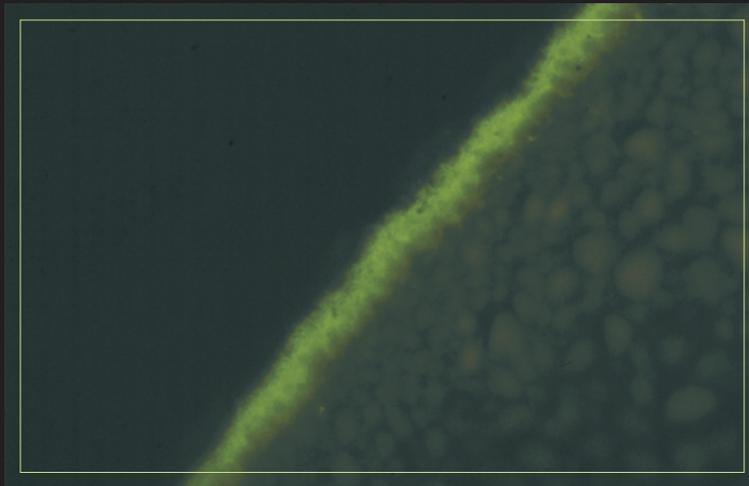


**Gerichtete Mutagenese am Natrium-abhängigen  
Gallensäuretransporter Ntcp zur Bedeutung  
negativ geladener Aminosäuren als Natrium-Sensor**



**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

**DANIEL ZAHNER**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**ISBN 3-89687-646-5**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2003

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2003

© 2003 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE  
[www.vvb-ips.de](http://www.vvb-ips.de)



Aus dem Institut für Veterinärpharmakologie  
und –toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Ernst Petzinger

**Gerichtete Mutagenese am Natrium-abhängigen  
Gallensäuretransporter Ntcp  
zur Bedeutung negativ geladener Aminosäuren als  
Natrium-Sensor**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Daniel Zahner  
Tierarzt aus Gießen

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Petzinger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 2003

**Inhaltsverzeichnis:**

<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><u>Literaturübersicht</u></b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b><u>Gallensäuren</u></b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b><u>Der enterohepatische Kreislauf</u></b>	<b>6</b>
<b>2.3</b>	<b><u>Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter [Sodium/Bile Acid Transporter (SBAT)]</u></b>	<b>6</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Organverteilung, zelluläre Lokalisation und Genkartierung der basolateralen (Ntcp) und apikalen (Asbt) Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter</b>	<b>8</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Substrate und Hemmstoffe der Ntcps und Asbts und die zwischen den Transporter-Gruppen vorhandenen Unterschiede</b>	<b>11</b>
<b>2.3.2.1</b>	Gallensäuren als Substrate der Ntcps und Asbts sowie deren Hemmwirkung auf den Taurocholat-Transport	11
<b>2.3.2.1.1</b>	Der Einfluss der Konjugation der Gallensäuren auf den Transport durch Ntcps und Asbts	14
<b>2.3.2.1.2</b>	Der Einfluss der Hydroxylierung der Gallensäuren auf den Transport durch Ntcps und Asbts	15
<b>2.3.2.2</b>	Andere Substrate und Hemmstoffe der Ntcps und Asbts und ihre transporterspezifische Unterschiede	17
<b>2.3.2.3</b>	Einfluss von Natrium auf den Gallensäuretransport	18
<b>2.3.3</b>	<b>Struktur der SBATs, insbesondere des Ratten-Ntcp</b>	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b><u>Regulierung der Gallensäuren-Aufnahme</u></b>	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b><u>Fragestellungen</u></b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b><u>Material</u></b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b><u>Biologische Materialien und Versuchstiere</u></b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b><u>DNA</u></b>	<b>23</b>
<b>3.3</b>	<b><u>Enzyme, DNA-Marker und Puffer</u></b>	<b>23</b>
<b>3.4</b>	<b><u>Kommerzielle Kits und Säulen</u></b>	<b>24</b>

---

3.5	<b><u>Reagenzien</u></b>	24
3.6	<b><u>Geräte</u></b>	26
4	<b><u>Methoden</u></b>	27
4.1	<b><u>Alignment zur Identifizierung konservierter Aminosäuren</u></b>	27
4.2	<b><u>Site-directed Mutagenese</u></b>	27
4.2.1	<b>Austausch der negativ geladenen Aminosäuren</b>	27
4.2.1.1	Primer-Design	30
4.2.1.2	Ansatz der Mutagenese-PCR	30
4.2.2	<b>Insertion der FLAG<sup>®</sup>-Sequenz</b>	31
4.2.3	<b>Transformation der Bakterienzellen</b>	32
4.2.4	<b>Vereinzeln der Kolonien und Ansetzen der Vermehrungskulturen</b>	33
4.2.5	<b>Herstellung lagerfähiger Gefrierpräparate (Steps) der isolierten Klone aus den Vermehrungskulturen</b>	34
4.3	<b><u>DNA-Präparation und Plasmidanalyse</u></b>	35
4.3.1	<b>Mikroquick Plasmid-Präparation aus 5 ml Bakterienkultur in LB-Amp-Medium</b>	35
4.3.2	<b>Verdau der gewonnenen Plasmid-DNA zur Kontrolle der Schnittmuster</b>	36
4.3.3	<b>Analyse des Restriktionsverdaus in der Elektrophorese</b>	37
4.3.4	<b>Plasmid Midi-Präparation aus einer 50 ml Bakterienkultur</b>	38
4.3.4.1	Herstellung einer 50 ml Bakterienkultur	39
4.3.4.2	Plasmid Midi-Präparation mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit	40
4.3.5	<b>Bestimmung der DNA-Konzentration</b>	41
4.4	<b><u>Sequenzierung der Mutanten</u></b>	41
4.4.1	<b>Die Polymerase-Reaktion</b>	42
4.4.2	<b>Polyacrylamidgelelektrophorese</b>	43
4.4.3	<b>Analyse der Sequenzen</b>	44

---

4.5	<b><u>[<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmemessung im <i>X. laevis</i>-Oozyten-Expressionsmodell</u></b>	44
4.5.1	<b><i>in vitro</i>-Transkription</b>	45
4.5.1.1	Linearisierung der Plasmide	45
4.5.1.2	<i>in vitro</i> -Transkriptionsreaktion	46
4.5.2	<b>Präparation der <i>X. laevis</i>-Oozyten</b>	47
4.5.3	<b>Mikroinjektion der <i>X. laevis</i>-Oozyten</b>	49
4.5.4	<b>Inkubation der Oozyten</b>	50
4.5.5	<b>Messung der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in Oozyten</b>	50
4.5.5.1	[ <sup>3</sup> H]Taurocholataufnahme von Oozyten in Na <sup>+</sup> -haltigem und Na <sup>+</sup> -freiem Medium	50
4.5.5.2	Überprüfung der [ <sup>3</sup> H]Taurocholataufnahme in Oozyten in Abhängigkeit von der injizierten cRNA-Menge	53
4.5.5.3	Messung der [ <sup>3</sup> H]Taurocholataufnahme in Oozyten bei verschiedenen Na <sup>+</sup> -Konzentrationen	53
4.6	<b><u>Statistische Auswertung</u></b>	54
4.7	<b><u>Immunhistologie</u></b>	55
4.7.1	<b>Injektion, Präparation und Fixation der Oozyten</b>	56
4.7.2	<b>Antikörperreaktionen</b>	56
4.7.2.1	Primäre Antikörperreaktion	57
4.7.2.2	Sekundäre Antikörperreaktion	57
4.7.3	<b>Einbettung in Technovit 7100 und Schneiden der Präparate</b>	57
5	<b><u>Ergebnisse</u></b>	60
5.1	<b><u>Alignment von neun SBAT-Aminosäuresequenzen zur Identifizierung konservierter negativ geladener Aminosäuren</u></b>	60
5.2	<b><u>Site-directed Mutagenese</u></b>	63
5.3	<b><u><i>in vitro</i>-Transkription</u></b>	65

---

5.4	<b><u>[<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme von <i>X. laevis</i>-Oozyten, nach Injektion mit cRNA des p-wildtyp-ntcp und der generierten Mutanten</u></b>	67
5.5	<b><u>Abhängigkeit der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in <i>X. laevis</i>-Oozyten, injiziert mit cRNA von p-wildtyp-ntcp und den Mutanten d24n10A2, d115n2.1 und e257q6.1 von der eingesetzten cRNA-Menge</u></b>	69
5.6	<b><u>[<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in Oozyten, injiziert mit cRNA von p-wildtyp-ntcp und den Mutanten d24n10A2, d115n2.1 und e257q6.1 bei verschiedenen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen</u></b>	74
5.7	<b><u>Lokalisation der Expressionsprodukte nach Injektion der cRNA für das Wildtyp-Ntcp und die Mutanten D24N, D115N und E257Q in <i>X. laevis</i>-Oozyten</u></b>	79
6	<b><u>Diskussion</u></b>	86
7	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	96
8	<b><u>Summary</u></b>	97
9	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	98
10	<b><u>Veröffentlichungen</u></b>	109

**Abkürzungen:**

[Ca] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calcium-Konzentration
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Amp	Ampicillin
Asbt	apical sodium/bile acid transporter
b	Basen
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	coding DNA
cRNA	copy RNA
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dITP	Desoxyinositriphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )
h	Stunde
Ibat	Ileal bile acid transporter
IC <sub>50</sub>	Hemmstoffkonzentration, welche die Aufnahme bei einer bestimmten Substratkonzentration zu 50% hemmt.
Isbt	ileal sodium/bile acid transporter
K <sub>i</sub>	Hemmkonstante
K <sub>m</sub>	Affinitätskonstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Meter
M	Mol pro Liter
min	Minute
mol	Mol

---

mRNA	messenger RNA
NPS	Normales Pferdeserum
Ntcp	Na <sup>+</sup> /Taurocholat-cotransportierendes Polypeptid
NZY	NZ-amine/yeast extract
PBS	phosphate buffered saline
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SBAT	sodium/bile acid transporter
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
U	Units

**Faktoren:**

k	kilo	10 <sup>3</sup>
c	centi	10 <sup>-2</sup>
m	milli	10 <sup>-3</sup>
μ	mikro	10 <sup>-6</sup>
n	nano	10 <sup>-9</sup>
p	pico	10 <sup>-12</sup>
f	femto	10 <sup>-15</sup>

# 1 Einleitung

Gallensäuren zirkulieren im Säugerorganismus im enterohepatischen Kreislauf. Dieser ermöglicht es, große Mengen an Gallensäuren, die täglich zur Verdauung der Lipide benötigt werden (beim Menschen handelt es sich um etwa 30 g täglich), aus dem Darmlumen wiederzugewinnen. Verluste von Gallensäuren müssten durch deren erneute Synthese aus Cholesterin ausgeglichen werden. Da die Synthese von Cholesterin energieaufwendig ist, würde dies zu unnötigen Energieverlusten führen. An ihrem enterohepatischen Kreislauf sind maßgeblich zwei Zellpopulationen beteiligt. Zum einen sind es die Enterozyten des Ileums, die Gallensäuren über ihre apikale Membran aus dem Darmlumen resorbieren, um sie an der basolateralen Membran dem Portalblut zu übergeben. Zum anderen die Hepatozyten, die die Gallensäuren an ihrer basolateralen Membran aus dem Portalblut wieder entnehmen, um sie kanalikulär in die Gallenkanälchen zu sezernieren. Für einige Spezies sind Proteine, die diese Aufnahme in die Zellen zum maßgeblichen Anteil katalysieren, bestimmt, kloniert und charakterisiert worden. Bei den Proteinen, welche die Gallensäureaufnahme vermitteln, handelt es sich um  $\text{Na}^+$ /Gallensäuren-Cotransporter, die einen streng  $\text{Na}^+$ -abhängigen Gallensäuretransport vermitteln. Der erste dieser  $\text{Na}^+$ /Gallensäuren-Cotransporter, der kloniert und charakterisiert wurde, war der  $\text{Na}^+$ /Gallensäuren-Cotransporter aus der Leber der Ratte (*Rattus norvegicus*), der als Ntcp bezeichnet wird (Hagenbuch et al. 1990, 1991). Der von Hagenbuch et al. 1991 erstellte cDNA-Klon p-wildtyp-ntcp stand mir für die folgenden eigenen Untersuchungen zur Verfügung.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von negativ geladenen Aminosäuren im Ntcp für die Funktionalität des Proteins, insbesondere in Bezug auf die Bindung der Natriumionen, zu untersuchen. Die negativen Ladungen der Seitenketten der Aminosäuren Aspartat und Glutamat spielen bei verschiedenen zellulären Vorgängen, bei denen Kationen Membranen permeieren, eine wesentliche Rolle. Sie wurden als  $\text{K}^+$ -Bindungsstelle im spannungsabhängigen  $\text{K}^+$ -Kanal  $\text{K}_v2.1$  aus dem Hirn der Ratte (Kirsch et al. 1995) nachgewiesen und spielen eine Rolle bei der Interaktion von Natriumpumpe und Natrium-Protonen-Austauscher mit Kationen (Johnson et al. 1995, Murtazina et al. 2001). Ihre funktionell wichtige Rolle für Natrium-Symporte wurde sowohl in prokaryontischen Systemen, nämlich an der  $\text{Na}^+$ /Prolin-Permease von *E. coli* (Quick und Jung 1997), als auch am eukaryontischen humanen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Dopamin-Transporter (Chen et al. 2001) gezeigt.

Verschiedene, natürlich vorkommende Mutationen, die den Gallensäuretransport über das Protein reduzieren, sind von einem Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter bekannt (Wong et al. 1995, Oelkers et al. 1997). Um die funktionelle Bedeutung der negativ geladenen Aminosäuren zu überprüfen, sollten diese mit Hilfe der Site-directed Mutagenese verändert werden. Die Zielstruktur der Mutationen war die  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Carboxylgruppe der Aspartate und Glutamate. Diese Gruppen besitzen pK-Werte von 3,90 (Aspartat) und 4,07 (Glutamat) (Dawson et al. 1986). Folglich liegen sie sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch unter den Versuchsbedingungen dissoziiert als COO<sup>-</sup> vor und stellen damit eine zusätzliche negative Ladung dieser Aminosäuren dar. Die Amide dieser Gruppen in den Aminosäuren Asparagin und Glutamin sind ladungsneutral. Gleichzeitig sind Asparagin und Glutamin bezüglich ihrer sterischen Ausdehnung den geladenen Aminosäuren Aspartat und Glutamat sehr ähnlich und auch der Hydropathie-Index der Aminosäuren ist mit -3,5 gleich (Kyte und Doolittle 1982). Neben dem deutlichen Unterschied in der Ladung ihrer Seitenketten unterscheiden sich sowohl Aspartat und Asparagin als auch Glutamat und Glutamin nur noch darin, dass die Amide sowohl als Wasserstoffdonatoren als auch -akzeptoren an einer Wasserstoffbrückenbindung teilnehmen können, während die Carboxylgruppen nur als Wasserstoffakzeptoren fungieren. Aufgrund der Ähnlichkeiten der Moleküle von Aspartat und Asparagin einerseits und Glutamat und Glutamin andererseits bei gleichzeitigem Fehlen der negativen Ladung bei Asparagin und Glutamin wurden Aspartat und Glutamat zu ihren Amidern mutiert. Dies hatte zusätzlich den Vorteil, dass hierfür nur ein Basenaustausch nötig war um das Kodon gac und gat (Aspartat) zu aac und aat (Asparagin), bzw. gaa (Glutamat) zu caa (Glutamin) zu mutieren.

Mit der heterologen Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten sollte festgestellt werden, ob der Gallensäuretransport durch die Mutationen beeinflusst wird. Die *X. laevis*-Oozyten wurden operativ aus den Krallenfröschen gewonnen und durch Kollagenaseverdau vereinzelt. Die durch die Site-directed Mutagenese gewonnen Klone und der Ausgangsklon wurden *in vitro*-transkribiert und die gewonnene cRNA in die Oozyten injiziert. Diese wurden dann daraufhin untersucht, ob die mit mutierter cRNA injizierten Oozyten in gleichem Maße wie die mit Wildtyp-Ntcp-RNA injizierten die Gallensäure Taurocholat aus dem sie umgebenden Medium aufnehmen können.

Der Nachweis der Expression der Proteine und deren Insertion in der Membran der Oozyten wurde anhand von Flag<sup>®</sup>-markierten Mutanten mit einer Immunfluoreszenztechnik geführt.

## **2**            **Literaturübersicht**

Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter transportieren nachgewiesenermaßen auch Substanzen, die nicht den Gallensäuren zuzuordnen sind (Craddock et al. 1998); trotzdem sind Gallensäuren die vermutlich wichtigsten physiologischen Substrate der Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter. Dies ist an dem Krankheitsbild der primären Gallensäurenmalabsorption erkennbar. Es handelt sich dabei um eine Erkrankung, die sich in kongenitaler Diarrhoe, Steatorrhoe und verringerten Plasmacholesterin-Werten äußert. Sie wird durch Mutationen im Gen *SLC10A2* verursacht. *SLC10A2* kodiert beim Menschen für den ilealen Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter. Mutationen in diesem Gen verhindern die Expression eines funktionstüchtigen Transportproteins, wodurch der enterohepatische Kreislauf unterbrochen wird. Dies führt zu Verlust der Gallensäuren über die Fäzes. Um den Verlust auszugleichen, werden Gallensäuren aus Cholesterin synthetisiert, was den erniedrigten Plasmacholesterinspiegel verursacht. Der Cholesterinmangel limitiert die Gallensäurensynthese, so dass es zu einem Mangel an Gallensäuren kommt. Durch die dadurch bedingten Störungen in der Fettverdauung entwickeln sich die klinischen Symptome der Steatorrhoe (Oelkers et al. 1997).

Weil Gallensäuren eine sehr heterogene Substanzgruppe darstellen, deren unterschiedliche Struktur von Einfluss auf den Transport durch die Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter ist, sollen sie im folgenden kurz dargestellt werden.

### **2.1**            **Gallensäuren**

Gallensäuren stellen eine Gruppe von amphipathischen Steroidverbindungen dar, die in der Leber synthetisiert werden. Sie sind mit rund 12 g/l oder 20-30 mM Hauptbestandteil der gelösten Substanzen in der Galle (Meier 1991). Gallensäuren besitzen definitionsgemäß mindestens das Steroidgerüst und eine Carboxylgruppe an der Seitenkette. Streng genommen ist der Begriff Gallen„säure“ für viele der unter diesem Begriff geführten Substanzen, wie Taurocholat oder Glycocholat, nicht korrekt, da sie im physiologischen pH-Bereich dissoziiert vorliegen und man eigentlich von Gallensalzen sprechen müsste. Der korrekte Terminus für die beiden genannten Verbindungen würde Cholytaurin bzw. Cholyglycin lauten (Meier 1991).

Tabelle 1: Systematik der Gallensäuren (nach Meier1991 und Kramer et al. 1999)

Gallensäure	Hydroxylierung	Amidierung
<i>Primäre:</i>		
Cholat	3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$	keine
Glycocholol	3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$	Glycin
Taurocholol	3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$	Taurin
Chenodeoxycholol	3 $\alpha$ , 7 $\alpha$	keine
Glychenodeoxycholol	3 $\alpha$ , 7 $\alpha$	Glycin
Taurochenodeoxycholol	3 $\alpha$ , 7 $\alpha$	Taurin
Hyodeoxycholol	3 $\alpha$ , 6 $\alpha$ ,	keine
Glychohyodeoxycholol	3 $\alpha$ , 6 $\alpha$ ,	Glycin
Taurohyodeoxycholol	3 $\alpha$ , 6 $\alpha$ ,	Taurin
$\alpha$ -Muricholol	3 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$	keine
$\beta$ -Muricholol	3 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\beta$	keine
<i>Sekundäre:</i>		
Deoxycholol	3 $\alpha$ , 12 $\alpha$	keine
Glycodeoxycholol	3 $\alpha$ , 12 $\alpha$	Glycin
Taurodeoxycholol	3 $\alpha$ , 12 $\alpha$	Taurin
Lithocholol	3 $\alpha$	keine
Glycolithocholol	3 $\alpha$	Glycin
Taurolithocholol	3 $\alpha$	Taurin
7-Ketolithocholol	3 $\alpha$ , 7-Keto	keine
Glyco-7-Ketolithocholol	3 $\alpha$ , 7-Keto	Glycin
Tauro-7-Ketolithocholol	3 $\alpha$ , 7-Keto	Taurin
<i>Tertiäre:</i>		
Sulfolithocholol	3 $\alpha$ -OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	keine
Ursocholol	3 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 12 $\alpha$	keine
Glycoursocholol	3 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 12 $\alpha$	Glycin
Taurourscholol	3 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 12 $\alpha$	Taurin
Ursodeoxycholol	3 $\alpha$ , 7 $\beta$	keine
Glycoursodeoxycholol	3 $\alpha$ , 7 $\beta$	Glycin
Tauroursodeoxycholol	3 $\alpha$ , 7 $\beta$	Taurin

Gallensäuren sind, wie oben angeführt, Abkömmlinge des Cholesterins, das ihre Grundstruktur bildet. Der erste Schritt der Synthese in Leberzellen besteht in einer Hydroxylierung des Cholesterins an der Position 7 $\alpha$ . Durch die Verkürzung der Seitenkette bis zum C24 und Einführung einer Carboxylgruppe entsteht Chenodeoxycholol. Durch eine zweite, fakultative Hydroxylierung an der Position 12 $\alpha$  entsteht Cholol. Aus Cholol und Chenodeoxycholol können nach Aktivierung zum Coenzym-A-Ester durch Konjugation mit Taurin oder Glycin Taurocholol bzw. Taurochenodeoxycholol sowie Glycocholol bzw. Glychenodeoxycholol gebildet werden (Löffler 1997). 99% der natürlich vorkommenden

Gallensäuren werden als Glycin- oder Taurinkonjugat in die Galle ausgeschieden (Matoba et al. 1986).

Cholat, Chenodeoxycholol und ihre Glycin- bzw. Taurinkonjugate werden als primäre Gallensäuren bezeichnet. Sie tragen alle mindestens die 3 $\alpha$ - und 7 $\alpha$ -ständigen Hydroxylgruppen, Cholat und seine Derivate zusätzlich die 12 $\alpha$ -ständige Hydroxylgruppe. Speziesspezifisch treten auch andere primäre Gallensäuren auf, beispielsweise das Hyocholat und seine Konjugate beim Schwein, das anstatt an Position 7 $\alpha$ - an der Position 6  $\alpha$ -hydroxyliert ist, oder die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Muricholsäuren bei Maus und Ratte, die an der Position 6  $\beta$ -hydroxyliert und an der Position 7  $\alpha$ - oder  $\beta$ -hydroxyliert sind.

Im Dünndarm können aus den primären Gallensäuren durch bakterielle enzymatische Modifikation die sekundären Gallensäuren entstehen. Drei Reaktionen sind typisch für die Entstehung sekundärer Gallensäuren: Die Dekonjugation, die Dehydroxylierung an Position 7 und die Oxidation der 7 $\alpha$ -Hydroxylgruppe zur Ketogruppe. Die sekundären Gallensäuren werden teilweise reabsorbiert. Die hepatischen oder intestinalen Metaboliten der sekundären Gallensäuren werden als tertiäre Gallensäuren bezeichnet. Diese sind Ursocholol und Ursodeoxycholol sowie sulfatierte Gallensäuren, die durch die Reduktion der 7-Ketogruppen entstehen (Doisy 1985). Eine Übersicht über die Gallensäuren gibt Tabelle 1.

Die besondere Struktur der Gallensäuren, ausgenommen die Ursochol- und Ursodeoxycholsäuren und deren Konjugate, besteht in den  $\alpha$ -ständigen Carboxyl- und  $\beta$ -ständigen Methylgruppen sowie dem Wasserstoff-Atom in Position 5 $\beta$ , die eine cis-Konfiguration der A-B-Ringverbindung verursachen. Dadurch erhält das quasilplanare Molekül eine hydrophile  $\alpha$ -Oberfläche und eine hydrophobe  $\beta$ -Oberfläche. Diese Struktur macht die Gallensäuren zu guten Detergenzien (Meier 1991).

Die mit der Nahrung aufgenommenen sowie die durch desquamierte Enterozyten und abgestorbene Bakterien in das Darmlumen gelangten Lipide sind wasserunlöslich. Auch die nach der Einwirkung der Lipasen aus dem Magen und dem Pankreas entstandenen freien Fettsäuren sind hydrophob und schlecht resorbierbar, weil die Oberfläche des jejunalen Epithels von einer 40 $\mu$ m starken unbewegten Wasserschicht bedeckt ist, die für hydrophobe Substanzen durch Diffusion schwer zu überwinden ist. Durch ihre detergenten Eigenschaft sind die Gallensäuren in der Lage, mit Phospholipiden, Fettsäuren und Monoglyzeriden die sogenannten Micellen zu bilden und so die hydrophoben Nahrungsbestandteile und Verdauungsprodukte (u. a. auch die fettlöslichen Vitamine) an die Zellmembran der Enterozyten zu bringen, von wo sie über Diffusion in die Zelle gelangen (Kubow und Jones 1999).

## 2.2 Der enterohepatische Kreislauf

Die Gallensäuren unterliegen einer sehr effizienten enterohepatischen Zirkulation (Hofmann 1976), bei der über 95% der in das Intestinum sezernierten Gallensäuren rückresorbiert und über den Portalkreislauf der Leber wieder zugeführt werden (Galatola et al. 1991). Die Rückresorption findet in erster Linie im terminalen Ileum statt, was beim syrischen Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) (Stelzner et al. 2000), beim Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) (Kramer et al. 1993) und beim Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) (Schwenk et al. 1982) gezeigt wurde. Aber auch schon in den Gallengängen (Lazaridis et al. 1997) und im Jejunum (Amelsberg 1996, 1999) kommt es zu einer Resorption der Gallensäuren. In der Leber werden die Gallensäuren mit einem „first pass-Effekt“ von 85% aus dem Portalblut resorbiert (Gilmore und Thompson 1978) und an ihrer kanalikulären Membran über ATP-abhängige Transportsysteme in die Gallenkanälchen sezerniert (Müller et al. 1991). Eines der an der Sekretion beteiligten Proteine ist die Bile-Salt-Export-Pump (Gerloff et al. 1998). Die Gallensäurekonzentration im portalen Blut nüchtern menschlicher Probanden beträgt 0,5  $\mu\text{M}$ . Die Konzentrationen der Gallensäuren in systemischem Serum, portalem Serum und Galle stehen im Verhältnis 1:3:2600 zueinander. Diese Verhältnisse bleiben auch dann erhalten, wenn sich die Serum-Gallensäurekonzentrationen postprandial erhöhen (Lindblad et al. 1977). Die Fähigkeit der Hepatozyten, einen so starken Konzentrationsgradienten zu bilden, stellt die treibende Kraft im enterohepatischen Kreislauf dar.

## 2.3 Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter [Sodium/Bile Acid Transporter (SBAT)]

Die Aufnahme der Gallensäuren in die Enterozyten und in die Hepatozyten erfolgt in erster Linie Na<sup>+</sup>-abhängig (Reichen und Paumgartner 1976, Beesley and Faust 1979, Petzinger und Frimmer 1984) durch Proteine, die unter der Bezeichnung sodium/bile acid transporter (SBATs) zusammengefasst werden (Hallén et al. 2000). Es wurde auch über eine Na<sup>+</sup>-unabhängige Gallensäureaufnahme in beide Zelltypen berichtet, sie stellt aber nur einen geringeren Anteil der Gesamtaufnahme dar (Anwer und Hegner 1978, Petzinger und Frimmer 1984, Amelsberg et al. 1999).

Die Gruppe der SBATs lässt sich in zwei Untergruppen einteilen, zum einen in die apikalen, zum anderen in die basolateralen Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter. Diese unterscheiden sich



Bei dem Ntcp2 der Maus handelt es sich um eine, um 45 Aminosäuren verkürzte Splicing-Variante des Ntcp1 (Cattori et al. 1999). Die Ntcps stellen die basolateralen Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter der Leberzelle dar.

Der erste intestinale Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter wurde 1994 aus dem Ileum eines Tieres kloniert, das von den Autoren als „Golden Syrian Hamster“ bezeichnet wurde (Wong et al. 1994). Drei entsprechende Protein-Datenbankeinträge beim National Center of Biotechnology Information, die sich auf diese Quelle beziehen, interpretieren den Quellorganismus widersprüchlich als *Mesocricetus auratus* oder *Cricetulus griseus*. Diese Unklarheit über die phylogenetische Herkunft der Sequenz schränkt ihre Verwertbarkeit leider ein. Die Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter aus dem Ileum werden uneinheitlich als ileal sodium-dependent bile acid transporter (Isbt) (Shneider et al. 1995, Wong et al. 1995, Stengelin et al. 1997, Saeki et al. 1999), apical sodium-dependent bile acid transporter (Asbt) (Hallén et al. 2000) oder ileal sodium/bile acid cotransporter (IBAT) (Wong et al. 1994) bezeichnet. Im Folgenden sollen sie mit der Bezeichnung apical sodium/bile acid transporter (Asbt) geführt werden, da sie die Untergruppe der apikalen Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter repräsentieren und die Zuordnung der Asbts zum Ileum keineswegs spezifisch ist (Craddock et al. 1998). Der Klonierung des Asbt des „syrischen Goldhamsters“ folgten die der Ratte (Isbt) (Shneider et al. 1995), des Menschen (ISBT) (Wong et al. 1995), der Maus (Isbt) (Saeki et al. 1999) und des Kaninchens (Ibat) (Stengelin et al. 1998). Die aktuellen Datenbankeinträge zu Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransportern und die Aminosäureidentität zwischen ihnen sind in Tabelle 2 dargestellt.

### **2.3.1 Organverteilung, zelluläre Lokalisation und Genkartierung der basolateralen (Ntcp) und apikalen (Asbt) Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter**

Die Ntcps werden ausschließlich in Hepatozyten exprimiert (Boyer et al. 1993). Die Verteilung innerhalb des Acinus ist homogen (Stieger et al. 1994, Ananthanarayanan et al. 1994). Das kodierende Gen der Ratte wurde mit *Slc10a1* bezeichnet und auf dem Chromosom 6q24 kartiert (Cohn et al. 1995), das Ortholog des Menschen (*SLC10A1*) auf Chromosom 14 (Hagenbuch und Meier 1994) und das der Maus auf Chromosom 12 (Green et al. 1998).

Asbt-mRNA und Na<sup>+</sup>-abhängige Gallensäureaufnahme finden sich demgegenüber im distalen Ileum (Stelzner et al. 2000, Kramer et al. 1992), in den Cholangiozyten (Lazaridis et

al. 1997) und der Niere (Craddock et al. 1998). Die funktionelle Notwendigkeit der Asbts im Ileum und in der Niere ist leicht herzuleiten.

- Im Ileum ist der Asbt zur Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs notwendig. Ein Verlust der Funktionalität oder der Expression des Proteins durch Mutationen führt zu primärer Gallensäuremalabsorption (Wong et al. 1995, Oelkers et al. 1997).
- Gallensäuren können den glomerulären Filtrationsapparat passieren. Der Organismus würde unnötig energieaufwendige Syntheseprodukte verlieren, wenn die Gallensäuren den Körper über den Urin verlassen würden. Die Niere ist in der Lage, die Gallensäuren aus dem Primärharn zu resorbieren (Chitranukroh et al. 1985). Dies erfolgt durch den apikal im Tubulusepithel lokalisierten Asbt.

Unabhängig vom Expressionsort handelt es sich bei den Proteinen im Ileum und in der Niere um das gleiche Genprodukt (Craddock et al. 1998). Das menschliche Gen wurde mit *SLC10A2* bezeichnet und findet sich auf Chromosom 13q33 (Wong et al. 1996). Auch Cholangiozyten in der Leber nehmen Taurocholat über ihre apikale Membran auf (Alpini 1996, 1997, 2001). Asbt-mRNA war in diesen Zellen nachweisbar und das Protein ließ sich durch anti-Asbt Antikörper auf der apikalen Membran nachweisen (Alpini et al. 1997, Lazaridis et al. 1997). Ob es sich um das gleiche Genprodukt wie in Ileum und Niere handelt, ist nicht geklärt. Cholangiozyten lassen sich in zwei Fraktionen einteilen, nämlich in große und kleine Cholangiozyten (Alpini et al. 1996). An der basolateralen Membran der sogenannten großen Cholangiozyten wurde eine Splicing-Variante des Asbt (tAsbt) nachgewiesen. Bei heterologer Expression in *X. laevis*-Oozyten vermittelt dieses Protein angeblich einen Efflux von Taurocholat aus den Zellen (Lazaridis et al. 2000).

Die Funktion der Gallensäureaufnahme in Cholangiozyten ist nicht geklärt. Lazaridis et al. (1997) nahmen an, dass sie Teil der Regulation der Gallebildung ist. Da Cholangiozyten auf die dauerhafte orale Aufnahme von Gallensäuren (1% der Diät) mit Proliferation und vermehrter Expression des Asbts reagieren (Alpini et al. 2001), ließe sich aber auch vermuten, dass Gallensäuren an der Genregulation beteiligt sind. Eine Beteiligung von Gallensäuren an der Genregulation wurde für den Promotor des Ileal Bile Acid-binding Protein Gens nachgewiesen, der ein durch Gallensäuren ansprechbares Element enthält. Die volle Aktivität des Promotors ist abhängig von der Anwesenheit des Farnesoid-X-Rezeptors, der mit dem Retinoic acid-X-Receptor interagiert. Beide beeinflussen auch die Expression der Bile Salt Export Pump (Grober et al. 1999, Ananthanarayanan et al. 2001, Kullak-Ublick et al. 1997). Die basale Expression des humanen ASBT ist abhängig vom HNF1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear

factor 1  $\alpha$ ) (Shih et al. 2001) und der Promotor des Gens wird durch Liganden des PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ ) aktiviert (Jung et al. 2002).

