

Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität
eingereicht von Prof. Dr. G. Burckhardt

**Die Regulation des Sulfat-Anionen-Transporters-1, sat-1, in HepG2-
Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert und von Bicarbonat**

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

vorgelegt von
Jan Helge Saathoff
aus
Leer

Göttingen 2019

Die vorliegende Dissertation wurde in Göttingen im Zeitraum August 2010 bis August 2018 im Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. G. Burckhardt (em.) angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer
Referent/in: Prof. Dr. phil. nat. B. C. Burckhardt
Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. A. R. Asif
Drittreferent/in: Prof. Dr. R. Mausberg
Datum der mündlichen Prüfung: 02.12.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Die Regulation des Sulfat-Anionen-Transporters-1, sat-1, in HepG2-Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert und von Bicarbonat“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Leer, den 25.09.2019

.....
Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Sulfat	1
1.2 Die Funktionen von Sulfat im menschlichen Körper	1
1.3 Sulfatmetabolismus	3
1.4 Die Funktion von Transportproteinen im menschlichen Organismus	4
1.5 Die <i>Solute Carrier (SLC)</i> -Transporterfamilie	5
1.5.1 Die SLC13-Transporterfamilie	6
1.5.2 Die SLC26-Transporterfamilie	6
1.6 Der Sulfat-Anionen-Transporter-1 (sat-1)	8
1.6.1 Lokalisation des sat-1	10
1.6.2 Transporteigenschaften des sat-1	11
1.6.3 Funktion und Regulation des sat-1	12
1.7 Zielstellung der Arbeit	12
2. Material	13
2.1 HepG2-Zellen	13
2.2 Oligonukleotidprimer	13
2.3 <i>Real-time</i> -Polymerase-Kettenreaktions-Assays (<i>real-time</i> -PCR)	14
2.4 Antikörper	15
2.5 Kits	15
2.5.1 RNA-Isolierungs-Kit	15
2.5.2 Reverse Transkriptase-Kit	15
2.6 Enzyme	16
2.7 Medien, Lösungen und Puffer	16
2.8 Chemikalien	18
2.9 Software, Online-Datenbanken und Geräte	18
3. Methoden	20
3.1 Herstellung der Medien unterschiedlicher pH-Werte	20
3.2 An- und Aufzucht der HepG2-Zellen	20
3.3 Vorversuche	21
3.4 Zeitreihe der Inkubation der HepG2-Zellen mit dem pH-Wert 6,5	22
3.5 Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA)	22
3.6 Reverse Transkription (RT)	24
3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.8 Agarose-Gelelektrophorese	27
3.9 <i>real-time</i> -Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR)	28
3.10 <i>Western Blot</i>	29

3.10.1 Vorbereitende Arbeitsschritte	29
3.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
3.10.3 Proteintransfer auf die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (<i>Blotting</i>)	31
3.10.4 Proteindetektion über <i>Western Blots</i>	32
3.11 Statistik	33
4. Ergebnisse	34
4.1 An- und Aufzucht der HepG2-Zellen	34
4.2 Nachweis von sat-1 in HepG2-Zellen auf mRNA-Ebene	36
4.3 Inkubation der HepG2-Zellen in Medien saurer pH-Werte	37
4.4 Zeitreihe der Inkubation der HepG2-Zellen in Relation zu GAPDH (pH 6,5)	40
4.5 Einfluss eines sauren Zellmediums auf das <i>house-keeping</i> -Gen GAPDH	43
4.6 Inkubation der HepG2-Zellen in Medien unterschiedlicher pH-Werte in Relation zu HPRT	46
4.7 Zeitreihe der Inkubation der HepG2-Zellen in Relation zu HPRT (pH 6,5)	49
4.8 Inkubation der HepG2-Zellen in Bicarbonat	51
4.9 Inkubation der HepG2-Zellen in bicarbonathaltigem Zellmedium basischen pH-Wertes in Relation zu GAPDH	54
4.10 sat-1-Proteinexpression in HepG2-Zellen nach Inkubation im Zellmedium mit pH-Wert 6,5	56
5. Diskussion	58
5.1 Der Einfluss von pH-Wert-Änderungen auf das Zellwachstum und die Zellmorphologie	58
5.2 Der Einfluss von Bicarbonat und unterschiedlichen pH-Werten auf den sat-1-Transporter	59
5.3 Der Einfluss von metabolischen Alkalosen	60
6. Zusammenfassung	62
7. Literaturverzeichnis	63
8. Abbildungsverzeichnis	70
9. Tabellenverzeichnis	72
10. Abkürzungsverzeichnis	74

1. Einleitung

1.1 Sulfat

Sulfat ist ein anorganisches Molekül und stellt das Anion der Schwefelsäure mit der chemischen Summenformel SO_4^{2-} dar. Die Schwefelsäure wird auch als Dihydrogensulfat bezeichnet und gehört zu den stärksten Säuren. In wässrigen Lösungen liegt Sulfat aufgrund seines niedrigen pK_d - Wertes (1.92 für das $\text{HSO}_4^- / \text{SO}_4^{2-}$ -Paar) hauptsächlich als divalentes Anion vor. In der Magensäure liegt es wegen der sauren Bedingungen teilweise auch als HSO_4^- vor. Sulfat kann direkt über die Nahrung aufgenommen oder durch Oxidation der sulfathaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein gebildet werden (Markovich 2001). SO_4^{2-} ist ein entscheidender Faktor für die physiologischen Funktionen einer Zelle, auch wenn es direkt keine katalysierende Funktion ausübt oder am Energiemetabolismus beteiligt ist (siehe Kap. 1.2). Die Nieren stellen das entscheidende Organ hinsichtlich der Sulfathomöostase dar. Sulfat wird freifiltriert und im proximalen Tubulus reabsorbiert (Markovich und Aronson 2007). Dies geschieht über eine Aufnahme mithilfe eines apikalen Transporters in die proximale Tubuluszelle und einer Abgabe in das Blut über einen basolateralen Transporter.

1.2 Die Funktionen von Sulfat im menschlichen Körper

Sulfat stellt einen essentiellen Bestandteil im menschlichen Organismus dar, weil Sulfat für viele unterschiedliche Prozesse wie zum Beispiel das Zellwachstum, die Entwicklung des Organismus, die Biosynthese, Detoxifikationen oder die Synthese der Zellmatrix wichtig ist. Die physiologisch entscheidende Funktion ist die Sulfatkonjugation vieler Stoffe, welche auch als Sulfatierung oder Sulfatisierung bezeichnet wird. Sulfatierungsreaktionen sind spezifische Übertragungen einer Sulfatgruppe

auf ein organisches Molekül. Dabei wird Sulfat irreversibel durch Enzyme aus der Gruppe der Sulfontransferasen an eine Hydroxylgruppe gekoppelt. Für die Konjugation muss Sulfat in einer enzymatisch katalysierten Reaktion zu 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) aktiviert werden, um anschließend ein universeller Sulfatdonor zu sein. Beispiele für sulfatierte Moleküle sind Glykoproteine, Proteoglykane und Glykolipide. Die beschriebene Sulfatisierung von Stoffen ist für die zuvor genannten Reaktionen notwendig (Markovich 2001). Die Sulfontransferasen sind bei Säugetieren vor allem in Leber, Nieren, Magen-Darm-Trakt sowie in den Lungen zu finden.

Hervorzuheben ist die besondere Rolle des Sulfats im Zusammenhang mit dem Wachstum. Dies kann in mehreren Studien anhand von erhöhten Serumkonzentrationen beim Fötus sowie bei Schwangeren und Kindern im Vergleich zu gesunden erwachsenen Menschen belegt werden (Cole et al. 1984, Tallgren 1980). Eine weitere wichtige Rolle spielen die anionischen Ladungen der Sulfatgruppen der Proteoglykane für die strukturelle Integrität des Knorpels. Genannt werden sollte ebenfalls, dass die Sulfatierungen dem Abbau von Steroid- und Schilddrüsenhormonen in der Leber dienen. Gleichzeitig spielen Sulfatierungen eine wichtige Rolle bei Interaktionen zwischen Zellen. So können sulfatierte Glykoproteine und Proteoglykane, die sich in der Zellmembran befinden, die Aufgabe der Zelladhäsion übernehmen (Passarge und Kohlhase 2006).

Im Säugetierorganismus spielt die Sulfatierung von toxischen Fremdstoffen eine wichtige Rolle bei der Reduzierung der biologischen Aktivität dieser Substanzen. Die Sulfatierung dient dabei der Entgiftung, da toxische Substanzen auf diese Weise besser wasserlöslich sind und somit über die Nieren ausgeschieden werden können. Zusätzlich dient die Sulfatgruppe als Erkennungsmerkmal zur Ausscheidung, sodass beide Mechanismen an der Detoxifizierung beteiligt sind (Mast et al. 2014). Beispiele für solche Konjugationen sind Glutathion auf Cyclophosphamid (Antikrebswirkstoff), Glukorodinat auf Morphin (Schmerzmittel) und eine Sulfatgruppe auf Minoxidil (Haarwuchsmittel).

1.3 Sulfatmetabolismus

Schwefelhaltige Moleküle sind seit der Entstehung von Leben auf der Erde essentielle Nährstoffe aller lebenden Organismen (Cole und Evrovski 2000). Bakterien, Pflanzen und Pilze können anorganisches Sulfat durch Reduktion fixieren und in die Aminosäuren Cystein und Methionin umwandeln (Dopson und Johnson 2012). Da humane Enzyme diese Reduktion nicht katalysieren können, muss Methionin mit der Nahrung aufgenommen werden. Methionin kann direkt in Cystein umgewandelt werden (Brosnan und Brosnan 2006). Anorganisches Sulfat wird in den Zellen durch Oxidation von Cystein gewonnen. Cole und Evrovski (2000) beschreiben, dass Sulfat auch in begrenzter Menge direkt oder als Thioester aus dem Darm aufgenommen werden kann.

Die anorganische Sulfatkonzentration im Blutplasma beträgt ca. 300 μM . Die Regulation des Sulfathaushalts findet primär in den Nieren statt. Die Sulfathomöostase wird vor allem durch die renale Ausscheidung von Sulfat aufrechterhalten (Cole und Evrovski 2000, Hatch und Freel 2005, Biber et al. 2014). Sulfat wird freifiltriert und im proximalen Tubulus reabsorbiert. Entscheidend für die Reabsorption ist ein Natrium-Sulfat-Cotransporter, NaS1 (Hierholzer et al. 1960, Markovich 2006, Markovich und Aronson 2007). Die Kapazität der Rückresorption ist begrenzt und sättigbar. Steigt beispielsweise die Sulfatkonzentration im Plasma, wird überschüssiges, nicht rückresorbiertes Sulfat mit dem Urin ausgeschieden (Markovich 2006). Die Ausscheidung für den Urin stellt im Sulfatmetabolismus den Hauptausscheidungsweg dar (Cole und Evrovski 2000). Die Abbildung 1.1 veranschaulicht stark vereinfacht den Sulfatmetabolismus.

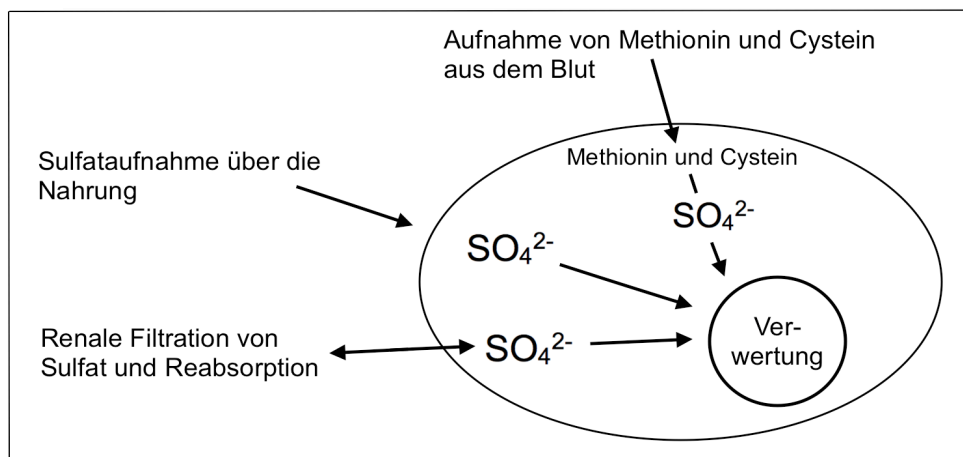


Abbildung 1.1: **Aufnahme, Synthese aus Schwefel-haltigen Aminosäuren und Ausscheidung von Sulfat.** Sulfat kann sowohl über die Nahrung aufgenommen als auch durch Oxidation von Methionin und Cystein gebildet werden. Die Homöostase des Sulfathaushalts wird durch die Nieren gewährleistet. Hier erfolgt eine freie Filtration sowie eine Reabsorption des Sulfats (eigene Darstellung).

1.4 Die Funktion von Transportproteinen im menschlichen Organismus

Der molekulare Grundbaustein biologischer Membranen sind amphipatische Lipide, welche sich in wässriger Umgebung folgendermaßen ausrichten: die hydrophilen Kopfgruppen zeigen nach außen und die hydrophoben Alkylketten nach innen. Aus diesem Aufbau ergibt sich eine Lipiddoppelschicht, die einem Teppich gleicht und die verschiedenen wässrigen Kompartimente der biologischen Zelle voneinander trennt (van Meer 2005). Aufgrund der Tatsache, dass die Zellmembran eine innere hydrophobe Schicht besitzt, folgt, dass hydrophile Moleküle, sowie auch Wasser selbst, nicht frei durch Membranen diffundieren können. Es ist daher nicht verwunderlich, dass es viele verschiedene Proteine gibt, welche biologische Membranen durchspannen und den selektiven Transport spezifischer Substrate medieren (Sadowski et al. 2008). Transporter werden auch als die Tore einer Zelle bezeichnet.

Die spezifische Expression von Transporterproteinen in verschiedenen Geweben erlaubt eine steuerbare und genaue Aufnahme sowie Abgabe von Molekülen, welche an die jeweiligen Aufgaben des Gewebes angepasst wird. Hinsichtlich des Transportmechanismus wird allgemein zwischen aktiven energieverbrauchenden und passiven Transportern unterschieden. Die passiven Transporter nutzen den von den aktiven Transportern aufgebauten chemischen bzw. elektrochemischen Gradienten.

1.5 Die *Solute Carrier (SLC)*-Transporterfamilie

Die *Solute Carrier (SLC)*-Transporterfamilie beschreibt eine große Gruppe von Transmembranproteinen, die als Transporter fungieren. Zu dieser Transporterfamilie gehören mittlerweile über 50 Genfamilien (SLC1 - SLC50), die für insgesamt mehr als 350 Transporter-Proteine kodieren (Alper und Sharma 2013). Die Zuordnung zu den Transporterfamilien erfolgt anhand der primären Aminosäuresequenz, welche eine Übereinstimmung von mindestens 20 % - 25 % aufweisen muss, damit sie der gleichen Familie zugeordnet werden können. Allen Transportern dieser großen Gruppe ist gemeinsam, dass sie membrangebunden sind und jeweils für den bestimmten Transport einiger Substanzen verantwortlich sind (Alper und Sharma 2013). Da Sulfat als ein divalentes Anion Zellmembranen nur schwer durchdringen kann, müssen Transporter für den Sulfattransport vorhanden sein. Im Folgenden werden einige Transporterfamilien aus der großen Gruppe der SLC-Transporterfamilie sowie der für den Sulfattransport zuständige Sulfat-Anionen-Transporter-1 (sat-1) beschrieben.

