

Institut für Ernährungswissenschaft
Molekulare Ernährungsforschung
Justus-Liebig-Universität Gießen

**Transportcharakteristika des
Sulfat Anionen Transporter 1, sat-1, und seine Regulation
durch Vorstufen des Oxalats**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
(Dr. oec. troph.)
am Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotrophologie
und Umweltmanagement

vorgelegt von
Dipl. oec. troph.
Nina Schnedler
aus Göttingen

Gießen 2010

Dissertation am Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 17.09.2010

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Hoy

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Wenzel

2. Gutachterin: Prof. Dr. B.C. Burckhardt

Prüfer: Prof. Dr. K. Eder

Prüfer: Prof. Dr. J. M. Geyer

für Tobias

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IX
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Oxalat.....	1
1.1.1 Oxalatzufuhr.....	1
1.1.2 Oxalatesorption im Gastrointestinaltrakt.....	2
1.1.3 Mögliche Synthesewege des Oxalats.....	3
1.1.4 Oxalatmetabolismus.....	5
1.1.5 Regulation der Oxalatsynthese.....	6
1.1.6 Störungen des Oxalatstoffwechsels - Primäre und sekundäre Hyperoxalurie.....	6
1.1.7 Oxalatausscheidung.....	8
1.1.8 Nierensteine.....	8
1.2 Sulfatmetabolismus.....	10
1.3 Die <i>solute carrier</i> (SLC) Transporterfamilie.....	11
1.3.1 Der natriumabhängige Sulfattransporter, NaS _i -1.....	13
1.3.2 Die SLC26 Transporterfamilie.....	14
1.3.3 Sulfat Anionen Transporter 1 (sat-1).....	16
1.3.3.1 Lokalisation des sat-1.....	18
1.3.3.2 Sat-1 Transport.....	19
1.3.3.3 Regulation des sat-1.....	21
1.3.3.4 Die sat-1 <i>knock-out</i> Maus.....	23
1.4 Zellen.....	23
1.4.1 <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	23
1.4.2 HepG2-Zellen.....	24
1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	26
2. MATERIAL.....	27
2.1 Oligonucleotidprimer.....	27
2.2 <i>Real-time</i> PCR Assays.....	27

INHALTSVERZEICHNIS

2.3 Zellen.....	28
2.4 Antikörper.....	28
2.5 Plasmidvektor.....	29
2.6 Kits.....	29
2.7 Enzyme.....	29
2.8 Medien, Lösungen und Puffer.....	29
2.9 Chemikalien.....	32
2.10 Software.....	32
2.11 Geräte.....	33
3. METHODEN.....	36
3.1 Gewinnung von cRNA für die Expression in Oozyten.....	36
3.1.1 Transformation der Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> Zellen.....	36
3.1.2 DNA-Isolierung und Aufreinigung.....	37
3.1.3 Restriktionsverdau mit <i>NOTI</i>	37
3.1.4 cRNA Synthese.....	38
3.2 Expression des <i>rsat-1</i> in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	39
3.2.1 Präparation der Oozyten.....	39
3.2.2 Injektion der Oozyten.....	39
3.2.3 Aufnahmeexperimente.....	41
3.3 Zellzucht mit HepG2-Zellen.....	43
3.4 Isolierung der RNA mit TRIzol®.....	43
3.5 Reverse Transkription (cDNA Synthese).....	44
3.6 Polymerase-Kettenreaktion.....	45
3.7 <i>Real-time</i> PCR.....	46
3.8 Agarosegel-Elektrophorese.....	47
3.9 Präparation der Zellmembranproteine.....	48
3.10 Proteinbestimmung nach Bradford.....	48
3.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	49
3.12 Western Blot.....	49
3.12.1 Proteintransfer auf die PVDF Membran.....	50
3.12.2 Proteindetektion auf Western Blots.....	50
3.13 Sulfattransport in HepG2-Zellen.....	51
3.14 Statistik.....	51

4. ERGEBNISSE.....	52
4.1. Zeitabhängigkeit der Sulfataufnahme in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺	52
4.2 Bestimmung der K _m für Sulfat.....	53
4.3 <i>Cis</i> -Inhibition der Sulfataufnahme.....	54
4.4 Hemmung der Sulfataufnahme durch aufsteigende Oxalatkonzentrationen...55	55
4.5 <i>Trans</i> -Stimulation mit Sulfat und Oxalat.....	56
4.6 Bestimmung der K _m von Oxalat.....	57
4.7 Hemmung der Oxalataufnahme durch aufsteigende Sulfatkonzentrationen...58	58
4.8 Bestimmung der maximalen Sulfat- und Oxalataufnahme.....	59
4.9 <i>Cis</i> -Inhibition der Sulfat- und Oxalataufnahme mit physiologischen Oxalat-, Sulfat- und Bicarbonatkonzentrationen.....	60
4.10 Interaktionen des rsat-1 mit Bicarbonat.....	62
4.11 Chloridabhängigkeit des rsat-1.....	64
4.12 Interaktionen von Phosphat mit dem rsat-1.....	66
4.13 Interaktionen von Glycolat mit dem rsat-1.....	68
4.14 Interaktionen von Glyoxylat mit dem rsat-1.....	69
4.15 Nachweis von hsat-1 RNA in HepG2-Zellen.....	71
4.16 Inkubation von HepG2-Zellen in Oxalat und Oxalatvorstufen.....	72
4.17 Zeitreihe der Inkubation von HepG2-Zellen in Glyoxylat.....	75
4.18 Konzentrationsreihe der Inkubation von HepG2-Zellen in Glyoxylat.....	78
4.19 Sat-1 Proteinexpression in HepG2-Zellen nach Inkubation in Glyoxylat.....	81
4.20 Funktionelle Analyse des erhöhten hsat-1 Proteins.....	82
4.21 Weitere Transporter in HepG2-Zellen.....	83
4.22 Verhalten der HepG2-Zellen unter Glyoxylatinkubation.....	84
5. DISKUSSION.....	86
5.1 Substrattransport über den sat-1.....	86
5.2 Die Bedeutung des sat-1 für den Anionentransport im proximalen Tubulus der Niere.....	89
5.3 Die Aufgabe des sat-1 in der Leber.....	90
5.4 Die Bedeutung des sat-1 für die Translokation von Vorstufen des Oxalats....92	92
5.5 Stimulation der sat-1 Expression durch Glyoxylat.....	93
5.6 Möglicher Wirkmechanismus des Glyoxylats.....	95
5.7 Schlussfolgerung und Ausblick.....	97

INHALTSVERZEICHNIS

6. ZUSAMMENFASSUNG.....	98
7. LITERATUR.....	100
DANKSAGUNG.....	112
ERKLÄRUNG.....	113
VERÖFFENTLICHUNGEN.....	114
KONFERENZEN.....	115
LEBENS LAUF.....	116

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1	Struktur des Oxalatanions.....	1
Abbildung 1.2	Oxalatsynthese in Hepatozyten.....	3
Abbildung 1.3	Oxalatmetabolismus in Hepatozyten.....	5
Abbildung 1.4	Struktur des Glyoxylat- und Glycolatanions.....	6
Abbildung 1.5	Calciumoxalatkristalle.....	9
Abbildung 1.6	Strukturformel des Sulfatanions.....	10
Abbildung 1.7	SLC Transporter.....	12
Abbildung 1.8	Modell des rsat-1.....	17
Abbildung 1.9	hsat-1 Spleißvarianten 1-3.....	18
Abbildung 1.10	Lokalisation des sat-1 in Niere und Leber.....	19
Abbildung 1.11	Die sechs Stadien der Oogenese von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten...	24
Abbildung 1.12	HepG2-Zellen.....	25
Abbildung 3.1	cRNA-Gewinnung für die Expression in Oozyten.....	36
Abbildung 3.2	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs von der cRNA-Injektion bis zur radiochemischen Untersuchung der rsat-1-exprimierenden <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	40
Abbildung 3.3	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Transportexperimente mit radioaktiv markierten Substanzen.....	42
Abbildung 3.4	Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	45
Abbildung 4.1	Zeitabhängigkeit der Sulfataufnahme.....	53
Abbildung 4.2	Konzentrationsabhängigkeit der Sulfataufnahme und Linearisierung nach Eadie-Hofstee.....	54
Abbildung 4.3	Cis-Inhibition der Sulfataufnahme durch verschiedene Anionen..	55
Abbildung 4.4	Hemmung der Sulfataufnahme durch aufsteigende Oxalatkonzentrationen (Dixon Plot Oxalat).....	56
Abbildung 4.5	Trans-Stimulation mit Sulfat und Oxalat.....	57
Abbildung 4.6	Konzentrationsabhängigkeit der Oxalataufnahme und Linearisierung nach Eadie-Hofstee.....	58
Abbildung 4.7	Hemmung der Oxalataufnahme durch aufsteigende Sulfatkonzentrationen (Dixon Plot Sulfat).....	59
Abbildung 4.8	Maximale Aufnahme von Sulfat und Oxalat.....	60

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4.9	<i>Cis</i> -Inhibition der Sulfataufnahme durch physiologische Oxalat- und Bicarbonatkonzentrationen.....	61
Abbildung 4.10	<i>Cis</i> -Inhibition der Oxalataufnahme durch physiologische Sulfat- und Bicarbonatkonzentrationen.....	61
Abbildung 4.11	<i>Cis</i> -Inhibition der Sulfataufnahme durch Bicarbonat.....	62
Abbildung 4.12	<i>Trans</i> -Stimulation der Sulfat- und Oxalataufnahme durch Bicarbonat.....	63
Abbildung 4.13	Sulfatefflux in Gegenwart von Bicarbonat.....	63
Abbildung 4.14	Sulfataufnahme in An- und Abwesenheit von Chlorid und Linearisierung nach Eadie-Hofstee.....	65
Abbildung 4.15	Sulfat- und Oxalatefflux in An- und Abwesenheit von Chlorid.....	66
Abbildung 4.16	<i>Cis</i> -Inhibition und <i>trans</i> -Stimulation der Sulfataufnahme durch Phosphat.....	67
Abbildung 4.17	Sulfatefflux in Gegenwart von Phosphat.....	67
Abbildung 4.18	<i>Cis</i> -Inhibition der Sulfataufnahme durch Glycolat.....	68
Abbildung 4.19	<i>Trans</i> -Stimulation der Sulfataufnahme durch Glycolat.....	68
Abbildung 4.20	<i>Cis</i> -Inhibition der Sulfataufnahme durch Glyoxylat.....	69
Abbildung 4.21	<i>Trans</i> -Stimulation der Sulfataufnahme durch Glyoxylat.....	70
Abbildung 4.22	<i>Trans</i> -Stimulation der Oxalataufnahme durch Glyoxylat.....	70
Abbildung 4.23	Sulfatefflux in Gegenwart von Glyoxylat.....	71
Abbildung 4.24	hsat-1 mRNA-Expression in HepG2-Zellen.....	72
Abbildung 4.25	hsat-1 mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen.....	73
Abbildung 4.26	Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvarianten 1 und 3) in HepG2-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen...	74
Abbildung 4.27	Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvariante 2) in HepG2-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen.....	75
Abbildung 4.28	hsat-1 mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Inkubation für 1-6 Tage in Glyoxylat.....	76
Abbildung 4.29	Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvarianten 1 und 3) in HepG2-Zellen nach Inkubation für 1-6 Tage in Glyoxylat.....	77
Abbildung 4.30	Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvariante 2) in HepG2-Zellen nach Inkubation für 1-6 Tage in Glyoxylat.....	77

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4.31	hsat-1 mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Inkubation für 3 Tage in verschiedenen Glyoxylatkonzentrationen.....	78
Abbildung 4.32	Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvariante 2) in HepG2-Zellen nach dreitägiger Inkubation in aufsteigenden Glyoxylatkonzentrationen.....	79
Abbildung 4.33	hsat-1 mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Inkubation für 4 Tage in verschiedenen Glyoxylatkonzentrationen.....	79
Abbildung 4.34	Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvarianten 1 und 3) in HepG2-Zellen nach viertägiger Inkubation in aufsteigenden Glyoxylatkonzentrationen.....	80
Abbildung 4.35	Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvariante 2) in HepG2-Zellen nach viertägiger Inkubation in aufsteigenden Glyoxylatkonzentrationen.....	81
Abbildung 4.36	hsat-1 Proteinexpression in HepG2-Zellen nach Inkubation in Glyoxylat.....	82
Abbildung 4.37	Sulfataufnahme in HepG2-Zellen nach Glyoxylatinkubation.....	83
Abbildung 4.38	mRNA-Expression verschiedener Transporter in HepG2-Zellen..	84
Abbildung 4.39	Medienfärbung nach Glyoxylatinkubation.....	85
Abbildung 4.40	Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvarianten 1, 2 und 3) in unterschiedlich dicht gewachsenen HepG2-Zellen.....	85
Abbildung 5.1	Modell des Sulfat- und Oxalattransports in Leber und Nieren....	91

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1 Ausgewählte Lebensmittel und deren Oxalatgehalt.....	2
Tabelle 1.2 Ausgewählte Transporter der SLC Familie.....	13
Tabelle 1.3 Transporter der SLC26 Familie.....	14
Tabelle 1.4 Substrate und Effektoren des sat-1.....	20
Tabelle 2.1 RT-PCR Primer.....	27
Tabelle 2.2 <i>Real-time</i> PCR Assays.....	28
Tabelle 3.1 Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für SDS-Page.....	49

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AGT	Alanin:Glyoxylat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CFEX	Chlorid Formiat Austauscher
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
cRNA	Ribonucleinsäure mit Capstruktur
DAO	D-Aminosäureoxidase
DTT	Dithiotreitol
Δ Ct	Differenz der Schwellenwert Zyklen (<i>Cycle Treshold</i>)
DIDS	Diisothiocyanostilbendisulfonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DRA	<i>Down regulated in Adenoma</i>
DTDST	diastrophischer Dysplasie Sulfat Transporter
ECL	erhöhte Chemiluminescence (<i>enhanced Chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESWL	extrakorporale Stoßwellenlithotripsie
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GO	Glycolatoxidase
GR	Glyoxylatreduktase
Hepes	Hydroxyethylpiperizinyethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
K_i	Inhibitionskonstante
LB	Luria Broth
LDH	Laktatdehydrogenase
MCT	Monocarboxylattransporter
M-MuLV	Moloney Maus Leukämievirus

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NaS _i -1	natriumabhängiger Sulfattransporter 1
NBC1	Natrium Bicarbonat Cotransporter 1
NKCC2	Natrium Kalium Chlorid Cotransporter 2
ORi	Oozyten Ringer
PAPS	Phosphoadenosylphosphosulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered Saline</i>)
pCMBS	p-Chlormercuribenzoessulfonsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PVDF	Polyvenylidindifluorid
PH	primäre Hyperoxalurie
RNA	Ribonucleinsäure
RT	reverse Transkription
sat-1	Sulfat Anionen Transporter 1
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SLC	<i>solute carrier</i>
Tat1	Testis Anionen Transporter 1
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TMA	Tetramethylammonium
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett

1. EINLEITUNG

Nierensteine sind eine Volkskrankheit, an der in Europa und Nordamerika jeder Zehnte erkrankt. 70-80 % der Nierensteine bestehen aus Calciumoxalat¹¹⁷, daher ist der Oxalatmetabolismus und -transport im Körper von besonderem Interesse. Der **Sulfat Anionen Transporter 1**, sat-1, ist am Oxalat-, Bicarbonat- und Sulfattransport⁷² in der Leber¹⁰⁷, den Nieren⁶² und möglicherweise auch im Darm beteiligt¹⁹.

1.1 Oxalat

Oxalsäure ist die einfachste Dicarbonsäure und durch die Nachbarstellung der Carboxylgruppen eine starke Säure¹³⁹. Oxalat (Abb. 1.1), das Oxalsäureanion, hat keine bekannte Funktion im Stoffwechsel, ist toxisch, wird nicht gespeichert und nicht metabolisiert¹⁴. Das mit dem Urin ausgeschiedene Oxalat stammt aus der Nahrung und aus der endogenen Synthese in der Leber¹³⁹.

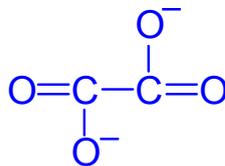


Abbildung 1.1 Struktur des Oxalatanions

1.1.1 Oxalatzufuhr

Die Oxalatzufuhr über die Nahrung variiert sehr stark und liegt zwischen 44 und 351 mg am Tag⁵³. Bisher wurde angenommen, dass die Oxalatzufuhr einen geringen Einfluss auf den Oxalatgehalt des Harns hat und nur etwa 10 % der mit dem Harn ausgeschiedenen Oxalsäure aus der Nahrung kommt. Demgegenüber konnten HOLMES *et al.* allerdings zeigen, dass ausgeschiedenes Oxalat etwa zur Hälfte aus der Nahrung stammen kann. Bei niedriger Oxalataufnahme trägt das Oxalat aus der Nahrung zu 24 % zum Urinoxalat bei und der Anteil erhöht sich bei hoher Oxalataufnahme auf 42 %⁵⁰.

Oxalatreiche Lebensmittel sind hauptsächlich Pflanzen und Pflanzenprodukte wie Spinat, Rhabarber, Rote Bete, Kakao- und Vollkornprodukte. Auch schwarzer Tee

und Pfefferminztee haben einen relativ hohen Oxalatgehalt^{63,123}. Tabelle 1.1 zeigt den Oxalatgehalt einer Auswahl an Lebensmitteln.

Tabelle 1.1 Ausgewählte Lebensmittel und deren Oxalatgehalt^{11,53}

Nahrungsmittel	Oxalatgehalt (mg / 100 g)
Spinat	774
Schokolade	34
Schwarze Oliven	27
Vollkornweizenbrot	27
Brezel	27
Kartoffeln	23
Pommes frites	21
Gemüsesuppe	7
Tomaten	7
Äpfel	1
Schwarzer Tee	3-16 mg / Tasse

1.1.2 Oxalatresorption im Gastrointestinaltrakt

Verschiedene Oxalattransporter (SLC26A1, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A6 und SLC26A7, siehe 1.3.2 und 1.3.3) werden im Gastrointestinaltrakt exprimiert und sind dort möglicherweise am Oxalattransport beteiligt. Neben der Oxalatresorption findet wahrscheinlich außerdem eine Oxalatsekretion in das Lumen des Intestinaltrakts statt^{19,85,118}.

Die Oxalatabsorption im Magen-Darm-Trakt variiert mit der aufgenommenen Oxalatsmenge. Befindet sich wenig Oxalat in der Nahrung, so liegt die Absorption bei 55 %, bei einer hohen Oxalatzufuhr werden nur 10 % des in der Nahrung vorkommenden Oxalats resorbiert⁵⁰. Erkrankungen des Dünndarms können mit einer vermehrten Oxalatresorption einhergehen⁶³ (siehe 1.1.6 sekundäre Hyperoxalurie).

Des Weiteren beeinflusst der Calciumgehalt der Nahrung das Ausmaß der Oxalatresorption, da sich Calcium mit Oxalat zu dem unlöslichen und damit nicht resorbierbaren Calciumoxalat verbindet. Die Aufnahme von Calcium vermindert folglich die Oxalatresorption^{50,63,79}.

Die Oxalatresorption wird auch von der Besiedelung des Darms mit *Oxalobacter formigenes* bestimmt. Dieses oxalatabbauende Bakterium befindet sich ab dem 9. Lebensmonat in der normalen Darmflora. Im Alter von 6 bis 9 Jahren lässt sich

Oxalobacter formigenes bei fast allen gesunden Kindern nachweisen. Bei wiederholter oder längerfristiger Behandlung mit Breitbandantibiotika kommt es zu einer erheblichen Reduktion bzw. zum Verschwinden dieses Bakteriums ⁶³. Möglicherweise vermindert *Oxalobacter formigenes* die Oxalataufnahme nicht nur durch Abbau des freien Oxalats im Darm, sondern auch durch die Erhöhung der Sekretion ins Darmlumen ³⁹.

1.1.3 Mögliche Synthesewege des Oxalats

Oxalat entsteht im Stoffwechsel als Endprodukt im Glyoxylatmetabolismus ⁶³. Als mögliche Vorstufen des Oxalats werden verschiedene Aminosäuren, Zucker und Ascorbinsäure diskutiert. Abbildung 1.2 zeigt die Bildung von Oxalat aus diesen Vorstufen.

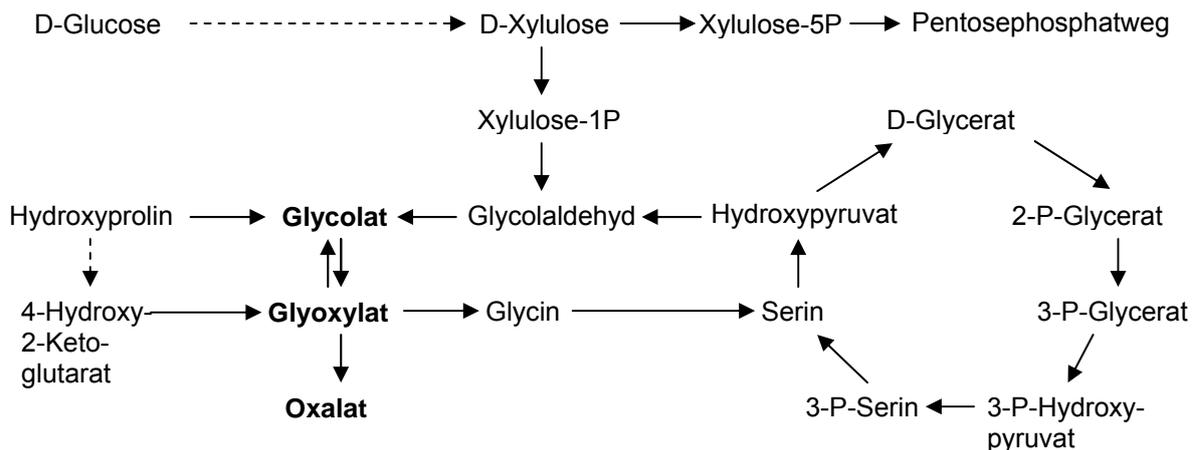


Abbildung 1.2 Oxalatsynthese in Hepatozyten

(zusammengefasst und modifiziert nach HOLMES und ASSIMOS 1998 ⁴⁸)

Es besteht kein Zusammenhang zwischen Proteinaufnahme und Oxalatausscheidung im Urin. Dies wurde bereits 1993 von HOLMES *et al.* für die westliche Ernährung gezeigt ⁵¹ und 2009 von KNIGHT *et al.* durch eine Studie mit kontrollierter Oxalataufnahme bestätigt ⁶⁸. Diese Studien zeigen, dass der Abbau von aus der Nahrung stammenden Aminosäuren offensichtlich nicht zu einer erhöhten endogenen Oxalatsynthese führt.

Hydroxyprolin, eine Aminosäure des Kollagens, ist eine mögliche Vorstufe des Glyoxylats. Tierisches Protein besteht zu ca. 30 % aus Kollagen und dieses enthält wiederum 10-13 % Hydroxyprolin. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Hydroxyprolin die Oxalatausscheidung erhöht ¹²⁷. Auch beim

Menschen ist die Oxalatausscheidung mit dem Urin bei einer Gelatinediät um 43 % erhöht. Wenn pro Tag 2-5 g Kollagen bzw. Gelatine abgebaut werden, so könnte dies 5-20 % des endogen produzierten Oxalats ausmachen⁶⁹.

Bei Glycin handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine bedeutende Oxalatvorstufe. Unter Verwendung von Meerschweinchenperoxisomen und isolierter Laktatdehydrogenase (LDH) konnten POORE *et al.* zeigen, dass Glycin weniger als 5 % zur Bildung von Glycolat und damit zum Glyoxylat- und Oxalatpool beiträgt¹⁰⁵.

Die Vorstellung, Oxalsäure entstehe beim Abbau von Ascorbinsäure und die Oxalatausscheidung im Harn werde folglich durch eine hohe Vitamin C-Zufuhr gesteigert, beruht möglicherweise auf methodischen Fehlern⁶³. ROBITAILLE *et al.* zeigten, dass bei einer sehr hohen intravenösen Ascorbinsäureinfusion (das 1 000fache der Zufuhrempfehlung) weniger als 0,5 % der aufgenommenen Ascorbinsäure als Oxalat mit dem Urin ausgeschieden werden¹¹³. Allerdings führt die Gabe von 1 bis 2 g Ascorbinsäure am Tag zu einer erhöhten Oxalatausscheidung^{5,131}.

Möglicherweise spielen auch Zucker und Zuckeralkohole eine Rolle im Oxalatmetabolismus¹³. Glucose kann über Glucuronat in Xylulose umgewandelt werden, welches in Oxalat abgebaut werden kann⁴⁸. Die orale Gabe von 20 g Glucose hat keinen Effekt auf die Oxalatausscheidung⁹⁵, während die Oxalatausscheidung nach der Gabe von 75 g Glucose ansteigt, allerdings besteht keine Korrelation zwischen Serumglucosegehalt und der Oxalatausscheidung⁹⁷. Eine intravenöse Glucoseinfusion erhöht die Oxalatausscheidung nicht⁹⁶.

Fructose wird in der Leber phosphoryliert und in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd gespalten. Glycerinaldehyd wird möglicherweise zu Hydroxypyruvat oxidiert¹³. Eine hohe Fructoseaufnahme korreliert mit einem erhöhten Nierensteinrisiko¹²⁸ und eine intravenöse Infusion von 35 g Fructose führt verglichen mit einer Glucoseinfusion zu einer 60 % erhöhten Oxalatausscheidung⁹⁶.

Xylitol ist ein Zuckeralkohol, der als Zuckeraustauschstoff (E 967) verwendet wird. Xylitol wird über D-Xylose in Xylose-1-Phosphat umgewandelt, das in Dihydroxyacetonphosphat und Glycolaldehyd gespalten werden kann¹³. Eine orale Dosis von 20 mg Xylitol führt zu einem vorübergehenden Anstieg der Urinoxalatausscheidung um 53 %⁹⁵.

Ob Ascorbinsäure, Glucose, Fructose und Xylitol unter physiologischen Bedingungen die Oxalatausscheidung erhöhen bleibt unklar.

1.1.4 Oxalatmetabolismus

Die Oxalatsynthese findet hauptsächlich in den Hepatozyten der Leber statt ^{26,78} und beträgt 10 bis 20 mg am Tag ^{3,50}. Endogenes Glyoxylat wird dort hauptsächlich in den Mitochondrien und Peroxisomen gebildet (Abb. 1.3).

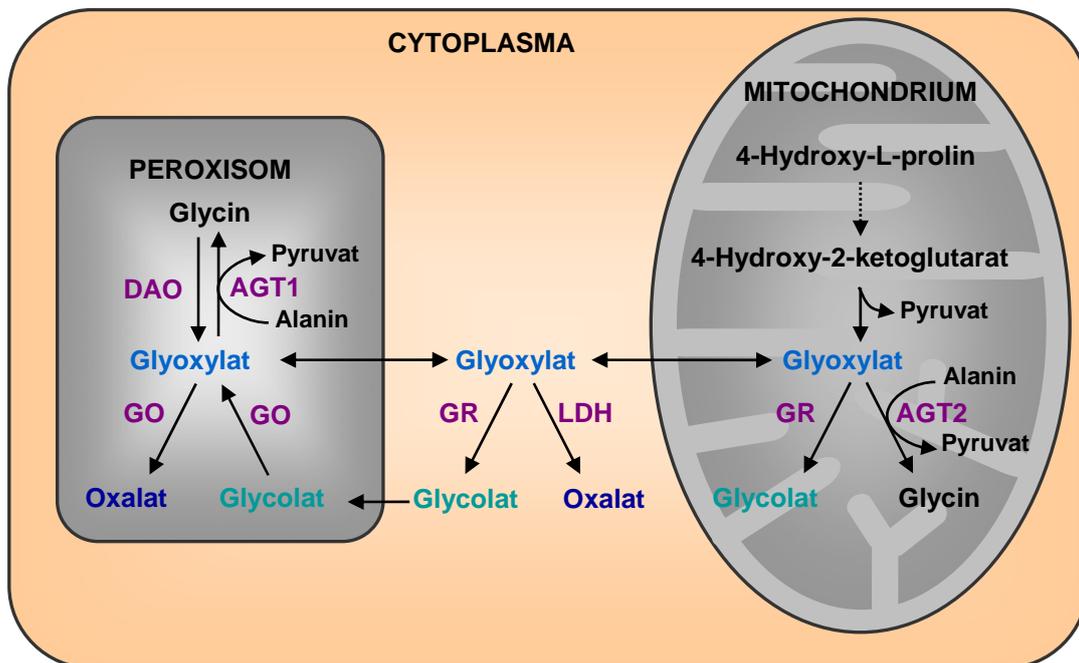


Abbildung 1.3 Oxalatmetabolismus in Hepatozyten

AGT: Alanin:Glyoxylat-Aminotransferase, DAO: D-Aminosäureoxidase, LDH: Laktatdehydrogenase, GO: Glycolatoxidase, GR: Glyoxylatreduktase (modifiziert nach BAKER *et al.* 2004 ³)

In den Peroxisomen wandelt die D-Aminosäureoxidase Glycin in Glyoxylat (Abb. 1.4) um, die Hauptvorstufe des Glyoxylats bildet allerdings Glycolat (Abb. 1.4) ¹⁰⁵. In die Peroxisomen transportiertes Glycolat wird durch die Glycolatoxidase (GO) in Glyoxylat umgewandelt. Glyoxylat kann auch aus dem Cytoplasma in die Peroxisomen gelangen. Glyoxylat wird normalerweise zusammen mit Alanin durch die Alanin:Glyoxylat-Aminotransferase 1 (AGT1) zu Glycin und Pyruvat abgebaut. Überschüssiges Glyoxylat wird in Peroxisomen durch die GO in Oxalat umgewandelt oder nach dem Transport ins Cytoplasma durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Oxalat konvertiert. Der Abbau des Glyoxylats durch die GO spielt normalerweise eine geringe Rolle ^{3,105}. Glyoxylat entsteht

außerdem in den Mitochondrien aus dem Abbau von 4-Hydroxyprolin. Mitochondriales Glyoxylat wird entweder durch die Glycolatreduktase (GR) zu Glycolat oder durch die AGT2 zu Glycin konvertiert ¹⁴.

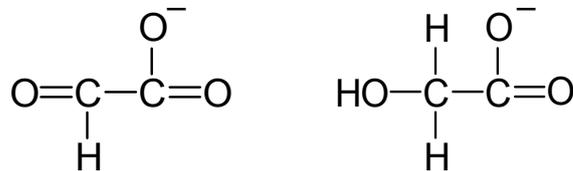


Abbildung 1.4 Struktur des Glyoxylat- (links) und Glycolatanions (rechts)

1.1.5 Regulation der Oxalatsynthese

Die Oxalatsynthese wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Pyridoxin (Vitamin B₆) ist das Coenzym der Alanin:Glyoxylat-Aminotransferase, die Glyoxylat in Glycin umwandelt. Durch Pyridoxingabe wurde die Oxalatausscheidung in hyperoxalurischen Ratten um 50 % gesenkt ¹². Die Pyridoxingabe hatte keinen Effekt auf die Oxalatausscheidung von Patienten mit Nierensteinleiden, obwohl bei diesen Patienten im Vergleich zu gesunden weniger Pyridoxalphosphat im Serum nachgewiesen wurde ⁶¹. Ob Glucagon die Oxalatausscheidung bei Menschen beeinflusst, konnte noch nicht geklärt werden, Tierversuche kommen diesbezüglich zu unterschiedlichen Ergebnissen ^{52,127}.

1.1.6 Störungen des Oxalatstoffwechsels - Primäre und sekundäre

Hyperoxalurie

Hyperoxalurie beschreibt die Ausscheidung von mehr als 40 mg Oxalat am Tag. Die primäre Hyperoxalurie ist eine relativ seltene autosomal rezessive Erbkrankheit die zu einer Störung des Oxalatstoffwechsels führt. Die primäre Hyperoxalurie vom Typ 1 (PH1) wird durch einen Mangel an Alanin:Glyoxylat Aminotransferase (AGT1), primäre Hyperoxalurie vom Typ 2 (PH2) durch einen Mangel an Glyoxylatreduktase (GR) verursacht. Beide Enzyme AGT1 und GR sind notwendig, um den Abbau von Glyoxylat zu Oxalat zu vermeiden. PH1 und PH2 führen zu einer erhöhten Oxalatausscheidung und Bildung von Calciumoxalatkristallen und -steinen. Obwohl Oxalat hauptsächlich in der Leber gebildet wird, zeigen sich die toxischen Wirkungen der Oxalose in anderen

Organen. PH1 führt nach mehreren Jahren möglicherweise zu einem Nierenversagen und unbehandelt zum Tod, während PH2 einen weniger schlimmen Verlauf hat^{14,55}. Die Behandlungsmöglichkeiten für Hyperoxalurie sind begrenzt: Besonders wichtig ist eine hohe Flüssigkeitsaufnahme von mehr als 3 l pro Tag. Um die Übersättigung des Urins mit Calciumoxalat zu verhindern, wird den Patienten Alkalicitrat verabreicht. Citrat bindet Calcium in einem löslichen Komplex und verhindert damit die Bildung von Calciumoxalatkristallen. Etwa 10-30 % der PH1 Patienten reagieren positiv auf eine Pyridoxinsupplementation. Eine Lebertransplantation ist bis heute die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit für PH1, da AGT1 hauptsächlich in der Leber vorkommt^{15,55}. Die folgenden Therapieansätze werden noch nicht eingesetzt. Eine Pilotstudie zur oralen Gabe von *Oxalobacter formigenes* zeigte eine Verminderung der Urinoxalatausscheidung bei PH1 Patienten⁵⁴. Ansätze zur Gentherapie würden eine Transduktion des normalen AGT Gens in einem Großteil der Hepatozyten erfordern, und damit wäre nur eine Therapie der PH1 möglich, da die GR in verschiedenen Geweben exprimiert wird. Ein weiterer Therapieansatz beschreibt die Verwendung chemischer Chaperone um Proteine mit Mutationen zu stabilisieren. Allerdings sind PH1 und PH2 genetisch heterogen und viele der Mutationen ergeben kein Proteinprodukt oder die Mutation hat einen direkten Effekt auf die katalytische Wirkung des Enzyms^{15,55}.

Bei der sekundären Hyperoxalurie tritt die erhöhte Oxalatausscheidung als Folge einer erhöhten Aufnahme an Oxalat oder Oxalatvorstufen auf. So wird beispielsweise aufgenommenes Ethylenglycol, das sich unter anderem in Frostschutzmitteln befindet, zu Glycolat und weiter zu Oxalat abgebaut⁴⁵. Verschiedene gastrointestinale Erkrankungen, z. B. zystische Fibrose oder Kurzdarmsyndrom führen zu einer erhöhten Oxalatabsorption⁵⁵. Durch den Verlust an Gallensäuren beim Kurzdarmsyndrom verzögert sich die Resorption von Fettsäuren, welche mit Calcium unlösliche Kalkseifen bilden. Da das Calcium nun nicht mehr zur Bildung von Calciumoxalat zur Verfügung steht, kann mehr freies Oxalat resorbiert werden⁶³. Eine lang andauernde Antibiotikabehandlung bei zystischer Fibrose kann zu einer verminderten Besiedlung des Darms mit *Oxalobacter formigenes* führen, wodurch die Oxalatabsorption erhöht wird¹²². Allerdings könnte die Hyperoxalurie bei zystischer Fibrose auch auf die fehlende Interaktion zwischen dem defekten Chloridkanal (CFTR) und einem Oxalattransporter in den Nieren zurückzuführen sein⁸⁵.

1.1.7 Oxalatausscheidung

Der Gesunde scheidet pro Tag unter Normalkost weniger als 40 mg Oxalat mit dem Harn aus ¹¹⁷. Oxalat wird im Glomerulus frei filtriert und im proximalen Tubulus zusätzlich absorbiert und sezerniert. Der bidirektionale Transport führt zu einer Nettosekretion von ca. 25 % der filtrierten Oxalatmenge ^{34,137}. In den Nieren werden drei Oxalattransporter der SLC26 Familie exprimiert (SLC26A1, SLC26A6 und SLC26A7, siehe 1.3.2 und 1.3.3) ⁸⁵.

Die Serumoxalatkonzentration beträgt normalerweise 1-5 μM , im Urin ist sie allerdings etwa 100fach höher. Calciumoxalat ist bei einem physiologischen Urin-pH kaum löslich, bei pH 7 können nur 5 mg Calciumoxalat in 1 l Wasser gelöst werden ¹¹⁷. Obwohl der Urin häufig mit Calciumoxalat übersättigt ist, wird ein Ausfallen durch die Präsenz verschiedener Stoffe verhindert. Zu diesen Präzipitationsinhibitoren gehören Harnstoff, Citrat, Sulfat, Pyrophosphat, Laktat, Magnesium, Kupfer, Eisen, Zink, Adenin, bestimmte Kolloide und niedermolekulare Polypeptide ¹³⁹.