Ntcps werden auf der basolateralen Membran der Hepatozyten exprimiert (Stieger et al. 1994, Ananthanarayanan et al. 1994). Asbts wurden, mit Ausnahme des t-Asbt, dagegen nur auf der apikalen Membran von Zellen nachgewiesen (Alpini et al. 1997, Christi et al. 1996, Shneider et al. 1995).

Diese Lokalisation findet man auch *in vitro* in polarisierten Zellkulturlinien. Madin-Darby canine kidney (MDCK) Zellen, transfiziert mit Ratten-Ntcp-DNA, exprimieren das Ntcp zu 90% auf ihrer basolateralen Membran. Werden sie mit Asbt-DNA transfiziert, so findet sich das Protein zu einem noch höheren Prozentsatz (>95%) auf der apikalen Membran.

Die Signaturen für das korrekte Membran-Sorting befinden sich in den C-Termini der Proteine. Beide Transporter verlieren ihre klare Zuordnung zu den Arealen, wenn sie um ihre intrazellulär lokalisierten C-Termini (siehe Abschnitt 2.3.3) verkürzt werden. Während das trunkierte Ntcp nur noch zu 75% basolateral lokalisiert ist, findet sich der trunkierte Asbt nur noch intrazellulär. Wird das trunkierte Ntcp um den C-Terminus des Asbt verlängert, findet sich die Ntcp-Asbt-Chimäre zu über 80% apikal. Der Umkehrversuch (trunkierter Asbt mit Ntcp-C-Terminus) verhält sich gleich dem trunkierten Asbt (Sun et al. 1998).

In der Aminosäuresequenz des C-Terminus des Ntcp befinden sich zwei Tyrosine (Y307 und Y321), die als wichtiges Sorting-Signal zur Insertion in die basolaterale Membran identifiziert wurden. Y321 stellte sich als essentielles Signal heraus, ohne dass das Protein in MDCK-Zellen über N-Glykosilierungen (Matter 2000) an die apikale Membran geleitet wird. Die Bedeutung von Y307 zeigt sich erst bei stimulierter Expression. Ohne Stimulation zeigen Mutanten, bei denen Y307 durch ein Alanin ersetzt wurde (Y307A), eine vorrangig basolaterale Verteilung. Erst nach Stimulation der Proteinexpression über Natriumbutyrat findet man das Protein gleichermaßen in der basolateralen und der apikalen Membran. Daraus wurde gefolgert, dass es sich bei Y307 um ein zusätzliches Signal handelt, das im Falle starker Expression das Protein an die basolaterale Membran leitet (Sun et al. 2001).

## **2.3.2 Substrate und Hemmstoffe der Ntcps und Asbts und die zwischen den Transporter-Gruppen gegebenen Unterschiede**

### **2.3.2.1 Gallensäuren als Substrate der Ntcps und Asbts sowie deren Hemmwirkung auf den Taurocholat-Transport**

Im enterohepatischen Kreislauf zirkulieren nur die amidierten Gallensäuren effizient (Cohen et al. 1986). Dieses am Ganztier beobachtete Phänomen findet zur heutigen Zeit eine Erklärung auf molekularer Ebene.

Das gebräuchlichste Substrat zur Untersuchung der Transporteigenschaften von Hepatozyten und heterolog exprimierten SBATs ist Taurocholat, obwohl es, wie im folgenden erklärt wird, nicht das optimale Substrat der Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter ist. Für diese Gallensäure finden sich in der Literatur die meisten K<sub>m</sub>-Werte für Hepatozyten und heterolog exprimierte SBATs. Tabelle 3 zeigt eine Zusammenstellung von in der Literatur erwähnten K<sub>m</sub>-Werten von Gallensäuren für verschiedene SBATs bei unterschiedlichen Präparationen von Zellen und Membranvesikeln und bei heterologer Expression. Die bei heterologer Expression des Asbt und Ntcp von Ratte und Mensch von mehreren Autoren unabhängig voneinander ermittelten K<sub>m</sub>-Werte sind für den jeweiligen SBAT annähernd gleich, unterscheiden sich gegenseitig aber deutlich. Daraus lässt sich ersehen, dass zwischen den SBATs Unterschiede in der Affinität zu Taurocholat bestehen. Bei der Maus wurden zwei unterschiedliche Splicing-Varianten gefunden, die sich in ihrem K<sub>m</sub>-Wert deutlich unterscheiden (Cattori et al. 1999). Zwei SBATs, der Ratten-Ntcp und der menschliche Asbt, wurden in heterologer Expression auch auf ihre Affinität zu anderen Gallensäuren untersucht (Craddock et al. 1998, Schroeder et al. 1998) (Tabelle 4). An drei weiteren SBATs, dem Ntcp des Kaninchens sowie dem Asbt des Kaninchens und des Menschen, wurde die Hemmung der Taurocholataufnahme durch andere Gallensäuren bestimmt (Craddock et al. 1998, Kramer et al. 1999). Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen lassen sich Rückschlüsse auf die von den Transportern bevorzugte Substratstruktur schließen. Diese sind in Abschnitt 2.3.2.1.1 und 2.3.2.1.2 näher dargestellt. Allgemein wurde für den Asbt des Kaninchens postuliert, dass an diesem Protein fünf chemische Merkmale die Substrat-Bindungsstelle charakterisieren. Dies sind je ein Wasserstoffbrückenbindungsdonor und -akzeptor sowie drei hydrophobe Regionen. Im Taurocholatmolekül interagieren nach dieser Veröffentlichung zwei hydrophobe Regionen mit dem Asbt. Die eine Region stellt der Ring D im Steroidkern dar, eine weitere die Methylgruppe 21 an der Seitenkette.

Tabelle 3: Übersicht über die  $K_m$ -Werte für Taurocholat von verschiedenen SBATs (ermittelt in präparierten Zellen oder Membranvesikeln oder bei heterologer Expression).

Transporter	Sequenzherkunft bzw. untersuchte Zellen	Präparation bzw. heterolog exprimiert in:	$K_m$ [ $\mu$ M]	
Asbt Mensch	Enterozyten, renale Tubuluszellen	COS-Zellen	13,3	Craddock et al. 1998
Asbt Mensch	Enterozyten	COS-Zellen	17	Wong et al. 1995
Asbt Ratte	Cholangiozyten	isoliert	46	Alpini et al. 1997
Asbt Ratte	Tubuluszellen und Enterozyten	Membranvesikel	40-70	Christie et al. 1996
Asbt Maus	Enterozyten	isoliert	27	Saeki et al. 1999
Asbt Maus	Enterozyten	COS-7-Zellen	34	Saeki et al. 1999
Asbt Hamster	Enterozyten	COS-Zellen	33	Wong et al. 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	isoliert	19	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	isoliert	15	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	isoliert	57	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	isoliert	21	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	isoliert	3,7	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	isoliert	18	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	isoliert	19,3	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	isoliert	25	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	isoliert	26	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	in Kultur	33	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	Membranvesikel	52	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	Membranvesikel	56	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	Membranvesikel	250	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	Membranvesikel	52	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	Membranvesikel	190	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	Membranvesikel	36,5	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	Membranvesikel	32,4	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	Membranvesikel	33,8	nach Petzinger 1994
Ntcp Ratte	Hepatozyten	<i>X. laevis</i> -Oozyten	30	Hagenbuch et al. 1991
Ntcp Ratte	Hepatozyten	CHO-Zellen	34	Schroeder et al. 1998
NTCP Mensch	Hepatozyten	<i>X. laevis</i> -Oozyten	6	Hagenbuch et al. 1994
NTCP Mensch	Hepatozyten	COS-Zellen	10	Craddock et al. 1998
Ntcp1 Maus	Hepatozyten	<i>X. laevis</i> -Oozyten	86	Cattori et al. 1999
Ntcp2 Maus	Hepatozyten	<i>X. laevis</i> -Oozyten	14	Cattori et al. 1999

Tabelle 4:  $K_m$ -Werte verschiedener Substrate des menschlichen Asbt und des Ratten-Ntcp, exprimiert in African Green Monkey Kidney (COS)-Zellen, Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen und isolierten Rattenhepatozyten.

	Asbt	Ntcp
	(Craddock et al. 1998)	(Schroeder et al. 1998)
	$K_m$ [ $\mu$ M] bei Expression in COS-Zellen	$K_m$ [ $\mu$ M] an isolierten Rattenhepatozyten
Cholat	33,3	61
		58
		67
		57,1
		28
Glycocholol		13
		27
		14,7
		13
Chenodeoxycholol		18
		33
Taurochenodeoxycholol	5	32,89
		11,1
Glycochenodeoxycholol	5,7	6
Tauroursodeoxycholol		14
Glycoursodeoxycholol	4,1	
Deoxycholol		24,6
Glycodeoxycholol	2,0	
Estron 3-Sulfat	27	

Als Wasserstoffbrückenbindungsdonor agieren die  $\alpha$ -ständigen Hydroxygruppen an Position 7 oder 12 und als ein Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor die negativ geladene Carboxylgruppe (Baringhaus et al. 1999).

### 2.3.2.1.1 Der Einfluss der Konjugation der Gallensäuren auf den Transport durch Ntcp und Asbts

Die Gallensäuren treten unkonjugiert oder als Glycin- oder Taurinkonjugate auf. Bei dem menschlichen Asbt führt die Konjugation von Cholat zum Taurinkonjugat Taurocholat zu einer Zunahme der Affinität zu dem Transporter ( $K_m$  Cholat: 33,3  $\mu\text{M}$ ;  $K_m$  Taurocholat: 13,3  $\mu\text{M}$ ) (Craddock et al. 1998). Beim Asbt des Kaninchens wurden von Kramer et al. 1999 die  $\text{IC}_{50}$ -Werte (bei 50  $\mu\text{M}$  Taurocholat) verschiedener freier und konjugierter Gallensäuren bestimmt (Tabelle 5). Die Untersuchungen ergaben, dass Cholat, Chenodeoxycholat, Hyodeoxycholat und 12-Oxocholat als Taurinkonjugate einen geringeren  $\text{IC}_{50}$ -Wert haben als die freien Gallensäuren. Jede dieser Gallensäuren trägt entweder an Position 6 oder 7 eine  $\alpha$ -ständige Hydroxylgruppe. Demgegenüber ist der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von Gallensäurenkonjugaten, die weder an Position 6 $\alpha$  noch an Position 7 $\alpha$  hydroxyliert sind (Taurourscholol und -ursodeoxycholat), unbeeinflusst bzw. höher als der der entsprechenden freien Gallensäure.

Tabelle 5: Hemmung der Taurochololtaufnahme ( $\text{IC}_{50}$ -Werte bei einem Angebot von 50  $\mu\text{M}$  Taurocholat) in ileale Bürstensaum-Membran Vesikel des Kaninchens durch verschiedene konjugierte und unkonjugierter Gallensäuren (nach Kramer et al. 1999).

	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] unkonjugiert	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] Taurin-Konjugat
Cholat	67	51
Chenodeoxycholat	31	21
Deoxycholat	19	20
Ursodeoxycholat	74	141
Hyodeoxycholat	122	71
Ursocholol	178	190
12-Oxocholat	231	196

Die Untersuchungen von Craddock et al. (1998) am humanen Asbt lieferten, bis auf Ursodeoxycholat, die gleichen Ergebnisse. Obwohl Deoxycholat, das an Position 7 dehydroxyliert ist, in dieser Untersuchung als Konjugat einen höheren  $\text{IC}_{50}$ -Wert aufweist, also den Ergebnissen von Kramer et al. (1999) entspricht, ist der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von Ursodeoxycholat (7 $\beta$ -hydroxyliert) als Taurinkonjugat geringer als der der unkonjugierten Gallensäure (Tabelle 6).

Vergleichende Untersuchungen über die Affinität freier Gallensäuren und ihrer Konjugate zu Ntcp sind mir nicht bekannt. Die Natur des Konjugats selbst, ob Taurin oder Glycin, hat nach Schroeder et al. (1998) keinen Einfluss auf die Affinität des Ratten-Ntcp.

Tabelle 6:  $K_i$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] für die Hemmung der Taurocholataufnahme in mit humanem Asbt transfizierte COS-Zellen durch Taurin-konjugierte und unkonjugierte Gallensäuren (Craddock et al. 1998).

	unkonjugiert	Taurin-Konjugat
Cholat	41,5	24,8
Chenodeoxycholot	3,3	6,1
Deoxycholot	6,3	17,2
Ursodeoxycholot	75,0	28,0

#### 2.3.2.1.2 Der Einfluss der Hydroxylierungen der Gallensäuren auf den Transport durch Ntcps und Asbts

Auffällig ist, dass bei den untersuchten Asbts sich für konjugierte Dihydroxygallensäuren ein geringerer  $K_m$ - und  $IC_{50}$ -Wert als für Taurocholot findet (Craddock et al. 1998, Schroeder et al. 1998, Kramer et al. 1999) (Tabellen 3 und 4). Die Affinität zu den Gallensäuren ist bei allen untersuchten apikalen Transportern am höchsten, wenn sich neben der  $3\alpha$ -Hydroxygruppe noch eine  $\alpha$ -ständige Hydroxylgruppe an Position 7 oder 12 befindet. Eine  $\alpha$ -Hydroxylierung an Position 6 hingegen verringert die Affinität des apikalen Transporters des Kaninchens zum Substrat.  $\beta$ -Hydroxylierungen an Position 7 reduzieren die Affinität zum apikalen Transporter ebenfalls (Kramer et al. 1999).

Vergleicht man die  $IC_{50}$ -Werte der Taurocholataufnahme-Hemmung der Gallensäuren von Kaninchen-Ntcp und dem Kaninchen-Asbt, so fällt auf, dass der Kaninchen-Ntcp  $6\alpha$ - und  $7\beta$ -Hydroxylierungen besser toleriert. Die  $IC_{50}$ -Werte (Tabelle 7) von Deoxy-, Ursodeoxy und Hyodeoxycholot sind annähernd gleich. Auch weitere, von Kramer et al. (1999) eingesetzte Gallensäuren, die verschiedene Kombinationen von  $6\alpha$ - und  $\beta$ - und  $7\alpha$ - und  $\beta$ -Hydroxylierungen tragen oder komplett dehydroxyliert sind, können die Taurocholataufnahme über den Asbt weniger gut hemmen als über den Ntcp.

Die Affinitäten der Asbt und des Ntcp entsprechen den Substraten in ihrer natürlichen Umgebung. Der apikale Transporter entzieht dem Darminhalt und dem Harn in erster Linie primäre Gallensäuren, um sie dem Organismus zu erhalten, während über den basolateralen Transporter in der Leber alle Metaboliten und Abfallprodukte der Gallensäuren ausgeschieden werden sollen (Kramer et al. 1999).

Tabelle 7: IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M] der Hemmung der Taurocholataufnahme (50  $\mu$ M Taurocholat) in CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen nach Expression apikaler (Asbt) und basolateraler (Ntcp) Gallensäuretransporter des Kaninchens durch verschiedene Gallensäuren (nach Kramer et al. 1999).

	Asbt	Ntcp
Cholat	25	36,5
Chenodeoxycholat	4,5	2
Deoxycholat	4,6	4,5
Ursodeoxycholat	17	3
Hyodeoxycholat	10,5	4,2
Ursocholat	77	51
12-Oxochoolat	150	107

Für die nicht natürlicherweise vorkommenden Gallensäuren 3 $\beta$ -Azido-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxycholanoyltaurin und 7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxycholanoyltaurin besitzen beide Transporter eine höhere Affinität als zu Taurochenodeoxycholat und -deoxycholat (Kramer et al. 1999). Daraus lässt sich schließen, dass die 3 $\alpha$ -Hydroxylgruppe der Gallensäuren zur Substraterkennung durch die SBATs nicht notwendig ist. Dies deckt sich mit den Postulaten von Baringhaus et al. 1999, in denen der 3 $\alpha$ -Hydroxylgruppe ebenfalls eine Beteiligung an der Substrat-Transporter Interaktion abgesprochen wurde. Die 3-Position am Steroidgerüst wird dadurch interessant für das Drug-Targeting. Dabei handelt es sich um gezielte organspezifische Medikamentenapplikation durch die Ausnutzung der Organverteilung bestimmter Transportproteine und die Kopplung der Medikamente an deren Substrate.

Oligonukleotide, die über die Position 3 an Gallensäuren gekoppelt sind, werden besser mit der Galle ausgeschieden als unkonjugierte Oligonukleotide. Die Aufnahme in isolierte Hepatozyten lässt sich aber nicht über Substrate der SBATs hemmen (Starke et al. 2001). Die Aufnahme anderer untersuchter 3'-Gallensäure-Konjugate in isolierte Hepatozyten ist nicht Na<sup>+</sup>-abhängig (Petzinger et al. 1999). Diese Ergebnisse machen es unwahrscheinlich, dass die Konjugate über Mitglieder der SBAT-Familie transportiert werden.

### 2.3.2.2 Andere Substrate und Hemmstoffe der Ntcps und Asbts und deren transporterspezifische Unterschiede

Die SBAT-vermittelte Aufnahme von nicht-Gallensäuren (siehe Definition in Abschnitt 2.1) in Zellen ist nur für Estron-3-Sulfat nachgewiesen (Craddock et al. 1998, Schroeder et al. 1998). Dieses sulfatierte Steroid wird von den Ntcps der Ratte und des Menschen mit unterschiedlicher Affinität transportiert. Der  $K_m$ -Wert für des Ratten-Ntcp beträgt 27  $\mu\text{M}$  (Schroeder et al. 1998), der des humanen wird mit 60  $\mu\text{M}$  angegeben (Craddock et al. 1998). Estron-3-Sulfat ist kein Substrat des humanen Asbt (Craddock et al. 1998).

Tabelle 8: Hemmstoffe des basolateralen (Ntcp) und apikalen (Asbt), in Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen exprimierten,  $\text{Na}^+$ -abhängigen Gallensäuren-Cotransporter des Kaninchens (10  $\mu\text{M}$  Taurocholat) (nach Kramer et al. 1999).

Substanz	Ntcp	Asbt
Bromsulphthalein	++	+
Indocyanin-Grün	++	++
DIDS	++	-
Bilirubin-Ditaurat	+	-
Iopanoat	+	+
Estron-3-Sulfat	+	-
17 $\beta$ -Estradiol-3-Sulfat	+	-
k-Strophanthin	+	+
Digitoxigenin	+	-
Corticosteron	+	+
6 $\alpha$ -Methylprednisolon	+	-
5 $\alpha$ -Pregnon	+	-
Dexamethason	+	-
Cortisol	+	-
Chlorpromazin	++	+
Novobiocin	+	-
Cefixim	+	-
Reserpin	+	-

(++:  $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$  bei 10  $\mu\text{M}$  Taurocholat; +:  $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$  bei 10  $\mu\text{M}$  Taurocholat; -: keine Hemmung bis 1 mM)

In Bezug auf Hemmstoffe zeigt sich bei einer vergleichenden Betrachtung von Asbt und Ntcp des Kaninchens, dass das Spektrum an wirksamen Substanzen für den Ntcp sehr viel weiter ist als für den Asbt. Beide Transporter lassen sich durch Bromsulphthalein und Indocyanin-Grün hemmen. Für das Ntcp existiert mit DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilben-Disulfonat) ein

potenter Hemmstoff, der am Asbt keine Wirkung zeigt. Das Ntcp lässt sich auch mit einer Vielzahl von Steroiden und weiteren Substanzen hemmen, von denen nur wenige auch am Asbt wirksam sind (siehe Tabelle 8).

### 2.3.2.3 Einfluss von Natrium auf den Gallensäuretransport

Die Gallensäureaufnahme in isolierte Rattenhepatozyten ist abhängig von einem zell-einwärts gerichteten Natriumionengradienten. Die  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der Cholat-Aufnahme ist mit ~50% (Anwer und Hegner 1978, Petzinger und Frimmer 1984) geringer als die der Taurocholataufnahme mit ~80% (Anwer und Hegner 1978). Diese  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit findet sich auch bei der Taurocholataufnahme in Membranvesikeln von Hepatozyten (Ruifrok und Meijer 1982) und Enterozyten (Schwenk et al. 1983) und auch bei heterolog exprimierten SBATs (Hagenbuch et al. 1991, Wong et al 1994, Wong et al. 1995, Shneider et al. 1995, Craddock et al. 1998, Saeki et al. 1999, Cattori et al. 1999). Der  $K_{\text{Na}^+}$  des Ratten-Ntcp beträgt 32,7 mM (Hagenbuch und Meier 1996).

Die Taurocholataufnahme in isolierte Rattenhepatozyten und in mit humanem Asbt transfizierte CHO-Zellen ist darüberhinaus ein elektrogener Prozess, für den eine Stöchiometrie von 2  $\text{Na}^+$ : 1 Gallensäure bestimmt wurde (Edmondson et al. 1985, Bear et al. 1987, Weinman et al. 1998). Der Hill-Koeffizient für  $\text{Na}^+$  bei der Aufnahme von Taurocholat in Hepatozyten wird mit 2-3 angegeben, bei heterologer Expression des Ntcp in *X. laevis*-Oozyten mit etwa 2 (Weinman 1997).

### 2.3.3 Struktur der SBATs, insbesondere des Ratten-Ntcp

Die SBATs stellen eine Gruppe von Proteinen dar, die, abgesehen von dem transport-inaktiven tAsbt, 317-362 Aminosäuren enthalten und untereinander eine Sequenzübereinstimmung von 35% aufweisen (Hallén et al. 1999). Sie zeigen keine signifikanten Übereinstimmungen mit anderen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transportern, wie den  $\text{Na}^+$ -Glucose- oder  $\text{Na}^+$ -Neurotransmitter-Cotransportern (Wright et al. 1996).

Antikörper gegen das C-terminale Ende des Ratten-Ntcp konnten dieses nur in permeabilisierten Zellen nachweisen (Stieger et al. 1994). Mit Hilfe von gezielten Mutationen an den 5 möglichen Glycosilierungsstellen wurden N5 und N11 als tatsächliche

Glycosilierungsstellen identifiziert (Hagenbuch et al. 1996). Das Protein besitzt demnach einen extrazellulären N-Terminus und einen zytoplasmatischen C-Terminus. Aufgrund von Hydrophobizitätsanalysen wurde für den Ntcp der Ratte eine Topologie mit 7 Transmembrandomänen postuliert (Hagenbuch et al. 1991) (Abbildung 1). Für den Asbt des Menschen wurde mit der selben Methode ein analoges Modell entwickelt (Wong et al. 1995). Diese Modelle stellen die Grundlage für die allgemein geltende Strukturvorstellung von Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransportern. Andere Autoren berechneten aufgrund des hidden Markov model-Algorithmus (Sonnhammer et al. 1998) für den humanen Asbt ein Modell mit 9 Transmembrandomänen (Hallén et al. 1999). Dieses Modell erscheint aber unwahrscheinlich, da über gerichtete Mutagenese an Position 266 des humanen Ntcp ein über die bekannten ASBTs konseviertes Cystein identifiziert wurde, dass durch Membran-impermeable SH-Gruppenblocker beeinflusst wird. Im 9 Transmembrandomänenmodell befände sich diese Aminosäure innerhalb einer Transmembrandomäne und wäre für den SH-Gruppenblocker nicht erreichbar (Hällén et al 2000).

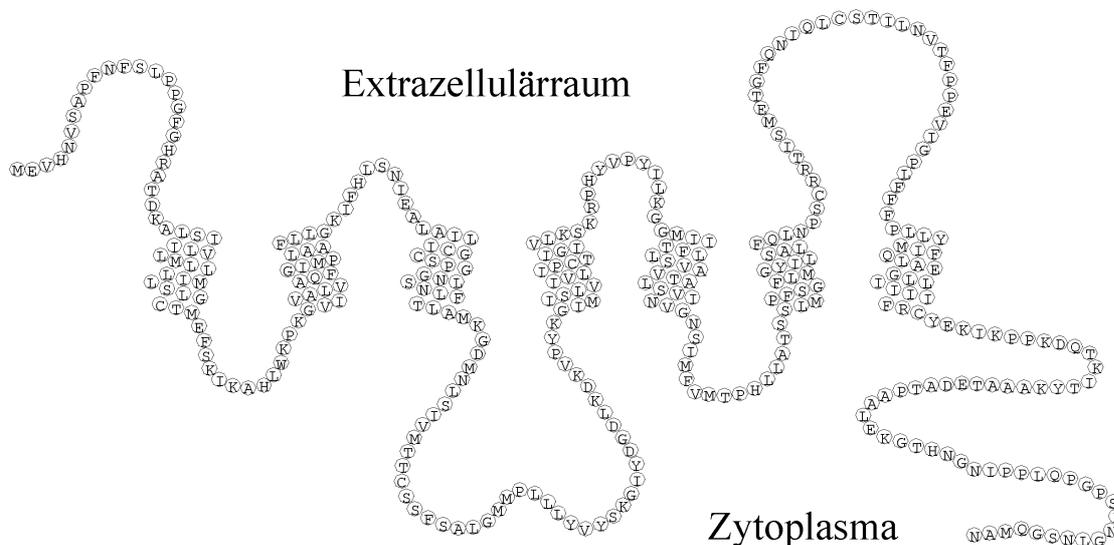


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ratten-Ntcp auf Grundlage der 7 Transmembrandomänen-Modells (nach Hagenbuch et al. 1991 und Meier et al. 1995). Die Transmembrandomänen sind als Blöcke von 20-21 Aminosäuren dargestellt.

Die cDNA des Ratten-Ntcp hat eine Größe von 1738 Basenpaaren. Sie beinhalten einen offenen Leserahmen von 1086 Basenpaaren, die für 362 Aminosäuren kodieren. Die Sequenz lässt rechnerisch auf eine Molekülmasse von 39 kDa schließen. Bei Expression in *X. laevis*-Oozyten findet man eine Molekülmasse von 41 kDa, die nach Behandlung mit N-Glycosidase

auf etwa 35 kDa zurückgeht. Bei Isolierung aus sinusoidalen Plasmamembranen von Hepatozyten wurde ein Protein von 49 kDa als Na<sup>+</sup>-Gallensäuren-Cotransporter identifiziert (Ananthanarayanan et al. 1988, v. Dippe und Levy 1990). Die Differenz ist auf unterschiedliche Glycosilierungen in den Hepatozyten und den *X. laevis*-Oozyten zurückzuführen (Hagenbuch et al. 1991). Bei dem funktionellen Protein soll es sich um ein Homo- oder Heteromer mit einer Molekülmasse von 170 kDa handeln (Elsner und Ziegler 1989).

## 2.4 Regulierung der Gallensäuren-Aufnahme

Die Gallensäurenkonzentration ist weder im Blut noch im Intestinum konstant. Die Transportsysteme, welche den enterohepatischen Kreislauf vermitteln, müssen sich diesen Gegebenheiten anpassen. Für die Gallensäureaufnahme in isolierte Rattenhepatozyten wurden verschiedene, durch Hormone und Second Messenger vermittelte Effekte beschrieben. Für die Regulation der Gallensäureaufnahme in Zellen, die apikale Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransporter exprimieren, existieren wenige Daten.

Glucagon führt zu einer Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> von isolierten Hepatozyten (Staddon und Hansford 1986) und erhöht die Na<sup>+</sup>-abhängige Taurocholataufnahme in isolierte Hepatozyten innerhalb von 5 min (Edmondson et al. 1985). Ebenso führt die Zugabe von Dibutyryl-cAMP oder Forskolin, einem Stimulator der Adenylat-Zyklase, zu einer Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und der Taurocholataufnahme in isolierte Hepatozyten (Botham and Suckling 1986, Staddon und Hansford 1986). Auch im Ileum lässt sich die Taurocholataufnahme durch Forskolin oder Phosphodiesterase-Inhibitoren stimulieren (Reymann et al. 1989). Bei der cAMP-vermittelten Zunahme der Taurocholataufnahme in isolierte Hepatozyten ändert sich der K<sub>m</sub>-Wert des Transports nicht (Grüne et al. 1993) und eine Regulation über eine vermehrte Transportersynthese ist auszuschließen, da die Zunahme auch in Gegenwart von Cycloheximid, einem Hemmstoff der Peptidyltransferase der ribosomalen 60S Untereinheit, zu beobachten ist (Mukhopadhyay et al. 1997). Vielmehr kommt es zu einer Translokation von Transportermolekülen aus Endosomen in die Zellmembran, durch die sich die Gesamtmenge an Transporterprotein pro Zelle nicht ändert, jedoch die Transporterdichte in der Zellmembran zunimmt (Mukhopadhyay et al. 1997). Diese Translokation kann auch durch die Schwellung der Hepatozyten in hypotonem Medium hervorgerufen werden (Webster et al. 2000).

Die Translokation der Proteine steht im Zusammenhang mit deren Phosphorylierung. Das Ntcp ist ein Serin-Threonin-Phosphoprotein, das unter dem Einfluss von cAMP dephosphoryliert wird (Mukhopadhyay et al. 1998a). Mukhopadhyay et al. (1998b) nehmen an, dass diese Dephosphorylierung die Translokation des Proteins aus den Endosomen in die Zellmembran begünstigt und umgekehrt. An der cAMP-vermittelten Zunahme der Taurocholataufnahme sind die Proteinkinase A (PKA), deren Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin verstärkt wird (Grüne et al. 1993), und die Proteinphosphatase 2A, die jedoch nicht selbst die Dephosphorylierung des Ntcp vermittelt (Mukhopadhyay et al. 1998b), beteiligt. Eine Hemmung des Phosphoinositol-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/PKB)-Signalwegs verhindert ebenfalls den cAMP-vermittelten Anstieg der Taurocholataufnahme und die Translokation des Proteins an die Zellmembran (Webster und Anwer 1999). Der PI3K/PKB Signalweg ist auch an der durch Zellschwellung verursachten Taurocholataufnahmesteigerung beteiligt (Webster et al. 2000). Zum Verständnis der Regulation sind die bekannten Daten bei weitem nicht umfassend genug (Anwer und Webster 2002).

## 2.5 Fragestellungen

Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Literatur wurden in dieser Arbeit folgende Fragestellungen behandelt:

1. Sind negativ geladene Aminosäuren des Ntcp-Proteins von essentieller Bedeutung für die Taurocholataufnahme? D. h. durch Mutation welcher negativ geladenen Aminosäuren lässt sich die [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme im *Xenopus laevis* Oozyten-Expressionsmodell gegenüber dem Wildtyp-Ntcp verringern?
2. Lässt sich eine verminderte [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme durch die Ntcp-Mutanten durch Steigerung der Expression in den Oozyten ausgleichen? D. h. wird eine verminderte [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme durch eine Erhöhung der injizierten cRNA-Menge je Oozyt korrigiert?
3. Welchen Einfluss hat der Verlust negativ geladener Aminosäuren auf die Insertion des Ntcp-Proteins in Oozytenmembranen? D. h. wird der Transportverlust ggf. durch eine Störung des Membran-Sortings der Carrierproteine hervorgerufen?

- 
4. Sind negativ geladene Aminosäuren an der Erkennung oder Bindung der Natriumionen beteiligt? Lässt sich die verminderte Gallensäureaufnahme der Ntcp-Mutanten durch eine Erhöhung der  $\text{Na}^+$ -Gradienten korrigieren? D. h. welchen Hill-Koeffizienten hat die  $\text{Na}^+$ -gekoppelte Taurocholataufnahme nach Änderung der negativ geladenen Aminosäuren?

### **3**            **Material**

#### **3.1**           **Biologische Materialien und Versuchstiere**

<i>E. coli</i> XL1-Blue superkompetent	Stratagene, Heidelberg
<i>Xenopus laevis</i>	Klinikum Eppendorf, Hamburg

#### **3.2**           **DNA**

p-wildtyp-ntcp (prLNaBA)	AG P. J. Meier, Zürich
--------------------------	------------------------

Das Plasmid prLNaBA enthält ein Insert von 1738 Basen in einem modifizierten pBlueskript KS+ Vektor (Stratagene). Das Insert wurde aus der gesamt-RNA von Rattenlebergewebe mittels RT-PCR gewonnen und kodiert für das Na<sup>+</sup>-abhängig Taurocholat-transportierende Protein der Leberzellen (Ntcp). Es enthält einen offenen Leserahmen von 1086 Nukleotiden, der bei Position 122 des Inserts startet. Er kodiert für 362 Aminosäuren. Die letzten 75 Basen des Inserts bilden den Poly-A-Schwanz. (Hagenbuch et al. 1991, Foguet et al. 1992). Um die Nomenklatur in dieser Arbeit zu vereinfachen, wird er im folgenden als p-wildtyp-ntcp bezeichnet.

