anfertigung einer sat-1-Zeitreihe.

Die sat-1-exprimierenden Oozyten hatten nach einer Inkubationsdauer von einer Minute $2,79 \pm 0,44$ pmol pro Oozyte aufgenommen. Nach einer zweiminütigen Inkubationsdauer betrug die Aufnahme $2,16 \pm 0,35$ pmol pro Oozyte. Die Aufnahme steigerte sich auf $5,03 \pm 1,16$ pmol pro Oozyte nach fünfminütiger Inkubation, $6,06 \pm 1,45$ pmol pro Oozyte nach einer Inkubationsdauer von zehn Minuten und $12,57 \pm 2,63$ pmol pro Oozyte nach 20-minütiger Inkubation.

Bei den „Mocks“ wurde nach einer einminütigen Inkubation eine Sulfataufnahme von $1,03 \pm 0,29$ pmol pro Oozyte gemessen. Nach einer Inkubationsdauer von zwei Minuten lag die Aufnahme bei $2,06 \pm 0,73$ pmol pro Oozyte. Die Sulfataufnahme nach fünfminütiger Inkubation betrug $1,68 \pm 0,4$ pmol pro Oozyte und fiel nach zehnminütiger Inkubation auf $1,27 \pm 0,16$ pmol pro Oozyte ab. Nach einer 20-minütigen Inkubation wurde in den „Mocks“ eine Aufnahme von $4,02 \pm 1,29$ pmol pro Oozyte gemessen.

Aufgrund des in Abbildung 21 dargestellten Aufnahmeverhaltens von sat-1 wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten radiochemischen Aufnahmeversuche eine Inkubationszeit von fünf Minuten pro Bedingung gewählt. In diesem Zeitfenster verläuft die Aufnahme von Sulfat nahezu linear.

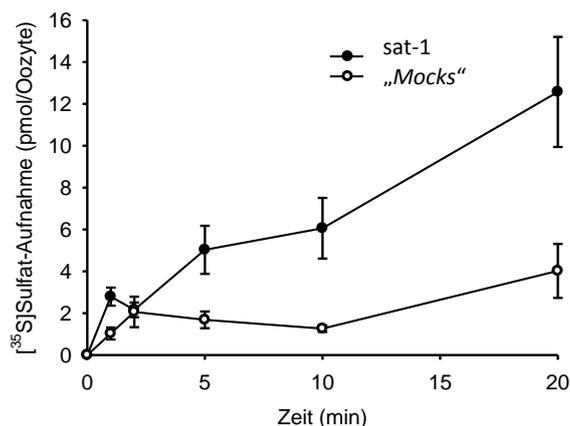


Abbildung 21: Sulfataufnahme sat-1-exprimierender Oozyten und „Mocks“ in Abhängigkeit der Inkubationsdauer von einer bis 20 Minuten in sulfathaltiger ORi₅*.

3.2.2 Chloridabhängigkeit der Aufnahme von [35S]Sulfat

Zur Untersuchung der Chloridabhängigkeit des Sulfattransports durch sat-1 wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt. Dabei wurde die Sulfataufnahme in die Oozyten nach einer fünfminütigen Inkubation in 20 μM Na_2SO_4 - sowie 0,01 μM $[^{35}\text{S}]\text{H}_2\text{SO}_4$ -haltiger ORi₅* untersucht.

3.2.2.1 Chloridersatz durch Gluconat, Thiocyanat und Nitrat

Wie bei den elektrophysiologischen Messungen wurden Natrium- und Kaliumchlorid in ORi₁ durch Natrium- und Kaliumgluconat, in ORi₂ durch Natrium- und Kaliumthiocyanat und in ORi₃ durch Natrium- und Kaliumnitrat ersetzt. Den Lösungen wurden jeweils 20 μM Na_2SO_4 sowie 0,01 μM $[^{35}\text{S}]\text{H}_2\text{SO}_4$ hinzugefügt. Die Inkubationszeit der Oozyten betrug fünf Minuten. Die Tabelle 14 nennt die Anzahl der pro Bedingung untersuchten Oozyten und der Spendertiere.

In Abbildung 22 ist die Sulfataufnahme der sat-1-exprimierenden Oozyten und der „Mocks“ dargestellt.

	sat-1-exprimierende Oozyten	„Mocks“
Oozyten, in ORi _s * inkubiert	53	54
Oozyten, in ORi ₁₅ * inkubiert	53	59
Oozyten, in ORi ₂₅ * inkubiert	51	55
Oozyten, in ORi ₃₅ * inkubiert	54	54
Spendertiere	4	4

Tabelle 14: Anzahl der pro Lösung verwendeten Oozyten und Spendertiere bei dem Versuch des Natrium- und Kaliumchloridersatzes durch Gluconat, Thiocyanat und Nitrat.

Die sat-1-exprimierenden Oozyten zeigten eine Sulfataufnahme von $4,28 \pm 0,84$ pmol/5 Minuten pro Oozyte in ORi_s*, in ORi₁₅* war die Aufnahme um 35,81 % auf $6,38 \pm 2,4$ pmol/5 Minuten pro Oozyte erhöht. In ORi₂₅* konnte eine um 61,84 % auf $1,79 \pm 0,51$ pmol/5 Minuten pro Oozyte verringerte Sulfataufnahme gemessen werden. Die Sulfataufnahme in ORi₃₅* war ebenfalls um 32,77 % auf $3,16 \pm 1,61$ pmol/5 Minuten pro Oozyte reduziert.

Bei den „Mocks“ fand in ORi_s* eine Aufnahme von $3,79 \pm 3$ pmol/5 Minuten pro Oozyte statt. Die Aufnahme in ORi₁₅* war um 6,52 % auf $3,54 \pm 1,46$ pmol/5 Minuten pro Oozyte vermindert. In ORi₂₅* steigerte sich die Aufnahme um 19,5 % auf $4,53 \pm 2$ pmol/5 Minuten pro Oozyte, in ORi₃₅* wurde eine Steigerung der Sulfataufnahme um 73,26 % auf $6,57 \pm 4,48$ pmol/5 Minuten pro Oozyte registriert.

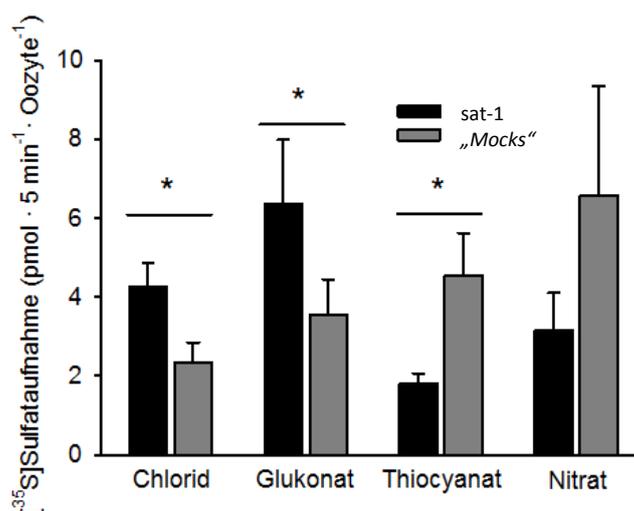


Abbildung 22: Sulfataufnahme von sat-1-exprimierenden und wasserinjizierten Oozyten „Mocks“ in ORi_s^* , ORi_{1s}^* , ORi_{2s}^* und ORi_{3s}^* . Die mit „*“ gekennzeichneten Balken zeigen einen signifikanten Unterschied bezogen auf die $[^{35}S]$ Sulfataufnahme. Die gewählte Signifikanz ist $p < 0,1$. Gezeigt werden die Daten aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, pro Bedingung wurden jeweils elf bis 16 Oozyten untersucht.

3.2.2.2 Natriumchloridersatz durch Mannit

In der Kontrolllösung ORi_{220Ms}^* wurden die in ORi enthaltenen 110 mM Natriumchlorid durch 220 mM Mannit ersetzt, die Kalium- sowie die Calciumchloridkonzentrationen blieben jedoch unverändert. Die so hergestellte ORi_{220Ms}^* enthielt zusätzlich 20 μM Na_2SO_4 und 0,01 μM $[^{35}S]H_2SO_4$. Die Inkubationszeit der Oozyten betrug fünf Minuten. Der Tabelle 15 sind die Anzahl der untersuchten Oozyten sowie der Spendertiere entnehmbar. Abbildung 23 stellt die Sulfataufnahme der sat-1-exprimierenden Oozyten und der „Mocks“ nach Inkubation in ORi_s^* und ORi_{220Ms}^* dar.

	sat-1-exprimierende Oozyten	„Mocks“
Oozyten, in ORi_s^* inkubiert	58	57
Oozyten, in ORi_{220Ms}^* inkubiert	58	58
Spendertiere	4	4

Tabelle 15: Anzahl der pro Bedingung eingesetzten Oozyten und Spendertiere bei dem Versuch des Natriumchloridersatzes durch Mannit.

In ORI nahmen die sat-1-exprimierenden Oozyten $3,39 \pm 1,11$ pmol/5 Minuten pro Oozyte auf. Die in $\text{ORI}_{220\text{M}_5^*}$ inkubierten, sat-1-exprimierenden Oozyten nahmen $5,52 \pm 1,82$ pmol/5 Minuten pro Oozyte auf, das heißt die Aufnahme war um 62,72 % gesteigert.

Bei den wasserinjizierten Oozyten „Mocks“ fand unter Inkubation in ORI_5^* eine Aufnahme von $1,08 \pm 0,19$ pmol/5 Minuten pro Oozyte statt. Die Inkubation in $\text{ORI}_{220\text{M}_5^*}$ führte zu einer Steigerung der Aufnahme um 88,99% auf $2,03 \pm 1,07$ pmol/5 Minuten pro Oozyte in den wasserinjizierten Oozyten.

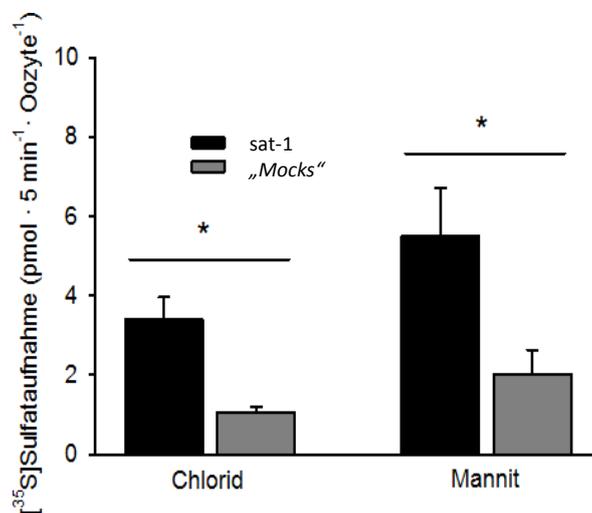


Abbildung 23: Sulfataufnahme von sat-1-exprimierenden und wasserinjizierten Oozyten „Mocks“ nach Ersatz des gesamten Natrium- und Kaliumchlorids durch Mannit (ORI_5^* und $\text{ORI}_{220\text{M}_5^*}$). Die in der Abbildung mit „*“ gekennzeichneten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied bezogen auf die $[^{35}\text{S}]$ Sulfataufnahme. Die gewählte Signifikanz ist $p < 0,1$. Gezeigt werden die Daten aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, pro Bedingung wurden jeweils zwölf bis 21 Oozyten untersucht.

