

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie
(Prof. Dr. G. Burckhardt)
im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Regulation des Sulfat-Anionen-Transporters-1, sat-1, in Caco2-Zellen
durch Oxalat und dessen Vorstufen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jan-Philipp Beck
aus
Göttingen

Göttingen 2014

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer
I. Berichterstatterin:	Prof. Dr. B. C. Burckhardt
II: Berichterstatter/in:	Prof. Dr. O. Groß
III. Berichterstatter/in:	
Tag der mündlichen Prüfung:	08.12.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Oxalat	5
1.1.1	Zufuhr und Resorption	5
1.1.2	Synthese und Metabolismus von Oxalat	7
1.1.3	Beeinflussung der Synthesewege des Oxalats durch Nahrungsbestandteile	9
1.1.4	Ausscheidung von Oxalat	10
1.1.5	Störungen des Oxalatstoffwechsels	11
1.2	Die SLC (solute carrier)-Transporterfamilie	15
1.2.1	Die SLC13-Transporterfamilie	16
1.2.2	SLC26-Transporterfamilie	17
1.3	Der Sulfat-Anionen-Transporter-1 (sat-1)	19
1.4	Lokalisation des sat-1	19
1.5	Transporteigenschaften des sat-1	21
1.6	Funktion und Regulation des sat-1	22
1.7	Caco2-Zellen	22
1.8	Aufgabenstellung und Zielsetzung	23
2.	Material	24
2.1	Caco2-Zellen	24
2.2	Oligonukleotidprimer	24
2.3	Real-time Polymerase-Kettenreaktions-Assays (real-time PCR)	25
2.4	Antikörper	25
2.5	Kits	25
2.5.1	RNA-Isolierungs-Kit	25
2.5.2	RT-Kit	26
2.6	Enzyme	26
2.7	Medien, Lösungen und Puffer	26
2.8	Chemikalien	27
2.9	Software, Online-Datenbanken und Geräte	28
3.	Methoden	30
3.1	Zellzucht mit Caco2-Zellen	30
3.1.1	Zeitreihe der Inkubation der Caco2-Zellen mit Oxalat und Glyoxylat	31
3.1.2	Konzentrationsreihe der Inkubation der Caco2-Zellen mit Oxalat und Glyoxylat	31
3.2	Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA)	31
3.2.1	Isolierung mit TRIzol®	31
3.2.2	Isolierung mit dem RNA-Isolierungs-Kit	33
3.3	Reverse Transkription	34
3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.5	Agarosegel-Elektrophorese	36
3.6	Real-time Polymerase-Kettenreaktion	37
3.7	Western Blot	38
3.7.1	Präparation der Zellmembranproteine	39
3.7.2	Proteinbestimmung nach Bradford	39
3.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.7.4	„Blotting“	41
3.7.5	Proteintransfer auf die Polyvenylidindifluorid (PVDF)-Membran	41
3.7.6	Proteindetektion auf Western Blots	42
3.8	Statistik	42

4.	Ergebnisse	43
4.1	Anzucht der Caco2-Zellen	43
4.2	Inkubation der Caco2-Zellen in Oxalat und Oxalatvorstufen	50
4.3	Zeitreihe der Inkubation der Caco2-Zellen	52
4.3.1	Oxalat	52
4.3.2	Glyoxylat	53
4.4	Konzentrationsreihe zur Bestimmung der optimalen Expression von sat-1-mRNA durch Oxalat und Glyoxylat	54
4.4.1	Oxalat	55
4.4.2	Glyoxylat	56
4.5	Sat-1-Proteinexpression in Caco2-Zellen nach Inkubation in Oxalat und Glyoxylat	57
5.	Diskussion	59
5.1	Die Bedeutung der Vorstufen des Oxalats für den sat-1-Transporter	60
5.2	Auswirkung der gesteigerten sat-1-Expression auf den Organismus	61
5.3	Die Bedeutung des Oxalats für die Entstehung einer Urolithiasis	62
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	62
6.	Zusammenfassung	63
7.	Literaturverzeichnis	64
8.	Abbildungsverzeichnis	76
9.	Tabellenverzeichnis	78
10.	Abkürzungsverzeichnis	79

1. Einleitung

1.1 Oxalat

Oxalat ist das Anion der Oxalsäure (Abb. 1.1) mit der chemischen Summenformel $C_2O_4^{2-}$. Die Oxalsäure ist eine Dicarbonsäure mit stark sauren Eigenschaften; ihre pK_s -Werte liegen bei 1,23 und 4,19 (*Williams & Wilson 1990*). Sie liegt bei physiologischem pH fast vollständig dissoziiert vor.

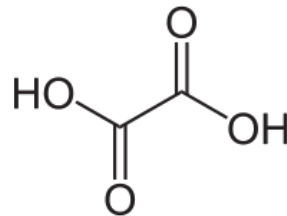


Abbildung 1.1: **Strukturformel der Oxalsäure.**

Oxalat wird mit der Nahrung aufgenommen oder in der Leber synthetisiert (*Williams & Wilson 1990*). Die Nieren sind sowohl das Ausscheidungsorgan des Oxalats als auch das Organ, in dem die Substanz ihre bis jetzt einzige bekannte Funktion ausübt: Oxalat stimuliert im proximalen Tubulus der Nieren die Resorption von Chlorid und Natrium und damit nachfolgend die Aufnahme von Wasser über spezielle Transportsysteme, auf die in späteren Abschnitten der Einleitung noch eingegangen wird (*Markovich 2006; 2011a, b, 2012*).

1.1.1 Zufuhr und Resorption

Das Oxalat im Blut stammt sowohl aus der dem Organismus zugeführten Nahrung als auch aus dem Abbau von Ascorbinsäure (Vitamin C) sowie der Produktion in Leber und Erythrozyten (*Holmes & Kennedy 2000, Marengo & Romani 2008*). Nach den Untersuchungen dieser Autoren stellt der Anteil des aus der Nahrung extrahierten Oxalats 20 % bis 40 % der vorhandenen Menge

an Oxalat im Blut dar. Dabei ist zu beachten, dass lediglich 5 % bis 15 % des Oxalats, das über die Nahrung aufgenommen wird, im Darm über spezielle Transportsysteme resorbiert wird (*Satoh et al. 1998, Mount & Romero 2004, Hatch & Freel 2005, Soleimani 2006, Knight et al. 2007, Thomas et al. 2008*). Die Annahme, dass das über die Nahrung zugeführte Oxalat lediglich einen geringen Anteil (10 % - 20 %) des über den Harn ausgeschiedenen Oxalats ausmacht, wird durch die Studien von *Holmes et al. (2001)* und *Zimmermann et al. (2005)* widerlegt. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass die oral aufgenommene Menge die ausgeschiedene Menge beeinflusst. Außerdem verdeutlichen *Holmes et al. (2001)*, dass die Oxalatmenge in der Nahrung Auswirkungen auf die Bildung von Kalziumoxalatsteinen haben kann. Geringfügige Veränderungen in der zugeführten Oxalatmenge wirken sich viel deutlicher auf Kristallisation und Steinentstehung aus als erhöhte Kalziummengen. Die Autoren folgern deshalb, dass der Anteil des Oxalats in der Nahrung eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Kalziumoxalatsteinen spielt (*Siener et al. 2006, Siener et al. 2013*).

Oxalat ist in pflanzlichen Produkten enthalten. Beispiele sind Spinat und Rhabarber. Es liegt in diesen Nahrungsmitteln in kristalliner Form als Kalziumoxalat oder als lösliches Anion vor. Weitere Beispiele für Nahrungsmittel, die diese Substanz enthalten, sind Nüsse, Schokolade, Obst, Gemüse und Weizenkleie (*Charrier et al. 2002, Liebman & Al-Wahsh 2011*). Die Oxalatmenge in tierischen Produkten gilt als sehr gering (*Holmes & Kennedy 2000*). Lange Zeit existierte keine Auflistung des Oxalatgehalts in unterschiedlichen Lebensmitteln. Eine Konzentration von weniger als 1,8 mg/100 g gilt als eine niedrige, mehr als 50 mg Oxalat in 100 g als hohe Konzentration (*Holmes & Kennedy 2000, Siener et al. 2006*). Die folgende Tabelle (Tab. 1.1, S.7) zeigt einige Beispiele für oxalathaltige Lebensmittel (*Charrier et al. 2002, Holmes & Kennedy 2000*):

Tabelle 1.1: **Oxalatgehalt verschiedener Nahrungsmittel** (*Holmes & Kennedy 2000, Charrier et al. 2002*).

Nahrungsmittel	Oxalatgehalt (mg / 100 g)
Schwarzer Tee	3 – 16 mg / Tasse
Apfel	1
Tomate	7
Pommes frites	21
Kartoffeln	23
Brezeln	27
Vollkornweizenbrot	27
Schwarze Oliven	27
Schokolade	34
Spinat	774

Die über Lebensmittel aufgenommene Oxalatsmenge kann den Anteil der Substanz im Harn deutlich beeinflussen (*Siener et al. 2006*). Außerdem kann der übermäßige Konsum dieser Lebensmittel eine Hyperoxalurie begünstigen (*Holmes & Kennedy 2000*). Dass die Rolle oxalathaltiger Lebensmittel und Getränke von Bedeutung ist, wird dadurch unterstrichen, dass es eine aktuelle Studie gibt, in der verschiedene Teesorten hinsichtlich ihrer Ziehzeit und der daraus resultierenden Oxalatkonzentration untersucht wurden (*Mahdavi et al. 2013*). Die tägliche Oxalatzufuhr sollte eine Menge von 50 mg bis 200 mg nicht überschreiten (*Holmes et al. 1995, Siener & Hesse 2002, Siener et al. 2005*).

1.1.2 Synthese und Metabolismus von Oxalat

Oxalat wird vor allem in den Hepatozyten synthetisiert (*Liao & Richards 1972, Baker et al. 2004*). Metabolische Vorstufen des Oxalats sind Glycin, Ethanolamin, Glykolaldehyd, Ethylenglykol, Glyoxylat, Glykolat, Tryptophan, Hydroxyprolin, Purin und Ascorbinsäure (*Hodgkinson & Zarembski 1968, Williams & Smith 1968*). Glyoxylat kann durch Oxidation von Glykolat über die Glykolat-Oxidase in den Peroxisomen, durch oxidative Desaminierung von Glycin durch die peroxisomale D-Aminosäureoxidase oder über den Hydroxyprolinmetabolismus in den Mitochondrien entstehen (*Holmes & Assimos 1998, Baker et al. 2004*).

Sowohl die Laktatdehydrogenase (LDH), ein zytoplasmatisches Enzym, als auch die Glykolat-Oxidase (GO), ein Enzym in den Peroxisomen der Hepatozyten, katalysieren die oxidative Umwandlung von Glyoxylat in Oxalat, während die LDH zusätzlich die Umwandlung von Glykolat zu Glyoxylat fördert. Die GO wird durch physiologische Konzentrationen von Glykolat und Laktat stark gehemmt. Die LDH wird durch den physiologischen Laktat-Spiegel nur sehr gering beeinflusst, während die Glykolat-Konzentration für das Enzym keine Rolle spielt (*Richardson & Tolbert 1961, Banner & Rosalki 1967, Poore et al. 1997, Baker et al. 2004*). Die folgende Abbildung (Abb. 1.2) fasst den Metabolismus des Oxalats zusammen:

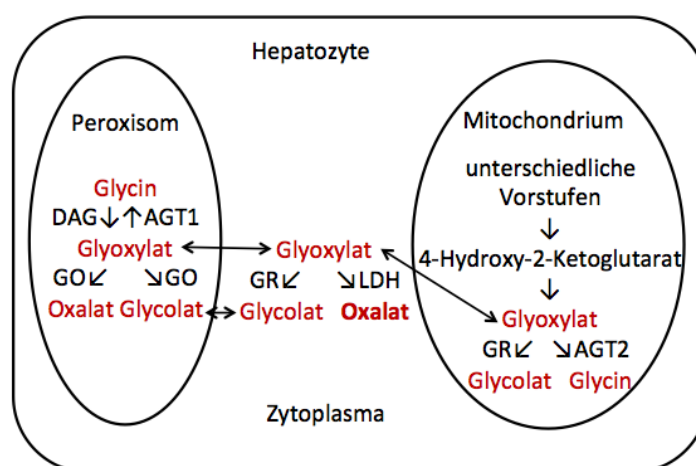


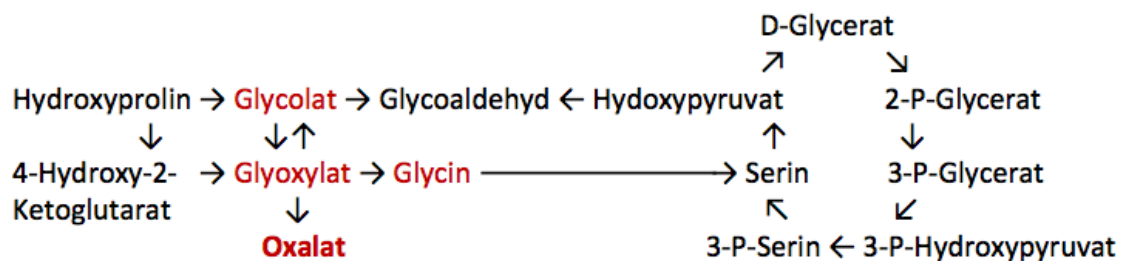
Abbildung 1.2: **Oxalatmetabolismus in den Hepatozyten.** Die Abkürzungen stehen für folgende Begriffe: Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 1, 2: AGT-1, AGT-2; D-Aminosäureoxidase: DAG; Laktatdehydrogenase: LDH; Glykolatoxidase: GO; Glyoxylatreduktase: GR.

Die Oxalatsynthese wird durch Alanin gehemmt, indem dieses einen Großteil des Glyoxylats in Glycin umwandelt. Alanin ist jedoch nicht in der Lage, die Synthese des Oxalats vollständig zu hemmen, da nicht das gesamte Glyoxylat in Glycin umgewandelt wird, sodass die Peroxisomen trotzdem noch in der Lage sind, Glyoxylat zu Oxalat zu oxidieren (*Poore et al. 1997*). Zu einer indirekten Hemmung der Oxalatsynthese kommt es durch die NADH-Dehydrogenase (reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid), indem durch den Einfluss der NADH-Dehydrogenase aus Glyoxylat vermehrt Glykolat synthetisiert wird, sodass die Laktatdehydrogenase die Oxidation von Glyoxylat zu Oxalat nur eingeschränkt katalysieren kann. Die Oxalatsynthese

ist folglich von den metabolischen Gegebenheiten in der Leber sowie Veränderungen des NADH-, Laktat- und Alaninspiegels abhängig (*Poore et al. 1997*).

1.1.3 Beeinflussung der Synthesewege des Oxalats durch Nahrungsbestandteile

Oxalat wird aus verschiedenen Stoffen wie Aminosäuren und Zuckern synthetisiert (*Holmes & Assimos 1998*). Die Abbildung 1.3 stellt weitere mögliche Synthesewege des Oxalats schematisch dar.



Vereinfachte Darstellung des Synthesewegs von Oxalat

Abbildung 1.3: **Schematische Darstellung der Oxalat-Synthesewege.**

Oxalat ist, wie in Kapitel 1.2.2 (S.7) beschrieben, das Endprodukt im Glyoxylatmetabolismus (*Kasper 2004*). Hydroxyprolin, das als Aminosäure in Kollagen enthalten ist, wird als potentielle Vorstufe des Glyoxylats angesehen (*Takayama et al. 2003, Knight et al. 2006*). Die Ausscheidung von Oxalat und Glyoxylat kann durch eine erhöhte Aufnahme von Hydroxyprolin gesteigert werden. Glycin stellt ebenfalls eine Vorstufe des Oxalats dar, jedoch ist seine Bedeutung für die Produktion von Oxalat nur gering (*Poore et al. 1997*).

Diverse Zucker, wie Glukose, Fruktose, Xylitol und Sorbitol, scheinen einen Einfluss auf die Oxalatsynthese zu haben (*Conyers et al. 1990*). Glukose kann über Glucuronat in Xylulose umgewandelt werden, das anschließend zu

Oxalat abgebaut werden kann (*Holmes & Assimos 1998*). Eine Untersuchung von *Nguyen et al. (1995)* ergab, dass eine orale Glukosezufuhr sowohl den Gehalt von Kalzium als auch den von Oxalat erhöht, während die Gabe von Fruktose die Kalziumkonzentration erhöht und die Oxalatkonzentration im Harn vermindert. Eine intravenöse Glukosegabe hat laut den Autoren allerdings keinen Einfluss auf die Oxalatausscheidung. Die Zufuhr der Zucker kann die Entstehung einer Hyperoxalurie begünstigen (*Bode et al. 1973*). In der Studie von *Nguyen et al. (1986)* ist bei einer Glukosezufuhr von 75 g ein Anstieg der Oxalatausscheidung nachweisbar. Die gleichen Autoren beschreiben einige Jahre später, dass nach der Gabe von 20 g Glukose keine wesentliche Veränderung hinsichtlich der Oxalatkonzentration im Harn resultiert (*Nguyen et al. 1993*), sodass nicht geklärt ist, ob eine Korrelation zwischen der Serum-Glukose-Konzentration und der Oxalatausscheidung besteht (*Nguyen et al. 1986*).

Ascorbinsäure erhöht die Ausscheidung von Oxalat: In einer Studie von *Baxmann et al. (2003)* steigert die Gabe von 1 g bis 2 g Vitamin C den Oxalatgehalt im Harn. Die Autoren weisen darauf hin, dass die Einnahme von Vitamin C die Oxalatausscheidung erhöhen und die Kristallisation von Kalziumoxalat begünstigen könnte. Diese Aussagen werden von *Robitaille et al. (2009)* unterstützt.

Der Zusammenhang zwischen der Proteinzufuhr und Oxalatsynthese ist nicht vollständig geklärt. Während *Holmes et al. (1993)* davon ausgehen, dass die Ernährung in den westlichen Ländern und somit auch die Proteinaufnahme keinen Einfluss auf die Oxalatausscheidung haben, beschreiben *Knight et al. (2009)* eine hohe Proteinzufuhr als einen Risikofaktor für die Entstehung von Kalziumoxalatsteinen.

1.1.4 Ausscheidung von Oxalat

Oxalat muss als Endprodukt des Stoffwechsels über den Harn ausgeschieden werden (*Marengo & Romani 2008, Dawson et al. 2010*). Der Oxalatanteil im Harn setzt sich aus dem in der Leber synthetisierten endogenen Teil und dem

aus der Nahrung absorbierten exogenen Teil zusammen (*Liebman & Chai 1997, Holmes & Kennedy 2000*). Die endogene Synthese ist in den Abbildungen 1.2 und 1.3 (S. 8 – 9) zusammengefasst.

Die Nieren sind das primäre Ausscheidungsorgan für Oxalat. Die renale Ausscheidung verläuft über die freie glomeruläre Filtration, da Oxalat kaum an Serumproteine gebunden wird, und über eine Sekretion im proximalen Tubulus. Zusätzlich erfolgt im proximalen Tubulus eine eingeschränkte Reabsorption des Oxalats (*Greger et al. 1978, Marengo & Romani 2008*).