#### **3.3**           **Enzyme, DNA-Marker und Puffer**

<i>PvuI</i>	MBI Fermentas, St Leon-Roth
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St Leon-Roth
10x R+-Puffer	MBI Fermentas, St Leon-Roth
RNA Marker 0,28-6,58 kB	Promega, Mannheim

### 3.4 Kommerzielle Kits und Säulen

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems Inc., ABI, Weiterstadt
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Qiagen® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Riboprobe® In Vitro Transcription System T3	Promega, Mannheim
G50 Quick Spin Columns for RNA-Purification	Boehringer/Roche, Mannheim

### 3.5 Reagenzien

[ <sup>3</sup> H]-Taurocholat (3Ci/mmol)	NEN Life Science Products GmbH, Köln
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Alexa Fluor® 488 Goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate	Molecular Probes, Leiden, NL
Ampicillin, Binotal®	Grünenthal, Stolberg
Anti-Flag® M2 monoclonale Maus-Antikörper	Sigma, Schnelldorf
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
CaN <sub>2</sub> O <sub>6</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Capping Analog (m <sup>7</sup> G (5') ppp (5') G)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cholinchlorid ([2-Hydroxyethyl]-trimethylammonium)	Sigma, Schnelldorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Entellan®	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma, Schnelldorf

---

Gentamicin	Sigma, Schnelldorf
Glukose	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
Hepes	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumaspartat	Sigma, Schnelldorf
KCl	Merck, Darmstadt
KOH	Merck, Darmstadt
Karoseriespachtelmasse	Nigrin, Pforzheim
Kollagenase D	Roche Diagnostics, Mannheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Na-EDTA	Serva, Heidelberg
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Sigma, Schnelldorf
Normal Horse Serum	Gibco, Karlsruhe
NZ-Amin-Casein-Hydrolysat	Difco, Augsburg
Phenol	Roth, Karlsruhe
Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg
RNase	Sigma, Schnelldorf
Rothiszint Szintillatorflüssigkeit	Roth, Karlsruhe
Taurocholat, Natriumsalz	Sigma Sigma, Schnelldorf
Technovit 7100 <sup>®</sup>	Heraeus Kulzer, Wehrheim/Ts
Tricain (3-Aminobenzoessäure-Ethylester)	Sigma, Schnelldorf
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	ICN-Biomedicals, Inc., Aurora Ohio
Xylencyanol	Sigma, Schnelldorf

### 3.6 Geräte

Beckmann Photometer DU-64

Zentrifuge 5415D

DNA Sequencer 373A

Gelelektrophoresekammern

GeneAmp 2400

Imagemaster VDS

Megafuge 1.0

Mikroinjektor Nanoliter 2000

Mikromanipulator

SpeedVac SPD111V

Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter

Beckmann, München

Eppendorf, Hamburg

Applied Biosystems Inc., ABI,

Weierstadt

Werkstatt des MZI, Giessen

Perkin Elmer, Überlingen

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Heraeus, Osterode

World Precision Instruments, Sarasota,

USA

Bachofer, Reutlingen

Savant, Holbrook, NY, USA

Wallac, Turku, Finland

## **4 Methoden**

### **4.1 Alignment zur Identifizierung konservierter Aminosäuren**

Um unter den negativ geladenen Aminosäuren im Ntcp diejenigen zu identifizieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von funktioneller Bedeutung für den Transport von Taurocholat sind, wurden 9 Mitglieder der SBAT-Familie miteinander verglichen. Es handelte sich dabei um 5 Transportproteine aus der Leber (Ntcp) und 4 aus dem Ileum (Asbt). Zum Vergleich wurden eingesetzt:

Ntcp der Ratte (*Rattus norvegicus*) (Hagenbuch et al. 1991)

Ntcp1 der Maus (*Mus musculus*) (Cattori et al. 1999)

Ntcp2 der Maus (*Mus musculus*) (Cattori et al. 1999)

Ntcp des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*) (Stengelin et al., NCBI-accession caa10360)

NTCP des Menschen (*Homo sapiens*) (Hagenbuch et al. 1994)

Asbt der Ratte (*Rattus norvegicus*) (Shneider et al. 1995)

Asbt der Maus (*Mus musculus*) (Saeki et al. 1999)

Asbt des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*) (Stengelin, NCBI-accession q28727)

Asbt des Mensch (*Homo sapiens*) (Craddock et al. 1998)

Das Alignment wurde über das Programm Clustal W 1.6 auf dem Server des Baylor College of Medicine, Houston (USA), mit den Standardeinstellungen (K-tuple size 1; Window size 5; Number of top diagonals 5; Gap penalty 3) erstellt.

## **4.2 Site-directed Mutagenese**

### **4.2.1 Austausch der negativ geladenen Aminosäuren**

Um die Notwendigkeit der negativen Ladungen der Seitenketten der Aminosäuren Aspartat und Glutamat für die Funktionalität des Proteins zu überprüfen, sollten die Aminosäuren Aspartat und Glutamat durch andere ersetzt werden. Aspartat sollte durch sein neutrales Amid Asparagin und Glutamat analog durch Glutamin ersetzt werden. Um dies zu erreichen, wurden die Kodons der cDNA, die für die fünf konservierten Aminosäuren kodieren, durch

gerichtete Mutagenese so verändert, dass sie für die jeweils andere Aminosäure kodieren. Zur Mutation von Aspartat und Glutamat zu Asparagin und Glutamin war jeweils nur der Austausch einer Base notwendig. Das jeweilige Basentriplett ist in Tabelle 9 dargestellt.

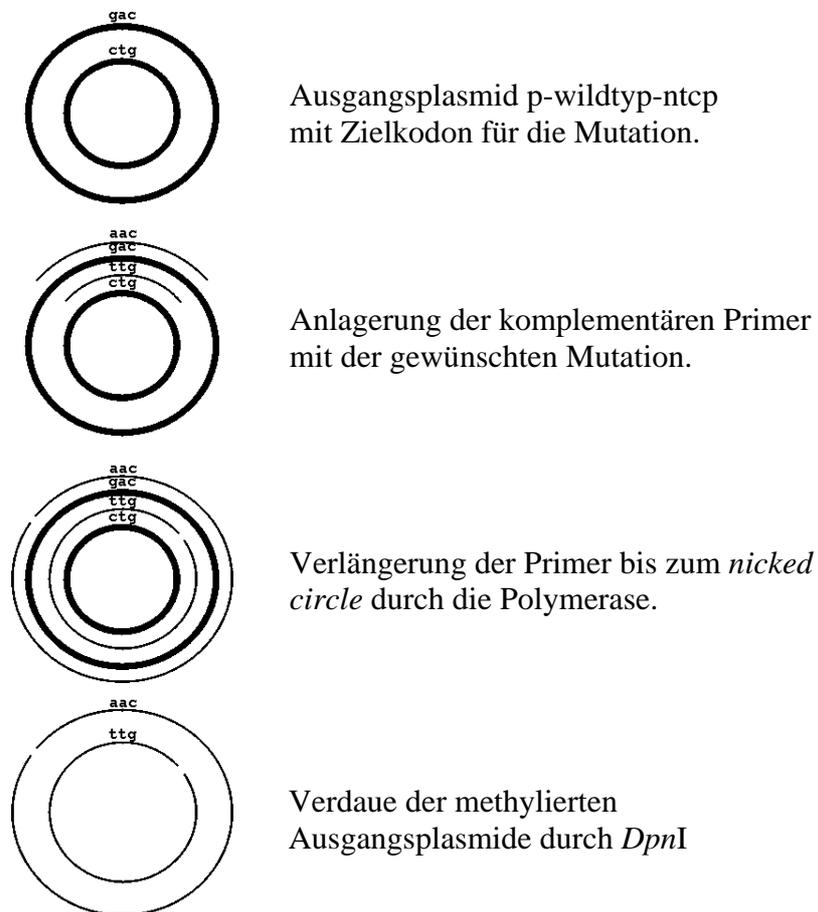


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mutagenese

Zur Mutagenese des Ausgangsklons p-wildtyp-ntcp wurde das Quick-Change™ Site-directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Bei dieser Methode wird eine Mutation in ein ungeschnittenes Plasmid eingeführt, indem es mit zwei komplementären Oligonukleotidprimern durch eine PCR amplifiziert wird. Diese komplementären Primer tragen die gewünschte Mutation, wodurch jede in der PCR erzeugte Kopie des Plasmids sie ebenfalls trägt. Die Abtrennung von unmutierter Ausgangs-DNA erfolgt durch das Restriktionsenzym *DpnI*. Dieses Enzym spaltet ausschließlich methylierte DNA und ist deshalb nicht in der Lage, die unmodifizierten Amplifikate zu spalten (siehe Abbildung 2). Die gewonnenen Plasmide sind ungeschlossene DNA-Ringe, sogenannte *nicked circles*, die nach der Transformation von der Bakterienzelle ligiert werden.

Tabelle 9: Mutageneseprimer zur Erstellung der Punktmutationen. Dargestellt sind die Basensequenzen aus dem Ausgangsklon p-wildtyp-ntcp und die verwendeten Mutageneseprimer (fett). Die Primer sind zueinander komplementär angeordnet. Über die Basensequenzen ist deren Übersetzung in die Aminosäuresequenz gezeigt. Das betroffene Kodon und die zugehörige Aminosäure sind unterstrichen. Tiefgestellte Ziffern geben die Position in der Aminosäuren- bzw. Basensequenz wieder.

Protein/DNA	Primername	Sequenzen
Wildtyp-Ntcp <b>p-wildtyp-ntcp</b> D24N		...T <u>D<sub>24</sub></u> K... 188 <b>acagacaag</b> 196
	<b>D24N-F</b> <b>D24N-R</b>	...T <u>N<sub>24</sub></u> K... 5'ggccaccggggccacaa <u>acaaggcgcttagcatc</u> 3' 3'ccggtggcccgggtg <u>ttgttccgccaatcgtag</u> 5'
Wildtyp-Ntcp <b>p-wildtyp-ntcp</b> E47Q		...M <u>E<sub>47</sub></u> F... 257 <b>atggaattc</b> 266
	<b>E47Q-F</b> <b>E47Q-R</b>	...M <u>Q<sub>47</sub></u> F... 5'ctgggctgcaccatg <u>caattcagcaagatcaag</u> 3' 3'gacccgacgtggtac <u>gttaagtcggttctagttc</u> 5'
Wildtyp-Ntcp <b>p-wildtyp-ntcp</b> E89Q		...I <u>E<sub>89</sub></u> A... 383 <b>attgaagct</b> 391
	<b>E89Q-F</b> <b>E89Q-R</b>	...I <u>Q<sub>89</sub></u> A... 5'cacctgagcaacatt <u>caagctctggccatcctc</u> 3' 3'gtggactcgttgta <u>agttcgagaccggtaggag</u> 5'
Wildtyp-Ntcp <b>p-wildtyp-ntcp</b> D115N		...G <u>D<sub>115</sub></u> M... 461 <b>ggggacatg</b> 469
	<b>D115N-F</b> <b>D115N-R</b>	...G <u>N<sub>115</sub></u> M... 5'ctggccatgaagg <u>ggaacatgaacctcagcatc</u> 3' 3'gaccggtacttccc <u>ttgtacttggagtcgtag</u> 5'
Wildtyp-Ntcp <b>p-wildtyp-ntcp</b> D147N		...Y <u>D<sub>147</sub></u> G... 560 <b>tacgatgga</b> 568
	<b>D147N-F</b> <b>D147N-R</b>	...Y <u>N<sub>147</sub></u> G... 5'gcaaaggcatctaca <u>atggagaccttaaggacaagg</u> 3' 3'cgtttccgtagatg <u>ttacctctggaattcctgttcc</u> 5'
Wildtyp-Ntcp <b>p-wildtyp-ntcp</b> E257Q		...M <u>E<sub>257</sub></u> T... 887 <b>atggaaca</b> 895
	<b>E257Q-F</b> <b>E257Q-R</b>	...M <u>Q<sub>257</sub></u> T... 5'gctgcagacgcaccatcagcatg <u>caaacaggattcc</u> 3' 3'cgacgtctgcgtggtagtcgtac <u>gtttgtcctaagg</u> 5'

Wildtyp-Ntcp  
**p-wildtyp-  
 ntcp**  
 E277Q

...P E<sub>277</sub>V...  
 947cctgaagtc955

E277Q-F 5' cctcaatgtgaccttccccctcaagtcattggggcc 3'  
 E277Q-R 3' ggagttacactggaaggggggagttcaatgaccgg 5'

#### 4.2.1.1 Primer-Design

Die zur Einführung der Mutationen verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 9 dargestellt. Sie sollten, laut Protokoll des Herstellers, folgenden Anforderungen entsprechen:

1. Ihre Länge sollte zwischen 25 und 45 Basenpaaren betragen und ihre Schmelztemperatur sollte über 78°C liegen. Die Schmelztemperatur sollte berechnet werden nach der Formel
 
$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%mismatch$$
 (%GC: Gehalt an Guanin und Cytosin in Prozent; N: Anzahl der Basen; %mismatch: Anteil der Basen, die bei der Anlagerung an die Template-DNA keine Basenpaarung eingehen können, in Prozent)
2. Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte des Primers liegen, wobei sich mindestens zehn Basen zwischen dem Ende des Primers und der Mutation befinden sollten.
3. Der GC-Gehalt der Primer sollte mindestens 40% betragen und die Primer sollten in einem oder mehreren Guaninen oder Cytosinen enden.
4. Die Primer mussten durch Polyacrylamidgelelektrophorese oder HPLC gereinigt sein. Die verwendeten Primer wurden vom Hersteller bereits durch HPLC gereinigt. Eine Phosphorylierung der Primer war nicht notwendig.

#### 4.2.1.2 Ansatz der Mutagenese-PCR

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 50 µl. In alle Ansätze wurden 5 µl des im Kit enthaltenen, 10fach konzentrierten Reaktionspuffers und 1 µl des ebenfalls im Kit enthaltenen Desoxynukleotidtriphosphat-Mix (dNTPmix) gegeben. Als Template-DNA wurden 50ng des Plasmids p-wildtyp-ntcp eingesetzt. Von den Vorwärts- und Rückwärtsprimern wurden je 125 ng eingesetzt. Die Differenz zum Endvolumen von 50 µl wurde mit autoklaviertem, zweifach destilliertem Wasser aufgefüllt. Dann wurde 1 µl des Enzyms *Pfu Turbo* DNA-Polymerase

zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde in den PCR-Cycler gegeben und die DNA bei 95°C für 30 s geschmolzen. Danach folgten 12 PCR-Zyklen mit folgendem Profil:

95°C für 30s,  
55°C für 60s  
68°C für 10 Min.

Nach der PCR wurden alle Ansätze mit 10 U des Enzyms *DpnI* versetzt und bei 37°C für 1 h inkubiert.

#### 4.2.2 Insertion der FLAG<sup>®</sup>-Sequenz

Um das Ntcp und seine Mutanten durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachweisen zu können, wurden an das Ende der kodierenden Regionen 24 Basen vor dem Stop-Codon eingeführt, deren Sequenz für das FLAG<sup>®</sup>-Peptid kodiert (siehe Abschnitte 4.6 und 5.7). Als Ausgangsplasmide wurden p-wildtyp-ntcp und die davon abgeleiteten Mutanten benutzt. Für alle Mutagenesen konnte dasselbe Primerpaar verwendet werden, da sich die Klone in der erfassten Region nicht unterscheiden. Das Primerpaar ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Mutageneseprimer zur Erstellung der FLAG<sup>®</sup>-Insertionen. Dargestellt ist die Basensequenz aus dem Ausgangsklon p-wildtyp-ntcp und die verwendeten Mutageneseprimer (fett). Die Primer sind zueinander komplementär angeordnet. Über die Basensequenzen ist deren Übersetzung in die Aminosäuresequenz gezeigt. Die eingeführten Basen und deren Auswirkung auf die Aminosäuresequenz sind unterstrichen. Tiefgestellte Ziffern geben die Position in der Aminosäuren- bzw. Basensequenz wieder.

Protein/DNA	Sequenzen
Wildtyp-Ntcp	...N <sub>362</sub> Stop...
<b>p-wildtyp-ntcp</b>	<b><sub>1202</sub>gcaaat tagaat<sub>1213</sub></b>
NtcpFLAG	...N <sub>362</sub> <u>D Y K D D D D K</u> Stop...
NtcpFLAG-F	5' ggtcagatggcaaat <u>gattacaaggatgacgacgataagtagaatg</u> ...
NtcpFLAG-R	3' ccagtctaccggtttact <u>aatggtcctactgctgctattcatcttac</u> ...
NtcpFLAG-F	...tgaaacttcgaagc 3'
NtcpFLAG-R	...actttgaagcttcg 5'

Das verwendete PCR-Profil war dasselbe wie bei der Einführung der Punktmutationen. Es unterschied sich nur in der Anzahl der Zyklen. Es wurden 18 Zyklen anstatt der 12 bei den Punktmutationen nötigen durchgeführt.

Auch hier wurden 10 U *DpnI* zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert um die Ausgangs-DNA zu verdauen.

### 4.2.3 Transformation der Zellen

Zur Vermehrung der Plasmide wurden sie in superkompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen (im Site-directed Mutagenesis Kit enthalten) eingeschleust. Dies erfolgte nach Mandel und Higa (1970) durch Hitzeschock auf die Zellen. Nach der Transformation wurden die Zellen zuerst in einem hemmstofffreien Medium inkubiert, um ihnen Gelegenheit zu geben, den Selektionsmarker ( $\beta$ -Lactamase) zu exprimieren, bevor sie auf Selektionsnährböden kultiviert wurden.

#### Lösungen und Nährböden:

##### NZY+-Brühe (hemmstofffreies Medium)

NZ-Amin-Casein-Hydrolysat	8 g/l
Hefe-Extrakt	4 g/l
NaCl	4 g/l

mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, 20 min bei 121°C autoklaviert, kurz vor der Verwendung 10 ml der Lösung mit 125  $\mu$ l 1M MgCl<sub>2</sub>, 125  $\mu$ l 1M MgSO<sub>4</sub> und 100  $\mu$ l 2M Glucose (sterilfiltriert) versetzt.

##### Luria-Bertani (LB)-Platten

NZ-Amin-Casein-Hydrolysat	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar-Agar	20 g/l

mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, 20 min bei 121°C autoklaviert, abkühlen lassen auf 60°C und unter sterilen Bedingungen auf 40 Petrischalen verteilt.

### LB-Ampicillin-Platten

NZ-Amin-Casein-Hydrolysat            10 g/l

Hefe-Extrakt                                5 g/l

NaCl    10 g/l

Agar-Agar                                    20 g/l

mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, 20 min bei 121°C autoklaviert, nach Abkühlen auf 60°C, 100 mg Ampicillin/l zugegeben und unter sterilen Bedingungen auf 40 Petrischalen verteilt.

Laut Protokoll des Herstellers war darauf zu achten, dass die Zellen vor der Transformation stets auf Eis gehalten wurden, da die Effizienz der Transformation wesentlich davon abhängt, dass die Zellen nicht über 4°C erwärmt werden. Daher wurden die Falcon 2059 PP-Röhrchen, in denen die Transformation durchgeführt wurde, auf Eis vorgekühlt. Die superkompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Pro Reaktionsansatz wurden in je ein Röhrchen 50 µl der Zellen vorgelegt. Von den mit *DpnI*-verdauten Reaktionsansätzen wurde 1 µl in je eines der vorbereiteten Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden sanft geschwenkt, um die Zellen mit der DNA zu vermischen, und für 30 min auf Eis gestellt. Darauf folgte der Hitzeschock. Dazu wurden die Röhrchen für 45 s in ein auf 42°C erwärmtes Wasserbad gehalten und im Anschluss wieder für 2 min auf Eis inkubiert.

Nach Zugabe von 500 µl, auf 42°C temperierte, NZY+-Broth pro Ansatz wurden die Röhrchen bei 37°C und 225 rpm für 1 h im Schüttelinkubator bebrütet. Danach wurden die Ansätze auf je eine LB-Amp-Platte ausplattiert. Zusätzlich wurden je eine LB-Amp-Platte und eine hemmstofffreie Platte mittels einer Impföse mit untransformierten *E. coli* XL1-Blue-Zellen beimpft, um die Zellen auf Vermehrungsfähigkeit und Resistenzeigenschaft zu überprüfen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht bebrütet.

#### **4.2.4            Picken der Kolonien und Ansetzen der Übernachtskulturen**

Jede Kolonie auf den LB-Amp-Platten ging aus einer transformierten Bakterienzelle hervor. Um diese einzelnen Klone getrennt untersuchen zu können wurden die Einzelkolonien von der Platte gepickt und im Selektionsmedium vermehrt.

Lösungen:Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) mit Ampicillin

NZ-Amin-Casein-Hydrolysat	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

Auf pH 7 mit NaOH eingestellt, 20 min bei 121°C autoklaviert, nach Abkühlen auf 60°C mit 100 mg Ampicillin/l versetzt.

Am nächsten Morgen wurden die Platten kontrolliert. Die untransformierten Zellen sollten nur auf den hemmstofffreien Platten gewachsen sein und auf den LB-Amp-Platten keine Kolonien gebildet haben. Wenn die Kolonien der transformierten Zellen auf den LB-Amp-Platten einen Durchmesser von etwa 0,5-1,0 mm erreicht hatten, wurden jeweils sechs der Einzelkolonien unter sterilen Bedingungen in 5 ml LB-Amp-Medium überführt und 16 h (übernacht) bei 37°C und 225 rpm im Schüttelinkubator bebrütet.

#### **4.2.5 Herstellung lagerfähiger Gefrierpräparate (Steps) der gepickten Klone aus den Übernachtskulturen**

Um die gewonnenen Klone bei -70°C lagern zu können, ohne dass die Zellen ihre Teilungsfähigkeit verloren, wurde ein Aliquot der Übernachtskulturen mit 15% Glycerin versetzt und in Flüssigstickstoff schockgefroren.

Zu diesem Zweck wurden 1,5 ml Schraubverschluss-Gefäße vorbereitet, in die 150 µl Glycerin vorgelegt wurden. Die Gefäße wurden 20 min autoklaviert. Von jedem Klon wurden 850 µl aus der Kultur entnommen und in je ein Gefäß mit dem vorgelegten Glycerin gegeben, gevortext und für 15 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren bevor es bei -70°C eingelagert wurde.

### 4.3 DNA-Präparationen und Plasmidanalyse

#### 4.3.1 **Mikroquick Plasmid-Präparation aus 5 ml Übernachtskultur in LB-Amp-Medium**

Bei der Mikroquick-Plasmid-Präparation handelt es sich um eine alkalische Lyse der Bakterienzellen und eine Trennung der chromosomalen DNA, die an den Zelldedritus gebunden bleibt, von der plasmidalen DNA, die löslich ist.

##### Lösungen:

###### Lösung 1

Tris	50 mM
Na-EDTA	10 mM

pH 8,0 mit HCl einstellen, 20 Min bei 121°C autoklavieren

RNase A	1 mg/l
---------	--------

bei max. 4°C gelagert

###### Lösung 2

NaOH	200 mM
SDS	1%

###### Lösung 3

K-Acetat	2,55M
----------	-------

mit HCl pH 4,8 eingestellt

###### 3M NaCl-Lösung

1,5 ml der Übernachtskultur wurden in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß und 2 min bei 14.500 x g (13.000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 2 wurde sachte überkopf geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Durch diesen Schritt wurden die Zellen aufgebrochen, wobei die plasmidale DNA in Lösung ging, während die chromosomale DNA der Bakterien

an den Zelldedritus gebunden blieb. Danach folgte die Zugabe von 150 µl auf Eis gekühlter Lösung 3. Es wurde erneut geschüttelt, 5 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 14.500 x g zentrifugiert. Im Überstand befanden sich dann die gelöste plasmidale DNA sowie andere lösliche Inhaltsstoffe der Zellen. Er wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 300 µl Phenol und 30 µl Chloroform versetzt. Die Zugabe von Phenol diente der Entfernung von gelösten Proteinen aus der Lösung. Die Mischung wurde gevortext und danach 1 min bei 14.500 x g zentrifugiert. Die untere Phase wurde verworfen und die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die Phenol-Waschung wurde wiederholt und die wässrige Phase erneut in ein neues Gefäß überführt. Nun wurde 1/10 des Volumens als 3 M NaCl-Lösung zugegeben, gemischt und sodann das dreifache Volumen an 100% Ethanol zugegeben. Durch die Zugabe von NaCl auf eine Endkonzentration von 0,3 M wurde eine Verringerung der Hydrathülle um die DNA-Moleküle erreicht, so dass durch die Zugabe von Ethanol die DNA ausgefällt werden konnte. Es wurde gemischt und 10 min bei 14.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 250 µl 70% Ethanol überschichtet und weitere 5 min bei 14.500 x g zentrifugiert. Durch diesen Waschschriff wurde der Salzanteil im DNA-Pellet reduziert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet 5 min in der Speed-Vac getrocknet und in 500 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### **4.3.2 Verdau der gewonnenen Plasmid-DNA zur Kontrolle der Schnittmuster**

Um zu kontrollieren, ob es sich bei der gewonnenen DNA um die gewünschte Plasmid-DNA handelte und wie groß der Grad der Verunreinigung war, wurde die DNA einem Restriktionsverdau unterworfen. Das entstandene Schnittmuster musste dem des Ausgangsplasmids p-wildtyp-ntcp entsprechen. Bei der verwendeten Restriktionsendonuklease handelte es sich um das Enzym *PvuI*. Pro gewonnener Plasmid-DNA wurden 10 µl eingesetzt. Diese wurden mit 4 µl Puffer R+, 25 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O und 1 µl *PvuI*, entsprechend 5 U, zu einem Endvolumen von 40 µl vermischt. Als Kontrolle wurde 1 µg des p-wildtyp-ntcp mit ddH<sub>2</sub>O auf 35 µl verlängert und mit 4 µl Puffer R+ und 1 µl *PvuI* versetzt. Die Proben und die Kontrolle wurden 2 h bei 37°C inkubiert.

### 4.3.3 Analyse des Restriktionsverdaus in der Elektrophorese

Die Analyse der Schnittmuster erfolgte über eine horizontale (submarine) Elektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel in TAE-Puffer. DNA wandert aufgrund seiner negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle in dem Agarosegel ist abhängig von ihrer Länge, da mit dieser die Reibung zunimmt. Je mehr Basenpaare das Molekül enthält, desto langsamer wandert es durch das Gel. Durch das Mitführen von DNA-Molekülen bekannter Länge kann die Größe der untersuchten DNA-Moleküle bestimmt werden. Der Nachweis der DNA im Gel erfolgte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid. Dieser Fluoreszenzfarbstoff reichert sich in der DNA an, indem er zwischen die Basen der DNA interkaliert.

#### Lösungen:

##### Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)

Tris	40 mM
EDTA	1 mM

pH 8,0 mit Na-Acetat eingestellt.

##### Lade-Puffer

Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol	0,25%
Glyzerin	30%

##### Färbelösung

10µg/ml Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O

Für ein Gel von 11 x 18 cm wurden 1,8 g Agarose in 180 ml TAE-Puffer so lange erhitzt, bis eine homogene, klare Lösung entstanden war. Die Lösung wurde unter Rühren abgekühlt. Während dessen wurde ein Agaroseschlitten vorbereitet, in dem die offenen Enden mit Klebeband verschlossen und die Kämme für die Slots eingebracht wurden. Wenn die Lösung auf etwa 60°C abgekühlt war, wurde sie luftblasenfrei in den Schlitten gegossen. Nach dem Erstarren des Gels und nach Entfernung der Klebestreifen wurde der Schlitten in die

Elektrophoresekammer eingebracht. Die Elektrophoresekammer wurde mit TAE-Puffer bis knapp über die Oberkante des Gels aufgefüllt und die Kämme aus dem Gel entfernt.

Von den Restriktionsansätzen der Proben und der Kontrolle wurden 20 µl mit 3 µl Ladepuffer versetzt und in die Slots geladen. Als DNA-Längenstandard wurde der GeneRuler™ DNA Ladder Mix eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einem maximalen Stromfluss von 100 mA bis das Bromphenolblau 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Dann wurde das Gel 20 min in der Färbelösung gefärbt, weitere 20 min in in Wasser entfärbt und im Imagemaster fotografiert.

#### **4.3.4 Plasmid Midi-Präparation aus einer 50 ml Übernachtskultur**

Um die DNA für die folgenden Versuche in ausreichender Menge und Reinheit zu gewinnen, wurde eine erneute Plasmid-Präparation mit dem Qiagen Midi Kit durchgeführt. Hierfür wurde in 50 ml Medium eine Übernachtskultur der Klone hergestellt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte, analog zur Mikro-Präparation, durch die alkalische Lyse. Die Reinigung der plasmidalen DNA wurde über eine QIAGEN-tip 100 Säule erreicht.

##### Lösungen:

LB-Amp-Medium (siehe oben)

##### Puffer P1

Tris	50 mM
EDTA	10 mM
auf pH 8,0 mit HCl eingestellt	
RNase A	100µg/ml

##### Puffer P2

NaOH	200 mM
SDS	1%

Puffer P3

K-Acetat 3M  
auf pH 5,5 mit konzentrierter Essigsäure  
eingestellt

Puffer QBT

NaCl 750 mM  
MOPS 50 mM  
Ethanol 15%  
Triton X-100 1,5%  
PH 7,0

Puffer QC

NaCl 1M  
MOPS 50 mM  
Ethanol 15%  
pH 7,0

Puffer QF

NaCl 1,5M  
Tris 50 mM  
Ethanol 15%  
pH 8,5

(Puffer P1 bis QF wurden als fertige Lösungen aus dem QIAGEN® Plasmid Midi Kit verwendet.)

#### 4.3.4.1 Herstellung einer 50 ml Übernachtskultur

Aus 6 Klonen einer Mutation mit korrektem Plasmidschnittmuster wurde willkürlich eine ausgewählt. Die Probe wurde auf Eis aufgetaut, unter sterilen Bedingungen in 50 ml LB-Amp-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und 16 h bei 37°C und 225 rpm im

Schüttelinkubator bebrütet. Danach wurden kleine Aliquots der Kulturen eingefroren und das übrige Material zur Plasmid Midi-Präparation weiterverwendet.

#### **4.3.4.2 Plasmid Midi Präparation mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit**

Die Kulturen wurden in 50 ml Sarstedt-Röhrchen bei 6.000 x g bei 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Röhrchen auf den Kopf gestellt, bis möglichst viel Medium abgelaufen war. Das Pellet wurde in 4 ml Puffer P1 durch Vortexen resuspendiert, mit 4 ml Puffer P2 versetzt, und sachte überkopf gemischt um eine Scherung der chromosomalen DNA zu verhindern und 5 min bei RT inkubiert. Die Lösung war nun sehr viskös. Im Anschluss wurden 4 ml eisgekühlter Puffer P3 zugegeben, vier- bis sechsmal überkopf gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Durch die niedrige Temperatur wurde die Präzipitation gefördert. Es entstand ein weißer Niederschlag aus chromosomaler DNA, Proteinen, Zelldedritus und SDS. Die Röhrchen wurden nun bei 20.000 x g bei 4°C 30 min zentrifugiert. Während dieser Zeit wurden die QIAGEN-tip100 Säulen auf 50 ml Sarstedt-Röhrchen aufgesetzt und mit 5 ml Puffer QBT zum Equilibrieren befüllt. Nachdem der Puffer aus den Säulen abgetropft war, wurden Faltenfilter von 185 mm Durchmesser auf die Säulen aufgesetzt und mit 2 ml ddH<sub>2</sub>O befeuchtet. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde durch den Filter auf die Säulen gegeben. Nachdem die Lösung durchgelaufen war, wurden die Säulen zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Säulen wurden dann auf neue 50 ml Sarstedt-Röhrchen aufgesteckt und die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde mit 3,5 ml Isopropanol bei RT präzipitiert und bei 15.000 x g bei 4°C 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen um das Pellet nicht zu verlieren, das Pellet mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 15.000 x g bei 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgegossen, das Pellet bei 80°C im Trockenschrank getrocknet und in 100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 4.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

1 µl der Lösung wurde 1:60 verdünnt und die Absorption der Probe im Photometer bei 260 und 280nm gemessen. Die Konzentration errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration}[\mu\text{g} / \text{ml}] = \frac{\text{Absorption}[260\text{nm}] \cdot 50 \cdot \text{gemessenesVolumen}}{\text{eingesetztesVolumen}}$$

Aus dem Quotienten der Absorption bei 260nm und 280nm ließ sich die Reinheit der DNA-Lösung abschätzen. Bei einer sehr reinen DNA-Lösung beträgt dieser Quotient etwa 1,8.

### 4.4 Sequenzierung der Mutanten

Um sicherzustellen, dass es während der Mutagenese-PCR nicht zu weiteren, als den geplanten Basenaustauschen gekommen war, wurden die Inserts aller Klone, die zu weiteren Versuchen verwendet werden sollten, sequenziert.

Sequenziert wurde nach der von Sanger entwickelten Methode (Sanger et al. 1977). Hierbei wird durch die Verwendung eines spezifischen Primers (Oligonukleotid) von einer definierten Stelle auf einer DNA mit Hilfe der DNA-Polymerase und Desoxynukleotiden eine DNA-Synthese gestartet. Durch die Verwendung von Fluoreszenz-markierten Oligonukleotidprimern oder Didesoxynukleotiden werden die Syntheseprodukte markiert und durch Zugabe von Didesoxynukleotiden wird die DNA-Synthese nukleotidspezifisch abgebrochen. Hierfür wurde das ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) eingesetzt, das mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden arbeitet, wodurch unmodifizierte Primer zu Sequenzierung eingesetzt werden können.

Die Inserts wurden in beiden Richtungen sequenziert. Die Sequenzierprimer sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Die zur Sequenzierung der Mutanten des p-wildtyp-ntcp verwendeten Primer. Tiefgestellte Ziffern geben die Position der komplementären Base im Insert des Plasmids wieder (T3 bindet stromaufwärts des Inserts, daher sind hier keine Ziffern angegeben). T3 und mit F bezeichnete Primer dienen zur Sequenzierung des Positiv-Strangs, mit R bezeichnete Primer zur Sequenzierung des Gegenstrangs.

