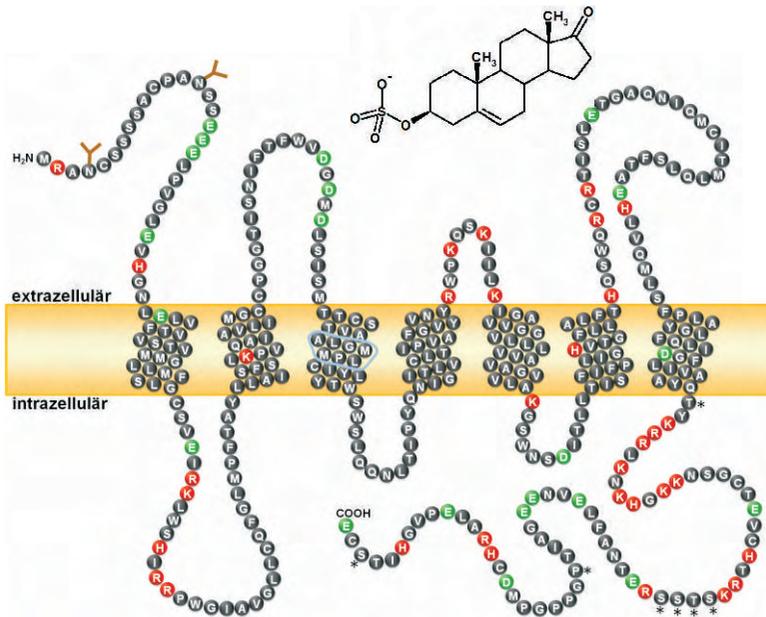


# MOLEKULARE UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES HUMANEN SODIUM-DEPENDENT ORGANIC ANION TRANSPORTERS (SOAT)

BARBARA DÖRING



## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. oec. troph.

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



*edition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



**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 2010

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 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)



# **Molekulare und funktionelle Charakterisierung des humanen Sodium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT)**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Ökotrophologie

(Dr. oec. troph.)

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

vorgelegt von

Dipl. oec. troph. Barbara Döring

Gießen 2009

Aus dem Institut für Biochemie der Ernährung,  
Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement

Betreuer: Prof. Dr. Katja Becker

Angefertigt am Institut für Pharmakologie und Toxikologie,  
Fachbereich Veterinärmedizin

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

Erstgutachter: Prof. Dr. Katja Becker

Professur für Biochemie der Ernährung  
Institut für Ernährungswissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Interdisziplinäres Forschungszentrum  
Heinrich-Buff-Ring 26-32  
35392 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Joachim Geyer

Juniorprofessur für Pharmakogenetik und Pharmakogenomik  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizin  
Frankfurter Str. 107  
35392 Gießen

## Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

### Peer-Reviewed Paper:

Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt H, Petzinger E (2007) Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem* 282:19728-19741.

### Kongressbeiträge:

Döring B, Geyer J, Petzinger E (2006) Cloning and functional characterisation of the human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6): Transport of steroid sulfates.

*47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz; 04.04.2006-06.04.2006*

*Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372, Suppl 1:15/1. (Vortrag)

Döring B, Geyer J, Petzinger E (2006) Transport of sulfated steroid hormones by the SOAT (SLC10A6) carrier, a newly cloned member of the SLC10 organic anion transporter family.

*10<sup>th</sup> International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT), Torino (Italy); 17.09.2006-22.09.2006*

*J vet Pharmacol Therap* 29, Suppl 1:192/F10. (Vortrag)

Döring B, Geyer J, Meerkamp K, Petzinger E (2007) The sodium-dependent organic anion transporter is a novel placental carrier for sulfoconjugated steroid hormones and sulfoconjugated bile acids. (Poster)

*6<sup>th</sup> Transport Colloquium at Castle Rauischholzhausen, Rauischholzhausen; 10.05.2007-11.05.2007*

Döring B, Geyer J, Meerkamp K, Petzinger E (2007) The sodium-dependent organic anion transporter SOAT (SLC10A6): Molecular and functional characterization. (Poster, Preis für das beste Poster: 3. Platz)

*BioMedical Transporters 2007, Bern; 12.08.2007-16.08.2007*

Grosser G, Döring B, Petzinger E, Geyer J (2009) Comparison of the substrate pattern of the SLC10 carriers NTCP, ASBT, and SOAT. (Poster)

*EASL-AASLD Monothematic Conference Nuclear Receptors and Liver Disease, Wien; 27.02.2009-01.03.2009*

Grosser G, Döring B, Meerkamp K, Geyer J (2009) Differences in substrate pattern of the SLC10 carriers NTCP, ASBT, and SOAT.

*50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz; 10.03.2009-12.03.2009*

*Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379, Suppl 1:8. (Vortrag)

Döring B, Grosser G, Neubauer A, Geyer J (2009) Substraterkennung und Transportmechanismus der Gallensäuretransporter NTCP, ASBT und SOAT: Bedeutung für die Cholesterinhomöostase.

*46. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., Gießen; 12.03.2009-13.03.2009*

*Proc Germ Nutr Soc* 13:2. (Vortrag)



## Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen .....	V
Verzeichnis der Tabellen .....	VII
Verzeichnis der Abkürzungen .....	VIII
Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren .....	XII
Der genetische Code .....	XII
Vorsätze im Dezimalsystem .....	XII
<b>1 Literaturübersicht .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Familie der SLC10-Transporter .....	1
1.2 Das Na <sup>+</sup> /Taurocholat Cotransporting Polypeptide (NTCP, SLC10A1) .....	3
1.2.1 Klonierung des NTCP/Ntcp .....	3
1.2.2 Expression und Funktion des NTCP/Ntcp .....	4
1.2.3 Varianten des NTCP/Ntcp .....	5
1.2.4 Pharmakologische Bedeutung des NTCP .....	5
1.3 Der Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter (ASBT, SLC10A2) .....	6
1.3.1 Klonierung des ASBT/Asbt .....	6
1.3.2 Expression und Funktion des ASBT/Asbt .....	6
1.3.3 Der t-Asbt der Ratte .....	7
1.3.4 Phänotypische Auswirkungen fehlender ASBT/Asbt-Funktion .....	8
1.3.5 Die Asbt Knockout-Maus .....	8
1.3.6 Pharmakologische Bedeutung des ASBT .....	9
1.4 Der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren .....	12
1.4.1 Allgemeiner Überblick .....	12
1.4.2 Gallensäure-Transportsysteme der Leber .....	13
1.4.3 Gallensäure-Transportsysteme des Darms und der Niere .....	15
1.4.4 Gallensäuretransportsysteme der Gallengänge – <i>Cholehepatic Shunt</i> .....	17
1.4.5 Gallensäuren als Regulatoren der Gallensäure-Homöostase .....	17
1.5 Neue Mitglieder der SLC10-Familie .....	19
1.5.1 SLC10A4 .....	19
1.5.2 SLC10A3 und SLC10A5 .....	19
1.5.3 SLC10A6 .....	20
1.5.4 SLC10A7 .....	20
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	21
<b>2 Material .....</b>	<b>22</b>
2.1 Molekularbiologisches Material .....	22
2.1.1 Primer .....	22
2.1.2 Enzyme .....	25
2.1.3 Vektoren .....	26
2.1.4 Bakterienstämme .....	29
2.1.5 RNA, cDNA Panels .....	29
2.1.6 qPCR .....	29
2.1.7 Längenstandards .....	30
2.1.8 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien .....	30
2.1.9 Puffer und Medien .....	31
2.2 Agarose-Gelelektrophoresen .....	31
2.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese (DNA) .....	31
2.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (RNA) .....	32
2.3 Zellkultur .....	32
2.3.1 Zelllinien .....	32
2.3.2 Medien .....	33
2.3.3 Antibiotika .....	34
2.4 Stabile und transiente Transfektion .....	35
2.4.1 Transfektionsreagenzien .....	35
2.4.2 Medien zur Transfektion .....	35

2.5	Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	35
2.5.1	Versuchstiere.....	35
2.5.2	Puffer und Lösungen für Transportmessungen.....	36
2.6	Transportmessungen an eukaryotischen Zellen .....	36
2.6.1	Puffer und Lösungen .....	36
2.6.2	Proteinbestimmung.....	37
2.7	Immunfluoreszenz.....	37
2.7.1	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	37
2.7.2	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen .....	38
2.8	Proteinanalyse .....	39
2.8.1	Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteine) .....	39
2.8.2	Puffer und Lösungen für Radioimmunpräzipitation (RIP).....	40
2.8.3	Puffer und Lösungen für Western Blot .....	40
2.8.4	Filmentwicklung .....	40
2.8.5	Kommerziell erhältliche Kits .....	41
2.9	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe .....	41
2.10	Chemische Substanzen .....	42
2.10.1	Reagenzien .....	42
2.10.2	Feinchemikalien.....	44
2.10.3	Radioaktiv-markierte Substanzen .....	45
2.11	Geräte .....	46
2.12	Verbrauchsmaterial .....	47
2.13	Bioinformatische Programme und Datenbanken.....	48
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>50</b>
3.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	50
3.1.1	Phenol/Chloroform-Extraktion proteinhaltiger Lösungen .....	50
3.1.2	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren .....	50
3.1.3	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung .....	50
3.1.4	Native Agarose-Gelelektrophorese .....	51
3.1.5	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten .....	51
3.1.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	52
3.1.7	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA.....	52
3.1.8	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab .....	52
3.1.9	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab .....	53
3.2	Methoden zur Isolierung und Aufarbeitung von RNA .....	54
3.2.1	Total-RNA Isolierung aus Zellen .....	54
3.2.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese .....	55
3.2.3	cDNA-Synthese aus Total-RNA .....	55
3.2.4	cDNA-Synthese aus Zelllysaten.....	55
3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	56
3.3.1	Allgemeine Regeln zur Primerauswahl .....	56
3.3.2	PCR-Reaktionsansatz .....	57
3.3.3	Touchdown-PCR .....	58
3.3.4	Zielgerichtete Mutagenese .....	58
3.3.5	Quantitative Real-Time PCR .....	60
3.4	DNA-Klonierung .....	61
3.4.1	Klonierung über Ligation .....	61
3.4.2	TOPO-Klonierung .....	62
3.4.3	Transformation .....	62
3.5	Sequenzierung und Auswertung der Sequenzspuren.....	62
3.6	Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	63
3.6.1	cRNA-Synthese.....	63
3.6.2	Oozytenentnahme und Aufbereitung der Oozyten.....	64
3.6.3	Mikroinjektion der cRNA.....	65
3.6.4	Transportmessung an Oozyten.....	65

3.7	Immunfluoreszenz FLAG-markierter Proteine in Oozyten.....	66
3.7.1	Vorbereitung der Oozyten .....	66
3.7.2	Primäre und sekundäre Antikörperreaktion.....	66
3.7.3	Einbettung der Oozyten und Schneiden der Präparate .....	67
3.8	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	67
3.8.1	Passagieren und Aussäen der Zellen .....	67
3.8.2	Einfrieren der Zellen .....	68
3.8.3	Auftauen der Zellen .....	68
3.9	Transfektion eukaryotischer Zellen .....	68
3.9.1	Stabile Transfektion.....	69
3.9.2	Tetrazyklin-regulierte Proteinexpression.....	71
3.9.3	Transiente Transfektion.....	72
3.10	Transportmessung an eukaryotischen Zellen .....	72
3.10.1	Ansetzen der Messlösung und Vorbereitung der Zellen .....	73
3.10.2	Aufnahmemessung.....	73
3.10.3	<i>cis</i> -Hemmung .....	73
3.10.4	Flüssigszintillationsmessung.....	74
3.10.5	Proteinbestimmung.....	74
3.10.6	Auswertung der Aufnahmeversuche .....	74
3.11	Immunfluoreszenz.....	75
3.11.1	Herstellung des SOAT <sub>2-17</sub> Antiserums.....	75
3.11.2	Indirekte Immunfluoreszenz mit dem SOAT <sub>2-17</sub> Antiserum .....	76
3.11.3	Indirekte Immunfluoreszenz mit den anti-FLAG und anti-V5 Antikörpern.....	77
3.11.4	Direkte Fluoreszenz EmGFP-markierter Proteine.....	77
3.11.5	Mikroskopie .....	78
3.12	Western Blot.....	78
3.12.1	Proteinaufbereitung .....	78
3.12.2	Proteinbestimmung.....	78
3.12.3	Gellauf und Blotting .....	79
3.12.4	Blockierung der Membran und Antikörperreaktion.....	80
3.12.5	Detektion .....	80
3.13	Radioimmunpräzipitation und Deglykosylierung.....	81
3.13.1	Expression der Proteine und Radioaktivmarkierung .....	81
3.13.2	Immunpräzipitation der FLAG-Proteine.....	81
3.13.3	Deglykosylierung .....	81
3.13.4	Detektion der Proteine.....	82
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>83</b>
4.1	Sequenzanalyse der SLC10A6-Subfamilie .....	83
4.2	Expression des humanen SOAT .....	86
4.3	Identifizierung des humanen SOAT als Natrium-abhängiges Transportsystem in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	86
4.4	Subklonierung des humanen SOAT, ASBT und NTCP in Expressionsvektoren für Säugetierzellen .....	88
4.5	Etablierung stabiler SOAT, SOAT-EmGFP, ASBT-FLAG und NTCP-FLAG HEK293 Zelllinien.....	89
4.5.1	Überprüfung der stabilen Zelllinien über quantitative Real-Time PCR .....	90
4.5.2	Nachweis des stabilen NTCP-FLAG, ASBT-FLAG und SOAT-EmGFP mit Immuncytochemie .....	91
4.5.3	Tetrazyklin-Induzierbarkeit der HEK293 Zelllinien .....	92
4.5.4	Temperaturabhängigkeit .....	94
4.6	Funktionelle Charakterisierung des humanen SOAT .....	94
4.6.1	Substratscreening.....	94
4.6.2	Zeit- und Natriumabhängigkeit des SOAT-Transports.....	96
4.6.3	Kinetiken der SOAT-vermittelten Aufnahme .....	97
4.6.4	<i>Cis</i> -Hemmungen.....	101
4.6.5	Ionenselektivität und Natrium-Abhängigkeit.....	104
4.6.6	pH-Abhängigkeit.....	107

4.7	Membranexpression und -topologie .....	108
4.8	N-Glykosylierung.....	111
4.9	Phosphorylierung .....	112
4.10	Polymorphismen .....	114
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>116</b>
5.1	Einordnung des humanen SOAT in die SLC10-Familie .....	116
5.1.1	Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse der SLC10-Mitglieder .....	116
5.1.2	Genomische Organisation der Mitglieder der SLC10-Familie.....	117
5.1.3	Expression.....	119
5.2	Strukturvergleich von SOAT, ASBT und NTCP.....	120
5.2.1	Transmembranäre Organisation .....	120
5.2.2	Sekundäre Modifikationen der Proteine: N-Glykosylierung .....	121
5.2.3	Sekundäre Modifikationen der Proteine: Phosphorylierung .....	124
5.3	Funktionsvergleich .....	125
5.3.1	Substratspektrum von NTCP, ASBT und SOAT .....	125
5.3.2	Interaktion des SOAT mit weiteren Substanzen .....	126
5.3.3	Transportmechanismus.....	128
5.3.4	Einfluss des pH-Wertes auf die Transportaktivität .....	130
5.3.5	Theorie der zwei Substratbindungsstellen .....	131
5.3.6	Neubewertung potenziell am Transport beteiligter Aminosäuren im ASBT .....	132
5.4	Physiologische Bedeutung des SOAT .....	133
5.4.1	Steroidsulfate und Synthese von Steroidhormonen.....	133
5.4.2	Brustdrüse .....	135
5.4.3	Plazenta.....	136
5.4.4	Hoden .....	138
5.4.5	Toxikologische Bedeutung des SOAT im Hoden .....	139
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>142</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>143</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>161</b>
<b>10</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>163</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1:	Bayesian Protein-Stammbaum ausgewählter Mitglieder der SLC10-Familie. ....	2
Abb. 1.2:	Chemische Klassen von ASBT-Inhibitoren welche bereits in verschiedenen Tierspezies getestet wurden. ....	11
Abb. 1.3:	Transportsysteme des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren. ....	16
Abb. 1.4:	Gallensäuren als Regulatoren der Gallensäurehomöostase in Hepatozyt (oben) und Enterozyt (unten) auf Ebene der Gallensäuretransporter. ....	18
Abb. 2.1:	Prinzip der Generierung der Flp-In T-REx 293 Zellen. ....	33
Abb. 3.1:	Überblick über die Funktionsweise der <i>QuikChange Site-directed Mutagenesis</i> Methode. ....	60
Abb. 3.2:	Prinzip der quantitativen Real-Time PCR mit dem <i>TaqMan</i> System. ....	61
Abb. 3.3:	Schematische Darstellung der stabilen Transfektion mit dem Flp-In System. ....	70
Abb. 3.4:	Darstellung der Tetrazyklin-regulierten Proteinexpression in Flp-In T-REx 293 Zellen. ....	71
Abb. 3.5:	Anregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren der verwendeten Fluorophore. ....	75
Abb. 3.6:	Überprüfung der Antigenität des Kaninchenserums gegen die SOAT-Epitope 2-17 und 349-364 mittels ELISA. ....	76
Abb. 3.7:	Aufbau des Semi-Dry Elektrolot Gelsandwiches. ....	79
Abb. 4.1:	Aminosäure-Sequenzalignment der SOAT/Soat-Proteine verschiedener Säugetier-spezies. ....	85
Abb. 4.2:	Untersuchung der SOAT-Expression in humanen Geweben mittels RT-PCR. ....	86
Abb. 4.3:	Na <sup>+</sup> -abhängiger Steroidsulfattransport in SOAT-injizierte <i>Xenopus laevis</i> Oozyten. ....	87
Abb. 4.4:	Nachweis des humanen SOAT über das FLAG-Epitop in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten. ....	87
Abb. 4.5:	Nachweis der SOAT-, ASBT- und NTCP-FLAG, -V5-His und -EmGFP Fusionsproteine mittels Immuncytochemie. ....	89
Abb. 4.6:	Kontrolle der stabilen HEK293 Zelllinien über quantitative Real-Time PCR. ....	90
Abb. 4.7:	Nachweis des ASBT-FLAG, NTCP-FLAG und SOAT-EmGFP in stabil transfizierten HEK293 Zellen mittels Immuncytochemie und Western Blot. ....	91
Abb. 4.8:	Aufnahme von TC (1 µM) und DHEAS (1 µM) in Tetrazyklin-induzierte (+) und nicht-induzierte (-) stabil transfizierte HEK293 Zelllinien. ....	93
Abb. 4.9:	Aufnahme von DHEAS und E <sub>1</sub> S in SOAT-HEK293 in Abhängigkeit von der Tetrazyklin-Induktionszeit. ....	93
Abb. 4.10:	Aufnahme von DHEAS (2,5 µM) in SOAT-HEK293 und Kontrollzellen in Abhängigkeit von der Temperatur. ....	94
Abb. 4.11:	Na <sup>+</sup> -abhängige Aufnahme von 2-SMP und Aufnahme und Hemmung von 4-SMP in SOAT-HEK293 Zellen. ....	96
Abb. 4.12:	Zeit- und Na <sup>+</sup> -abhängiger Transport von Steroidsulfaten in SOAT-HEK293 Zellen. ....	97
Abb. 4.13:	Initiale Aufnahmegeschwindigkeit von DHEAS in SOAT-HEK293 Zellen. ....	98
Abb. 4.14:	Konzentrationsabhängige Aufnahme von DHEAS, E <sub>1</sub> S und PREGS in SOAT-HEK293 Zellen. ....	99
Abb. 4.15:	Transformation der konzentrationsabhängigen SOAT-spezifischen Aufnahme nach Hill. ....	100
Abb. 4.16:	Bestimmung der K <sub>i</sub> -Werte für TLCS, 2-SMP und 4-SMP durch Hemmung des SOAT-vermittelten Transports von DHEAS bzw. E <sub>1</sub> S. ....	101
Abb. 4.17:	Hemmung der SOAT-vermittelten DHEAS-Aufnahme mit Steroiden, Gallensäuren, nicht-steroidalen Organosulfaten und Naphthylderivaten. ....	103
Abb. 4.18:	Hemmung der TLCS-Aufnahme in SOAT-HEK293 Zellen. ....	104

Abb. 4.19: Einfluss equimolarer Substitution von NaCl auf die DHEAS-Aufnahme in SOAT-HEK293 Zellen. ....	105
Abb. 4.20: Aufnahme von DHEAS und TC in Abhängigkeit von der Na <sup>+</sup> -Konzentration.....	106
Abb. 4.21: Aufnahme von 1 µM DHEAS (A) und 1 µM TC (B) in Abhängigkeit von dem pH-Wert. ...	108
Abb. 4.22: Immunfluoreszenz zur Bestimmung der Membrantopologie des SOAT-Proteins.....	110
Abb. 4.23: Immunpräzipitation und Deglykosylierung der SOAT-FLAG- und ASBT-FLAG-Proteine. ....	111
Abb. 4.24: Einfluss einer potenziellen Deglykosylierung und Dephosphorylierung des SOAT-Proteins auf die Transportaktivität. ....	112
Abb. 4.25: Nachweis der Wildtyp und S230A SOAT-FLAG- und -V5-His-Proteine mittels Immunocytochemie. ....	113
Abb. 4.26: Aufnahme von E <sub>1</sub> S in (100 nM) SOAT-Wildtyp, SOAT-I114V und SOAT-S6F exprimierende <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	115
Abb. 5.1: Phylogenetischer Stammbaum der SLC10/Slc10-Familie (nach Geyer et al. 2006). ....	117
Abb. 5.2: Genomische Organisation der SLC10/Slc10-Gene. ....	118
Abb. 5.3: Postulierte Transmembrantopologien des SOAT und Hydrophobizitätsplot. ....	121
Abb. 5.4: Aminosäure-Sequenzalignment der humanen ASBT-, SOAT- und NTCP-Proteine.....	122
Abb. 5.5: Transmembrandomänenmodell des humanen SOAT.....	124
Abb. 5.6: Strukturformeln der Steroidsulfate DHEAS, E <sub>1</sub> S und PREGS. ....	126
Abb. 5.7: Strukturformeln, der für die <i>cis</i> -Hemmung eingesetzten Gallensäuren und nicht-steroidalen Organosulfate. ....	128
Abb. 5.8: Humane Steroidogenese aus Cholesterin und sulfatierten Steroiden. ....	134

## Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1.1:	Übersicht über bisher identifizierte NTCP/Ntcp-Transkripte verschiedener Spezies.....	3
Tab. 1.2:	Übersicht über bisher identifizierte ASBT/Asbt-Transkripte verschiedener Spezies. ....	6
Tab. 4.1:	Übersicht über bisher identifizierte SOAT-Transkripte verschiedener Spezies. ....	83
Tab. 4.2:	Aufnahme verschiedener [ <sup>3</sup> H]- und [ <sup>14</sup> C]-markierter Substanzen in SOAT-HEK293 Zellen.....	95
Tab. 4.3:	Kinetische Parameter der SOAT-vermittelten Aufnahme von DHEAS, E <sub>1</sub> S und PREGS. .	98
Tab. 4.4:	Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden eines Plots, in dem die Aufnahme (pmol/mg Protein/5 min) gegen die Aufnahme (pmol/mg Protein/5 min)/[Na <sup>+</sup> -Konzentration] <sup>n</sup> aufgetragen wurde.....	107
Tab. 4.5:	Vergleich der Membrantopologie des humanen SOAT nach Voraussage verschiedener bioinformatischer Programme. ....	109
Tab. 4.6:	Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in der kodierenden Region des humanen SOAT.....	114
Tab. 4.7:	SNPs des humanen SOAT, welche zu einem Aminosäureaustausch führen, wurden nach der R-Gruppen-Zugehörigkeit, Konservierung über verschiedene Spezies und PolyPhen Berechnung bewertet.....	114
Tab. 5.1:	Aminosäuresequenzidentitäten und –ähnlichkeiten der sechs humanen Mitglieder der SLC10-Familie.....	116
Tab. 5.2:	Anzahl der Transmembrandomänen und Orientierung der N- und C-Termini der humanen NTCP-, ASBT- und SOAT-Proteine nach Voraussage verschiedener bioinformatischer Programme.....	120

## Abkürzungen

%	Prozent
λ	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	ATP Binding Cassette
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASBT/ISBT/IBAT	Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter/Ileal Sodium-dependent Bile salt Transporter/Ileal Bile Acid Transporter
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
BARE	Bile Acid Response Element
BARI	Bile Acid Reabsorption Inhibitor
BAPA	Bile Acid-Polyamine Derivative
BBMV	Brush-Border Membrane Vesicles
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BHK	Baby Hamster Kidney
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
b	Base
bp	Basenpaare, base pair
Bq	Becquerel
BSA	Bovines Serum Albumin
BSEP	Bile salt export pump
BSP	Bromsulphophthalein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
Ci	Curie
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CoMFA	Comparative Molecules Field Analysis
COS	<i>Cercopithecus aethiops</i> , origin-defective SV-40
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
cRNA	complementary RNA
C <sub>T</sub>	Signal threshold cycle
CYP7A1	Cholesterol 7α-Hydroxylase
Da	Dalton
DABCO	Diazobicyclooctan
DAPI	4', 6'-Diamidine-2'-Phenylindol Dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIfE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
D-MEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dpm	Disintegration per minute (Zerfall pro Minute)
EB	Ethidiumbromid

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay analysis
EmGFP	Emerald Green Fluorescence Protein
ER	Estrogenrezeptor
E <sub>1</sub> S	Estron-3-sulfat
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
FKS	Fetales Kälberserum
FRT	Flp Recombinase Target
FXR	Farnesoid X receptor
g	Gramm
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
GOI	Gene of interest
GP	Large taking of blood
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Gonad-Specific Transporter
h	Stunde
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HGNC	HUGO Nomenclature Committee
hMEC	Human Mammary Epithelial Cell
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
HUGO	Human Genome Organisation
IBABP/ILBP	Ileal Bile Acid Binding Protein/Ileal Lipid Binding Protein
IBAM	Idiopathic Bile Acid Malabsorption/ideopathische Gallensäure-Malabsorption
IC <sub>50</sub>	Hemmstoffkonzentration, welche die Aufnahme bei einer bestimmten Substratkonzentration um 50 % hemmt
K <sub>i</sub>	Hemmkonstante
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	Luria Bertani
LDL	Low-Density Lipoprotein
LDL-R	Low-Density Lipoprotein Rezeptor
L-FABP	Liver Fatty Acid Binding Protein
LRH	Liver Receptor Homologue
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MCS	Multi Cloning Site
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MDR	Multidrug-resistance
MGB	Minor Groove Binder
MGF	Mutageneseprimer Vorwärts
MGR	Mutageneseprimer Rückwärts
min	Minute

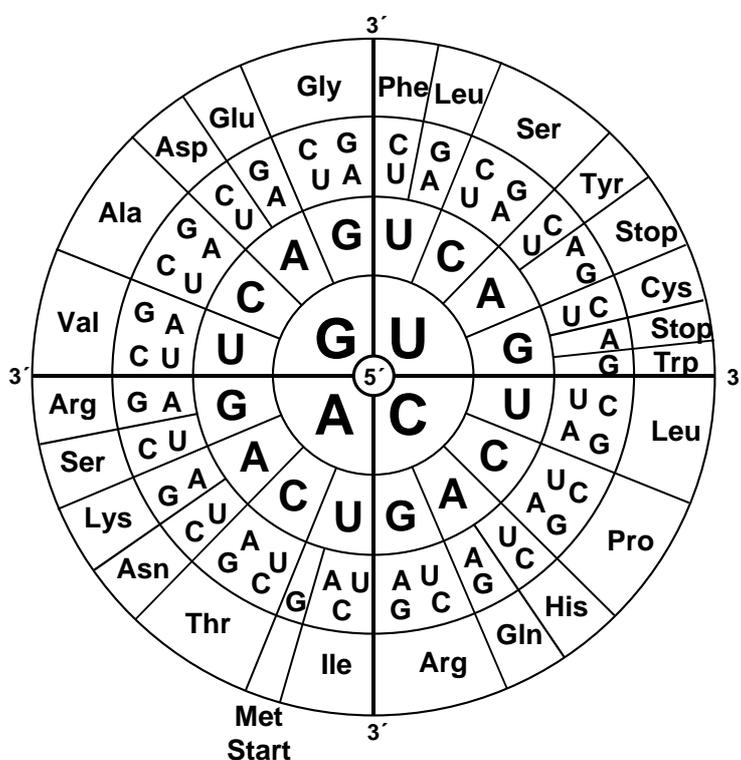
MMLV	Murine Moloney Leukaemia Virus
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug Resistance-Associated Protein
MSR	Macrophage Scavenger Receptor
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	Non Essential Amino Acids
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NTCP	Na <sup>+</sup> -Taurocholate Cotransporting Polypeptide
NZY	NZ-amine/yeast extract
OAT	Organic Anion Transporter
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame, offener Leserahmen
OSCP	Organic Solute Carrier Protein
OST	Organic Solute Transporter
p	Plasmid
PAH	<i>para</i> -Aminohippursäure
PBAM	Primary Bile Acid Malabsorption/Primäre Gallensäure-Malabsorption
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PNGase F	N-Glycosidase F
PPI	Pre-immune serum
PREGS	Pregnenolonsulfat
qPCR	Quantitative PCR
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RXR	Retinoid X receptor
s	Sekunde
SBAT	Sodium-Dependent Bile acid Transporter
SBF	Sodium Bile acid Family
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEP	Sulfooxyethylpyrene
SHP	Short Hairpin Protein
SLC	Solute Carrier
SMP	Sulfooxymethylpyrene
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SOAT	Sodium-dependent Organic Anion Transporter
SSC	Sodium-chloride – Sodium Citrate solution
ST	Sulfotransferase
StS	Steroidsulfatase
Tab.	Tabelle

TAE	Tris-Acetat-EDTA
t-Asbt	trunkierter Apical sodium-dependent bile salt transporter
TC	Taurocholat
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
TetO <sub>2</sub>	Tetrazyklin-Operator
TetR	Tetrazyklin-Repressor
TLCS	Taurolithocholat-3-sulfat
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
V <sub>max</sub>	Maximale Aufnahmegeschwindigkeit
WT	Wildtyp

## Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## Der genetische Code



## Vorsätze im Dezimalsystem

Potenz	Vorsilbe	Kurzzeichen	Potenz	Vorsilbe	Kurzzeichen
$10^{15}$	Peta	P	$10^{-15}$	Femto	f
$10^{12}$	Tera	T	$10^{-12}$	Piko	p
$10^9$	Giga	G	$10^{-9}$	Nano	n
$10^6$	Mega	M	$10^{-6}$	Mikro	$\mu$
$10^3$	Kilo	k	$10^{-3}$	Milli	m
$10^2$	Hekto	h	$10^{-2}$	Centi	c

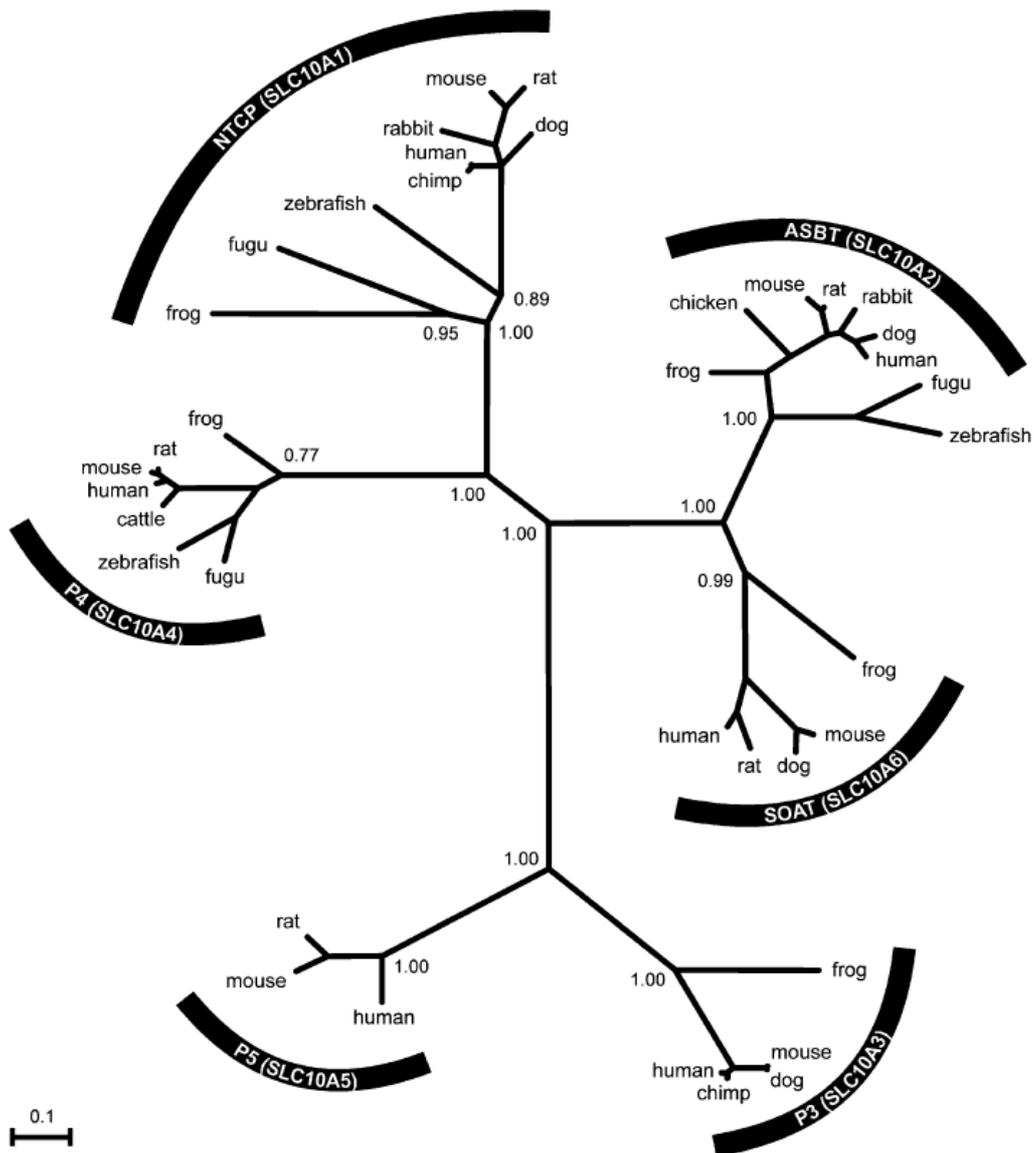
# 1 LITERATURÜBERSICHT

Zurzeit werden vom *Human Genome Organisation* (HUGO) *Nomenclature Committee* (HGNC) 48 *Solute Carrier* (SLC) Familien mit über 380 humanen Transportgenen unterschieden (Frederiksson et al. 2008; [www.genenames.org/index.html](http://www.genenames.org/index.html); [www.bioparadigms.org/slc/intro.asp](http://www.bioparadigms.org/slc/intro.asp)). Mitglieder dieser Familien gehören zu den passiven Transportern, Ionengekoppelten Symportern und Antiportern. Diese regulieren in der Plasmamembran und in Membranen von Zellkompartimenten den Ein- und Austritt zahlreicher Substanzen und haben somit eine wichtige physiologische, pathophysiologische und pharmakologische Bedeutung (Hediger et al. 2004). Der in dieser Arbeit untersuchte *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* (SOAT, SLC10A6) wurde als neues Mitglied der SLC10-Familie identifiziert. Daher wird hier zunächst ein Einblick in diese Familie gegeben, indem die einzelnen Mitglieder näher erläutert werden.

## 1.1 Die Familie der SLC10-Transporter

Die SLC10-Familie wurde bekannt unter dem Namen „*Sodium Bile Acid Cotransporter family*“ (SBAT), deren Mitglieder für die Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren verantwortlich sind. Bis 2004 umfasste diese Familie die Mitglieder *Na<sup>+</sup>/Taurocholate Cotransporting Polypeptide* (NTCP, SLC10A1) und den *Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter* (ASBT, SLC10A2), auch *Ileal Sodium-dependent Bile salt Cotransporter* (ISBT, IBAT) genannt. Seit 2004 gelang die Identifizierung weiterer Mitglieder dieser Familie, welche als P3 (SLC10A3), P4 (SLC10A4), P5 (SLC10A5) und SOAT (SLC10A6), der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, bezeichnet werden (Hagenbuch und Dawson 2004; Geyer et al. 2004, 2006, 2007; Fernandes et al. 2007; Geyer et al. 2008). Somit umfasst die SLC10-Familie heute sechs Subfamilien, welche 19 % bis 42 % Aminosäure-Sequenzidentität teilen (Abb. 1.1) (Geyer et al. 2006). P7 (SLC10A7) ist ein weiteres Protein, welches auf Grundlage der vorhandenen *Sodium Bile acid symporter Family domain* (SBF-domain) (Protein family database Accession Nummer PF01758) in die SLC10-Familie eingruppiert wurde. Allerdings teilt P7 nur 12-16 % Sequenzidentität zu den etablierten Mitgliedern dieser Familie (Godoy et al. 2007). Nach den Richtlinien des HGNC weisen Mitglieder einer Genfamilie mindestens 20-25 % Sequenzidentität auf (Hediger et al. 2004). Daher ist P7 als Mitglied der SLC10-Familie kritisch zu betrachten und wurde nicht in die näheren Analysen der SLC10-Familie einbezogen.

Im Gegensatz zu NTCP und ASBT sind die neuen Mitglieder der SLC10-Familie noch weitgehend unbekannt und unerforscht. In der Literaturübersicht wird ein Überblick über die bisher gewonnenen Erkenntnisse zu den einzelnen Mitgliedern, insbesondere NTCP/Ntcp\* und ASBT/Asbt, gegeben.



**Abb. 1.1: Bayesian Protein-Stammbaum ausgewählter Mitglieder der SLC10-Familie.**

Die SLC10-Familie umfasst sechs Subfamilien. Für die Subfamilien P3, P4 und P5 konnte bis heute keine Funktion ermittelt werden. Der Maßstab gibt Aminosäureaustausche pro Ort entsprechend dem angewendeten Modell der Aminosäureevolution an. Dog (*Canis familiaris*), frog (*Xenopus tropicalis*, *Xenopus laevis*), cattle (*Bos taurus*), chimp (*Pan troglodytes*), fugu (*Fugu rubripes*), zebrafish (*Danio rerio*), chicken (*Gallus gallus*) (nach Geyer et al. 2006).

\*Zur Unterscheidung der Gene und Genprodukte von Mensch und anderen Spezies erfolgt die Nomenklatur in Groß- (Mensch) und Kleinbuchstaben (andere Spezies).

## 1.2 Das Na<sup>+</sup>/Taurocholat Cotransporting Polypeptide (NTCP, SLC10A1)

### 1.2.1 Klonierung des NTCP/Ntcp

Die Grundlagen für die Identifizierung der SLC10-Familie wurden schon sehr früh mit der Charakterisierung eines Na<sup>+</sup>-abhängigen Gallensäure-Transportsystems an isolierten Rattenhepatozyten und Membranvesikeln gelegt (Schwarz et al. 1975; Frimmer und Ziegler 1988; Petzinger 1994). Allerdings konnte nicht geklärt werden, ob ein einzelner multi-spezifischer oder mehrere monospezifische Transportsysteme für die Aufnahmen verantwortlich waren. Daher wurde nach potenziellen Gallensäuretransportsystemen der Leber gesucht. 1990 gelang die Identifizierung eines solchen Carriers durch Expressionsklonierung in *Xenopus laevis* Oozyten aus mRNA der Rattenleber. Dieses wurde als *Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide*, *Ntcp*, bezeichnet (Hagenbuch et al. 1990, 1991). Auf Grundlage der *Ntcp*-cDNA der Ratte konnte das humane Ortholog (Hagenbuch und Meier 1994), danach zwei Spleiß-Varianten der Maus (Cattori et al. 1999) sowie das Ortholog des Kaninchens (Kramer et al. 1999) und weiterer Spezies identifiziert werden. Die Sequenzierung weiterer Genome ermöglichte die Identifizierung von *Ntcp*-Orthologen auf Grundlage von Sequenzanalysen (Tab. 1.1). Diese berechneten Sequenzen müssen noch experimentell verifiziert werden.

**Tab. 1.1: Übersicht über bisher identifizierte NTCP/Ntcp-Transkripte verschiedener Spezies.**

Spezies	Accession-No. Nukleotid	Accession-No. Protein	cds (bp)	Prot.-länge (AS)	Chromosom	GenBank Eintrag (Jahr)
<i>Rattus norvegicus</i> <sup>a</sup>	NM_017047	NP_058743	1089	362	6q24	1991
<i>Homo sapiens</i> <sup>a</sup>	NM_003049	NP_003040	1150	349	14q24	1994
<i>Mus musculus V1</i> <sup>a</sup>	U95131	AAB81023	1089	362	12D1	1997
<i>Mus musculus V2</i> <sup>a</sup>	NM_011387	NP_035517	954	317	12D1	1997
<i>Oryctolagus cuniculus</i> <sup>a</sup>	NM_001082768	NP_001076237	1047	348		1998
<i>Bos taurus</i> <sup>a</sup>	NM_001046339	NP_001039804	1113	370	10	2005
<i>Macaca fascicularis</i> <sup>a</sup>	AK240619	BAF47373	978	325		2006
<i>Mesocricetus auratus</i> <sup>a</sup>	AF181258	AAD53961	562	187		1999
	partielle cds					
<i>Canis familiaris V1</i> <sup>b</sup>	XM_537494	XP_537494	1179	392	8	berechnet
<i>Canis familiaris V2</i> <sup>b</sup>	XM_862213	XP_867306	1020	339	8	berechnet
<i>Equus caballus</i> <sup>b</sup>	XM_001500563	XP_001500613	1050	349	24	berechnet
<i>Pan troglodytes</i> <sup>b</sup>	XM_510035	XP_510035	1050	349	14	berechnet
<i>Macaca mulatta V1</i> <sup>b</sup>	XM_001110188	XP_001110188	954	317	7	berechnet
<i>Macaca mulatta V2</i> <sup>b</sup>	XM_001110268	XP_001110268	1050	349	7	berechnet
<i>Monodelphis domestica</i> <sup>b</sup>	XM_001378731	XP_001378768	1053	350	1	berechnet
<i>Danio rerio</i> <sup>b</sup>	XM_685653	XP_690745	900	299	20	berechnet

<sup>a</sup> Daten wurden experimentell ermittelt; <sup>b</sup> Daten beruhen auf bioinformatischer Analyse der Sequenzen aus Genomprojekten

### 1.2.2 Expression und Funktion des NTCP/Ntcp

Der NTCP/Ntcp wird hauptsächlich an der basolateralen (sinusoidalen) Membran von Hepatozyten exprimiert (Ananthanarayanan et al. 1994; Stieger et al. 1994; Kullak-Ublick et al. 1997). Hier vermittelt er eine effiziente  $\text{Na}^+$ -abhängige Aufnahme von Gallensäuren aus dem Portalblut und hält somit die Plasmakonzentration von Gallensäuren in der systemischen Zirkulation niedrig. Die Stöchiometrie der Aufnahme beträgt  $2 \text{Na}^+ : 1$  Gallensäure (Hagenbuch und Meier 1996; Weinman 1997). Die treibende Kraft bildet (1) der einwärts gerichtete  $\text{Na}^+$ -Gradient, welcher durch die  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase aufgebaut wird und (2) das negative intrazelluläre Potenzial. 2002 konnte der Ntcp der Ratte auch in der luminalen (apikalen) Membran der Azinuszellen des Pankreas nachgewiesen werden. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist Ntcp hier möglicherweise an der Beseitigung von Gallensäuren beteiligt, welche in den terminalen Azinus eingedrungen sind. Die Expression in diesem Organ wird aber auch mit Zellschäden und der Gallensäure-abhängigen Pankreatitis in Verbindung gebracht (Kim et al. 2002).

Das Substratspektrum des NTCP/Ntcp umfasst unkonjugierte sowie Taurin- und Glycinkonjugierte Gallensäuren (Boyer et al. 1994; Hagenbuch und Meier 1994; Platte et al. 1996; Kramer et al. 1999; Hata et al. 2003), sulfatierte Gallensäuren und Steroidsulfate (Craddock et al. 1998; Schroeder et al. 1998; Kramer et al. 1999) und freie sowie konjugierte Jodthyronine (Friesema et al. 1999). Daneben wurde auch der Transport von Arzneistoffen und deren Konjugaten über den NTCP/Ntcp berichtet. Dazu zählen unter anderem Bromosulfophthalein (BSP), Chlorambucil-Taurocholat und der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktasehemmer (HMG-CoA Reduktasehemmer) Rosuvastatin (Kullak-Ublick et al. 1997; Hata et al. 2003; Ho et al. 2006). Zusätzlich interagiert NTCP/Ntcp mit einer großen Vielfalt an Arzneistoffen und Steroiden (Kouzuki et al. 1998, Kim et al. 1999; Kouzuki et al. 2000; Kramer et al. 1999; Mita et al. 2006; Leslie et al. 2007). Dies lässt vermuten, dass NTCP/Ntcp auch eine Rolle bei der hepatobiliären Clearance von Arzneistoffen und deren Metaboliten spielt.

Es gibt viele Indizien dafür, dass Ntcp den Hauptteil des  $\text{Na}^+$ -abhängigen Taurocholat-Transports an Hepatozyten vermittelt (Trauner und Boyer 2003; Hagenbuch und Dawson 2004; Kullak-Ublick et al. 2004). Folgende Eigenschaften wurden sowohl für Ntcp, als auch den  $\text{Na}^+$ -abhängigen Gallensäuretransporter der Hepatozyten beschrieben: (1) präferierte hoch-affine Aufnahme konjugierter Gallensäuren, (2) ähnliche Taurocholataufnahme-Kinetik, (3) elektrogener Transport, (4) Hauptexpression in der Leber, (5) ähnliche Ontogenese der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Gallensäureaufnahme und Ntcp Expression (Boyer et al. 1993) und (6) Injek-

tion von Ntcp-Antisense Oligonukleotiden in Oozyten, welche mit Ratten mRNA injiziert waren, reduzierte die Taurocholataufnahme um 90 % (Hagenbuch et al. 1996).

### 1.2.3 Varianten des NTCP/Ntcp

Wie oben erwähnt (siehe 1.2.1) wurden in der Maus zwei Spleiß-Varianten des Ntcp beschrieben (Cattori et al. 1999). Während das Protein der Spleiß-Variante 1 (Ntcp-V1) aus 362 Aminosäuren besteht, ist das Protein der Spleiß-Variante 2 (Ntcp-V2) am C-terminalen Ende verkürzt und wird nur aus 317 Aminosäuren gebildet. Durch alternatives Spleißen wird im Ntcp-V2 das letzte Intron beibehalten, welches zu einem verfrühten Abbruch der Proteinsynthese durch ein vorzeitiges Stoppcodon führt. Diese verkürzte Isoform ist weniger weit verbreitet als Ntcp-V1. Beide Spleiß-Varianten sind funktionell aktiv und transportieren Na<sup>+</sup>-abhängig Gallensäuren. Kinetische Untersuchungen beider Varianten zeigten, dass Ntcp-V1 in der Leber einen *low-affinity, high-capacity* und Ntcp-V2 einen *high-affinity, low-capacity* Transporter darstellt. Möglicherweise spielt Ntcp-V2 eine Rolle, wenn Ntcp-V1 z.B. unter cholestaten Bedingungen herunter reguliert wird (Cattori et al. 1999).

In verschiedenen ethnischen Gruppen konnten spezifische NTCP Polymorphismen nachgewiesen werden. Diese gehen *in vitro* mit einem veränderten Gallensäuretransport einher (Ho et al. 2004). Bisher wurden allerdings noch keine klinischen Auswirkungen erkannt. Das kann damit zusammenhängen, dass der Verlust des NTCP an der Leber durch andere Na<sup>+</sup>-abhängige und Na<sup>+</sup>-unabhängige Gallensäuretransporter kompensiert wird.

### 1.2.4 Pharmakologische Bedeutung des NTCP

Die Leber stellt ein wichtiges Zielorgan für Therapeutika dar. Da NTCP die selektive Aufnahme von Gallensäuren in die Hepatozyten vermittelt, wurde dieses Transportsystem in einigen Studien ausgewählt, um einen gezielten Transport von Therapeutika zur Leber zu gewährleisten (Kramer et al. 1992). Dafür wurden die fraglichen Substanzen an Position 3, 7 oder 12 der Gallensäuren gekoppelt. Besonders geeignet ist die Kopplung an Position 3, da diese modifizierten Gallensäuren weiterhin als Substrate erkannt werden. Gallensäuren wurden als „Shuttle“ für Zytostatika (Chlorambucil) (Kramer et al. 1992; Kramer und Wess 1996; Kullak-Ublick et al. 1997), HMG-CoA-Reduktasehemmer (Kramer et al. 1994a), Peptide (Kramer et al. 1994b, 1997b; Petzinger et al. 1999) und Nukleotide (Lischka et al. 2003) getestet (Enhsen et al. 1998; Petzinger und Kramer 2003). Für Chlorambucil-Taurocholat konnte gezeigt werden, dass dieses *Prodrug* tatsächlich *in situ* in der Leber ausgeschieden wurde, im Gegensatz zur renalen Ausscheidung des freien Chlorambucils. Eine intraarterielle Applika-

tion dieses Zytostatikums gekoppelt an Gallensäuren, könnte ein therapeutischer Ansatz in der Behandlung hepatozellulärer Karzinome beim Menschen sein (Kullak-Ublick et al. 1997).

### 1.3 Der Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter (ASBT, SLC10A2)

#### 1.3.1 Klonierung des ASBT/Asbt

Der *Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter* war das zweite Mitglied der SLC10-Familie und wurde, wie auch Ntcp, durch Expressionsklonierung identifiziert, wozu eine ileale cDNA Bibliothek des Hamsters verwendet wurde (Wong et al. 1994). Kurz darauf erfolgte auch die Identifizierung des ASBT/Asbt in anderen Spezies wie Mensch (Wong et al. 1995), Ratte (Shneider et al. 1995), Kaninchen (Kramer et al. 1999) und Maus (Saeki et al. 1999). Auch beim ASBT/Asbt bildeten Genomprojekte die Grundlage für die Identifizierung weiterer Orthologe (Tab. 1.2).

**Tab. 1.2: Übersicht über bisher identifizierte ASBT/Asbt-Transkripte verschiedener Spezies.**

Spezies	Accession-No. Nukleotid	Accession-No. Protein	Cds (bp)	Prot.-länge (AS)	Chromosom	GenBank Eintrag (Jahr)
<i>Cricetulus griseus</i> <sup>a</sup>	U02028	AAA18640	1047	348		1993
<i>Homo sapiens</i> <sup>a</sup>	NM_000452	NP_000443	1047	348	13q33	1994
<i>Rattus norvegicus</i> <sup>a</sup>	NM_017222	NP_058918	1047	348	16q12	1994
<i>Mus musculus</i> <sup>a</sup>	NM_011388	NP_035518	1047	348	8 A1	1997
<i>Oryctolagus cuniculus</i> <sup>a</sup>	NM_001082764	NP_001076233	1044	347		1997
<i>Canis familiaris</i> <sup>a</sup>	NM_001002968	NP_001002968	1047	348	22	2003
<i>Danio rerio</i> <sup>a</sup>	NM_200358	NP_956652	1086	361	9	2003
<i>Pongo pygmaeus</i> <sup>a</sup>	CR857964	CAH90209	1080	359		2004
<i>Bos taurus</i> <sup>b</sup>	XM_604179	XP_604179	773	256	12	berechnet
	partielle cds					
<i>Equus caballus</i> <sup>b</sup>	XM_001493450	XP_001493500	1047	348	17	berechnet
<i>Gallus gallus</i> <sup>b</sup>	XM_425589	XP_425589	1083	360	1	berechnet
<i>Macaca mulatta</i> <sup>b</sup>	XM_001095212	XP_001095212	1047	348	17	berechnet
<i>Monodelphis domestica</i> <sup>b</sup>	XM_001376304	XP_001376341	1092	363	7	berechnet
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> <sup>b</sup>	XM_001513315	XP_001513365	1041	346		berechnet
<i>Pan troglodytes</i> <sup>b</sup>	XM_522716	XP_522716	1047	348	13	berechnet

<sup>a</sup> Daten wurden experimentell ermittelt; <sup>b</sup> Daten beruhen auf bioinformatischer Analyse der Sequenzen aus Genomprojekten

#### 1.3.2 Expression und Funktion des ASBT/Asbt

Die Hauptexpression des ASBT/Asbt findet man in der apikalen Bürstensaummembran der Enterozyten des terminalen Ileums von Ratte (Shneider et al. 1995), Maus (Dawson et al.

2003) und Hamster (Wong et al. 1994). Im Menschen findet sich ASBT zusätzlich auch im Duodenum (Hruz et al. 2006). Neben der Expression im Darm wurde der ASBT/Asbt auch in der Niere nachgewiesen (Christie et al. 1996; Craddock et al. 1998). Die Expression beschränkt sich hier auf den proximalen Tubulus, wo Asbt eine wichtige Funktion bei der Reabsorption glomerulär filtrierter Gallensäuren besitzt (Christie et al. 1996). In der Ratte wird Asbt auch in der apikalen Membran von Cholangiozyten, den Epithelzellen des intrahepatischen Gallengangs, exprimiert (Alpini et al. 1997; Lazaridis et al. 1997). Welche Bedeutung Asbt dort besitzt, ist noch nicht gänzlich geklärt. Möglicherweise vermittelt er zusammen mit der trunkierten Form des Asbt (t-Asbt) einen alternativen Weg für Gallensäuren zwischen Gallengang und Leber (*Cholehepatischer Shunt*) (siehe 1.3.3, 1.4.4) (Alpini et al. 2005).

Das Substratspektrum des ASBT/Asbt ist viel enger gefasst und spezifischer, als das des NTCP/Ntcp. Es umfasst unkonjugierte Gallensäuren, aber auch deren Glycin- und Taurinkonjugate (Wong et al. 1994; Craddock et al. 1998; Kramer et al. 1999), welche  $\text{Na}^+$ -abhängig mit einer Stöchiometrie von  $2 \text{Na}^+ : 1$  Gallensäure transportiert werden (Craddock et al. 1998; Weinman et al. 1998). Ein Transport von Xenobiotika und Steroidsulfaten, wie für den NTCP/Ntcp gezeigt, konnte für den ASBT/Asbt nicht nachgewiesen werden (Craddock et al. 1998; Ho et al. 2006). Dies spricht für die postulierte Funktion dieses Transportsystems im enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren, welche in der Rückgewinnung der Gallensäuren aus dem Darmlumen bzw. proximalen Tubulus liegt. Xenobiotika und nicht gallensäureartige Endobiotika werden dagegen nicht rückresorbiert und mit dem Faeces bzw. Urin ausgeschieden.

### **1.3.3 Der t-Asbt der Ratte**

Neben dem nativen Asbt wurde in Ileum, Niere und Cholangiozyten der Ratte auch eine trunkierte Variante des Asbt (t-Asbt) nachgewiesen, welche im Ileum und in den Cholangiozyten sogar stärker exprimiert wurde als der native Asbt. In dieser Transkriptionsvariante fehlt durch alternatives Spleißen Exon 2. Diese 119 Basenpaar (bp) Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserahmens mit vorzeitigem Stoppcodon. Das resultierende Protein besteht nur noch aus 154 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 19 Kilodalton (kDa). Im Gegensatz zum Asbt ist t-Asbt an der basolateralen Membran der Cholangiozyten lokalisiert. Transportmessungen an Oozyten haben erstaunlicherweise gezeigt, dass t-Asbt einen Efflux und nicht eine Aufnahme von Gallensäuren vermittelt (Lazaridis et al. 2000).

### 1.3.4 Phänotypische Auswirkungen fehlender ASBT/Asbt-Funktion

Die wichtige Rolle des ASBT bei der Aufnahme von Gallensäuren aus dem Ileum wird durch Funktionsverlust-Mutationen bestätigt. Primäre Gallensäure-Malabsorption (PBAM, *Primary Bile Acid Malabsorption*) ist eine idiopathische intestinale Funktionsstörung, welche mit einer angeborenen Diarrhö, Steatorrhö, einer Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren und reduzierten Plasma *Low density lipoprotein* (LDL) Cholesterin-Werten einhergeht. Mit dieser Erkrankung wurden drei Mutationen im ASBT assoziiert, welche nicht in gesunden Probanden zu finden waren. Eine 3 bp Substitution an der *Donor-Spleiß-Site* von Exon 3 (AAG → CTt) führte zu einem alternativen Spleißen des ASBT. Weiterhin fanden sich Substitutionen von Thymin zu Cytosin bzw. Cytosin zu Thymin mit Aminosäureaustauschen von Leucin an Position 243 zu Prolin (L243P) und Threonin an Position 262 zu Methionin (T262M) (Oelkers et al. 1997). Bei einem Patienten mit *Morbus Crohn* führte ein einzelner Basenaustausch von Cytosin zu Thymin zu einem Aminosäurewechsel von Prolin an Position 290 zu Serin (P290S) (Wong et al. 1995). Alle ASBT-Mutanten mit Aminosäureaustausch zeigten zwar keine veränderte Proteinsynthese und subzelluläre Verteilung, verloren aber ihre Transportfunktion für Gallensäuren. Somit scheint die Substraterkennung, Bindung, Translokation oder Freisetzung des Substrats durch diese Mutationen beeinträchtigt zu sein. Ob diese dysfunktionalen Formen des ASBT ursächlich mit den Erkrankungen in Zusammenhang standen, konnte allerdings nicht geklärt werden. Möglicherweise erhöhen sie die Empfindlichkeit für inflammatorische Darmerkrankungen (Wong et al. 1995; Oelkers et al. 1997). In den meisten Fällen ideopathischer Gallensäure-Malabsorption (IBAM, *Ideopathic Bile Acid Malabsorption*) konnte allerdings keine Assoziation mit Polymorphismen/Mutationen im ASBT-Gen nachgewiesen werden (Montagnani et al. 2001, 2006).

### 1.3.5 Die Asbt Knockout-Maus

Um die direkte Auswirkung fehlender ASBT/Asbt-Expression zu untersuchen, wurde 2003 eine *Slc10a2*<sup>(-/-)</sup> Knockout-Maus generiert, welche die Erkenntnisse, die auch schon bei Funktionsverlust-Mutationen beobachtet wurden, im Mausmodell reevaluierten (Dawson et al. 2003). Die Knockout-Maus unterschied sich in ihrer Lebensfähigkeit und Fertilität nicht von den Wildtyp-Mäusen. Phänotypisch zeigten sich aber einige gravierende Unterschiede. Die *Slc10a2*<sup>(-/-)</sup> Knockout-Maus hatte eine 10- bis 20-fach erhöhte fäkale Gallensäureausscheidung, welche nicht durch Fütterung eines gallensäurebindenden Harzes erhöht werden konnte. Diese erhöhte Ausscheidung führte zu einer gesteigerten Gallensäureneusynthese, welche den

Verlust aber nicht ausgleichen konnte. Daraus resultierte eine Verringerung des Gallensäurepools um 80 % und signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Galleflüssigkeit. Während in Wildtyp-Mäusen die primären Gallensäuren Taurocholat und Tauro- $\beta$ -muricholat den Hauptteil der Galle ausmachten, zeigte sich in Slc10a2<sup>(-/-)</sup> Knockout-Mäusen eine starke Verringerung des Tauro- $\beta$ -muricholat Anteils zugunsten des Taurocholat (Dawson et al. 2003; Jung et al. 2007). Dies führte zu einer geringfügig schlechteren Fett- und Cholesterinaufnahme im Darm und somit zu einer leicht erhöhten Ausscheidung von Fett, Fettsäuren und neutralen Sterolen. Die Charakterisierung der Slc10a2<sup>(-/-)</sup> Knockout-Maus belegt, dass ASBT für die intestinale Aufnahme der Gallensäuren essentiell ist und dass alternative Absorptionsmechanismen nicht in der Lage sind, den Verlust des ASBT auszugleichen (Dawson et al. 2003).

### 1.3.6 Pharmakologische Bedeutung des ASBT

Der ASBT ist in zweifacher Hinsicht als pharmakologisches Target interessant. Zum einen kann er genutzt werden, um über gezieltes *Drug Design* die orale Bioverfügbarkeit von schlecht absorbierbaren Therapeutika zu verbessern (Balakrishnan und Polli 2006). Die Koppung der Substanzen erfolgt, wie unter 1.2.4 erwähnt, an Gallensäuren, Substrate des ASBT, welche als *Prodrug* von ASBT erkannt und aufgenommen werden. Untersucht wurde dieser Ansatz für Peptide (z.B. Renin-Inhibitoren) und HIV-Proteaseinhibitoren (Kim et al. 1993; Kramer et al. 1994b, Kagedahl et al. 1997; Kramer et al. 1997b; Swaan et al. 1997a). Relativ erfolgreich war dieses Konzept für Acyclovir, dessen orale Bioverfügbarkeit als *Prodrug* Acyclovir-Valylchenodeoxycholat verdoppelt wurde (Tolle-Sander et al. 2004).