3.2.2.3 Aufnahme von Sulfat nach Inkubation der Oozyten in chloridreduzierter ORI_1

Um die Oozyten intrazellulär an Chlorid zu verarmen, fand eine dem Aufnahmeversuch vorrausgehende Inkubation in ORI_1 über 180 Minuten statt. Für den Aufnahmeversuch wurden in chloridreduzierter ORI_1 inkubierte Oozyten sowie in chloridreicher ORI_1 inkubierte Oozyten als Kontrolle fünf Minuten in $20 \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ - sowie $0,01 \mu\text{M } [^{35}\text{S}]\text{H}_2\text{SO}_4$ -haltiger

ORi_s* inkubiert. Die Anzahl der untersuchten Oozyten und der Spendertiere ist der Tabelle 16 entnehmbar.

	sat-1-exprimierende Oozyten	„Mocks“
Oozyten, nicht chloridverarmt	35	36
Oozyten, durch Inkubation in chloridreduzierter ORi ₁ chloridverarmt	36	33
Spendertiere	3	3

Tabelle 16: Anzahl der pro Lösung verwendeten Oozyten und Spendertiere bei dem Versuch der Chloridverarmung der Oozyten durch Inkubation in chloridreduzierter ORi₁.

Abbildung 24 zeigt die Sulfataufnahme der chloridverarmten und nicht chloridverarmten Oozyten.

Die in der chloridhaltigen Kontrolllösung ORi inkubierten sat-1-exprimierenden Oozyten nahmen in ORi_s* $4,67 \pm 2,23$ pmol/5 Minuten pro Oozyte auf. In chloridreduzierter ORi₁ inkubierte sat-1-exprimierende Oozyten zeigten eine Aufnahme von $12,72 \pm 6,46$ pmol/5 Minuten pro Oozyte, die Aufnahme war im Vergleich zu den in ORi inkubierten Oozyten um 172,08 % gesteigert.

Die wasserinjizierten Oozyten „Mocks“ nahmen in ORi_s* $3,58 \pm 2,33$ pmol/5 Minuten pro Oozyte auf. Nach Inkubation in chloridverarmter ORi₁ nahmen die „Mocks“ $5,5 \pm 4,87$ pmol/5 Minuten pro Oozyte, das heißt 53,64 % mehr, auf.

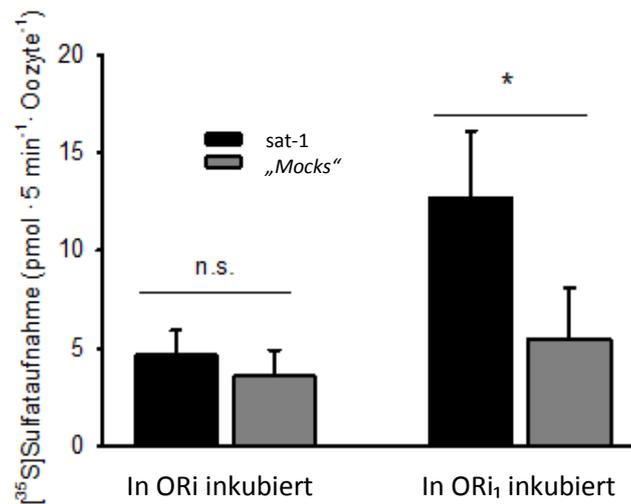


Abbildung 24: Sulfataufnahme von sat-1-exprimierenden und wasserinjizierten Oozyten „Mocks“ abhängig von der vorausgehenden Inkubation in chloridreduzierter ORI₁ und chloridreicher ORI. Die mit „*“ gekennzeichneten Balken zeigen einen signifikanten Unterschied bezüglich der [³⁵S]Sulfataufnahme. Die gewählte Signifikanz ist $p < 0,1$. Gezeigt werden die Daten aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, pro Bedingung wurden zehn bis 14 Oozyten untersucht.

3.2.3 pH-Abhängigkeit der Aufnahme von [³⁵S]Sulfat: Ansäuerung der Oozyten mit Ammoniumchlorid

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Sulfataufnahme durch sat-1 wurden einige Oozyten 15 Minuten in 10 mM ammoniumchloridhaltiger ORI_{NH₄Cl} inkubiert. Unmittelbar nach der Ansäuerung fand der Aufnahmeversuch mit einer Inkubationszeit von fünf Minuten in ORI_s* statt. Eine Messung des intrazellulären pH-Wertes wurde nicht vorgenommen. Ammoniumchlorid führt über einen in Kapitel 4.5 genauer erläuterten Mechanismus zur Ansäuerung der Oozyten. Die Tabelle 17 führt die Anzahl der verwendeten Oozyten und Spendertiere auf. In Abbildung 25 ist die Sulfataufnahme der nicht angesäuerten sowie der angesäuerten Oozyten dargestellt.

	sat-1-exprimierende Oozyten	„Mocks“
Oozyten, nicht inkubiert	49	49
Oozyten, in ORiNH ₄ Cl inkubiert	55	53
Spendertiere	4	4

Table 17: Anzahl der pro Lösung verwendeten Oozyten und Spendertiere bei dem Versuch der Ansäuerung der Oozyten mit Ammoniumchlorid.

Die sat-1-exprimierenden Oozyten nahmen in ORi_s* $4,25 \pm 0,67$ pmol/5 Minuten pro Oozyte auf, nach der Inkubation in ORiNH₄Cl steigerte sich die Aufnahme um 15,61 % auf $4,92 \pm 0,81$ pmol/5 Minuten pro Oozyte.

Bei den wasserinjizierten Oozyten fand eine Steigerung der Aufnahme um 6,03 % von $1,03 \pm 1,28$ pmol/5 Minuten pro Oozyte ohne Inkubation auf $1,16 \pm 0,9$ pmol/5 Minuten pro Oozyte nach Inkubation in ORiNH₄Cl statt.

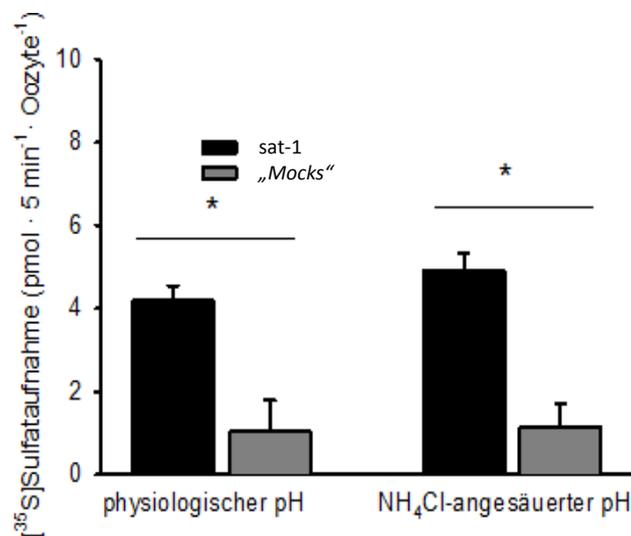


Abbildung 25: Sulfataufnahme von sat-1-exprimierenden und wasserinjizierten Oozyten „Mocks“ abhängig von der vorausgehenden Inkubation in ammoniumchloridhaltiger ORiNH₄Cl. Die mit „*“ gekennzeichneten Balken zeigen einen signifikanten Unterschied bezogen auf die [³⁵S]Sulfataufnahme. Die gewählte Signifikanz ist $p < 0,1$. Gezeigt werden die Daten aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, pro Bedingung wurden neun bis 17 Oozyten untersucht.

4 Diskussion

4.1 Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*

In allen Versuchen dieser Arbeit wurden die für die Expression heterologer Proteine genutzten Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* als Expressionssystem für sat-1 verwendet.

Die Oozyten können nach DUMONT in sechs verschiedene Stadien eingeteilt werden, die aufgrund der asynchronen Oogenese alle gleichzeitig im Ovar vorhanden sind. Makroskopisch unterscheiden sich die Oozyten der unterschiedlichen Stadien vor allem in ihrer Farbe und Größe, die von 50 µm im Stadium I bis 1300 µm im Stadium VI reicht (DUMONT 1972).

Während der Oogenese, die ungefähr acht Monate dauert, kommt es zur Akkumulation von Ribosomen, Glykogen, Lipiden, Dotter und zelleigener mRNA in den Oozyten, die in der ersten meiotischen Prophase arretiert sind (WEBER 1999a). Oozyten des Stadiums VI verharren zunächst in diesem, bevor es zur Atresie kommt (WAGNER et al. 2000). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sind lediglich Oozyten der Stadien V und VI nach DUMONT (1972) geeignet, da nur Oozyten dieser Stadien artfremde cRNA transkribieren und translatieren können. Ein durch ein unpigmentiertes äquatoriales Band klar abgrenzbarer animalischer und vegetativer Pol und die entsprechende Größe ermöglichen die einfache Selektion dieser Oozyten.

Die durch Stimulation mit β -HCG auslösbare Ovulation des Krallenfroschs wurde historisch zur Durchführung diagnostischer Schwangerschaftstests genutzt (DUMONT 1972). GURDON et al. (1971) demonstrierten, dass die Oozyten nach Injektion von mRNA zur Produktion von Hämoglobin fähig sind.

Die Injektion von cRNA in *Xenopus-laevis*-Oozyten, deren Größe eine sehr einfache Handhabung zulässt, ermöglicht das Untersuchen exprimierter Membranproteine innerhalb von kurzer Zeit durch einen hohen Grad der Expression dieser Proteine in der Membran der Oozyte (SIGEL 1990). Die Membran der Oozyten besitzt zahlreiche Mikro- und Makrovilli, die die Oberfläche um das Vierfache vergrößern (DUMONT 1972; WEBER 1999a). Es besteht die Möglichkeit der funktionellen Untersuchung von Membranproteinen aller Spezies

(MARKOVICH 2008). Während der Inkubationszeit der mRNA-injizierten Oozyten ist eine einfache Kontrolle der Umgebungsbedingungen möglich, außerdem ist die Oozyte mit allen für Wachstum und Translation notwendigen Substraten ausgestattet (SIGEL 1990; WAGNER et al. 2000). Bei regelmäßigem Wechsel des Inkubationsmediums und der Lagerung der Oozyten bei einer konstanten Temperatur von 14 bis 16 °C sind die Oozyten zehn bis 15 Tage für Experimente verwendbar. Die in der Oozyte exprimierten Proteine können unter anderem mit verschiedenen elektrophysiologischen und radiochemischen Techniken untersucht werden (MARKOVICH 2008; WAGNER et al. 2000; WEBER 1999a).

Neben den genannten Vorteilen, die die Oozyten von *Xenopus laevis* bieten, sind jedoch auch einige Nachteile feststellbar. Saisonale Schwankungen sind sowohl in Hinblick auf die Qualität als auch bezüglich des Membranpotentials zu verzeichnen (SIGEL 1990; WEBER 1999a). Stammen die Oozyten von verschiedenen Fröschen, können deutliche Unterschiede im gemessenen Ruhemembranpotential sichtbar sein, das sich normalerweise zwischen -30 und -70 mV, in Ausnahmefällen sogar um -90 mV, bewegt (WEBER 1999a). Starke inter- und intraindividuelle Schwankungen zeigten auch die intrazellulären Ionenkonzentrationen. Oozyten, die am selben Tag von einem Weibchen entnommen wurden, weisen jedoch ähnliche Ionenkonzentrationen auf (BARISH 1983; WEBER 1999a). Schwankungen der Temperatur während der Lagerung der Oozyten haben sich als sehr ungünstig erwiesen. Die kurze Lebensdauer von ungefähr 14 Tagen stellt ebenfalls einen limitierenden Faktor in der Verwendung der *Xenopus-laevis*-Oozyten dar (WEBER 1999b). Da die zelluläre Umgebung Einfluss auf die Funktion von Proteinen hat, kann es zu einer Beeinträchtigung der Transporteigenschaften der Transporter durch eine modifizierte extrazelluläre Umgebung kommen (WAGNER et al. 2000). Falls das exogene, exprimierte Protein eine toxische Wirkung auf die Oozyte hat, ist eine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Oozyte möglich. Die exprimierten, exogenen Proteine können auf vielfältige Weise die Funktion der endogenen Proteine beeinflussen, so können beispielsweise Komplexe aus endogenen und exogenen Proteinen entstehen oder es kann eine gegenseitige Regulation der Transportfunktion stattfinden (WAGNER et al. 2000). In Hinblick auf die Wirkung von Chlorid auf sat-1 könnten Konfigurationsänderungen durch eine allosterische Modulation stattfinden.