Primername	Sequenz
T3	gcgcgcaattaaccctcac
F2	<sup>179</sup> caccgggcccacagacaag <sub>196</sub>
F3	<sup>436</sup> caacctcttcaccctggc <sub>453</sub>
F4	<sup>698</sup> atcatcaccttcctcctctc <sub>717</sub>
F5	<sup>965</sup> cttttcttctttcctcctc <sub>985</sub>
F6	<sup>1228</sup> cagcaagaaaaggaacgaac <sub>1247</sub>
F7	<sup>1507</sup> ggctatgaactctatgaaagc <sub>1527</sub>
R2	<sup>1436</sup> ggttgatcttgagtttctgag <sub>1456</sub>
R3	<sup>1182</sup> catctgaccagaattcaggc <sub>1201</sub>
R4	<sup>925</sup> ggaagggtcacattgaggatg <sub>944</sub>
R5	<sup>649</sup> agtgtggccttttggacttg <sub>668</sub>
R6	<sup>396</sup> tgaggatggccagagcttc <sub>404</sub>
R7	<sup>136</sup> aaattgaaaggggctgatacg <sub>156</sub>

#### 4.4.1 Die Polymerase-Reaktion

Die Polymerase-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

In einem 200 µl Gefäß wurden 1 µg DNA, 4,8 pmol des Oligonukleotidprimers und 8 µl des Terminator Reaction Mixes, der im Kit enthalten ist, gemischt. Dieser Mix enthielt:

- die Nukleotide dATP, dCTP, dTTP und dITP (Desoxyinositoltriphosphat). Während die ersten drei die natürlichen Substrate der DNA-Polymerasen darstellen, wurde dITP vom Hersteller anstelle des in der Natur an dieser Stelle vorkommenden dGTP eingesetzt, um zu vermeiden, dass es durch die Interaktion von Guanin und Cytosin in den Polymerisationsprodukten zu störenden Effekten bei der nachfolgenden Elektrophorese kommt.
- Fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide, wobei auch unter diesen die Guaninbasen durch Inositol ersetzt waren.
- die AmpliTaq DNA-Polymerase FS, eine durch Mutationen hinsichtlich des Einsatzes in der Sequenzierung optimierte Form der *Taq*-Polymerase. Dieses Enzym ist besser in der Lage Didesoxynukleotide zu verwerten und hat eine geringere 5'-3' Polymeraseaktivität als die Wildform.
- MgCl<sub>2</sub>.

- thermisch stabile Pyrophosphatase.

Die Lösung wurde auf ein Endvolumen von 20 µl mit sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Ansätze wurden in den Thermocycler verbracht und dort 25 Zyklen mit folgendem Profil unterworfen: 96°C für 15 s, 50°C für 15 s und 60°C für 4 Min.

Die gewonnenen Produkte wurden mit sterilem ddH<sub>2</sub>O um 70 µl verlängert und durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 7 und 250 µl 100% Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde bei 14.500 x g für 30 Min sedimentiert und der Überstand wurde verworfen. Durch Zugabe von 250 µl 70% Ethanol und einen weiteren Zentrifugationsschritt wurden lösliche Salze und freie Nukleotide aus dem Sediment ausgewaschen. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt, und das Pellet 5 Min in der Speed-Vac getrocknet.

#### 4.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente und die Identifizierung der Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotide (Terminatoren) erfolgte in einer vertikalen Elektrophorese im DNA Sequencer 373A durch ein denaturierendes Harnstoffgel.

##### Lösungen:

##### 10 x TBE

Tris	1 M
Borsäure	1 M
EDTA	20 mM

##### Ladepuffer

EDTA 25 mM mit 50 mg/ml Blue Dextran	1 Teil
Formamid, deionisiert	5 Teile

##### Ammoniumpersulfat 10%ig

##### Bisacrylamid 40%ig

Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wurden zunächst die benötigten Glasplatten gereinigt. Die Platten wurden durch 0,4 mm Spacer getrennt und durch Klammern fixiert. Für das Gel wurden 30g Harnstoff in 6 ml 10 x TBE-Puffer und 21,5 ml Wasser bei 50°C gelöst. Die Lösung wurde durch einen Membranfilter mit 0,2 µm Porenweite filtriert. Danach wurden 9,5 ml 40%iges Bisacrylamid, 180 µl 10%iges Ammoniumpersulfat und 24 µl TEMED zugegeben und das Gel in horizontaler Lage gegossen. Nach zwei h konnte das Gel in den Sequencer eingebracht werden. Die Gelkammern wurden eingesetzt und mit TBE-Puffer gefüllt. Mit dem Haifischzahnkamm wurden die Probenaschen (Slots) im Gel gebildet. Es folgte ein zehnminütiger Vorlauf. Die Proben aus der Polymerasereaktion wurden in 4 µl Ladepuffer aufgenommen und 2 Min bei 94°C denaturiert. Bis zum Auftrag wurden sie auf Eis gestellt. Die Proben der geradzahligen und der ungeradzahligen Slots wurden in zehnminütigem Abstand aufgetragen. Der Lauf dauerte ca. 14 h.

#### 4.4.3 Analyse der Sequenzen

Die erhaltenen Sequenzen wurden daraufhin überprüft, ob in der graphischen Darstellung eindeutige Peaks vorhanden waren. War dies der Fall, wurden die Sequenzen mit Hilfe der Lasergene<sup>®</sup>-Software DNA-Star mit der Ausgangssequenz verglichen und die überlappenden Sequenzen miteinander kombiniert. Erwies sich die Sequenz der mutierten Klone in zusätzlichen als den gewünschten Positionen abweichend von dem Klon p-wildtyp-ntcp, wurde der Klon verworfen.

#### 4.5 [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmemessungen im *Xenopus laevis*-Oozyten-Expressionsmodell

Das erste Modell, in dem die Fähigkeit des Ntcp [<sup>3</sup>H]Taurocholats über Membranen zu transportieren nachgewiesen worden war, war das *X. laevis*-Oozyten-Expressionsmodell. Bei dieser Methode wird mRNA, die entweder aus Zellen isoliert oder durch *in vitro*-Transkription gewonnen wurde, in *X. laevis*-Oozyten injiziert, um die kodierten Proteine durch den Proteinbiosyntheseapparat der Zellen produzieren zu lassen. Die Oozyten des Südafrikanischen Krallenfroschs *X. laevis* sind aufgrund ihrer Größe für die Mikroinjektion besonders gut geeignet.

Die Methode bietet sich an, um Membranproteine, insbesondere Poren- und Transportproteine, zu untersuchen, da sich die Transporteigenschaften bzw. die Ionendurchlässigkeit der Proteine gut anhand der Aufnahme ihrer Substrate in die Zellen überprüfen lassen.

Zur Untersuchung der gewonnenen Mutanten des Ntcp hinsichtlich ihrer Taurocholat-Transportaktivität wurde auf dieses Expressionssystem zurückgegriffen. Durch das Ausbleiben der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Taurocholat in die Oozyten bei korrekter Membraninsertion, lässt sich eindeutig zeigen, dass das Protein an Transportaktivität verloren hat.

Da es sich bei p-wildtyp-ntcp um einen cDNA-Klon handelt, der stromaufwärts von einem T3-Promoter flankiert ist, ließ sich durch *in vitro*-Transkription mit der T3 RNA-Polymerase RNA von dem p-wildtyp-ntcp gewinnen. Um diese von der zellulären mRNA zu abzugrenzen, soll sie im folgenden als cRNA (copy-RNA) bezeichnet werden.

In den folgenden Untersuchungen wurde das Substrat Taurocholat als Tritium-markiertes [<sup>3</sup>H]Taurocholat eingesetzt, so dass es sich im Szintillationscounter nachweisen ließ.

#### **4.5.1 *In vitro*-Transkription**

Um die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die Oozyten, injiziert mit der Wildtyp-Ntcp und der mutierten cRNA messen zu können, musste die DNA der Mutanten und des Wildtyps in RNA transkribiert werden. Von den zwei Promotoren des pBlueskript KS+ lag der T3-Promotor stromaufwärts des Inserts. Die linearisierte DNA wurde mit der DNA-abhängigen T3-RNA-Polymerase inkubiert (rekombinante T3-Phagen RNA-Polymerase) und die Transkripte über Sephadex G-50 Säulen von nicht polymerisierten Nukleotiden gereinigt.

##### **4.5.1.1 Linearisierung der Plasmide**

Als erster Schritt mussten die Klone, deren Sequenz die gewünschte Mutation aufwies, linearisiert werden. Dies erfolgte wieder mit *PvuI*. Es wurden 5 µg DNA mit 4 µl Puffer R+, 3 µl *PvuI* (15 U) und ddH<sub>2</sub>O zu einem Endvolumen von 40 µl gemischt und 2 h bei 37°C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 1,6 µl (~ 200 ng) auf ein 1% Agarosegel aufgetragen um den Verdau zu kontrollieren. Der Rest des Ansatzes wurde mit 61,6 µl ddH<sub>2</sub>O verlängert

und mit 100 µl Phenol versetzt. Nach kräftigem Vortexen wurde 1 min bei 14.500 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgezogen, in ein neues Gefäß gegeben und der Vorgang wiederholt. Die wässrige Phase wurde wieder in ein neues Gefäß gegeben und mit 10 µl 3 M Natriumacetat versetzt. Nach Zugabe von 250 µl 100% Ethanol wurde 15 min bei 14.500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 300 µl 70% Ethanol bei 14.500 x g 15 min gewaschen. Nach dem Abziehen des Überstandes wurde das Pellet 5 min in der SpeedVac getrocknet und in 5 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Um den vollständigen Verdau der DNA zu kontrollieren, wurde die DNA auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Hierfür wurde 1 µl der Lösung mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl verlängert und mit 2 µl Loading Dye versetzt. Die Analyse erfolgte analog zu 4.3.3.

#### 4.5.1.2 *in vitro*-Transkriptionsreaktion

Für die eigentliche Transkription wurde folgender Ansatz pipettiert:

DNA	5,00 µl
ddH <sub>2</sub> O	16,78 µl
Dithiothreitol 100 mM	5,00 µl
ATP 10 mM	2,50 µl
GTP 10 mM	2,50 µl
CTP 10 mM	2,50 µl
UTP 10 mM	0,50 µl
capping analogue 10 mM	2,50 µl
5 x transcription buffer	10,00 µl
RNAsin (40 u/µl)	1,25 µl
T3 RNA-Polymerase (17 u/µl)	1,47 µl

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden 1 U DNase und 50 U RNAsin (Rnase-Inhibitor) zugegeben und weitere 15 Min bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurden die QuickSpin™ Columns vorbereitet, indem man den Überstand ablaufen ließ und sie zweimal bei 1.100 x g zentrifugierte, wobei zwischen jedem Schritt die Vorlage entleert werden musste.

Der Ansatz wurde mit 100 µl ddH<sub>2</sub>O verlängert und zweimal mit 100 µl Phenol gewaschen. Nach der zweiten Phenolisierung wurde der wässrige Überstand auf die Säulen gegeben und diese 4 Min bei 1.100 x g zentrifugiert.

Das Eluat wurde mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat und mit drei Volumina 100% Ethanol gefällt. Die RNA wurde bei 14.500 x g in der Tischzentrifuge sedimentiert und mit 300 µl 70% Ethanol bei 14.500 x g gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in der SpeedVac getrocknet. Die RNA wurde in 10 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen wovon 1 µl zur Konzentrationsbestimmung verwendet wurde. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte analog der der DNA. Die Konzentration wurde berechnet nach:

$$\text{Konzentration}[\mu\text{g} / \text{ml}] = \frac{\text{Absorption}[260\text{nm}] \cdot 40 \cdot \text{gemessenesVolumen}}{\text{eingesetztesVolumen}}$$

200ng der cRNA wurden auf einem 1% Agarosegel analysiert. Die RNA wurde auf 0,1 µg/µl mit ddH<sub>2</sub>O eingestellt und in 5 µl Aliquots bei -70°C gelagert.

#### 4.5.2 Präparation der *X. laevis*-Oozyten

Für die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmemessungen wurden *X. laevis*-Oozyten operativ gewonnen. Die Oozyten wurden mittels Kollagenase aus dem Eierstockgewebe isoliert.

##### Lösungen:

##### OR-2-Puffer

NaCl	82,5 mM
Hepes	5,0 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,0 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 mM
mit KOH pH 7,8 eingestellt	

modifizierte Barth's-Lösung

NaCl	88,00 mM
Hepes	15,00 mM
NaHCO <sub>3</sub>	2,40 mM
KCl	1,00 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,30 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,41 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,82 mM

mit KOH pH 7,6 eingestellt

Die Frösche wurden zur Betäubung in ein Becherglas mit 0,1% Tricain in Leitungswasser (ca. 1 Liter) gesetzt. Während der gesamten Präparation und der späteren Haltung der Oozyten war darauf zu achten, dass ihre Temperatur nicht über 18°C anstieg, da dies zu vermehrtem Verlust an Oozyten führte. Falls die Betäubungsmittel-Lösung wärmer als 18°C war, wurde sie mit etwas Eis auf die gewünschte Temperatur gebracht. In dieser Narkoselösung wurde der Frosch belassen, bis er sich widerstandslos auf den Rücken drehen ließ. Anschließend wurde er mit dem Rücken auf ein Eisbett gelegt. Um Zugang zur Bauchhöhle zu verschaffen, erfolgte seitlich der Medianen am Abdomen ein Hautschnitt von 1 cm in lateromedialer Richtung. Die Bauchdecke wurde mit einem Scherenschlag durchtrennt. Das Ovar mit den durch die Hülle sichtbaren Oozyten wurde mittels einer Pinzette vorgelagert und portionsweise mit einer Schere abgetrennt. Das gewonnene Gewebe wurde in auf Eis gekühltes OR-2-Medium gegeben. Hier wurde es vorsichtig vorzerkleinert, wobei möglichst wenig Oozyten zerstört werden durften. In einen 100 ml Erlenmeyerkolben wurden 20 mg Kollagenase eingewogen und in 5 ml OR-2-Medium gelöst. In einem skalierten Röhrchen wurden die Oozyten mit OR-2-Medium auf 5 ml aufgefüllt und zu der Kollagenaselösung gegeben. Dieser Ansatz wurde in einem auf 18°C temperierten Wasserbad für eine Stunde sachte geschwenkt. Nach Ablauf der Stunde wurde kontrolliert, ob sich die Oozyten vereinzelt hatten. Lagen sie zum größten Teil vereinzelt vor, wurden sie gewaschen. Dafür wurde die Kollagenaselösung abgegossen und durch etwa 20 ml OR-2-Medium ersetzt. Die Oozyten wurden geschwenkt und der Überstand abgegossen. Dies wurde insgesamt dreimal durchgeführt und fünfmal unter Verwendung modifizierter Barth-Lösung mit Gentamicin (50 µg/ml) wiederholt.

Tabelle 12: Morphologische Differenzierungsmerkmale der *X. laevis*-Oozyten

Stadium	Farbe/Pigmentierung	Größe [ $\mu\text{m}$ ]
I	transparent	50-100
II	durchscheinend bis weiß	100-450
III	gesamte Oberfläche gleichmäßig pigmentiert, hell	450-600
IV	Hemisphären differenziert:	600-1000
V	Animale dunkelbraun bis schwarz, vegetative hell	1000-1200
VI	scharfe Trennung zwischen den Hemisphären, animale Hemisphäre hellt sich auf unpigmentiertes Äquatoriales Band zwischen den Hemisphären.	1200-1300

Die isolierten Oozyten wurden bei 18°C in modifizierter Barth-Lösung mit Gentamicin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) gehalten. Veränderte Oozyten wurden beim täglichen Mediumwechsel aussortiert.

Die Entwicklung der Oozyten lässt sich aufgrund ihrer Morphologie in sechs Stadien einteilen (Dumont 1972). Die Unterschiede in der Morphologie der einzelnen Stadien ist in Tabelle 12 angegeben. Zur Injektion wurden Oozyten der Stadien IV-VI verwendet. Durch die Präparationen der Oozyten wurden immer Oozyten verschiedener Entwicklungsstadien gewonnen. Diese wurden randomisiert, so dass eine gleichmäßige Verteilung der Entwicklungsstadien auf die untersuchten Klone erreicht wurde.

### 4.5.3 Mikroinjektion der *X. laevis*-Oozyten

In die Oozyten wurde die cRNA, die durch die *in vitro*-Transkription gewonnen worden war, injiziert. Kontroll-Oozyten wurde die gleiche Menge ddH<sub>2</sub>O injiziert. Dies erfolgte durch eine Nanoliterpumpe, die durch Glaskapillaren, mit denen die Oozyten punktiert wurden, die cRNA-Lösung in die Oozyten presste.

Zur Injektion wurden die Oozyten auf Eis gekühlt. Verwendung fand eine selbst ausgezogene und mit einem Skalpell abgeschnittene Glaskapillare. Der Durchmesser der Kapillare sollte zwischen 30 und 50  $\mu\text{m}$  betragen. Bei zu geringen Durchmessern verstopften die Kapillaren sehr oft und bei zu großen Durchmessern wurden zu viele der Oozyten geschädigt. Die Kapillare wurde mittels einer feinen Kanüle mit Mineralöl gefüllt, auf den Kolben der Nanoliterpumpe aufgesteckt und befestigt. Dann wurde soviel Mineralöl ausgepresst, bis

genügend Aufzugsvolumen für die RNA vorhanden war. Die Nanoliterpumpe wurde in einem Mikromanipulator befestigt und die cRNA oder das ddH<sub>2</sub>O in die Kapillare aufgesaugt.

Um einen Temperaturanstieg während der Injektion zu vermeiden, wurde die Injektion auf einem massiven, auf Eis gekühlten Aluminiumblock von etwa 10 x 10 x 5 cm vorgenommen. Die Oozyten wurden auf einem mit Rillen versehenen Schlitten, der sich in einer Petrischale mit modifiziertem Barth-Puffer befand, vorgelegt. Die Spitze der Kapillare wurde in die Oozyten eingestochen und die gewünschte Menge RNA injiziert. Bei richtiger Applikation ließ sich beobachten, dass sich die Oozyten während der Injektion etwas aufblähten.

Die injizierte Menge an cRNA betrug in allen Standardversuchen 2,3 ng pro Oozyte. In den Versuchen, bei denen die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in Abhängigkeit von der Menge injizierter RNA überprüft werden sollte (vgl. 5.5.2), wurden 0,46 ng, 0,92 ng, 2,3 ng, 4,6 ng oder 6,9 ng eingesetzt.

#### **4.5.4 Inkubation der Oozyten**

Nach der Injektion wurden die Oozyten bei 18°C 48 h inkubiert, wobei das Medium einmal täglich gewechselt wurde. Danach erfolgte die Bestimmung der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die Oozyten.

#### **4.5.5 Messung der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in Oozyten**

##### **4.5.5.1 [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme von Oozyten in Na<sup>+</sup>-haltigem und Na<sup>+</sup>-freiem Medium**

Die injizierten Oozyten wurden in einer 5 µM [<sup>3</sup>H]Taurocholat-Lösung inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Oozyten, injiziert mit Wildtyp-Ntcp cRNA, und als Negativkontrolle ddH<sub>2</sub>O-injizierte Oozyten eingesetzt. Als Ersatz für Natriumchlorid wurde Cholinchlorid verwendet.

Lösungen:Na<sup>+</sup>-haltiges Inkubationsmedium mit [<sup>3</sup>H]Taurocholat

NaCl	100 mM
Hepes/Tris pH 7,5	10 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
[ <sup>3</sup> H]Taurocholat	10 μM

Na<sup>+</sup>-freies Inkubationsmedium mit [<sup>3</sup>H]Taurocholat

Cholinchlorid	100 mM
Hepes/Tris pH 7,5	10 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
[ <sup>3</sup> H]-Taurochoat	10 μM

Na<sup>+</sup>-haltiges Inkubationsmedium ohne [<sup>3</sup>H]Taurocholat

NaCl	100 mM
Hepes/Tris pH 7,5	10 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

Na<sup>+</sup>-freies Inkubationsmedium ohne [<sup>3</sup>H]Taurocholat

Cholinchlorid	100 mM
Hepes/Tris pH 7,5	10 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

### Stopplösung

Cholinchlorid	100 mM
Hepes/Tris pH 7,5	10 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Taurocholat	1 mM

### 10%ige SDS-Lösung

Nach Ablauf der Expressionszeit von 48 h wurden die Oozyten auf Eis gestellt und anschließend in dem jeweiligen [<sup>3</sup>H]Taurocholat-freien Inkubationsmedium gewaschen. Zu diesem Zweck wurden sie mit einer Pipette in etwa 20 ml der entsprechenden Lösung überführt, leicht geschwenkt und dann wieder mit einer Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß mit Waschlösung überführt. Die überstehende Waschlösung wurde mit einer Pipette möglichst vollständig abgesaugt und die Oozyten schließlich mit 50 µl der jeweiligen [<sup>3</sup>H]Taurocholat-freien Lösungen überschichtet.

Zum Beginn der Messung wurden 50 µl Inkubationsmedium mit 10 µM [<sup>3</sup>H]Taurocholat zugegeben, entspricht 500 pmol mit einer Aktivität von 1 µCi [<sup>3</sup>H]Taurocholat, so dass sich ein Endvolumen von 100 µl mit einer Konzentration von 5 µM [<sup>3</sup>H]Taurocholat einstellte. Die Oozyten wurden in einem Wasserbad bei 25°C 30 min inkubiert.

Danach wurde die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme durch 3 Maßnahmen beendet:

- Die Temperatur wurde auf <4°C erniedrigt.
- Das Inkubationsmedium wurde durch Stopplösung ersetzt; diese enthielt 1 mM Taurocholat, wodurch es zu einer kompetitiven Hemmung der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme kam.
- Die Na<sup>+</sup>-Konzentration wurde durch wiederholtes Überführen der Oozyten in frische, Na<sup>+</sup>-freie Stopplösung erniedrigt.

Dabei wurde so vorgegangen, dass zu den Oozyten in den 100 µl Inkubationsmedium 1,5 ml eisgekühlte, Na<sup>+</sup>-freie Stopplösung gegeben wurde. Die Oozyten wurden dann sofort in 5 ml eisgekühlte Stopplösung überführt, ohne mehr als notwendig von dem Inkubationsmedium mit zu überführen. Sie wurden dann noch zweimal in 5 ml neue Stopplösung überführt und auf Eis belassen.

Die Oozyten wurden nun in so genannte Minivials vereinzelt und durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  einer 10%-SDS-Lösung lysiert. Dies dauerte etwa 15 min. Dann wurden 3 ml der Szintillationsflüssigkeit zugegeben, die Vials verschlossen, gevortext und 2 h bei 40°C inkubiert. Die zellassoziierte Radioaktivität der Proben wurde im Szintillationscounter gemessen. Um die Substanzmenge errechnen zu können, die die Oozyten aufgenommen hatten, wurde mit je dreimal 5  $\mu\text{l}$  der Messlösungen ebenso verfahren. Aus diesen Standards mit bekannter Menge an [ $^3\text{H}$ ]Taurocholat ließ sich die Menge an aufgenommenem [ $^3\text{H}$ ]Taurocholat berechnen.

#### **4.5.5.2 [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme in Oozyten in Abhängigkeit von der injizierten cRNA-Menge**

Es wurden Oozyten verwendet, denen gemäß Abschn. 4.5.3, verschiedene Mengen cRNA injiziert worden waren. Folgende Mengen wurden eingesetzt: 0,46 ng, 0,92 ng, 2,3 ng, 4,6 ng und 6,9 ng. Als Negativkontrolle wurden Oozyten mit 50 nl Wasser injiziert.

Die Messung der [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme wurde analog zu Abschn. 5.5.1 in  $\text{Na}^+$ haltigem Medium durchgeführt.

#### **4.5.5.3 Messung der [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme in Oozyten bei verschiedenen $\text{Na}^+$ -Konzentrationen**

Nachdem einige Mutationen am Ntcp die Gallensäuretransportaktivität des Proteins erheblich reduziert haben, stellte sich die Frage, ob diese Mutanten eine andere  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit für den Gallensäuretransport besitzen als der Wildtyp. Durch die Erhöhung der  $\text{Na}^+$ -Konzentration sollte gezeigt werden, ob bei dem Wildtyp-Ntcp und den transportdefizienten Mutanten eine unterschiedliche Abhängigkeit der [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme von der  $\text{Na}^+$ -Konzentration besteht. Die  $\text{Na}^+$ -Konzentration wurde dafür über den physiologischen Wert hinaus auf 200 mM erhöht. Diese maximale Konzentration von 200 mM ergab sich aus Vorversuchen, in denen überprüft worden war, welche  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen von den Oozyten toleriert werden.

Die Versuche wurden analog zu Abschn. 4.5.5.1 durchgeführt, wobei aber anstatt der dort angegebenen Inkubationsmedien die anschließend mit a)-f) bezeichneten Lösungen mit

steigenden Na<sup>+</sup>-Konzentrationen bis 200 mM eingesetzt wurden. Die Differenz zu 200 mM NaCl wurde jeweils mit Cholinchlorid aufgefüllt.

### Lösungen

#### Lösungen ohne [<sup>3</sup>H]Taurocholat

	a)	b)	c)	d)	e)	f)
NaCl	0 mM	25 mM	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Cholinchlorid	200 mM	175 mM	150 mM	100 mM	50 mM	0 mM
Hepes/Tris pH 7,5	10 mM					
KCl	2 mM					
CaCl <sub>2</sub>	1 mM					
MgCl <sub>2</sub>	1 mM					

#### Lösungen mit [<sup>3</sup>H]Taurocholat

	a)	b)	c)	d)	e)	f)
NaCl	0 mM	25 mM	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Cholinchlorid	200 mM	175 mM	150 mM	100 mM	50 mM	0 mM
Hepes/Tris pH 7,5	10 mM					
KCl	2 mM					
CaCl <sub>2</sub>	1 mM					
MgCl <sub>2</sub>	1 mM					
[ <sup>3</sup> H]-Taurocholat	10 µM					

## **4.6 Statistische Auswertung**

Die Datenhaltung und -auswertung im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen und auf den Rechnern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die ststistische Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogramm pakets BMDP/Dynamic, Release 7.0,

Microsoft<sup>TM</sup> Excel 1997 und GraphPad Prism 3.0 durchgeführt. Die grafischen Abbildungen wurden mit Microsoft<sup>TM</sup> Excel 1997 und GraphPad Prism 3.0 erstellt.

Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenumfänge berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten ( $\bar{x}_g$ ) und Streufaktoren (SF), dargestellt in Form von Intervallen ( $\bar{x}_g / \text{SF}$ ;  $\bar{x}_g \cdot \text{SF}$ ), vorgenommen.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanz wurde das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  zugrundegelegt, d.h. Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Wenn möglich wurde der exakte p-Wert angegeben.

Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei quantitativen Merkmalen mit Hilfe von Regressionsanalysen mit dem Programm GraphPad Prism 3.0.

#### **4.7 Immunhistologie**

Da nicht nur funktionelle Störungen durch die Mutationen hervorgerufen werden können, sondern die Beeinträchtigung einer [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die injizierten Oozyten auch durch Störungen in der Proteinbiosynthese, der Faltung der Proteine oder Insertion der Proteine in die Membran der Oozyten verursacht sein kann, wurde ihre Lokalisation in der Membran untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Klone, die eine verminderte [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme zeigten, in der kodierenden Region um eine Sequenz verlängert, die für das acht Aminosäuren lange FLAG<sup>®</sup>-Peptid (DYKDDDDK) kodiert. Diese acht Aminosäuren bilden das Epitop, das von dem Anti-FLAG M2 monoklonalen Antikörper erkannt wird. Dieser wiederum wurde durch Fluoreszenz-markierte Antikörper (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate) nachgewiesen. Zum Schneiden der 5 µm Schnitte wurden die Oozyten in Technovit 7100 eingebettet. Dieser Kunststoff härtet erst nach Zugabe der Härter I und II aus.

### 4.7.1 Injektion, Präparation und Fixation der Oozyten

#### Lösungen:

##### K-Aspartat-Lösung

K-Aspartat	200 mM
Hepes/KOH pH 7,4	5 mM

##### Dent's Fixans

Methanol	80%
DMSO	20%

Pro Klon (wildtyp-ntcpFLAG20.4, d24nFLAG21.3, d115nFLAG22.4 und e257qFLAG23.1) wurden, wie in Abschn. 4.5.3 beschrieben, 30 Oozyten injiziert. Nach 48 h wurde zur funktionellen Kontrolle mit etwa 10 Oozyten für jeden Klon eine [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmemessung gemäß Abschn. 4.5.5.1 durchgeführt. Die übrigen Oozyten wurden in eisgekühlter K-Aspartat-Lösung etwa 5 min eingelegt. Danach wurde mechanisch mit zwei Pinzetten (Dumont Medical 5/45) die Vitellinmembran entfernt. Schließlich wurden die Oozyten in 2 ml Dent's Fixans überführt und mindestens 2 h fixiert.

### 4.7.2 Antikörperreaktionen

#### Lösungen:

##### Phosphate-buffered-saline (PBS)

NaCl	137,00 mM
KCl	2,68 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,30 mM
pH 7,4	

### PBS/NPS

PBS	90%
Normales Pferde Serum	10%

#### **4.7.2.1 Primäre Antikörperreaktion**

Die mit der vcRNA eines Ntcp-Klons injizierten Oozyten wurden in 1 ml einer absteigenden Methanol-Reihe in PBS (90, 70, 50, 30% Methanol) je 10 min inkubiert und anschließend dreimal 10 min in PBS gewaschen. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Dieser wurde 1:1.000 in PBS/NPS verdünnt und die Oozyten in 500 µl der Antikörper-Lösung bei 4°C 12 h inkubiert.

Es folgten 11 Waschschrte in jeweils 2 ml PBS: 3 x 5 Min, 3 x 15 Min, 3 x 15 Min, 3 x 30 Min und 2 x eine Stunde.

#### **4.7.2.2 Sekundäre Antikörperreaktion**

Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte bei einer Verdünnung von 1:200 in PBS/NPS für 2 h bei RT. Alle weiteren Schritte wurden unter Lichtabdeckung vorgenommen, um die Fluoreszenzfarbstoffe vor dem Ausbleichen zu schützen. Danach wurden die Oozyten 6 x 10 min und anschließend übernacht mit jeweils 2 ml PBS gewaschen.

#### **4.7.3 Einbettung in Technovit 7100 und Schneiden der Präparate**

##### Lösungen:

##### 3,7% Formaldehyd/PBS

Formaldehyd 37%	10%
PBS	90%

Infiltrationslösung A

Technovit 7100	50%
Ethanol	50%

Infiltrationslösung B

Technovit 7100 + Härter I

Am nächsten Morgen wurden die Oozyten mit 3,7% Formaldehyd/PBS für 30 Min nachfixiert und anschließend mit einer aufsteigenden alkoholischen Reihe entwässert (30% Ethanol/PBS, 50% Ethanol/PBS, 70% Ethanol/ddH<sub>2</sub>O, 90% Ethanol/ddH<sub>2</sub>O, 100% Ethanol für je 30 Min).

Anschließend wurden die Oozyten für 2 h bei RT in 2 ml Infiltrationslösung A überführt. Nach Ablauf der 2 Stunden wurde die Lösung abgegossen und die Oozyten mit 2 ml Infiltrationslösung B überschichtet. Diese Lösung wurde nach 2 Stunden erneuert und die Oozyten wurden übernacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Lösung B ein weiteres Mal erneuert.

Als Gussform für die eingebetteten Oozyten wurden 1,5 ml Eppendorf-Gefäße verwendet. Diese wurden zuerst mit 150 µl Technovit 7100 + Härter I + Härter II befüllt, damit die Oozyten nicht in der Spitze des Gefäßes zu liegen kamen. Nach dem Aushärten der Vorlage wurde die Infiltrationslösung B von den Oozyten abgesaugt und durch 2 ml Technovit 7100 + Härter I + Härter II ersetzt. Nun wurden die Oozyten mit dem Kunststoff in die vorbereiteten Eppendorf-Gefäße überführt und so angeordnet, dass sie sich nicht berührten.

Nach dem Aushärten des Kunststoffs wurden die Eppendorf-Gefäß aufgeschnitten und die Kunststoffkegel mit den Oozyten entnommen. Mit einer feinen Säge (Sägeblatt einer Eisensäge) wurde die Spitze der Kegel soweit abgetrennt, dass die Oozyten noch nicht angeschnitten wurden. Diese Kegel wurden mit Karoseriespachtelmasse in den Einbettkassetten fixiert. Nach dem Aushärten der Spachtelmasse wurden die Präparate geschnitten.