Verbreiteter ist die Anwendung des ASBT als *Target* für cholesterinsenkende Therapien zur Prävention von Arteriosklerose (Kramer und Glombik 2006). Grundlage hierfür ist die negative Feedbackregulation von Gallensäuren auf die Expression der hepatischen Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1), dem limitierenden Enzym der Gallensäuresynthese (Chiang et al. 2000). Die Hemmung der Gallensäurerückresorption im Ileum fördert deren Ausscheidung über den Faeces, der Gallensäurepool wird reduziert und die Neubildung von Gallensäuren aus Cholesterin angeregt. Die reduzierte intrazelluläre Cholesterinkonzentration im Hepatozyten führt zu einer erhöhten Neusynthese von LDL-Rezeptoren (LDL-R), welche Cholesterin aus dem Plasma zur Gallensäureneubildung aufnehmen. In der Folge sinken schließlich die Plasma-Cholesterinwerte. Auf diesem Prinzip beruht bereits der Einsatz unspezifischer Gallensäurefänger wie Cholestyramin und Colestipol. Die gezielte Hemmung des ASBT mit *Bile Acid Reabsorption Inhibitors* (BARIs) hat aber einige Vorteile gegenüber diesen Substanzen. Durch ihre hohe Spezifität ist die Aufnahme geringer Dosen pro Tag möglich (Milligramm

gegen Gramm). Die Gallensäuren bleiben in ihrer aktiven Form im Darm erhalten, üben ihre physiologische Funktion aus und führen somit nicht zu Malabsorption und Maldigestion. Allerdings kann die hohe intestinale Gallensäurekonzentration Diarrhö verursachen. BARIs werden selbst nicht aus dem Darm absorbiert und wirken somit nicht systemisch. Toxizitäten und Arzneistoffinteraktionen sind daher gering und eine klassische pharmakokinetische Anpassung ist nicht notwendig. Inzwischen wurden zahlreiche ASBT-Inhibitoren verschiedenster chemischer Klassen entwickelt und untersucht (Abb. 1.2) (Hara 1999; Geyer et al. 2006; Kramer und Glombik 2006):

- **oligomere Gallensäureanaloge:** Aktivitäten im niedrigen  $\mu\text{M}$ -Bereich; z.B. S 0960 (Wess et al. 1994; Kramer und Wess 1996; Baringhaus et al. 1999)  
**Gallensäure-Propandiamine:** BAPA-3, BAPA-6, BAPA-8 (Vicens et al. 2007a, b)
- **Benzothiazepin Derivate:** erste BARIs, welche nicht auf der Gallensäurestruktur beruhten; z.B. 2164U90 [ $K_i$  (mASbt-HEK293) = 0,068  $\mu\text{M}$ ,  $K_i$  (hASBT-HEK293) = 10  $\mu\text{M}$ ,  $K_i$  (rat ileal BBMV) = 1,6  $\mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$  rat, monkey, human ileal BBMV = 2-5  $\mu\text{M}$ ] (Lewis et al. 1995; Root et al. 1995; Hallén et al. 2002a), 264W94 [ $K_i$  (hASBT-CHO) = 0,2  $\mu\text{M}$ ] (Root et al. 2002), 1,2-Benzothiazepin 1,1-Dioxide [ $\text{IC}_{50}$  (hASBT-BHK) = nM-Bereich] (Tollefson et al. 2003)  
**Benzothiepin Derivate:** z.B. SC-435 [ $\text{IC}_{50}$  (hASBT-BHK) = 1,5 nM] (Bhat et al. 2003; Huang et al. 2005; Tremont et al. 2005)
- **Propanolamine, Barbiturate, Benzylamine** (Kramer und Glombik 2006)
- **Lignane:** z.B. S 8921 [ $\text{IC}_{50}$  (rat ileal BBMV) = 2,1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$  (ASBT-COS) = 66  $\mu\text{M}$ ] (Hara et al. 1997; Ichihashi et al. 1998), TA-7552 (Iwasaki et al. 1995)  
**4-Phenylquinoline** [ $\text{IC}_{50}$  (hASBT-BHK) = 5-10  $\mu\text{M}$ ] (Tollefson et al. 2000)
- **4-Oxo-1-phenyl-1,4-dihydroquinoline:** z.B. R-146224 [ $\text{IC}_{50}$  (hASBT-HEK293) = 0,023  $\mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$  (hamster ileal tissue) = 0,73  $\mu\text{M}$ ] (Kurata et al. 2004; Kitayama et al. 2006)
- **Cyclobutene** (Kramer und Glombik 2006).

Tierstudien haben überzeugend belegt, dass ASBT-Inhibitoren in der Lage sind, die Plasma-Cholesterinspiegel zu senken und somit eine praktikable Methode für cholesterinsenkende Therapien darstellen (Takashima et al. 1994 [TA-7552, Ratte]; Lewis et al. 1995 [2164U90, Ratte und Maus]; Hara et al. 1997 [S-8921, Hamster]; Higaki et al. 1998 [S8921, Kaninchen]; Ichihashi et al. 1998 [S-8921, Ratte]; Huff et al. 2002 [SC-435, Minischwein]; Root et al. 2002 [264W94, Ratte]; West et al. 2002 [SC-435, Meerschweinchen]; Bhat et al. 2003

[SC-435, apoE Knockout-Maus]; Telford et al. 2003 [SC-435, Minischwein]; West et al. 2003 [SC-435, Meerschweinchen]; Kurata et al. 2004; Li et al. 2004 [SC-435, Kaninchen]; Tremont et al. 2005 [Benzothiazepine, Goldhamster]; Kitayama et al. 2006 [R-146224, Hamster und Affe]).

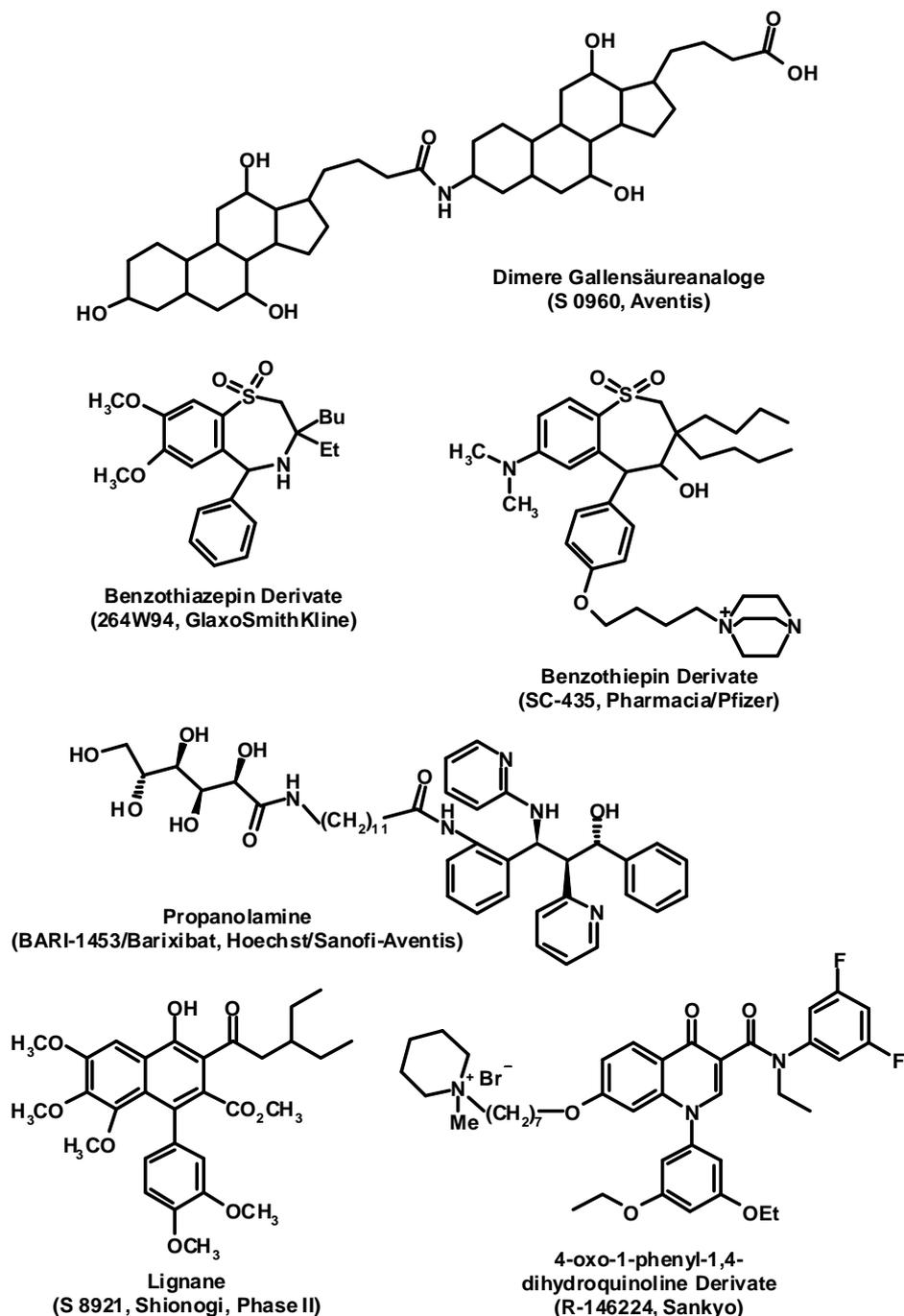


Abb. 1.2: Chemische Klassen von ASBT-Inhibitoren welche bereits in verschiedenen Tier- spezies getestet wurden.

Kombinationstherapien von BARIs mit Statinen (HMG-CoA-Reduktasehemmer) werden als Möglichkeit angesehen, die cholesterinsenkende Wirkung beider Arzneistoffgruppen noch zu verstärken, da zwei Therapiestrategien gleichzeitig angewendet werden. Ein additiver Effekt wurde in Kombinationstherapien von Atorvastatin mit SC-435 in Minischweinen (Telford et al. 2003) und Hunden (Bhat et al. 2003) sowie Simvastatin und SC-435 in Meerschweinchen (West et al. 2003) festgestellt. PR 835 führte in Kombination mit Atorvastatin in LDL-R/apoE Knockout-Mäusen ebenfalls zu einer deutlichen Senkung der Plasma- und LDL-Cholesterinspiegel. Da diese Mäuse keinen LDL-Rezeptor besitzen, ist die Reduktion auf neue, bisher noch nicht identifizierte Ansatzpunkte lipidsenkender Therapien zurückzuführen (Gälman et al. 2003). Die ersten BARIs werden bereits in klinischen Studien beim Menschen eingesetzt und getestet. Dazu gehören S-8921 (Shionogi, Phase II), AZD-7808 (Astra-Zeneca, Phase I) und BARI-1741 (Sanofi-Aventis, Phase I) (Kramer und Glombik 2006).

## **1.4 Der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren**

### **1.4.1 Allgemeiner Überblick**

Die Galle wird in der Leber gebildet und besteht aus Wasser, Elektrolyten ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ), Gallensäuren, Phospholipiden, Cholesterin, Bilirubin und Proteinen. Aber auch lipidlösliche Xenobiotika, Arzneistoffe und Schwermetalle finden sich in der Galle und kommen über diese zur Ausscheidung. Die in die Galle sekretierten Gallensäuren wurden zum größten Teil über den enterohepatischen Kreislauf recycelt. Nur ein kleiner Teil wird in der Leber aus Cholesterin neu synthetisiert, was einen wichtigen Prozess zur Eliminierung von Cholesterin aus dem Körper darstellt und damit zur Cholesterinhomöostase beiträgt. Die Sekretion der Gallensäuren erfolgt aus den Hepatozyten in die Gallenkanälchen entgegen eines Konzentrationsgefälles, was zur Ausbildung eines osmotischen Drucks führt. Dies zieht den Influx von Wasser und Elektrolyten in die Gallenkanälchen nach sich. Über den Gallenkanal wird die Galle in die Gallenblase geleitet und dort bis zur postprandialen Ausschüttung in das Duodenum gespeichert. Im Darm spielt die Galle eine essentielle Rolle bei der Verdauung und der Absorption von Fettsäuren, Cholesterin und fettlöslichen Vitaminen (A, D, E und K) indem die Gallensäuren, bedingt durch ihren amphipatischen Charakter, mit dem Fett Mizellen bilden. Diese Mizellen können durch das wässrige Milieu zur Bürstensaummembran der Enterozyten vordringen und dort absorbiert werden. 95 % der in den Darm abgegebenen Gallensäuren werden durch eine Kombination von passiver Diffusion in Dünn- und Dickdarm,  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Anionenaustausch im Jejunum und aktivem  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transport im

terminalen Ileum (Hauptanteil der Gallensäuren) recycelt. Der Rest dringt bis in das Colon vor, wo die primären Gallensäuren durch bakterielle Prozesse in sekundäre Gallensäuren transformiert werden. Ein Teil dieser Gallensäuren wird reabsorbiert, die übrigen Gallensäuren über den Faeces ausgeschieden. Die in die Enterozyten aufgenommenen Gallensäuren gelangen über den Portalkreislauf zurück zur Leber. 75-90 % werden dort in der *first-pass* Extraktion in die Hepatozyten aufgenommen und von dort wieder aktiv in die Galle ausgeschieden. Dieser kontinuierliche Fluss der Gallensäuren zwischen Leber, Gallenganggeflecht, Darm und Portalblut wird als enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren bezeichnet. Insgesamt besteht der menschliche Gallensäurepool aus ca. 3-5 Gramm (g) Gallensäuren, welche etwa viermal pro Tag zirkulieren. Dies entspricht einem täglichen Umsatz von ca. 12-18 g Gallensäuren, von denen nur 0,5 g über den Faeces verloren gehen, was die Effektivität dieses Kreislaufs widerspiegelt. Der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren stellt für den Körper einen wichtigen Mechanismus zur Konservierung von Cholesterinderivaten dar und reduziert den Energieverlust, welcher durch die Neusynthese von Gallensäuren in der Leber entstehen würde (Shneider 2001; St-Pierre et al. 2001; Meier und Stieger 2002; Russell 2003; Trauner und Boyer 2003; Kullak-Ublick et al. 2004; Marin et al. 2005; Alrefai und Gill 2007; Hofmann 2007).

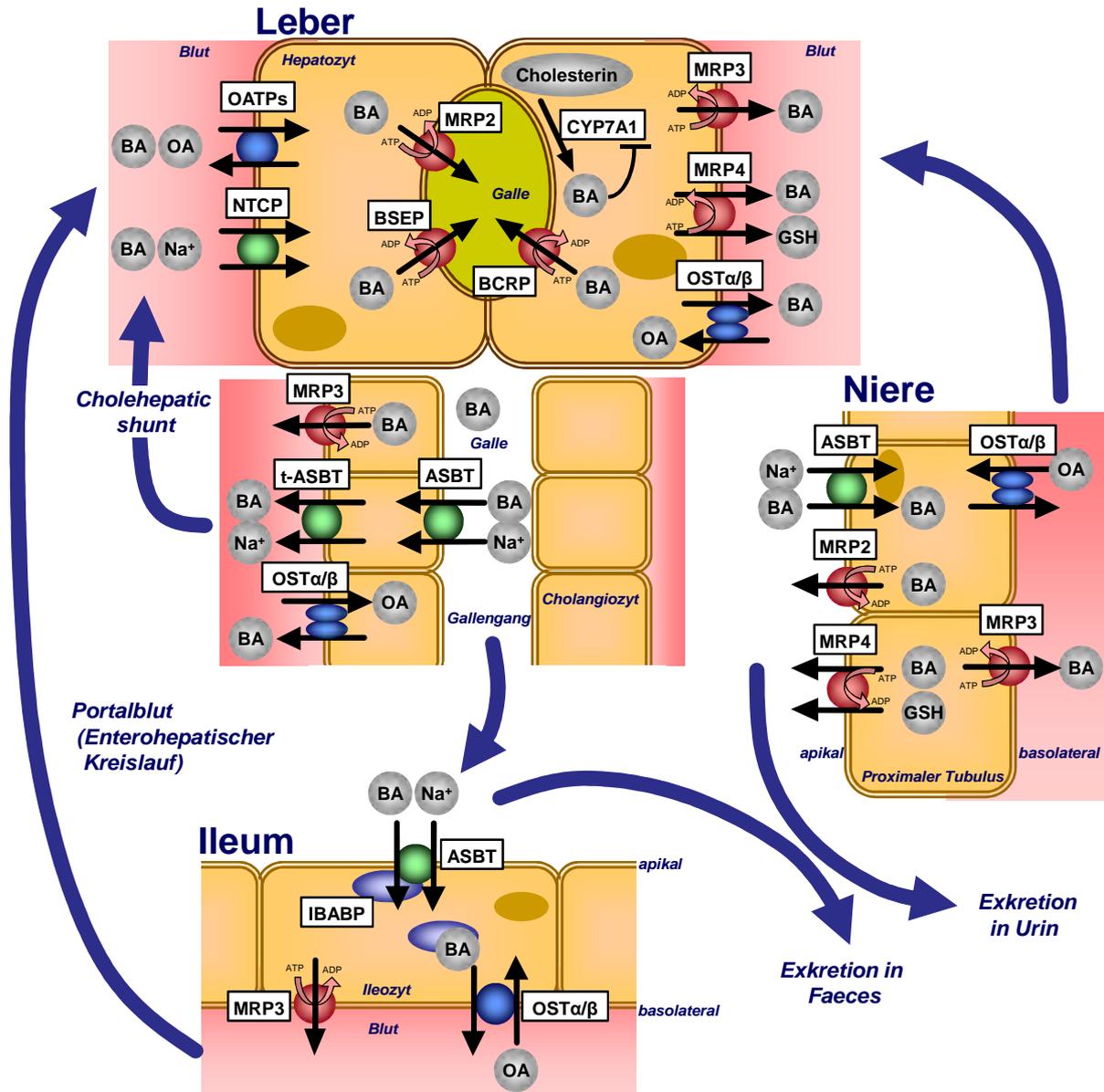
#### **1.4.2 Gallensäure-Transportsysteme der Leber**

Der erste Schritt des enterohepatischen Kreislaufs besteht in der Aufnahme der Gallensäuren aus dem Portalblut an der basolateralen Membran der Hepatozyten (Abb. 1.3). Diese Membran steht in direktem Kontakt mit dem Diss'schen Raum, in welchen die Substanzen des Portalblutes durch große Poren (*Fenestrae*) gelangen (Meier 1995). Der Transport der Gallensäuren wird hauptsächlich über den Na<sup>+</sup>-abhängigen NTCP (SLC10A1) vermittelt. Aber auch Mitglieder der *Organic Anion Transporting Polypeptide* (OATP) Familie (SLCO; SLC21) sind in der Lage Na<sup>+</sup>-unabhängig vor allem unkonjugierte, aber auch konjugierte Gallensäuren zu transportieren (Meier und Stieger 2002; Hagenbuch und Meier 2003; Trauner und Boyer 2003; Hagenbuch und Dawson 2004; Hagenbuch und Meier 2004; Kullak-Ublick et al. 2004). Dazu gehören beim Menschen OATP1A2, OATP1B1 und OATP1B3 und bei Ratte und Maus *Oatp1a1*, *Oatp1a4* und *Oatp1b2*. Mitglieder der SLCO-Transporterfamilie zeigen typischerweise ein breites Substratspektrum, welches neben Gallensäuren auch Hormone, Prostaglandine, konjugierte Steroide und weitere Fremdstoffe beinhaltet (Hagenbuch und Meier 2003, 2004). Der transzelluläre Transport der Gallensäuren von der basolateralen zur kanalikulären Membran wird wahrscheinlich zum größten Teil über intrazelluläre Bindungs-

proteine wie die 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\alpha$ -HSD), Glutathion S-Transferase und das *Liver Fatty Acid Binding Protein* (L-FABP) vermittelt, während ein kleiner Teil der ungebundenen Gallensäuren auch durch die Hepatozyten diffundieren kann. Auch ein Vesikelvermittelter Transportprozess wird postuliert (Bahar und Stolz 1999; Agellon und Torchia 2000; Meier und Stieger 2002; Alrefai und Gill 2007). Die Exkretion an der kanalikulären Membran der Hepatozyten ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Gallebildung und essentiell für die Generierung des Gallensäure-abhängigen Galleflusses (Trauner und Boyer 2003). Die Exkretion in das Gallenkanälchen erfolgt gegen einen 100- bis 1000-fachen Konzentrationsgradienten, was aktive, ATP-abhängige Effluxsysteme der *ATP-Binding Cassette* (ABC) Superfamilie notwendig macht. Dazu gehört die *Bile Salt Export Pump* (BSEP; ABCB11), welche für den größten Anteil der Exkretion verantwortlich ist und hauptsächlich Taurin- oder Glycin-konjugiertes Cholat, Chenodeoxycholat und Deoxycholat transportiert (Arrese und Ananthanarayanan 2004; Suchy und Ananthanarayanan 2006). Sulfatierte und glucuronidierte Gallensäuren werden durch ein Mitglied der *Multidrug Resistance-associated Protein* (MRP) Familie, MRP2 (ABCC2), in die Galle ausgeschieden. Durch die kanalikuläre Exkretion reduzierten Glutathions (GSH) in die Galle stellt der MRP2 die treibende Kraft für den Gallensäure-unabhängigen Gallefluss dar. Neben den genannten Substraten werden auch Bilirubin-Glucuronide, Glutathion-Konjugate, Leukotrien C<sub>4</sub>, divalente Gallensäurekonjugate, Arzneistoffe und Antibiotika von MRP2 transportiert (St-Pierre et al. 2001; Borst und Elferink 2002; Trauner und Boyer 2003; Fardel et al. 2005; Leslie et al. 2005). Auch das *Breast Cancer Resistant Protein* (BCRP, ABCG2) (Hauptexpression in Brust und Plazenta) wird an der kanalikulären Membran der Hepatozyten exprimiert. Da es in der Lage ist sulfatierte Gallensäuren zu transportieren, trägt dieses Protein auch zur hepatozellulären Exkretion der Gallensäuren bei (Suzuki et al. 2003a; Pauli-Magnus et al. 2005; Robey et al. 2009). Unter cholestatischen Bedingungen findet eine stark erhöhte Expression von MRP3 (ABCC3), MRP4 (ABCC4) und dem heterodimeren *Organic Solute Transporter* Ost $\alpha$ /Ost $\beta$  an der basolateralen Membran der Hepatozyten statt. Gallensäuren sind Substrate dieser Transporter und werden von MRP3 und MRP4 ATP-abhängig und von Ost $\alpha$ /Ost $\beta$  Na<sup>+</sup>-unabhängig transportiert. Sie stellen ein alternatives Effluxsystem in das Blut dar und dienen somit dem Schutz des Hepatozyten vor hohen Gallensäurekonzentrationen. Die Aktivierung dieses Schutzsystems während einer Cholestase zieht eine erhöhte renale Ausscheidung von Gallensäuren nach sich (Borst und Elferink 2002; Meier und Stieger 2002; Trauner und Boyer 2003; Boyer et al. 2006; Zollner und Trauner 2006; Geier et al. 2007; Hofmann 2007).

### 1.4.3 Gallensäure-Transportsysteme des Darms und der Niere

Der zweite wichtige Schritt des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren stellt die effiziente intestinale Aufnahme der Gallensäuren und deren Abgabe in das Portalblut dar (Abb. 1.3). Auf der apikalen Seite des Darms im terminalen Ileum wird ASBT (SLC10A2) exprimiert, welcher ein hoch effizientes  $\text{Na}^+$ -abhängiges Aufnahmesystem für Gallensäuren darstellt (Trauner und Boyer 2003; Hagenbuch und Dawson 2004; Kullak-Ublick et al. 2004; Alrefai und Gill 2007). Im Enterozyten werden die Gallensäuren vom 14 kDa großen cytoplasmatischen *Intestinal Bile Acid Binding Protein* (IBABP), auch *Ileal Lipid-Binding Protein* (ILBP) genannt, reversibel gebunden. Durch die intrazelluläre Bindung werden die Aufnahme und der transzelluläre Transport der Gallensäuren erleichtert (Kramer et al. 1993; Oelkers und Dawson 1995; Stenglin et al. 1996; Kramer et al. 1997a, 2001a, b; Nakahara et al. 2005). Der Zusammenschluss von ASBT und IBABP stellt den funktionellen Gallensäure-Aufnahmekomplex dar. Das Molekulargewicht dieses Komplexes wurde auf  $451 \pm 35$  kDa bestimmt. Dies lässt vermuten, dass er ein Homotetramer ist, welcher aus vier 93 kDa ASBT-Dimeren und vier cytoplasmatisch angelagerten 14 kDa IBABP Proteinen besteht (Kramer et al. 1995). An der basolateralen Membran werden die Gallensäuren  $\text{Na}^+$ -unabhängig über *Ost $\alpha$ /Ost $\beta$*  in das Portalblut transportiert (Seward et al. 2003; Ballatori 2005; Ballatori et al. 2005; Dawson et al. 2005; Ballatori et al. 2009; Rao et al. 2008). An Albumin gebunden gelangen die Gallensäuren zurück zur Leber, um hier erneut aufgenommen zu werden. Gallensäuren, welche der Reabsorption entgehen, sind durch die Bindung an das Albumin weitgehend vor der glomerulären Filtration in der Niere geschützt. Die aktive Rückresorption dennoch filtrierter Gallensäuren erfolgt im proximalen Tubulus an der apikalen Membran der Epithelzellen über ASBT (Abb. 1.3) (Christie et al. 1996; Trauner und Boyer 2003; Kullak-Ublick et al. 2004). Der Rücktransport aus den Epithelzellen in das Blut, und damit zur Leber, erfolgt über den heterodimeren Gallensäuretransporter *Ost $\alpha$ /Ost $\beta$*  und zu einem kleinen Anteil auch über MRP3 (Rost et al. 2002; Ballatori et al. 2005; Sakamoto et al. 2006). An der apikalen Membran renaler Tubuluszellen werden auch MRP2 und MRP4 exprimiert. Unter cholestatischen Bedingungen erhöhen sie die renale Exkretion von Gallensäuren (Schaub et al. 1997, 1999; van Aabel et al. 2002; Trauner und Boyer 2003; Zollner und Trauner 2006).



**Abb. 1.3: Transportsysteme des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren.**

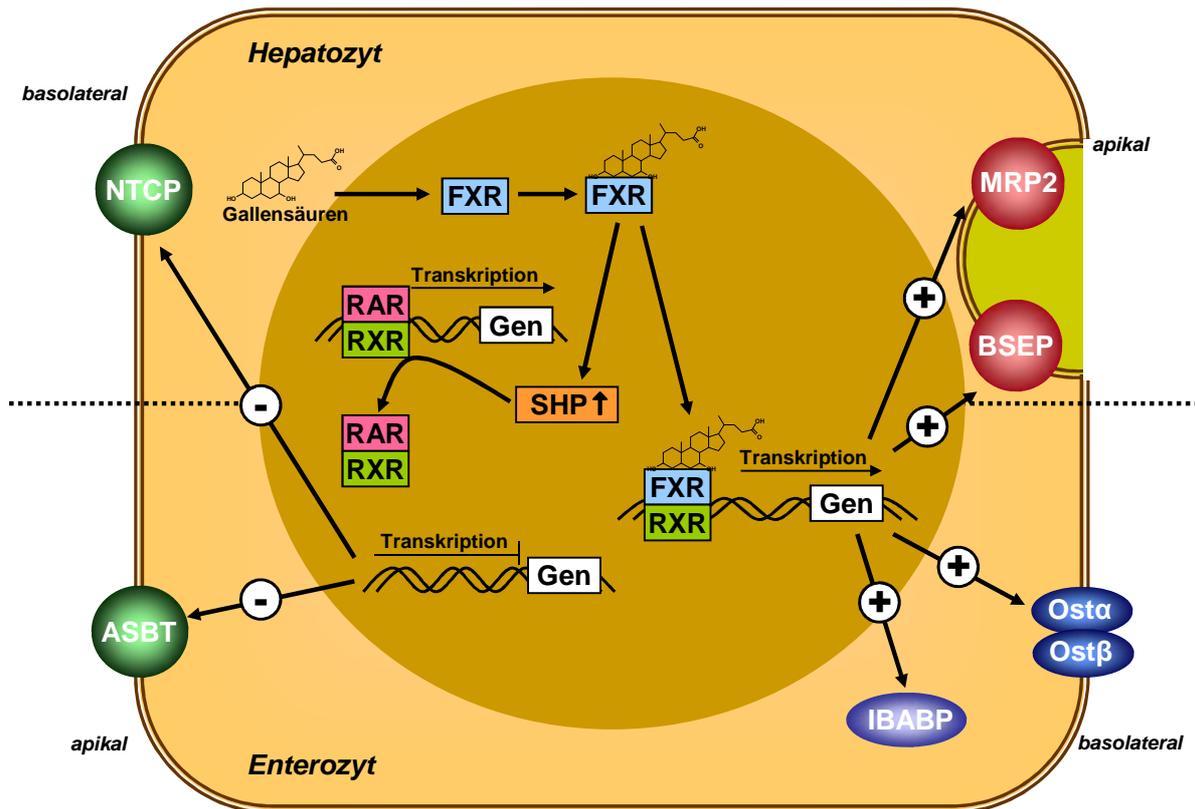
Die Aufnahme von Gallensäuren aus dem Portalblut in die Hepatozyten erfolgt über den an der basolateralen Membran lokalisierten  $\text{Na}^+$ -abhängigen NTCP und  $\text{Na}^+$ -unabhängig über Mitglieder der OATP-Familie. Aktive ATP-abhängige Effluxsysteme, insbesondere BSEP und MRP2, sind für den Export der Gallensäuren in die Gallenkanälchen verantwortlich. Zusätzlich kann auch ein Efflux über die basolaterale Membran der Hepatozyten stattfinden. Dieser wird von MRP3, MRP4 und OST $\alpha$ /OST $\beta$  vermittelt. Die in den Darm abgegebenen Gallensäuren werden im terminalen Ileum effektiv vom  $\text{Na}^+$ -abhängigen ASBT aufgenommen. Nur ca. 5 % der Gallensäuren gehen über den Faeces verloren. Der intrazelluläre Transport der Gallensäuren durch den Enterozyten erfolgt an IBABP gebunden. Der Efflux in das Portalblut wird über das  $\text{Na}^+$ -unabhängige Heterodimer OST $\alpha$ /OST $\beta$  vermittelt. Über das Portalblut werden die Gallensäuren der Reabsorption im Hepatozyten zugeführt, welches den enterohepatischen Kreislauf schließt. Renal filtrierte Gallensäuren werden im proximalen Tubulus aktiv über den ASBT reabsorbiert, was den Gallensäureverlust über den Urin sehr gering hält. Über OST $\alpha$ /OST $\beta$  und in geringerem Anteil über MRP3 erfolgt der Efflux der Gallensäuren in die systemische Zirkulation und deren Zuführung zur Leber. Unter cholestatischen Bedingungen können MRP2 und MRP4 den Efflux von Gallensäuren an der apikalen Membran vermitteln. Als alternative Zirkulation ist der Kreislauf zwischen Cholangiozyt und Hepatozyt als *Cholehepatic Shunt* bekannt. Aus dem Gallengang können Gallensäuren über den ASBT in die Cholangiozyten aufgenommen werden. Die Ausschleusung über die basolaterale Membran in das Blut erfolgt über den t-ASBT, OST $\alpha$ /OST $\beta$  und MRP3 und somit zurück zur Leber. BA = bile acid; OA = organisches Anion.

#### **1.4.4 Gallensäure-Transportsysteme der Gallengänge – *Cholehepatic Shunt***

Einen alternativen Zirkulationsweg stellt der *Cholehepatic Shunt* dar, womit die Zirkulation zwischen Cholangiozyt und Hepatozyt beschrieben wird (Abb. 1.3). Im Gallengang können Gallensäuren aktiv durch den ASBT in die Cholangiozyten aufgenommen werden, über IBABP transzellulär an die basolaterale Membran transportiert und vermutlich über t-ASBT, Osta/Ost $\beta$  und/oder MRP3 in das Blut abgegeben und der Leber erneut zugeführt werden (Alpini et al. 1997; Lazaridis et al. 1997, 2000; Rost et al. 2001; Trauner und Boyer 2003; Ballatori et al. 2005; Xia et al. 2006). Die Bedeutung dieses Weges ist noch nicht geklärt. In Fällen chronischer Cholestase ist dies wahrscheinlich der einzige Weg zur Rückgewinnung von Gallensäuren und trägt so zur Gallensäuresekretion und der Aufrechterhaltung des Gallenflusses bei. Weiterhin könnte dieser Weg zur Konzentrationsbestimmung von Gallensäuren in der Galle dienen und adaptive intrazelluläre Regulationsmechanismen und Signalwege aktivieren und beeinflussen (Alpini et al. 1997, 1999; Chignard et al. 2001, 2003; Alpini et al. 2005; Xia et al. 2006).

#### **1.4.5 Gallensäuren als Regulatoren der Gallensäure-Homöostase**

Gallensäuren können aufgrund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften in hohen Konzentrationen toxisch auf Zellmembranen wirken. Zum Schutz des Körpers ist es daher essentiell, die Gallensäure-Homöostase aufrecht zu erhalten. Dies geschieht zum großen Teil durch Regulation der Gallensäure-Transporter. Kurzfristige Regulationen gehen mit einer posttranskriptionellen Veränderung des Proteins einher. Langfristige Veränderungen der Expression werden auf Transkriptionsebene reguliert. Hier spielen Gallensäuren selbst eine wichtige Rolle. Neben ihrer Funktion als Detergenz sind sie auch in der Lage, Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, welche ihre eigene Biosynthese und/oder -transport beeinflussen (Alrefai und Gill 2007; Geier et al. 2007; Pellicoro und Faber 2007).



**Abb. 1.4: Gallensäuren als Regulatoren der Gallensäurehomöostase in Hepatozyt (oben) und Enterozyt (unten) auf Ebene der Gallensäuretransporter.**

Die Aufnahme von Gallensäuren führt zur Aktivierung von FXR. Dieser führt nachgeschaltet zu einer Erhöhung der SHP Expression und in der Folge zur verminderten Expression von NTCP und ASBT. Weiterhin kann der aktivierte FXR zusammen mit RXR die Expression von MRP2, BSEP, Ostα/Ostβ und IBABP erhöhen. SHP = Short Heterodimer Partner; FXR = Farnesoid X Receptor; RXR = Retinoic acid Receptor.

Zahlreiche dieser Regulationen werden über den nukleären *Farnesoid X Receptor* (FXR) vermittelt, welcher als Gallensäuresensor dient (Abb. 1.4). Gallensäuren, insbesondere Chenodeoxycholat, können an diesen Rezeptor binden und ihn aktivieren (Pellicoro und Faber 2007). Der aktivierte FXR bindet nicht direkt an den Promotor, beeinflusst aber dessen Aktivität indirekt, indem die Expression des Transkriptionsfaktors *Short Heterodimer Partner* (SHP) angeregt wird, welcher den stimulierenden Effekt des *Retinoic Acid Receptor* (RAR) und *Retinoic X Receptor* (RXR) Heterodimers am NTCP- bzw. ASBT-Promotor hemmt (Denson et al. 2001; Anwer 2004; Neimark et al. 2004). Zusätzlich inhibiert SHP die Gallensäuresynthese indem es mit dem *Liver X Rezeptor* (LXR) interagiert, welches ein Aktivator der CYP7A1-Expression ist (Chiang et al. 2001). Neben diesen Effekten kann der Gallensäure-aktivierte FXR mit RXR ein Heterodimer bilden und über die Bindung an spezifische *Bile Acid Response Elements* (BARE) die Promotoraktivität von BSEP, IBABP, Ostα/Ostβ und MRP2 steigern (Grober et al. 1999; Ananthanarayanan et al. 2001; Kast et al. 2002; Plass

et al. 2002; Redinger 2003; Arrese und Ananthanarayanan 2004; Landrier et al. 2006). Auch die Regulation der ilealen Expression des Asbt der Maus steht unter einem negativen Feedback durch Gallensäuren. Die erhöhte Expression des SHP unterdrückt die *Liver Receptor Homologue-1* (LRH-1) abhängige Aktivierung der Asbt-Expression (Chen et al. 2003). In Ratten dagegen zeigte sich keine Gallensäure-abhängige Regulation der Asbt-Expression (Arrese et al. 1998). Bei dieser Spezies existiert keine LRH-1 Bindungsstelle im Asbt-Promotor, durch welche der FXR normalerweise die Asbt-Expression reguliert (Chen et al. 2003; Li et al 2004). Die oben genannten Regulationsvorgänge führen in Hepatozyten und Enterozyten zu einer reduzierten Gallensäuresynthese, einer verminderten Gallensäureaufnahme und einem erhöhten Gallensäureefflux und verhindern so, dass die intrazelluläre Gallensäurekonzentration weiter steigt, was zytotoxische Wirkungen der Gallensäuren zur Folge hätte (Pellicoro und Faber 2007).

## **1.5 Neue Mitglieder der SLC10-Familie**

### **1.5.1 SLC10A4**

Neben NTCP und ASBT wurden inzwischen fünf weitere Mitglieder der SLC10-Familie identifiziert, deren Charakterisierung noch am Anfang steht. SLC10A4/Slc10a4 bildet mit NTCP/Ntcp eine Subfamilie (Geyer et al. 2006), zeigt aber ein für die SLC10-Familie untypisches und überraschendes Expressionsmuster: Slc10a4 der Ratte wurde in Synapsen cholinergischer Neurone des zentralen Nervensystems und Darmnervensystems lokalisiert (Geyer et al. 2008). Neuere Untersuchungen identifizierten das Slc10a4-Protein zusätzlich in Synapsen monoaminergischer Neurone des zentralen und peripheren Nervensystems sowie im Epithel von Lunge und Harnblase (Burger et al. 2008, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Funktion von Slc10a4 ist bisher ungeklärt. Weder Substrate der SLC10-Familie wie Taurocholat (TC), Estron-3-sulfat ( $E_1S$ ), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) und Pregnenolonsulfat (PREGS), noch Cholinchlorid, ein Substrat des *high-affinity Choline Transporters* ChT1, dem Marker für cholinerge Neuronen, wurden von Slc10a4 transportiert (Splinter et al. 2006; Geyer et al. 2008).

### **1.5.2 SLC10A3 und SLC10A5**

SLC10A5/Slc10a5 bildet mit SLC10A3/Slc10a3 eine weitere Subfamilie der SLC10-Familie. Aufgrund seiner weiten Gewebeexpression wird SLC10A3/Slc10a3 als ein Protein mit *Housekeeping* Funktion angesehen, welche bisher allerdings noch ungeklärt ist (Hagenbuch

und Dawson 2004). SLC10A5/Slc10a5 wird bei Mensch, Maus und Ratte am stärksten in Leber und Niere exprimiert und konnte in der Ratte in Hepatozyten bzw. im proximalen Tubulus der Niere nachgewiesen werden. Auch SLC10A5/Slc10a5 zeigte keine Transportaktivität für bekannte Substrate der SLC10-Familie wie TC, Cholat, E<sub>1</sub>S und DHEAS. Sein Expressionsmuster spricht aber dafür, dass dieser Carrier am hepatischen und renalen Transport anderer, bisher nicht identifizierter Substanzen beteiligt ist (Fernandes et al. 2007).

### **1.5.3 SLC10A6**

Ein weiteres Mitglied dieser Familie ist der *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* (SOAT/Soat, SLC10A6/Slc10a6). SOAT/Soat zeigt die höchste phylogenetische Verwandtschaft zu ASBT/Asbt (Geyer et al. 2004, 2005). Kloniert und experimentell untersucht wurde bisher der Soat der Ratte, welcher eine relativ breite Expression in Gehirn, Herz, Niere, Lunge, Muskel, Milz, Testis, Nebenniere, Dünn- und Dickdarm zeigt. Im Gegensatz zu den anderen neuen Mitgliedern wurde für den Soat eine Transportaktivität für E<sub>1</sub>S und DHEAS nachgewiesen. Allerdings transportiert der Soat der Ratte keine Gallensäuren (Geyer et al. 2004). Die Charakterisierung des humanen Orthologs ist Gegenstand dieser Arbeit.

### **1.5.4 SLC10A7**

Der Carrier SLC10A7/Slc10a7 zeigt bei Mensch, Ratte, Maus und Frosch eine sehr breite Gewebeexpression. Eine hohe phylogenetische Verwandtschaft findet sich zu zahlreichen bakteriellen Proteinen (*SLC10A7-related proteins*). Bisher ist keine Funktion für den SLC10A7 bekannt (Godoy et al. 2007). Wie in 1.1 erwähnt, ist die Zuordnung des SLC10A7 in die SLC10-Familie aufgrund seiner geringen Sequenzidentität zu den anderen Mitgliedern kritisch zu betrachten. Daher wurde er von weiteren Vergleichen ausgeschlossen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die schon lange bekannten Mitglieder der SLC10-Familie, NTCP und ASBT, haben mit der Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren eine wichtige physiologische Funktion im Körper inne. Die Identifizierung neuer Mitglieder dieser Transporterfamilie ließ erkennen, dass dies nicht die einzige Aufgabe dieser Familie darstellt. Insbesondere der fehlende Gallensäuretransport und das zu den Gründungsmitgliedern unterschiedliche Expressionsmuster der neuen Mitglieder deuten darauf hin. Von den neuen Carriern konnte bisher nur für das sechste Mitglied, den *Sodium-dependent organic anion transporter* (Soat) der Ratte, eine Transportfunktion identifiziert werden, welche sulfatierte Steroidhormone umfasst. Hormonell inaktive Steroidsulfate zirkulieren im Blut in relativ hohen Konzentrationen und gelten als Vorläufer-Moleküle für die Synthese aktiver Steroidhormone. Somit besitzen Transporter für Steroidsulfate, wie auch die an der Synthese aktiver Hormone beteiligten Enzyme, eine wichtige Funktion in der hormonellen Regulation durch Steroidhormone. Die Charakterisierung von Steroidsulfattransportern trägt daher erheblich zum Verständnis dieser hormonellen Regelkreise bei.

Ziel der Arbeit war die funktionelle und molekulare Charakterisierung des humanen Carriers SOAT. Zunächst erfolgte eine ausgiebige bioinformatische Analyse des Proteins und dessen Einordnung in die SLC10-Familie sowie die Untersuchung der Expression. Die funktionelle Charakterisierung umfasste die Identifizierung von Substraten, Inhibitoren des Transports, Untersuchungen zum Transportmechanismus des SOAT, teils im Vergleich zu NTCP und ASBT sowie Auswirkungen von Polymorphismen auf den Transport. Auf molekularer Ebene wurden die transmembranäre Organisation und sekundäre Modifikationen (N-Glykosylierung und Phosphorylierung) des Proteins näher untersucht. Auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse wurden mögliche physiologische Funktionen des SOAT erörtert und diskutiert.

## 2 MATERIAL

Das Auffüllen der Ansätze, Puffer und Medien auf das entsprechende Volumen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O). Nichtbenutzung von <sup>TM</sup> oder ® bedeutet nicht, dass die Produktbezeichnungen frei verfügbar sind.

### 2.1 Molekularbiologisches Material

#### 2.1.1 Primer

Klonierung in pBluePolyA-XbaI*	Sequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub>
SOAT-SacII-F	atgaccgcggatgagagccaattgttccagcagctc SacII	74,0°C
SOAT-XbaI-R	cgtctagactatcgcataagtgatgtggccaactg XbaI	71,7°C
ASBT-SacII-F	ccagccgcggaaccagcaatgaaatg SacII	69,5°C
ASBT-XbaI-R	gtcctctagatgtctaacttttcgtcagggt XbaI	65,4°C
NTCP-XbaI-F	tctctagaggatggaggcccacaac XbaI	66,3°C
NTCP-XbaI-R	accaggtctagagctaggctgtgcaag XbaI	68,0°C
<b>Subklonierung in pcDNA5/FRT/TO (aus pBlue-polyA-XbaI)*</b>		
SOAT-KpnI-F	tccaggtaccatgagagccaattgttccag KpnI	59,5°C
SOAT-NotI-R	ttcaaccctccttcaagcggccgcctattc NotI	58,9°C
ASBT-EcoRV-F	ggagatatcaatgaaatgatccgaacagctg EcoRV	63,5°C
ASBT-XhoI-R	cagtctcgagatgtctaacttttc XhoI	65,7°C
NTCP-KpnI-F	gcggtaccggatggaggcccacaac KpnI	66,4°C
NTCP-XhoI-R	tctctcgagctaggctgtgcaag XhoI	71,0°C

---

**Subklonierung in TOPO-Vektoren\***


---

SOAT-TOPO-F (aus pcDNA5/FRT/TO)	acc <b>atg</b> agagccaattgttc	55,3°C
SOAT-TOPO-R ohne Stop	ttcacatgaagtgatgtggc	55,3°C
ASBT-TOPO-F (aus pBlue-polyA-XbaI)	agca <b>atg</b> aatgatccgaac	52,4°C
ASBT-TOPO-R ohne Stop	cttttcgtcagggtgaaatc	53,2°C
NTCP-XbaI-F (aus pBlue-polyA-XbaI)	tctctagagg <b>atg</b> gaggcccacaac XbaI	66,3°C
NTCP-TOPO-R ohne Stop	ggctgtgcaaggggagcagtc	65,7°C
GFP-R mit 3 x Stop	<b>ttatcatt</b> acttgtacagctcgtcc	59,7°C

---

**Zielgerichtete Mutagenese  
(im pcDNA5/FRT/TO)\***


---

SOAT-FLAG-MGF	catcacttcatgcaagattacaaggatgacgacgat aag <b>tag</b> ggcggccgctcgagtctag FLAG-Motiv	84,1°C
SOAT-FLAG-MGR	ctagactcgagcggccgc <b>cta</b> cttatcgtcgtcatcc ttgtaatcttcgcatgaagtgatg FLAG-Motiv	84,1°C
ASBT-FLAG-MGF	caacctgacgaaaaggattacaaggatgacgacgata ag <b>tag</b> acatctcgagtc FLAG-Motiv	77,2°C
ASBT-FLAG-MGR	gactcgagatgt <b>cta</b> cttatcgtcgtcatccttgtaa tccttttcgtcaggttg FLAG-Motiv	77,2°C
NTCP-FLAG-MGF	gctccccttgacacagccgattacaaggatgacgacga taag <b>tag</b> ctcgagtctagagg FLAG-Motiv	83,6°C
NTCP-FLAG-MGR	cctctagactcgag <b>cta</b> cttatcgtcgtcatccttgt aatcggctgtgcaaggggagc FLAG-Motiv	83,6°C

---

**Zielgerichtete Mutagenese  
(im pBlue-polyA-XbaI)\***


---

SOAT-pBlue-FLAG-MGF	catcacttcatgtgaagattacaaggatgacgacgat aag <b>tag</b> tctagagactgaagga FLAG-Motiv	78,9°C
SOAT-pBlue-FLAG-MGR	tccttcagtctctag <b>cta</b> cttatcgtcgtcatcctt gtaatcttcacatgaagtgatg FLAG-Motiv	78,9°C

---

**Zielgerichtete Mutagenese  
(N-Glykosylierungsstellen)#**


---

SOAT-N4D-MGF	ccttatgagagcc <b>G</b> attgttccagcagctc	77,6°C
SOAT-N4D-MGR	gagctgctggaacaat <b>C</b> ggctctcataagg	77,6°C
SOAT-N14D-MGF	ctcagcctgccctgcc <b>G</b> acagttcagag	80,2°C
SOAT-N14D-MGR	ctctgaactgt <b>C</b> ggcagggcaggctgag	80,2°C
SOAT-N157D-MGF	gtcctggagctctcagcag <b>G</b> atctcaccattcc	79,1°C
SOAT-N157D-MGR	ggaatggtgagat <b>C</b> ctgctgaagactccaggac	79,1°C

---

---

**Zielgerichtete Mutagenese  
(Phosphorylierungsstelle)<sup>#</sup>**


---

SOAT-S230A-MGF	cacccttctgaccatc <u>GC</u> tttcatctttcctttgattgg	78°C
SOAT-S230A-MGR	ccaatcaaaggaaagatgaaa <u>GC</u> gatggtcagaaggggtg	78°C

---

**Zielgerichtete Mutagenese  
(Polymorphismen)<sup>#</sup>**


---

SOAT-S6F-MGF	gccaattggtt <u>T</u> cag <u>T</u> agctcagcctgcctgc	77,2°C
SOAT-S6F-MGR	gcagggcaggctgagct <u>A</u> ctg <u>A</u> aacaattggc	77,2°C
SOAT-I114V-MGF	gggggcaccatctctaac <u>G</u> ttttcaccttc	77,5°C
SOAT-I114V-MGR	gaaggtgaaaa <u>C</u> gttagagatggtgcccc	77,5°C

---

**Expressionsprofil RT-PCR**


---

GAPDH-F	acgggaagctcactggcatg	61,4°C
GAPDH-R	ccaccaccctggttgctgtag	61,4°C
SOAT-F	tggtggtcgcagttgctggtgtg	66,0°C
SOAT-R	gatgtggccaactggctcgagag	66,0°C

---

**Sequenzierung**


---

pBluePolyA-R	gaaaaatgacccttgaaagac	54,0°C
Oatp2ratF1	tgaccatgattacgccaagc	57,3°C
CMV-F	cgcaaatgggcggtagggctg	65,7°C
BGH-R	tagaaggcacagtcgagg	56,0°C
T7-F	taatacgactcactataggg	53,2°C
FP2-R	tcaccatgttaacagcatcaa	54,0°C
FLAG-R	cttatcgtcgtcatccttg	54,5°C
SOAT-F1	attgctgttctcatcatgggctg	60,6°C
ASBT-F1	ctcgttggttctggttccattg	58,4°C

---

\*Start- und Stopp-Codons sind fett dargestellt, Restriktionsschnittstellen und das FLAG-Motiv sind unterstrichen

<sup>#</sup>mutierte Basen sind als Großbuchstabe und fett dargestellt, das kodierende Triplet ist unterstrichen

Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

## 2.1.2 Enzyme

### Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	BSA	Hersteller
<i>DpnI</i>	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  5' - \text{g a} \downarrow \text{t c} - 3' \\  3' - \text{c t} \uparrow \text{a g} - 5' \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	Buffer # 7	-	Stratagene, La Jolla, CA, USA
<i>EcoRV</i>	$  \begin{array}{c}  5' - \text{g a t} \downarrow \text{a t c} - 3' \\  3' - \text{c t a} \uparrow \text{t a g} - 5'  \end{array}  $	NEB Buffer 3	+	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>KpnI</i>	$  \begin{array}{c}  5' - \text{g g t a c} \downarrow \text{c} - 3' \\  3' - \text{c} \uparrow \text{c a t g g} - 5'  \end{array}  $	NEB Buffer 1	+	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>NotI</i>	$  \begin{array}{c}  5' - \text{g c} \downarrow \text{g g c c g c} - 3' \\  3' - \text{c g c c g g} \uparrow \text{c g} - 5'  \end{array}  $	NEB Buffer 3	+	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>SacII</i>	$  \begin{array}{c}  5' - \text{c c g c} \downarrow \text{g g} - 3' \\  3' - \text{g g} \uparrow \text{c g c c} - 5'  \end{array}  $	NEB Buffer 4	-	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>XbaI</i>	$  \begin{array}{c}  5' - \text{t} \downarrow \text{c t a g a} - 3' \\  3' - \text{a g a t c} \uparrow \text{t} - 5'  \end{array}  $	NEB Buffer 2	+	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>XhoI</i>	$  \begin{array}{c}  5' - \text{c} \downarrow \text{t c g a g} - 3' \\  3' - \text{g a g c t} \uparrow \text{c} - 5'  \end{array}  $	NEB Buffer 2	+	NEB, Ipswich, MA, USA

### Hitzebeständige DNA-Polymerasen

AmpliTaq Gold DNA Polymerase → Abspaltung einer angefügten chemischen Gruppe bei optimaler Anlagerungstemperatur ( <i>Hot Start</i> ) → keine 3'→5' Exonuklease Aktivität	Applied Biosystems, Darmstadt
Expand High Fidelity PCR System → Mix aus thermostabiler <i>Taq</i> DNA Polymerase und thermostabiler <i>Tgo</i> DNA Polymerase mit 3'→5' Exonuklease Aktivität ( <i>proofreading</i> )	Roche Diagnostics, Mannheim
Pfu Turbo DNA Polymerase → Mix aus <i>Pfu</i> DNA Polymerase und dem <i>ArchaeMaxx polymerase-enhancing factor</i> → geringe Fehlerrate durch 3'→5' Exonuklease Aktivität ( <i>proofreading</i> ) → keine 5'→3' Exonuklease Aktivität	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Thermoprime Plus DNA Polymerase → <i>Taq</i> DNA Polymerase	ABgene, Hamburg
YieldAce DNA Polymerase → höhere Erträge als <i>Taq</i> Polymerase → enthält <i>ArchaeMaxx polymerase-enhancing factor</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA

## Reverse Transkriptase

Advantage RT-for-PCR Kit MMLV  
(*Murine Moloney Leukemia Virus*)

BD Clontech, Heidelberg

## Ligasen

Rapid DNA Ligation Kit  
T4-DNA Ligase

Roche Diagnostics, Mannheim  
BD Clontech, Heidelberg

## Sonstige Enzyme

PNGase F  
CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*)  
DNA-Polymerase I Large Fragment (Klenow-Fragment)  
T3-RNA-Polymerase

NEB, Ipswich, MA, USA  
MBI Fermentas, St. Leon-Roth  
NEB, Ipswich, MA, USA  
Promega, Madison, WI, USA

## Sonstiges Material

dNTPs (je 10 mM)  
Wasser für die Molekularbiologie

MBI Fermentas, St. Leon-Roth  
Roth, Karlsruhe

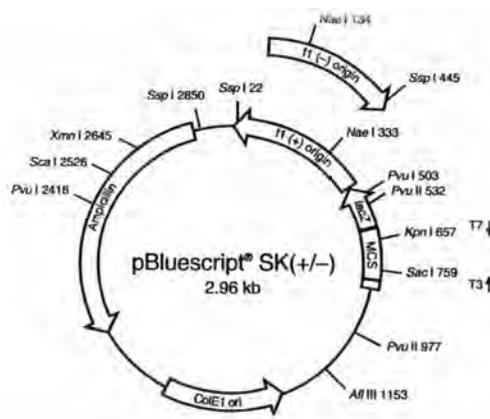
## 2.1.3 Vektoren

### pBluescript SK (+/-) (Stratagene, La Jolla)

2960 bp Gesamtlänge

LacZ, T3-Promotor, T7-Promotor, f1 origin, Amp<sup>r</sup>

MCS: *SacI*, *BstXI*, *SacII*, *NotI*, *EagI*, *XbaI*, *SpeI*, *BamHI*, *SmaI*, *PstI*, *EcoRI*, *XhoI*, *ApaI*,  
*DraI*, *KpnI*



**pBlue-polyA-XbaI (basierend auf pBluescript)**

3100 bp Gesamtlänge

LacZ, T3-Promotor, f1 origin, PolyA, Amp<sup>r</sup>

MCS: *SacI*, *BstXI*, *SacII*, *NotI*, *EagI*, *XbaI*

β-Galactosidase → T3 promoter +1 →

```

CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGTGGCGCCGCTCTAGA
GTCGATACTGGTACTAATGCGGTTTCAGAGCTTTAATTGGGAGTGATTTCCCTTGTTTTCGACCTCGAGGTGGCGCCACCGCCGGGAGATCA
    
```

```

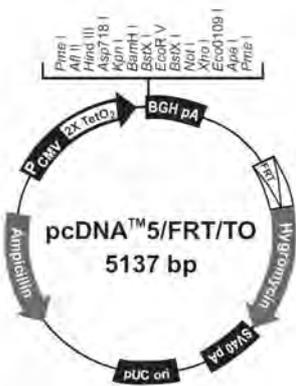
XbaI                                     PolyA                                     XhoI   ApaI   KpnI
TCTAGAGACTGAAGGAGGGTTGAACTCTGTATTGTCTTTCAAGGGTCATTTTTCTCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGGGGGCCCGTACCC
AGATCTCTGACTTCTCCCACTTGAGACATAACAGAAAGTCCAGTAAAAAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGGTCCTCCCGGGCCATGGG
    
```

**pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen, Karlsruhe)**

5137 bp Gesamtlänge

CMV-Promotor mit TATA-Box und 2 x Tetracyclin-Operon (TetO<sub>2</sub>), BGH PolyA, FRT site, SV40 early PolyA, pUC origin, *bla* Promotor, Hyg<sup>r</sup>, Amp<sup>r</sup>

MCS: *PmeI*, *AflIII*, *HindIII*, *Asp718I*, *KpnI*, *BamHI*, *BstXI*, *EcoRV*, *BstXI*, *NotI*, *XhoI*, *Eco0109I*, *ApaI*, *PmeI*



```

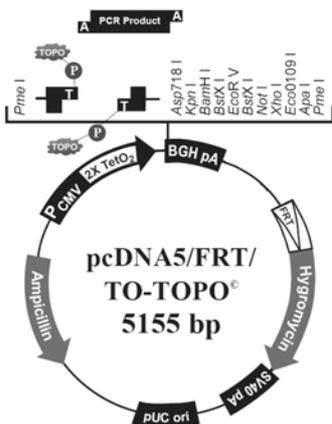
721  AAAATCAACG  GSACTTTCCA  AAATGTGGTA  ACAACTCCGC  CCCATTGACG  CAAATGGGCG
761  GTAGGCGTGT  ACGGTGGGAG  GTCTATATAA  SCAGAGCTCT  CCCTATCAGT  GATAGAGATC
841  TCCCTATCAG  TGATAGAGAT  CGTCGACGAG  CTCGTTTAST  GAACCGTCAG  ATCGCCTGGA
901  GACGCCATCC  ACGCTGTTTT  GACCTCCATA  GAAGACACCG  GGACCGATCC  AGCCTCCGGA
961  CTCTAGCGTT  TAAACTTAAG  CTGGTACCG  AGCTCGATC  CACTAGTCCA  GTGTGGTGGG
1021  ATCTGTGAGA  TATCCAGCAC  AGTGGCGCC  GCTCGAGTCT  AGAGGGCCCG  TTTAAATCCG
1081  CTGATCAGCC  TCGACTGGCC  CTCTAGTTG  CCAGCCATCC
    
```

\* Note that there are two *PmeI* sites and two *BstXI* sites in the polylinker.