1.1.8 Nierensteine

15 % der Männer und 6 % der Frauen in Industrieländern erkranken in ihrem Leben an Nephrolithiasis und die Häufigkeit von Nierensteinerkrankungen steigt ¹²⁶. Im Jahr 2000 lag die Inzidenz in Deutschland bei 1,5 % und die Prävalenz bei 4,7 % der Bevölkerung ⁴⁶. Bei der Hälfte der Patienten tritt die Erkrankung innerhalb der folgenden 10 Jahre erneut auf ¹³². Etwa 80 % der Nierensteine bestehen aus Calciumsalzen, meistens aus Calciumoxalat (Abb. 1.5) und seltener aus Calciumphosphat. Die übrigen 20 % der Steine bestehen aus Harnsäure, Struvit oder Cystin ¹⁰².



Abbildung 1.5 Calciumoxalatkrystalle (GAINES und WAIBEL 2007 ³¹)

Die mit dem Urin ausgeschiedene Menge an Oxalat ist ein bedeutender Risikofaktor für die Nierensteinentstehung. Da der Urin normalerweise bedeutend weniger Oxalat (0,1-0,5 mM) als Calcium (1-5 mM) enthält, hat eine geringe Veränderung der Oxalatkonzentration einen viel größeren Einfluss auf die Übersättigung des Urins mit Calciumoxalat als ein vergleichbarer Anstieg der Calciumkonzentration ¹¹². Bei 50 % der Steinbildner liegt allerdings auch eine Hypercalciurie vor ¹⁰².

Die Gründe für eine Hyperoxalurie können (1) eine angeborene Störung des Oxalatmetabolismus, die zu einer erhöhten Oxalatproduktion führt (siehe 1.1.6), (2) ein erhöhtes Substratangebot durch die Aufnahme oxalatreicher Lebensmittel oder Oxalatvorstufen oder (3) eine erhöhte intestinale Oxalatabsorption sein ^{49,117}. Das Überschreiten des Löslichkeitsprodukts steinbildender Substanzen erscheint nicht ausreichend, um die komplexen Vorgänge bei der Entstehung von Nierensteinen zu beschreiben. Die Ausgangspunkte der Nierensteinbildung sind wahrscheinlich Calciumphosphatablagerungen, die Harnkristalle an den Epithelzellen der Nierenpapillen verankern, diese werden als Randall-Plaques bezeichnet ^{117,138}.

Gehen Nierensteine nicht spontan ab, müssen sie entfernt werden. Bis Ende der 70er Jahre wurden Nierensteine operativ entfernt. Heute wird hauptsächlich eine Zertrümmerung der Steine durch die nichtinvasive, extrakorporale Stoßwellenlithotripsie (ESWL) durchgeführt. Sprechen Faktoren wie Größe, Lage oder Zusammensetzung des Steins gegen eine ESWL, so können Steine endoskopisch durch perkutane Nephrolitholapaxie oder ureterorenoskopisch entfernt werden ^{46,93}. Um ein erneutes Auftreten von Nierensteinen zu vermeiden,

werden eine hohe Aufnahme an Flüssigkeit und diätetische Maßnahmen empfohlen und auch Medikamente eingesetzt ⁴⁶.

Die Ursache für die Bildung von Nierensteinen ist noch nicht geklärt, es werden verschiedene Ursachen diskutiert: Wahrscheinlich handelt es sich um eine polygenetische Erkrankung, mehrere Gene sind also an der Entwicklung der Erkrankung beteiligt ³³. Steinbildner zeigen eine höhere Oxalat- und Calciumaufnahme im Darm ⁸⁰. Die erhöhte Oxalataufnahme könnte durch das verminderte Auftreten von *Oxalobacter formigenes* in der Darmflora von unter Nierensteinen leidenden Patienten verursacht werden ¹¹⁷. Steinbilder unterscheiden sich auch dadurch von Gesunden, dass sich bei vermehrter Proteinaufnahme eine erhöhte Urinoxalatausscheidung einstellt ⁹⁸. Möglicherweise hat außerdem der Östrogenspiegel einen Einfluss auf die Ausscheidung steinbildender Substanzen mit dem Urin und Frauen haben dadurch ein geringeres Risiko, Nierensteine zu bilden ⁴². Wahrscheinlich führt eine Kombination verschiedener Faktoren zur Nierensteinentstehung.

1.2 Sulfatmetabolismus

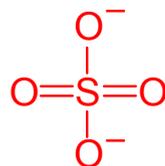


Abbildung 1.6 Strukturformel des Sulfatanions

Die Sulfatkonzentration im Plasma beträgt 300-400 μM ^{7,73}. Sulfat entsteht beim Abbau der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein. Methionin kann in verschiedenen Organen in Cystein umgewandelt werden. Beim Abbau von Cystein zu Kohlendioxid und Wasser wird Schwefelwasserstoff gebildet. Dieser kann nach enzymatischer Oxidation zu anorganischem Sulfat mit dem Urin ausgeschieden werden. Die ausgeschiedene Sulfatmenge beträgt in Abhängigkeit von der zugeführten Proteinmenge 30-60 mmol am Tag ²³. Die Regulation der Sulfathomöostase findet hauptsächlich in den Nieren statt, wo ein Großteil des filtrierten Sulfats im proximalen Tubulus rückresorbiert wird. Sulfat wird von einem apikalen Transporter in die proximale Tubuluszelle aufgenommen und über einen basolateralen Transporter ins Blut abgegeben ^{87,94}. Das nicht im Harn

ausgeschiedene Sulfat wird mittels ATP zu Phosphoadenosylphosphosulfat (PAPS) „aktiviert“. Die Sulfatgruppe des PAPS kann durch Phosphotransferasen auf verschiedene Akzeptoren übertragen werden. Es dient der Biosynthese von Heparin in der Leber, Glucosaminogluanen in Bindegewebe, Knorpel und Knochen und Sulfatiden im Gehirn. Zur Entgiftung und Verbesserung der Löslichkeit werden Steroide, Phenole und Alkohole in der Leber mit Sulfat konjugiert ²³.

1.3 Die *solute carrier* (SLC) Transporterfamilie

Transporter kontrollieren die Aufnahme und Abgabe verschiedener Stoffe wie beispielsweise Zucker, Aminosäuren, Peptide, Nucleotide, organische Kationen und Anionen oder Medikamente, um nur einige zu nennen. Aktive Transporter erzeugen über verschiedene energiegekoppelte Mechanismen einen Stoff- oder Ionengradienten über die Membran. Primär aktive, ATP-abhängige Transporter schließen die Mitglieder der „ATP-binding cassette“ (ABC) Transporterfamilie ein. Ionenpumpen hydrolysieren ATP, um Ionen wie Na⁺, K⁺, H⁺ oder Ca²⁺ aus der Zelle oder in Organellen zu transportieren und generieren dadurch elektrochemische Ionengradienten über die Membran. Diese Ionengradienten werden von sekundär aktiven Transportern verwendet, um Nährstoffe gegen ihren Gradienten über die Membran zu transportieren. Passive Transporter bzw. Uniporter und Kanäle ermöglichen die Membranpassage gelöster Stoffe (z. B. Glucose, Aminosäuren, Harnstoff) entlang ihres chemischen Gradienten. Während Transporter ihre Substrate mit einem bestimmten Zahlenverhältnis transportieren, wird der Substratfluß durch einen Kanal durch dessen Offenwahrscheinlichkeit bestimmt ⁴¹.

Die „solute carrier“ (SLC) Familie besteht aus Uniportern, Symportern und Antiportern (Abb. 1.7).

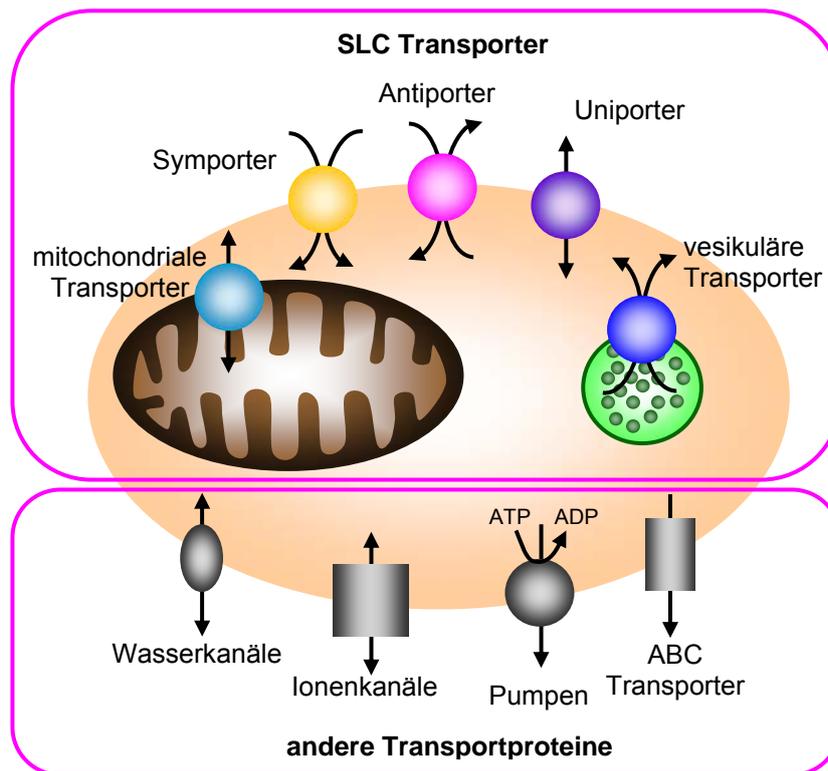


Abbildung 1.7 SLC Transporter

Zellmodell mit *solute carrier* (SLC) und nicht-SLC Transportern in der Membran der Zelle und von Zellkompartimenten. Transportproteine die nicht zur SLC-Familie gehören, können ebenfalls in Zellkompartimenten exprimiert werden (modifiziert nach HEDIGER *et al.* 2004⁴¹).

Die *solute carrier* (SLC) Superfamilie umfasst 55 Genfamilien mit insgesamt mindestens 362 mutmaßlich funktionellen proteincodierenden Genen⁴⁰.

In der folgenden Tabelle sind einige ausgewählte Mitglieder aufgelistet.

Tabelle 1.2 Ausgewählte Transporter der SLC Familie

(aus SCHMIDT *et al.* 2005¹¹⁹ und <http://www.bioparadigms.org/slc/menu.asp>)

Gen	Name	Substrate	Lokalisation	
SLC2A2	GLUT2	Glucose, Galactose, Fructose	proximaler Tubulus, Dünndarm, Pankreas	basolateral
SLC2A5	GLUT5	Fructose	Dünndarm, proximaler Tubulus	apikal
SLC4A4	NBC1	Na ⁺ , HCO ₃ ⁻	proximaler Tubulus, Pankreas, Leber, Darm	basolateral
SLC5A1	SGLT1	Na ⁺ , Glucose, Galactose	Dünndarm, proximaler Tubulus S3	apikal
SLC5A2	SGLT2	Na ⁺ , Glucose	proximaler Tubulus S1	apikal
SLC13A1	NaS _i -1	Na ⁺ , SO ²⁻	Dünndarm, proximaler Tubulus	apikal
SLC13A3	NaDC3	Na ⁺ , Dicarboxylate	proximaler Tubulus S1-S2, Leber	basolateral
SLC15A1	PepT1	H ⁺ , Di- und Tripeptide	Dünndarm, proximaler Tubulus S1	apikal
SLC15A2	PepT2	H ⁺ , Di- und Tripeptide	proximaler Tubulus S2-S3	apikal
SLC16A1	MCT-1	Laktat, Pyruvat, Ketonkörper	ubiquitär	
SLC16A7	MCT-2	Pyruvat, Laktat, Ketonkörper	Nieren, Gehirn	

1.3.1 Der natriumabhängige Sulfattransporter, NaS_i-1

Da der natriumabhängige Sulfattransporter, NaS_i-1, sowohl im Darm als auch in der Niere am Sulfattransport beteiligt ist, hat er eine essentielle Rolle in der Sulfathomöostase und seine Expression ist notwendig, um eine Reihe physiologischer Funktionen zu gewährleisten^{16,86}. Durch das Fehlen des NaS_i-1 in der *knock-out* Maus, ist auch die Expression des basolateralen Sulfattransporters, sat-1, in den Nieren stark vermindert¹⁷.

Die Transkription des NaS_i-1 wird möglicherweise über Vitamin D und das Schilddrüsenhormon reguliert¹⁸. Vitamin D-Mangel und experimentell induzierter Hypothyreoidismus senken die Expression des NaSi-1 in der Niere^{27,116}.

1.3.2 Die SLC26 Transporterfamilie

Die SLC26 Transporter sind Anionentransporter mit facettenreicher Substratspezifität. SLC26A1 und SLC26A2 sind Sulfattransporter, SLC26A3, SLC26A4 und SLC26A6 sind Chlorid-Bicarbonat-Austauscher. Bei SLC26A7 und SLC26A9 handelt es sich um Chloridkanäle ^{21,100}.

In der folgenden Tabelle sind die Mitglieder der SLC26 Familie aufgelistet.

Tabelle 1.3 Transporter der SLC26 Familie

Gen	Name	Substrate	Lokalisation	
SLC26A1	sat-1	SO ₄ ²⁻ , Oxalat ²⁻ ⁶	proximaler Tubulus ⁶² , Darm ¹⁹ Leber ¹⁰⁷	basolateral sinusoidal
SLC26A2	DTDST	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ ¹¹⁸ , Oxalat ²⁻ ²⁻⁴³	Darm ¹¹⁸ Knorpel ³⁷ , ubiquitär ³⁸	apikal
SLC26A3	DRA	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ ^{90,120} , OH ⁻ ⁹² , Oxalat ²⁻	Darm ^{85,124}	luminal
SLC26A4	Pendrin	Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , I ⁻ ¹²¹ , Formiat ⁻ ²⁴	Ohrspeicheldrüse ¹²¹ , Niere ¹³⁵ Innenohr ¹³⁶ , Schilddrüse ²⁴	luminal
SLC26A5	Prestin		Innenohr ¹⁴⁵	
SLC26A6	CFEX	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , OH ⁻ , Oxalat ²⁻ , Formiat ⁻ ^{67,140}	Magen, Dünndarm ⁸⁵ , Pankreas ⁸² , Niere ⁶⁷	apikal
SLC26A7		Cl ⁻ ⁶⁴	Niere ⁸³ , Magen ⁷¹ hochendotheliale Venolen, Nasenepithel, Nebenhoden ²¹	basolateral
SLC26A8	Tat1	SO ₄ ²⁻ , I ⁻ ^{83,130,133}	Hoden ^{83,130} Spermien ⁸³ , Gehirn ¹³³	luminal
SLC26A9		Cl ⁻ ²⁰	Lunge ⁸³ Magen ¹⁴¹	apikal
SLC26A10		Pseudogen ¹²⁵		
SLC26A11		SO ₄ ²⁻ ¹³³	hochendotheliale Venolen, Plazenta, Niere, Gehirn ¹³³	

Auf SLC26A1 wird im Kapitel 1.3.3 genauer eingegangen.

Der diastrophische Dysplasie Sulfat Transporter (DTDST, SLC26A2) ist der engste Verwandte des sat-1 und tauscht Sulfat und Chlorid gegeneinander aus. SLC26A2 ist ubiquitär verbreitet und hoch exprimiert im Knorpel und im Dünndarm ¹¹⁸. SLC26A2 liefert Sulfat, das für die Sulfatierung der Proteoglykane bei der Knorpelentwicklung benötigt wird. Mutationen des SLC26A2 führen zu diastrophischer Dysplasie, einer Erkrankung, die durch verkürzte Gliedmaßen,

Kleinwüchsigkeit oder Deformationen in Knochen und Gelenken gekennzeichnet ist³⁸.

Das Protein des SLC26A3 wurde nach seinem Expressionsmuster „**Down Regulated in Adenoma**“ (DRA) genannt und ist ein Chlorid-Bicarbonat-Austauscher des Colonepithels^{90,120}, der Chlorid auch gegen Hydroxylionen austauschen kann⁹². Mutationen des SLC26A3 führen zu erblich bedingter Chloriddiarrhoe⁴⁷.

Pendrin (SLC26A4) arbeitet als Chlorid-Bicarbonat, Chlorid-Iodid oder Iodid-Bicarbonat-Austauscher¹²¹. In den Nieren vermittelt Pendrin die chloridabhängige Bicarbonatsekretion¹³⁵. Durch eine Mutation des SLC26A4 kommt es zum Pendred-Syndrom, das durch eine Beeinträchtigung der Iodaufnahme in die Schilddrüse zur Kropfbildung führt²⁴. Außerdem wird das Pendred-Syndrom mit Schwerhörigkeit assoziiert, da SLC26A4 die Bicarbonatsekretion der Epithelzellen des Innenohrs vermittelt¹³⁶.

Prestin (SLC26A5) wird in den äußeren Haarzellen der Cochlea des Innenohrs gebildet. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der SLC26 Familie handelt es sich bei Prestin nicht um einen Transporter, sondern um einen „molekularen Motor“, der als Reaktion auf das Membranpotential die Form der äußeren Haarzellen verändert¹⁴⁵. Chlorid- und Bicarbonationen binden an Prestin und dienen damit als extrinsische Spannungssensoren¹⁰¹. Ein Spleißdefekt des SLC26A5 führt zu Taubheit⁸¹.

Der CFEX (SLC26A6) ist ein **Chlorid Formiat** Austauscher (**Exchanger**), der neben Formiat auch Oxalat, Hydroxylionen und Bicarbonat gegen Chlorid austauschen und auch Sulfat transportieren kann. Er wird in den Nieren und Pankreas exprimiert^{67,82,140}. Im Ileum transportiert CFEX Oxalat zurück ins Lumen²⁹. Durch ihre vermehrte Oxalataufnahme im Darm ist die CFEX *knock-out* Maus hyperoxalämisch und bildet Nierensteine^{59,65}.

Der SLC26A7 wird in verschiedenen Geweben exprimiert²¹ und ist ein pH-abhängiger Chloridkanal⁶⁴. Seine physiologische Bedeutung ist noch unbekannt, möglicherweise vermittelt er die Chloridaufnahme in die Parietalzellen des Magens⁷¹.

Der **Testis Anionen Transporter 1** (Tat-1, SLC26A8) ist in Hoden und Gehirn zu finden und transportiert Sulfat und Iodid^{83,130,133}. Während die männliche Tat-1 *knock-out* Maus steril ist¹²⁹, wurde in unfruchtbaren Männern keine Mutation des SLC26A8 gefunden⁸⁴.

Wie der SLC26A7 ist auch der SLC26A9 ein Chloridkanal ²⁰ und wurde in Epithelzellen von Bronchien und Alveolen und im Magen nachgewiesen ^{83,141}. Die Expression des SLC26A9 ist in mit *Helicobacter pylori* infizierten Mäusen hochreguliert ⁴⁴ und er hat möglicherweise eine entscheidende Bedeutung in der Magensäuresekretion ¹⁴².

Beim SLC26A10 handelt es sich um ein Pseudogen ¹²⁵.

SLC26A11 ist ubiquitär verbreitet, eine Northern Blot Analyse zeigte eine besonders starke Expression in Plazenta, Nieren und Gehirn. Es wird vermutet, dass der SLC26A11 am Sulfattransport in den hochendothelialen Venolen beteiligt ist ¹³³.

1.3.3 Sulfat Anionen Transporter 1 (sat-1)

Das humane sat-1 Protein (hsat-1) besteht aus 701 Aminosäuren ¹⁰⁹ das sat-1 Protein der Ratte (rsat-1) aus 703 (Abb. 1.8) ⁶ und das der Maus (msat-1) aus 704 Aminosäuren ⁷⁷. Die errechnete Molekülmasse beträgt ungefähr 75 kDa. Das Molekül besitzt wahrscheinlich 12 Transmembrandomänen, der C- und N-Terminus liegen vermutlich intrazellulär ^{6,77,109}.

Die Aminosäuresequenz des hsat-1 stimmt mit anderen SLC26 Proteinen überein: zu 78 % mit rsat-1 und 77 % mit msat-1, 44 % mit hDTDST, 29 % mit hDRA, 30 % mit dem humanen Pendrin, 33 % mit hCFEX und zu 25 % mit den humanen SLC26A7, SLC26A8 und SLC26A9 ¹⁰⁹.

In Leber und Nieren von Mäusen sind zwei sat-1 cDNA Varianten detektiert worden⁷⁷. In Ratten wurde nur ein Transkript einer sat-1 cDNA identifiziert⁶.

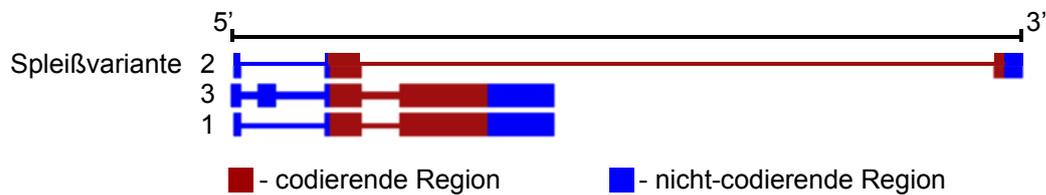


Abbildung 1.9 hsat-1 Spleißvarianten 1-3

(modifiziert nach dem National Center for Biotechnology Information)

1.3.3.1 Lokalisation des sat-1

Der sat-1 ist in der basolateralen Membran von Darm und Niere und in der sinusoidalen Membran der Leber lokalisiert:

Beim Menschen wird die hsat-1 mRNA in Leber, Niere und Nebenniere stark exprimiert, eine geringere Expression konnte im Gehirn, Dickdarm, Thymus, Milz, Dünndarm, Leukozyten, Pankreas, Testis und Prostata nachgewiesen werden^{99,109}. Die mRNA-Expression in Leberproben unterschiedlicher Personen zeigte kaum interindividuelle Schwankungen⁹⁹.

Sat-1 mRNA konnte bei Ratten in der Leber und den Nieren detektiert werden, Gehirn und Muskel zeigten ein deutlich schwächeres Signal, während Herz, Lunge, distales und proximales Colon, Ileum und Duodenum keine sat-1 mRNA-Expression zeigten^{6,76}. Der rsat-1 konnte immunhistochemisch in der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen und in der sinusoidalen Membran von Hepatozyten der Ratte nachgewiesen werden^{62,107}.

In der Maus wird sat-1 mRNA unter anderem in Herz, Gehirn, Leber, Skelettmuskel und Nieren exprimiert⁷⁷. Die mRNA-Expression des msat-1 ist in der Leber 40fach höher als in der Niere⁹. BRZICA *et al.* lokalisierten den msat-1 mittels Immunhistochemie in der sinusoidalen Membran der Leber und in der basolateralen Membran des proximalen Konvoluts⁹. Sat-1 mRNA konnte außerdem in der basolateralen Membran des distalen Darms der Maus detektiert werden. Die Western Blot Analyse bestätigte die Expression des msat-1 Proteins und der Oxalattransport in diesem Abschnitt ist bei der *knock-out* Maus vermindert¹⁹.

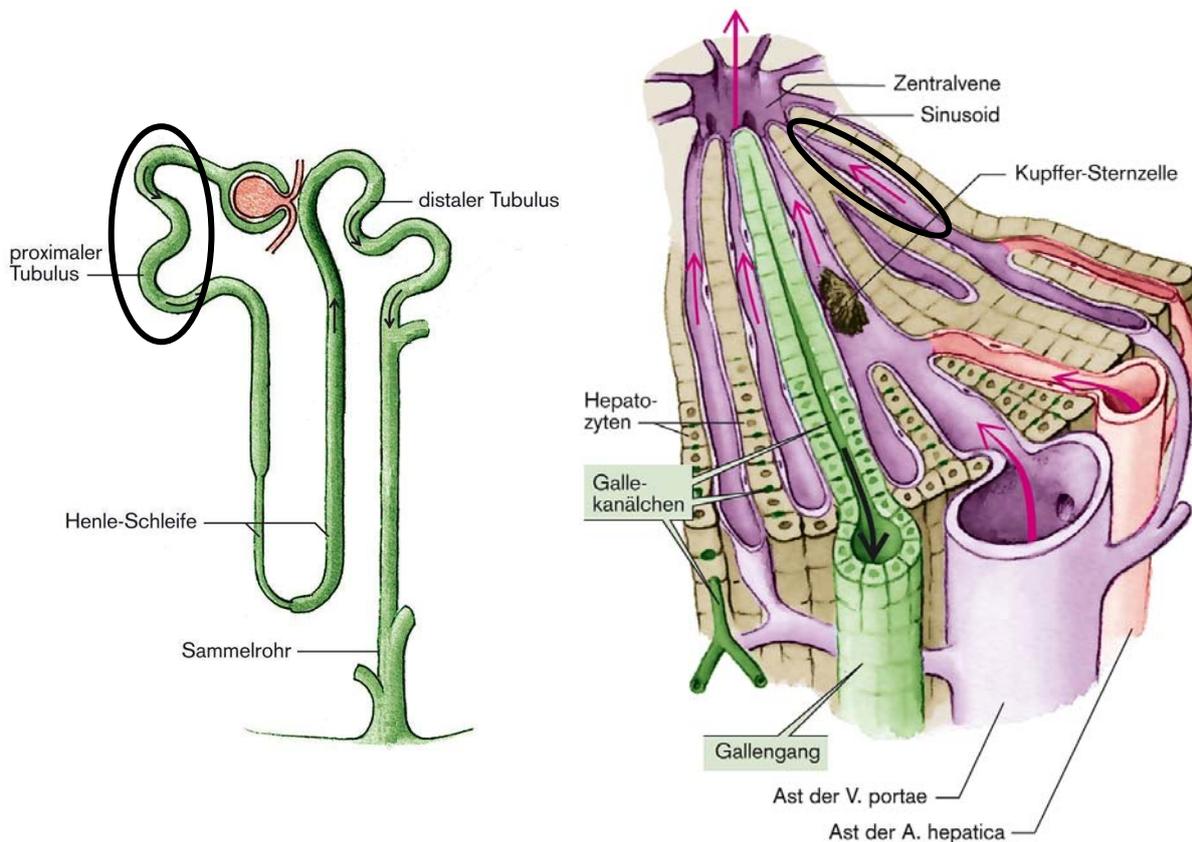


Abbildung 1.10 Lokalisation des sat-1 in Niere und Leber

Die Regionen, in denen sat-1 nachgewiesen wurde, sind schwarz eingekreist (modifiziert nach Klinke, Silbernagel 2005⁶⁶).

1.3.3.2 Sat-1 Transport

Die Substrate des sat-1 sind in Tabelle 1.4 zusammengefasst. Der hsat-1 transportiert Sulfat, Oxalat und Chlorid, allerdings kein Formiat. Die K_m für Sulfat beträgt 0,19 mM. Die Sulfataufnahme wurde durch Diisothiocyanostilbendisulfonat (DIDS), Phenolrot, Thiosulfat, Molybdat, Wolframat und Selenat signifikant gehemmt, während Citrat und Glucose keinen Effekt auf die Sulfataufnahme zeigten¹⁰⁹.

EINLEITUNG

Tabelle 1.4 Substrate und Effektoren des sat-1

Versuchsbedingung	Mensch	Ratte	Maus
<u>Aufnahme radioaktiv markierter Substrate</u>			
Sulfat (K_m)	0,19 mM ¹⁰⁹	0,14 mM ⁶	0,31 mM ⁷⁷
Oxalat (K_m)	+ ¹⁰⁹	+ ⁶² / 53 μ M ⁷²	+ ^{77,140}
Chlorid	+ ¹⁰⁹		+ ⁷⁷ / - ¹⁴⁰
Formiat	- ¹⁰⁹		- ^{77,140}
L-Leucin			- ⁷⁷
Succinat			- ⁷⁷
Estronsulfat		- ¹⁰⁷	
Dehydroepiandrosteronsulfat		- ¹⁰⁷	
<u>Hemmung der Aufnahme von Sulfat</u>			
Oxalat		+ ^{6,118}	+ ⁷⁷
Molybdat	+ ¹⁰⁹		+ ⁷⁷
Selenat	+ ¹⁰⁹		+ ⁷⁷
Wolframat	+ ¹⁰⁹		+ ⁷⁷
Diisothiocyano-stilbendisulfonat (DIDS)	+ ¹⁰⁹	+ ^{6,118}	+ ⁷⁷
Thiosulfat	+ ¹⁰⁹	+ ^{72,118}	+ ⁷⁷
Phenolrot	+ ¹⁰⁹		+ ⁷⁷
Probenecid			+ ⁷⁷
Glucose	- ¹⁰⁹		- ⁷⁷
Citrat	- ¹⁰⁹		- ⁷⁷
Cholat		- ⁶	
Succinat		- ^{6,118}	
Blei		- ⁸⁹	
Chrom		+ ⁸⁹	
Cadmium		+ ⁸⁹	
Quecksilber		+ ⁸⁹	
Azetazolamid		+ ¹⁰⁷	
Furosemid		- ¹⁰⁷	
Bumetanid		- ¹⁰⁷	
Hydrochlorothiazid		- ¹⁰⁷	
Sulfit		+ ⁷²	
Sulfid		- ⁷²	
Sulfamat		- ⁷²	
<u>Abhängigkeit der Sulfataufnahme</u>			
Chlorid		+ ¹¹⁸	+ ^{77,140}
Bicarbonat			+ ⁷⁷
pH			+ ¹⁴⁰

rsat-1-exprimierende Sf9 Zellen transportieren Sulfat und Oxalat⁶². Weder Estronsulfat noch Dehydroepiandrosteronsulfat sind Substrate des sat-1¹⁰⁷. Die K_m des rsat-1 für Sulfat beträgt 0,14 mM und die Sulfataufnahme ist durch Oxalat, Thiosulfat, DIDS, Quecksilber (irreversible Hemmung), Chrom, Cadmium, Sulfit und Azetazolamid aber nicht durch Cholat, Blei, Succinat, Furosemid, Bumetanid, Sulfid, Sulfamat und Hydrochlorothiazid hemmbar. rsat-1 benötigt für den Sulfattransport extrazelluläres Chlorid^{6,72,89,118}.

Der msat-1 transportiert Sulfat und Oxalat, aber nicht Formiat, L-Leucin und Succinat. Die Sulfataufnahme wurde durch Oxalat, Molybdat, Selenat, Wolframat, DIDS, Thiosulfat, Phenolrot und Probenecid gehemmt, nicht durch Glucose und Citrat. Die K_m für Sulfat beträgt 0,31 mM^{77,140}. Versuche zum Chloridtransport des msat-1 und zur Chloridabhängigkeit des Sulfattransports kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während LEE *et al.* zeigten, dass der msat-1 Chlorid transportiert und in Abwesenheit von Chlorid und Bicarbonat kein Sulfat transportiert wird⁷⁷, konnten XIE *et al.* keine Chloridaufnahme über den msat-1 messen. Des Weiteren zeigten sie eine Stimulation der Sulfataufnahme in Anwesenheit von Chlorid, aber auch durch Iodid, Bromid, Formiat und Laktat und eine pH-Abhängigkeit der Sulfataufnahme. Auch die Oxalataufnahme war in Gegenwart von Chlorid, Iodid oder Formiat erhöht¹⁴⁰.

1.3.3.3 Regulation des sat-1

Bei der Analyse des hsat-1 und msat-1 Promoters konnte eine GC Box aber keine TATA oder CAAT Box identifiziert werden^{77,109}. Außerdem wurden in den Sequenzen von hsat-1 und msat-1 mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und mögliche „responsive“ Elemente für das Schilddrüsenhormon und Vitamin D gefunden. Während im Luciferase Assay eine Stimulation der Transkription des msat-1 durch das Schilddrüsenhormon gezeigt werden konnte, hatte es keinen Effekt auf die Transkription des hsat-1. Vitamin D hatte weder einen Effekt auf msat-1 noch auf hsat-1^{77,109}. Experimentell induzierter Hypothyreoidismus zeigte bei Ratten keinen Einfluss auf den basolateralen Sulfattransport in den Nieren¹¹⁶.

Die Sulfattransporterfamiliendomäne (PF00916) und das Sulfattransportersignaturmotiv (PS00130) wurde in den ersten vier Mitgliedern der SLC26 Familie (sat-1, DTDST, DRA und Pendrin) nachgewiesen. Da Pendrin kein

Sulfat transportiert, sind diese Domänen offensichtlich nicht für den Sulfattransport erforderlich. Die in *hsat-1* und *msat-1* nachgewiesene STAS Domäne lässt vermuten, dass der Anionentransport durch intrazelluläre Konzentrationen von ATP und / oder GTP reguliert wird ^{6,77,109}.

Die C-terminale Sequenz des *hsat-1* (AHL) entspricht einer C-terminalen Zielsequenz in peroxisomalen Proteinen, die Bedeutung dieser Sequenz im *hsat-1* ist allerdings unklar ¹⁰⁹. Die Sequenzanalyse des *msat-1* und *rsat-1* ergab eine C-terminale PDZ-bindende Domäne (SAL). PDZ Domänen spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung von Polarität und Funktion der Zellen, bei der Verteilung asymmetrischer Rezeptoren, Transporter, Ionenkanäle und Lipide auf die apikale und basolaterale Membran ^{2,10,25}. Das Entfernen der drei C-terminalen Aminosäuren hatte allerdings keinen Einfluss auf die Lokalisation und Transporteigenschaften des *rsat-1*. Für den Transport des *sat-1* zur basolateralen Membran ist ein Dileucin Motiv, das sich C-terminal an der Position 26/27 befindet, notwendig ¹¹⁰. Die Bedeutung von Dileucin Motiven als Zielsequenzen, die für den Transport zur basolateralen Membran sorgen, konnte bereits für andere Transportproteine gezeigt werden ^{35,36,91}.

Die Sequenzen von *rsat-1* und *msat-1* weisen drei mögliche Glycosylierungsstellen auf ^{6,77}, während die Sequenz des *hsat-1* nur zwei mögliche Glycosylierungsstellen besitzt ¹⁰⁹. Die Glycosylierung von Proteinen dient verschiedenen Funktionen: Sie schützt vor proteolytischem Abbau, verändert die Affinität für Bindungspartner (z. B. beim Insulinrezeptor), beeinflusst die Aktivität von Enzymen und Hormonen und den intrazellulären Transport (Proteintargeting) zwischen Organellen und Membran ¹¹¹.

Des Weiteren enthält die Sequenz des *hsat-1* sieben mögliche Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen, eine mögliche Tyrosinphosphorylierungsstelle und sieben mögliche Caseinkinase II Phosphorylierungsstellen ¹⁰⁹.

Die *sat-1* Expression wird möglicherweise durch Geschlechtshormone reguliert. Das *rsat-1* Protein ist bei männlichen Ratten in Leber und Nieren stärker exprimiert als bei weiblichen Tieren, in der mRNA-Expression in der Leber unterscheiden sich männliche und weibliche Tiere nicht ⁹, während die mRNA-Expression in der Niere zu unterschiedlichen Ergebnissen kommt ^{9,115}. Die *sat-1* Proteinexpression in der Leber wurde durch die weiblichen Geschlechtshormone Progesteron und Östrogen herunterreguliert, während diese Hormone keinen

Effekt auf die Expression in der Niere zeigten⁹. Estronsulfat selbst ist kein Substrat des rsat-1¹⁰⁷.

1.3.3.4 Die sat-1 *knock-out* Maus

2010 wurde von DAWSON *et al.* eine sat-1 *knock-out* Maus generiert¹⁹. Die sat-1 *knock-out* Mäuse unterscheiden sich optisch und im Gewicht nicht von Wildtypmäusen. Die histologische Untersuchung von Leber und Gehirn ergab keine Strukturunterschiede zwischen *knock-out*- und Wildtyptieren. Der Sulfat- und Oxalattransport in Leber und Nieren, sowie der Oxalattransport im distalen Ileum, Caecum und proximalen Colon ist in den *knock-out* Mäusen stark vermindert. Die sat-1^{-/-}-Mäuse zeigten eine Leukozyteninfiltration der kortikalen Nierengefäße, Calciumoxalatkristalle wurden im kortikalen Sammelrohr und in der Blase nachgewiesen.