Von den Präparaten wurde in 10 µm Schnitten soviel abgenommen, bis die Oozyten im mittleren Drittel angeschnitten waren. Für die eigentliche Untersuchung wurden 5 µm Schnitte angefertigt. Zum Entspannen der Schnitte wurde ein Tropfen ddH<sub>2</sub>O auf einen Objektträger gegeben, der Schnitt mit der Pinzette vom Messer abgenommen und auf das Wasser gegeben, wobei er sich entfaltete. Nach Abschneiden des Wassers wurden die

---

Präparate bei RT getrocknet. Anschließend wurden sie mit Deckgläschen und Entellan<sup>®</sup> eingedeckelt. Nach dem Trocknen wurde mikroskopiert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Alignment von neun SBAT-Aminosäuresequenzen zur Identifikation konservierter negativ geladener Aminosäuren

E47

```

mml1 1 -----MEAHNVSAPFNFSLPPGFGHRAITDTALSVILVVMLLIIMLSLGCTMEFSKIK
mml2 1 -----MEAHNVSAPFNFSLPPGFGHRAITDTALSVILVVMLLIIMLSLGCTMEFSKIK
rnl 1 -----MEVHNVSAPFNFSLPPGFGHRAITDKALSIILVIMLLIIMLSLGCTMEFSKIK
ocl 1 -----MEAHNESAPFNFTLPPNFGKRPTDLALSVILVIMLLIIMLSLGCTMEFSKIK
hsl 1 -----MEAHNASAPFNFTLPPNFGKRPTDLALSVILVIMLLIIMLSLGCTMEFSKIK
rna 1 -MDNSSVCSPNATFCEGDSCLVTESNFNAILSTVMSTVLTILLAMVMFSMGCNVEINKFL
mma 1 -MDNSSVCPPNATVCEGDSVVPESNFNAILNTVMSTVLTILLAMVMFSMGCNVEVHKFL
oca 1 MSNLTVGC LANATVCEGASCVAPESNFNAILSVVLTSTVLTILLALVMFSMGCNVEIKKFL
hsa 1 -MNDPNSCVDNATVCSGASCVVPESNFNAILSVVLTSTVLTILLALVMFSMGCNVEIKKFL
    
```

```

mml1 53 AHFWKPKGVIIAIVAQYGIMPLSAFLLGKVFHLTSEALAILICGCSPGGNLSNLFITLAM
mml2 53 AHFWKPKGVIIAIVAQYGIMPLSAFLLGKVFHLTSEALAILICGCSPGGNLSNLFITLAM
rnl 53 AHLWKPKGVIVALVAQYGFIMPLAFLLGKVFHLTSEALAILICGCSPGGNLSNLFITLAM
ocl 53 AHFLKPKGLAIALVAQYGIMPLTAFVLGKVFRLMNI EALAILICGCSPGGNLSNLFITLAM
hsl 53 AHLWKPKGLAIALVAQYGIMPLTAFVLGKVFRLKNI EALAILICGCSPGGNLSNLFITLAM
rna 60 GHIKRPWGI FVGF L C QFGIMPLTGFILSVASGILPVQAVVVLIMGCCPGCTGSNITLAYWI
mma 60 GHIKRPWGI FVGF L C QFGIMPLTGFILSVASGILPVQAVVVLIMGCCPGCTGSNITLAYWI
oca 61 GHIRRPWGI FVGF L C QFGIMPLTGFVLAFAFGIMPIQAVVVLIMGCCPGCTASNITLAYWV
hsa 60 GHIKRPWGI CVGF L C QFGIMPLTGFILSVAFDILPQAVVVLIMGCCPGCTASNITLAYWV
    
```

D115

D147

```

mml1 113 KGD MNLSIVMTTCSSFTALGMMPLLLYIYSKGIYDGLKDKVPYK GIMLSLVMVLI PCAI
mml2 113 KGD MNLSIVMTTCSSFTALGMMPLLLYIYSKGIYDGLKDKVPYK GIMLSLVMVLI PCAI
rnl 113 KGD MNLSIVMTTCSSFSALGMMPLLLYIYSKGIYDGLKDKVPYK GIMISLVI VLI PCTI
ocl 113 KGD MNLSIVMTTCSTFLALGMMPLLLYIYSRGIYDGLKDKVPYK GIMISLVMILIPCTI
hsl 113 KGD MNLSIVMTTCSTFCALGMMPLLLYIYSRGIYDGLKDKVPYK GIVISLVLVLI PCTI
rna 120 DGDMDLSVSM TTCSTLLALGMMPLCLFIYTKMWVD-SGTIVIPYDSIGISLVALVIPVSI
mma 120 DGDMDLSVSM TTCSTLLALGMMPLCLFVYTKMWVD-SGTIVIPYDSIGISLVALVIPVSI
oca 121 DGDMDLSVSM TTCSTLLALGMMPLCLLYYTKMWVD-SGTIVIPYDNIGTSLVALVIPVSI
hsa 120 DGDMDLSVSM TTCSTLLALGMMPLCLLIYTKMWVD-SGSIVIPYDNIGTSLVALVIPVSI
    
```

```

mml1 173 GIFLKS KRPHYVPYVLKAGMIITFSLSVAVITVLSVINVCNSIMFVMTPHLLATSSLMPFT
mml2 173 GIFLKS KRPHYVPYVLKAGMIITFSLSVAVITVLSVINVCNSIMFVMTPHLLATSSLMPFT
rnl 173 GIVLKS KRPHYVPYVILKGGMIITFLLSVAVITVLSVINVCNSIMFVMTPHLLATSSLMPFS
ocl 173 GIILKS KRPHYVPYVIVKVGIIITFSLISAVAVLSAINVCNSIMFVMTPHYLLATSSLMPFI
hsl 173 GIVLKS KRPHYVMRYVIVKGGMIITLILCSVAVITVLSAINVCNSIMFAMTPLLATSSLMPFI
rna 179 GMFVNHKWPQKAKIILKIGSIAGAILIVL IAVVGGI LYQS--AWIIEPKLWIIGTIFPIA
mma 179 GMFVNHKWPQKAKIILKIGSITGVILIVL IAVVGGI LYQS--AWIIEPKLWIIGTIFPIA
oca 180 GMFVNHKWPQKAKIILKVGSIAGAVLIVL IAVVGGI LYQS--AWIIEPKLWIIGTIFPMA
hsa 179 GMFVNHKWPQKAKIILKIGSIAGAILIVL IAVVGGI LYQS--AWIIEPKLWIIGTIFPVA
    
```



Kaninchens (*O. cuniculus*) und des Menschen (*H. sapiens*) sowie den Aminosäuresequenzen der Asbts der Ratte (*R. norvegicus*), der Maus (*M. musculus*), des Kaninchens (*O. cuniculus*) und des Menschen (*H. sapiens*) verglichen, um konservierte Aminosäuren zu identifizieren. Der Sequenzvergleich wurde bewusst unter Ausschluss der Sequenz des Asbt des Hamsters durchgeführt, da diese Aminosäuresequenz, wie schon in der Einleitung erwähnt, nicht eindeutig zu einer der beiden Hamsterarten zugeordnet werden kann. In der Datenbank des National Center of Biotechnology Information (NCBI) finden sich drei Einträge, die die von Wong et al. 1994 veröffentlichte Sequenz wiedergeben. Unter den Accession Nrn. aaa18640 und q60414 wird *Cricetulus griseus* und unter a49876 *Mesocricetus auratus* als Quellorganismus angegeben. Die beiden Gattungen *Cricetulus* und *Mesocricetus* gehören zu der Subfamilie *Cricetinae* in der Familie der *Muridae*. Da die Sequenz keiner Spezies zuzuordnen war, wurde sie hier aus formalen Gründen nicht berücksichtigt. Eine Einbeziehung der Sequenzen in das Alignment hätte das Ergebnis jedoch auch nicht beeinflusst.

Tatsächlich ergab der Sequenzvergleich der SBATs (Ntcps und Asbts) 5 negativ geladene Aminosäuren, die in allen Sequenzen konserviert waren (Abbildung 3). Dies sind die negativ geladenen Aminosäuren E47, D115, D147, E257 und E277. D147 war nicht als Aspartat konserviert, sondern wurde beim Ntcp des Kaninchens (*O. cuniculus*) durch ein Glutamat ersetzt. Da dies zu keiner Veränderung hinsichtlich der Ladung führt, weil beide aufgrund der pK-Werte ihrer  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Carboxylgruppe bei physiologischem pH-Wert dissoziiert vorliegen und Aspartat und Glutamat sich gegenseitig ersetzen können (Murtazina et al. 2001, Mogi et al. 1988), wurde D147 mit in die Untersuchungen einbezogen.

Innerhalb der Mitglieder jeweils einer SBAT-Untergruppe (Ntcps bzw. Asbts) sind jedoch noch weitere negative Ladungen konserviert. Sie werden im Folgenden mit der analogen Position im Ratten-Ntcp bezeichnet.

Unter den Ntcps sind alle negativen Ladungen, außer denen im C-Terminus (ab Position 307), konserviert. Dies sind die Aminosäuren E2, D24, E89, D149, D152 und E296.

Unter den Asbts ist an Position 113 ein Aspartat und an Position 278 eine negative Ladung (Aspartat oder Glutamat) sowie im C-Terminus an Position 317 ein Glutamat sowie eine negative Ladung (Aspartat oder Glutamat) an Position 320, 323 und 327 konserviert.

Unter Berücksichtigung dieser Analyse wurden sieben negativ geladene Aminosäuren des Ntcp der Ratte einzeln in ihre neutralen Analoge überführt. Dies waren D24, E47, E89, D115, D147, E257 und E277. Zusätzlich wurden zwei Doppelmutanten E47/D115 und D24/E89 charakterisiert

## 5.2 Site-directed Mutagenese

Die sieben Aspartate und Glutamate wurden mit Hilfe der site-directed Mutagenese in ihre Amide mutiert. Die Herstellung der Mutanten erfordert einen 1-Basenaustausch im jeweiligen Codon, wobei gewährleistet sein muss, dass sich keine andere, als die geplante Mutation einschleicht. Durch die verwendete PCR-Technik kann es aber zu zusätzlichen Basenaustauschen oder zum Verlust einer Base kommen. Das Fehlen einer Base in der kodierenden Region verschiebt den offenen Leserahmen, so dass alle folgenden Aminosäuren verändert sind und die Proteinbiosynthese wegen entstandener Stop-Kodons verfrüht abgebrochen wird.

Die Primer wurden daher sorgfältig, unter Berücksichtigung der Herstellerempfehlungen gewählt und die PCR gemäß des Hersteller-Protokolls durchgeführt. Aus den nach der Transformation gewonnenen Kolonien wurden willkürlich sechs ausgewählt, von denen Kulturen angesetzt wurden, aus denen die plasmidale DNA präpariert wurde.

Da sich der Erfolg der Mutation, anders als bei einer Klonierung, nicht durch Restriktionsverdau und Agarosegel-Elektrophorese analysieren lässt, mussten die Inserts der gewonnenen Klone sequenziert werden. Damit gewährleistet war, dass durch die Plasmid-Präparation keine chromosomale sondern nur plasmidale DNA und diese in ausreichender Reinheit gewonnen worden war, wurde sie einem Restriktionsverdau mit *PvuI* unterzogen. Die entstandenen Fragmente wurden anschließend durch Agarosegel-Elektrophorese getrennt und auf ihre Größe untersucht. In diesem Schritt wurde gleichzeitig überprüft, ob die *PvuI*-Schnittstellen, die in der Folge für die Linearisierung des Plasmids bei der *in vitro*-Transkription benötigt wurden, erhalten geblieben waren. Diese liegen außerhalb des Inserts und wurden daher durch die Sequenzierung nicht erfasst.

Nach der Agarosegel-Analyse wurde von jeder Mutation ein Klon ausgewählt und sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte in beiden Richtungen. Nachdem von der Mutation D115N ein fehlerfreier Klon identifiziert worden war, wurde in diesen zusätzlich die Mutation E47Q eingeführt um die Doppelmutation E47Q/D115N zu erstellen. Von den jeweils sechs gepickten Klonen jeder Mutation erwiesen sich nach der Sequenzierung die Klone

e47q1.6

d115n2.1

d147n3.1

e257q6.1

e277q7.1

## e47q/d115n4.1

als fehlerlos und wurden neben den Mutanten des Aspartats 24 (d24n10A2) und des Glutamats 89 (e89q11.2) sowie der Doppelmutante der beiden (d24n-e89q12.III) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frank und Marita Langewische, Gießen) in die weiteren Studien einbezogen.

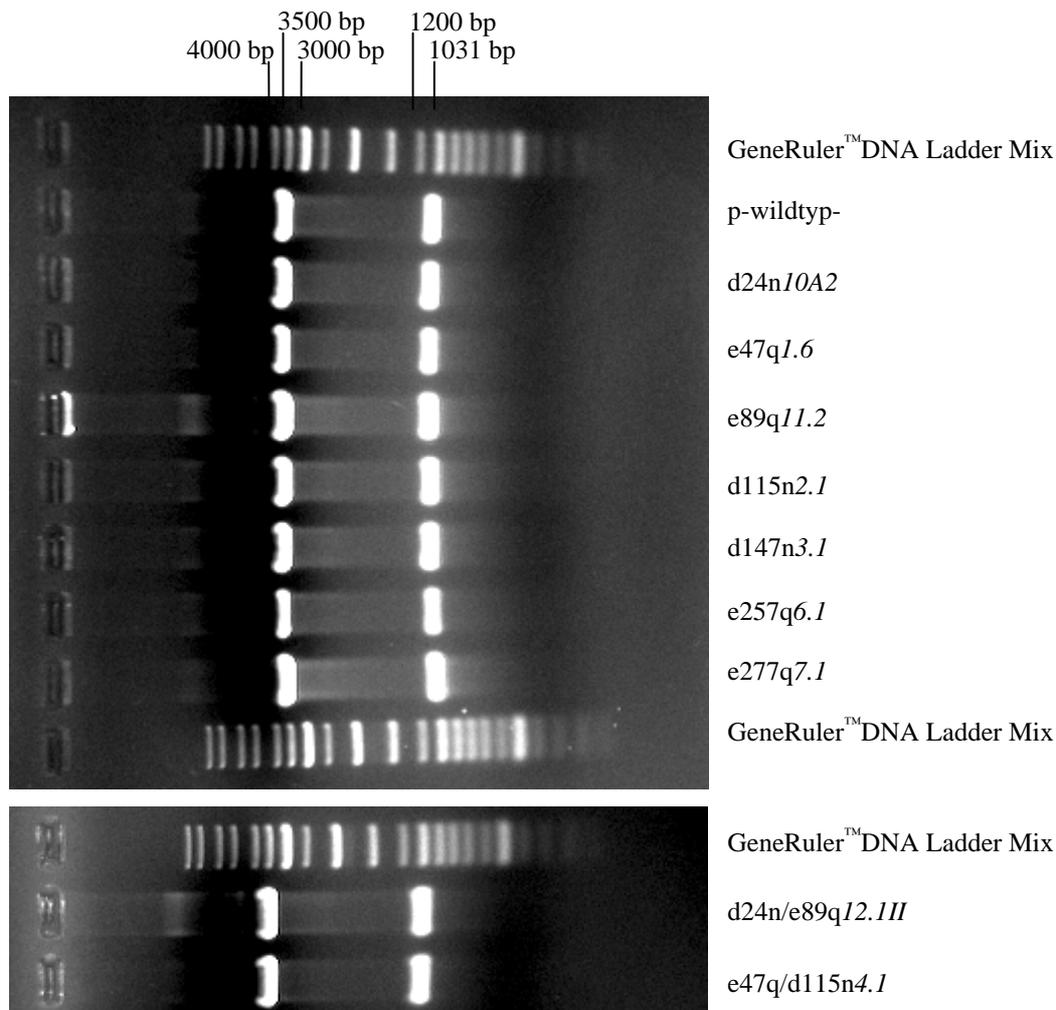


Abbildung 4: Gelelektrophoretische Auftrennung (1% Agarose) des p-wildtyp-ntcp und der Mutanten d24n10A2, e47q1.6, e89q11.2, d115n2.1, d147n3.1, e257q6.1, e277q7.1, e47q/d115n4.1 und d24n/e89Q12.1II nach Verdau mit *PvuI*; Ethidiumbromidfärbung.

Abbildung 4 zeigt die nach *PvuI*-Verdau erhaltenen DNA-Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung. *PvuI* schneidet DNA an der palindromischen Sequenz 5'-CGATCG<sub>3</sub>'. Das Plasmid p-wildtyp-ntcp hat zwei Schnittstellen für *PvuI*, eine bei Position 500 und eine an Position 2416. Dadurch entstehen zwei Fragmente von 1045 und 3548

Basenpaaren. Diese ließen sich in sämtlichen Mutanten anhand der Größenstandards verifizieren.

### 5.3 *in vitro* Transkription

Die oben aufgeführten Mutanten wurden *in vitro* transkribiert. Nach Transkription, Reinigung und Fällung der RNA ergab die Gelelektrophorese der Transkripte in allen Fällen eine eindeutige Bande bei 1,9kb (Abbildung 5).

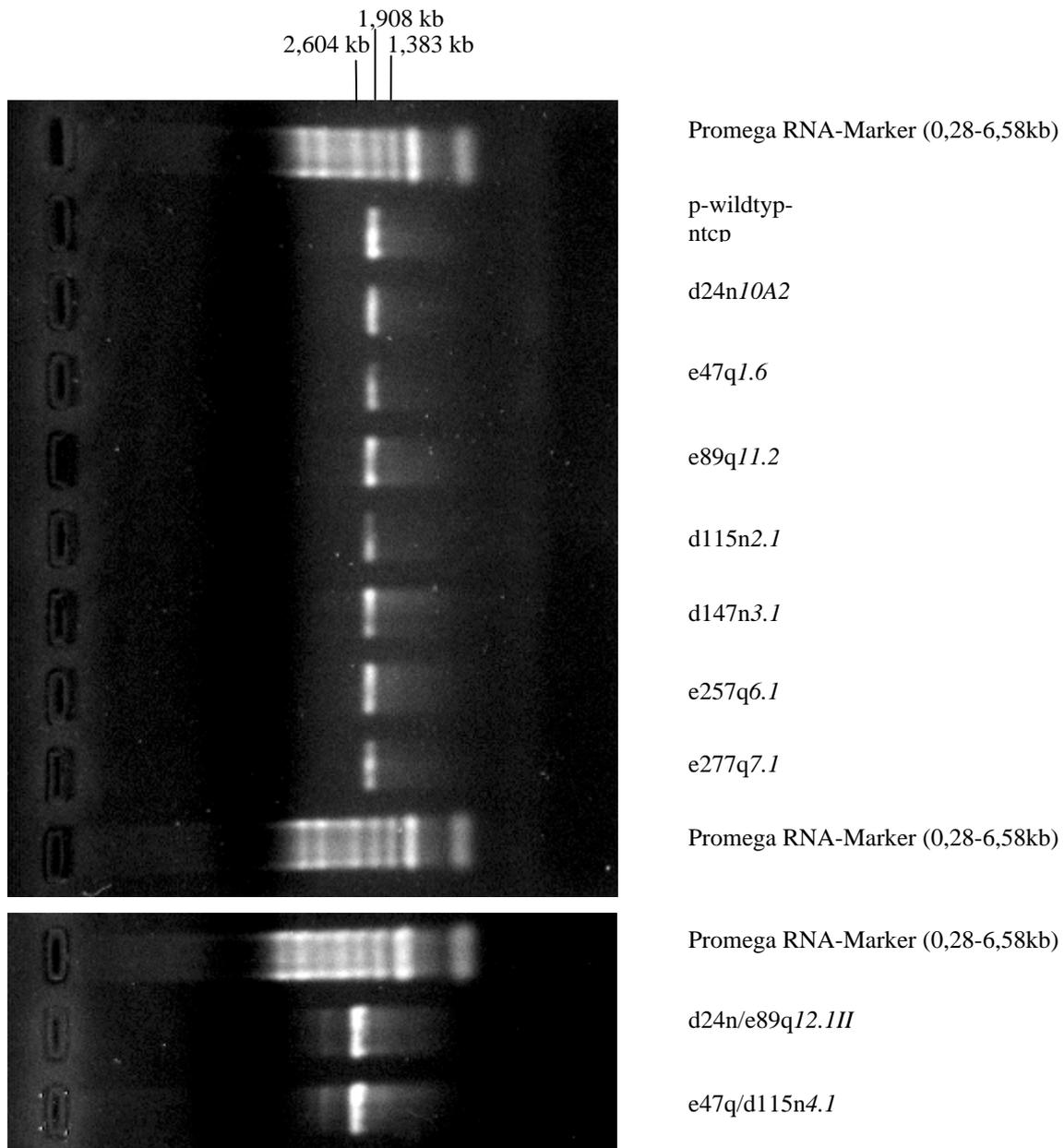


Abbildung 5: Gelelektrophoretische Auftrennung (1% Agarose) der *in vitro*-Transkripte von p-wildtyp-ntcp und der Mutanten d24n/0A2, e47q1.6, e89q11.2, d115n2.1, d147n3.1, e257q6.1, e277q7.1, e47q/d115n4.1 und d24n/e89Q12.1II; Ethidiumbromidfärbung.

#### 5.4 [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme von *X. laevis*-Oozyten, nach Injektion mit cRNA des p-wildtyp-ntcp und der generierten Mutanten

Die Aufnahmeversuche wurden zunächst mit jeder Mutante mindestens zweimal durchgeführt, wobei das p-wildtyp-ntcp als positive Kontrolle eingesetzt wurde. Da es sich bei dem Gallensäuretransport durch den Ratten-Ntcp um einen Gallensäuren/Na<sup>+</sup>-Symport handelt, wurde die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die Oozyten in Na<sup>+</sup>-haltigem Medium und in Na<sup>+</sup>-freiem Medium bestimmt. In dem Na<sup>+</sup>-freien Medium wurde Natrium durch Cholin ersetzt. Durch Subtraktion der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme im Cholin-Medium von der im Na<sup>+</sup>-Medium konnte die Na<sup>+</sup>-abhängige [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme bestimmt werden.

Die ermittelten dpm-Werten der einzelnen Oozyten eines Versuches ergaben keine Standard-Normalverteilungen, sondern schiefe Verteilungen. Die Mittelwerte der Oozyten eines Versuches wurden daher als geometrisches Mittel mit Streufaktor berechnet. Über die spezifische Aktivität ließen sich die aufgenommenen Mengen an [<sup>3</sup>H]Taurocholat in Mol berechnen.

Erwiesen sich die Oozyten, die mit cRNA der Mutanten injiziert waren, in ihrem Na<sup>+</sup>-abhängigen [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmeverhalten bezogen auf den Wildtyp als unverändert, so wurden die Mutanten als voll funktionell angesehen. Zeigten sie eine verminderte [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme, wurde die *in vitro*-Transkription wiederholt und die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmeversuche mit der neuen cRNA wiederholt, um Transkriptionsfehler als Ursache für die verminderte [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme ausschließen zu können. Bestätigte sich die reduzierte Aufnahme auch bei wiederholter Transkription, wurden die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmeversuche mindestens sechs Mal durchgeführt. Die durch den Wildtyp-Ntcp und seine Mutanten vermittelte Natrium-abhängige [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die Oozyten ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Na<sup>+</sup>-abhängige [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in fmol/Oozyte in *X. laevis*-Oozyten, injiziert mit 2,3 ng cRNA, kodierend für den Wildtyp-Ntcp und für die von ihm abgeleiteten Mutanten, bei einer [<sup>3</sup>H]Taurocholeat-Konzentration von 5 µM (fmol [<sup>3</sup>H]Taurocholeat/Oozyte x 30 min). Der Wert einer Messung stellt das geometrische Mittel von 10-15 Oozyten dar.

	Wildtyp- Ntcp	D24N	E47Q	E89Q	D115N	D147N	E257Q	E277Q	E47Q/ D115N	D24N/ E89Q
Geomittel	1.557,8	143,6	1.603,6	1.167,7	145,0	1.766,1	29,7	1.631,4	20,4	43,9
Streufaktor	1,81	1,76	1,80	1,70	2,14	1,45	1,96	2,56	1,89	1,10
Messung:										
15. 07. 00	3517				223					
28. 08. 00	1204		877		197	1650				
04. 09. 00	1402		1111		141	1607				
30. 09. 00	1607		2009		222	2023				
09. 10. 00	2044		1823		303					
09. 11. 00	789	64	865	1215		1024				
20. 11. 00	1741	90	2948	2035		2457			35	53
30. 11. 00	687	239		768	40		21		18	58
14. 01. 01	2847	216		1787	327		110	3755		
v1	3203	331			189		28			
v2	2427	257			247		55	2710		
v3	3686	206			179		33			
v5	1598	300			89		48			

Da der absolute Wert in fmol/Oozyte x 30 min der untersuchten Klone zwischen den einzelnen Messungen stark variierte, wurde die [<sup>3</sup>H]TC-Aufnahme der Mutanten in Prozent der Aufnahme des an der gleichen Oozytencharge gemessenen Ntcp-Wildtyp angegeben. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 6 dargestellt.

Von den untersuchten Mutationen verursachten fünf eine deutlich verminderte [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme. Dies waren die Mutationen D24N, D115N, E257Q sowie die beiden Doppelmutationen D24N/E89Q und E47Q/D115N, welche aber jeweils eine der bereits allein wirksamen Mutationen enthielten. Von den anderen Mutationen zeigte keine eine signifikante Verringerung der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme im Vergleich zum Wildtyp. Da bei den Doppelmutanten kein deutlich von den jeweils wirksamen Einzelmutanten abweichendes Aufnahmeverhalten im *X. laevis*-Oozyten-Expressionsmodell auftrat, konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die Ntcp-Klone mit den Mutationen

D24N

D115N und

E257Q.

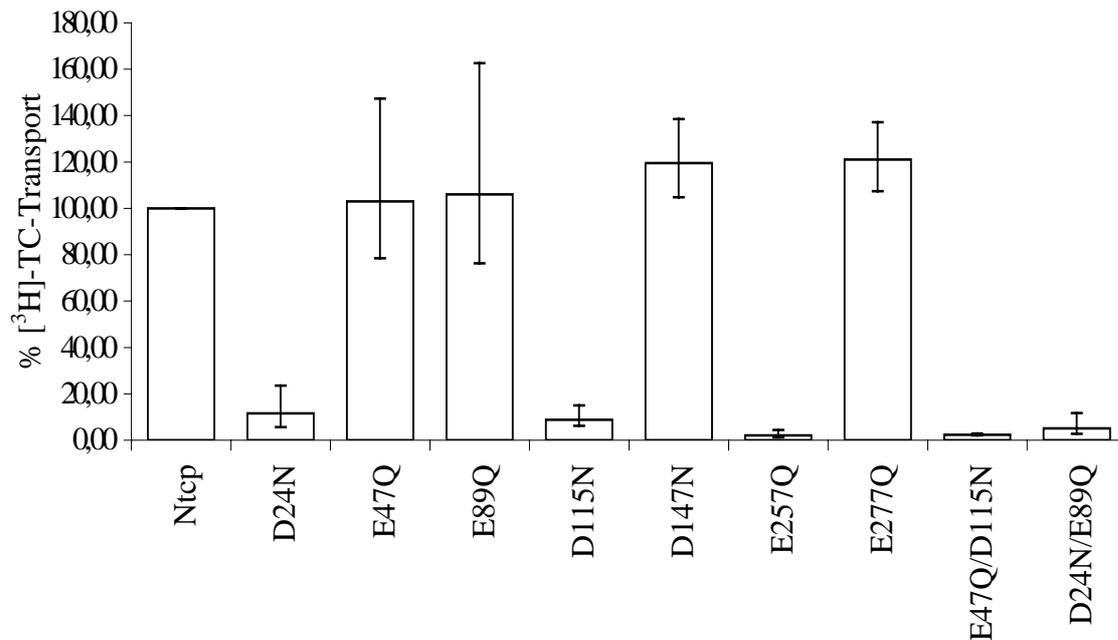


Abbildung 6:  $\text{Na}^+$ -abhängige  $[^3\text{H}]$ Taurocholataufnahme von *X. laevis*- Oozyten, injiziert mit 2,3ng cRNA, kodierend für den Wildtyp-Ntcp und für die von ihm abgeleiteten Mutanten, bei einer  $[^3\text{H}]$ Taurocholat-Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  (in %  $[^3\text{H}]$ Taurocholataufnahme des Wildtyp-Ntcp). p-Werte: D24N < 0,0001; E47Q = 0,8; E89Q = 1,0; D115N < 0,0001; D147N = 0,005; E257Q < 0,0001; E277Q = 0,3; E47Q/D115N = 0,03; D24N/E89Q = 0,1. Die p-Werte wurden bei vergleichsbezogenem Signifikanzniveau ermittelt.

### **5.5 Abhängigkeit der $[^3\text{H}]$ Taurocholataufnahme in *X. laevis*-Oozyten, injiziert mit cRNA von p-wildtyp-ntcp und den Mutanten d24n10A2, d115n2.1 und e257q6.1 von der eingesetzten cRNA-Menge**

Aufgrund der großen Schwankungen in den Einzelmessungen der  $[^3\text{H}]$ Taurocholataufnahme im *X. laevis*-Oozyten-Expressionsmodell war sicherzustellen, dass die gefundenen Daten tatsächlich auf die Veränderungen im Protein zurückzuführen sind und nicht auf Schwankungen in der Expressionsrate, hervorgerufen durch schlechtere cRNA-Qualität oder Fehler bei der Konzentrationsbestimmung der cRNA, beruhen. Daher wurde in weiteren Versuchen überprüft, ob sich die  $[^3\text{H}]$ Taurocholataufnahme in die Oozyten durch die Injektion höherer cRNA-Mengen steigern lässt, beziehungsweise ab welcher cRNA-Menge eine Sättigung (Aufnahme<sub>max</sub>) in der  $[^3\text{H}]$ Taurocholataufnahme auftritt.

Die Aufnahmen des Wildtyp-Ntcp und der drei transportdefizienten Mutanten in Abhängigkeit von der eingesetzten RNA-Menge ist in Abbildung 7 dargestellt. Aus den [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmen der 10-15 *X. laevis*-Oozyten, die mit der gleichen Menge cRNA injiziert wurden, wurde das geometrische Mittel und der Streufaktor bestimmt. Über die ermittelten Werte wurde eine Regressionsanalyse auf Basis der Mitscherlich-Gleichung ( $y = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min})(1 - e^{-cx})$ ) durchgeführt.

Aus Abbildung 7 lässt sich ersehen, dass nach Injektion von 2,3 ng cRNA die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme noch nicht im Bereich der Sättigung liegt. Dies ist besonders deutlich bei dem Klon e257q6.1, für den bis 6.9 ng cRNA/Oozyte keine Sättigung feststellbar war. Mit den nichtlinearen Regressionen nach der Mitscherlich-Gleichung wurden die Aufnahmemaxima der verschiedenen Klone bestimmt. Um zu überprüfen, ob die Aufnahme<sub>max</sub> der Klone unter den Obergrenzen der 95% Konfidenzintervalle der mit 2,3 ng cRNA/Oozyte ermittelten Ergebnisse liegen, wurden die Aufnahme<sub>max</sub> der Klone d24n10A2, d115n2.1 und e257q6.1 in % des Aufnahme<sub>max</sub> des p-wildtyp-ntcp berechnet (Tabelle 14).

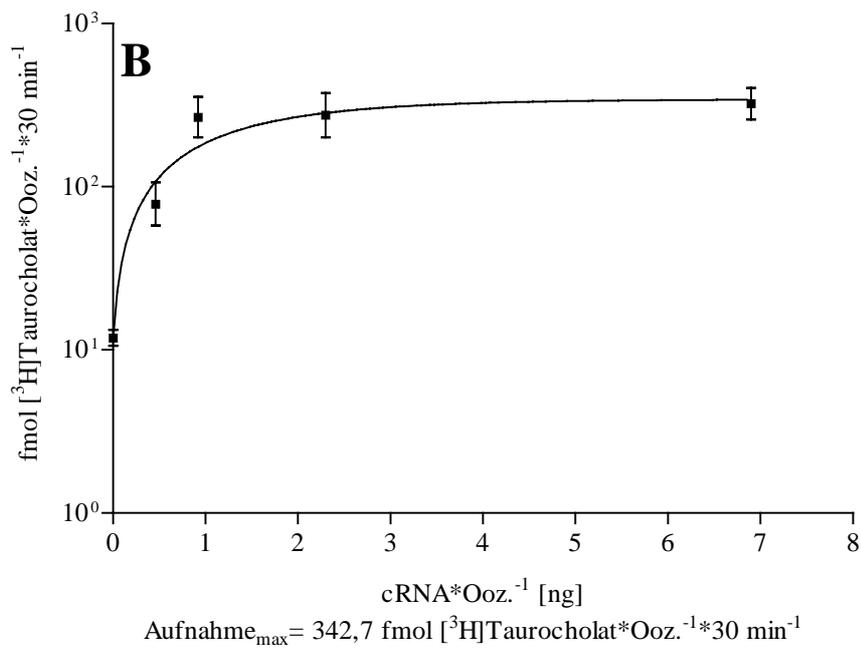
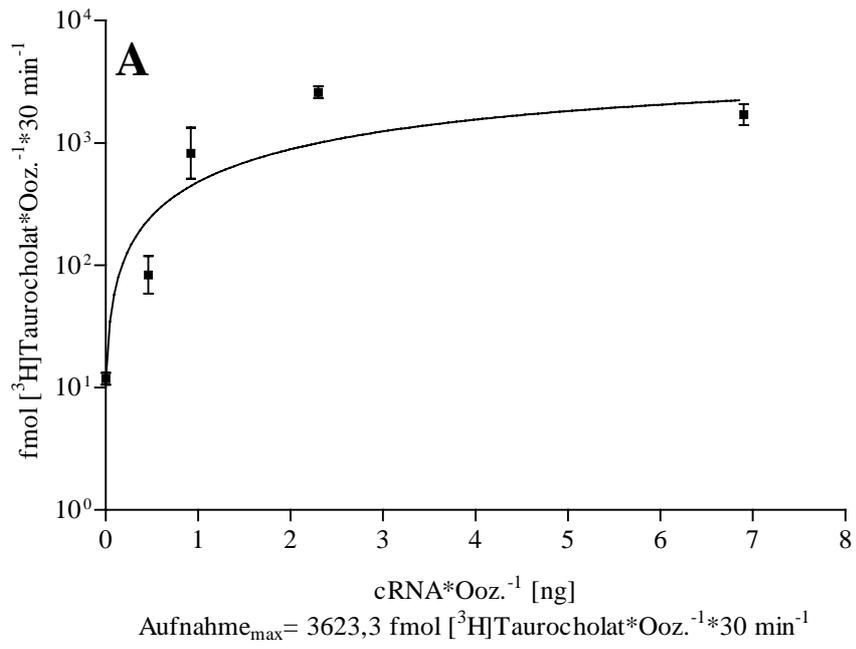
Tabelle 14: Rechnerisch ermittelte maximale [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme (Aufnahme<sub>max</sub>) in *X. laevis*-Oozyten nach Injektion mit cRNA des p-wildtyp-ntcp und der Klone d24n10A2, d115n2.1 und e257q6.1.