1.5.1 Die SLC13-Transporterfamilie

Die SLC13-Transporterfamilie besteht aus natriumabhängigen Transportern, die Anionen transportieren. Es sind fünf unterschiedliche Transporter bekannt, von denen drei Dicarboxylate bzw. Zitrat transportieren. Die beiden anderen Transporter transportieren Sulfat (Pajor 2014). Die Mitglieder der SLC13-Transporterfamilie weisen eine Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz von mindestens 20 % bis 25 % auf. Abgeleitet von den zuvor beschriebenen Substraten wird zwischen den Natrium-Sulfat-Cotransportern (NaS), welche als Substrat Sulfat aufweisen, sowie den Natrium-Carboxylat-Cotransportern (NaC) unterschieden. Alle Mitglieder arbeiten als Cotransporter, bei denen neben den zuvor beschriebenen Substraten drei bzw. vier Natrium-Ionen transportiert werden.

Einer aktuellen Studie zufolge konnte nachgewiesen werden, dass Mitglieder der Transporterfamilie im Zusammenhang mit einer erhöhten Lebenserwartung sowie der Regulation der Fettspeicherung und der Insulinresistenz stehen (Colas et al. 2015).

Ein Mitglied der Transporterfamilie, der natriumabhängige Sulfat-Transporter-1 (NaS1, NaSi-1, SLC13A1), ist vor allem in den Nieren in der luminalen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert (Dawson und Markovich 2002, Markovich und Murer 2004), wo er für die Reabsorption von Sulfat verantwortlich ist.

1.5.2 Die SLC26-Transporterfamilie

Die SLC26-Transporterfamilie besteht in Säugetieren aus elf Mitgliedern (SLC26A1-SLC26A11). Die kodierten SLC-Proteine sind Membranproteine mit wahrscheinlich zwölf Membran-durchspannenden Helices und einer Gesamtlänge von 700 - 1000 Aminosäuren. Sowohl der *N*-Terminus als auch der *C*-Terminus sind im Zytoplasma lokalisiert. Die Faltung des C-terminalen zytoplasmatischen Endes bildet eine *sulfate transporter and anti-sigma factor*

antagonist (STAS)-Domäne (Koonin 2000, Kovacs et al. 1998). Bislang sind keine strukturellen Daten von kompletten SLC26-Transportern vorhanden, es wird allerdings angenommen, dass die SLC26-Proteine entweder Homo-Dimere oder Homo-Tetramere bilden.

Mount und Romero (2004) beschreiben die Mitglieder der SLC26-Transporterfamilie mit Ausnahme von SLC26A7 und SLC26A9, die als Kanäle fungieren, als Anionenaustauscher für mono- und divalente Anionen wie Chlorid, Iodid, Bromid, Hydroxylionen, Bicarbonat, Formiat, Glyoxylat, Sulfat und Oxalat.

Drei Mitglieder der Transporterfamilie stehen im Zusammenhang mit genetisch bedingten Krankheiten. So wird der SLC26A2 mit der Chondrodysplasie, der SLC26A3 mit der *chloride-losing diarrhea* und der SLC26A4 mit der vererbten Taubheit (*pendred syndrome*, DFNB4) in Verbindung gebracht (Mount und Romero 2004).

Markovich und Aronson (2007) untersuchten die Spezifität und Regulation der renalen Sulfattransporter und weisen darauf hin, dass der SLC26A6-Transporter, der auch als Chlorid-Formiat-Austauscher (CFEX) bezeichnet wird, in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen lokalisiert ist und ähnlich dem SLC26A1-Transporter (*sat-1*) ebenfalls Sulfat in Form eines Anionenaustauschers transportieren kann. Der Transporter führt somit wahrscheinlich den Rückfluss von Sulfat ins Lumen herbei. Die Autoren erwähnen, dass mehrere andere Transporter der SLC26-Transporterfamilie am Sulfattransport beteiligt sind. Bei einigen konnte die Expression in den Nieren nachgewiesen werden (SLC26A2, SLC26A7, SLC26A11). Ihre Rolle beim renalen tubulären Sulfattransport wird in der Literatur allerdings nicht weiter erläutert.

Die Tabelle 1.1 fasst die Eigenschaften der SLC26-Transporterfamilie zusammen.

Tabelle 1.1: **Übersicht der humanen SLC26-Transporter** (modifiziert nach Mount und Romero 2004, Alper und Sharma 2013).

Genname	Proteinname	Substrat	Lokalisation
SLC26A1	Sat-1	Sulfat, Oxalat	Leber, Nieren (proximaler Tubulus), Darm
SLC26A2	DTDST	Sulfat, Cl ⁻	ubiquitär
SLC26A3	DRA, CLD	Sulfat, Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , OH ⁻ , Oxalat	Intestinaltrakt, Prostata, Schweißdrüsen, Pankreas
SLC26A4	Pendrin	Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , I ⁻ , Formiat	Innenohr, Nieren, Schilddrüsen
SLC26A5	Prestin	unbekannt	Innenohr
SLC26A6	CFEX, PAT-1	Sulfat, Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , OH ⁻ , Oxalat, Formiat	ubiquitär, Nieren (proximaler Tubulus)
SLC26A7	-	Sulfat, Cl ⁻ , Oxalat	Nieren
SLC26A8	Tat1	Sulfat, Cl ⁻ , Oxalat	Gehirn, Samenzellen
SLC26A9	-	Sulfat, Cl ⁻ , Oxalat	Lungen
SLC26A10	Pseudogen	unbekannt	unbekannt
SLC26A11	-	Sulfat	unbekannt

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

Der Sulfat-Anionen-Transporter-1 (sat-1) gehört als SLC26A1 zur SLC26-Transporterfamilie. Das humane SLC26A1-Gen ist auf dem Chromosom 4p16 lokalisiert (Markovich et al. 2007, Sindic et al. 2007). Die Klonierung des Transporters wurde erstmals im Jahr 2003 durch Reeger et al. beschrieben. Der sat-1-Transporter besitzt einen K_M -Wert von 190 μ M für

Sulfat und kann neben Sulfat auch Chlorid und Oxalat transportieren. Dies wurde anhand von Transportexperimenten an *Xenopus*-Oozyten gezeigt (Reeger et al. 2003).

Da der sat-1-Transporter Oxalat transportiert und somit auch für den Oxalathaushalt im Organismus zuständig ist, beschäftigen sich Studien mit einem möglichen Zusammenhang zwischen der Expression des Transporters und einer Hyperoxalurie, die eine häufige Ursache einer Nephrolithiasis ist (Schnedler et al. 2011). Die Abbildung 1.2 veranschaulicht die Rolle des sat-1-Transporters bei der Rückresorption von Sulfat im proximalen Tubulus der Nieren.

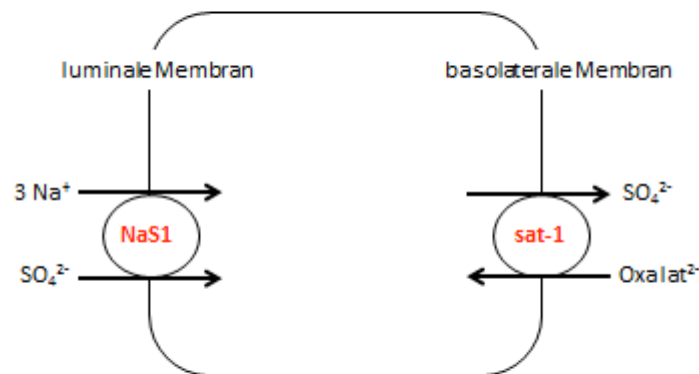


Abbildung 1.2: **Rückresorption von Sulfat im proximalen Tubulus der Nieren.** Sulfat (SO_4^{2-}) wird über den NaS1 im Kotransport mit Natrium aufgenommen und über den basolateral lokalisierten sat-1 in das Blut im Austausch gegen andere Anionen, vorzugsweise Oxalat, abgegeben (eigene Darstellung).

1.6.1 Lokalisation des sat-1

Im Menschen wurde sat-1-mRNA in Hepatozyten, in proximalen Tubuluszellen, in Enterozyten, dem Gehirn, den Lungen, der Prostata und Leukozyten nachgewiesen (Übersichten in: Burckhardt und Burckhardt 2003, Regeer et al. 2003, Lee et al. 2005, Sindic et al. 2007, Dawson et al. 2010, Freel und Hatch 2012). In der Niere ist das sat-1-Protein in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert (Karniski et al. 1998, Regeer und Markovich 2004, Quondamatteo et al 2006, Brzica et al. 2009).

Bei Untersuchungen an Ratten konnte der rsat-1 für Niere und Leber auf mRNA-Ebene deutlich nachgewiesen werden, während der Nachweis für Muskel und Gehirn nicht ganz so stark war (Bissig et al. 1994, Lee et al. 1999, Ko et al. 2012). Der Nachweis des sat-1 Transporters bei der Maus wurde ebenfalls auf mRNA-Ebene durchgeführt. Hier wird eine Lokalisation in Niere, Gehirn, Leber, Herz und Skelettmuskel beschrieben (Lee et al. 2003). Sowohl bei der Maus (msat-1) als auch bei der Ratte (rsat-1) ist der Transporter in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten bzw. in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus der Niere lokalisiert (Brzica et al. 2009, Dawson et al. 2010, Quondamatteo et al. 2006).



Abbildung 1.3: Lokalisation des sat-1-Transporters in der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen der Niere (Brzica et al. 2013). Die Pfeile markieren die basolaterale Membran.

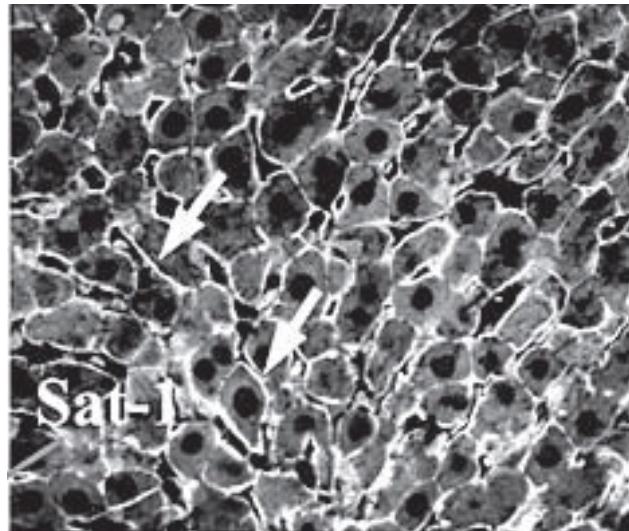


Abbildung 1.4: **Lokalisation des sat-1-Transporters in der Leber** (Brzica et al. 2013). Die Pfeile weisen auf die sinusoidale Lokalisation des sat-1 hin.

1.6.2 Transporteigenschaften des sat-1

Wie die meisten Transporter der SLC26-Transporterfamilie arbeitet der sat-1-Transporter als Anionenaustauscher (Sindic et al. 2007). Zum Substratspektrum des Transporters gehören hauptsächlich Sulfat, Oxalat, Chlorid und die Oxyanionen Molybdat und Selenat (Regeer et al. 2003). Den Transport von Sulfat und Oxalat haben Karniski 1998 und Quondamatteo et al. 2006 in ihren Untersuchungen an Sf9-Insektenzellen und Oozyten von *Xenopus laevis* mit radioaktiv markiertem Sulfat und Oxalat gezeigt. Diese Substrate werden unabhängig von Natrium über sat-1 transportiert (Krick et al. 2009, Ohana et al. 2009). Schnedler et al. (2011) haben gezeigt, dass ein weiteres Substrat des sat-1-Transporters Glyoxylat ist. Außerdem wird beschrieben, dass der Transporter eine sehr wichtige Rolle als Austauscher von Oxalat gegen Bicarbonat oder Sulfat im Rahmen des Oxalattransports spielt (Brändle et al. 1998, Karniski 1998, Krick et al. 2009).

1.6.3 Funktion und Regulation des sat-1

Hinsichtlich der Fragestellung nach der physiologischen Funktion des sat-1-Transporters im Organismus beschreiben einige Autoren die Homöostase der renalen Oxalatkonzentration sowie der Sulfatkonzentration in der Leber (Lee et al. 2003, Dorwart et al. 2008, Ohana et al. 2009, Dawson et al. 2010, Markovich 2011). Ohana et al. (2009) weisen aber auch ausdrücklich darauf hin, dass die physiologische Funktion noch nicht exakt definiert werden konnte. Untersuchungen, die sich mit der Regulation des sat-1-Transporters beschäftigen, sehen in der an den Transporter gekoppelten Sulfat-Reabsorption eine wichtige Funktion, da durch eine induzierte Herunterregulierung des sat-1-Expression eine erhöhte Ausscheidung des Sulfats gezeigt werden konnte (Fernandes et al. 2001).

1.7 Zielstellung der Arbeit

Intoxikation haben oft metabolische Azidosen zur Folge, die durch einen pH-Abfall im Blut gekennzeichnet sind. Da eine erhöhte sat-1-Expression in einer gesteigerten Sulfatkonzentration im Blut resultiert, ist es möglich, vermehrt Sulfatgruppen auf die Moleküle zu übertragen, welche die Intoxikation initial ausgelöst haben. Somit kann ein Detoxifizierungseffekt erzielt werden, da die Sulfatgruppenübertragung zur schnelleren Ausscheidung der toxischen Substanzen beitragen kann.

Falls es eine Korrelation zwischen dem pH-Wert im Blut und der sat-1-Expression gibt, können die theoretischen Zusammenhänge zwischen der sat-1-Expression, metabolischer Azidose und Sulfatgruppenübertragung auf Intoxikationen auslösende Substanzen weiter untersucht werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, zu untersuchen, ob es zu einer veränderten Expression (Transkription und Translation) des sat-1-Transporters bei unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten durch Bicarbonat kommt.

2. Material

2.1 HepG2-Zellen

Die HepG2-Zelllinie entstammt einem primären Hepatoblastom eines 15-jährigen Patienten, das im Zuge einer Leberbiopsie entnommen wurde. Die Zellen wachsen vornehmlich als Monolayer und zeigen im Zellrasen ein epitheloides Wachstum (Aden et al. 1979, Ballet et al. 1984).

Die im Rahmen der Versuche verwendeten HepG2-Zellen wurden vom Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

2.2 Oligonukleotidprimer

In Tabelle 2.1 (S. 18) sind die für die reverse Transkription und anschließende Polymerase-Kettenreaktion sequenzspezifisch verwendeten Primer aufgeführt. Die Oligonukleotidprimer stammen von Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

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 Agarose-Gels, die zur Auftrennung der jeweiligen PCR-Produkte verwendet wurden. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, sat-1: Sulfat-Anionen-Transporter-1.

Protein (Gen)	Primer	Sequenz 5' - 3'	Produktlänge	Annealing-Temp.	Zyklen	Gel
GAPDH	334for	TCA CCA TCT TCC AGG AGC G	572 bp	58° C	22	1,5 %
	905rev	CTG CTT CAC CAC CTT CTT GA				
HPRT	165for	CATTATGCTGAG GATTTGGAAAGG	128 bp	52° C	22	1,5%
	292rev	CTTGAGCACACA GAGGGCTACA				
sat-1 (SLC26A1)	700for	GCC AAC CTC ATC TAC TTC	254 bp	56° C	35	2 %
	953rev	CTC TGG TAA AGC CCG GTC ATC AG				

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

Die für die *real-time*-PCR eingesetzten Bezugs- bzw. Referenzgene wurden von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) bezogen (Tab. 2.2).

Tabelle 2.2: **Übersicht über die verwendeten Referenzgene**

Protein (Gen)	Assay	Spleißvariante
hGAPDH	Hs99999905_m1	NM_002046.3
HPRT	Hs02800695_m1	ENST00000462974
hsat-1 (SLC26A1)	Hs00758179_m1	(1) NM_022042.2 (3) NM_213613.2

2.4 Antikörper

In Tabelle 2.3 sind die verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tabelle 2.3: Übersicht über die eingesetzten Konzentrationen und die Bezugsquellen.

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 und 74106)

2.5.2 Reverse Transkriptase-Kit

Moloney-Maus-Leukämievirus (M-MuLV)

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

2.6 Enzyme

Bei der Polymerase-Kettenreaktion kam das Enzym Taq-Polymerase zum Einsatz, welches im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Universitätsmedizin Göttingen isoliert wurde.