4.2 Endogene Ionenkanäle der *Xenopus-laevis*-Oozyten

Die Oozyte selbst besitzt zahlreiche endogene Transporter und Ionenkanäle (Übersichten in DASCAL 1987; WAGNER et al. 2000; WEBER 1999b). Diese können mit den durch die Injektion von RNA exprimierten heterologen Proteinen interagieren, weshalb genaue Kenntnisse über die endogenen Transportproteine notwendig sind (WAGNER et al. 2000). Zu den endogen vorhandenen Transportproteinen gehören unterschiedliche Natrium-, Kalium-, Calcium-, Chlorid- und Wasserkanäle und die Natrium-Kalium-ATPase (WEBER 1999a; WEBER 1999b). Der Hauptionenstrom durch die endogenen Ionenkanäle, der das mittlere Ruhemembranpotential von -40 mV erzeugt, findet durch calciumregulierte Chloridkanäle statt (DASCAL 1987). Um eine genaue Beurteilung der durch die Injektion von RNA exprimierten exogenen Transporter und Kanäle zu ermöglichen, muss bei der experimentellen Verwendung von *Xenopus-laevis*-Oozyten stets der Einfluss der endogenen Transporter auf die Messergebnisse betrachtet werden. Die Messungen an wasserinjizierten Oozyten, die nur die Ionenströme der endogenen Transporter darstellen, ermöglichen eine Darstellung der Ströme durch endogene Transporter und lassen so eine Unterscheidung der durch endogene und mRNA-injizierte Transporter verursachten Ionenströme zu. Aus diesem Grund wurden bei den elektrophysiologischen und radiochemischen Versuchen neben den sat-1-exprimierenden Oozyten stets auch wasserinjizierte Oozyten untersucht.

4.2.1 Die endogenen Chloridkanäle der *Xenopus-laevis*-Oozyten

Chlorid gehört mit einer intraozytären Konzentration von 24 bis 62 mM zu den am höchsten konzentrierten Ionen in den *Xenopus-laevis*-Oozyten (Übersicht in WEBER 1999a). Der größte Teil der zelleigenen Anionenströme der Oozyten wird von Chlorid vermittelt (WEBER 1999a). Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Iod, ^{125}I , das selektiv durch Chloridkanäle transportiert wird und das Isotop der Wahl zum Untersuchen der Chloridleitfähigkeit darstellt, konnten vier Gruppen von Chloridkanälen identifiziert werden (CHAO und KATAYAMA 1991).

In den Oozyten einiger Frösche wurden hyperpolarisationsaktivierte Chloridkanäle entdeckt. Die Chloridströme durch diese Kanäle variierten bei Oozyten unterschiedlicher Spendertiere stark. Die hyperpolarisationsaktivierten Chloridkanäle weisen keine hohe Selektivität für

Chlorid auf, sondern transportieren auch die Anionen Iodid, Nitrat, Bromid, Propionat und Acetat (KOWDLEY et al. 1994).

Volumensensitive Chloridkanäle, die durch Aktivierung von Chloridkanälen in hypotonen Medien entdeckt wurden, transportieren neben Chlorid unter anderem Thiocyanat, Iodid, Nitrat, Bicarbonat und Gluconat (ACKERMAN et al. 1994).

Calciumaktivierte Chloridkanäle werden durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert (BARISH 1983; WEBER 1999a). In Versuchen von BARISH (1983) führten bereits sehr geringe Änderungen der extrazellulären Calciumkonzentration zu einer Aktivierung transienter Chloridströme. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass ein geringer Calciumeinstrom in die Oozyte eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern triggert (BARISH 1983). Neben der intrazellulären Calciumkonzentration gibt es diverse andere Stimulatoren der calciumaktivierten Chloridkanäle, die außer Chlorid auch selektiv Iodid und Bromid akzeptieren (KATAYAMA und WIDDICOMBE 1991). Bislang konnte nicht geklärt werden, ob unterschiedliche calciumaktivierte Chloridkanäle existieren (WEBER 1999a).

Calciuminaktivierte Chloridkanäle werden durch den Abfall des extrazellulären Calciums aktiviert und führen zu einem Efflux des Chlorids aus der Oozyte (WEBER et al. 1995). Die Funktion der calciuminaktivierten Chloridkanäle ist bislang noch nicht geklärt (WEBER 1999b).

Die Untersuchungen des Chloridtransports durch endogene Transporter von *Xenopus laevis* zeigten, dass der Ersatz von Chlorid durch Gluconat in Perfusionslösungen zu einer Depolarisation um 40 ± 5 mV führt (KATAYAMA und WIDDICOMBE 1991). Diese Reaktion der Oozyten konnte auch in unseren Versuchen beim Wechsel der Perfusionslösung von OR_i auf OR_i beobachtet werden (Abbildung 13; Abbildung 20). Die Depolarisation von *Xenopus-laevis*-Oozyten in chloridfreien Medien ist dabei durch den nach extrazellulär abfallenden Chloridgradienten begründet (KATAYAMA und WIDDICOMBE 1991). Während der Perfusion von *Xenopus-laevis*-Oozyten fand eine Depolarisation statt, wenn die Oozyten für ein Anion weniger durchlässig als für Chlorid waren. Die Oozyten hyperpolarisierten hingegen, wenn sie für das perfundierende Anion permeabler waren als für Chlorid, so zum

Beispiel für Bromid (KATAYAMA und WIDDICOMBE 1991) und in den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen mit Thiocyanat und Nitrat (Abbildung 13).

Die Sensitivität der endogenen Chloridkanäle für blockierende Substanzen hat sich in Versuchen als gering erwiesen. Nach einer sieben- bis 14-tägigen Lagerung bei 4 °C ist die endogene Chloridleitfähigkeit der *Xenopus-laevis*-Oozyten jedoch auch nach dem erneuten Erwärmen auf Raumtemperatur stark eingeschränkt. Durch diese Eigenschaft wäre gegebenenfalls eine Reduktion der Einflüsse der endogenen Chloridkanäle auf exogene Transportmoleküle wie sat-1 möglich (KATAYAMA und WIDDICOMBE 1991).

4.3 Substrattransport durch sat-1: aktueller Stand

Bislang ist nicht vollständig geklärt, welches intrazelluläre Anion sat-1 im Austausch gegen Sulfat transportiert. Sulfat und Bicarbonat, nicht jedoch Oxalat, scheinen unter physiologischen Bedingungen die hauptsächlich von sat-1 transportierten Substrate zu sein. Da die extrazelluläre Bindungsstelle unter physiologischen Bedingungen bereits zu 90 % mit Bicarbonat besetzt ist, wird die Sulfataufnahme in Anwesenheit von Bicarbonat um $78,3 \pm 10,6$ % gehemmt. Die Inhibitionskonstante K_i dieser kompetitiven Hemmung der Sulfataufnahme durch Bicarbonat beträgt 2,7 mM und liegt damit weit unter der physiologischen Konzentration von Bicarbonat. Aufgrund einer höheren intrazellulären als extrazellulären Sulfatkonzentration könnte also die extrazelluläre Bindungsstelle von sat-1 vorzugsweise von Bicarbonat und die intrazelluläre von Sulfat besetzt sein.

Physiologische Oxalatkonzentrationen hingegen führen nicht zu ausgeprägten Änderungen der Sulfataufnahme. Die Sulfataufnahme wird mit einer K_i von 63,5 μ M durch Oxalat gehemmt. Für einen zusätzlich vorhandenen Oxalat-Sulfat-Austausch spricht die Hemmung der Oxalataufnahme durch Sulfat mit einer K_i von $85,9 \pm 9,5$ μ M. Unter gleichzeitiger Anwesenheit von Bicarbonat und Oxalat wurde ein Rückgang der Sulfataufnahme auf 8 ± 4 % des Ausgangswertes verzeichnet.

Da der Transport durch sat-1 scheinbar elektroneutral ist, findet im Falle eines Bicarbonat-Sulfat-Austauschs wahrscheinlich der Transport von zwei Bicarbonatmolekülen oder einem Carbonatmolekül im Austausch gegen ein Sulfatmolekül statt. Ebenfalls möglich wären ein Oxalat-Bicarbonat-, ein 2-Chlorid-Sulfat- sowie ein bidirektionaler

Oxalat-Sulfat-Austausch (KRICK et al. 2009), wie er in Abbildung 2 skizziert ist. Bei Patienten mit Störungen der Synthese von Oxalat wäre ein solcher Mechanismus denkbar, der zu einer erhöhten Konzentration von Oxalat im Urin führen könnte und dadurch die Bildung von Calciumoxalatsteinen begünstigen könnte (KRICK et al. 2009).

4.4 Einfluss des Chlorids auf den Sulfattransport durch sat-1

Vermutet wird, dass eine speziesabhängige Rolle von sat-1 in Bezug auf den Chloridtransport vorliegt (KRICK et al. 2009). In Versuchen von REGEER et al. (2003) führte die Expression von hsat-1 in *Xenopus-laevis*-Oozyten zu einer fünffachen Steigerung der Chloridaufnahme im Vergleich zu wasserinjizierten Oozyten. LEE A et al. (2003) wiesen eine sechsfache Steigerung der Chloridaufnahme in msat-1-exprimierenden Oozyten nach. Der Sulfattransport über rsat-1 und msat-1 zeigte sich als vom extrazellulären Chlorid abhängig (LEE A et al. 2003; MARKOVICH und ARONSON 2007). Aufnahmeversuche mit radioaktiv markiertem $^{36}\text{Cl}^-$ von XIE et al. (2002) zeigten sowohl in An- als auch in Abwesenheit von extrazellulärem Sulfat eine nur minimale Aufnahme von radioaktiv markiertem Chlorid über msat-1 in *Xenopus-laevis*-Oozyten. Die Sulfataufnahme durch msat-1 wurde durch monovalente Anionen wie Chlorid in den Versuchen jedoch stark erhöht (XIE et al. 2002). In den von KRICK et al. (2009) durchgeführten Versuchen zeigten rsat-1-exprimierende Oozyten in der Anwesenheit von Chlorid einen höheren Sulfatefflux als Oozyten, die sich in chloridfreiem Medium befanden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Chlorid zumindest teilweise durch einen Sulfat-Chlorid-Austausch den Sulfatefflux begünstigt. Die Menge des über diesen Mechanismus transportierten Chlorids könnte so gering sein, dass sie aufgrund der niedrigen spezifischen Aktivität des in den vorausgehenden von XIE et al. durchgeführten Versuchen verwendeten radioaktiv markierten Chlorids nicht detektiert wurde (KRICK et al. 2009; XIE et al. 2002). Den Ergebnissen nach könnte msat-1 einen funktionellen Sulfat-Chlorid-Oxalat-Anionenaustauscher darstellen (MARKOVICH und ARONSON 2007).

Das Chlorid könnte folglich auf verschiedene Arten am Sulfattransport durch sat-1 beteiligt sein. Neben einem Symport mit Sulfat oder einem Austausch gegen Sulfat könnte eine allosterische Modulation im Sinne einer Hemmung oder Stimulation des Sulfattransports über sat-1 stattfinden. Dabei könnte eine Bindung von Chlorid an eine Bindungsstelle erfolgen, die modifizierend auf die Bindungsstelle für Sulfat am Sulfat-Anionen-Transporter 1

wirkt. Eine Konfigurationsänderung von sat-1 könnte im Rahmen einer allosterischen Förderung eine höhere Affinität von sat-1 für Sulfat bedingen, wohingegen bei einer allosterischen Hemmung ein Affinitätsverlust von sat-1 für Sulfat die Folge wäre.