Die normale Oxalatkonzentration im Serum beträgt nach Aussage von *Sakhaee (2009)* 1 μM bis 5 μM , die Urinkonzentration ist ungefähr 100-fach erhöht. Die Oxalatausscheidung über den Harn eines gesunden Erwachsenen liegt zwischen 28 mg und 43 mg pro Tag. Die durchschnittliche Menge ist bei Männern im Vergleich zu Frauen leicht erhöht. Ausgeschiedene Mengen von 40 mg bis 45 mg täglich gelten als milde klinische Hyperoxalurie (*Marengo & Romani 2008, Sakhaee 2009*). Die ausgeschiedene Menge hat einen großen Einfluss auf eine mögliche Übersättigung des Harns mit Kalziumoxalat sowie die Bildung von Kalziumoxalatsteinen (*Holmes et al. 2001*). Ein Ausfallen des Kalziumoxalats wird durch verschiedene Stoffe wie Harnstoff, Citrat, Sulfat, Laktat, Magnesium, Kupfer, Eisen und Zink verhindert (*Williams & Wilson 1990*).

1.1.5 Störungen des Oxalatstoffwechsels

1.1.5.1 Hyperoxalurie

Eine Hyperoxalurie beschreibt eine vermehrte Ausscheidung von Oxalat über den Harn. Dabei wird eine primäre Hyperoxalurie von einer sekundären Form unterschieden. Die primären Hyperoxalurien sind recht selten vorkommende, genetisch bedingte Störungen im Glyoxylatmetabolismus, die zu einer verstärkten Produktion von Oxalat führen. Eine sekundäre Hyperoxalurie dagegen ist bedingt durch eine erhöhte Zufuhr von Oxalat oder Oxalatvorstufen in den Organismus (*Hess et al. 2004, Coulter-Mackie 2006, Hoppe et al. 2009, Cochat & Groothoff 2013*). Bei der primären Form ist die

Oxalatüberproduktion durch einen Mangel an spezifischen Enzymen in der Leber bedingt. Das Krankheitsbild wird weiter unterteilt in die primäre Hyperoxalurie 1 (PH1) und die primäre Hyperoxalurie 2 (PH2). Die PH1 wird durch einen Mangel der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase-1 (AGT-1) verursacht. Dieses Enzym katalysiert die Transaminierung von Glyoxylat zu Glycin (*Coulter-Mackie 2006, Beck et al. 2013*). Das nicht ausreichende Vorhandensein der AGT-1 bewirkt, dass Glyoxylat vor allem zu Glykolat reduziert und dieses im Anschluss zu Oxalat oxidiert wird. Bei der PH2 liegt ein Mangel der Glyoxylatreduktase (GR) vor. Im gesunden Organismus katalysiert die GR die Umwandlung von Glyoxylat in Glykolat. Im Jahr 2010 wurde erstmals ein dritter Typ der primären Hyperoxalurie beschrieben (PH3) (*Hoppe 2012*). Diese Krankheitsform ist durch eine Genmutation der 4-Hydroxy-2-Oxoglutarat-Aldolase (HOGA) gekennzeichnet. Durch diesen Defekt kommt es zu einer exzessiven Oxalatproduktion. Das Enzym katalysiert die Spaltung von 4-Hydroxy-2-Oxoglutarat (HOG) in Pyruvat und Glyoxylat und stellt somit den letzten Schritt in der Ausscheidung bzw. im Abbau von Hydroxyprolin in den Mitochondrien dar (siehe Abb. 1.2, S.8).

Bei den primären, jeweils autosomal rezessiv vererbten Hyperoxalurien kommt es in der Folge zu einer Übersättigung des Urins, einem Ausfallen des Oxalats mit Kalzium und anschließender Ablagerung dieses Konglomerats in den Nephronen der Nieren und, bei besonders schweren Fällen, im ganzen Organismus. Diese systemische Oxalateinlagerung wird als Oxalose bezeichnet. Es kann zu einer Nephrokalzinose sowie einer Urolithiasis in den Nieren und den ableitenden Harnwegen sowie zu einem vollständigen Nierenversagen kommen. Die Betroffenen haben eine stark verminderte Lebensqualität. Die Sterberate ist im Zusammenhang mit der beschriebenen Krankheit recht hoch (*Danpure 2001, Danpure 2005, Coulter-Mackie 2006, Hoppe et al. 2009, Beck et al. 2013, Cochat & Groothoff 2013*). Patienten, die von Hyperoxalurien betroffen sind, haben häufig schon im ersten Lebensjahrzehnt Nierensteine (*Hoppe 2012, Riedel et al. 2012, Williams et al. 2012*).

Die sekundäre Hyperoxalurie weist einen milderen Krankheitsverlauf auf. *Kasper (2004)* beschreibt, dass es bei einem Kurzdarmsyndrom zu einem Gallensäureverlust kommt. Dieser Verlust bewirkt, dass die Fettsäuren nur

verzögert resorbiert werden können und unlösliche Komplexe mit Kalzium bilden, daher steht weniger Kalzium zur Bildung von Kalziumoxalat zur Verfügung, sodass mehr Oxalat resorbiert werden kann.

Die therapeutischen Möglichkeiten von Hyperoxalurien sind begrenzt. Es wird empfohlen, auf eine ausreichende tägliche Flüssigkeitszufuhr (3 l) zu achten. Zusätzlich kann durch Einnahme von Alkalicitrat einer Übersättigung des Urins mit Oxalat vorgebeugt werden. Dabei kann Kalzium über einen löslichen Komplex an Citrat gebunden werden, sodass es nicht mehr an Oxalat binden kann und somit weniger oder keine Kalziumoxalatkristalle und Kalziumoxalatsteine entstehen. Für die primäre Hyperoxalurie 1 existiert bisher nur eine kurative Therapiemöglichkeit. Da es sich bei der AGT-1 um ein hepatisches Enzym handelt, kann der Mangel dieses Enzyms durch eine Lebertransplantation behoben werden, wobei *Hoppe (2012)* bei der PH1 eine kombinierte Nieren- und Lebertransplantation und einige Autoren bei der PH2 eine isolierte Nierentransplantation empfehlen (*Hoppe et al. 2009, Hoppe 2012, Cochat & Groothoff 2013*). In einer aktuellen Studie kommen *Dahiya & Pundir (2013)* zu dem Schluss, dass die Ethylen-Malein-Anhydrid-Oxidase (EMA), gehüllt in Liposomen, eine vermehrte Oxalatausscheidung fördern und das Enzym in Zukunft möglicherweise als therapeutisches Mittel bei einer Hyperoxalurie dienen könnte.

Das Auftreten von Nierensteinen ist in den letzten 25 Jahren in den westlichen Ländern deutlich gestiegen (*Stamatelou et al. 2003*). So ist in dem Zeitraum von 1979 bis 2001 ein Anstieg der Patienten mit Urolithiasis von 4,0 % auf 4,7 % zu verzeichnen. Im Jahr 2001 hatten 5,5 % der Männer und 4,0 % der Frauen einen Nierenstein (*Hesse et al. 2003*). Die Wahrscheinlichkeit, dass die Krankheit innerhalb von zehn Jahren erneut auftritt, liegt bei 50 % (*Uribarri et al. 1989*). Insgesamt liegt das Risiko, während des Lebens an einer Urolithiasis zu erkranken, für Männer bei 10 % bis 12 % und für Frauen bei 3 % bis 5 % (*Nguyen et al. 2001*). Das verminderte Risiko für Frauen könnte in dem höheren Östrogenspiegel begründet sein, der die Ausscheidung steinbildender Substanzen fördern könnte (*Heller et al. 2002*). In den industrialisierten Ländern bestehen 80 % der Nierensteine aus Kalziumsalzen, meistens handelt es sich um Kalzium-

oxalat, seltener um Kalziumphosphat. Die übrigen 20 % bestehen aus Harnsäure, Struvit oder Carbonat.

1.1.5.2 Entstehung von Kalziumoxalatsteinen

Durch eine unphysiologische Urinzusammensetzung kommt es zu einer Kristallisation der steinbildenden Substanzen (*Hesse & Siener 1997, Pak 1998*). Es handelt sich meist um idiopathische Kalziumoxalatsteine, die aufgrund eines Überschreitens des Löslichkeitsprodukts von Oxalat im Harn entstehen. Anfangs entstehen auf der Basalmembran im Bereich der Henle-Schleifen in den Nieren sogenannte Plaques aus Kalziumphosphat. Anschließend kommt es zu einer Kristallisation von Kalziumoxalat aus dem Urin auf diesen Plaques (*Randall 1937, Wendt-Nordahl et al. 2008*). Der Urin eines gesunden Patienten enthält 0,1 μM bis 0,5 μM Oxalat und 1 μM bis 5 μM Kalzium. Eine geringe Änderung der Oxalat-Konzentration wirkt sich daher wesentlich deutlicher hinsichtlich einer Übersättigung des Harns mit Kalziumoxalat aus als ein erhöhter Kalziumgehalt (*Robertson & Hughes 1993*). Nierensteine bleiben in der Regel nicht unbemerkt. Die Patienten klagen über Schmerzen im Nieren- und Rückenbereich (*Stamatelou et al. 2003*). Vor einer medikamentösen Therapie sollte bei der Ernährung Folgendes beachtet werden: ausreichendes Trinken, sodass eine Ausscheidung von mindestens 2 l Urin pro Tag gewährleistet ist, eine reduzierte Zufuhr von Natrium und Oxalat, die Vermeidung fleischhaltiger Ernährung sowie das Sicherstellen einer moderaten Kalziumzufuhr (*Pak 1998*).

Eine Studie von *Siener et al. (2013)* beschreibt das Bakterium *Oxalobacter formingens*, ein gramnegatives, anaerobes Bakterium, im Intestinaltrakt als weitere therapeutische Möglichkeit zur Senkung des Risikos, einen Kalziumoxalatstein auszubilden. *Oxalobacter formingens* senkt durch eigenes Verstoffwechseln die intestinale Oxalatkonzentration, sodass weniger Oxalat im Darm resorbiert werden kann. Es gibt Hinweise, dass durch eine Kolonisation mit *Oxalobacter formingens* das Risiko eines rezidivierenden Nierensteinleidens reduziert werden kann (*Siener et al. 2013*).

1.2 Die SLC (solute carrier)-Transporterfamilie

Transporter haben im Organismus vielfältige Aufgaben und Funktionen der Resorption und Ausscheidung. Sie stellen im übertragenden Sinne die Tore einer Zelle bzw. einer Zellorganelle dar.

Die „Solute Carrier (SLC)“-Transporterfamilie besteht aus insgesamt 55 Genfamilien mit mindestens 365 funktionellen proteinkodierenden Genen. Allgemein können die Transporter in aktive und passive Transporter unterteilt werden. Während der aktive Transport über einen energieverbrauchenden Mechanismus funktioniert, verläuft der passive Transport entlang des elektrochemischen Gradienten. Bei den Genprodukten dieser großen Familien handelt es sich um passive Transporter sowie Symporter und Antiporter, die auch als Austauschcher (Exchanger) bezeichnet werden (Abb. 1.4).

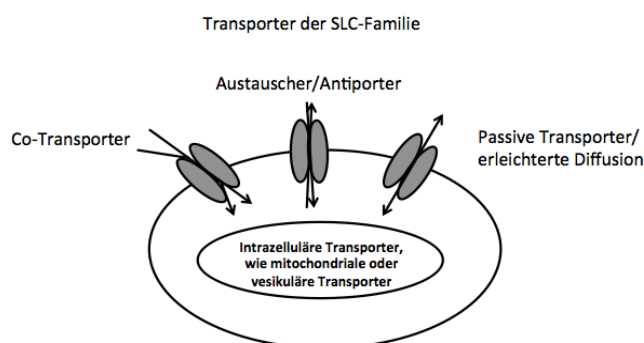


Abbildung 1.4: Die „Solute Carrier (SLC)“-Transporterfamilie.

Alle von der SLC-Transporterfamilie kodierten Transporter sind membrangebunden, entweder in der Plasmamembran, in der mitochondrialen Membran oder in Membranen von Vesikeln. Beispiele für Substrate, die durch die verschiedenen Transporter der SLC-Familie transportiert werden, sind neben den Aminosäuren auch Oligopeptide und Zucker. Die Transporter der SLC-Familie vermitteln einen spezifischen Transport verschiedener Substanzen sowohl entlang als auch gegen einen Konzentrationsgradienten. Sehr viele Transporter im menschlichen Organismus lassen sich der SLC-Transporterfamilie zuordnen. Von den bereits oben beschriebenen 55 Genfamilien haben vier Genfamilien zusätzliche Untergruppen (SLC01,

SLC02,04 und SLC35). Die anderen 51 Genfamilien verfügen über keinerlei weitere Untergruppierung. Transporter einer SLC-Familie haben mindestens 20 % bis 25 % Übereinstimmung hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen. Es existieren zahlreiche Gendefekte der SLC-Transporter, die beim Menschen für verschiedene Krankheiten verantwortlich sind (*Hediger et al. 2004, He et al. 2009*).

1.2.1 Die SLC13-Transporterfamilie

Die SLC13-Transporterfamilie besteht aus fünf Mitgliedern, die sich in ihrer Aminosäuresequenz ähneln. Die Proteine als Genprodukte der SLC13-Transporterfamilie können wie folgt unterteilt werden: Eine Gruppe bilden die Natrium-Sulfat-Cotransporter (NaS), die andere Gruppe stellen die Natrium-Carboxylat-Cotransporter (NaC) dar. Allen gemeinsam ist, dass sie ihr Substrat, Sulfat im Falle der NaS-Transporter und ein Di- oder Tricarboxylat im Falle der NaC-Transporter, im Cotransport mit drei bzw. vier Natrium-Ionen über die Membran transportieren. Charakteristika der SLC13-Familie sind, dass die von ihr kodierten Proteine acht bis 13 Transmembrandomänen haben und im Gewebe weit verbreitet sind.

Ein Beispiel für einen Transporter aus der SLC13-Familie ist der SLC13A1, der auch als renaler Na⁺-abhängiger Sulfat-Transporter-1 (NaSi-1) bezeichnet wird. Dieser Transporter spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Sulfatkonzentration im Organismus (*Dawson & Markovich 2002, Markovich & Murer 2004*). Die stärkste Expression ist in den Zellen des proximalen Tubulus zu finden. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die SLC13-Transporterfamilie (Tab. 1.2) (*Markovich & Murer 2004*).

Tabelle 1.2: **Die SLC13-Transporterfamilie** (modifiziert nach *Markovich & Murer 2004*).

Name des Gens	Name des Proteins	Ursprünglicher Proteinname	Substrate	Lokalisation
SLC13A1	NaS1	NaSi-1, Na-Sulfat	Sulfat, Selenat, Thiophosphat	Niere, proximaler Tubulus (luminale Membran)
SLC13A2	NaC1	NaDC-1, SDCT1, NaDC-2	Succinat, Citrat, α -Ketoglutarat	Niere, Intestinaltrakt (luminale Membran)
SLC13A3	NaC2	NaDC-3, SDCT2	Succinat, Citrat, α -Ketoglutarat	Niere, proximaler Tubulus (basolaterale Membran),
SLC13A4	NaS2	SUT-1	Sulfat	Plazenta, Tonsillen, Testis, Herz
SLC13A5	NaC2	NaCT	Citrat	Leber, Gehirn, Testis

1.2.2 SLC26-Transporterfamilie

Bei der SLC26-Transporterfamilie handelt es sich um Anionentransporter, die als Austauscher in einem natriumunabhängigen Modus arbeiten. Bislang wurden in der SLC26-Familie elf Gene identifiziert, die sich durch eine N-terminale zytoplasmatische Domäne, zehn bis 14 hydrophobe Transmembrandomänen und eine C-terminale zytoplasmatische STAS (Sulfat-Transporter-Anti-Sigma-Antagonist) Domäne auszeichnen. Es wird angenommen, dass es sich bei dem SLC26A10-Gen um ein Pseudogen handelt. Die SLC26-Transporter sind große Proteine, die aus 700 bis 1000 Aminosäuren bestehen und zu einem Großteil in den Nieren exprimiert werden. Zwischen den einzelnen Mitgliedern konnten 21 % bis 43 % identischer Aminosäuren nachgewiesen werden. Die SLC26-Transporter spielen eine wichtige Rolle bezüglich der Resorption und Ausscheidung von Anionen. Es werden unter anderem Cl^- , HCO_3^- , Sulfat, Oxalat, I^- und Formiat transportiert. Die SLC26-Transporterfamilie spielt in den meisten Organsystemen des menschlichen Organismus eine physiologische Rolle und dient vor allem der Homöostase vieler Anionen (*Sindic et al. 2007, Dorwart et al. 2008, Ohana et al. 2009, Alper & Sharma 2013*). Die funktionellen Variationen innerhalb der Genfamilie lassen keine Korrelation zwischen einer Funktion und einer spezifischen Aminosäuresequenz zu.

Die elf Mitglieder der Genfamilie lassen sich in drei Gruppen einteilen: Die erste Gruppe bilden die SO_4^{2-} -Transporter. Vertreter dieser Gruppe sind SLC26A1 und SLC26A2. Der erstgenannte ist der Transporter, der als Erster der Gruppe entdeckt wurde. Er wird auch als sat-1-Transporter bezeichnet und ist für den Transport von Sulfat und Oxalat über die basolaterale Membran verantwortlich (siehe Kap. 1.3, S. 19). Die zweite Gruppe bilden die $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Exchanger SLC26A3, SLC26A4 und SLC26A6. Der Transporter SLC26A6 wird auch als CFEX oder Pat-1 bezeichnet und befindet sich in der luminalen Membran der Zellen des proximalen Tubulus. Neben der Funktion als Austauscher ist er zusätzlich an der tubulären Absorption von Na^+ und Cl^- sowie an der Oxalatausscheidung beteiligt. Die dritte Gruppe stellen Transporter dar, die möglicherweise auch als Ionenkanäle (Chloridkanäle) arbeiten können. Dazu gehören die Transporter SLC26A7 und SLC26A9. Der SLC26A7 fungiert zusammen mit dem SLC26A4 als Transporter von Cl^- und HCO_3^- im distalen Nephron (*Dorwart et al. 2008*).

Es sind unterschiedliche Krankheiten im Zusammenhang mit der SLC26-Transporterfamilie bekannt. So spielt der SLC26A2 eine Rolle bei der Chondrodysplasie und der SLC26A4 bei Taubheit mit Vergrößerung des vestibulären Gangsystems (*Alper & Sharma 2013*). Der Transporter SLC26A6 hat Einfluss auf die Entstehung der Nephrolithiasis, während für SLC26A4 und SLC26A6 ein Zusammenhang mit der Ausbildung eines Bluthochdrucks vermutet wird (*Sindic et al. 2007*). In SLC26A1 und SLC26A6 Knock-out-Mäusen konnte ein Zusammenhang dieser Transporter mit der Bildung von Nierensteinen gezeigt werden (*Alper & Sharma 2013*). Die folgende Tabelle (Tab. 1.3, S. 19) fasst die SLC26-Transporterfamilie zusammen:

Tabelle 1.3: **Die SLC26-Transporterfamilie** (modifiziert nach *Mount & Romero 2004, Alper & Sharma 2013*).