2.7 Medien, Lösungen und Puffer

Die zur Anwendung gekommenen Zellkulturmedien wurden steril filtriert und sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Übersicht der Puffer und Medien.

Substanz	Zusammensetzung
Agarose-Gelelektrophorese-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 Liter aufgefüllt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (HG)	AppliChem / A13169050 13,44 g DMEM-HG, 3,7 g NaHCO ₃ mit <i>aqua dest.</i> auf 1 Liter 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
Ehtidumbromid (Stammlösung)	Sigma / E1510 10 mg / ml in nukleasefreiem <i>aqua dest.</i>
HepG2-Medium (DMEM)	DMEM-HG, 2 mM Glutamin, 1,25 mM Pyruvat, 100 U / ml Penicillin, 100 µg / ml Streptomycin, 10 % FCS (fetales Kälberserum)
HepG2-Medium (Hepes)	Hepes, 2 mM Glutamin, 1,25 mM Pyruvat, 100 U / ml Penicillin, 100 µg / ml Streptomycin, 10 % FCS (fetales Kälberserum)
Marker (Agarose-Gelelektrophorese)	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 Agarose-Gelelektrophorese-Ladepuffer, 150 µl nukleasefreies <i>aqua dest.</i>
Marker (<i>Western Blot</i>)	Fermentas / SM 0671, 250 µl Marker
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
Natronlauge	AppliChem / A1432, 1000, 1 M
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	AppliChem / A0964, 9100 9,55 g in 1 Liter <i>aqua dest.</i>
Salzsäure	AppliChem / A1434, 1000, 1 M
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris-Base, 144 g Glycin, 10 g SDS, mit <i>aqua dest.</i> auf 1 Liter 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 Liter aufgefüllt
<i>Western Blot</i> -Puffer	25 mM Tris-HCl, 19 Glycin, 20 % (v/v) Methanol

2.8 Chemikalien

Die eingesetzten chemischen Substanzen wurden von folgenden Firmen bezogen: Applichem (Darmstadt, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und SigmaAldrich (Taufkirchen, Deutschland). Sie waren mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ gekennzeichnet.

2.9 Software, Online-Datenbanken und Geräte

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die folgende/n *Software* und *Online Server* 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).

In Tabelle 2.5 sind die Geräte aufgelistet, die für die Versuche 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)
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 MiniSpin Fuge-Vortex 2400	National Labnet Co. (Woodbridge, NJ) -(Hamburg) L.U.M. GmbH (Berlin)
PCR Zykler	C1000 Thermal Cycler PTC-200	BIO-RAD (Singapur) MJ Research (Watertown, MA)
<i>real-time</i> -PCR Thermozykler	MX3000p	Stratagene (Waldbronn)
RNA/DNA Calculator (Photometer)	GeneQuant II	PharmaciaBiotech (Cambridge, England)
Schüttler	KS 250 basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Sterile Werkbank	Safe 2020 Biowizard Silverline	Thermo Scientific (Langenselbold) Kojair (Vilppula, Finnland)
Ultrazentrifuge	OTD65B	Thermo Scientific (Waltham, MA)
Ultrazentrifugenrotor	TFT6513	Thermo Scientific (Waltham, MA)
UV-Transilluminator	TM 40	UVP (Upland, CA)
Vortex	MS 1 REAX top	IKA-Works (Wilmington (NC)) Heidolph (Schwabach)
Waage	LC6215	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	DB 1083	Haake (Karlsruhe) GFL (Burgwedel)
<i>Western Blot</i> - Kammer		Bio-Rad (München)
<i>Western Blot</i> - Netzgerät	ST 606T	Gibco (Karlsruhe)
Zählkammer (Neubauer)	hell-linig	Saaringia (Saarlouis)
Zentrifugen	5415 D, 5417 R Biofuge fresco Megafuge 40 R Labofuge 400 R	Eppendorf (Hamburg) Heraeus (Hanau)

3. Methoden

3.1 Herstellung der Medien unterschiedlicher pH-Werte

Das HepG2-Medium wurde durch Titration mit 1 M HCl-Lösung auf die pH-Werte 6,5, 7 und 8 eingestellt. Für die Herstellung des Bicarbonat-Mediums (Konzentration 2 mM) wurde für die Titration 1 M NaOH-Lösung verwendet, um den pH-Wert 9 einzustellen. Im Anschluss wurden die Medien steril filtriert.

3.2 An- und Aufzucht der HepG2-Zellen

Die HepG2-Zellen wurden auf Kulturschalen (Durchmesser 20 cm) im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Raumluft) angezogen und nach 7 Tagen im Verhältnis 1 : 5 aufgeteilt.

Nach dem Absaugen des HepG2-Mediums wurden die Zellen mit 10 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, mit 3 ml Trypsin (0,1 % in PBS) versetzt und für 3 min bei 37 °C inkubiert, um das Lösen von der Platte zu unterstützen. Mit 10 ml PBS wurden die Zellen anschließend von der Platte gespült. Um die Aktivität des Trypsins zu beenden, wurden die HepG2-Zellen mit 3 ml HepG2-Medium in ein Sarstedt-Röhrchen gegeben und 5 min zentrifugiert (195 · g, Raumtemperatur). Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml HepG2-Medium gelöst und die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt.

Für die Versuche wurden die HepG2-Zellen mit einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen / ml Medium in 6-Well-Platten ausgesät (2 ml pro Well) und in den Inkubator gestellt. An den beiden Folgetagen wurde jeweils das HepG2-Medium abgesaugt und durch 2 ml neues HepG2-Medium ersetzt.

Bei den Versuchen mit saurem pH-Wert wurden zwei unterschiedliche

Passagen der HepG2-Zellen auf jeweils drei Platten des 6-Wells ausgesät. Vom dritten bis einschließlich sechsten Folgetag wurden jeweils zwei der Wells mit 2 ml neuem HepG2-Medium mit dem pH-Wert 6,5 und 7 inkubiert. Dabei diente jeweils das dritte Well als Leerwert und wurde mit 2 ml HepG2-Medium mit dem pH-Wert 8 versetzt.

Für die Versuche mit alkalischem pH-Wert und den Vergleich der beiden HepG2-Medien (Hepes- versus Bicarbonat-Medium) wurden ebenfalls zwei unterschiedliche Passagen der HepG2-Zellen auf jeweils drei Platten des 6-Wells ausgesät. Am dritten bis einschließlich sechsten Folgetag wurden jeweils zwei der Wells mit 2 ml neuem HepG2-Medium (Bicarbonat-Medium) mit dem pH-Wert 8, zwei mit HepG2-Medium (Bicarbonat-Medium) mit dem pH-Wert 9 und zwei mit HepG2-Medium (Hepes-Medium) mit dem pH-Wert 8 gefüllt.

Die Ernte der HepG2-Zellen erfolgte am siebten Tag.

3.3 Vorversuche

Im Vorfeld der Versuchsdurchführung der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Vorversuchen ermittelt, welche pH-Werte für die Inkubation der HepG2-Zellen sinnvoll sind.

Zu Beginn wurden die HepG2-Zellen mit dem standardmäßig eingesetzten bicarbonathaltigen Medium inkubiert. Das Medium wurde dabei mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5 und 10) angesetzt. Bei der Inkubation der HepG2-Zellen mit dem Medium mit den pH-Werten 5,5 und 6 zeigte sich schon ab dem zweiten Inkubationstag, dass kein Zellwachstum unter diesen stark sauren Bedingungen stattfinden konnte.

Die verbliebenen sauren pH-Werte 6,5 und 7, unter deren Bedingung ein Zellwachstum möglich war, wurden von dem Standard-Medium so stark gepuffert, dass die Versuche mit saurem pH-Wert mit einem nicht-bicarbonathaltigen Medium (Hepes) durchgeführt wurden.

Bei dem jeweils bei der Inkubation mit neuem HepG2-Medium zuvor abgenommenen Medium wurde täglich der pH-Wert gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass die pH-Werte 9,5 und 10 so stark abgepuffert waren, dass kein Unterschied zum Medium mit dem pH-Wert 9 zustande kam.

Außerdem glichen sich die Werte des Standard-Mediums (pH 8) und des Mediums mit dem pH-Wert 8,5 so stark an, dass auch hier kein Unterschied nach Abnahme des Mediums festgestellt werden konnte.

Aufgrund dieser Vorversuche wurden die Zellen mit HepG2-Medium (Hepes-Medium) mit den pH-Werten 6,5 und 7 und mit HepG2-Medium (Bicarbonat-Medium) mit dem pH-Wert 9 inkubiert.

Die angegebenen pH-Werte stellen die gemessenen Werte außerhalb des Inkubators dar. In Medien, die innerhalb des Inkubators den pH-Wert von 7,4 aufweisen, wurde außerhalb des Inkubators ein pH-Wert von 8,0 gemessen.

3.4 Zeitreihe der Inkubation der HepG2-Zellen mit dem pH-Wert 6,5

Für die Erstellung einer Zeitreihe wurden die HepG2-Zellen in dem Medium mit dem pH-Wert 6,5 für ein bis vier Tage inkubiert. Dieser Versuch diente der Feststellung, welche Inkubationsdauer die Expression des sat-1-Transporters in den HepG2-Zellen für den pH-Wert 6,5 am deutlichsten beeinflusst.

3.5 Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA)

Die Isolierung der RNA wurde bei allen HepG2-Zellen anhand von zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Die Zellen wurden vorher mit einem Zellmedium eines definierten pH-Wertes angezogen.

Eine Methode war die Isolierung der HepG2-Zellen mit dem Reagenz TRIzol®. Dabei wurde zuerst das Zellmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS auf Eis gewaschen. Anschließend wurde auf jedes Well 1 ml TRIzol®

gegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Zellen vom Boden der Wells gelöst werden konnten. Im nächsten Schritt wurden 200 µl Chloroform zusammen mit den HepG2-Zellen in Eppendorfgefäße gegeben, welche dann für 15 Sekunden geschüttelt, nochmals für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zuletzt für 15 Minuten zentrifugiert wurden (12 000 · g). Nach der Zentrifugation liegen drei Phasen vor, die sich anhand unterschiedlicher Merkmale und Bestandteile voneinander unterscheiden. Die obere Phase ist eine wässrige Phase und enthält die RNA. Die mittlere Phase/Interphase enthält die DNA, während die untere Phase, die Phenol-Chloroform-Phase, die Proteine beinhaltet. Die obere Phase mit der RNA wurde im nächsten Arbeitsschritt entnommen. Für die weitere Isolierung wurden 500 µl Isopropanol zur RNA hinzugefügt und das Gemisch für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor eine weitere Zentrifugation für 20 Minuten erfolgte (7500 · g, 4 °C). Das auf diese Weise entstandene RNA-Pellet wurde in 1 ml 75% Ethanol durch Vortexen gewaschen. Im letzten Arbeitsschritt erfolgte eine weitere Zentrifugation für fünf Minuten (7500 · g, 4 °C). Danach wurde das Ethanol wieder entfernt und das Pellet getrocknet, bevor es in 30 µl nukleasefreies aqua dest. aufgenommen wurde, sodass es für die folgende reverse Transkription eingesetzt oder für spätere Versuche (- 80 °C) aufbewahrt werden konnte.

Die zweite Methode zur Isolierung der RNA ist die Verwendung eines RNA-Isolierungs-Kits (RNeasy Minikit, Qiagen). Bei diesem Verfahren werden anfangs 350 µl RLT Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol in einem Sarstedt-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurde das HepG2-Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS auf Eis gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 350 µl des RLT-Puffer-β-Mercaptoethanol-Gemisches in jede Vertiefung des 6-Wells, da auf diese Weise die Zellen vom Boden gelöst werden können und in jedem Kompartiment eine visköse Suspension entsteht.

Der nächste Arbeitsschritt umfasst das Befüllen von sechs Eppendorfgefäßen (1,5 ml) mit der Suspension aus den 6-Well-Kompartimenten sowie 350 µl Ethanol (70 %). Dieses Gemisch wurde anschließend mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten unterzogen. Die Isolierung der RNA

mithilfe des RNA-Isolierungs-Kits war durch Eluieren der RNA mit 20 μ l RNase-freiem aqua dest. abgeschlossen.

3.6 Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird die Sequenzfolge einer RNA in einer komplementäre DNA (cDNA) übersetzt. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym reverse Transkriptase.

Für die reverse Transkription wurde 1 μ l Random Primer Oligo dT und 1 μ l 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) zu 5 μ l RNA der HepG2-Zellen hinzugefügt und anschließend mit nukleasefreiem aqua dest. auf ein Volumen von 13 μ l aufgefüllt. Die DNA wurde für zehn Minuten bei 65° C denaturiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurden 1,5 μ l Wasser, 4 μ l 5x *first-strand*-Puffer, 1 μ l 0,1 M DTT sowie 0,5 μ l reverse Transkriptase hinzugefügt und die reverse Transkription für eine Stunden bei 50 °C durchgeführt. Um das Enzym der Reaktion, die reverse Transkriptase, zu inaktivieren, wurde das Gemisch für 15 Minuten auf 70 °C erhitzt. Die auf diese Weise erhaltenen cDNA wurde auf 4 °C abgekühlt und konnte anschließend bei - 20 °C für die nächsten Schritte gelagert werden.

3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase ist es möglich, die bei der reversen Transkription entstandene cDNA in der Polymerase-Kettenreaktion zu vervielfältigen. Dadurch, dass die Produkte vorangegangener Zyklen in den folgenden Zyklen weiter vervielfältigt werden, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des Produktes.

In der folgenden Auflistung sind die benötigten Reaktionsbestandteile aufgeführt:

- Original-DNA
- 2 Primer (Oligonukleotide), die die Startpunkte der DNA-Synthese definieren
- Taq-Polymerase (temperaturstabile DNA-Polymerase)
- Desoxynucleosidtriphosphate als Bausteine für die DNA-Synthese
- Pufferlösung zur Stabilisierung der DNA-Polymerase.

Das Polymerase-Kettenreaktion umfasst drei Phasen, die in Tabelle 3.1 aufgeführt und erläutert sind:

Tabelle 3.1: **Die Phasen der Polymerase-Kettenreaktion.**

Denaturierung (Melting)	<ul style="list-style-type: none"> • Auftrennen der DNA-Stränge mithilfe einer Temperaturerhöhung durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen • vollständige Trennung in Einzelstränge
Primer Annealing (Hybridisierung)	<ul style="list-style-type: none"> • Temperaturabsenkung • Anlagern der Primer an die Einzelstränge
Elongation (Amplifikation)	<ul style="list-style-type: none"> • Anlagern der DNA-Polymerase an DNA-Strang (3`-Ende des Primers) • freie Nucleotide ergänzen den fehlenden Strang

In der vorliegenden Arbeit wurde eine qualitative Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt, um die Qualität der zuvor durchgeführten reversen Transkription kontrollieren zu können. Das Arbeitsprotokoll wird im Folgenden aufgelistet:

- Versetzen von 5 μ l (GAPDH) bzw. 2 μ l (sat-1) der cDNA mit
 - 8 μ l 1,25 mM dNTPs
 - 5 μ l 10x PCR-Puffer
 - 1 μ l Forward-Primer (20 pmol / ml)
 - 1 μ l Reverse-Primer (20 pmol / ml)
 - 1 μ l DNA-Polymerase (Taq-Polymerase)
- Auffüllen des Gemisches mit nucleasefreiem aqua dest. auf 50 μ l

Die Polymerase-Kettenreaktion für GAPDH und sat-1 wurde in einem Thermocycler durchgeführt.