Sat-1^{-/-} Mäuse weisen stark erhöhte Plasmaoxalatspiegel auf, während die Serumsulfatkonzentration vermindert ist. Sowohl die Oxalat- als auch die Sulfatausscheidung mit dem Urin ist signifikant erhöht. Außerdem konnte eine verminderte Oxalat- und erhöhte Sulfatausscheidung mit den Faeces registriert werden. Da in der Leber von sat-1^{-/-} Mäusen durch das Fehlen des sat-1 kein Sulfat transportiert wird, somit also das Sulfat zur entgiftenden Sulfatierung fehlt, ist die durch Xenobiotika induzierte Lebertoxizität erhöht¹⁹.

1.4 Zellen

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden *Xenopus laevis* Oozyten und HepG2-Zellen verwendet.

1.4.1 *Xenopus laevis* Oozyten

Die Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* werden für die Expression heterologer Proteine verwendet¹³⁴. Heterologe cRNA kann relativ einfach in die Oozyten injiziert und die Proteinexpression und Funktion mit verschiedenen Methoden untersucht werden. Da *Xenopus laevis* Oozyten aus ihrer natürlichen Umgebung keine Nährstoffe aufnehmen, bilden sie nur wenige endogene Transportsysteme an ihrer Oberfläche aus¹³⁴.

Die Oogenese der *Xenopus laevis* Oozyten verläuft asynchron, im Ovar treten alle Entwicklungsstadien zur gleichen Zeit auf ^{22,134}. Die Oogenese kann in sechs Stadien (I-VI) unterteilt werden (Abb. 1.11): Die Oozyten im ersten Stadium sind farblos, haben ein transparentes Cytoplasma und einen Durchmesser von 50-100 µm. Im zweiten Stadium sind die Oozyten weiß, lichtundurchlässig und haben einen Durchmesser von bis zu 450 µm. Ab dem dritten Stadium beginnt die Pigmentsynthese und die Ablagerung von Dotterproteinen. Die Oozyten des dritten Stadiums sind an der gesamten Oberfläche schwach pigmentiert. Im vierten Stadium wachsen die Oozyten sehr schnell, die animalische, pigmentierte Hemisphäre und die vegetative Hemisphäre grenzen sich voneinander ab. Die Oozyten haben jetzt einen Durchmesser von 600-1000 µm. Oozyten im fünften Stadium (1000-1200 µm) haben ihre Maximalgröße fast erreicht und hören allmählich auf, Dottermaterial zu akkumulieren. Im sechsten Stadium sind die Oozyten mit einem Durchmesser von 1200-1300 µm ausgewachsen ²².

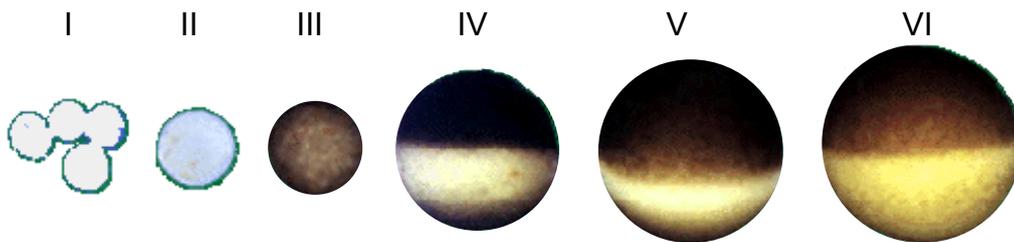


Abbildung 1.11 Die sechs Stadien der Oogenese von *Xenopus laevis* Oozyten

(nach DUMONT ²², <http://www.luc.edu/faculty/wwasser/dev/xenoogen.htm>)

Die Kulturbedingungen für die Oozyten und die verwendeten Oozyten Ringer werden in 2.8 und 3.2.2 beschrieben.

1.4.2 HepG2-Zellen

Die humane Zelllinie HepG2 stammt aus der Leberbiopsie eines 15-Jährigen, der an einem primären Hepatoblastom erkrankt war ¹. In dieser Zelllinie sind viele für gesunde humane Hepatozyten typische Funktionen erhalten. In Kultur sezernieren HepG2-Zellen verschiedene Plasmaproteine, wie z. B. Albumin, Fibrinogen und α -Fetoprotein ins Medium ⁷⁰. Des Weiteren besitzen HepG2-Zellen die Fähigkeit verschiedene Apolipoproteine, Kollagene und Gallensäuren zu synthetisieren ^{8,58}.

Unter dem Lichtmikroskop erscheinen HepG2-Zellen flach und polygonal mit einem Durchmesser von 12-19 μm . Im Zellrasen zeigen HepG2-Zellen epitheloides Wachstum. Sie wachsen grostenteils als Monolayer, bei längeren Kultivierungszeiten kommt es zu einem dreidimensionalen Wachstum (siehe Abb. 1.12). In den Zellhaufen sind die interzellulären Verbindungen sehr intensiv, was die Dissoziation mit Trypsin erschwert. Die Morphologie von HepG2-Zellen ist der von humanen Hepatozyten in Kultur ähnlich ⁴.

Die verwendeten Medien und die Bedingungen für die Zellkultur der HepG2-Zellen werden in 2.8 und 3.3 beschrieben.

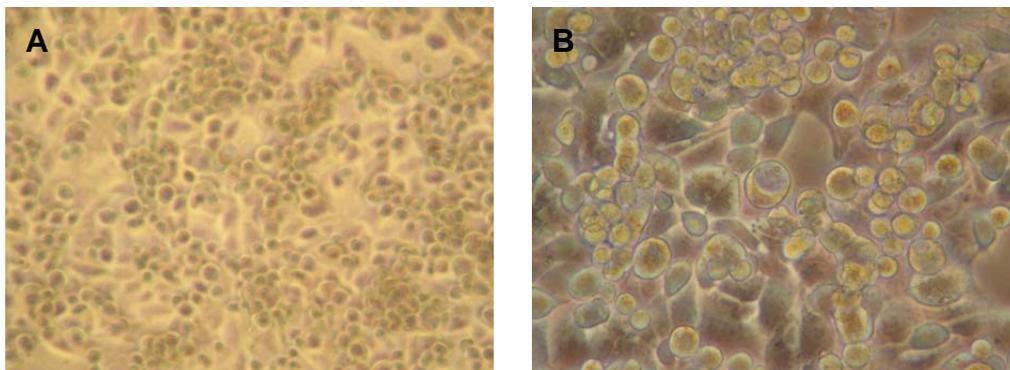


Abbildung 1.12 HepG2-Zellen

Lichtmikroskopische Aufnahmen einer HepG2-Kultur in HepG2-Medium, (A) 50fache Vergrößerung und (B) 100fache Vergrößerung

1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Da das Auftreten von Nierensteinerkrankungen zunimmt ¹²⁶, ist der Transport und Metabolismus des Oxalats, dem häufigsten Bestandteil von Nierensteinen ¹⁰², von besonderem Interesse. Während die Mechanismen des Oxalattransports in den Nieren weitgehend bekannt sind, sind diese in Darm und Leber nur unzureichend geklärt. Bis jetzt sind zwei Anionenaustauscher identifiziert worden, die für den Transport von Oxalat und Sulfat verantwortlich sein könnten: der Sulfat Anionen Transporter 1 (sat-1, slc26a1) und der Chlorid Formiat Austausch (CFEX, slc26a6). Im Rahmen dieser Arbeit soll der sat-1 der Ratte im Oozytenexpressionssystem funktionell charakterisiert und der Einfluss von Oxalatvorstufen auf die Expression des hsat-1 in HepG2-Zellen, einem etablierten System für die Analyse der Synthesewege des Oxalats ³, untersucht werden.

2. MATERIAL

2.1 Oligonucleotidprimer

Sequenzspezifische Primer für die reverse Transkription mit anschließender Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen und sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1 RT-PCR Primer

Protein (Gen)	Primer	Sequenz 5'-3'	Produktlänge	Anneal. Temp.	Zyklen	Gel
GAPDH	334for	TCA CCA TCT TCC AGG AGC G	572 bp	58°C	22	1,5 %
	905rev	CTG CTT CAC CAC CTT CTT GA				
CFEX (SLC26A6)	1681for	TGT GGC AGA GTA CTC AGA GGC CA	927 bp	68°C	25	1 %
	2608rev	ATG CAC CAG TTC CCT CCC TGT ACC				
MCT-1 (SLC16A1)	1183for	GTA TTT CTT TGC GGC TTC CG TTG	512 bp	58°C	30	1,5 %
	1694rev	AGA CTG GAC TTT CCT CCT CCT TG				
MCT-2 (SLC16A7)	334for	GGT TGG ATT GTG GTT GGA GC	564 bp	56°C	40	1,5 %
	897rev	CTT AGA AGT GGT TTG ATT GG GTC C				
NaS _i -1 (SLC13A1)	165for	TTT GGC TCA CAG AAG CAT TG	228 bp	55°C	40	2 %
	393rev	AGC CAT GCA GGA TTT ACA CC				
sat-1 (SLC26A1)	700for	GCC AAC CTC ATC TAC TTC CTC	254 bp	56°C	35	2 %
	953rev	TGG TAA AGC CCG GTC ATC AG				

Genspezifische Primer, ihre Position und Sequenz in 5'-3' Richtung, die Länge des PCR-Produkts, „Annealing“ Temperatur, Anzahl der Zyklen und die Agarosekonzentration, welche zur Trennung des PCR-Produkts verwendet wurde, die CFEX Primersequenzen wurden der Arbeit von LOHI *et al.*⁸² entnommen, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, CFEX: Chlorid Formiat Austauscher, MCT: Monocarboxylattransporter, NaS_i-1: natriumabhängiger Sulfattransporter 1, sat-1: Sulfat Anionen Transporter 1.

2.2 Real-time PCR Assays

Assays für die „real-time“ PCR wurden bei Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) erworben und sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.2 Real-time PCR Assays

Protein (Gen)	Assay	Spleißvariante
hGAPDH	Hs99999905_m1	NM_002046.3
hCFEX (SLC26A6)	Hs00370470_m1	NM_022911.2 NM_134263.2 NM_134426.2 NM_001040454.1
hsat-1 (SLC26A1)	Hs00758179_m1	(1) NM_022042.2 (3) NM_213613.2
	Hs00758185_m1	(2) NM_134425.1

2.3 Zellen

HepG2	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. D. Katschinski, Zentrum Physiologie und Pathophysiologie, Abteilung Herz- und Kreislaufphysiologie, Universitätsmedizin Göttingen
<i>E. coli</i> XL1 blue (Hitzeschock kompetent)	zur Verfügung gestellt von PD Dr. N. A. Wolff, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Private Universität Witten/Herdecke
<i>Xenopus laevis</i> Oozyten	Nasco, Fort Atkinson, WI, USA

2.4 Antikörper

Antikörper	Konzentration	Anbieter / Katalognummer
β-Aktin monoclonales Maus-IgG	0,1 mg / ml	Dianova / DLN-07274
Ziege anti-Maus IgG	1 mg / ml	Calbiochem / 401215
SLC26A1 polyklonales Kaninchen-IgG	1 mg /ml	Aviva Systems Biology / ARP 44028_P050 QC 14168
Ziege anti-Kaninchen IgG	0,4 mg / ml	Santa Cruz Biotechnology / sc-2004

2.5 Plasmidvektor

rsat-1 cDNA in pSport 1
(GIBCO / 15382-013)

zur Verfügung gestellt von
Dr. Daniel Markovich, School of
Biomedical Sciences, University of
Queensland, Brisbane, Australien

2.6 Kits

Name

Anbieter / Katalognummer

NucleoSpin® Plasmid

Macherey Nagel / 40588.50

Moloney Maus Leukämievirus (M-MuLV)
Reverse Transkriptase, RNase H minus

AppliChem / A5211,50000

T7 mMESSAGE mMACHINE

Ambion / 1344

2.7 Enzyme

Name

Anbieter / Katalognummer

NotI Restriktionsenzym

New England Biolabs / R0189

Taq-Polymerase

in eigener Arbeitsgruppe isoliert

2.8 Medien, Lösungen und Puffer

Alle Zellkulturmedien wurden autoklaviert.

Medium, Lösung, Puffer

Zusammensetzung

Agarosegel-Elektrophorese Ladepuffer (5x)

6,3 g Glycerol
2 ml 0,5 M Ethylendiamintetraacetat
(EDTA) pH 8.0
50 µl Trishydroxymethylamino-
methan (Tris) HCl pH 7,6
0,001 % (w/v) Bromphenolblau
0,001 % (w/v) Xylencyanol FF
mit nucleasefreiem aqua dest. auf
10 ml aufgefüllt

Ampicillin (Stammlösung)

USB / US11259
100 mg / ml in aqua dest.

MATERIAL

Bradford Lösung (4x)	0,4 g Coomassie Brilliant Blau G-250 200 ml Ethanol 400 ml Phosphorsäure mit aqua dest. auf 1 l aufgefüllt
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) <i>High Glucose</i> (HG)	Applichem / A13169050 13,44 g DMEM-HG 3,7 g NaHCO ₃ mit aqua dest. auf 1 l aufgefüllt
<i>Enhanced Chemiluminescence</i> (ECL)- Lösung	100 mM Tris/HCl pH 8,5 2,65 mM H ₂ O ₂ 1,25 mM Luminol in Dimethylsulfoxid (DMSO) 0,225 mM Coumarsäure in DMSO
Ethidiumbromid (Stammlösung)	Sigma / E1510 10 mg / ml in nucleasefreiem aqua dest.
Luria Broth (LB) Medium	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt mit aqua dest. auf 1 l aufgefüllt pH mit 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt
LB-Agar	LB-Medium 1,5 % (w/v) Agarose 1 µl / ml Ampicillin-stammlösung
Mammalian Ringer (SO ₄ ²⁻ -frei)	130 mM NaCl 4 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 20 mM HEPES 1 mM TMAPO ₄ 18 mM Glucose pH mit NaOH auf 7,4 eingestellt
Marker (Agarosegel-Elektrophorese)	Fermentas / SM0321 100 µl Marker 100 µl 6x Ladepuffer (Fermentas / R0611) 400 µl nucleasefreies aqua dest. Invitrogen / 15628-050 10 µl Marker 40 µl 5x Agarosegel-Elektrophorese Ladepuffer 150 µl nucleasefreies aqua dest.

MATERIAL

HepG2-Medium	DMEM-HG 2 mM Glutamin 1,25 mM Pyruvat 100 U / ml Penicillin 100 µg /ml Streptomycin 10 % fetales Kälberserum (FCS)
Membranpuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 100 µl / 10ml Phenylmethylsulfonyl- fluorid 4 µl / 10 ml Aprotinin 4 µl / 10 ml Leupeptin
Oozyten Ringer (ORi)	110 mM NaCl 3 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 5 mM Hepes pH mit Tris auf 7,5 eingestellt
ORi (Ca ²⁺ -frei), Aufnahmemedium für radio- chemische Untersuchungen an Oozyten	110 mM NaCl 3 mM KCl 5 mM Hepes pH mit Tris auf 7,5 eingestellt
ORi (Ca ²⁺ -und Cl ⁻ -frei)	110 mM Natriumgluconat 3 mM Kaliumgluconat 5 mM Hepes pH mit Tris auf 7,5 eingestellt
ORi zur Aufbewahrung der Oozyten während der Proteinexpression	ORi 2,5 mM Pyruvat 50 µM Gentamycin pH mit Tris auf 7,5 eingestellt
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Applichem / A0964,9100 9,55 g in 1 l aqua dest.
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris-Base 144 g Glycin 10 g SDS mit aqua dest. auf 1 l aufgefüllt
SDS-PAGE Sammelgel Puffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % SDS in aqua dest.
SDS-PAGE Trenngel Puffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS in aqua dest.

MATERIAL

SDS-PAGE Ladepuffer	5 mM Tris-HCl, pH 6,8 10 % Glycerol (v/v) 1 % SDS 1 % β -Mercaptoethanol
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml 0,25 M KCl 5 ml 2 M $MgCl_2$ 20 ml 1 M Glucose mit aqua dest. auf 1 l aufgefüllt pH mit NaOH auf 7,5 eingestellt
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (5x)	54 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,5 mit aqua dest. auf 1 l aufgefüllt
Western Blot Puffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

2.9 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen und hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“. Radioaktiv markiertes Oxalat (100 mCi / mmol) stammt von Biotrend (Köln, Deutschland), radioaktiv markiertes Sulfat (1200 Ci / mmol) von Hartmann (Braunschweig, Deutschland).

2.10 Software

Im Folgenden sind die Software und die Online Server aufgelistet, die zum Zeichnen der Strukturformeln, zur Analyse der Rohdaten, zum Sequenzvergleich und „Designen“ der Primer verwendet wurden.

MATERIAL

Programm	Verwendung	Bezug
ChemWindow	Strukturformeln	Cherwell Scientific Publishing
Microsoft Exel	Auswertung der Aufnahme-experimente	Microsoft Corporation
SigmaPlot	Bestimmung der Transportparameter	Systat Software

Onlineserver zur Sequenzanalyse

Programm	Verwendung	Referenz
Entrez Browser	Abfrage der Sequenz	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/
MAP	Sequenzalignment	http://genome.cs.mtu.edu/map.htm
Blast	Sequenzalignment	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

2.11 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Blotabbildung	LAS 3000 Imager	Fujifilm (Düsseldorf, Deutschland)
Brutschrank	Function Line BB16	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Elektrophorese	EPS 3500 XL	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Feinwaage	2002 MP1	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Geldokumentation	Gel Print 2000 I	Biophotonics (Ann Arbor, MI, USA)
Gelkammer	Midi	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Homogenisator	Labsonic 3000	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Inkubationsschüttler	3031	GFL (Burgwedel, Deutschland)

MATERIAL

Inkubator für Oozyten	Kühlschrank	Liebherr (Biberach an der Riss, Deutschland), Umbau durch die institutseigene Werkstatt
Kapillarziehgerät	PE-II	Narishige (Tokio, Japan)
Mikroinjektor	Nanoliter 2000	World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA)
Magnetrührer	KM02 electronic	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Mikroskop	500052	World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA)
	Telaval 31	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikrowelle	Privileg 8521	Quelle Schikedanz (Fürth, Deutschland)
Minizentrifuge	C-1200	Woodbridge (NJ, USA)
PCR Zyklus	GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
	RoboCycler Gradient 96	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
pH-Meter	CG820	Schott (Mainz, Deutschland)
	611	Orion Research (Beverly MA, USA)
Photometer	Novaspec II	Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)
<i>Real-time</i> PCR Thermozyklus	Mx3005p	Stratagene (Waldbronn, Deutschland)
RNA / DNA Calculator (Photometer)	GeneQuant II	Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)
Szintillationszähler	1500 Tri-Carb	Packard Instrument (Meriden, CT, USA)
Schüttler	KS 250 basic	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)

MATERIAL

Spektralphotometer	GeneQuant II	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Sterile Werkbank	Microflow	nunc (Langenselbold, Deutschland)
Ultrazentrifuge Rotor	OTD65B TFT6513	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
UV Transilluminator	TM40	UVP (Upland, CA, USA)
Vortex	MS1	IKA (Staufen, Deutschland)
Waage	LC6215	Satorius (Göttingen, Deutschland)
Wasserbad	D8	Haake (Karlsruhe, Deutschland)
	1083	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Wärmehaube	B15	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Western Blot Kammer		Bio-Rad (München, Deutschland)
Western Blot Netzgerät	ST606T	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Zählkammer (Neubauer)	hell-linig	Saaringia (Saarlouis, Deutschland)
Zentrifugen	Biofuge fresco, Labofuge 400R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
	5417R, 5415 D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

3. METHODEN

3.1 Gewinnung von cRNA für die Expression in Oozyten

Der methodische Ablauf vom Plasmid zur cRNA-Synthese ist in Abbildung 3.1 zusammenfassend dargestellt. Die für *rsat-1* codierende DNA wurde in einem Plasmid in *E. coli* Zellen transformiert. Nach Selektion der transformierten Zellen wurden diese vermehrt und das *rsat-1* DNA-enhaltene Plasmid isoliert. Die DNA wurde linearisiert, in cRNA umgeschrieben und in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert.

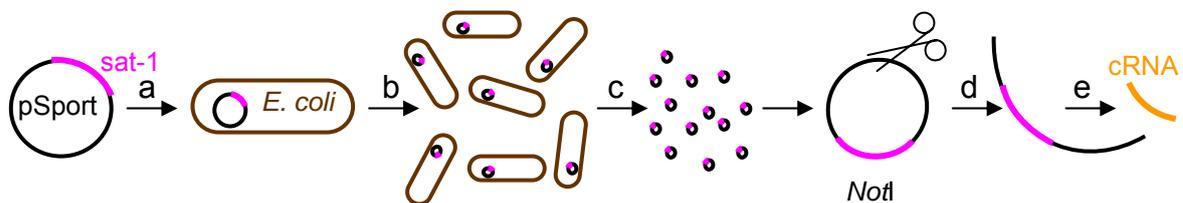


Abbildung 3.1 cRNA-Gewinnung für die Expression in Oozyten

a) Transformation von *rsat-1* in *E. coli*, b) Vermehrung der Zellen, c) Isolierung des Plasmids, d) Schneiden mit *NotI* Restriktionsenzym, e) Transkription

3.1.1 Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen

Unter Transformation versteht man die nicht-virale Aufnahme freier DNA in kompetente Bakterienzellen, Algen, Hefen, Pilze oder Pflanzen. 20 ng des pSport Vektors, der die für *rsat-1* und Ampicillinresistenz codierende DNA enthielt, wurden zusammen mit 50 µl hitzekompetenten *E. coli* Zellen (XL1 blue) in ein Inkubationsgefäß gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gefäß für 45 s in ein 42 °C warmes Wasserbad gehalten (Hitzeschock) und 2 min auf 4 °C abgekühlt. Die Zellen wurden in 500 ml SOC-Medium gegeben und 1 h bei 220 rpm und 37 °C inkubiert. Nun wurde die Zelllösung auf zwei Selektivagarplatten (LB-Agar), die Ampicillin enthielten, in verschiedenen Konzentrationen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Auf dem Agar sollten nur Kolonien wachsen, die das pSport Plasmid enthalten und damit gegen Ampicillin resistent wären.

3.1.2 DNA-Isolierung und Aufreinigung

E. coli Kolonien mit dem *rsat-1*-enthaltenden pSport Plasmid wurden über Nacht in 8 ml LB-Medium angezogen, welches 100 µg / ml Ampicillin enthielt. Abhängig von der Dichte der Kultur wurden 4-6 ml durch Zentrifugieren geerntet. Die Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der SDS / alkalischen Lyse, gemäß der Anleitung des Herstellers (NucleoSpin® Plasmid Kit, Macherey Nagel) isoliert. Die Zellen wurden in 250 µl RNase-haltigem Puffer A1 resuspendiert und durch die Zugabe von 250 µl SDS-haltigem Puffer A2 lysiert. Nach vollständiger Lyse der Zellen wurden durch Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer (A3) die Bedingungen für die Bindung der Plasmid-DNA an die Silica-Membran verbessert und das SDS ausgefällt. Um ausgefallenes SDS und Zelltrümmer zu entfernen, wurde 10 min bei 11 000 x g zentrifugiert und der Überstand auf eine NucleoSpin® Säule gegeben. Durch das Waschen und Zentrifugieren mit 500 µl auf 50 °C erwärmten AW Puffer und mit 600 µl ethanolhaltigem Puffer A4 wurden Kontaminationen wie Salze, Metabolite oder lösliche makromolekulare Zellbestandteile entfernt. Das verbliebene Ethanol wurde durch erneutes Zentrifugieren für 2 min entfernt. Schließlich wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl Puffer AE (5 mM Tris-HCl, pH 8,5) und durch 1 min Zentrifugieren bei 11 000 x g eluiert.

3.1.3 Restriktionsverdau mit *NotI*

Vor der cRNA Synthese muss die doppelsträngige DNA vollständig mit einem passenden Restriktionsenzym distal des Promotors stromabwärts des zu transkribierenden Inserts gespalten werden. *NotI* ist hier das Enzym der Wahl. Zum Verdau wurden 10 µg Plasmid, 5 µl 10x BSA und 5 µl *NotI* Restriktionsenzym (New England Biolabs) in 1x NE Puffer 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,9 bei 25 °C, New England Biolabs) mit nucleasefreiem aqua dest. aufgefüllt auf 50 µl und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Das linearisierte Produkt wurde durch Ethanolfällung aufgereinigt. Zum Produkt wurden 250 µl eiskaltes Ethanol (100 %) und 10 µl 3 molares Natriumacetat gegeben. Um die DNA auszufällen, wurde diese Lösung für 20 bis 60 min auf -20 °C abgekühlt. Anschließend wurde für 20 min bei 12 000 x g zentrifugiert und

der Überstand vorsichtig abgenommen, ohne das Pellet zu zerstören. Das Pellet wurde mit 900 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 5 min bei 12 000 x g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstands wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 20 µl nucleasefreiem aqua dest. aufgenommen.

3.1.4 cRNA Synthese

cRNA wurde mit Hilfe des T7 mMESSAGE mMACHINE Kits (Ambion) synthetisiert. Dieses Kit ermöglicht die Synthese großer Mengen an Cap-RNA aus linearisierter DNA durch das Einfügen eines Cap Analogons während der Polymerisationsreaktion. Durch seine 7-Methyl-Guanosin-Cap-Struktur am 5'-Ende imitiert die Cap-RNA die meisten *in vivo* gefundenen eukaryontischen mRNAs. Das Cap-Analogon wird nur als das erste oder 5' terminale G des Transkripts eingebaut, da seine Struktur einen Einbau an anderen Positionen des RNA-Moleküls verhindert.

Um die Transkriptionsreaktion durchzuführen wurden 2 µl 10x Reaktionspuffer, 10 µl 2x Ribonucleotidgemisch (NTP / CAP), 1,1 µg linearisierte, aufgereinigte DNA, und 2 µl Enzymgemisch eingesetzt und mit nucleasefreiem aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt. Die cRNA-Synthese wurde für 2 h bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1 µl RNase freier TURBO DNase und einer Inkubation von 15 min bei 37 °C abgebaut. Die cRNA wurde nun durch die Zugabe von 30 µl nucleasefreiem aqua dest., 30 µl 7,5 molarer LiCl-Fällungslösung und Abkühlen auf -20 °C für mindestens 1 h ausgefällt. Danach wurde 30 min bei 4 °C und 13 000 x g zentrifugiert, das Pellet mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstands wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 15 µl nucleasefreiem aqua dest. aufgenommen. Mit Hilfe des RNA / DNA Calculators wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt und anschließend mit nucleasefreiem aqua dest. auf 1 µg / µl eingestellt. Die cRNA wurde bis zur Injektion in Oozyten bei -80 °C aufbewahrt.

3.2 Expression des rsat-1 in *Xenopus laevis* Oozyten

Zur funktionellen Charakterisierung des rsat-1 wurden *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem verwendet. Die Oozyten wurden mit rsat-1 cRNA injiziert. Nach einer Expressionszeit von 3 Tagen schloss sich die funktionelle Charakterisierung des in die Oozytenmembran eingebauten rsat-1 Proteins an. Der [¹⁴C]Oxalat- und [³⁵S]Sulfattransport der rsat-1-exprimierenden Oozyten und Wasser-injizierten Kontrollen (mocks) wurde unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gemessen. In Abbildung 3.2 ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

3.2.1 Präparation der Oozyten

Die Oozyten wurden von einer Mitarbeiterin des Instituts zur Verfügung gestellt. Um die Oozyten von dem sie umgebenden Bindegewebe und Follikelzellen zu befreien, wurden sie mit Kollagenase (Typ II, Biochrom) behandelt. Mehrere Ovarlappen wurden zerkleinert, in 20 ml ORi gelegt und 7 mg Kollagenase hinzugefügt. Am folgenden Tag wurde die Kollagenase durch Waschen mit Ca²⁺-freiem ORi entfernt. Die Oozyten wurden anschließend für 10 min in Ca²⁺-freiem ORi inkubiert. Danach wurden die Oozyten mit ORi gewaschen, darin aufbewahrt, die Stadien V und VI unter dem Lichtmikroskop selektiert und für die Injektion der cRNA verwendet.

3.2.2 Injektion der Oozyten

Sat-1 cRNA wurde mit Hilfe eines Nanoliter Mikroinjektors unter Verwendung von Sodaklarglaskapillaren in die Oozyten injiziert. In die Oozyten wurden 23 nl RNA mit einer Konzentration von 1 µg / µl injiziert oder das entsprechende Volumen nucleasfreie aqua dest. als Kontrolle. Die Wasser-injizierten Oozyten werden im Folgenden als mocks bezeichnet. Oozyten wurden zum Injizieren auf eine spezielle Kammer mit Rinnen gegeben, um das Injizieren zu erleichtern. Sie waren mit ORi bedeckt, um das Austrocknen zu verhindern. Nach dem Injizieren wurden sie für 3 Tage bei 16 °C in ORi (zur Aufbewahrung) inkubiert. Dieser wurde täglich

gewechselt und Oozyten, deren Abgrenzung der Pole nicht eindeutig erkennbar war, wurden verworfen.

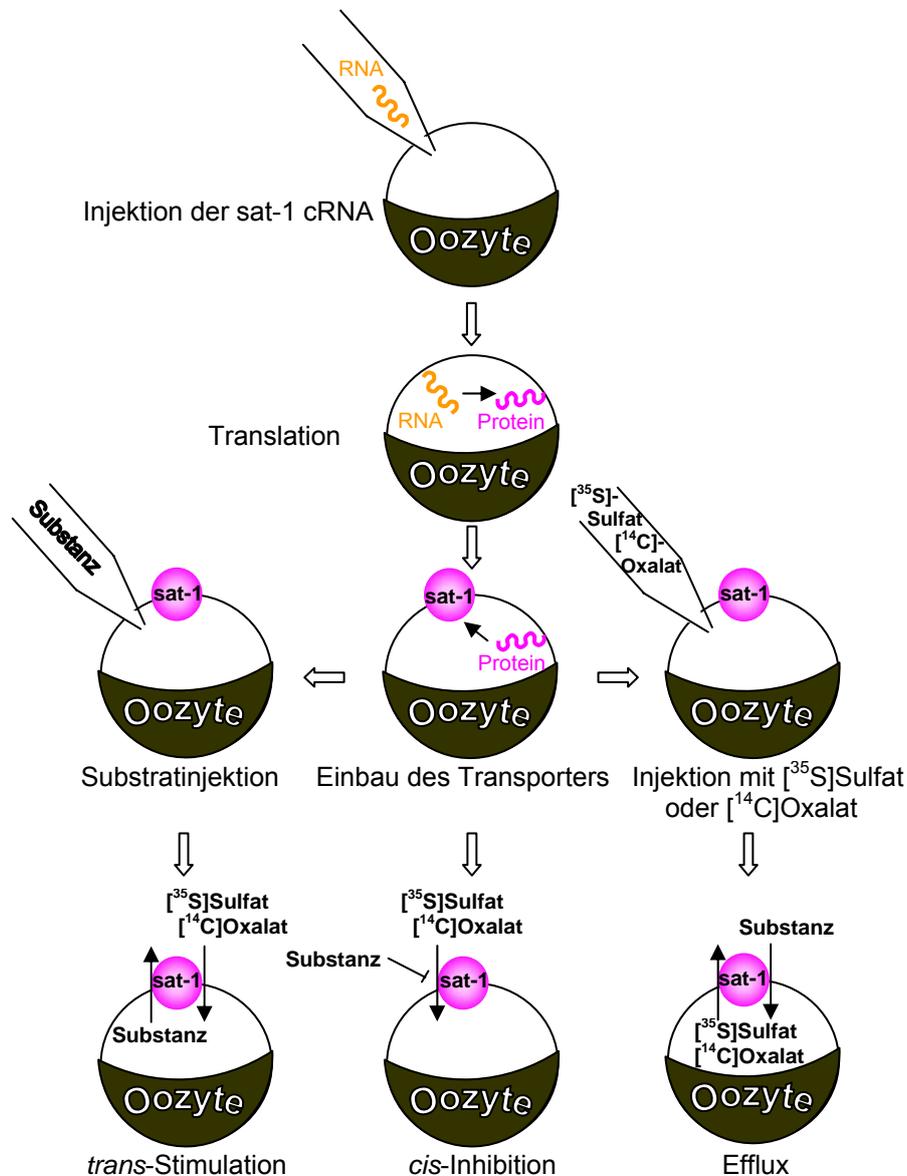


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs von der cRNA-Injektion bis zur radiochemischen Untersuchung der rsat-1-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten.

Sat-1 cRNA wurde in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. In den folgenden drei Tagen fand die Translation und der Einbau des Proteins in die Membran statt. Danach konnten die Funktionen des rsat-1 untersucht werden: als *cis*-Inhibition, bei der die Aufnahme von [³⁵S]Sulfat oder [¹⁴C]Oxalat durch unterschiedliche Substanzen gehemmt wurde, durch *trans*-Stimulationsexperimente, bei denen mögliche Substrate in die Oozyte injiziert und die Aufnahme von [³⁵S]Sulfat oder [¹⁴C]Oxalat bestimmt wurde oder durch Effluxexperimente. Um einen Efflux durchzuführen, wurden [³⁵S]Sulfat oder [¹⁴C]Oxalat in die Oozyten injiziert, um anschließend den Efflux von markiertem Sulfat oder Oxalat in Abhängigkeit unterschiedlicher Komponenten im Medium zu messen.

3.2.3 Aufnahmeexperimente

Der Versuchsablauf der Transportexperimente mit radioaktiv markierten Substraten ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt. Die Oozyten wurden mit ORi gewaschen, um Pyruvat und Gentamycin zu entfernen, in Gruppen von bis zu 12 Oozyten aufgeteilt und in ein 10 ml Schnappdeckelglas mit 1 ml Aufnahmemedium überführt. Im Aufnahmemedium befanden sich verschiedene Substanzen zusammen mit radioaktiv markiertem Sulfat oder Oxalat. Vor der Durchführung der Versuche wurden die entsprechenden Substanzen in Ca^{2+} -freiem ORi gelöst und der pH auf 7,5 eingestellt. Um ein Ausfallen von Calciumoxalat zu vermeiden, wurden die Versuche unter nominal Ca^{2+} -freien Bedingungen durchgeführt. Die Aufnahme wurde, wenn nicht anders erwähnt für 5 min in Ca^{2+} -freiem ORi und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Bei *cis*-Inhibitionsversuchen wurden den Oozyten im Aufnahmemedium verschiedene Substanzen angeboten um die Hemmung der [^{35}S]Sulfat- oder [^{14}C]Oxalataufnahme durch diese Verbindungen zu untersuchen. Die Konzentrationen an [^{35}S]Sulfat und [^{14}C]Oxalat sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben. Die Oozyten wurden für 5 min im Aufnahmemedium inkubiert. Die [^{35}S]Sulfat- oder [^{14}C]Oxalataufnahme aus dem ORi ohne Zugabe weiterer Substanzen wurde als Kontrolle verwendet.

Für die *trans*-Stimulation wurden die Oozyten vor der Inkubation im Aufnahmemedium mit verschiedenen Substanzen vorbeladen. Dazu wurden in die Oozyten 23 nl von 50 mM Lösungen dieser möglichen Substrate in Ca^{2+} -freiem ORi injiziert. Als Kontrolle wurden Oozyten mit Ca^{2+} -freiem ORi injiziert.

Um die Aufnahme zu beenden, wurde das Aufnahmemedium abgesaugt und die Oozyten drei Mal mit 3 ml eiskaltem ORi gewaschen. Die Oozyten wurden nun einzeln in Szintillationröhrchen gegeben.

Um einen [^{35}S]Sulfat- oder [^{14}C]Oxalatefflux durchzuführen, wurden Oozyten mit 23 nl [^{35}S]Sulfat oder [^{14}C]Oxalat injiziert und diese anschließend einzeln in je 150 μl Ca^{2+} -freiem ORi, dem verschiedene Substanzen zugesetzt waren, inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde das Medium in ein Szintillationsröhrchen überführt, 150 μl Medium zum Waschen auf die Oozyte gegeben, die Oozyte in ein weiteres Szintillationsröhrchen gegeben und das Waschmedium mit dem Medium im ersten Röhrchen vereint.

METHODEN

Die Oozyten wurden durch die Zugabe von 250 μ l 1 M NaOH und zweistündiges Schütteln (150 / min) bei Raumtemperatur aufgelöst. Nach dem Neutralisieren mit 250 μ l 1 M HCl und der Zugabe von 2,5 ml Lumasafe Szintillationsflüssigkeit, wurde der [14 C]- bzw. [35 S]-Gehalt im Szintillationszähler bestimmt.