Im Falle eines Symports wäre die Sulfataufnahme der sat-1-exprimierenden Oozyten in Abwesenheit von Chlorid verringert. Folglich müsste in den chloridreduzierten Lösungen ORi_{15}^* , ORi_{25}^* und ORi_{35}^* sowie in der mannithaltigen Lösung ORi_{220M5}^* die Sulfataufnahme reduziert sein. Die Perfusion mit thiocyanathaltiger ORi_{25}^* führte erwartungsgemäß zu einer deutlichen Reduktion der Sulfataufnahme, in nitrathaltiger ORi_{35}^* war die Sulfataufnahme ebenfalls vermindert (Abbildung 22). In gluconathaltiger ORi_{15}^* war die Sulfataufnahme jedoch erhöht, in mannithaltiger ORi_{220M5}^* wurde ebenfalls eine Steigerung der Sulfataufnahme gemessen (Abbildung 22; Abbildung 23). Die Chloridverarmung der Oozyten durch 180-minütige Inkubation in gluconathaltiger ORi_1 führte zu einer Steigerung der Sulfataufnahme (Abbildung 24). Das Verhalten der Sulfataufnahme der sat-1-exprimierenden Oozyten in ORi_{15}^* und ORi_{220M5}^* spricht gegen einen Symport von Chlorid und Sulfat durch sat-1. Die Reduktion der Sulfataufnahme in ORi_{25}^* und ORi_{35}^* könnte hingegen für einen Symport von Chlorid und Sulfat sprechen.

KRICK et al. (2009) wiesen einen begünstigenden Einfluss des extrazellulären Chlorids auf den Sulfatefflux nach, der durch einen Sulfat-Chlorid-Austausch begründet sein könnte. Wenn Chlorid im Rahmen eines Antiports als Austauschpartner des Sulfats über sat-1 transportiert würde, hätte eine Reduktion des extrazellulären Chloridgehalts eine Steigerung der Sulfataufnahme durch den vermehrten Transport von Chlorid aus der Zelle im Rahmen eines Konzentrationsausgleichs zur Folge. Die extrazelluläre Bindungsstelle von sat-1 könnte weniger Chlorid binden und würde dadurch vermehrt Sulfat binden und in die Zelle transportieren. Ebenso würde durch einen kompensatorisch erfolgenden Konzentrationsausgleich das Chlorid vermehrt aus der Zelle heraustransportiert werden, was im Rahmen eines Antiports von Chlorid und Sulfat zur Aufnahme von Sulfat in die Zelle führen könnte. In chloridverarmter ORi_{15}^* , ORi_{25}^* , ORi_{35}^* und mannithaltiger ORi_{220M5}^* müsste also eine Steigerung der Sulfataufnahme erfolgen. In gluconathaltiger ORi_{15}^* und ORi_{220M5}^* konnte in den sat-1-exprimierenden Oozyten eine Steigerung der Sulfataufnahme beobachtet werden (Abbildung 22; Abbildung 23). Eine Behandlung der sat-1-exprimierenden Oozyten mit thiocyanathaltiger ORi_{25}^* und nitrathaltiger ORi_{35}^* führte

jedoch zur Reduktion der Sulfataufnahme (Abbildung 22). Die Sulfataufnahme der sat-1-exprimierenden Oozyten nach vorausgehender Chloridverarmung hätte im Falle eines Sulfat-Chlorid-Austauschs verringert sein müssen, war in den hier durchgeführten Versuchen jedoch deutlich gesteigert (Abbildung 24).

Würde im Rahmen einer allosterischen Modulation eine allosterische Förderung stattfinden, so wäre in sämtlichen unter chloridreduzierten Bedingungen stattfindenden radiochemischen Versuchen eine Reduktion der Sulfataufnahme zu erwarten. Unter Verwendung von gluconathaltiger ORi_{15}^* , thiocyanathaltiger ORi_{25}^* und nitrathaltiger ORi_{35}^* sowie mannithaltiger ORi_{220M5}^* wäre die Sulfataufnahme folglich im Vergleich zu den in chloridreicher ORi_{15}^* inkubierten Oozyten verringert. Die Chloridverarmung sat-1-exprimierender Oozyten würde im Falle einer allosterischen Förderung durch Chlorid ebenfalls zu einer Reduktion der Sulfataufnahme führen. Vereinbar mit einer allosterischen Förderung durch Chlorid sind in dieser Arbeit jedoch nur die Ergebnisse der mit thiocyanat- und nitrathaltigen Lösungen durchgeführten radiochemischen Versuche, die in ORi_{25}^* und ORi_{35}^* eine Hemmung der Sulfataufnahme aufwiesen (Abbildung 22). Nicht vereinbar mit einer allosterischen Förderung durch Chlorid waren hingegen die Ergebnisse der Sulfataufnahme unter gluconathaltigen Bedingungen in ORi_{15}^* (Abbildung 22) und mannithaltigen Bedingungen in ORi_{220M5}^* (Abbildung 23) sowie nach vorausgehender Chloridverarmung (Abbildung 24), in denen eine Steigerung der Sulfataufnahme messbar war.

Eine allosterische Hemmung durch Chlorid sollte eine Steigerung der Sulfataufnahme in Abwesenheit von Chlorid zur Folge haben. In ORi_{15}^* , ORi_{25}^* und ORi_{35}^* sowie in chloridverarmten Oozyten nach dem „unstirred layers“ Modell sollte also im Falle einer allosterischen Hemmung eine Erhöhung der Sulfataufnahme nachweisbar sein. Unter chloridreduzierten Bedingungen war die Sulfataufnahme in den durchgeführten radiochemischen Versuchen in gluconathaltiger ORi_{15}^* (Abbildung 22) und in mannithaltiger ORi_{220M5}^* (Abbildung 23), ebenso wie nach Chloridverarmung der sat-1-exprimierenden Oozyten (Abbildung 24) deutlich erhöht. Die in thiocyanathaltiger ORi_{25}^* (Abbildung 22) gemessene Reduktion der Sulfataufnahme stimmt mit Beobachtungen von KRICK et al. (2009) überein, die eine Hemmung von sat-1 durch Thiocyanat mit einer K_i von

101,7 ± 9,7 µM nachwiesen. In nitrathaltiger ORi_{3s}* (Abbildung 22) war die Sulfataufnahme ebenfalls stark gehemmt. Bislang sind keine Effekte von Nitrat auf sat-1 beschrieben worden.

Die in chloridreduzierter ORi₁ inkubierten Oozyten sind gesondert zu betrachten, da hier zwei verschiedene Optionen zu beachten sind. Zu berücksichtigen bei der Auswertung des Versuchs der Chloridverarmung der Oozyten ist das Modell der „unstirred layers“, der ungerührten Schichten. Aufgrund der starken Oberflächenvergrößerung durch Mikro- und Makrovilli, die den Flüssigkeitsaustausch direkt an der Zellmembran verlangsamt, sind die Konzentrationen der Ionen in diesem Bereich anders als im umgebenden Medium. Auch nach der Beendigung der Inkubation wäre so die Chloridkonzentration direkt an der Zellmembran zunächst weiterhin verringert, da sich die Ionenkonzentration in diesem Bereich verzögert an die der perfundierenden Lösung angleicht. Geht man hingegen davon aus, dass der Chloridspiegel an der äußeren Membran der Oozyte unmittelbar nach der Chloridverarmung in ORi_s* wieder deutlich höher als der intraozytäre Chloridgehalt ist, so ist im Falle eines Symports eine Steigerung der Sulfataufnahme zu erwarten. Im Rahmen eines Antiports oder einer allosterischen Hemmung wäre die Sulfataufnahme reduziert. Eine allosterische Förderung würde zu keiner signifikanten Veränderung der Sulfataufnahme im Vergleich zu den nicht chloridverarmten Oozyten führen. Die erhöhte Sulfataufnahme nach der Chloridverarmung wäre in diesem Fall Hinweis auf einen Symport von Chlorid und Sulfat. Nach dem Modell der „unstirred layers“ wäre bei den Oozyten auch nach Beendigung der Inkubation in chloridreduzierter ORi₁ der Chloridgehalt direkt an der Zellmembran sehr niedrig. Dies hätte zur Folge, dass im Rahmen eines Symports, eines Antiports und einer allosterischen Förderung des Sulfattransports über sat-1 durch Chlorid die Sulfataufnahme in chloridverarmten Oozyten reduziert wäre. Nur im Falle einer allosterischen Hemmung durch Chlorid wäre die Sulfataufnahme erhöht. Da die Sulfataufnahme der chloridverarmten Oozyten stark gesteigert war (Abbildung 24), würde diesem Modell nach eine allosterische Hemmung durch Chlorid vorliegen. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der kurzen Inkubationszeit mit [³⁵S]Sulfat eine Aufnahme nach dem Modell der „unstirred layers“ stattfindet.

In den elektrophysiologischen Versuchen wurde die Veränderung des Membranpotentials der Oozyten während der Perfusion mit chloridreduzierter ORi₁, ORi₂ und ORi₃ gemessen. Hyperpolarisationen weisen dabei auf eine erhöhte Permeabilität der Membran für das

perfundierende Anion hin, Depolarisationen auf eine verminderte Permeabilität (KATAYAMA und WIDDICOMBE 1991). Die sat-1-exprimierenden Oozyten sowie die „Mocks“ depolarisierten in allen Messungen mit gluconathaltiger ORi_1 deutlich (Abbildung 13; Abbildung 20). Unter Perfusion mit thiocyanathaltiger ORi_2 (Abbildung 13) hyperpolarisierten die sat-1-exprimierenden Oozyten stark. Die Perfusion mit thiocyanat- und sulfathaltiger ORi_{2s} (Abbildung 13; Abbildung 16A) ließ die Oozyten depolarisieren. Die „Mocks“ verhielten sich ähnlich, hyperpolarisierten jedoch weniger stark unter Perfusion mit ORi_2 (Abbildung 13; Abbildung 16B). Die Perfusion mit nitrathaltiger ORi_3 (Abbildung 13) führte in den sat-1-exprimierenden Oozyten ebenfalls zu einer deutlichen Hyperpolarisation, die jedoch schwächer als die unter Perfusion mit Thiocyanat ausfiel und von einer leichten Depolarisation in Anwesenheit von Sulfat gefolgt war (Abbildung 13; Abbildung 17A). In den „Mocks“ waren ebenfalls die gleichen Effekte, jedoch schwächer ausgeprägt, zu beobachten (Abbildung 13; Abbildung 17B). Es kann auf eine verminderte Permeabilität der Oozytenmembran unter Perfusion mit ORi_1 , ORi_{2s} und ORi_{3s} im Vergleich zu einer erhöhten Durchlässigkeit unter der Perfusion mit ORi_2 und ORi_3 geschlossen werden. Die gesteigerte Durchlässigkeit könnte durch eine vermehrte Öffnung von Chloridkanälen zum Ausgleich der Chloridkonzentration oder eine Öffnung unselektiver Ionenkanäle durch Thiocyanat und Nitrat begründet sein.