Polymerase-Kettenreaktion für GAPDH: 22 Zyklen

- initiale Denaturierung: 2 min, 94 °C
- Denaturierung: 40 s, 94 °C
- Primer *Annealing*: 50 s, 58 °C
- Elongation: 60 s, 72 °C
- terminale Elongation (5 min, 72°C): gewährleistet ein Abschließen der Aktivität der DNA-Polymerase

Polymerase-Kettenreaktion für sat-1: 35 Zyklen

- initiale Denaturierung: 2 min, 94 °C
- Denaturierung: 40 s, 94 °C
- Primer *Annealing*: 50 s, 56 °C
- Elongation: 60 s, 72 °C
- terminale Elongation: 5 min, 72 °C

3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt ein Verfahren dar, mit dem zuvor isolierte DNA zuerst anhand ihrer Größe aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Die DNA ist aufgrund der an den Nucleinsäuren bindenden Phosphatgruppen negativ geladen. Jede Base enthält eine Phosphatgruppe, sodass das Verhältnis zwischen Größe und Ladung der Moleküle direkt proportional ist.

Beim Anlegen eines elektrischen Feldes an das in einer Pufferlösung platzierte Gel wandert die negativ geladene DNA in Richtung Anode. Dabei wandern kleinere Moleküle schneller durch die siebartige Struktur des Gels als größere. Die Pufferlösung sorgt während des Prozesses für eine verbesserte elektrische Leitfähigkeit.

Durch Versetzen der DNA mit Ethidiumbromid, das als interkalierender Farbstoff an die Nucleinsäuren der DNA bindet, können die aufgetrennten Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Das Agarose-Gel wird hergestellt, indem 2,5 g Agarose in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst wird. Nach Hinzugabe von 4,5 µl Ethidiumbromid wird das Gemisch in einen Gelschlitten gefüllt, in welchem es auspolymerisiert.

Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

- Einlegen des polymerisierten Agarosegels in die Elektrophoresekammer
- Hinzugabe der Pufferlösung (0,5 x TBE-Puffer)
- Hinzugabe von 5 µl 5x DNA Agarose-Gelelektrophorese Ladepuffer zu 20 µl der DNA
- Injektion des Gemisches in die Geltaschen des Agarosegels
- Anlegen der Spannung (90 V) für 80 min.
- Begutachtung des Ergebnisses unter UV-Licht

3.9 *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR)

Die *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR) beschreibt eine Reaktion, bei der die Genexpression quantifiziert werden kann. Die Bezeichnung resultiert daraus, dass der Reaktionsverlauf während des gesamten Verfahrens überprüft werden kann.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Taqman-Methode angewandt, bei der zur Quantifizierung für die DNA spezifische Oligonukleotide eingesetzt werden. An diese Oligonukleotide sind jeweils zwei Fluoreszenzfarbstoffe gebunden. Die *real-time*-PCR wurde mit Taqman-Sonden durchgeführt, welche während der Polymerase-Kettenreaktion an die DNA binden und durch die Polymerase hydrolysiert werden, sodass Fluoreszenzfarbstoffe freigesetzt werden. Diese freigesetzten Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Lage Licht zu emittieren. Folglich korreliert die Lichtstärke mit der Menge der freigesetzten Fluoreszenzfarbstoffe und somit auch mit der Menge der synthetisierten DNA.

Die Vorbereitung der *real-time*-PCR bestand im Zusammenfügen der folgenden Bestandteile:

- 2 µl DNA
- 10 µl 2x *Taqman*-Reaktionspuffer
- 1 µl 20x *Taqman*-Primer
- 7 µl aqua dest.

Der Ablauf der rt-PCR umfasst drei Segmente, deren Dauer, Temperatur und Zyklenanzahl sich unterscheiden. Das dritte Segment umfasst zwei verschiedene Temperaturintervalle. Die Einstellungen des Thermocyclers wurden wie folgt programmiert:

- | | | | |
|---------------|--------|-------|-----------|
| • 1. Segment: | 2 min | 50 °C | 1 Zyklus |
| • 2. Segment: | 10 min | 95 °C | 1 Zyklus |
| • 3. Segment: | 15 s | 95 °C | 40 Zyklen |
| | 60 s | 60 °C | |

Für die Auswertung der rt-PCR wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (*cycle threshold*, Schwellenwert-Zyklus) verwendet. Der *cycle threshold*-Wert beschreibt eine theoretisch existente Größe, die wiederum den Beginn eines exponentiellen Wachstums beschreibt. Da es sich in der vorliegenden Untersuchung um eine quantitative *real-time*-PCR handelt, beschreibt der Ct-Wert die DNA-Molekül-Quantifizierung. Ziel der Auswertung ist ein Vergleich des Einflusses der verschiedenen pH-Werte auf die Quantität der Ribonukleinsäuren. Dieser Vergleich kann anhand der Ct-Werte vorgenommen werden. Die Formel der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode lautet:

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

3.10 Western Blot

Für die Durchführung des *Western Blots* sind vorbereitende Arbeitsschritte notwendig.

3.10.1 Vorbereitende Arbeitsschritte

Präparation der Zellmembranproteine

Die HepG2-Zellen wurden auf 4 °C abgekühlt und mit eiskaltem PBS zweimal gewaschen. Anschließend wurden in jedes Well 0,5 ml Membranpuffer mit Proteaseinhibitoren hinzugefügt und die Zellen vom Boden des Wells gelöst, um sie in ein zuvor gekühltes Inkubationsgefäß geben zu können. Nach der Homogenisierung wurde das Zelllysate für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert (13 000 · g) und das Pellet im Anschluss entfernt. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte eine Ultrazentrifugation für 30 Minuten bei ebenfalls 4 °C (100 000 · g). Das entstandene Pellet, welches

die Zellmembranen enthält, wurde anschließend mit Membranpuffer gewaschen und in 1x SDS Ladepuffer gelöst. Zum Überstand wurde ein Viertel seines Volumens an 5x SDS Ladepuffer gegeben.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinlösung wurde auf ein Verhältnis von 1 : 10 verdünnt. Anschließend wurden 20 µl Proteinlösung, 20 µl Ameisensäure und 1 ml Bradfordlösung (1x) zusammengegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine Extinktionsmessung im Photometer bei 595 nm. Dabei wurde der Leerwert mit 20 µl aqua dest., 20 µl Ameisensäure und 1 ml Bradfordlösung gemessen. Eine Eichgerade wurde mit aufsteigenden Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt. Die Durchführung dieser Proteinbestimmung nach Bradford ermöglicht bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine gleichmäßige Gelbeladung.

3.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Trennungsvorgang, mit dem es möglich ist, die Proteine eines Proteingemisches gemäß ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. SDS steht für *sodium dodecyl sulfate*, Natriumlaurylsulfat. Es handelt sich um ein anionisches Detergens, das sehr stark negativ geladen und in der Lage ist, an die hydrophoben Regionen von Proteinen zu binden. Mithilfe der stark negativen Ladung ist es möglich, die Ladung der Proteine zu maskieren, sodass sich alle Proteine im gleichen Ladungszustand befinden.

Die Vorbehandlung umfasste zuerst eine Inkubation des Proteingemischs mit Thiolen, welche Disulfidbrücken aufbrechen können. Ein Beispiel hierfür ist β-Mercaptoethanol.

Für die Gelelektrophorese werden ein Trenngel sowie ein Sammelgel hergestellt. Das Sammelgel wird in einem diskontinuierlichen Gel auf das Trenngel gegeben. Die Zusammensetzung der beiden Gele ist folgend aufgelistet:

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

Die Arbeitsschritte der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden im Folgenden kurz erläutert: Zuerst werden 20 µg des zytosolischen Proteins bzw. 40 µg des Membranproteins für zehn Minuten auf 95 °C erhitzt. Dies geschieht in SDS-PAGE Ladepuffer. Anschließend erfolgen das Färben mit Bromphenolblau sowie das Auftragen auf das diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel, sodass danach die Elektrophorese bei konstantem Strom (20 mA) und einer maximalen Spannung von 300 V durchgeführt werden kann. Für den vorgefärbten Molekulargewichtsmarker (Fermentas / SM0671) wurde eine separate Geltasche verwendet.

3.10.3 Proteintransfer auf die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (*Blotting*)

Um die zuvor mittels der Elektrophorese aufgetrennten Proteine spezifisch nachzuweisen, folgt das sogenannte *Blotting*. Dabei werden die Proteine von dem Trenngel der Elektrophorese auf eine spezielle Trägermembran

übertragen, die aus Nitrocellulose bestehen kann. Auf diese Weise entsteht ein Abbild des Gels. Für den Immunoblot werden zwei Antikörper benötigt. Der primäre Antikörper ist gegen das nachzuweisende Protein gerichtet. Der sekundäre Antikörper ist gegen den primären Antikörper gerichtet. Für den Proteinnachweis ist der sekundäre Antikörper mit einem speziellen Enzym (z.B. Peroxidase) gekoppelt, welches die Reaktion katalysiert. Diese Reaktion ist in der Lage, Licht zu emittieren, welches über einen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran (Roche / 3010040) erfolgt im Anschluss an die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Dafür wird das Gel zuerst in *Western Blot*-Puffer bei 4 °C äquilibriert. Eine PVDF-Membran wird in Methanol getaucht und anschließend in aqua dest. gewaschen, bevor sie ebenfalls in den *Western Blot*-Puffer gelegt wird. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgt die Schichtung. Dabei werden das Gel und die aktivierte PVDF-Membran zwischen in *Western Blot*-Puffer getränkte *Faserpads* sowie Filterpapier gelegt. Danach wird alles in den *Western Blot*-Kassettenhalter und dieser in die *Western Blot*-Kammer eingesetzt. Die Kammer wird mit *Western Blot*-Puffer befüllt und die Elektrophorese für eine Stunde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt.

3.10.4 Proteindetektion über *Western Blots*

Für die Proteindetektion über *Western Blots* erfolgt zunächst ein Waschen der PVDF-Membran in PBS plus 0,05 % Tween 20, um die Reste des Methanols zu beseitigen. Anschließend wird die PVDF-Membran in 1,5 prozentiger Magermilch für eine Stunde inkubiert, da auf diese Weise ein unspezifisches Binden des Antikörpers verhindert wird. Es folgt ein Verdünnen des primären anti-sat-1- bzw. anti- β -Aktin-Antikörpers auf ein Verhältnis von 1 : 1000. Dies geschieht ebenfalls mit Magermilch (5 %) in PBS (0,05 % Tween 20). Im nächsten Schritt wird zunächst 1 ml Antikörperlösung auf die Membran gegeben und die Membran anschließend

mit Parafilm versiegelt. Es folgt eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Danach wird die Membran dreimal in Intervallen von 15 Minuten mit PBS gewaschen (0,05 % Tween 20). Außerdem werden der Peroxidase-gekoppelte sekundäre anti-Kaninchen- bzw. anti-Maus-Antikörper in Magermilch (5 %) in PBS (0,05 % Tween 20) verdünnt, sodass sie im Verhältnis 1 : 1000 bzw. 1 : 10000 vorliegen. Es folgen eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur, ein erneutes dreimaliges Waschen (15-minütige Intervalle, PBS mit 0,05 % Tween 20 versetzt) sowie die Detektion mit 10 ml frisch angesetzter ECL-Lösung. Die Membran wird nochmals für 5 Minuten inkubiert, bevor der Blot mithilfe des LAS3000 Imagers entwickelt wird.

3.11 Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 An- und Aufzucht der HepG2-Zellen

Nachdem die HepG2-Zellen bis zum dritten Tag nach Aussaat zu ca. 70 % konfluent angewachsen waren (Abb. 4.1), wurden sie für die kommenden Tage in Zellkulturmedien unterschiedlicher pH-Werte inkubiert (Abb. 4.2).

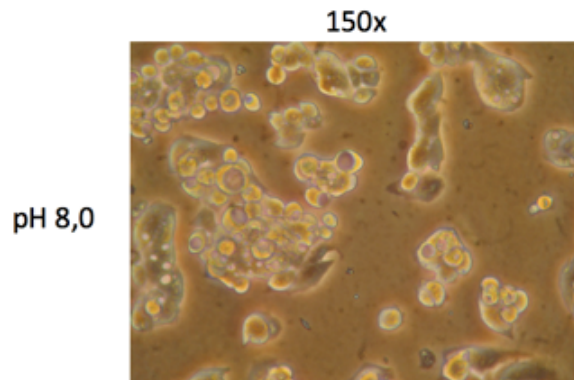


Abbildung 4.1: **HepG2-Zellen vor der Inkubation mit Zellkulturmedien unterschiedlicher pH-Werte.** Die Aufnahme der Zellen erfolgte bei 150-facher Vergrößerung.

Während die HepG2-Zellen vor der Inkubation in Zellkulturmedien unterschiedlicher pH-Werte ein kugeliges oder Pflasterstein-ähnliches Aussehen hatten und sich größere Zellcluster gebildet hatten (Abb. 4.1), veränderte sich das Aussehen der Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Zeit, in der sie in den entsprechenden pH-Werten inkubiert wurden (Abb. 4.2).

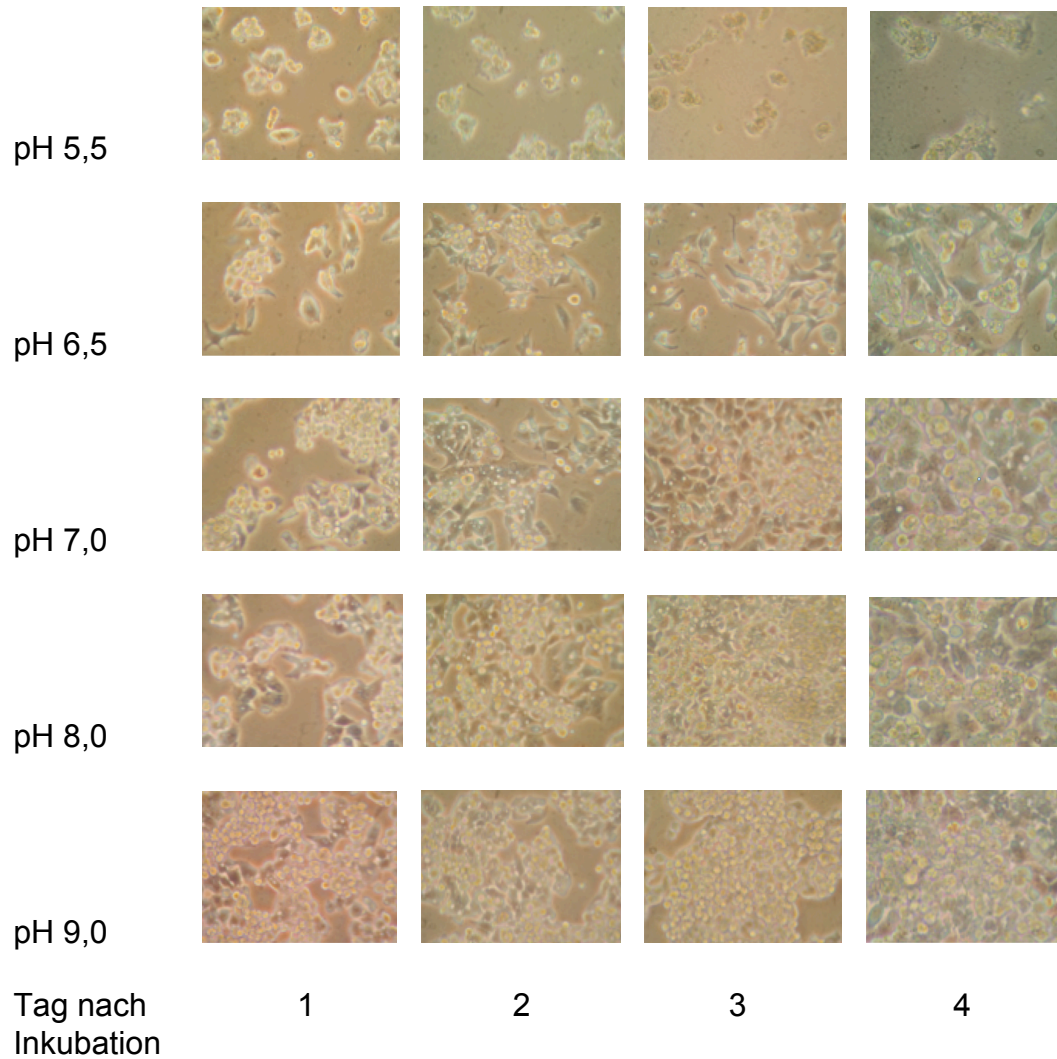


Abbildung 4.2: **Inkubation der HepG2-Zellen in Zellkulturmedien unterschiedlicher pH-Werte für 1 - 4 Tage.** Die Aufnahmen der Zellen erfolgten bei 150-facher Vergrößerung. Die Abbildungen zeigen charakteristische Bildausschnitte aus insgesamt 6 Versuchen.