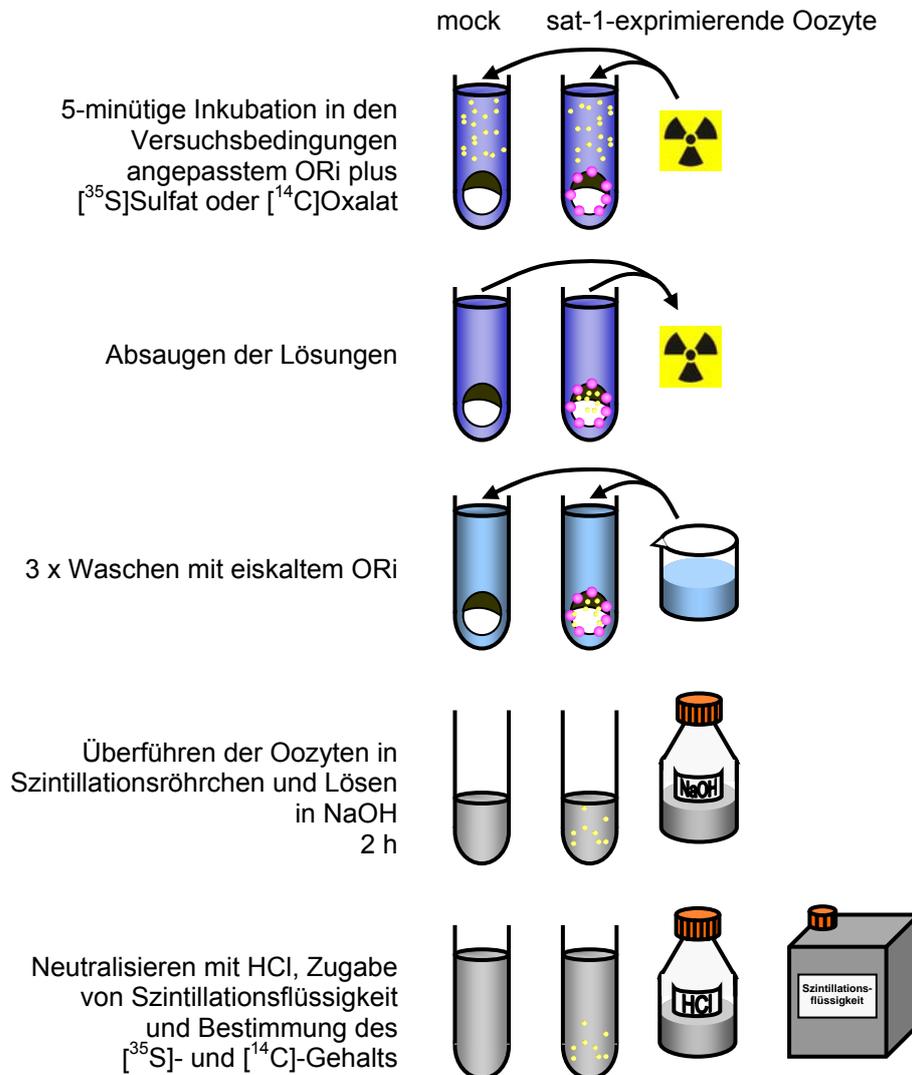


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Transportexperimente mit radioaktiv markierten Substanzen.

In jedem Schnappdeckelglas befinden sich 10-12 Oozyten, exemplarisch ist der Versuchsablauf hier an nur einer Oozyte dargestellt. Die Oozyten wurden in radioaktivem Aufnahmemedium inkubiert, nach 5 min wurde das Aufnahmemedium entfernt und die Oozyten drei Mal mit eiskaltem ORi gewaschen. Anschließend wurden die Oozyten einzeln in Szintillationsröhrchen überführt und durch Zugabe von NaOH aufgelöst. Nach 2 h wurde die Oozytenlösung durch HCl neutralisiert und nach der Zugabe von Szintillationsflüssigkeit der Gehalt an Radioaktivität der Proben im Szintillationszähler gemessen.

3.3 Zellzucht mit HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden auf 20 cm Kulturschalen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ / 95 % Raumluft angezogen und alle 7 Tage im Verhältnis 1 : 5 aufgeteilt. Vor dem Teilen wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 3 ml Trypsin (0,1 % in PBS) auf die Zellen gegeben. Sie wurden für ca. 3 min bei 37 °C inkubiert, um sie von der Platte zu lösen. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS von der Platte gespült. Um den Trypsinverdau zu stoppen, wurde die Zellsuspension zusammen mit 3 ml HepG2-Medium 5 min bei 195 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml HepG2-Medium aufgenommen und die Zelldichte in einer Neubauerzählkammer bestimmt.

Für die RNA-Isolierung wurden die HepG2-Zellen mit einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen / ml Medium in 6-Wellplatten ausgesät (2 ml pro Well) und sieben Tage lang inkubiert. Das Medium wurde täglich gewechselt. Die Zellen wurden für vier Tage in 1 mM Glycin, Hydroxyprolin, Sulfat, Glycolat, 20 mM Glycolat, 0,1 mM Oxalat, 0,1, 0,5, 1 oder 2 mM Glyoxylat inkubiert bzw. für 1-6 Tage in 1 mM Glyoxylat. Je ein Well diente als Kontrolle und wurde ohne Substanzzugabe inkubiert.

Um die Sulfataufnahme in HepG2-Zellen zu untersuchen, wurden 24-Well-Platten mit Polylysin vorbehandelt, um das Anhaften der Zellen am Plattenboden zu verbessern. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $5 \cdot 10^4$ / ml ausgesät (500 µl pro Well) und sechs Wells wurden vier Tage lang in 1 mM Glyoxylat inkubiert. Zellen in weiteren sechs Wells dienten als Kontrolle. Die Kontrollzellen wurden analog, jedoch ohne Zugabe von Glyoxylat behandelt.

3.4 Isolierung der RNA mit TRIzol®

Zur Isolierung der RNA aus HepG2-Zellen wurde TRIzol®-Reagenz (Invitrogen / 15596-018) verwendet. Am Tag der Ernte wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und sie wurden zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Je 1 ml TRIzol® pro Well wurde auf die Zellen gegeben und sie wurden darin für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl Chloroform wurden in Eppendorfgefäßen vorgelegt, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren von den Platten gelöst und auf das Chloroform gegeben. Nach 15 s manuellen Schüttelns wurden die Proben für

2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 min bei 12 000 x g zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen: in der unteren, pinkfarbenen, Phenol-Chloroform-Phase befanden sich die Proteine, die mittlere, die sogenannte Interphase enthielt die DNA und in der oberen wässrigen Phase fand man die RNA. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und, um die RNA auszufällen, mit 500 µl Isopropanol versetzt. Das RNA-Isopropanolgemisch wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 4 °C für 20 min mit 12 000 x g zentrifugiert, um ein Pellet der ausgefallenen RNA zu erhalten. Zum Waschen wurde das Pellet in 1 ml 75 %igem Ethanol gevortext und 5 min bei 4 °C und 7 500 x g zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 30 µl nucleasefreies aqua dest. aufgenommen und entweder sofort zur reversen Transkription verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

3.5 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Complementary DNA (cDNA) ist das Ergebnis der reversen Transkription der RNA mit Hilfe einer DNA-Polymerase, die als „Reverse Transkriptase“ bezeichnet wird. 5 µg der RNA aus den HepG2-Zellen wurden mit 1 µl Random Primer Oligo dT versetzt. Oligo dT Primer binden an den Poly-A-Schwanz von mRNAs. Mit nucleasefreiem aqua dest. wurde auf 8 µl aufgefüllt, 10 min bei 70 °C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen und 15 min auf 4 °C abgekühlt. Nach der Denaturierung wurden 6 µl Wasser, 4 µl 5x Puffer, 1 µl 10 mM Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) und 1 µl Reverse Transkriptase des Moloney Maus Leukämievirus (M-MuLV) zugegeben und die Reverse Transkription für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Danach wurde die Reverse Transkriptase durch 10 min bei 70 °C inaktiviert und die Probe auf 4 °C abgekühlt. Die erhaltene cDNA wurde bis zum weiteren Gebrauch für die PCR oder *real-time* PCR bei -20 °C eingefroren.

3.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein dreistufiger Prozess, der es ermöglicht, beliebige DNA-Abschnitte zu vermehren. Man benötigt zwei Oligonucleotide (Primer), die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren, die vier Desoxynucleosidtriphosphate und eine hitzestabile DNA-Polymerase. Jeder PCR-Zyklus besteht aus der Denaturierung, dem Trennen der DNA-Stränge, dem Annealing, dem Anlagern der Primer und der Elongation, der Synthese neuer DNA-Stränge.

In Abbildung 3.4 ist der Ablauf von drei PCR-Zyklen schematisch dargestellt.

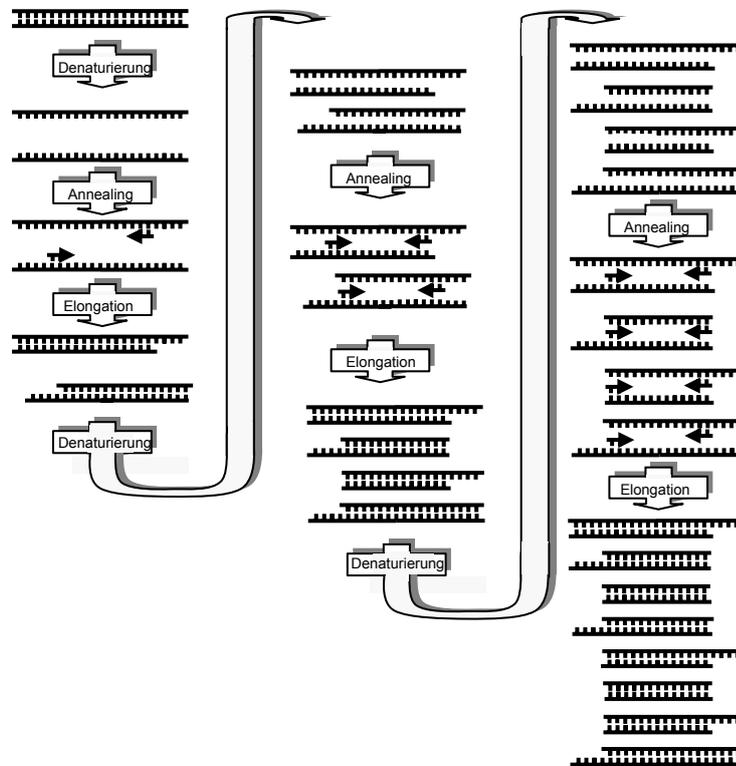


Abbildung 3.4 Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Denaturierungsschritt trennen sich die DNA-Stränge, beim anschließenden Annealing wird die Temperatur gesenkt um die Hybridisierung der Primer an die DNA zu ermöglichen, in der Elongationsphase wird die Temperatur auf das Optimum der Polymerase erhöht, um die Synthese des zweiten DNA-Stranges zu ermöglichen

Zur PCR wurden 2,5 µl (verschiedene Transporter) oder 5 µl (GAPDH) der cDNA verwendet. Diese wurden mit 8 µl 1,25 mM dNTPs, 5 µl 10x PCR-Puffer, je 1 µl des Forward- und Reverse-Primers (20 pmol / ml) und 1 µl *Taq*-Polymerase

METHODEN

versetzt und mit nucleasefreiem aqua dest. auf 50 µl aufgefüllt. Das Temperaturprofil der PCR für GAPDH lautete wie folgt:

Initiale Denaturierung	2 min	94 °C	
Denaturierung	40 s	94 °C	} 22 Zyklen
Annealing	50 s	58 °C	
Elongation	1 min	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	

Bei der sat-1 PCR betrug die Annealingtemperatur 56 °C und es wurden 35 Zyklen durchgeführt. Die Annealingtemperaturen und Zyklenzahlen der PCRs weiterer Transporter sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Um die Qualität der reversen Transkription zu überprüfen, wurde vor der *real-time* PCR eine qualitative PCR durchgeführt und die Produkte auf einem Ethidiumbromidgel visualisiert.

3.7 *Real-time* PCR

Die *real-time* PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Sie beruht auf der Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers. Ein Fluoreszenzfarbstoff wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und gibt anschließend Licht in einer anderen Wellenlänge wieder ab. Der Fluoreszenzfarbstoff hat ein für ihn charakteristisches Anregungs- und Emissionsspektrum. Bringt man nun einen weiteren Fluoreszenzfarbstoff in seine Nähe, dessen Anregungsspektrum dem Emissionsspektrum des ersten entspricht, kann man durch die Messung der Lichtstärke der emittierten Wellenlänge ermitteln, ob sich die Fluorochrome getrennt oder beieinander befinden. Für die *real-time* PCR wurde das Taqman-Prinzip verwendet. Beide Fluoreszenzfarbstoffe befinden sich auf demselben Oligonukleotid. Solange das Oligonukleotid intakt ist, ist die vom ersten Fluorochrom emittierte Lichtstärke gering, werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch die Polymerase freigesetzt, steigt die Lichtproduktion bei dieser Wellenlänge an. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Fluorochrome werden freigesetzt und die Signalstärke steigt.

METHODEN

Für die *real-time* PCR wurden 12,5 µl 2x Reaktionspuffer, 1,25 µl 20x Taqman Primer, 1-2,5 µl cDNA verwendet und mit nucleasefreiem aqua dest. auf 25 µl aufgefüllt. Der Thermozykler wurde wie folgt programmiert:

2 min	50 °C	
10 min	95 °C	
15 s	95 °C	} 40 Zyklen
1 min	60 °C	

Für die Datenanalyse der Taqman-basierten *real-time* PCR wurde die ΔCt (*Cycle Threshold*, Schwellenwert Zyklus) Methode verwendet. Die mRNA-Expression wurde auf GAPDH normiert und ΔCt gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an:

$$\Delta Ct = (Ct(\text{sat-1})_{\text{unbeh.}} - Ct(\text{GAPDH})_{\text{unbeh.}}) - (Ct(\text{sat-1})_{\text{beh.}} - Ct(\text{GAPDH})_{\text{beh.}})$$

Pro Zyklusdifferenz kommt es in etwa zu einer Verdopplung der DNA, bei einem ΔCt von n ist die Expression 2^n -fach erhöht.

3.8 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine Methode um DNA-Stränge zu trennen. Mit Hilfe eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle durch das Agarosegel. Die Siebstruktur der Agarose bewirkt, dass sich kleine Fragmente schneller bewegen als große. Die Laufstrecke ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Länge und durch den Vergleich mit Größenmarkern kann man Rückschlüsse auf die Länge des Stranges ziehen. Ethidiumbromid bindet an die DNA-Fragmente, welche dadurch im UV-Licht sichtbar werden.

Um ein 1,5 %iges Agarosegel zu gießen, wurden 1,5 g Agarose (Peqlab / 35-1020) in 100 ml 0,5x TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach einer kurzen Abkühlphase wurden 4,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gemisch in eine Kammer mit Gelschlitten gegossen. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert war, wurde es in die Elektrophoresekammer gelegt und soviel 0,5x TBE-Puffer hinzugegeben, bis es knapp bedeckt war. 20 µl der cDNA Proben

wurden mit 5 µl 5x DNA Agarosegel-Elektrophorese Ladepuffer gemischt und in die Taschen pipettiert. Für den Marker wurde eine eigene Tasche verwendet. Für ca. 80 min wurde eine Spannung von 90 V angelegt und das Gel anschließend unter UV-Licht betrachtet.

3.9 Präparation der Zellmembranproteine

Die Zellen wurden auf 4 °C abgekühlt und zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. 0,5 ml Membranpuffer wurden in jedes Well der 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber abgekratzt, die abgelösten Zellen in vorgekühlte Inkubationsgefäße gegeben und homogenisiert. Das Zellysate wurde bei 4 °C für 10 min bei 13 000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit ca. 100 000 x g, 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Im Überstand befand sich das Zytosol, während das Pellet die Zellmembranen enthielt. Das Pellet wurde mit eiskaltem Membranpuffer gewaschen und in 1x SDS Ladepuffer gelöst. Zum Überstand wurden 1/4 seines Volumens an 5x SDS Ladepuffer gegeben.

3.10 Proteinbestimmung nach Bradford

Vor dem Beladen des Gels muss ein Bradford-Test durchgeführt werden, um die Proteinkonzentration in den Proben zu bestimmen und so ein gleichmäßiges Beladen des Gels zu ermöglichen. Die Proteinlösungen wurden für den Bradford-Test 1 : 5 oder 1 : 10 verdünnt.

20 µl Proteinlösung wurden mit 20 µl Ameisensäure vermischt und 1 ml Bradford-Lösung (1x) hinzugegeben. Nach dem Mischen wurde die Probe für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Extinktion bei 595 nm im Photometer bestimmt. Als Leerwert wurden 20 µl aqua dest. mit 20 µl Ameisensäure und 1 ml Bradford-Lösung verwendet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit aufsteigenden Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA) eine Eichgerade erstellt.

3.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Trennung von Proteinen nach ihrer Masse. Durch eine Vorbehandlung des Proteingemisches hängt die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins im Gel nicht mehr von Größe, Form und Ladung, sondern nur noch von der Masse ab. Dies wird durch den Zusatz von Natrium-Lauroylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) erreicht. SDS ist ein Detergenz mit stark amphipatischen Eigenschaften, entfaltet die Peptidketten der Proteine und verleiht ihnen durch seine Bindung eine stark negative Ladung. Zur vollständigen Denaturierung gibt man außerdem Thiole wie Dithiotreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol hinzu, um Disulfid-Brücken im Protein zu spalten.

In einem diskontinuierlichen Gel wird ein Sammel- auf ein Trenngel gegeben. Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels ist in Tabelle 3.3 aufgelistet. 20 μ g des zytosolischen bzw. 40 μ g des Membranproteins in SDS-PAGE Ladepuffer wurden für 10 min auf 95 °C erhitzt, mit Bromphenolblau gefärbt und auf das diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel geladen. Für den vorgefärbten Molekulargewichtsmarker (Fermentas / SM0671) wurde eine separate Geltasche verwendet. Die Gelelektrophorese im SDS-PAGE Laufpuffer wurde unter einem konstanten Strom von 20 mA und einer maximalen Spannung von 300 V durchgeführt.

Tabelle 3.1 Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für SDS-Page

	Sammelgel 4 %	Trenngel 10 %
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	333 μ l	2,97 ml
H ₂ O	1,52 ml	3,78 ml
Sammel- / Trenngelpuffer (4x + 0,4 % SDS)	0,625 ml	2,25 ml
Tetramethylethyldiamin	2,5 μ l	4,5 μ l
Ammoniumpersulfat	12,5 μ l	45 μ l

3.12 Western Blot

Der Western Immunoblot ermöglicht den Nachweis eines einzelnen Proteins in einem Proteingemisch und erlaubt außerdem eine Aussage über die Proteingröße.

Die Methode beruht auf der Verwendung eines primären Antikörpers der gegen das ausgewählte Protein gerichtet ist. Der primäre Antikörper wird durch einen sekundären Antikörper detektiert, dieser ist mit einem Enzym konjugiert (z. B. Peroxidase) und gegen die F_c-Region des primären Antikörpers gerichtet. Gibt man nun das Substrat der Peroxidase dazu, so katalysiert sie eine lichtemittierende Reaktion, die sichtbar gemacht werden kann, indem man einen Röntgenfilm auf die Membran legt.

3.12.1 Proteintransfer auf die PVDF Membran

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in gekühltem (4 °C) Western Blot Puffer equilibriert. Eine zugeschnittene PVDF Membran (Polyvinylidendifluorid, Roche / 3010040) wurde kurz in Methanol getaucht, mit aqua dest. gewaschen und ebenfalls in den Western Blot Puffer gelegt. Gel und aktivierte Membran wurden zwischen in Western Blot Puffer getränkte Faserpads und Filterpapier geschichtet. Das geschichtete Gel-Blot-Sandwich wurde in den Western Blot Kassettenhalter gesetzt und dieser wiederum in die Western Blot Kammer. Die Kammer wurde mit Western Blot Puffer gefüllt und die Elektrophorese für 1 h bei 100 V durchgeführt.

3.12.2 Proteindetektion auf Western Blots

Nach Abschluss des Transfers wurde die PVDF-Membran kurz in PBS (0,05 % Tween 20) gewaschen, um das verbliebene Methanol zu entfernen. Die Membran wurde für 1 h in 5 %iger Magermilch (in PBS, 0,05 % Tween20) inkubiert, um ein unspezifisches Binden des Antikörpers zu verhindern. Die primären anti-sat-1 bzw. anti- β -Aktin-Antikörper wurden 1 : 1 000 in 5 %iger Magermilch (in PBS, 0,05 % Tween 20) verdünnt auf die Membran gegeben. 1 ml der Lösung bedeckte die gesamte Membran, die mit Parafilm versiegelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde.

Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal in Intervallen von 15 min mit PBS, dem 0,05 % Tween 20 zugesetzt war, gewaschen. Die Peroxidase-konjugierten sekundären anti-Kaninchen bzw. anti-Maus Antikörper wurden 1 : 1 000 bzw. 1 : 10 000 mit 5 %iger Magermilch (in PBS, 0,05 % Tween 20) verdünnt. Nach der

zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran drei Mal in Intervallen von 15 min mit PBS plus 0,05 % Tween 20 gewaschen. Für die Detektion wurden 10 ml frisch angesetzte ECL-Lösung auf die Membran gegeben und diese für 5 min inkubiert. Die Blots wurden unter Verwendung des LAS3000 Imagers entwickelt.

3.13 Sulfattransport in HepG2-Zellen

Die konfluenten Zellen wurden zwei Mal mit auf 37 °C angewärmtem PBS gewaschen. Sechs Wells mit Kontrollzellen und sechs Wells mit in Glyoxylat inkubierten Zellen wurden zwei Mal mit sulfatfreiem „Mammalian“ Ringer gewaschen. Beide Zellgruppen wurden in sulfatfreiem *Mammalian* Ringer inkubiert, dem 50 µM Sulfat und 0,01 µM [³⁵S]Sulfat zugefügt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Zellen drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und durch die Zugabe von 500 µl NaOH unter Schütteln aufgelöst. Nach zwei Stunden wurden 500 µl HCl hinzugefügt, um die Lösung zu neutralisieren. 50 µl der Zelllösung wurde für die Bradford-Proteinbestimmung verwendet. Der [³⁵S]-Gehalt der verbleibenden Lösung wurde mit Hilfe des Szintillationszählers bestimmt.

3.14 Statistik

Die Signifikanz wurde durch den t-Test nach Student ermittelt, $p < 0.05$ ist durch *, $p < 0.01$ ist durch ** gekennzeichnet. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

4. ERGEBNISSE

Der erste Teil der Arbeit umfasst die funktionelle Charakterisierung des rsat-1 in *Xenopus laevis* Oozyten, im zweiten Teil wurde der Einfluss von Komponenten des Oxalatmetabolismus auf die Expression des hsat-1 untersucht.

4.1. Zeitabhängigkeit der Sulfataufnahme in An- und Abwesenheit von Ca^{2+}

Um den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die Sulfataufnahme optimal ist, wurde die Zeitabhängigkeit der Aufnahme gemessen. In Vorversuchen zeigte die Sulfataufnahme Sättigungsverhalten. Für alle weiteren Experimente musste eine Inkubationszeit gewählt werden, bei der die Sulfataufnahme noch linear ansteigt.

Da es schon bei niedrigen Oxalatkonzentrationen zum Ausfallen von Calciumoxalat kommt, wurden die Experimente unter nominal calciumfreien Bedingungen durchgeführt. Um einen Einfluss des Calciums auf die Transporteigenschaften des rsat-1 bzw. die von ihm vermittelte Sulfataufnahme auszuschließen, wurde diese in Anwesenheit von 2 mM Calcium und in nominaler Abwesenheit von Calcium bestimmt. Abbildung 4.1 zeigt, dass die Sulfataufnahme unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration im Aufnahmemedium ist. Die wasserinjizierten Kontrolloozyten werden als „mocks“ bezeichnet und zeigten eine sehr geringe, zu vernachlässigende Sulfataufnahme.

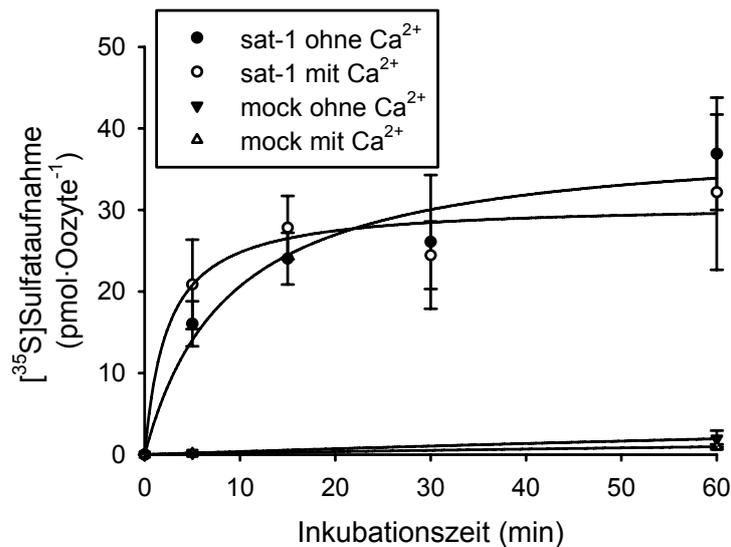


Abbildung 4.1 Zeitabhängigkeit der Sulfataufnahme

Die Sulfataufnahme ($0,01 \mu\text{M}$ $[^{35}\text{S}]$ Sulfat, $50 \mu\text{M}$ Gesamtsulfat) in rsat-1-exprimierende und wasserinjizierte (mock) Oozyten wurde nach 5, 15, 30 und 60 Minuten in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} bestimmt. Die Mittelwerte fassen vier Messungen an jeweils 5-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen.

4.2 Bestimmung der K_m für Sulfat

Die Sulfataufnahme wurde bei aufsteigenden Sulfatkonzentrationen im Medium gemessen. Aus den Aufnahmen konnte über eine Linearisierung nach Eadie-Hofstee ein K_m -Wert von $113 \pm 27 \mu\text{M}$ und eine V_{max} von $58 \pm 13 \text{ pmol} \cdot \text{Oocyte}^{-1} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$ für die Sulfataufnahme des rsat-1 bestimmt werden. Die Analyse mittels SigmaPlot ergab eine K_m von $127 \pm 64 \mu\text{M}$ und eine V_{max} von $64 \pm 13 \text{ pmol} \cdot \text{Oocyte}^{-1} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$. Die zur Berechnung von K_m und V_{max} verwendeten Aufnahmewerte in rsat-1-exprimierende Oozyten wurden um die Aufnahme in „mocks“ korrigiert.

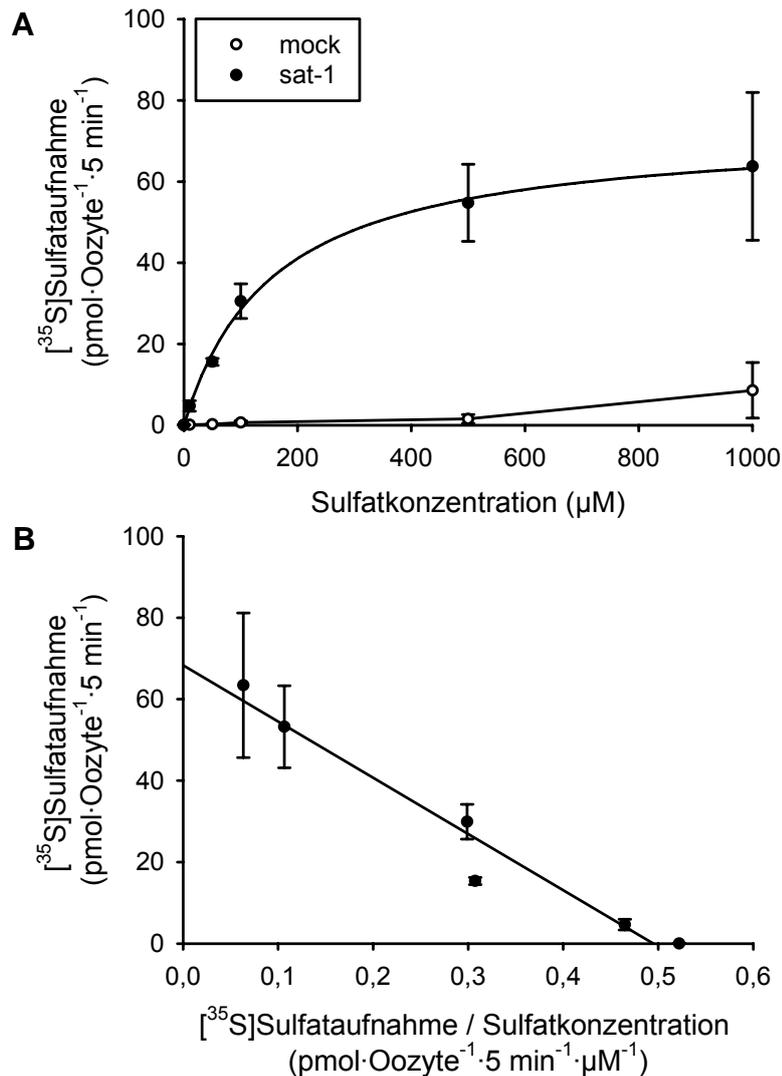


Abbildung 4.2 Konzentrationsabhängigkeit der Sulfataufnahme und Linearisierung nach Eadie-Hofstee

(A) Die Sulfataufnahme in rsat-1-exprimierende und wasserinjizierte (mock) Oozyten bei steigenden Sulfatkonzentrationen von 0,01, 10, 50, 100, 500 und 1000 μM Sulfat (0,01 μM [^{35}S]Sulfat) wurde bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen vier Messungen an jeweils 4-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, (B) Eadie-Hofstee-Diagramm der Daten aus (A).

4.3 Cis-Inhibition der Sulfataufnahme

Abbildung 4.3 fasst den Einfluss verschiedener Anionen auf die Sulfataufnahme zusammen. Während Oxalat, Bicarbonat, Phosphat und Formiat die Sulfataufnahme signifikant hemmten, hatten die Dicarboxylate Malonat, Succinat und Glutarat, die Oxalatvorstufen Glyoxylat und Glycolat und weitere Anionen (Acetat, Laktat, Pyruvat und Ascorbat) keinen Einfluss auf die Sulfataufnahme.

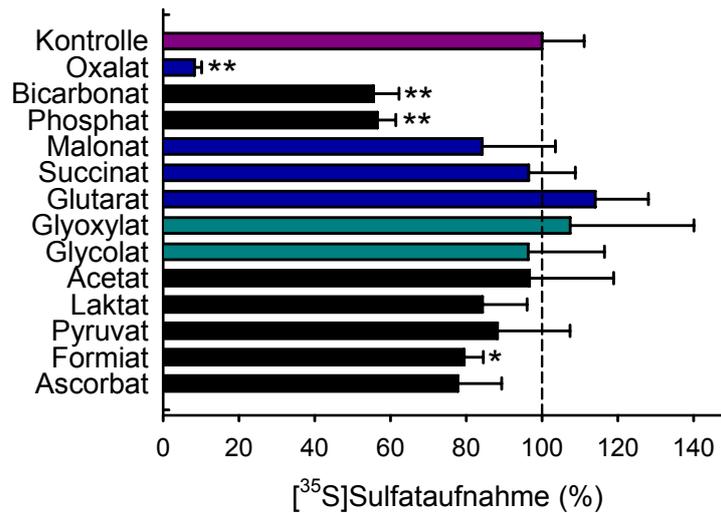


Abbildung 4.3 Cis-Inhibition der Sulfataufnahme durch verschiedene Anionen

Die Sulfataufnahme ($0,01 \mu\text{M}$ [^{35}S]Sulfat, $20 \mu\text{M}$ Gesamtsulfat) in rsat-1-exprimierende Oozyten wurde in Anwesenheit von 1 mM Oxalat, Bicarbonat, Phosphat, Malonat, Succinat, Glutarat, Glyoxylat, Glycolat, Acetat, Laktat, Pyruvat, Formiat und Ascorbat bestimmt. Die Sulfataufnahme in Abwesenheit der Anionen wurde 100% gesetzt und dient als Kontrolle (rot). Die absoluten Werte der Kontrolle betragen bei Oxalat, Formiat, Bicarbonat, Phosphat und Ascorbat $18,1 \pm 0,57 \text{ pmol}\cdot\text{Oozyte}^{-1}\cdot 5 \text{ min}^{-1}$, bei Glyoxylat, Glycolat, Acetat, Laktat und Pyruvat $10,5 \pm 1,3 \text{ pmol}\cdot\text{Oozyte}^{-1}\cdot 5 \text{ min}^{-1}$ und bei Malonat, Succinat und Glutarat $5,7 \pm 0,6 \text{ pmol}\cdot\text{Oozyte}^{-1}\cdot 5 \text{ min}^{-1}$. Dicarboxylate sind blau und Oxalatvorstufen grün dargestellt. Die Inkubationszeit betrug 5 min , die Mittelwerte fassen zwei bis vier Messungen an jeweils 4-12 Oozyten unterschiedlicher Spendiertiere zusammen, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.4 Hemmung der Sulfataufnahme durch aufsteigende Oxalatkonzentrationen

Cis-Inhibitionsversuche zeigten, dass Oxalat die Sulfataufnahme hemmt (Abb. 4.3). Zur Bestimmung des Hemmtyps mussten Experimente durchgeführt werden, die eine Dixon Plot-Analyse erlauben. Hierzu wurden rsat-1-exprimierenden Oozyten im Aufnahmemedium neben zwei verschiedenen Sulfatkonzentrationen aufsteigende Konzentrationen von Oxalat angeboten und nach einer Inkubationszeit von 5 min die Hemmung der Sulfataufnahme bestimmt. Die Dixon Plot-Analyse zeigte eine kompetitive Hemmung der Sulfataufnahme durch Oxalat mit einer K_i von $69 \pm 35 \mu\text{M}$ (Abb. 4.4).

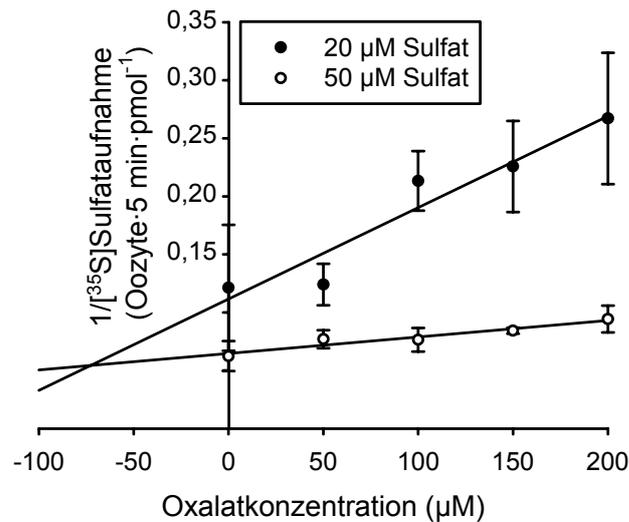


Abbildung 4.4 Hemmung der Sulfataufnahme durch aufsteigende Oxalatkonzentrationen (Dixon Plot Oxalat)

Die Sulfataufnahme (20 bzw. 50 µM Gesamtsulfat, je 0,01 µM [³⁵S]Sulfat) in rsat-1-exprimierende Oozyten wurde bei steigenden Oxalatkonzentrationen von 0,01, 50, 100, 150 und 200 µM Oxalat bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen fünf Messungen an jeweils 7-12 Oozyten zusammen.

4.5 *Trans*-Stimulation mit Sulfat und Oxalat

Oxalat wurde in rsat-1-exprimierende Oozyten injiziert und anschließend die Sulfataufnahme gemessen. Der Vergleich der Sulfataufnahme gegenüber Oozyten, in die nur eine entsprechende Menge an ORi injiziert worden war, zeigte eine Verdopplung der Sulfataufnahme (Abb. 4.5 A). Durch die Injektion von Sulfat und anschließende Inkubation in [¹⁴C]Oxalat konnte die aufgenommene Oxalatmenge nahezu vervierfacht werden (Abb. 4.5 B).

Um zu untersuchen, ob eine Erhöhung der Osmolarität innerhalb der Oozyte bei *trans*-Stimulationsversuchen die Transporteigenschaften des rsat-1 verändert, wurden als Kontrollexperiment 23 nl ORi mit 110 bzw. 135 mM NaCl in Oozyten injiziert und anschließend die Sulfataufnahme gemessen. Da die Aufnahme von Sulfat unter beiden Versuchsbedingungen gleich war, konnte ein Einfluss der intraozytären Osmolarität auf die Sulfataufnahme ausgeschlossen werden.