Die elektrophysiologischen Versuche mit chloridverarmten Oozyten ließen weder bei den sat-1-exprimierenden Oozyten noch bei den „Mocks“ einen klaren Zusammenhang der Inkubationszeit der Oozyten und des gemessenen Membranpotentials erkennen, da sich das Ruhemembranpotential der Oozyten kaum veränderte. Aufgrund einer breiten Streuung der intrazellulären Chloridkonzentration der Oozyten (BARISH 1983; WEBER 1999a) und der Notwendigkeit für jeden Versuch eine neue Oozyte zu verwenden, ist von starken Variationen der Chloridkonzentration der Oozyten auszugehen. Zusätzlich ist der Abfall der intrazellulären Chloridkonzentration als Faktor der Zeit schwer abschätzbar. Es können also bei Oozyten, die gleich lang inkubiert wurden, unterschiedliche intraozytäre Chloridkonzentrationen vorliegen oder ähnliche Chloridkonzentrationen bei unterschiedlicher Inkubationsdauer. Insgesamt wurde bei den „Mocks“ ein niedrigeres Membranpotential als bei den sat-1-exprimierenden Oozyten detektiert (Abbildung 18). Erwartet gewesen wäre eine mit zunehmender Inkubationsdauer gemessene Erniedrigung des Membranpotentials aufgrund einer vermehrten Öffnung von Chloridkanälen. In

Zusammenhang mit der Dauer der Inkubationszeit sollten die chloridverarmten Oozyten im Falle eines Symports unter Perfusion mit ORi_s eine mit zunehmender Inkubationszeit stärkere Hyperpolarisation aufweisen, die durch einen vom Chloridgradienten angetriebenen Sulfat-Chlorid-Symport durch sat-1 begründet sein sollte. Im Falle eines Antiports wäre somit eine zunehmende Depolarisation festzustellen. In ORi_{15} wäre mit steigender Inkubationsdauer die Aktivität eines Antiports verringert, was ebenfalls zu einer Depolarisation führen würde. Unter der Perfusion mit ORi_{15} hyperpolarisierten die sat-1-exprimierenden, in chloridreduzierter ORi_1 inkubierten Oozyten ohne zeitlichen Zusammenhang marginal, vereinbar mit einer allosterischen Hemmung (Abbildung 18). In ORi_s hyperpolarisierten die Oozyten aller Gruppen ohne zeitlichen Zusammenhang zur Inkubationsdauer. Da bei den sat-1-exprimierenden Oozyten, die in chloridhaltiger ORi inkubiert wurden jedoch ähnlich Änderungen des Membranpotentials detektiert wurden, sind keine eindeutigen Wirkungen der Chloridverarmung auf das vorliegende Membranpotential zu erkennen. Die elektrophysiologischen Versuche erlauben daher keine Aussage zum Einfluss der intraoozytären Chloridverarmung auf die Ionenströme sat-1-exprimierender Oozyten.

Die vermehrte Durchlässigkeit der Membran unter der Perfusion mit thiocyanathaltiger ORi_2 und nitrathaltiger ORi_3 (Abbildung 13) in den elektrophysiologischen Versuchen könnte die sehr hohe Sulfataufnahme der „Mocks“ in den radiochemischen Versuchen erklären (Abbildung 22). Die Sulfataufnahme der „Mocks“ in ORi_2 und ORi_3 war wesentlich höher als die der sat-1-exprimierenden Oozyten. Thiocyanat und Nitrat könnten zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Membran für Sulfat geführt haben. Das Sulfat hätte sich in diesem Fall in den sat-1-exprimierenden Oozyten und den „Mocks“ anreichern können. In den sat-1-exprimierenden Oozyten könnte das Sulfat über sat-1 wieder aus der Zelle heraus transportiert werden. Dieser Mechanismus würde ebenfalls die in den „Mocks“ deutlich höhere Sulfataufnahme erklären. Nachgewiesen ist jedoch ein hemmender Effekt von Thiocyanat auf sat-1. Notwendig für das beschriebene Modell wäre eine ausreichende Restfunktion von sat-1, die einen Sulfattransport aus den sat-1-exprimierenden Zellen auch während der Inkubation in thiocyanathaltiger ORi_{25^*} gewährleistet.

Da Nitrat in den vorliegenden radiochemischen Versuchen ebenfalls eine Hemmung der Sulfataufnahme verursacht hat, könnte eine Hemmung von sat-1 durch Stickstoff erfolgen.

Um diesen hemmenden Effekt genauer zu untersuchen, könnten Versuche mit nitrit- und cyanidhaltigen Verbindungen durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sind folglich nicht hinweisend auf einen Chloridtransport durch sat-1 im Sinne eines Symports oder Antiports. Sollte die in ORi_{2s}^* und ORi_{3s}^* reduzierte Sulfataufnahme durch eine Hemmung durch Stickstoff begründet sein, könnten die Ergebnisse der anderen radiochemischen Versuche dahingehend interpretiert werden, dass eine allosterische Hemmung durch Chlorid vorliegt.

Beim Vergleich der elektrophysiologischen und radiochemischen Versuche muss beachtet werden, dass die Versuche aufgrund der unterschiedlich langen Perfusions- und Inkubationszeiten nicht uneingeschränkt miteinander vergleichbar sind. Eine Veränderung der Perfusions- oder Inkubationszeit kann zu unspezifischen oder toxischen Effekten des perfundierenden Anions auf die Oozyte oder sat-1 führen. Eine Angleichung dieser Zeiten in weiteren Versuchen könnte weitere Ergebnisse liefern.

Um die Chloridströme besser darzustellen, könnten weiterhin Aufnahmeversuche mit radioaktiv markiertem Iod I^{125} durchgeführt werden. Da I^{125} ein flüchtiger Stoff ist, der sich im menschlichen Organismus anreichert, sind hier höhere Sicherheitsvorschriften einzuhalten. Eine entsprechende Genehmigung liegt für die Abteilung nicht vor.

4.5 Einfluss des intrazellulären pH-Wertes auf den Sulfattransport durch sat-1

Bicarbonat ist ein kompetitiver Hemmstoff des Sulfattransports durch sat-1. Bei physiologischen Konzentrationen wird der Sulfattransport zu mehr als 75 % durch Bicarbonat gehemmt (KRICK et al. 2009). Die Bicarbonatkonzentration ist dabei vom extrazellulären pH-Wert abhängig. Sinkt dieser, so fällt auch die Bicarbonatkonzentration ab: Die kompetitive Hemmung des Bicarbonats wird reduziert, die Sulfataufnahme über sat-1 ist erhöht. Der Sulfattransport über msat-1 zeigte sich insbesondere in der Anwesenheit von extrazellulärem Chlorid als signifikant durch einen niedrigen extrazellulären pH-Wert stimulierbar (XIE et al. 2002). Eine Alkalisierung führt hingegen zum Anstieg des Bicarbonatspiegels mit einer Erhöhung der kompetitiven Hemmung. In Versuchen von KRICK et al. (2009) führte die Alkalisierung des Inkubationsmediums von pH-Wert 7,5 auf 8,5

beziehungsweise 9,5 zu einer Reduktion der Sulfataufnahme. Der Grad der Inhibition der Sulfataufnahme durch Bicarbonat und Carbonationen, CO_3^{2-} , sowie durch Bicarbonat und Sulfitionen, SO_3^{2-} , nahm mit steigendem pH-Wert ab (KRICK et al. 2009).

Durch den Transport von Bicarbonat über sat-1 wird durch sat-1 auch der intrazelluläre pH-Wert beeinflusst. Die Alkalisierung in den Zellen des proximalen Tubulus wird durch NBC1 und dessen Funktion als Natrium-Bicarbonat-Cotransporter vermieden (Abbildung 2).

In den in dieser Arbeit durchgeführten radiochemischen Versuchen zum Einfluss des pH-Wertes auf die Sulfataufnahme durch sat-1 wurden die Oozyten durch Inkubation in ammoniumchloridhaltigen Medien angesäuert.

Die Applikation von Ammoniumchlorid führt in den meisten Zellen zunächst zu einer Alkalisierung (BOLDT et al. 2003; BORON und DE WEER 1976). Ursache dafür ist eine höhere Permeabilität der Membranen für Ammoniak, NH_3 , die auch, wenn Ammoniak wesentlich niedriger konzentriert ist als die Ammoniumionen, NH_4^+ , zunächst zu einer Anreicherung von Ammoniak in den Zellen führt (BORON 2006; BORON und DE WEER 1976). Ein langsamer Einstrom der Ammoniumionen, der von der Dissoziation der Ammoniumionen in Ammoniak und Protonen gefolgt wird, führt zur langsamen Reazidifizierung (BOLDT et al. 2003; BORON und DE WEER 1976; BORON 1983). Bei dem Beenden der Zellexposition für Ammoniumchlorid kommt es zu einem Abfall des intrazellulären pH-Wertes unter den ursprünglich vorliegenden Ausgangswert, da die Ammoniumionen langsamer als Ammoniak aus der Zelle transportiert werden können (BORON und DE WEER 1976; BORON 1983; BORON 2006). Ursprünglich wurde für die *Xenopus-laevis*-Oozyten angenommen, dass die oozytäre Membran für Ammoniumionen durchlässiger als für Ammoniak ist, da die Anwesenheit von Ammoniak und Ammoniumionen in relativ hohen Konzentrationen wie zehn bis 20 mM zu einer paradoxen intrazellulären Azidifizierung der Oozyte sowie einem pH-Abfall an der oozytären Membran führt (BOLDT et al. 2003; MUSA-AZIZ et al. 2009). Es wurde davon ausgegangen, dass der Transport von Ammoniumionen hauptsächlich durch einen nicht selektiven Kationenkanal erfolgt, dessen molekulare Identität bislang nicht geklärt ist (BOLDT et al. 2003). Außerdem wurde ein Transport durch die Natrium-Kalium-ATPase, den Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter und einen Kaliumkanal in Betracht gezogen (BOLDT et al. 2003; COUGNON et al. 1996). Weiterhin wurde angenommen, dass die Ammoniumionen in der Oozyte zu Ammoniak und Protonen

dissoziieren: Das Ammoniak könnte in zytoplasmatischen Lipidvorräten der Oozyte abgelagert werden (BURCKHARDT und FRÖMTER 1992). MUSA-AZIZ et al. (2009) gelangten jedoch zu dem Ergebnis, dass vor allem Ammoniak durch die Zellmembran in die Oozyte gelangt. In den „unstirred layers“ direkt vor der Oozytenmembran diffundiert Ammoniak demnach durch die Membran, Ammoniumionen reagieren aufgrund des Gradienten zu Ammoniak und Protonen, deren Anreicherung hier zu einem Abfall des pH-Wertes an der Membran der Oozyten führt. Gegebenenfalls besitzen Oozyten von *Xenopus laevis* einen Sensor, der bei Stimulation durch extrazelluläres Ammoniak oder Ammoniumionen durch metabolische Prozesse die intrazelluläre Bildung von Protonen anregt, die zusammen mit Ammoniak zu Ammoniumionen reagieren. Die Ammoniumionen könnten in intrazellulären säurespeichernden Kompartimenten angereichert werden. Neben der Azidifizierung der Oozyten konnte eine starke Depolarisation beobachtet werden (BORON und DE WEER 1976; BURCKHARDT und BURCKHARDT 1997; BOLDT et al. 2003; MUSA-AZIZ et al. 2009). In von BOLDT et al. (2003) durchgeführten Versuchen waren schon vor der Azidifizierung eine Änderung der Ionenströme sowie eine Depolarisation messbar. Nach Entfernen des Ammoniumchlorids aus der Perfusionslösung konnte erst nach 30 Minuten das Membranpotential und der vor der Ammoniumgabe detektierte intrazelluläre pH-Wert erreicht werden (BOLDT et al. 2003), sodass angenommen werden muss, dass die der Azidifizierung und der Alkalisierung zugrunde liegenden Prozesse unterschiedlich sind.