An Tag 1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in pH-Werten von 5,5 und 6,5 war das Aussehen der Zellen nur unwesentlich verändert. Es waren kugelige und Pflasterstein-artige Zellen zu erkennen. Die pH-Werte 5,5 und 6,5 schienen jedoch einen Einfluss auf das Zellwachstum zu haben. Im Vergleich zu pH 7, 8 und 9 sind in der Abbildung deutlich weniger Zellen bei pH 5,5 und 6,5 nachzuweisen. An Tag 2 nach Inkubation hatten sich im entsprechenden Bildabschnitt bei pH 5,5 weitere Zellen gelöst. In den Zellkulturmedien pH 6,5

bis 9 war ein deutliches Zellwachstum zu verzeichnen, wobei besonders bei pH 6,5 und pH 7,0 Fibroblasten-artige Zellen zu beobachten waren. Insgesamt nahm die Konfluenz bei diesen pH-Werten zu. An Tag 3 und 4 nach Inkubation nahmen das Zellwachstum und damit die Konfluenz weiter zu. Es kam teilweise, besonders an Tag 4 und bei pH 8 und 9 zum Überwachsen des Zellrasens. Auch waren mehr Fibroblasten-artige Zellen zu sehen.

4.2 Nachweis von sat-1 in HepG2-Zellen auf mRNA-Ebene

Der Nachweis der sat-1-mRNA erfolgte mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurde die RNA zuvor mittels Trizol® sowie eines RNA-Isolierungs-Kits gewonnen, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und diese anschließend für die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Die Agarose-Gelelektrophorese bestätigte das Vorhandensein des *house-keeping*-Gens GAPDH und des sat-1-Transporters (Abb. 4.3).

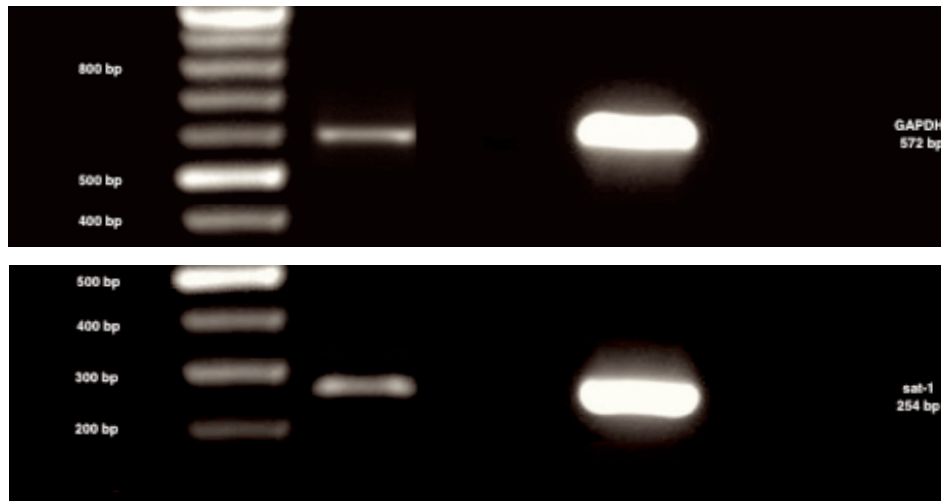


Abbildung 4.3: **Agarose-Gelelektrophorese-Bild der RNA-Expression von sat-1 in HepG2-Zellen.** Die HepG2-Zellen wurden in HepG2-Zellmedium inkubiert. Im Anschluss erfolgten die RNA-Isolierung, die reverse Transkription, die Polymerase-Kettenreaktion sowie die Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Sichtbarmachung durch Ethidiumbromid. Bei der Abbildung handelt es sich um ein repräsentatives Experiment aus fünf Versuchen, die nach einem identischen Versuchsprotokoll durchgeführt wurden.

4.3 Inkubation der HepG2-Zellen in Medien saurer pH-Werte

Der Nachweis der sat-1-mRNA-Expression erfolgte über eine *real-time*-PCR. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, haben die HepG2-Zellen einen niedrigeren pH-Wert als 6,5 nicht toleriert, sodass sich in der vorliegenden Studie bei der PCR auf die pH-Werte 6,5, 7 und 8 beschränkt wurde. Die Tabellen (Tab. 4.1 und 4.2) sowie die Abbildungen (Abb. 4.4 und 4.5) zeigen, dass die sauren Zellkulturmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 die mRNA-Expression (ΔCt) bzw. die relative mRNA-Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$) beeinflussen. Die Inkubation der HepG2-Zellen mit Zellkulturmedien der pH-Werte 6,5 und 7 hatte eine Verminderung der sat-1-mRNA-Expression zur Folge. Dies zeigte sich durch den im Mittelwert 1,32 Zyklen später erfolgten Nachweis von sat-1-mRNA bei pH 6,5 im Vergleich zu pH 7. Aus den *real-time*-Analysen von vier unabhängigen Zellpassagen wurden die Mittelwerte ermittelt. Diese vier

Zellpassagen werden im Ergebnisteil der vorliegenden Untersuchung jeweils als Passage 1, 2, 3 und 4 bezeichnet.

Tabelle 4.1: **Veränderung der mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu GAPDH.** Neben dem unveränderten Ausgangsmedium (pH 8) wurden die HepG2-Zellen in Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert.

	pH 6,5 Δ Ct	pH 7 Δ Ct	pH 8 Δ Ct
Passage 1	18,51	16,66	15,52
Passage 2	16,71	15,83	15,62
Passage 3	17,84	15,81	15,78
Passage 4	16,99	16,47	15,50
Mittelwert	17,51	16,19	15,61
SEM	0,41	0,24	0,06

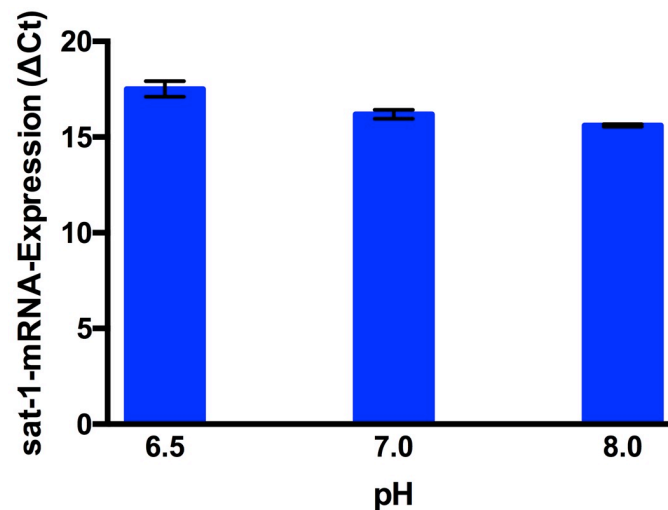


Abbildung 4.4: mRNA-Expression des **sat-1** nach Inkubation der **HepG2-Zellen** in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu **GAPDH**. Neben dem unveränderten Ausgangsmedium (pH 8) wurden die HepG2-Zellen mit zwei sauren Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. Je zwei Wiederholungen aus vier unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

Tabelle 4.2: **Veränderung der relativen mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu GAPDH**. Die HepG2-Zellen wurden mit Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert.

	pH 6,5 $\Delta\Delta Ct$	pH 7 $\Delta\Delta Ct$
Passage 1	-2,99	-1,14
Passage 2	-1,09	-0,21
Passage 3	-2,06	-0,03
Passage 4	-1,49	-0,97
Mittelwert	-1,91	-0,59
SEM	0,41	0,27

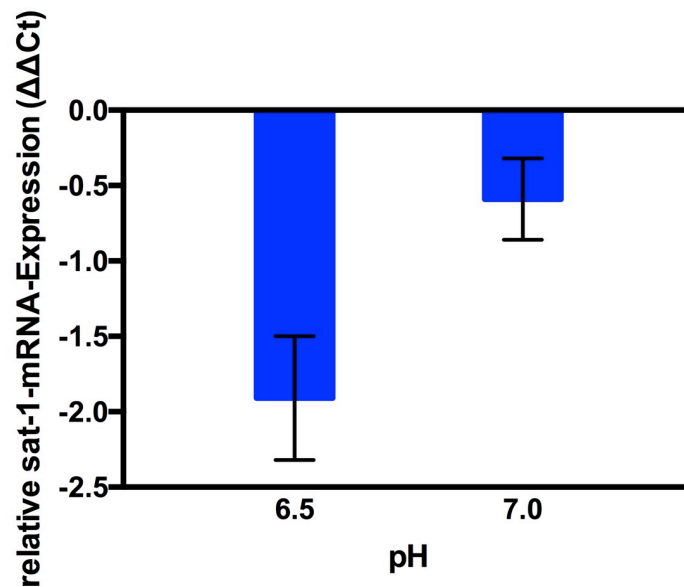


Abbildung 4.5: **Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu GAPDH.** Die HepG2-Zellen wurden mit Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. $\Delta\Delta Ct$ gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Je zwei Wiederholungen aus vier unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

4.4 Zeitreihe der Inkubation der HepG2-Zellen in Relation zu GAPDH (pH 6,5)

Die *real-time*-PCR hatte gezeigt, dass bei Einsatz des Zellmediums mit dem pH-Wert 6,5 die mRNA-Expression von sat-1 am deutlichsten beeinflusst wurde, sodass eine fünftägige Zeitreihe der Inkubation unter Verwendung dieses Zellmediums durchgeführt wurde.

Nach Durchführung der RNA-Isolierung und der reversen Transkription konnte die mRNA von sat-1 und GAPDH mithilfe der *real-time*-PCR nachgewiesen werden. Die Zeitreihe diente dem Nachweis darüber, welche Inkubationsdauer einen maximalen Effekt auf die sat-1-mRNA-Expression hat. Für alle Inkubationszeiträume zeigte sich eine Herunterregulation der sat-1-mRNA-Expression, wobei dieser Effekt für den Inkubationszeitraum

von drei Tagen am deutlichsten ausgeprägt war (Tab. 4.3 u. 4.4, Abb. 4.6 u. 4.7).

Tabelle 4.3: Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu GAPDH für 1 – 5 Tage. Die Zellen für den Leerwert wurden mit dem unveränderten Ausgangsmedium (pH 8) versetzt.

	Leerwert	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Passage 1	16,14	17,42	17,47	17,57	17,33	17,03
Passage 2	16,06	17,28	17,34	17,72	17,51	17,03
Passage 3	16,28	17,64	17,47	17,80	18,00	16,78
Passage 4	16,00	17,12	17,58	17,37	17,27	16,51
Mittelwert	16,12	17,36	17,46	17,61	17,53	16,84
SEM	0,06	0,11	0,05	0,09	0,17	0,12

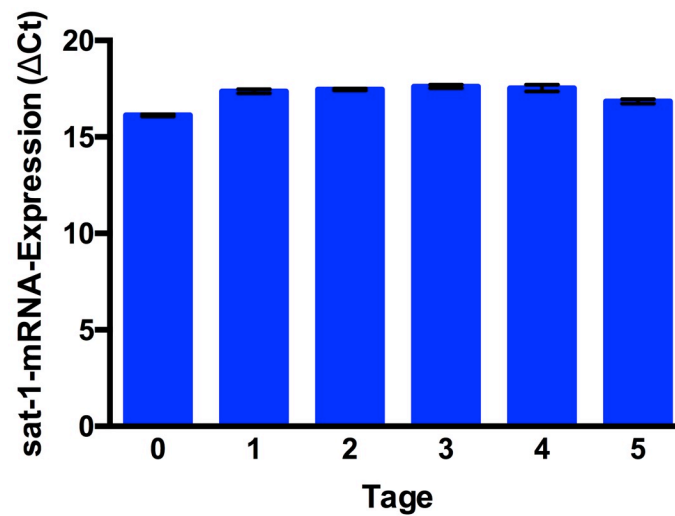


Abbildung 4.6: mRNA-Expression des **sat-1** nach Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu GAPDH für 1 – 5 Tage. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. Je zwei Wiederholungen aus vier unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

Tabelle 4.4: Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu GAPDH für 1 – 5 Tage.

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Passage 1	-1,28	-1,33	-1,43	-1,19	-0,90
Passage 2	-1,22	-1,28	-1,66	-1,45	-0,97
Passage 3	-1,37	-1,19	-1,53	-1,73	-0,51
Passage 4	-1,12	-1,58	-1,38	-1,27	-0,52
Mittelwert	-1,25	-1,35	-1,50	-1,41	-0,72
SEM	0,05	0,08	0,06	0,12	0,12

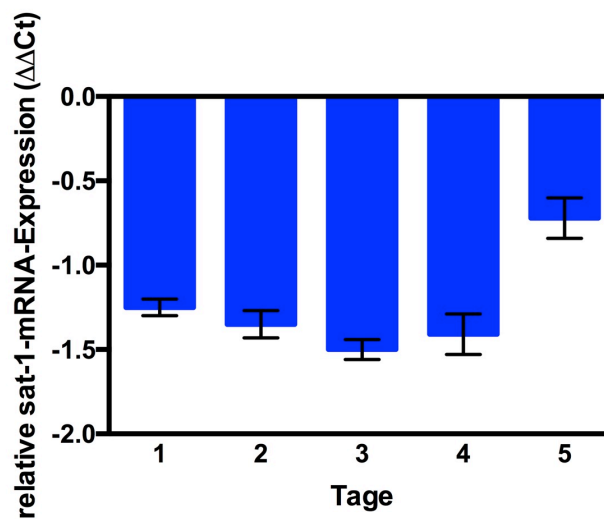


Abbildung 4.7: **Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu GAPDH für 1 – 5 Tage.** Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. $\Delta\Delta Ct$ gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Je zwei Wiederholungen aus vier unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

4.5 Einfluss eines sauren Zellmediums auf das *house-keeping*-Gen GAPDH

In den vorangegangenen Versuchen, bei denen die HepG2-Zellen den Zellmedien mit niedrigem pH-Wert ausgesetzt wurden, ist deutlich geworden, dass die sauren Zellmedien auch einen Einfluss auf die mRNA-Expression des *house-keeping*-Gens GAPDH haben. Um diesen Einfluss zu überprüfen, wurde im folgenden Versuch das *house-keeping*-Gen HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) in Relation zu GAPDH gesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression vom *house-keeping*-Gen HPRT von den sauren pH-Werten des Zellmediums nicht beeinflusst wurde. Der Effekt auf die mRNA-Expression von GAPDH hat sich bestätigt, somit konnte GAPDH als nicht pH-unabhängig bezeichnet werden (Tab. 4.5 u. 4.6, Abb. 4.8 u. 4.9).

Durch diesen Versuch konnte eine passende Referenz für saure pH-Wert-

Veränderungen gefunden werden, sodass die in Kapitel 4.3 und 4.4 beschriebenen Versuche mit dem *house-keeping*-Gen HPRT wiederholt wurden.