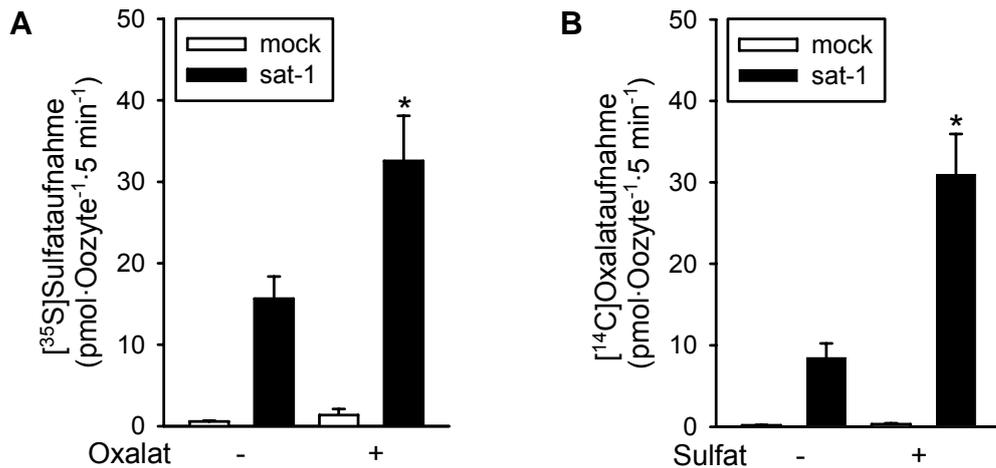


Abbildung 4.5 Trans-Stimulation mit Sulfat und Oxalat

(A) Die Sulfataufnahme (50 µM Gesamtsulfat; 0,01 µM [³⁵S]Sulfat) in mit 23 nl ORI bzw. 50 mM Oxalat in ORI injizierten Oozyten und (B) die Oxalataufnahme (20 µM [¹⁴C]Gesamtoxalat) in mit 23 nl ORI bzw. 50 mM Sulfat in ORI injizierten Oozyten wurde unter Verwendung von rsat-1-exprimierenden und wasserinjizierten (mock) Oozyten bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen drei bzw. vier Messungen an jeweils 4-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, * p < 0,05.

4.6 Bestimmung der K_m von Oxalat

Zur Bestimmung der Affinität des rsat-1 für Oxalat wurde die Oxalataufnahme bei verschiedenen Konzentrationen in rsat-1-exprimierende Oozyten bestimmt (Abb. 4.6). Der K_m-Wert wurde über eine Linearisierung nach Eadie-Hofstee ermittelt und lag bei 55 ± 9 µM, die V_{max} betrug 43 ± 4 pmol·Oocyte⁻¹·5 min⁻¹. Mittels SigmaPlot wurde dagegen eine K_m von 134 ± 47 µM und eine V_{max} von 74 ± 14 pmol·Oocyte⁻¹·5 min⁻¹ bestimmt.

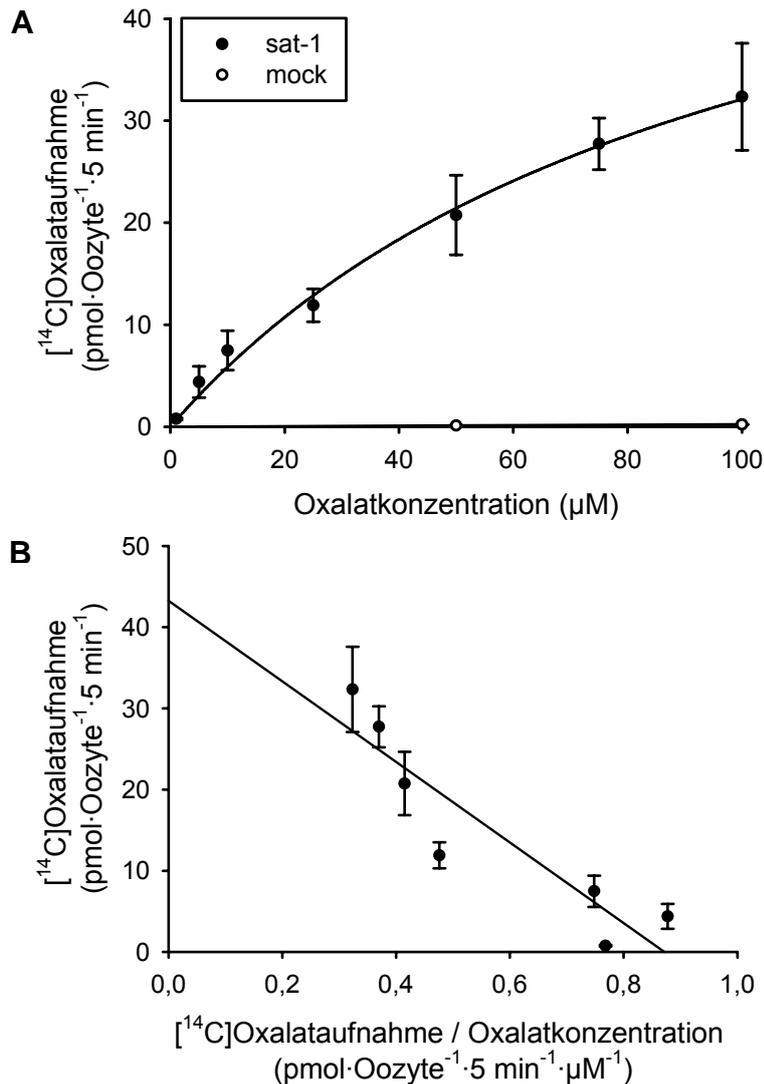


Abbildung 4.6 Konzentrationsabhängigkeit der Oxalataufnahme und Linearisierung nach Eadie-Hofstee

(A) Die Oxalataufnahme in rsat-1-exprimierende und wasserinjizierte (mock) Oozyten wurde bei steigenden Oxalatkonzentrationen von 1, 5, 10, 25, 50, 75 und 100 μM ^{14}C Oxalat bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen zwei bis drei Messungen an jeweils 6-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, (B) Eadie-Hofstee-Diagramm der Daten aus (A).

4.7 Hemmung der Oxalataufnahme durch aufsteigende Sulfatkonzentrationen

Sat-1-exprimierenden Oozyten wurden neben zwei verschiedenen Oxalatkonzentrationen aufsteigende Sulfatkonzentrationen im Aufnahmemedium angeboten und die Oxalataufnahme nach 5 min bestimmt (Abb. 4.7). Die Dixon

Plot-Analyse zeigte, dass es sich um eine kompetitive Hemmung mit einer K_i von $83 \pm 11 \mu\text{M}$ handelt.

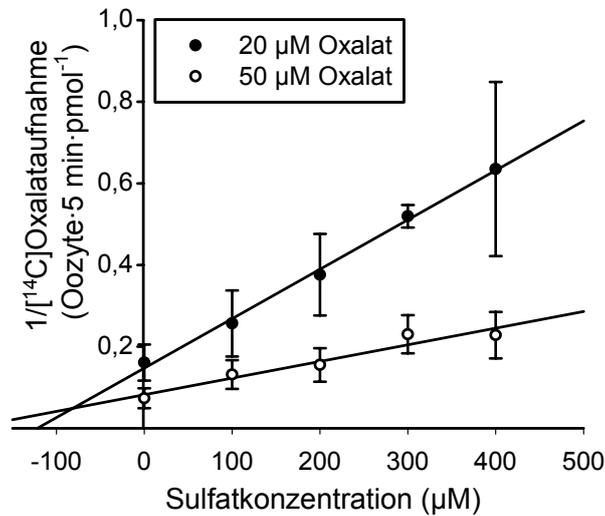


Abbildung 4.7 Hemmung der Oxalataufnahme durch aufsteigende Sulfatkonzentrationen (Dixon Plot Sulfat)

Die Oxalataufnahme (20 bzw. 50 μM [^{14}C]Oxalat) in rsat-1-exprimierende Oozyten wurde bei steigenden Sulfatkonzentrationen von 0, 100, 200, 300, 400 μM bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen drei Messungen an jeweils 6-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen.

4.8 Bestimmung der maximalen Sulfat- und Oxalataufnahme

Um zu bestimmen, ob der rsat-1 Sulfat oder Oxalat als Substrat bevorzugt, wurde die Sulfat- und Oxalataufnahme bei ca. 10facher Konzentration des K_m -Wertes bestimmt. Es wurden 500 μM Gesamtoxalat und 1500 μM Gesamtsulfat eingesetzt. Nach Abzug der Aufnahme in „mocks“ ergaben sich eine maximale Oxalataufnahme von $20 \pm 5 \text{ pmol}\cdot\text{Oocyte}^{-1}\cdot 5 \text{ min}^{-1}$ und eine maximale Sulfataufnahme von $34 \pm 6 \text{ pmol}\cdot\text{Oocyte}^{-1}\cdot 5 \text{ min}^{-1}$. Der Unterschied zwischen Sulfat- und Oxalataufnahme war nicht signifikant.

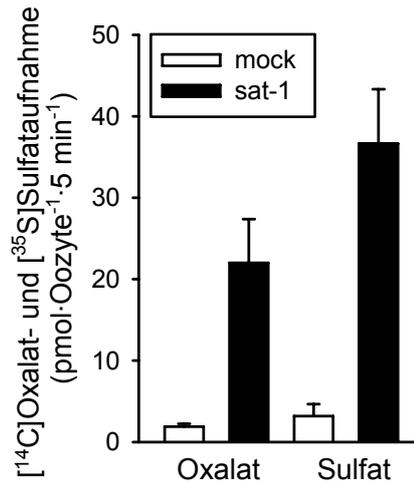


Abbildung 4.8 Maximale Aufnahme von Sulfat und Oxalat

Die Oxalataufnahme (500 µM Gesamtoxalat, davon 100 µM [¹⁴C]Oxalat) und die Sulfataufnahme (1500 µM Gesamtsulfat, 0,01 µM [³⁵S]Sulfat) in rsat-1-exprimierende und wasserinjizierte (mock) Oozyten wurde bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen vier Messungen an jeweils 10-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen.

4.9 Cis-Inhibition der Sulfat- und Oxalataufnahme mit physiologischen Oxalat-, Sulfat- und Bicarbonatkonzentrationen

Um herauszufinden, welches Substrat der sat-1 im Körper bevorzugt transportiert, wurden *cis*-Inhibitionsversuche mit Konzentrationen an Oxalat, Sulfat und Bicarbonat durchgeführt, die den Konzentrationen im menschlichen Blut entsprechen. Es wurden 20 µM Oxalat, 300 µM Sulfat und 25 mM Bicarbonat eingesetzt.

Die *cis*-Inhibitionsversuche zeigten, dass Bicarbonat bzw. die Kombination von Bicarbonat und Oxalat die [³⁵S]Sulfataufnahme um 93 ± 7 % bzw. 98 ± 2 % reduzieren, während Oxalat allein die Sulfataufnahme in diesem Konzentrationsverhältnis nicht signifikant hemmt (Abb. 4.9).

Die [¹⁴C]Oxalataufnahme wurde durch Bicarbonat um 95 ± 1 % und durch Sulfat um 70 ± 41 % reduziert. Die simultane Gabe von Bicarbonat und Sulfat hemmte die Oxalataufnahme mit 97 % nahezu vollständig (Abb. 4.10).

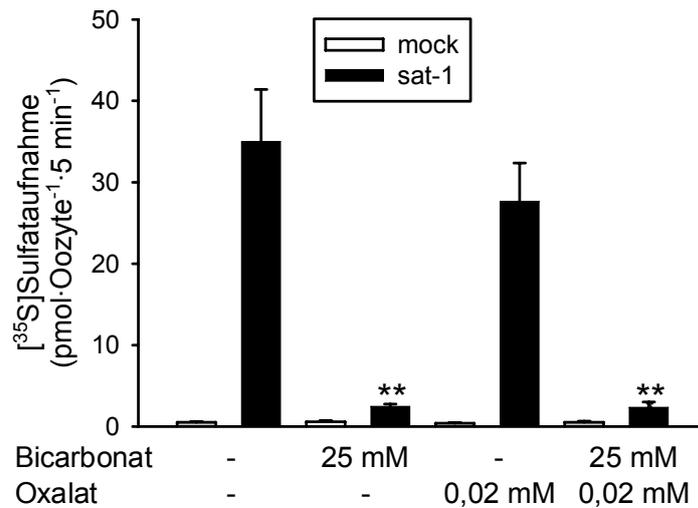


Abbildung 4.9 Cis-Inhibition der Sulfataufnahme durch physiologische Oxalat- und Bicarbonatkonzentrationen

Die Sulfataufnahme (300 µM Gesamtsulfat, 0,01 µM [³⁵S]Sulfat) in rsat-1-exprimierende und wasserinjizierte (mock) Oozyten wurde in Anwesenheit von 20 µM Oxalat und 25 mM Bicarbonat bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen drei Messungen an jeweils 8-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, ** p < 0,01.

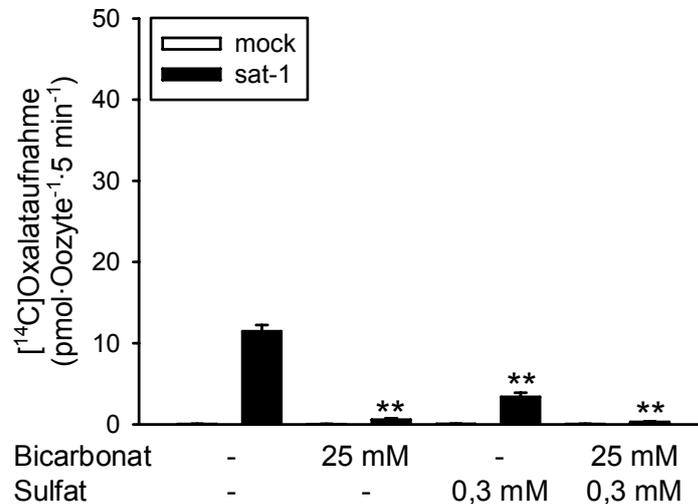


Abbildung 4.10 Cis-Inhibition der Oxalataufnahme durch physiologische Sulfat- und Bicarbonatkonzentrationen

Die Oxalataufnahme (20 µM [¹⁴C]Oxalat) in rsat-1-exprimierende und wasserinjizierte (mock) Oozyten wurde in Anwesenheit von 300 µM Sulfat und 25 mM Bicarbonat bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen drei Messungen an jeweils 8-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, ** p < 0,01.

4.10 Interaktionen des rsat-1 mit Bicarbonat

Um den Einfluss von Bicarbonat auf den Transport des rsat-1 zu zeigen, wurden *cis*-Inhibitionsversuche mit Sulfat, *trans*-Stimulationsversuche mit Oxalat und Sulfat, sowie ein Effluxexperiment mit Sulfat durchgeführt. Die Sulfataufnahme wurde durch die Anwesenheit von Bicarbonat um $44 \pm 7 \%$ gesenkt (Abb. 4.11). Sowohl die Sulfat- als auch die Oxalataufnahme wurde durch die Injektion von Bicarbonat signifikant um $53 \pm 30 \%$ bzw. $55 \pm 13 \%$ stimuliert (Abb. 4.12 A und B). In Gegenwart von Bicarbonat im umgebenden Medium war der Sulfatefflux signifikant um $25 \pm 3 \%$ erhöht (Abb. 4.13). Um die Osmolarität im Aufnahmemedium nicht zu verändern, wurden 25 mM NaCl durch 25 mM Bicarbonat ersetzt. Durch die geringere NaCl-Konzentration war der Sulfatefflux leicht, aber nicht signifikant erhöht.

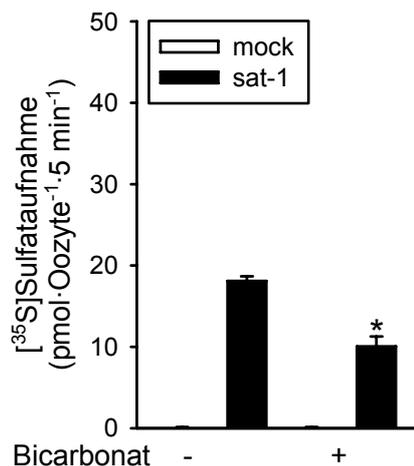


Abbildung 4.11 *Cis*-Inhibition der Sulfataufnahme durch Bicarbonat

Die Sulfataufnahme (20 μ M Gesamtsulfat, 0,01 μ M [³⁵S]Sulfat) in rsat-1-exprimierende und wasserinjizierte (mock) Oozyten wurde in Anwesenheit von 1 mM Bicarbonat bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen drei Messungen an jeweils 10-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, * $p < 0,05$.

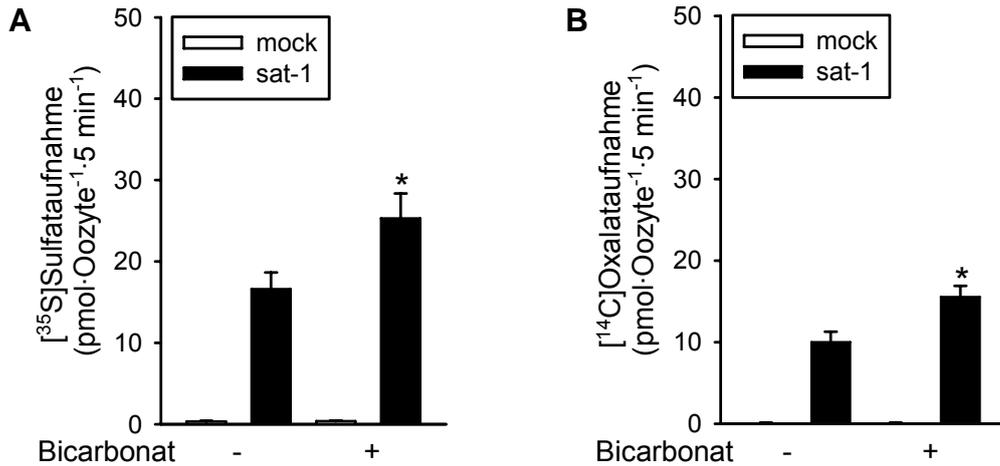


Abbildung 4.12 *Trans*-Stimulation der Sulfat- und Oxalataufnahme durch Bicarbonat

(A) Die Sulfataufnahme (50 μM Gesamtsulfat, 0,01 μM [³⁵S]Sulfat) in mit 23 nl ORi bzw. 50 mM Bicarbonat in ORi injizierten Oozyten und (B) die Oxalataufnahme (20 μM [¹⁴C]Oxalat) in mit 23 nl ORi bzw. 50 mM Bicarbonat in ORi injizierten Oozyten wurde unter Verwendung von rsat-1-exprimierenden und wasserinjizierten (mock) Oozyten gemessen. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen drei bzw. neun Messungen an jeweils 6-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, * $p < 0,05$.

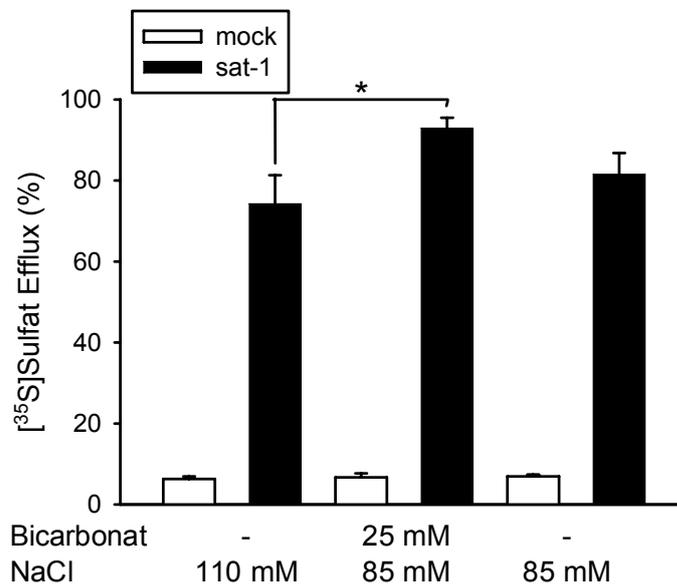


Abbildung 4.13 Sulfatefflux in Gegenwart von Bicarbonat

Der Sulfatefflux aus mit 23 nl [³⁵S]Sulfat (8 μM) injizierten Oozyten in An- und Abwesenheit von 25 mM Bicarbonat, in normalem ORi (110 mM NaCl) und modifiziertem ORi (85 mM NaCl) wurde unter Verwendung von rsat-1-exprimierenden und wasserinjizierten (mock) Oozyten bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 30 min, die Mittelwerte fassen 7 Messungen an jeweils 6-8 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, * $p < 0,05$.

4.11 Chloridabhängigkeit des rsat-1

Bis jetzt konnte noch nicht geklärt werden, ob der sat-1 Chlorid transportiert^{77,109,140}. Die Bestimmung der K_m der Sulfataufnahme in Gegenwart und in Abwesenheit von Chlorid, wobei Chlorid durch Gluconat ersetzt wurde, zeigte eine Stimulation der Sulfataufnahme in Gegenwart von Chlorid (Abb. 4.14). Bis zu einer Konzentration von 50 μM Sulfat unterscheidet sich die Sulfataufnahme in Anwesenheit signifikant von der Aufnahme in Abwesenheit von Chlorid. K_m und V_{max} wurden durch Linearisierung nach Eadie-Hofstee (Abb. 4.14 B) und mit Hilfe von SigmaPlot ermittelt. Die K_m nach Eadie-Hofstee betrug in Anwesenheit von Chlorid $64 \pm 21 \mu\text{M}$ und in Abwesenheit von Chlorid $59 \pm 6 \mu\text{M}$. Die V_{max} wurde durch die Abwesenheit von Chlorid verändert und sank von $32 \pm 8 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$ auf $14 \pm 3 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$. Die Datenanalyse mittels SigmaPlot ergab in Anwesenheit von Chlorid eine K_m von $93 \pm 33 \mu\text{M}$, die in Abwesenheit von Chlorid auf $171 \pm 44 \mu\text{M}$ anstieg. Die V_{max} lag in Anwesenheit von Chlorid bei $37 \pm 10 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$ und fiel in Abwesenheit von Chlorid auf $22 \pm 6 \text{ pmol} \cdot \text{Oozyte}^{-1} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$ ab.

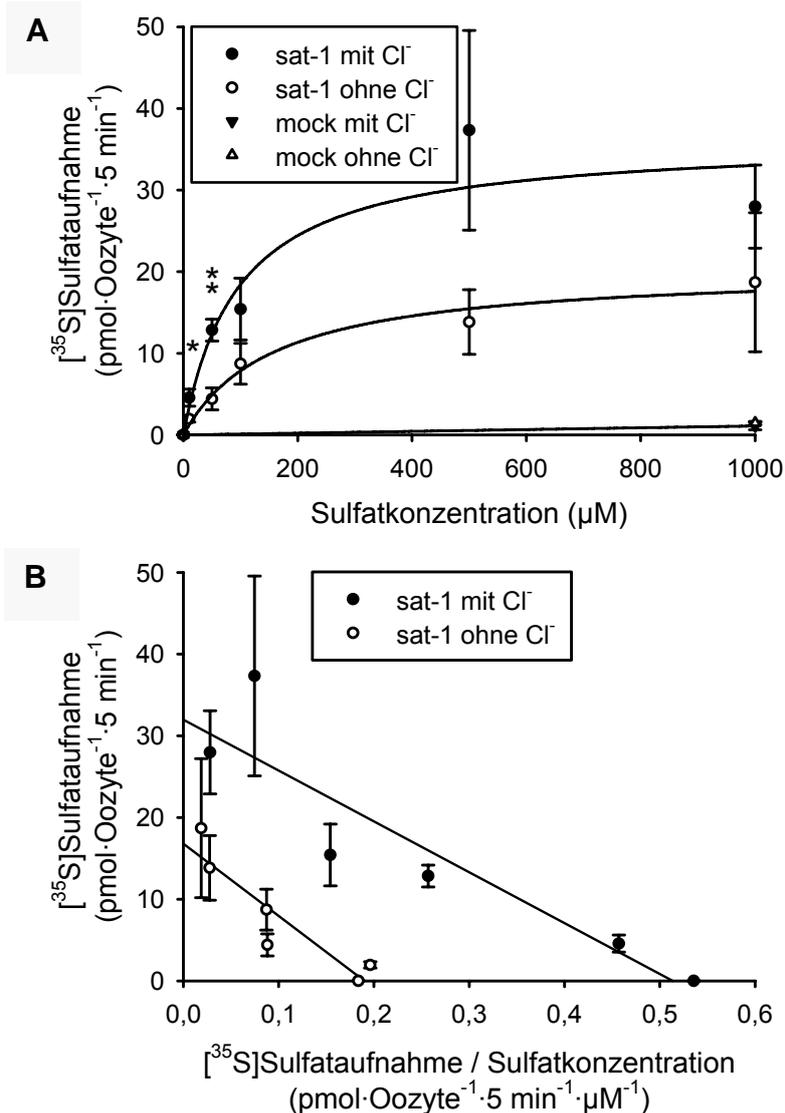


Abbildung 4.14 Sulfataufnahme in An- und Abwesenheit von Chlorid und Linearisierung nach Eadie-Hofstee

(A) Die Sulfataufnahme bei steigenden Sulfatkonzentrationen von 0,01, 10, 50, 100, 500 und 1000 μM Sulfat (0,01 μM $[\text{S}^{35}]$ Sulfat) wurde in An- und Abwesenheit von Chlorid und in rsat-1-exprimierende und wasserinjizierte (mock) Oozyten bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen vier Messungen an jeweils 6-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, (B) Eadie-Hofstee-Diagramm der Daten aus (A).

Durch einen Sulfat- und einen Oxalatefflux aus Oozyten in Gegenwart und Abwesenheit von Chlorid konnte gezeigt werden, dass der rsat-1 in Abwesenheit von Chlorid $38 \pm 8 \%$ weniger Sulfat und $32 \pm 4 \%$ weniger Oxalat aus den Oozyten in das umgebende Medium transportiert (Abb. 4.15). Als Kontrollgruppe diente hier ORi, der 113 mM Chlorid enthält, dieses wurde in der chloridfreien Gruppe durch Gluconat ersetzt.

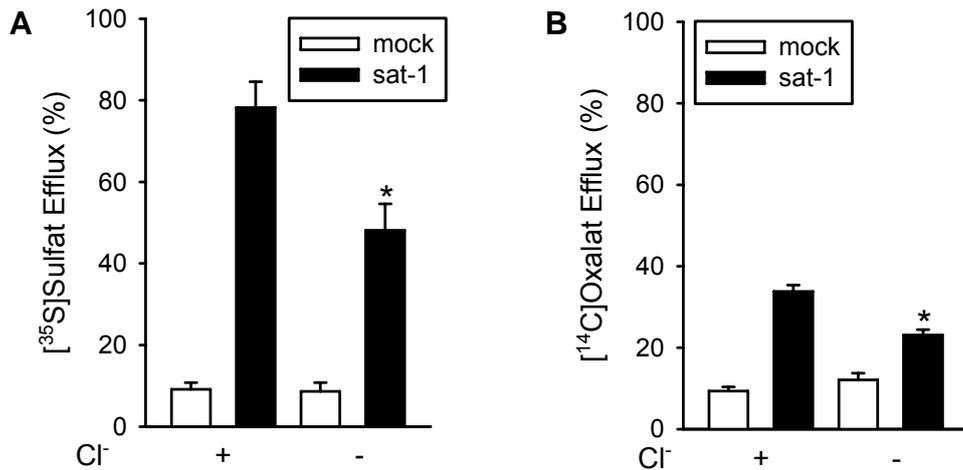


Abbildung 4.15 Sulfat- und Oxalatefflux in An- und Abwesenheit von Chlorid

(A) Der [³⁵S]Sulfatefflux von Oozyten injiziert mit 23 nl [³⁵S]Sulfat (8 μM) und (B) der [¹⁴C]Oxalatefflux von Oozyten injiziert mit 23 nl [¹⁴C]Oxalat (10 mM) wurde unter Verwendung von rsat-1-exprimierenden und wasserinjizierten (mock) Oozyten bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Die Mittelwerte fassen drei Messungen an jeweils 7-8 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, * p < 0,05.

4.12 Interaktionen von Phosphat mit dem rsat-1

Im *cis*-Inhibitionsversuch hemmte Phosphat die Sulfataufnahme signifikant um 43 ± 5 % (Abb. 4.16 A). Um zu untersuchen, ob rsat-1 möglicherweise auch Phosphat transportiert, wurden *trans*-Stimulationsversuche und ein Sulfatefflux in Gegenwart von Phosphat durchgeführt. Allerdings konnte die Sulfataufnahme durch die Vorbeladung mit Phosphat nicht erhöht werden (Abb. 4.16 B) und auch der Sulfattransport aus den Oozyten wurde nicht durch Phosphat stimuliert (Abb. 4.17).

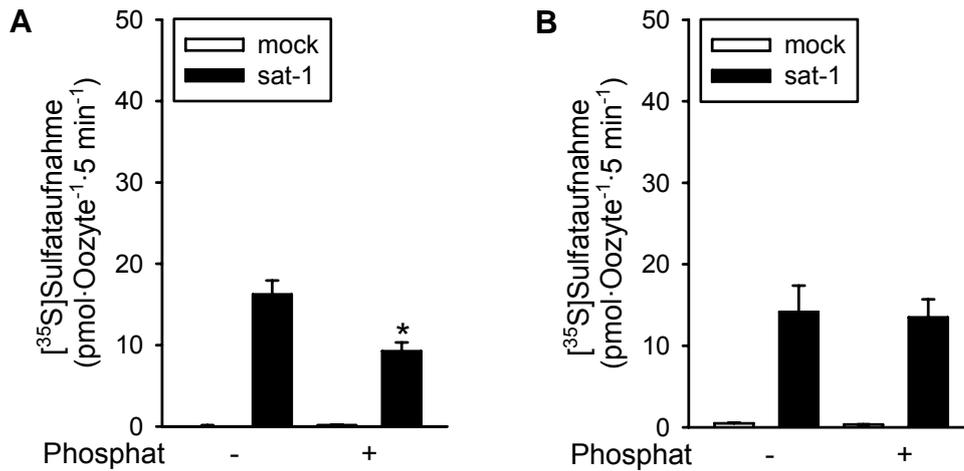


Abbildung 4.16 Cis-Inhibition und *trans*-Stimulation der Sulfataufnahme durch Phosphat

(A) Die Sulfataufnahme (20 µM Gesamtsulfat, 0,01 µM [³⁵S]Sulfat) wurde in An- und Abwesenheit von 1 mM Phosphat bestimmt. (B) Die Sulfataufnahme (50 µM Gesamtsulfat, 0,01 µM [³⁵S]Sulfat) in Oozyten injiziert mit 23 nl ORi bzw. 50 mM Phosphat in ORi wurde bestimmt. Es wurden rsat-1-exprimierende und wasserinjizierte (mock) Oozyten verwendet. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen drei bzw. fünf Messungen an jeweils 6-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, * p < 0,05.

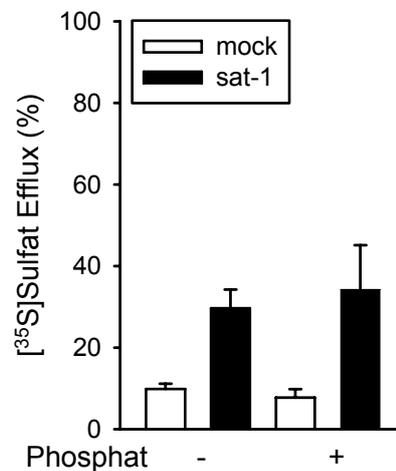


Abbildung 4.17 Sulfatefflux in Gegenwart von Phosphat

Der Sulfatefflux aus Oozyten injiziert mit [³⁵S]Sulfat (8 µM) wurde in An- und Abwesenheit von 2,5 mM Phosphat unter Verwendung von rsat-1-exprimierenden und wasserinjizierten (mock) Oozyten bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Die Mittelwerte fassen drei Messungen an jeweils 5-6 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen.

4.13 Interaktionen von Glycolat mit dem rsat-1

Die Sulfataufnahme wurde durch die Anwesenheit von bis zu 5 mM Glycolat nicht verändert (Abb. 4.18) und auch in *trans*-Stimulationsversuchen zeigte Glycolat keine Wirkung auf die Sulfat- und Oxalataufnahme (Abb. 4.19).

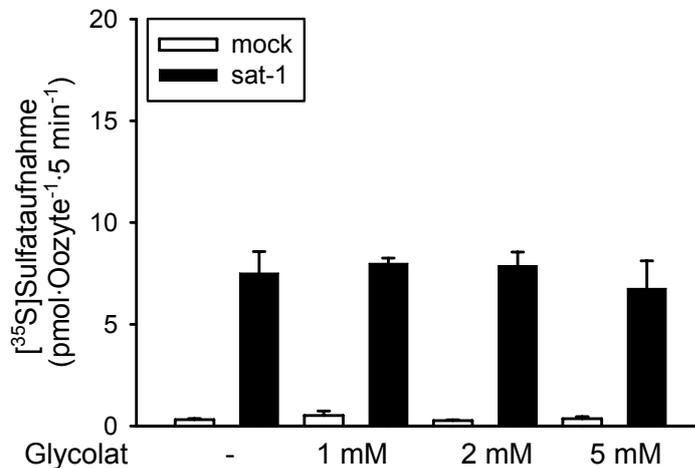


Abbildung 4.18 Cis-Inhibition der Sulfataufnahme durch Glycolat

Die Sulfataufnahme (20 µM Gesamtsulfat, 0,01 µM [³⁵S]Sulfat) wurde in An- und Abwesenheit von 1, 2 und 5 mM Glycolat unter Verwendung von rsat-1-exprimierenden und wasserinjizierten (mock) Oozyten bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen drei Messungen an jeweils 9-11 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen.

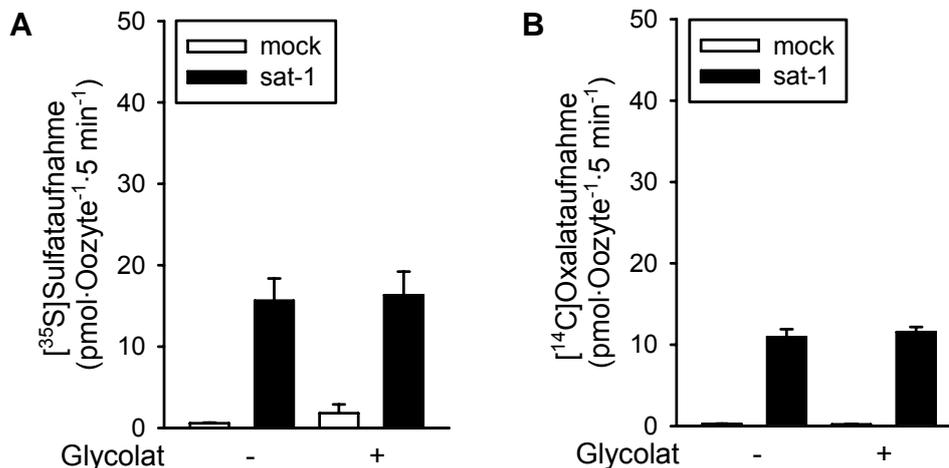


Abbildung 4.19 Trans-Stimulation der Sulfataufnahme durch Glycolat

(A) Die Sulfataufnahme (50 µM Gesamtsulfat, 0,01 µM [³⁵S]Sulfat) und (B) die Oxalataufnahme (20 µM [¹⁴C]Oxalat) in Oozyten injiziert mit 23 nl ORi bzw. 50 mM Glycolat in ORi wurde unter Verwendung von rsat-1-exprimierenden und wasserinjizierten (mock) Oozyten bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen vier Messungen an jeweils 4-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen.

4.14 Interaktionen von Glyoxylat mit dem rsat-1

Die Sulfataufnahme konnte nur durch sehr hohe Konzentrationen an Glyoxylat gehemmt werden. Während Glyoxylatkonzentrationen von 1 und 2 mM keinen Einfluss auf die Sulfataufnahme hatten, hemmte eine Glyoxylatkonzentration von 5 mM die Sulfataufnahme signifikant um $42 \pm 10 \%$ (Abb. 4.20). Aus diesen Daten konnte eine IC_{50} von $7,3 \pm 1,5$ mM für Glyoxylat bestimmt werden.