Gen	Name	Substrat	Lokalisation
SLC26A1	Sat-1	SO ₄ ²⁻ , Oxalat	Leber, Nieren, Darm
SLC26A2	DTDST	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻	weitverbreitet
SLC26A3	DRA, CLD	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , OH ⁻ , Oxalat	Intestinaltrakt, Schweißdrüsen, Pankreas, Prostata
SLC26A4	Pendrin	Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , I ⁻ , Formiat	Innenohr, Nieren, Schilddrüse
SLC26A5	Prestin	?	Innenohr
SLC26A6	CFEX, PAT-1	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , OH ⁻ , Oxalat, Formiat	weitverbreitet
SLC26A7	nicht benannt	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , Oxalat	Nieren
SLC26A8	Tat1	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , Oxalat	Gehirn, Samenzelle
SLC26A9	nicht benannt	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , Oxalat	Lunge
SLC26A10	nicht benannt	Pseudogen	
SLC26A11	nicht benannt	SO ₄ ²⁻	weitverbreitet

1.3 Der Sulfat-Anionen-Transporter-1 (sat-1)

Regeer et al. (2003) beschrieben erstmalig die Isolierung des humanen Sulfat-Anionen-Transporters-1 (hsat-1/SLC26A1). Der hsat-1 besteht aus vier Exons und weist eine Länge von 6 kb (6000 Basenpaare) auf. Er ist auf dem humanen Chromosom 4p16.3 lokalisiert. Die Molekülmasse beträgt 75 kDa. Das Protein besitzt wahrscheinlich zwölf Transmembrandomänen (*Regeer et al. 2003, Markovich 2011a*). Das humane sat-1-Gen umfasst 701 Aminosäuren (*Regeer et al. 2003*), das der Ratte (rsat-1) 703 Aminosäuren (*Bissig et al. 1994 a, Markovich 2012*) und das der Maus (msat-1) 704 Aminosäuren (*Lee et al. 2003*). Das Startcodon befindet sich im dritten Exon. Insgesamt existieren für den hsat-1 drei Spleißvarianten. Die Spleißvarianten 1 und 3 kodieren die Isoform a, die Spleißvariante 2 die Isoform b.

1.4 Lokalisation des sat-1

Der humane sat-1-Transporter konnte auf mRNA-Ebene in der Niere und in der Leber nachgewiesen werden (Abb. 1.5, S. 21). Zusätzlich existiert eine

geringere Expression in Gehirn, Pankreas, Lunge, Testis, Duodenum, Kolon, Thymus, Leukozyten und Prostata (*Regeer et al. 2003, Sindic et al. 2007, Nishimura & Naito 2008, Freel und Hatch 2012*).

Der Nachweis der sat-1-mRNA der Ratte (*rsat-1*) fiel für Leber und Niere, aber auch für Gehirn und Skelettmuskel, positiv aus, wobei die Ausprägung in Leber und Nieren viel deutlicher ist. In Herz, Lunge, Kolon, Ileum und Duodenum konnte keine mRNA-Expression des *rsat-1* nachgewiesen werden (*Bissig et al. 1994 b, Lee et al. 1999, Ko et al. 2012*). In der Niere ist der *rsat-1*-Transporter in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert (*Karniski et al. 1998*). *Quondamatteo et al. (2006)* konnten den *rsat-1* in der sinusoidalen Membran und zwischen den Zellgrenzen der Hepatozyten nachweisen.

Bei Untersuchungen an der Maus konnte die Expression der mRNA des *msat-1* in Niere, Herz, Gehirn, Leber und Skelettmuskel gezeigt werden (*Lee et al. 2003*). Wie bei der Ratte ist der Transporter auch bei der Maus in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus bzw. in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten lokalisiert. Außerdem konnte er in der basolateralen Membran des distalen Darms nachgewiesen werden (*Brzica et al. 2009, Dawson et al. 2010*). Die Lokalisation des Transporters ist für beide Organe in der folgenden Abbildung skizziert.

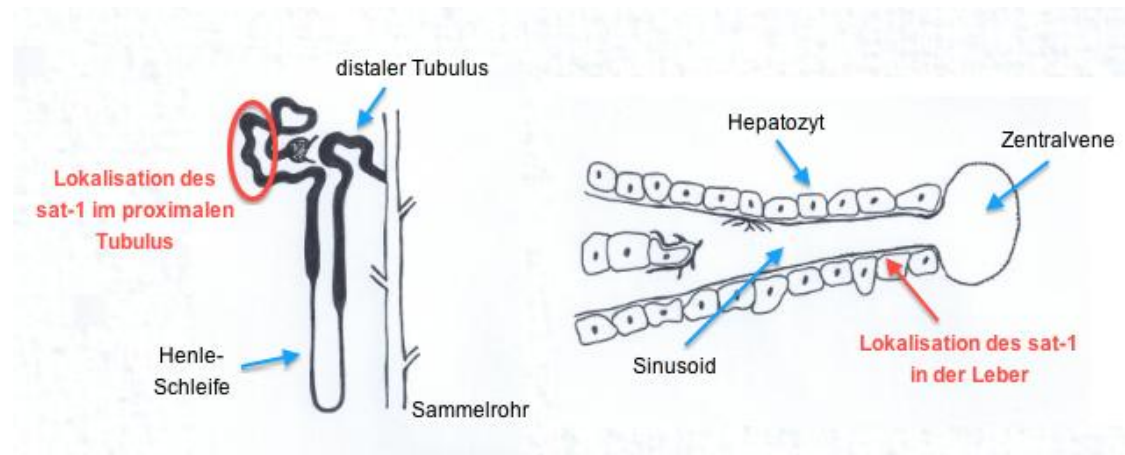


Abbildung 1.5: **Lokalisation des sat-1-Transporters in der Niere (links) und in der Leber (rechts)**. Die rote Ellipse bzw. der rote Pfeil markieren den Bereich, in dem der sat-1 nachgewiesen wurde.

1.5 Transporteigenschaften des sat-1

Der rsat-1 transportiert natriumunabhängig Sulfat und Oxalat in einem bidirektionalen Austauschmechanismus. Chlorid, OH^- , HCO_3^- , Estronsulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) sind keine Substrate des rsat-1 (Quondamatteo et al. 2006, Krick et al. 2009, Ohana et al. 2009). Studien an Oozyten von *Xenopus laevis* und Sf9-Insektenzellen zeigen, dass der sat-1 Sulfat und Oxalat transportiert (Karniski 1998, Quondamatteo et al. 2006). Die rsat-1-Expression in Oozyten bewirkt eine 20-fache Steigerung des SO_4^{2-} -Transports sowie eine Steigerung des Oxalattransports um den Faktor sechs im Vergleich zu Kontrollen (Lee et al. 2003, Markovich 2006). Glyoxylat ist ebenfalls ein Substrat des sat-1 (Schnedler et al. 2011). Der Transporter spielt eine entscheidende Rolle für den Oxalattransport, indem er Oxalat gegen Sulfat oder Bicarbonat austauscht (Brändle et al. 1998, Karniski 1998, Krick et al. 2009).

1.6 Funktion und Regulation des sat-1

Die physiologische Rolle des sat-1-Transporters konnte nach Aussage von *Ohana et al. (2009)* noch nicht genau geklärt werden. Viele Literaturstellen nennen diesbezüglich die Homöostase der Sulfatkonzentration in der Leber und die Oxalatkonzentration in den Nieren (*Lee et al. 2003, Dorwart et al. 2008, Ohana et al. 2009, Dawson et al. 2010, Markovich 2011 a*). Die an den sat-1-Transporter gekoppelte Reabsorption des Sulfats hat aus physiologischer Sicht eine wichtige Bedeutung. Durch eine in Studien induzierte Herunterregulierung der sat-1-Expression konnte eine daraus resultierende deutlich erhöhte Sulfatausscheidung sowie ein chronisches Nierenversagen gezeigt werden (*Fernandes et al. 2001*).

Der rsat-1 wird sowohl durch Geschlechts- als auch über Schilddrüsenhormone und den Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert (*Sabolic et al. 2007, Brzica et al. 2009, Beck & Markovich 2000, Lee et al. 2003, Lee et al. 2005*).

1.7 Caco2-Zellen

Caco2-Zellen wurden aus einem humanen kolorektalen Adenokarzinom isoliert. Diese Zelllinie wurde in den vergangenen zwei Jahrzehnten in vielen Untersuchungen als *in vitro*-Modell der intestinalen Barriere in der Mukosa verwendet (*Sambuy et al. 2005, Borchardt 2011, Gupta et al. 2013*).

Das Wachstum der Caco2-Zellen auf einem Plastikuntergrund bewirkt, dass die Zellen morphologische Eigenschaften von humanen Enterozyten entwickeln (*Hidalgo et al. 1989*). Sie weisen einen Bürstensaum sowie Mikrovilli auf und differenzieren sich zu einem zusammenhängenden Monolayer mit engen Tight Junctions zwischen den einzelnen Zellen (*Hidalgo et al. 1989, Borchardt 2011*). Caco2-Zellen transportieren Aminosäuren, Nukleoside, Polypeptide, Vitamine und Gallensäuren. In der pharmazeutischen Industrie werden Caco2-Zellen für Untersuchungen zur Bestimmung der Absorptionsrate von Medikamenten über die intestinale Barriere herangezogen (*Lakshmana Rao & Sankar 2009*). Wichtig für die in

dieser Arbeit beschriebenen Versuche war, dass Caco2-Zellen den sat-1 exprimieren (*Hatch et al. 2003*).

1.8 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Zahl der Patienten, bei denen Nierensteine diagnostiziert werden, nimmt stetig zu. In den meisten Fällen werden Kalziumoxalatsteine identifiziert. Aus diesem Grund stellt eine bessere Kenntnis über Oxalat und seine Vorstufen einen wichtigen Aspekt für die Therapie und Prävention der Kalziumoxalatlithiasis dar (*Pak 1998, Stamatelou et al. 2003*).

Der Transport von Oxalat ist bisher lediglich in den Nieren erforscht. Für Leber und Darm stehen die Untersuchungen noch aus.

2. Material

2.1 Caco2-Zellen

Caco2-Zellen stammen von einem humanen Kolon-Adenokarzinom und können sich spontan zu einer konfluenten Monoschicht polarisierter Zellen differenzieren, die strukturell und funktionell dem Epithel des Dünndarms ähnlich ist (*Smetanová et al. 2011*).

Die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Caco2-Zellen wurden zur Verfügung gestellt vom Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen.

2.2 Oligonukleotidprimer

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden sequenzspezifische Primer verwendet, die von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen wurden. Die folgende Tabelle (Tab. 2.1) zeigt die verwendeten Primer.

Tabelle 2.1: **Übersicht über die spezifischen Primer mit ihren 5'- 3'-Sequenzen sowie weiteren Eigenschaften** (entnommen aus *Lohi et al. 2000*): Produktlänge, Annealing-Temperatur, Zyklen und Konzentration des Agarosegels, die zur Auftrennung der jeweiligen PCR-Produkte verwendet wurden. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, sat-1: Sulfat-Anionen-Transporter-1.

Protein (Gen)	Primer	Sequenz 5' - 3'	Produktlänge	Annealing-Temperatur	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				
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				

2.3 Real-time Polymerase-Kettenreaktions-Assays (real-time PCR)

Die bei der real-time PCR verwendeten Assays wurden von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) bezogen (Tab. 2.2).

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Assays mit ihren Spleißvarianten.

Protein (Gen)	Assay	Spleißvariante
hGAPDH	Hs99999905_m1	NM_002046.3
hsat-1 (SLC26A1)	Hs00758179_m1	(1) NM_022042.2 (3) NM_213613.2

2.4 Antikörper

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Antikörper aufgelistet (Tab. 2.3).

Tabelle 2.3: Übersicht über die Antikörper, die Konzentration und den Bezug.

Antikörper	Konzentration	Anbieter / Katalognummer
β-Aktin (monoklonales Maus-IgG)	0,1 mg / ml	Dianova / DLN-07274
Ziege anti-Maus IgG	1 mg / ml	Calbiochem / 401215
SLC26A1 (polyklonales Kaninchen-IgG)	0,4 mg / ml	Aviva Biosystems Biology ARP 44028_P050QC
Ziege anti-Kaninchen (sekundärer Antikörper)	0,4 mg/ml	SantaCruz Biotechnology SC-2004

2.5 Kits

2.5.1 RNA-Isolierungs-Kit

RNeasy MiniKit (Qiagen, Katalognummer: 74104 & 74106)

2.5.2 RT-Kit

Moloney-Maus-Leukämievirus (M-MuLV)

Reverse Transkriptase, RNase H minus (AppliChem, Katalognummer: A5211, 50000)

2.6 Enzyme

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde als Enzym die Taq-Polymerase verwendet; diese wurde im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen isoliert.

2.7 Medien, Lösungen und Puffer

Alle Zellkulturmedien wurden sterilfiltriert. Die folgende Tabelle (Tab. 2.4) fasst die verwendeten Substanzen zusammen.

Tabelle 2.4: **Übersicht der Puffer und Medien.**

Substanz	Zusammensetzung
Agarosegel-Elektrophorese-Ladepuffer (5x)	6,3 g Glycerol 2 ml 0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) pH 8,0 50 µl Trishydroxymethylaminomethan (Tris) HCl pH 7,6 0,001 % (w/v) Bromphenolblau 0,001 % (w/v) Xylencyanol FF mit nukleasefreiem <i>aqua dest.</i> auf 10 ml aufgefüllt
Bradfordlösung (4x)	0,4 g Coomassie Brilliant Blau G-250 200 ml Ethanol 400 ml Phosphorsäure mit <i>aqua dest.</i> auf 1 l aufgefüllt
Caco2-Medium	DMEM-HG 100 ml FCS (fetales Kälberserum)/500 ml 5 ml 1-prozentige nicht-essentielle Aminosäuren/ 500 ml 100 U / ml Penicillin 100 µg / ml Streptomycin
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (HG)	Appllichem / A13169050 13,44 g DMEM-HG 3,7 g NaHCO ₃ mit <i>aqua dest.</i> auf 1 l aufgefüllt

Enhanced Chemiluminescence (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
Ehtidiumbromid (Stammlösung)	Sigma / E1510 10 mg / ml in nukleasefreiem <i>aqua dest.</i>
Marker (Agarosegel-Elektrophorese)	Fermentas / SM0321 100 µl Marker 100 µl 6x Ladepuffer (Fermentas / R0611) 400 µl nukleasefreies <i>aqua dest.</i> Invitrogen / 15628-050 100 µl Marker 40 µl 5x Agarosegel-Elektrophorese-Ladepuffer 150 µl nukleasefreies <i>aqua dest.</i>
Membranpuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 100 µl / 10 ml Phenylmethylsulfonylfluorid 4 µl / 10 ml Aprotinin 4 µl / 10 ml Leupeptin
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Appllichem / A0964,9100 9,55 g in 1 l <i>aqua dest.</i>
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris-Base 144 g Glycin 10 g SDS mit <i>aqua dest.</i> auf 1 l aufgefüllt
SDS-PAGE-Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % SDS in <i>aqua dest.</i>
SDS-PAGE-Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS in <i>aqua dest.</i>
SDS-PAGE-Ladepuffer	5 mM Tris-HCl, pH 6,8 10 % Glycerol (v/v) 1 % β-Mercaptoethanol
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (5x)	54 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,5 mit <i>aqua dest.</i> auf 1 l aufgefüllt
Western Blot-Puffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

2.8 Chemikalien

Die verwendeten Substanzen, die mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ gekennzeichnet waren, wurden von folgenden Firmen bezogen: Appllichem

(Darmstadt, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und SigmaAldrich (Taufkirchen, Deutschland).

2.9 Software, Online-Datenbanken und Geräte

Folgende Software und Online Server wurden im Rahmen dieser Untersuchung verwendet:

- Microsoft Excel (Microsoft Corporation)
- MxPro QPCR Software (Agilent Technologies)
- <http://www.ncbi.nlm.gov/Entrez> (Entrez Browser)
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Blast).

Im Folgenden (Tab. 2.5) sind die Geräte aufgelistet, die für die unterschiedlichen Arbeitsschritte eingesetzt wurden.

Tabelle 2.5: In dieser Arbeit eingesetzte Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Bioclav	Schütt Labortechnik GmbH (Göttingen)
Blotabbildung	LAS 3000 Imager	Fujifilm (Düsseldorf)
Brutschrank	Function Line BB16	Heraeus (Hanau)
Digitalkamera	Canon PowerShot G2	Canon (Krefeld)
Elektrophorese	EPS 3500 XL	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Feinwaage	MP7-2 2002 MP1	Sartorius (Göttingen)
Geldokumentation	Gel Print 2000 I	Biophotonics (Ann Arbor, MI, USA)
Gelkammer	Midi	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)
Homogenisator	Labsonic 3000	B. Braun (Melsungen)
Inkubationsschüttler	3031	GFL (Burgwedel)
Magnetrührer	KM02 electronic	IKA Labortechnik (Staufen)
Mikroskop	Telaval 31	Zeiss (Oberkochen)

Mikrowelle	Privileg 8521	Quelle Schickedanz (Fürth)
Minizentrifugen	C-1200	National Labnet Co. (Woodbridge, NJ, USA)
	MiniSpin	-(Hamburg)
	Fuge-Vortex 2400	L.U.M. GmbH (Berlin)
PCR Zyklus	C1000 Thermal Cycler	BIO-RAD (Singapur)
	PTC-200	MJ Research (Watertown, MA, USA)
real-time PCR Thermozyklus	MX3000p	Stratagene (Waldbronn)
RNA/DNA Calculator (Photometer)	GeneQuant II	PharmaciaBiotech (Cambridge, England)
Schüttler	KS 250 basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Sterile Werkbank	Safe 2020	Thermo Scientific (Langenselbold)
	Biowizard Silverline	Kojair (Vilppula, Finnland)
Ultrazentrifuge	OTD65B	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Ultrazentrifugenrotor	TFT6513	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Ultraviolett-Transilluminator	TM 40	UVP (Upland, CA, USA)
Vortex	MS 1	IKA-Works (Wilmington (NC, USA)
	REAX top	Heidolph (Schwabach)
Waage	LC6215	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	DB	Haake (Karlsruhe)
	1083	GFL (Burgwedel)
Western Blot-Kammer		Bio-Rad (München)
Western Blot-Netzgerät	ST 606T	Gibco (Karlsruhe)
Zählkammer (Neubauer)	hell-linig	Saaringia (Saarlouis)
Zentrifugen	5415 D 5417 R	Eppendorf (Hamburg)
	Biofuge fresco Megafuge 40 R Labofuge 400 R	Heraeus (Hanau)

3. Methoden

3.1 Zellzucht mit Caco2-Zellen

Die Caco2-Zellen wurden in einer Kulturschale (Durchmesser 10 cm) dauerhaft im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Raumluft) angezogen und regelmäßig an jedem siebten Tag entnommen. Um die Zellen aufzuteilen, wurde zunächst das Caco2-Medium abgesaugt und die Zellen im Anschluss mit 5 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Im nächsten Schritt wurden zunächst 1,5 ml Trypsin (0,1 % in PBS) zu den Zellen gegeben, bevor sie anschließend mit 2 ml PBS vom Boden des 6-Well abgespült werden konnten. Die Zellsuspension wurde mit 1,5 ml des Zellmediums für 5 min. bei 1000 x g zentrifugiert. Zu dem Zellpellet wurden 5 ml Caco2-Medium hinzugegeben und die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Auf diese Weise konnten die Caco2-Zellen in einem Verhältnis von 1 : 10 neu aufgeteilt und ein Teil der Caco2-Zellen in die nächste Passage überführt werden.