**pcDNA5/FRT/TO-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)**

5155 bp Gesamtlänge

CMV-Promotor mit TATA-Box und 2 x Tetracyclin-Operon (TetO<sub>2</sub>), TOPO-Klonierungsstelle, BGH PolyA, FRT site, SV40 early PolyA, pUC origin, *bla* Promotor, Hyg<sup>r</sup>, Amp<sup>r</sup>



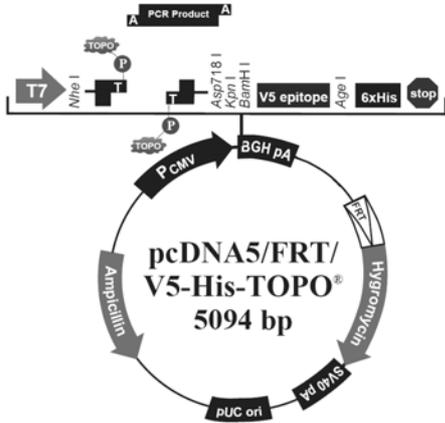
```

721  AAAATCAACG  GSACTTTCCA  AAATGTGGTA  ACAACTCCGC  CCCATTGACG  CAAATGGGCG
761  GTAGGCGTGT  ACGGTGGGAG  GTCTATATAA  SCAGAGCTCT  CCCTATCAGT  GATAGAGATC
841  TCCCTATCAG  TGATAGAGAT  CGTCGACGAG  CTCGTTTAST  GAACCGTCAG  ATCGCCTGGA
901  GACGCCATCC  ACGCTGTTTT  GACCTCCATA  GAAGACACCG  GGACCGATCC  AGCCTCCGGA
961  CTCTAGCGTT  TAAACTTAAG  CTGGTACCG  AGCTCGATC  CACTAGTCCA  GTGTGGTGGG
1011  CTCGGATCCA  CTAGTCCAGT  GTGGTGAAT  TCTGCAGATA  TCCAGCACAG  TGGCGCCGCT
1071  TCGAGTCTAG  AGGGCCGCTT  TAAACCGCT  GATCAGCCTC  GACTGTGGCT  TCTAGTTCCG
    
```

**pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)**

5094 bp Gesamtlänge

CMV-Promotor, T7-Promotor, TOPO Klonierungsstelle, V5 Epitop, Polyhistidin (6 x His) Region, BGH PolyA, FRT site, SV40 early PolyA, pUC origin, *bla* Promotor, *Hyg*<sup>r</sup>, *Amp*<sup>r</sup>



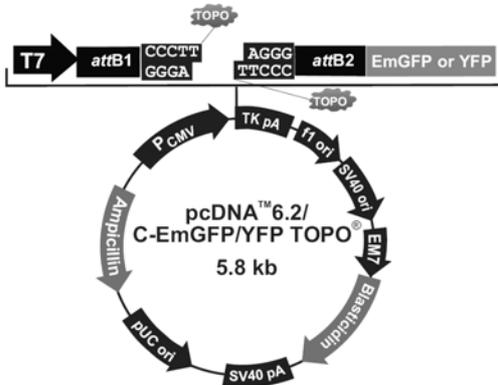
```

721  AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAATCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
      CMV forward priming site          TATA 3' end of CMV promoter          putative transcriptional start
761  GTAGGGCGTG ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
      T7 promoter/priming site
841  CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCEAA GCTGGCTAGC
      Asp718 | KpnI
901  GTTTAAACTT AAGCTGGCCCT TTTGAGCCGGGA GAG GGC GAG CTT GGT ACC GAG CTC
      BamHI          V5 epitope
947  GGA TCC GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT
      Gly Ser Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser
995  ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTT TAAACCCGCT
      The Arg Thr Gly His His His His His His His ***
1041 GATCAGCCTC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AACCATCTGT TGTTEGCCCC TCCCCCGTGC
      BGH reverse priming site
    
```

**pcDNA6.2/C-EmGFP-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)**

5814 bp Gesamtlänge

CMV-Promotor, T7-Promotor, TOPO Klonierungsstelle, attB2 site, EmGFP Epitop (*Emerald Green Fluorescent Protein*), TK PolyA, *f1* origin, SV40 early promotor und origin, EM7 Promotor, SV40 PolyA, pUC origin (komplementärer Strang), *bla* Promotor (komplementärer Strang), *Hyg*<sup>r</sup>, *Amp*<sup>r</sup> (komplementärer Strang)



```

710  CAAATGGGCG GTAGGGGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT
      CAAT          TATA 3' end of CMV promoter          Putative transcriptional start
770  AGAGAACCCA CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCEAA
      T7 promoter/priming site
830  GCTGGGTAGT TAAGCTGAGC ATCAACAAGT TTGTACAAA AAGCAGGCTC CGAATTCCGC
      att B1
890  CTT PCR AAG GGG GAA TTC GAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTT
      GAA PRODUCT TTC COC CTT AAG CTG GGT CGA AAG AAC ATG TTT CAC CAA
      Lys Gly Glu Phe Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val
932  GAT GCT GTT AAC ATG GIG NJC // --- TGA TAA GTT TAAACGGGGG AGGCTAACTG
      FP 2 Rev priming site          HpaI          FseI
      Asp Ala Val Asn EmGFP or YFP ***
1693 AAACACGGAA GGAGACAA
    
```

**pOG44 (Invitrogen, Karlsruhe)**

5785 bp Gesamtlänge

CMV-Promotor, synthetisches Intron, Leserahmen Flp Recombinase (FLP), SV40 PolyA, pUC origin, *bla* Promotor, *Amp*<sup>r</sup>



## 2.1.4 Bakterienstämme

### TOP10 chemically competent cells (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: *F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG*

### XL1-Blue supercompetent cells (Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*

## 2.1.5 RNA, cDNA Panels

Human Adrenal Gland Poly(A) <sup>+</sup> RNA	BD Clontech, Heidelberg
Human Mammary Gland Poly(A) <sup>+</sup> RNA	BD Clontech, Heidelberg
Human Multiple Tissue cDNA (MTC) Panel I [heart, brain (whole), placenta, lung, liver, skeletal muscle, kidney, pancreas]	BD Clontech, Heidelberg
Human Multiple Tissue cDNA (MTC) Panel II [spleen, thymus, prostate, testis, ovary, small intestine, colon, peripheral blood leukocyte]	BD Clontech, Heidelberg
hMEC (human Mammary Epithelial Cell) Total RNA	Bernhard Ugele, München

## 2.1.6 qPCR

### TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Darmstadt)

ASBT human: Hs00166561\_m1 (Exongrenze 4-5)  
 GAPDH human: Hs99999905\_m1  
 NTCP human: Hs00161820\_m1 (Exongrenze 1-2)  
 SOAT human: Hs01399354\_m1 (Exongrenze 5-6)

Komponenten: zwei unmarkierte Primer zur Amplifikation  
 FAM-markierte TaqMan MGB (Minor Groove Binder) Sonde

### TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems, Darmstadt)

Komponenten: AmpliTaq Gold DNA Polymerase  
 dNTPs mit dUTP  
 Referenzfarbstoff ROX  
 optimierte Pufferkomponenten

### TaqMan Gene Expression Cells-to-C<sub>T</sub> Kit (Ambion, Foster City, CA)

Komponenten: Lysis Solution  
 Stop Solution  
 DNase I  
 20 x RT Enzyme Mix  
 2 x RT Buffer  
 TaqMan Gene Expression Master Mix

## 2.1.7 Längenstandards

### Agarose-Gelelektrophorese

Gene Ruler DNA Ladder Mix	100, 200, 300, 400, <b>500</b> , 600, 700, 800, 900, <b>1031</b> , 1200, 1500, 2000, 2500, <b>3000</b> , 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
peqGOLD High Range RTU RNA-Leiter	200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000 bp	PeqLab, Erlangen

### Protein-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	11, 17, 28, 36, 56, 72, 95, 130, 230 kDa	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Rainbow [ <sup>14</sup> C]methylated protein molecular weight marker	14,3, 20,1, 30, 45, 66, 97, 220 kDa	Amersham Biosciences, Buckinghamshire
Roti-Mark Western Marker mit Roti-Mark Western-HRP-Konjugat	10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 120 kDa	Roth, Karlsruhe

## 2.1.8 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien

High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics, Penzberg
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
Oligotex mRNA Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Riboprobe <i>in vitro</i> Transcription System T3	Promega, Mannheim
Sephadex G50 Quick Spin Columns for RNA purification	Roche Diagnostics, Mannheim
Tri Reagent (RNA-Isolierung)	Sigma, Taufkirchen

## 2.1.9 Puffer und Medien

<b>LB-Medium (1 l)</b>	Trypton		10 g
	NaCl		10 g
	Yeast-Extract		5 g
	→ pH 7,0 (NaOH), autoklavieren		
	→ vor Gebrauch Selektionsantibiotikum hinzufügen		
<b>LB-Agar (1 l)</b>	LB-Medium		1 l
	+ Agar-Agar		20 g
	→ autoklavieren und abkühlen auf 60°C		
	→ Selektionsantibiotikum zufügen und Platten gießen		
<b>NZY<sup>+</sup>-Broth (1 l)</b>	NZamine		10 g
	Yeast-Extract		5 g
	NaCl		5 g
	→ pH 7,5 (NaOH), autoklavieren		
	1 M MgSO <sub>4</sub> (sterilfiltriert)	12,5 mM	12,5 ml
	1 M MgCl <sub>2</sub> (sterilfiltriert)	12,5 mM	12,5 ml
	2 M Glucose (sterilfiltriert)	20 mM	10 ml
	→ kurz vor Gebrauch hinzufügen		
<b>SOC Medium</b> (Invitrogen, Karlsruhe)	Trypton	2 %	
	Yeast-Extract	0,5 %	
	NaCl	10 mM	
	KCl	2,5 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM	
	Glucose	20 mM	

## 2.2 Agarose-Gelelektrophoresen

### 2.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese (DNA)

<b>6 x Ladepuffer</b> (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)	Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM	
	Bromphenolblau	0,03 %	
	Xylen Cyanol FF	0,03 %	
	Glycerin	60 %	
	EDTA	60 mM	
<b>10 x TAE-Puffer (1 l)</b>	Tris	400 mM	484 g
	Essigsäure		114,2 ml
	0,25 M EDTA, pH 8,0	100 mM	400 ml
	→ als 1 x verwenden		
<b>EB-Färbelösung</b>	Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O	1 µg/µl	
<b>1 % Agarosegel</b>	Agarose		1 g
	1 x TAE Puffer		100 ml

## 2.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (RNA)

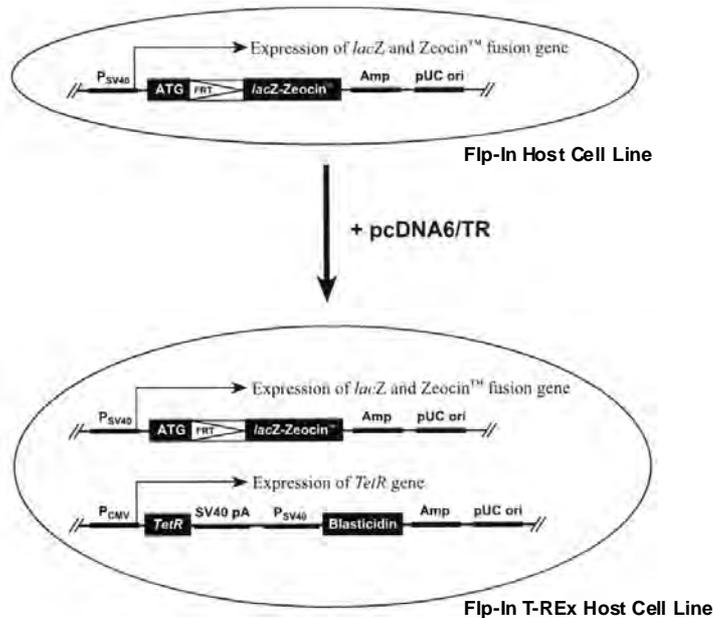
<b>DEPC-ddH<sub>2</sub>O (1 l)</b>	DEPC [1 mg/ml]	0,1 %	1 ml
	ddH <sub>2</sub> O		1 l
	→ über Nacht inkubieren		
	→ autoklavieren		
<b>10 x MOPS-Puffer (400 ml)</b>	MOPS	200 mM	16,74 g
	Natriumacetat	100 mM	3,28 g
	20 mM EDTA	1 mM	20 ml
	DEPC-ddH <sub>2</sub> O		380 ml
	→ pH 7,0 (NaOH)		
	→ lichtgeschützt lagern		
	→ als 1 x verwenden		
<b>Agarosegel</b>	Agarose		1 g
	DEPC-ddH <sub>2</sub> O		40 ml
	10 x MOPS		5 ml
	→ kochen bis Agarose gelöst ist		
	Formaldehyd		7 ml
	→ zugeben und Gel gießen		
<b>1,3 x Ladepuffer Roti-Load RNA (Roth, Karlsruhe)</b>	Formamid	55 %	
	MOPS	22 mM	
	Natriumacetat	8,8 mM	
	EDTA	1 mM	
	Formaldehyd	6,8 %	
	Bromphenolblau	0,03 %	
	Ethidiumbromid	0,005 %	
	→ pH 7,0		

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Zelllinien

#### Flp-In T-REx 293 Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)

Wirtszelllinie:	<i>human embryonic kidney cells 293 (HEK293)</i> ATTC-Nummer CRL-1573
Modifikation:	stabile Integration einer <i>FRT site</i> in das Genom (pFRT/ <i>lacZeo</i> ) konstitutive Expression eines Tet-Repressors (pcDNA6/TR) siehe Abb. 2.1
Charakteristika:	adhärent wachsend Zeocin-resistent → Selektion auf integrierte <i>FRT site</i> Blasticidin-resistent → Selektion auf pcDNA6/TR (Tet-Repressor)



**Abb. 2.1: Prinzip der Generierung der Flp-In T-REx 293 Zellen.**

Durch die stabile Transfektion des pFRT//lacZeo in die Wirtszelllinie HEK293 entstand zunächst die Zeocin-resistente Flp-In Host Cell Linie. In diese wurde stabil der pcDNA6/TR Vektor transfiziert. Es resultierte eine Zeocin- und Blastidicin-resistente Flp-In T-REx Host Cell Linie (Quelle: Manual Flp-In™ T-REx™ Core Kit, Invitrogen).

### GripTite 293 MSR Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)

- Wirtszelllinie: *human embryonic kidney cells 293* (HEK293-H)
- Modifikation: konstitutive Expression des *human macrophage scavenger receptor type 1* (MSR 1) (pCMV SPORT6 MSR.neo)  
 → sehr hohe Adhärenz im Vergleich zu den Ausgangszellen
- Charakteristika: adhärent wachsend  
 Geneticin-resistent → Selektion auf pCMV SPORT6 MSR.neo

### 2.3.2 Medien

<b>HEK293-Medium</b> (500 ml)	D-MEM (high glucose)	217,5 ml
	F-12 (Ham)	217,5 ml
	FKS	10 % 50 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM 10 ml
	Pen/Strep [10000 Units/ml; 10000 µg/ml]	1 % 5 ml
<b>GripTite MSR-Medium</b> (500 ml)	D-MEM (high glucose)	430 ml
	FKS	10 % 50 ml
	MEM Non-Essential	0,1 mM 5 ml
	Amino acids (NEAA)	
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM 10 ml
	Pen/Strep [10000 Units/ml; 10000 µg/ml]	1 % 5 ml

<b>HEPES-Puffer (1 l)</b>	HEPES	4,77 g	18 mM
	NaCl	7,07 g	120 mM
	KCl	0,4 g	5 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06 g	0,4 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,08 g	0,3 mM
	Glucose	1 g	6 mM
	Phenolrot	0,01 g	0,03 mM
	EDTA	0,37 g	1 mM
	→ pH 7,3 (HCl/NaOH)		
<b>Trypsinlösung (100 ml)</b>	Trypsin	0,025 %	25 mg
	HEPES-Puffer		100 ml
<b>Einfriermedium</b>	Normalmedium	90 %	
	DMSO	10 %	
<b>Beschichtungsmedium</b>	Poly-D-Lysin	100 µg/ml	
<b>Trypanblau (100 ml)</b>	Trypanblau	4 %	4 g
	NaCl	0,9 %	0,9 g

### 2.3.3 Antibiotika

<b>Antibiotika</b>	<b>Verwendungs- zweck</b>	<b>End- konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Blasticidin S Hydrochlorid	Selektion auf pcDNA6/TR	15 µg/ml	Roth, Karlsruhe
Geneticin Disulfat (G418)	Selektion auf pCMV SPORT6 MSR.neo	600 µg/ml	Roth, Karlsruhe
Hygromycin B [50 mg/ml]	Selektion auf Insert	150 µg/ml	Roth, Karlsruhe
Tetrazyklin Hydrochlorid	Induktion der Proteinexpression	10 µg/ml	Sigma, Taufkirchen
Zeocin	Selektion auf pFRT/ <i>lacZeo</i>	100 µg/ml	InvivoGen, Toulouse, Frankreich

## 2.4 Stabile und transiente Transfektion

### 2.4.1 Transfektionsreagenzien

Fugene 6	Roche Diagnostics, Basel
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Roti-Fect	Roth, Karlsruhe

### 2.4.2 Medien zur Transfektion

<b>HEK293-Medium ohne Antibiotika (50 ml)</b>	D-MEM (high glucose)		22 ml
	F-12 (Ham)		22 ml
	FKS	10 %	5 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	1 ml
<b>HEK293-Medium ohne Antibiotika und FKS (50 ml)</b>	D-MEM (high glucose)		24,5 ml
	F-12 (Ham)		24,5 ml
	L-Glutamin	4 mM	1 ml
<b>GripTite MSR-Medium ohne Antibiotika (50 ml)</b>	D-MEM (high glucose)		43,5 ml
	FKS	10 %	5 ml
	MEM Non-Essential Amino acids (NEAA)	0,1 mM	0,5 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	1 ml
<b>GripTite MSR-Medium ohne Antibiotika und FKS (50 ml)</b>	D-MEM (high glucose)		48,5 ml
	MEM Non-Essential Amino acids (NEAA)	0,1 mM	0,5 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	1 ml

## 2.5 Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

### 2.5.1 Versuchstiere

Für die heterologe Expression der Transportproteine in *Xenopus laevis* Oozyten wurden weibliche südafrikanische Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) eingesetzt. Diese wurden von der Tierversuchsanstalt Hamburg-Eppendorf (Zucht), der Versuchstierhaltung der Universität Konstanz (Zucht) und Dipl. Biol. Horst Kähler (Wildfänge) bezogen und unter Standardbedingungen im Tierstall des Mehrzweckinstitutsgebäudes (MZI) gehalten.

## 2.5.2 Puffer und Lösungen für Transportmessungen

<b>OR-2 Ca<sup>2+</sup>-freie Lösung (1 l)</b>	NaCl	82,5 mM	4,82 g
	HEPES	5,0 mM	1,19 g
	KCl	2,5 mM	0,186 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,0 mM	0,2033 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,0 mM	0,178 g
	→ pH 7,8 (KOH), autoklavieren		
<b>Modifizierte Barth's Lösung (1 l)</b>	NaCl	88 mM	5,14 g
	HEPES	15 mM	3,57 g
	NaHCO <sub>2</sub>	2,4 mM	0,2 g
	KCl	1,0 mM	0,0745 g
	Ca(NO <sub>3</sub> ) x 4 H <sub>2</sub> O	0,3 mM	0,0708 g
	CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,41 mM	0,0603 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,82 mM	0,2 g
	→ pH 7,6 (NaOH), autoklavieren → vor Gebrauch 0,1 % Gentamicin zugeben		
<b>Cholin Lösung (1 l)</b>	Cholinchlorid	100 mM	13,96 g
	HEPES	10 mM	2,385 g
	KCl	2 mM	0,149 g
	CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 mM	0,147 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 mM	0,2033 g
	→ pH 7,5 (1 M Tris), kühl lagern		
<b>Natrium-Lösung (1 l)</b>	NaCl	100 mM	5,84 g
	HEPES	10 mM	2,385 g
	KCl	2 mM	0,149 g
	CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 mM	0,147 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 mM	0,2033 g
	→ pH 7,5 (1 M Tris), kühl lagern		
<b>Kollagenase-Lösung (10 ml)</b>	Kollagenase D		20 mg
	OR-2 Ca <sup>2+</sup> -freie Lösung		10 ml

## 2.6 Transportmessungen an eukaryotischen Zellen

### 2.6.1 Puffer und Lösungen

<b>Transportpuffer mit Na<sup>+</sup> (1 l)</b>	NaCl	142,9 mM	8,35 g
	KCl	4,7 mM	0,35 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM	0,296 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	0,163 g
	HEPES	20 mM	4,777 g
	200 mM CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM	9 ml
	[0,294 g / 10 ml ddH <sub>2</sub> O] → pH 7,4 (1 M KOH), kühl lagern		

<b>Transportpuffer ohne Na<sup>+</sup> (1 l)</b>	Cholinchlorid	142,9 mM	19,95 g
	KCl	4,7 mM	0,35 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM	0,296 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	0,163 g
	HEPES	20 mM	4,777 g
	200 mM CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM	9 ml
	[0,294 g / 10 ml ddH <sub>2</sub> O] → pH 7,4 (1 M KOH), kühl lagern		

<b>Lysepuffer (1 l)</b>	NaOH	1 N	40,01 g
	SDS	0,1 %	1 g

### 2.6.2 Proteinbestimmung

<b>Stammlösung für Protein- standardreihe</b>	BSA (bovines Serum Albumin, Cohn Fraktion V)		2 mg
	Lysepuffer		1 ml

<b>Lösung C (für 100 wells)</b>	4 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		20 ml
	1 % CuSO <sub>4</sub>		0,8 ml
	2 % K-Na-Tartrat		0,8 ml

<b>Folin-Lösung (für 100 wells)</b>	Folin & Ciocalteu´s phenol reagent		1 ml
	ddH <sub>2</sub> O		3 ml

## 2.7 Immunfluoreszenz

### 2.7.1 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an *Xenopus laevis* Oozyten

<b>K<sup>+</sup>-Aspartat-Lösung (1 l)</b>	Kalium-Aspartat	200 mM	34,24 g
	KCl	20 mM	1,49 g
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM	0,2 g
	EGTA	10 mM	3,8 g
	HEPES	10 mM	2,38 g
	→ pH 7,4 (KOH)		

<b>Dent's Fixans (100 ml)</b>	Methanol	80 %	80 ml
	DMSO	20 %	20 ml

<b>1 x PBS (1 l)</b>	NaCl	137 mM	8 g
	KCl	2,68 mM	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,3 mM	1,3 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM	0,2 g
	→ pH 7,4 (HCl)		

<b>3,7 % Formaldehyd/PBS</b>	Formaldehyd 37 %	10 %	
	PBS	90 %	

<b>Präinfiltrationslösung</b>	Technovit 7100*	50 %	
	Ethanol	50 %	
<b>Infiltrationslösung</b>	Technovit 7100*		100 ml
	Härter I* → bei 4°C lagern	1 %	1 g
<b>Polymerisationslösung</b>	Technovit 7100*	93,7 %	15 ml
	Härter II*	6,3 %	1 ml

\* Bestandteile des Technovit 7100 Kits der Firma Heraeus Kulzer, Wehrheim/Ts.

## 2.7.2 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen

<b>10 x PBS (1 l)</b>	NaCl	1380 mM	80 g
	KCl	27 mM	2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	100 mM	26,8 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18 mM	2,4 g
	→ pH 7,4 (HCl), autoklavieren → als 1 x verwenden		
<b>2 % PFA (50 ml)</b>	PFA	2 %	1 g
	ddH <sub>2</sub> O (50-60°C)		45 ml
	10 x PBS		5 ml
	→ 1-2 Tropfen NaOH zugeben → unter Rühren bei 50°C lösen → pH 6,8-7,2 (HCl)		
<b>Puffer A (110 ml)</b>	Glycin	20 mM	165,22 mg
	1 x PBS		110 ml
<b>Puffer B (70 ml)</b>	BSA	1 %	700 mg
	Puffer A		70 ml
<b>Blockierlösung</b>	Serum der Spezies, in welcher der 2. AK generiert wurde	4 %	2,8 ml
	Puffer B		67,2 ml
<b>DAPI/Methanol 1:5000</b>	DAPI [1 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O]		50 µl
	Methanol		250 ml

<b>Eindeckelmedium</b>	Mowiol	2,4 g
<b>Mowiol</b>	Glycerin	6,0 g
	→ rühren	
	ddH <sub>2</sub> O	6 ml
	→ zugeben und mehrere Stunden bei Raumtemperatur rühren	
	0,2 M Tris (pH 8,5)	12 ml
	→ zugeben und über Nacht rühren lassen	
	→ 2 h ruhen	
	→ auf 50°C erwärmen	
	→ 15 min zentrifugieren, 5000 g	
	→ Überstand dekantieren und in Aliquots bei -20°C einfrieren	
	DABCO	0,1 %
	→ nach Auftauen zugeben	

## 2.8 Proteinanalyse

### 2.8.1 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteine)

	Sammelgel (5 ml)	Trenngel (15 ml)		
		8 %	10 %	12 %
ddH <sub>2</sub> O	3,4 ml	7	6	5 ml
30 % Acrylamid Mix	0,83 ml	4	5	6 ml
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,63 ml	-----	-----	-----
1,5 M Tris (pH 8,8)	-----	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
10 % SDS	50 µl	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
10 % APS	50 µl	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
TEMED	5 µl	9 µl	6 µl	6 µl

<b>10 x Tris-Glycin-SDS</b>	Tris	250 mM	30,3 g
<b>Elektrophoresepuffer (1 l)</b>	Glycin	1920 mM	144 g
	SDS	1 %	10 g
	→ pH 8,3 (HCl)		
	→ als 1 x verwenden		

<b>2 x Lämmli Puffer (10 ml)</b>	SDS	4 %	0,4 g
(Sigma-Aldrich, Steinheim)	Glycerin	20 %	2 g
	β-Mercaptoethanol	10 %	1 ml
	Bromphenolblau	0,004 %	0,4 mg
	1 M Tris (pH 6,8)	0,125 M	1,25 ml

<b>4 x Lämmli Puffer (10 ml)</b>	SDS	8 %	0,8 g
	Glycerin	40 %	4 g
	β-Mercaptoethanol	20 %	2 ml
	Bromphenolblau	0,008 %	0,8 mg
	1 M Tris (pH 6,8)	0,25 M	2,5 ml

### 2.8.2 Puffer und Lösungen für Radioimmunpräzipitation (RIP)

<b>RIPA-Puffer (0,5 l)</b>	5 M NaCl	150 mM	15 ml
	Nonidet P40	1 %	5 ml
	Sodium Deoxycholat	0,5 %	2,5 g
	10 % SDS	0,1 %	5 ml
	1 M Tris (pH 8)	50 mM	25 ml
<b>Protein A-Sepharose</b> (Sigma-Aldrich, Steinheim)	25 % Suspension in RIPA-Puffer		
<b>Fixierlösung (1 l)</b>	Methanol	30 %	
	Essigsäure	10 %	

### 2.8.3 Puffer und Lösungen für Western Blot

<b>Transferlösung (1 l)</b>	1 x Tris-Glycin-SDS Elektrophoresepuffer		800 ml
	Ethanol	20 %	200 ml
<b>10 x TBS (1 l)</b>	NaCl	1370 mM	12,1 g
	Tris	100 mM	121,2 g
	→ pH 8,0 (HCl)		
	→ als 1 x verwenden		
<b>TBS-T (1 l)</b>	1 x TBS		1 l
	Tween 20	0,05 %	500 µl
<b>Blockierlösung (50 ml)</b>	TBS-T		50 ml
	ECL Membrane Blocking Agent (Amersham)	5 %	2,5 g
<b>Coomassie-Färbelösung (220 ml)</b>	Coomassie Brilliant Blue R250	≈ 0,4 %	0,5 g
	Ethanol	≈ 50 %	100 ml
	Essigsäure	≈ 10 %	20 ml
	ddH <sub>2</sub> O		100 ml
<b>Coomassie- Entfärbelösung (1 l)</b>	Ethanol	30 %	300 ml
	Essigsäure	10 %	100 ml
	ddH <sub>2</sub> O		600 ml

### 2.8.4 Filmentwicklung

Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Hypam Schnellfixierer (1:25 in H <sub>2</sub> O)	Ilford, Cheshire, England
Rodinal B & W Film Developer (1:5 in H <sub>2</sub> O)	Agfa, Leverkusen
Eastman Kodak Co. BioMax MR Film	Sigma, Deisenhofen

### 2.8.5 Kommerziell erhältliche Kits

Amersham ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
BCA Protein Assay Kit	Novagen, Darmstadt
Rotilumin 1 & 2	Roth, Karlsruhe

## 2.9 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Primärantikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
anti-V5	GKPIPPLLGLDST	Monoklonal, Maus	Invitrogen, Karlsruhe
anti-FLAG	DYKDDDDK	Polyklonal, Kaninchen	Sigma, Taufkirchen
anti-FLAG M2	DYKDDDDK	Monoklonal, Maus	Sigma, Taufkirchen
anti-GFP	rekombinantes GFP	Monoklonal, Maus (Mix von Klon 7.1 und 13.1)	Roche, Mannheim
anti-SOAT <sub>2-17</sub>	RANCSSSSACPANSSE	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec, Seraing, Belgien (custom antibody)
anti-SOAT <sub>349-364</sub>	EEGAIPTGPPGPMDC	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec, Seraing, Belgien (custom antibody)
Sekundärantikörper			
anti-Maus IgG-Alexa Fluor 488	Maus IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	MoBiTec, Göttingen Invitrogen, Karlsruhe
anti-Kaninchen IgG- FITC	Kaninchen IgG (H)	Monoklonal, Maus	Sigma, Taufkirchen
anti-Kaninchen IgG- Cy3	Kaninchen IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Dianova, Hamburg
ECL anti-Maus HRP- gekoppelt	Maus IgG	Schaf	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Fluoreszenzfarbstoff			
DAPI	Färbung von Zellkernen		Roche Diagnostics, Mannheim

## 2.10 Chemische Substanzen

### 2.10.1 Reagenzien

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Amersham Amplify	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA Fraktion V	Roche, Mannheim
BSA, Cohn Fraktion V	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Calciumnitrat Tetrahydrat, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Casein enzymatic hydrolysate, NZ-amine A	Sigma, Steinheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cholinchlorid	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
DABCO, 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan	Roth, Karlsruhe
DAPI, 4', 6'-Diamidino-2'-Phenylindol Dihydrochlorid	Roche, Mannheim
DEPC, Diethylpyrocarbonat	Roth, Karlsruhe
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
D-MEM	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
DMSO	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's modified eagle's medium (ohne Methionin und Cystein)	Sigma, Steinheim
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure- $\text{Na}_2$	Roth, Karlsruhe
EGTA, Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)- tetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (> 99,8 %), EtOH abs.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethyl-3-Aminobenzoat (Tricain, MS-222)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
F-12 Nutrient Mixture (HAM) + Glutamin	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
FKS, fetales Kälberserum	Sigma, Taufkirchen
Folin & Ciocalteu's phenol Reagenz	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	Roth, Karlsruhe
Gentamicin	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Fluka, Steinheim
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Immersion liquid Typ N (Öl für Mikroskopie)	Leica, Wetzlar
IPTG, Isopropylthiogalactosid	Roth, Karlsruhe

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck, Darmstadt
Kaliumaspartat	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid, $\text{KCl}$	Merck, Darmstadt
Kaliumgluconat	Fluka, Buchs
Kaliumhydroxid, $\text{KOH}$	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Steinheim
Kaninchenserum	DAKO Cytomation, Hamburg
Kollagenase Typ D	Roche Diagnostics, Mannheim
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Lämmli Puffer (2 x Konzentrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
Lithiumchlorid, $\text{LiCl}$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
MEM Non Essential Amino acids (NEAA)	PAA, Cölbe
Membrane blocking agent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl für Molekularbiologie	Sigma, Steinheim
Molekularbiologisches Wasser	Roth, Karlsruhe
MOPS, 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid	Sigma, Steinheim
Mowiol	Calbiochem, Darmstadt
N,N-Dimethyl-Formamide (DMF)	Sigma, Steinheim
Natriumacetat Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, $\text{NaCl}$	Roth, Karlsruhe
Natriumgluconat	Fluka, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat, $\text{NaHCO}_3$	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, $\text{NaOH}$	Roth, Karlsruhe
N-Methyl-D-glucamine	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	NEB, Ipswich, MA, USA
Paraformaldehyd, PFA	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin/Streptomycin (10000 Units/ml; 10000 $\mu\text{g/ml}$ )	Roth, Karlsruhe
Phenolrot	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
Poly-D-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S Solution	Sigma, Taufkirchen
ProLong Gold	Sigma, Steinheim
Protease Inhibitor Cocktail	Invitrogen, Karlsruhe
Protein A Sepharose	Sigma, Taufkirchen
ProteoJet Mammalian Lysis Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti-Histokitt	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Roti-Load RNA 1,3 x Ladepuffer	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol/Chloroform Lösung	Roth, Karlsruhe
Rotiszint 22 eco Szintillatoröl	Roth, Karlsruhe
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure, $\text{HCl}$	Roth, Karlsruhe

Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Stickstoff, flüssig, N <sub>2</sub>	Messer, Griesheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Trinatriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Fluka, Seelze
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Tryptone Peptone	Roth, Karlsruhe
Tween 20, Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat	Serva, Heidelberg
Versene	Gibco, Karlsruhe
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Xylen Cyanol FF	Sigma, Steinheim
Ziegenserum	DAKO Cytomation, Hamburg
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

### 2.10.2 Feinchemikalien

1-(omega-Sulfooxyethyl)pyren, 1omega-SEP	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
2-Sulfooxymethylfurfural	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
2-Sulfooxymethylpyren, 2-SMP	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
4-Methylumbelliferylsulfat	Sigma, Steinheim
4-Sulfooxymethylpyren, 4-SMP	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
BSP, Bromosulfophthalein	Sigma, Steinheim
Chenodeoxycholat	Sigma, Steinheim
Cholat	Serva, Heidelberg
Dehydrocholat	Sigma, Steinheim
Dehydroepiandrosterone, DHEA	Sigma, Steinheim
Dehydroepiandrosteron-3-sulfat, DHEAS	Sigma, Steinheim
Deoxycholat	Sigma, Steinheim
Digoxin	Roth, Karlsruhe
Estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronid	Sigma, Steinheim
Estradiol-3,17-disulfat	Sigma, Steinheim
Estron-3-sulfat, E <sub>1</sub> S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Estron-3 $\beta$ -D-glucuronid	Sigma, Steinheim
Estron	Sigma, Steinheim
Ethylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
Glycochenodeoxycholat	Sigma, Steinheim
Glycocholat	Sigma, Steinheim
Glycodeoxycholat	Sigma, Steinheim
Glycolithocholat	Calbiochem, La Jolla
Glycolithocholat-3-sulfat	Sigma, Steinheim
Hydroquinonsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
Hyochoolat, Muricholat	Sigma, Steinheim
Hyodeoxycholat, Murideoxycholat	Sigma, Steinheim
Indoxylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
Lithocholat	Sigma, Steinheim
Lithocholat-3-sulfat	Sigma, Steinheim
Ouabain	Sigma, Steinheim
Phenylethylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam

Phenylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
Pregnenolon-3-sulfat, PREGS	Sigma-RBI, Steinheim
Propylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
Taurochenodeoxycholol	Sigma, Steinheim
Taurocholol	Sigma, Steinheim
Taurodeoxycholol	Sigma, Steinheim
Taurolithocholol	Calbiochem, La Jolla
Taurolithocholol-3-sulfat, TLCS	Sigma, Steinheim
Tauroursodeoxycholol	Sigma, Steinheim
$\alpha$ -Naphthylamin	Sigma, Steinheim
$\alpha$ -Naphthylisothiocyanat	Sigma, Steinheim
$\alpha$ -Naphthylphosphat	Sigma, Steinheim
$\alpha$ -Naphthylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam

### 2.10.3 Radioaktiv-markierte Substanzen

Substanz	Spezifische Aktivität (Ci/mmol)*	Konzentration ( $\mu$ M)	fmol/dpm
[ <sup>3</sup> H]Deoxycholol <sup>a</sup>	20,0	25	0,0227275
[ <sup>3</sup> H]DHEA <sup>b</sup>	54,0	18,5	0,0084175
[ <sup>3</sup> H]DHEAS <sup>b</sup>	60,0	16,7	0,0075758
[ <sup>3</sup> H]Digoxin <sup>b</sup>	23,5	42,5	0,0193425
[ <sup>3</sup> H]Estron <sup>b</sup>	75,5	13,2	0,0060205
[ <sup>3</sup> H]Estron-3-sulfat <sup>b</sup>	57,3	17,5	0,0079328
[ <sup>3</sup> H]Estron-3 $\beta$ -D-glucuronid <sup>c</sup>	10,3	48,5	0,0441310
[ <sup>3</sup> H]Estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronid <sup>b</sup>	44,0	22,7	0,0103306
[ <sup>3</sup> H]Lithocholol <sup>a</sup>	50,0	10,0	0,0090910
[ <sup>3</sup> H]Ouabain <sup>b</sup>	22,5	44,4	0,0202020
[ <sup>3</sup> H]Pregnenolon-3-sulfat <sup>a</sup>	20,0	50,0	0,0227275
[ <sup>3</sup> H]Taurolithocholol-3-sulfat <sup>d</sup>	24,1	1,20	0,0188609
	(0,029 mCi/ml)		
[ <sup>3</sup> H]Taurocholol <sup>b</sup>	3,5	285,7	0,1298714
[ <sup>14</sup> C]Cholol <sup>a</sup>	55 mCi/mmol (0,1 mCi/ml)	1818,2	8,2645
[ <sup>14</sup> C]Chenodeoxycholol <sup>a</sup>	51,3 mCi/mmol	1949,3	8,8606
L-S[ <sup>35</sup> S] <i>in vitro</i> cell labeling mix <sup>e</sup>	>1000 ( $\approx$ 14 mCi/ml)		

\*Soweit nicht anders angegeben, beträgt die Konzentration 1 mCi/ml.

Hersteller: <sup>a</sup>ARC, St. Louis, MO, USA; <sup>b</sup>PerkinElmer, Boston, MA, USA; <sup>c</sup>zur Verfügung gestellt durch Dr. B. Ugele, I. Frauenklinik München <sup>d</sup>Sanofi-Aventis, Frankfurt (zur Verfügung gestellt durch Prof. Kramer); <sup>e</sup>Amersham, Buckinghamshire, UK.

## 2.11 Geräte

7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysewaagen:	
AE 260 Delta Range	Mettler-Toledo, Gießen
C-30 Microbalance	Cahn Instruments, Cerritos, CA, USA
Precisa 3000C-6000D	DAK-Oerlikon, Zürich
Autoklav Sanoclav	Wolf, Geislingen
Autoklav Systec 3150 EL	Systec, Wettenberg
Benchmark Microplate Reader	Bio-Rad, München
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA
Divac 2.4L Vakuumpumpe	Leybold, Köln
Electrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Elektrophorese-Kammern	Werkstatt MZI, Gießen
14,5 x 6,5 cm	
35,5 x 11,0 cm	
Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1409	Pharmacia, Freiburg
Fluoreszenz Mikroskop DM5500B	Leica, Wetzlar
Software LAS AF 6000 mit 3D Deconvolution	
S/W Kamera DFC340FX	
Filter A4 UV	
(Ex: BP 360/40, BS: 400, Em: BP 470/40)	
Filter L5	
(Ex: BP 480/40, BS: 505, Em: BP 527/30)	
Filter Y3	
(Ex: BP 545/30, BS: 565, Em: 610/75)	
Objektiv N PLAN 5x/0.12	
Objektiv HCX PL FL 10x/0.25 PH1	
Objektiv HC PLAN APO 20x/0.70	
Objektiv HCX PL APO 40x/0.85 CORR, 0.11-0.23	
Fluoreszenz Mikroskop DM6000B	Leica, Wetzlar
S/W Kamera DFC350FX	
Software FW4000 V1.2 Fluorescence Workstation mit Deblur V2.3.2 Deconvolution und 3D-Reconstruction	
G24 Environmental Incubator shaker	New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA
Gelschlitten	Werkstatt MZI, Gießen
12 x 18 cm	
7,5 x 5 cm	
HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Image Master	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Kryo-Thermostat WK5	Colora Meßtechnik, Lorch/Württ.
Laminar Flow, Clean Air, Typ DLF-REL 6	Heraeus, Hanau

Laminar Flow, DanLAF VFR 1806	Claus Damm, Fredensborg DK
Laminar Flow, NU-437-500-E	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Mikroinjektor Nanoliter 2000	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Mikromanipulator	Bachofer, Reutlingen
Mikroskop Fluovert	Leica, Wetzlar
Mikroskop M3Z	Wild, Heerbrugg
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Operationsbesteck	diverse
PerfectBlue 'Semi Dry'-Blotter Sedec M 20 cm x 20 cm	PeqLab, Erlangen
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin L, 20 cm x 20 cm	PeqLab, Erlangen
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S, 10 cm x 10 cm	PeqLab, Erlangen
Perkin-Elmer Gene Amp Cycler Typ 2400	PerkinElmer, Weiterstadt
Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)	Werkstatt MZI, Gießen
Taumler Heidolph Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermocycler Primus 96 advanced gradient	PeqLab, Erlangen
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vortex VF 2	Janke und Kunkel, Staufen
Wärmeplatte	LKB, Bromma, Schweden
Wärmeschrank	Melag, Berlin
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasserbad SW21	Julabo, Seelbach
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge 5471	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Sorvall Kühlzentrifuge RC5C mit Rotor HB4	Du Pont, Bad Homburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Vakuumbzentrifuge Speed Vac SC 110	Savant, Farmingdale, USA

## 2.12 Verbrauchsmaterial

12,5 cm <sup>2</sup> Kulturschalen	Becton Dickinson Falcon, Le Pont De Caix, France
12-well Platten	greiner bio one, Frickenhausen
24-well Platten	greiner bio one, Frickenhausen
25 cm <sup>2</sup> Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
6-well Platten	greiner bio one, Frickenhausen
75 cm <sup>2</sup> Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
96well ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (0,45 µm)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
CryoPure Gefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen, Ø 12 mm	Roth, Karlsruhe
Einmalhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegskalpell	megro, Wesel
Faltenfilter 5951/2, Ø 185 mm	Schleicher und Schuell, Dassel
Gel Blotting Paper	Schleicher und Schuell, Dassel
Klonierringe	Werkstatt MZI, Gießen
MicroAmp Optical 96 well Reaction plate	Applied Biosystems, Singapur

Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten Assistent	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
PCR-tubes, 0,2 ml	ABgene, Epsom, UK
Petrischalen	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
PonyVial H/I (Minivial)	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rundbodenröhrchen, 14 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Schraubdeckelgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter 0,22 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Transferpipetten/Liquipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Uvetten	Eppendorf, Hamburg
Vicryl 4.0	Ethicon GmbH, Norderstedt

## 2.13 Bioinformatische Programme und Datenbanken

<b>BLAST, NCBI</b> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>	Vergleich von Sequenzen gegen Datenbank
<b>Boxshade 3.21</b> <a href="http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html">www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html</a>	Visualisierung von Sequenzalign- ments
<b>ClustalW</b> <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html">www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html</a>	Sequenzalignments
<b>ConPred II</b> <a href="http://bioinfo.si.hirosaki-u.ac.jp/~ConPred2/">http://bioinfo.si.hirosaki-u.ac.jp/~ConPred2/</a>	Vorhersage von TMDs
<b>DNASar Version 8.0.2, Lasergene, Madison, USA</b> EditSeq MegAlign MapDraw	Bearbeiten von Sequenzen Sequenzvergleich und Alignments Ermitteln von Schnittstellen
<b>Double Digest Finder, NEB</b> <a href="http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp">www.neb.com/nebecomm/DoubleDigest Calculator.asp</a>	Ermitteln der Bedingungen für Restriktion mit zwei Enzymen
<b>DoubleDigest</b> <a href="http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html">www.fermentas.com/doubledigest/index.html</a>	Ermitteln der Bedingungen für Restriktion mit zwei Enzymen
<b>EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute</b> <a href="http://www.ebi.ac.uk/Information/sitemap.html">www.ebi.ac.uk/Information/sitemap.html</a>	Datenbankportal Europa
<b>Ensembl, EBI</b> <a href="http://www.ensembl.org">www.ensembl.org</a>	Gen Browser
<b>FinchTV (Geospiza)</b> <a href="http://www.geospiza.com/finchtv/">www.geospiza.com/finchtv/</a>	Auswertung von Sequenzspuren
<b>GraphPad Prism 4, San Diego, CA, USA</b> <a href="http://www.graphpad.com/prism/pdemo.htm">www.graphpad.com/prism/pdemo.htm</a>	Berechnung und Darstellung von Kinetiken, Graphiken, statistische Auswertung
<b>HMMTOP 2.0</b> <a href="http://enzim.hu/hmmtop/">enzim.hu/hmmtop/</a>	Vorhersage von TMDs

<b>HUGO Gene Nomenclature Committee</b> <a href="http://www.genenames.org/">http://www.genenames.org/</a>	Nomenklatur humaner Gene
<b>NCBI</b> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Datenbankportal des National Center for Biotechnology Information, USA (Literaturrecherche, Sequenzsuche)
<b>NetNGlyc 1.0 Server</b> <a href="http://cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/">cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/</a>	Ermittlung von N-Glykosylierungsstellen
<b>NetPhos 2.0 Server</b> <a href="http://cbs.dtu.dk/services/NetPhos/">cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</a>	Ermittlung von Phosphorylierungsstellen
<b>MEMSAT</b> <a href="http://saier-144-37.ucsd.edu/memsat.html">http://saier-144-37.ucsd.edu/memsat.html</a>	Vorhersage von TMDs
<b>MEMSAT3</b> <a href="http://www.psipred.net/psiform.html">www.psipred.net/psiform.html</a>	Vorhersage von TMDs
<b>Oligo 4.0</b> (Wojciech Rychlik, Oslo, Norwegen)	Primerauswahl
<b>PolyPhen</b> <a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/</a>	Berechnung funktioneller Effekte von Aminosäureaustauschen
<b>PredictProtein</b> <a href="http://www.predictprotein.org/">www.predictprotein.org/</a>	Vorhersage von TMDs, Phosphorylierungsstellen, N-Glykosylierungsstellen
<b>PRED-TMR2</b> <a href="http://o2.biol.uoa.gr/PRED-TMR2/">http://o2.biol.uoa.gr/PRED-TMR2/</a>	Vorhersage von TMDs
<b>PSORT II</b> <a href="http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html">http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html</a>	Berechnung der Proteinlokalisierung in der Zelle
<b>SLC Tables</b> <a href="http://www.bioparadigms.org/slc/intro.asp">www.bioparadigms.org/slc/intro.asp</a>	Übersicht über alle Mitglieder der SLC10-Familie
<b>SNP Datenbank</b> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/">www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/</a>	Suche von Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)
<b>SOSUI</b> <a href="http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/">http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/</a>	Vorhersage von TMDs
<b>Spectra Viewer</b> <a href="http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/">http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/</a>	Darstellung von Anregungs- und Emissionsspektren von Fluorophoren
<b>TMAP</b> <a href="http://bioinfo4.limbo.ifm.liu.se/tmap/index.html">bioinfo4.limbo.ifm.liu.se/tmap/index.html</a>	Vorhersage von TMDs
<b>TMHMM Server v. 2.0</b> <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>	Vorhersage von TMDs
<b>TMPred</b> <a href="http://ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>	Vorhersage von TMDs
<b>TopPred</b> <a href="http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred">http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred</a>	Vorhersage von TMDs
<b>TreeView 1.6.6</b> <a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>	Darstellung von Verwandtschaftsdiagrammen

## **3      METHODEN**

### **3.1    Allgemeine molekularbiologische Methoden**

Im Folgenden werden grundlegende molekularbiologische Methoden erläutert, welche in dieser Arbeit Anwendung fanden.

#### **3.1.1   Phenol/Chloroform-Extraktion proteinhaltiger Lösungen**

Die Aufreinigung von DNA oder RNA aus proteinhaltigen Lösungen erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Extraktion. Dazu wurden die Lösungen mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und mit der gleichen Menge *Roti-Phenol/Chloroform-Lösung* (Roth) 30 Sekunden (s) durch Puls-Vortexen gemischt. Während einer 2-minütigen Zentrifugation bei 16100 g (13200 rpm) erfolgte die Auftrennung in drei Phasen: eine untere organische Phase, eine Interphase und eine obere wässrige Phase, welche die DNA/RNA enthielt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Aufreinigung nochmals wiederholt. Mit Hilfe einer DNA- oder RNA-Präzipitation konnte der wässrige Überstand aus der zweiten Extraktion aufkonzentriert werden.

#### **3.1.2   Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren**

Zu der in wässriger Lösung befindlichen DNA oder RNA wurden zunächst 1/10 Volumenteile 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und das 2,5-fache Volumen 100%iges Ethanol zugegeben, durch mehrfaches Invertieren vermischt und anschließend bei –20°C für 30 Minuten (min) (DNA) oder bei –80°C für 2 Stunden (h) (RNA) gekühlt. Die Präzipitation der DNA bzw. RNA erfolgte durch Zentrifugation bei 16100 g (13200 rpm) für 30 min. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet in 250 µl eiskaltem 70%igen Ethanol durch erneute Zentrifugation (15 min) gewaschen. Nach Abziehen des Überstandes wurde das Pellet für 5 min unter Vakuum getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer gelöst und bei –20°C gelagert.

#### **3.1.3   DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die zu messende Lösung wurde in ddH<sub>2</sub>O verdünnt, in eine Küvette überführt und im Photometer (Eppendorf) die optische Dichte bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) gemessen. Als Leerwert dienten der Lösungspuffer der DNA bzw. RNA im gleichen Verhältnis mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt wie die entsprechenden Proben.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\text{OD}_{260} \times E \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000 \mu\text{l}}$$

$E$  = Extinktionskoeffizient;  $E_{\text{DNA}} = 50 \mu\text{g}$ ;  $E_{\text{RNA}} = 40 \mu\text{g}$

Zusätzlich konnte die Reinheit der DNA bzw. RNA, durch Bestimmung der  $\text{OD}_{280}$  ermittelt werden. Der Quotient von  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  sollte für DNA zwischen 1,7 und 2,0 und für RNA über 1,8 liegen.

### 3.1.4 Native Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch native Agarose-Gelelektrophorese. Standardmäßig wurden 1%ige Agarosegele verwendet, welche eine gute Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 500-10000 bp ermöglichte. 1 g Agarose wurde durch Kochen in 100 ml 1 x TAE gelöst und nach leichtem Abkühlen das Gel gegossen. Das erhärtete Gel wurde in die mit 1 x TAE (Laufpuffer) gefüllte Elektrophoresekammer überführt und die mit 6 x Ladepuffer vermischten Proben auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung diente der Längenstandard *GeneRuler DNA Ladder Mix* (MBI Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte bei 5-10 V/cm, bis die Bromphenolblaufront 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Anschließend wurden die Gele 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gefärbt, 10 min gewässert und auf dem UV-Transilluminator fotografiert.

### 3.1.5 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Die Aufreinigung von PCR-Amplifikaten aus PCR-Ansätzen erfolgte mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Zunächst wurde der PCR-Ansatz mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf ein Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, 500  $\mu\text{l}$  *Binding Buffer* dazu pipettiert und gut gemischt. Der *High Pure Filter* wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, die Lösung auf den Filter gegeben und 60 s bei 16100 g (13200 rpm) zentrifugiert. Darauf folgten zwei Zentrifugations-Waschschritte mit 500  $\mu\text{l}$  und 200  $\mu\text{l}$  *Wash Buffer*, zwischen welchen der Durchfluss verworfen wurde. Die Elution der gebundenen PCR-Produkte aus dem Filter erfolgte mit 50  $\mu\text{l}$  *Elution Buffer* (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) durch Zentrifugation (30 s, 16100 g) in ein neues Auffanggefäß.

### 3.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das *Qiaex II Gel Extraction Kit* (Qiagen) diente zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel (siehe 3.1.4) wurde auf dem UV-Transilluminator betrachtet, die gewünschte DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein vorgewogenes 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei DNA-Fragmenten von 100-4000 bp, erfolgte die Zugabe von 300 µl Puffer QX1, für Fragmente >4000 bp zusätzlich 200 µl ddH<sub>2</sub>O, pro 100 mg Agarosegel und 10 µl resuspendierte *QIAEX II Suspension*. Das Gemisch wurde 10 min bei 50°C erhitzt und dabei alle 2 min gevortext, um die *QIAEX II* Kügelchen in Suspension zu halten. Anschließend wurden die *QIAEX II* Kügelchen durch Zentrifugation bei 16100 g (13200 rpm) für 30 s pelletiert. Nach Abziehen des Überstandes folgten drei Waschschrte: einmal mit 500 µl Puffer *QXI* und zweimal mit je 500 µl Puffer *PE*, zwischen denen jeweils zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Nach Trocknung des Pellets erfolgte die Elution der DNA in 25 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) für 5 min bei Raumtemperatur (RT). Die eluierte DNA befand sich nach der Zentrifugation im Überstand und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Überprüfung der aufgereinigten DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### 3.1.7 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Die Spaltung doppelsträngiger DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Temperatur- und Pufferangaben der Enzymhersteller. Für den Verdau von 1 µg Plasmid-DNA in einem 50 µl Reaktionsansatz wurden 5-10 Units des entsprechenden Enzyms, 5 µl des empfohlenen Puffers und, wenn notwendig, 0,5 µl BSA zugegeben und der Ansatz für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Bei dem Verdau größerer DNA-Mengen wurden die Volumina entsprechend erhöht. Die Ermittlung der optimalen Restriktionsbedingungen für den gleichzeitigen Einsatz von zwei unterschiedlichen Enzymen erfolgte mit Hilfe der Online-Programme *Double Digest Finder* (NEB) oder *DoubleDigest* (MBI Fermentas). Die geschnittene DNA wurde auf einem Agarosegel analysiert.

### 3.1.8 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab kam das *Qiaprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) zur Anwendung. Zunächst wurden mit einer Bakterienkolonie 4 ml LB-Ampicillin-Medium angeimpft und für 16 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Zum Anlegen einer haltbaren Glycerinkultur wurden 850 µl der Bakteriensuspension mit 150 µl Glycerol vermischt,

in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80°C gelagert. 2 ml der Bakteriensuspension wurden für 2 min bei 16100 g (13200 rpm) zentrifugiert und das Bakterienpellet in 250 µl Puffer *P1* vollständig resuspendiert. Anschließend folgte die zügige Zugabe von 250 µl Puffer *P2* und 350 µl Puffer *N3*, wonach jeweils das Reaktionsgefäß zum Mischen invertiert wurde. Das entstandene Präzipitat wurde durch 10-minütige Zentrifugation pelletiert und anschließend der Überstand in eine *Qiaprep* Säule überführt und für 60 s durch die Silikamembran zentrifugiert. Anschließend folgte das Waschen der Säule mit 500 µl Puffer *PB* und 750 µl Puffer *PE*, wobei nach jeder Zugabe 60 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen wurde. Die Elution der gebundenen Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µl Puffer *EB* (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) oder ddH<sub>2</sub>O durch Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß. Die DNA konnte bei -20°C gelagert werden.

### 3.1.9 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab

Aus einer Glycerinkultur (siehe 3.1.8) wurden 50-100 ml LB-Ampicillin-Medium im Verhältnis 1:1000 angeimpft und über Nacht (16 h) bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA dienen das *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen) oder das *NucleoBond Xtra Midi Kit* (Macherey-Nagel). Für beide Kits erfolgte zunächst die Pelletierung der Bakterien bei 4300 g in einem 50 ml Reaktionsgefäß. Für die Isolierung mit dem Qiagen-Kit wurde das Bakterienpellet in 4 ml Puffer *P1* resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 4 ml Puffer *P2*, Mischen durch vier- bis sechsmaliges Invertieren und eine 5-minütige Inkubation bei RT. Zu der Suspension wurden 4 ml gekühlter Puffer *P3* gegeben, vier- bis sechsmal invertiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde im Kühlraum 30 min bei 4300 g zentrifugiert, der Überstand über einen angefeuchteten Faltenfilter aufgereinigt und das Filtrat anschließend auf eine mit 4 ml Puffer *QBT* equilibrierte *Qiagen-tip 100* Säule (Kapazität ~100 µg DNA) gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 10 ml Puffer *QC* gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer *QF* in ein neues Reaktionsgefäß eluiert.

Die Isolierung mit dem *NucleoBond Xtra Midi-Kit* erfolgte mit einem optimierten Protokoll. Nach der Resuspension des Bakterienpellets in 10 ml *RES*-Puffer wurden die Bakterien durch Zugabe von 10 ml *LYS*-Puffer und anschließender 5-minütiger Inkubation bei RT lysiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Equilibrierung der *NucleoBond Xtra* Säule (Kapazität ~250 µg DNA), mit integriertem *NucleoBond Xtra Filter*, mit 12 ml *EQU*-Puffer. Zum Lysat wurden 10 ml *NEU*-Puffer zur Neutralisierung gegeben, durch zehn- bis fünfzehnmaliges Invertieren gründlich gemischt und in den angefeuchteten Filter überführt. Das geklärte Filtrat wurde direkt auf die Säule geladen. Der Filter und die Säule wurden einmal mit 5 ml *EQU*-Puffer

gewaschen und dann die Säule ohne Filter noch zweimal mit 8 ml *WASH*-Puffer. Anschließend konnte die gebundene Plasmid-DNA in 5 ml *ELU*-Puffer eluiert werden.

Zur Konzentrierung und Entsalzung der gewonnenen Plasmid-DNA folgte eine Isopropanol-Präzipitation. Hierzu wurden zu dem QF- und ELU-Eluat 3,5 ml Isopropanol (RT) gegeben, gemischt und 60 min bei 4300 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort dekantiert und das DNA-Pellet mit 2 ml 70%igem Ethanol (RT) durch 30-minütige Zentrifugation gewaschen. Der Überstand wurde abgeschüttet, die verbliebenen Ethanoltröpfchen mit einer Pipette abgesaugt und das getrocknete Pellet in 100-200 µl 10 mM Tris-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration der DNA-Lösung bestimmt.

## **3.2 Methoden zur Isolierung und Aufarbeitung von RNA**

Die RNA von Geweben und Zellen ist das Ausgangsmaterial zahlreicher Experimente in der Molekularbiologie. In dieser Arbeit erfolgte die RNA-Isolierung aus stabil transfizierten Zellen. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in die quantitative Real-Time PCR eingesetzt. Über diese Methode konnte die stabile Integration und Transkription des Zielgens in den Zellen untersucht werden.

### **3.2.1 Total-RNA Isolierung aus Zellen**

Zur Isolierung von Total-RNA aus Zellen wurden diese zunächst abtrypsiniert, ausgezählt und  $5 \times 10^6$  Zellen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml *TRI Reagent* (Sigma) und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, bis eine homogene Suspension entstand. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 0,2 ml Chloroform zugefügt, durch energisches Schütteln 15 s gemischt und eine 2- bis 15-minütige Inkubation bei RT angeschlossen. Bei der anschließenden Zentrifugation (15 min, 15000 g, 4°C) separierten sich drei Phasen: eine rote organische Phase, in welcher sich die Proteine befanden, eine Interphase mit der DNA und eine obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 0,5 ml Isopropanol zugefügt, gemischt, für 5 bis 10 min bei RT inkubiert und danach 10 min bei 15000 g (4°C) zentrifugiert. Während dieses Zentrifugationsschrittes präzipitierte die RNA als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Nach Abziehen des Überstandes wurde das RNA-Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol durch Zentrifugation bei 12000 g für 5 min bei 4°C gewaschen. Nach Trocknung des RNA-Pellets wurde die RNA durch Zugabe von 20 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration und Reinheit mittels Photometrie und denaturierender Gelelektrophorese bestimmt.

### 3.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Denaturierende Agarosegele dienten zur Überprüfung der RNA-Qualität. 1 g Agarose wurde mit 40 ml DEPC-ddH<sub>2</sub>O und 5 ml 10 x MOPS-Puffer gekocht, bis die Agarose gelöst war. Anschließend wurden 7 ml Formaldehyd zugegeben, das Gel gegossen und dieses nach Aushärtung in die mit 1 x MOPS-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. 1 µg RNA wurde mit 1,3 x Ladepuffer *Roti-Load RNA* (Roth) versetzt, bei 68°C für 10 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Längenstandard dienten 3 µl *peqGOLD High Range RTU RNA-Leiter* (Peqlab) gemischt mit 6 µl Ladepuffer *Roti-Load RNA* (Roth). Der Einlauf der Proben erfolgte bei 30 mA für 15 min mit einer anschließenden Auftrennung der RNA bei 60 mA. Nach Färbung mit Ethidiumbromid konnte das Gel unter dem UV-Transilluminator begutachtet und fotografiert werden. Reine, nicht-degradierte RNA zeigt zwei Banden, eine bei ~1800 bp (18S-rRNA) und eine bei ~5000 bp (28S-rRNA). Eine Degradation der RNA zeigte sich als Schmier auf dem angefärbten Agarosegel.

### 3.2.3 cDNA-Synthese aus Total-RNA

Die Synthese von cDNA aus Total-RNA erfolgte mit dem *Advantage RT-for-PCR Kit* (Clontech). 1 µg RNA wurden mit DEPC-ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 12,5 µl aufgefüllt, 1 µl *Oligo(dT)<sub>18</sub>* Primer hinzu pipettiert, für 2 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl 5 x *Reaction Buffer*, 1 µl *dNTP Mix*, 0,5 µl *RNase Inhibitor* und 1 µl *MLLV Reverse Transkriptase* wurde der Ansatz 1 h bei 42°C inkubiert und anschließend die cDNA-Synthese durch Erhitzen auf 94°C für 5 min gestoppt. Der Reaktionsmix wurde mit 80 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O verdünnt und in Aliquots bei -20°C gelagert. 5-10 µl der synthetisierten cDNA wurden in die PCR eingesetzt.

### 3.2.4 cDNA-Synthese aus Zelllysaten

Das *TaqMan Gene Expression Cells-to-CT-Kit* (Ambion) ermöglichte die Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR ohne eine separate Isolierung oder Aufreinigung von RNA aus Zellen. Diese Methode wurde zur Überprüfung der stabil transfizierten NTCP-FLAG- und ASBT-FLAG-HEK293 Zellen genutzt. Die genannten Zellen sowie Flp-In T-REx 293 Zellen wurden in einer 96-well Schale mit jeweils 25000 Zellen/well ausgesät und mit Tetrazyklin induziert (siehe 3.9.2). Nach 48 h erfolgte die Lyse der mit eiskaltem PBS gewaschenen Zellen in 49,5 µl *Lysis Solution* plus 0,5 µl *DNase I* durch fünfmaliges Mischen und eine 5-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurde die 96-well Platte auf Eis ge-

stellt, 5 µl *Stop Solution* zugegeben, gemischt, für 2 min bei RT inkubiert und erneut auf Eis gestellt. Pro Probe wurden 40 µl Master Mix (25 µl 2 x *RT Buffer* + 2,5 µl 20 x *RT Enzyme Mix* + 12,5 µl *Nuclease-free Water*) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, 10 µl Zelllysatz pipettiert und die Reverse Transkription für 60 min bei 37°C durchgeführt. Eine 5-minütige Inkubation bei 95°C stoppte die Reaktion. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zum Gebrauch bei -20°C. 5 µl der Reversen Transkriptase Reaktion (cDNA) wurden in der Real-Time PCR eingesetzt (siehe 3.3.5).

### 3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Methoden wurden zum Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte (Expressionsprofil, Klonierungskontrollen), zur Klonierung von Nukleinsäuren und zum Einfügen von Mutationen und Insertionen angewendet. Im Folgenden werden die einzelnen Techniken näher erläutert.

#### 3.3.1 Allgemeine Regeln zur Primerauswahl

Die Auswahl der Primer erfolgte mit Hilfe des Programms *Oligo 4.0*. Dabei wurden, soweit möglich, folgende generelle Rahmenbedingungen eingehalten:

- Die Primer trugen an ihrem 3'-Ende ein AC, AG, TC oder TG.
- Der (G+C)-Gehalt der Primer lag zwischen 50-60 %.
- Um Dimerbildungen zu vermeiden, waren insbesondere die 3'-Enden der Primer nicht untereinander und nicht mit sich selbst komplementär.
- Um Sekundärstrukturen im Primer zu vermeiden war  $\Delta G$  für eine Loopbildung  $>0$ .
- Die Schmelztemperatur  $T_m$  wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$T_m = 69,3 + 41 \times \frac{(\text{Anzahl G} + \text{Anzahl C})}{\text{Primerlänge}} - \frac{650}{\text{Primerlänge}}$$

Die Synthese der Primer wurde von der Firma *MWG-Biotech* (Ebersberg) durchgeführt.

#### Besonderheiten bei der Auswahl von Klonierungsprimern

Grundlage für die Auswahl der Klonierungsprimer war die mRNA-Sequenz der zu klonierenden Transporter. Der Vorwärts-Primer umfasste das Startcodon und der Rückwärts-Primer das Stoppcodon. Im 5'-nichttranslatierten Bereich des Vorwärts-Primers (F), wie auch im 3'-untranslatierten Bereich des Rückwärts-Primers (R), wurden die Basen so geändert, dass

die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym resultierte. Dabei wurden auch Fehlpaarungen zugelassen. Weiterhin wurden die notwendige Anzahl an Basenpaaren beachtet, die am Ende des DNA-Fragmentes notwendig waren, um ein Schneiden des Enzyms zu gewährleisten (1 Base bei *EcoRV*; 2 Basen bei *XbaI* und *KpnI*; 4 Basen bei *SacII*; 7 Basen bei *NotI*). Die Berechnung der Schmelztemperaturen  $T_m$  dieser Primer erfolgte nach folgender Formel:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times \%GC - \frac{675}{\text{Primerlänge}} - \% \text{ Fehlpaarungen}$$

Das resultierende PCR-Produkt umspannte dabei den kompletten Leserahmen und enthielt am 5'- und 3'-Ende eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym.

### Besonderheiten bei der Auswahl von Primern für Expressionsprofile

Die Primer für Expressionsprofile wurden in einer Länge von 20-25 Basen ausgewählt und umfassten einen Amplifikationsbereich zwischen 300-1000 bp. Die Schmelztemperatur  $T_m$  beider Primer lag nicht mehr als 2°C auseinander. Mit einer BLAST-Analyse wurde die Sequenzspezifität der gewählten Primer überprüft.

### 3.3.2 PCR-Reaktionsansatz

Je nach PCR-Anwendung kamen verschiedene Polymerasen zum Einsatz. Klonierungsexperimente benötigten eine hohe Lesegenauigkeit der Polymerase. Dementsprechend wurde das *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) ausgewählt, welches eine 3'→5' Exonukleaseaktivität aufweist. In PCR-Reaktionen, bei denen eine hohe Ausbeute gewünscht war (z.B. Klonierungskontrollen, RT-PCR), wurden die *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (Applied Biosystems), *YieldAce DNA Polymerase* (Stratagene) und die *ThermoPrime Plus DNA Polymerase* (ABGene) verwendet. Für jede Polymerase wurde ein speziell optimiertes Puffersystem eingesetzt. Die Reaktionsansätze für eine Probe setzten sich wie folgt zusammen:

	Expand High Fidelity	AmpliTaq Gold	YieldAce	ThermoPrime Plus
Enzym	0,75 µl	0,25 µl	0,5 µl	0,5 µl
10 x Puffer	10 µl	5 µl	5 µl	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	-	3 µl	-	6 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
DNA (cDNA, Plasmid-DNA)	5-10 µl	5-10 µl	5-10 µl	5-10 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 100 µl	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 100 µl

Bei größeren Versuchsansätzen wurde aus den oben genannten Reagenzien ein Master Mix vorbereitet und zu jeder DNA-Probe gegeben. Die Amplifikation erfolgte von 5-10 µl cDNA oder Plasmid-DNA (50 ng). Die Proben wurden gemischt, herunter zentrifugiert und in einem *Perkin-Elmer Gene Amp Cycler Typ 2400* (PerkinElmer) oder *Thermocycler Primus 96 advanced gradient* (PeqLab) inkubiert.

### 3.3.3 Touchdown-PCR

Die Touchdown-PCR diente als Grundlage für viele PCR-Protokolle wie die Klonierungs-PCR oder RT-PCR. Sie hat den Vorteil, dass bei hohen Anlagerungstemperaturen in den ersten Zyklen eine hohe Spezifität gewährleistet ist und anschließend bei niedrigeren Anlagerungstemperaturen eine hohe Ausbeute erzielt wird.

Denaturierung	94°C	2 min	} 10 Zyklen
Denaturierung	94°C	15 s	
Primer-Anlagerung	$T_m - 2^\circ\text{C}$ (-0,5°C/Zyklus)	30 s	
Primer-Verlängerung	72°C	1 min/kb	
Denaturierung	94°C	15 s	} 20-30 Zyklen
Primer-Anlagerung	$T_m - 7^\circ\text{C}$	30 s	
Primer-Verlängerung	72°C	1 min/kb (+5 s/Zyklus)	
Kühlung	4°C	∞	

Die Anlagerungstemperatur der ersten 10 Zyklen wurde relativ nahe am  $T_m$ -Wert der Primer gewählt ( $T_m - 2^\circ\text{C}$ ), wobei sich pro Zyklus die Temperatur um  $0,5^\circ\text{C}$  reduzierte. Nach 10 Zyklen war eine Anlagerungstemperatur von  $T_m - 7^\circ\text{C}$  erreicht, bei welcher die folgenden 20-30 Zyklen fortgesetzt wurden.

### 3.3.4 Zielgerichtete Mutagenese

Zum Einfügen von Mutationen, Insertionen oder Deletionen in DNA-Sequenzen wurde das *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) verwendet (Abb. 3.1). Diese Methode ermöglichte die Insertion des FLAG-Motivs an die C-terminalen Enden von SOAT, ASBT und NTCP. Der Auswahl der Primer lagen einige Besonderheiten zu Grunde:

- Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthielten die gewünschte Mutation in der Mitte der Sequenz mit 10-15 Basen korrekter Sequenz zu beiden Seiten der Mutation.
- Vorwärts- und Rückwärts-Primer waren komplementär.