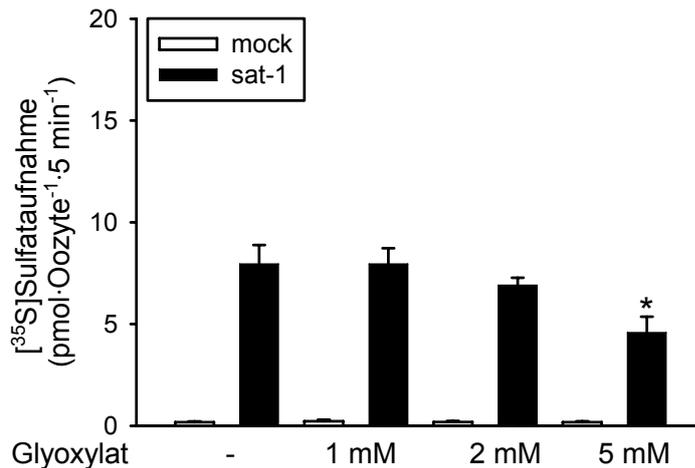


Abbildung 4.20 Cis-Inhibition der Sulfataufnahme durch Glyoxylat

Die Sulfataufnahme (20 μ M Gesamtsulfat, 0,01 μ M [³⁵S]Sulfat) wurde in Anwesenheit von 1, 2 und 5 mM Glyoxylat unter Verwendung von rsat-1-exprimierenden und wasserinjizierten (mock) Oozyten bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen drei Messungen an jeweils 8-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, * $p < 0,05$.

Sowohl die Sulfat- als auch die Oxalataufnahme wurde durch Glyoxylat signifikant *trans*-stimuliert. Während die Oxalataufnahme durch die Injektion mit Glyoxylat um den Faktor zwei zunahm (Abb. 4.22), kam es zu einer Vervierfachung der Sulfataufnahme (Abb. 4.21). Um eine Umwandlung von Glyoxylat in Oxalat auszuschließen, wurde *p*-Chlormercuribenzo-sulfonsäure (*p*CMBS) zusammen mit Glyoxylat in die Oozyten injiziert. *p*CMBS ist ein Hemmstoff der Glycolatoxidase. Die Sulfataufnahme wurde durch die Injektion von *p*CMBS nicht verändert, und die simultane Injektion von *p*CMBS und Glyoxylat beeinflusste die *trans*-Stimulation nicht.

Ein Effluxexperiment (Abb. 4.23), bei dem Glyoxylat im Bad angeboten wurde, zeigte außerdem, dass der [³⁵S]Sulfatfluss aus den Oozyten durch die Anwesenheit von Glyoxylat um $14 \pm 1 \%$ erhöht wurde.

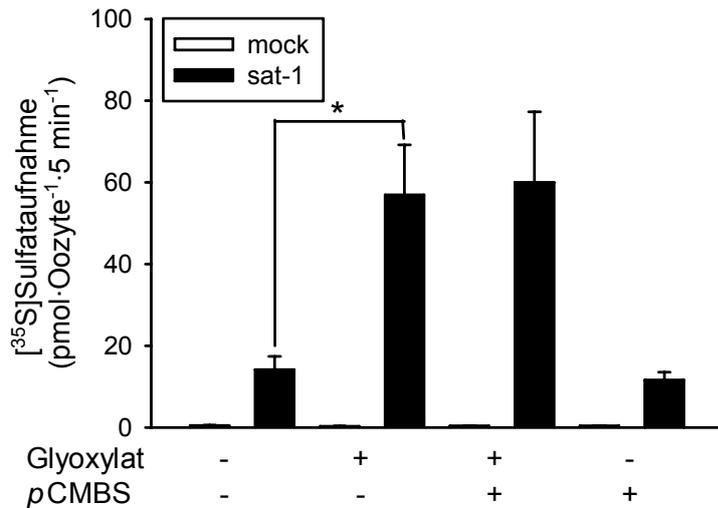


Abbildung 4.21 Trans-Stimulation der Sulfataufnahme durch Glyoxylat

Die Sulfataufnahme (50 μM Gesamtsulfat, 0,01 μM [^{35}S]Sulfat) in Oozyten injiziert mit 23 nl ORI, 50 mM Glyoxylat bzw. 1,74 mM pCMBS in ORI wurde unter Verwendung von rsat-1-exprimierenden und wasserinjizierten (mock) Oozyten bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen fünf Messungen an jeweils 9-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, * $p < 0,05$.

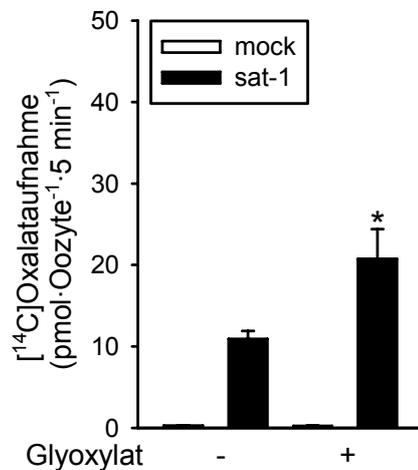


Abbildung 4.22 Trans-Stimulation der Oxalataufnahme durch Glyoxylat

Die Oxalataufnahme (20 μM [^{14}C]Oxalat) in Oozyten injiziert mit 23 nl ORI bzw. 50 mM Glyoxylat in ORI wurde unter Verwendung von rsat-1-exprimierenden und wasserinjizierten (mock) Oozyten bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die Mittelwerte fassen vier Messungen an jeweils 6-12 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, * $p < 0,05$.

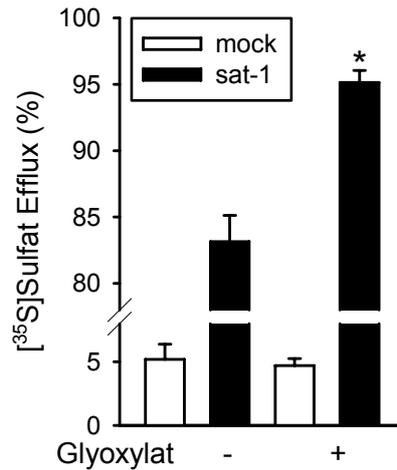


Abbildung 4.23 Sulfatefflux in Gegenwart von Glyoxylat

Der Sulfatefflux aus Oozyten injiziert mit [³⁵S]Sulfat (8 µM) wurde in An- und Abwesenheit von 50 µM Glyoxylat unter Verwendung von rsat-1- exprimierenden und wasserinjizierten (mock) Oozyten bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 30 min, die Mittelwerte fassen drei Messungen an jeweils 8 Oozyten unterschiedlicher Spendertiere zusammen, * p < 0,05.

4.15 Nachweis von hsat-1 RNA in HepG2-Zellen

Baker *et al.* zeigten 2001, dass es sich bei HepG2-Zellen um ein geeignetes Modell für den Oxalatmetabolismus in Hepatozyten handelt ³. Da HepG2-Zellen humanen Ursprungs sind ¹, wurden in den folgenden Experimenten Primer für den hsat-1 eingesetzt. Mittels RT-PCR konnten wir hsat-1 mRNA in HepG2-Zellen nachweisen. Die PCR-Produkte von hsat-1 und GAPDH hatten die erwartete Größe von 254 und 572 bp (Abb. 4.24).

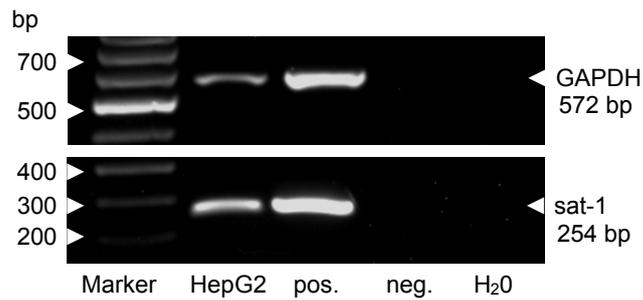


Abbildung 4.24 hsat-1 mRNA-Expression in HepG2-Zellen

Die Gesamt-RNA aus HepG2-Zellen wurde isoliert, mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und als Template für die PCR mit hsat-1- und GAPDH-spezifischen Primern verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese auf Agarosegelen getrennt und durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Gele zeigen ein repräsentatives Experiment. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit mRNA aus drei unabhängigen Passagen von HepG2-Zellen erzielt.

4.16 Inkubation von HepG2-Zellen in Oxalat und Oxalatvorstufen

Um den Einfluss von Oxalat und dessen Vorstufen auf die mRNA-Expression in HepG2-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 4 Tage in HepG2-Medium plus 1 mM Hydroxyprolin, Glycin, Glyoxylat, Glycolat bzw. 100 µM Oxalat inkubiert. Für die Analyse mittels *real-time* PCR wurden die Zellen zusätzlich in 1 mM Sulfat und in 20 mM Glycolat inkubiert. Die RNA wurde mittels TRIzol[®] isoliert, durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und für die PCR und *real-time* PCR verwendet. Mittels RT-PCR wurden GAPDH und hsat-1 RNA in den mit verschiedenen Substanzen inkubierten HepG2-Zellen nachgewiesen (Abb. 4.25).

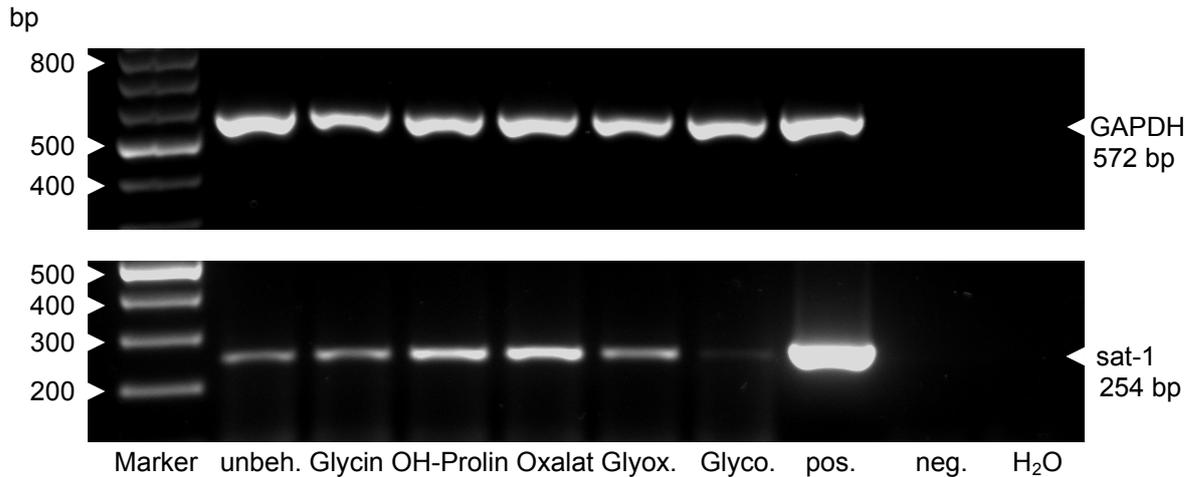


Abbildung 4.25 hsat-1 mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen

HepG2-Zellen wurden für 4 Tage in 1 mM Glycin, Hydroxyprolin, Glyoxylat und Glycolat bzw. 0,1 mM Oxalat inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und als Template für die PCR mit hsat-1- und GAPDH-spezifischen Primern verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese auf Agarosegelen getrennt und durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Gele zeigen ein repräsentatives Experiment. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit mRNA aus drei unabhängigen Passagen von HepG2-Zellen erzielt.

Für die *real-time* PCR wurden zwei verschiedene Assays verwendet, einer war gegen die Spleißvarianten 1 und 3, der andere gegen die Spleißvariante 2 gerichtet. Die hsat-1 mRNA-Expression der drei Spleißvarianten wurde durch Glyoxylat hochreguliert, die Expression der Varianten 1 und / oder 3 wurde nahezu achtfach erhöht während die Variante 2 vervierfacht wurde. Während Oxalat die Expression der Variante 2 nicht beeinflusste, wurde die Expression der Varianten 1 und / oder 3 durch Oxalat nahezu verdoppelt. Glycin, Hydroxyprolin, Sulfat und Glycolat zeigten keine Wirkung auf die hsat-1 mRNA-Expression (Abb. 4.26 und 4.27).

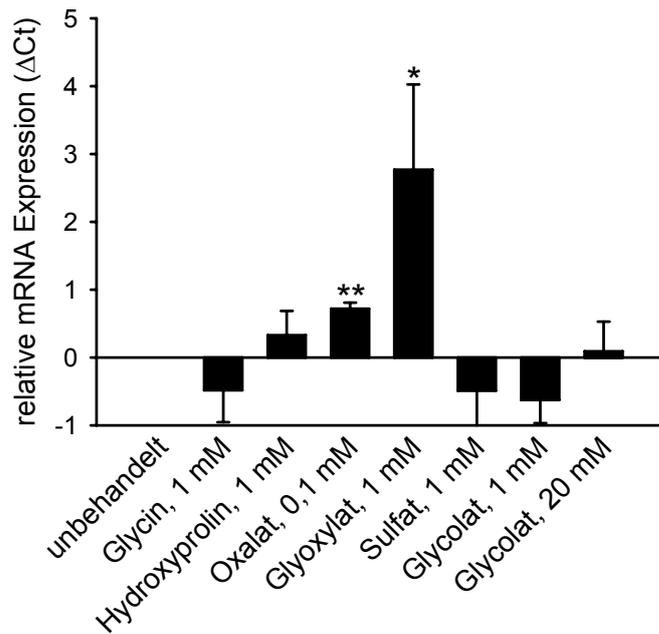


Abbildung 4.26 Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvarianten 1 und 3) in HepG2-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen

HepG2-Zellen wurden für 4 Tage in 1 mM Glycin, Hydroxyprolin, Glyoxylat, Sulfat, Glycolat, 20 mM Glycolat oder in 100 μ M Oxalat inkubiert. Der Taqman *real-time* PCR Assay war gegen die Spleißvarianten 1 und 3 gerichtet. Die hsat-1 mRNA-Expression wurde um die GAPDH mRNA-Expression korrigiert. Δ Ct gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten von unterschiedlichen Passagen der HepG2-Zellen mit je zwei Wiederholungen ermittelt, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

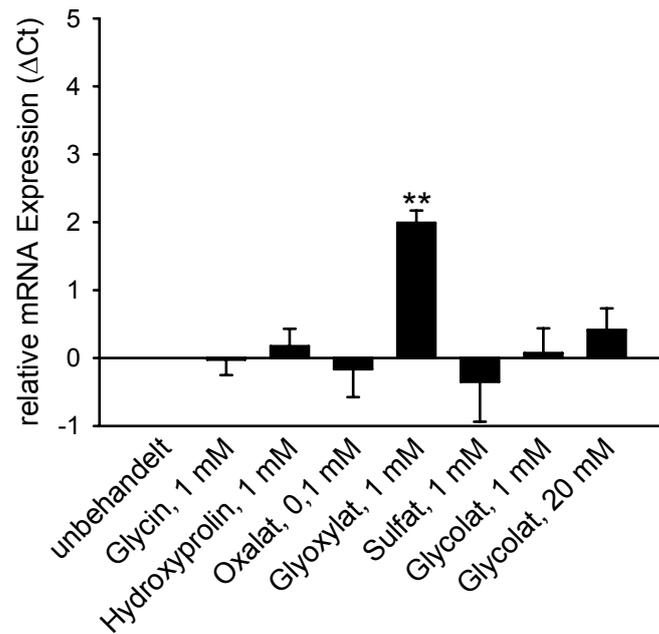


Abbildung 4.27 Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvariante 2) in HepG2-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen

HepG2-Zellen wurden für 4 Tage in 1 mM Glycin, Hydroxyprolin, Glyoxylat, Sulfat, Glycolat, 20 mM Glycolat oder in 100 μ M Oxalat inkubiert. Der Taqman *real-time* PCR Assay war gegen die Spleißvariante 2 gerichtet. Die hsat-1 mRNA-Expression wurde um die GAPDH mRNA-Expression korrigiert. Δ Ct gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten von unterschiedlichen Passagen der HepG2-Zellen mit je zwei Wiederholungen ermittelt, ** $p < 0,01$.

4.17 Zeitreihe der Inkubation von HepG2-Zellen in Glyoxylat

Da die Inkubation von HepG2-Zellen in 1 mM Glyoxylat zu einer vermehrten Expression der hsat-1 mRNA führte (Abb. 4.26 und 4.27), wurden die Zellen für ein bis sechs Tage in Glyoxylat inkubiert, um zu ermitteln, nach wie vielen Tagen die hsat-1 mRNA-Expression maximal erhöht ist. Mittels RT-PCR wurden GAPDH und hsat-1 mRNA in den für ein bis sechs Tage in 1 mM Glyoxylat inkubierten HepG2-Zellen nachgewiesen (Abb. 4.28).

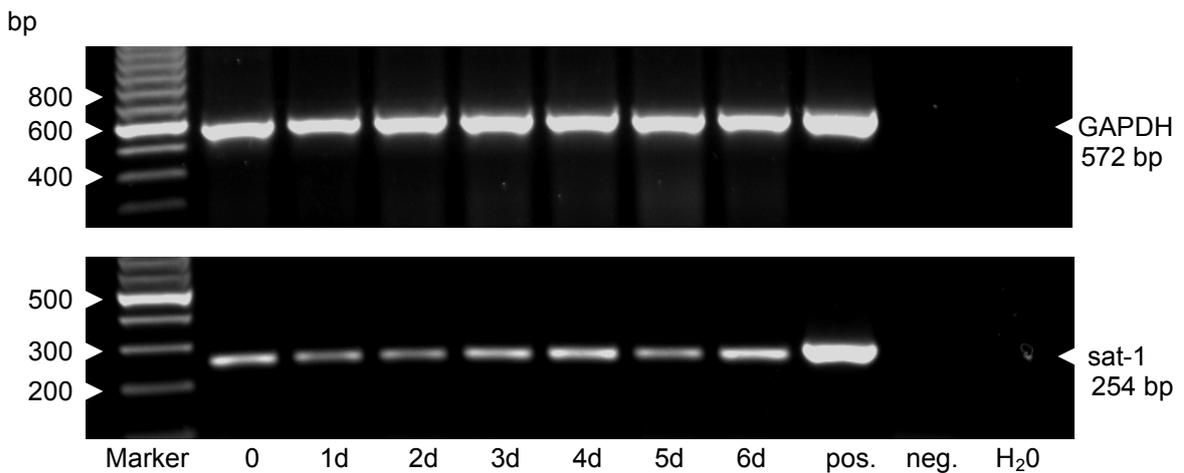


Abbildung 4.28 hsat-1 mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Inkubation für 1-6 Tage in Glyoxylat

HepG2-Zellen wurden für 1-6 Tage in 1 mM Glyoxylat inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und als Template für die PCR mit hsat-1- und GAPDH-spezifischen Primern verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese auf Agarosegelen getrennt und durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Gele zeigen ein repräsentatives Experiment. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit mRNA aus vier unabhängigen Passagen von HepG2-Zellen erzielt.

Die hsat-1 mRNA-Expression war an allen Inkubationstagen mindestens um den Faktor zwei erhöht. Während die Expression der Varianten 1 und / oder 3 am 1. und 4. Tag maximal war (Abb. 4.29), war die Expression der Variante 2 vom 3. bis zum 5. Tag besonders hoch (Abb. 4.30). Eine Varianzanalyse mittels ANOVA ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Inkubationstagen.

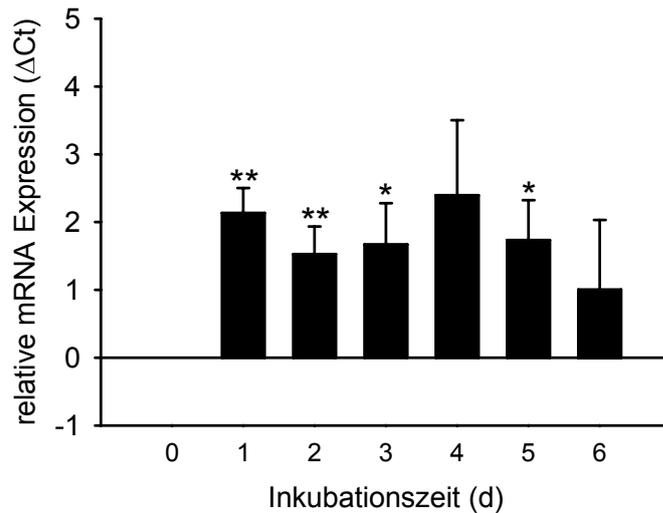


Abbildung 4.29 Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvarianten 1 und 3) in HepG2-Zellen nach Inkubation für 1-6 Tage in Glyoxylat

HepG2-Zellen wurden für 1-6 Tage in 1 mM Glyoxylat inkubiert. Der Taqman *real-time* PCR Assay war gegen die Spleißvarianten 1 und 3 gerichtet. Die hsat-1 mRNA-Expression wurde um die GAPDH mRNA-Expression korrigiert. Δ Ct gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte wurden aus fünf unabhängigen Experimenten von unterschiedlichen Passagen der HepG2-Zellen mit je zwei Wiederholungen ermittelt, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

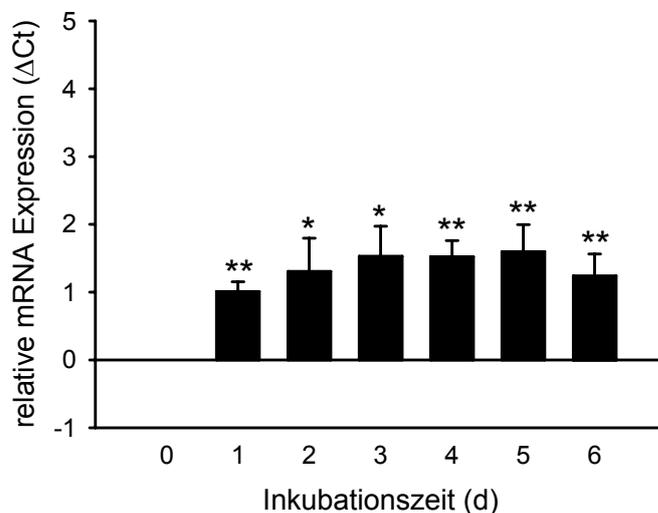


Abbildung 4.30 Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvariante 2) in HepG2-Zellen nach Inkubation für 1-6 Tage in Glyoxylat

HepG2-Zellen wurden für 1-6 Tage in 1 mM Glyoxylat inkubiert. Der Taqman *real-time* PCR Assay war gegen die Spleißvariante 2 gerichtet. Die hsat-1 mRNA-Expression wurde um die GAPDH mRNA-Expression korrigiert. Δ Ct gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte wurden aus vier unabhängigen Experimenten von unterschiedlichen Passagen der HepG2-Zellen mit je zwei Wiederholungen ermittelt, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.18 Konzentrationsreihe der Inkubation von HepG2-Zellen in Glyoxylat

Um die Glyoxylatkonzentration zu ermitteln, bei der die *hsat-1* mRNA-Expression maximal hochreguliert wird, wurden HepG2-Zellen für 3 und 4 Tage in Glyoxylatkonzentrationen von 0,1, 0,5, 1 und 2 mM inkubiert. Mittels RT-PCR wurden GAPDH und *hsat-1* mRNA in den Zellen detektiert (Abb. 4.31 und 4.33).

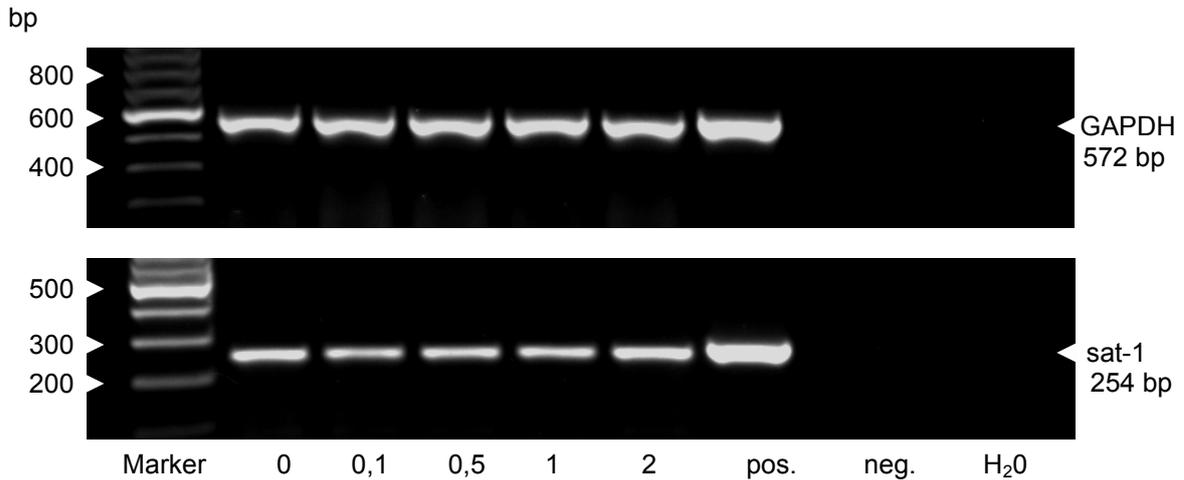


Abbildung 4.31 *hsat-1* mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Inkubation für 3 Tage in verschiedenen Glyoxylatkonzentrationen

HepG2-Zellen wurden für 3 Tage in 0, 0,1, 0,5, 1 und 2 mM Glyoxylat inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und als Template für die PCR mit *hsat-1*- und GAPDH-spezifischen Primern verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese auf Agarosegelen getrennt und durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Gele zeigen ein repräsentatives Experiment. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit mRNA aus drei unabhängigen Passagen von HepG2-Zellen erzielt.

Die Analyse mittels *real-time* PCR zeigte eine maximale Expression der Variante 2 der *hsat-1* mRNA bei einer Glyoxylatkonzentration von 2 mM nach 3 Tagen Inkubation. Während die Konzentrationen von 0,1 und 0,5 mM Glyoxylat die *hsat-1* mRNA-Expression kaum beeinflussten, wurde die Expression durch 1 und 2 mM Glyoxylat signifikant um den Faktor von 2 bzw. 6 erhöht (Abb. 4.32).

ERGEBNISSE

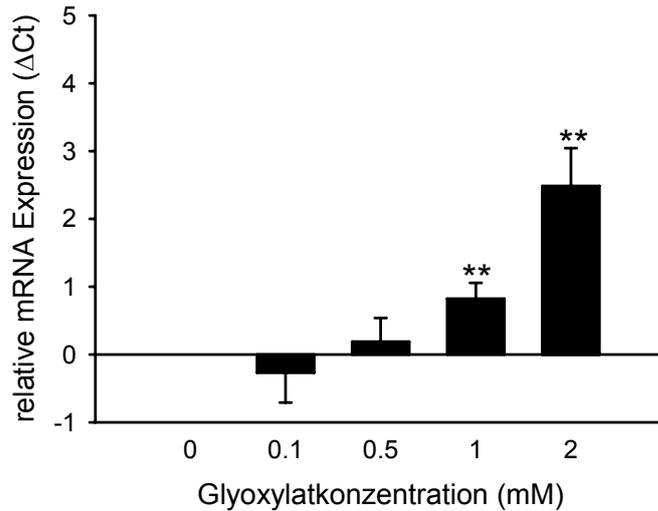


Abbildung 4.32 Relative hsa1 mRNA-Expression (Spleißvariante 2) in HepG2-Zellen nach dreitägiger Inkubation in aufsteigenden Glyoxylatkonzentrationen

HepG2-Zellen wurden für drei Tage in 0,1, 0,5, 1 und 2 mM Glyoxylat inkubiert. Der Taqman *real-time* PCR Assay war gegen die Spleißvariante 2 gerichtet. Die hsa1 mRNA-Expression wurde um die GAPDH mRNA-Expression korrigiert. ΔCt gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten von unterschiedlichen Passagen der HepG2-Zellen mit je zwei Wiederholungen ermittelt, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

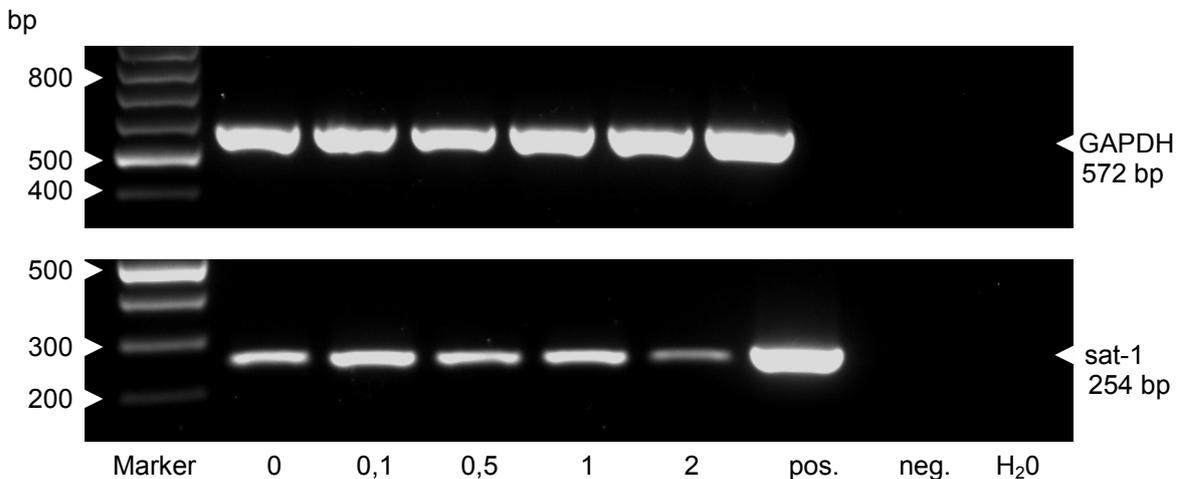


Abbildung 4.33 hsa1 mRNA-Expression in HepG2-Zellen nach Inkubation für 4 Tage in verschiedenen Glyoxylatkonzentrationen

HepG2-Zellen wurden für vier Tage in 0, 0,1, 0,5, 1 und 2 mM Glyoxylat inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und als Template für die PCR mit hsa1- und GAPDH-spezifischen Primern verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese auf Agarosegelen getrennt und durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Gele zeigen ein repräsentatives Experiment. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit mRNA aus drei unabhängigen Passagen von HepG2-Zellen erzielt.

In der *real-time* PCR Analyse führten alle getesteten Konzentrationen zu einer vermehrten mRNA-Expression der Spleißvarianten 1 und / oder 3. Während 0,1 mM die mRNA-Expression um 40 ± 10 % erhöhte, führten 0,5, 1 und 2 mM zu einer Stimulation der mRNA-Expression um den Faktor 4, 6 bzw. 18 (Abb. 4.34).

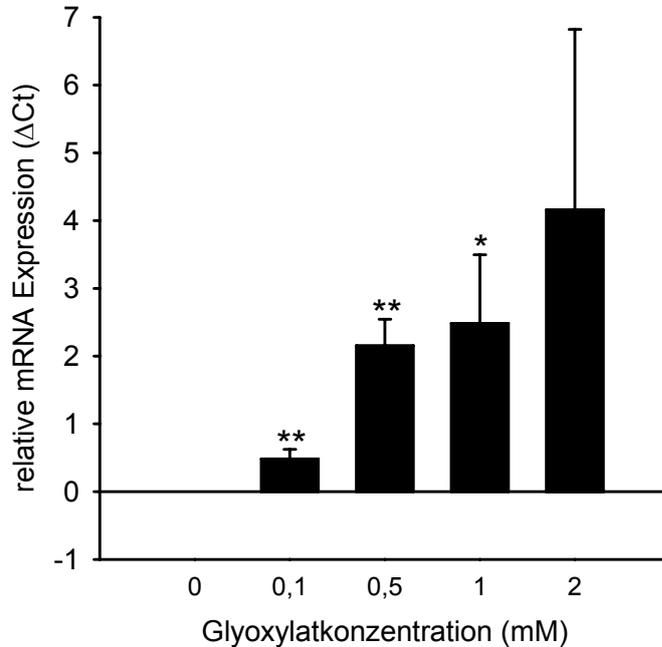


Abbildung 4.34 Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvarianten 1 und 3) in HepG2-Zellen nach viertägiger Inkubation in aufsteigenden Glyoxylatkonzentrationen

HepG2-Zellen wurden für vier Tage in 0,1, 0,5, 1 und 2 mM Glyoxylat inkubiert. Der Taqman *real-time* PCR Assay war gegen die Spleißvarianten 1 und 3 gerichtet. Die hsat-1 mRNA-Expression wurde um die GAPDH mRNA-Expression korrigiert. Δ Ct gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte wurden aus vier unabhängigen Experimenten von unterschiedlichen Passagen der HepG2-Zellen mit je zwei Wiederholungen ermittelt, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Auf die Expression der Variante 2 hatten die niedrigen Glyoxylatkonzentrationen (0,1 und 0,5 mM) nahezu keinen Effekt. Dagegen führten die Inkubation in 1 mM Glyoxylat zu einer Verdopplung der Expression und 2 mM zu einem Anstieg um den Faktor 6 (Abb. 4.35).

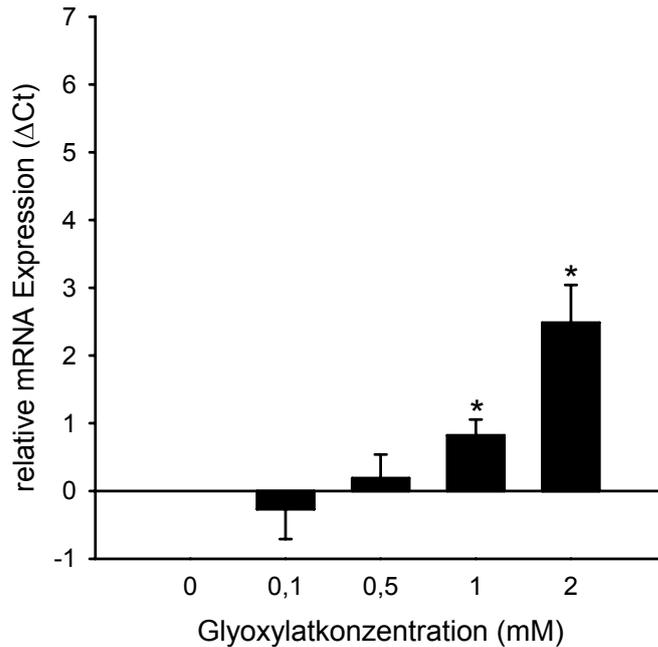


Abbildung 4.35 Relative hsat-1 mRNA-Expression (Spleißvariante 2) in HepG2-Zellen nach viertägiger Inkubation in aufsteigenden Glyoxylat-konzentrationen

HepG2-Zellen wurden für vier Tage in 0,1, 0,5, 1 und 2 mM Glyoxylat inkubiert. Der Taqman *real-time* PCR Assay war gegen die Spleißvariante 2 gerichtet. Die hsat-1 mRNA-Expression wurde um die GAPDH mRNA-Expression korrigiert. ΔC_t gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten von unterschiedlichen Passagen der HepG2-Zellen mit je zwei Wiederholungen ermittelt, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.19 hsat-1 Proteinexpression in HepG2-Zellen nach Inkubation in Glyoxylat

In der Western Blot Analyse konnte mit Hilfe des sat-1 Antikörpers eine Bande bei 70 kDa detektiert werden. Nach einer viertägigen Inkubation der HepG2-Zellen in Glyoxylat wurde das sat-1 Protein vermehrt exprimiert und eine zweite Bande bei 100 kDa wurde sichtbar. β -Aktin wurde als „Housekeeping“ Protein verwendet (Abb. 4.36).

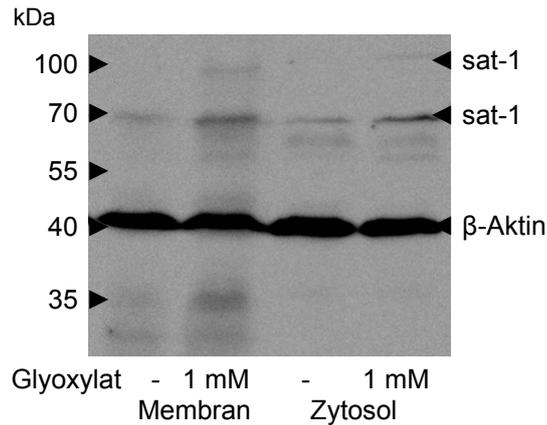


Abbildung 4.36 hsat-1 Proteinexpression in HepG2-Zellen nach Inkubation in Glyoxylat

Western Blot der Membran- und zytosolischen Proteinfraction aus HepG2-Zellen nach der Inkubation für 4 Tage in 1 mM Glyoxylat unter Verwendung eines anti- β -Aktin- und anti-sat-1-Antikörpers. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment und vergleichbare Ergebnisse wurden mit Protein aus zwei unabhängigen Passagen von HepG2-Zellen erzielt.

4.20 Funktionelle Analyse des erhöhten hsat-1 Proteins

Um zu zeigen, dass nicht nur die hsat-1 mRNA- und Proteinexpression erhöht ist, sondern dass das hochregulierte Protein funktional ist, wurde die Sulfataufnahme in HepG2-Zellen nach Glyoxylatinkubation untersucht. Die Sulfataufnahme war nach der viertägigen Inkubation in 1 mM Glyoxylat um $34 \pm 3 \%$ erhöht (Abb. 4.37).