Für die eigentlichen Versuche wurde ein anderer Teil der Zellen in ein 6-Well überführt und jeweils mit dem Caco2-Medium auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt. Das 6-Well wurde anschließend in den Inkubator gestellt. Sowohl am ersten als auch am zweiten Folgetag wurde das Caco2-Medium von den sich am Schalenboden festgesetzten Caco2-Zellen abgesaugt und durch jeweils 2 ml neues Caco2-Medium ersetzt. Am dritten bis einschließlich sechsten Folgetag wurde neben einem Wechsel des Mediums in fünf der sechs Kompartimente des Wells eine Inkubation der Zellen mit jeweils einer der folgenden Substanzen durchgeführt: Glycin (1 mM), Hydroxyprolin (1 mM), Oxalat (100 µM), Glyoxylat (1 mM) und Glykolat (1 mM). Das sechste Kompartiment diente als Leerwert, d.h. es wurde nur eine äquivalente Menge an Puffer dazugegeben. Die Inkubationszeit betrug insgesamt vier Tage.

Am siebten Folgetag wurden die Caco2-Zellen des 6-Well geerntet, indem zunächst das Medium abgesaugt, die Caco2-Zellen mittels PBS gewaschen und eine RNA-Isolierung durchgeführt wurde.

3.1.1 Zeitreihe der Inkubation der Caco2-Zellen mit Oxalat und Glyoxylat

Da die beiden Substanzen Oxalat und Glyoxylat die Expression des sat-1-Transporters in den Caco2-Zellen während der Inkubation am deutlichsten gesteigert haben (Kap. 4.2, S. 50), wurde jeweils eine Zeitreihe erstellt. Diesbezüglich wurden die Caco2-Zellen in 100 μ M Oxalat bzw. 1 mM Glyoxylat für je ein, zwei, drei, vier, fünf und sechs Tage inkubiert. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, welche Inkubationsdauer die Expression für die jeweilige Substanz am deutlichsten verstärkt.

3.1.2 Konzentrationsreihe der Inkubation der Caco2-Zellen mit Oxalat und Glyoxylat

Im Anschluss an die Erstellung der Zeitreihe wurde für die beiden Substanzen Oxalat und Glyoxylat jeweils eine Konzentrationsreihe (für Oxalat in folgenden Konzentrationsschritten: 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM; für Glyoxylat in folgenden Konzentrationsschritten: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM) erstellt, um eine Aussage hinsichtlich der Inkubationsmenge treffen zu können.

3.2 Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA)

Die Isolierung der RNA erfolgte bei sämtlichen Caco2-Zellen, die zuvor mit Glycin, Hydroxyprolin, Oxalat, Glyoxylat sowie Glykolat inkubiert wurden.

3.2.1 Isolierung mit TRIzol®

Um die RNA der Caco2-Zellen zu isolieren, wurde das Reagenz TRIzol® (Invitrogen / 15596-018) verwendet. Im Folgenden sind die Arbeitsschritte der RNA-Isolierung aufgelistet:

- Absaugen des Caco2-Mediums
- Waschen der Zellen mit PBS auf Eis

- Hinzugabe von 1 ml TRIzol® auf jedes der Wells
- Inkubation für 5 min. (Raumtemperatur)
- Lösen der Caco2-Zellen vom Wellboden
- Gabe von 200 µl Chloroform in Eppendorf-Gefäße
- Hinzugabe der Caco2-Zellen
- Schütteln (15 sec.)
- Inkubation für ca. 3 min. (Raumtemperatur)
- Zentrifugation für 15 min. (12 000 x g).

Durch das Zentrifugieren entstanden die folgenden drei Phasen, welche durch spezielle Eigenschaften sowie Inhalte voneinander zu differenzieren sind:

- untere Phase Phenol-Chloroform-Phase: enthält Proteine
- mittlere Phase Interphase: enthält die DNA
- obere Phase wässrige Phase: enthält die RNA.

Um die RNA weiter isolieren zu können, wurde die obere Phase, welche die RNA enthielt, von den beiden anderen Phasen entnommen und folgende Schritte durchgeführt:

- Hinzugabe von 500 µl Isopropanol zur RNA
- Inkubation für 10 min. (Raumtemperatur)
- Zentrifugation für 20 min. (7500 x g, 4 °C).

Das durch das Zentrifugieren entstandene RNA-Pellet wurde mithilfe eines Vortex mit 1 ml Ethanol (75 %) gewaschen.

- Zentrifugation für 5 min. (7500 x g, 4 °C)
- Entfernen des Ethanols
- Trocknen des Pellets (Raumtemperatur)
- Aufnahme des Pellets in 30 µl nukleasefreies *aqua dest.*

Anschließend konnte das Produkt entweder zur weiteren Untersuchung für die folgende reverse Transkription eingesetzt oder für spätere Versuche im Tiefkühlschrank (-80 °C) aufbewahrt werden.

3.2.2 Isolierung mit dem RNA-Isolierungs-Kit

Im Rahmen der Studie wurde die RNA außerdem mit einem weiteren Verfahren isoliert, das nachfolgend beschrieben wird: Zu Anfang wurden 350 µl RLT-Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol in einem Sarstedt-Röhrchen vorgelegt.

- Absaugen des Caco2-Mediums
- Waschen der Zellen mit PBS auf Eis
- Hinzugabe von je 350 µl des RLT-Puffer-β-Mercaptoethanol-Gemisches in die Komponenten des 6-Well.

Durch die Addition des Gemisches wurden die Zellen vom Boden des Wells abgelöst, sodass in jeder Komponente des Wells eine dickflüssige Suspension, bestehend aus RLT-Puffer, β-Mercaptoethanol und gelösten Caco2-Zellen, entstand. Diese sechs Volumina wurden in je ein 1,5 ml fassendes Eppendorf-Cup überführt und entsprechend ihres Inhalts (Caco2-Zellen in Ab- und Anwesenheit von Glycin, Hydroxyprolin, Oxalat, Glyoxylat oder Glykolat) beschriftet. In jedes Eppendorf-Cup wurden 350 µl 70-prozentiges Ethanol hinzugegeben. Der gesamte Inhalt wurde dann einem Spinnsäulenverfahren unterzogen, bei dem durch mehrere Zentrifugationszyklen (jeweils 1 min., 10 x g) bei zweimaliger Zugabe von je 500 µl RPE-Puffer und einer abschließenden Zufuhr von 20 µl RNAsefreiem *aqua dest.* die RNA isoliert wurde.

3.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der RNA dient dazu aus ihr eine *complementary* DNA (cDNA) zu gewinnen. Die beschriebene Reaktion wird durch ein spezielles Enzym, die Reverse Transkriptase, katalysiert. Die reverse Transkription der zuvor isolierten Caco2-Zell-RNA wurde in den aufgelisteten Schritten durchgeführt:

- Hinzugabe von 1 μ l Random Primer Oligo dT zu 5 μ g RNA der Caco2-Zellen
- Auffüllen mit nukleasefreiem *aqua dest.* auf 8 μ l
- Inkubation für 10 min. bei 70 °C zur Denaturierung der RNA
- Abkühlen für 15 min. auf 4 °C
- Hinzugabe von 6 μ l Wasser, 4 μ l 5x Puffer, 1 μ l 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie 1 μ l Reverse Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämievirus (M-MuLV)
- Durchführung der reversen Transkription (1h bei 37 °C)
- Inaktivierung des Enzyms (Reverse Transkriptase) bei 70 °C für 10 min.
- Abkühlen der erhaltenen cDNA auf 4 °C
- Aufbewahrung bei -20 °C für die nachfolgenden Arbeitsschritte.

3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein enzymabhängiges Verfahren, das der Vervielfältigung spezieller DNA-Sequenzen *in vitro* dient. Neben der Original-DNA werden zwei Primer (Oligonukleotide) benötigt, die die Startpunkte der DNA-Synthese definieren. Darüber hinaus wird eine DNA-Polymerase benötigt, die sich auch bei hohen Temperaturen als stabil erweist (in dieser Studie: Taq-Polymerase). Desoxynukleosidtriphosphate als Bausteine für die DNA-Synthese und eine Pufferlösung zur Stabilisierung der DNA-Polymerase sind ebenfalls notwendig. Ausgehend von der zu untersuchenden Ursprung-DNA stellt sich der Ablauf des Verfahrens wie folgt dar:

- Denaturierung (*melting*): Durch eine Temperaturerhöhung, die ein Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen der beiden DNA-Stränge zueinander bewirkt, wird der DNA-Doppelstrang aufgetrennt. Auch werden dabei die Primer vollständig voneinander getrennt, sodass diese ebenso in Einzelsträngen vorliegen.
- Primer Annealing (Hybridisierung): Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge bei Temperaturabsenkung.
- Elongation (Amplifikation): DNA-Polymerase füllt fehlende Stränge mit freien Nukleotiden, beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers dem DNA-Strang folgend, auf.

Die qualitative Polymerase-Kettenreaktion diente in der vorliegenden Studie der Qualitätskontrolle der reversen Transkription und wurde folgendermaßen durchgeführt:

5 µl (GAPDH) bzw. 2 µl (sat-1) der cDNA wurden mit 8 µl 1,25 mM dNTPs, 5 µl 10x PCR-Puffer, je 1 µl GAPDH-Forward- und Reverse-Primer (20 pmol / ml) und 1 µl DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) versetzt. Der Ansatz wurde anschließend mit nukleasefreiem *aqua dest.* auf 50 µl aufgefüllt. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem sogenannten Thermocycler durchgeführt. Insgesamt umfasste das Verfahren 22 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus den drei oben genannten Einzelschritten (Denaturierung, Primer Annealing, Elongation) bestand. Eine initiale Denaturierung von zwei Minuten, die einmalig vor dem ersten Zyklus stattfindet, stellt sicher, dass sowohl die DNA als auch die Primer gänzlich in Einzelsträngen vorliegen.

Der sich wiederholende Zyklus beginnt mit der Phase der Denaturierung, die 40 Sekunden umfasst und durch eine Temperatur von konstant 94 °C gekennzeichnet ist. Die Hybridisierung der Primer dauert 50 Sekunden und wird durch eine Temperaturabsenkung auf konstant 58 °C bewirkt. Die dritte Phase (Elongationsphase) hat eine Dauer von 60 Sekunden bei konstanten 72 °C.

Nach Ablauf der 22 Zyklen folgt eine letzte Elongation für weitere fünf Minuten bei 72 °C, um das Abschließen der Aktivität der DNA-Polymerase zu gewährleisten. Bei der Polymerase-Kettenreaktion für sat-1 beträgt die

Annealing-Temperatur 56 °C bei einer Zyklenanzahl von 35. Die beiden Tabellen (Tab. 3.1 und 3.2) fassen die Phasen der Polymerase-Kettenreaktion zusammen:

Tabelle 3.1: **Phasen der Polymerase-Kettenreaktion für GAPDH.**

Initiale Denaturierung	2 min	94 °C	
Denaturierung	40 s	94 °C	x 22
Primer Annealing	50 s	58 °C	
Elongation	60 s	72 °C	
Terminale Elongation	5 min	72 °C	

Tabelle 3.2: **Phasen der Polymerase-Kettenreaktion für sat-1.**

Initiale Denaturierung	2 min	94 °C	
Denaturierung	40 s	94 °C	x 35
Primer Annealing	50 s	56 °C	
Elongation	60 s	72 °C	
Terminale Elongation	5 min	72 °C	

3.5 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um ein Elektrophoreseverfahren, das ein Gel als Trägermedium verwendet. Die Methode ist ein Trennverfahren, das in der Lage ist, DNA aufzutrennen. Das verwendete Gel dient als eine Art Sieb. Die DNA wird auf das Gel gegeben, das in eine Pufferlösung gelegt wird, und anschließend wird ein elektrisches Feld angelegt. Die Pufferlösung verbessert die elektrische Leitfähigkeit. Innerhalb des elektrischen Feldes bewegen sich nun die Moleküle. Da die DNA negativ geladen ist, wandern die Fragmente abhängig von ihrer Größe und Ladung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in Richtung der Anode. Kurze DNA-Sequenzen wandern schneller als längere Segmente. Um die Bewegung der DNA im elektrischen Feld nachvollziehen zu können, wird sie mit Ethidiumbromid angefärbt und kann anschließend mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Zu Beginn wurde das Agarosegel (1,5 %) folgendermaßen hergestellt:

- Lösen von 1,5 g Agarose in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer (Erhitzen in der Mikrowelle),
- Hinzugabe von 4,5 µl Ethidiumbromid,
- Einfüllen der fertigen Mischung in einen Gelschlitten.

Das fertig auspolymerisierte Agarosegel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt. Wie oben beschrieben, wurde zur Verbesserung der elektrischen Leitfähigkeit eine Pufferlösung (0,5 x TBE-Puffer) hinzugegeben. Zu 20 µl der zu untersuchenden DNA wurden 5 µl 5x DNA-Agarosegel-Elektrophorese-Ladepuffer hinzugefügt und das Gemisch in die Geltaschen injiziert. Für das elektrische Feld wurde eine Spannung von 90 V angelegt und für etwa 80 Minuten aufrechterhalten. Danach konnte das Ergebnis unter UV-Licht betrachtet werden.

3.6 Real-time Polymerase-Kettenreaktion

Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip einer Polymerase-Kettenreaktion in Kombination mit einer Quantifizierung der Genexpression. Da während dieser Methode eine ständige Beobachtung des Reaktionsverlaufes möglich ist, wird das Verfahren als Echtzeit- oder real-time PCR bezeichnet.

In der vorliegenden Studie wurde die real-time PCR mit der Taqman-Sonde durchgeführt. Dieses Prinzip beruht auf dem Einsatz für die vervielfältigte DNA spezifischer Oligonukleotide, an die bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Fluoreszenzfarbstoffe zeichnen sich dadurch aus, dass sie in Gegenwart einer Lichtquelle Licht emittieren. Bei der Taqman-Methode enthalten die verwendeten Oligonukleotide jeweils zwei Fluoreszenzfarbstoffe. Die Taqman-Sonden binden während der Polymerase-Kettenreaktion an die DNA und werden durch die Polymerase hydrolysiert. Auf diese Weise werden die Fluoreszenzfarbstoffe freigesetzt und emittieren Licht. Folglich korreliert die Lichtstärke mit der Menge der freigesetzten Fluoreszenzfarbstoffe und daher auch mit der Menge der synthetisierten DNA.

Für die real-time PCR wurden 2 µl DNA, 10 µl 2x Taqman-Reaktionspuffer, 1 µl 20x Taqman-Primer und 7 µl *aqua dest.* zusammengefügt und der Thermocycler mit folgenden Einstellungen (Tab. 3.3) programmiert:

Tabelle 3.3: **Segmente der real-time PCR.**

Segment	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
1. Segment	2 min.	50 °C	1
2. Segment	10 min.	95 °C	1
3. Segment	15 sec. 1 min.	95 °C 60 °C	40

Die real-time PCR ist in drei Segmente gegliedert, wobei die ersten beiden Segmente jeweils einmal durchlaufen werden, während das dritte Segment zwei verschiedene Temperaturintervalle umfasst und 40 Mal abläuft.

Die Auswertung der real-time PCR wurde anhand folgender Formel mit der $\Delta\Delta C_t$ Methode (*cycle threshold*, Schwellenwert Zyklus) vorgenommen:

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

Dieser *cycle threshold-Wert* ist eine theoretisch existente Größe und beschreibt den Beginn eines exponentiellen Wachstums. In der quantitativen real-time PCR findet der C_t -Wert Anwendung hinsichtlich der DNA-Molekül-Quantifizierung. Durch den Vergleich der C_t -Werte ist es möglich zu ersehen, in wie weit die Vorstufen des Oxalats die Quantität der Ribonukleinsäure beeinflusst haben.

3.7 Western Blot

Folgende Schritte wurden als vorbereitende Maßnahmen durchgeführt:

3.7.1 Präparation der Zellmembranproteine

- Abkühlen der Caco2-Zellen auf 4 °C
- Zweimaliges Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS
- Hinzugabe von 0,5 ml Membranpuffer in jedes Well
- Abschaben der Zellen vom Boden des Wells
- Transfer in vorgekühltes Inkubationsgefäß
- Homogenisierung
- Zentrifugation des Zellysats für 10 min. bei 13 000 x g und 4 °C
- Entfernen des Pellets
- Ultrazentrifugation (30 min., 100 000 x g, 4 °C)
 - Pellet: Waschen des Pellets (enthält die Zellmembranen) mit Membranpuffer und Lösen des Pellets in 1 x SDS-Ladepuffer
 - Überstand: Hinzugabe von ¼ des Volumens des Überstandes an 5 x SDS-Ladepuffer.

3.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

- Durchführung eines Bradfordtests zur Ermöglichung einer gleichmäßigen Gelbeladung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
- Verdünnung der Proteinlösung auf 1 : 10
- Zusammenfügen von 20 µl Proteinlösung, 20 µl Ameisensäure und 1 ml Bradfordlösung (1x)
- Inkubation für 5 min. bei Raumtemperatur
- Extinktion im Photometer bei 595 nm (Leerwert: 20 µl *aqua dest.*, 20 µl Ameisensäure und 1 ml Bradfordlösung)
- Erstellen einer Eichgeraden mit aufsteigenden Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA).

3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine eines Proteingemisches gemäß ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Im ersten Schritt erfolgt eine Vorbehandlung des Proteingemisches mit Natriumlaurylsulfat sowie einem Thiol. Bei Natriumlaurylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) handelt es sich um ein anionisches Detergens, das an die hydrophoben Regionen der Proteine bindet. Da Natriumlaurylsulfat sehr stark negativ geladen ist, wird die Ladung der Proteine maskiert, sodass sich die Proteine alle im gleichen Ladungszustand befinden. Zusätzlich erfolgt eine Inkubation mit Substanzen, die in der Lage sind, Disulfidbrücken aufzuspalten (z.B. β -Mercaptoethanol). Für die Gelelektrophorese werden ein Trenngel sowie ein Sammelgel hergestellt. Letzteres wird in einem diskontinuierlichen Gel auf das Trenngel gegeben. Die beiden Gele setzen sich wie folgt (Tab. 3.4) zusammen:

Tabelle 3.4: **Zusammensetzung des Trenn- bzw. Sammelgels.**

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

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gliedert sich in folgende Schritte:

- Erhitzen von 20 μ g des zytosolischen Proteins bzw. 40 μ g des Membranproteins in SDS-PAGE-Ladepuffer auf 95 °C (10 min.)
- Färben mit Bromphenolblau
- Aufladen auf das diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel
- Durchführen der Elektrophorese bei einer maximalen Spannung von 300 V und einem konstanten Strom von 20 mA.

Für den vorgefärbten Molekulargewichtsmarker (Fermentas / SM0671) wurde eine eigene Geltasche verwendet.