- Die Länge der Primer lag zwischen 25 bis 45 Basen.
- Die Schmelztemperatur  $T_m$  sollte  $\geq 78^\circ\text{C}$  sein.
- Der Berechnung der  $T_m$ -Werte für Insertionsmutationen erfolgte nach folgender Formel:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times \%GC - \frac{675}{\text{Primerlänge (ohne Insertion/Deletion)}}$$

- Die Berechnung der  $T_m$ -Werte für Basenaustausche erfolgte nach folgender Formel:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times \%GC - \frac{675}{\text{Primerlänge}} - \% \text{ Fehlpaarungen}$$

- Der (G+C)-Gehalt war  $\geq 40\%$ .
- Die Primer sollten mit einem oder mehreren C- oder G-Nukleotiden enden.

Die Mutagenesereaktion erfolgte, indem 10  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA [5 ng/ $\mu\text{l}$ ], je 2,5  $\mu\text{l}$  Mutageneseprimer F und R [50 ng/ $\mu\text{l}$ ], 5  $\mu\text{l}$  10 x *Reaktionspuffer*, 1  $\mu\text{l}$  *dNTP-Mix*, 29  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O und 1  $\mu\text{l}$  *PfuTurbo* DNA-Polymerase zusammen pipettiert und im Thermocycler nach folgendem Programm inkubiert wurden:

Denaturierung	95°C	30 s	} 18 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 s	
Primer-Anlagerung	55°C	1 min	
Primer-Verlängerung	68°C	1 min/kb Plasmid	
Kühlung	4°C	$\infty$	

Nach der Reaktion wurde zu dem PCR-Ansatz 1  $\mu\text{l}$  *DpnI* gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Dies führte zum Verdau der noch vorhandenen methylierten und nicht-mutierten Ausgangsplasmide. Zur Transformation der mutierten Plasmide wurden 50  $\mu\text{l}$  *XLI-Blue super-competent cells* (Stratagene) in ein vorgekühltes 14 ml BD Falcon Tube überführt, 1  $\mu\text{l}$  des *DpnI*-Verdau dazu gegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Hitzeschock-Transformation erfolgte bei 42°C für 45 s und einer anschließenden Abkühlung des Ansatzes für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  NZY<sup>+</sup>-Medium (42°C) wurde für 1 h bei 37°C und 225 rpm geschüttelt, anschließend der Ansatz auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und die Platten über Nacht (16 h) bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden zum Animpfen einer LB-Ampicillin-Kultur zur Plasmid-DNA Isolierung verwendet.

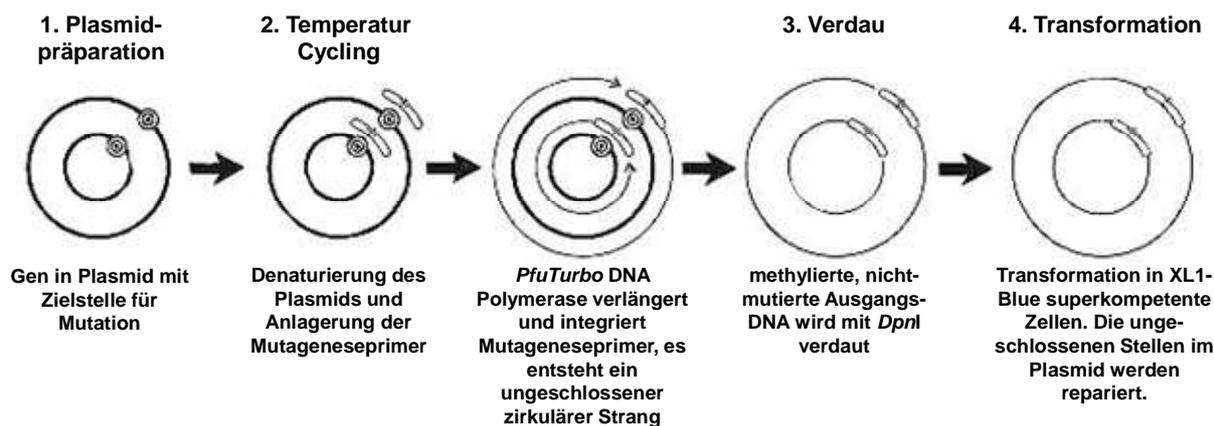


Abb. 3.1: Überblick über die Funktionsweise der *QuikChange Site-directed Mutagenesis Methode*.

(Quelle: Manual QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene).

### 3.3.5 Quantitative Real-Time PCR

Die Überprüfung der stabilen Transfektion erfolgte mittels quantitativer PCR unter Verwendung des folgenden Reaktionsmixes in einer 96-well Platte:

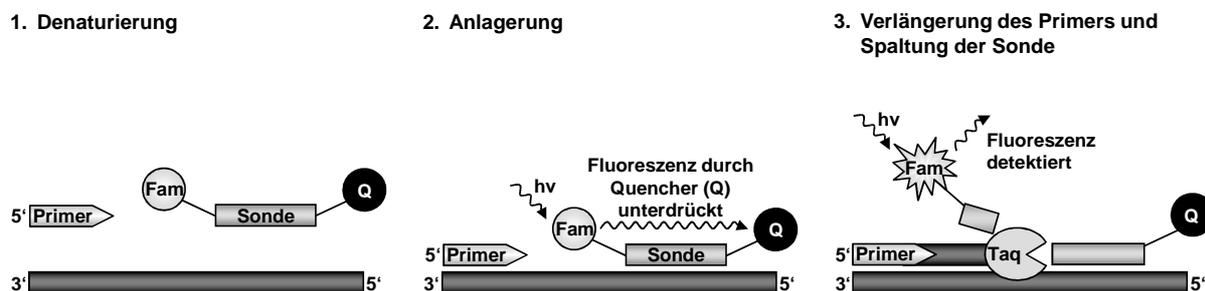
ddH <sub>2</sub> O	6,25 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5 µl
TaqMan Gene Expression Assay	1,25 µl
cDNA	5 µl

Die eingesetzte cDNA stammte aus der Synthese mit dem *Cells-to-C<sub>T</sub> Kit* (Ambion) (siehe 3.2.4) für die NTCP-FLAG-HEK293 und ASBT-FLAG-HEK293 Zellen bzw. der cDNA-Synthese mit dem *Advantage RT-for-PCR Kit* (Roche) (siehe 3.2.3) für die SOAT-HEK293 Zellen. Als endogene Kontrolle diente GAPDH. Die 96-well Platte wurde verschlossen, zentrifugiert und die PCR-Reaktion im ABI PRISM 7300 nach folgendem Schema durchgeführt (siehe auch Abb. 3.2):

Denaturierung	95°C	10 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	95°C	15 s	
Primer-Anlagerung	60°C	1 min	
Kühlung	4°C	∞	

Die relative Expression wurde nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode bestimmt. Der  $\Delta C_T$ -Wert der Transporter-Expression wurde bestimmt, indem der *signal threshold cycle* ( $C_T$ ) der endogenen Kontrolle GAPDH von dem  $C_T$ -Wert des Transporters subtrahiert wurde. Der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert wurde errechnet, indem der  $\Delta C_T$ -Wert der Flp-In Zellen von den  $\Delta C_T$ -Werten der stabil transfizierten Zellen abgezogen wurde. Anschließend erfolgte die Transformation nach der Formel

$2^{-\Delta\Delta CT}$ . Dieser Wert gibt die n-fache Expression des Transporters im Vergleich zu den Flp-In T-REx 293 Zellen an, welche die Ausgangszellen der stabilen Transfektion waren.



**Abb. 3.2: Prinzip der quantitativen Real-Time PCR mit dem TaqMan System.**

Während der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang getrennt. Anschließend lagern sich Primer und Sonde an die Zielsequenz an. Die Fluoreszenz des Farbstoffes *Fam* an der Sonde wird durch die räumliche Nähe zum Quencher (Q) unterdrückt. Während der Verlängerung des Primers gelangt die Taq-Polymerase an das 5'-Ende der angelagerten Sonde. Durch ihre 5'→3' Exonukleaseaktivität baut sie die Sonde ab und der Farbstoff *Fam* kann sich vom Quencher entfernen. Nach Anregung von *Fam* kann das Fluoreszenzsignal detektiert werden.

### 3.4 DNA-Klonierung

Als DNA-Klonierung bezeichnet man die Integration von DNA in einen Vektor (Plasmid) und deren Einbringung in eine Bakterienzelle. Über Antibiotika-Resistenzen werden die Bakterien selektioniert, welche die Fremd-DNA aufgenommen haben. Diese Bakterien können in hoher Zahl vermehrt und die Plasmide daraus isoliert werden.

#### 3.4.1 Klonierung über Ligation

Zunächst wurden mit Hilfe der Klonierungsprimer bzw. Subklonierungsprimer PCR-Amplifikate erstellt, welche jeweils am 3'- und 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle besaßen. Nach Aufreinigung mit dem *PCR-Product Purification Kit* (Roche) (siehe 3.1.5) erfolgte ein Verdau der PCR-Produkte sowie des Plasmids, in welches das PCR-Produkt eingefügt werden sollte, mit den Enzymen, deren Restriktionsschnittstellen über die Primer in die PCR-Amplifikate eingefügt wurden. Nach dem Doppelverdau wurden die geschnittenen DNA-Moleküle über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe 3.1.6) und mit dem *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) ligiert. Dazu wurden das PCR-Fragment und der Vektor in einem Molekülverhältnis von 5:1 eingesetzt, mit 1 x *DNA Dilution Buffer* auf 10 µl aufgefüllt, 10 µl *Ligation Buffer* und 1 µl *T4 DNA Ligase* zugegeben, gemischt und 1 h bei RT bzw. über Nacht (16 h) bei 14°C (Thermocycler) inkubiert. 5 µl des Ligationsansatzes wurden für die Transformation eingesetzt oder der Ansatz bei -20°C gelagert.

### 3.4.2 TOPO-Klonierung

Zum Einbringen von DNA in die Epitop-markierten Expressionsvektoren (TOPO-TA Klonierung) wurde zunächst mit Hilfe der *Expand High Fidelity* (Roche) ein PCR-Produkt mit 3'-A-Überhang amplifiziert. Es folgte das Mischen von 4  $\mu$ l dieses PCR-Produkts mit 1  $\mu$ l *Salt Solution* (Invitrogen) und 1  $\mu$ l TOPO-Vektor (pcDNA5/FRT/TO-TOPO, pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO oder pcDNA6.2/C-EmGFP-TOPO) (Invitrogen) und eine 5-minütige Inkubation bei RT mit anschließender Abkühlung auf Eis. Die linearisierten TOPO-Vektoren enthalten einen 3'-T-Überhang und eine kovalent gebundene Topoisomerase I. Während der Inkubationszeit findet die Ligation von Vektor und PCR-Produkt über die komplementären Enden statt, wobei die Topoisomerase abgespalten wird. Für die Transformation wurden 2  $\mu$ l der TOPO-Klonierungsreaktion eingesetzt oder der Ansatz bei -20°C aufbewahrt.

### 3.4.3 Transformation

Das Einbringen der rekombinierten Plasmide in die Wirtszelle erfolgte durch Hitzeschock-Transformation. Hierzu wurde ein Aliquot der kompetenten *TOP10* Bakterien (Invitrogen) auf Eis aufgetaut, 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes bzw. 2  $\mu$ l des TOPO-Klonierungsansatzes zugegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde für genau 30 s bei 42°C durchgeführt und anschließend die Probe für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250  $\mu$ l *SOC-Medium* (Invitrogen) (37°C) wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C und 225 rpm im Warmluftinkubator geschüttelt und anschließend 25  $\mu$ l, 75  $\mu$ l und 200  $\mu$ l des Ansatzes auf vorgewärmten LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Das Ampicillin-Resistenzgen im transformierten Plasmid gewährleistet, dass während der Bebrütung (37°C, 16 h) nur Bakterien vermehrt wurden, die das Plasmid aufgenommen hatten. Einzelne Bakterienkolonien wurden vermehrt und die enthaltenen Plasmide über eine Minipräparation (siehe 3.1.8) aufgereinigt. Die Überprüfung der Plasmide erfolgte über Kontrollverdau und Sequenzierung.

## 3.5 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzspuren

Die Firma Genterprise Genomics (Mainz) führte die Sequenzierung der DNA durch. In einem 200  $\mu$ l PCR-Tube mit flachem Deckel wurden 170-350 ng Plasmid-DNA mit 1 pmol Primer gemischt, mit ddH<sub>2</sub>O auf 6  $\mu$ l aufgefüllt und anschließend zur Sequenzierung verschickt. Die Sequenziererergebnisse wurden per e-mail im FASTA-Format und als Chromatogramm zugesendet. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen *DNAstar* und *FinchTV*.

## 3.6 Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

Die heterologe Expression von Membrantransportern in Oozyten des südafrikanischen Kralenfrosches *Xenopus laevis* stellte eine Methode zur Funktionsuntersuchung dieser Proteine dar. Der proteinkodierende Leserahmen wurde zunächst in das modifizierte Plasmid pBlue-polyA-*XbaI* kloniert und in komplementäre RNA (cRNA) umgeschrieben, welche einer prozessierten mRNA sehr ähnlich ist. Nach Mikroinjektion der cRNA in die Froschoozyten wurde diese in das kodierte Protein translatiert und in die Oozytenmembran eingebaut. In diesen Oozyten konnte das exprimierte Protein (SOAT) auf seine Transporteigenschaften untersucht werden.

### 3.6.1 cRNA-Synthese

Zunächst erfolgte die Linearisierung von 5 µg SOAT-pBlue-polyA-*XbaI* bzw. SOAT-FLAG-pBlue-polyA-*XbaI* in einem 100 µl Ansatz mit *KpnI* wie unter 3.1.7 beschrieben. Die Schnittstelle fand sich nur einmal im Plasmid und zwar stromabwärts der PolyA-Sequenz. Da 3'-Überhänge bei der cRNA-Synthese häufig Probleme bereiten, wurden nach dem Verdau mit *KpnI*, die 3'-Überhänge aufgefüllt. Zum geschnittenen Plasmid wurden dazu 3,3 µl dNTP-Mix (MBI Fermentas) und 1 µl *Klenow-Fragment* (NEB) pipettiert, gemischt und für 15 min bei 25°C inkubiert. Die Zugabe von 2 µl 500 mM EDTA und Erhitzen auf 75°C für 20 min stoppte die Reaktion. Das geschnittene Plasmid wurde durch Phenolisieren (siehe 3.1.1) aufgereinigt und anschließend, wie unter 3.1.2 beschrieben, präzipitiert und die getrockneten DNA-Pellets schließlich in 5,5 µl TE-Puffer gelöst. Die Überprüfung der DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.4).

Mit Hilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase konnte, ausgehend von dem linearisierten Plasmid, eine cRNA synthetisiert werden. Die *T3-RNA-Polymerase* (Promega) bindet an den T3-Promotor und transkribiert den stromabwärts gelegenen Leserahmen und das PolyA-Signal, bis das Ende des linearisierten Plasmids erreicht ist („run-off“ Synthese). Die Komponenten des *Riboprobe in vitro Transcription System* (Promega) wurden wie folgt auf Eis zusammen pipettiert, gemischt, herunter zentrifugiert und 90 min bei 37°C inkubiert.

5 $\mu$ l	linearisierte Plasmid-DNA in TE-Puffer
16,25 $\mu$ l	nukleasefreies Wasser
5 $\mu$ l	DTT
Je 2,5 $\mu$ l	rATP, rCTP, rUTP
0,5 $\mu$ l	rGTP
2,5 $\mu$ l	Capping Analog
1,25 $\mu$ l	RNasin
10 $\mu$ l	Transkriptionspuffer
2 $\mu$ l	T3-Polymerase

Anschließend erfolgte die Zugabe von 1  $\mu$ l *DNase* I und eine weitere Inkubation von 15 min bei 37°C, bevor die Reaktion durch Zugabe von 75  $\mu$ l nukleasefreiem Wasser und 25  $\mu$ l TE-Puffer gestoppt wurde. Nach Phenolisieren der Probe (siehe 3.1.1), folgte die Reinigung von nicht eingebauten Ribonukleotiden und der Plasmid-DNA, indem die Probe durch eine vorbereitete *G50 Sephadex Säule* (Roche) für 4 min zentrifugiert wurde. Die Vorbereitung der Säule umfasste die Resuspension des Säulenmediums und die vollständige Entfernung des Säulenpuffers durch zweimalige Zentrifugation bei 1140 g (2400 rpm) für je 2 min. Die eluierte cRNA wurde präzipitiert (siehe 3.1.2) und in 10  $\mu$ l nukleasefreiem Wasser gelöst. 1  $\mu$ l der cRNA diente zur Konzentrationsbestimmung (siehe 3.1.3) und ein weiterer  $\mu$ l der Überprüfung auf einem Agarosegel (siehe 3.1.4). Die restliche cRNA wurde auf eine Konzentration von 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt und in 5  $\mu$ l Aliquots bei -80°C gelagert.

### 3.6.2 Oozytenentnahme und Aufbereitung der Oozyten

Die Gewinnung von Oozyten für die Mikroinjektion der cRNA erfolgte aus weiblichen *Xenopus laevis* Fröschen. Zur Narkotisierung wurden diese für 10 min in eine 0,1%ige Tricain-Lösung (MS222; Aminobenzoesäure-Ethylester, Sigma) gesetzt, bis eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war. In diesem Zustand ließen sich die Frösche ohne Gegenwehr auf den Rücken drehen. Der Frosch wurde dann mit dem Rücken auf Eis gelegt und das Operationsfeld mit feuchten Tüchern abgedeckt. Nach Eröffnung des Abdomens konnten Ovarien mit einer spitzen Pinzette aus dem Bauchraum entnommen und in eine mit OR-2-Puffer (18°C) gefüllte Petrischale überführt werden. Muskulatur und Haut wurden mit Vicryl 4.0 genäht, der operierte Frosch bis zum Wiedererwachen in ein Becherglas mit etwas Leitungswasser gesetzt und anschließend wieder in das Froschbecken gebracht.

Mit Hilfe einer Pinzette und Platinöse wurden die Oozyten aus den entnommenen Ovarien vereinzelt und die vitalen Oozyten in einem 14 ml Rundbodenröhrchen in einer Kollagenase D-Lösung 45-60 min bei 18-20°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Kollagenisierung führte zum Andauen und Ablösen der die Oozyten umgebenden Follikelhülle. Zum Stoppen der

enzymatischen Reaktion und Entfernen der Oozyentrümmer wurden die Oozyten fünfmal mit OR-2-Puffer und fünfmal mit modifizierter Barth's Lösung gewaschen und in einer Petri-schale mit modifizierter Barth's Lösung für 1 h ruhen gelassen. Anschließend erfolgte die Auswahl der Oozyten nach folgenden Kriterien: scharf getrennte Hemisphären (animaler Pol = schwarz, vegetativer Pol = weiß); fleckenlose und glatte Oberfläche; guter Turgor; Teilungsstadium 5 bis 6 ( $\varnothing$  1 bis 1,2 mm). Die Oozyten wurden bis zur cRNA-Injektion am nächsten Tag in modifizierter Barth's Lösung, versetzt mit 0,1 % Gentamicin, gelagert.

### **3.6.3 Mikroinjektion der cRNA**

Eine Glaskapillare (Eingangsöffnung 20-30  $\mu\text{m}$ ) wurde mit Mineralöl gefüllt, auf den Kolben der elektrischen Nanoliterpumpe aufgesetzt und an einem Mikromanipulator befestigt. Nach dem Spülen der Kapillare mit RNase-freiem Wasser konnten 5  $\mu\text{l}$  cRNA [0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] aufgezogen werden. Die erneut selektionierten Oozyten wurden auf ein feinmaschiges Netz gelegt, welches mit modifizierter Barth's Lösung bedeckt war. Die Injektion von 46 nl cRNA (= 4,6 ng cRNA) oder ddH<sub>2</sub>O (Negativkontrolle), erfolgte in den hellen Pol der Oozyten. Die injizierten Oozyten wurden drei Tage in modifizierter Barth's Lösung plus 0,1 % Gentamicin bei 18°C gelagert, wobei der Puffer jeden Tag gewechselt sowie beschädigte oder abgestorbene Oozyten aussortiert wurden.

### **3.6.4 Transportmessung an Oozyten**

Für die Transportmessung fanden nur vitale injizierte Oozyten Verwendung. Diese wurden in Transportpuffer (Na<sup>+</sup>-haltig oder Na<sup>+</sup>-frei) gewaschen, mit 50  $\mu\text{l}$  Transportpuffer portionsweise (10-15 Oozyten) in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zum Beginn der Transportmessung auf Eis gelagert. Die Messlösung setzte sich aus einem Anteil radioaktiv-markierter Substanz und einem Anteil unmarkierter Substanz zusammen. Die entsprechende Menge der in Ethanol gelösten radioaktiven Stammlösung wurde mit N<sub>2</sub> abgedampft, im jeweiligen Transportpuffer gelöst und die Konzentration durch Zugabe unmarkierter Substanz eingestellt. Durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Messlösung zu den Oozyten wurde die Transportmessung gestartet und die Oozyten während der Aufnahme in einem Wasserbad bei 25°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transport durch Zugabe von 1,5 ml eiskalter Stopplösung (100-facher Überschuss unmarkierter Messsubstanz in Transportpuffer) beendet. Es folgte zweimaliges Waschen der Oozyten in jeweils 4 ml Stopplösung und schließlich die Vereinzelung der Oozyten in die Minivials. Die Oozyten wurden durch Zugabe

von 500  $\mu$ l 10 % SDS lysiert (30 min, RT), mit 3 ml Szintillatoröl versetzt und nach gründlichem Mischen der Anteil an aufgenommener Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler detektiert. Unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils radioaktiv-markierter Substanz in der Messlösung und anhand substanzspezifischer Umrechnungsfaktoren konnte aus jedem Messwert die Menge der in die Oozyten aufgenommenen Substanz in fmol/Oozyte/min berechnet werden.

### **3.7 Immunfluoreszenz FLAG-markierter Proteine in Oozyten**

Zum Nachweis der Expression und Sortierung des SOAT-FLAG-Proteins in den Oozyten wurde das über Mutagenese eingefügte FLAG-Epitop mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert.

#### **3.7.1 Vorbereitung der Oozyten**

Ein Teil der für die Transportmessungen injizierten Oozyten (siehe 3.6) wurden für die Immunfluoreszenz verwendet und zunächst in eisgekühlter  $K^+$ -Aspartat-Lösung für 5 min bei 4°C inkubiert. Mit zwei feinen Pinzetten wurde die Vitellinmembran der Oozyten entfernt und die Oozyten anschließend in 2 ml Dent's Fixans bei -20°C für 4 h fixiert und permeabilisiert.

#### **3.7.2 Primäre und sekundäre Antikörperreaktion**

Die permeabilisierten und fixierten Oozyten wurden jeweils 10 min in 1 ml einer absteigenden Methanol-Reihe (90 %, 70 %, 50 %, 30 % Methanol in PBS) inkubiert und danach dreimal für 10 min in der Blockierlösung PBSAG (PBS + 2 % BSA + 4 % Goat Serum) gewaschen, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Der primäre Antikörper Maus anti-FLAG M2 (Sigma) wurde 1:1000 in PBSAG-Puffer verdünnt und die Oozyten über Nacht bei 4°C mit diesem inkubiert. Am nächsten Tag folgten elf Waschschrte in jeweils 2 ml PBS: 3 x 5 min, 3 x 15 min, 3 x 30 min und 2 x 1 h. Anschließend wurden die Oozyten mit dem sekundären Antikörper anti-Maus Alexa Fluor 488 (1:500 in PBSAG) bei RT für 2 h unter Lichtabdeckung inkubiert. Zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgten alle weiteren Schritte unter Lichtausschluss. Schließlich wurden die Oozyten 6 x 10 min und nochmals über Nacht mit jeweils 2 ml PBS gewaschen.

### 3.7.3 Einbettung der Oozyten und Schneiden der Präparate

Am nächsten Tag wurden die Oozyten in 2 ml 3,7 % Formaldehyd für 30 min nachfixiert und anschließend in einer aufsteigenden alkoholischen Reihe (30 %, 50 %, 70 % Ethanol in PBS und 100 % Ethanol) je 30 min entwässert. Es folgte eine Inkubation in 2 ml Präinfiltrationslösung und Infiltrationslösung für jeweils 2 h bei RT und danach eine Inkubation über Nacht (4°C) in frischer Infiltrationslösung. Als Gussformen zum Einbetten der Oozyten dienten 1,5 ml Reaktionsgefäße, welche mit 150 µl Polymerisationslösung gefüllt wurden. Am nächsten Morgen wurde die Infiltrationslösung sauber von den Oozyten abgezogen, durch 2 ml Polymerisationslösung ersetzt und die Oozyten in Gruppen von fünf bis sechs Stück rasch nebeneinander auf den Kunststoffkegel der vorbereiteten Gussform angeordnet. Nach dem Aushärten des Kunststoffes bei RT konnten die Reaktionsgefäße aufgeschnitten und die Kunststoffkegel entnommen werden. Die Spitze der Kegel wurde abgeschnitten, so dass die Oozyten am Rand zu sehen, aber noch nicht angeschnitten waren. Es folgte die Einbettung der Kegel mit Karosseriespachtelmasse in Einbettkassetten. Nach Aushärtung der Präparate wurden bis zur Oozyten-Grenze 10 µm dicke Schnitte und anschließend 5 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms (Institut für Veterinär-Pathologie) angefertigt. Mit einer Pinzette wurden die Schnitte auf die Oberfläche eines Wassertropfens auf einem Objektträger gegeben und mit einem Pinsel entfaltet und entspannt. Die getrockneten Präparate wurden mit *Histokitt* (Roth) eingedeckelt und an einem Fluoreszenzmikroskop (Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie) bei einer Wellenlänge von 488 nm begutachtet.

## 3.8 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der Flp-In T-REx 293 Zelllinie, der daraus hervorgegangenen stabilen Zelllinien und der GripTite 293 MSR Zellen erfolgte nach den allgemeinen Techniken sterilen Arbeitens. Die Zellen wurden standardmäßig in HEK293-Medium bzw. GripTite MSR-Medium unter 95 % Wasserdampfsättigung, 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Die Flp-In T-REx 293 Zelllinie wurde regelmäßig mit Zeocin und Blastocidin selektioniert, die stabilen Zelllinien mit Hygromycin B und Blastocidin und die GripTite 293 MSR Zellen mit Geneticin.

### 3.8.1 Passagieren und Aussäen der Zellen

Zum Erhalt der Zellkultur wurden die Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturschalen vermehrt. Bei einer Konfluenz von 80-90 % erfolgte ihre Splittung. Dazu wurde das Medium abgezogen, die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend 1 ml Trypsin-EDTA auf die Zellen

gegeben, dieses gut verteilt und für 1 min bei 37°C inkubiert. Die hohe Adhärenz der GripTite 293 MSR Zellen machten es erforderlich, die Zellen vor dem Abtrypsinieren mit 1 ml Versene für 5 min bei RT zu inkubieren. Durch Klopfen an der Kulturschale konnten die Zellen vom Untergrund abgelöst und anschließend die Trypsinierung durch Zugabe von 2 ml HEK293- bzw. GripTite MSR-Medium gestoppt werden. Das Vereinzeln noch vorhandener Zellklumpen erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension. Je nach Bedarf wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:10 in eine neue Kulturschale oder nach Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Kammer gleichmäßig in 6-, 12- oder 24-well Schalen ausgesät. Die well-Schalen wurden vor dem Aussäen für 30 min mit Polylysin inkubiert, das Polylysin abgezogen und die Zellen auf die noch feuchte Oberfläche gegeben. Dies erhöhte die Adhärenz der Flp-In T-REx 293 Zellen am Boden. Für die GripTite 293 MSR-Zellen war dies nicht notwendig.

### **3.8.2 Einfrieren der Zellen**

Nach dem Abtrypsinieren der Zellen (siehe 3.8.1) wurden 900 µl Zellsuspension in Cryovials, welche 100 µl DMSO enthielten, überführt und gut vermischt. Zum langsamen und kontrollierten Einfrieren der Zellen wurden diese in einer Styroporschachtel zunächst für 24 h bei -80°C eingefroren und anschließend zur Langzeitkonservierung in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert.

### **3.8.3 Auftauen der Zellen**

Das Auftauen der Zellen in den Cryovials erfolgte in einem Wasserbad bei 37°C. Kurz bevor die Zellen komplett aufgetaut waren, wurde die Außenseite des Cryovials mit 70%igem Ethanol dekontaminiert und die Zellen unter der Sterilwerkbank zunächst in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturschale mit 5 ml Normalmedium überführt. Nach Absetzen der Zellen am Boden (nach einigen Stunden), konnte vorsichtig das Medium gewechselt werden, um so das DMSO des Einfriermediums zu entfernen. Waren die Zellen 80-90 %, konfluent, wurden sie in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturschale passagiert.

## **3.9 Transfektion eukaryotischer Zellen**

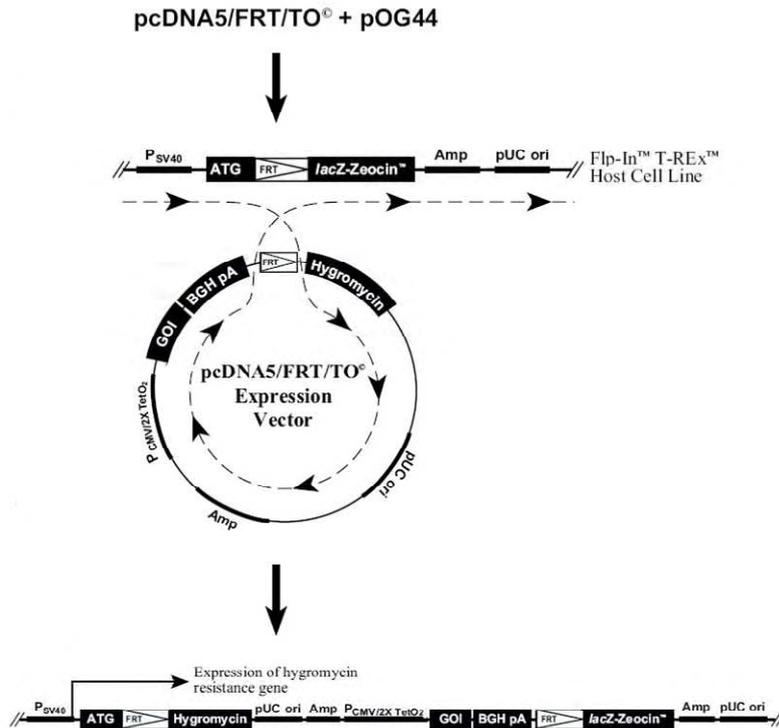
Zur funktionellen und molekularen Charakterisierung von Proteinen müssen diese zunächst exprimiert werden. Zur Expression in eukaryotischen Zellen wird durch Transfektion ein Plasmid, mit dem zu untersuchenden Gen unter Kontrolle eines Promotors, in die Zelle eingebracht. Dort wird der eingebrachte Leserahmen von der Translationsmaschinerie der Zelle

abgelesen und in ein Protein translatiert. Das kurzfristige Einbringen des Plasmids in die Zelle wird als transiente Transfektion bezeichnet. Wird das Konstrukt dagegen dauerhaft in das Genom der Wirtszelle eingebaut und so auch an die Tochterzellen weitergegeben, wird von einer stabilen Transfektion gesprochen. Diese stabilen Zelllinien eignen sich besonders für längerfristige Untersuchungen einzelner Proteine.

### 3.9.1 Stabile Transfektion

Zur Integration des zu untersuchenden Gens in das Genom einer eukaryotischen Wirtszelle wurde das Flp-In System der Firma Invitrogen angewendet (Abb. 3.3). Dieses System besteht aus speziellen Flp-In Zelllinien, welche eine stabil in das Genom integrierte *FRT site* (Flp Rekombinase Erkennungsstelle) besitzen und dazu kompatiblen Plasmiden, welche ebenfalls eine *FRT site* enthalten. Das zu untersuchende Gen (*gene of interest*, GOI) wird in das Expressionsplasmid kloniert und mit dem pOG44-Vektor in die Flp-In Zelllinie kotransfiziert. Der pOG44-Vektor kodiert für die Flp-Rekombinase, welche zwischen der *FRT site* im Genom der Zelle und der *FRT site* im Expressionsplasmid eine homologe Rekombination vermittelt. Dies führt zu einer Integration des zu untersuchenden Gens in das Genom der Wirtszelle. Parallel zum GOI wird ein Hygromycin-Resistenzgen integriert, über welches erfolgreich transfizierte Zellen selektioniert werden können.

Für die stabile Transfektion des humanen SOAT, welche im Labor von Dr. B. Ugele (München) erfolgte, wurde dessen Leserahmen zunächst aus dem pBlue-polyA-*Xba*I Plasmid in den pcDNA5/FRT/TO Expressionsvektor (Invitrogen) subkloniert (SOAT-pcDNA5/FRT/TO). Flp-In T-REx 293 Zellen wurden in eine 6-well Platte in 2 ml HEK293-Medium ohne Antibiotika ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ungefähr 50-80 % vermehrt. Für jedes zu transfizierende well wurden 3 µl des Transfektionsreagenzes *Fugene 6* (Roche) mit 97 µl HEK293-Medium ohne Antibiotika und FKS. gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe des DNA-Gemisches aus 0,4 µg SOAT-pcDNA5/FRT/TO und 1,6 µg pOG44 (Invitrogen). Nach Mischen wurde der Ansatz zur Ausbildung der DNA-Liposomen-Komplexe 30 min bei RT belassen, dann tröpfchenweise auf die Zellen gegeben, durch leichtes Schwenken verteilt und die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 500 µl Trypsin abgelöst, die Reaktion mit 1,5 ml Medium abgestoppt und je 2 x 1 ml Zellsuspension tröpfchenweise in eine Polylysin beschichtete Petri-schale mit 9 ml HEK293-Medium überführt. Nach Absetzen der Zellen erfolgte die Zugabe des Selektionsantibiotikums Hygromycin B in einer Endkonzentration von 150 µg/ml.



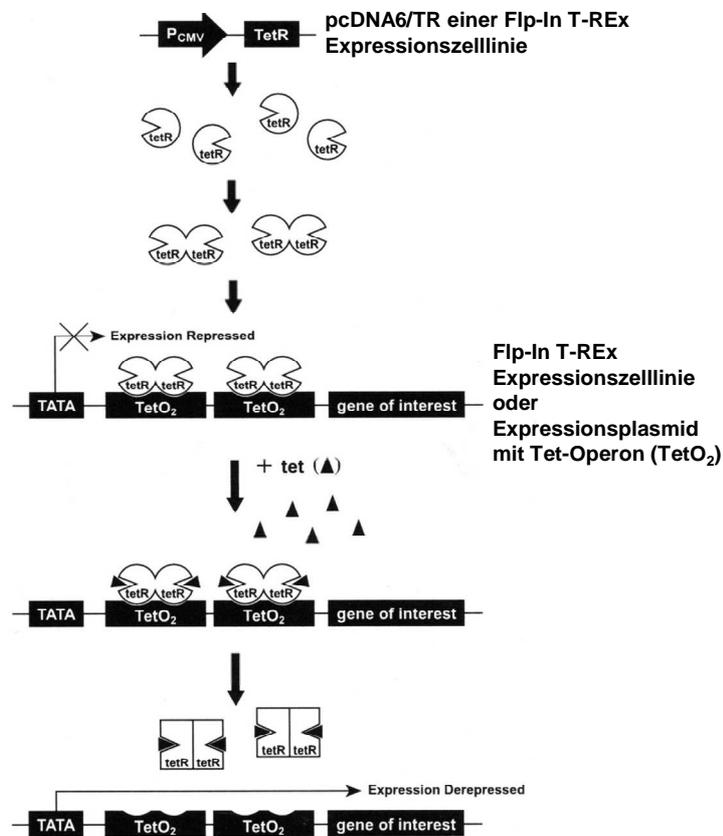
**Abb. 3.3: Schematische Darstellung der stabilen Transfektion mit dem Flp-In System.**

Die Integration des Expressionsplasmids pcDNA5/FRT/TO in das Genom der Flp-In Zellen erfolgt über Rekombination der *FRT sites*. Das katalysierende Enzym ist die Rekombinase, welche vom pOG44 kodiert, mit pcDNA5/FRT/TO kotransfiziert und anschließend in den Zellen exprimiert wird (Quelle: Manual Flp-In<sup>™</sup> T-REx<sup>™</sup> Core Kit, Invitrogen).

Die stabilen Transfektionen der ASBT-FLAG-pcDNA5/FRT/TO, NTCP-FLAG-pcDNA5/FRT/TO und SOAT-EmGFP-pcDNA5/FRT/TO Konstrukte wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Gießen) durchgeführt. Für jedes zu transfizierende well erfolgte der Einsatz von 1 µg Expressionsplasmid und 7 µg pOG44 sowie 24 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen). DNA und Transfektionsreagenz wurden mit HEK293-Medium ohne Antibiotika und FKS zu einem Endvolumen von je 50 µl gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden beide Lösungen miteinander vereinigt, gemischt, 20 min stehen gelassen und tröpfchenweise zu den 80-90 % konfluenten Zellen gegeben. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 h wurden die Zellen, wie oben beschrieben, abtrypsiniert und erneut ausgesät. Nach Zugabe des Selektionsantibiotikums starben die Zellen, bei welchen die stabile Transfektion nicht erfolgreich verlaufen war. Nach zwei bis drei Wochen waren einzelne Klone erkennbar, welche mit Hilfe von Klonierungsringen gepickt und in 24-well Schalen überführt werden konnten. Die SOAT-HEK293, SOAT-EmGFP-HEK293, NTCP-FLAG-HEK293 und ASBT-FLAG-HEK293 Zellklone wurden vermehrt und mittels qPCR, Immunfluoreszenz und Transportmessungen auf die funktionelle Expression der Proteine hin untersucht.

### 3.9.2 Tetrazyklin-regulierte Proteinexpression

Die stabile Transfektion der oben genannten Konstrukte erfolgte in die Flp-In T-REx 293 Zelllinie (Invitrogen).



**Abb. 3.4: Darstellung der Tetrazyklin-regulierten Proteinexpression in Flp-In T-REx 293 Zellen.** Der von den Flp-In T-REx 293 Zellen exprimierte Tetrazyklin-Repressor (*tetR*) bindet an die Tetrazyklin-Operator sites (*TetO<sub>2</sub>*) des Expressionsplasmids. Die Transkription des Zielgens wird dadurch verhindert. Tetrazyklin führt, nach dessen Zugabe und Bindung an den *tetR*, zur Konformationsänderung des *tetR*, worauf dieser sich vom *TetO<sub>2</sub>* löst und das Gen transkribiert wird (Quelle: Manual Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> Core Kit, Invitrogen).

Flp-In T-REx 293 Zellen haben, neben der *FRT site*, das Plasmid *pcDNA6/TR* (Invitrogen) stabil integriert, wodurch sie unter Kontrolle eines CMV-Promotors einen Tetrazyklin-Repressor (*tetR*) exprimieren (Abb. 3.4). Das durch die stabile Transfektion in die Zellen eingebaute Tetrazyklin-regulierte Expressionsplasmid *pcDNA5/FRT/TO* enthält zwischen CMV-Promotor und dem proteinkodierenden Gen zwei *Tetracycline-Operator sites* (*TetO<sub>2</sub>*). An diese lagert sich jeweils ein *tetR*-Homodimer an, wodurch die Transkription des Gens verhindert wird. Nach Zugabe von Tetrazyklin führt dessen Anlagerung an die *tetR*-Homodimere zu deren Konformationsänderung. Die *tetR*-Homodimere lösen sich vom *TetO<sub>2</sub>* und das zu untersuchende Gen kann transkribiert werden. Die Tetrazyklin-Induktion sollte mindestens 24 h vor einer funktionellen Untersuchung des rekombinanten Proteins durchgeführt werden.

Die optimale Tetrazyklin-Konzentration zur Induktion der Proteinexpression beträgt 1 µg/ml. Werden die Expressionsplasmide des T-REx-Systems in Zellen transfiziert, welche keinen tetR bilden (z.B. GripTite 293 MSR Zellen), ist keine Tetrazyklin-Induktion notwendig. Das Protein wird konstitutiv exprimiert.

### 3.9.3 Transiente Transfektion

Transiente Transfektionen wurden mit den Transfektionsreagenzien *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) oder *Rotifect* (Roth) durchgeführt. Beide Reagenzien basieren auf einer Liposomenformulierung, welche mit der DNA kondensiert und hocheffizient in die Zellen aufgenommen wird. Die transiente Transfektion erfolgte in 24-well (Transportmessung, Immunfluoreszenz) und 6-well Platten (Immunpräzipitation) bei einer Konfluenz der Zellen von 70-90 %. Folgende Mengenangaben galten für die verschiedenen Transfektionsmedien und Zellschalen:

Pro well	Lipofectamine 2000		Rotifect	
	24-well	6-well	24-well	6-well
DNA-Menge	1 µg	4 µg	1 µg	4 µg
Transfektionsreagenz	2 µl	10 µl	2,5 µl	12,5 µl
Verdünnungsvolumen für DNA und Transfektionsreagenz	50 µl	250 µl	30 µl	100 µl
Medium im well	500 µl	2 ml	250 µl	1,5 ml

Medium ohne Antibiotika und FKS diente zur Verdünnung der DNA und des Transfektionsreagenz. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die DNA/Medium-Lösung und die Transfektionsreagenz/Medium-Lösung vereinigt, für 20-30 min inkubiert und anschließend tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 4-16 h bei 37°C inkubiert, dann einmal mit PBS gewaschen und in normalem Medium weiter kultiviert. 24-48 h nach der Transfektion erfolgte die Untersuchung der transient transfizierten Zellen.

### 3.10 Transportmessung an eukaryotischen Zellen

Aufnahmemessungen erfolgten an stabil transfizierten oder auch an transient transfizierten Zellen. Für Transportmessungen an transient transfizierten Zellen wurden GripTite 293 MSR Zellen verwendet, welche nach transienter Transfektion eine höhere Adhärenz im Vergleich zu transient transfizierten Flp-In T-REx 293 Zellen aufwiesen. Mindestens 24 h vor der Messung wurden Zellen, deren Proteinexpression induzierbar war, mit Tetrazyklin behandelt (siehe 3.9.2). Als Negativkontrollen dienten Flp-In T-REx 293 oder mit Leervektor transient

transfizierte Zellen.

### **3.10.1 Ansetzen der Messlösung und Vorbereitung der Zellen**

Die Messlösung setzte sich aus einem Anteil radioaktiv-markierter und einem Anteil unmarkierter Substanz zusammen. Die entsprechende Menge radioaktiver Stammlösung wurde mit N<sub>2</sub> abgedampft, in Transportpuffer bei 37°C gelöst und die Konzentration der Messlösung mit in DMSO gelöster unmarkierter Substanz eingestellt. Da DMSO in hohen Mengen zelltoxisch ist wurde darauf geachtet, dass die Endkonzentration an DMSO weniger als 0,5 % betrug. Für Messungen in verschiedenen Transportpuffern (z.B. Na<sup>+</sup>-haltig, Na<sup>+</sup>-frei), wurde eine entsprechend höher konzentrierte Lösung angesetzt, welche in die verschiedenen Puffer aufgeteilt wurde. Zum leichteren Umgang mit den Zellplatten und für zeitgenaues Pipettieren der Messlösungen bzw. Stoppen der Messungen erfolgte, je nach Zeitschema des Versuches, eine Teilung der Platten mit Hilfe eines heißen Drahts in Cluster bzw. Einzelwells.

### **3.10.2 Aufnahmemessung**

Vor dem Beginn der Transportmessung wurde zunächst das Medium von den Zellen abgezogen, die Zellen dreimal mit PBS (37°C) gewaschen und für ca. 15 min in 1 ml des jeweiligen Transportpuffers (z.B. Na<sup>+</sup>-haltig, Na<sup>+</sup>-frei) auf einer Wärmeplatte bei 37°C equilibriert. Dann wurde der Transportpuffer abgezogen und die Aufnahmemessung durch Zugabe von 300 µl oder 500 µl Messlösung (je nach Größe der wells) gestartet. Die Aufnahme wurde durch Abkippen der Messlösung und fünfmaliges Waschen der Zellen in eiskaltem PBS beendet.

### **3.10.3 *cis*-Hemmung**

Hemmungen stellen eine Methode dar, um Interaktionen unmarkierter Substanzen auf die Aufnahme von Substraten zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden *cis*-Hemmungen durchgeführt, in welchen der Inhibitor auf der gleichen Seite der Zellmembran (extrazelluläres Milieu) wie das Substrat zugeführt wird. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Transportpuffer equilibriert und dann nach Abziehen des Transportpuffers, mit 450 µl Hemmlösung (Transportpuffer mit gelöstem Inhibitor) für einen bestimmten Zeitraum (in der Regel 30 s) vorinkubiert. Die Zugabe von 50 µl Messlösung startete die Aufnahme und stellte gleichzeitig die Endkonzentration an unmarkiertem Inhibitor und radioaktiv-markiertem Substrat ein. Die Beendigung des Versuches erfolgte nach Ablauf der Aufnahmezeit wie unter 3.10.2 beschrieben.

### **3.10.4 Flüssigszintillationsmessung**

Nach dem Stoppen der Aufnahmemessung wurden die Zellen über Nacht bei 37°C in 400 µl oder 500 µl Lysepuffer (je nach Größe der wells) lysiert. Ein Aliquot des Zelllysats wurde in Minivials überführt, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und nach Durchmischen der Proben die enthaltene Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter ermittelt.

### **3.10.5 Proteinbestimmung**

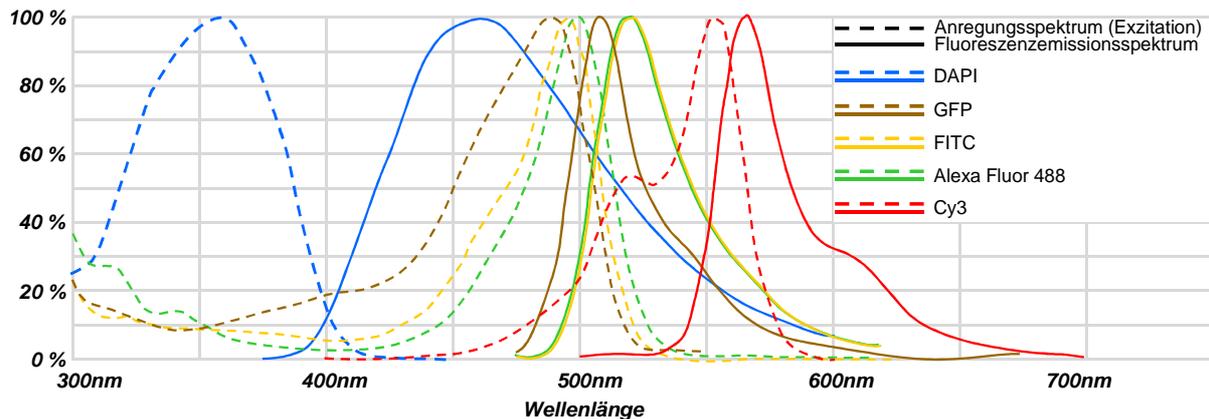
Die Proteinbestimmung erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Lowry (Lowry et al. 1951). Bei jeder Proteinbestimmung wurde eine Standardreihe mit definierten Konzentrationen an Protein (0–800 µg/ml) mitgeführt. Je 3 x 20 µl Standard oder Probe (Zelllysats) wurden in die wells einer 96-well Platte pipettiert. Es folgten die Zugabe von 200 µl Lösung C, 15 min Inkubation bei RT und die Zugabe von 40 µl Folinreagenz. Nach zwei-stündiger Inkubation bei RT war die Farbreaktion abgeschlossen und die Extinktion wurde bei 655 nm im ELISA-Reader bestimmt. Die Extinktionen der Standardreihe ergaben in einer linearen Regression eine Eichgerade, die zur Bestimmung der Proteinkonzentration in der Probe diente.

### **3.10.6 Auswertung der Aufnahmeversuche**

Die in die Zellen aufgenommene Stoffmenge des Substrats wurde, wie unter 3.6.4 beschrieben, berechnet und zusätzlich auf die Proteinkonzentration bezogen. Somit erfolgte die Angabe der Aufnahmemenge in pmol/mg Protein. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse und zur statistischen Auswertung wurde das Programm *GraphPad Prism 4* verwendet.

### 3.11 Immunfluoreszenz

Der Nachweis des nativen SOAT sowie aller FLAG- und V5-His-markierten Proteine erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Verwendete Primärantikörper waren das SOAT<sub>2-17</sub> Antiserum und die kommerziell erhältlichen *anti-FLAG* (Sigma) und *anti-V5* (Invitrogen) Antikörper.



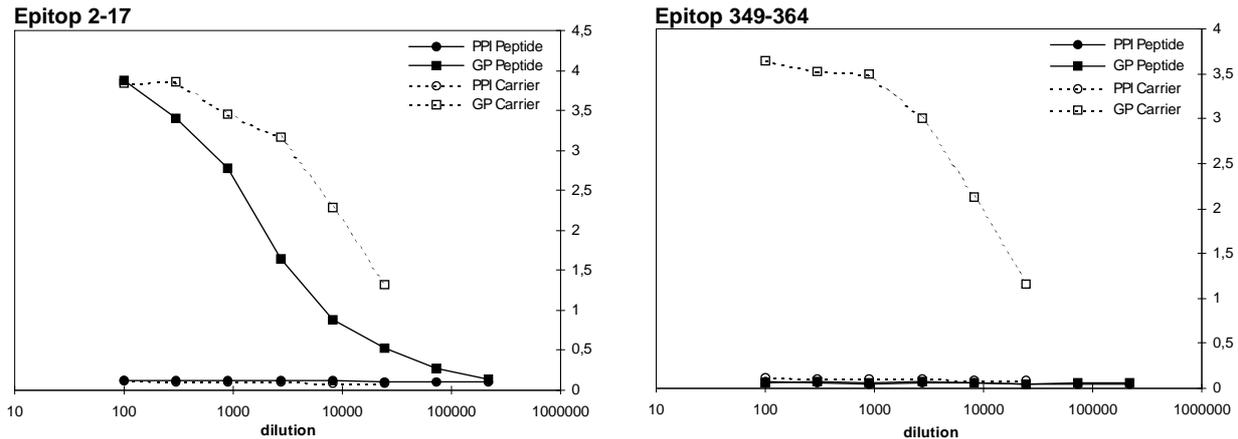
**Abb. 3.5: Anregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren der verwendeten Fluorophore.**

Die Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms *Spectraviewer* (<http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>).

Die Primärantikörper wurden über Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sekundärantikörper nachgewiesen (Abb. 3.5), EmGFP gekoppelte Proteine über direkte Fluoreszenz, ohne Antikörperreaktion.

#### 3.11.1 Herstellung des SOAT<sub>2-17</sub> Antiserums

Die Firma *Eurogentec* (Seraing, Belgien) wurde mit der Generierung eines SOAT-Antiserums beauftragt. Die Immunisierung erfolgte gegen zwei Epitope des SOAT. Das erste Epitop umfasste die Aminosäuren 2-17 der SOAT-Sequenz (RANCSSSSACPANSSE), welches dem N-Terminus entspricht. Als zweites Epitop wurden die Aminosäuren 349-364 des C-Terminus (EEGAITPGPPGPMDCHE) ausgewählt. Die synthetischen Peptide wurden am C-Terminus mit KLH (keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt, welches die Antigenantwort schwacher Antigene erhöht. Die Peptid-Carrier-Konjugate wurden zur Doppelimmunisierung von zwei Kaninchen genutzt. Die Überprüfung der Antigenität der Kaninchensera erfolgte mittels ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Analysis) gegen das Peptid-Carrier-Konjugat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6 exemplarisch für ein Kaninchen dargestellt.



**Abb. 3.6: Überprüfung der Antigenität des Kaninchenserums gegen die SOAT-Epitope 2-17 und 349-364 mittels ELISA.**

Das Antiserum (GP) zeigte nach der Immunisierung mit den beiden Peptiden eine Reaktivität gegen das Epitop 2-17. Epitop 349-364 war dagegen im ELISA nicht immunogen. In beiden ELISAs zeigte das Serum (GP) eine Reaktivität gegen den Carrier KLH (Positivkontrolle). Das Präimmunserum (PPI) zeigte weder für die Peptide noch den Carrier KLH eine Reaktion (Negativkontrolle). PPI = *pre-immune serum*; GP = *large taking of blood*; KLH = *Keyhole Limpet Hemocyanin*.

Nur das Epitop 2-17 zeigte eine Antigenität in beiden Kaninchen. Epitop 349-364 war dagegen nicht immunogen im ELISA. Daher wurde nur das Antiserum für das Epitop 2-17 einer Affinitätsreinigung unterzogen und weiter verwendet.

### 3.11.2 Indirekte Immunfluoreszenz mit dem SOAT<sub>2-17</sub> Antiserum

SOAT-HEK293 Zellen wurden in 24-well Platten auf Polylysin beschichteten Deckgläschen bis zu einer Dichte von 90 % Konfluenz kultiviert. Durch Zugabe von Tetrazyklin (1 µg/ml) erfolgte die Induktion der SOAT-Expression. Als Negativkontrolle dienten nicht-induzierte Zellen. Nach Abziehen des Kulturmediums wurden die Zellen zunächst 3 x 5min mit PBS gewaschen und anschließend 1 h mit dem SOAT<sub>2-17</sub> Antiserum in einer Verdünnung von 1:10 in PBS bei RT inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit PBS (jeweils 5 min) und die Inkubation mit dem sekundären Maus FITC-gekoppelten anti-Kaninchen IgG Antikörper (Sigma), 1:200 in PBS verdünnt, für 1 h bei RT. Die Zellen wurden erneut 3 x 5 min mit PBS gewaschen und dann für 5 min mit einer DAPI/Methanol Lösung (1:5000) bei 8°C inkubiert. Es schloss sich ein letzter Waschschrift mit Methanol/Aceton (1:1) an, bevor die Zellen luftgetrocknet und mit Mowiol auf Objektträgern eingedeckelt wurden.

### 3.11.3 Indirekte Immunfluoreszenz mit den anti-FLAG und anti-V5 Antikörpern

GripTite 293 MSR Zellen wurden in 24-well Platten auf Deckgläschen kultiviert und mit den FLAG- oder V5-His-Transporter-Konstrukten oder pcDNA5/FRT/TO-Leervektor (Negativkontrolle) transient transfiziert (siehe 3.9.3). Die Kultivierung der stabil transfizierten NTCP-FLAG-HEK293 und ASBT-FLAG-HEK293 Zellen erfolgte auf Polylysin beschichteten Deckgläschen mit oder ohne Tetrazyklin (Negativkontrolle). Nach 48 h wurden die Zellen 5 min mit PBS bei RT gewaschen und dann mit 2 % PFA für 15 min bei 4°C fixiert. Waschen mit PBS (2 x 5 min, RT) und Puffer A (5 min, RT) beendete die Fixierung. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch Inkubation mit Puffer A + 0,2 % Triton-X 100 für 5 min bei RT. Bei Zellen, welche zur Lokalisierung eines extrazellulär lokalisierten Epitops eingesetzt werden sollten, wurde dieser Schritt übergangen (nicht-permeabilisierte Zellen). Die Zellen wurden 30 min bei RT in Blockierlösung blockiert und mit dem primären polyklonalen Kaninchen anti-FLAG oder monoklonalen Maus anti-FLAG M2 Antikörper (1:40000, Sigma) bzw. Maus anti-V5 (1:5000, Invitrogen) in Blockierlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 min wurden die Zellen 1 h bei RT mit dem sekundären Ziege Cy3-gekoppelten anti-Kaninchen IgG (1:800) oder Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelten anti-Maus (1:800) Antikörper in Blockierlösung inkubiert. Zum Schutz des konjugierten Fluoreszenzfarbstoffes fanden dieser sowie die nächsten Schritte in einem abgedunkelten Raum statt. Es folgten dreimaliges Waschen mit PBS und das Anfärben der Zellkerne mit DAPI/Methanol (1:5000) für jeweils 5 min bei RT. Nach Waschen mit Methanol wurden die Zellen getrocknet und die Deckgläschen mit Mowiol oder *ProLong Gold* (Invitrogen) auf Objektträgern eingedeckelt.

### 3.11.4 Direkte Fluoreszenz EmGFP-markierter Proteine

Die transiente Transfektion der EmGFP-Konstrukte, die Kultivierung der stabil transfizierten SOAT-EmGFP-HEK293 Zellen sowie die Fixierung der Zellen erfolgte wie unter 3.11.3 beschrieben. An die Fixierung schlossen sich dreimaliges Waschen mit PBS und die Zellkernfärbung an, welche für 10 min bei RT mit DAPI/PBS (1:5000) durchgeführt wurde. Überschüssiger Farbstoff konnte durch erneutes Waschen mit PBS entfernt werden. Nach Trocknen der Zellen wurden die Deckgläschen mit *ProLong Gold* (Invitrogen) auf Objektträgern eingedeckelt.

### 3.11.5 Mikroskopie

Die Fluoreszenzbilder wurden an den *Leica DM6000B* und *Leica DM5500B* Fluoreszenzmikroskopen aufgenommen. Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Programme *FW4000 V1.2 Fluorescence Workstation*, *Deblur V2.3.2 Deconvolution* und *3D-Reconstruction (DM6000B)* oder *LAS AF6000* mit *3D Deconvolution (DM5500B)* von Leica Microsystems.

### 3.12 Western Blot

Der Nachweis und die Größenbestimmung der Fusionsproteine NTCP-FLAG, ASBT-FLAG und SOAT-EmGFP der stabil transfizierten HEK293-Zellen erfolgte mittels Western Blot. Zur Detektion wurden Antikörper gegen die angefügten Epitope verwendet.

#### 3.12.1 Proteinaufbereitung

In einer 6-well Platte wurden jeweils zwei wells mit 250000 Zellen (NTCP-FLAG-HEK293, ASBT-FLAG-HEK293, SOAT-EmGFP-HEK293) ausgesät und in je einem well die Proteinexpression mit Tetrazyklin induziert. Nach drei Tagen waren die Zellen konfluent und wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 750 µl PBS mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, für 5 min bei 1000 g und 4°C pelletiert und zum Zellpellet das 20-fache Volumen (ca. 200 µl) *ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent* (MBI Fermentas) plus 2 µl *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma) gegeben. Nach Resuspension des Pellets durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT auf einem Drehrad. Die Zelltrümmer wurden bei 4°C und 16000 g für 15 min herunter zentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen (Zelllysate) in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

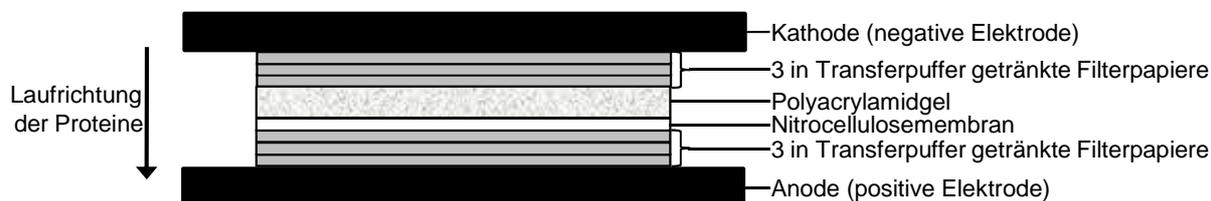
#### 3.12.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Zelllysate erfolgte mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Novagen). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sie auch in Anwesenheit zahlreicher chemischer Verbindungen und Detergenzien durchgeführt werden kann. Zunächst wurde eine BSA-Standardreihe in Lysepuffer (*ProteoJet Mammalian Lysis Reagent*) erstellt (0-1000 µg Protein), um einen Einfluss der Pufferbestandteile auf den Assay ausschließen zu können. Die Proteinmessung der Standards erfolgte in Dreifachbestimmung, diejenige der Proben in Dop-

pelbestimmung. In eine 96-well Mikrotiterplatte wurden je 25  $\mu\text{l}$  Standard oder Probe in die wells pipettiert, pro Probe 200  $\mu\text{l}$  *BCA Solution* und 4  $\mu\text{l}$  4 % *Cupric Sulfate* gemischt und davon 200  $\mu\text{l}$  in jedes well gegeben. Auf einem Plattenschüttler erfolgte das Mischen der Proben für 30 s. Die Platte wurde verschlossen, zur Farbentwicklung für 30 min bei 37°C inkubiert und nach Abkühlen der Platte die Farbintensität bei 570 nm im ELISA-Reader bestimmt. Als Leerwert (Blank) diente der Standardwert ohne Protein (0  $\mu\text{g}$  Protein). Über die Standardreihe konnte die Proteinkonzentration der Zellysate extrapoliert werden.

### 3.12.3 Gellauf und Blotting

Je 15  $\mu\text{g}$  Protein der Zellysate wurden 1:4 mit 4 x Lämmli-Puffer gemischt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Visualisierung der Auftrennung und des erfolgreichen Blottens wurden 5  $\mu\text{l}$  *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (MBI Fermentas) aufgetragen, für die exakte Größenbestimmung 5  $\mu\text{l}$  *RotiMark Western Marker* (Roth). Letzterer gibt nach Inkubation der geblotteten Membran mit dem *RotiMark Western Konjugat* (Roth) und *Rotilum* (Roth) Chemilumineszenzsignale ab, welche direkt auf dem ECL-Film detektiert werden (s.u.). Die Separierung des Proteingemischs erfolgte für die FLAG-Konstrukte in einem 10%igem und für das GFP-Konstrukt in einem 8%igem SDS-Polyacrylamidgel. Anschließend wurde das Sammelgel entfernt, die *Hybond ECL Nitrocellulose Membran* (GE Healthcare) sowie sechs Filterpapiere auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und das Gel, die Membran und Filterpapiere für 10 min in Transferlösung inkubiert. Für den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde das *semi-dry* Verfahren in einem *PerfectBlue „Semi-Dry“-Elektroblotter* (PeqLab) angewendet und der Blot wie unter Abb. 3.7 gezeigt aufgebaut.



**Abb. 3.7: Aufbau des Semi-Dry Elektroblot Gelsandwiches.**

Um eventuell eingeschlossene Luftblasen zu entfernen wurde vorsichtig mit einem 50 ml Reaktionsgefäß über das Gelsandwich gerollt und anschließend überschüssiger Transferpuffer von der Bodenplatte entfernt. Der Blot erfolgte bei 1,5  $\text{mA}/\text{cm}^2$  für 2 h. Der erfolgreiche

Transfer der Proteine war an der Übertragung des vorgefärbten Proteinmarkers sichtbar. Eine zusätzliche Kontrolle ergab sich durch die Visualisierung der geblotteten Proteine durch Inkubation der Membran in *Ponceau S Solution* (Sigma). Durch Waschen der Membran in TBS-T konnte der Farbstoff wieder von der Membran entfernt werden.