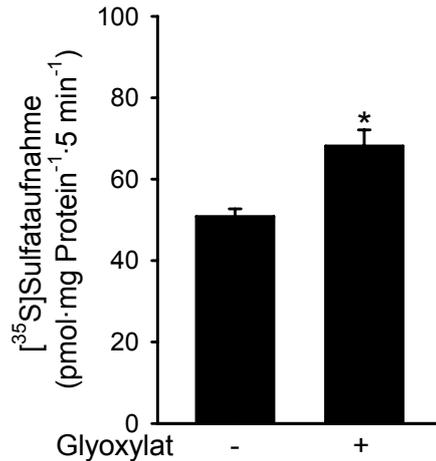


Abbildung 4.37 Sulfataufnahme in HepG2-Zellen nach Glyoxylatinkubation

Sulfataufnahme (50 µM Gesamtsulfat, 0,01 µM [³⁵S]Sulfate) in HepG2-Zellen nach viertägiger Inkubation in An- und Abwesenheit von 1 mM Glyoxylat. Die Mittelwerte fassen drei unabhängige Experimente mit 6 Wiederholungen pro Bedingung zusammen, * p < 0,05.

4.21 Weitere Transporter in HepG2-Zellen

Um auszuschließen, dass die erhöhte Sulfataufnahme auf einen anderen, ebenfalls in den HepG2-Zellen vorkommenden und auch Sulfat transportierenden Transporter zurückzuführen ist und um zu zeigen, dass ausschließlich sat-1 hochreguliert wurde, wurde eine RT-PCR mit Primern für den Chlorid-Formiat-Austauscher (CFEX), für die Monocarboxylattransporter 1 und 2 (MCT-1 und -2) und für den natriumabhängigen Sulfattransporter (NaS_i-1) durchgeführt. In den HepG2-Zellen wurden CFEX und MCT-1 mRNA, nicht jedoch NaS_i-1 und MCT-2 mRNA nachgewiesen (Abb. 4.38 A). Weder die Expression von CFEX noch von MCT-1 waren nach der viertägigen Inkubation in 1 mM Glyoxylat verändert (Abb. 4.38).

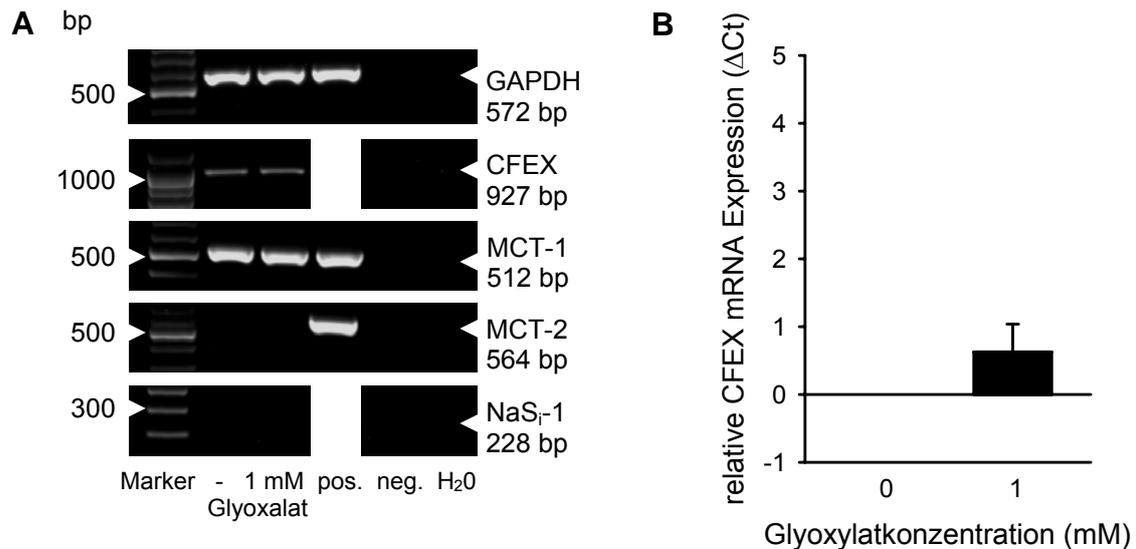


Abbildung 4.38 mRNA-Expression verschiedener Transporter in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden für vier Tage in 1 mM Glyoxylat inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. **(A)** Die PCR wurde mit spezifischen Primern (Tabelle 3.1) für CFEX, MCT-1, MCT-2, NaSi_i-1 und GAPDH durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese getrennt und durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit mRNA aus drei verschiedenen Passagen von HepG2-Zellen gewonnen. **(B)** Die Expression des CFEX in HepG2-Zellen wurde mittels Taqman *real-time* PCR bestimmt unter Verwendung von gegen CFEX gerichtete Taqman Assays. Die CFEX mRNA-Expression wurde um die GAPDH mRNA-Expression korrigiert. Δ Ct gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte fassen drei unabhängige Experimente aus unterschiedlichen Passagen von HepG2-Zellen mit je zwei Wiederholungen zusammen.

4.22 Verhalten der HepG2-Zellen unter Glyoxylatinkubation

Die Glyoxylatinkubation führte zu einem verminderten Zellwachstum. Die Proteinkonzentration nach einer viertägigen Inkubation in Glyoxylat war um 36 ± 7 % geringer als in unbehandelten Zellen, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Nach der Inkubation von HepG2-Zellen in 1 und 2 mM Glyoxylat für vier Tage behielt das Medium länger seine rote Farbe, während es bei den Kontrollzellen orange wurde (Abb. 4.39). Folglich sinkt der pH-Wert des Mediums in den unbehandelten Zellen schneller ab. Eine Überprüfung des pH-Wertes ergab, dass der pH-Wert nach der Inkubation in 1 mM Glyoxylat um ca. 0,5 pH-Einheiten höher ist als in Abwesenheit von Glyoxylat.

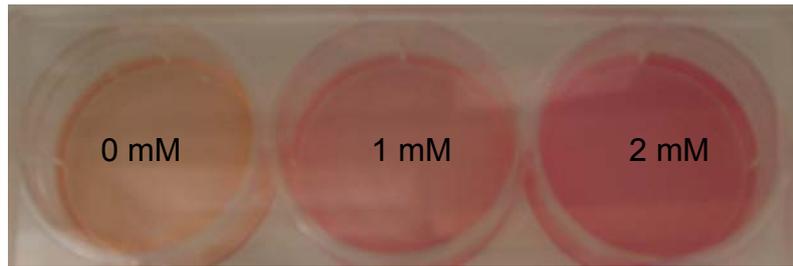


Abbildung 4.39 Medientfärbung nach Glyoxylatinkubation.

Inkubation der HepG2-Zellen für 4 Tage in HepG2-Medium mit 0, 1 und 2 mM Glyoxylat.

Durch die verminderte Zelldichte nach Glyoxylatinkubation haben die Zellen untereinander weniger Berührungsflächen. Um einen Einfluss der verminderten Zell-Zell-Kontakte auf die *hsat-1* mRNA-Expression auszuschließen, wurden die HepG2-Zellen mit halbiertes Dichte ausgesät. Die mittels TRIzol[®] isolierte RNA wurde für die RT *real-time* PCR verwendet. Es konnte kein stimulierender Effekt der verminderten Zell-Zell-Kontakte auf die *hsat-1* mRNA-Expression detektiert werden (Abb. 4.40).

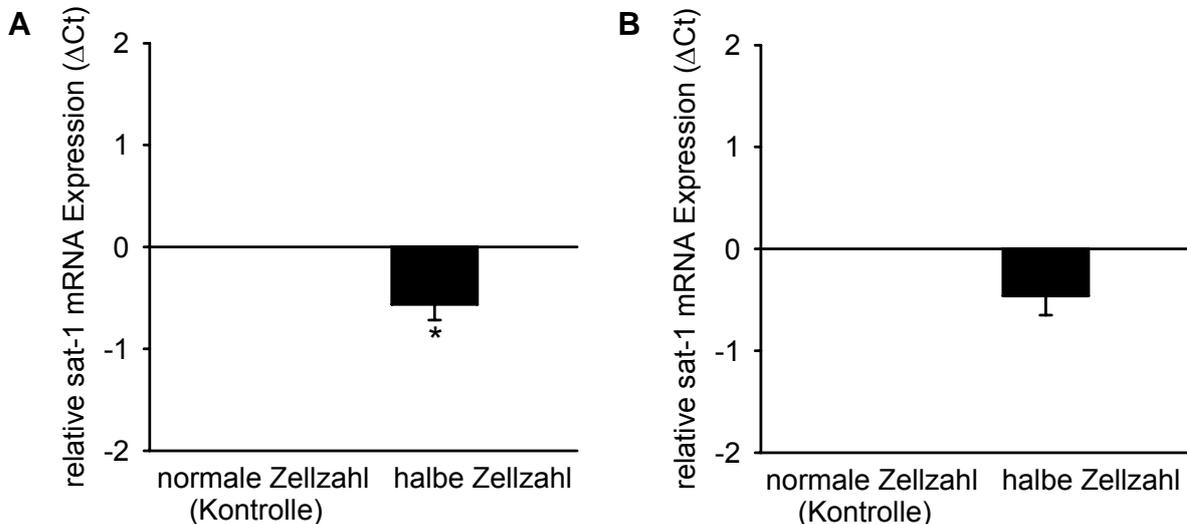


Abbildung 4.40 Relative *hsat-1* mRNA-Expression (Spleißvarianten 1, 2 und 3) in unterschiedlich dicht gewachsenen HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden mit einer Dichte von $5 \cdot 10^4$ / ml und $1 \cdot 10^5$ / ml (Kontrolle) ausgesät und für 6 Tage inkubiert. Die Taqman *real-time* PCR Assays waren (A) gegen die Spleißvarianten 1 und 3 und (B) gegen die Variante 2 gerichtet. Die *hsat-1* mRNA-Expression wurde um die GAPDH mRNA-Expression korrigiert. ΔCt gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten von unterschiedlichen Passagen der HepG2-Zellen mit je zwei Wiederholungen ermittelt.

5. DISKUSSION

Nierensteine sind eine Volkskrankheit, die hauptsächlich auf die Übersättigung des Urins mit Calciumoxalat zurückzuführen ist. Um die Oxalatausscheidung zu vermindern, ist es notwendig, den Oxalattransport und -metabolismus im Körper zu verstehen. Das Ziel dieser Arbeit war daher eine weitere Aufklärung des Substrattransports über den Sulfat-Oxalat-Bicarbonat-Austauscher, sat-1, und die Untersuchung des Einflusses von Oxalat und seinen Vorstufen auf die sat-1 Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene.

5.1 Substrattransport über den sat-1

Die Sulfataufnahme in rsat-1-exprimierende Oozyten zeigte Sättigungsverhalten, bereits nach 15 min sind ca. 75 % der maximal möglichen Sulfataufnahme erreicht (Abb. 4.1). Für alle weiteren Versuche wurde eine Aufnahmezeit von 5 min gewählt, bei der die Sulfataufnahme noch linear ansteigt. Dadurch wurde verhindert, dass bereits in die Oozyte aufgenommenes Sulfat die weitere Sulfataufnahme durch das Besetzen einer möglichen intrazellulären Bindungsstelle von innen hemmt. Bei längeren Aufnahmezeiten wäre auch ein Zurückfließen des Sulfats ins Medium aufgrund eines Sulfat-Sulfat-Austausches denkbar, der bei hohen Sulfatkonzentrationen im Medium allerdings eher unwahrscheinlich ist. Um das Ausfallen von Calciumoxalat zu vermeiden, wurden alle Transportexperimente an Oozyten unter nominal calciumfreien Bedingungen durchgeführt. Weder die Sulfataufnahme durch rsat-1 bei unterschiedlichen Aufnahmezeiten (Abb. 4.1) noch die K_m für Sulfat (Abb. 4.2) zeigten bei Calciumkonzentrationen von 0 und 2 μM Calciumabhängigkeit. BISSIG *et al.* ermittelten eine K_m von 136 μM in Anwesenheit von 1 mM Calcium⁶. Dieser Wert entspricht in etwa dem im Rahmen dieser Arbeit in Abwesenheit von Calcium ermittelten K_m -Wert von $113 \pm 27 \mu\text{M}$. Die Abwesenheit von Calcium verursacht einen Anstieg des Membranpotentials von -42 ± 7 auf $-10 \pm 3 \text{ mV}$ ⁷². Trotz dieser Depolarisation der Zellmembran war die Sulfataufnahme unter nominal calciumfreien Bedingungen unverändert, was auf einen elektroneutralen Aufnahmemodus schließen lässt.

Es konnte noch nicht geklärt werden, welches intrazelluläre Anion der sat-1 gegen Sulfat austauscht. Verschiedene Anionen wurden auf ihre Interaktion mit rsat-1 untersucht (Abb. 4.3). Während 1 mM Oxalat, Bicarbonat, Phosphat und Formiat die Sulfataufnahme signifikant hemmten, zeigten gleiche Konzentrationen der Oxalatvorstufen Glyoxylat und Glycolat, sowie Acetat, Laktat, Pyruvat und Ascorbat keinen Effekt auf die Sulfataufnahme. Da es sich bei Oxalat um ein Dicarboxylat handelt, wurde auch die Hemmung der Sulfataufnahme des rsat-1 durch weitere Dicarboxylate getestet. Allerdings beeinflussten Malonat, Succinat und Glutarat die Sulfataufnahme nicht. Möglicherweise verhindert das im Vergleich zum Oxalat verlängerte Kohlenstoffgrundgerüst dieser Dicarboxylate die Interaktion mit dem rsat-1.

Die Oxalataufnahme wurde durch Sulfat und die Sulfataufnahme durch Oxalat kompetitiv gehemmt. Es konnte eine K_i von $83 \pm 11 \mu\text{M}$ für Sulfat (Abb. 4.7) und eine K_i von $69 \pm 35 \mu\text{M}$ für Oxalat (Abb. 4.4) ermittelt werden. Die Oxalataufnahme zeigte Sättigungsverhalten mit einer K_m von $55 \pm 9 \mu\text{M}$ (Abb. 4.6), dieser Wert entsprach in etwa dem für die kompetitive Hemmung der Sulfataufnahme durch Oxalat ermittelten K_i -Wert. Während die Sulfataufnahme in Oozyten durch die Injektion von Oxalat erhöht war, wurde umgekehrt auch die Oxalataufnahme durch Sulfatinjektion stimuliert (Abb. 4.5). Auch der Sulfatefflux ist in Gegenwart von Oxalat erhöht⁷². Diese Beobachtungen weisen auf einen bidirektionalen Sulfat-Oxalat-Austausch hin und sind mit Ergebnissen aus basolateralen Membranvesikeln der Kaninchenniere vergleichbar⁷⁴. Studien an basolateralen Vesikeln betrachten allerdings nicht nur den sat-1, sondern schließen auch weitere mögliche Sulfat- und Oxalattransporter ein.

Bicarbonat ist ein weiteres mögliches Substrat des sat-1 und hemmt die Sulfataufnahme kompetitiv mit einer K_i von 2,7 mM⁷². Durch die Injektion von Bicarbonat in rsat-1-exprimierende Oozyten wurde sowohl die Sulfat- als auch die Oxalataufnahme signifikant *trans*-stimuliert (Abb. 4.12). Der Sulfatefflux war in Gegenwart von Bicarbonat im Medium erhöht (Abb. 4.13). Diese Ergebnisse und frühere Beobachtungen, dass die Sulfataufnahme durch den Carboanhydrasehemmer Acetazolamid gehemmt¹⁰⁷ und durch einen sauren extrazellulären pH stimuliert wird¹⁴⁰, zeigen, dass der sat-1 Sulfat auch gegen Bicarbonat austauscht.

Da die Sulfataufnahme in Anwesenheit von Chlorid erhöht ist, steht auch Chlorid als Austauschpartner für Sulfat zur Diskussion^{77,118,140}. Bei der Chloridaufnahme in sat-1-exprimierende Oozyten wurden Speziesunterschiede beobachtet: Während der humane sat-1 eine Chloridaufnahme zeigt, kommen Experimente mit dem Maus sat-1 zu unterschiedlichen Ergebnissen^{77,109,140}. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Sulfat- und Oxalatefflux in An- und Abwesenheit von Chlorid untersucht. Sowohl Sulfat- als auch Oxalatefflux waren in der Anwesenheit von Chlorid im Medium signifikant erhöht (Abb. 4.15). Obwohl die Sulfataufnahme in Abwesenheit von Chlorid vermindert war, änderte sich die K_m nicht, während die V_{max} auf die Hälfte des Ursprungswerts sank (Abb. 4.14). Möglicherweise handelt es sich um einen allosterischen Effekt und das Chlorid vereinfacht die Substratbindung oder den Substrattransport. Aufgrund der geringen spezifischen Aktivität von ³⁶Chlorid wurde auf Aufnahmeexperimente mit dieser Substanz verzichtet. Die in dieser Arbeit mit rsat-1 erzielten Ergebnisse bestätigen indirekt die Ergebnisse von XIE *et al.*¹⁴⁰, der keine Translokation von Chlorid über den msat-1 detektierte.

Auch Phosphat hemmte die Sulfataufnahme in Oozyten (Abb. 4.16 A). Da der basolaterale Phosphattransporter noch nicht bekannt ist¹⁰⁶, könnte der sat-1 möglicherweise diese Aufgabe übernehmen. Da Phosphat allerdings weder im *trans*-Stimulationsversuch noch im Efflux gegen Sulfat austauschte (Abb. 4.16 B und 4.17), handelt es sich wahrscheinlich nicht um ein Substrat des sat-1. Zu bedenken ist allerdings, dass beim pH des Oozytenringers das Phosphat zu 39 % als primäres Phosphat ($H_2PO_4^-$) und zu 61 % als sekundäres Phosphat (HPO_4^{2-}) vorliegt. Da in dieser Arbeit nicht zwischen primärem und sekundärem Phosphat differenziert wurde, ist es möglich, dass nur ca. die Hälfte des Phosphats in einer für den sat-1 akzeptablen Form vorlag. Bei der *cis*-Inhibition wurde eine Phosphatkonzentration von 1 mM verwendet, beim Efflux 2,5 mM und bei der *trans*-Stimulation wurde die intraoozytäre Konzentration auf ca. 2 mM geschätzt. Daher ist der mangelnde Effekt auf Efflux und *trans*-Stimulation der Sulfat- bzw. Oxalataufnahme wahrscheinlich nicht auf eine zu geringe Phosphatverfügbarkeit zurückzuführen.

Da Formiat die Sulfataufnahme nur sehr schwach hemmte (Abb. 4.3), wurde auf weitere Versuche mit Formiat verzichtet.

5.2 Die Bedeutung des sat-1 für den Anionentransport im proximalen Tubulus der Niere

Die Frage, ob der sat-1 unter physiologischen Bedingungen Sulfat, Oxalat oder Bicarbonat transportiert, konnte bisher in der Literatur noch nicht abschließend geklärt werden. Oxalat wird im Glomerulus frei filtriert und im proximalen Tubulus zusätzlich absorbiert und sezerniert. Der bidirektionale Transport führt zu einer Nettosekretion von ca. 25 % der filtrierten Oxalatsmenge^{34,137}. Die Plasmaoxalatkonzentration liegt normalerweise bei 1-5 μM , kann bei Patienten mit primärer Hyperoxalurie aber auf über 30 μM ansteigen¹¹⁷. In eigenen Versuchen hemmte die simultane Gabe von Bicarbonat und Sulfat die Oxalataufnahme nahezu vollständig (Abb. 4.10). Möglicherweise reichen die verbleibenden 3 % Oxalattransport und die hohe Affinität des sat-1 zum Oxalat aus, um genügend Oxalat in die Zelle zu transportieren. Die Bedeutung des Oxalattransports über den sat-1 nimmt zu, wenn die Plasmaoxalatkonzentration wie bei der primären Hyperoxalurie ansteigt. Durch den luminalen natriumabhängigen Sulfattransporter ($\text{NaS}_i\text{-1}$)⁸⁸ ist die intrazelluläre Sulfatkonzentration proximaler Tubuluszellen wahrscheinlich höher als die Konzentration im Blut. Die intrazelluläre Bicarbonatkonzentration ist niedriger als die extrazelluläre¹⁴⁴. Daher vermuten wir, dass die intrazelluläre Bindungsstelle des sat-1 bevorzugt Sulfat bindet, während Bicarbonat und Oxalat um die extrazelluläre Bindungsstelle konkurrieren. Dies führt zu einer Aufnahme von Oxalat oder Bicarbonat in die Zelle, während Sulfat in das Blut abgegeben wird. Oxalat gelangt über den Chlorid Formiat Austauscher (CFEX)⁶⁷ im Austausch gegen Chlorid in den Urin und Bicarbonat wird, um eine Alkalisierung der Zelle zu vermeiden, über den Natrium Bicarbonat Cotransporter (NBC1)¹¹⁴ zurück ins Blut transportiert.

Neue Erkenntnisse wurden durch die sat-1 *knock-out* Maus gewonnen¹⁹. Bei dieser *knock-out* Maus ist die Oxalatausscheidung im Urin erhöht. Dies könnte auf die vermehrte Oxalatesorption im Darm und die dadurch erhöhte Plasmaoxalatkonzentration zurückzuführen sein. Als andere Ursache für die gesteigerte Urinoxalatausscheidung in der *knock-out* Maus wäre denkbar, dass der sat-1 das Oxalat im gesunden Tier eher aus der Zelle ins Blut transportiert. Auch die fraktionelle Exkretion des Oxalats weist darauf hin, dass Oxalat vermutlich nicht sezerniert, sondern resorbiert wird. Die fraktionelle Exkretion lag

bei 0,68 und erhöhte sich in den *knock-out* Tieren auf 0,80¹⁹. Folglich könnte der sat-1 eine Rolle in der Rückresorption des Oxalats aus dem Urin spielen.

5.3 Die Aufgabe des sat-1 in der Leber

In den Hepatozyten der Leber ist der sat-1 in der sinusoidalen Membran lokalisiert¹⁰⁷. HUGENTOBLETER *et al.* zeigten den Austausch von Sulfat und Oxalat an sinusoidalen Membranvesikeln und die Stimulation der Sulfataufnahme durch einen einwärts gerichteten, also außen saureren, pH-Gradienten⁵⁶. Da die Oxalatsynthese in der Leber stattfindet, ist die Oxalatkonzentration in der Leber höher als im Blut und liegt bei ca. 70 μM ³. Daher nimmt Oxalat in der Leber wahrscheinlich die intrazelluläre Bindungsstelle des sat-1 ein. Das Oxalat wird vermutlich im Austausch gegen Bicarbonat oder Sulfat aus der Leber ins Blut transportiert. Während das Bicarbonat in der Leber der pH-Homöostase dienen könnte, wird Sulfat für Sulfatierungsreaktionen benötigt. Da bei der sat-1 *knock-out* Maus Sulfat für Entgiftungsreaktionen in der Leber fehlt, dient wahrscheinlich eher Sulfat als Austauschpartner. Allerdings könnte das verminderte Sulfatangebot in der Leber auch auf die gesenkte Plasmasulfatkonzentration zurückzuführen sein. Eine genauere Aussage könnte über die Bestimmung des pH-Wertes in der Leber der *knock-out* Maus getroffen werden.

In Abbildung 5.1 ist der Sulfat- und Oxalattransport in den Hepatozyten der Leber und in den proximalen Tubuluszellen der Nieren zusammenfassend dargestellt.

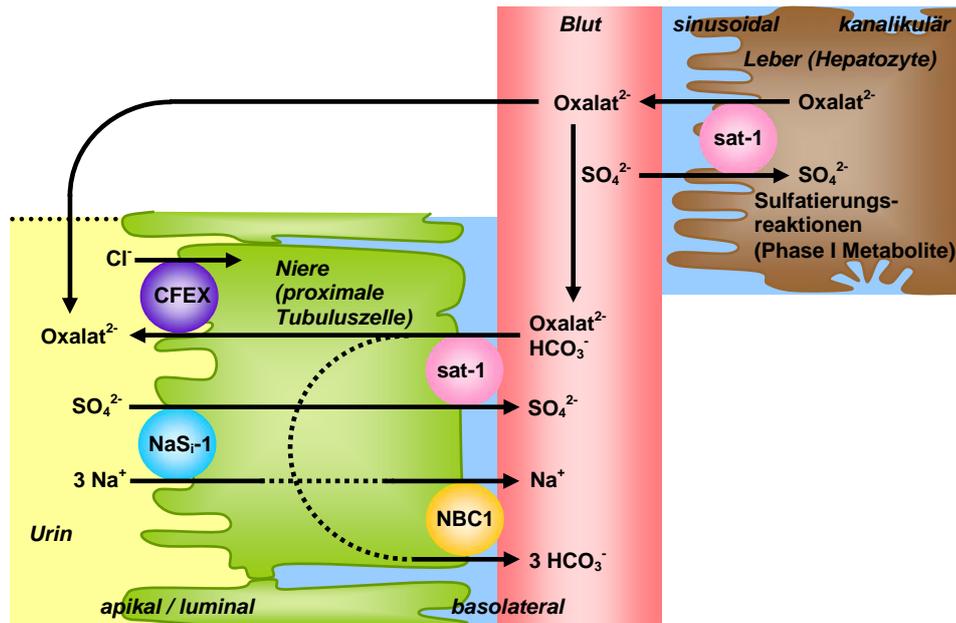


Abbildung 5.1 Modell des Sulfat- und Oxalattransports in Leber und Nieren

CFEX: Chlorid Formiat Austausch, NaS_r-1: natriumabhängiger Sulfattransporter 1, NBC1: Natrium Bicarbonat Cotransporter 1, sat-1: Sulfat Anionen Transporter 1

Die mit der *sat-1 knock-out* Maus¹⁹ erzielten Ergebnisse entsprechen nicht vollständig den Modellvorstellungen von der Funktion des *sat-1*. Man ging davon aus, dass das in der Leber produzierte Oxalat über den *sat-1* ins Blut abgegeben wird. In der Leber der *sat-1 knock-out* Maus müsste es folglich zur Akkumulation von Oxalat kommen. Die grobe histologische Untersuchung der Leber zeigte allerdings keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *knock-out* Maus. Eine unveränderte Glycolatausscheidung weist darauf hin, dass der Oxalatmetabolismus in den *knock-out* Tieren wahrscheinlich nicht beeinträchtigt ist¹⁹. Allerdings wäre das Messen der intrahepatozytären Oxalat-, Glycolat- und Glyoxylatkonzentration eine zu bevorzugende Methode, um einen veränderten Oxalatmetabolismus auszuschließen.

Es bleibt unklar, ob ein weiterer Oxalattransporter an der Oxalatrofreisetzung aus der Leber beteiligt ist. Eigene Ergebnisse mit HepG2-Zellen bestätigten die Untersuchungen von KNAUF *et al.*, die die CFEX mRNA in Lebergewebe der Maus nachwiesen⁶⁷. Allerdings steigt bei der CFEX *knock-out* Maus das Plasmaoxalat auch bei oxalatfreier Ernährung an, folglich handelt es sich beim CFEX auch nicht um den Transporter, der Oxalat aus der Leber heraus transportiert.

mRNA des DTDST (diastrophische Dysplasie Sulfat Transporter) wurde mittels Northern Blot in der Leber lokalisiert³⁸ und der DTDST ist in der Lage, Oxalat zu transportieren⁴³. Allerdings ist nicht bekannt, dass es bei der Mutation des DTDST, die zur diastrophischen Dysplasie führt, zu einer Oxalatakkumulation in der Leber kommt.

Da CFEX und DTDST als mögliche Kandidaten ausscheiden, bleibt unklar, wie das Oxalat in der *sat-1 knock-out* Maus aus der Leber ins Blut abgegeben wird oder ob der Oxalatmetabolismus in den *knock-out* Tieren möglicherweise doch beeinträchtigt ist.

5.4 Die Bedeutung des *sat-1* für die Translokation von Vorstufen des Oxalats

Glyoxylat und Glycolat sind die direkten Vorstufen des Oxalats. Während es sich beim Oxalat um ein Dicarboxylat handelt, weisen Glyoxylat und Glycolat nur eine Carboxylgruppe auf. Glyoxylat besitzt eine Aldehyd-, Glycolat eine Hydroxylgruppe anstelle der zweiten Carboxylgruppe des Oxalats. Da sich die molekularen Strukturen stark ähneln, könnte vermutet werden, dass der *sat-1* nicht nur Oxalat^{62,72,77,109}, sondern auch Glyoxylat und Glycolat transportiert. In *rsat-1*-exprimierenden Oozyten war eine Glyoxylatkonzentration von 5 mM (IC_{50} : $7,3 \pm 1,5$ mM) notwendig, um die Sulfataufnahme signifikant zu hemmen (Abb. 4.20). Glycolat in denselben Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf die Aufnahme des Sulfats (Abb. 4.18). Glyoxylat und Glycolat haben folglich nur eine sehr geringe Affinität zum *sat-1* oder werden nicht transportiert. BAKER *et al.* konnten zeigen, dass beide Substanzen in HepG2-Zellen aufgenommen werden. Es wird vermutet, dass Glycolat von dem ubiquitären Monocarboxylat Transporter 1 (MCT-1) transportiert wird³, der im Rahmen dieser Arbeit in HepG2-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.38). MCT-1 hat eine sehr niedrige Affinität zu Glyoxylat und Glycolat, die K_m -Werte betragen 27 und 7 mM⁵⁷. Wahrscheinlich handelt es sich beim MCT-1, wenigstens in Bezug auf Glyoxylat, nicht um den Haupttransportweg.

5.5 Stimulation der sat-1 Expression durch Glyoxylat

Bei der Inkubation von HepG2-Zellen in Glyoxylat steigen die intrazelluläre Glyoxylat- und Glycolat- und die extrazelluläre Oxalat- und Glycolatkonzentration an³. Da die intrazelluläre Oxalatkonzentration konstant bleibt, während das Oxalat im Medium ansteigt, findet offensichtlich ein Oxalattransport ins Medium statt. Eine Oxalatakkumulation würde zu intrazellulären Schäden führen⁶⁰, daher ist ein schneller auswärtsgerichteter Oxalattransport notwendig. Da die Inkubation von HepG2-Zellen mit Glyoxylat zu einer erhöhten hsat-1 Expression führte (Abb. 4.26 und 4.27), handelt es sich möglicherweise um einen sat-1 vermittelten Oxalattransport.

Die *real-time* PCR wurde mit zwei unterschiedlichen Primersets durchgeführt, da drei Spleißvarianten, die zwei verschiedene Isoformen des hsat-1 codieren, bekannt sind¹⁰⁹ (National Center for Biotechnology Information). Die Varianten 1 und 3 unterscheiden sich nur im 5'-nichttranslatierten Bereich und kodieren folglich wahrscheinlich für das gleiche Protein. Dagegen hat die Variante 2 einen abweichenden und verkürzten C-Terminus. Wahrscheinlich ist das aus nur 224 Aminosäuren bestehende Protein nicht in der Lage, eine Transportfunktion auszuüben. Von einem anderen Transporter, dem NKCC2 (Natrium Kalium Chlorid Cotransporter 2), weiss man, dass eine kürzere Isoform, die allerdings auch selbst für einen Transporter codiert, möglicherweise die Aktivität der längeren Isoform reguliert³². Obwohl die physiologische Bedeutung der verschiedenen Isoformen noch nicht geklärt wurde, zeigten beide Primersets bei den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen vergleichbare Veränderungen der hsat-1 mRNA-Expression.

Sat-1 wurde aus drei Gründen als ein möglicher Kandidat des erhöhten Oxalattransports aus HepG2-Zellen identifiziert (Abb. 1.3). Erstens wurde die hsat-1 mRNA-Expression durch die viertägige Inkubation der HepG2-Zellen in Glyoxylat erhöht, während Glycolat, Glycin, Hydroxyprolin, Sulfat und in gewissem Ausmaß auch Oxalat keinen Einfluss auf die hsat-1 mRNA-Expression hatten (Abb. 4.26 und 4.27). Dieser Effekt wurde schon am ersten Inkubationstag beobachtet (Abb. 4.29 und 4.30). Auch eine Inkubation der HepG2-Zellen in

20 mM Glycolat blieb ohne Wirkung auf die *hsat-1* mRNA-Expression. Der Vergleich mit den Ergebnissen von BAKER *et al.* zeigt, dass wahrscheinlich bedeutend höhere Glycolatkonzentrationen notwendig wären, um eine Oxalatsynthese zu erreichen, die der Inkubation mit Glyoxylat entspricht, um damit einen dem Glyoxylat vergleichbaren Effekt zu erzielen ³.

Zweitens steigert Glyoxylat die *hsat-1* mRNA-Expression konzentrationsabhängig (Abb. 4.34 und 4.35).

Drittens konnte eine erhöhte Expression eines funktionellen *hsat-1* Proteins gezeigt werden. Unter Verwendung eines anti-*sat-1*-Antikörpers konnte im Western Blot sowohl in der Plasmamembran als auch im Zytosol von HepG2 Zellen eine Bande bei 70 kDa identifiziert werden (Abb. 4.36). Eine zweite, sehr schwache Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa zeigte sich nur nach der Inkubation der HepG2-Zellen in Glyoxylat. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von KARNISKI *et al.* überein, die eine Bande bei 68 kDa und eine weitere bei 98 kDa identifizierten, bei der es sich möglicherweise um das glycosylierte *sat-1* Protein handelt ⁶². Während das *sat-1* Protein unter nativen Bedingungen, d. h. wenn das *sat-1* Protein aus der basolateralen Membran der Niere von Ratte oder Kaninchen isoliert wurde, glycosyliert vorliegt, ist das *sat-1* Protein bei der Expression in Insektenzellen (Sf9) nicht oder nur teilweise glycosyliert. Da *sat-1*-exprimierende Sf9 Zellen Sulfat und Oxalat transportieren, ist die Glycosylierung zumindest in diesen Zellen nicht notwendig für den Transport ⁶². Im Gegensatz dazu zeigten MARKOVICH *et al.*, dass eine gerichtete Mutagenese der Glycosylierungsstellen des *rsat-1* zu einem verminderten Sulfattransport führt ⁸⁶. Das *hsat-1* Protein hat zwei mögliche extrazelluläre *N*-Glycosylierungsstellen ¹⁰⁹. In eigenen Versuchen trat nach der Inkubation der HepG2-Zellen mit Glyoxylat in den Zellen sowohl die glycosylierte als auch die nicht-glycosylierte Form auf. Die erhöhte Sulfataufnahme in HepG2-Zellen nach Glyoxylatinkubation könnte auf die erhöhte Proteinexpression zurückzuführen sein, die durch eine stärkere Bande bei 70 kDa nachgewiesen wird oder durch die Glycosylierung des Proteins. Die Zunahme der Sulfataufnahme beweist die vermehrte Expression eines funktionellen *hsat-1* Proteins (Abb. 4.37)

Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf einem anderen Sulfattransporter, dessen Expression ebenfalls durch die Glyoxylatinkubation beeinflusst wird, zurückzuführen ist, wurde die mRNA-Expression verschiedener Transporter in HepG2-Zellen untersucht. Keiner der in Frage kommenden Sulfattransporter, wie CFEX und NaS_i-1^{75,140}, wurde durch die Glyoxylatinkubation verstärkt exprimiert. NaS_i-1 wurde in HepG2-Zellen nicht exprimiert, während CFEX durch die Inkubation mit Glyoxylat nicht hochreguliert wurde (Abb. 4.38).

5.6 Möglicher Wirkmechanismus des Glyoxylats

Das verminderte Wachstum und der verringerte Proteingehalt der HepG2-Zellen nach Inkubation der Zellen in Glyoxylat (Kap. 4.22) wurde von PATEL *et al.* auch an Chorionkarzinomzellen (JEG-3) nach Glyoxylatinkubation beobachtet. Dieser Effekt ist möglicherweise auf eine Hemmung der Sekretion von Wachstumshormonen durch Glyoxylat zurückzuführen¹⁰⁴. Ein Effekt der geringeren Zelldichte auf die *hsat-1* mRNA-Expression konnte ausgeschlossen werden.

REGEEER *et al.* wiesen in der Promoterregion des *hsat-1* Abschnittes nach, die stark Vitamin D- und Schilddrüsenhormon-responsiven Elementen ähneln. Allerdings konnte bei der funktionellen Analyse dieser Elemente mittels Luciferase Assay keine Stimulation der Promotoraktivität durch Vitamin D oder Schilddrüsenhormone detektiert werden¹⁰⁹.