Herkunft der cRNA	Aufnahme <sub>max</sub> [fmol/Oozyte x 30 min]	Aufnahme <sub>max</sub> in % des Aufnahme <sub>max</sub> des Wildtyp-Ntcp
p-wildtyp-ntcp	3623,3	100,0%
d24n10A2	342,7	9,5%
d115n2.1	168,7	4,7%
e257q6.1	140,4	3,9%

Vergleicht man die mit 2,3 ng cRNA/Oozyte ermittelten verbleibenden [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmen und die Aufnahme<sub>max</sub> miteinander (Tabelle 15), zeigt sich, dass die Aufnahme<sub>max</sub> der Klone d24n10A2 und e257q6.1 innerhalb des 95% Konfidenzintervalls liegen. Die bei Injektion der cRNA des Klons d115n2.1 in *X. laevis*-Oozyten ermittelte maximale Aufnahme liegt sogar darunter. Damit ist eindeutig gezeigt, dass auch bei einer größeren Menge cRNA pro Oozyte die Klone d24n10A2, d115n2.1 *X.* und e257q6.1 eine signifikant geringere [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die Oozyten vermitteln als der p-wildtyp-ntcp.

Tabelle 15: [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme in *X. laevis*-Oozyten nach Injektion mit 2,3 ng cRNA des p-wildtyp-ntcp und der Klone d24n10A2, d115n2.1 und e257q6.1 (A) und deren rechnerisch ermittelte maximale [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme (B).

Herkunft der cRNA	A		B
	[ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme bei 2,3 ng injizierter cRNA [% der Wildtyp-Ntcp-[ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme]	95% Konfidenzintervall	Aufnahme <sub>max</sub> [% Aufnahme <sub>max</sub> des Wildtyp-Ntcp]
p-wildtyp-ntcp	100		100,0
d24n10A2	11,5	6,1-17,6	9,5
d115n2.1	8,8	6,5-11,8	4,7
e257q6.1	2,0	1,0-4,0	3,9



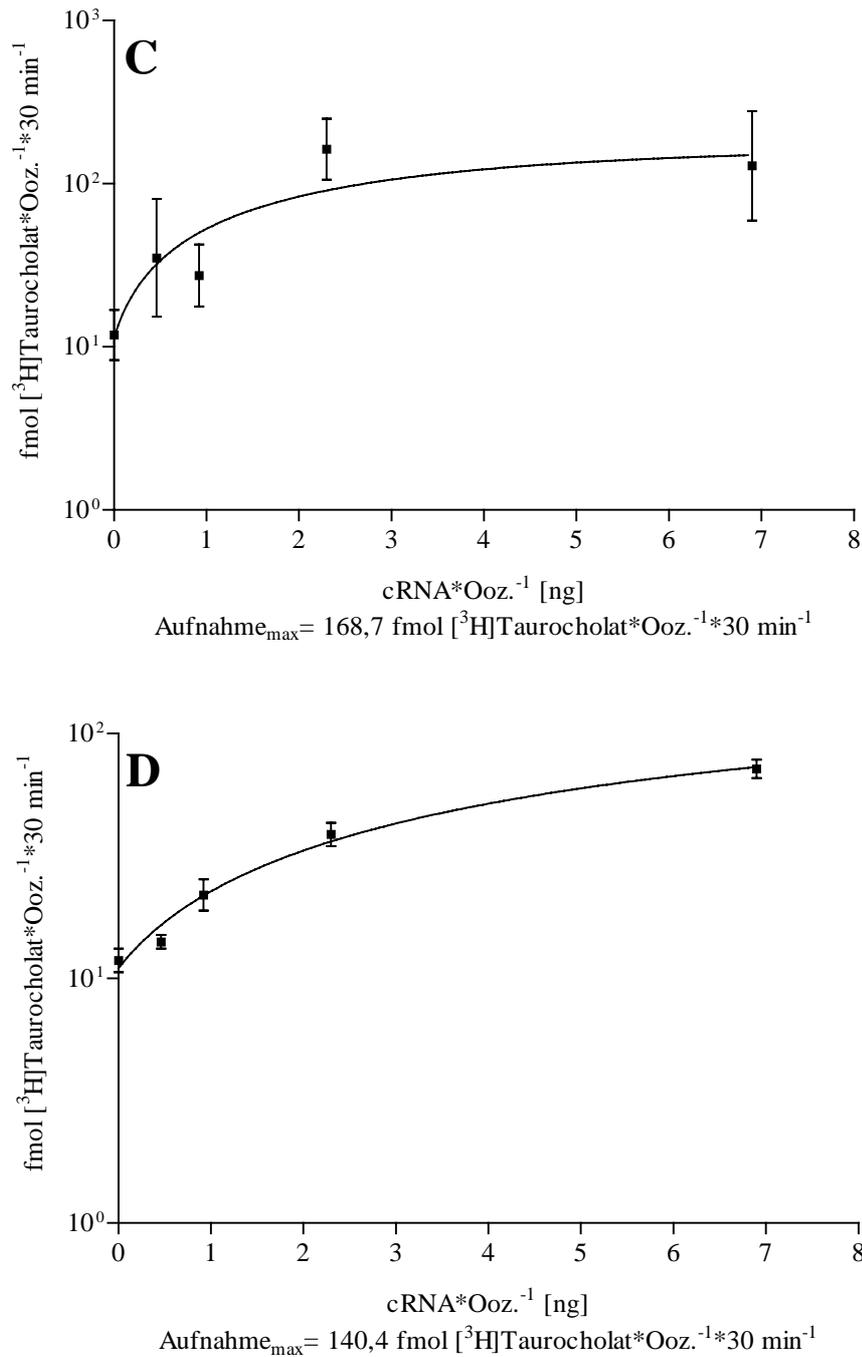
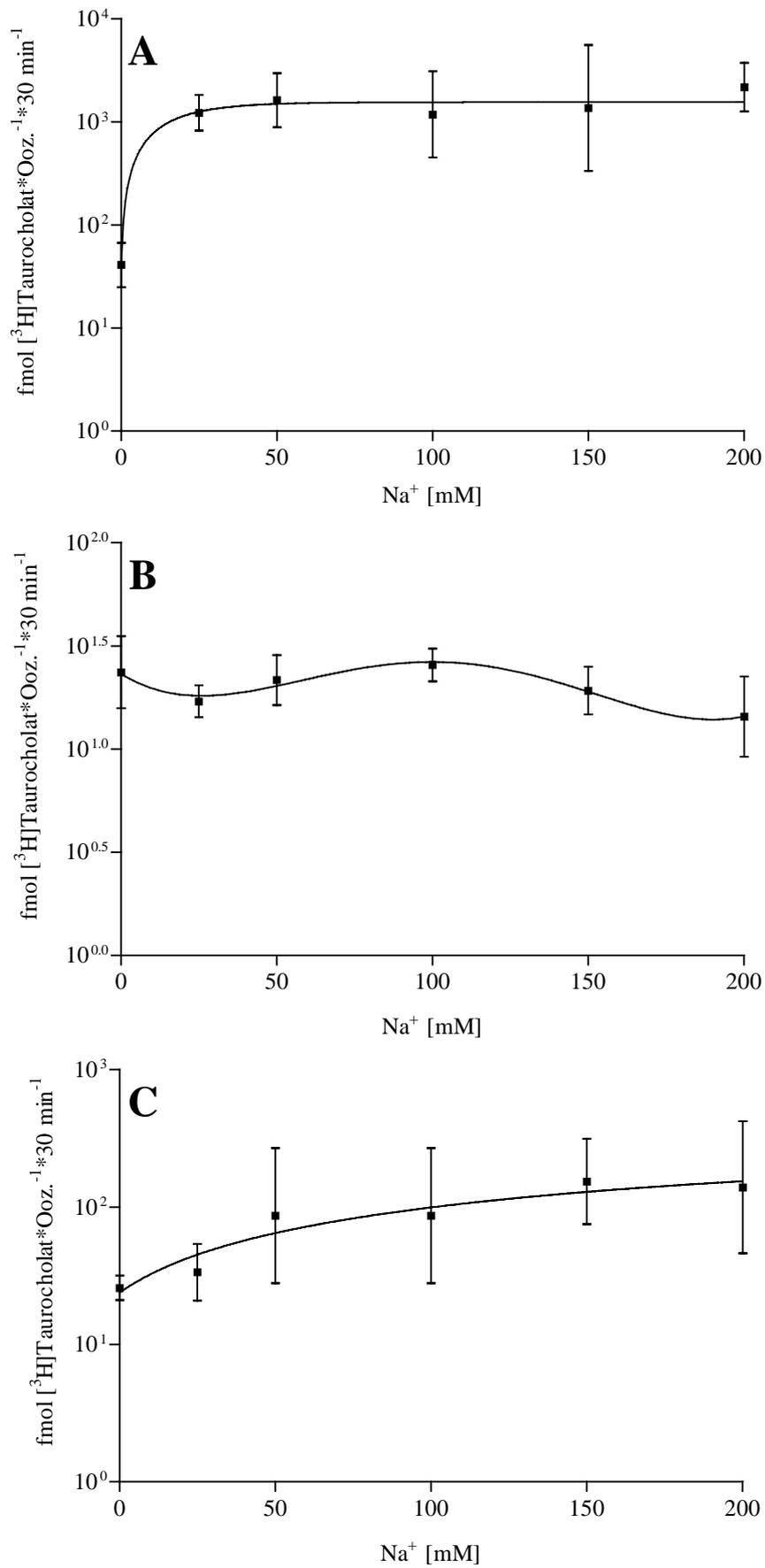


Abbildung 7 (A-D):  $[^3\text{H}]\text{Taurocholataufnahme}$  in *X. laevis*-Oozyten (fmol  $[^3\text{H}]\text{Taurocholat}/\text{Oocyte} \times 30 \text{ min}$ ) bei 30 min Inkubation mit  $5 \mu\text{M } [^3\text{H}]\text{Taurocholat}$  nach Injektion steigender Mengen (ng cRNA/Oocyte) cRNA des p-wildtyp-ntcp (A) sowie der Mutanten *d24n10A2* (B), *d115n2.1* (C) und *e257q6.1* (D). Jeder Punkt stellt den geometrischen Mittelwert von 10 bis 15 Oozyten dar.  $\text{Aufnahme}_{\text{max}}$ : Maximale  $[^3\text{H}]\text{Taurocholataufnahme}$  nach nichtlinearer Regression auf Basis der Mitscherlich-Gleichung.

## 5.6 [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in Oozyten nach Injektion mit cRNA von p-wildtyp-ntcp und den Mutanten d24n10A2, d115n2.1 und e257q6.1 bei verschiedenen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen

Nachdem drei negativ geladene Aminosäuren identifiziert worden waren, deren Veränderung zu neutralen Aminosäuren die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme im *X. laevis*-Oozyten-Expressionsmodell signifikant verringerten, sollte durch die folgenden Versuche untersucht werden, ob zwischen dem Wildtyp-Ntcp und den Proteinen mit den Mutationen D24N, D115N und E257Q Unterschiede in der Natriumabhängigkeit der Gallensäureaufnahme bestehen. Um die Affinität der einzelnen Proteine zu Natriumionen zu bestimmen, wurde die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in *X. laevis*-Oozyten, die mit der cRNA von p-wildtyp-ntcp, d24n10A2, d115n2.1 und e257q6.1 injiziert wurden, bei verschiedenen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen gemessen. Es sollten durch nichtlineare Regressionsanalyse die halbmaximale Sättigungskonzentration von Natrium für die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme ermittelt werden. Ebenso sollte mittels der Hill-Gleichung die Kooperativität zwischen Na<sup>+</sup> und Taurocholat durch Berechnung des Hill-Koeffizienten bestimmt werden. In Vorversuchen wurde ermittelt, welche maximale Na<sup>+</sup>-Konzentration von den *X. laevis*-Oozyten toleriert wurde. Es stellte sich heraus, dass bei einer Na<sup>+</sup>-Konzentration über 200 mM sehr viele der Oozyten während der 30 min, die sie mit dem Messmedium inkubiert wurden, zugrunde gingen und dass die übriggebliebenen, unveränderten Oozyten nur unzuverlässige, stark streuende Ergebnisse lieferten. Die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme wurde daher bei 0, 25, 50, 100, 150 und 200 mM NaCl gemessen. Damit in den Messmedien immer die gleiche Osmolarität herrschte, wurde die Differenz von der jeweiligen eingesetzten Na<sup>+</sup>-Konzentration zu 200 mM (der höchsten eingesetzten Na<sup>+</sup>-Konzentration) durch Cholinchlorid ersetzt. Abbildung 8 (A-E) zeigt die graphische Darstellung der Abhängigkeit der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme von Oozyten, die mit cRNA des p-wildtyp-ntcp, mit ddH<sub>2</sub>O und mit cRNA der Klone d24n10A2, d115n2.1 und e257q6.1 injiziert worden waren.



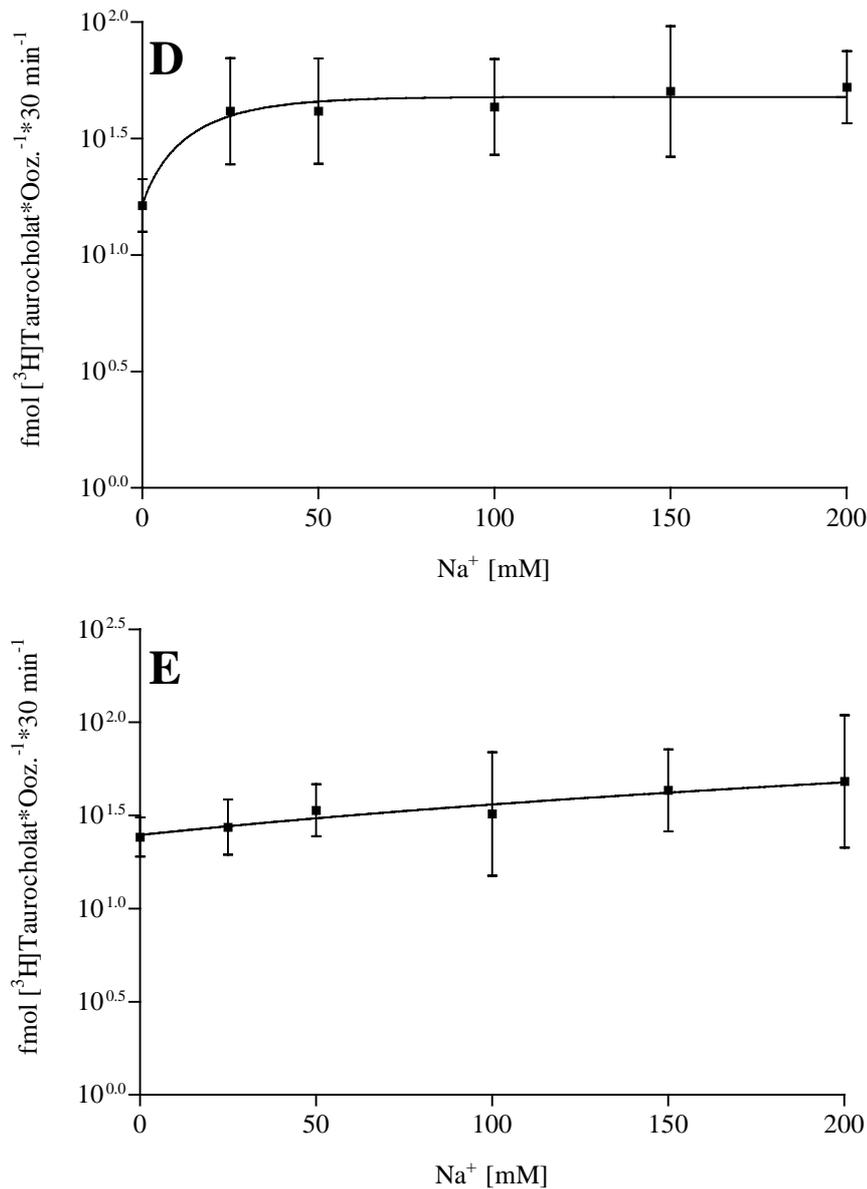


Abbildung 8: [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in Oozyten nach Injektion von cRNA des p-wildtyp-ntcp (A), doppelt destilliertem Wasser (B) und der Mutanten d24n10A2 (C), d115n2.1 (D) und e257q6.1 (E) bei steigenden Na<sup>+</sup>-Konzentrationen (fmol [<sup>3</sup>H]Taurocholat/Ooz. x 30 min). Jeder Punkt stellt das geometrische Mittel von 10-15 *X. laevis*-Oozyten dar. Die nichtlineare Regression erfolgte auf Basis der Mitscherlich-Gleichung ( $y = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min})(1 - e^{-cx})$ ).

Aus den ermittelten [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmen der einzelnen Oozyten, die mit einer bestimmten Na<sup>+</sup>-Konzentration inkubiert worden waren, wurde das geometrische Mittel und der Streufaktor bestimmt. Die nichtlineare Regression der Ergebnisse wurde auf Basis der Mitscherlich-Gleichung durchgeführt. Die Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit konnte beim Wildtyp-Ntcp und der Mutante D115N bis in die Sättigung der Aufnahme verfolgt werden. Bei der Negativkontrolle (Abb. 8B) ließ sich keine Zunahme der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme im

Zusammenhang mit einer Erhöhung der  $\text{Na}^+$ -Konzentration feststellen. Die Mutanten D24N und E257Q zeigten bis 200 mM NaCl keine Sättigung der Aufnahme. Da schon augenscheinlich ist, dass die Aufnahmekurve der Mutante E257Q, wenn überhaupt, eine sehr geringe Krümmung aufweist, wurden über die erste Ableitung der Mitscherlich-Gleichung ( $y'=(y_{\max}-y_{\min})xe^{-cx}$ ) die Steigungen der Kurven bei 25, 100, 200 und 500 mM  $\text{Na}^+$  berechnet (Tabelle 16).

Tabelle 16: Steigungen der [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahmekurven des Wildtyp-Ntcp und der Mutanten D24N, D115N und E257Q bei verschiedenen  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen.

Konzentration [mM]	Wildtyp-Ntcp	D24N	D115N	E257Q
25	19,4192	0,8179	0,4401	0,1138
100	0,1515	0,6416	0,0078	0,1138
200	0,0002	0,4641	<0,0000	0,1138
500	<0,0000	0,1575	<0,0000	0,1138

Während das Wildtyp-Ntcp-Protein und die Mutante D115N schon bei 200 mM eine Steigung von nahe null zeigten, zeigte die Mutante D24N bis über die  $\text{Na}^+$ -Konzentration von 500 mM eine Steigung der Kurve, wobei sich eine stetige Abnahme der Steigung beobachten ließ. Die [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahmekurve der Mutante E257Q wies bei allen berechneten  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen die gleiche Steigung auf, was darauf hindeutet, dass die Kurve eine extrem geringe Konstante  $c$  aufweist. In der Folge bedeutet dies, dass die Regressionsanalyse nur sehr ungenau sein kann, da der der Untersuchung zugängliche Konzentrationsbereich nur einen geringen Teil der Kurve beschreibt. Die Ergebnisse lassen in Bezug auf die Mutante E257Q aber den Schluss zu, dass die  $\text{Na}^+$ -Konzentration mit der halbmaximalen [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme sehr viel höher liegen muss als beim Wildtyp-Ntcp.

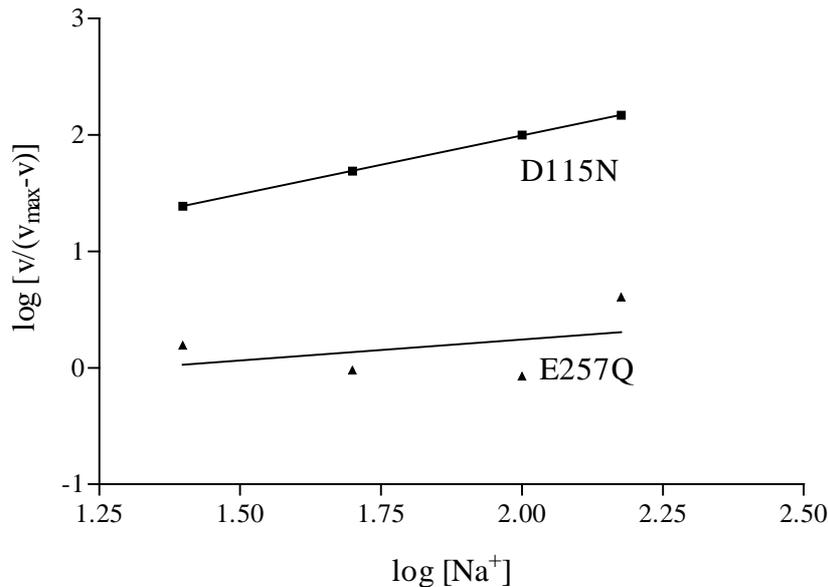


Abbildung 9: Auftrag der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in *X. laevis*-Oozyten, injiziert mit cRNA der Mutanten D115N und E257Q in Abhängigkeit von der Na<sup>+</sup>-Konzentration nach Hill. ( $v = [\text{^3H}]$ Taurocholataufnahme/Oozyte  $\times$  30 min,  $v_{\text{max}}$  = maximale [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme nach nichtlinearer Regression nach Mitscherlich)

Zur Bestimmung der Na<sup>+</sup>-Konzentration mit dem halben Restzuwachs der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme wurde in die Mitscherlich-Gleichung für  $y$  die halbe Restzunahme eingesetzt und die Gleichung nach  $x$  (Na<sup>+</sup>-Konzentration) umgeformt ( $x_{(y_{\text{max}}-y_{\text{min}})/2} = \frac{\ln 2}{c}$ ).

Die ermittelten Werte betragen für den Wildtyp-Ntcp 10,7, für die Mutanten D24N 214,1, und für D115N 12,9 mM Na<sup>+</sup>. Der Wert für die Mutante E257Q wurde mit 2.329.906,5 mM Na<sup>+</sup> berechnet. Erwartungsgemäß bestätigten die Werte die Vermutung, dass die Na<sup>+</sup>-Konzentration mit dem halben Restzuwachs der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme für die Mutante E257Q um ein Vielfaches höher liegt, als für den Ntcp-Wildtyp. Allerdings ist, wie oben erwähnt, dem Wert der Mutante E257Q nur ein hinweisender Charakter zuzubilligen.

Durch den Auftrag der Oozyten-[<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in Abhängigkeit von der Na<sup>+</sup>-Konzentration als Hill-Plot ergibt sich für die Mutanten D115N ein Hill-Koeffizient von 1 und für E257Q ein Hill-Koeffizient von 0,4 (Abbildung. 9). Dies bedeutet im Falle der Mutante D115N, dass die Stöchiometrie der Na<sup>+</sup>-gekoppelten Taurocholataufnahme von 2:1 im Wildtyp-Ntcp auf 1:1 zurückgeht. Im Falle der Mutante E257Q findet dagegen kein Na<sup>+</sup>-Cotransport mehr statt. Der Wert 0,4 anstelle von 0 könnte auf eine sogenannten Slippage von Natriumionen hinweisen, das nicht an die geringe Taurocholataufnahme dieser Mutante gekoppelt ist.

## **5.7 Lokalisation der Expressionsprodukte nach Injektion der cRNA für das Wildtyp-Ntcp und die Mutanten D24N, D115N und E257Q in *X. laevis*-Oozyten**

Das Ausbleiben der Taurocholataufnahme in die Oozyten nach Einfügung der Mutationen D24N, D115N und E257Q alleine beweist nicht die funktionelle Bedeutung dieser Aminosäuren, wenn nicht gezeigt werden kann, dass die mutierten Proteine tatsächlich exprimiert werden, bzw. sich auch in der Oozytenmembran befinden. Die Ntcp-Proteine sollten über eine spezifische Antikörperreaktion nachgewiesen werden. Die dafür von Herrn Bruno Hagenbuch aus der Arbeitsgruppe von Herrn Peter J. Meier zur Verfügung gestellten polyklonalen Antikörper erwiesen sich im Western-Blot mit Oozyten als nicht brauchbar. In der Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page) ließ sich keine zusätzliche Bande in den Präparationen aus Wildtyp-Ntcp cRNA injizierten Oozyten gegenüber Wasser injizierten Oozyten nachweisen. Die SDS-Page enthielt eine überdeutliche Bande, die alle anderen überlagerte, so dass darüber hinaus auch keine deutliche Größenordnung möglich war. Nach dem Blotten auf Nitrozellulose ließ sich durch den vorhandenen Antikörper auch keine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion zeigen. Da auf Grund der langen Lagerung auch die Qualität der Antikörper nicht mehr gewährleistet war, wurde eine andere Nachweismethode verwendet.

Bei dieser handelt es sich darum, durch Fusion mit einem anderen Peptid die Proteine zu markieren. Vom Prinzip ergeben sich hierbei zwei Möglichkeiten. Proteine können direkt als Fusionsprotein mit dem Green Fluorescent Protein (GFP) exprimiert werden oder mit einem Epitop, für das Antikörper kommerziell erhältlich sind.

GFP ist ein Protein, das ursprünglich in der Qualle *Aequoria victoria* entdeckt wurde (Shimomura et al. 1962). Es absorbiert Licht an zwei Maxima mit einer Wellenlänge von 478 und 398 nm und emittiert im sichtbaren Spektrum (Chattoraj et al. 1996). Durch diese Eigenschaft kann das GFP-Fusionsprotein direkt durch Fluoreszenzmikroskopie oder aber mit kommerziell erhältlichen Antikörpern im Westernblot nachgewiesen werden. Der Nachteil der Markierung mit GFP besteht darin, dass die Domäne des GFP, die zur Fluoreszenz notwendig ist, eine Größe von 223 Aminosäuren (entspricht 669 bp) hat (Li et al. 1997). Diese Ausmaße erschweren aber sowohl die Fusion der Basensequenzen als auch möglicherweise die Expression des Proteins. Das von mir verwendete FLAG<sup>®</sup>-Tag (nach to

tag: markieren) hat eine Größe von 24 bp bzw. acht Aminosäuren. Diese 24 Basen lassen sich durch Mutagenese in das Plasmid insertieren. So wurde bereits veröffentlicht, dass sich der Ratten-Ntcp auch mit dem FLAG<sup>®</sup>-Tag am C-terminalen Ende exprimieren lässt (Sun et al. 1998).

Aufgrund der Probleme bei der Darstellung der Proteine in der SDS-Page entschied ich mich auch methodisch dafür, anstelle des Western-Blots die Proteine durch Immunhistologie nachzuweisen. Dies hatte zusätzlich den Vorteil, dass damit die Lokalisation der Proteine in der Zelle dargestellt werden konnten.

Die Plasmide p-wildtyp-ntcp, d24n10A2, d115n2.1 und e257q6.1, deren Translatate eine verminderte [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in den Oozyten gezeigt hatten, wurden um das FLAG<sup>®</sup>-Insert vergrößert. Die Methode der Site-directed Mutagenese hatte sich bei der Einführung der Punktmutationen als sehr präzise herausgestellt. Zur Insertion des FLAG<sup>®</sup>-Motivs mussten nun, anstelle einer Punktmutation, 24 Basen in die DNA eingefügt werden. Diese 24 Basen bilden während der Anlagerung an das Ausgangsplasmid einen sogenannten Loop, da für sie kein komplementärer DNA-Strang vorhanden ist. Das sonstige Vorgehen entsprach, bis auf eine Erhöhung der Zahl der PCR-Zyklen auf 18, dem bei der Erstellung der Punktmutanten. Nach der Transformation der Zellen wurden diese ausplattiert und am folgenden Tag willkürlich sechs Kolonien ausgewählt, von denen Übernachtskulturen hergestellt wurden und eine Plasmid-Präparation durchgeführt wurde. Die gewonnene DNA wurde nach Verdau mit *PvuI* durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Bei Vorliegen der gewünschten Fragmente wurden Klone aller Mutationen sequenziert, um zu gewährleisten, dass keine weiteren als die erwünschten Veränderungen in der Sequenz des Inserts aufgetreten waren. Es zeigte sich, dass bei der Einfügung einer so langen Sequenz durch Site-Directed Mutagenese die Fehlerhäufigkeit der in der PCR eingesetzten Polymerase zunahm, wobei die meisten Fehler in Syntheserichtung am Übergang von dem gebildeten Loop zum komplementären Bereich des Primers lagen. Es wurden aber dennoch von allen FLAG<sup>®</sup>-Mutanten Klone gewonnen, die keine Fehler beinhalteten. Für die weiteren Versuche wurden die Klone

wildtyp-ntcpFLAG20.4

d24nFLAG21.3

d115nFLAG22.4

e257qFLAG23.1

ausgewählt. Abbildung 10 zeigt die nach *PvuI*-Verdau erhaltenen DNA-Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung.

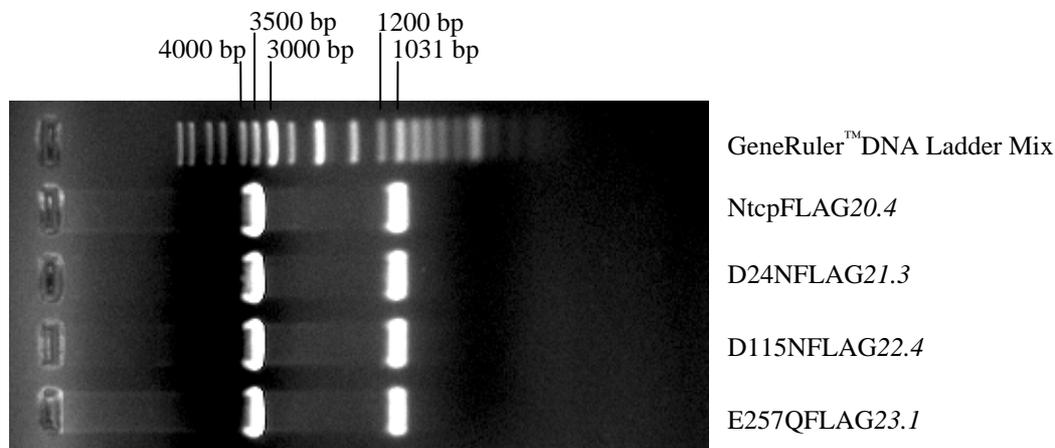


Abbildung 10: Gelelektrophoretische Auftrennung (1% Agarose) des wildtyp-ntcpFLAG20.4, d24nFLAG21.3, d115nFLAG22.4 und e257qFLAG23.1 nach Verdau mit *PvuI*; Ethidiumbromidfärbung.

Die Klone wurden analog zum Vorgehen bei den [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme-Messungen *in vitro*-transkribiert. Nach Transkription, Reinigung und Fällung der RNA ließ sich nach Gelelektrophorese der Transkripte in allen Fällen eine eindeutige Bande bei 1,9 kb nachweisen (Abbildung 11).

Die cRNA wurde in *X. laevis*-Oozyten injiziert. Den Ergebnissen aus 5.5 Rechnung tragend wurden die Versuche nicht mit 2,3 ng, sondern mit 5 ng pro Oozyte durchgeführt, um einen Expressionsgrad nahe dem Maximum zu erreichen. Die injizierten Oozyten wurden 48 h inkubiert. Bevor die immunhistologische Untersuchung begann, wurde mit je 10 Oozyten, die mit der cRNA eines Klons injiziert waren, ein [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmeversuch nach Abschnitt 4.5.5.1 durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Expression der Proteine stattgefunden hatte. War eine [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die Oozyten feststellbar, wurden die übrigen injizierten Oozyten devitellinisiert und in Dent's Fixans (Methanol:DMSO 4:1) fixiert.

Die Entfernung der Vitellinmembran erwies sich als schwierigster Schritt des immunhistologischen Nachweises. Diese, selbst bei 40facher Vergrößerung nur schwer erkennbare Struktur, musste mit Hilfe zweier kleiner Pinzetten von den Oozyten entfernt werden. Dies erforderte Übung, wobei anfänglich viele Oozyten mechanisch beschädigt wurden.

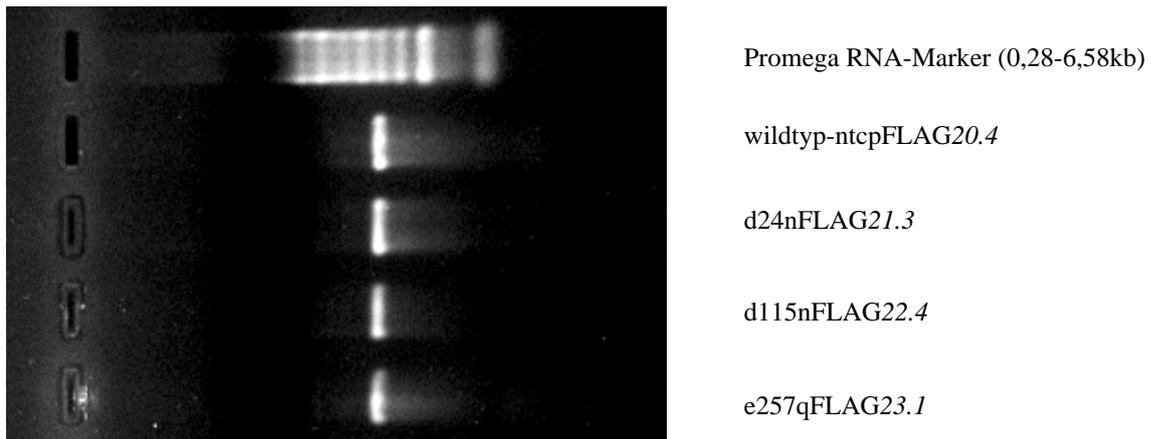
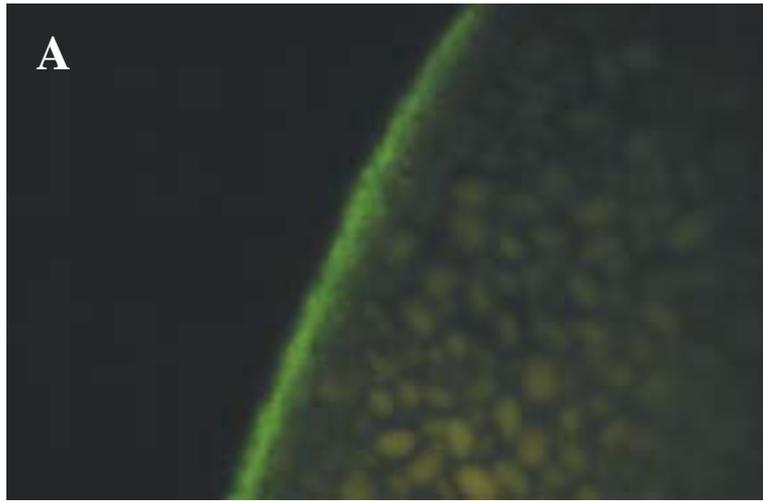


Abbildung 11: Gelelektrophoretische Auftrennung (1% Agarose) der *in vitro*-Transkripte von wildtyp-ntcpFLAG20.4 und der Mutanten d24nFLAG21.3, d115nFLAG22.4, e257qFLAG23.1; Ethidiumbromidfärbung.