#### **3.12.4 Blockierung der Membran und Antikörperreaktion**

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockierlösung geschwenkt. Es folgte ein kurzer Waschschrift in TBS-T und die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierlösung über Nacht bei 4°C. Als Primärantikörper kamen für die FLAG-Proteine der monoklonale Maus anti-FLAG M2 (1:5000, Sigma) und für das GFP-Protein der monoklonale Maus anti-GFP (1:1000, Roche) zur Anwendung. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal kurz und dann zweimal für 15 min in TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem sekundären anti-Maus HRP-gekoppelten Antikörper (GE Healthcare) sowie dem *RotiMark Western Konjugat* (Roth) jeweils in einer Verdünnung von 1:5000 in TBS-T inkubiert. Es folgten drei kurze und zwei 15-minütige Waschschriffe in TBS-T und die Detektion der immunmarkierten Proteine.

#### **3.12.5 Detektion**

Die Detektionsreagenzien *Rotilumin 1 & 2* (Roth) wurden zu gleichen Teilen miteinander gemischt, für 2 min auf die Membran gegeben und nach Entfernen des Rotilumins die Membran in eine durchsichtige Folie eingeschweißt. Dies ist wichtig, um ein Benetzen des ECL-Films mit dem auf der Membran verbliebenen Rotilumin zu vermeiden. In einer Dunkelkammer erfolgte die Exposition der Membran auf einen *Amersham Hyperfilm ECL*-Film (GE Healthcare) in einer Röntgenkassette. Die Umsetzung des Rotilumins (Luminol) durch die Horseradish peroxidase (HRP) des Sekundärantikörpers führt zur Aussendung von Chemilumineszenzsignalen, welche den Film belichten. Nach der Exposition wurde der Film für ca. 3 min im Entwicklerbad *Rodinal B & W Developer* (Agfa) geschwenkt, die Reaktion durch Inkubation in 2%iger Essigsäure abgestoppt und anschließend die Signale in *Hypam Schnellfixierer* (Ilford) für ca. 2 min fixiert. Nach Wässern und Trocknen des Films konnten die Signale begutachtet und ausgewertet werden. Je nach Signalstärke wurde die Belichtungszeit verkürzt oder verlängert.

### 3.13 Radioimmunpräzipitation und Deglykosylierung

NTCP und ASBT wurden in der Literatur als Glykoproteine beschrieben. Um dies auch für den SOAT zu überprüfen erfolgte eine Radioimmunpräzipitation des SOAT-FLAG mit anschließender Deglykosylierung. ASBT-FLAG wurde als Positivkontrolle mitgeführt.

#### 3.13.1 Expression der Proteine und Radioaktivmarkierung

Zunächst erfolgte die transiente Transfektion der Konstrukte SOAT-FLAG-pcDNA5/FRT/TO, ASBT-FLAG-pcDNA5/FRT/TO und pcDNA5/FRT/TO-Leervektor in Flp-In T-REx 293 Zellen in einer 6-well Schale (siehe 3.9.3). 4 h nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Proteinexpression durch Tetrazyklinzugabe induziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h in Methionin- und Cystein-freiem DMEM-Medium (Sigma), supplementiert mit 4 mM L-Glutamin und 1 µg/ml Tetrazyklin, „ausgehungert“. Anschließend erfolgte die *in vitro* Zellmarkierung, der ab diesem Zeitpunkt synthetisierten Proteine mit 70 µCi L-[<sup>35</sup>S] *in vitro cell labeling mix* pro well (Amersham Biosciences) für 6 h unter Standardbedingungen (siehe 3.8). Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 500 µl eiskaltem Radioimmunpräzipitations-Puffer (RIPA-Puffer) mit *Protease Inhibitor Cocktail* (1:100; Sigma) für 5 min auf Eis unter Schütteln lysiert und das Zelllysate in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für weitere 30 min auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden herunter zentrifugiert (15 min, 13200 rpm, 4°C) und der Überstand in der Immunpräzipitation eingesetzt.

#### 3.13.2 Immunpräzipitation der FLAG-Proteine

Zu den Zellüberständen wurden 5 µg des monoklonalen Maus anti-FLAG Antikörpers (Sigma) gegeben und für 1 h bei 4°C unter Drehen inkubiert. Dann folgten die Zugabe von 100 µl *Protein A-Sepharose* (Sigma, 25 % Suspension in RIPA-Puffer) und eine weitere Inkubation für 1 h auf dem Drehrad bei 4°C. Die Sepharose wurde herunter zentrifugiert, der Überstand verworfen und insgesamt dreimal mit eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen.

#### 3.13.3 Deglykosylierung

Die an Protein A-Sepharose Beads gebundenen Proteine wurden durch 10-minütiges Kochen in *1 x glycoprotein denaturation buffer* (NEB) freigesetzt. Die Sepharose Beads wur-

den herunter zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltenen Proteine in 1 x *G7 reaction buffer* (NEB) plus 1 % *Nonidet P-40* (NEB) und 1000 Units *PNGase F* (NEB) über Nacht bei 37°C inkubiert. Die nicht deglykosylierten Proben wurden gleich behandelt aber statt des Enzyms ddH<sub>2</sub>O zugegeben.

#### **3.13.4 Detektion der Proteine**

Die Proben wurden 1:2 mit 2 x Lämmli Puffer gemischt und 10 min gekocht. Anschließend erfolgte die Auftrennung der deglykosylierten und nicht deglykosylierten Proteine auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel. Das Gel wurde 30 min in Fixierlösung fixiert, 30 min in *Amersham Amplify Fluorographic reagent* (GE Healthcare) geschwenkt und unter Vakuum auf einem Filterpapier getrocknet. Die Detektion der Proteine erfolgte auf einem *Eastman Kodak Co. BioMax MR Film* (Sigma) in einer Autoradiographie Kassette bei -80°C. Die Entwicklung des Films erfolgte wie unter 3.12.5 beschrieben.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Sequenzanalyse der SLC10A6-Subfamilie

Im Jahr 2003 wurden an unserem Institut durch eine Megablast Analyse der SLC10-Familie vier neue Mitglieder dieser Familie identifiziert und als SLC10A4-SLC10A7 klassifiziert. Der humane Carrier SLC10A6 (SOAT) ist Gegenstand dieser Arbeit und wurde über RT-PCR aus der Nebenniere des Menschen kloniert. Die Sequenz wurde am 23. September 2003 an die *DDBJ/GenBank/EMBL*-Datenbanken übermittelt und erhielt die Accession Nummer AJ583502/NM\_197965 (cDNA) und CAE47477/NP\_932069 (Protein) (Geyer, Dissertation 2005). Das klonierte Transkript umfasst 1134 bp, welches ein 377 Aminosäuren langes Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 41,2 kDa kodiert. Dieses Protein erhielt später aufgrund seiner Funktion den Namen *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* (SOAT). Das *full-length* Transkript umfasst 1502 bp mit einem 148 bp langen 5'- und einem 220 bp langen 3'-untranslatierten Bereich (GenBank Accession Nummer EF437223). Das SLC10A6-Gen ist auf Chromosom 4q21.3 lokalisiert und hat eine Länge von 25,8 kb. Das mRNA Transkript setzt sich aus sechs Exonen mit Längen von 525, 119, 89, 176, 158 und 435 bp zusammen (Geyer et al. 2007). Inzwischen wurden zahlreiche Homologe des humanen SOAT in anderen Spezies identifiziert (Tab. 4.1). Die entsprechenden Proteine haben eine Länge von 370 bis 377 Aminosäuren.

**Tab. 4.1: Übersicht über bisher identifizierte SOAT-Transkripte verschiedener Spezies.**

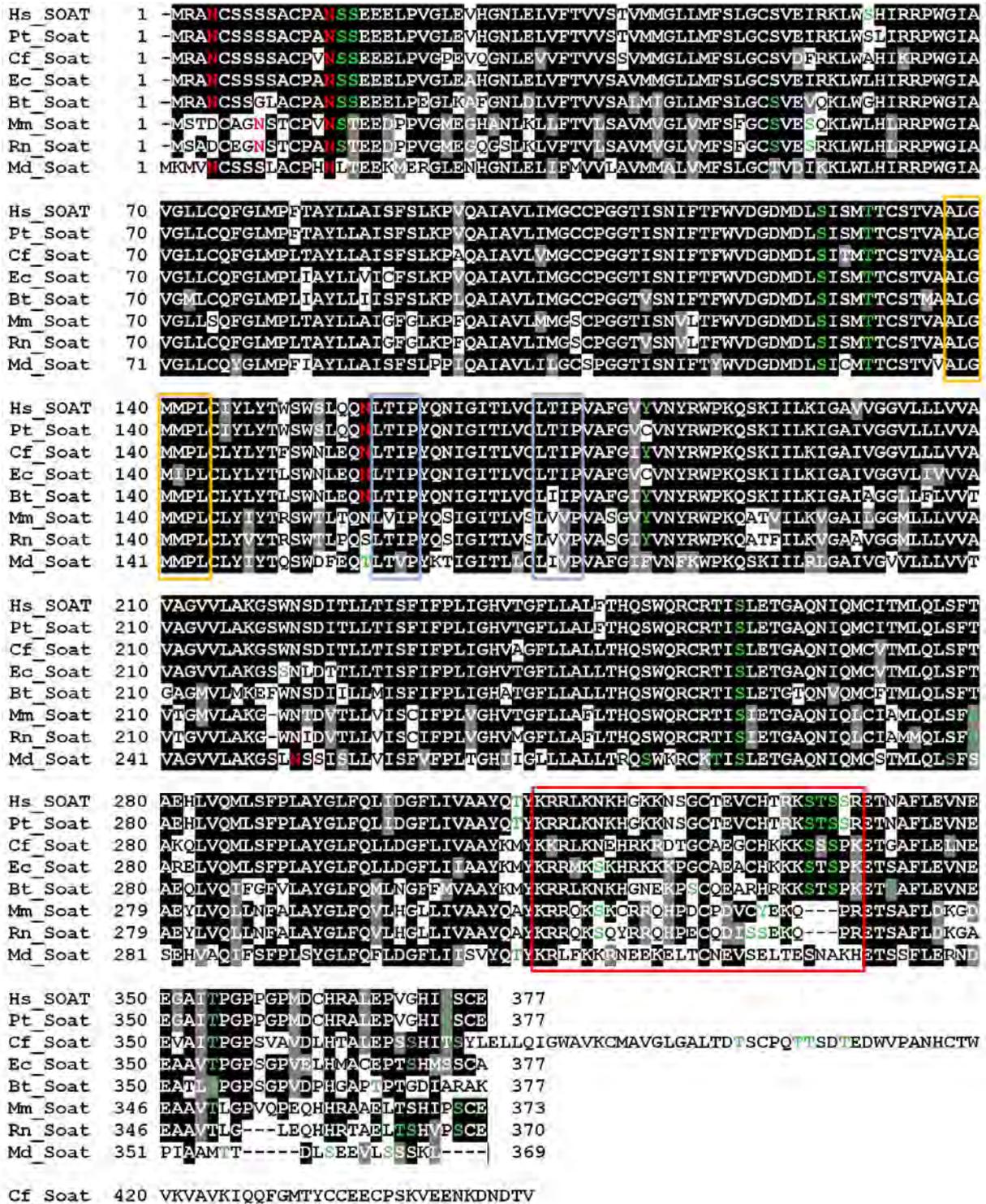
Spezies	Accession-No. Nukleotid	Accession-No. Protein	Cds (bp)	Protein (AS)	Chro- mosom	GenBank Eintrag (Jahr)
<i>Mus musculus</i> <sup>a</sup>	NM_029415	NP_083691	1122	373	5 E5	2000*
<i>Homo sapiens</i> <sup>a</sup>	NM_197965	NP_932069	1134	377	4q21.3	2003
<i>Rattus norvegicus</i> <sup>a</sup>	NM_198049	NP_932166	1113	370	14p22	2003
<i>Bos taurus V1</i> <sup>a</sup>	NM_001081738	NP_001075207	1134	377	6	2006
<i>Bos taurus V2</i> <sup>a</sup>	EF495204	ABP49613	750	248	6	2007
<i>Bos taurus V3</i> <sup>a</sup>	EF495205	ABP49614	750	238	6	2007
<i>Bos taurus V4</i> <sup>a</sup>	EF495206	ABP49615	417	138	6	2007
<i>Canis familiaris</i> <sup>a</sup>	DQ409210 partielle cds	ABD66745	354	117	32	2006
<i>Equus caballus</i>	DQ409212 partielle cds	ABD66747	305	101	3	2006
<i>Canis familiaris</i> <sup>b</sup>	XM_846210	XP_851303	1356	451	32	berechnet
<i>Equus caballus</i> <sup>b</sup>	XM_001494147	XP_001494197	1134	377	3	berechnet
<i>Monodelphis domestica</i> <sup>b</sup>	XM_001370871	XP_001370908	1110	369	5	berechnet
<i>Pan troglodytes</i> <sup>b</sup>	XM_526626	XP_526626	1134	377	4	berechnet

<sup>a</sup>Daten wurden experimentell ermittelt; <sup>b</sup>Daten beruhen auf bioinformatischer Analyse der Sequenzen aus Genomprojekten; \*Sequenz entstammt der *RIKEN full-length enriched library* der Maus

Die Sequenzidentitäten der homologen tierischen Soat-Proteine betragen zum humanen SOAT-Protein 69,4 % (*Mus musculus*), 68,1 % (*Rattus norvegicus*), 77,7 % (*Bos taurus*), 86,5 % (*Canis familiaris*), 86,2 % (*Equus caballus*), 67,2 % (*Monodelphis domestica*) und 99,2 % (*Pan troglodytes*) (berechnet mit DNASTar MegAlign). Wie zu erwarten, zeigen Mensch und Schimpanse die nächste Verwandtschaft zueinander. Daneben zeigen auch Soat von Maus und Ratte eine hohe Verwandtschaft mit 90 % Sequenzidentität (siehe auch Abb. 5.1). Alle Proteine beinhalten das Signaturmotiv der SLC10-Familie „ALGMMPL“ (Geyer et al. 2006). Nur der Soat des Pferdes weicht von diesem Motiv geringfügig ab. Dieser zeigt das Motiv „ALGMIPL“ (Abb. 4.1).

Die SOAT/Soat-Proteine von Mensch, Schimpanse, Hund, Pferd und Rind besitzen drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen ( $N^4$ ,  $N^{14}$ ,  $N^{157}$ ), deren Position in allen Proteinen konserviert ist. Bei der Haus-Spitzmausbeutelratte finden sich ebenfalls die potenziellen N-Glykosylierungsstellen an den Positionen  $N^4$  und  $N^{14}$  und eine weitere an Position  $N^{252}$ . Für die Soat-Proteine von Maus und Ratten lassen sich nur zwei potenzielle N-Glykosylierungsstellen identifizieren, eine gemeinsame mit den anderen Proteinen ( $N^{14}$ ) und eine weitere an Position  $N^8$ . Für alle Proteine lassen sich mit Hilfe bioinformatischer Programme zahlreiche potenzielle Phosphorylierungsstellen ermitteln, welche bevorzugt im C-Terminus lokalisiert sind. Dieser ist im Gegensatz zu den übrigen Proteindomänen äußerst variabel zwischen den verschiedenen Spezies (Abb. 4.1).

An den Aminosäurepositionen 158-161 und 172-175 kann bei den SOAT/Soat-Proteinen von Mensch, Schimpanse, Hund und Pferd ein Tandem-Repeat „LTIP“ identifiziert werden. Bei Soat von Rind und Ratte findet sich dieses Motiv nur an einer der beiden Positionen (158-161), Maus und Haus-Spitzmausbeutelratte besitzen dieses gar nicht. Der C-Terminus weist ein Cluster mit auffällig vielen positiv geladenen Aminosäuren (K, R) an den Positionen 312-339 bzw. 311-335 (Maus, Ratte) auf. Daraus resultiert, unter Berücksichtigung der wenigen negativ geladenen Aminosäuren (D, E), positive Nettoladungen von +12 (Pferd), +9 (Mensch, Schimpanse), +8 (Rind, Hund), +6 (Maus), +5 (Ratte) und +1 (Haus-Spitzmausbeutelratte).

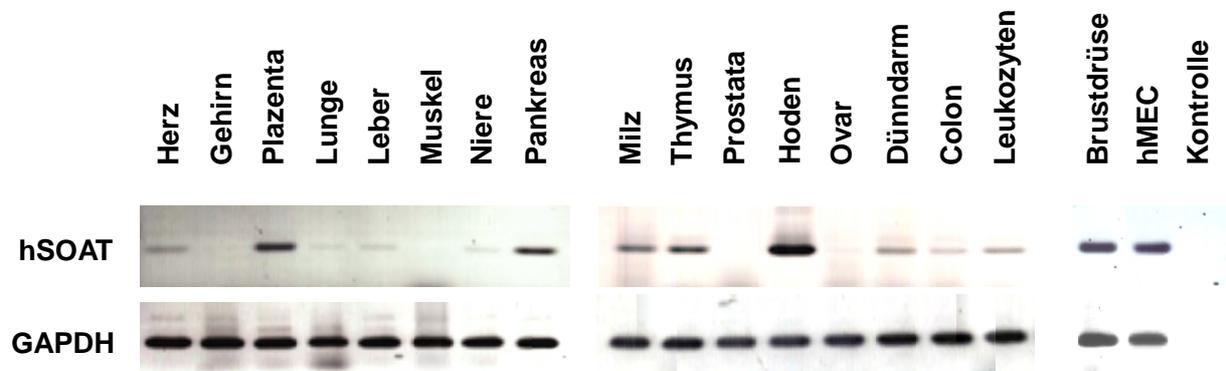


**Abb. 4.1: Aminosäure-Sequenzalignment der SOAT/Soat-Proteine verschiedener Säugetier-spezies.**

Das Alignment wurde mit dem *ClustalW* Algorithmus berechnet und mit *BOXSHADE 3.21* visualisiert. Aminosäure-Identitäten sind schwarz hinterlegt, Aminosäure-Ähnlichkeiten grau schattiert. Lücken (-) wurden zur Optimierung des Alignments eingefügt. Potenzielle N-Glykosylierungsstellen (berechnet mit *NetNGlyc 1.0*) sind rot, potenzielle Phosphorylierungsstellen (berechnet mit *NetPhos 2.0*) grün dargestellt. Das Signaturmotiv der SLC10-Familie, „ALGMMPL“, wurde orange umrandet, das Tandem repeat „LTIP“ blau und das Cluster positiv geladener Aminosäuren im C-Terminus rot markiert. Grundlage des Alignments sind die vollständig identifizierten Proteine, der in Tab. 4.1 angegebenen Sequenzen. Hs = *Homo sapiens* (Mensch), Pt = *Pan troglodytes* (Schimpanse), Cf = *Canis familiaris* (Hund), Ec = *Equus caballus* (Pferd), Bt = *Bos taurus* (Rind), Mm = *Mus musculus* (Maus), Rn = *Rattus norvegicus* (Ratte), Md = *Monodelphis domestica* (Haus-Spitzmausbeutelratte).

## 4.2 Expression des humanen SOAT

Die Expression des humanen SOAT wurde mittels RT-PCR in verschiedenen humanen Geweben und einer Brustepithelzelllinie (hMEC, *human mammary epithelial cell*) untersucht.



**Abb. 4.2: Untersuchung der SOAT-Expression in humanen Geweben mittels RT-PCR.**

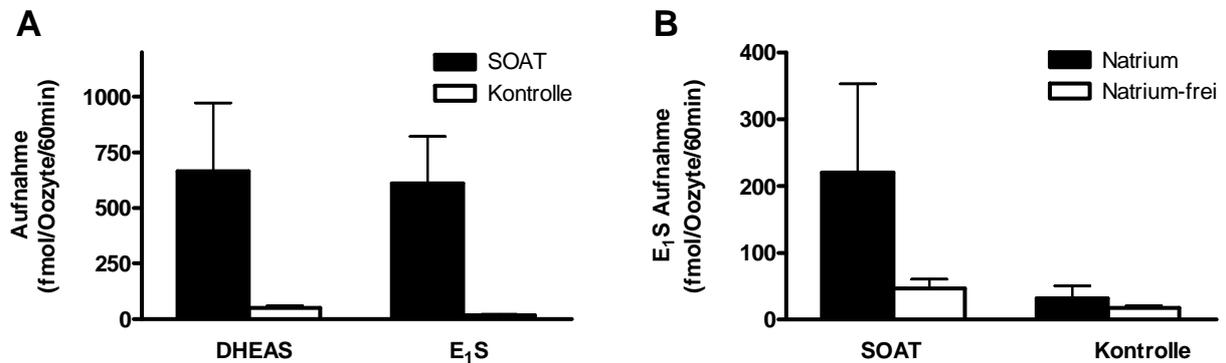
Die cDNAs der Humangewebe wurden zwei *Human Multiple Tissue cDNA Panels* entnommen. Aus der Brustepithelzelllinie hMEC wurde RNA gewonnen und diese in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR erfolgte mit genspezifischen Primern des humanen SOAT (Amplifikat ca. 400 bp) und humanen GAPDH (Amplifikat ca. 300 bp) mit anschließender Auftrennung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel.

Eine besonders starke Expression zeigt sich in Hoden, Plazenta, Brustdrüse sowie der Epithelzelllinie hMEC. Schwächere Expressionsraten konnten auch in Pankreas, Milz, Thymus, Herz, Dünndarm, Colon und Leukozyten nachgewiesen werden (Abb. 4.2). Die dominante Expression von SOAT im Hoden und die relativ hohe Expression in Plazenta und Brustdrüse konnte auch mit Hilfe einer quantitativen PCR bestätigt werden (Geyer et al. 2007; Meerkamp et al. 2008).

## 4.3 Identifizierung des humanen SOAT als Natrium-abhängiges Transportsystem in *Xenopus laevis* Oozyten

Zunächst erfolgte die Klonierung des Leserahmens des humanen SOAT in einen Expressionsvektor, welcher für die cRNA-Synthese geeignet war (pBlue-polyA-*Xba*I). Die synthetisierte cRNA wurde zur heterologen Expression in *Xenopus laevis* Oozyten genutzt und die Aufnahme verschiedener Substrate der SLC10-Familie getestet. Interessanterweise zeigten die SOAT-exprimierenden Oozyten keine Aufnahme von Taurocholat, einem typischen Substrat der bis dato bekannten Transporter der SLC10-Familie NTCP und ASBT. Stattdessen wurden die sulfatierten Steroide DHEAS und E<sub>1</sub>S als Substrate des humanen SOAT identifiziert (Abb. 4.3, A). Der Austausch von NaCl gegen Cholinchlorid im Transportpuffer führte zu

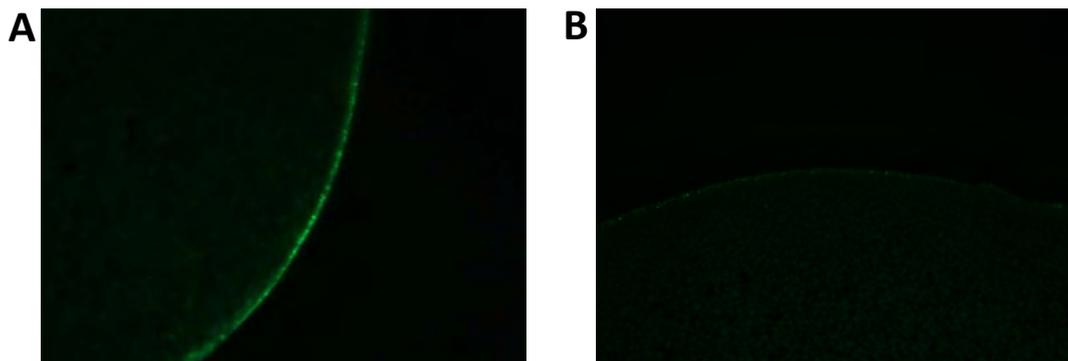
einer drastischen Reduktion des E<sub>1</sub>S-Transports (Abb. 4.3, B). Aufgrund dieses Transportmusters wurde der Name *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* (SOAT) vergeben.



**Abb. 4.3: Na<sup>+</sup>-abhängiger Steroidsulfattransport in SOAT-injizierte *Xenopus laevis* Oozyten.**

4,6 ng SOAT-cRNA wurden in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Nach drei Tagen Expressionszeit erfolgte eine 60-minütige Aufnahme von DHEAS (0,5 μM) und E<sub>1</sub>S (0,5 μM) (A, B). Der Transport von E<sub>1</sub>S wurde in Abhängigkeit von Natrium ermittelt (B). Dargestellt sind die MW ± SD von 7-12 Oozyten eines repräsentativen Experiments.

Zum Nachweis des humanen SOAT mittels immunhistochemischen Untersuchungen wurde über zielgerichtete Mutagenese das FLAG-Epitop an das C-terminale Ende des SOAT angefügt. Das SOAT-FLAG Fusionsprotein konnte mit einem gegen das FLAG-Epitop gerichteten Antikörper eindeutig in der Membran der Oozyten nachgewiesen werden (Abb. 4.4, A). Dagegen zeigte sich in ddH<sub>2</sub>O-injizierten Oozyten keine Färbung (Abb. 4.4, B).

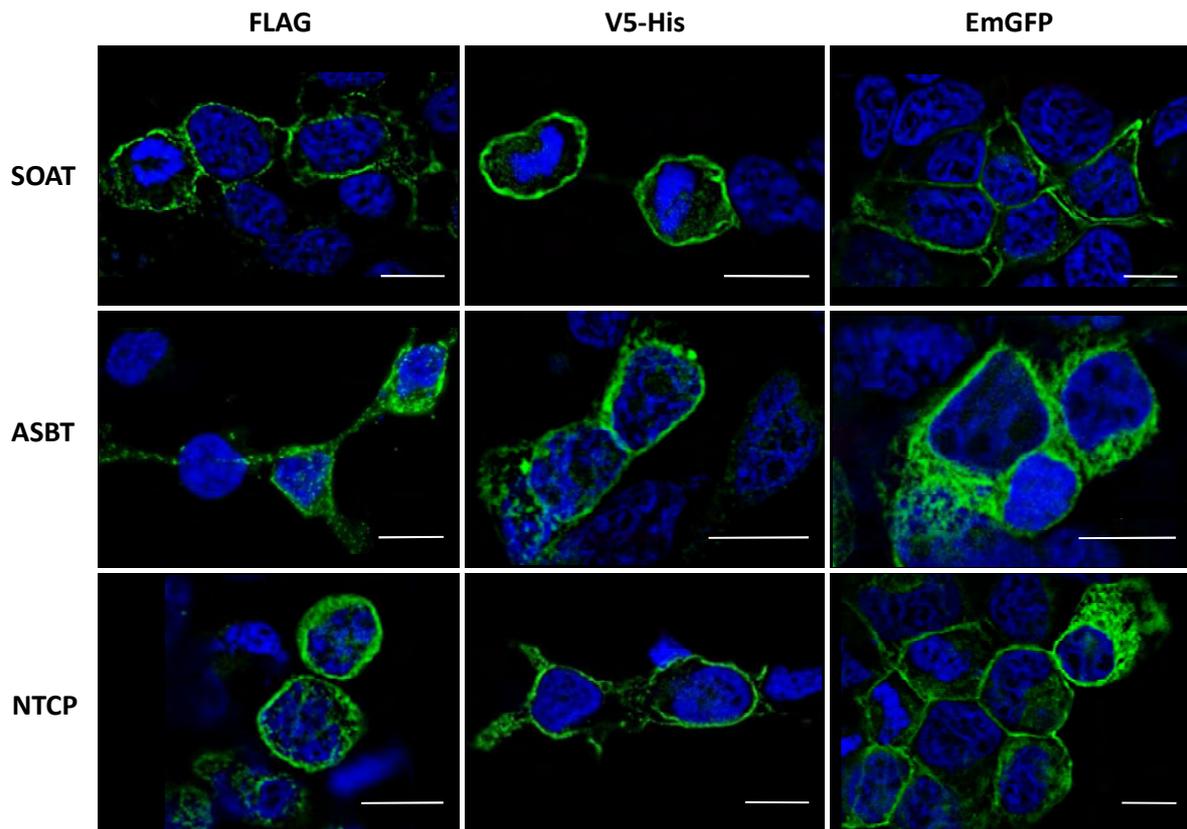


**Abb. 4.4: Nachweis des humanen SOAT über das FLAG-Epitop in *Xenopus laevis* Oozyten.**

(A) SOAT-FLAG wurde heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Das FLAG-Epitop wurde vom monoklonalen Maus anti-FLAG M2 Antikörper erkannt und über einen sekundären Alexa Fluor 488-gekoppelten anti-Maus Antikörper nachgewiesen. (B) Gleichbehandelte ddH<sub>2</sub>O-injizierte Oozyten dienen als Negativkontrolle.

#### 4.4 Subklonierung des humanen SOAT, ASBT und NTCP in Expressionsvektoren für Säugetierzellen

Nachdem der humane SOAT als ein  $\text{Na}^+$ -abhängiges Transportsystem für sulfatierte Steroide identifiziert war, wurde er für die weiteren molekularen und funktionellen Analysen in verschiedene Vektoren zur Expression in Säugetierzellen subkloniert. Für Vergleichsstudien erfolgte auch die Subklonierung von ASBT und NTCP in die entsprechenden Vektoren. Ausgangsmaterial waren mir zur Verfügung gestellte SOAT-, ASBT- und NTCP-Konstrukte im pBlue-polyA-*Xba*I Vektor. Die Subklonierung in den Tetrazyklin induzierbaren pcDNA5/FRT/TO Vektor (Invitrogen) erfolgte über PCR mit Mutageneseprimern (siehe 2.1.1), anschließendem Restriktionsverdau und Ligation in den geschnittenen Vektor. Da für die genannten Transporter keine Antikörper zur Verfügung standen, wurden verschiedene C-terminale *tags* an die Carrier angefügt, über welche eine Detektion möglich war. Zu diesen *tags* gehörte das FLAG-Epitop, welches über zielgerichtete Mutagenese angefügt wurde (siehe 3.3.4). Weitere Vektoren, in welche sowohl SOAT als auch ASBT und NTCP kloniert wurden, sind pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO (Invitrogen) und pcDNA6.2/C-EmGFP/GW/TOPO (Invitrogen). Nach Amplifikation der Leserahmen, ohne das entsprechende Stopp-Codon, konnte das PCR-Produkt über eine TOPO-Reaktion in die Vektoren kloniert werden (siehe 3.4.2). Die Leserahmen lagen dabei im Frame mit den C-terminalen *tags* der Vektoren (V5-His bzw. EmGFP). Die Translation des Leserahmens führte zur Bildung von Fusionsproteinen. Um SOAT-EmGFP über eine *FRT site* stabil transfizieren zu können (siehe 3.9.1), wurde der SOAT-EmGFP Leserahmen amplifiziert und in den TOPO-Vektor pcDNA5/FRT/TO-TOPO (Invitrogen) subkloniert. Mittels Immuncytochemie konnte gezeigt werden, dass alle Fusionsproteine korrekt translatiert wurden und eine membranassoziierte Fluoreszenz aufwiesen. Einige Fluoreszenzsignale konnten aber auch im intrazellulären Kompartiment nachgewiesen werden. Dies war besonders stark bei dem ASBT-EmGFP Konstrukt zu beobachten (Abb. 4.5). Mit Hilfe des Programms PSORT II kann die mögliche Lokalisation von Proteinen in der Zelle vorhergesagt werden. Diese Kalkulation lieferte für den humanen SOAT folgende Ergebnisse: Plasmamembran 60,9 %, Endoplasmatisches Retikulum 21,7 %, Golgi Apparat 4,3 % und Nukleus 4,3 %. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für ASBT und NTCP berechnet. Dabei war es unerheblich, welches Fusionsprotein zur Berechnung herangezogen wurde. Generell kann man sagen, dass die Vorhersagen des PSORT II-Programms und die Lokalisation der Fusionsproteine in der Immunfluoreszenz übereinstimmen.



**Abb. 4.5: Nachweis der SOAT-, ASBT- und NTCP-FLAG, -V5-His und -EmGFP Fusionsproteine mittels Immunfluoreszenz.**

Die genannten Konstrukte wurden transient in GripTite 293 MSR Zellen transfiziert und nach 24-48 h die Immunocytochemie durchgeführt. Die Detektion des FLAG-Epitops erfolgte mit dem monoklonalen Maus anti-FLAG M2 Antikörper (1:40000) (Sigma), die des V5-Epitops mit dem monoklonalen Maus anti-V5 Antikörper (1:5000) (Invitrogen). Beide Primärantikörper wurden über einen sekundären Alexa Fluor 488-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper (1:800, grün) (Invitrogen) nachgewiesen. Die EmGFP-gekoppelten Konstrukte konnten über direkte Fluoreszenz (grün) detektiert werden. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Die Bilder wurden mittels automatischer Z-Fokussierung (Z-Stapel) in drei Ebenen aufgenommen und mit Hilfe einer 3D-Deconvolution Software nachberechnet. Dargestellt ist ein Einzelbild des aufgenommenen Z-Stapels. Maßstab 10 µm.

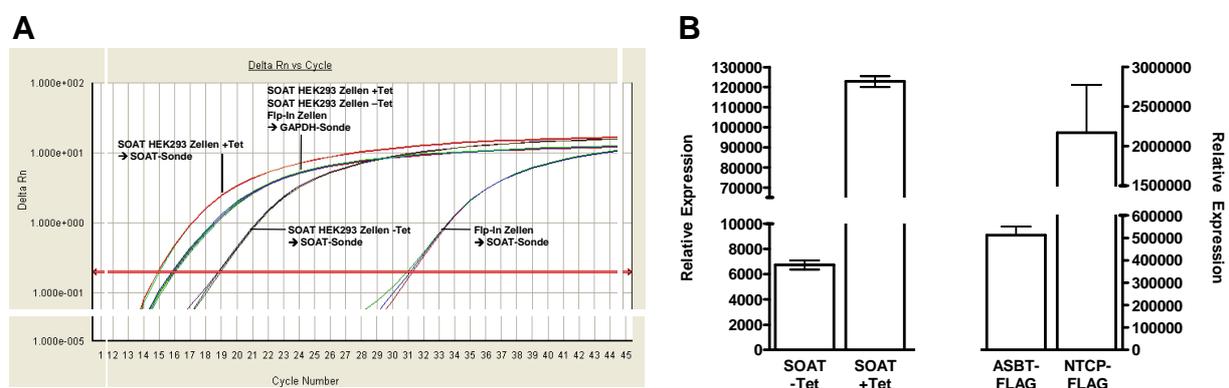
#### 4.5 Etablierung stabiler SOAT, SOAT-EmGFP, ASBT-FLAG und NTCP-FLAG HEK293 Zelllinien

Nachdem die korrekte Translation und Sortierung der generierten SOAT-, ASBT- und NTCP-Konstrukte nachgewiesen wurde, erfolgte zur weiteren Charakterisierung dieser Konstrukte eine stabile Transfektion in Flp-In T-REx 293 Zellen (Invitrogen). Zur funktionellen Charakterisierung des humanen SOAT wurde der unmarkierte SOAT-pcDNA5/FRT/TO stabil transfiziert, um einen Einfluss des *tags* ausschließen zu können. Für Vergleichsstudien zwischen den funktionellen Proteinen der SLC10-Familie erfolgte die stabile Transfektion der ASBT-FLAG-pcDNA5/FRT/TO und NTCP-FLAG-pcDNA5/FRT/TO Konstrukte. Um für weiterführende Analysen zum *Proteinsorting* mittels *Live Cell Imaging* eine direkte Möglichkeit zur Detektion des SOAT-Proteins zu haben, wurde auch das SOAT-EmGFP-pcDNA5/FRT/TO

Konstrukt stabil transfiziert (siehe 3.9.1). Es resultierte jeweils eine Tetrazyklin-induzierbare HEK293 Zelllinie.

#### 4.5.1 Überprüfung der stabilen Zelllinien über quantitative Real-Time PCR

Zunächst wurde die stabile Integration der Konstrukte in Flp-In T-REx 293 Zellen auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR überprüft. Mit Hilfe dieser Technik konnte das Ausmaß der Überexpression des integrierten Transkripts im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrollzelle, aber auch im Vergleich mit und ohne Tetrazyklin-Induktion aufgezeigt werden.



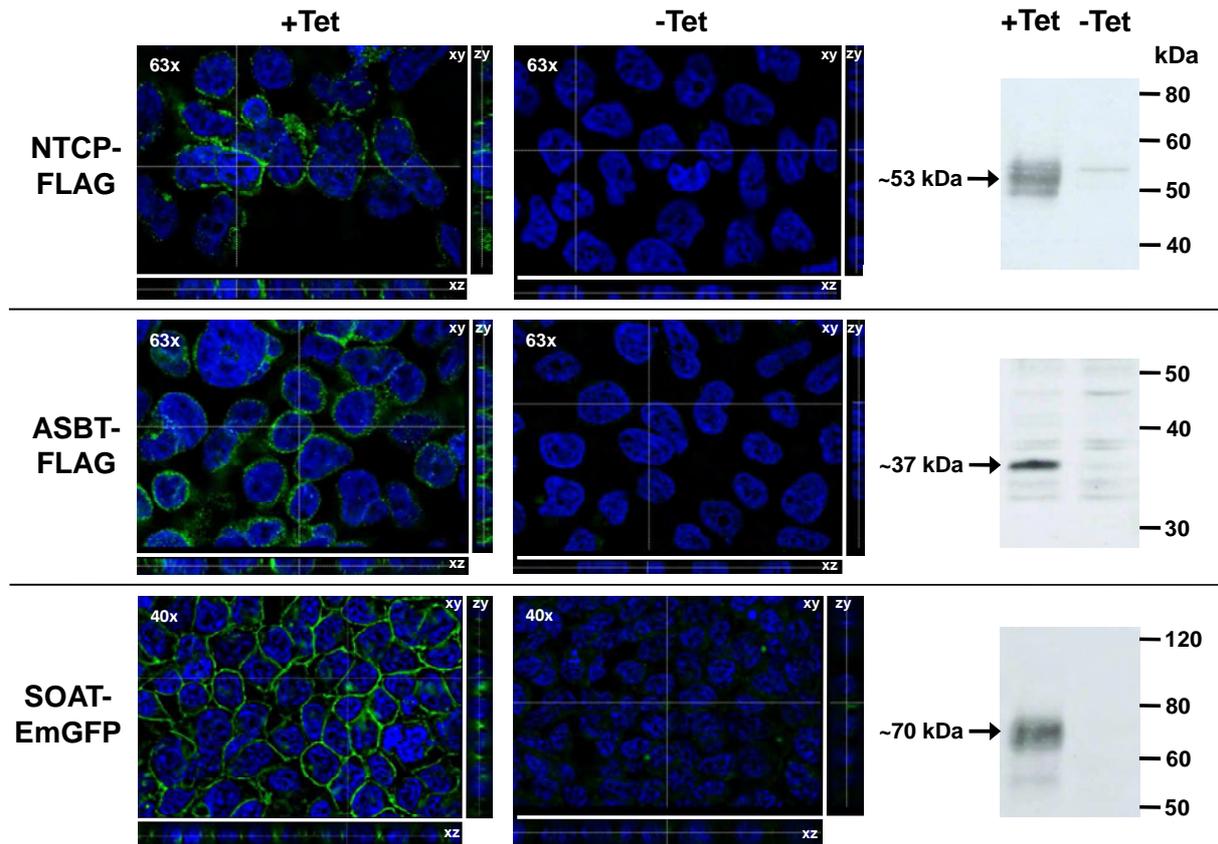
**Abb. 4.6: Kontrolle der stabilen HEK293 Zelllinien über quantitative Real-Time PCR.**

SOAT-HEK293 und Kontrollzellen (Flp-In T-REx 293) wurden für drei Tage mit bzw. ohne Tetrazyklin kultiviert und anschließend einer RNA-Isolierung unterzogen. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in die Real-Time PCR eingesetzt. ASBT-FLAG-HEK293 und NTCP-FLAG-HEK293 Zellen wurden für drei Tage mit Tetrazyklin induziert und mit dem *Cells-to-CT* Kit für die Real-Time PCR vorbereitet. (A) Amplifikationsplot der SOAT- und GAPDH-Detektion der Tetrazyklin-induzierten und nicht-induzierten SOAT-HEK293 Zellen sowie der Flp-In T-REx 293 Zellen (Kontrolle). Dargestellt ist der normalisierte *Reporter value* (delta Rn) gegen die Zyklenzahl. (B) Relative Expression der stabilen Konstrukte, berechnet nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Diese gibt die n-fache Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen an.

Alle generierten Zelllinien zeigten eine massive Überexpression des stabil integrierten Targets im Vergleich zu den nicht transfizierten Kontrollzellen. Überraschenderweise wiesen aber auch die nicht mit Tetrazyklin induzierten stabil transfizierten Zellen eine relativ hohe Expression (ca. 6000-fach) des integrierten Targets auf (Abb. 4.6). Damit wird deutlich, dass die Blockade der Promotoraktivität über den Tet-Repressor nicht zu 100 % effizient funktioniert. Aus diesem Grund wurde für viele der funktionellen Transportstudien die Ausgangszelllinie Flp-In T-REx 293 und nicht die stabilen Zellklone ohne Tetrazyklin-Induktion als Kontrolle verwendet.

#### 4.5.2 Nachweis des stabilen NTCP-FLAG, ASBT-FLAG und SOAT-EmGFP mit Immunfluoreszenz

Die stabile Transfektion der FLAG-markierten Konstrukte von ASBT und NTCP hatten den Vorteil, dass das Protein mit Antikörpern gegen das FLAG-Epitop in den stabil transfizierten Zellen nachgewiesen werden konnte. SOAT-EmGFP wurde durch direkte Fluoreszenz detektiert (Abb. 4.7).



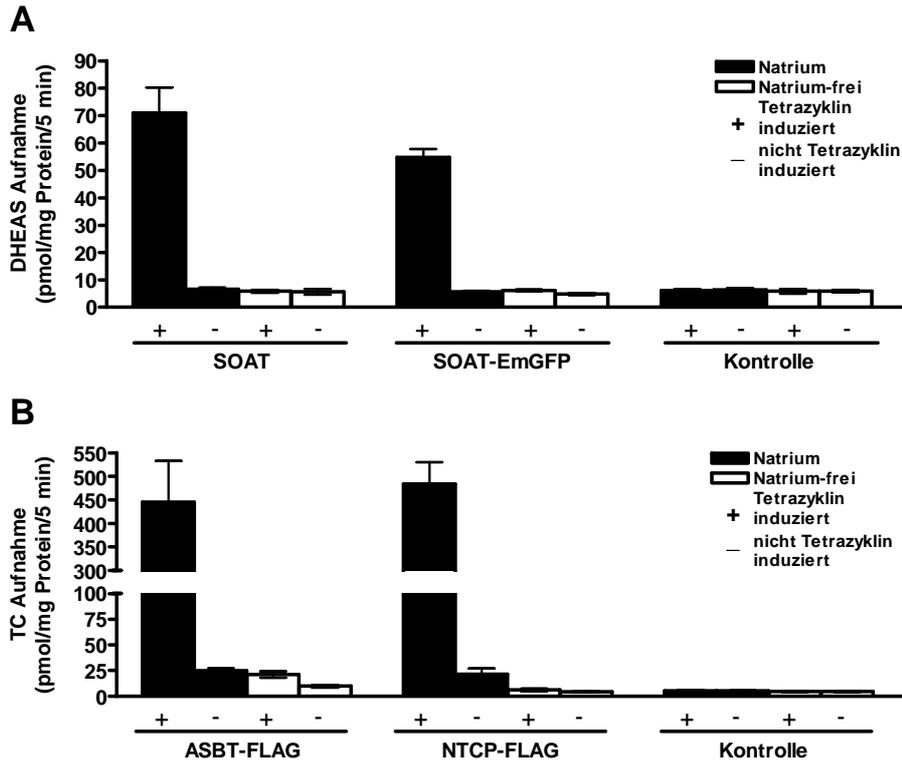
**Abb. 4.7: Nachweis des ASBT-FLAG, NTCP-FLAG und SOAT-EmGFP in stabil transfizierten HEK293 Zellen mittels Immunfluoreszenz und Western Blot.**

Für die Immunfluoreszenz wurden die stabilen ASBT-FLAG-, NTCP-FLAG- und SOAT-EmGFP-HEK293 Zellen in 24-well Schalen auf Deckgläschen kultiviert und drei Tage mit Tetrazyklin induziert oder nicht induziert (Kontrolle). Die Detektion des FLAG-Epitops erfolgte mit dem monoklonalen Maus anti-FLAG M2 Antikörper (1:40000, Sigma) und einem sekundären Alexa Fluor 488-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper (1:800, grün) (Invitrogen). SOAT-EmGFP konnte mittels direkter Fluoreszenz nachgewiesen werden (grün). Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Die Bilder wurden mittels automatischer Z-Fokussierung (Z-Stapel) in drei Ebenen aufgenommen um mit Hilfe einer 3D-Deconvolution Software nachberechnet. Dargestellt ist ein Einzelbild des aufgenommenen Z-Stapels (xy) mit entsprechenden xz- und zy-Ebenen, welche entlang der unterbrochenen Linien dargestellt wurden. Für den Western Blot wurden 15 µg Protein aus Zelllysaten der drei stabilen Zelllinien auf einem 10%igen (NTCP-FLAG, ASBT-FLAG) bzw. 8%igen (SOAT-EmGFP) denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Als Primärantikörper wurden der monoklonale Maus anti-FLAG M2 Antikörper (1:5000, Sigma) (NTCP-FLAG, ASBT-FLAG) bzw. der monoklonale Maus anti-GFP Antikörper (1:1000, Roche) (SOAT-EmGFP) eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente ein anti-Maus HRP-gekoppelter Antikörper (1:5000, GE Healthcare). Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz.

Die nicht-induzierten NTCP-FLAG, ASBT-FLAG und SOAT-EmGFP Zellen wiesen nur vereinzelt Fluoreszenzsignale auf. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Repression der Target-Transkription nicht komplett vom tetR unterdrückt wird. Unter Tetrazyklin-Induktion zeigte sich dagegen in nahezu 100 % aller Zellen ein membranassoziiertes Fluoreszenzsignal (Abb. 4.7). Der Nachweis des unmarkierten SOAT-Proteins war erst nach Generierung eines SOAT-Antiserums möglich (siehe Abb. 4.22). In Zelllysaten der induzierten und nicht-induzierten stabilen Zelllinien wurden die Fusionsproteine mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 4.7). Spezifische Signale waren jeweils nur in den Tetrazyklin-induzierten Zellen sichtbar. NTCP-FLAG zeigte ein dominantes Signal bei einem Molekulargewicht von ~53 kDa. Dies liegt sehr viel höher als das berechnete Molekulargewicht von 39,1 kDa (38,1 kDa NTCP plus 1 kDa FLAG-tag) und repräsentiert die glykosylierte Form des Proteins (Ananthanarayanan et al. 1994; Stieger et al. 1994; Mukhopadhyay et al. 1997; Shneider et al. 1997; Sun et al. 1998; Ho et al. 2004; Mareninova et al. 2005). Das scheinbare Molekulargewicht des ASBT-FLAG ~37 kDa stimmte dagegen mit der kalkulierten Größe von 38,5 kDa (37,5 kDa ASBT plus 1 kDa FLAG-tag) überein. Entsprechendes gilt für SOAT-EmGFP mit ~70 kDa (Western Blot) und 68,2 kDa (41,2 kDa SOAT plus 27 kDa EmGFP) (berechnet). Das SOAT<sub>2-17</sub>-Antiserum (siehe 3.11.1) zeigte keine spezifische Immunreaktion im Western Blot und konnte daher nicht zum Nachweis des SOAT-Proteins in dieser Anwendung herangezogen werden.

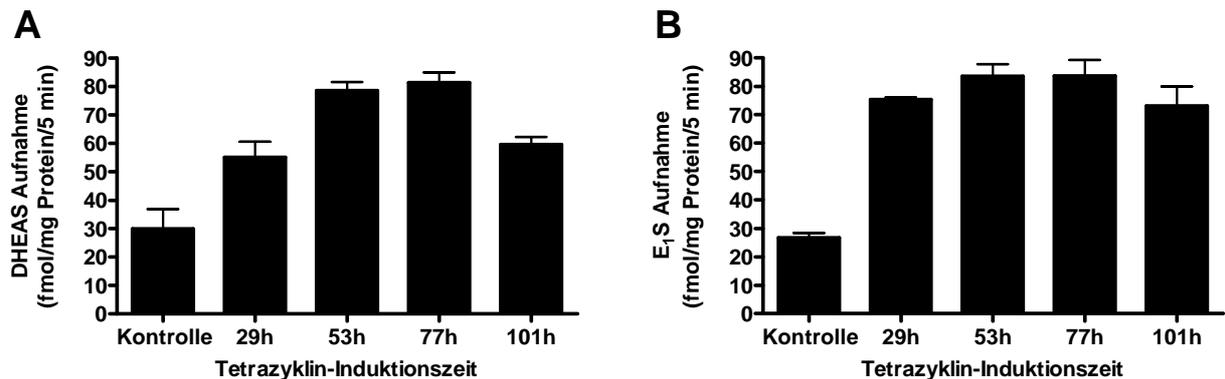
#### **4.5.3 Tetrazyklin-Induzierbarkeit der HEK293 Zelllinien**

Die Kontrolle der erfolgreichen stabilen Transfektion erfolgte zunächst über Transportversuche und der Überprüfung der Tetrazyklin-Induzierbarkeit der Proteinexpression. Alle vier Zelllinien ließen sich durch die Zugabe von Tetrazyklin in ihrem Transport stimulieren und zeigten eine eindeutige Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit (Abb. 4.8). Um den optimalen Zeitpunkt der Tetrazyklin-Induktion zu ermitteln, wurde die Aufnahme in Abhängigkeit von der Induktionszeit untersucht (Abb. 4.9). Bereits 29 h nach der Induktion mit Tetrazyklin war ein deutlicher Anstieg der Transportrate zu erkennen. Diese stieg bis zu einer Induktionszeit von 77 h (DHEAS), bzw. blieb konstant (E<sub>1</sub>S). Nach 101 h Induktion nahm die Aufnahme wieder ab. Somit lag der optimale Zeitpunkt für die Transportversuche bei einer Induktionszeit von zwei bis drei Tagen. Daher wurden alle Transportversuche mit den stabilen Zelllinien drei Tage nach der Induktion durchgeführt.



**Abb. 4.8: Aufnahme von TC (1  $\mu$ M) und DHEAS (1  $\mu$ M) in Tetrazyklin-induzierte (+) und nicht-induzierte (-) stabil transfizierte HEK293 Zelllinien.**

Stabil transfizierte SOAT-, SOAT-EmGFP-, ASBT-FLAG- und NTCP-FLAG-HEK293 Zellen sowie Kontrollzellen wurden für drei Tage mit Tetrazyklin induziert (+) oder nicht-induziert (-). Anschließend erfolgte die Aufnahme von 1  $\mu$ M [ $^3$ H]DHEAS in SOAT-HEK293, SOAT-EmGFP-HEK293 und Kontrollzellen (A) und 1  $\mu$ M [ $^3$ H]TC in ASBT-FLAG-HEK293, NTCP-FLAG-HEK293 und Kontrollzellen (B) für 5 min bei 37°C in Natrium-haltigem (■) und Natrium-freiem (□) Transportpuffer. Nach Waschen der Zellen und Zellyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Angegeben sind die MW  $\pm$  SD eines repräsentativen Experiments in Vierfachbestimmung.

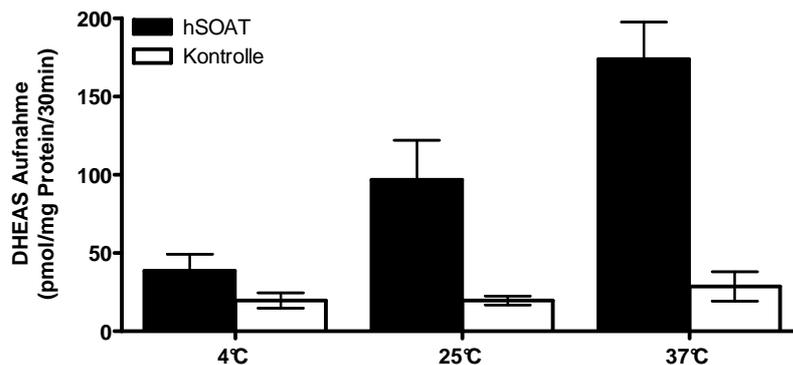


**Abb. 4.9: Aufnahme von DHEAS und E<sub>1</sub>S in SOAT-HEK293 Zellen in Abhängigkeit von der Tetrazyklin-Induktionszeit.**

SOAT-HEK293 Zellen wurden für 29, 53, 77 und 101 h mit Tetrazyklin induziert bzw. nicht induziert (Kontrolle). Die Inkubation erfolgte für 5 min mit 2,4 nM [ $^3$ H]DHEAS (A) oder 3 nM [ $^3$ H]E<sub>1</sub>S (B). Nach Waschen der Zellen und Zellyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Angegeben sind die MW  $\pm$  SD eines repräsentativen Experiments in Dreifachbestimmung.

#### 4.5.4 Temperaturabhängigkeit

Als weiteres Charakteristikum eines Membrantransports gilt die Abhängigkeit der Transportfunktion von der Temperatur. Bei niedrigen Temperaturen ist die Transportfunktion erwartungsgemäß gering und die Substrataufnahme nimmt entsprechend ab. Unspezifische Bindungen gelten dagegen als temperaturunabhängig.



**Abb. 4.10: Aufnahme von DHEAS (2,5  $\mu$ M) in SOAT-HEK293 und Kontrollzellen in Abhängigkeit von der Temperatur.**

SOAT-HEK293 (■) und Kontrollzellen (□) wurden 30 min mit 2,5  $\mu$ M [ $^3$ H]DHEAS bei 4°C, 25°C und 37°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zellyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Angegeben sind die MW  $\pm$  SD von zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Dieses Prinzip ließ sich experimentell auch für den humanen SOAT zeigen: Die Aufnahme von DHEAS nahm mit sinkender Temperatur ab. Dagegen blieb die unspezifische Bindung, gemessen an den nicht SOAT-exprimierenden Kontrollzellen, bei allen Temperaturen gleich (Abb. 4.10).

## 4.6 Funktionelle Charakterisierung des humanen SOAT

Nach Etablierung der stabilen Tetrazyklin-induzierbaren SOAT-HEK293 Zelllinie folgte die funktionelle Charakterisierung des humanen SOAT-Proteins.

### 4.6.1 Substratscreening

Das Substratspektrum des humanen SOAT wurde überprüft, indem die Aufnahme verschiedener radioaktiv-markierter steroidaler Substanzen in die Tetrazyklin-induzierbaren SOAT-HEK293 Zellen getestet wurde (Tab. 4.2). Die SOAT-HEK293 Zellen zeigten keine Aufnahme der unkonjugierten Steroide Estron und DHEA, der glucuronidierten Steroide Estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronid und Estron-3 $\beta$ -D-glucuronid sowie aller getesteten Gallensäuren (Tauro-

cholat, Cholat, Chenodeoxycholat, Deoxycholat und Lithocholat) und der Herzglykoside Ouabain und Digoxin.

**Tab. 4.2: Aufnahme verschiedener [<sup>3</sup>H]- und [<sup>14</sup>C]-markierter Substanzen in SOAT-HEK293 Zellen.**

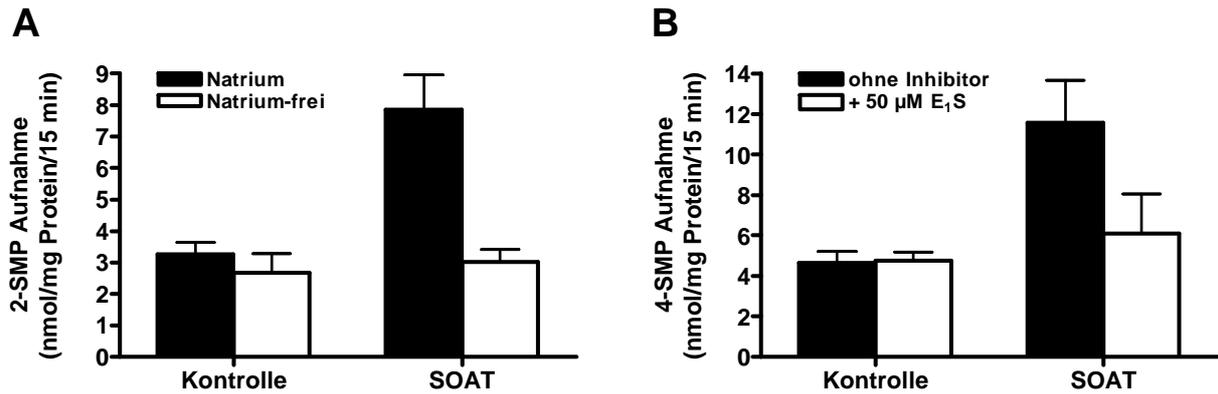
SOAT-HEK293 Zellen und Flp-In T-REx 293 Zellen (Kontrolle) wurden mit verschiedenen radioaktiv-markierten Substanzen für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zelllyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Angegeben sind die MW ± SD von zwei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung.

Substanz	SOAT-HEK293 (pmol/mg Protein/ 10 min)	Kontrolle (pmol/mg Protein/ 10 min)	Ratio (SOAT/Kontrolle)
DHEAS [0,2 µM]	13,1 ± 1,7	1,1 ± 0,1	12,2*
E <sub>1</sub> S [0,2 µM]	10,2 ± 1,3	0,8 ± 0,1	12,1*
PREGS [0,2 µM]	146,1 ± 16,0	19,5 ± 9,0	7,5*
TLCS [0,35 nM]	14,83 ± 2,8	9,1 ± 1,5	1,6*
Estron [1 µM]	21,5 ± 1,3	21,7 ± 1,7	1,0
Dehydroepiandrosteron [1 µM]	31,0 ± 3,2	33,4 ± 1,8	0,9
Estradiol-17β-D-glucuronid [1 µM]	4,8 ± 1,6	4,4 ± 1,3	1,1
Estron-3β-D-glucuronid [1 µM]	17,3 ± 6,6	15,9 ± 6,2	1,1
Taurocholat [1 µM]	1,7 ± 0,7	1,8 ± 0,5	1,0
Cholat [2,5 µM]	20,5 ± 10,7	21,0 ± 5,8	1,0
Chenodeoxycholat [2,5 µM]	387,1 ± 92,9	414,6 ± 121,8	0,9
Deoxycholat [2,5 µM]	124,9 ± 11,9	124,3 ± 6,0	1,0
Lithocholat [2,5 µM]	281,4 ± 51,0	311,0 ± 27,0	0,9
Ouabain [1 µM]	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,0
Digoxin [1 µM]	6,2 ± 0,8	6,2 ± 0,2	1,0

\*statistisch signifikant mit p < 0,01

Eine statistisch signifikante Aufnahme wurde für die sulfatierten Steroide DHEAS, E<sub>1</sub>S und PREGS mit Ratios von 12,2, 12,1 und 7,5 nachgewiesen. Auch die sulfatierte Gallensäure Tauroolithocholat-3-sulfat (TLCS) wurde als Substrat des SOAT identifiziert. Die Transportrate betrug das 1,6-fache der Bindung an die Kontrollzellen.

In Hemmstudien (siehe 4.6.4) wurden 2-Sulfooxymethylpyren (2-SMP) und 4-Sulfooxymethylpyren (4-SMP) als Inhibitoren des SOAT-vermittelten DHEAS-Transports identifiziert. Leider war es nicht möglich, die direkte Aufnahme dieser Substanzen zu messen, da beide Substanzen nicht als Radioliganden zur Verfügung stehen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Glatt am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE) in Potsdam-Rehbrücke, wurde die intrazelluläre Akkumulation dieser beiden Substanzen über eine HPLC-basierte Methode mit Fluoreszenzdetektion ermittelt, welche in unserem Labor nicht etabliert ist. Im Rahmen dieser Kooperation war es möglich, eine Na<sup>+</sup>-abhängige Aufnahme von 2-SMP und 4-SMP in die SOAT-HEK293 Zellen nachzuweisen (Abb. 4.11) (Geyer et al. 2007). Die Aufnahme von 4-SMP war durch ein weiteres Substrat des SOAT, E<sub>1</sub>S, hemmbar.

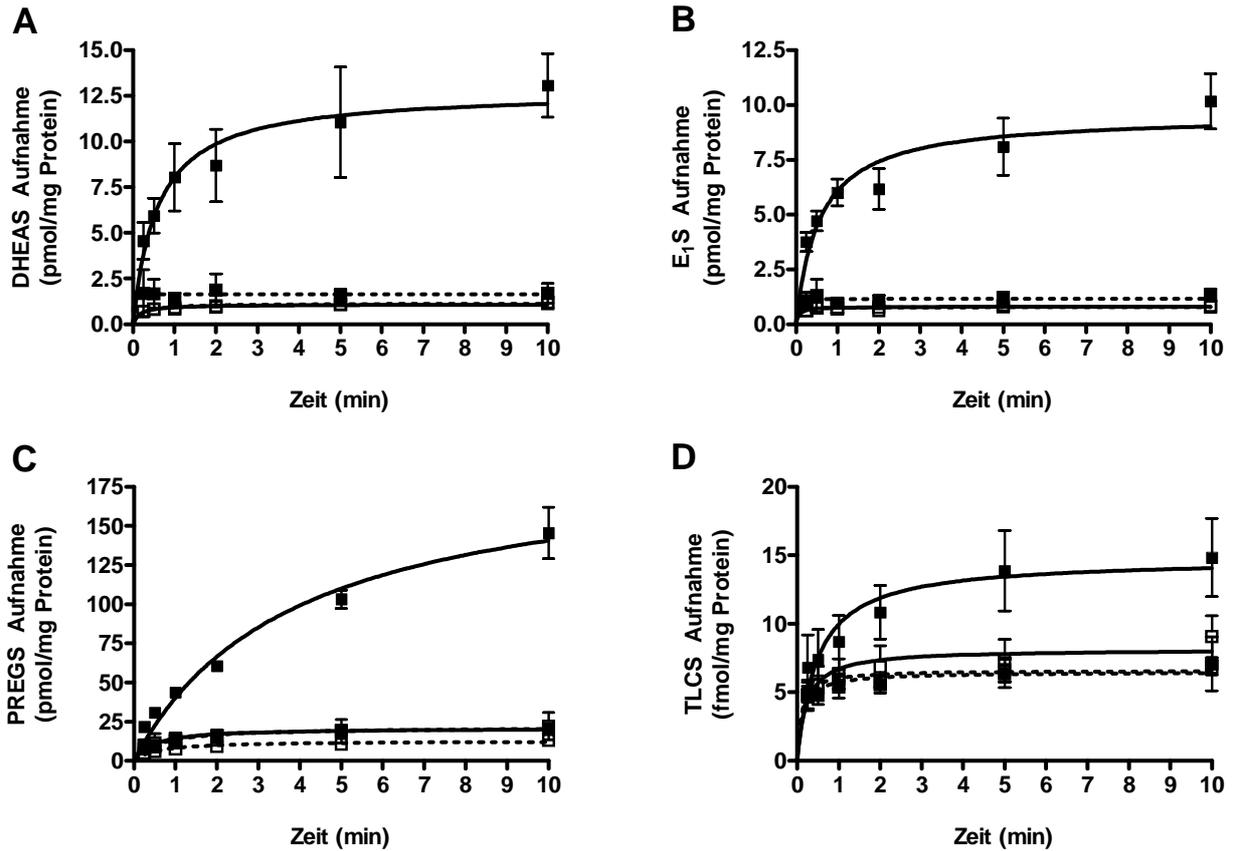


**Abb. 4.11: Na<sup>+</sup>-abhängige Aufnahme von 2-SMP und Aufnahme und Hemmung von 4-SMP in SOAT-HEK293 Zellen.**

(A) Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 und Kontrollzellen wurden mit 10 µM 2-SMP in Na<sup>+</sup>-Transportpuffer (■) und Na<sup>+</sup>-freiem Transportpuffer (□) für 15 min bei 37°C inkubiert. (B) Aufnahme von 10 µM 4-SMP in Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 und Kontrollzellen ohne Inhibitor (■) und mit 50 µM E<sub>1</sub>S als Inhibitor (□) für 15 min bei 37°C. Nach Waschen der Zellen erfolgte die Bestimmung der 2-SMP und 4-SMP Aufnahme durch HPLC-Analyse mit Fluoreszenzdetektion (siehe Geyer et al. 2007). Dargestellt sind die MW ± SE von drei unabhängigen Versuchen.