Für die HepG2-Zellen wurde eine Inkubationsdauer von 1-6 Tagen ausgewählt, um anschließend die mRNA-Expression des *hsat-1* zu bestimmen. Allerdings konnten RAHEJA *et al.* zeigen, dass es bei der Inkubation von Caco-2 Zellen mit *Lactobacillus acidophilus* bereits nach acht Stunden zu einer Stimulation der DRA (*Down Regulated in Adenoma*) mRNA-Expression kommt und die Proteinexpression nach 24 Stunden signifikant erhöht ist¹⁰⁸. Möglicherweise wären in eigenen Experimenten die Effekte der Glyoxylatinkubation in den HepG2-Zellen bereits nach weniger als 24 Stunden sichtbar gewesen.

Interessanterweise ist die Promotoraktivität des DRA nach acht Stunden maximal erhöht und fällt nach zwölf Stunden bereits wieder auf den Ausgangswert ab¹⁰⁸.

Folglich wäre es möglich, dass die von REGEER *et al.* für die Inkubation mit Vitamin D verwendete Zeit von 24 Stunden zu lang war, um einen Effekt des Vitamin D auf den sat-1 Promotor zu detektieren¹⁰⁹. Dem widerspricht allerdings, dass bei der Inkubation des NaS_i-1 Promotors nach 24 Stunden die Promotoraktivität erhöht wurde¹⁸.

Die Vitamin D-Wirkung ist bei chronischem Nierenversagen vermindert³⁰. Ein Grund hierfür könnte die Hemmung der Interaktion zwischen Hormonrezeptorkomplex und Vitamin D-responsiven Elementen durch urämische Toxine sein¹⁰³. Urämische Toxine bilden möglicherweise Schiff'sche Basen mit den Lysinresten der DNA-bindenden Domäne des Vitamin D-Rezeptors und verhindern so die Interaktion des Vitamin D-Rezeptors mit Vitamin D-responsiven Elementen. In vitro und in vivo hemmt Glyoxylat die Wirkung des Vitamin D-Rezeptors¹⁰⁴. Eine Glyoxylatinfusion in Ratten reduziert die 24-Hydroxylaseaktivität signifikant und verursacht eine Einschränkung der Nierenfunktion¹⁰⁴. FERNANDES *et al.* zeigten eine verringerte mRNA- und Proteinexpression des sat-1 bei experimentell hervorgerufenem chronischen Nierenversagen in Ratten²⁸.

Da die Plasmakonzentration des Glyoxylats sehr gering ist und bei 3 µM liegt¹⁴³ und die Konzentration in der Leber 20 µM beträgt³, ist eine dem Tierversuch vergleichbare Wirkung des Glyoxylats beim Menschen eher unwahrscheinlich.

5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Transportmodi des sat-1 und der Einfluss von Oxalat und seinen Vorstufen auf die Expression des sat-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Während der sat-1 in der Leber produziertes Oxalat im Austausch gegen Sulfat ins Blut abgibt, tauscht der sat-1 in der Niere wahrscheinlich eher Bicarbonat gegen in die proximale Tubuluszelle zurückresorbiertes Sulfat aus. Ob und in welche Richtung Oxalat in der Niere transportiert wird, konnte noch nicht geklärt werden.

Glyoxylat konnte als ein weiteres mögliches Substrat des sat-1 identifiziert werden und stimuliert die sat-1 mRNA- und Proteinexpression in HepG2-Zellen. Der sat-1 ist möglicherweise am erhöhten auswärtsgerichteten Oxalattransport bei Hyperoxalurie beteiligt. Weiterer Forschungsbedarf besteht in der Frage, ob diese Substratinduktion auch beim gesunden Menschen auftritt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Nierensteine sind eine weit verbreitete Erkrankung und bestehen meistens aus Calciumoxalat. Über den Oxalattransport im Körper ist bis heute wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Sulfat Anionen Transporter 1 (sat-1) untersucht, der neben Sulfat auch Oxalat und Bicarbonat transportiert und in Leber, Nieren und wahrscheinlich auch im Darm lokalisiert ist.

Die Transportcharakteristika des sat-1 wurden in sat-1-exprimierenden Oozyten, die Regulation des sat-1 in HepG2-Zellen, die den sat-1 endogen exprimieren, untersucht.

Der sat-1 transportiert sowohl Sulfat als auch Oxalat, es konnten K_m -Werte von $113 \pm 27 \mu\text{M}$ und $55 \pm 9 \mu\text{M}$ ermittelt werden und er ist in der Lage, Sulfat, Oxalat und Bicarbonat gegeneinander auszutauschen. Ein Transport von Chlorid und Phosphat über den sat-1 konnte weitgehend ausgeschlossen werden. Glyoxylat wird wahrscheinlich über den sat-1 transportiert und ist die einzige Vorstufe des Oxalats, die die sat-1 mRNA-Expression erhöhte. Nach der Inkubation der HepG2-Zellen in Glyoxylat war sowohl die sat-1 Proteinexpression als auch die Sulfataufnahme in die Zellen erhöht.

In der Leber gibt der sat-1 wahrscheinlich das in den Hepatozyten produzierte Oxalat im Austausch gegen Sulfat ins Blut ab. In der Niere wird Sulfat über den natriumabhängigen Sulfattransporter (NaS_i-1) rückresorbiert und möglicherweise durch den sat-1 im Austausch gegen Oxalat oder Bicarbonat ins Blut abgegeben.

Die Oxalatvorstufe Glyoxylat konnte als neues Substrat des sat-1 identifiziert werden. Die gesteigerte Expression der sat-1 mRNA und eines funktionellen sat-1 Proteins durch Glyoxylat zeigt, dass Glyoxylat möglicherweise bei der Hyperoxalurie für die vermehrte Oxalatfreisetzung aus Hepatozyten verantwortlich ist.

ABSTRACT

Kidney stones are a commonly occurring problem and mainly consist of calcium oxalate. However, little is known about oxalate transport in the body and therefore, in this work the role of sulfate anion transporter 1 (sat-1) was investigated. Sat-1 is responsible for transporting not only sulfate, but also oxalate and bicarbonate. In the body, it is localized in liver, kidneys and possibly also in the intestine.

Sat-1 transport mechanisms were analyzed in sat-1 expressing oocytes. Since HepG2 cells endogenously express sat-1, these cells were used to investigate the regulation of sat-1 expression.

The K_m values for sat-1 mediated transport of sulfate and oxalate were determined to be $113 \pm 27 \mu\text{M}$ and $55 \pm 9 \mu\text{M}$, respectively. Sat-1 exchanges sulfate, oxalate, and bicarbonate bidirectionally. Chloride and phosphate do not seem to be substrates of sat-1. Transport of glyoxylate is most likely mediated by sat-1 and glyoxylate was the only oxalate-precursor that resulted in increased sat-1 mRNA levels in HepG2 cells. Incubation with glyoxylate also increased sat-1 protein expression as well as sulfate uptake in HepG2 cells.

The oxalate produced by hepatocytes in the liver is possibly released by sat-1 in exchange for sulfate from the blood. In the kidneys, sulfate is reabsorbed from the urine by a sodium dependent sulfate transporter ($\text{NaS}_1\text{-1}$) and is perhaps transported into the blood by sat-1 in exchange for oxalate or bicarbonate. Oxalate's precursor glyoxylate was identified as a new substrate of sat-1. Increased expression of mRNA and of a functional sat-1 protein by glyoxylate shows that sat-1 is possibly also responsible for enhanced oxalate release from hepatocytes during hyperoxaluria.

7. LITERATUR

1. **Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB** (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **282**: 615-616.
2. **Aroeti B, Okhrimenko H, Reich V, Orzech E** (1998) Polarized trafficking of plasma membrane proteins: emerging roles for coats, SNAREs, GTPases and their link to the cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* **1376**: 57-90.
3. **Baker PRS, Cramer SD, Kennedy M, Assimios DG, Holmes RP** (2004) Glycolate and glyoxylate metabolism in HepG2 cells. *Am J of Physiol Cell Physiol* **287**: C1359-C1365.
4. **Ballet F, Bouma ME, Wang SR, Amit N, Marais J, Infante R** (1984) Isolation, culture and characterization of adult human hepatocytes from surgical liver biopsies. *Hepatology* **4**: 849-854.
5. **Baxmann AC, Mendonca CDG, Heilberg IP** (2003) Effect of vitamin C supplements on urinary oxalate and pH in calcium stone-forming patients. *Kidney Int* **63**: 1066-1071.
6. **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**: 3017-3021.
7. **Blinn CM, Dibbs ER, Hronowski LJ, Vokonas PS, Silbert JE** (2005) Fasting serum sulfate levels before and after development of osteoarthritis in participants of the veterans administration normative aging longitudinal study do not differ from levels in participants in whom osteoarthritis did not develop. *Arth Rheum* **52**: 2808-2813.
8. **Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G** (1989) Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cell Dev Biol* **25**: 267-275.
9. **Brzica H, Breljak D, Krick W, Lovric M, Burckhardt G, Burckhardt BC, Sabolic I** (2009) The liver and kidney expression of sulfate anion transporter sat-1 in rats exhibits male-dominant gender differences. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **457**: 1381-1392.
10. **Caplan MJ** (1997) Ion pumps in epithelial cells: sorting, stabilization, and polarity. *Am J Physiol* **272**: G1304-G1313.
11. **Charrier MJ, Savage GP, Vanhanen L** (2002) Oxalate content and calcium binding capacity of tea and herbal teas. *Asia Pac J Clin Nutr* **11**: 298-301.

12. **Chetyrkin SV, Kim D, Belmont JM, Scheinman JI, Hudson BG, Voziyan PA** (2005) Pyridoxamine lowers kidney crystals in experimental hyperoxaluria: A potential therapy for primary hyperoxaluria. *Kidney Int* **67**: 53-60.
13. **Conyers RAJ, Bais R, Rofe AM** (1990) The relation of clinical catastrophes, endogenous oxalate production, and urolithiasis. *Clin Chem* **36**: 1717-1730.
14. **Coulter-Mackie MB** (2006) 4-Hydroxyproline metabolism and glyoxylate production: A target for substrate depletion in primary hyperoxaluria? *Kidney Int* **70**: 1891-1893.
15. **Danpure CJ** (2005) Molecular etiology of primary hyperoxaluria type 1: New directions for treatment. *Am J Nephrol* **25**: 303-310.
16. **Dawson PA, Beck L, Markovich D** (2003) Hyposulfatemia, growth retardation, reduced fertility, and seizures in mice lacking a functional NaS_i-1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 13704-13709.
17. **Dawson PA, Gardiner B, Lee S, Grimmond S, Markovich D** (2008) Kidney transcriptome reveals altered steroid homeostasis in NaS1 sulfate transporter null mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* **112**: 55-62.
18. **Dawson PA, Markovich D** (2002) Regulation of the mouse Nas1 promoter by vitamin D and thyroid hormone. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **444**: 353-359.
19. **Dawson PA, Russell CS, Lee S, McLeay SC, van Dongen JM, Cowley DM, Clarke LA, Markovich D** (2010) Urolithiasis and hepatotoxicity are linked to the anion transporter Sat1 in mice. *J Clin Invest* **120**: 706-712.
20. **Dorwart MR, Shcheynikov N, Wang Y, Stippec S, Muallem S** (2007) SLC26A9 is a Cl⁻ channel regulated by the WNK kinases. *J Physiol* **584**: 333-345.
21. **Dorwart MR, Shcheynikov N, Yang D, Muallem S** (2008) The solute carrier 26 family of proteins in epithelial ion transport. *Physiology* **23**: 104-114.
22. **Dumont JN** (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* **136**: 153-179.
23. **Elmadfa I, Leizmann C** (1998) Ernährung des Menschen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart. 3. Auflage
24. **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**: 411-422.

25. **Fanning AS, Anderson JM** (1999) PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* **103**: 767-772.
26. **Farinelli MP, Richardson KE** (1983) Oxalate Synthesis from [¹⁴C₁] Glycolate and [¹⁴C₁] Glyoxylate in the Hepatectomized Rat. *Biochimica et Biophysica Acta* **757**: 8-14.
27. **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**: 2196-2203.
28. **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**: 210-221.
29. **Freel RW, Hatch M, Green M, Soleimani M** (2006) Ileal oxalate absorption and urinary oxalate excretion are enhanced in Slc26a6 null mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**: G719-G728.
30. **Fukagawa M, Kaname S, Igarashi T, Ogata E, Kurokawa K** (1991) Regulation of parathyroid hormone synthesis in chronic renal failure in rats. *Kidney Int* **39**: 874-881.
31. **Gaines L, Waibel KH** (2007) Calcium oxalate crystalluria. *Emerg Med J* **24**: 310.
32. **Gamba G, Friedman PA** (2009) Thick ascending limb: the Na⁺:K⁺:2Cl⁻ co-transporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **458**: 61-76.
33. **Goodman HO, Brommage R, Assimos DG, Holmes RP** (1997) Genes in idiopathic calcium oxalate stone disease. *World J Urol* **15**: 186-194.
34. **Greger R, Lang F, Oberleithner H, Deetjen P** (1978) Handling of oxalate by rat kidney. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **374**: 243-248.
35. **Gu HH, Wu XH, Giros B, Caron MG, Caplan MJ, Rudnick G** (2001) The NH₂-terminus of norepinephrine transporter contains a basolateral localization signal for epithelial cells. *Mol Biol Cell* **12**: 3797-3807.
36. **Guezguez B, Vigneron P, Alais S, Jaffredo T, Gavard J, Mege RM, Dunon D** (2006) A dileucine motif targets MCAM-1 cell adhesion molecule to the basolateral membrane in MDCK cells. *FEBS Lett* **580**: 3649-3656.
37. **Haila S, Hastbacka J, Bohling T, Karjalainen-Lindsberg ML, Kere J, Saarialho-Kere U** (2001) SLC26A2 (diastrophic dysplasia sulfate transporter) is expressed in developing and mature cartilage but also in other tissues and cell types. *J Histochem Cytochem* **49**: 973-982.

38. **Hastbäcka 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**: 1073-1087.
39. **Hatch M, Cornelius J, Allison M, Sidhu H, Peck A, Freel RW** (2006) *Oxalobacter sp.* reduces urinary oxalate excretion by promoting enteric oxalate secretion. *Kidney Int* **69**: 691-698.
40. **He L, Vasiliou K, Nebert DW** (2009) Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics* **3**: 195-206.
41. **Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA** (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins - Introduction. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **447**: 465-468.
42. **Heller HJ, Sakhaee K, Moe OW, Pak CYC** (2002) Etiological role of estrogen status in renal stone formation. *J Urol* **168**: 1923-1927.
43. **Heneghan JF, Akhavein A, Salas M, Shmukler BE, Karniski LP, Vandorpe DH, Alper SL** (2010) Regulated transport of sulfate and oxalate by SLC26A2/DTDST. *Am J Physiol Cell Physiol*.
44. **Henriksnas J, Phillipson M, Storm M, Engstrand L, Soleimani M, Holm L** (2006) Impaired mucus-bicarbonate barrier in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**: G396-G403.
45. **Hess R, Bartels MJ, Pottenger LH** (2004) Ethylene glycol: an estimate of tolerable levels of exposure based on a review of animal and human data. *Arch Toxicol* **78**: 671-680.
46. **Hesse A, Brandle E, Wilbert D, Kohrmann KU, Alken P** (2003) Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs. 2000. *Eur Urol* **44**: 709-713.
47. **Hoglund P, Haila S, Socha J, Tomaszewski L, Saarialho-Kere U, Karjalainen-Lindsberg ML, Airola K, Holmberg C, de la Chapelle A, Kere J** (1996) Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. *Nat Genet* **14**: 316-319.
48. **Holmes RP, Assimos DG** (1998) Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. *J Urol* **160**: 1617-1624.
49. **Holmes RP, Assimos DG** (2004) The impact of dietary oxalate on kidney stone formation. *Urol Res* **32**: 311-316.
50. **Holmes RP, Goodman HO, Assimos DG** (2001) Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney Int* **59**: 270-276.

51. **Holmes RP, Goodman HO, Hart LJ, Assimos DG** (1993) Relationship of Protein-Intake to Urinary Oxalate and Glycolate Excretion. *Kidney International* **44**: 366-372.
52. **Holmes RP, Hurst CH, Assimos DG, Goodman HO** (1995) Glucagon Increases urinary oxalate excretion in the guinea-pig. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **32**: E568-E574.
53. **Holmes RP, Kennedy M** (2000) Estimation of the oxalate content of foods and daily oxalate intake. *Kidney Int* **57**: 1662-1667.
54. **Hoppe B, Beck B, Gatter N, von Unruh G, Tischer A, Hesse A, Laube N, Kaul P, Sidhu H** (2006) Oxalobacter formigenes: a potential tool for the treatment of primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int* **70**: 1305-1311.
55. **Hoppe B, Beck BB, Milliner DS** (2009) The primary hyperoxalurias. *Kidney Int* **75**: 1264-1271.
56. **Hugentobler G, Meier PJ** (1986) Multispecific anion exchange in basolateral (sinusoidal) rat liver plasma membrane vesicles. *Am J Physiol* **251**: G656-G664.
57. **Jackson VN, Halestrap AP** (1996) The kinetics, substrate, and inhibitor specificity of the monocarboxylate (lactate) transporter of rat liver cells determined using the fluorescent intracellular pH indicator, 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein. *J Biol Chem* **271**: 861-868.
58. **Javitt NB** (1990) Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J* **4**: 161-168.
59. **Jiang Z, Asplin JR, Evan AP, Rajendran VM, Velazquez H, Nottoli TP, Binder HJ, Aronson PS** (2006) Calcium oxalate urolithiasis in mice lacking anion transporter Slc26a6. *Nat Genet* **38**: 474-478.
60. **Jonassen JA, Kohjimoto Y, Scheid CR, Schmidt M** (2005) Oxalate toxicity in renal cells. *Urol Res* **33**: 329-339.
61. **Kaelin A, Casez JP, Jaeger P** (2004) Vitamin B6 metabolites in idiopathic calcium stone formers: no evidence for a link to hyperoxaluria. *Urol Res* **32**: 61-68.
62. **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 Renal Physiol* **275**: F79-F87.
63. **Kasper H** (2004) Ernährungsmmedizin und Diätetik. Urban und Fischer, München, Jena. 10. Auflage
64. **Kim KH, Shcheynikov N, Wang Y, Muallem S** (2005) SLC26A7 is a Cl⁻ channel regulated by intracellular pH. *J Biol Chem* **280**: 6463-6470.

-
65. **Kleta R** (2006) A key stone cop regulates oxalate homeostasis. *Nat Genet* **38**: 403-404.
 66. **Klinke R, Silbernagl S** (2005) Lehrbuch der Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
 67. **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 Nat Acad Sci USA* **98**: 9425-9430.
 68. **Knight J, Easter L, Neiberg R, Assimos DG, Holmes RP** (2009) Increased protein intake on controlled oxalate diets does not increase urinary oxalate excretion. *Urol Res* **37**: 63-68.
 69. **Knight J, Jiang J, Assimos DG, Holmes RP** (2006) Hydroxyproline ingestion and urinary oxalate and glycolate excretion. *Kidney Int* **70**: 1929-1934.
 70. **Knowles BB, Howe CC, Aden DP** (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**: 497-499.
 71. **Kosiek O, Busque SM, Foller M, Shcheynikov N, Kirchhoff P, Bleich M, Muallem S, Geibel JP** (2007) SLC26A7 can function as a chloride-loading mechanism in parietal cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **454**: 989-998.
 72. **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**: F145-F154.
 73. **Krijgsheld KR, Scholtens E, Mulder GJ** (2010) Serum concentration of inorganic sulfate in mammals - species differences and circadian rhythm. *Comp Biochem Phys* **67**: 683-686.
 74. **Kuo SM, Aronson PS** (1988) Oxalate transport via the sulfate/HCO₃ exchanger in rabbit renal basolateral membrane vesicles. *J Biol Chem* **263**: 9710-9717.
 75. **Lee A, Beck L, Markovich D** (2000) The human renal sodium sulfate cotransporter (SLC13A1; hNaS_i-1) cDNA and gene: organization, chromosomal localization, and functional characterization. *Genomics* **70**: 354-363.
 76. **Lee A, Beck L, Brown RJ, Markovich D** (1999) Identification of a mammalian brain sulfate transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **263**: 123-129.

-
77. **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 thyroid hormone. *DNA Cell Biol* **22**: 19-31.
 78. **Liao LL, Richards KE** (1972) Metabolism of oxalate precursors in isolated perfused rat livers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **153**: 438-448.
 79. **Liebman M, Chai W** (1997) Effect of dietary calcium on urinary oxalate excretion after oxalate loads. *Am J Clin Nutr* **65**: 1453-1459.
 80. **Lindsjo M, Danielson BG, Fellstrom B, Ljunghall S** (1989) Intestinal oxalate and calcium absorption in recurrent renal stone formers and healthy subjects. *Scand J Urol Nephrol* **23**: 55-59.
 81. **Liu XZ, Ouyang XM, Xia XJ, Zheng J, Pandya A, Li F, Du LL, Welch KO, Petit C, Smith RJ, Webb BT, Yan D, Arnos KS, Corey D, Dallos P, Nance WE, Chen ZY** (2003) Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* **12**: 1155-1162.
 82. **Lohi H, Kujala M, Kerkela E, Saarialho-Kere U, Kestila M, Kere J** (2000) Mapping of five new putative anion transporter genes in human and characterization of *SLC26A6*, a candidate gene for pancreatic anion exchanger. *Genomics* **70**: 102-112.
 83. **Lohi H, Kujala M, Makela S, Lehtonen E, Kestila M, Saarialho-Kere U, Markovich D, Kere J** (2002) Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers *SLC26A7*, *-A8*, and *-A9*. *J Biol Chem* **277**: 14246-14254.
 84. **Makela S, Eklund R, Lahdetie J, Mikkola M, Hovatta O, Kere J** (2005) Mutational analysis of the human *SLC26A8* gene: exclusion as a candidate for male infertility due to primary spermatogenic failure. *Mol Hum Reprod* **11**: 129-132.
 85. **Marengo SR, Romani AMP** (2008) Oxalate in renal stone disease: the terminal metabolite that just won't go away. *Nat Clin Pract Nephrol* **4**: 368-377.
 86. **Markovich D** (2001) Physiological roles and regulation of mammalian sulfate transporters. *Physiol Rev* **81**: 1499-1533.
 87. **Markovich D, Aronson PS** (2007) Specificity and regulation of renal sulfate transporters. *Annu Rev Physiol* **69**: 361-375.
 88. **Markovich D, Forgo J, Stange G, Biber J, Murer H** (1993) Expression cloning of rat renal $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$ cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8073-8077.

-
89. **Markovich D, James KM** (1999) Heavy metals mercury, cadmium, and chromium inhibit the activity of the mammalian liver and kidney sulfate transporter sat-1. *Toxicol Appl Pharmacol* **154**: 181-187.
 90. **Melvin JE, Park K, Richardson L, Schultheis PJ, Shull GE** (1999) Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem* **274**: 22855-22861.
 91. **Miranda KC, Khromykh T, Christy P, Le TL, Gottardi CJ, Yap AS, Stow JL, Teasdale RD** (2001) A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *J Biol Chem* **276**: 22565-22572.
 92. **Moseley RH, Hoglund 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**: G185-G192.
 93. **Müller SC, Hofmann R, Köhrmann KU, Hesse A** (2004) Epidemiologie, instrumentelle Therapie und Metaphylaxe des Harnsteinleidens. *Deutsches Ärzteblatt* **101**: 1331-1336.
 94. **Murer H, Manganel M, Roch-Ramel F** (1992) Handbook of Physiology. Oxford University Press, New York.
 95. **Nguyen NU, Dumoulin G, Henriët MT, Berthelay S, Regnard J** (1993) Carbohydrate metabolism and urinary excretion of calcium and oxalate after ingestion of polyol sweeteners. *J Clin Endocri Metab* **77**: 388-392.
 96. **Nguyen NU, Dumoulin G, Henriët MT, Regnard J** (1995) Increase in urinary calcium and oxalate after fructose infusion. *Horm Metab Res* **27**: 155-158.
 97. **Nguyen NU, Dumoulin G, Wolf JP, Bourderont D, Berthelay S** (1986) Urinary oxalate and calcium excretion in response to oral glucose-load in man. *Hormone and Metabolic Research* **18**: 869-870.
 98. **Nguyen QV, Kalin A, Drouve U, Casez JP, Jaeger P** (2001) Sensitivity to meat protein intake and hyperoxaluria in idiopathic calcium stone formers. *Kidney Int* **59**: 2273-2281.
 99. **Nishimura M, Naito S** (2008) Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* **23**: 22-44.
 100. **Ohana E, Yang DK, Shcheynikov N, Muallem S** (2009) Diverse transport modes by the solute carrier 26 family of anion transporters. *J Physiol* **587**: 2179-2185.

-
101. **Oliver D, He DZ, Klocker N, Ludwig J, Schulte U, Waldegger S, Ruppertsberg JP, Dallos P, Fakler B** (2001) Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein. *Science* **292**: 2340-2343.
 102. **Pak CYC** (1998) Kidney stones. *Lancet* **351**: 1797-1801.
 103. **Patel SR, Ke HQ, Vanholder R, Koenig RJ, Hsu CH** (1995) Inhibition of calcitriol receptor binding to vitamin D response elements by uremic toxins. *J Clin Invest* **96**: 50-59.
 104. **Patel SR, Xu Y, Koenig RJ, Hsu CH** (1997) Effect of glyoxylate on the function of the calcitriol receptor and vitamin D metabolism. *Kidney Int* **52**: 39-44.
 105. **Poore RE, Hurst CH, Assimos DG, Holmes RP** (1997) Pathways of hepatic oxalate synthesis and their regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* **41**: C289-C294.
 106. **Prie D, Urena Torres P, Friedlander G** (2009) Latest findings in phosphate homeostasis. *Kidney Int* **75**: 882-889.
 107. **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**: G1075-G1081.
 108. **Raheja G, Singh V, Ma K, Boumendjel R, Borthakur A, Gill RK, Saksena S, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK** (2010) Lactobacillus acidophilus stimulates the expression of SLC26A3 via a transcriptional mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**: G395-G401.
 109. **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**: 107-117.
 110. **Regeer RR, Markovich D** (2004) A dileucine motif targets the sulfate anion transporter sat-1 to the basolateral membrane in renal cell lines. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**: C365-C372.
 111. **Rehm H** (2006) Der Experimentator - Proteinbiochemie / Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag, München. 5. Auflage
 112. **Robertson WG, Hughes H** (1993) Importance of mild hyperoxaluria in the pathogenesis of urolithiasis - new evidence from studies in the Arabian Peninsula. *Scanning Microscopy* **7**: 391-402.
 113. **Robitaille L, Mamer OA, Miller WH, Levine M, Assouline S, Melnychuk D, Rousseau C, Hoffer LJ** (2009) Oxalic acid excretion after intravenous ascorbic acid administration. *Metabolism* **58**: 263-269.

-
114. **Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF** (1997) Expression cloning and characterization of a renal electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter. *Nature* **387**: 409-413.
115. **Sabolic I, Asif AR, Budach WE, Wanke C, Bahn A, Burckhardt G** (2007) Gender differences in kidney function. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **455**: 397-429.
116. **Sagawa K, Murer H, Morris ME** (1999) Effect of experimentally induced hypothyroidism on sulfate renal transport in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **276**: F164-F171.
117. **Sakhaee K** (2009) Recent advances in the pathophysiology of nephrolithiasis. *Kidney Int* **75**: 585-595.
118. **Satoh H, Susaki M, Shukunami C, Iyama K, Negoro T, Hiraki Y** (1998) Functional analysis of diastrophic dysplasia sulfate transporter. Its involvement in growth regulation of chondrocytes mediated by sulfated proteoglycans. *J Biol Chem* **273**: 12307-12315.
119. **Schmidt RF, Lang F, Thews G** (2005) Physiologie des Menschen. Springer Medizin Verlag, Heidelberg. 29. Auflage
120. **Shcheynikov N, Wang Y, Park M, Ko SB, Dorwart M, Naruse S, Thomas PJ, Muallem S** (2006) Coupling modes and stoichiometry of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by *slc26a3* und *slc26a6*. *J Gen Physiol* **127**: 511-524.
121. **Shcheynikov N, Yang D, Wang Y, Zeng W, Karniski LP, So I, Wall SM, Muallem S** (2008) The *Slc26a4* transporter functions as an electroneutral $\text{Cl}^-/\text{I}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger: role of *Slc26a4* and *Slc26a6* in I^- and. *J Physiol* **586**: 3813-3824.
122. **Sidhu H, Hoppe B, Hesse A, Tenbrock K, Bromme S, Rietschel E, Peck AB** (1998) Absence of *Oxalobacter formigenes* in cystic fibrosis patients: A risk factor for hyperoxaluria. *Lancet* **352**: 1026-1029.
123. **Siener R, Honow R, Voss S, Seidler A, Hesse A** (2006) Oxalate content of cereals and cereal products. *J Agri Food Chem* **54**: 3008-3011.
124. **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**: 11897-11902.
125. **Sindic A, Chang MH, Mount DB, Romero MF** (2007) Renal physiology of SLC26 anion exchangers. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **16**: 484-490.
126. **Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA, Nyberg LM, Curhan GC** (2003) Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976-1994. *Kidney Int* **63**: 1817-1823.

-
127. **Takayama T, Fujita K, Suzuki K, Sakaguchi M, Fujie M, Nagai E, Watanabe S, Ichiyama A, Ogawa Y** (2003) Control of oxalate formation from L-hydroxyproline in liver mitochondria. *J Am Soc Nephrol* **14**: 939-946.
128. **Taylor EN, Curhan GC** (2008) Fructose consumption and the risk of kidney stones. *Kidney Int* **73**: 207-212.
129. **Toure A, Lhuillier P, Gossen JA, Kuil CW, Lhote D, Jegou 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**: 1783-1793.
130. **Toure A, Morin L, Pineau C, Becq F, Dorseuil O, Gacon G** (2001) Tat1, a novel sulfate transporter specifically expressed in human male germ cells and potentially linked to rhoGTPase signaling. *J Biol Chem* **276**: 20309-20315.
131. **Traxer O, Huet B, Poindexter J, Pak CYC, Pearle MS** (2003) Effect of ascorbic acid consumption on urinary stone risk factors. *J Urol* **170**: 397-401.
132. **Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ** (1989) The first kidney stone. *Ann Intern Med* **111**: 1006-1009.
133. **Vincourt JB, Jullien D, Amalric F, Girard JP** (2003) Molecular and functional characterization of SLC26A11, a sodium-independent sulfate transporter from high endothelial venules. *FASEB J* **17**: 890-892.
134. **Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S** (2000) The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* **10**: 1-12.
135. **Wall SM** (2005) Recent advances in our understanding of intercalated cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **14**: 480-484.
136. **Wangemann P, Nakaya K, Wu T, Maganti RJ, Itza EM, Sanneman JD, Harbidge DG, Billings S, Marcus DC** (2007) Loss of cochlear HCO₃⁻ secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca²⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**: F1345-F1353.
137. **Weinman EJ, Frankfurt SJ, Knight TF** (1977) Renal Tubular Transport of Organic-Acids - Studies with Oxalate and PAH. *Kidney Int* **12**: 577.
138. **Wendt-Nordahl G, Evan AP, Spahn M, Knoll T** (2008) Calcium oxalate stone formation. New pathogenetic aspects of an old disease. *Urology* **47**: 538-544.
139. **Williams AW, Wilson DM** (1990) Dietary-intake, absorption, metabolism, and excretion of oxalate. *Sem Nephrol* **10**: 2-8.

-
140. **Xie Q, Welch R, Mercado A, Romero MF, Mount DB** (2002) Molecular characterization of the murine Slc26a6 anion exchanger: functional comparison with Slc26a1. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**: F826-F838.
141. **Xu J, Henriksnas J, Barone S, Witte D, Shull GE, Forte JG, Holm L, Soleimani M** (2005) SLC26A9 is expressed in gastric surface epithelial cells, mediates Cl⁻/HCO₃⁻ exchange, and is inhibited by NH₄⁺. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**: C493-C505.
142. **Xu J, Song P, Miller ML, Borgese F, Barone S, Riederer B, Wang Z, Alper SL, Forte JG, Shull GE, Ehrenfeld J, Seidler U, Soleimani M** (2008) Deletion of the chloride transporter Slc26a9 causes loss of tubulovesicles in parietal cells and impairs acid secretion in the stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 17955-17960.
143. **Yan Z, Henderson GN, James MO, Stacpoole PW** (1997) Determination of dichloroacetate and its metabolites in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **703**: 75-84.
144. **Yoshitomi K, Frömter E** (1984) Cell pH of rat renal proximal tubule in vivo and the conductive nature of peritubular. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **402**: 300-305.
145. **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**: 149-155.

DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. Birgitta C. Burckhardt gebührt mein herzlicher Dank für die interessante Themenstellung und engagierte Förderung meiner Arbeit. Für ihre geduldige und freundliche Unterstützung, sowie die fachliche Beratung bei der Anfertigung dieser Arbeit bin ich sehr dankbar.

Für die Ermöglichung der Durchführung der Promotion und für viele wertvolle Hinweise bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Burckhardt.

Herrn Prof. Dr. Uwe Wenzel danke ich für die Betreuung meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank geht an Dr. Shivangi Gupta, Sonia Garcia-Caraballo und Waja Wegner ihre stetige Hilfe und Freundschaft.

Danken möchte ich außerdem Katja Brauburger, Gesche Dallmeyer, Dr. Simone Dieckmann, Julia Grottker, PD Dr. Yohannes Hagos, PD Dr. Wolfgang Krick, Dr. Annett Kühne, Irmgard Markmann, Sören Petzke, Dr. Ahsan N. Rizwan, Reinhard Schirmer, Dr. Sabine Vogel und Dr. Marieke Wottawa für ihre Hilfe und die gute Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung der primären Hepatozyten danke ich Frau Prof. Dr. Irmelin Probst und Kirsten Unthan-Fechner.

Ganz besonders möchte ich meinem Mann und meiner Familie danken.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (BU 998/4-1,2) gefördert.

ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Artikel

Krick W, Schnedler N, Burckhardt G, and Burckhardt BC (2009) Ability of sat-1 to transport sulfate, bicarbonate, or oxalate under physiological conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 297:F145-F154. 2009.

Schnedler N, Burckhardt G, Burckhardt BC. Glyoxylate is a substrate of the sulfate-oxalate exchanger, sat-1, and increases its expression in HepG2 cells. Angenommen zur Publikation im "Journal of Hepatology" am 12.07.2010

Abstracts

Krause C, Lodahl N, Kirschbaum J, Brückner H (2004) Sequences of peptaibol antibiotics trichobrachins. *J Peptide Sci* 10 Suppl.: 161

Schnedler N, Krick W, Burckhardt G, Burckhardt BC (2008) Sulfate and oxalate transport via sat-1. *Acta Physiol* 192, Suppl. 663: 135

Schnedler N, Krick W, Burckhardt G, Burckhardt BC (2008) Sulfate and oxalate transport mediated by the sulfate-anion-transporter-1, sat-1. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 37/9: 442

Schnedler N, Krick W, Burckhardt G, Burckhardt BC (2009) Sat-1 transport mechanisms and regulation of mRNA expression by oxalate precursors. *Acta Physiol* 195, Suppl. 669: 98

Schnedler N, Krick W, Burckhardt G, Burckhardt BC (2009) Glyoxylate – Transport and stimulation of sat-1 mRNA expression. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 38/9: 496

KONFERENZEN

Teile dieser Arbeit wurden bei folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

- Vortrag „Oxalate, glyoxylate, and glycolate transport mediated by sat-1“, Transporttage, 10. und 11. November 2007, Göttingen
- Poster „Sulfate and oxalate transport via sat-1“, Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, 2. bis 5. März 2008, Köln
- Vortrag „Sulfat- und Oxalattransport über den Sulfat-Anionen-Transporter-1, Sat-1“, Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, 27. bis 30. September 2008, Tübingen
- Vortrag „Functional Studies on Sat-1“, Transporttage, 22. und 23. November 2008, Göttingen
- Poster „Sat-1 transport mechanisms and regulation of mRNA expression by oxalate precursors“, Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, 22. bis 25. März 2009, Gießen
- Poster „Glyoxylate – Transport and stimulation of sat-1 mRNA expression“, Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, 26. bis 29. September 2009, Göttingen
- Vortrag „Regulation of the sulfate anion transporter 1, sat-1, by glyoxylate“, Transporttage, 16. bis 18. Oktober 2009, Göttingen
- Poster „Oxalate’s precursor glyoxylate is a substrate of sulfate anion transporter 1, sat-1, and increases its expression“, Transportkolloquium, 27. und 28. Mai 2010, Rauischholzhausen