Nach dem vorliegenden Modell von sat-1, bei dem Bicarbonat die Sulfataufnahme kompetitiv hemmt, müsste der Abfall des intrazellulären pH-Wertes und damit der Bicarbonatkonzentration zu einem vermehrten kompensatorischen Transport von Bicarbonat über sat-1 in die Oozyte führen, die Sulfataufnahme über sat-1 wäre somit vermindert. Da die intrazelluläre Bindungsstelle von sat-1 aufgrund der Ansäuerung weniger Bicarbonat binden könnte, würde zudem vermehrt Sulfat aus der Oozyte transportiert, was einen zusätzlichen Abfall der intrazellulären Sulfatkonzentration zur Folge hätte. Dieses Modell lässt annehmen, dass die Sulfataufnahme der sat-1-exprimierenden *Xenopus-laevis*-Oozyten nach Inkubation in Ammoniumchlorid deutlich vermindert ist. Die Inkubation in Ammoniumchlorid führte jedoch in den sat-1-exprimierenden Oozyten zu einer Steigerung der Sulfataufnahme (Abbildung 25). In den elektrophysiologischen Versuchen depolarisierten die sat-1-exprimierenden Oozyten sowie die „Mocks“ während der Perfusion mit ammoniumchloridhaltiger OR_{iNH_4Cl} sehr stark (Abbildung 19), was auf eine verminderte

Permeabilität der Membran der Oozyten im angesäuerten Zustand hinweist. Die stärkere Ausprägung der Depolarisation bei den „Mocks“ könnte durch eine vermehrte Öffnung von sat-1 begründet sein. Nach der 15-minütigen Perfusion mit Ammoniumchlorid war das Membranpotential der Oozyten gegenüber den vor der Ansäuerung gemessenen Werten unter der Perfusion mit sulfathaltiger ORIs reduziert, während der sich anschließenden Perfusion mit ORi hyperpolarisierten die Oozyten noch weiter. Dieses Absinken des Membranpotentials lässt darauf schließen, dass die Oozyten auch nach Beenden der Perfusion mit Ammoniumchlorid noch intrazellulär angesäuert waren. Eine Messung des intrazellulären pH-Wertes könnte in weiteren Versuchen durchgeführt werden, aufgrund des Umfangs dieser Messungen wurden diese im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Möglich wäre, dass durch die protonierenden Effekte der Säuren eine Konfigurationsänderung der extra- sowie intrazellulären Bindungsstelle des sat-1 stattgefunden haben könnte. Ammoniumchlorid könnte derart modifizierend wirken, dass eine Affinitätssteigerung von sat-1 für Sulfat vorliegt.

Neben dieser Möglichkeit könnte die Aufnahme der sat-1-exprimierenden Oozyten nach Inkubation in Ammoniumchlorid durch das Modell der „unstirred layers“ erklärt werden. Demnach wäre nach der Inkubation in Ammoniumchlorid die Säurekonzentration direkt an der Membran der Oozyten auch noch nach Beendigung der Exposition erhöht. Die Bicarbonatkonzentration direkt an der Zellmembran wäre durch den niedrigen pH vorerst weiterhin reduziert. Die kompetitive Hemmung durch Bicarbonat würde somit weniger stark ausfallen, Sulfat würde vermehrt über sat-1 in die Zelle transportiert. Im Falle der Ansäuerung der Oozyten mit Ammoniumchlorid könnte dieses Modell zutreffen, da vermehrt Sulfat in die Zelle aufgenommen wurde. Um diese Effekte noch stärker herauszuarbeiten, wurden nominal bicarbonatfreie Lösungen verwendet.

4.6 Einfluss des Calciums auf den Sulfattransport durch sat-1

In von KRICK et al. (2009) durchgeführten Versuchen zeigten sich Sulfataufnahme und K_m für Sulfat calciumunabhängig. Unter calciumfreien Bedingungen depolarisierten sowohl die sat-1-exprimierenden als auch die wasserinjizierten Oozyten um ungefähr 30 mV. In calciumhaltigem und calciumfreiem Medium war die Sulfataufnahme gleich: Dies lässt

darauf schließen, dass die Sulfataufnahme durch sat-1 sowohl unabhängig von der umgebenden Calciumkonzentration als auch vom Membranpotential ist (KRICK et al. 2009). Bei elektrogenen Transportern müsste im Fall einer Änderung des Membranpotentials auch eine Änderung bezüglich der Transporteigenschaften erfolgen. Die Sulfataufnahme war unter nominal calciumfreien Bedingungen sättigbar, wasserinjizierte Oozyten zeigten unter diesen Bedingungen keine signifikante Sulfataufnahme. Unter calciumfreien Bedingungen betrug die K_m für Sulfat nach der Kleinstquadratmethode $162 \pm 26 \mu\text{M}$ und der Eadie-Hofstee-Analyse $156 \pm 52 \mu\text{M}$ (KRICK et al. 2009) und war somit nicht verschieden von der unter calciumhaltigen Bedingungen gemessenen K_m für Sulfat.

In *Xenopus-laevis*-Oozyten konnten zahlreiche von Calcium beeinflusste Ionenkanäle sowie Calciumkanäle nachgewiesen werden, darunter spannungsabhängige endogene Calciumkanäle und durch den Calciumgehalt gesteuerte Calciumkanäle. Außerdem sind calciuminaktivierte nichtselektive Kationenkanäle sowie calciumaktivierte und -inaktivierte Chloridkanäle entdeckt worden (Übersicht in WEBER 1999b). Unter physiologischen Bedingungen ist die Leitfähigkeit der Oozyten für Calcium jedoch gering.

In von CHAO und KATAYAMA (1991) durchgeführten elektrophysiologischen Versuchen zur Darstellung der endogenen Chloridleitfähigkeit führte eine Erhöhung des extrazellulären Calciums von 0,4 mM auf 10 mM zu einem deutlichen Anstieg des ^{125}I defflux'. Da ^{125}I selektiv durch Chloridtransporter und Kanäle transportiert wird, lässt dieses Ergebnis darauf schließen, dass die Leitfähigkeit der endogenen Chloridtransporter der *Xenopus-laevis*-Oozyten unter physiologischen Bedingungen vor allem durch den intrazellulären Calciumspiegel reguliert wird (CHAO und KATAYAMA 1991).

In den in dieser Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Versuchen wurde die Reaktion der Oozyten unter der Perfusion mit natrium- und kaliumgluconathaltiger ORi_1 , ORi_4 und ORi_5 beobachtet. In ORi_1 , die 2 mM Calciumchlorid enthielt, depolarisierten sowohl die sat-1-exprimierenden Oozyten als auch die „Mocks“ deutlich, die Zugabe von Sulfat führte zu einer weiteren Depolarisation. Während der Perfusion mit 4 mM calciumchloridhaltiger ORi_4 fand eine schwächere Depolarisation der sat-1-exprimierenden Oozyten statt, die „Mocks“ hyperpolarisierten leicht. Die Perfusion mit Sulfat führte bei den sat-1-exprimierenden Oozyten zu einer ähnlich starken Depolarisation wie unter Perfusion mit sulfathaltiger ORi_1 . Unter der Perfusion mit 6 mM calciumchloridhaltiger ORi_5 änderte

sich das Membranpotential der sat-1-exprimierenden Oozyten und der „Mocks“ nur marginal (Abbildung 20). Die Ausprägung der Veränderungen des Membranpotentials war bei den sat-1-exprimierenden Oozyten und den „Mocks“ nahezu identisch. Die „Mocks“ zeigten jedoch nahezu durchgehend geringfügig niedrigere Potentiale.

Da ORi_1 die gleiche Calciumchloridkonzentration wie ORi enthält, kann die Depolarisation unter Perfusion mit ORi_1 auf den Austausch von Natrium- und Kaliumchlorid gegen Natrium- und Kaliumgluconat zurück geführt werden, durch den zahlreiche Chloridkanäle der Oozyte inaktiviert werden. In sämtlichen anderen Versuchen, in denen eine Perfusion mit chloridreduzierter, gluconathaltiger ORi stattfand, depolarisierten die Oozyten ebenfalls deutlich. Die steigenden Calciumchloridkonzentrationen in ORi_4 und ORi_5 führten zu weniger stark ausgeprägten Depolarisationen. Diese Ergebnisse könnten mit den Ergebnissen von KRICK et al. (2009) vereinbar sein, nach denen die Oozyten in calciumfreien Medien depolarisieren. Es sind keine signifikanten Änderungen der Reaktion des Membranpotentials während der Perfusion mit sulfathaltigen Lösungen steigender Calciumchloridkonzentrationen feststellbar. Um den Einfluss der Veränderung des Chloridgehaltes auf die Oozyten auszuschließen, müsste die Calciumkonzentration in ORi bei gleichbleibendem Chloridgehalt verändert werden. Des Weiteren könnten Versuche mit Perfusion der Oozyten mit chloridreduzierten und gluconathaltigen Lösungen mit höheren Calciumchloridkonzentrationen als den hier genannten durchgeführt werden, in denen es zu einer weiteren Verminderung der Depolarisation kommen sollte.

Da Gluconat Calcium chelatiert, entsprechen 6 mM Calcium in einer gluconathaltigen Lösung etwa 2 mM Calcium in einer chloridhaltigen Lösung (COTE' et al. 1987). Um den Einfluss von Calcium auf das Membranpotential sat-1-exprimierender Oozyten weiter zu untersuchen könnten Versuche mit gluconathaltigen Lösungen, die höhere Calciumchloridkonzentrationen enthalten, durchgeführt werden. Außerdem könnte der Calciumchloridgehalt in natrium- und kaliumchloridhaltiger ORi verändert werden, um den calciumchelatierenden Effekt des Gluconats zu umgehen.

5 Zusammenfassung

Der Sulfat-Anionen-Transporter 1 ist ein elektroneutraler Sulfattransporter. Bislang konnte eine spezieabhängige Transportfunktion für Sulfat, Oxalat, Bicarbonat, Chlorid und Glyoxylat im Rahmen eines Anionenaustauschs nachgewiesen werden. Die Expression von *sat-1* in Niere und Leber ist für die Sulfathomöostase unabdingbar. Eine mRNA-Expression konnte in zahlreichen Geweben, eine Expression des Proteins jedoch bislang nur in Nieren und Leber nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde die Transportfunktion des Sulfat-Anionen-Transporters 1 der Ratte, *rsat-1*, untersucht. Das Ziel war, eine genauere Kenntnis über den Einfluss von Chlorid, des intrazellulären pH-Wertes und der extrazellulären Calciumkonzentration auf den Sulfattransport durch *rsat-1* zu erlangen.

Als Expressionssystem für *rsat-1* wurden Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* verwendet. Neben den *rsat-1*-exprimierenden Oozyten wurden Versuche mit wasserinjizierten Oozyten zur Kontrolle durchgeführt. Elektrophysiologische Versuche, die im „*Current-Clamp-Modus*“ durchgeführt wurden, ermöglichten eine Messung von substratinduzierten Potentialänderungen. Durch radiochemische Versuche konnte die Sulfataufnahme durch *sat-1* unter variierenden Bedingungen bestimmt werden.

Die Rolle des Chlorids in Hinblick auf den Sulfattransport durch *sat-1* konnte nicht gänzlich geklärt werden. Da Thiosulfat und Nitrat in den durchgeführten Versuchen die Aufnahme von Sulfat über *rsat-1* hemmten, könnte das Stickstoffatom den Transport von Sulfat beeinflussen. Hier wären weitere Versuche notwendig, um den Effekt zu bestätigen. In diesem Fall wären die Ergebnisse dieser Arbeit mit einer allosterischen oder kompetitiven Hemmung vereinbar. Eine genauere Untersuchung des Chloridtransports über *sat-1* wäre durch Versuche mit radioaktiv markiertem Iod¹²⁵ möglich, das wie Chlorid transportiert wird.

Die intrazelluläre Ansäuerung der Oozyten durch Ammoniumchlorid führte zu einer erhöhten Sulfataufnahme in die *rsat-1*-exprimierenden Oozyten. Diese könnte durch eine verminderte Bicarbonatkonzentration an der äußeren Zellmembran mit einer reduzierten kompetitiven Hemmung begründet sein. Ebenso könnte Ammoniumchlorid durch eine protonierende Wirkung eine Konformationsänderung mit einer Affinitätssteigerung von

rsat-1 für Sulfat zur Folge haben. Das detektierte Membranpotential der angesäuerten Oozyten könnte auf eine auch nach der Inkubation weiterhin bestehende Ansäuerung hinweisen. Hier wären zur näheren Untersuchung Messungen des intrazellulären pH-Wertes nötig.

Mit steigender Calciumkonzentration wurde die Depolarisation rsat-1-exprimierender Oozyten in chloridreduzierten und gluconathaltigen Lösungen geringer. Es sind keine signifikanten Änderungen des Membranpotentials unter Perfusion mit sulfathaltigen Lösungen verschiedener Calciumkonzentrationen gemessen worden. Um genauere Aussagen über das Verhalten der rsat-1-exprimierenden Oozyten machen zu können, könnten weitere Versuche mit höheren Calciumchloridkonzentrationen durchgeführt werden.