#### 4.6.2 Zeit- und Natriumabhängigkeit des SOAT-Transports

Die Aufnahme der identifizierten Substrate DHEAS, E<sub>1</sub>S, PREGS und TLCS wurde in Abhängigkeit der Zeit und der Anwesenheit von Natrium im Transportpuffer untersucht (Abb. 4.12). Die Kontrollzellen zeigten sowohl in Natrium-freiem als auch in Natrium-haltigem Transportpuffer keine spezifische Aufnahme über die Zeit von 10 min. Die SOAT-exprimierenden Zellen verloren in Abwesenheit von Natrium ihre Transportaktivität vollständig und wiesen nur eine geringe unspezifische Bindung, vergleichbar den Kontrollzellen auf. In Natrium-haltigem Transportpuffer transportierten die SOAT-Zellen alle vier Substrate. Die Aufnahme der Substrate verlief bis zu 1 min nahezu linear und ging danach in eine Sättigung über, welche für DHEAS, E<sub>1</sub>S und TLCS nach 5 min und für PREGS erst nach 10 min erreicht wurde.

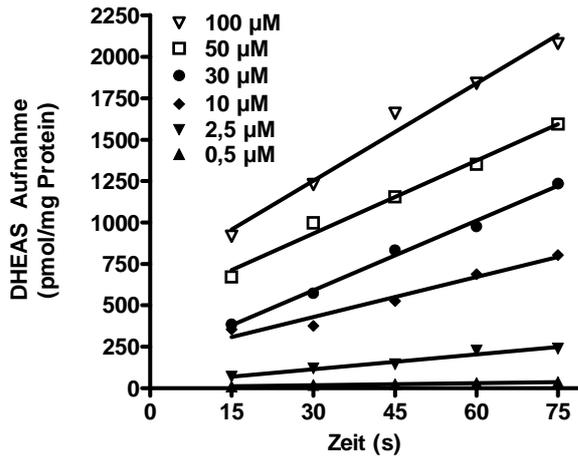


**Abb. 4.12: Zeit- und Na<sup>+</sup>-abhängiger Transport von Steroidsulfaten in SOAT-HEK293 Zellen.**

Aufnahme von 200 nM DHEAS (A), 200 nM E<sub>1</sub>S (B), 200 nM PREGS (C) und 0,35 nM TLCS (D) in SOAT-HEK293 (■) und Kontrollzellen (□) mit Natrium (—) und ohne Natrium (---) im Transportpuffer zu den angegebenen Zeitpunkten. Nach Waschen der Zellen und Zellyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Dargestellt sind die MW ± SD von zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

### 4.6.3 Kinetiken der SOAT-vermittelten Aufnahme

Die Bestimmung der initialen Aufnahmegeschwindigkeit wurde für das Substrat DHEAS ausgiebig untersucht. Bei den eingesetzten Konzentrationen von 0,5 μM bis 100 μM DHEAS zeigte sich dabei über 75 s eine lineare Aufnahme in die SOAT-HEK293 Zellen (Abb. 4.13). Die Bestimmung der konzentrationsabhängigen Aufnahme der sulfatierten Steroidhormone DHEAS, E<sub>1</sub>S und PREGS erfolgte bei 1 min, da sich zu diesem Zeitpunkt der Transport noch in der linearen Anfangsphase befand.



**Abb. 4.13: Initiale Aufnahmegeschwindigkeit von DHEAS in SOAT-HEK293 Zellen.**

Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 Zellen wurden für 15, 30, 45, 60 und 75 s mit den angegebenen Konzentrationen [<sup>3</sup>H]DHEAS bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zellyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Die Werte entsprechen den Mittelwerten einer Doppelbestimmung eines repräsentativen Experiments.

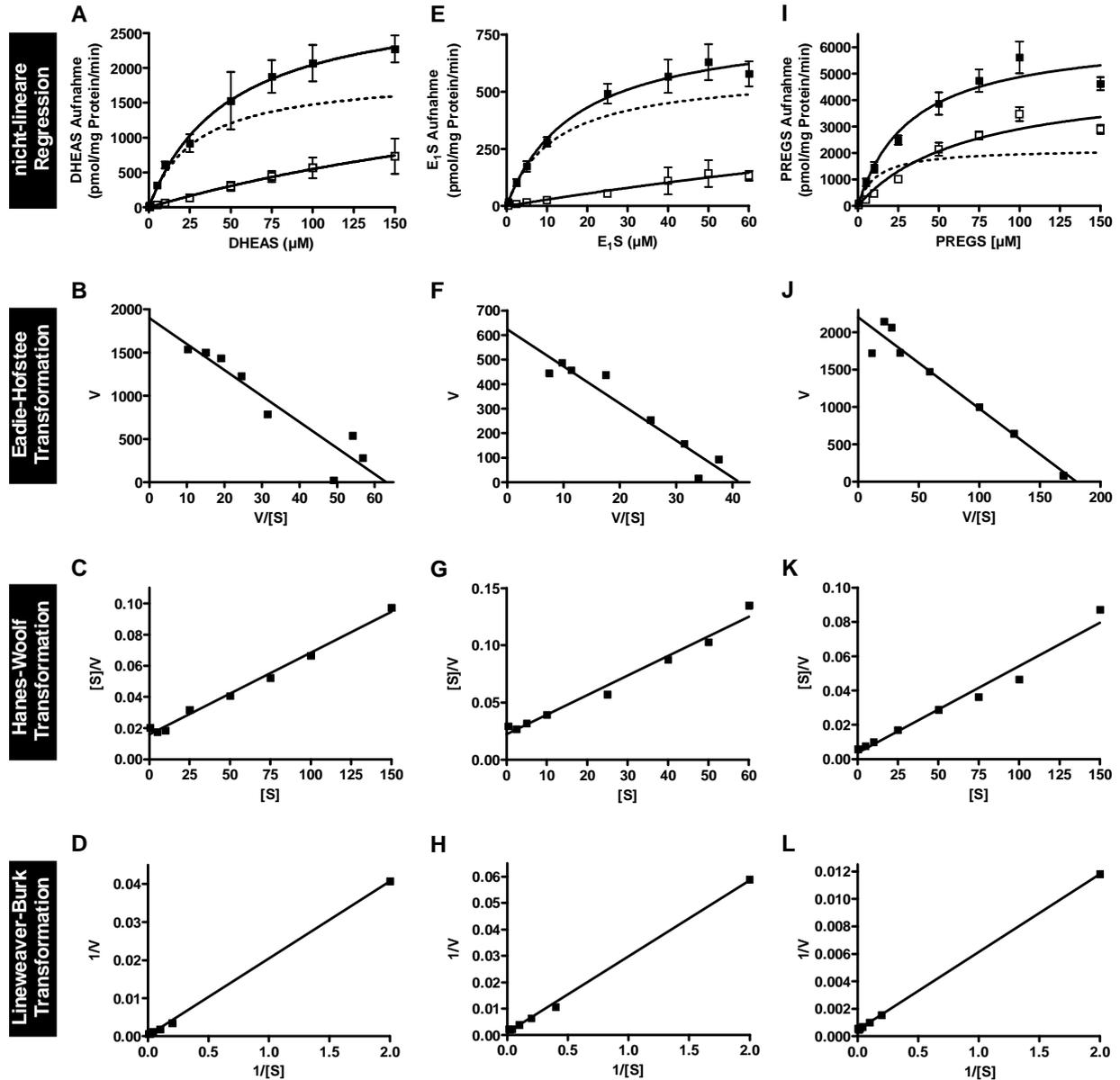
Der direkte Auftrag der Transportrate gegen die Substratkonzentration resultierte bei allen Substraten in einem Sättigungsverlauf, welcher charakteristisch für eine Michaelis-Menten-Kinetik ist (Abb. 4.14: A, E, I). Aus den spezifischen Aufnahmen der SOAT-HEK293 Zellen wurden über eine nicht-lineare Regressionsanalyse die kinetischen Parameter  $K_m$  (Michaelis-Menten-Konstante) und  $V_{max}$  (maximale Aufnahmegeschwindigkeit) der Substrate berechnet (Tab. 4.3). Linearisierungsverfahren wie die Eadie-Hofstee (Abb. 4.14: B, F, J), Hanes-Woolf (Abb. 4.14: C, G, K) und Lineweaver-Burk Transformation (Abb. 4.14: D, H, L) wurden ebenfalls genutzt, um die Konzentrations-Abhängigkeiten zu visualisieren und die kinetischen Parameter vergleichend zu berechnen. Tab. 4.3 gibt einen Überblick, über die mit den verschiedenen Verfahren berechneten  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte.

**Tab. 4.3: Kinetische Parameter der SOAT-vermittelten Aufnahme von DHEAS, E<sub>1</sub>S und PREGS.**

Die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  der konzentrationsabhängigen SOAT-spezifischen Aufnahme wurden mittels nicht-linearer Regression nach Michaelis-Menten sowie Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf und Lineweaver-Burk Transformation ermittelt.

Substrat	nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten		Eadie-Hofstee Transformation		Hanes-Woolf Transformation		Lineweaver-Burk Transformation	
	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$
DHEAS	28,7 ± 3,9	1899 ± 81	30,1 ± 4,5	1897 ± 166	30,3	1906	84,9	4201
E <sub>1</sub> S	12,0 ± 2,3	585 ± 34	15,1 ± 1,9	623 ± 46	13,1	585	28,5	993
PREGS	11,3 ± 3,0	2168 ± 134	12,2 ± 1,2	2201 ± 106	7,3	1976	12,7	2236

$K_m$ -Werte sind in µM,  $V_{max}$ -Werte in pmol/mg Protein/min angegeben. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte wie unter Abb. 4.14 angegeben.

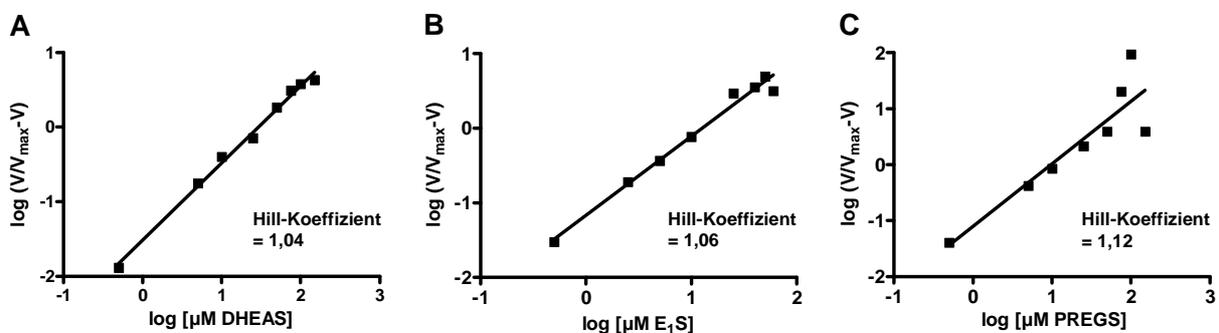


**Abb. 4.14: Konzentrationsabhängige Aufnahme von DHEAS, E<sub>1</sub>S und PREGS in SOAT-HEK293 Zellen.**

Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 (■) und Kontrollzellen (□) wurden für 1 min mit den angegebenen Konzentrationen [<sup>3</sup>H]DHEAS, [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S und [<sup>3</sup>H]PREGS bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zellyse wurde die zellassozierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. (A, E, I) Nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten. Dargestellt sind die MW ± SD von zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die SOAT-spezifische Aufnahme (----) wurde durch Subtraktion der unspezifischen Aufnahme von der Aufnahme in die SOAT-HEK293 Zellen ermittelt. Aus der SOAT-spezifischen Aufnahme erfolgte die Berechnung der kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 4*. (B, F, J) Eadie-Hofstee Transformation der SOAT-spezifischen Aufnahme. Der  $K_m$ -Wert lässt sich aus der negativen Steigung der Regressionsgeraden ableiten.  $V_{max}$  ist als Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse definiert. (C, G, K) Hanes-Woolf Transformation der SOAT-spezifischen Aufnahme. Der Anstieg der Regressionsgeraden beträgt  $1/V_{max}$ , der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse  $K_m/V_{max}$ . (D, H, L) Lineweaver-Burk Transformation der SOAT-spezifischen Aufnahme. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse entspricht  $-1/K_m$ , der mit der y-Achse  $1/V_{max}$ . V gibt jeweils die Aufnahme bei den entsprechenden Substratkonzentrationen [S] an.

Die höchste Affinität zu SOAT (entspricht niedrigstem  $K_m$ -Wert) und auch die höchste Transportrate hat in allen Berechnungen PREGS.  $E_1S$  hat eine höhere Affinität zu SOAT als DHEAS, wird aber mit einer geringeren Kapazität als DHEAS transportiert. Die kinetischen Parameter stimmen zwischen den unterschiedlichen Berechnungen gut überein. Die nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten stellt dabei die genaueste Methode dar. Daher wurden die mit dieser Regression ermittelten Werte für alle weiteren Vergleiche herangezogen.

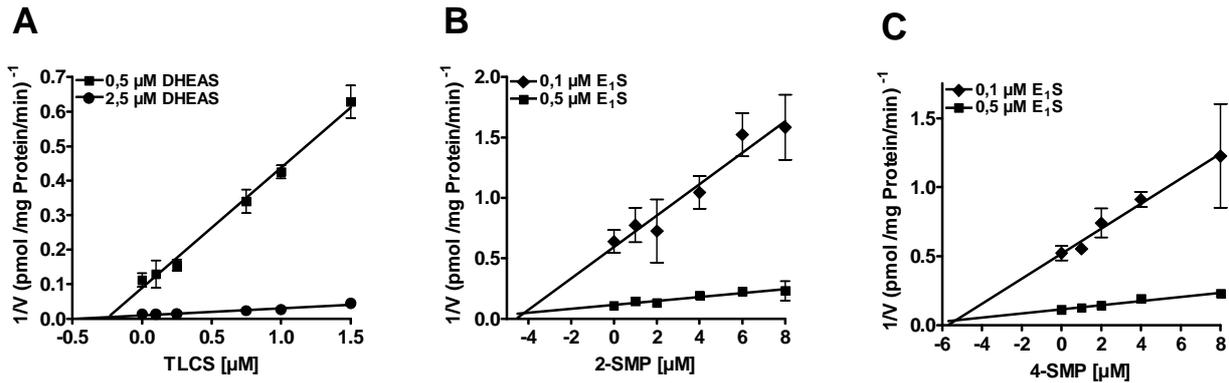
Die Transformation der spezifischen Aufnahme nach Hill (Abb. 4.15) ergaben Hill-Koeffizienten von 1,04 für DHEAS, 1,06 für  $E_1S$  und 1,12 für PREGS, was auf eine einzelne oder nicht-interagierende Bindungsstelle hinweist.



**Abb. 4.15: Transformation der konzentrationsabhängigen SOAT-spezifischen Aufnahme nach Hill.**

Die SOAT-spezifische Aufnahme der Substrate wurde, wie unter Abb. 4.14 beschrieben, bestimmt. Die Steigung der Regressionsgeraden entspricht dem Hill-Koeffizienten.  $V$  gibt die Aufnahme bei den entsprechenden Substratkonzentrationen an,  $V_{max}$  entspricht der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit.

Für die Substrate TLCS sowie 2-SMP und 4-SMP konnte keine direkte Aufnahmekinetik bestimmt werden, da die vorhandene Menge radioaktiv-markierter Substanz nicht ausreichend war bzw. der analytische Aufwand zu hoch gewesen wäre. Stattdessen wurde für diese Substanzen jeweils die Hemmkonstante  $K_i$  bestimmt (Abb. 4.16). Die Hemmung des DHEAS-Transports durch TLCS wurde in unserem Institut durchgeführt. Die Bestimmung der  $K_i$ -Werte für 2-SMP und 4-SMP erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Glatt am DIfE in Potsdam-Rehbrücke. Die  $K_i$ -Werte betragen für TLCS  $0,24 \mu M$ , für 2-SMP  $4,3 \mu M$  und für 4-SMP  $5,5 \mu M$ . Demnach scheinen diese Substanzen eine höhere Affinität zu SOAT zu haben, als die sulfatierten Steroide PREGS,  $E_1S$  und DHEAS.



**Abb. 4.16: Bestimmung der  $K_i$ -Werte für TLCS, 2-SMP und 4-SMP durch Hemmung des SOAT-vermittelten Transports von DHEAS bzw.  $E_1S$ .**

(A) Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 Zellen wurden für 30 s mit den angegebenen Konzentrationen TLCS (Inhibitor) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme von 2,5  $\mu M$  [ $^3H$ ]DHEAS ( $\bullet$ ) und 0,5  $\mu M$  [ $^3H$ ]DHEAS ( $\blacksquare$ ) in Anwesenheit des Inhibitors für 5 min bei 37°C. (B, C) Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 Zellen wurden für 2 min bei 37°C mit 0, 1  $\mu M$  [ $^3H$ ]E $_1S$  ( $\blacklozenge$ ) und 0,5  $\mu M$  [ $^3H$ ]E $_1S$  ( $\blacksquare$ ) und steigenden Konzentrationen 2-SMP (B) und 4-SMP (C) inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zelllyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. In den Dixon-Plots gibt der x-Wert am Schnittpunkt der beiden Regressionsgeraden  $-K_i$  an. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD eines repräsentativen Experiments in Dreifachbestimmung.

#### 4.6.4 *Cis*-Hemmungen

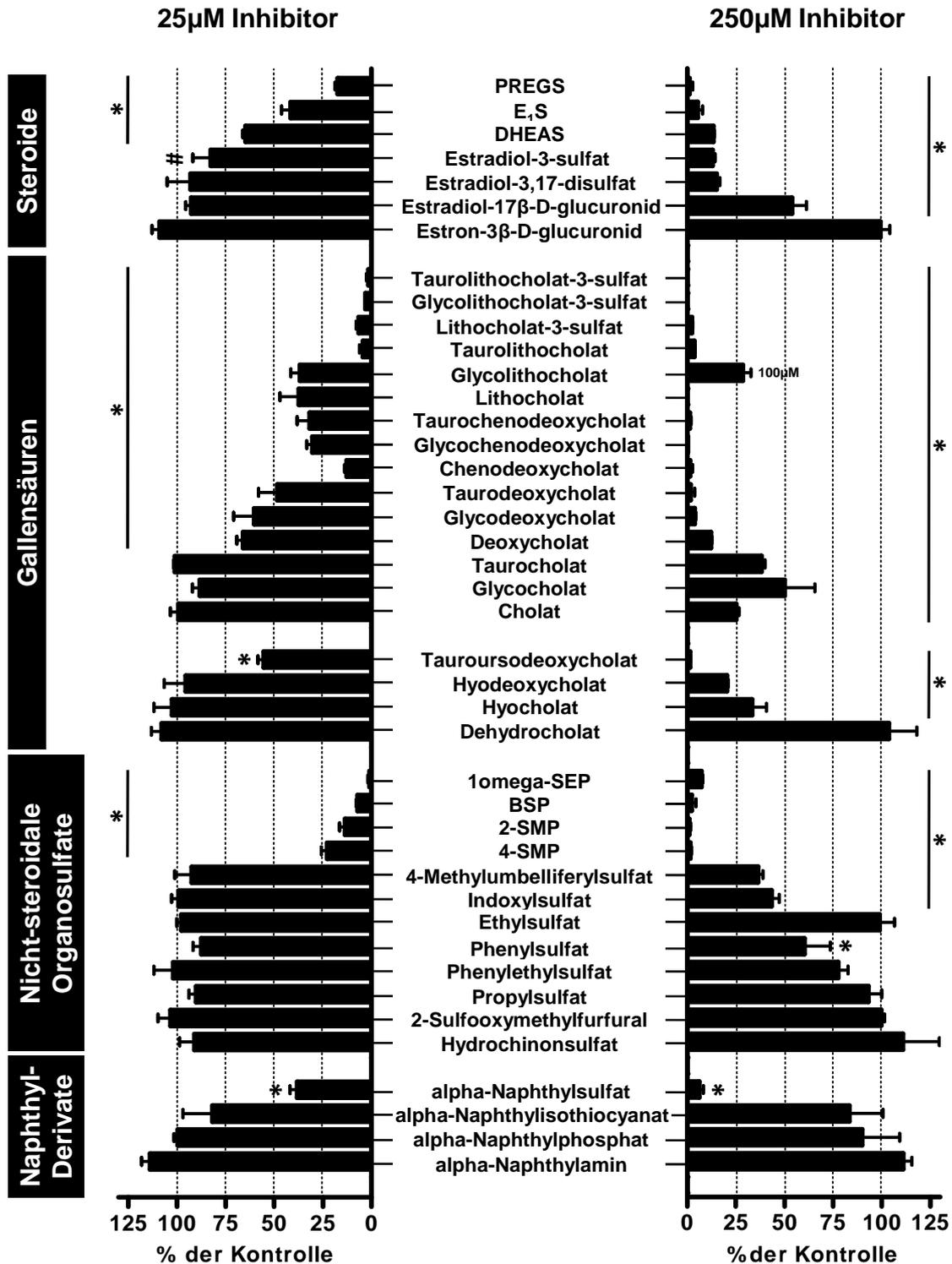
Die Identifizierung von weiteren Substraten des SOAT wurde dadurch limitiert, dass nur eine begrenzte Anzahl radioaktiv-markierter Substanzen zur Verfügung standen. Um weitere mit dem SOAT interagierende Substanzen zu identifizieren, wurden daher verschiedene *cis*-Hemmungen durchgeführt. Dies bedeutet, dass die Aufnahme eines radioaktiv-markierten Substrats in Anwesenheit nicht-markierter Substanzen, Inhibitoren, untersucht wurde (Abb. 4.17).

Zunächst wurde der Einfluss konjugierter Steroide untersucht. Alle Substrate des SOAT (PREGS,  $E_1S$ , DHEAS) führten zu einer signifikanten Reduktion der DHEAS-Aufnahme. Die Hemmwirkung der Substrate entsprach auch den Affinitäten, welche durch die  $K_m$ -Werte bestimmt wurden (siehe 4.6.3). Je niedriger die Affinität, desto weniger stark hemmte das Substrat den Transport. Somit ergab sich eine abnehmende Hemmwirkung von PREGS >  $E_1S$  > DHEAS. Im 10-fachen Konzentrationsüberschuss, bezogen auf die Molarität von Substrat und Inhibitor, hatte Estradiol-3-sulfat eine schwach signifikante Hemmwirkung auf den SOAT-Transport, wohingegen das Disulfat und die entsprechenden Glucuronide zu keiner Hemmung führten. In 100-fach molarem Überschuss (250  $\mu M$ ) hemmten dagegen alle konjugierten Steroide bis auf Estron-3 $\beta$ -D-glucuronid die Aufnahme signifikant. Dabei war die Hemmung durch Estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronid nicht so stark wie die Hemmwirkung der Sulfate. In der Gruppe der Gallensäuren bildeten die 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -Trihydroxy-Gallensäuren (Cholat, Glycocholat, Taurocholat) die schlechtesten Inhibitoren. Im 10-fach molaren Über-

schuss waren diese keine Inhibitoren des SOAT-vermittelten DHEAS-Transports. Im 100-fachen Überschuss zeigten jedoch auch diese Substanzen eine signifikante Hemmung, welche aber nicht so ausgeprägt ausfiel wie bei den anderen untersuchten Gallensäuren. Dihydroxy-Gallensäuren hemmten den SOAT-Transport signifikant, wobei die inhibitorische Potenz der 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -dihydroxylierten Gallensäuren (Chenodeoxycholat, Glycochenodeoxycholat, Taurochenodeoxycholat) höher war als die der 3 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -dihydroxylierten Gallensäuren (Deoxycholat, Glycodeoxycholat, Taurodeoxycholat). Auch die 3 $\alpha$ -Monohydroxy-Gallensäuren (Lithocholat, Glycolithocholat, Tauroolithocholat) zeigten eine starke Hemmung des SOAT-vermittelten Transports. Chenodeoxycholat war der potenteste Inhibitor unter den Dihydroxy-Gallensäuren. Allerdings wurde für die entsprechende [<sup>14</sup>C]-markierte Gallensäure, wie auch für [<sup>14</sup>C]Lithocholat, in direkten Transportexperimenten keine signifikante Aufnahme in SOAT-HEK293 Zellen gezeigt (Tab. 4.2). Den stärksten inhibitorischen Effekt riefen die an Position 3 sulfatierten Gallensäuren Lithocholat-3-sulfat, Glycolithocholat-3-sulfat und Tauroolithocholat-3-sulfat hervor. Fanden sich diese in 10-fach molarem Überschuss im Transportpuffer, sank die Aufnahme auf unter 10 % im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor. Diese Daten decken sich mit dem deutlich niedrigeren K<sub>i</sub>-Wert für Tauroolithocholat-3-sulfat (0,24  $\mu$ M) im Vergleich zum K<sub>m</sub>-Wert des DHEAS-Transports (28,7  $\mu$ M) (Tab. 4.3, Abb. 4.14, Abb. 4.16). Wie bereits erwähnt, wurde diese Gallensäure auch als Substrat des SOAT identifiziert (Tab. 4.2). Ein 100-facher molarer Überschuss der Mono- und Dihydroxy-Gallensäuren reduzierte den Transport fast komplett. Gar keine Hemmwirkung zeigten dagegen die Gallensäuren Dehydrocholat, Hyocholat und Hyodeoxycholat bei 25  $\mu$ M. Die beiden letztgenannten hatten jedoch bei 250  $\mu$ M eine Hemmwirkung. Tauroursodeoxycholat führte in beiden Konzentrationen zu einer signifikanten Abnahme des Transports.

Weiterhin wurde der Einfluss xenobiotischer nicht-steroidaler Organosulfate und Naphthylderivate auf den SOAT-vermittelten Transport untersucht. Von diesem Substanzset hatten nur folgende Substanzen in 10-fachem Überschuss eine signifikante inhibitorische Wirkung:

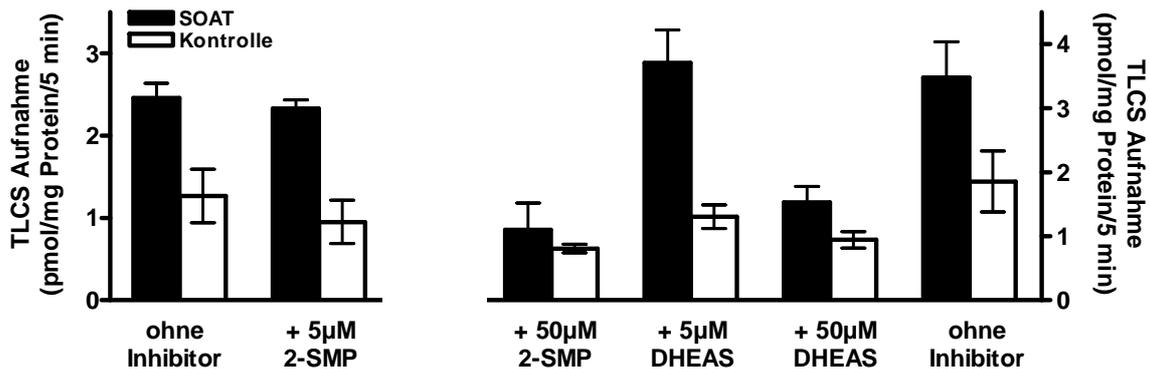
$\alpha$ -Naphthylsulfat < 4-SMP < 2-SMP < BSP < 1 $\omega$ -SEP (1omega-Sulfooxyethylpyrene). Die K<sub>i</sub>-Werte für 4-SMP und 2-SMP wurden wie bereits beschrieben, auf 5,5  $\mu$ M und 4,3  $\mu$ M bestimmt (Abb. 4.16). In einer Konzentration von 250  $\mu$ M zeigten zusätzlich auch Phenylsulfat, Indoxylsulfat und 4-Methylumbelliferylsulfat eine signifikante Inhibition des SOAT-Transports. Keinen Einfluss auf die Transportrate hatten dagegen Hydrochinonsulfat, 2-Sulfooxymethylfurfural, Propylsulfat, Phenylethylsulfat, Ethylsulfat,  $\alpha$ -Naphthylamin,  $\alpha$ -Naphthylphosphat und  $\alpha$ -Naphthylisothiocyanat.



**Abb. 4.17: Hemmung der SOAT-vermittelten DHEAS-Aufnahme mit Steroiden, Gallensäuren, nicht-steroidalen Organosulfaten und Naphthyl-derivaten.**

SOAT-HEK293 Zellen wurden 30 s mit 25 µM oder 250 µM Inhibitor bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme von 2,5 µM [<sup>3</sup>H]DHEAS in Anwesenheit des Inhibitors für 5 min bei 37°C. Als Positivkontrolle dienten SOAT-HEK293 Zellen, welche nicht mit einem Inhibitor inkubiert wurden. Nach Waschen der Zellen und Zelllyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale DHEAS-Aufnahme in Anwesenheit der Inhibitoren relativ zur Positivkontrolle (100 %). Die Werte geben den MW ± SD eines repräsentativen Experiments in Dreifachbestimmung an. \*, p<0,01; #, p<0,05, statistisch signifikanter Unterschied zur Positivkontrolle (one-way analysis of variance mit Dunnett *post hoc* Test).

Neben der Hemmung des DHEAS-Transports wurden auch Hemmungen der 4-SMP- und TLCS-Aufnahme durchgeführt. Die Aufnahme von 4-SMP konnte bereits durch einen 5-fachen molaren Überschuss an E<sub>1</sub>S komplett gehemmt werden (Abb. 4.11). Dagegen war der Transport von TLCS nicht mit einem 100-fachen, sondern erst mit einem 1000-fachen Überschuss an 2-SMP und DHEAS hemmbar (Abb. 4.18). Dies entspricht einer höheren Affinität von TLCS zum SOAT im Vergleich zu SMP und DHEAS.

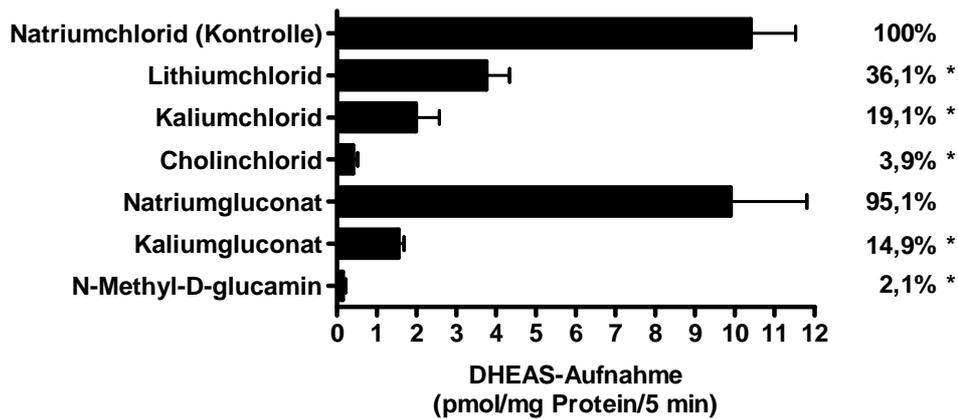


**Abb. 4.18: Hemmung der TLCS-Aufnahme in SOAT-HEK293 Zellen.**

Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 Zellen und Kontrollzellen wurden 30 s mit der angegebenen Konzentration Inhibitor vorinkubiert und anschließend in Anwesenheit des Inhibitors für 5 min bei 37°C mit 50 nM [<sup>3</sup>H]TLCS inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zellyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Dargestellt sind die MW ± SD repräsentativer Experimente in Dreifachbestimmung.

#### 4.6.5 Ionenselektivität und Natrium-Abhängigkeit

Um den Transportmechanismus des SOAT-Transports näher zu untersuchen, wurde die Aufnahme in die SOAT-HEK293 Zellen mit Transportpuffern untersucht, in denen eine Substitution von Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> gegen andere Kationen bzw. Anionen vorgenommen wurde (Abb. 4.19). Im Vergleich zur Aufnahme von DHEAS in Natrium-haltigem Transportpuffer (100 %) bewirkte der Austausch gegen Lithium und Kalium eine signifikante Reduktion des Transports. Jedoch blieben noch 36 % bzw. 19 % der Transportaktivität erhalten. Cholinchlorid und N-Methyl-D-glucamin waren dagegen nicht in der Lage, den Transport aufrecht zu erhalten. Ein Austausch von Chlorid in den Natrium- und Kaliumhaltigen Transportpuffern veränderte das Transportverhalten des SOAT nicht. Dies deutet darauf hin, dass der SOAT-Transport nicht Chlorid-, aber Natrium-abhängig ist.

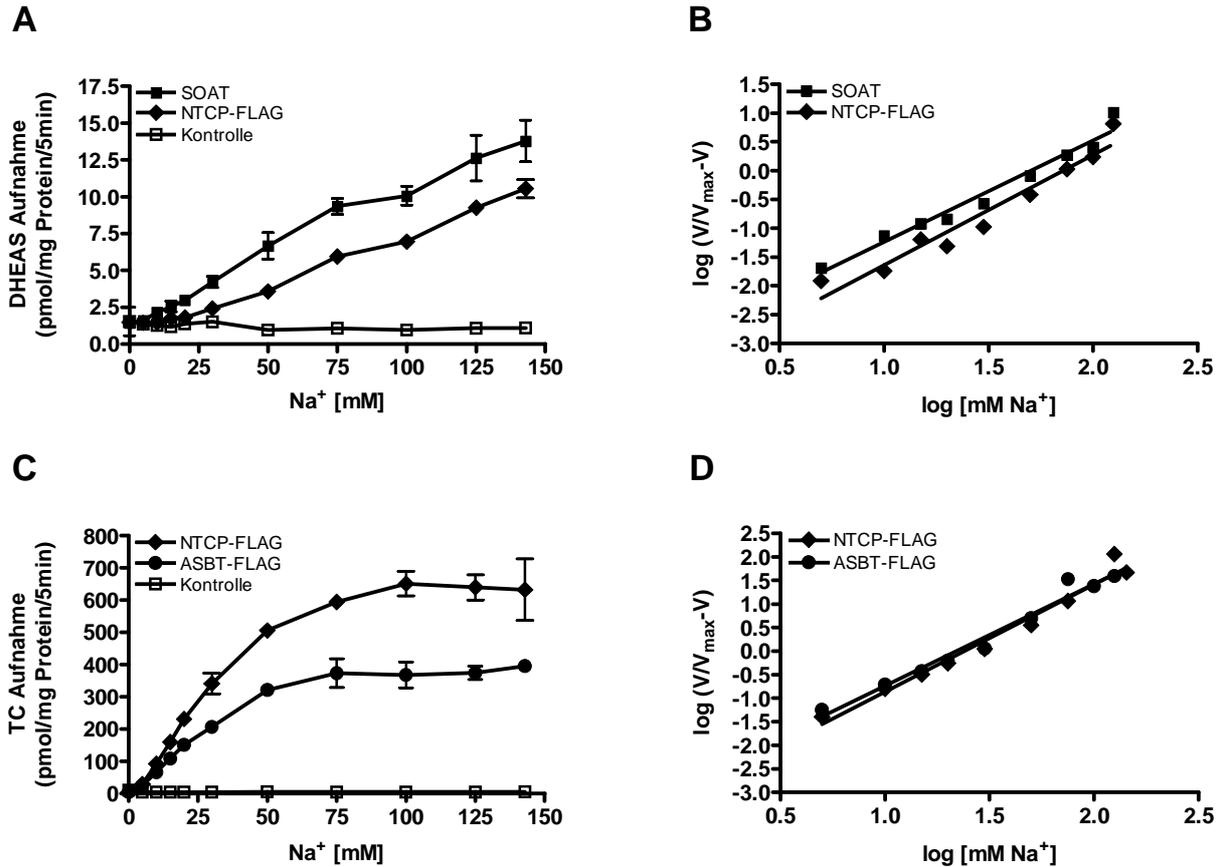


**Abb. 4.19: Einfluss equimolarer Substitution von NaCl auf die DHEAS-Aufnahme in SOAT-HEK293 Zellen.**

Die Aufnahme von 200 nM [<sup>3</sup>H]DHEAS in SOAT-HEK293 Zellen erfolgte für 5 min bei 37°C in Transportpuffern, in denen 142 mM NaCl (Kontrollexperiment) durch equimolare Konzentrationen Lithiumchlorid, Kaliumchlorid, Cholinchlorid, Natriumgluconat, Kaliumgluconat und N-Methyl-D-glucamin substituiert wurden. Nach Waschen der Zellen und Zellyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Angegeben sind die MW ± SD von zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die prozentuale Aufnahme im Vergleich zum Kontrollexperiment ist jeweils hinter den Balken angegeben. \*, p<0,01, statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollaufnahme (one-way analysis of variance mit Dunnett *post hoc* Test).

Um den Einfluss des Natriums näher zu untersuchen, wurde der DHEAS-Transport in Abhängigkeit der Na<sup>+</sup>-Konzentration ermittelt. Um Vergleiche zu den anderen funktionellen Transportern der SLC10-Familie herstellen zu können, wurden auch ASBT und NTCP in diesen Versuchsaufbau integriert (Abb. 4.20).

Die Aufnahme von DHEAS sowohl in SOAT-HEK293 als auch in NTCP-FLAG-HEK293 Zellen zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Na<sup>+</sup>-Konzentration und einen stetigen Anstieg bis 142 mM Na<sup>+</sup>. Bei dieser physiologischen Konzentration wurde keine Sättigungsphase erreicht. Der TC-Transport in NTCP-FLAG-HEK293 und ASBT-FLAG-HEK293 Zellen zeigte dagegen einen völlig anderen Verlauf: ASBT-FLAG erreichte schon bei ca. 50 mM Na<sup>+</sup>, NTCP-FLAG bei 75-100 mM eine Sättigung der Aufnahme. Damit führen für TC bereits subphysiologische Na<sup>+</sup>-Konzentrationen zu einer maximalen Transportaktivität. Besonders interessant bei diesen Untersuchungen war die Tatsache, dass NTCP für zwei Substratgruppen, sulfatierte Steroide und Gallensäuren, offensichtlich eine gänzlich unterschiedliche Na<sup>+</sup>-Affinität zeigte.



**Abb. 4.20: Aufnahme von DHEAS und TC in Abhängigkeit von der Na<sup>+</sup>-Konzentration.**

Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 (■), NTCP-FLAG-HEK293 (◆), ASBT-FLAG-HEK293 (●) und Kontrollzellen (□) wurden für 5 min mit 1 μM [<sup>3</sup>H]TC (A) und 200 nM [<sup>3</sup>H]DHEAS (B) bei 37°C inkubiert. Nach Waschen und Zelllyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Dargestellt sind die MW ± SD eines repräsentativen Experiments in Dreifachbestimmung. (B, D) Hill-Transformationen der Transporter-spezifischen Aufnahmen. Die Steigung der Regressionsgeraden ist der Hill-Koeffizient. V gibt die Aufnahme bei den entsprechenden Na<sup>+</sup>-Konzentrationen an, V<sub>max</sub> ist die maximale Aufnahme.

Wie bereits zuvor für den TC-Transport in humane *ileal Brush Border Membrane Vesicles* (BBMV) beschrieben (Barnard und Grishan 1987), wurde eine Hill-Plot der gemessenen Werte erstellt, um einen Eindruck davon zu bekommen, wie viele Na<sup>+</sup>-Ionen pro transportiertem Substrat (TC oder DHEAS) in den Transportzyklus einfließen. Die Anzahl der transportierten Na<sup>+</sup>-Ionen wird dabei über den Hill-Koeffizienten ermittelt, welcher der Steigung der Regressionsgeraden im Hill-Plot entspricht. Zur Berechnung des Hill-Koeffizienten wird die maximale Aufnahme herangezogen, welche in der Sättigung erreicht wurde. Obwohl die Aufnahme von DHEAS bei physiologischer Na<sup>+</sup>-Konzentration nicht gesättigt war, wurde die Hill-Berechnung dennoch mit eingeschränkter Aussagekraft für dieses Substrat durchgeführt. Die Hill-Koeffizienten des DHEAS-Transports betragen für SOAT 1,8 und für NTCP 1,9, die des TC-Transports für NTCP 2,3 und für ASBT 2,2. Dies lässt darauf schließen, dass trotz des unterschiedlichen Kurvenverlaufs zwischen TC- und DHEAS-Transport, 2 Na<sup>+</sup>-Ionen pro

Transportzyklus für ein Substrat benötigt werden. Dies wurde bereits für den TC-Transport über ASBT in CHO-Zellen mittels elektrophysiologischer Messungen etabliert (Weinman et al. 1998). Allerdings besteht für DHEAS, wie oben erwähnt, nur eine eingeschränkte Aussagekraft der berechneten Werte. Eine weitere in der Literatur beschriebene Methode zur Berechnung der Stöchiometrie des Transports ist eine modifizierte Form der Eadie-Hofstee Transformation, in welcher die Aufnahme gegen die Aufnahme/[Na<sup>+</sup>-Konzentration]<sup>n</sup> aufgetragen wird, wobei n der Aktivator:Substrat Stöchiometrie entspricht (Tab. 4.4). Diese Methode wurde bereits herangezogen, um die Stöchiometrie des TC-Transports über ASBT zu ermitteln (Craddock et al. 1998).

**Tab. 4.4: Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden eines Plots, in dem die Aufnahme (pmol/mg Protein/5 min) / [Na<sup>+</sup>-Konzentration]<sup>n</sup> gegen die Aufnahme (pmol/mg Protein/5 min) aufgetragen wurde.**

Substrat	Transporter	Korrelationskoeffizient für		
		n = 1	n = 2	n = 3
DHEAS	SOAT	0,1928	0,7147	0,3878
	NTCP-FLAG	0,8130	0,3880	0,2130
TC	NTCP-FLAG	0,1336	0,9795	0,6401
	ASBT-FLAG	0,3060	0,9393	0,5975

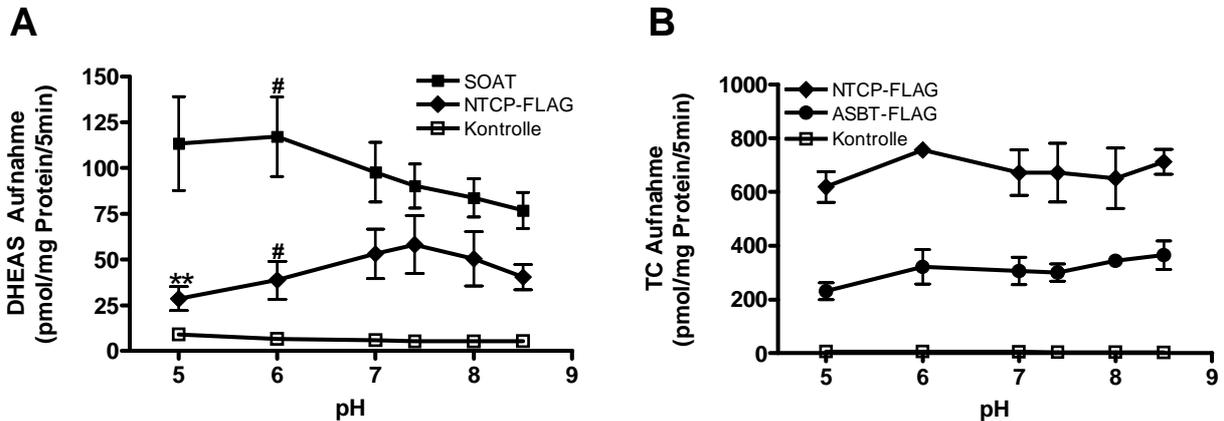
n = Aktivator:Substrat Stöchiometrie

Die fehlende Linearität (Werte <<1) für die Aufnahme von DHEAS über SOAT sowie von TC über NTCP und ASBT für ein „n = 1“ lässt die Beteiligung von mehr als einem Na<sup>+</sup> pro Transportzyklus für ein Substrat vermuten. In diesen Punkten ist die Berechnung in Übereinstimmung mit der zuvor geschilderten Hill-Kalkulation. Für NTCP zeigte diese Berechnung aber den besten Konsens mit einer 1:1 Stöchiometrie zwischen Substrat und Na<sup>+</sup>.

#### 4.6.6 pH-Abhängigkeit

Für Transportvorgänge haben die in der Substratbindungsdomäne und im Transportkanal befindlichen Aminosäuren und deren Ladung einen erheblichen Einfluss auf das Transportverhalten. Um den Einfluss geladener Aminosäuren auf das Transportverhalten zu ermitteln, wurde die Aufnahme von DHEAS und TC durch SOAT, NTCP und ASBT in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte untersucht (Abb. 4.21). Jeweils vergleichend zur Aufnahme bei pH 7,4 zeigte sich für die DHEAS-Aufnahme in SOAT-exprimierenden Zellen ein signifikanter Anstieg des Transports im sauren Bereich. Für NTCP wurde ein entgegengesetzter Zusammenhang ermittelt. Hier führte die pH-Absenkung zu einer signifikant verschlechterten Transportrate. Eine Alkalisierung des Transportpuffers zeigte weder bei SOAT noch NTCP-FLAG eine signifikante Veränderung. Allerdings ist der Trend zu einer sinkenden Transport-

rate zu erkennen. Das Transportoptimum für DHEAS erreicht SOAT im schwach sauren und der NTCP-FLAG im neutralen pH-Bereich. Der Transport von TC ist sowohl beim NTCP-FLAG als auch beim ASBT-FLAG nicht pH-abhängig. Damit zeigte der NTCP, wie auch schon bei der Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit, ein unterschiedliches Verhalten bei den beiden eingesetzten Substraten TC und DHEAS.



**Abb. 4.21: Aufnahme von 1  $\mu\text{M}$  DHEAS (A) und 1  $\mu\text{M}$  TC (B) in Abhängigkeit von dem pH-Wert.** Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 (■), NTCP-FLAG-HEK293 (◆), ASBT-FLAG-HEK293 (●) und Kontrollzellen (□) wurden 5 min mit 1  $\mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H]DHEAS (A) und 1  $\mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H]TC (B) bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zelllyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD von zwei Experimenten in Vierfachbestimmung. \*\*,  $p < 0,001$ ; #,  $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied zur Aufnahme bei pH 7,4 (one-way Analysis of variance mit Bonferroni's Multiple Comparison *post hoc* Test).

## 4.7 Membranexpression und -topologie

Mittels verschiedener bioinformatischer Programme lassen sich Vorhersagen zur Topologie transmembranärer Proteine machen. Die Sequenz des humanen SOAT wurde dazu mit 13 verschiedenen Algorithmen analysiert (Tab. 4.5).

TMAP, PSORT II, ConPred II, MEMSAT, PRED-TMR2, TMHMM, TMpred, TopPred (GES-scale) und SOSUI berechneten eine Membrantopologie mit acht Transmembrandomänen (TMD). Bis auf PSORT II wurde von allen Programmen eine extrazelluläre Lokalisation der C- und N-Termini vorhergesagt. TMAP, PRED-TMR2 und SOSUI waren nicht in der Lage, eine zuverlässige Berechnung der Terminuslokalisation zu liefern. Die 8-TMD-Modelle klassifizierten in der Regel die Aminosäuren im Bereich von 258-284 nicht als TMD. Eine Ausnahme bildete das Programm SOSUI. Dieses definiert den Bereich zwischen Aminosäure 85-119 nicht als hydrophobe transmembranäre Domäne. Das Programm Toppred (GES-scale) berechnet sowohl ein Modell mit acht als auch neun TMD. Weitere Programme, die ein 9-TMD-Modell bevorzugten, sind HMMTOP, MEMSAT3 und PredictProtein. In diesen Fällen wurde ein extrazellulärer N- und intrazellulärer C-Terminus vorhergesagt. Mit der glei-

chen Orientierung kalkulierte TopPred (KD-scale) ein 7-TMD-Modell. Dieses Modell klassifiziert die Aminosäuren in den Bereichen 85-119 und 258-284 nicht ausdrücklich als TMD. Die  $N_{ex}/C_{in}$  Orientierung resultiert dabei aus einem Cluster positiv geladener Aminosäuren stromabwärts von TMD1 (Nettoladung erster intrazellulärer Loop +3) und entspricht der „positive-inside“-Regel (von Heijne und Gavel 1988; von Heijne 1992, 1995).

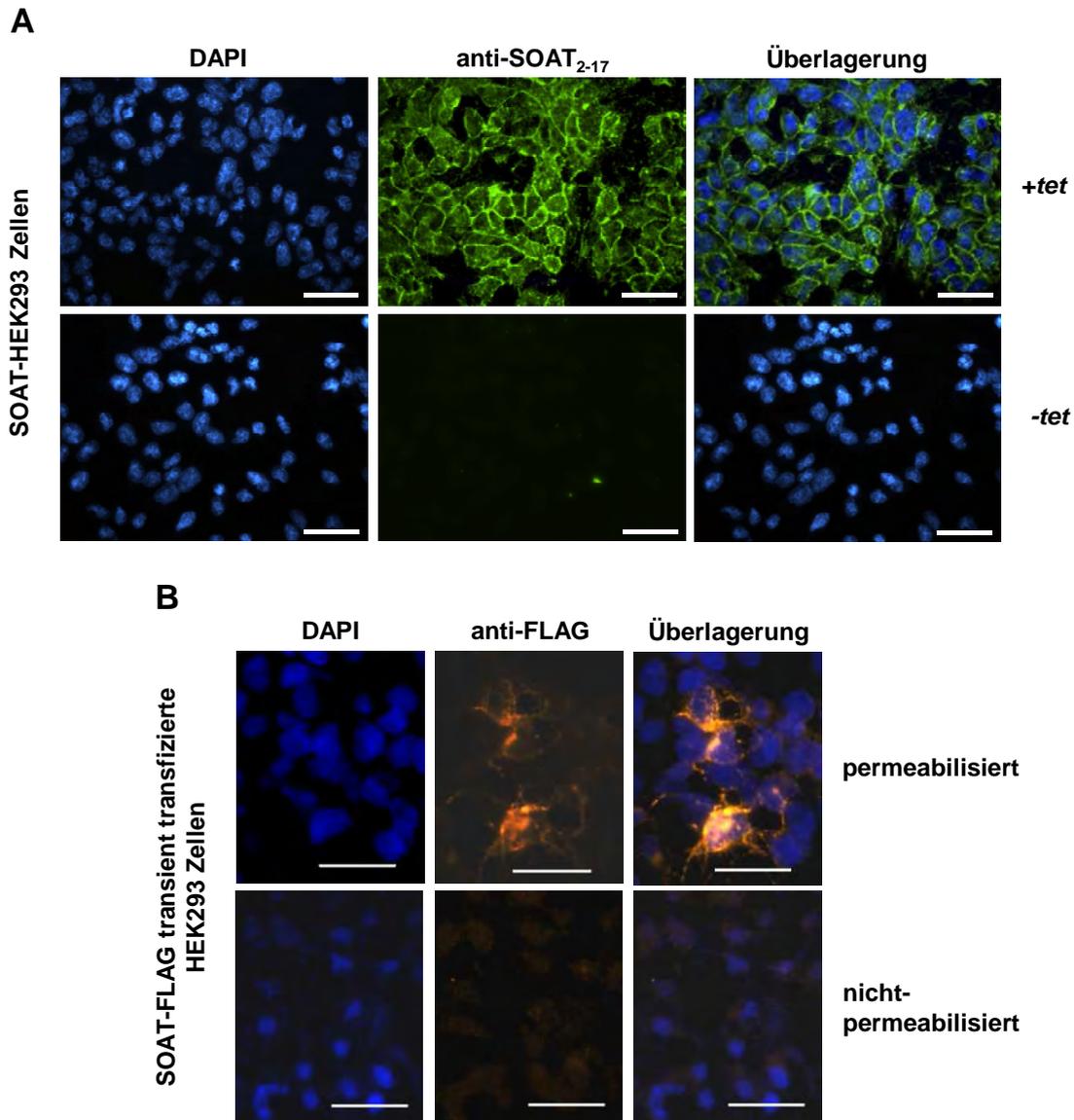
**Tab. 4.5: Vergleich der Membrantopologie des humanen SOAT nach Voraussage verschiedener bioinformatischer Programme.**

Soweit in den Programmen angegeben ist die Orientierung des N- und C-Terminus aufgeführt.

		TMD1	TMD2	TMD3	TMD4	TMD5	TMD6	TMD7	TMD8	TMD9
<b>Toppred (KD)</b>	$N_{ex}/C_{in}$	30-50		85-105	130-150	164-184	196-216	228-248		289-309
<b>TMAP</b>	----	28-56	69-89	95-115	131-153	159-182	191-218	220-248		283-307
<b>PSORT II</b>	$N_{in}/C_{in}$	32-48	67-83	86-102	131-147	165-181	199-215	231-247		291-307
<b>ConPred II</b>	$N_{ex}/C_{ex}$	31-51	70-90	96-116	130-150	163-183	195-215	226-246		287-307
<b>MEMSAT</b>	$N_{ex}/C_{ex}$	32-53	66-90	97-119	127-148	165-182	192-216	224-247		286-308
<b>PRED-TMR2</b>	----	32-51	68-88	98-119	127-147	165-182	196-216	229-247		289-308
<b>TMHMM</b>	$N_{ex}/C_{ex}$	30-52	65-87	97-119	132-154	164-186	193-215	225-247		289-311
<b>TMpred</b>	$N_{ex}/C_{ex}$	32-55	66-87	94-119	127-147	164-184	196-215	229-246		291-308
<b>Toppred (GES)</b>	$N_{ex}/C_{ex(in)}$	32-52	72-92	95-115	125-145	164-184	196-216	228-248	(264-284)	287-307
<b>SOSUI</b>	----	30-52	75-97		128-150	162-182	193-215	226-248	260-282	286-308
<b>HMMTOP</b>	$N_{ex}/C_{in}$	32-53	66-88	97-119	132-154	165-184	197-216	225-247	260-280	289-308
<b>MEMSAT3</b>	$N_{ex}/C_{in}$	30-54	67-91	97-119	124-148	160-183	196-220	224-248	258-277	286-310
<b>PredictProtein</b>	$N_{ex}/C_{in}$	33-50	69-93	98-115	130-147	162-180	197-214	226-243	266-283	288-306

Die *in silico* Berechnung der Membrantopologie des SOAT favorisierte demnach ein 8-TMD-Modell. Daneben wurden aber auch Topologien mit sieben bzw. neun TMD vorgeschlagen. Um zu klären, ob der SOAT eine Topologie mit einer ungeraden oder geraden Anzahl an TMD besitzt, wurde die Lokalisation des N- und C-Terminus experimentell ermittelt (Abb. 4.22). Um den N-Terminus des SOAT zu detektieren, wurde zunächst ein SOAT-Antiserum, welches gegen die Aminosäuren 2-17 des SOAT-Proteins gerichtet war, generiert (siehe 3.11.1). Mit diesem Antiserum konnte der SOAT in vitalen, nicht-fixierten und entsprechend nicht-permeabilisierten Tetrazyklin-induzierten SOAT-HEK293 Zellen detektiert werden. Da ein Durchdringen des Antiserums in diesem Fall nicht möglich war, muss der N-Terminus des SOAT extrazellulär lokalisiert sein. Nicht Tetrazyklin-induzierte Zellen zeigten kein Fluoreszenzsignal (Abb. 4.22 A). Zur Detektion des C-Terminus wurde ein Antiserum gegen die Aminosäuren 349-364 des SOAT generiert. Dieser Antikörper zeigte allerdings keine Immunreaktion im ELISA (siehe 3.11.1, Abb. 3.6). In einer Alternativstrategie erfolgte der Nachweis des C-terminal lokalisierten FLAG-Epitops im SOAT-FLAG Fusionsprotein, welches transient in Flp-In T-Rex 293 Zellen exprimiert wurde. Der Nachweis des FLAG-

Epitops gelang nur, wenn die Zellen permeabilisiert wurden und somit der anti-FLAG Antikörper in die Zelle eindringen konnte. Unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen war kein Nachweis des FLAG-tags möglich. Daraus lässt sich schließen, dass der C-Terminus des SOAT intrazellulär lokalisiert sein muss. Mit diesen Ergebnissen kann ein TMD-Modell mit acht TMD experimentell ausgeschlossen werden. Stattdessen kann für SOAT eine Topologie mit sieben oder neun TMD angenommen werden.

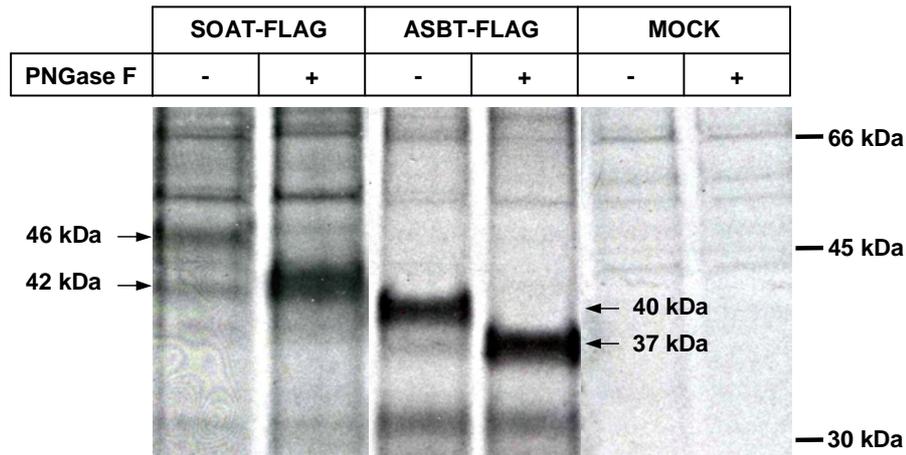


**Abb. 4.22: Immunfluoreszenz zur Bestimmung der Membrantopologie des SOAT-Proteins.**

(A) Tetrazyklin-induzierte (+tet) und nicht-induzierte (-tet) SOAT-HEK293 Zellen wurden unter nativen Bedingungen (nicht-fixiert, nicht-permeabilisiert) mit dem SOAT<sub>2-17</sub> Antiserum (1:10) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels eines FITC-gekoppelten anti-Kaninchen Sekundärantikörpers (1:200, grün) (Sigma). (B) Flp-In T-REx 293 Zellen wurden mit dem SOAT-FLAG-pcDNA5/FRT/TO Konstrukt transient transfiziert und Tetrazyklin-induziert. Das C-terminale FLAG-tag wurde unter permeabilisierenden und nicht-permeabilisierenden Bedingungen mit dem polyklonalen Kaninchen anti-FLAG Primärantikörper (1:40000, Sigma) und einem Cy3-gekoppelten anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1:800, orange) (Dianova) detektiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Maßstab 25 µm.

## 4.8 N-Glykosylierung

SOAT, wie auch die anderen Mitglieder der SLC10-Familie, besitzt mehrere potenzielle N-Glykosylierungsstellen ( $N^4$ ,  $N^{14}$  und  $N^{157}$ ). Der experimentelle Nachweis der N-Glykosylierung des SOAT-Proteins in Zellkultur gelang mit Hilfe einer radioaktiven Immunpräzipitation (RIP). Die Immunpräzipitation erfolgte am SOAT-FLAG- und zu Vergleichszwecken am ASBT-FLAG-Protein (Abb. 4.23).



**Abb. 4.23: Immunpräzipitation und Deglykosylierung der SOAT-FLAG- und ASBT-FLAG-Fusionsproteine.**

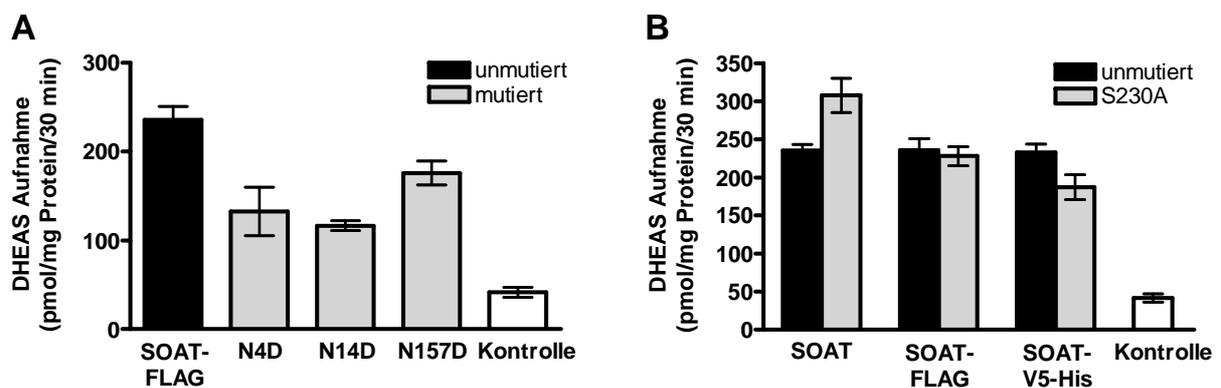
SOAT-FLAG-pcDNA5/FRT/TO, ASBT-FLAG-pcDNA5/FRT/TO und pcDNA5/FRT/TO (MOCK) wurden transient in Flp-In T-REx 293 Zellen transfiziert und die Proteinexpression mit Tetrazyklin induziert. Nach [ $^{35}\text{S}$ ]-Markierung der Proteine erfolgte eine Radioimmunpräzipitation mit dem mono-klonalen Maus anti-FLAG M2 Antikörper. Die präzipitierten Proteine wurden mit PNGase F (Spur 2, 4, 6) oder Wasser (Spur 1, 3, 5) über Nacht inkubiert und anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der [ $^{35}\text{S}$ ]-markierten Proteine erfolgte, nach Trocknung des Gels, auf einem Röntgenfilm.