Tabelle 4.5: Veränderung der mRNA-Expression von GAPDH nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu HPRT. Neben dem unveränderten Ausgangsmedium (pH 8) wurden die HepG2-Zellen mit zwei sauren Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert.

	pH 6,5 Δ Ct	pH 7 Δ Ct	pH 8 Δ Ct
Passage 1	6,30	6,92	7,75
Passage 2	5,84	6,23	6,92
Passage 3	5,95	6,65	7,93
Passage 4	6,10	6,58	7,37
Mittelwert	6,05	6,60	7,49
SEM	0,10	0,14	0,22

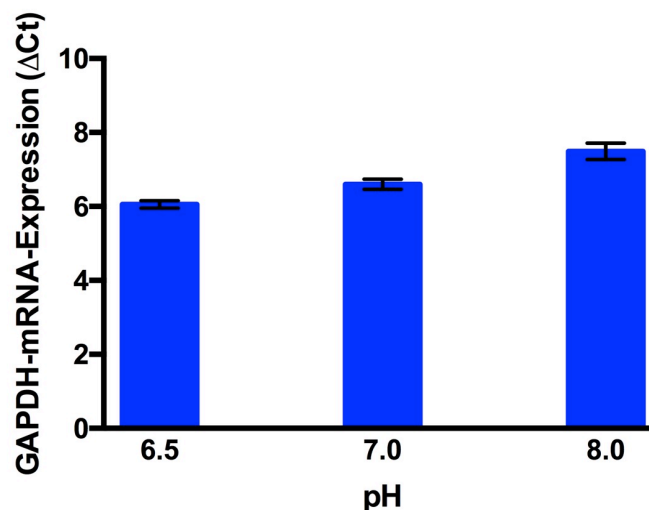


Abbildung 4.8: mRNA-Expression von GAPDH nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien verschiedener pH-Werte. Neben dem unveränderten Ausgangsmedium (pH 8) wurden die HepG2-Zellen mit zwei sauren Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die HPRT-mRNA-Expression korrigiert. Je zwei Wiederholungen aus vier unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

Tabelle 4.6: **Veränderung der relativen mRNA-Expression von GAPDH nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte.** Die HepG2-Zellen wurden mit Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert.

	pH 6,5 $\Delta\Delta Ct$	pH 7 $\Delta\Delta Ct$
Passage 1	1,45	0,83
Passage 2	1,08	0,69
Passage 3	1,98	1,28
Passage 4	1,64	1,16
Mittelwert	1,54	0,99
SEM	0,19	0,14

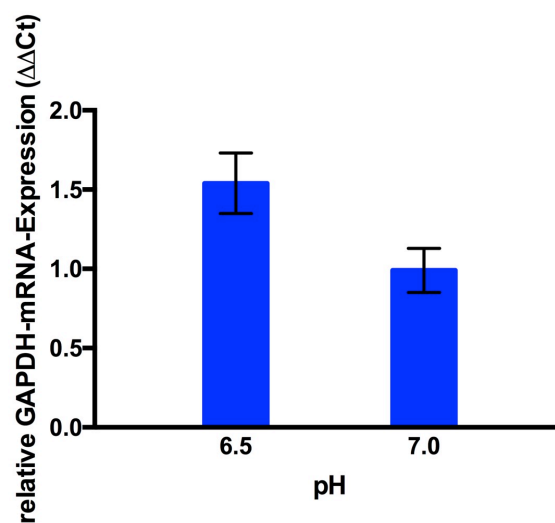


Abbildung 4.9: **Relative mRNA-Expression von GAPDH nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien verschiedener pH-Werte.** Die HepG2-Zellen wurden mit Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die HPRT-mRNA-Expression korrigiert. $\Delta\Delta Ct$ gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Je zwei Wiederholungen aus vier unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

4.6 Inkubation der HepG2-Zellen in Medien unterschiedlicher pH-Werte in Relation zu HPRT

Wie in Kapitel 4.3 beschrieben, erfolgte der Nachweis der sat-1-mRNA-Expression ebenfalls mithilfe der *real-time*-PCR. Der in der vorliegenden Studie verwendete Assay richtete sich gegen die Spleißvarianten 1 und 3. Die Tabellen 4.7 und 4.8 und Abbildungen 4.10 und 4.11 zeigen, dass die Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 die mRNA-Expression (ΔCt) bzw. die relative mRNA-Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$) beeinflusst haben. Die Inkubation der HepG2-Zellen mit den Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 hatte eine Verminderung der sat-1-mRNA-Expression zur Folge. Die Zyklenzahl für den pH-Wert 7 erhöhte sich im Vergleich zu pH 8 um 1,16 Zyklen, während der Anstieg für pH 6,5 bei 3,21 Zyklen lag. Somit zeigte sich für die mRNA-Expression des sat-1 in Relation zum *house-keeping*-Gen HPRT, wie bereits bei GAPDH beobachtet, eine Herunterregulation der sat-1-mRNA. Aus den *real-time*-Analysen von drei unabhängigen Zellpassagen wurden die Mittelwerte ermittelt.

Tabelle 4.7: **Veränderung der mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu HPRT.** Neben dem unveränderten Ausgangsmedium (pH 8) wurden die HepG2-Zellen in Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert.

	pH 6,5 ΔCt	pH 7 ΔCt	pH 8 ΔCt
Passage 1	13,58	11,34	10,00
Passage 2	12,12	10,39	9,54
Passage 3	13,24	11,07	9,78
Mittelwert	12,98	10,93	9,77
SEM	0,44	0,28	0,13

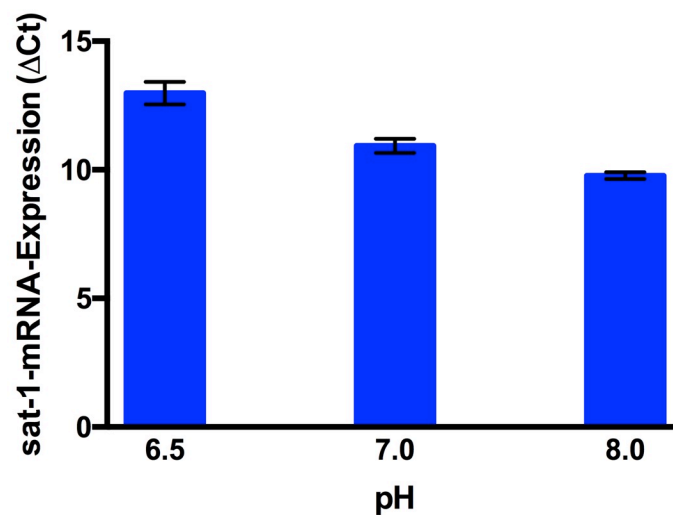


Abbildung 4.10: **mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu HPRT.** Neben dem unveränderten Ausgangsmedium (pH 8) wurden die HepG2-Zellen mit zwei sauren Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die HPRT-mRNA-Expression korrigiert. Je zwei Wiederholungen aus drei unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

Tabelle 4.8: **Veränderung der relativen mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu HPRT.** Die HepG2-Zellen wurden mit Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert.

	pH 6,5 $\Delta\Delta Ct$	pH 7,0 $\Delta\Delta Ct$
Passage 1	-3,58	-1,34
Passage 2	-2,58	-0,85
Passage 3	-3,46	-1,29
Mittelwert	-3,21	-1,16
SEM	0,32	0,16

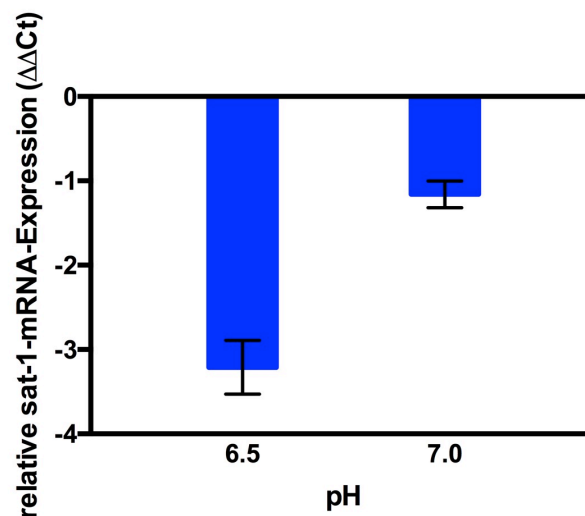


Abbildung 4.11: **Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu HPRT.** Die HepG2-Zellen wurden mit Zellmedien mit den pH-Werten 6,5 und 7 für 4 Tage inkubiert. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die HPRT-mRNA-Expression korrigiert. $\Delta\Delta Ct$ gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Je zwei Wiederholungen aus drei unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

4.7 Zeitreihe der Inkubation der HepG2-Zellen in Relation zu HPRT (pH 6,5)

Anhand der Ergebnisse der *real-time*-PCR, die in Kapitel 4.6 beschrieben wurden, hatte sich auch hier der deutlichere Effekt hinsichtlich der sat-1-mRNA-Expression bei Verwendung des Zellmediums mit dem pH-Wert 6,5 gezeigt. Es folgte auch hier eine Zeitreihe der Inkubation über einen Zeitraum von fünf Tagen. Nach Isolierung der RNA und anschließender reversen Transkription konnte die mRNA von sat-1 und HPRT mithilfe der *real-time*-PCR nachgewiesen werden. Die Zeitreihe diente dem Nachweis darüber, welche Inkubationsdauer einen maximalen Effekt auf die sat-1-mRNA-Expression hatte.

Für alle Inkubationszeiträume zeigte sich eine Herunterregulation der sat-1-mRNA-Expression (Tab. 4.9 u. 4.10, Abb. 4.12 u. 4.13), wobei dieser Effekt für den Inkubationszeitraum von drei Tagen mit 2,47 Zyklen mehr im Vergleich zum Leerwert am deutlichsten ausgeprägt war und mit dem Ergebnis aus Kapitel 4.4 korrelierte.

Tabelle 4.9: Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu HPRT für 1 – 5 Tage. Die Zellen für den Leerwert wurden mit dem unveränderten Ausgangsmedium (pH 8) versetzt.

	Leerwert	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Passage 1	11,07	13,53	13,53	13,60	13,17	12,65
Passage 2	11,17	13,37	13,41	13,48	12,93	12,61
Passage 3	10,28	12,56	12,78	12,85	13,08	12,41
Mittelwert	10,84	13,24	13,24	13,31	13,06	12,56
SEM	0,28	0,30	0,23	0,23	0,07	0,07

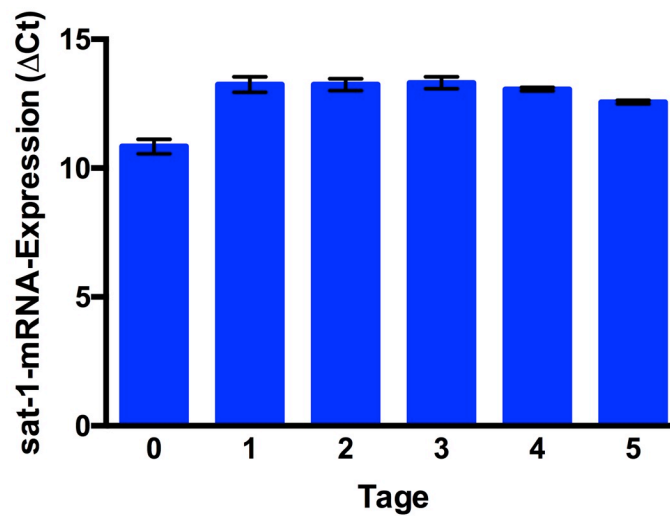


Abbildung 4.12: mRNA-Expression des *sat-1* nach Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu HPRT für 1 – 5 Tage. Die *sat-1*-mRNA-Expression wurde um die HPRT-mRNA-Expression korrigiert. Je zwei Wiederholungen aus drei unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

Tabelle 4.10: Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu HPRT für 1 – 5 Tage.

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Passage 1	-2,46	-2,46	-2,53	-2,10	-1,58
Passage 2	-2,20	-2,24	-2,31	-1,76	-1,44
Passage 3	-2,28	-2,50	-2,57	-2,80	-2,13
Mittelwert	-2,31	-2,40	-2,47	-2,22	-1,72
SEM	0,08	0,08	0,08	0,31	0,21

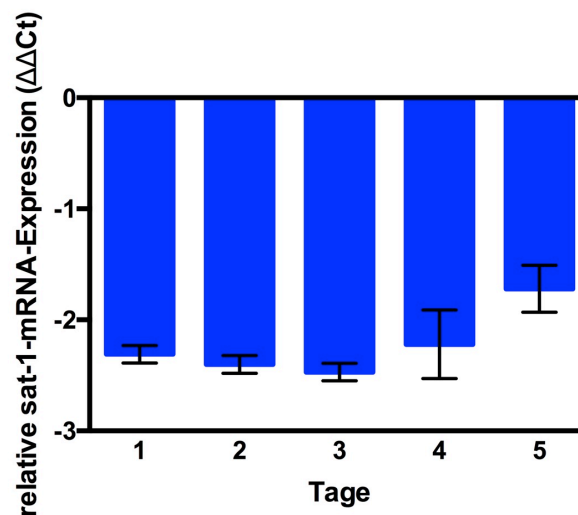


Abbildung 4.13: **Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu HPRT für 1 – 5 Tage.** Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die HPRT-mRNA-Expression korrigiert. $\Delta\Delta Ct$ gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Je zwei Wiederholungen aus drei unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

4.8 Inkubation der HepG2-Zellen in Bicarbonat

Da der sat-1 auch als Sulfat-Bicarbonat-Austauscher arbeiten kann, sollte in einer weiteren Versuchsreihe der zeitabhängige Einfluss von Bicarbonat auf die sat-1-mRNA-Expression untersucht werden. Die Zusammensetzung des Zellkulturmediums findet sich in Tabelle 2.4 Die Tabellen 4.11 und 4.12 und Abbildungen 4.14 und 4.15 zeigen, welchen Einfluss Bicarbonat auf die mRNA-Expression (ΔCt) bzw. die relative mRNA-Expression ($\Delta\Delta Ct$) hat. Die Inkubation der HepG2-Zellen mit bicarbonathaltigem Zellmedium hat eine Erhöhung der sat-1-mRNA-Expression zur Folge. Aus den *real-time*-Analysen von drei unabhängigen Zellpassagen wurden die Mittelwerte ermittelt.

Tabelle 4.11: **Veränderung der mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen mit Bicarbonat in Relation zu GAPDH.** Neben dem unveränderten Ausgangsmedium (pH 8) wurden die HepG2-Zellen mit bicarbonathaltigem Zellmedium (pH 8, 1 mM NaHCO₃) für 4 Tage inkubiert.

	Hepes Δ Ct	Bicarbonat Δ Ct
Passage 1	11,72	10,98
Passage 2	12,98	12,12
Passage 3	11,71	10,50
Mittelwert	12,14	11,20
SEM	0,73	0,83

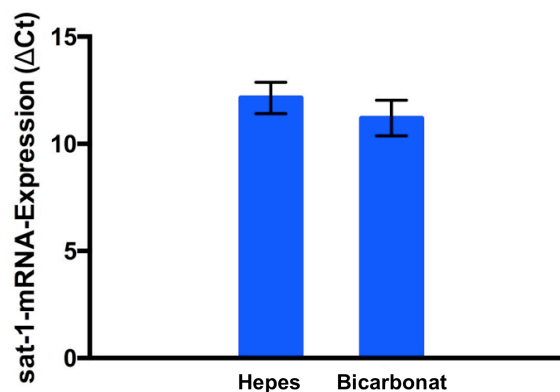


Abbildung 4.14: **mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Bicarbonat in Relation zu GAPDH.** Neben dem unveränderten Ausgangsmedium (pH 8) wurden die HepG2-Zellen mit bicarbonathaltigem Zellmedium (pH 8, 1 mM NaHCO₃) für 4 Tage inkubiert. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. Je zwei Wiederholungen aus drei unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

Tabelle 4.12: **Veränderung der relativen mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen mit Bicarbonat in Relation zu GAPDH.** Die HepG2-Zellen wurden mit bicarbonathaltigem Zellmedium (pH 8, 1 mM NaHCO₃) für 4 Tage inkubiert.