3.7.4 „Blotting“

Der Western Blot wird auch als Immunblot bezeichnet und ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Proteinen. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Trenngel werden auf eine Trägermembran (z.B. Nitrozellulose) übertragen. Dieser Vorgang wird als „Blotting“ bezeichnet. Auf diese Weise entsteht ein Abbild des Gels. Für den Proteinnachweis werden ein primärer sowie ein sekundärer Antikörper eingesetzt. Der primäre Antikörper ist gegen das nachzuweisende Protein gerichtet, während der sekundäre Antikörper den primären Antikörper erkennen kann. Für den Nachweis ist der sekundäre Antikörper mit einem Enzym (z.B. Peroxidase) gekoppelt. Durch die Zugabe der Peroxidase wird eine Reaktion katalysiert, die lichtemittierend ist und mithilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann.

3.7.5 Proteintransfer auf die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran

Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran (Roche / 3010040) erfolgt im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

- Äquilibration des Gels in Western Blot-Puffer bei 4 °C
- Eintauchen einer PVDF-Membran in Methanol
- Waschen der PVDF-Membran in *aqua dest.*
- Hinzulegen der Membran in den Western Blot-Puffer
- Schichten des Gels sowie der aktivierten PVDF-Membran zwischen in Western Blot-Puffer getränkte Faserpads und Filterpapier
- Einsetzen in den Western Blot-Kassettenhalter
- Einsetzen des Kassettenhalters in die Western Blot-Kammer
- Füllen der Kammer mit Western Blot-Puffer

- Durchführen der Elektrophorese (1h, 100 V).

3.7.6 Proteindetektion auf Western Blots

- Waschen der PVDF-Membran in PBS (0,05 % Tween 20) zur Entfernung des restlichen Methanols
- Inkubation der PVDF-Membran in Magermilch (1,5 %) für 1h; dieser Schritt verhindert ein unspezifisches Binden des Antikörpers
- Verdünnen der primären anti-sat-1- bzw. anti- β -Aktin-Antikörpers (1 : 1000) in 5-prozentiger Magermilch (in PBS, 0,05 % Tween 20)
- Gabe von 1 ml der Antikörperlösung auf die Membran
- Versiegelung der Membran mit Parafilm
- Inkubation über Nacht bei 4 °C
- Dreimaliges Waschen der Membran (15-minütige Intervalle) mit PBS (mit 0,05 % Tween 20 versetzt) am nächsten Tag
- Verdünnen der Peroxidase-gekoppelten sekundären anti-Kaninchen- bzw. anti-Maus-Antikörper (1 : 1000 bzw. 1 : 10000) in 5-prozentiger Magermilch (in PBS, 0,05 % Tween 20)
- Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden
- Dreimaliges Waschen der Membran (15-minütige Intervalle) mit PBS (mit 0,05 % Tween 20 versetzt)
- Detektion mit 10 ml frisch angesetzter ECL-Lösung
- Inkubation der Membran für 5 Minuten
- Entwicklung der Blots mithilfe des LAS3000 Imagers.

3.8 Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Zum Vergleich der unterschiedlichen RNA- oder Proteinexpression in der PCR und im Western Blot wurde der ungepaarte *t*-Test nach Student herangezogen.

4. Ergebnisse

4.1 Anzucht der Caco2-Zellen

Zu Beginn wurden die Caco2-Zellen täglich mit dem Caco2-Zellmedium gefüttert; vom dritten bis einschließlich sechsten Tag wurden sie zusätzlich in Oxalat bzw. einer Oxalatvorstufe (Glycin, Hydroxyprolin, Glyoxylat und Glykolat) inkubiert.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 4.1 – 4.6, S. 44 - 49) veranschaulichen lichtmikroskopisch sichtbare morphologische Veränderungen der Caco2-Zellen während der Inkubation in Oxalat, Glyoxylat, Glycin, Glykolat und Hydroxyprolin. Die folgenden Abbildungen zeigen Parallelansätze für Oxalat und Glyoxalat sowie die unbehandelten Kontrollen. Zur besseren Übersicht und Charakterisierung wurden die Zellen bei drei unterschiedlichen Vergrößerungen fotografiert.

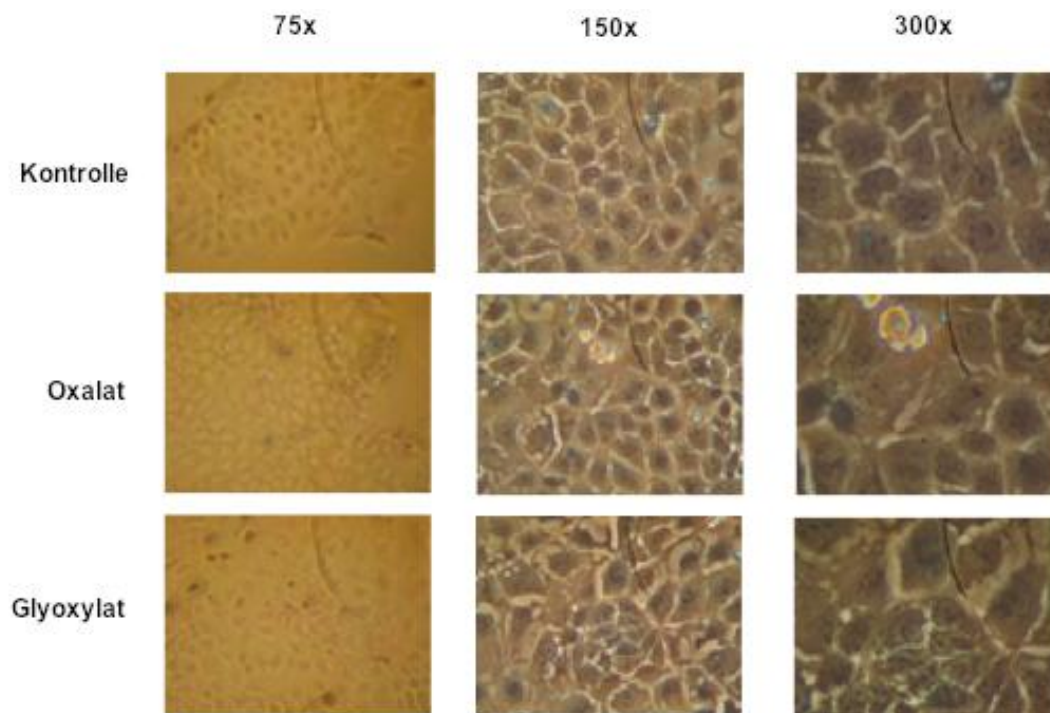


Abbildung 4.1: **Caco2-Zellen vor der Inkubation (Tag 0)**. Für alle Zellen sind Aufnahmen bei 75-, 150-, und 300-facher Vergrößerung durchgeführt worden.

Abbildung 4.1 verdeutlicht, dass für die Inkubation nahezu identische Ausgangsbedingungen vorlagen. Alle Zellen waren konfluent ausgewachsen (75-fache Vergrößerung) und bei den höheren Vergrößerungen (150- und 300-fach) waren die Zellgrenzen gut erkennbar und zeigten eine „pflastersteinartige“ Gestalt.

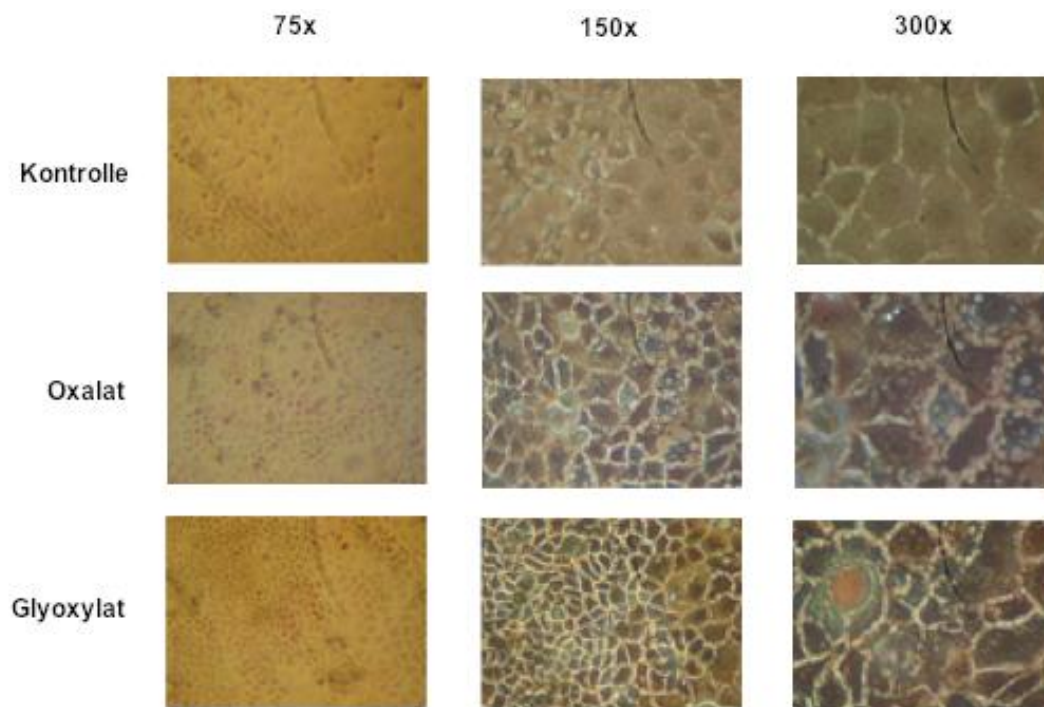


Abbildung 4.2: **Caco2-Zellen inkubiert in Oxalat bzw. Glyoxylat an Tag 1 nach Zugabe der Substanzen.** Sowohl für die unbehandelte Kontrolle als auch für die in Oxalat bzw. Glyoxylat inkubierten Zellen sind Aufnahmen bei 75-, 150-, und 300-facher Vergrößerung dargestellt.

Eine eintägige Inkubation mit Oxalat und Glyoxylat (Abb. 4.2) schien für das Zellwachstum förderlich zu sein, da im ausgewählten Areal deutlich mehr Zellen nachzuweisen waren, ohne dass sich die Form der Zellen wesentlich geändert zu haben schien. Diese Beobachtungen schienen sich an Tag 2 und 3 der Inkubation zu bestätigen (Abb. 4.3 und 4.4, S. 46 - 47).

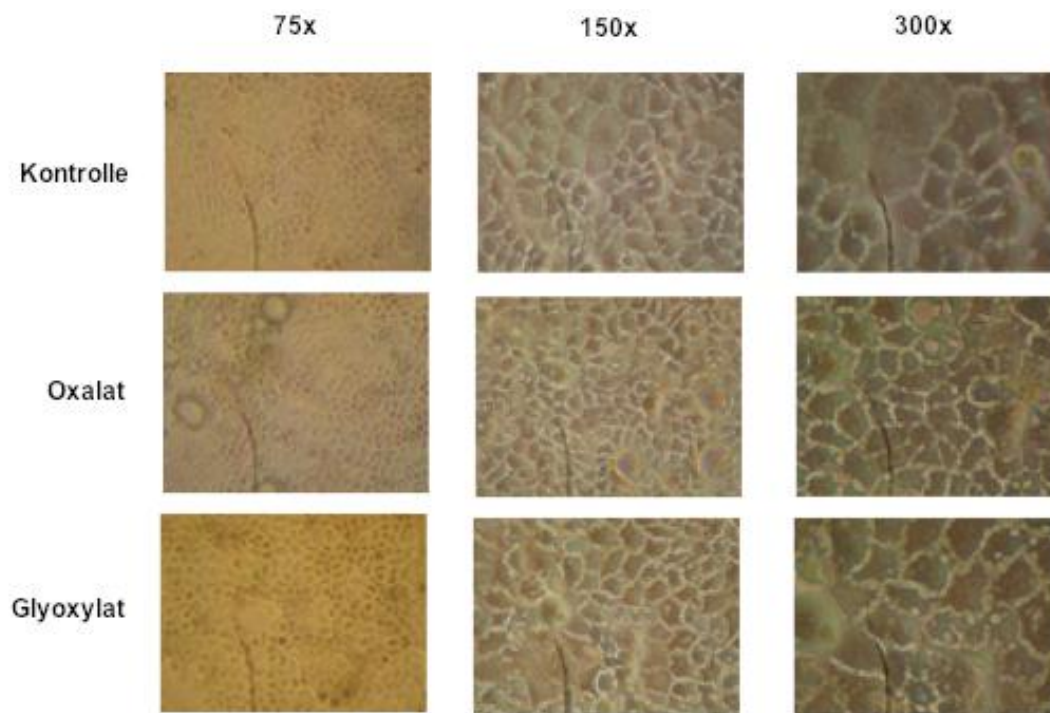


Abbildung 4.3: **Caco2-Zellen inkubiert in Oxalat bzw. Glyoxylat an Tag 2 nach Zugabe der Substanzen.** Sowohl für die unbehandelte Kontrolle als auch für die in Oxalat bzw. Glyoxylat inkubierten Zellen sind Aufnahmen bei 75-, 150-, 300-facher Vergrößerung dargestellt. Die Zellgrenzen auf den niedrigen Vergrößerungen erscheinen im Vergleich zum ersten Inkubationstag etwas undeutlicher. Zusätzlich kann eine weitere Zellvermehrung beobachtet werden.

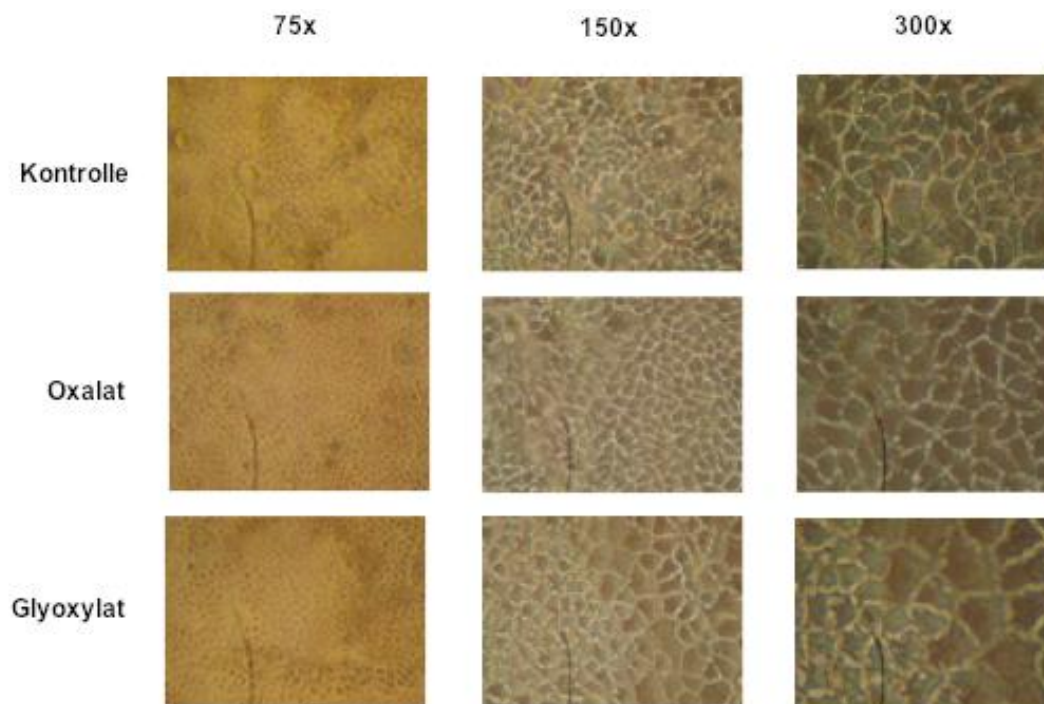


Abbildung 4.4: **Caco2-Zellen inkubiert in Oxalat bzw. Glyoxylat an Tag 3 nach Zugabe der Substanzen.** Alle Abbildungen sind bei 75-, 150-, 300-facher Vergrößerung dargestellt. Am dritten Inkubationstag sind bei höchster Vergrößerung in der unbehandelten Kontrolle einzelne Caco2-Zellen mit deutlichen Zellgrenzen zu erkennen. Auffällig ist, dass die in Oxalat bzw. Glyoxylat inkubierten Zellen größer sind als die der unbehandelten Kontrolle. Die in Oxalat inkubierten Zellen weisen eine regelmäßige Zellform auf, während die in Glyoxylat inkubierten Zellen etwas unregelmäßiger geformt sind. Im Vergleich zum zweiten Inkubationstag ist ein weiteres Wachstum der Caco2-Zellen erkennbar, das für die in Oxalat bzw. Glyoxylat inkubierten Zellen stärker ausfällt.

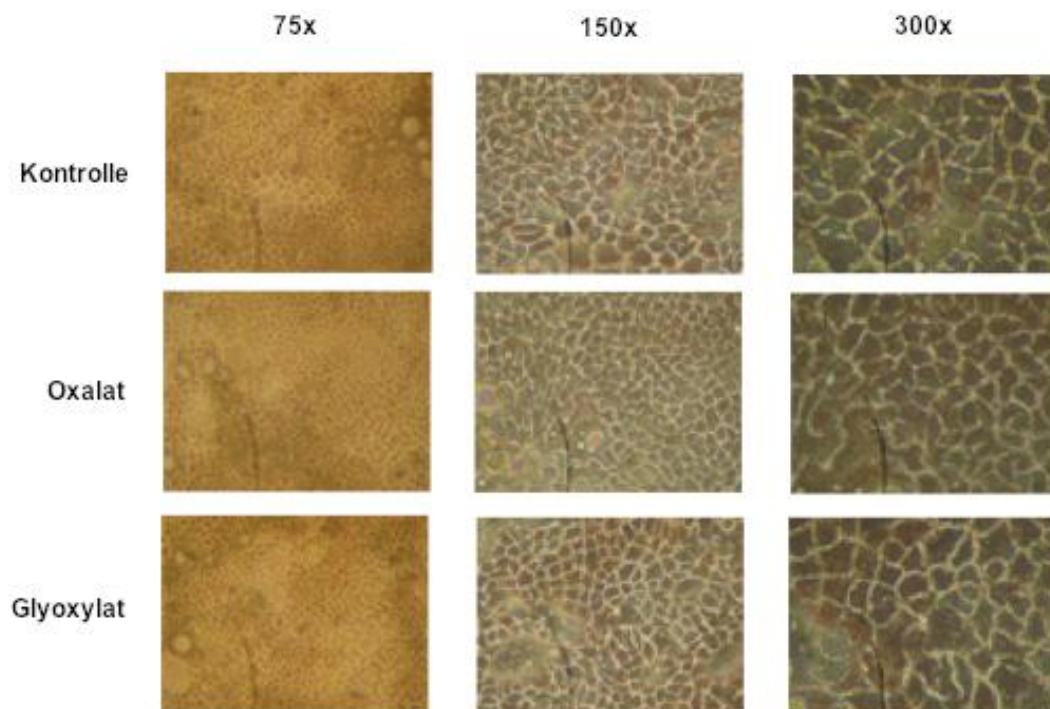


Abbildung 4.5: **Caco2-Zellen inkubiert in Oxalat bzw. Glyoxylat an Tag 4 nach Zugabe der Substanzen.** Sowohl für die unbehandelte Kontrolle als auch für die in Oxalat bzw. Glyoxylat inkubierten Zellen sind Aufnahmen bei 75-, 150-, 300-facher Vergrößerung dargestellt. Die in Oxalat bzw. Glyoxylat inkubierten Caco2-Zellen sind im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle annähernd regelmäßig geformt. Sie weisen zudem klare Zellgrenzen auf, die vor allem bei 300-facher Vergrößerung gut erkennbar sind.