6 Literaturverzeichnis

Ackerman MJ, Wickman KD, Clapham DE (1994): Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 103 (2): 153-179

Barish ME (1983): A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J Physiol* 342: 309-325

Beck L, Markovich D (2000): The mouse Na⁺-sulfate cotransporter gene *Nas1*. Cloning, tissue distribution, gene structure, chromosomal assignment, and transcriptional regulation by vitamin D. *J Biol Chem* 275 (16): 11880-11890

Becker L, Heinemann HO, Igarashi K, Hodler J, Gershberg H (1960): Renal mechanisms for the excretion of inorganic sulfate in man. *J Clin Invest* 39: 1909-1913

Bissig M, Hagenbuch B, Stieger B, Koller T, Meier PJ (1994): Functional expression cloning of the canalicular sulfate transport system of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 269 (4): 3017-3021

Boldt M, Burckhardt G, Burckhardt BC (2003): NH₄⁺ conductance in *Xenopus laevis* oocytes. III. Effect of NH₃. *Pflugers Arch* 446: 652-657

Boron WF (1983): Transport of H⁺ and of ionic weak acids and bases. *J Membr Biol* 72 (1-2): 1-16

Boron WF (2006): Acid-base transport by the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 17: 2368-2382

Boron WF, De Weer P (1976): Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors. *J Gen Physiol* 67 (1): 91-112

Brzica H, Breljak D, Krick W, Lovrić M, Burckhardt G, Burckhardt BC, Sabolić I (2009): The liver and kidney expression of sulfate anion transporter *sat-1* in rats exhibits male-dominant gender differences. *Pflugers Arch* 457: 1381-1392

Burckhardt BC, Frömter E (1992): Pathways of NH₃/NH₄⁺ permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflugers Arch* 420 (1): 83-86

Burckhardt BC, Burckhardt G (1997): NH₄⁺ conductance in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflugers Arch* 434 (3): 306-12

Busch AE, Waldegger S, Herzer T, Biber J, Markovich D, Murer H, Lang F (1994): Electrogenic cotransport of Na⁺ and sulfate in *Xenopus* oocytes expressing the cloned Na⁺/SO₄²⁻ transport protein *NaSi-1*. *J Biol Chem* 269 (17): 12407-12409

Chang MH, Plata C, Zandi-Nejad K, Sinđić A, Sussman CR, Mercado A, Broumand V, Raghuram V, Mount DB, Romero MF (2009): SLC26a9- anion exchanger, channel and Na⁺ transporter. *J Membr Biol* 228 (3): 125-140

Chao AC, Katayama Y (1991): Regulation of endogenous chloride conductance in *Xenopus* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 180 (3): 1377-1382

- Chernova MN, Jiang L, Friedman DJ, Darman RB, Lohi H, Kere J, Vandorpe DH, Alper SL** (2005): Functional comparison of mouse *slc26a6* anion exchanger with human SLC26A6 polypeptide variants: differences in anion selectivity, regulation, and electrogenicity. *J Biol Chem* 280 (9): 8564-8580
- Clark JS, Vandorpe DH, Chernova MN, Henghan JF, Stewart AK, Alper SL** (2008): Species differences in Cl⁻ affinity and electrogenicity of SLC26A6- mediated oxalate/Cl⁻ exchange correlate with the distinct human and mouse susceptibilities to nephrolithiasis. *J Physiol* 586 (5): 1291-1306
- Clarke LA, Nasir J, Zhang H, McDonald H, Applegarth DA, Hayden MR, Toone J** (1994): Murine alpha-L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Genomics* 24 (2): 311-316
- Cole DE, Evrovski J** (2000): The clinical chemistry of inorganic sulfate. *Crit Rev Clin Lab Sci* 37: 299-344
- Cole DE, Baldwin LS, Stirk LJ** (1984): Increased inorganic sulfate in mother and fetus at parturition: evidence for a fetal-to-maternal gradient. *Am J Obstet Gynecol* 148 (5): 596-599
- Cole DE, Baldwin LS, Stirk LJ** (1985): Increased serum sulfate in pregnancy: relationship to gestational age. *Clin Chem* 31 (6): 866-867
- Cote' CJ, Drop LJ, Daniels AL, Hoaglin DC** (1987): Calcium chloride versus calcium gluconate: Comparison of ionization and cardiovascular effects in children and dogs. *Anesthesiology* 66 (4): 465-470
- Cougnon M, Bouyer P, Hulin P, Anagnostopoulos T, Planelles G** (1996): Further investigation of ionic diffusive properties and of NH₄⁺ pathways in *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflugers Arch* 431 (4): 658-667
- Dascal N** (1987): The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22 (4): 317-87
- Dawson PA, Beck L, Markovich D** (2003): Hyposulfatemia, growth retardation, reduced fertility, and seizures in mice lacking a functional NaSi-1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (23): 13704-13709
- Dawson PA, Russell CS, Lee S, McLeay SC, van Dongen JM, Cowley DM, Clarke LA, Markovich D** (2010a): Urolithiasis and hepatotoxicity are linked to the anion transporter Sat1 in mice. *J Clin Invest* 120 (3): 706-712
- Dawson PA, Choyce A, Chuang C, Whitelock J, Markovich D, Leggatt GR** (2010b): Enhanced tumor growth in the NaS1 sulfate transporter null mouse. *Cancer Sci* 101 (2): 369-373
- Dawson PA, Rakoczy J, Simmons DG** (2012): Placental, renal, and ileal sulfate transporter gene expression in mouse gestation. *Biol Reprod* 87 (2): 43, 1-9
- Detro-Dassen S, Schänzler M, Lauks H, Martin I, zu Berstenhorst SM, Nothmann D, Torres-Salazar D, Hidalgo P, Schmalzing G, Fahlke C** (2008): Conserved dimeric subunit stoichiometry of SLC26 multifunctional anion exchangers. *J Biol Chem* 283 (7): 4177-4188
- Dorwart MR, Shcheynikov N, Wang Y, Stippec S, Muallem S** (2007): SLC26A9 is a Cl⁻ channel regulated by the WNK kinases. *J Physiol* 584 (Pt 1): 333-345
- Dorwart MR, Shcheynikov N, Yang D, Muallem S** (2008): The solute carrier 26 family of proteins in epithelial ion transport. *Physiology* 23: 104-114

- Dumont JN** (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136 (2): 153-179
- Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevanis AD, Sheffield VC, Green ED** (1997): Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 17 (4): 411-422
- Falany CN** (1997): Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J* 11: 206–216
- Fernandes I, Hampson G, Cahours X, Morin P, Coureau C, Couette S, Prie D, Biber J, Murer H, Friedlander G, Silve C** (1997): Abnormal sulfate metabolism in vitamin D-deficient rats. *J Clin Invest* 100 (9): 2196–2203
- Fernandes I, Laouari D, Tutt P, Hampson G, Friedlander G, Silve C** (2001): Sulfate homeostasis, NaSi-1 cotransporter, and SAT-1 exchanger expression in chronic renal failure in rats. *Kidney Int* 59 (1): 210-221
- Forlino A, Piazza R, Tiveron C, Della Torre S, Tatangelo L, Bonafè L, Gualeni B, Romano A, Pecora F, Superti-Furga A, Cetta G, Rossi A** (2005): A diastrophic dysplasia sulfate transporter (SLC26A2) mutant mouse: morphological and biochemical characterization of the resulting chondrodysplasia phenotype. *Hum Mol Genet* 14 (6): 859-871
- Freel RW, Hatch M** (2012): Hyperoxaluric rats do not exhibit alterations in renal expression patterns of Slc26a1 (SAT1) mRNA or protein. *Urol Res* 40 (6): 647-654
- Girard JP, Baekkevold ES, Feliu J, Brandtzaeg P, Amalric F** (1999): Molecular cloning and functional analysis of SUT-1, a sulfate transporter from human high endothelial venules. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (22): 12772-12777
- Goudsmit AJ, Power MH, Bollman JL** (1939): The excretion of sulfates by the dog. *Am J Physiol* 125: 506-520
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Mairbaix G** (1971): Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 177-182
- Hästbacka J, de la Chapelle A, Mahtani MM, Clines G, Reeve-Daly MP, Daly M, Hamilton BA, Kusumi K, Trivedi B, Weaver A** (1994): The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell* 78 (6): 1073-87
- Hästbacka J, Superti-Furga A, Wilcox WR, Rimoin DL, Cohn DH, Lander ES** (1996): Atelosteogenesis type II is caused by mutations in the diastrophic dysplasia sulfate-transporter gene (DTDST): evidence for a phenotypic series involving three chondrodysplasias. *Am J Hum Genet* 58 (2): 255-262
- Heneghan JF, Akhavein A, Salas MJ, Shmukler BE, Karniski LP, Vandorpe DH, Alper SL** (2010): Regulated transport of sulfate and oxalate by SLC26A2/DTDST. *Am J Physiol Cell Physiol* 298 (6): C1363-C1375
- Hierholzer K, Cade R, Gurd R, Kessler R, Pitts R** (1960): Stop-flow analysis of renal reabsorption and excretion of sulfate in the dog. *Am J Physiol* 198: 833-837
- Holmberg C** (1986): Congenital chloride diarrhoea. *Clin Gastroenterol* 15: 583–602

- Jiang Z, Grichtchenko II, Boron WF, Aronson PS** (2002): Specificity of anion exchange mediated by mouse Slc26a6. *J Biol Chem* 277 (37): 33963-33967
- Karniski LP, Lötscher M, Fucentese M, Hilfiker H, Biber J, Murer H** (1998): Immunolocalization of sat-1 sulfate/oxalate/bicarbonate anion exchanger in the rat kidney. *Am J Physiol* 275 (1 Pt 2): F79-87
- Katayama Y, Widdicombe JH** (1991): Halide transport in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 443: 587-599
- Kere J, Lohi H, Höglund P** (1999): Genetic Disorders of Membrane Transport III. Congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol* 276 (1 Pt 1): G7-G13
- Kim KH, Shcheynikov N, Wang Y, Muallem S** (2005): SLC26A7 is a Cl⁻ channel regulated by intracellular pH. *J Biol Chem* 280 (8): 6463-6470
- Knauf F, Yang CL, Thomson RB, Mentone SA, Giebisch G, Aronson PS** (2001): Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (16): 9425-9430
- Ko N, Knauf F, Jiang Z, Markovich D, Aronson PS** (2012): Sat1 is dispensable for active oxalate secretion in mouse duodenum. *Am J Physiol Cell Physiol* 303 (1): C52-C57
- Kowdley GC, Ackerman SJ, John JE 3rd, Jones LR, Moorman JR** (1994): Hyperpolarization-activated chloride currents in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 103 (2): 217-230
- Krick W, Schnedler N, Burckhardt G, Burckhardt BC** (2009): Ability of sat-1 to transport sulfate, bicarbonate, or oxalate under physiological conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 297 (1): F145-F154
- Lee A, Beck L, Markovich D** (2000): The human renal sodium sulfate cotransporter (SLC13A1; hNaSi-1) cDNA and gene: organization, chromosomal localization, and functional characterization. *Genomics* 70 (3): 354-363
- Lee A, Beck L, Markovich D** (2003): The mouse sulfate anion transporter gene Sat1 (Slc26a1): cloning, tissue distribution, gene structure, functional characterization, and transcriptional regulation by thyroid hormone. *DNA Cell Biol* 22 (1): 19-31
- Lee HJ, Sagawa K, Shi W, Murer H, Morris ME** (2000): Hormonal regulation of sodium/sulfate co-transport in renal epithelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 225 (1): 49-57
- Lind T** (1980): Clinical chemistry of pregnancy. *Adv Clin Chem* 21: 1-24
- Lohr JW, Willsky GR, Acara MA** (1998): Renal drug metabolism. *Pharmacol Rev* 50 (1): 107-141
- Markovich D** (2001): Physiological roles and regulation of mammalian sulfate transporters. *Physiol Rev* 81 (4): 1499-1533
- Markovich D** (2008): Expression cloning and radiotracer uptakes in *Xenopus laevis* oocytes. *Nat Protoc* 3 (12): 1975 - 1980
- Markovich D, Murer H** (2004): The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch* 447 (5): 594-602