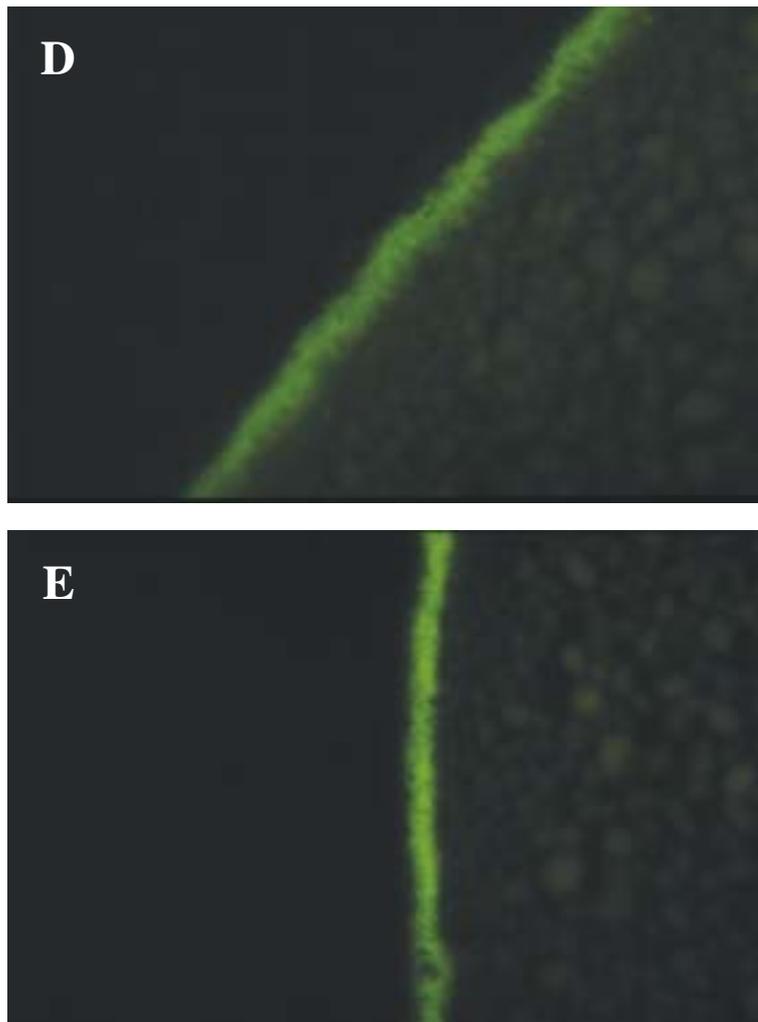


Abbildung 12 (A-E): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (5 $\mu$ m Schnitte) von *X. laevis*-Oozyten, injiziert mit 2,5 ng cRNA des Klons wildtyp-ntcpFLAG20.4 (A) und 25 nl ddH<sub>2</sub>O als Negativkontrolle (B) sowie 2,5 ng cRNA der Klone d24nFLAG21.3 (C), d115nFLAG22.4 (D) und e257qFLAG23.1 (E) nach Behandlung mit M2 Anti-FLAG<sup>®</sup> Antikörper und Alexa-Fluor<sup>®</sup> 488 Goat anti-mouse Konjugat (1250fache Vergrößerung).

Die fixierten Oozyten wurden den Antikörperreaktionen unterworfen. Der primäre Antikörper wurde mit einer Verdünnung 1:1000 eingesetzt. Dies ergab eine Konzentration von 4  $\mu$ g/ml. Vom Hersteller wurde ein Konzentrationsbereich von 1-10  $\mu$ g/ml für alle Anwendungen angegeben. Der sekundäre Antikörper wurde 1:200 verdünnt ( $\sim$  2  $\mu$ g/ml). Für den Zweitantikörper existieren keine Herstellerangaben. Die gewählten Konzentrationen wiesen schon im ersten Versuch spezifisch das Ntcp-Protein auf der Oozyten-Oberfläche nach. In der Negativkontrolle ohne Ntcp-Protein war hierbei kein Signal zu erzeugen.

Für die mikroskopische Untersuchung mussten die Oozyten eingebettet und geschnitten werden. Die Einbettung erfolgte in Technovit 7100, einem Kunststoff-Einbettungsmedium. Sie wurden hierfür durch eine alkoholische Reihe entwässert und über mehrere Inkubationsschritte mit Technovit 7100 durchtränkt. Von den hergestellten Präparaten wurden 5 µm starke Schnitte angefertigt, die im Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden. Die Schnitte wurden an einem Mikrotom des Instituts für Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin gefertigt. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde im Institut für Parasitologie des Fachbereichs Veterinärmedizin durchgeführt.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde der Versuch dreimal durchgeführt. Das heißt, es wurden von drei verschiedenen Fröschen Oozyten präpariert, mit je 5 ng der cRNAs wildtyp-ntcpFLAG20.4, d24nFLAG21.3, d115nFLAG22.4 und e257qFLAG23.1 injiziert, fixiert, den Antikörperreaktionen unterworfen und im Immunfluoreszenzmikroskop untersucht.

Die Abbildung 12 (A-E) zeigt exemplarisch die Ergebnisse dieser Versuche. Das Wildtyp-Ntcp-Protein und die Mutanten D115NFLAG und E257QFLAG ließen sich auf diese Weise auf der Oozytenoberfläche nachweisen und zeigten in der Immunfluoreszenz vergleichbar starke Signale. Demgegenüber war bei den mit d24nFLAG21.3 injizierten Oozyten bei keinem der Versuche ein Fluoreszenzsignal nachweisbar, weder auf der Oberfläche, noch im Inneren der Zellen. Da für das Fehlen des Fluoreszenzsignals auch eine fehlgeschlagene Expression verantwortlich sein kann, wurden zusätzlich die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahmen der Oozyten, die mit cRNA des Klons d24nFLAG21.3 bzw. mit ddH<sub>2</sub>O injiziert worden waren (als Negativkontrolle), statistisch miteinander verglichen. Das geometrische Mittel der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme der Negativkontrolle betrug 18,8, das der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme durch die FLAG-Mutante d24nFLAG21.3-cRNA 136,4 fmol [<sup>3</sup>H]Taurocholat/Ooz. x 30 min. Der p-Wert der geometrischen Mittelwerte ist kleiner 0,0001. Es findet demnach eine gegenüber der Negativkontrolle erhöhte [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die mit d24nFLAG21.3-cRNA injizierten Oozyten statt, ohne dass das Protein durch Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisbar ist.

## 6 Diskussion

Diese Arbeit hatte den Na<sup>+</sup>/Gallensäuren Cotransporter aus der Leber der Ratte (Ntcp) zum Gegenstand. Der Transporter gehört zur Gruppe der SBATs (sodium/bile acid transporter)(Hallen et al. 2000). Die physiologischen Substrate der SBATs sind Gallensäuren (Oelkers et al. 1997) und die SBATs sind sehr selektiv in ihrer Transportaktivität. Nur von einer Substanz, die nicht den Gallensäuren zugerechnet werden kann, nämlich Estron-3-Sulfat, ist ein beachtenswerter Transport über SBATs nachgewiesen (Craddock et al. 1998, Schroeder et al. 1998). Es ist auch erwiesen, dass der über SBATs vermittelte Gallensäuretransport natriumabhängig ist (Hagenbuch et al. 1991, Wong et al. 1994, Shneider et al. 1995, Craddock et al. 1998, Saeki et al. 1999, Cattori et al. 1999).

Durch diese Arbeit wurden negativ geladene Aminosäuren in der Sequenz identifiziert, die essentiell für die Funktionalität des Proteins sind und deren qualitative Bedeutung ermittelt.

Als erster Schritt in wurden über einen Sequenzvergleich der bekannten Aminosäuresequenzen der SBATs diejenigen negativ geladenen Aminosäuren identifiziert, die über alle Sequenzen konserviert sind. Dies bot sich hier in besonderer Weise an, da die Ähnlichkeit der SBATs in Bezug auf ihr Transportverhalten, wie oben erwähnt, groß ist, insbesondere auch zwischen den apikalen und basolateralen Vertretern dieser Gruppe, die in ihrer Aminosäuresequenz deutliche Unterschiede aufweisen. Durch diesen Schritt konnten unter den 16 negativ geladenen Aminosäuren des Ntcp diejenigen differenziert werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit von funktioneller Bedeutung sind. Diese konservierten Aminosäuren sind E47, D115, D147, E257 und E277.

Diese Aminosäuren wurden wie vorher beschrieben in ihre ladungsneutralen Amide mutiert. Von diesen Mutationen wurden folgende Einflüsse auf die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die *X. laevis*-Oozyten ausgeübt:

- a) Die Mutation D147N führt zu einer Erhöhung der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die Oozyten im Vergleich zum Wildtyp-Ntcp auf 120% (p-Wert = 0,03).
- b) Die Mutationen D24N, D115N und E257Q sowie die Doppelmutanten D24N/E89Q und E47Q/D115N führen zu einer signifikant reduzierten [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme: D24N: 10% der Kontrolle (p-Wert <0,0001); D115N: 9% der Kontrolle (p-Wert <0,0001); E257Q 2% der Kontrolle (p-Wert <0,0001); D24N/E89Q: 5% der Kontrolle

(p-Wert =0,1); E47Q/D115N: 2% der Kontrolle (p-Wert =0,03). Da die Doppelmutationen bereits die Mutationen D24N bzw. D115N enthielten und kein abweichendes Transportverhalten von diesen zeigten, wurden sie von den weiteren Untersuchungen ausgenommen. Dass die Ergebnisse der Doppelmutationen E47Q/D115N und D24N/E89Q nur schwach signifikant sind bzw. unter der Signifikanzgrenze liegen, liegt an den zu geringeren Probenumfängen.

c) Alle übrigen Mutationen üben keinen signifikanten Einfluss auf die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme aus.

ad a) Die Erhöhung der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme durch die Mutation D147N zeigt, dass das Protein mit dieser Mutation exprimiert und korrekt in die Membran inseriert wird, da ansonsten keine [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die Oozyten hätte stattfinden können.

Die Region um das Aspartat 147 (Position 144-153) ist unter den Ntcps und Asbts hochkonseviert, wobei zwischen den beiden Gruppen, bis auf D147, keine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz vorliegen. Bei den Ntcps finden sich zusätzlich zu D147 noch zwei weitere Aspartate an Position 149 und 152 (siehe oben), während in der Sequenz der Asbts keine anderen negativen Ladungen in diesem Abschnitt existieren. Die räumliche Nähe dieser Aspartate in den Ntcps ließen die Möglichkeit zu, dass die Funktion der negativen Ladung nicht genau an das Aspartat 147 gebunden ist, sondern auch von den beiden anderen Aspartaten übernommen werden kann. Es wäre in diesem Zusammenhang interessant, die analoge Mutation in einen Klon eines apikalen Transporters einzufügen, um zu überprüfen, welcher Effekt auf die Taurocholataufnahme dadurch ausgeübt wird.

ad b) Weil die FLAG-markierten Mutantenproteine D115N und E257Q in der Membran der Oozyten nachweisbar sind kann ausgeschlossen werden, dass die minimale Restaufnahme in die injizierten Oozyten auf einem Expressionsdefekt beruht. Vielmehr muss angenommen werden, dass beide negativ geladenen Aminosäuren für die Bindung von Natriumionen von Bedeutung sind.

Eine völlig andere Schlussfolgerung betrifft die Mutante D24N. Dass Veränderungen am Aspartat an Position 24 die Expression des Proteins beeinflussen steht im Einklang mit den Erkenntnissen, die über die Topologie der meisten Membranproteine, die als Helixbündel in die Membran integriert sind, bestehen. Unabhängig, ob diese Proteine pro- oder eukaryontischer Herkunft sind, gilt die Regel, dass apolare helikale Regionen, die die

Transmembrandomänen bilden, von geladenen Aminosäuren flankiert werden. Dabei ist der Gehalt an positiv geladenen Aminosäuren (Arginin und Lysin) in den intrazellulär flankierenden Regionen höher als in den extrazellulären (von Heijne 1986, von Heijne und Gavel 1988, Wallin und von Heijne 1998). Diese Regel wird als *positive-inside-rule* bezeichnet. Sie trifft auch für die Region um das Asparat 24 zu. In beiden existierenden Topologiemodellen des Ntcp (eine basiert auf der Annahme von 7 und eine auf der Annahme von 9 Transmembrandomänen) flankiert D24 mit dem benachbarten Lysin K25 die erste Transmembrandomäne extrazellulär, während sie intrazellulär von E47 flankiert wird, in dessen Nachbarschaft mit den Lysinen K50 und K52 sich zwei positiv geladene Aminosäuren befinden. Es wäre daher möglich, dass der Verlust der negativen Ladung an Position 24 die Proteinfaltung während der Translation stört und so die geringe Expression verursacht. Dass bei Injektion mit cRNA des Klons d24n10A2 immer noch eine Restaufnahme von etwa 10% der Kontrolle zu beobachten ist, lässt vermuten, dass geringe Mengen des Proteins trotz der Behinderung der Synthese exprimiert werden. Es handelt sich hierbei aber um zuwenig Protein, um es durch Immunfluoreszenz nachzuweisen.

Wendet man *positiv-inside-rule* auf die Aminosäuren D115 und E257 an, ergeben sich folgende Aussagen:

Das Aspartat 115 befindet sich, bei einer 7 Transmembrandomänen-Topologie, gemeinsam mit dem Lysin 113 am intrazellulären Übergang der dritten Transmembrandomäne zu einem zytoplasmatischen Loop. Extrazellulär wird die Transmembrandomäne drei vom Glutamat 89 flankiert. Diese Ladungsverteilung entspricht der *positive-inside-rule*. Wenn diese Topologie der Wirklichkeit entspräche wäre, ein Einfluss auf die Proteinfaltung durchaus denkbar, was bedeuten könnte, dass D115 nicht direkt an dem Transportprozess beteiligt wäre.

In der 9 Transmembrandomänen-Topologie befindet sich das D115 im Zentrum eines kleinen zytoplasmatischen Loops, dessen begrenzende Transmembrandomänen nicht von geladenen Aminosäuren flankiert werden. Wenn dieses Modell der tatsächlichen Topologie entspräche, könnte das Aspartat 115 als Bindungsstelle für das Natriumion während der Translokation fungieren.

Auch für das Glutamat an Position 257 besteht Unklarheit über seine Lokalisation. In keinem der beiden Topologiemodelle hat E257 eine Position, in der es Transmembrandomänen flankiert. Bei der Annahme von 9 Transmembrandomänen befindet es sich im Inneren der achten Transmembrandomäne. In der 7 Transmembrandomänen-Topologie befindet es sich in

einem großen extrazellulären Loop. Für diese Aminosäure ist es daher annehmbar, dass sie nicht für die Topologie des Proteins von Bedeutung ist, sondern dass sie am Transportprozess beteiligt ist.

Weitere Hinweise auf die Funktion der Aminosäuren ergaben Versuche, bei denen die Affinität des Wildtyp-Ntcp und der Mutanten zu  $\text{Na}^+$ -Ionen bestimmt wurde. Es stellte sich heraus, dass die Mutante D115N in ihrer  $\text{Na}^+$ -Affinität dem Wildtyp-Ntcp entspricht. Für beide Proteine liegt die  $\text{Na}^+$ -Konzentration mit der halben Restzunahme der [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme unter 20 mM. Die Mutante E257Q dagegen zeigt eine sehr viel geringere  $\text{Na}^+$ -Affinität. Hier war es schwierig, einen genaueren halbmaximalen Sättigungswert zu bestimmen, da innerhalb des der Untersuchung zugänglichen  $\text{Na}^+$ -Konzentrationsbereichs eine lineare Beziehung zwischen  $\text{Na}^+$ -Konzentration und [ $^3\text{H}$ ]Taurocholataufnahme bestand. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die negativ geladene Seitenkette des E257 mit dem kationischen Cosubstrat  $\text{Na}^+$  interagiert und bei Fehlen dieser negativen Ladung die Affinität des Transporters zu Natriumionen reduziert ist.

Die Region um das Glutamat 257 fand in der Literatur vielfach Erwähnung, da innerhalb der SBAT-Familie weitere, natürlich vorkommende und künstlich erstellte, Mutationen mit direktem oder indirektem Einfluss auf die Funktionalität in dieser Region lokalisiert sind (Oelkers et al 1997, Ong et al. 1995, Hallen et al. 2000, Langewische et al. 2001a, Langewische et al 2001b). In direkter Nachbarschaft zu E257 liegt das Threonin 258. Diese Aminosäure ist über alle 9 in den Sequenzvergleich einbezogenen SBATs konserviert. Von diesem Threonin ist im humanen Asbt eine natürlich vorkommende Mutation zu Methionin bekannt, die den Taurocholat-Transport in die Enterozyten aufhebt und zu primärer Gallensäurenmalabsorption führt. Zu dem gleichen Effekt führt die Mutation eines Leucin (es entspricht dem Isoleucin 239 im Ratten-Ntcp) in der Transmembrandomäne 6 zu Prolin (Oelkers et al. 1997). Am Übergang des Loop 6 zur letzten Transmembrandomäne befindet sich ein konserviertes Prolin (P290 im Ratten-Ntcp). Aus dem Gewebe eines Patienten mit Morbus Crohn wurde cDNA für den humanen Asbt isoliert, die eine Mutation dieses Prolins zu einem Serin aufwies und die bei heterologer Expression keinen Taurocholat-Transport vermittelte (Wong et al. 1995). Interessante Untersuchungsergebnisse existieren von dem Cystein, das im Ratten-Ntcp an Position 266 steht. Es ist über alle SBATs konserviert. Durch die künstlich eingeführte Mutation Cystein 266 nach Alanin (C266A) ließ sich durch Hallen et al. 2000 zeigen, dass diese Mutation die Sensitivität des Proteins auf geladene, Membran-

impermeable Methanthsulfonate, die SH-Gruppen durch Alkylierung blockieren, aufhebt, während die Transportaktivität des Proteins voll erhalten bleibt. Sie folgerten, dass die Alkylierung der SH-Gruppe die Transportaktivität durch sterische Veränderung der Seitenkette aufhebt, die die Bewegungen innerhalb des Moleküls oder die Bindung des Substrates behindert (Hallen et al 2000). In Untersuchungen von Langewische et al. (2001) wurde C266 ebenfalls zu Alanin mutiert. Hier zeigte sich direkt eine gegenüber dem Wildtyp verminderte Taurocholataufnahme der Mutante C266A bei Expression in *X. laevis*-Oozyten (Langewische et al 2001a und 2001b)

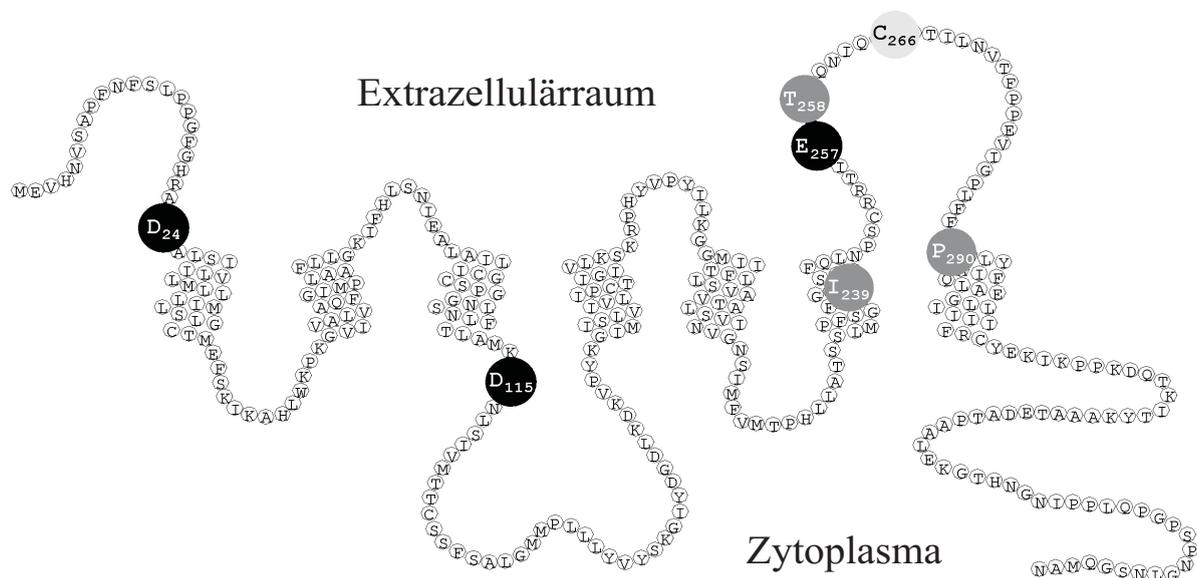


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Topologie des Ratten-Ntcp auf Grundlage der 7 Transmembran-Domänen-Modells (nach Hagenbuch et al. 1991). Die Aminosäuren von denen Mutationen in Mitgliedern der ASBT-Familie bekannt sind, die Einfluss auf den Taurocholattransport haben, sind hervorgehoben. Schwarz: Die in dieser Arbeit identifizierten Aminosäuren; dunkelgrau: Aminosäuren mit natürlich vorkommenden Mutationen; hellgrau: In anderen Arbeiten identifizierte Aminosäuren.

Alle genannten Aminosäuren, deren Mutationen die [<sup>3</sup>H]Taurocholat-Aufnahme beeinflussen, befinden sich in dem extrazellulären Loop 6 oder in der angrenzenden Transmembrandomänen 6 und 7 (siehe Abbildung 13). Ansonsten sind mir keine Veröffentlichungen bekannt, die von Mutationen an Na<sup>+</sup>/Gallensäuren-Cotransportern mit

funktioneller Beeinträchtigung des Proteins berichten. Dass diese Häufung der bekannten Mutationen mit funktionellen Auswirkungen in dem Loop 6 zufällig ist, ist nicht wahrscheinlich. Es ist eher anzunehmen, dass in dieser Region die Strukturen lokalisiert sind, die die Bindung der Substrate und Cosubstrate und deren Transport in die Zelle vermitteln.

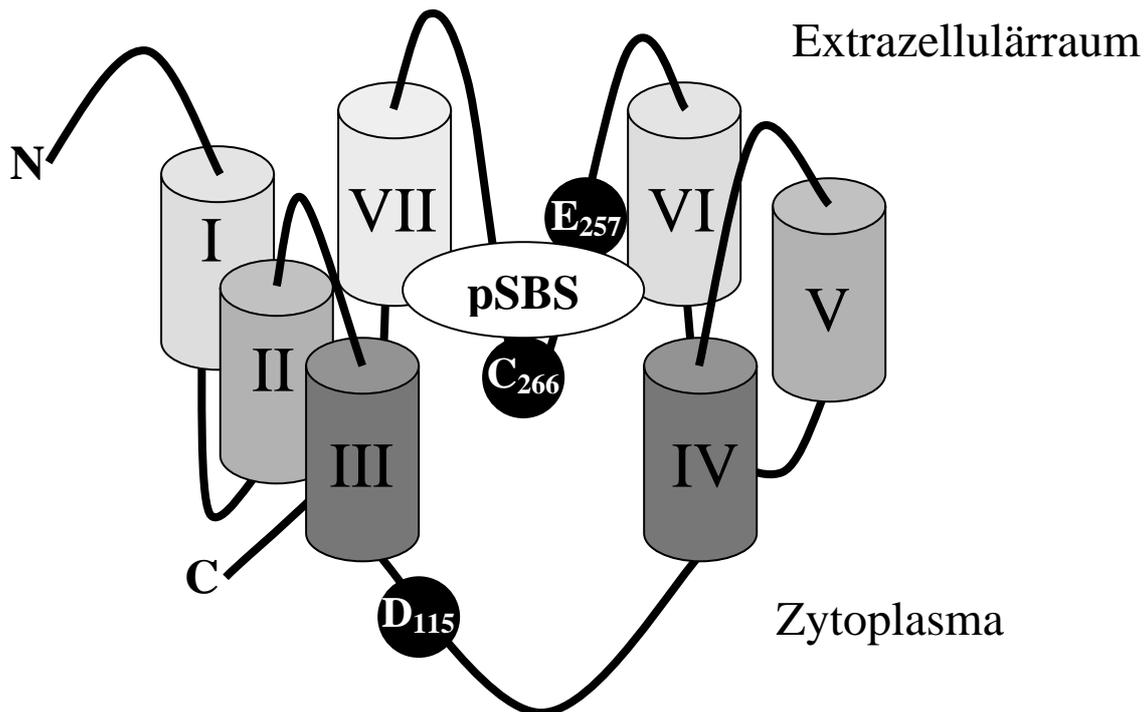


Abbildung 14: Strukturmodell des Ratten-Ntcp auf Basis der 7 Transmembrandomänen-Topologie in Abwesenheit von Natrium. Der Loop 6 schlägt sich in die von den Transmembrandomänen gebildete Pore, wodurch die putative Substrat-Bindungsstelle (pSBS) kein Substrat binden kann und das Cystein 266 ( $C_{266}$ ) für Membran-impermeable SH-Gruppenblocker unerreichbar ist.

Für die Lokalisation der Substrat-Bindungsstellen in dieser Region sprechen noch andere Hinweise in der Literatur. Hällen et al (2000) konnten mit ihren Ergebnissen auch zeigen, dass die Sensitivität des Ntcp gegenüber dem SH-Gruppenblocker abhängig ist von der  $Na^+$ - und der Substratkonzentration (in dieser Untersuchung wurde Glycodeoxycholol verwandt). Die Sensitivität gegen SH-Gruppenblocker steigt mit der  $Na^+$ -Konzentration. Die Anwesenheit von Glycodeoxycholol dagegen schützt vor der Inaktivierung durch das Methanthiosulfonat, wobei diese Schutzwirkung wiederum von der Anwesenheit von Natriumionen abhängig ist. Bei Fehlen von Natrium im Medium schützte das Substrat nicht

vor der Alkylierung. Daraus ließe sich folgern, dass das C266 bei Anwesenheit von  $\text{Na}^+$ , möglicherweise durch Konformationsänderung des Proteins, soweit in das Extrazellulärmedium exponiert wird, dass es von dem hydrophilen Methanthiosulfonat erreicht werden kann. Fehlt Natrium in dem Medium, so befindet sich C266 außerhalb der Verteilungsräume der Substanz. Aus der  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der Schutzwirkung durch das Substrat lässt sich schließen, dass die Substratbindung nur in Verbindung mit oder nach der Bindung der Natriumionen erfolgt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass E257 an der Bindung der Natriumionen beteiligt ist.

Folgendes Strukturmodell läßt sich aus diesen Daten entwickeln:

Möglich wäre eine Topologie des Proteins, bei dem der Loop 6, vergleichbar der P-Loops in Kaliumkanälen (Choe et al. 1999), in oder als globuläre Struktur über der Pore des Transporters liegt. In diesem Loop ist die putative Substratbindungsstelle lokalisiert. Bei ungenügender  $\text{Na}^+$ -Konzentration im extrazellulären Medium befindet sich das Protein in einer Konformation, die es nicht erlaubt, das Substrat zu binden, da die putative Substratbindungsstelle für das Substrat nicht zugänglich ist. Gleichzeitig ist C266 dem SH-Gruppenblockern nicht zugänglich (Abbildung 14). Ist die  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Medium hoch genug, so kommt es zu einer Konformationsänderung, durch welche die Substratbindungsstelle und mit ihr das C266 in den Extrazellulärraum exponiert wird, so dass das Substrat gebunden werden kann (Abbildung 15).

Möglicherweise erlaubt diese Substratbindung wiederum eine Konformationsänderung, wodurch das Substrat mit einem weiteren Natriumion in das Zellinnere transportiert wird, wobei das Aspartat D115 eines der Natriumionen übernimmt und so die Abgabe des Substratmoleküls ins Zellinnere ermöglicht (Abbildung 16). Danach läge das Transportermolekül wieder in der Ausgangskonformation vor (Abbildung 17).

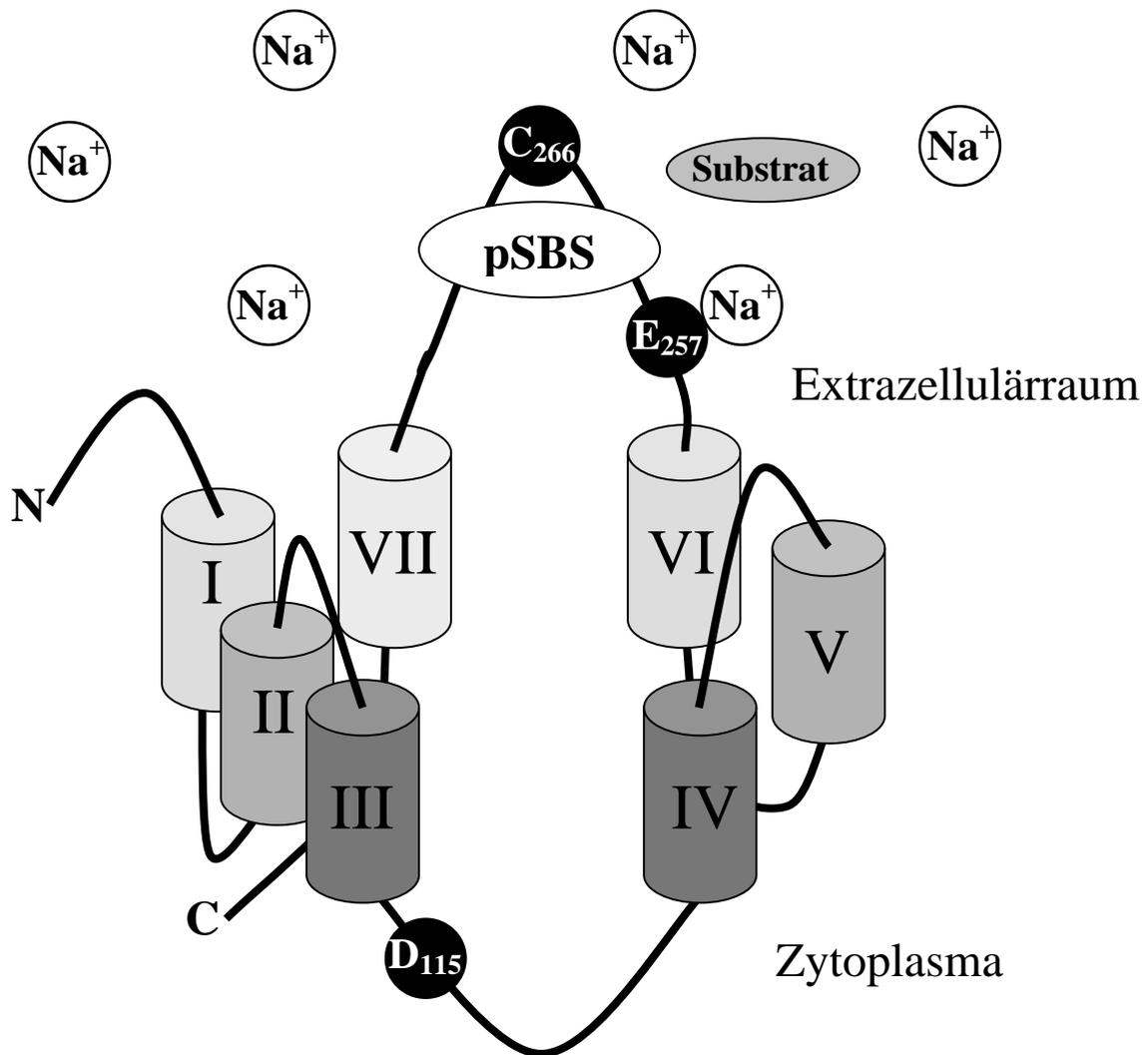


Abbildung 15: Strukturmodell des Ratten-Ntcp auf Basis der 7 Transmembrandomänen-Topologie. Der Loop 6 kann durch Interaktion des Glutamats 257 (E<sub>257</sub>) mit den Natriumionen in den Extrazellulärraum aufragen und so die putative Substratbindungsstelle (pSBS) und das Cystein 266 (C<sub>266</sub>) exponieren.