Nach der Immunpräzipitation wurden SOAT-FLAG-spezifische Banden bei 46 kDa und 42 kDa detektiert. Die 42 kDa Bande entspricht dem kalkulierten Molekulargewicht von 41,2 kDa (377 AS) für das SOAT-Protein plus 1 kDa (acht AS) für das FLAG-Epitop. Die höhere Bande von 46 kDa wies auf eine posttranslationale Modifikation des SOAT-Proteins hin. Nach Deglykosylierung mit PNGase F war die 46 kDa Bande nicht mehr zu detektieren, während die Intensität der 42 kDa Bande deutlich zunahm. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass mindestens eine der drei potenziellen N-Glykosylierungsstellen ( $N^4$ ,  $N^{14}$ ,  $N^{157}$ ) des SOAT nach Expression in HEK293 Zellen glykosyliert vorliegt. ASBT-FLAG wurde zum Vergleich ebenfalls präzipitiert und deglykosyliert. Nach der Präzipitation mit dem FLAG-Antikörper zeigte sich eine Bande von 40 kDa, welche nach Abspaltung der Zuckerreste bei 37 kDa lag. Dies entspricht Daten aus der Literatur (Wong et al. 1995; Zhang et al. 2004). Es ist bekannt, dass die Glykosylierung von Transportproteinen einen Einfluss auf die Trans-

portaktivität haben kann. Um dies für SOAT zu ermitteln, wurden die einzelnen N-Glykosylierungsstellen im SOAT von Asparagin nach Aspartat mutiert und anschließend die Transportfunktion untersucht. Alle Mutanten waren funktionell aktiv, zeigten aber eine Abnahme der Transportaktivität im Vergleich zum nicht mutierten bzw. voll glykosylierten Protein (Abb. 4.24 A). Welche der drei möglichen Glykosylierungsstellen des SOAT tatsächlich glykosyliert vorliegen, ist bisher noch nicht bekannt.

## 4.9 Phosphorylierung

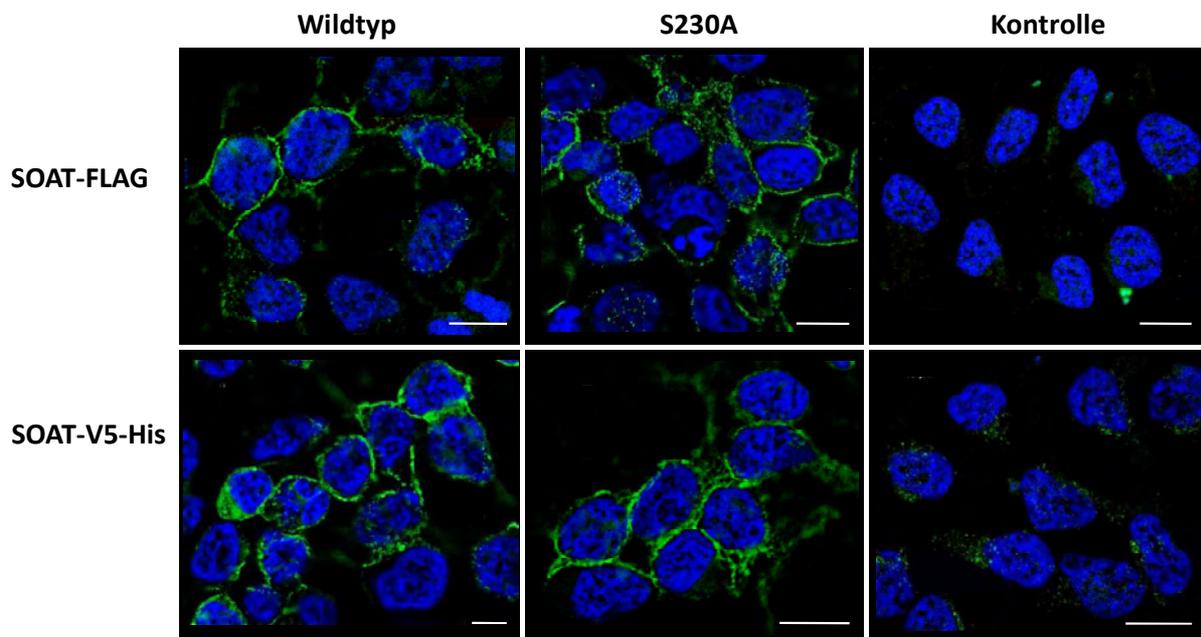
Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen dienen häufig der kurzfristigen Regulation der Proteinfunktion oder wie für Transportproteine bereits gezeigt, dem *Trafficking* in die Plasmamembran. Im NTCP wurde eine Phosphorylierungsstelle identifiziert, welche im dephosphorylierten Zustand eine verstärkte Membranexpression des NTCP bewirkt (Anwer et al. 2005). Dieses Serin an Position 226 des NTCP entspricht dem Serin an Position 230 des SOAT. Um zu überprüfen, ob auch für den SOAT ein entsprechender Effekt gesehen werden kann, wurden in SOAT-, SOAT-FLAG- und SOAT-V5-His-pcDNA5/FRT/TO über zielgerichtete Mutagenese das Serin 230 nach Alanin mutiert (S230A) und mit den gewonnenen Konstrukten Transportstudien (Abb. 4.24, B) und immuncytochemische Versuche (Abb. 4.25) durchgeführt.



**Abb. 4.24: Einfluss einer potenziellen Deglykosylierung und Dephosphorylierung des SOAT-Proteins auf die Transportaktivität.**

(A) Die potenziellen N-Glykosylierungsstellen (N<sup>4</sup>, N<sup>14</sup>, N<sup>157</sup>) wurden durch zielgerichtete Mutagenese im SOAT-FLAG durch Aspartat ausgetauscht. (B) Die potenzielle Phosphorylierungsstelle S<sup>230</sup> wurde im SOAT, SOAT-FLAG und SOAT-V5-His durch Alanin ersetzt. Die genannten Konstrukte wurden transient in GripTite 293 MSR Zellen transfiziert und nach 48 h die Transportmessung durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 2,5 µM [<sup>3</sup>H]DHEAS. Nach 30 min wurde die Aufnahme gestoppt und die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Dargestellt sind die MW ± SD eines repräsentativen Experiments in Vierfachbestimmung.

Die S230A-Mutante des unmarkierten SOAT zeigte eine signifikant höhere Transportrate als der Wildtyp. Dies würde für die oben genannte Theorie sprechen, nach welcher, analog zum NTCF, eine Dephosphorylierung bzw. Nichtphosphorylierung an S<sup>230</sup> eine vermehrte Membranexpression und damit verbunden eine erhöhte Transportrate nach sich ziehen würde. Zwischen SOAT-FLAG und SOAT-FLAG S230A war allerdings kein Unterschied erkennbar und die V5-His markierte SOAT S230A Mutante zeigte eine vergleichsweise niedrigere Transportrate für DHEAS. Auch mittels Immunocytochemie konnte keine eindeutig erhöhte oder erniedrigte Membranexpression der S230A-Mutanten nachgewiesen werden (Abb. 4.25). Um wirklich zu klären, ob SOAT durch Phosphorylierung reguliert wird und die genannte Position eventuell eine Rolle spielt, sind weiterführende Untersuchungen, etwa mit dem SOAT-EmGFP-Konstrukt, im *Live Cell Imaging* notwendig.



**Abb. 4.25: Nachweis der Wildtyp und S230A SOAT-FLAG- und -V5-His-Proteine mittels Immunocytochemie.**

Die genannten Konstrukte wurden transient in GripTite 293 MSR Zellen transfiziert und nach 24-48 h die Immunocytochemie durchgeführt. Die Detektion des FLAG-Epitops erfolgte mit dem monoklonalen Maus anti-FLAG M2 Antikörper (1:40000) (Sigma), die des V5-Epitops mit dem monoklonalen Maus anti-V5 Antikörper (1:5000, grün) (Invitrogen). Beide Primärantikörper wurden über einen sekundären Alexa Fluor 488-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:800, grün) (Invitrogen) nachgewiesen. Die Bilder wurden mittels automatischer Z-Fokussierung (Z-Stapel) in drei Ebenen aufgenommen und mit Hilfe einer 3D-Deconvolution Software nachberechnet. Dargestellt ist ein Einzelbild des aufgenommenen Z-Stapels. Maßstab 10 µm.

## 4.10 Polymorphismen

Eine Analyse der *Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Datenbank* zeigte, dass für das SLC10A6-Gen des Menschen zahlreiche Polymorphismen im nichtkodierenden Bereich des Gens zu finden sind. Einige Polymorphismen liegen aber auch im kodierenden Bereich der mRNA. Alle Austausche stellen Transitionen an unterschiedlichen Stellen des Codons dar. Drei dieser SNPs führen zu einem Aminosäureaustausch (Tab. 4.6).

**Tab. 4.6: Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in der kodierenden Region des humanen SOAT.**

SNPId	Exon	mRNA-Position	Basen-austausch	AS-Austausch	Genotyp*			Allel*	
rs17694522	1	17	TCC→TIC	S6F	C/C 0,976	T/C 0,024	T/T 0	C 0,988	T 0,012
rs13106574	1	340	ATT→GTT	I114V	A/A 0,797	A/G 0,191	G/G 0,012	A 0,893	G 0,107
rs4386565	2	489	CAG→CAA	Q163Q	G/G n.d.	G/A n.d.	A/A n.d.	G n.d.	A n.d.
rs57559561	4	595	GTT→ATT	V199I	G/G n.d.	G/A n.d.	A/A n.d.	G n.d.	A n.d.

\*Mittelwerte aller in der SNP-Datenbank vorhandenen Daten zu diesem Polymorphismus; n.d. = no data

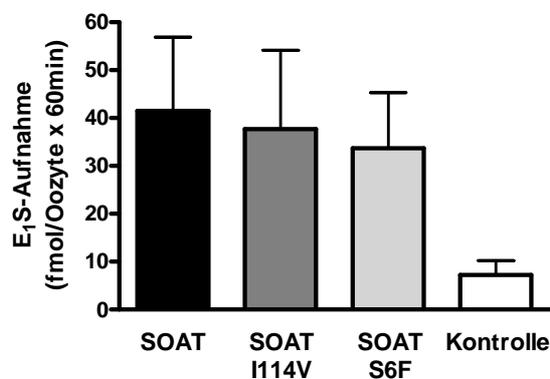
Der Austausch an Position 6 liegt nach der Topologieberechnung (Tab. 4.5) im extrazellulären N-Terminus. Die I114V und V199I Substitutionen sind nach den meisten Berechnungen in der 3. bzw. 6. TMD lokalisiert. Ein Aminosäureaustausch kann die Struktur eines Proteins verändern und so zu einer Funktionsänderung bis hin zum vollständigen Funktionsverlust führen. Um einen Eindruck davon zu bekommen, ob diese SNPs eine Veränderung des Phänotyps nach sich ziehen könnten, erfolgte zunächst eine bioinformatische Bewertung dieser Aminosäureaustausche (Tab. 4.7).

**Tab. 4.7: SNPs des humanen SOAT, welche zu einem Aminosäureaustausch führen, wurden nach der R-Gruppen-Zugehörigkeit, Konservierung über verschiedene Spezies und PolyPhen Berechnung bewertet.**

Aminosäure-Austausch	Position	Änderung der Klasse nach R-Gruppen*	Aminosäure-Konservierung <sup>#</sup>	PolyPhen Berechnung <sup>§</sup>
S→F	6	Änderung polar, ungeladen → aromatisch	variabel	<i>benign</i> = kein Effekt
I→V	114	keine Änderung nichtpolar, aliphatisch → nichtpolar, aliphatisch	variabel	<i>benign</i> = kein Effekt
V→I	199	keine Änderung nichtpolar, aliphatisch → nichtpolar, aliphatisch	variabel	<i>benign</i> = kein Effekt

\*nach Lehninger Biochemie, 3. Auflage; <sup>#</sup>Konservierung der Aminosäuren über sechs Säugetierspezies; <sup>§</sup>Berechnung funktioneller Effekte der Aminosäure-Substitutionen mit *PolyPhen*.

Der einzige Austausch, welcher zu einer veränderten Zugehörigkeit zu den R-Gruppen führt, ist der Austausch an Position 6 von Serin nach Phenylalanin. Alle genannten Polymorphismen zeigten in anderen Spezies an den jeweiligen Positionen Alterationen, teils sogar zur substituierten Aminosäure. Dies spricht dafür, dass diese Aminosäuren für die Funktion und Struktur des Proteins nicht essentiell sind. Auch das Programm *PolyPhen* bewertet die identifizierten SNPs als unschädlich. Um diese Ergebnisse auch experimentell zu verifizieren, wurden die nicht-synonymen Polymorphismen durch zielgerichtete Mutagenese in den humanen SOAT eingefügt und Transportmessungen an Oozyten durchgeführt (Abb. 4.26).



**Abb. 4.26: Aufnahme von E<sub>1</sub>S (100 nM) in SOAT-Wildtyp, SOAT-I114V und SOAT-S6F exprimierende *Xenopus laevis* Oozyten.**

4,6 ng SOAT-Wildtyp, SOAT-I114V oder SOAT-S6F cRNA wurden in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Als Negativkontrolle dienten mit 46 nl ddH<sub>2</sub>O injizierte Oozyten. Nach drei Tagen erfolgte die Inkubation der Oozyten für 60 min bei 25°C in 100 nM [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S. Nach Stoppen der Reaktion wurde die Oozyten-assoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Dargestellt sind die MW ± SD eines repräsentativen Experiments mit jeweils 14 Oozyten.

Sowohl der Wildtyp-SOAT als auch der SOAT mit dem I114V bzw. S6F Polymorphismus sind in der Lage E<sub>1</sub>S in die Oozyten aufzunehmen. Somit führen diese Polymorphismen zu keinem Funktionsverlust des SOAT, wie dies auch durch die vorangegangenen Bewertungen vorausgesagt wurde. Der Polymorphismus V199I wurde erst kürzlich in der SNP Datenbank hinterlegt und daher noch nicht in die experimentellen Untersuchungen aufgenommen.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Einordnung des humanen SOAT in die SLC10-Familie

#### 5.1.1 Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse der SLC10-Mitglieder

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen Mitglieder der SLC10-Familie zeigt, dass SOAT die höchste Sequenzidentität (41,8 %)/-ähnlichkeit (69,7 %) mit dem ASBT besitzt. Innerhalb der Familie haben keine anderen Mitglieder eine höhere Identität/Ähnlichkeit zueinander. Nach dem ASBT hat der SOAT die nächst höhere Verwandtschaft zum NTCP mit 33,4 % Identität und 62,6 % Ähnlichkeit.

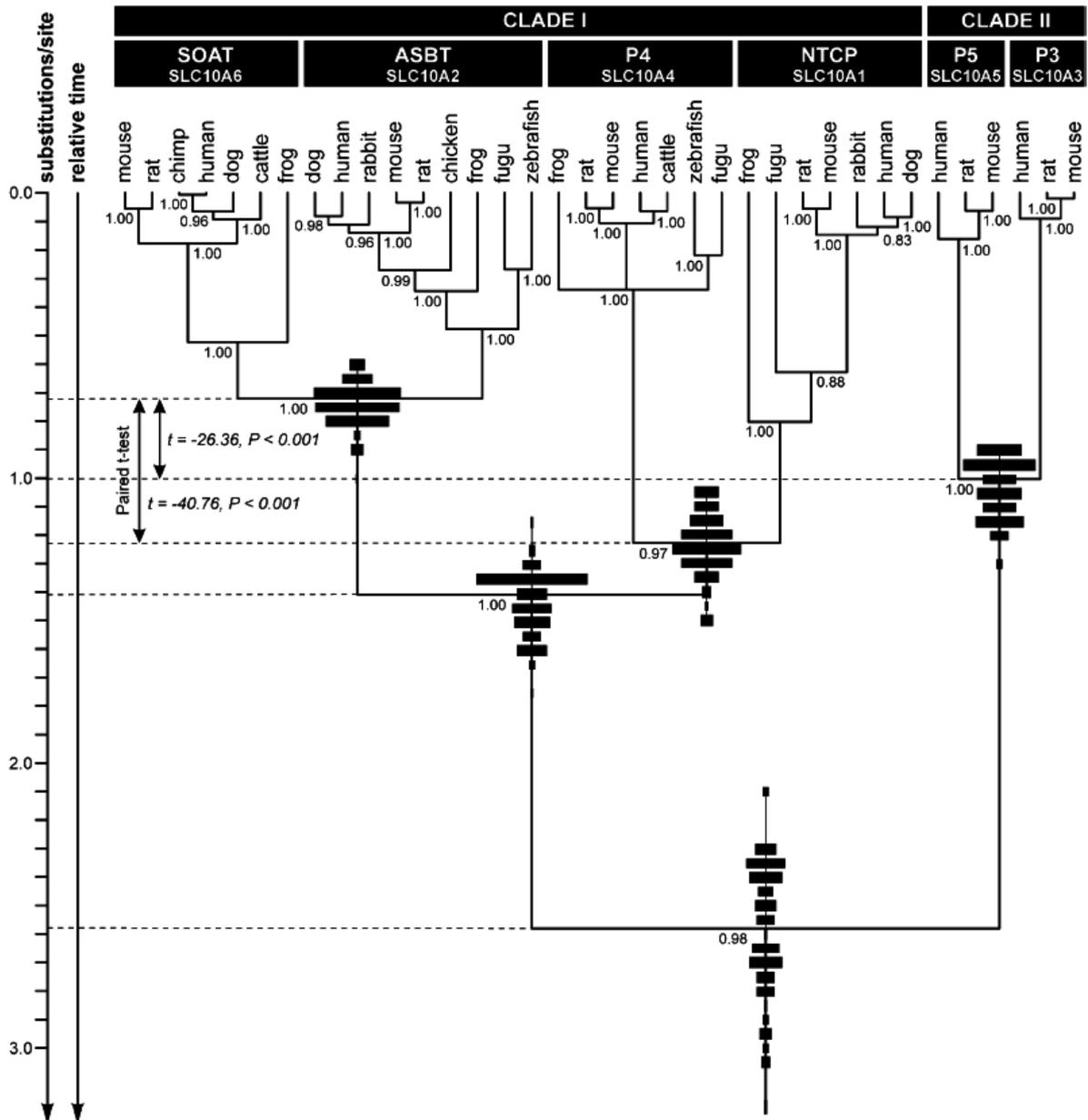
**Tab. 5.1: Aminosäuresequenzidentitäten und –ähnlichkeiten der sechs humanen Mitglieder der SLC10-Familie.**

	NTCP	ASBT	SLC10A3	SLC10A4	SLC10A5	SOAT		
NTCP		34,9	19,4	29,7	22,0	33,4		
ASBT	62,8		18,8	29,1	22,0	<b>41,8</b>		
SLC10A3	39,2	38,8		23,0	33,9	21,1	% Identität	
SLC10A4	53,5	54,4	44,9		21,7	28,7		
SLC10A5	44,6	43,4	60,9	48,7		20,1		
SOAT	62,6	<b>69,7</b>	36,8	51,5	41,3			
			% Ähnlichkeit					

Die Aminosäureidentitäten wurden nach paarweisen optimalen GLOBAL Alignment mit dem *BioEdit Programm Version 7.0.5.2* berechnet (Hall 1999). Aminosäureähnlichkeiten wurden nach der DAYHOFF similarity matrix kalkuliert. Aminosäuresequenzen entstammen folgenden GenBank Accession Nummern: NTCP, NP\_003040; ASBT, NP\_000443; P3, NP\_062822; P4, NP\_689892; P5, NP\_001010893; SOAT, NP\_932069.

Die Identifizierung der neuen Mitglieder der SLC10-Familie SLC10A4-SLC10A6 ermöglichte eine Analyse der phylogenetischen Entwicklung dieser Transporterfamilie (Geyer et al. 2006) (Abb. 5.1). Demnach untergliedert sich die SLC10-Familie in zwei Hauptzweige. Der erste Zweig (Clade I) besteht aus zwei Subfamilien, welche aus SOAT und ASBT sowie P4 und NTCP gebildet werden. Der zweite Hauptzweig (Clade II) setzt sich aus den Mitgliedern P5 und P3 zusammen. In der zeitlichen Skalierung wird deutlich, dass alle Mitglieder der SLC10-Familie ursprünglich aus dem gleichen Vorläufergenen entstanden sein müssen. Von diesem ausgehend entwickelten sich die Vorläufergene für Clade I und Clade II. Innerhalb des ersten Zweiges fand die Auftrennung in P4 und NTCP signifikant früher statt, als die Trennung in SOAT und ASBT. Somit stellt die Trennung zwischen ASBT und SOAT den jüngsten *gene split* in der SLC10-Familie dar (Geyer et al. 2006). Basierend auf der bekannten Substratspezifität von NTCP, ASBT und SOAT, muss man davon ausgehen, dass das

Ursprungsgen des ersten Hauptzweiges die Transportfunktion aller drei Gene inkorporierte. Davon ausgehend hat sich die Transportfunktion für Gallensäuren und Steroidsulfate im NTCP konserviert, während sich diese zwischen ASBT und SOAT aufgeteilt hat.

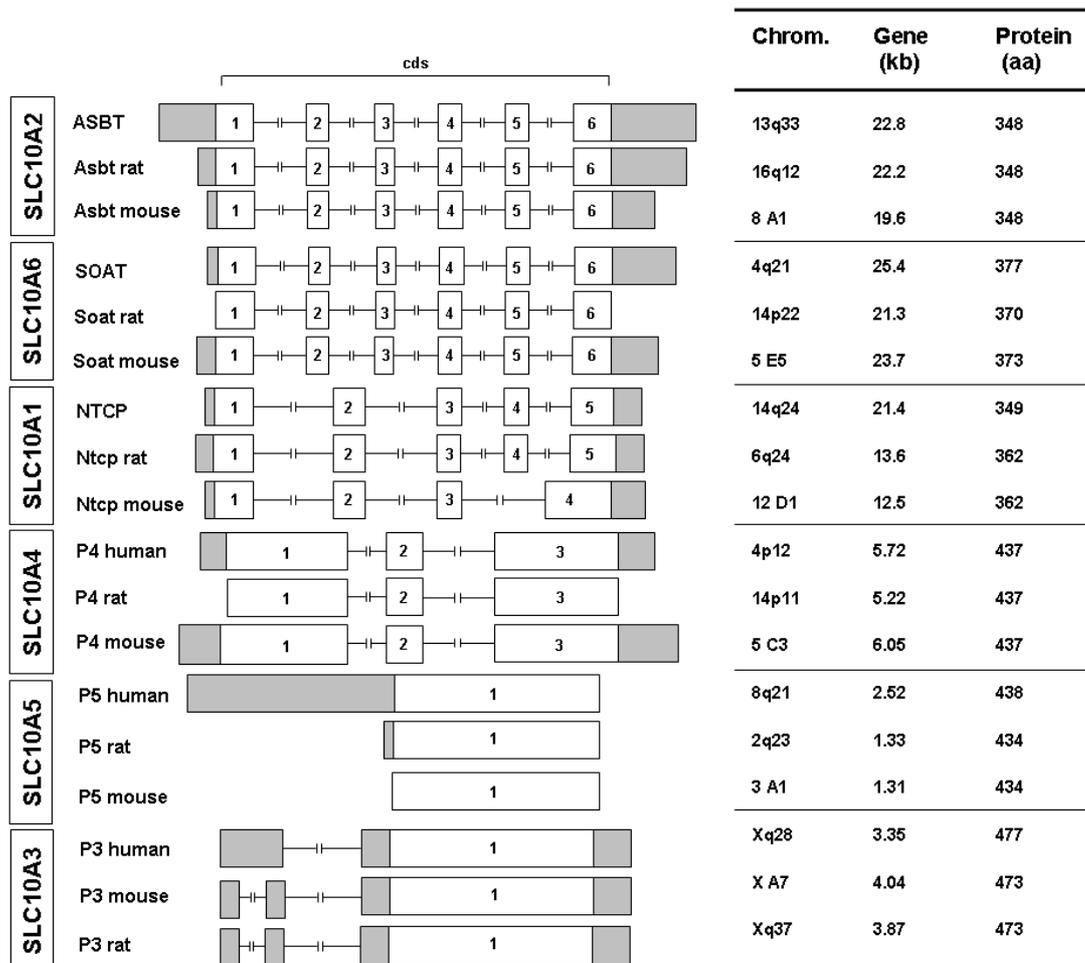


**Abb. 5.1: Phylogenetischer Stammbaum der SLC10/Slc10-Familie (nach Geyer et al. 2006).** Zeitbezogener Bayesian cDNA Baum mit Darstellung der zeitlichen Abstammung ausgewählter Mitglieder der SLC10-Familie. Die y-Achse repräsentiert die Basenaustausche/Ort.

### 5.1.2 Genomische Organisation der Mitglieder der SLC10-Familie

Auch auf genomischer Ebene zeigen SOAT und ASBT die höchste Ähnlichkeit ihrer Gene zueinander. Beide Gene setzen sich aus sechs Exonen zusammen. NTCP/Ntcp von Mensch und Ratte besitzen dagegen nur fünf Exone. Das zweite Exon umfasst Exon 2 und 3 des

SOAT und ASBT. Im Ntcp-Gen der Maus sind zusätzlich die Exone 4 und 5 des NTCP bzw. 5 und 6 des SOAT und ASBT zusammengefasst. Damit hat das Ntcp-Gen der Maus nur vier kodierende Exone. Das SLC10A4-Gen besitzt dagegen nur drei und SLC10A5 und SLC10A3 sogar nur ein kodierendes Exon. Bis auf SOAT und SLC10A4, welche bei Mensch, Maus und Ratte jeweils auf dem gleichen Chromosom lokalisiert sind, finden sich alle Gene auf unterschiedlichen Chromosomen (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2: Genomische Organisation der SLC10/Slc10-Gene.**

Die Exone sind als Kästchen, die Introns als unterbrochene Linie dargestellt. Die 5' und 3' UTR sind grau markiert (nach Geyer et al. 2006).

Für den Asbt der Ratte wurde eine Spleiß-Variante in Cholangiozyten, Ileum und Niere identifiziert, in welcher Exon 2 durch alternatives Spleißen fehlte. Dieser trunkierte Asbt (t-Asbt) wurde als Effluxcarrier für Gallensäuren charakterisiert (Lazaridis et al. 2000). Auch für den bovinen Soat wurden alternativ gespleißte Varianten identifiziert, welche durch Deletion des Exons 4 (Variante 2), Deletion der Exone 2, 3 und 4 (Variante 3), Deletion von Exon 4 und Insertion eines zusätzlichen Exons zwischen Exon 1 und 2 (Variante 4) bzw. Insertion eines zusätzlichen Exons zwischen Exon 1 und 2 (Variante 5) gekennzeichnet sind (Tab. 4.1,

Greven, Dissertation 2008; Schuler et al. 2008). Unter Kenntnis dieser Daten wurde auch untersucht, ob Transkriptionsvarianten für den humanen SOAT existieren. Mittels RT-PCR wurden jedoch von Geyer et al. 2007 in verschiedenen humanen Geweben (Hoden, Plazenta, Pankreas) gezeigt, dass keine Transkriptionsvarianten des SOAT in diesen Geweben existieren (Geyer et al. 2007).

### **5.1.3 Expression**

Mittels RT-PCR wurde eine besonders hohe Expression des humanen SOAT in Hoden, Plazenta und Brustdrüse festgestellt. Geringere Expressionsraten zeigten sich auch in Pankreas, Milz, Thymus, Herz, Dünndarm, Colon und Leukozyten. Ein entsprechendes Profil wurde auch in einer quantitativen Real-Time PCR ermittelt, welche im Rahmen einer weiteren Promotionsarbeit an unserem Institut durchgeführt wurde. Hier zeigte sich ebenfalls die höchste SOAT mRNA-Expression im Hoden, welche 678-mal höher lag als im Gehirn, dem Gewebe mit der niedrigsten SOAT-Expression in dieser Untersuchung. Auf den Hoden folgten mit absteigendem Transkriptionsniveau Plazenta, Pankreas, Brustdrüse, Herz und Lunge. Eine sehr geringe SOAT mRNA-Expression zeigte sich in Gehirn, Colon, Niere, Leber, Ovar, Prostata, Dünndarm, Milz und Thymus (Geyer et al. 2007). Auch bei anderen Spezies sind bereits Gene bzw. Transkripte des Soat bekannt, darunter mRNA Transkripte aus dem Hoden von Ratte (Geyer et al. 2004), Hengst (GenBank Accession Nummer DQ409212), Rind (GenBank Accession Nummer DQ409211), Hund (GenBank Accession Nummer DQ409210) und Eber (Döring et al. 2006) sowie aus der Plazenta von Rind (GenBank Accession Nummern EF186076, EF495204, EF495205, EF495206; Schuler et al. 2008), Hund und Katze (Döring et al. 2006). Neben der gesunden Brustdrüse wurde die SOAT-Expression auch in Brustkrebsgewebe nachgewiesen, wobei bei einer Untersuchung von 20 Mammatumormproben keine Korrelation zwischen SOAT-Expression und Estrogenrezeptorstatus nachgewiesen wurde (Meerkamp et al. 2008). Im Gegensatz zum Menschen und den genannten Haus- und Nutztieren, zeigte Soat der Ratte in der RT-PCR eine breitere Gewebeverteilung. Die höchste Expression wurde in Herz, Lunge, Skelettmuskel, Milz, Hoden, Nebenniere und Dünndarm detektiert, schwächere Expressionsraten zeigten sich in Gehirn, Niere und Colon (Geyer et al. 2004). In der Maus wird Soat am höchsten in Herz und Lunge und schwächer in Plazenta und Hoden exprimiert (Grosser et al. 2008). Die Hauptexpressionsorgane des humanen SOAT unterscheiden sich markant von denen der anderen Mitgliedern der SLC10-Familie (NTCP: Leber; ASBT: Ileum; P3: ubiquitär; P4: Gehirn; P5: Leber und Niere) (Geyer et al. 2006; Fernandes et al. 2007; Geyer et al. 2007, 2008). Schon aufgrund dieser besonderen Lokalisation

liegt es nahe, dass SOAT nicht an der Hauptfunktion von NTCP und ASBT, der Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren beteiligt ist und somit eine andere physiologische Bedeutung innehaben muss.

## 5.2 Strukturvergleich von SOAT, ASBT und NTCP

### 5.2.1 Transmembranäre Organisation

NTCP, ASBT und SOAT werden mit Hilfe des Programms PSORT II als transmembranäre Proteine der Plasmamembran identifiziert. Weitere bioinformatische Programme sind verfügbar, welche Anzahl und Lokalisation möglicher TMD berechnen. Auf Grundlage dieser Programme ergeben sich für diese drei Transportproteine sechs bis neun TMD mit unterschiedlichen Orientierungen der N- und C-Termini (Tab. 5.2 und Anhang).

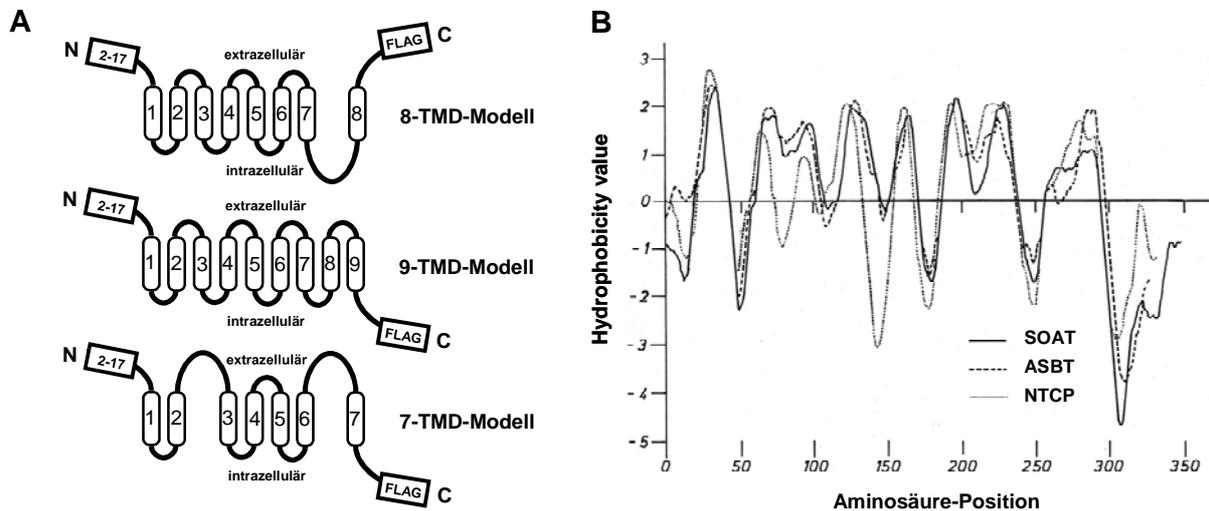
**Tab. 5.2: Anzahl der Transmembrandomänen und Orientierung der N- und C-Termini der humanen NTCP-, ASBT- und SOAT-Proteine nach Voraussage verschiedener bioinformatischer Programme.**

	NTCP	ASBT	SOAT
<b>Toppred (KD-scale)</b>	7 (8) (N/C <sub>indifferent</sub> )	7 (N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub> )	7 N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub>
<b>TMAP</b>	7 ----	7 (N <sub>in</sub> /C <sub>ex</sub> )	8 ----
<b>PSORT II</b>	8 (N <sub>in</sub> /C <sub>in</sub> )	8 (N <sub>in</sub> /C <sub>in</sub> )	8 N <sub>in</sub> /C <sub>in</sub>
<b>ConPred II</b>	9 (N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub> )	7 (N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub> )	8 N <sub>ex</sub> /C <sub>ex</sub>
<b>MEMSAT</b>	9 (N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub> )	8 (N <sub>ex</sub> /C <sub>ex</sub> )	8 N <sub>ex</sub> /C <sub>ex</sub>
<b>TMHMM</b>	8 (N <sub>in</sub> /C <sub>in</sub> )	8 (N <sub>in</sub> /C <sub>in</sub> )	8 N <sub>ex</sub> /C <sub>ex</sub>
<b>TMpred</b>	8 (N <sub>ex</sub> /C <sub>ex</sub> )	8 (N <sub>ex</sub> /C <sub>ex</sub> )	8 N <sub>ex</sub> /C <sub>ex</sub>
<b>Toppred (GES-scale)</b>	7 (8) (N/C <sub>indifferent</sub> )	8 (N <sub>ex</sub> /C <sub>ex</sub> )	8 (9) N <sub>ex</sub> /C <sub>ex(in)</sub>
<b>SOSUI</b>	8 ----	6 ----	8 ----
<b>HMMTOP</b>	9 (N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub> )	9 (N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub> )	9 N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub>
<b>MEMSAT3</b>	9 (N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub> )	9 (N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub> )	9 N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub>
<b>PredictProtein</b>	9 (N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub> )	9 (N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub> )	9 (N <sub>ex</sub> /C <sub>in</sub> )

Indifferent = keine eindeutige Orientierung des N- und C-Terminus möglich; ---- = keine Angabe zur Orientierung.

Für SOAT berechnen die meisten Programme acht TMD mit extrazellulärer Lokalisation von N- und C-Terminus. Immunfluoreszenz-Untersuchungen des SOAT-Proteins belegten die extrazelluläre Lokalisation des N-Terminus, aber eine intrazelluläre Lokalisation des C-Terminus (siehe 4.7). Folglich muss eine ungerade Anzahl transmembranärer Domänen vorhanden sein, weshalb ein Modell mit acht TMD ausgeschlossen ist. Diese Unstimmigkeiten zwischen berechneter und experimentell ermittelter Anzahl an TMD sind auch in der Literatur zu NTCP und ASBT zu finden. Nach längerer Diskussion über die Anzahl der TMD in den beiden Gallensäuretransportern, wird heute auf Grundlage von experimentellen Daten

ein 7-TMD-Modell mit extrazellulärem N- und intrazellulärem C-Terminus für diese Transporter angenommen (Stieger et al. 1994; Hallén et al. 1999; Kramer et al. 2001a; Hallén et al. 2002b; Zhang et al. 2004; Mareninova et al. 2005; Banerjee und Swaan 2006). Für den SOAT berechnete nur das Programm Toppred (KD-scale) ein entsprechendes Modell.



**Abb. 5.3: Postulierte Transmembrantopologien des SOAT und Hydrophobizitätsplot.**

(A) Vorhergesagte Transmembranmodelle des humanen SOAT nach der Berechnung verschiedener Topologieprogramme für eukaryotische Proteine (Tab. 4.5, 5.2). Die TMD sind als Kästen dargestellt, die extrazellulären und intrazellulären Loops als Linien. (B) Hydrophobizitätsprofile eines Aminosäurealignments des humanen SOAT im Vergleich zum humanen ASBT und NTCP. Die x-Achse gibt die Aminosäureposition im jeweiligen Protein an. Steigende Werte der y-Achse spiegeln die steigende Hydrophobizität wider. Der Hydrophobizitätsindex wurde mit dem TopPred II Programm (GES-scale) berechnet.

Die Hydrophobizitätsprofile aller drei Transporter ähneln sich sehr, unterscheiden sich aber im Bereich der Aminosäuren 70-170 (entsprechend TMD 2-4) zwischen ASBT/SOAT und NTCP. Dies wirkte sich allerdings nicht auf die berechneten TMD aus (Tab. 5.2 und Anhang). Die Aminosäurebereiche, in denen die TMD lokalisiert werden, sind in den drei Proteinen sehr ähnlich. Dies gibt einen Hinweis auf eine gemeinsame Kernstruktur mit einem exoplasmatischen N-Terminus, höchst wahrscheinlich sieben TMD und einem cytoplasmatischen C-Terminus.

### 5.2.2 Sekundäre Modifikationen der Proteine: N-Glykosylierung

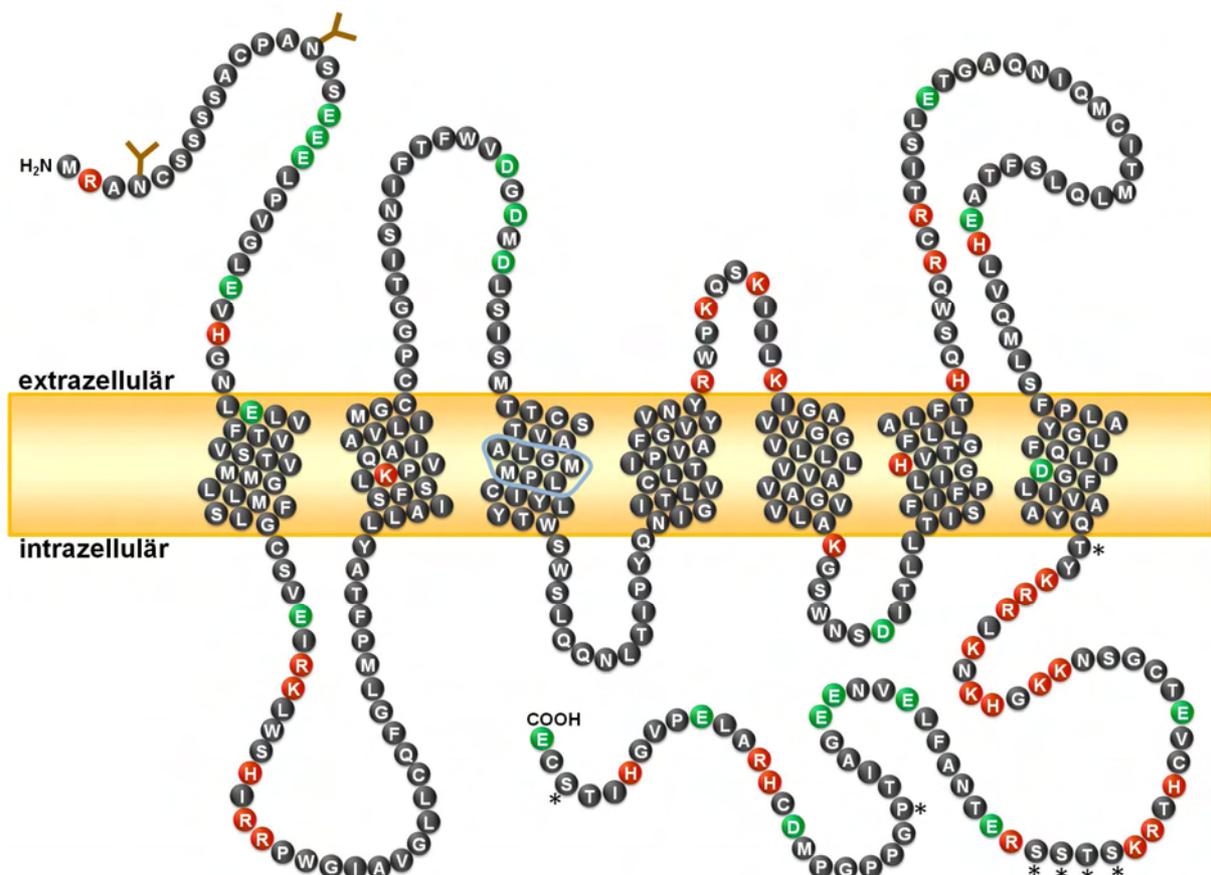
Wie auch SOAT, haben ASBT und NTCP mehrere potenzielle N-Glykosylierungsstellen und wurden in der Literatur bereits als Glykoproteine beschrieben (Hagenbuch et al. 1991; Hagenbuch und Meier 1994; Stieger et al. 1994; Shneider et al. 1995; Wong et al. 1995; Shneider et al. 1997; Sun et al. 1998; Hallén et al. 1999, 2002; Ho et al. 2004; Zhang et al.



Auch im Western Blot zeigte sich eine Übereinstimmung des kalkulierten mit dem experimentell ermittelten Molekulargewicht des ASBT-FLAG und SOAT-EmGFP in den stabil transfizierten HEK293-Zellen. In welchem Ausmaß diese Proteine in der stabilen Zelllinie glykosyliert vorliegen, wurde nicht näher untersucht. Das scheinbare Molekulargewicht des NTCP-FLAG lag dagegen bei ~53 kDa, was viel höher ist als das kalkulierte Molekulargewicht von 39,1 kDa. Dies steht in Übereinstimmung mit Berichten in der Literatur, welche die hochmolekulare Bande als glykosylierte Form identifizierten (Ananthanarayanan et al. 1994; Stieger et al. 1994; Mukhopadhyay et al. 1997; Shneider et al. 1997; Sun et al. 1998; Ho et al. 2004; Mareninova et al. 2005). Der humane NTCP zeigte in *crude human liver membranes* und COS-Zellen eine glykosylierte Bande bei einem Molekulargewicht von 56 kDa, welche sich nach Deglykosylierung auf 39 kDa verringerte (Shneider et al. 1997). NTCP-YFP zeigte sogar drei Banden bei 60 kDa, 68 kDa und 75-85 kDa, welche als unglykosyliert, kernglykosyliert und vollglykosyliert beschrieben wurden (Mareninova et al. 2005). Man kann also davon ausgehen, dass NTCP in HEK293-Zellen ebenfalls glykosyliert ist. Im Ntcp der Ratte wurde bereits nachgewiesen, dass die Aminosäuren N<sup>5</sup> und N<sup>12</sup> N-glykosyliert vorliegen (Hagenbuch 1997). Alle bisher identifizierten tatsächlichen N-Glykosylierungsstellen wurden im N-Terminus lokalisiert. Damit war gleichzeitig bewiesen, dass dieser extrazellulär lokalisiert ist. Auch für den humanen SOAT zeigte sich eine extrazelluläre Lokalisation des N-Terminus. Dieser beinhaltet ebenfalls zwei potenzielle N-Glykosylierungsstellen. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass eine oder beide dieser N-Glykosylierungsstellen, zumindest in der verwendeten Zellkultur, auch tatsächlich biologische Relevanz für N-Glykosylierungen zeigen. Die dritte potenzielle N-Glykosylierungsstelle (N<sup>157</sup>) liegt nach dem favorisierten TMD-Modell nach Toppred (KD scale) intrazellulär und würde demnach nicht glykosyliert vorliegen. Die Entfernung der einzelnen Glykosylierungsstellen durch zielgerichtete Mutagenese hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Transportfunktion. Allerdings zeigten die N4D und N14D Mutanten eine etwas niedrigere Transportrate als der Wildtyp und die N157D Mutante. Immunpräzipitationen mit den generierten Mutanten müssen in weiteren Experimenten klären, an welcher potenziellen N-Glykosylierungsstelle tatsächlich Zuckerreste angehängt sind.

### 5.2.3 Sekundäre Modifikationen der Proteine: Phosphorylierung

Eine Regulation der Membranexpression über Phosphorylierung und Dephosphorylierung wurde für den Ntcp der Ratte nachgewiesen. Eine cAMP vermittelte Dephosphorylierung führte bei diesem Protein zu einer erhöhten Transportfunktion und Translokation aus den Endosomen in die Plasmamembran (Mukhopadhyay et al. 1997; Dranoff et al. 1999; Webster et al. 2002). Obwohl von den verfügbaren Programmen nicht als potenzielle Phosphorylierungsstelle erkannt, wurde S<sup>226</sup> im 3. intrazellulären Loop des Ntcp der Ratte als die dafür verantwortliche Phosphorylierungsstelle identifiziert (Anwer et al. 2005). Dieses Serin findet sich konserviert in allen NTCP/Ntcp und SOAT/Soat-Proteinen, aber nicht im ASBT/Asbt. Vorversuche im humanen SOAT, indem der Einfluss des Entfernens der entsprechenden potenziellen Phosphorylierungsstelle untersucht wurde legten aber nahe, dass diese Stelle nicht zur Phosphorylierung im SOAT genutzt wird bzw. eine Dephosphorylierung keinen Einfluss auf die Transportaktivität und Membranexpression hat (siehe 4.9).



**Abb. 5.5: Transmembrandomänenmodell des humanen SOAT.**

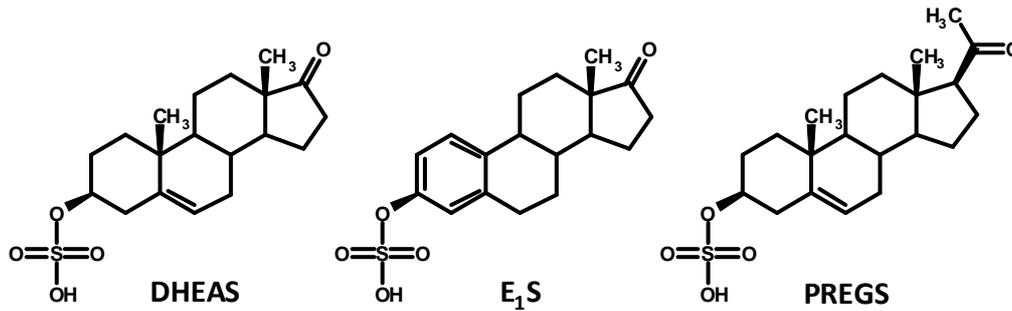
Die Transmembrandomänen wurden nach dem Programm *Toppred* (*KD scale*) berechnet. Positiv geladene Aminosäuren (K, R, H) sind rot, negativ geladene Aminosäuren (D, E) grün dargestellt. Das Signaturmotiv ALGMMPL der SLC10-Familie ist blau umrandet. Y = potenzielle N-Glykosylierungsstelle; \* = potenzielle Phosphorylierungsstelle.

Eine endgültige Antwort, ob diese oder auch andere Phosphorylierungsstellen an der Regulation des SOAT-Proteins beteiligt sind, wird durch weitere Experimente z.B. mittels *Live Cell Imaging* erwartet. Zur Vorbereitung entsprechender Versuche wurde im Rahmen dieser Dissertation bereits eine stabile SOAT-EmGFP-HEK293 Zelllinie generiert. Gezielte Mutagenesen potenzieller Phosphorylierungsstellen in diesem Konstrukt sollen mögliche Auswirkungen auf Transportfunktion und Proteinsorting identifizieren.

## 5.3 Funktionsvergleich

### 5.3.1 Substratspektrum von NTCP, ASBT und SOAT

NTCP und ASBT sind schon seit Anfang der 90er Jahre bekannt und gelten als die Gründungsmitglieder der SLC10-Familie. Aufgrund ihrer Transportfunktion hat sich für die SLC10-Transporterfamilie auch die Bezeichnung „Familie Na<sup>+</sup>-abhängiger Gallensäuretransporter SBAT“ etabliert. In verschiedenen Expressionssystemen zeigten beide Carrier einen Transport aller physiologischen dihydroxylierten und trihydroxylierten Gallensäuren. Ihre Präferenz liegt mehr bei den Taurin- oder Glycin-konjugierten Formen im Vergleich zu den unkonjugierten Molekülen (Craddock et al. 1998; Schroeder et al. 1998; Kramer et al. 1999; Hata et al. 2003). Das Substratspektrum des NTCP ist nicht so eng gefasst wie das des ASBT, welcher nur Gallensäuren als Substrate akzeptiert. NTCP transportiert dagegen auch Steroidsulfate wie E<sub>1</sub>S, freie und konjugierte Schilddrüsenhormone sowie einige Arzneistoffe (Kullak-Ublick et al. 1997; Craddock et al. 1998; Schroeder et al. 1998; Friesema et al. 1999; Kramer et al. 1999; Hata et al. 2003; Ho et al. 2006). Die sulfatierte Gallensäure Chenodeoxycholat-3-sulfat wird nicht von ASBT, aber mit geringer Aufnahmerate von NTCP transportiert (Craddock et al. 1998). In einer weiteren Promotionsarbeit an unserem Institut wurde ein Transport von TLCS durch NTCP ( $K_m = 7 \mu\text{M}$ ,  $V_{max} = 1152 \text{ pmol/mg Protein/min}$ ), aber nicht durch ASBT gezeigt, obwohl TLCS als Inhibitor beider Proteine identifiziert wurde (Kramer et al. 1999). Interessanterweise zeigte SOAT für die Gallensäuren Taurocholat und Cholat keine Transportaktivität und ist somit kein typischer Gallensäuretransporter dieser Familie. Obwohl er mit dem ASBT die nächste Sequenzverwandtschaft aufweist, transportiert SOAT Substratgruppen des NTCP und nicht des ASBT. Dazu gehören sulfatierte Steroidhormone (DHEAS, E<sub>1</sub>S, PREGS) und die sulfokonjugierte Gallensäure TLCS (Tab. 4.2). Ein Transport von 2-SMP und 4-SMP wurde bisher für den NTCP noch nicht untersucht. Daher ist eine Aussage, ob es sich bei den genannten Substanzen eventuell um alleinige Substrate des SOAT handelt, nicht möglich.



**Abb. 5.6: Strukturformeln der Steroidsulfate DHEAS, E<sub>1</sub>S und PREGS.**

Die  $K_m$ -Werte der SOAT-Substrate liegen für DHEAS bei 28,7  $\mu\text{M}$ , für E<sub>1</sub>S bei 12  $\mu\text{M}$  und für PREGS bei 11,3  $\mu\text{M}$ . Ähnliche Affinitäten wurden auch für den Soat der Ratte ( $K_m = 30 \mu\text{M}$  für DHEAS und 31  $\mu\text{M}$  für E<sub>1</sub>S) und Maus ( $K_m = 87 \mu\text{M}$  für DHEAS, 6,4  $\mu\text{M}$  für E<sub>1</sub>S und 1,3  $\mu\text{M}$  für PREGS) bestimmt (Geyer et al. 2004; Grosser et al. 2008). Die für NTCP/Ntcp ermittelten Affinitäten für E<sub>1</sub>S lagen mit 27  $\mu\text{M}$  und 60  $\mu\text{M}$  ebenfalls in diesem Bereich (Craddock et al. 1998; Schroeder et al. 1998; Ho et al. 2004). Der  $K_i$ -Wert des humanen SOAT für TLCS beträgt 0,24  $\mu\text{M}$  und ist damit 100-fach niedriger als der entsprechende  $K_m$ -Wert für DHEAS. Weiterhin konnte die Aufnahme von TLCS in SOAT-HEK293 Zellen erst durch einen 1000-fach molaren Überschuss an DHEAS bzw. 2-SMP gehemmt werden, wohingegen der 5-fach molare Überschuss TLCS die DHEAS-Aufnahme nahezu komplett inhibierte. Dies spricht dafür, dass die sulfatierte Gallensäure TLCS eine viel höhere Affinität zu SOAT hat als die anderen Substrate. Alle identifizierten Substrate des SOAT haben das Steroidgrundgerüst mit einer an Position C3 lokalisierten Sulfatgruppe mit negativer Nettoladung bei physiologischem pH-Wert. Da weder glucuronidierte noch freie Steroide oder Gallensäuren von SOAT transportiert werden, liegt der Schluss nahe, dass diese an Position C3 des Steroidgerüsts lokalisierte Sulfatgruppe für die Substraterkennung von entscheidender Bedeutung zu sein scheint. Um für diese Aussage weitere experimentelle Evidenz zu erlangen, wurden zahlreiche Hemmversuche mit verschiedenartig sulfatierten organischen Verbindungen durchgeführt (s.u.).

### 5.3.2 Interaktion des SOAT mit weiteren Substanzen

Die sulfokonjugierte Gallensäure TLCS wurde als Substrat des SOAT identifiziert. Weiterhin stellen Sulfokonjugate des Lithocholats die besten bisher bekannten Inhibitoren eines SOAT-vermittelten Transports dar. Durch das lipophile Steroidgerüst mit der anionischen Sulfatgruppe sind diese sulfatierten Gallensäuren den sulfatierten Steroidhormonen strukturell sehr

ähnlich. Obwohl weitere untersuchte Gallensäuren nicht von SOAT transportiert wurden, stellen sie doch Inhibitoren mit einer deutlichen Hemmwirkung in folgender Potenz dar:  $3\alpha$ -Monohydroxy Gallensäuren  $\approx$   $3\alpha, 7\alpha$ -Dihydroxy Gallensäuren  $>$   $3\alpha, 12\alpha/\beta$ -Dihydroxy Gallensäuren  $>$   $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -Trihydroxy Gallensäuren/Hyodeoxycholol/Hyocholol/Dehydrocholol. Bei der Interaktion mit SOAT scheint zum einen die Anzahl der Hydroxylgruppen, als auch deren Position einen Einfluss auf die Hemmwirkung zu haben. Die  $12\alpha/\beta$ -Hydroxylgruppe scheint eine Inhibition eher zu verschlechtern, wohingegen die  $7\alpha$ -Hydroxylgruppe keinen wesentlichen Einfluss hat. Je weniger Hydroxylgruppen eine Gallensäure besitzt, desto besser kann sie die SOAT-Aufnahme hemmen. Die Art der Konjugation (Glycin oder Taurin) an Position 24 ist für die Hemmwirkung unbedeutend, eine Sulfatierung an Position C3 erhöht dagegen deutlich das Hemmpotenzial der entsprechenden Gallensäuren. Im Gegensatz dazu zeigen NTCP und ASBT besonders hohe Affinitäten/Interaktionen mit Dihydroxy-Gallensäuren; insbesondere die  $7\alpha$ - und  $12\alpha$ -Hydroxylgruppen sind von Bedeutung. Eine Hydroxylgruppe an Position C3 scheint für die hochaffine Interaktion mit diesen beiden Transportsystemen nicht essentiell. Trihydroxy-Gallensäuren haben, wie auch für SOAT gezeigt, eine schlechtere Interaktionsfähigkeit mit diesen Transportern (Baringhaus et al. 1999; Kramer et al. 1999; Zhang et al. 2004).

Auch nicht-steroidale Organosulfate wie  $1\omega$ -SEP, BSP, 2-SMP, 4-SMP und  $\alpha$ -Naphthylsulfat hemmen SOAT sehr gut. Bis auf BSP besitzen diese Substanzen mindestens zwei Hydrocarbonringen. Kleinere Moleküle ohne diese Ringstruktur sind schlechte Inhibitoren. Dazu gehören 4-Methylumbelliferylsulfat, Indoxylsulfat, Ethylsulfat, Phenylsulfat, Phenylethylsulfat, Propylsulfat, 2-Sulfooxymethylfurfural und Hydrochinonsulfat. Um mit dem SOAT interagieren zu können, scheinen mindestens zwei Hydrocarbonringe benötigt zu werden. Die Untersuchung der Naphthylderivate ermöglichte es, den Einfluß der Sulfatgruppe zu untersuchen. Die Substitution des Sulfats durch Phosphat, Amin und Isothiocyanat hob die Hemmwirkung nahezu vollständig auf. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Sulfatgruppe essentiell für die Beeinflussung der Substratbindungsstelle im SOAT ist.

Diese Inhibitionsexperimente geben einen Hinweis auf mögliche Strukturanforderungen eines SOAT-Substrats und/oder -Inhibitors. Allerdings bedeutet die Hemmung eines Transporters durch ein Substrat nicht automatisch, dass diese Substanz auch tatsächlich ein Substrat darstellt. Dies konnte für Cholol und Chenodeoxycholol am SOAT experimentell gezeigt werden: Beide Gallensäuren wurden nicht transportiert, sind aber gute Inhibitoren des SOAT-Transports.

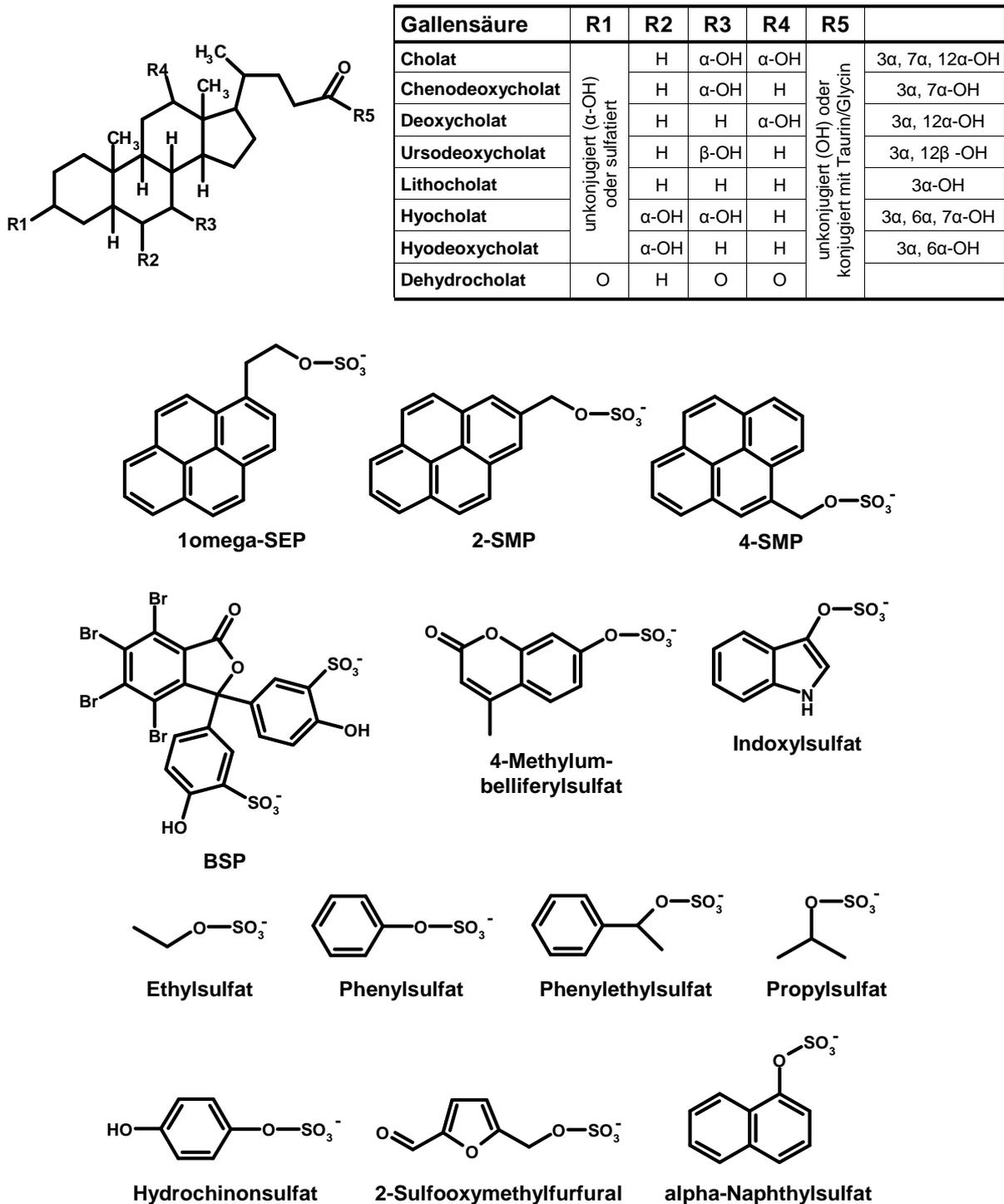


Abb. 5.7: Strukturformeln, der für die *cis*-Hemmung eingesetzten Gallensäuren und nicht-steroidalen Organosulfate.

### 5.3.3 Transportmechanismus

Für NTCP und ASBT ist  $\text{Na}^+$  als die treibende Kraft für den Transport von Gallensäuren identifiziert worden. Auch SOAT zeigte einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transport von DHEAS,  $\text{E}_1\text{S}$ , PREGS, TLCS, 2-SMP und 4-SMP (Abb. 4.3, 4.8, 4.12, 4.20). Während der equimolare Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{Li}^+$  bzw.  $\text{K}^+$  noch 36 % bzw. 19 % der SOAT-Aufnahme aufrecht er-

hielt (Abb. 4.19), führte dieses beim humanen ASBT zu einem vollständigen Verlust der Transportfunktion (Craddock et al. 1998). Der Austausch gegen Cholinchlorid führte dagegen bei allen drei Transportern zum Funktionsverlust (Wong et al. 1994; Craddock et al. 1998; Sun et al. 2001). Die Substitution des  $\text{Cl}^-$  im  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Puffer durch Gluconat zog keine signifikante Veränderung des Transports nach sich, was darauf hindeutet, dass  $\text{Cl}^-$  nicht essentiell für den Transport ist. Auch der ASBT hat keine spezifische Anionenabhängigkeit. Bicarbonat, Bromid und Sulfat waren in Kombination mit  $\text{Na}^+$  ebenfalls in der Lage den Transport zu unterstützen (Craddock et al. 1998). Die Aktivierungskurven der Substrataufnahme durch steigende  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen unterschieden sich für NTCP, ASBT und SOAT interessanterweise zwischen den Substraten DHEAS und TC signifikant. ASBT-FLAG und NTCP-FLAG zeigten schon bei subphysiologischen Konzentrationen die maximale Aufnahmekapazität (NTCP-FLAG 75-100 mM, ASBT-FLAG 50 mM) für TC (Abb. 4.20 C). Dies steht im Einklang mit Daten aus der Literatur. Die Aufnahme von TC durch den Ntcp der Ratte war zwischen 60-80 mM  $\text{Na}^+$  (Hagenbuch und Meier 1996) und durch den humanen ASBT zwischen 30-50 mM  $\text{Na}^+$  bereits gesättigt (Craddock et al. 1998). Im Gegensatz dazu war die DHEAS-Aufnahme über SOAT und NTCP-FLAG bei physiologischer  $\text{Na}^+$ -Konzentration noch nicht in der Sättigung (Abb. 4.20). In dieser Arbeit wurde die  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der DHEAS-Aufnahme für NTCP erstmals bestimmt. Umso überraschender war das Ergebnis, dass Mitglieder unterschiedlicher Substratgruppen (Gallensäuren und sulfatierte Steroide) einen unterschiedlichen Effekt zeigten. Ähnliches wurde von Bonge et al. für den Glycocholat-Transport von ASBT- und NTCP berichtet. ASBT benötige hierbei nur 40-50 mM  $\text{Na}^+$  für die maximale Aufnahmerate, wogegen NTCP bei 137 mM noch nicht in der Sättigung war (Bonge et al. 2000). Eine Erklärung für dieses Phänomen konnte noch nicht gegeben werden. Auf Grundlage der kinetischen Messungen bei steigender  $\text{Na}^+$ -Konzentration wurde die Stöchiometrie des  $\text{Na}^+$ :Gallensäure-Transports für den Ntcp der Ratte und den humanen ASBT auf 2:1 bestimmt (Hagenbuch und Meier 1996; Craddock et al. 1998). Diese Ergebnisse wurden durch elektrophysiologische Untersuchungen verifiziert (Weinman 1997; Weinman et al. 1998). Eine entsprechende Stöchiometrie konnte auch durch die Messungen der vorliegenden Arbeit ermittelt werden, obwohl die  $\text{Na}^+$ -Affinitäten der Substrate TC und DHEAS signifikant unterschiedlich sind (siehe 4.6.5). Wegen der hohen Verwandtschaft der Proteine zueinander kann man also davon ausgehen, dass ein ähnlicher elektrogener Transportmechanismus der drei Proteine existiert. Ein derart energetisierter Transport zeigt verschiedene Besonderheiten: das Membranpotenzial dient, zusätzlich zum chemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten, als treibende Kraft

für den Transport. Dies erlaubt den Aufbau eines hohen Substrat-Konzentrationsgradienten und den Transport gegen einen bestehenden Substratgradienten.