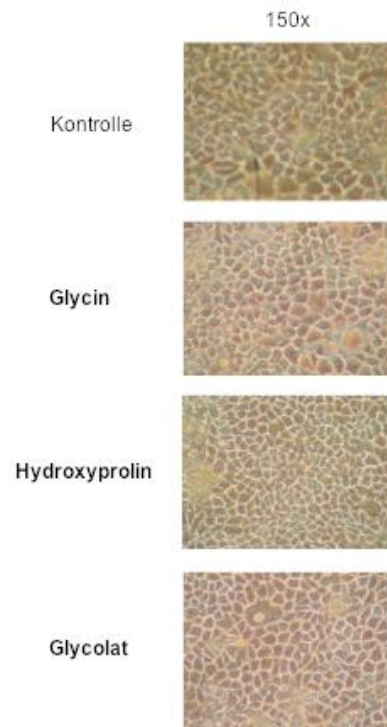


Abbildung 4.6: **Caco2-Zellen inkubiert in Glycin, Hydroxyprolin bzw. Glykolat an Tag 4 nach Zugabe der Substanzen.** Die Aufnahmen sind bei 150-facher Vergrößerung dargestellt. Das Zellwachstum für die in Glycin, Hydroxyprolin bzw. Glykolat inkubierten Caco2-Zellen weicht im Vergleich zu Oxalat bzw. Glyoxylat nicht so deutlich von der unbehandelten Kontrolle ab.

Die Inkubation der Caco2-Zellen in Glycin, Hydroxyprolin bzw. Glykolat ist lediglich mit jeweils einer Aufnahme bei 150-facher Vergrößerung (Abb. 4.6) am vierten Inkubationstag dargestellt, da die folgenden Untersuchungen nur mit den beiden anderen Inkubationssubstanzen Oxalat und Glyoxylat durchgeführt wurden (siehe Kap. 4.2, S. 49). In allen drei Versuchen ist eine „pflastersteinartige“ Formation der Zellen zu erkennen. Die Zellgrenzen sind gut sichtbar, während bei der Inkubation der Caco2-Zellen in Hydroxyprolin eine deutlichere Zellvermehrung stattgefunden hat und die Zellen kleiner erscheinen.

4.2 Inkubation der Caco2-Zellen in Oxalat und Oxalatvorstufen

Die Caco2-Zellen wurden in einem Caco2-Medium mit Oxalat oder einer Oxalatvorstufe für insgesamt vier Tage inkubiert (Glycin 1 mM, Hydroxyprolin 1 mM, Oxalat 100 μ M, Glyoxylat 1mM, Glykolat 1 mM, jeweils im Zellkulturmedium gelöst), um den Einfluss dieser Substanzen auf die Expression der RNA in den Caco2-Zellen zu untersuchen. Die Isolierung der RNA erfolgte mittels TRIzol® und einem RNA-Isolierungs-Kit. Durch eine reverse Transkription wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und für die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Das „house-keeping“-Gen GAPDH und der Sulfat-Anionen-Transporter sat-1 wurden mithilfe der real-time PCR in den zuvor mit den Substanzen inkubierten Caco2-Zellen nachgewiesen (Abb. 4.7).

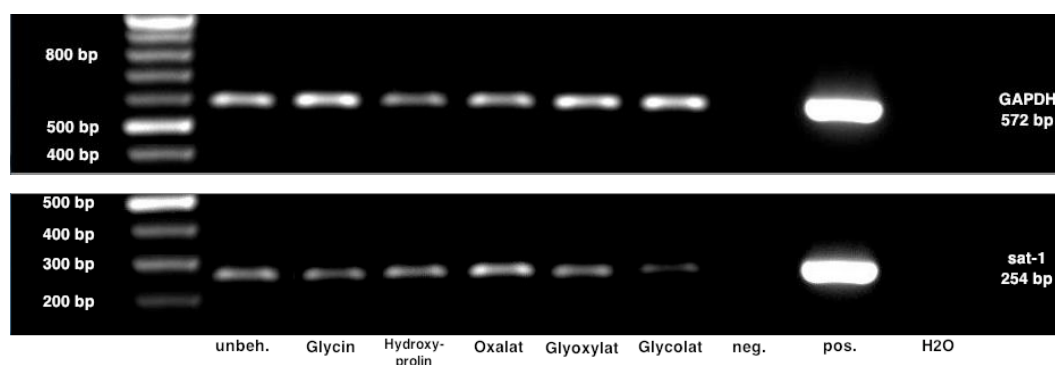


Abbildung 4.7: **Elektrophorese-Bild der RNA-Expression von sat-1 in Caco2-Zellen nach Inkubation in Oxalat und Oxalatvorstufen.**

Für den Versuch wurde folgendes Protokoll gewählt: Inkubation der Caco2-Zellen in je 1 mM Glycin, Hydroxyprolin, Glyoxylat, Glykolat sowie 100 μ M Oxalat für 4 Tage, anschließende RNA-Isolierung, reverse Transkription zum Umschreiben der RNA in cDNA; Sichtbarmachung der Produkte der PCR mithilfe einer Agarosegel-Elektrophorese und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von fünf Versuchen, die nach einem identischen Protokoll durchgeführt wurden.

Die mRNA-Expression des sat-1 wurde mithilfe einer real-time PCR nachgewiesen. Es wurde ein Assay verwendet, der gegen die Spleißvarianten 1 und 3 gerichtet war. Sowohl Oxalat als auch die Vorstufen Hydroxyprolin,

Glyoxylat und Glykolat haben die relative mRNA-Expression des sat-1 ($\Delta\Delta Ct$) erhöht, während die Inkubation mit Glycin zu keiner wesentlichen Veränderung des sat-1-mRNA-Gehaltes führte. Oxalat und Glyoxylat haben die Expression des sat-1 am deutlichsten beeinflusst (Abb. 4.8, S. 52). Die folgende Tabelle (Tab. 4.1) zeigt die jeweilige Veränderung in der relativen mRNA-Expression nach Inkubation mit Oxalat bzw. seinen Vorstufen. Die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler ergeben sich aus den Untersuchungen der real-time-Analysen an drei voneinander unabhängigen Zellpassagen, die zur Vereinfachung in den Tabellen 4.1, 4.2 und 4.3 (S. 51 – 54) jeweils als Passage 1, 2 und 3 bezeichnet wurden.

Tabelle 4.1: Veränderung der mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der Caco2-Zellen in Oxalat und Oxalatvorstufen.

Folgende Konzentrationen wurden eingesetzt: Glycin, Hydroxyprolin, Glyoxylat und Glykolat jeweils 1 mM, Oxalat 100 μM . Die Inkubationszeit betrug 4 Tage.

	Glycin	Hydroxyprolin	Oxalat	Glyoxylat	Glykolat
Passage 1	- 0,10	0,30	0,69	0,86	0,56
Passage 2	0,21	0,37	0,85	0,97	0,38
Passage 3	0,13	0,26	1,39	1,56	0,37
Mittelwert	0,08	0,31	0,98	1,13	0,44
SEM	0,09	0,03	0,21	0,22	0,06

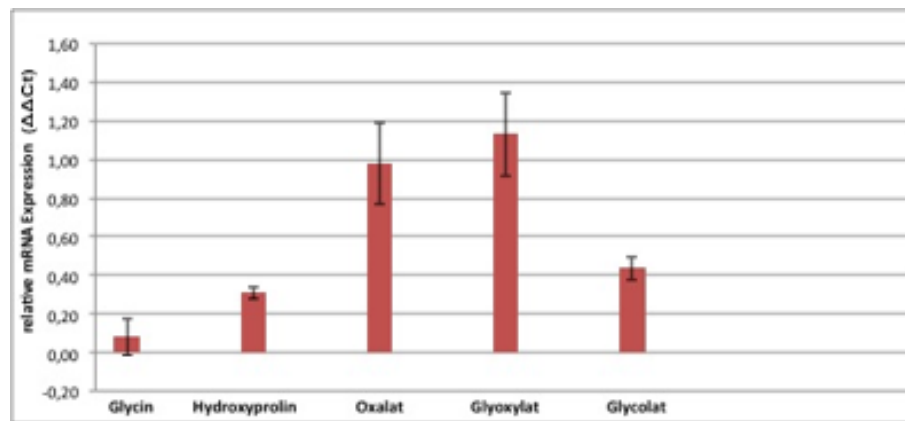


Abbildung 4.8: **Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der Caco2-Zellen in Oxalat und Oxalatvorstufen.**

Die Versuche wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt: Inkubation der Caco2-Zellen in je 1 mM Glycin, Hydroxyprolin, Glyoxylat, Glykolat bzw. 100 μ M Oxalat gelöst im Medium für 4 Tage. Der in der real-time PCR (Taqman-Sonde) verwendete Assay war gegen die Spleißvarianten 1 und 3 gerichtet. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. Die Darstellung ergibt sich aus drei unabhängigen Zellpassagen mit je zwei Wiederholungen.

4.3 Zeitreihe der Inkubation der Caco2-Zellen

Aufgrund der Ergebnisse aus der real-time PCR, dass Oxalat und Glyoxylat die Expression des sat-1 in den Caco2-Zellen am stärksten beeinflussen, wurde im Anschluss jeweils eine Zeitreihe der Inkubation mit diesen beiden Substanzen durchgeführt.

4.3.1 Oxalat

Die Caco2-Zellen wurden über einen Zeitraum von ein bis sechs Tagen in 100 μ M Oxalat (gelöst im Zellkulturmedium) inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert, mithilfe einer reversen Transkription die RNA in cDNA umgeschrieben und die mRNA von sat-1 und GAPDH in einer real-time PCR nachgewiesen. Auf diese Weise konnte ermittelt werden, nach wie vielen Tagen der Inkubation die mRNA-Expression des sat-1 maximal erhöht ist.

Die Inkubation der Caco2-Zellen mit Oxalat ergab eine Erhöhung der mRNA-Expression des sat-1 für alle Inkubationszeiträume gegenüber dem 1. Tag.

Während der RNA-Gehalt in den ersten drei Tagen anstieg, wurde ab dem 4. Tag keine Änderung des RNA-Gehalts registriert. Letztendlich führte die Inkubation mit 100 μM Oxalat zu einer Verdopplung des sat-1-RNA-Gehalts (Tab. 4.2 u. Abb. 4.9).

Tabelle 4.2: **Inkubation der Caco2-Zellen in Oxalat für 1 – 6 Tage.** Oxalat lag in einer Konzentration von 100 μM vor.

	1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage
Passage 1	1,79	1,12	1,18	1,40	1,07	1,44
Passage 2	0,22	0,03	0,83	0,52	0,68	0,08
Passage 3	0,02	0,44	0,77	1,35	1,36	1,62
Mittelwert	0,34	0,53	0,93	1,09	1,04	1,05
SEM	0,23	0,32	0,13	0,29	0,20	0,49

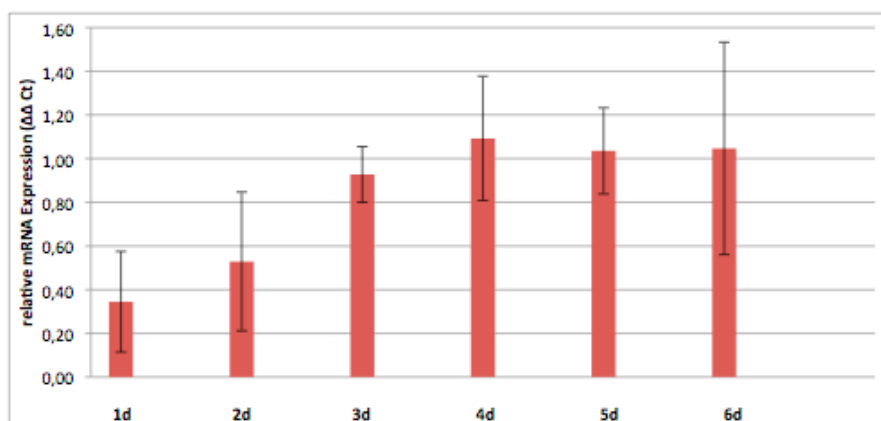


Abbildung 4.9: **Inkubation der Caco2-Zellen für 1 – 6 Tage in Oxalat.**

Der real-time PCR Assay (Taqman-Sonde) war gegen die Spleißvarianten 1 und 3 gerichtet. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. $\Delta\Delta\text{Ct}$ gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Zellpassagen mit je zwei Wiederholungen.

4.3.2 Glyoxylat

Auch für Glyoxylat wurde eine Zeitreihe mit ein bis sechs Tagen Inkubation (1 mM Glyoxylat) der Caco2-Zellen durchgeführt und anschließend die maximale mRNA-Expression des sat-1 in einer real-time PCR ermittelt. Während der ersten vier Inkubationstage ist ein kontinuierlicher Anstieg der

mRNA-Expression des sat-1 zu erkennen. Am dritten und vierten Inkubationstag ist die mRNA-Expression um mehr als den Faktor 2 erhöht. Nach Erreichen des Maximums an Tag 4 ist ein Abfall der Expression zu verzeichnen (Tab. 4.3 u. Abb. 4.10).

Tabelle 4.3: **Inkubation der Caco2-Zellen in Glyoxylat für 1 – 6 Tage.** Glyoxylat lag in einer Konzentration von 1 mM vor.

	1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage
Passage 1	0,66	0,72	0,92	1,87	1,01	1,16
Passage 2	0,19	0,25	1,16	0,54	0,66	0,01
Passage 3	0,30	0,83	1,01	1,17	0,72	0,41
Mittelwert	0,38	0,60	1,03	1,19	0,80	0,53
SEM	0,14	0,18	0,07	0,39	0,11	0,34

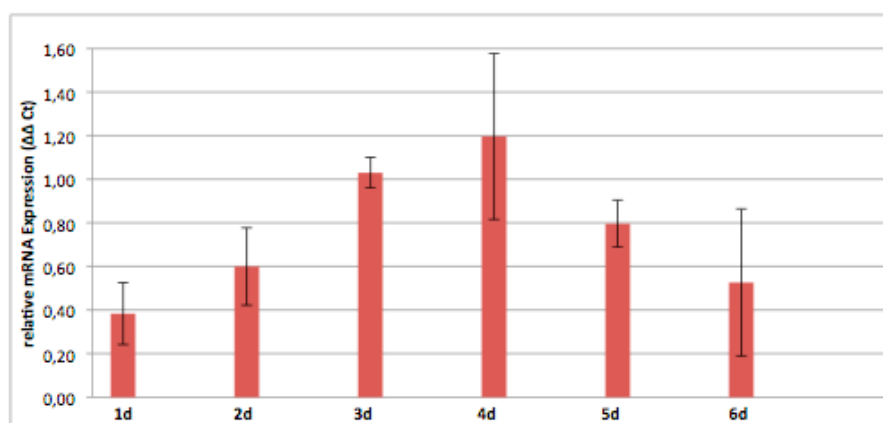


Abbildung 4.10: **Inkubation der Caco2-Zellen für 1 – 6 Tage in Glyoxylat.** Der real-time PCR Assay (Taqman-Sonde) war gegen die Spleißvarianten 1 und 3 gerichtet. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. $\Delta\Delta Ct$ gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Passagen mit je zwei Wiederholungen.

4.4 Konzentrationsreihe zur Bestimmung der optimalen Expression von sat-1-mRNA durch Oxalat und Glyoxylat

Zusätzlich zu der Bestimmung der Inkubationszeit, die eine maximale sat-1-mRNA-Expression bewirkt, sollte anhand der Konzentrationsreihe die Oxalat- bzw. Glyoxylatkonzentration ermittelt werden, die eine maximale Expression

der sat-1-mRNA bewirkt. Die Inkubationsdauer betrug sowohl in der Konzentrationsreihe für Oxalat als auch in derjenigen für Glyoxylat vier Tage, nachdem sich diese Inkubationsdauer in den zuvor durchgeführten Zeitreihen als die Dauer mit der maximalen sat-1-mRNA-Expression erwiesen hat. Die Bestimmung der mRNA von sat-1 und GAPDH in den Caco2-Zellen wurde erneut in einer real-time PCR vorgenommen.

4.4.1 Oxalat

Die Inkubation der Caco2-Zellen wurde in Oxalatkonzentrationen von 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM durchgeführt, jeweils gelöst im Zellkulturmedium und auf den pH adjustiert (Tab. 4.4).

Die Auswertung der real-time PCR ergab, dass bei einer Inkubationsdauer von vier Tagen eine Oxalatkonzentration von 0,2 mM zu einer maximalen Expression der mRNA des sat-1 führte. Während eine Inkubation in Oxalatkonzentration von 0,01 mM und 0,05 mM lediglich eine geringfügige Steigerung der relativen mRNA-Expression bewirkte, war ab einer Inkubationskonzentration von 0,1 mM eine deutliche Steigerung zu verzeichnen, die bei 0,2 mM in die Sättigung überging (Tab. 4.4 u. Abb. 4.11, S. 56).

Tabelle 4.4: Inkubation der Caco2-Zellen für 4 Tage in verschiedenen Oxalatkonzentrationen.

	0,01 mM	0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM
Passage 1	0,04	0,17	1,43	1,67
Passage 2	0,13	0,36	0,22	0,72
Passage 3	0,17	0,79	0,96	1,37
Mittelwert	0,11	0,44	1,20	1,25
SEM	0,04	0,18	0,14	0,26

Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Passagen mit je zwei Wiederholungen.

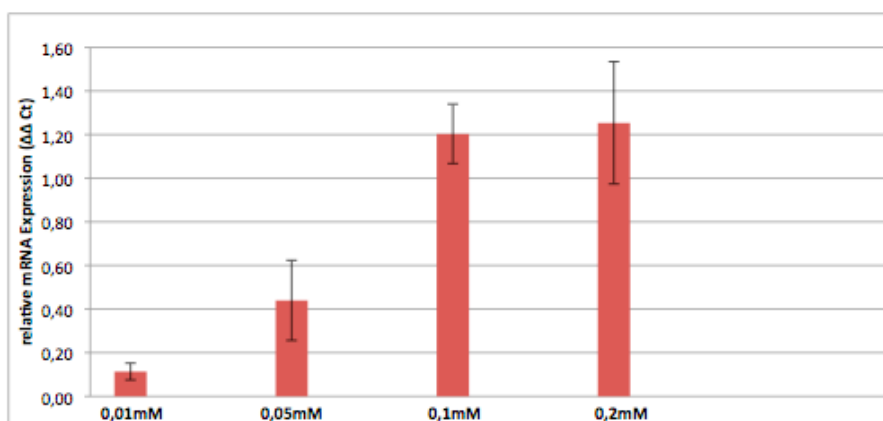


Abbildung 4.11: **Relative sat-1-mRNA-Expression in Caco2-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen in aufsteigenden Oxalatkonzentrationen.**

Inkubation der Caco2-Zellen für 4 Tage in Oxalatkonzentrationen von 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM. Die real-time PCR Assay (Taqman-Sonde) war gegen die Spleißvarianten 1 und 3 gerichtet. Die sat-1-mRNA-Expression wurden um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. $\Delta\Delta Ct$ gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte ergeben sich aus 3 unabhängigen Passagen mit je 2 Wiederholungen.