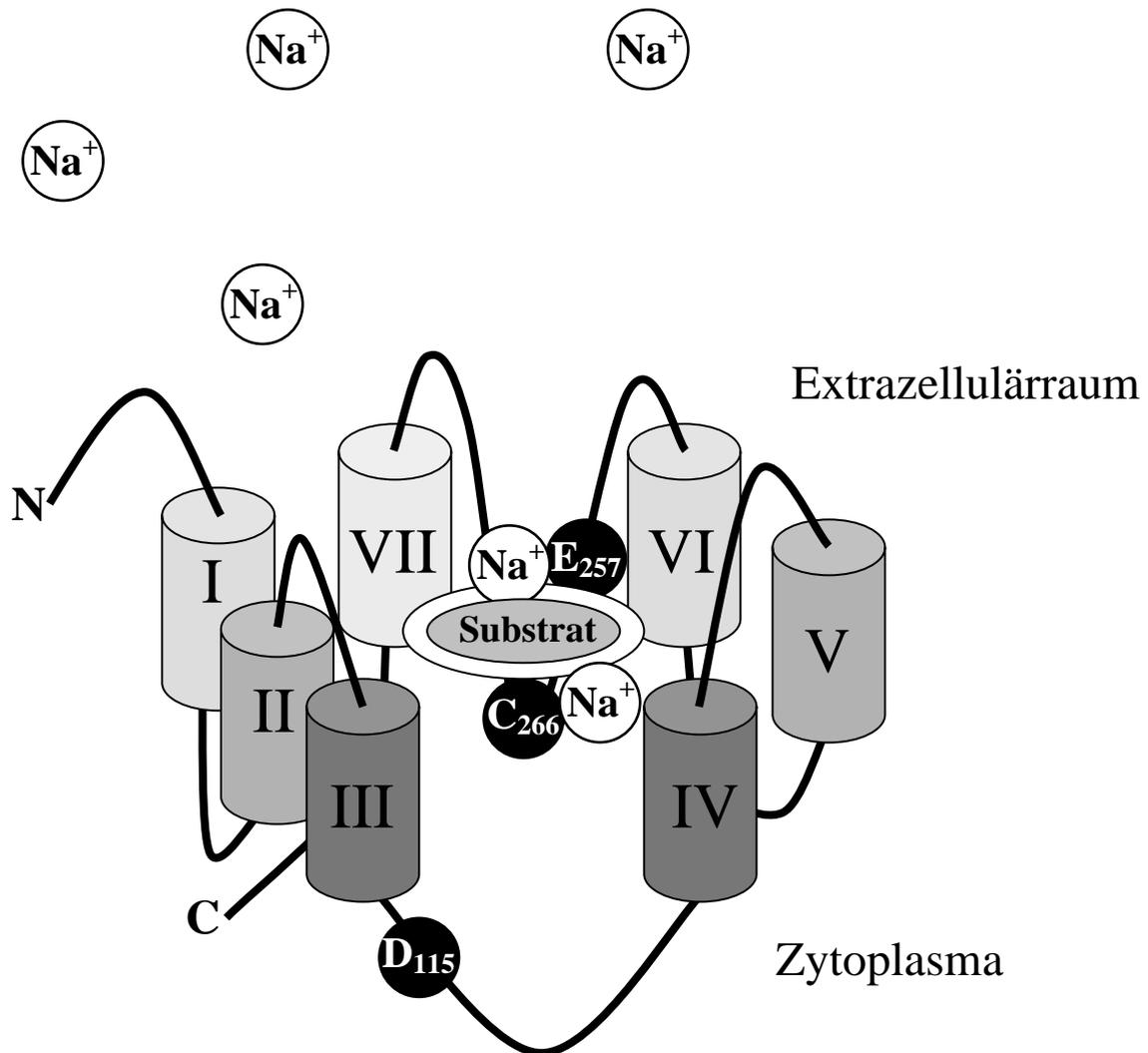


Abbildung 16: Strukturmodell des Ratten-Ntcp auf Basis der 7 Transmembrandomänen-Topologie. Nach der Bindung des Substrates kommt es erneut zur Konformationsänderung, wodurch das Substrat mit zwei Natriumionen ins Zellinnere bewegt wird.

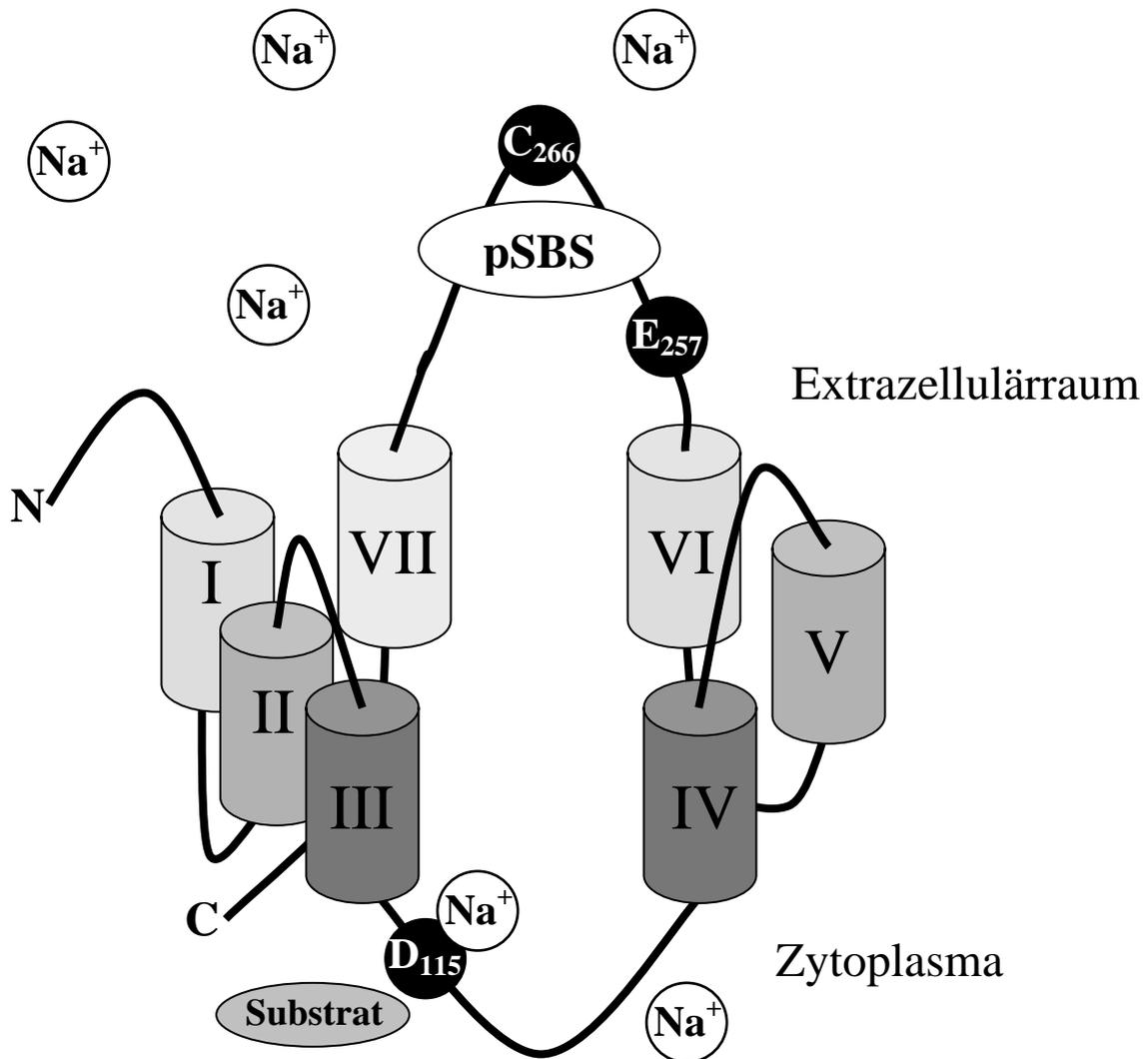


Abbildung 17: Durch die Übernahme eines Natriumions wird das Substrat ins Zellinnere freigegeben und im Anschluss die Substratbindungsstelle wieder nach außen exponiert.

## 7 Zusammenfassung

Gallensäuren zirkulieren bei Säugern im enterohepatischen Kreislauf zwischen dem Darm, der Leber und der Galle. An der Leber der Ratte werden Gallensäuren durch das Na<sup>+</sup>/Taurocholat cotransportierende Polypeptid (Ntcp) aus dem Portalblut in die Leberparenchymzellen transportiert. Ziel dieser Untersuchungen war es, über Mutagenesestudien am Ntcp funktionell notwendige, negativ geladene Aminosäuren in dem Protein zu identifizieren und zu klären, ob diese an der Na<sup>+</sup>-Bindung des Proteins beteiligt sind.

Durch Site-directed Mutagenese wurden, ausgehend von dem cDNA-Klon des Ntcp, Mutantenklone generiert, bei denen je eine von sieben negativ geladenen Aminosäuren, nämlich D24, E47, E89, D115, D147, E257 und E277 (fünf konservierte und zwei nicht konservierte), durch ihre neutralen Amide ersetzt wurden. Bei heterologer Expression in *X. laevis*-Oozyten wurde die Funktionalität der Klone durch Messung der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme in die Zellen geprüft. Die drei Mutationen D24N, D115N und E257Q reduzierten die [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme hochsignifikant. Diese Klone wurden nach Markierung mit dem FLAG<sup>®</sup>-Tag durch Immunfluoreszenzmikroskopie auf ihre Präsenz in der Oozytenmembran untersucht. Von den drei waren die Mutanten D115N und E257Q in der Oozyten-Oberfläche nachweisbar, während D24N dort fehlte. Dies zeigt, dass D24 zur korrekten Membraninsertion des Proteins notwendig ist. Durch Variation der Na<sup>+</sup>-Konzentration im Medium wurde die Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme der Klone D24N, D115N und E257Q und des Wildtyp-Ntcp bestimmt. Beim Wildtyp-Ntcp und den Mutanten D24N und D115N ergab diese eine Sättigungskinetik. Bei Mutante E257Q bestand eine lineare Beziehung zwischen [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme und der externen Na<sup>+</sup>-Konzentration. Der Hill-Koeffizient der [<sup>3</sup>H]Taurocholataufnahme des Wildtyp-Ntcp beträgt 2, er verringerte sich auf 1 für die Mutante D115N und 0,4 für die Mutante E257Q. Hieraus läßt sich schließen, dass E257 an der Natriumbindung beteiligt ist.

Diese Ergebnisse führten zu einer Hypothese über die Struktur-Funktions-Beziehung in dem Ntcp-Molekül, nach der sich in der Region des E257 eine Struktur ausbildet, die vergleichbar einem P-loop in Kaliumkanälen, in die Pore des Transporters hineinragt und bei der E257 eine Natriumbindungsstelle darstellt.

## 8 Summary

In mammals bile acids circulate between the gut, the liver and the bile in the enterohepatic circulation. The absorption of bile acids from the gut lumen as well as their clearance from portal blood is mediated by Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporters. In the liver the Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter is the Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp). The aim of this study is to identify negatively charged amino acids with functional importance for Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransport and to investigate, whether these amino acids are involved in Na<sup>+</sup>-binding by the protein.

Ntcp mutants were generated by site-directed mutagenesis of the cDNA-clone of the Ntcp. Seven negatively charged amino acids, namely D24, E47, E89, D115, D147, E257 und E277 (five conserved and two non conserved), were mutated into their uncharged amides. Functionality was proven by heterologous expression in *X. laevis*-oocytes and [<sup>3</sup>H]taurocholate uptake in the cells. The three mutations D24, D115 and E257 reduced [<sup>3</sup>H]taurocholate uptake significantly. These clones were tagged by the FLAG<sup>®</sup>-motif in order to follow their expression by immunofluorescence microscopy. The mutants D115N and E257Q were detected in the cell-membrane of the oocytes whereas mutant D24N was not present there. This indicates a role of D24 in the appropriate membrane sorting of the Ntcp-protein. The Na<sup>+</sup>-dependence of the [<sup>3</sup>H]taurocholate uptake was determined by altering the Na<sup>+</sup>-concentrations. Wildtype-Ntcp and the mutants D24N and D115N showed saturation kinetics whereas mutant E257Q exhibited a linear relation between [<sup>3</sup>H]taurocholate uptake and Na<sup>+</sup>-concentration. The Hill-coefficient of the [<sup>3</sup>H]taurocholate uptake of wildtype-Ntcp is 2 and it changed to 1 for the mutant D115N and 0,4 for the mutant E257Q. These results lead to the conclusion, that E257 is involved in Na<sup>+</sup>-binding.

This study shows, that the amino acids D24, D115, and E257 are of functional relevance for the Ntcp. D24 is required for the folding across or the insertion into the membrane. D115 might generate the cytoplasmic Na<sup>+</sup>-binding site of a P-loop structure from which sodium ions are released into the cytoplasm. E257 is with high probability involved in the binding of extracellular sodium ions.

## 9 Literaturverzeichnis

*Alpini G., Roberts S., Kuntz S.M., Ueno Y., Gubba S., Podila P.V., LeSage G., LaRusso N.* (1996). Morphological, molecular, and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology* 110: 1636-1643

*Alpini G., Glaser S.S., Rodgers R., Phinizyn J.L., Robertson W.E., Lasater J., Caligiuri A., Trejcek Z., LeSage G.D.* (1997). Functional expression of the apical Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology* 113(5): 1734-40

*Alpini G., Ueno Y., Glaser S.S., Marziani M., Phinizyn J.L., Francis H., Lesage G.* (2001). Bile acid feeding increased proliferative activity and apical bile acid transporter expression in both small and large rat cholangiocytes. *Hepatology* 34: 868-876

*Amelsberg A., Schteingart C.D., Ton-Nu H.-T., Hoffmann A.F.* (1996). Carrier mediated jejunal Absorption of conjugated bile acids in the guinea pig. *Gastroenterology* 110: 1098-11106

*Amelsberg A., Jochims C., Richter C.P., Nitsche R., Fölsch U.R.* (1999). Evidence for an anion exchange mechanism for uptake of conjugated bile acid from the rat jejunum. *Am. J. Physiol.* 276: G737-G742

*Ananthanarayanan M., von Dippe P., Levy D.* (1988). Identification of the hepatocyte Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transport protein using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 1988 Jun 15;263(17):8338-43

*Ananthanarayanan M., Ng O.C., Boyer J.L., Suchy F.J.* (1994). Characterization of cloned rat liver Na<sup>+</sup>-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *Am. J. Physiol.* 267(4 Pt 1):G637-43

*Ananthanarayanan M., Balasubramanian N., Makishima M., Mangelsdorf D.J., Suchy F.J.* (2001). Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J. Biol. Chem.* 276: 28857-28865

**Anwer M.S., Hegner D.** (1978). Effect of Na on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. Evidence for a heterogeneous system. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 359(2):181-92

**Anwer M.S., Webster C.R.L.** (2002). Signal Transduction in Bile Formation and Cholestasis, Molecular Pathogenesis of Cholestasis, eds. Trauner M., Jansen P.

**Baringhaus K.-H., Matter H., Stengelin S., Kramer W.** (1999). Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter of the rabbit. II. A reliable 3D QSAR pharmacophore model of the ileal Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. *J. Lipid Res.* 40: 2158-2168

**Bear C.E., Davidson J.S., Shaffer E.A.** (1987). Sodium-dependent taurocholate uptake by isolated rat hepatocytes occurs through an electrogenic mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 903(2): 388-94.

**Beesley R.C., Faust R.G.** (1979). Sodium ion-coupled uptake of taurocholate by intestinal brush-border membrane vesicles. *Biochem. J.* 178: 299-303

**Botham K.M., Suckling K.E.** (1986). The effect of dibutyryl cyclic AMP on the uptake of taurocholic acid by isolated rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* 883(1): 26-32

**Boyer J.L., Hagenbuch B., Ananthanarayanan M., Suchy F., Stieger B., Meier P.J.** (1993). Phylogenetic and ontogenetic expression of hepatocellular bile acid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 435-438

**Cattori V., Eckhardt U., Hagenbuch B.** (1999). Molecular cloning and functional characterization of two alternatively spliced Ntcp isoforms from mouse liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1445(1): 154-159

**Chattoraj M., King B.A., Bublitz G.U., Boxer S.G.** (1996). Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(16): 8362-8367

**Chitranukroh A., Taggart D., Billing B.H.** (1985). Enhancement of the urinary excretion of non-sulphated and sulphated radioactive bile acids by sodium acetate in the bile duct obstructed rat. *Clin. Sci. (London)* 68: 63-70

**Christie D.M., Dawson P.A., Thevananther S., Shneider B.L.** (1996). Comparative analysis of the ontogeny of a sodium-dependent bile acid transporter in rat kidney and ileum. *Am. J. Physiol.* 271: G377-G385

**Cohen B.I., Hofmann A.F., Mosbach E.H., Stenger R.J., Rothschild M.A., Hagey L.R., Yoon Y.B.** (1986). Differing effects of nor-ursodeoxycholic or ursodeoxycholic acid on hepatic histology and bile acid metabolism in the rabbit. *Gastroenterology* 91(1):189-97

**Cohn M.A., Rounds D.J., Karpen S.J., Ananthanarayanan M., Suchy F.J.** (1995). Assignment of a rat liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter gene to chromosome 6q24. *Mamm. Genome* 6(1):60

**Craddock A.L., Love M.W., Daniel R.W., Kirby L.C., Walters H.C., Wong M.H., Dawson P.A.** (1998). Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am. J. Physiol.* 274(1 Pt 1): G157-169.

**Dawson R.M.C., Elliot D.C., Elliot W.H., Jones K.M.** (1986). *Data for biochemical research*, third edition, Oxford University Press, Oxford, Walton Street, Seiten 6-16

**Dumont J.N.** (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136(2):153-719

**Edmondson J.W., Miller B.A., Lumeng L.** (1985). Effect of glucagon on hepatic taurocholate uptake: relationship to membrane potential. *Am. J. Physiol.* 1985 Oct;249(4 Pt 1):G427-433

**Elsner R., Ziegler K.** (1989). Determination of the apparent functional molecular mass of the hepatocellular sodium-dependent taurocholate transporter by radiation inactivation. *Biochim. Biophys. Acta* 983(1):113-117

**Galatola G., Jazrawi R.P., Bridges C., Joseph A.E., Northfield T.C.** (1991). Direct measurement of first-pass ileal clearance of a bile acid in humans. *Gastroenterology* 100: 1100-1105

**Gerloff T., Stieger B., Hagenbuch B., Madon J., Landmann L., Roth J., Hofmann A.F., Meier P.J.** (1998). The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J. Biol. Chem.* 273(16):10046-10050.

**Gilmore I.T., Thompson R.P.** (1978). Kinetics of <sup>14</sup>C-glycocholic acid clearance in normal man and in patients with liver disease. *Gut* 19: 1110-1115

**Green R.M., Ananthanarayanan M., Suchy F.J., Beier D.R.** (1998). Genetic mapping of the Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide to mouse chromosome 12. *Mamm.Genome.* 9(7): 598

**Grober J., Zaghini I., Fujii H., Jones S.A., Kliewer S.A., Willson T.M., Ono T., Besnard P.** (1999). Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J. Biol. Chem.* 274(42): 29749-54

**Grüne S., Engelking L.R., Anwer M.S.** (1993). Role of intracellular Calcium and protein kinases in the activation of hepatic Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransport by cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* 268(24): 17734-17741

**Hagenbuch B., Lubbert H., Stieger B., Meier P.J.** (1990). Expression of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 265(10): 5357-5360

**Hagenbuch B., Stieger B., Foguet M., Lubbert H., Meier P.J.** (1991). Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(23): 10629-10633

**Hagenbuch B., Meier P.J.** (1994). Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. *J. Clin. Invest.* 93: 1326-1331

**Hagenbuch B., Meier P.J.** (1996). Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin. Liver Dis.* 16(2):129-36.

**Hallen S., Branden M., Dawson P.A., Sachs G.** (1999). Membrane insertion scanning of the human ileal sodium/bile acid co-transporter. *Biochemistry* 38(35):11379-11388

**Hallen S., Fryklund J., Sachs G.** (2000). Inhibition of the human sodium/bile acid cotransporters by side-specific methanethiosulfonate sulfhydryl reagents: substrate-controlled accessibility of site of inactivation. *Biochemistry* 39(22): 6743-6750

**Hofmann A.F.** (1976). The enterohepatic circulation of bile acids in man. *Adv. Inter. Med.* 21:501-534

**Jung D., Fried M., Kullak-Ublick G.A.** (2002). Human apical sodium-dependent bile salt transporter gene (*SLC10A2*) is regulated by the peroxysome proliferator-activated receptor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 277(34):30559-30566

**Kramer W., Nicol S.B., Girbig F., Gutjahr U., Kowalewski S., Fasold H.** (1992). Characterization and chemical modification of the Na<sup>(+)</sup>-dependent bile acid transport system in brush-border membrane vesicles from rabbit ileum. *Biochim. Biophys. Acta* 1111(1): 93-102

**Kramer W., Girbig F., Gutjahr U., Kowalewski S., Jouvenal K., Muller G., Tripier D., Wess G.** (1993). Intestinal bile acid absorption. Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transport activity in rabbit small intestine correlates with the coexpression of an integral 93-kDa and a peripheral 14-kDa bile acid-binding membrane protein along the duodenum-ileum axis. *J. Biol. Chem.* 268(24):18035-18046

**Kramer W., Stengelin S., Baringhaus K.-H., Enhsen A., Heuer H., Becker W., Corsiero D., Girbig F., Noll R., Weyland C.** (1999). Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J. Lipid Res.* 40: 1604-1617

**Kubow S. und Jones P.J.H.** (1999): Lipids sterols and their metabolits, Modern nutrition in health and disease, eds: Shils M.E., Olson J.A., Shike M., Ross A.C., 9. Aufl, Williams & Wilkins, S 70-78

**Kullak-Ublick G.A., Beuers U., Fahney C., Hagenbuch B., Meier P.J., Paumgartner G.** (1999): Identification and functional characterization of the promoter region of the human organic anion transporting polypeptide gene. *Hepatology* 26(4):991-7

**Kyte J., Doolittle R.F.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157(1):105-132

**Langewische F.W., Zahner D., Eckhardt U., Langewische M.E., Jüngst-Carter E., Petzinger E.** (2001). Influence of cysteine, threonine and acidic amino acid residues of rat liver Ntcp for the transport of taurocholate. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement to Volume 363, Nr. 4: R11*

**Langewische F.W., Zahner D., Eckhardt U., Langewische M.E., Jüngst-Carter E., Petzinger E.** (2001). Changes in the transport of taurocholate by the rat liver Ntcp by mutations of cysteine, threonine and acidic amino acid residues. *Biol. Chem.* 382, Special supplement: S51

**Lazaridis K.N., Pham L., Tietz P., Marinelli R.A., deGroen P.C., Levine S., Dawson P.A., LaRusso N.F.** (1997). Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Clin. Invest.* 100(11): 2714-2721

**Lazaridis KN., Tietz P., Wu T., Kip S., Dawson P.A., LaRusso N.F.** (2000). Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97(20):11092-11097.

**Lindblad L., Lundholm K., Schersten T.** (1977). Bile acid concentrations in systemic and portal serum in presumably normal man and in cholestatic and cirrhotic conditions. *Scand. J. Gastroenterol.* 12(4):395-400

**Löffler G.** (1997): Gastrointestinaltrakt, Biochemie und Pathobiochemie, Hrsg: Löffler G., Petrides P.E., 5. Aufl. S.: 1001-1002

**Matoba N., Une M., Hoshita T.** (1986). Identification of unconjugated bile acids in human bile. *J. Lipid Res.* 27: 1154-1162

**Matter K.** (2000). Epithelial polarity: Sorting out the sorters. *Current Biology* 10: R39-R42

**Meier, P. J.** (1991): Biliary excretion of bile acids. *Progress in Pharmacology and clinical Pharmacology*, Vol. 8, No. 4, eds, Eichelbaum F.M., Forth W., Meyer U., Van Zwieten P.A., S.: 159-164

**Meier P.J., Hagenbuch B., Stieger B.** (1995): Properties of two cloned basolateral bile acid uptake proteins of rat and human liver. *Bile Acids in Gastroenterology, Basic and Clinical Advances*, eds. Hofmann A.F., Paumgartner P., Stiehl A., Kluwer Academic Publishers, 139-146

**Mukhopadhyay S., Ananthanarayanan M., Stieger B., Meier P.J., Suchy F.J., Anwer M.S.** (1997). cAMP increases liver Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransport by translocating transporter to plasma membranes. *Am. J. Physiol.* 273(4 Pt 1): G842-848

**Mukhopadhyay S., Ananthanarayanan M., Stieger B., Meier P.J., Suchy F.J., Anwer M.S.** (1998a). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a serine, threonine phosphoprotein and is dephosphorylated by cyclic adenosine monophosphate. *Hepatology* 28(6):1629-1636

**Mukhopadhyay S., Webster C.R.L., Anwer M.S.** (1998b). Role of protein phosphatases in cyclic AMP-mediated stimulation of hepatic Na<sup>+</sup>/Taurocholate cotransport. *J. Biol. Chem.* 273(45): 30039-30045

**Müller M., Ishikawa T., Berger U., Klünemann C., Lucka L., Schreyer A., Kannicht C., Reutter W., Kurz G., Keppler D.** (1991). ATP-dependent transport of taurocholate across the hepatocyte canalicular membrane mediated by a 110-kDa Glycoprotein binding ATP and bile salt. *J. Biol. Chem.* 266: 18920-18926

**Oelkers P., Kirby L.C., Heubi J.E., Dawson P.A.** (1997). Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2).

J. Clin. Invest. 99(8): 1880-1887

**Petzinger E., Frimmer M.** (1984). Driving forces in hepatocellular uptake of phalloidin and cholate. Biochim. Biophys. Acta. 778(3):539-548.

**Petzinger E.**, (1994). Transport of organic anions in the liver. An update on bile acid, fatty acid, monocarboxylate, anionic amino acid, cholephilic organic anion, and anionic drug transport. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 123:47-211

**Petzinger E., Wickboldt A., Pagels P., Starke D., Kramer W.** (1999). Hepatobiliary transport of bile acid amino acid, bile acid peptide, and bile acid oligonucleotide conjugates in rat. Hepatology 30: 1257-1268

**Reichen J., Paumgartner G.** (1976). Uptake of bile acids by perfused rat liver. Am. J. Physiol. 231: 734-742

**Reymann A., Braun W., Drobik C., Woermann C.** (1989). Stimulation of bile acid active transport related to increased mucosal cyclic AMP content in rat ileum in vitro. Biochim. Biophys. Acta 1011(2-3):158-164

**Ruifrok P.G., Meijer D.K.** (1982). Sodium ion-coupled uptake of taurocholate by rat-liver plasma membrane vesicles. Liver 2(1):28-34

**Saeki T., Matoba K., Furukawa H., Kirifuji K., Kanamoto R., Iwami K.** (1999). Characterization, c-DNA cloning and functional expression of mouse ileal sodium-dependent bile acid transporter. J. Biochem. (Tokyo), 125: 846-851

**Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74(12):5463-5467

**Schroeder A., Eckhardt U., Stieger B., Tynes R., Schteingart C.D., Hofmann A.F., Meier P.J., Hagenbuch B.** (1998). Substrate specificity of the rat liver Na<sup>+</sup>-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *Am. J. Physiol.* 274(2 Pt 1): G370-375

**Schwenk M., Del Pino V.L., Hegazy E.** (1982). Bile acid uptake by isolated intestinal mucosa cells of guinea pig. *Biochim. Biophys. Acta* 721(3):247-252

**Schwenk M., Hegazy E., del Pino V.L.** (1983). Kinetics of taurocholate uptake by isolated ileal cells of guinea pig. *Eur. J. Biochem.* 131(2): 387-391

**Shih D.Q., Bussen M., Sehayek E., Ananthanarayanan M., Shneider B.L., Suchy F.J., Shefer S., Bollileni J.S, Gonzalez F.J., Breslow J.L., Stoffel M.** (2001) Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat Genet.* 27(4):375-82

**Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y.** (1962). Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. cell. comp. Physiol.* 59: 223-239

**Shneider B.L., Dawson P.A., Christie D.M., Hardikar W., Wong M.H., Suchy F.J.** (1995). Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ilal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Clin. Invest.* 95: 745-754

**Sonnhammer E.L., von Heijne G., Krogh A.** (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 6:175-182.

**Staddon J.M., Hansford R.G.** (1986). 4 beta-Phorbol 12-myristate 13-acetate attenuates the glucagon-induced increase in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 238: 737-743

**Starke D., Lischka K., Pagels P., Uhlmann E., Kramer W., Wess G., Petzinger E.** (2001). Bile acid-oligodeoxynucleotide conjugates: synthesis and liver excretion in rats. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11: 945-949

**Stelzner M., Hoagland V., Somasundaram S.** (2000). Distribution of bile acid absorption and bile acid transporter gene message in the hamster ileum. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 440: 157-162

**Stengelin S., Apel S., Becker W., Maier M., Rosenberger J., Wess G., Kramer W.** (1997). direct submission, NCBI Accessionnr. q28727

**Stengelin S.** (1998). direct submission, NCBI Accessionnr. caa10360

**Stieger B., Hagenbuch B., Landmann L., Hochli M., Schroeder A., Meier P.J.** (1994). In situ localization of the hepatic Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 107(6):1781-1787

**Sun A.Q., Ananthanarayanan M., Soroka C.J., Thevananther S., Shneider B.L., Suchy F.J.** (1998). Sorting of rat liver and ileal sodium-dependent bile acid transporters in polarized epithelial cells. *Am-J-Physiol.* 275(5 Pt 1): G1045-1055

**Sun A.Q., Arrese M.A., Zeng L., Swaby I., Zhou M.M., Suchy F.J.** (2001). The rat liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. Importance of the cytoplasmic tail to function and plasma membrane targeting. *J. Biol. Chem.* 276(9):6825-6833

**von Dippe P., Levy D.** (1990). Reconstitution of the immunopurified 49-kDa sodium-dependent bile acid transport protein derived from hepatocyte sinusoidal plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 265(25):14812-14816

**von Heijne G.** (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* 5: 1335-1342

**von-Heijne G., Gavel Y.** (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 174(4): 671-678

**Wallin E., von Heijne G.** (1998). Genome wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7:1029-1038

**Webster C.R., Anwer M.S.** (1999). Role of the PI3K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *Am. J. Physiol.* 277(6 Pt 1):G1165-72.

**Webster C., Blanch C.J., Phillips J., Anwer M.S.** (2000). Cell swelling-induced translocation of rat liver Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransport polypeptide is mediated via the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 275(38):29754-29760

**Weinman S.A.**, (1997) Electrogenicity of Na<sup>+</sup>-coupled bile acid transporters. *Y. J. Biol. Med.* 70:331-340

**Weinman S.A., Carruth MW., Dawson P.A.** (1998). Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J. Biol. Chem.* 273(52): 34691-34695

**Wong M.H., Oelkers P., Craddock A.L., Dawson P.A.** (1994). Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Biol. Chem.* 269(2): 1340-1347

**Wong M.H., Oelkers P., Dawson P.A.** (1995). Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J. Biol. Chem.* 270(45): 27228-27234

**Wong M.H., Rao P.N., Pettenati M.J., Dawson P.A.** (1996). Localization of the ileal sodium.bile acid cotransporter gene (SLC10A2) to human chromosome 13q33. *Genomics* 33(3): 538-540

**Wright E.M., Loo D.D., Turk E., Hirayama B.A.** (1996). Sodium cotransporters. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8(4):468-73

## 10 Veröffentlichungen

*Langewische F.W., Zahner D., Eckhardt U., Langewische M.E., Jüngst-Carter E., Petzinger E.* (2001). Influence of cysteine, threonine and acidic amino acid residues of rat liver Ntcp for the transport of taurocholate. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement to Volume 363, Nr. 4: R11

*Langewische F.W., Zahner D., Eckhardt U., Langewische M.E., Jüngst-Carter E., Petzinger E.* (2001). Changes in the transport of taurocholate by the rat liver Ntcp by mutations of cysteine, threonine and acidic amino acid residues. Biol. Chem. 382, Special supplement: S51

*Zahner D., Eckhardt U., Petzinger E.* (2003). Transport of taurocholate by mutants of negatively charged amino acids, cysteines, and threonines of the rat liver sodium-dependent taurocholate cotransporting polypeptide Ntcp. Eur. J. Biochem. 270: 1117-1127

## Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich auf ganz unterschiedliche Art und Weise bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle spreche ich Prof. Dr. Ernst Petzinger meinen Dank dafür aus, dass er mir dieses Thema übertragen hat und mir dessen Bearbeitung im Institut für Veterinärpharmakologie und –toxikologie ermöglicht hat. Ich möchte in diesem Zusammenhang hervorheben, dass seine Vision die Basis für diese Arbeit darstellt. Seine oft auch unbequeme Kritik hat mir geholfen hat aus einer Idee eine Arbeit zu entwickeln.

Dres. Marita und Frank Langewische und Dr. Uta Tortell danke ich für die Anleitung bei meinen ersten Gehversuchen in der Molekularbiologie sowie für die Einweisung in die Aufnahmeversuche.

Den Kollegen am Institut für Veterinärpharmakologie und –toxikologie, vor allem Dr. Jörg Alber, Achim Geier, Silke Neumann, Regina Leidolf, Klaus Schuh und Kurt Stumpf danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung.

Dr. Jörg Hirzmann und Dr. Tarig Dafa'alla aus dem Institut für Parasitologie standen mir für vielseitige Beratungen, insbesondere bei der Bedienung des Immunfluoreszenzmikroskops zur Verfügung.

Beim Erstellen der mikroskopischen Schnitte stellten die Mitarbeitern des Instituts für Pathologie eine große Hilfe dar.

Frau von Schnakenburg danke ich für ihren Einsatz an den Fronten der Bürokratie.

Großer Dank gilt meinem Vater in zweierlei Hinsicht: Für die wissenschaftliche Begleitung und Beratung, sowie gemeinsam mit meiner Mutter für die nötige moralische Unterstützung und Motivation.

Meiner Frau Tina und meinen Töchtern Philine und Greta danke ich für ihre Geduld und die Zeit die sie mich für diese Arbeit entbehren mussten.