	Bicarbonat $\Delta\Delta Ct$
Passage 1	0,74
Passage 2	0,86
Passage 3	1,21
Mittelwert	0,94
SEM	1,21

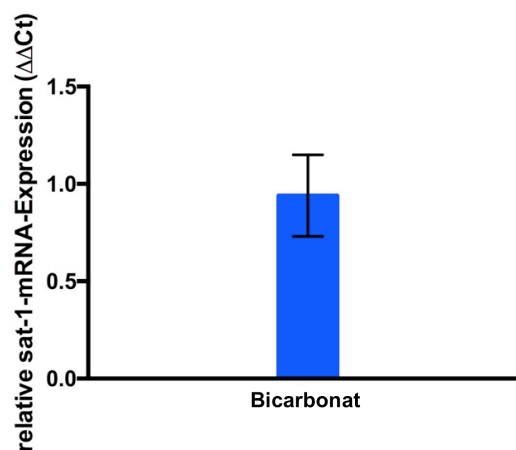


Abbildung 4.15: **Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Bicarbonat in Relation zu GAPDH.** Die HepG2-Zellen wurden mit bicarbonathaltigem Zellmedium (pH 8, 1 mM NaHCO₃) für 4 Tage inkubiert. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. $\Delta\Delta Ct$ gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Je zwei Wiederholungen aus drei unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

4.9 Inkubation der HepG2-Zellen in bicarbonathaltigem Zellmedium basischen pH-Wertes in Relation zu GAPDH

Um den Einfluss von HepG2-Zellmedium mit alkalischem pH-Wert auf die sat-1-mRNA-Expression zu untersuchen, wurde im folgenden Versuch bicarbonathaltiges Zellmedium eingesetzt, da sich das HEPES-Medium aufgrund seiner Puffereigenschaften für diese Versuche nicht eignet. Beim Vergleich von bicarbonathaltigem Standardmedium (pH 8) und Medium mit dem pH-Wert 9 hat sich eine leichte Erhöhung der sat-1-mRNA-Expression bei den mit dem Zellmedium (pH 9) inkubierten HepG2-Zellen gezeigt. Die Tabellen 4.13 und 4.14 und die Abbildungen 4.16 und 4.17 veranschaulichen das beschriebene Resultat. Aus den *real-time*-Analysen von drei unabhängigen Zellpassagen wurden die Mittelwerte ermittelt.

Tabelle 4.13: **Veränderung der mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in alkalischem Zellmedium in Relation zu GAPDH.** Die HepG2-Zellen wurden mit bicarbonathaltigem Zellmedium mit den pH-Werten 8 und 9 für 4 Tage inkubiert.

	pH 8 Δ Ct	pH 9 Δ Ct
Passage 1	11,39	11,00
Passage 2	9,32	8,94
Passage 3	9,64	9,43
Mittelwert	10,12	9,79
SEM	0,64	0,62

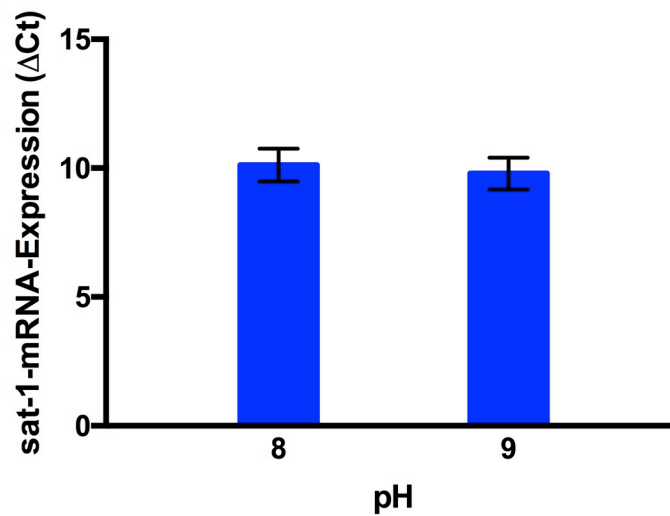


Abbildung 4.16: **mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in alkalischem Zellmedium in Relation zu GAPDH.** Die HepG2-Zellen wurden mit Zellmedien mit den pH-Werten 8 und 9 für 4 Tage inkubiert. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. Je zwei Wiederholungen aus drei unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

Tabelle 4.14: **Veränderung der relativen mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in alkaischem Zellmedium in Relation zu GAPDH.** Die HepG2-Zellen wurden mit bicarbonathaltigem Zellmedium (pH 9) für 4 Tage inkubiert.

	pH 9 $\Delta\Delta\text{Ct}$
Passage 1	0,39
Passage 2	0,38
Passage 3	0,21
Mittelwert	0,33
SEM	0,06

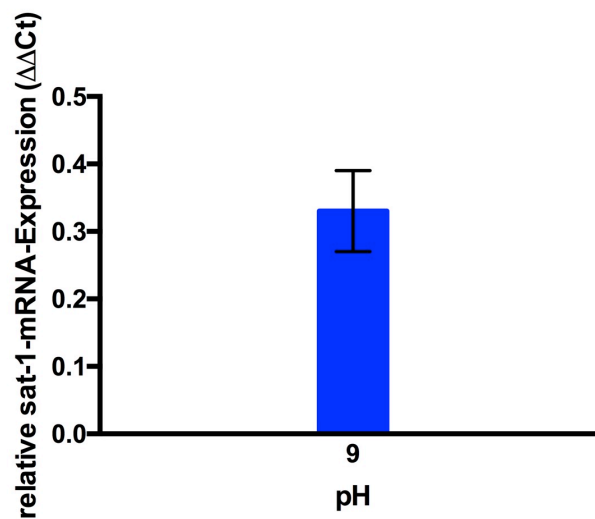


Abbildung 4.17: **Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in alkalischem Zellmedium in Relation zu GAPDH.** Die HepG2-Zellen wurden mit Zellmedien mit den pH-Wert 9 für 4 Tage inkubiert. Die sat-1-mRNA-Expression wurde um die GAPDH-mRNA-Expression korrigiert. $\Delta\Delta C_t$ gibt die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an. Je zwei Wiederholungen aus drei unabhängigen Zellpassagen ergeben die Darstellung.

4.10 sat-1-Proteinexpression in HepG2-Zellen nach Inkubation im Zellmedium mit pH-Wert 6,5

Im *Western Blot* wird der Einfluss der quantitativen Proteinexpression des sat-1-Transporters bei HepG2-Zellen, welche für 4 Tage mit dem Zellmedium (pH 6,5) inkubiert wurden, gezeigt. Dafür wurden als *house-keeping*-Protein β -Aktin und ein anti-sat-1-Antikörper eingesetzt. Für das unveränderte Ausgangsmedium (pH 8) und die mit dem Zellmedium (pH 6,5) inkubierten HepG2-Zellen konnten Banden bei 70 kDa sichtbar gemacht werden (Abb. 4.18). Die Bande bei pH 6,5 zeigt eine schwächere Ausprägung. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis auf mRNA-Ebene.

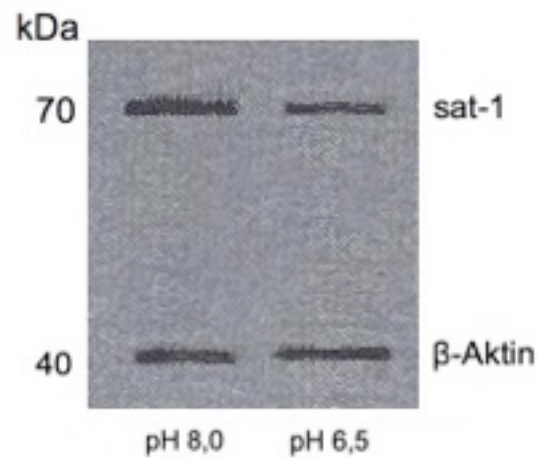


Abbildung 4.18: **Sat-1-Proteinexpression in HepG2-Zellen nach Inkubation mit Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5.** *Western Blot* der HepG2-Zellen nach Inkubation mit dem Zellmedium (pH 6,5) für 4 Tage. Zur Anwendung kamen ein anti-β-Aktin- und ein anti-sat-1-Antikörper. Aus einer Anzahl von drei Versuchen mit identischem Protokoll zeigt die Abbildung ein repräsentatives Ergebnis.

5. Diskussion

Auf Grundlage der Ergebnisse von Krick et al. (2009) hinsichtlich der Sulfataufnahme über den sat-1-Transporter bei einem alkalischen pH-Wert in Kurzzeitmessungen war es die Intention der vorliegenden Studie, den Einfluss längerfristiger Inkubationszeiten bei unterschiedlichen pH-Werten im Hinblick auf die mRNA- und Proteinexpression des sat-1-Transporters in HepG2-Zellen zu untersuchen. Die HepG2-Zellen exprimieren den sat-1-Transporter endogen und besitzen folglich die Mechanismen, die für eine Regulation notwendig sind.

5.1 Der Einfluss von pH-Wert-Änderungen auf das Zellwachstum und die Zellmorphologie

Die Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedium sauren pH-Wertes hat einen Einfluss auf die Zellmorphologie sowie die Zelldichte. Die Veränderungen werden im Ergebnisteil beschrieben und anhand der dort aufgeführten Fotografien veranschaulicht (Kap. 4.1, Abb. 4.2). Besonders bei den pH-Werten 5,5 und 6,5 wurde ein geringeres Zellwachstum beobachtet. Insgesamt nahm die Konfluenz mit alkalischen pH-Werten zu.

Es ist davon auszugehen, dass viele Stoffwechselabläufe und Enzymkaskaden bei niedrigen pH-Werten nicht optimal ablaufen können. Weiterhin ist es möglich, dass sich der Expressionsgrad vieler Gene in den Zellen bei den pH-Werten 5,5 und 6,5 geändert hat. Dieser Aspekt führt dazu, dass sich die Zellmorphologie verändert und das Zellwachstum begrenzt wird.

5.2 Der Einfluss von Bicarbonat und unterschiedlichen pH-Werten auf den sat-1-Transporter

Die Untersuchungen von Krick et al. (2009) haben ergeben, dass die Sulfataufnahme über den sat-1-Transporter bei einem alkalischen pH-Wert reduziert, durch Bicarbonat kompetitiv gehemmt wird und der Sulfatefflux in Anwesenheit von Bicarbonat erhöht ist, sodass der Sulfatgehalt in Anwesenheit von Bicarbonat reduziert ist. Die Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass ein Sulfat-Bicarbonat-Austausch und möglicherweise auch ein Sulfat-OH-Austausch oder ein Sulfat-Protonen-Cotransport existiert.

Eine Studie von Xie et al. (2002) belegt ebenfalls, dass der Sulfattransport des murinen sat1-Transporters (SLC26A1) in Oozyten bei einem pH-Wert von 7 signifikant höher ist als bei einem pH-Wert von 6.

In einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2016 konnte gezeigt werden, dass der Sulfattransporter aus *Salmonella typhimurium* ebenfalls eine pH-Wert-abhängige Funktion aufweist. Hier wird bei einem pH-Wert von 8 ein signifikant erhöhter Bicarbonattransport im Vergleich zu pH-Wert 6 und pH-Wert 7 gemessen (Srinivasan et al. 2016). In dieser Studie wurden die Experimente in vitro an einem isolierten und in nano-discs rekonstruierten Sulfattransporter durchgeführt, der rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert wurde. Des Weiteren wird in dieser Studie Fumarat als potentieller Inhibitor für den Bicarbonattransport beschrieben (Srinivasan et al. 2016).

Diese Ergebnisse korrelieren mit den bzw. bestätigen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse/n, dass die sat-1-Proteinexpression bei einem pH-Wert von 8 im Vergleich zu einem pH-Wert von 6,5 signifikant erhöht ist.

In 2013 wurde gezeigt, dass eine Version des SLC26A6-Transporters im Herzen Chloridionen gegen Bicarbonat sowie Oxalat austauscht und somit eine zentrale Rolle bei der pH-Wert-Regulation des Herzens einnimmt (Kim et al. 2013). Diese Versuche wurden mit Chinese Hamster Ovarian (CHO)-Zellen bei einem einzigen pH-Wert von 7,4 durchgeführt (Kim et al. 2013). Sie belegen jedoch, dass neben dem sat-1 zumindest ein weiterer Vertreter der SLC26-Familie mit Bicarbonat interagiert.

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass es fein regulierte und spezifische Abhängigkeiten in der Funktionsweise von Sulfattransporterproteinen gibt,

die bislang nur teilweise verstanden sind. Die Funktionen scheinen vom Gewebe abhängig zu sein, in dem die Transporter exprimiert werden sowie von verschiedenen externen Faktoren wie beispielsweise dem pH-Wert, der Bicarbonat- und der Sulfatkonzentration.

Als Kontrollen für die Expression der *sat-1*-mRNA in Abhängigkeit von der zeitlichen Inkubation in Medien unterschiedlicher pH-Werte und in An- und Abwesenheit von Bicarbonat wurden zwei verschiedene *house-keeping*-Gene, Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), eingesetzt, da sich in den Versuchen herausstellte, dass die Expression von GAPDH vom pH-Wert des Inkubationsmediums abhängig war.

Da in der vorliegenden Arbeit der Expressionsgrad von *sat-1*-mRNA in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert untersucht werden sollte, konnte GAPDH nicht als Kontrollgen in den folgenden Versuchen eingesetzt werden. Das *house-keeping*-Gen HPRT dagegen hat sich als pH-Wert-unabhängig herausgestellt, das bedeutet, dass sein Expressionsgrad bei den gemessenen pH-Werten identisch war. Deswegen wurde HPRT in den nachfolgenden Experimenten als *house-keeping*-Gen eingesetzt.

5.3 Der Einfluss von metabolischen Alkalosen

Von einer metabolischen Alkalose spricht man, wenn sich der pH-Wert des Blutes und des extrazellulären Raumes auf über 7,45 verschiebt. Dies wird normalerweise durch einen Anstieg der Bicarbonatkonzentration hervorgerufen. Krankheitsbilder, die eine metabolische Alkalose auslösen können, beinhalten unter anderem einen vermehrten Verlust von HCl, Kalium und Wasser über den Gastrointestinaltrakt oder die Nieren (Li und Xu 2015). Es ist nicht auszuschließen, dass der *sat-1*-Transporter an diesen Vorgängen beteiligt ist.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mutationen in unterschiedlichen SLC26-Genen zu einer abweichenden Expression führen können. Dies hat starke Schwankungen im Säure-Basen-Haushalt sowie in der Anionenhomöostase zur Folge. Auf pathologischer Ebene resultiert die abweichende SLS26-Expression in einer gestörten Entwicklung der Zahnmineralisierung. Im Tiermodell konnte weiterhin gezeigt werden, dass bei einem *knock-out* der Gene SLC26A1 und SLS26A7 andere Gene hochreguliert werden, welche ebenfalls in der pH-Homöostase involviert sind und somit einen kompensatorischen Effekt bewirken (Yin et al. 2015).

Diese Ergebnisse stimmen mit der in dieser Arbeit gezogenen Schlussfolgerung überein, dass es einen fein regulierten Zusammenhang zwischen Säuren-Basen-Haushalt (pH-Wert) und der Expression sowie Funktion von SLC26-Proteinen gibt. Gee et al. (2016) haben gezeigt, dass Mutationen im SLC26A1-Gen die Bildung von Nierensteinen befördern können. Insbesondere eine Mutation, welche auf Proteinebene zu einem Austausch der Aminosäure 185 führt (Threonin wird gegen Methionin ausgetauscht), hat einen stark negativen Effekt auf die Faltung und den Transport des SLC26A1-Proteins. Daher kommt es zu einer abgeschwächten Proteintransporteraktivität und der Bildung von Kalzium-Oxalat-Nierensteinen (Gee et al. 2016). Dies wurde ebenfalls in einer Studie von Wu et al. (2016) gezeigt. Die Autoren zeigen weiterhin, dass der SLC26A1-Transporter bei alkalischem pH-Wert stärker aktiv ist und dass extrazelluläres Chlorid einen aktivierenden allosterischen Effekt auf den Sulfat- und Oxalattransport hat. Dieser allosterische Effekt wird darauf zurückgeführt, dass extrazelluläre Protonen nach Chloridbindung nicht mehr in der Lage sind, die Sulfatbindung zu inhibieren. Somit haben die Chloridionen ebenfalls eine direkte Auswirkung auf die pH-Abhängigkeit des Sulfattransportes (Wu et al. 2016).