4.4.2 Glyoxylat

Die Caco2-Zellen wurden in Glyoxylatkonzentrationen von 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM und 2 mM inkubiert (Tab. 4.5). Die Inkubation der Caco2-Zellen in aufsteigenden Glyoxylatkonzentrationen von 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM und 2 mM ergab eine kontinuierliche Steigerung der Expression des mRNA des sat-1 (Abb. 4.12). Da keine höheren Konzentrationen als 2 mM Glyoxylat getestet wurden, kann über die Höhe des maximal erreichbaren RNA-Gehalts keine Aussage gemacht werden.

Tabelle 4.5: **Inkubation der Caco2-Zellen für 4 Tage in verschiedenen Glyoxylatkonzentrationen.**

	0,1 mM	0,5 mM	1 mM	2 mM
Passage 1	0,42	0,80	0,94	0,79
Passage 2	0,02	0,22	1,37	1,32
Passage 3	0,37	0,53	0,93	1,63
Mittelwert	0,27	0,52	1,08	1,25
SEM	0,13	0,17	0,15	0,25

Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Passagen mit je zwei Wiederholungen.

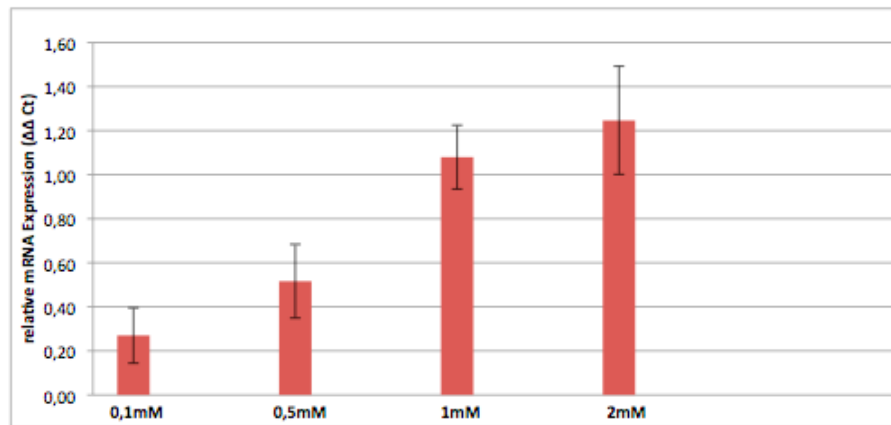


Abbildung 4.12: **Relative sat-1-mRNA-Expression in Caco2-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen in aufsteigenden Glyoxylatkonzentrationen.**

Inkubation der Caco2-Zellen für 4 Tage in Glyoxylatkonzentrationen von 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM und 2 mM. Der real-time PCR Assay (Taqman-Sonde) war gegen die Spleißvarianten 1 und 3 gerichtet. Die sat-1-mRNA-Expression wurden um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. $\Delta\Delta Ct$ gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Passagen mit je zwei Wiederholungen.

4.5 Sat-1-Proteinexpression in Caco2-Zellen nach Inkubation in Oxalat und Glyoxylat

Die Western Blot-Analyse wurde mithilfe des sat-1-Antikörpers sowie β -Aktin als „house-keeping“ Protein durchgeführt. Es konnten sowohl für Oxalat als auch für Glyoxylat Banden bei 70 kDA gefärbt werden. Diese waren jedoch in ihrer Intensität schwächer als die der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4.13, S. 58).

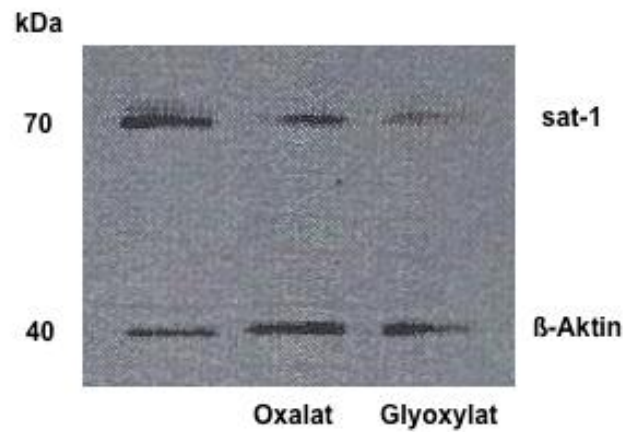


Abbildung 4.13: **Sat-1-Proteinexpression in Caco2-Zellen nach Inkubation in Oxalat bzw. Glyoxylat.**

Western Blot der Caco2-Zellen nach viertägiger Inkubation in Oxalat bzw. Glyoxylat. Es wurden ein anti-β-Aktin sowie ein anti-sat-1-Antikörper verwendet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus einer Anzahl von drei Versuchen, die nach einem identischen Protokoll durchgeführt wurden.

5. Diskussion

Die Intention der vorliegenden Studie war die Untersuchung des Einflusses von Oxalat und seinen Vorstufen auf die Expression eines Sulfat-Anionen-Transporters, des sat-1. Der sat-1 transportiert Oxalat und Sulfat durch einen bidirektionalen Austauschmechanismus, sodass die Sulfatresorption sowie die Homöostase von Oxalat und Sulfat an ihn gekoppelt sind.

Da erhöhte Kalziumoxalatspiegel in Plasma und Urin als eine Ursache für das Nierensteinleiden gelten, sind Erkenntnisse über Oxalat und seine Vorstufen und deren Wirkung auf bei der Resorption von Sulfat und Oxalat beteiligte Transporter wichtig, um die Pathophysiologie der durch Kalziumoxalat entstehenden Nierensteine erklären zu können.

Die Untersuchungen erfolgten an Caco2-Zellen, da diese sowohl den sat-1-Transporter endogen enthalten als auch die Eigenschaften von Enterozyten aufweisen und ein brauchbares Modell zu der *invivo*-Situation darstellen.

Die im Ergebnisteil beschriebenen Fotografien veranschaulichen die Zellzucht der Caco2-Zellen. Dabei ist ein Einfluss von Oxalat und Glyoxylat auf das Wachstumsverhalten der Caco2-Zellen deutlich zu erkennen. Die in Oxalat bzw. Glyoxylat inkubierten Zellen unterscheiden sich vom ersten Inkubationstag an von den Zellen in der unbehandelten Kontrolle. Die Bilder lassen vermuten, dass es durch die Inkubation in Oxalat bzw. Glyoxylat zu einem beschleunigten Zellwachstum kommt, wie in der 300-fachen Vergrößerung erkennbar ist (Kap. 4.1, S. 44 – 48). Dies ist jedoch nur eine Vermutung, da kein Auszählen der Zellen an den entsprechenden Inkubationstagen erfolgte. Die Betrachtung der Zellfotografien während der vier Inkubationstage zeigt deutlich, dass sowohl Oxalat als auch seine Vorstufe Glyoxylat einen Einfluss auf die Caco2-Zellen haben.

5.1 Die Bedeutung der Vorstufen des Oxalats für den sat-1-Transporter

Bei Glyoxylat und Glykolat handelt es sich um direkte Vorstufen des Oxalats. Oxalat selbst ist ein Dicarboxylat mit zwei endständigen Carboxylgruppen, während Glyoxylat über eine Carboxyl- und eine Aldehydgruppe und Glykolat über eine Carboxyl- und eine Hydroxylgruppe verfügen. Die beiden weiteren Oxalatvorstufen Glycin und Hydroxyprolin sind Aminosäuren und stellen keine direkten Vorstufen des Oxalats dar.

Schnedler et al. (2011) beschreiben, dass nicht nur Oxalat sondern auch die direkte Vorstufe Glyoxylat vom sat-1 transportiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden (*Schnedler et al. 2011*), dass Glyoxylat die Expression des sat-1-Proteins in HepG2-Zellen steigern kann. Aufgrund dessen kann vermutet werden, dass diese und gegebenenfalls auch weitere Vorstufen einen Einfluss auf die Expression des sat-1 haben könnten. Diese Untersuchung lässt aufgrund der ähnlichen Eigenschaften der Caco2-Zellen und menschlicher Enterozyten eine Aussage über den menschlichen Organismus zu.

In der Gelelektrophorese konnte für alle Substanzen in den Caco2-Zellen (Abb. 4.7, S. 50) eine, den sat-1 repräsentierende Bande unterschiedlicher Intensität bei gleicher Beladung des Gels nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die Substanzen unterschiedliche Wirkungen auf die Expression haben. Da es sich bei Glyoxylat und Glykolat um direkte Vorstufen des Oxalats handelt, könnte angenommen werden, dass diese beiden Substanzen die sat-1-Expression entweder direkt oder durch nachfolgende Synthese von Oxalat während der Inkubation erhöhen können. Diese Vermutung kann in der vorliegenden Studie nur teilweise bestätigt werden, da lediglich die in Oxalat bzw. Glyoxylat inkubierten Caco2-Zellen eine ähnlich starke Expression des sat-1-Transporters bewirken konnten, wohingegen die Expression der in Glykolat inkubierten Zellen deutlich schwächer ausgeprägt ist. Der Einfluss von Hydroxyprolin und Glycin entspricht der unbehandelten Kontrolle.

Schnedler et al. (2011) beschreiben, dass neben Oxalat Glyoxylat nicht nur ein Substrat des sat-1 ist, sondern zusätzlich die sat-1-Proteinexpression in HepG2-Zellen erhöht. Auch in Caco2-Zellen scheint neben Oxalat Glyoxylat

die sat-1-Proteinexpression geringfügig zu erhöhen. Da die Ergebnisse nicht quantifiziert wurden, steht eine abschließende Bewertung noch aus. Die Versuche zeigen jedoch, dass unabhängig vom Zelltyp die Expression von sat-1 sowohl auf RNA-Ebene als auch auf der Ebene des Proteins möglicherweise erhöht ist.

Beim Austesten der Konzentrationsabhängigkeit zum Auffinden der optimalen Konzentration von Oxalat und Glyoxylat auf die sat-1-RNA-Expression wurde ab 0,1 mM Oxalat und ab 1 mM Glyoxalat ein Sättigungsverhalten festgestellt. Dies zeigt, dass Oxalat gegenüber Glyoxalat bei einer 10-fach niedrigeren Konzentration wirksam ist.

5.2 Auswirkung der gesteigerten sat-1-Expression auf den Organismus

Die vorliegende Untersuchung konnte nachweisen, dass die Expression der sat-1-RNA in den humanen Caco2-Zellen durch Oxalat und Glyoxylat gesteigert werden kann. Es muss hinterfragt werden, wie sich eine solche verstärkte Expression des sat-1-Transporters auf den Organismus auswirken könnte. Der Transporter fungiert als bidirektionaler natriumabhängiger Austausch von Sulfat und Oxalat und spielt somit eine entscheidende Rolle für den Oxalat- und Sulfattransport, da er für die Homöostase der beiden Substanzen verantwortlich ist (*Brzica et al. 2013, Krick et al. 2009*). Eine in Studien induzierte Herunterregulierung des sat-1-Transporters bewirkte eine erhöhte Sulfatausscheidung, da die Reabsorption an den Transporter gekoppelt ist, sowie ein chronisches Nierenversagen (*Fernandes et al. 2001*).

Da es sich beim sat-1-Transporter um einen Austauscher von Sulfat und Oxalat handelt und eine verminderte Expression eine erhöhte Sulfatausscheidung bewirkt, könnte vermutet werden, dass eine verstärkte Expression eine erhöhte Oxalatausscheidung zur Folge hat und die Entstehung einer Kalziumoxalat-Nephrolithiasis begünstigen würde. Dies bleibt jedoch eine reine Vermutung.

5.3 Die Bedeutung des Oxalats für die Entstehung einer Urolithiasis

Brzica et al. (2013) beschreiben den Zusammenhang zwischen *sat-1* und den Erkrankungen Hyperoxalurie und Urolithiasis. Das Fehlen oder die Herunterregulation des *sat-1* in *sat-1*-knock-out-Tieren kann mit diesen Krankheitsbildern in direkten Zusammenhang gebracht werden. Der Transporter ist klinisch nicht nur für die Homöostase des Oxalathaushalts, sondern auch für die Ausscheidung des Oxalats relevant und spielt somit in Bezug auf die Urolithiasis eine wichtige Rolle (*Stieger 2011*). *Dawson et al. (2010)* weisen darauf hin, dass bei Mäusen mit einem Gendefekt des *sat-1*-Transporters eine Urolithiasis aufgezeigt werden konnte. Aufgrund der deutlich abweichenden Prävalenz eines Nierensteinleidens zwischen Frauen und Männern muss davon ausgegangen werden, dass nicht der *sat-1*-Transporter allein und der damit in Verbindung stehende Oxalathaushalt für das Auftreten der Erkrankung verantwortlich ist. Vielmehr lässt die geschlechtliche Divergenz darauf schließen, dass die Geschlechtshormone zusätzlichen Einfluss bei der Entstehung von Nierensteinen haben könnten (*Brzica et al. 2013, Beck & Markovich 2000, Lee et al. 2005*).

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Bedeutung des *sat-1*-Transporters in Bezug auf das Auftreten eines Nierensteinleidens wurde in den letzten Jahren häufig beschrieben. Da es sich bei der Urolithiasis meistens um eine Kalziumoxalat-Nephrolithiasis handelt, kann angenommen werden, dass der Oxalathaushalt sowie die für ihn zuständigen Mechanismen im menschlichen Organismus für die Entstehung, aber auch für die Prävention und Therapie dieses Steinleidens von großer Bedeutung sind. Aufgrund der ungleichen Prävalenz der Erkrankung zwischen Frauen und Männern dürfen die Geschlechtshormone bei diesem Ansatz nicht außer Acht gelassen werden. Die expressionssteigernde Wirkung von Oxalat und Glyoxylat auf die Expression der *sat-1*-RNA wurde in dieser Studie an Caco2-Zellen, die einem humanen kolorektalen Adenokarzinom entstammen, durchgeführt und gezeigt. Diese Zellen verfügen wie menschliche Enterozyten über den *sat-1*-Transporter.

6. Zusammenfassung

Der Transport des Oxalats im menschlichen Körper ist bisher nur unzureichend verstanden. Es ist lediglich bekannt, dass Nierensteine vorwiegend aus Kalziumoxalat bestehen.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Oxalat und seinen Vorstufen Glycin, Hydroxyprolin, Glyoxylat und Glykolat auf die Expression des Sulfat-Anionen-Transporters (sat-1) untersucht.

Bei diesem Transporter handelt es sich um ein Mitglied der SLC26-Transporterfamilie mit dem Namen SLC26A1. Lokalisiert wurde der sat-1 in der sinusoidalen Membran von Hepatozyten, in der basolateralen Membran von proximalen Tubuluszellen und (mit Einschränkung) in der serosalen Membran von Enterozyten. Die Funktion des sat-1 besteht im Transport von Sulfat, Oxalat und Bicarbonat, wobei alle Modi wie Sulfat-Oxalat-, Sulfat-Bicarbonat-, Oxalat-Bicarbonat- und Sulfat-Glyoxylat-Austausch beschrieben wurden.

In dieser Arbeit wurde die Regulation der Expression des sat-1 in Caco2-Zellen untersucht. Diese Zellen wurden ursprünglich aus einem humanen kolorektalen Adenokarzinom isoliert und besitzen Eigenschaften humaner Enterozyten. Für diese Studie hatten sie den Vorteil einer endogenen sat-1 Expression.

In dieser Arbeit sollte die Hypothese überprüft werden, ob Oxalat und möglicherweise Ausgangs- oder Zwischenprodukte der Synthese von Oxalat, wie Glyoxylat, Glykolat, Hydroxyprolin und Glycin die Expression des sat-1 auf RNA- und Proteinebene stimulieren könnten. Von diesen Substanzen konnten nur Oxalat selbst und Glyoxylat die sat-1-RNA-Expression, gemessen über die real-time PCR, erhöhen. Von diesen beiden Substanzen wurden die optimale Konzentration und der optimale Zeitpunkt der Inkubation zur Steigerung des RNA-Gehalts ermittelt und anschließend bei diesen Werten über einen Western Blot die sat-1-Proteinexpression bestimmt. Durch die viertägige Inkubation der Caco2-Zellen in Oxalat beziehungsweise Glyoxylat konnte die sat-1-Proteinexpression in den Zellen gesteigert werden.

7. Literaturverzeichnis

Alper SL, Sharma AK (2013):

The SLC26 gene family of anion transporters and channels.
Mol Aspects Med 34, 494-515

Baker PRS, Cramer SD, Kennedy M, Assimos DG, Holmes RP (2004):

Glycolate and glyoxylate metabolism in HepG2 cells.
Am J Physiol Cell Physiol 287, C1359-65

Banner MR, Rosalki SB (1967):

Glyoxylate as a substrate for lactate dehydrogenase.
Nature 213, 726-7

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, 1066-71

Beck BB, Hoyer-Kuhn H, Göbel H, Habig S, Hoppe B (2013):

Hyperoxaluria and systemic oxalosis: an update on current therapy and future directions.
Expert Opin Investig Drugs 22, 117-29

Beck L, Markovich D (2000):

The mouse Na⁺-sulfate cotransporter gene Nas!. Cloning, tissue distribution, gene structure, chromosomal assignment, and transcriptional regulation by vitamin D.
J Biol Chem 275, 11880-90

Bissig M, Hagenbuch B, Stieger B, Koller T, Meier PJ (1994 a):

Functional expression cloning on urinary oxalate and pH in calcium stone-forming patients.
Kidney Int 63, 1066-71

Bissig M, Hagenbuch B, Stieger B, Koller T, Meier PJ (1994 b):

Functional expression cloning of the canalicular sulfate transport system of rat hepatocytes.
J Biol Chem 269, 3017-21

Bode JC, Zelder O, Runipelt HJ, Wittkanip U (1973):

Depletion liver adenosine phosphates and metabolic effects of intraveno infusion of fructose or sorbitol in man and in the rat.

Eur J Cl Invest 3, 436-41

Borchardt RT (2011):

Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T.: Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, Gastroenterology, 96, 736-749, 1989 - the backstory.

AAPS J 13, 323-7

Brändle E, Bernt U, Hautmann RE (1998):

In situ characterization of oxalate across the basolateral membrane of the proximal tubule.

Eur J Physiol 435, 840-9

Brzica H, Breljak D, Krick W, Lovric M, Burckhardt G, Burckhardt BC (2009):

The liver and kidney expression of sulfate anion transporter sat-1 in rats exhibits male dominant gender differences.

Pflügers Arch Eur J Physiol 272, G1304-13

Brzica H, Breljak D, Burckhardt BC, Burckhardt G, Sabolić I (2013):

Oxalate: From the Environment to Kidney Stones

Arh Hig Rada Toksikol 64, 609-30

Charrier MJ, Savage GP, Vanhanen L (2002):

Oxalate content and calcium binding capacity of tea and herbal teas.

Asia Pac J Clin Nur 11, 298-301

Cochat P, Groothoff J (2013):

Primary hyperoxaluria type 1: practical and ethical issues.