- Markovich D, Aronson PS** (2007): Specificity and regulation of renal sulfate transporters. *Annu Rev Physiol* 69: 361-75
- Markovich D, Forgo J, Stange G, Biber J, Murer H** (1993): Expression cloning of rat renal Na⁺/SO₄²⁻ cotransport. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (17): 8073-8077
- Markovich D, Bissig M, Sorribas V, Hagenbuch B, Meier PJ, Murer H** (1994): Expression of rat renal sulfate transport systems in *Xenopus laevis* oocytes. Functional characterization and molecular identification. *J Biol Chem* 269 (4): 3022-3026
- Markovich D, Murer H, Biber J, Sakhaee K, Pak C, Levi M** (1998): Dietary sulfate regulates the expression of the renal brush border Na/Si cotransporter NaSi-1. *J Am Soc Nephrol* 9 (9): 1568-73
- Markovich D, Wang H, Puttapparthi K, Zajicek H, Rogers T, Murer H, Biber J, Levi M** (1999): Chronic K depletion inhibits renal brush border membrane Na/sulfate cotransport. *Kidney Int* 55 (1): 244-51
- Michalk D, Klare B, Manz F, Schärer K** (1981): Plasma inorganic sulfate in children with chronic renal failure. *Clin Nephrol* 16 (1): 8-12
- Moseley RH, Höglund P, Wu GD, Silberg DG, Haila S, de la Chapelle A, Holmberg C, Kere J** (1999): Downregulated in adenoma gene encodes a chloride transporter defective in congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol* 276 (1 Pt 1): G185-192
- Murer H, Burckhardt G** (1983): Membrane transport of anions across epithelia of mammalian small intestine and kidney proximal tubule. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 96: 1-51
- Musa-Aziz R, Jiang L, Chen LM, Behar KL, Boron WF** (2009): Concentration-dependent effects on intracellular and surface pH of exposing *Xenopus* oocytes to solutions containing NH₃/NH₄⁺. *J Membr Biol* 228 (1): 15-31
- Nozawa T, Sugiura S, Hashino Y, Tsuji A, Tamai I** (2004): Role of anion exchange transporter PAT1 (SLC26A6) in intestinal absorption of organic anions. *J Drug Target* 12 (2): 97-104
- Ofosu FA, Modi GJ, Blajchman MA, Buchanan MR, Johnson EA** (1987): Increased sulphation improves the anticoagulant activities of heparan sulphate and dermatan sulphate. *Biochem J* 248 (3): 889-896
- Ohana E, Yang D, Shcheynikov N, Muallem S** (2009): Diverse transport modes by the solute carrier 26 family of anion transporters. *J Physiol* 587 (Pt 10): 2179-2185
- Ohana E, Shcheynikov N, Yang D, So I, Muallem S** (2011): Determinants of coupled transport and uncoupled current by the electrogenic SLC26 transporters. *J Gen Physiol* 137 (2): 239-251
- Pajor AM** (2000): Molecular properties of sodium/dicarboxylate cotransporters. *J Membr Biol* 175 (1): 1-8
- Pajor AM** (2006): Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflugers Arch* 451 (5): 597-605
- Petrovic S, Ju X, Barone S, Seidler U, Alper SL, Lohi H, Kere J, Soleimani M** (2003): Identification of a basolateral Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger specific to gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284 (6): G1093-1103

- Puttapparthi K, Markovich D, Halaihel N, Wilson P, Zajicek HK, Wang H, Biber J, Murer H, Rogers T, Levi M** (1999): Metabolic acidosis regulates rat renal Na-Si cotransport activity. *Am J Physiol* 276 (6 Pt 1): C 1398-1404
- Quondamatteo F, Krick W, Hagos Y, Krüger MH, Neubauer-Saile K, Herken R, Ramadori G, Burckhardt G, Burckhardt BC** (2006): Localization of the sulfate/anion exchanger in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290 (5): G 1075-1081
- Regeer RR, Lee A, Markovich D** (2003): Characterization of the human sulfate anion transporter (hsat-1) protein and gene (SAT1, SLC26A1). *DNA Cell Biol* 22 (2): 107-117
- Romero MF, Boron WF** (1999): Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology. *Annu Rev Physiol* 61: 699-723
- Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF** (1997): Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *Nature* 387 (6631): 409-413
- Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED** (2000): Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 141 (2): 839-845
- Sagawa K, Murer H, Morris ME** (1999): Effect of experimentally induced hypothyroidism on sulfate renal transport in rats. *Am J Physiol* 276 (1 Pt 2): F164-71
- Schaechinger TJ, Oliver D** (2007): Nonmammalian orthologs of prestin (SLC26A5) are electrogenic divalent/chloride anion exchangers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (18): 7693-7698
- Schnedler N, Burckhardt G, Burckhardt BC** (2011): Glyoxylate is a substrate of the sulfate-oxalate exchanger, sat-1, and increases its expression in HepG2 cells. *J Hepatol* 54 (3): 513-520
- Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP** (1999): The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 21 (4): 440-443
- Shcheynikov N, Yang D, Wang Y, Zeng W, Karniski LP, So I, Wall SM, Muallem S** (2008): The Slc26a4 transporter functions as an electroneutral Cl⁻/I⁻/HCO₃⁻ exchanger: role of Slc26a4 and Slc26a6 in I⁻ and HCO₃⁻ secretion and in regulation of CFTR in the parotid duct. *J Physiol* 586 (16): 3813-3824
- Sigel E** (1990): Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membr Biol* 117 (3): 201-221
- Silberg DG, Wang W, Moseley RH, Traber PG** (1995): The Down regulated in Adenoma (dra) gene encodes an intestine-specific membrane sulfate transport protein. *J Biol Chem* 270 (20): 11897-11902
- Superti-Furga A, Hästbacka J, Wilcox WR, Cohn DH, van der Harten HJ, Rossi A, Blau N, Rimoin DL, Steinmann B, Lander ES, Gitzelmann R** (1996): Achondrogenesis type IB is caused by mutations in the diastrophic dysplasia sulphate transporter gene. *Nat Genet* 12 (1): 100-102
- Tallgren LG** (1980): Inorganic sulphates in relation to the serum thyroxine level and in renal failure. *Acta Med Scand Suppl* 640: 1-100

- Touré A, Lhuillier P, Gossen JA, Kuil CW, Lhôte D, Jégou B, Escalier D, Gacon G** (2007): The testis anion transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse. *Hum Mol Genet* 16 (15): 1783–1793
- Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Bröer S** (2000): The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 10 (1-2): 1-12
- Waldegger S, Moschen I, Ramirez A, Smith RJ, Ayadi H, Lang F, Kubisch C** (2001): Cloning and characterization of SLC26A6, a novel member of the solute carrier 26 gene family. *Genomics* 72 (1): 43-50
- Wang Z, Petrovic S, Mann E, Soleimani M** (2002): Identification of an apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282 (3): G573-579
- Weber WM** (1999a): Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* 1421 (2): 213-233
- Weber WM** (1999b): Endogenous Ion Channels of *Xenopus laevis*: Recent Developments. *J Membr Biol* 170 (1): 1-12
- Weber WM, Liebold KM, Reifarth FW, Uhr U, Clauss W** (1995): Influence of extracellular Ca_2^+ on endogenous Cl^- channels in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 429 (6): 820-824
- Xie Q, Welch R, Mercado A, Romero MF, Mount DB** (2002): Molecular characterization of the murine Slc26a6 exchanger: functional comparison with Slc26a1. *Am J Physiol Renal Physiol* 283 (4): F826-F838
- Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P** (2000): Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405 (6783): 149-155

7 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
A _{Oozyte}	Gemessene Aktivität einzelner Oozyten
AP	Activator protein
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
A _{spez}	Spezifische Aktivität
A _{stand}	Aktivität der Standardwerte
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	Komplementäre DNA
CFEX	Chlorid-Formiat-Austauscher
C ₆ H ₁₄ O ₆	Mannit
Ci	Curie
³⁶ Cl ⁻	Radioaktiv markiertes Chlorid
cm	Zentimeter
CO ₃ ²⁻	Carbonat
C _{Sulf}	Konzentration des radioaktiv markierten Sulfats im Inkubationsmedium
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure
dpm	Decays per minute
DRA	Diarrhoea anion transporter
DTDST	Diastrophic dysplasia sulphate transporter
g	Gramm
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(Ethansulfonsäure)
HepG2	Human hepatocellular liver carcinoma cell line
hNaSi-1	Humaner natriumabhängiger Sulfattransporter 1
hsat-1	Sat-1 des Menschen
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
¹²⁵ I	Radioaktiv markiertes Iod
IDUA	α-L-Iduronidase
kb	Kilobasenpaare
KC ₆ H ₁₁ O ₇	Kaliumgluconat
KCl	Kaliumchlorid
K _i	Inhibitionskonstante
K _m	Michaeliskonstante
KNO ₃	Kaliumnitrat
KSCN	Kaliumthiocyanat
M	Molar

μg	Mikrogramm
min	Minute
μl	Mikroliter
mM	Millimol/l
μM	Mikromol
μm	Mikrometer
mmol	Millimol
mNaSi-1	Natriumabhängiger Sulfattransporter 1 der Maus
mol	Mol
mRNA	Messenger RNA
msat-1	Sat-1 der Maus
mV	Millivolt
N	Normalität
$\text{NaC}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$	Natriumgluconat
NaCl	Natriumchlorid
NaCT	Natriumgekoppelter Citrattransporter
NaDC-1	Natriumabhängiger Dicarboxylattransporter 1
NaDC-3	Natriumabhängiger Dicarboxylattransporter 3
NaNO_3	Natriumnitrat
NaSCN	Natriumthiocyanat
NaSi-1	Natriumabhängiger Sulfattransporter 1
Na_2SO_4	Natriumsulfat
NBC_1	Natrium-Bicarbonat-Cotransporter 1
NH_3	Ammoniak
NH_4^+	Ammoniumion
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
ORi	Oozytenringerlösung
PAPS	Adenosin-3'Phosphat-5'Sulfatophosphat
pmol	Pikomol
PP_i	Anorganisches Pyrophosphat
rNaSi-1	Natriumabhängiger Sulfattransporter 1 der Ratte
rsat-1	Sat-1 der Ratte
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Sat-1	Sulfat-Anionen-Transporter 1
SAT1	Sat-1 kodierendes Gen
$[\text{}^{35}\text{S}]\text{H}_2\text{SO}_4$	Radioaktiv markiertes Sulfat
SITS	4-Acetamido-4'-isothiocyanatostilben-2,2'-disulfonat
SLC13	Solute Linked Carrier 13
SLC26	Solute Linked Carrier 26
SO_3^{2-}	Sulfit
SUT-1	Sulfat-Transporter 1

TAT1	Testis anion transporter
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
T _{sulf}	Sulfataufnahme
T _{Transport}	Transportzeit
V _{stand}	Standardvolumen

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. phil. nat. B. C. Burckhardt für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation. Sowohl während der experimentellen Phase als auch während des Verfassens und der Korrektur dieser Arbeit hat Frau Burckhardt mich stets sehr verlässlich und mit außergewöhnlichem Engagement unterstützt.

Bei Frau Dr. K. Brauburger bedanke ich mich für die Unterstützung während der experimentellen Phase, während der sie mir jederzeit bei Fragen behilflich war.

Frau I. Markmann danke ich für die Anleitung und Einführung in das elektrophysiologische Arbeiten sowie das Bereitstellen der Oozyten.

Weiterhin danke ich Frau Dr. N. Schnedler, Herrn S. Petzke und Herrn R. Schirmer für ihre Hilfe.