6. Zusammenfassung

Sulfat ist ein essentieller Bestandteil des menschlichen Organismus und das vierthäufigste Anion im Blut. Es greift in unterschiedliche Prozesse wie die Biosynthese, die Synthese der Zellmatrix und des Knochenaufbaus ein und ist wichtig für die Detoxifikation wasserunlöslicher Abbauprodukte und Schadstoffe. Diese Stoffe werden nach Sulfatierung in der Leber wasserlöslich und können über entsprechende Transportsysteme über die Galle und die Nieren ausgeschieden werden. Für die Aufnahme von Sulfat aus dem Blut in die Hepatozyten und die proximalen Tubuluszellen ist ein Sulfat-Anionen-Transporter, der sat-1, verantwortlich. Er transportiert Sulfat im Austausch gegen Oxalat und Bicarbonat und ist das erste Mitglied der Gen-Familie der *Solute Carrier 26* (SLC26A1).

In der vorliegenden Studie wurde die Regulation des sat-1 auf RNA- und Protein-Ebene in HepG2-Zellen in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert und der extrazellulären Bicarbonatkonzentration untersucht. Hierzu wurden Methoden der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Western Blots eingesetzt. Veränderungen der extrazellulären Protonen- und Bicarbonat-Konzentration können bei Störungen des Säuren-Basen-Haushalts auftreten.

Die Inkubation der HepG2-Zellen bei pH 6,5 führte zeitabhängig zu einer Abnahme und bei pH 8 zu einer Zunahme des sat-1-mRNA-Gehalts. Die Inkubation der HepG2-Zellen in bicarbonathaltigen Medien erhöhte den sat-1-mRNA-Gehalt. Als interessanter Nebenfund wurde eine pH-Abhängigkeit des *house-keeping*- bzw. Referenz-Gens GAPDH beobachtet, sodass in einer zweiten Versuchsreihe HPRT als *house-keeping*-Gen eingesetzt wurde.

Ein anti-sat-1-Antikörper detektierte eine geringere sat-1-Expression bei pH 6,5 auch auf Proteinebene und bestätigte die schon in der PCR erzielten Ergebnisse eines geringeren sat-1-mRNA-Gehalts nach Inkubation der HepG2-Zellen bei pH 6,5.

7. Literaturverzeichnis

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979):

Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line.

Nature 282, 615-616

Alper SL, Sharma AK (2013):

The SLC26 gene family of anion transporters and channels.

Mol Aspects Med 34, 494-515

Ballet F, Bouma ME, Wang SR, Amit N, Marais J, Infante R (1984):

Isolation, culture and characterization of adult human hepatocytes from surgical liver biopsies.

Hepatology 4, 849-54

Biber J, Murer H, Mohebbi N, Wagner CA (2014):

Renal handling of phosphate and sulfate.

Compr Physiol 4, 771-92

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

Functional expression cloning of the canalicular sulfate transport system of rat hepatocytes.

J Biol Chem 269, 3017-21

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, Sabolic I (2009):

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

Pflugers Arch 457, 1381-92

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

Oxalate: from the environment to kidney stones.

Arh Hig Toksikol 64, 609-30

Brosnan JT, Brosnan ME (2006):

The sulfur-containing amino acids: an overview.
J Nutr 136, 1636S-40S

Burckhardt BC, Burckhardt G (2003):

Transport of organic anions cross the basolateral membrane of proximal tubule cells.
Rev Physiol Biochem Pharmacol 146, 95-158

Colas C, Pajor AM, Schlessinger A (2015):

Structure-Based Identification of Inhibitors for the SLC13 Family of Na(+)/Dicarboxylate Cotransporters.
Biochemistry 54, 4900-8

Cole DE, Evrovski J (2000):

The clinical chemistry of inorganic sulfate.
Crit Rev Clin Lab Sci 37, 299-344

Cole DE, Baldwin LS, Stirk LJ (1984):

Increased inorganic sulphate in mother and fetus at parturition: evidence for a fetal-to-maternal gradient.
Am J Obstet Gynecol 148, 596-9

Dawson PA, Markovich D (2002):

Regulation of the mouse Nas1 promotor 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

Dopson M, Johnson DB (2012):

Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms.
Environ Microbiol 14, 2620-31

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, Hampson 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

Gee HY, Jun I, Braun DA, Lawson JA, Halbritter J, Shril S, Nelson CP, Tan W, Stein D, Wassner AJ, Ferguson MA, Gucev Z, Sayer JA, Milosevic D, Baum M, Tasic V, Lee MG, Hildebrandt F (2016):

Mutations in SLC26A1 Cause Nephrolithiasis.

Am J Hum Genet 98, 1228-34

Hatch M, Freel RW (2005):

Intestinal transport of an obdurate anion: oxalate.

Urol Res 33, 1-16

Hierholzer K, Cade R, Gurd R, Kessler R, Pitts R (1960):

Stop-flow analysis of renal reabsorption and excretion of sulfate in the dog.

Am J Physiol 198, 833-7

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

Kim HJ, Myers R, Sihm CR, Rafizadeh S, Zhang XD (2013):

Slc26a6 functions as an electrogenic Cl/HCO₃ exchanger in cardiac myocytes.

Cardiovasc Res 100(3), 383–391

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

Koonin EV (2000):

How many genes can make a cell: the minimal-gene-set concept.

Annu Rev Genomics Hum Genet 1, 99-116

Kovacs H, Comfort D, Lord M, Campbell ID, Yudkin MD (1998):

Solution structure of SpoIIAA, a phosphorylatable component of the system that regulates transcription factor σ^F of *Bacillus subtilis*.

Proc Natl Acad Sci USA 95, 5067-71

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

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

Identification of 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, functional characterization, and transcriptional 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 Biochem Cell Biol 37, 1350-6

Li K, Xu Y (2015):

Citrate metabolism in blood transfusions and its relationship due to metabolic alkalosis and respiratory acidosis.

Int J Clin Exp Med 8(4), 6578–6584

Lohi H, Kujala M, Kerkelä E, Saarialho-Kere U, Kestilä M, Kere J (2000):

Mapping of five new putative anion transporter genes in human and characterization of SLC26A6, a candidate gene for pancreatic anion exchanger.

Genomics 70, 102-12

Markovich D (2001):

Physiological roles and regulation of mammalian sulfate transporters.

Physiol Rev 81, 1499-533

Markovich D (2006):

Sulfate transport by SLC26 transporters.

Novartis Found Sympo 273, 42-58

Markovich D (2011):

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

Markovich D, Murer H (2004):

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

Markovich D, Aronson PS (2007):

Specificity and regulation of renal sulfate transporters.
Annu Rev Physiol 69, 361-75

Mast C, Joly C, Savary-Auzeloux I, Remond D, Dardevet D, Papet I (2014):

Skeletal muscle wasting occurs in adult rats under chronic treatment with paracetamol when glutathione-dependent detoxification is highly activated.
J Physiol Pharmacol 5, 623-31

Morris ME, Murer H (2001):

Molecular mechanisms in renal and intestinal sulfate (re)absorption.
J Membr Biol 181, 1-9

Mount DB, Romero MF (2004):

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

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

Pajor AM (2014):

Sodium-coupled dicarboxylate and citrate transporters from the SLC13 family.
Pflugers Arch 466, 119-30

Passarge E, Kohlhasse J:

Genetik. In: Siegenthaler W, Blum HE (Hrsg.): Klinische Pathophysiologie. 9. Auflage, Georg Thieme Verlag
Stuttgart, New York 2006, 2-67

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

Regeer RR; Markovich D (2004):

A dileucine motif targets the sulfate anion transporter sat-1 to the basolateral membrane in renal cell lines.

Am J Physiol Cell Physiol 287, C365-72

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

Sadowski PG, Groen AJ, Dupree P, Lilley KS (2008):

Sub-cellular localization of membrane proteins.

Proteomics 8, 3991-4011

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

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

Renal physiology of SLC26 anion exchangers.

Curr Opin Nephrol Hypertens 16, 484-90

Srinivasan L, Baars TL, Fendler K, Michel H (2016):

Functional characterization of solute carrier (SLC) 26/sulfate permease (SulP) proteins in membrane mimetic systems.

Biochim Biophys Acta - Biomembr 1858(4): 698–705

Tallgren L (1980):

Inorganic sulphate in relation to the serum thyroxine level and in renal failure.

Acta Med Scand Suppl 640, 1-100

van Meer G (2005):

Cellular lipidomics.

EMBO J 24, 3159-65

Wu M, Heneghan JF, Vandorpe DH, Escobar LI, Wu BL, Alper SL (2016):

Extracellular Cl⁻ regulates human So4²⁻/anion exchanger SLC26A1 by altering pH sensitivity of anion transport.

Pflugers Arch 468, 1311-32

Xie Q, Welch R, Mercado A, Romero MF, Mount DB (2002):

Molecular characterization of the murine Slc26a6 anion exchanger: functional comparison with Slc26a1.

Am J Physiol Renal Physiol 283(4): F826–F838

Yin K, Lei Y, Wen X, Lacruz RS, Soleimani M, Kurtz I, Snead ML, White SN, Paine ML (2015):

SLC26A Gene Family Participate in pH Regulation during Enamel Maturation.

PloS One 10, e0144703

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Aufnahme, Synthese aus Schwefel-haltigen Aminosäuren und Ausscheidung von Sulfat.....	8
Abbildung 1.2	Rückresorption von Sulfat im proximalen Tubulus der Nieren.....	13
Abbildung 1.3	Lokalisation des sat-1-Transporters in der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen in der Niere.....	14
Abbildung 1.4	Lokalisation des sat-1-Transporters in der Leber.....	15
Abbildung 4.1	HepG2-Zellen vor der Inkubation mit Zellkulturmedien unterschiedlicher pH-Werte.....	38
Abbildung 4.2	Inkubation der HepG2-Zellen in Zellkulturmedien unterschiedlicher pH-Werte für 1 - 4 Tage.....	39
Abbildung 4.3	Agarose-Gelelektrophorese-Bild der RNA-Expression von sat-1 in HepG2-Zellen.....	41
Abbildung 4.4	mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu GAPDH.....	43
Abbildung 4.5	Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu GAPDH.....	44
Abbildung 4.6	mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu GAPDH für 1 – 5 Tage.....	46
Abbildung 4.7	Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu GAPDH für 1 – 5 Tage.....	47

Abbildung 4.8	mRNA-Expression von GAPDH nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien verschiedener pH-Werte.....	49
Abbildung 4.9	Relative mRNA-Expression von GAPDH nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien verschiedener pH-Werte.....	50
Abbildung 4.10	mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu HPRT.....	52
Abbildung 4.11	Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu HPRT.....	53
Abbildung 4.12	mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu HPRT für 1 – 5 Tage.....	55
Abbildung 4.13	Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu HPRT für 1 – 5 Tage.....	56
Abbildung 4.14	mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Bicarbonat in Relation zu GAPDH.....	57
Abbildung 4.15	Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Bicarbonat in Relation zu GAPDH.....	58
Abbildung 4.16	mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in alkalischem Zellmedium in Relation zu GAPDH.....	60
Abbildung 4.17	Relative mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in alkalischem Zellmedium in Relation zu GAPDH.....	61
Abbildung 4.18	Sat-1-Proteinexpression in HepG2-Zellen nach Inkubation mit Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5.....	62

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Übersicht der humanen SLC26-Transporter.....	12
Tabelle 2.1	Übersicht über die spezifischen Primer mit ihren 5'- 3'- Sequenzen sowie weiteren Eigenschaften.....	18
Tabelle 2.2	Übersicht über die verwendeten Referenzgene.....	19
Tabelle 2.3	Übersicht über die eingesetzten Konzentrationen und die Bezugsquellen.....	19
Tabelle 2.4	Übersicht der Puffer und Medien.....	21
Tabelle 2.5	In dieser Arbeit eingesetzte Geräte.....	23
Tabelle 3.1	Die Phasen der Polymerase-Kettenreaktion.....	29
Tabelle 4.1:	Veränderung der mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu GAPDH.....	42
Tabelle 4.2	Veränderung der relativen mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu GAPDH.....	43
Tabelle 4.3	Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu GAPDH für 1 – 5 Tage.....	45
Tabelle 4.4	Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu GAPDH für 1 – 5 Tage.....	46
Tabelle 4.5	Veränderung der mRNA-Expression von GAPDH nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu HPRT.....	48
Tabelle 4.6	Veränderung der relativen mRNA-Expression von GAPDH nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte.....	49

Tabelle 4.7	Veränderung der mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu HPRT.....	51
Tabelle 4.8	Veränderung der relativen mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in Zellmedien saurer pH-Werte in Relation zu HPRT.....	52
Tabelle 4.9	Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu HPRT für 1 – 5 Tage.....	54
Tabelle 4.10	Inkubation der HepG2-Zellen im Zellmedium mit dem pH-Wert 6,5 in Relation zu HPRT für 1 – 5 Tage.....	55
Tabelle 4.11	Veränderung der mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen mit Bicarbonat in Relation zu GAPDH.....	57
Tabelle 4.12	Veränderung der relativen mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen mit Bicarbonat in Relation zu GAPDH.....	58
Tabelle 4.13	Veränderung der mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in alkalischem Zellmedium in Relation zu GAPDH.....	59
Tabelle 4.14	Veränderung der relativen mRNA-Expression des sat-1 nach Inkubation der HepG2-Zellen in alkaischem Zellmedium in Relation zu GAPDH.....	60

10. Abkürzungsverzeichnis

cDNA	<i>complementary</i> DNA (Desoxyribonukleinsäure mit Capstruktur)
CFEX	Chlorid-Formiat-Austauscher
CLD	<i>chloride anion exchanger</i>
Ct	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert-Zyklus)
$\Delta\Delta$ Ct	Differenz der Schwellenwert-Zyklen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRA	<i>down-regulated in adenoma</i>
DTDST	diastrophischer Dysplasie-Sulfat-Transporter
ECL	erhöhte Chemilumineszenz
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCl	Salzsäure (chemische Summenformel)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
hsat-1	humaner Sulfat-Anionen-Transporter-1
IgG	Immunglobulin G
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
msat-1	Sulfat-Anionen-Transporter-1 der Maus
NaC	Natrium-Carboxylat-Cotransporter
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat, Natriumbicarbonat (chemische Summenformel)
NaOH	Natriumhydroxid (chemische Summenformel)
NaS	Natrium-Sulfat-Cotransporter
NaSi-1	Na ⁺ -abhängiger Sulfat-Transporter-1
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PAT-1	<i>putative anion amino acid transporter</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PVDF	Polyvenylidindifluorid
RLT	Herstellerbezeichnung eines Puffers
RNA	Ribonukleinsäure

rsat-1	Sulfat-Anionen-Transporter-1 der Ratte
rt-PCR	<i>real-time</i> -Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLC	<i>solute carrier</i>
STAS	Sulfat-Transporter-Anti-Sigma-Antagonist
Tat1	Testis Anionen Transporter 1
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
UV	ultraviolett

Danksagung

Für das Überlassen des Dissertationsthemas sowie die stets freundliche und engagierte Betreuung gebührt mein herzlicher Dank Frau Prof. Dr. Birgitta C. Burckhardt.

Außerdem möchte ich mich für die gute Betreuung während der Durchführung der Versuche in der Abteilung für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie bei Frau Dr. Nina Schnedler, Waja Wegner, Gesche Dallmeyer, Sören Petzke und Reinhard Schirmer bedanken.