Pediatr Nephrol 28, 2273-81

Conyers RAJ, Bais R, Rofe AM (1990):

The relation of clinical catatrophes, endogenous oxalate production, and urolithiasis.

Clin Chem 36, 1717-30

Coulter-Mackie MB (2006):

4-Hydroxyproline metabolism and glyoxylate production: A target for substrate depletion in primary hyperoxaluria?

Kidney Int 70, 1891-3

Dahiya T, Pundir CS (2013):

In vivo oxalate degradation by liposome encapsulated oxalate oxidase in rat model of hyperoxaluria.

Indian J Med Res 137, 136-41

Danpure CJ:

Primary hyperoxaluria.

In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th edition

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.)

McGraw-Hill, New York **2001**

Danpure CJ (2005):

Molecular etiology of primary hyperoxaluria type 1: New directions for treatment.

Am J Nephrol 25, 303-10

Dawson PA, Markovich D (2002):

Regulation of the mouse Nas1 promoter by vitamin D and thyroid hormone.

Pflügers Arch Eur J Physiol 444, 353-9

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, 706-12

Dorwart MR, Shcheynikov N, Yang D, Muallem S (2008):

The solute carrier 26 family of proteins in epithelial ion transport.

Physiology 23, 104-14

Fernandes I, Laouri D, Tutt P, Hampsom G, Friedlander G, Silve C (2001):

Sulfate homeostasis, NaSi-1 cotransport, and SAT-1 exchanger expression in chronic renal failure in rats.

Kidney Int 59, 210-21

Freel RW, Hatch M (2012):

Hyperoxaluric rats do not exhibit alteration in renal expression patterns of Slc26a1 (SAT1) mRNA protein.

Urol Res 40, 647-54

Greger R, Lang F, Oberleithner H, Deetjen P (1978):

Handling of oxalate by rat kidney.

Pflügers Arch Eur J Physiol 374, 243-8

Gupta V, Doshi N, Mitragotri S (2013):

Permeation of Insulin, Calcitonin and Exenatide across Caco-2 Monolayers: Measurement using a Rapid, 3-Day System.

PloS One 8, e57136

Hatch M, Freel RW (2005):

Intestinal transport of an obdurate anion: oxalate.

Urol Res 33, 1-16

Hatch M, Green ML, Freel RW:

Oxalate Transport: Intestine.

NIH Oxalosis and Hyperoxaluria Workshop **2003**

He L, Vasilio K, Nebert DW (2009):

Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily.

Hum Genomics 3, 195-206

Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanga 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, 465-8

Heller HJ, Sakhaee K, Moe OW, Pak CYC (2002):

Etiological role of estrogen status in renal stone formation.

J Urol 168, 1923-27

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, 671-80

Hesse A, Siener R (1997):

Current aspects of epidemiology and nutrition stone disease.

World J Urol 15, 165-71

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, 709-13

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT (1989):

Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability.

Gastroenterology 96, 736-49

Hodgkinson A, Zarembski PM (1968):

Oxalic acid metabolism in man: a review.

Calcif Tissue Res 2, 115-32

Holmes RP, Assimos DG (1998):

Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis.

J Urol 160, 1617-24

Holmes RP, Kennedy M (2000):

Estimation of the oxalate content of foods and daily oxalate intake.

Kidney Int 57, 1662-7

Holmes RP, Goodman HO, Hart LJ, Assimos DG (1993):

Relationship of Protein-Intake to Urinary Oxalate and Glycolate Excretion.

Kidney Int 44, 366-72

Holmes RP, Goodman HO, Assimos DG (1995):

Dietary oxalate and its intestinal absorption.

Scanning Micros 9, 1109-20

Holmes RP, Goodman HO, Assimos DG (2001):

Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion.

Kidney Int 59, 270-6

Hoppe B (2012):

An update on primary hyperoxaluria.

Nat Rev Nephrol 8, 467-75

Hoppe B, Beck BB, Milliner DS (2009):

The primary hyperoxalurias.

Kidney Int 75, 1264-71

Karniski LP (1998):

Effects of sulfate and chloride in three separate oxalate transporters reconstituted from rabbit renal cortex.

Am J Physiol Renal Physiol 274, F189-96

Karniski LP, Lötscher M, Fucentese M, Hilfiker H, Biber J, Murer H (1998):

Immunolocalization of sat-2 sulfate/oxalate/bicarbonate anion exchanger in the rat kidney.

Am J Physiol Renal Physiol 275, F79-87

Kasper H:

Ernährungsmedizin und Diätetik

10. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena, 2004

Knight J, Jiang J, Assimos DG, Holmes RP (2006):

Hydroxyproline ingestion and urinary oxalate and glycolate excretion.

Kidney Int 70, 1929-34

Knight J, Holmes RP, Assimos DG (2007):

Intestinal and renal handling of oxalate loads in normal individuals and stone formers.

Urol Res 35, 111-7

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, 63-8

Ko N, Knauf F, Jiang Z, Markovich D, Aronson PS (2012):

Sat1 dispensable for active oxalate secretion in mouse duodenum.

Am J Physiol Cell Physiol 303, C52-7

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, F145-54

Lakshmana Rao A, Sankar GG (2009):

Caco-2 Cells: An Overview.

JPRHC 1, 260-75

Lee A, Beck L, Brown RJ, Markovich D (1999):

Identification of a mammalian brain sulfate transporter.

Biochem Biophys Res Commun 263, 123-9

Lee A, Beck L, Markovich D (2003):

The mouse sulfate anion transporter gene Sat1 (Slc26a1): cloning, tissue distribution, gene structure, funktional characterization, and transriptional regulation thyroid hormone.

DNA Cell Biol 22, 19-31

Lee A, Dawson PA, Markovich D (2005):

NaSi-1 and Sat-1: structure, function and transcriptional regulation of two genes encoding renal proximal tubular sulfate transporters.

Int J Bioch Cell Biol 37, 1350-6

Liao LL, Richards KE (1972):

Metabolism of oxalate precursors in isolated perfused rat livers.

Archive of Biochemistry and Biophysics 153, 438-48

Liebman M, Chai W (1997):

Effect of dietary calcium on urinary oxalate excretion after oxalate loads.

Am J Clin Nutr 65, 1453-9

Liebman M, Al-Wahsh IA (2011):

Probiotics and other key determinants of dietary oxalate absorption.

Adv Nutr 2, 254-60

Lohi H, Kujala M, Kerkela E, Saarialho-Kere U, Kestila M, Kere J (2000):

Mapping of five new putitive anion transporter genes in human encharacterization of SLC26A6, a candidate gene for pancreatic anion exchanger.

Genomics 70, 102-12

Mahdavi R, Lotfi Yagin N, Liebman M, Nikniaz Z (2013):

Effect of different brewing times on soluble oxalate content of loose-packed black teas and tea bags.

Urolithiasis 41, 15-9

Marengo SR, Romani AMP (2008):

Oxalate in renal stone disease: the terminal metabolite that just won't go away.

Nat Clin Pract Nephrol 7, 368-77

Markovich D (2006):

Sulfate transport by SLC26 transporters.

Novartis Found Symo 273, 42-58

Markovich D (2011 a):

Physiological roles of renal anion transporters NaS1 and Sat1.
Am J Physiol Renal Physiol 300, F1267-70

Markovich D (2011 b):

Physiological Roles of Mammalian Sulfate Transporters NaS1 and Sat1.
Arch Immunol Ther Exp 59, 113-6

Markovich D (2012):

Slc13a1 und Alc26a1 KO models reveal physiological roles of anion transporters.
Physiology 27, 7-14

Markovich D, Murer H (2004):

The SLC13 gene family of sodium sulfate/carboxylate cotransporters.
Pflügers Arch Eur J Physiol 447, 594-602

Mount DB, Romero MF (2004):

The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers.
Pflugers Arch 447, 710-21

Nguyen NU, Dumoulin G, Wolf JP, Bourderont D, Berthelay S (1986):

Urinary oxalate and calcium excretion in response to oral glucose-load in man.
Horm Metab Res 18, 869-70

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, 388-92

Nguyen NU, Dumoulin G, Henriët MT, Regnard J (1995):

Increase in urinary calcium and oxalate after fructose infusion.
Horm Metab Res 27, 155-8

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, 2273-81

Nishimura M, Naito S (2008):

Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies.
Drug Metab Pharmacokinet 23, 22-44

Ohana E, Yang DK, Shcheynikov N, Muallem S (2009):

Diverse transport modes by the solute carrier 26 family of anion transporters.
J Physiol 587, 2179-85

Pak CYC (1998):

Kidney stones.
Lancet 351, 1797-801

Poore RE, Hurst CH, Assimos DG, Holmes RP (1997):

Pathways of hepatic oxalate synthesis and their regulation.
Am J Physiol Cell Physiol 272, C289-94

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, G1075-81

Randall A (1937):

The origin and growth of renal calculi.
Ann Surg 105, 1009-27

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, 107-17

Richardson KE, Tolbert NE (1961):

Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by acid oxidase.
J Biol Chem 236, 1280-4

Riedel TJ, Knight J, Murray MS, Milliner DS, Holmes RP, Lowther WT (2012):

4-Hydroxy-2-oxoglutarate aldolase inactivity in primary hyperoxaluria type 3 and glyoxylate reductase inhibition.
Biochem Biophys Acta 1822, 1544-52

Robertson WG, Hughes H (1993):

Importance of mild hyperoxaluria in the pathogenesis of urolithiasis – new evidence from studies in the Arabian Peninsula.
Scanning Microsc 7, 391-402

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, 263-9

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

Sakhaee (2009):

Recent advances in the pathophysiology of nephrolithiasis.
Kidney Int 75, 585-95

Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F (2005):

The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics.
Cell Biology and Toxicology 21, 1-26

Satoh H, Susaki M, Shukunami C, Iyama K, Negoro T, Hiraki Y (1998):

Functional analysis of diastrophic sulfate transporter. Its involvement in growth regulation of chondrocytes mediated by sulfated proteoglycans.
J Biol Chem 273, 12307-15

Schnedler N:

Transportcharakteristika des Sulfat Anionen Transporter 1, sat-1, und seine Regulation durch Vorstufen des Oxalats.
Naturwissenschaftliche Dissertation, Gießen 2010

Schnedler N, Burckhardt G, Burckhardt BC (2011):

Glyoxylate is a substrate of the sulfate-oxalate exchanger, sat-1, and increases its expression in HepG2 cells.
J Hepatol 54, 513-20

Siener R, Hesse A (2002):

The effect of different diets on urine composition and the risk of calcium oxalate crystallisation in healthy subjects.
Eur Urol 42, 289-96

Siener R, Schade N, Nicolay C, von Unruh GE, Hesse A (2005):

The efficacy of dietary intervention on urinary risk factors for stone formation in recurrent calcium oxalate stone patients.
J Urol 173, 1601-5

Siener R, Honow R, Voss S, Seidler A, Hesse A (2006):

Oxalate content of cereals and cereal products.

J Agri Food Chem 54, 3008-11

Siener R, Bangen U, Sidhu H, Hönow R, von Unruh G, Hesse A (2013):

The role of Oxalobacter formingens colonization in calcium oxalate stone disease.

Kidney Int 83, 1144-9

Sindic A, Chang MH, Mount DB, Romero MF (2007):

Renal physiology of SLC26 anion exchangers.

Curr Opin Nephrol Hypertens 16, 484-90

Smetanová L, Stetinová V, Svoboda Z, Kvetina J (2011):

Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver.

Acta Medica (Hradec Kralove) 54, 3-8

Soleimani M (2006):

Expression, regulation and the role of SLC26 Cl-/HCO₃⁻ exchangers in kidney and gastrointestinal tract.

Novartis Found Symp 273, 91-102

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, 1817-23

Stieger B (2011):

Regulation of the expression of the hepatocellular sulfate-oxalate exchanger SAT-1 (SLC26A1) by glyoxylate: a metabolic link between liver and kidney?

J Hepatol 54, 406-7

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, 939-46

Thomas E, von Unruh GE, Hesse A (2008):

Influence of a low- and a high-oxalate vegetarian diet on intestinal oxalate absorption and urinary excretion.

Eur J Clin Nutr 62, 1090-7

Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ (1989):

The first kidney stone.

Ann Intern Med 111, 1006-9

Wendt-Nordahl G, Evan AP, Spahn M, Knoll T (2008):

Calcium oxalate stone formation. New pathogenetic aspects of an old disease.

Urologe 47, 538-44

Williams AW, Wilson DM (1990):

Dietary-intake, absorption, metabolism, and excretion of oxalate.

Sem Nephrol 10, 2-8

Williams EL, Bockenhauer D, van 't Hoff WG, Johri N, Laing C, Sinha MD, Unwin R, Vilioen A, Rumsby G (2012):

The enzyme 4-Hydroxy-2-oxoglutarate aldolase is deficient in primary hyperoxaluria type 3.

Nephrol Dial Transplant 27, 3191-5

Williams HE, Smith LH (1968):

Disorders of oxalate metabolism.

Am J Med 45, 715-35

Zimmermann DJ, Hesse A, von Unrug GE (2005):

Influence of a high-oxalate diet on intestinal oxalate absorption.

World J Urol 23, 324-9

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Strukturformel der Oxalsäure.....	5
Abbildung 1.2	Oxalatmetabolismus in den Hepatozyten.....	8
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung der Oxalat-Synthesewege.....	9
Abbildung 1.4	Die „Solute Carrier (SLC)“-Transporterfamilie.....	15
Abbildung 1.5	Lokalisation des sat-1-Transporters in der Niere (links) und in der Leber (rechts).....	21
Abbildung 4.1	Caco2-Zellen vor der Inkubation (Tag 0).....	44
Abbildung 4.2	Caco2-Zellen inkubiert in Oxalat bzw. Glyoxylat an Tag 1 nach Zugabe der Substanzen.....	45
Abbildung 4.3	Caco2-Zellen inkubiert in Oxalat bzw. Glyoxylat an Tag 2 nach Zugabe der Substanzen.....	46
Abbildung 4.4	Caco2-Zellen inkubiert in Oxalat bzw. Glyoxylat an Tag 3 nach Zugabe der Substanzen.....	47
Abbildung 4.5	Caco2-Zellen inkubiert in Oxalat bzw. Glyoxylat an Tag 4 nach Zugabe der Substanzen.....	48
Abbildung 4.6	Caco2-Zellen inkubiert in Glycin, Hydroxyprolin bzw. Glykolat an Tag 4 nach Zugabe der Substanzen...	49
Abbildung 4.7	Elektrophorese-Bild der RNA-Expression von sat-1 in Caco2-Zellen nach Inkubation in Oxalat und Oxalatvorstufen.....	50
Abbildung 4.8	Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der Caco2-Zellen in Oxalat und Oxalatvorstufen.....	52
Abbildung 4.9	Inkubation der Caco2-Zellen für 1 – 6 Tage in Oxalat....	53
Abbildung 4.10	Inkubation der Caco2-Zellen für 1 – 6 Tage in Glyoxylat.....	54

Abbildung 4.11	Relative sat-1-mRNA-Expression in Caco2-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen in aufsteigenden Oxalatkonzentrationen.....	56
Abbildung 4.12	Relative sat-1-mRNA-Expression in Caco2-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen in aufsteigenden Glyoxylatkonzentrationen.....	57
Abbildung 4.13	Sat-1-Proteinexpression in Caco2-Zellen nach Inkubation in Oxalat bzw. Glyoxylat.....	58

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Oxalatgehalt verschiedener Nahrungsmittel.....	7
Tabelle 1.2	Die SLC13-Transporterfamilie.....	17
Tabelle 1.3	Die SLC26-Transporterfamilie.....	19
Tabelle 2.1	Übersicht über die spezifischen Primer mit ihren 5'- 3'- Sequenzen sowie weiteren Eigenschaften.....	24
Tabelle 2.2	Übersicht über die verwendeten Assays mit ihren Spleißvarianten.....	25
Tabelle 2.3	Übersicht über die Antikörper, die Konzentration und den Bezug.....	25
Tabelle 2.4	Übersicht der Puffer und Medien.....	26
Tabelle 2.5	In dieser Arbeit eingesetzte Geräte.....	28
Tabelle 3.1	Phasen der Polymerase-Kettenreaktion für GAPDH.....	36
Tabelle 3.2	Phasen der Polymerase-Kettenreaktion für sat-1.....	36
Tabelle 3.3	Segmente der real-time PCR	38
Tabelle 3.4	Zusammensetzung des Trenn- bzw. Sammelgels.....	40
Tabelle 4.1	Veränderung der mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der Caco2-Zellen in Oxalat und Oxalatvorstufen.....	51
Tabelle 4.2	Inkubation der Caco2-Zellen in Oxalat für 1 – 6 Tage.....	53
Tabelle 4.3	Inkubation der Caco2-Zellen in Glyoxylat für 1 – 6 Tage.....	54
Tabelle 4.4	Inkubation der Caco2-Zellen für 4 Tage in verschiedenen Oxalatkonzentrationen.....	55
Tabelle 4.5	Inkubation der Caco2-Zellen für 4 Tage in verschiedenen Glyoxylatkonzentrationen.....	56

10. Abkürzungsverzeichnis

AGT	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase
AGT-1	Alanin-Glyoxylat-Aminotranferase-1
AGT-2	Alanin-Glyoxylat-Aminotranferase-2
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary</i> DNA (Desoxyribonukleinsäure mit Capstruktur)
Ct	<i>cycle treshold</i> (Schwellenwert-Zyklus)
$\Delta\Delta$ Ct	Differenz der Schwellenwert-Zyklen
DAO	D-Aminosäureoxidase
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	erhöhte Chemilumineszenz
EMA	Ethylen-Malein-Anhydrid(-Oxidase)
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GO	Glykolat-Oxidase
GR	Glyoxylatreduktase
HOG	4-Hydroxy-2-Oxoglutarat
HOGA	4-Hydroxy-2-Oxoglutarat Aldolase
hsat-1	humaner Sulfat-Anionen-Transporter-1
LDH	Laktatdehydrogenase
M-MuLV	Moloney-Maus-Leukämievirus
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
msat-1	Sulfat-Anionen-Transporter-1 der Maus
NaC	Natrium-Carboxylat-Cotransporter
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NaS	Natrium-Sulfat-Cotransporter
NaSi-1	Na ⁺ -abhängiger Sulfat-Transporter-1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PH1	primäre Hyperoxalurie 1

PH2	primäre Hyperoxalurie 2
PH3	primäre Hyperoxalurie 3
PVDF	Polyvenylidindifluorid
RLT	Herstellerbezeichnung eines Puffers
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Herstellerbezeichnung eines Puffers
rsat-1	Sulfat-Anionen-Transporter-1 der Ratte
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLC	<i>solute carrier</i>
STAS	Sulfat-Transporter-Anti-Sigma-Antagonist
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
UV	ultraviolett

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Birgitta C. Burckhardt für das Überlassen des Dissertationsthemas sowie die hervorragende Betreuung. Die engagierte Unterstützung hat entscheidend zum Gelingen der Dissertation beigetragen.

Für die gute Betreuung während der Versuchsdurchführung danke ich vor allem Frau Dr. Nina Schnedler sowie Waja Wegner, Gesche Dallmeyer, Sören Petzke und Reinhard Schirmer.