### **5.3.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Transportaktivität**

Der pH-Wert ist ein wichtiger Faktor, welcher das Transportverhalten über verschiedene Mechanismen beeinflussen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der TC-Transport via NTCP und ASBT unabhängig vom pH-Wert verläuft (Abb. 4.21), wie es Nozawa et al. bereits für den ASBT gezeigt haben (Nozawa et al. 2004a). Auch die Aufnahme von TC in Hepatozyten der Ratte, welche zum größten Teil durch Ntcp vermittelt wird, hatte ein breites pH-Optimum, welches zwischen pH 6,5 und 8,0 lag (Schwarz et al. 1975). SOAT hingegen zeigte eine statistisch signifikant höhere Aufnahme von DHEAS im sauren Bereich. Dieser Effekt konnte nicht auf eine erhöhte Diffusion durch eine Ladungsänderung von DHEAS zurückgeführt werden, da NTCP beim gleichen pH-Wert eine signifikant niedrigere Aufnahme hatte und auch die Bindung an die Kontrollzellen nicht beeinflusst wurde. Eine veränderte Substratbindung und/oder Transportrate kann auch durch pH-sensitive Modifikationen des Transportproteins erfolgen. Die Verminderung des pH-Wertes führt zur Protonierung des Imidazolringes von Histidin ( $pK_s = 6,0$ ) und damit zu einer zusätzlichen positiven Ladung. Im SOAT liegen nach dem favorisierten 7-TMD nach Toppred (KD-scale) drei Histidine im extrazellulären Bereich. Somit würde sich die extrazelluläre Gesamtladung von -1 auf +2 verschieben. In NTCP und ASBT hat jeweils nur ein Histidin Zugang zum extrazellulären Milieu. Die extrazelluläre Gesamtladung dieser Proteine liegt nach dem 7-TMD nach Toppred (KD-scale) bei +7 bzw. +3 und bleibt auch im sauren pH-Bereich positiv. Ob die unterschiedliche extrazelluläre Nettoladung aber als Ursache der unterschiedlichen Reaktionen von SOAT und NTCP auf den pH-Wert angesehen werden kann, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Dies kann zum Beispiel durch den Einsatz des Histidinspezifischen Reagenz DEPC oder Mutationsstudien erfolgen. Weiterhin könnte die höhere Aufnahmerate von SOAT im sauren Bereich auch bedeuten, dass der Transport direkt an den Protonengradienten bzw. die Aufnahme von Protonen gekoppelt ist. Ob die Störung des Protonengradienten durch Substanzen wie FCCP, Nigericin oder Amilorid einen Einfluss auf die höhere Transportrate bei saurem pH-Wert hat, muss noch geklärt werden. Kinetiken der Steroidsulfataufnahme unter geänderten pH-Bedingungen werden erste Hinweise auf die Ursache dieses Effekts liefern. Eine Veränderung der Affinität würde für eine veränderte Substratbindung und eine Veränderung der maximalen Aufnahmekapazität für einen Protonencotransport sprechen.

Neben SOAT sind zahlreiche weitere pH-abhängige Transportsysteme bekannt. Dazu gehören auch Steroidsulfattransporter wie das *Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1* (OATP2B1), das *Organic Solute Carrier Protein* (OSCP) und der *Organic Anion Transporter 4* (OAT4), welche ebenfalls eine erhöhte Transportrate im sauren Bereich zeigen (Kobayashi et al. 2003; Nozawa et al. 2004a; Kobayashi et al. 2005; Hagos et al. 2007b; Leuthold et al. 2009). OATP2B1 zeigt zudem im sauren pH-Bereich eine breitere Substratspezifität als unter neutralen Bedingungen (Nozawa et al. 2004a). Ob dies auch für SOAT zutrifft, müssen weitere Studien zeigen. Für intestinale Transporter wie den OATP2B1 scheint eine Regulation über den pH-Wert sinnvoll, da das Darmmilieu pH-Schwankungen unterliegt. Welche Rolle wechselnde pH-Verhältnisse aber unter physiologischen Bedingungen für SOAT und NTCP spielen könnten, welche in Kompartimenten mit streng reguliertem pH-Milieu exprimiert werden, ist unklar.

### 5.3.5 Theorie der zwei Substratbindungsstellen

Die Carrier der SLC10-Familie NTCP, ASBT und auch SOAT (s.u.) sind interessante *Drug Targets* für die Pharmaforschung (siehe 1.2.4, 1.3.6, 5.4.2). Insbesondere Inhibitoren des ASBT, welche bereits klinische Anwendung für eine cholesterinsenkende Therapie finden, sind von großem Interesse in der Pharmakologie und Pharmakotherapie. Zur Identifizierung wichtiger Substratbindungsdomänen und zur Optimierung von ASBT-Inhibitoren wurde durch *Quantitative Structure Activity Relationship* (QSAR) Analysen und *Comparative Molecules Field Analysis* (CoMFA) ein Pharmakophoren-Modell für den ASBT generiert, welches gut zur Voraussage potenzieller Substrate und Inhibitoren geeignet ist (Swaan et al. 1997b; Baringhaus et al. 1999; Kramer et al. 1999). Allerdings ist trotz intensiver experimenteller Arbeiten am ASBT, welche Photoaffinitätsmarkierungen, Mutagenesen und *in silico* Modellierung des ASBT-Proteins umfassten, die Substratbindungsdomäne im ASBT immer noch nicht eindeutig identifiziert (Hallén et al. 2000; Kramer et al. 2001a; Hallén et al. 2002a; Zhang et al. 2002, 2004; Banerjee et al. 2005, Hussainzada et al. 2006; Sun et al. 2006; Banerjee et al. 2008; Hussainzada et al. 2006, 2008a, 2008b; Khantwal und Swaan 2008). Mit SOAT wurde ein neues Mitglied der SLC10-Familie identifiziert, der zwar höchste Sequenzverwandtschaft zum ASBT aufweist, aber ein entgegengesetztes Substratspektrum zum ASBT besitzt. Aus dem strukturellen und funktionellen Vergleich dieser beiden Transporter ergibt sich nun eine völlig neue Möglichkeit, die Substratbindungsdomäne(n) der SLC10-Carrier näher zu definieren. NTCP, welcher eine Transportfunktion für beide Substratgruppen des ASBT (Gallensäuren) und SOAT (Steroidsulfate) vereint, weist im Transportverhalten inte-

ressante Unterschiede zwischen diesen beiden Substratgruppen auf. Zunächst bestehen für DHEAS und TC unterschiedliche Natriumaffinitäten, welche sich jeweils im Transport über SOAT und ASBT widerspiegeln (siehe 4.6.5). Ebenso zeigte der pH-abhängige Transport über NTCP Unterschiede im Transport beider Substrate (siehe 4.6.6). Weiterhin ist ein C800T Polymorphismus im humanen NTCP bekannt, welcher zum Aminosäure-Austausch S267F im 3. extrazellulären Loop führt. Dieser Polymorphismus verursacht einen nahezu kompletten Verlust der TC- und Cholat-Transportaktivität, ließ aber den Transport von E<sub>1</sub>S unverändert (Ho et al. 2004). Somit scheint dieses Serin an Position 267, welches sich in einem hoch konservierten Bereich von NTCP und ASBT verschiedener Spezies befindet, in einer Proteindomäne lokalisiert zu sein, welche spezifisch an der Gallensäuresubstraterkennung beteiligt ist. Dafür spricht ebenfalls, dass dieses Serin nicht im SOAT zu finden ist. Insgesamt lassen die dargestellten Beobachtungen vermuten, dass im NTCP zwei Substratbindungsdomänen existieren: eine für Gallensäuren und eine für sulfatierte Steroide. Beide Bindungsstellen waren vermutlich im gemeinsamen Ursprungsgen von NTCP, ASBT und SOAT konserviert und blieben im Laufe der Evolution im NTCP erhalten, teilten sich aber auf ASBT und SOAT auf, oder gingen ganz verloren (SLC10A4). Um diese Theorie von zwei Substratbindungsdomänen in den SLC10-Carriern NTCP, ASBT und SOAT weiter untermauern zu können, müssen Transportstudien mit Gallensäuren und Steroidsulfaten durchgeführt werden, wobei der Transport der einen Substratgruppe jeweils mit einer Substanz der zweiten Substratgruppe gehemmt wird. Über eine Bestimmung der entsprechenden Hemmkonstanten ( $K_i$ -Werte) und einen Vergleich mit den entsprechenden  $K_m$ -Werten erwarten wir uns weitere Informationen über den Transportmechanismus beider Substratgruppen. Mutations- und Chimärenstudien zwischen NTCP und SOAT sowie ASBT und SOAT sollen weitere Aufschlüsse über die Anzahl und Lokalisation der Substratbindungsdomänen geben.

### **5.3.6 Neubewertung potenziell am Transport beteiligter Aminosäuren im ASBT**

Im Zuge verschiedener Studien zur Assoziation bestimmter Erkrankungen mit Polymorphismen im ASBT wurden einige Aminosäuren identifiziert, welche einen Funktionsverlust nach sich ziehen und daher in Zusammenhang mit der Gallensäurebindung gebracht wurden. Dazu gehören die Polymorphismen L243P, T262M und P290S (siehe 1.3.4) (Wong et al. 1995; Oelkers et al. 1997). Ein Vergleich mit der Aminosäuresequenz des SOAT zeigte allerdings, dass die genannten Aminosäuren L<sup>243</sup>, T<sup>262</sup> und P<sup>290</sup> auch im SOAT zu finden sind. Daher ist auszuschließen, dass diese spezifisch für den Gallensäuretransport von Bedeutung sind. Eher

ist zu vermuten, dass eine Substitution dieser Aminosäuren eine Störung der allgemeinen Transportfunktion oder Proteinstruktur nach sich zieht.

## 5.4 Physiologische Bedeutung des SOAT

Der SOAT des Menschen ist vor allem in den hormonabhängigen Geweben Hoden, Plazenta und Brustdrüse exprimiert und transportiert, abgesehen von STLC, 2-SMP und 4-SMP, spezifisch sulfatierte Steroidhormone. Im Folgenden soll zunächst ein kurzer Überblick über die Steroidhormonsynthese gegeben werden und anschließend die mögliche Funktion des SOAT in den genannten Geweben diskutiert werden.

### 5.4.1 Steroidsulfate und Synthese von Steroidhormonen

In der klassischen Endokrinologie erfolgt die Synthese von Sexualsteroiden in Nebenniere, Hoden, Eierstock und, während der Schwangerschaft, auch in der Plazenta. Ausgangssubstanz ist, außer in der Plazenta (s.u.), Cholesterin (Abb. 5.8). Die Steroidhormone werden in das Blut abgegeben und gelangen so an ihre Zielorgane. Zusätzlich zu diesem klassischen Konzept der endokrinen Wirkung von Sexualsteroiden, wurde auch eine intrakrine Synthese von Androgenen und Estrogenen direkt in den Zielzellen der peripheren Gewebe (Brustdrüse, Prostata, Endometrium, Fettgewebe, Haut) beschrieben (Labrie 1991; Simpson 2003; Labrie et al. 2005). Ausgangssubstanzen dieser intrakrinen Synthese sind die in der Nebenniere gebildeten nicht aktiven Vorläufermoleküle DHEA, DHEAS und Androstendion (4-dion) (Labrie 1991; Simpson 2003; Labrie et al. 2005). Bei der Umsetzung in aktive Hormone spielen die Enzyme Sulfatase und Aromatase eine entscheidende Rolle, welche insbesondere im Zusammenhang mit der Entstehung hormonabhängiger Mammatumore untersucht wurden (s.u.). Als „*Aromatase-Pathway*“ wird die Umsetzung von 4-dion durch die Aromatase in Estron bezeichnet. Durch die Transformation von DHEA in 4-dione durch die 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) kann auch dieses Steroid in den „*Aromatase-Pathway*“ eingehen (Labrie et al. 2001; Foster 2008). Sulfatierte Steroide können über den „*Sulfatase-Pathway*“ einen Beitrag zur Estrogen und Androgensynthese leisten. Durch die mikrosomale Steroidsulfatase erfolgt die Desulfatierung von Arylsulfaten (z.B. E<sub>1</sub>S) und Alkylsulfaten (z.B. DHEAS, PREGS, Deoxycorticosteronsulfat, Cholesterolsulfat) in ihre unkonjugierte Form, welche wiederum zu hormonell aktiven Steroiden umgesetzt werden (Santner et al. 1984, 1986; Pasqualini et al. 1989, 1996, 2005; Foster 2008). Steroidsulfate entstehen durch die Sulfatierung von Steroiden wie DHEA, Estron oder Pregnenolon mittels



### 5.4.2 Brustdrüse

Estrogene spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung hormonabhängiger Mammakarzinome (Carlstrom 1984; Henderson et al. 1988; Pasqualini 2004). Da sich 2/3 der Brustkrebsfälle nach der Menopause entwickeln, wenn die Konzentration (aktiver) Estrogene sehr niedrig ist, wurde eine intrakrine Estrogenproduktion über den oben genannten Aromatase- (Sasano et al. 1996; Labrie et al. 2001; Foster 2008) und Sulfatase-Weg (Santner et al. 1984, 1986; Pasqualini et al. 1989, 1996, 2005) für die Proliferation der Karzinome postuliert und auch beschrieben. In gesundem Brustgewebe überwiegt die Aktivität der Estron-Sulfotransferase die der Steroidsulfatase (Falany und Falany 1996; Suzuki et al. 2003b). Die Sulfatierung ist ein wichtiger Prozess zur Inaktivierung aktiver Estrogene, indem durch die Einführung der geladenen Gruppe die Bindung an den Estrogenrezeptor (ER) verhindert wird. In Mammakarzinomzellen werden die Enzyme, die auf eine Synthese aktiver Estrogene ausgerichtet sind (Sulfatase, Aromatase, 17 $\beta$ -HSD1) hochreguliert und die Expression der Sulfotransferase und 17 $\beta$ -HSD2 vermindert (Chetrite et al. 2000; Suzuki et al. 2000; Miyoshi et al. 2001; Suzuki et al. 2003b, 2005). Als wichtigstes Reservoir der Bildung aktiver Estrogene gilt E<sub>1</sub>S, welches mit ~10 nM 10-fach höher im Plasma konzentriert ist als unkonjugiertes Estrogen (Ruder et al. 1972; Platia et al. 1984; Geisler 2003). DHEAS zirkuliert sogar mit einer 100-fach höheren Konzentration (2-10  $\mu$ M) im Blut als DHEA (Labrie et al. 1997). Pregnenolonsulfat, ein Precursor zur DHEA und Progesteronsynthese aus der Nebenniere, erreicht zirkulierende Konzentrationen von 1  $\mu$ M und kann im Brustgewebe in DHEA und Androstendion umgesetzt werden (Abul-Hajj et al. 1979; de Peretti und Mappus 1983). In Brustkrebsgewebe und Brustzystenfluid wurden erhöhte Konzentrationen sulfatierter Steroidsulfate nachgewiesen, was auf einen vermehrten Import hindeutet (Pasqualini et al. 1995, 1996, 1997; Chetrite et al. 2000; Maeda et al. 2002).

Tatsächlich wurde OATP2B1 (OATP-B, SLC21A9, SLCO2B1), für welchen ein Transport von E<sub>1</sub>S beschrieben wurde, immunhistochemisch in einem invasiven duktalem Mammakarzinom nachgewiesen. Allerdings zeigt OATP2B1 nur einen marginalen Transport von DHEAS und PREGS bzw. keinen Transport von PREGS (Pizzagalli et al. 2003; Grube et al. 2006; Ugele et al. 2008). Mittels RT-PCR wurden in diesem Karzinom, wie auch in den ER<sup>+</sup>-Zelllinien T47D und MCF-7, die Expression von OATP3A1 (OATP-D) und OATP4A1 (OATP-E) nachgewiesen. Daneben fand sich eine sehr schwache, und damit wahrscheinlich unbedeutende, Expression von OAT4 (SLC22A11) und OATP1A2 (OATP-A) in MCF-7-Zellen. Eine OATP2B1-Expression konnte in den genannten Zelllinien nicht gezeigt werden (Pizzagalli et al. 2003; Nozawa et al. 2004b, 2005). Alle genannten Transportsysteme sind in

der Lage,  $E_1S$   $Na^+$ -unabhängig zu transportieren (Cha et al. 2000; Tamai et al. 2000; Hagenbuch und Meier 2004). Eine direkte Aufnahme von  $E_1S$  in T47D- und MCF-7-Zellen wurde als  $Na^+$ -unabhängig beschrieben, war aber nur schwach durch Gallensäuren, dem typischen Substrat von OATPs, hemmbar. Somit bleibt weiterhin offen, ob die genannten Transportsysteme tatsächlich am Import von  $E_1S$  in Mammakarzinomzellen beteiligt sind (Nozawa et al. 2004b, 2005). Mit dem humanen SOAT wurde nun erstmals ein Transportsystem in der Brustdrüse identifiziert, welches einen aktiven  $Na^+$ -abhängigen Transport von  $E_1S$ , DHEAS und PREGS vermittelt. SOAT wird ebenfalls in den  $ER^+$ -Zelllinien MCF-7 und T47D exprimiert und wurde in  $ER^+$  und  $ER^-$  Biopsien von Mammakarzinomen nachgewiesen (Meerkamp et al. 2008; unveröffentlichte Ergebnisse). In diesem entarteten Gewebe wurde für zehn  $ER^+$  und zehn  $ER^-$  Mammakarzinome ein vergleichbar hohes Expressionsniveau für SOAT und die Steroidsulfatase nachgewiesen, was eine pathophysiologische Bedeutung des SOAT für den Import sulfatierter Steroide in Mammakarzinomgewebe möglich macht (Meerkamp et al. 2008). In einer weiteren Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie wurde gezeigt, dass durch stabile Überexpression von SOAT in die  $ER^+$  Mammakarzinomzelllinie T47D eine Zunahme der  $E_1S$ -vermittelten Proliferation zu beobachten ist. Diese Proliferationszunahme war durch Tamoxifen am ER, durch STX64, ein spezifischer Steroidsulfatase-Inhibitor sowie durch 2-SMP und 4-SMP, die hochaffinen Inhibitoren des SOAT, hemmbar. Damit gilt SOAT als mögliches neues *Drug Target* für die Therapie hormonabhängiger Mammakarzinome.

### 5.4.3 Plazenta

Neben dem Hoden ist der humane SOAT auch relativ hoch in der Plazenta exprimiert. Während der Schwangerschaft steigt die Estrogenproduktion stark an, wobei ab der neunten Schwangerschaftswoche die Plazenta den Hauptsyntheseort darstellt. Die menschliche Plazenta ist durch das Fehlen der  $17\alpha$ -Hydroxylase/ $C_{17,20}$ -Lyase-Aktivität nicht in der Lage, Estrogene selber aus den Vorläufermolekülen Progesteron/Pregnenolon bzw.  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron/-pregnenolon zu bilden. Die plazentare Estrogensynthese ist daher auf den Import von  $C_{19}$ -Steroiden extraplazentaren Ursprungs angewiesen (Albrecht und Pepe 1990; Kuss 1994; Strauss et al. 1996). Ausgangssubstanz für die Estron- und Estradiolsynthese ist das DHEA(S) der maternalen und fetalen Nebenniere, welches etwa zu gleichen Teilen zur Synthese beiträgt (Siiteri und MacDonald 1966). Das fetale  $16\alpha$ -Hydroxy-DHEAS (Hydroxylierung von DHEAS in der Leber) trägt zu 90 % zur plazentaren Estriolsynthese bei. Der Synzytiotrophoblast exprimiert alle für die Umwandlung nötigen

intrazellulären Enzyme: Steroidsulfatase,  $3\beta$ -HSD, Aromatase und  $17\beta$ -HSD (Kuss 1994; Rainey et al. 2004). Damit die Enzymsubstrate ihren Um-setzungsort erreichen, müssen sie über die Zellmembran aufgenommen werden. Der Transport von Steroidsulfaten wurde an Präparationen basaler (*fetal-facing*) Synzytiotrophoblastmembranen untersucht. Der  $E_1S$ -Transport war durch einen  $K_m$ -Wert von  $35 \mu\text{M}$  charakterisiert und ließ sich signifikant durch PREGS hemmen (St-Pierre et al. 2002). Mononukleäre Zytotrophoblasten transportierten DHEAS mit einer sättigbaren Aufnahme von  $K_m = 26 \mu\text{M}$  (Ugele und Simon 1999; Ugele et al. 2003). Der Transport war zum großen Teil  $\text{Na}^+$ -abhängig und konnte durch BSP, andere Steroidsulfate (DHEAS,  $E_1S$ , Estradiol- $17\beta$ -sulfat, Estradiol-3,17-disulfat, Vitamin  $D_3$ -sulfat) und Probenecid, aber nicht durch Estradiol- $17\beta$ -glucuronid, Estronglucuronid, DHEA,  $16\alpha$ -Hydroxy-DHEAS, Ouabain, Dexamethason, Taurocholat oder Tauroursodeoxycholat gehemmt werden. Estradiol- $17\beta$ -glucuronid, Taurocholat und Ouabain wurden zudem nicht transportiert (Ugele et al. 2003). In der polarisierten Plazentazelllinie HRP-1 der Ratte wurde ebenfalls ein Transport von  $E_1S$  und DHEAS gemessen.  $E_1S$  wurde mit einem  $K_m$ -Wert von  $4,67 \mu\text{M}$  über die apikale (*maternal-facing*) Membran transportiert und war  $\text{Na}^+$ - und pH-abhängig (höchste Aufnahme bei pH 5,0) und  $\text{Li}^+$ -tolerant.  $E_1S$ , DHEAS,  $\beta$ -Estradiol-3-sulfat und Estradiol-3,17-disulfat hemmten den  $E_1S$ -Transport im Gegensatz zu Taurocholat und *para*-Aminohippursäure (PAH). Der DHEAS Transport konnte durch DHEAS selber und  $E_1S$  gehemmt werden (Zhou et al. 2003). Auf Grundlage dieser Daten wurde bisher diskutiert, ob Mitglieder der „*Organic anion transporter*“ Familien SLCO und SLC22 für die Aufnahme von Steroidsulfaten an der Plazenta verantwortlich sein könnten. Tatsächlich konnten OATP2B1 und OAT-4 in der basolateralen Membran der Synzytiotrophoblasten und in Zytotrophoblasten nachgewiesen werden (St-Pierre et al. 2002; Ugele et al. 2003). Beide Transporter transportieren  $E_1S$  und DHEAS, wenngleich die Affinität von DHEAS zum OATP2B1 mit einem  $K_m$ -Wert von  $>200 \mu\text{M}$  sehr niedrig ist (Cha et al. 2000; Kullak-Ublick et al. 2001; Tamai et al. 2001; Pizzagalli et al. 2003; Ugele et al. 2008). Relativ neu identifiziert wurde OSCP, dessen humanes Homolog ebenfalls  $E_1S$  transportiert. Auch dieser Carrier wird auf der fetalen Seite der Synzytiotrophoblasten exprimiert, seine höchste Expression findet sich aber im Hoden (s.u.) (Kobayashi et al. 2005). Alle diese Transportsysteme sind  $\text{Na}^+$ -unabhängig, womit sie nur zu einem geringen Teil für den Transport in die Zytotrophoblasten verantwortlich sein können. Mit dem SOAT wurde nun ein Carrier der Plazenta identifiziert, welcher einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transport von Steroidsulfaten vermittelt. Die Transportdaten des SOAT stimmen gut mit den Messungen an mononukleären Zytotrophoblastenzellen und der HRP1-Zelllinie überein. Die  $K_m$ -Werte des SOAT für

DHEAS (28,7  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{E}_1\text{S}$  (12  $\mu\text{M}$ ) und sein Hemmprofil sind vergleichbar mit denen in den Zellkultursystemen. Weiterhin zeigt SOAT eine gesteigerte Aufnahme im sauren pH-Bereich, wie auch die  $\text{E}_1\text{S}$ -Aufnahme in der HRP1-Zelllinie. Somit gibt es einige Indizien dafür, dass SOAT für den  $\text{Na}^+$ -abhängigen Import von  $\text{C}_{19}$ -Steroiden an der maternalen und/oder fetalen Seite der Plazenta verantwortlich ist. Eine weitere Funktion könnte in der Bereitstellung von PREGS zur Progesteronsynthese gesehen werden. Progesteron ist ein lebenswichtiges Hormon zum Erhalt der Schwangerschaft und wird nach dem ersten Trimester zum größten Teil in der Plazenta aus Pregnenolon gebildet. Pregnenolon kann zum einen direkt aus Cholesterin synthetisiert werden, oder auch aus PREGS, welches in der Nebenniere gebildet und über die maternale und fetale Zirkulation dem Trophoblasten zugeführt wird (Miller 1998; Rainey et al. 2004). Sowohl SOAT als auch OATP2B1 sind in der Lage, das Vorläufermolekül PREGS zu transportieren (Grube et al. 2006). Neben dem Transport von Steroidsulfaten zeigte SOAT auch einen Transport von bzw. starke Inhibition durch sulfatierte Gallensäuren. Diese werden vermehrt unter cholestatischen Bedingungen und im Fetus gebildet (Nakagawa und Setchell 1990; Watkins 1983). Der SOAT könnte einen Beitrag zum Transfer von sulfatierten Gallensäuren aus dem Fetus in die Mutter leisten, um sie so ihrer Elimination zuzuführen und damit toxische Konzentrationen im Fetus zu vermeiden. Die Zuordnung der Lokalisation des SOAT zur fetalen und/oder maternalen Seite des Synzytio-trophoblasten steht noch aus. Die Klärung der subzellulären Expression von SOAT in der Plazenta wird in Zukunft weitere Hinweise auf die physiologische Bedeutung von SOAT in der Plazenta liefern.

#### **5.4.4 Hoden**

Der Hoden hat, im Vergleich zu den anderen Organen, eine sehr viel höhere SOAT-Expression. Die Funktion des SOAT in diesem Organ ist bisher unbekannt und lässt sich schwer vorhersagen. In den letzten Jahrzehnten häuften sich die Hinweise, dass Estrogene eine wichtige Rolle in der Spermatogenese spielen, indem sie ihre Wirkung über die im gesamten Genitaltrakt exprimierten  $\text{ER}\alpha$  und  $\text{ER}\beta$  ausüben. Die Zellen des Hodens sind selbst in der Lage, Estrogene zu synthetisieren. Das Schlüsselenzym der Estrogensynthese, die Aromatase, wird in den Leydigzellen, aber auch in Sertoli- und Keimzellen exprimiert (Carreau et al. 1999; O'Donnell et al. 2001; Carreau et al. 2003; de Ronde et al. 2003; Hess 2003; Rochira et al. 2005; Carreau et al. 2007a, 2007b, 2008). Die Sekretion sulfatierter Steroide aus dem Hoden geht mit einer Sulfotransferaseaktivität einher. Auch dieses Enzym wurde in Leydigzellen lokalisiert (Laatikainen et al. 1971; Miki et al. 2002). Neben der Eigensynthese ist es aber auch wahrscheinlich, dass der Import sulfatierter Steroide wie DHEAS,  $\text{E}_1\text{S}$  und

PREGS zur Androgen- und Estrogenproduktion in diesem Organ beiträgt (Martel et al. 1994; Labrie et al. 2001; Hess 2003; Reed et al. 2005). So wurde in Mikrosomen eines Hodenhomogenats Steroidsulfataseaktivität nachgewiesen (Payne 1972). Die genaue Lokalisation der Sulfatase innerhalb des Hodens ist aber noch nicht endgültig geklärt. Vor der Abspaltung des Sulfat-Rests durch die Steroidsulfatase, müssen Steroidsulfate zunächst, wie bereits oben beschrieben, Carrier-vermittelt in die Zielzelle aufgenommen werden. Neben dem SOAT wurden weitere Transportsysteme für sulfatierte Steroide mit spezifischer oder dominanter Expression im Hoden nachgewiesen. OSCP wurde bei Mensch, Ratte und Maus identifiziert und transportiert  $\text{Na}^+$ -unabhängig und pH-abhängig zahlreiche anionische und kationische Substanzen, darunter die Steroide Testosteron,  $\text{E}_1\text{S}$  und DHEAS (Kobayashi et al. 2005, 2007; Izuno et al. 2007). Die zelluläre Lokalisation des humanen Proteins ist bisher unklar. Dagegen konnte *Oscpl* der Ratte und der Maus an der basalen Plasmamembranseite der Sertolizellen lokalisiert werden (Izuno et al. 2007; Kobayashi et al. 2007). Eine weitere Arbeit von Hiratsuka et al. identifizierte den *Oscpl* der Maus als cytosolisches Protein in spermatogenen Zellen, außer in Spermatogonien (Hiratsuka et al. 2008). Die zelluläre und subzelluläre Expression dieses Proteins im Hoden wirft daher noch einige Fragen auf. Ein weiteres Transportsystem ist der Gonaden-spezifische Transporter GST (OATP6A1). Dieser Carrier wird bei Mensch und Ratte am höchsten im Hoden exprimiert und findet sich dort besonders in Sertoli-Zellen, Spermatogonien und Leydigzellen (Suzuki et al. 2003c; Augustine et al. 2005). *Oatp6a1* der Ratte, welcher in zwei Isoformen existiert, transportiert neben weiteren Substraten auch DHEAS. Dieser Transport wurde als  $\text{Na}^+$ -unabhängig und mit  $K_m$ -Werten von 25,5  $\mu\text{M}$  und 21  $\mu\text{M}$  für die beiden Isoformen beschrieben (Suzuki et al. 2003c). Somit scheint neben der Steroidhormonsynthese in den Leydig-Zellen die Bereitstellung der aktiven freien Estrogene auch von der Lokalisation, Aktivität und dem Zusammenspiel von Sulfotransferase und Sulfatase sowie den genannten Transportsystemen abzuhängen. Inwieweit SOAT in der endokrinen Regulation des Hodens eine Rolle spielt, muss weiter untersucht werden. Entscheidend hierfür wird eine zelluläre und subzelluläre Lokalisation des SOAT-Proteins mit einem spezifischen Antikörper sein.

#### **5.4.5 Toxikologische Bedeutung des SOAT im Hoden**

Wie in Transport- und Hemmstudien gezeigt, sind die Xenobiotika 2-SMP und 4-SMP sowohl Substrate des SOAT, als auch Inhibitoren des SOAT-vermittelten Transports. Diese beiden Substanzen sind Isomere von 1-SMP und haben verglichen zu diesem eine längere Halbwertszeit in Wasser ( $T_{1/2}$  1-SMP = 2,8 min,  $T_{1/2}$  2- und 4-SMP > 1 Tag) (Bakhiya et al. 2006),

weswegen sie als Modellsubstanzen für 1-SMP in Aufnahmemessungen eingesetzt wurden. 1-SMP entsteht durch Cytochrom P450-abhängige Metabolisierung von 1-Methylpyren zu 1-Hydroxymethylpyren (1-HMP) und anschließender Sulfokonjugation durch Sulfotransferasen in der Leber. 1-Methylpyren kommt in hohen Konzentrationen im Zigarettenrauch vor und wird als Prokarzinogen klassifiziert, da dessen aktivierter Metabolit 1-SMP stabile DNA-Addukte bilden kann und dadurch mutagen wirkt (Engst et al. 1999; Glatt 2000). 1-SMP wird über das Blut zur Niere transportiert, welches auch der Ort der bevorzugten DNA-Adduktbildung ist. Die Aufnahme in die Nierenzellen erfolgt über die basolateralen Transporter OAT1 (SLC22A6) und OAT3 (SLC22A8) in die renalen proximalen Tubuluszellen (Bakhiya et al. 2006). Neuere Untersuchungen zeigten, dass auch der an der luminalen Membran der proximalen Tubuluszellen lokalisierte OAT4 in der Lage ist 4-SMP zu transportieren (Hagos et al. 2007a). Mit dem Hintergrund, dass 30 % bzw. 24 % der Nierentumore bei Männern bzw. Frauen in Zusammenhang mit Zigarettenrauchen gebracht werden (Martel und Lara 2003), liegt es nahe, dass die genannten Transportsysteme einen bisher unbekanntem Einfluss auf die Entstehung von Nierentumoren haben. Srivastava und Kreiger 2004 erkannten auch eine Beziehung zwischen Rauchen und Hodentumoren. Obwohl Hodentumore im Vergleich zu anderen Tumoren relativ selten sind, stellen sie bei jungen Männern die häufigste Krebsart dar (Srivastava und Kreiger 2004). Der SOAT hat seine höchste Expression im Hoden und ist in der Lage 2-SMP und 4-SMP in Zielzellen zu transportieren. Daher ist es möglich, dass eine testikuläre Aufnahme dieser Substanzen über SOAT mit anschließender DNA-Adduktbildung ein erhöhtes Risiko für eine Tumorbildung nach sich zieht, wie es zuvor schon für Nierentumore beschrieben wurde.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die SLC10-Familie ist bekannt als die Familie der Na<sup>+</sup>-abhängigen Gallensäuretransporter. NTCP und ASBT sind die Gründungsmitglieder dieser Familie und verantwortlich für die Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren. Die Identifizierung weiterer Mitglieder führte zu einer Neubetrachtung dieser Familie. In der vorgelegten Arbeit wurde zum ersten Mal das sechste Familienmitglied, der humane *Sodium-dependent Organic Anion Transporter SOAT* (SLC10A6), molekular und funktionell charakterisiert. Der humane SOAT ist ein Protein mit 377 Aminosäuren und besitzt das SLC10-Signaturmotiv „ALGMMPL“. Seine höchste Verwandtschaft hat SOAT zum ASBT, mit welchem er eine Subfamilie bildet. SOAT ist ein transmembranäres Glykoprotein mit wahrscheinlich sieben TMD und einer N<sub>ex</sub>/C<sub>in</sub>-Topologie. In stabil transfizierten Zellen wurde SOAT auf seine Transporteigenschaften untersucht. Im Gegensatz zu NTCP und ASBT zeigt SOAT keinen Transport der Gallensäuren Taurocholat, Cholat, Lithocholat, Deoxycholat und Chenodeoxycholat. Stattdessen transportiert er die sulfatierten Steroidhormone DHEAS, E<sub>1</sub>S und PREGS, welche auch Substrate des NTCP, aber nicht des ASBT sind. Weiterhin stellen die sulfatierte Gallensäure TLCS und die Xenobiotika 2-SMP und 4-SMP Substrate des SOAT dar. In Hemmstudien zeigten insbesondere Substanzen mit mindestens zwei Hydrocarbonringen und einer negativ geladenen Sulfatgruppe eine starke Interaktion mit dem SOAT-Transport. Der Transport über den SOAT ist Na<sup>+</sup>-abhängig und erreicht erst bei physiologischen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen sein Transportmaximum. Weiterhin weist dieser bei pH-Werten <7,4 höhere Transportraten auf als bei pH ≥ 7,4. NTCP besitzt für den Transport von Steroidsulfaten und Gallensäuren eine jeweils unterschiedliche Na<sup>+</sup>-Affinität und pH-Abhängigkeit. Daher vermuten wir im NTCP zwei Substratbindungsstellen, eine für Gallensäuren und eine für Steroidsulfate, welche im Laufe der Evolution jeweils nur im ASBT (Gallensäuren) bzw. SOAT (Steroidsulfate) funktionell erhalten geblieben sind. SOAT ist am höchsten im Hoden und relativ hoch in Plazenta und Brustdrüse exprimiert. Dieses Expressionsmuster steht im Gegensatz zur Expression von NTCP in Leber und ASBT in Ileum und Niere. Aufgrund der Transportfunktion von SOAT und der Expression in hormonabhängigen Geweben gehen wir davon aus, dass die physiologische Funktion des SOAT im Import sulfatierter Steroide liegt. Diese können intrazellulär durch die katalytische Aktivität der Steroidsulfatase in aktive Steroide überführt werden (Konzept der intrakrinen Hormonsynthese). Da SOAT, wie auch die Steroidsulfatase, in Brustkrebsgewebe nachweisbar ist, wird auch eine Beziehung zur Entstehung hormonabhängiger Mammakarzinome diskutiert. In diesem Zusammenhang gilt SOAT als neues *Drug Target* für die Therapie hormonabhängiger Mammakarzinome.

## 7 SUMMARY

The SLC10-family is well known as the family of sodium-dependent bile acid transporters SBAT. The founding members NTCP and ASBT are responsible for the maintenance of the enterohepatic circulation of bile acids. With the identification of new members (SLC10A4-SLC10A7) we got new insights into the relevance of this carrier family. The present work describes for the first time the molecular and functional characterization of the novel carrier SLC10A6, named *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* SOAT. Human SOAT consists of 377 amino acids and contains the SLC10-signature motif "ALGMMPL". SOAT and ASBT have the closest relationship within the SLC10-family and both derive from a common ancestor. SOAT is a transmembrane glycoprotein with a 7 predicted transmembrane topology and a  $N_{ex}/C_{in}$ -topology. Transport measurements were performed in stably transfected SOAT-HEK293 cells to gain information about transport characteristics of human SOAT. In contrast to NTCP and ASBT, SOAT has no transport activity for the bile acids taurocholic acid, cholic acid, lithocholic acid, deoxycholic acid, and chenodeoxycholic acid. Instead the sulfated steroids DHEAS, E<sub>1</sub>S, and PREGS are transported. These compounds are also substrates of NTCP, but not ASBT. Furthermore the sulfated bile acid TLCS and the xenobiotics 2-SMP and 4-SMP are transported by SOAT. Strong inhibition of SOAT transport was demonstrated for compounds with at least two hydrocarbon rings and a negatively charged sulfate moiety including  $\alpha$ -Naphthylsulfate, 2-SMP, 4-SMP, 1 $\omega$ -SEP and sulfated bile acids. Transport by SOAT is  $Na^+$ -dependent and reached maximal transport activity at physiological  $Na^+$ -concentrations. Transport rates are higher at  $pH < 7,4$  than  $\geq 7,4$ . The carrier NTCP showed different transport characteristics regarding  $Na^+$ -affinity and pH-dependency for bile acids and steroid sulfates. For this we assume that two substrate binding pockets are present in NTCP, one for bile acids and one for steroid sulfates. During phylogenetic development ASBT and SOAT conserved only one of the functional properties of NTCP, bile acids and steroid sulfates, respectively. In man, SOAT is dominantly expressed in testis and showed also relatively high expression in placenta and mammary gland. This expression pattern is completely different to the expression of NTCP (liver) and ASBT (ileum, kidney). Because of the high expression in hormone-dependent tissues and its substrate pattern we assume the physiological function of SOAT in the cellular import of sulfated steroids. These circulating precursor steroids can be converted into active steroids after intracellular cleavage of the sulfate group by the steroid sulfatase (concept of intracrine hormone synthesis). As SOAT and steroid sulfatase were shown to be highly expressed in breast carcinoma, a role of SOAT for the pathophysiology of breast carcinoma is discussed.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abul-Hajj YJ, Iverson R, Kiang DT (1979) Metabolism of pregnenolone by human breast cancer. Evidence for 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase. *Steroids* 34:817-827.
- Agellon LB, Torchia EC (2000) Intracellular transport of bile acids. *Biochim Biophys Acta* 1486:198-209.
- Albrecht ED, Pepe GJ (1990) Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev* 11:124-150.
- Alpini G, Glaser SS, Rodgers R, Phinizy JL, Robertson WE, Lasater J, Caligiuri A, Tretjak Z, LeSage GD (1997) Functional expression of the apical Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology* 113:1734-1740.
- Alpini G, Glaser SS, Ueno Y, Rodgers R, Phinizy JL, Francis H, Baiocchi L, Holcomb LA, Caligiuri A, LeSage GD (1999) Bile acid feeding induces cholangiocyte proliferation and secretion: evidence for bile acid-regulated ductal secretion. *Gastroenterology* 116:179-186.
- Alpini G, Glaser S, Baiocchi L, Francis H, Xia X, LeSage G (2005) Secretin activation of the apical Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter is associated with cholehepatic shunting in rats. *Hepatology* 41:1037-1045.
- Alrefai WA, Gill RK (2007) Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res.* 24:1803-1823.
- Ananthanarayanan M, Ng OC, Boyer JL, Suchy FJ (1994) Characterization of cloned rat liver Na<sup>+</sup>-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *Am J Physiol* 267:G637-G643.
- Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ (2001) Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 276:28857-28865.
- Anwer MS (2004) Cellular regulation of hepatic bile acid transport in health and cholestasis. *Hepatology* 39:581-590.
- Anwer MS, Gillin H, Mukhopadhyay S, Balasubramaniyan N, Suchy FJ, Ananthanarayanan M (2005) Dephosphorylation of Ser-226 facilitates plasma membrane retention of Ntcp. *J Biol Chem* 280:33687-33692.
- Arrese M, Trauner M, Sacchiero RJ, Crossman MW, Shneider BL (1998) Neither intestinal sequestration of bile acids nor common bile duct ligation modulate the expression and function of the rat ileal bile acid transporter. *Hepatology* 28:1081-1087.
- Arrese M, Ananthanarayanan M (2004) The bile salt export pump: molecular properties, function and regulation. *Pflugers Arch* 449:123-131.
- Augustine LM, Markelewicz RJ, Jr., Boekelheide K, Cherrington NJ (2005) Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier. *Drug Metab Dispos* 33:182-189.
- Bahar RJ, Stolz A (1999) Bile acid transport. *Gastroenterol Clin North Am* 28:27-58.
- Bakhiya N, Stephani M, Bahn A, Ugele B, Seidel A, Burckhardt G, Glatt H (2006) Uptake of chemically reactive, DNA-damaging sulfuric acid esters into renal cells by human organic anion transporters. *J Am Soc Nephrol* 17:1414-1421.
- Balakrishnan A, Polli JE (2006) Apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT, SLC10A2): a potential prodrug target. *Mol Pharm* 3:223-230.

- Ballatori N (2005) Biology of a novel organic solute and steroid transporter, OST $\alpha$ -OST $\beta$ . *Exp Biol Med* (Maywood ) 230:689-698.
- Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS, Li N (2005) OST $\alpha$ -OST $\beta$ : a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* 42:1270-1279.
- Ballatori N, Li N, Fang F, Boyer JL, Christian WV, Hammond CL (2009) OST $\alpha$ -OST $\beta$ : a key membrane transporter of bile acids and conjugated steroids. *Front Biosci* 14:2829-2844.
- Banerjee A, Ray A, Chang C, Swaan PW (2005) Site-directed mutagenesis and use of bile acid-MTS conjugates to probe the role of cysteines in the human apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2). *Biochemistry* 44:8908-8917.
- Banerjee A, Swaan PW (2006) Membrane topology of human ASBT (SLC10A2) determined by dual label epitope insertion scanning mutagenesis. New evidence for seven transmembrane domains. *Biochemistry* 45:943-953.
- Banerjee A, Hussainzada N, Khandelwal A, Swaan PW (2008) Electrostatic and potential cation- $\pi$  forces may guide the interaction of extracellular loop III with Na<sup>+</sup> and bile acids for human apical Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter. *Biochem J* 410:391-400.
- Baringhaus KH, Matter H, Stengelin S, Kramer W (1999) Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporters of the rabbit. II. A reliable 3D QSAR pharmacophore model for the ileal Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. *J Lipid Res* 40:2158-2168.
- Barnard JA, Ghishan FK (1987) Taurocholate transport by human ileal brush border membrane vesicles. *Gastroenterology* 93:925-933.
- Bhat BG, Rapp SR, Beaudry JA, Napawan N, Butteiger DN, Hall KA, Null CL, Luo Y, Keller BT (2003) Inhibition of ileal bile acid transport and reduced atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> mice by SC-435. *J Lipid Res* 44:1614-1621.
- Bonge H, Hallén S, Fryklund J, Sjöström JE (2000) Cytostar-T scintillating microplate assay for measurement of sodium-dependent bile acid uptake in transfected HEK-293 cells. *Anal Biochem* 282:94-101.
- Borst P, Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537-592.
- Boyer JL, Hagenbuch B, Ananthanarayanan M, Suchy F, Stieger B, Meier PJ (1993) Phylogenetic and ontogenic expression of hepatocellular bile acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:435-438.
- Boyer JL, Ng OC, Ananthanarayanan M, Hofmann AF, Schteingart CD, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ (1994) Expression and characterization of a functional rat liver Na<sup>+</sup> bile acid cotransport system in COS-7 cells. *Am J Physiol* 266:G382-G387.
- Boyer JL, Trauner M, Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Moustafa T, Zollner G, Lee JY, Ballatori N (2006) Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OST $\alpha$ -OST $\beta$  in cholestasis in humans and rodents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G1124-G1130.
- Burger S, Fernandes C, Wunsch J, Lips S, Gerstberger R, Petzinger E, Geyer J (2008) Expression of the orphan carrier SLC10A4 in cholinergic neurons of the peripheral and enteric nervous system, and lung and bladder epithelium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377 Suppl 1:17.
- Carlstrom K (1984) Influence of intratumoral estradiol biosynthesis on estrogen receptors. *Recent Results Cancer Res* 91:145-149.

- Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J (1999) Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl* 22:211-223.
- Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S (2003) Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1:35.
- Carreau S, Silandre D, Bois C, Bouraima H, Galeraud-Denis I, Delalande C (2007a) Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol* 45 Suppl 1:S5-10.
- Carreau S, Silandre D, Bourguiba S, Hamden K, Said L, Lambard S, Galeraud-Denis I, Delalande C (2007b) Estrogens and male reproduction: a new concept. *Braz J Med Biol Res* 40:761-768.
- Carreau S, de Vienne C, Galeraud-Denis I (2008) Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Adv Med Sci* 53:139-144.
- Cattori V, Eckhardt U, Hagenbuch B (1999) Molecular cloning and functional characterization of two alternatively spliced Ntcp isoforms from mouse liver. *Biochim Biophys Acta* 1445:154-159.
- Cha SH, Sekine T, Kusuhara H, Yu E, Kim JY, Kim DK, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H (2000) Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J Biol Chem* 275:4507-4512.
- Chen F, Ma L, Dawson PA, Sinal CJ, Sehayek E, Gonzalez FJ, Breslow J, Ananthanarayanan M, Shneider BL (2003) Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* 278:19909-19916.
- Chetrite GS, Cortes-Prieto J, Philippe JC, Wright F, Pasqualini JR (2000) Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 72:23-27.
- Chiang JY, Kimmel R, Weinberger C, Stroup D (2000) Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J Biol Chem* 275:10918-10924.
- Chiang JY, Kimmel R, Stroup D (2001) Regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR $\alpha$ ). *Gene* 262:257-265.
- Chignard N, Mergey M, Veissiere D, Parc R, Capeau J, Poupon R, Paul A, Housset C (2001) Bile acid transport and regulating functions in the human biliary epithelium. *Hepatology* 33:496-503.
- Chignard N, Mergey M, Veissiere D, Poupon R, Capeau J, Parc R, Paul A, Housset C (2003) Bile salts potentiate adenylyl cyclase activity and cAMP-regulated secretion in human gallbladder epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G205-G212.
- Christie DM, Dawson PA, Thevananther S, Shneider BL (1996) Comparative analysis of the ontogeny of a sodium-dependent bile acid transporter in rat kidney and ileum. *Am J Physiol* 271:G377-G385.
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 274:G157-G169.
- Dawson PA, Haywood J, Craddock AL, Wilson M, Tietjen M, Kluckman K, Maeda N, Parks JS (2003) Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *J Biol Chem* 278:33920-33927.

- Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV, Ballatori N (2005) The heteromeric organic solute transporter  $\alpha$ - $\beta$ , Ost $\alpha$ -Ost $\beta$ , is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* 280:6960-6968.
- de Peretti E, Mappus E (1983) Pattern of plasma pregnenolone sulfate levels in humans from birth to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 57:550-556.
- de Ronde W, Pols HA, van Leeuwen JP, de Jong FH (2003) The importance of oestrogens in males. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58:529-542.
- Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Karpen SJ (2001) The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121:140-147.
- Döring B, Geyer J, Petzinger E (2006) Transport of sulfated steroid hormones by the SOAT (SLC10A6) carrier, a newly cloned member of the SLC10 organic anion transporter family. *J Vet Pharmacol Ther* 29 Suppl 1:192/F10.
- Dranoff JA, McClure M, Burgstahler AD, Denson LA, Crawford AR, Crawford JM, Karpen SJ, Nathanson MH (1999) Short-term regulation of bile acid uptake by microfilament-dependent translocation of rat ntcp to the plasma membrane. *Hepatology* 30:223-229.
- Engst W, Landsiedel R, Hermersdorfer H, Doehmer J, Glatt H (1999) Benzylic hydroxylation of 1-methylpyrene and 1-ethylpyrene by human and rat cytochromes P450 individually expressed in V79 Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 20:1777-1785.
- Enhsen A, Kramer W, Wess G (1998) Bile acids in drug discovery. *Drug Discov Today* 3:409-418.
- Falany JL, Falany CN (1996) Expression of cytosolic sulfotransferases in normal mammary epithelial cells and breast cancer cell lines. *Cancer Res* 56:1551-1555.
- Fardel O, Jigorel E, Le Vee M, Payen L (2005) Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. *Biomed Pharmacother* 59:104-114.
- Fernandes CF, Godoy JR, Döring B, Cavalcanti MC, Bergmann M, Petzinger E, Geyer J (2007) The novel putative bile acid transporter SLC10A5 is highly expressed in liver and kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 361:26-32.
- Foster PA (2008) Steroid metabolism in breast cancer. *Minerva Endocrinol* 33:27-37.
- Fredriksson R, Nordström KJ, Stephansson O, Hägglund MG, Schiöth HB (2008) The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Lett* 582:3811-3816.
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (1999) Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun* 254:497-501.
- Frimmer M, Ziegler K (1988) The transport of bile acids in liver cells. *Biochim Biophys Acta* 947:75-99.
- Gälman C, Östlund-Lindqvist AM, Björquist A, Schreyer S, Svensson L, Angelin B, Rudling M (2003) Pharmacological interference with intestinal bile acid transport reduces plasma cholesterol in LDL receptor/apoE deficiency. *FASEB J* 17:265-267.
- Geier A, Wagner M, Dietrich CG, Trauner M (2007) Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1773:283-308.

- Geisler J (2003) Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:245-253.
- Geyer J, Godoy JR, Petzinger E (2004) Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 316:300-306.
- Geyer J (2005) Ouabaintransporter in Leber und Nebenniere von Ratte und Rind: Klonierung, Charakterisierung und funktionelle Bedeutung. Dissertation am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, ISBN 3-89687-456-X.
- Geyer J, Wilke T, Petzinger E (2006) The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372:413-431.
- Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt H, Petzinger E (2007) Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem* 282:19728-19741.
- Geyer J, Fernandes CF, Döring B, Burger S, Godoy JR, Rafalzik S, Hübschle T, Gerstberger R, Petzinger E (2008) Cloning and molecular characterization of the orphan carrier protein Slc10a4: expression in cholinergic neurons of the rat central nervous system. *Neuroscience* 152:990-1005.
- Glatt H (2000) Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 129:141-170.
- Godoy JR, Fernandes C, Döring B, Beuerlein K, Petzinger E, Geyer J (2007) Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *Eur J Cell Biol* 86:445-460.
- Greven HE (2008) Hydrolyse und Transport sulfatierter Steroide in den Plazentomen des Rindes : Charakterisierung der Expression und der Funktionen von Steroidsulfatase (StS) und des Sodium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT). Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, ISBN ISBN 3-8359-5319-2.
- Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliewer SA, Willson TM, 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* 274:29749-29754.
- Grosser G, Meerkamp K, Döring B, Ugele B, Petzinger E, Geyer J (2008) Cloning and functional characterization of the mouse sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377 Suppl 1:12.
- Grube M, Köck K, Karner S, Reuther S, Ritter CA, Jedlitschky G, Kroemer HK (2006) Modification of OATP2B1-mediated transport by steroid hormones. *Mol Pharmacol* 70:1735-1741.
- Hagenbuch B, Lübbert H, Stieger B, Meier PJ (1990) Expression of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 265:5357-5360.
- Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lübbert H, Meier PJ (1991) Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10629-10633.
- Hagenbuch B, Meier PJ (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 PJ (1996) Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin Liver Dis* 16:129-136.
- Hagenbuch B, Scharschmidt BF, Meier PJ (1996) Effect of antisense oligonucleotides on the expression of hepatocellular bile acid and organic anion uptake systems in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 316 ( Pt 3):901-904.
- Hagenbuch B (1997) Molecular properties of hepatic uptake systems for bile acids and organic anions. *J Membr Biol* 160:1-8.
- Hagenbuch B, Meier PJ (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1609:1-18.
- Hagenbuch B, Dawson P (2004) The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch* 447:566-570.
- Hagenbuch B, Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447:653-665.
- Hagos Y, Bakhiya N, Bahn A, Glatt H, Burckhardt G (2007a) Interaction of carcinogenic sulfoxymethylpyrenes with human organic anion transporter 4. *Acta Physiol* 189 Suppl:53: P09-L7-08.
- Hagos Y, Stein D, Ugele B, Burckhardt G, Bahn A (2007b) Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter. *J Am Soc Nephrol* 18:430-439.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Hallén S, Branden M, Dawson PA, Sachs G (1999) Membrane insertion scanning of the human ileal sodium/bile acid co-transporter. *Biochemistry* 38:11379-11388.
- Hallén 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* 39:6743-6750.
- Hallén S, Björquist A, Östlund-Lindqvist AM, Sachs G (2002a) Identification of a region of the ileal-type sodium/bile acid cotransporter interacting with a competitive bile acid transport inhibitor. *Biochemistry* 41:14916-14924.
- Hallén S, Mareninova O, Branden M, Sachs G (2002b) Organization of the membrane domain of the human liver sodium/bile acid cotransporter. *Biochemistry* 41:7253-7266.
- Hara S, Higaki J, Higashino K, Iwai M, Takasu N, Miyata K, Tonda K, Nagata K, Goh Y, Mizui T (1997) S-8921, an ileal Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter inhibitor decreases serum cholesterol in hamsters. *Life Sci* 60:L-70.
- Hara S (1999) Ileal Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter inhibitors. *Drugs of the Future* 24:425-430.
- Hata S, Wang P, Eftychiou N, Ananthanarayanan M, Batta A, Salen G, Pang KS, Wolkoff AW (2003) Substrate specificities of rat oatp1 and ntcp: implications for hepatic organic anion uptake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G829-G839.
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch* 447:465-468.
- Henderson BE, Ross R, Bernstein L (1988) Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* 48:246-253.

- Hess RA (2003) Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1:52.
- Higaki J, Hara S, Takasu N, Tonda K, Miyata K, Shike T, Nagata K, Mizui T (1998) Inhibition of ileal Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter by S-8921 reduces serum cholesterol and prevents atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1304-1311.
- Hiratsuka K, Yin SA, Ohtomo T, Fujita M, Ohtsuki K, Isaka H, Suga T, Kurosawa T, Yamada J (2008) Intratesticular localization of the organic solute carrier protein, OSCP1, in spermatogenic cells in mice. *Mol Reprod Dev* 75:1495-1504.
- Ho RH, Leake BF, Roberts RL, Lee W, Kim RB (2004) Ethnicity-dependent polymorphism in Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) reveals a domain critical for bile acid substrate recognition. *J Biol Chem* 279:7213-7222.
- Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB (2006) Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology* 130:1793-1806.
- Hofmann AF (2007) Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts. *Ann Hepatol* 6:15-27.
- Hruz P, Zimmermann C, Gutmann H, Degen L, Beuers U, Terracciano L, Drewe J, Beglinger C (2006) Adaptive regulation of the ileal apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT) in patients with obstructive cholestasis. *Gut* 55:395-402.
- Huang HC, Tremont SJ, Lee LF, Keller BT, Carpenter AJ, Wang CC, Banerjee SC, Both SR, Fletcher T, Garland DJ, Huang W, Jones C, Koeller KJ, Kolodziej SA, Li J, Manning RE, Mahoney MW, Miller RE, Mischke DA, Rath NP, Reinhard EJ, Tollefson MB, Vernier WF, Wagner GM, Rapp SR, Beaudry J, Glenn K, Regina K, Schuh JR, Smith ME, Trivedi JS, Reitz DB (2005) Discovery of potent, nonsystemic apical sodium-codependent bile acid transporter inhibitors (Part 2). *J Med Chem* 48:5853-5868.
- Huff MW, Telford DE, Edwards JY, Burnett JR, Barrett PH, Rapp SR, Napawan N, Keller BT (2002) Inhibition of the apical sodium-dependent bile acid transporter reduces LDL cholesterol and apoB by enhanced plasma clearance of LDL apoB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1884-1891.
- Hussainzada N, Banerjee A, Swaan PW (2006) Transmembrane domain VII of the human apical sodium-dependent bile acid transporter ASBT (SLC10A2) lines the Substrate translocation pathway. *Mol Pharmacol* 70:1565-1574.
- Hussainzada N, Da Silva TC, Zhang EY, Swaan PW (2008a) Conserved aspartic acid residues lining the extracellular loop 1 of sodium-coupled bile acid transporter ASBT Interact with Na<sup>+</sup> and 7 $\alpha$ -OH moieties on the ligand cholestane skeleton. *J Biol Chem* 283:20653-20663.
- Hussainzada N, Khandewal A, Swaan PW (2008b) Conformational flexibility of helix VI is essential for substrate permeation of the human apical sodium-dependent bile acid transporter. *Mol Pharmacol* 73:305-313.
- Ichihashi T, Izawa M, Miyata K, Mizui T, Hirano K, Takagishi Y (1998) Mechanism of hypocholesterolemic action of S-8921 in rats: S-8921 inhibits ileal bile acid absorption. *J Pharmacol Exp Ther* 284:43-50.
- Iwasaki T, Kondo K, Nishitani T, Kuroda T, Hirakoso K, Ohtani A, Takashima K (1995) Arylnaphthalene lignans as novel series of hypolipidemic agents raising high-density lipoprotein level. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 43:1701-1705.

- Izuno H, Kobayashi Y, Sanada Y, Nihei D, Suzuki M, Kohyama N, Ohbayashi M, Yamamoto T (2007) Rat organic solute carrier protein 1 (rOscp1) mediated the transport of organic solutes in *Xenopus laevis* oocytes: isolation and pharmacological characterization of rOscp1. *Life Sci* 81:1183-1192.
- Jung D, Inagaki T, Gerard RD, Dawson PA, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ, Moschetta A (2007) FXR agonists and FGF15 reduce fecal bile acid excretion in a mouse model of bile acid malabsorption. *J Lipid Res* 48:2693-2700.
- Kagedahl M, Swaan PW, Redemann CT, Tang M, Craik CS, Szoka FC, Jr., Oie S (1997) Use of the intestinal bile acid transporter for the uptake of cholic acid conjugates with HIV-1 protease inhibitory activity. *Pharm Res* 14:176-180.
- Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA (2002) Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 277:2908-2915.
- Khantwal CM, Swaan PW (2008) Cytosolic half of transmembrane domain IV of the human bile acid transporter hASBT (SLC10A2) forms part of the substrate translocation pathway. *Biochemistry* 47:3606-3614.
- Kim DC, Harrison AW, Ruwart MJ, Wilkinson KF, Fisher JF, Hidalgo IJ, Borchardt RT (1993) Evaluation of the bile acid transporter in enhancing intestinal permeability to renin-inhibitory peptides. *J Drug Target* 1:347-359.
- Kim RB, Leake B, Cvetkovic M, Roden MM, Nadeau J, Walubo A, Wilkinson GR (1999) Modulation by drugs of human hepatic sodium-dependent bile acid transporter (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) activity. *J Pharmacol Exp Ther* 291:1204-1209.
- Kim JY, Kim KH, Lee JA, Namkung W, Sun AQ, Ananthanarayanan M, Suchy FJ, Shin DM, Muallem S, Lee MG (2002) Transporter-mediated bile acid uptake causes  $Ca^{2+}$ -dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 122:1941-1953.
- Kitayama K, Nakai D, Kono K, van der Hoop AG, Kurata H, de Wit EC, Cohen LH, Inaba T, Kohama T (2006) Novel non-systemic inhibitor of ileal apical  $Na^{+}$ -dependent bile acid transporter reduces serum cholesterol levels in hamsters and monkeys. *Eur J Pharmacol* 539:89-98.
- Kobayashi D, Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I (2003) Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 306:703-708.
- Kobayashi Y, Shibusawa A, Saito H, Ohshiro N, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T (2005) Isolation and functional characterization of a novel organic solute carrier protein, hOSCP1. *J Biol Chem* 280:32332-32339.
- Kobayashi Y, Tsuchiya A, Hayashi T, Kohyama N, Ohbayashi M, Yamamoto T (2007) Isolation and characterization of polyspecific mouse organic solute carrier protein 1 (mOscp1). *Drug Metab Dispos* 35:1239-1245.
- Kouzuki H, Suzuki H, Ito K, Ohashi R, Sugiyama Y (1998) Contribution of sodium taurocholate co-transporting polypeptide to the uptake of its possible substrates into rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 286:1043-1050.
- Kouzuki H, Suzuki H, Stieger B, Meier PJ, Sugiyama Y (2000) Characterization of the transport properties of organic anion transporting polypeptide 1 (oatp1) and  $Na^{+}$ /taurocholate co-transporting polypeptide (Ntcp): comparative studies on the inhibitory effect of their possible substrates in hepatocytes and cDNA-transfected COS-7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 292:505-511.

- Kramer W, Wess G, Schubert G, Bickel M, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Baringhaus KH, Enhsen A, Glombik H (1992) Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids. *J Biol Chem* 267:18598-18604.
- Kramer W, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Jouvenal K, Müller 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* 268:18035-18046.
- Kramer W, Wess G, Enhsen A, Bock K, Falk E, Hoffmann A, Neckermann G, Gantz D, Schulz S, Nickau L (1994a) Bile acid derived HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1227:137-154.
- Kramer W, Wess G, Neckermann G, Schubert G, Fink J, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Baringhaus KH, Boger G (1994b) Intestinal absorption of peptides by coupling to bile acids. *J Biol Chem* 269:10621-10627.
- Kramer W, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S (1995) Radiation-inactivation analysis of the Na<sup>+</sup>/bile acid co-transport system from rabbit ileum. *Biochem J* 306:241-246.
- Kramer W, Wess G (1996) Bile acid transport systems as pharmaceutical targets. *Eur J Clin Invest* 26:715-732.
- Kramer W, Wess G, Bewersdorf U, Corsiero D, Girbig F, Weyland C, Stengelin S, Enhsen A, Bock K, Kleine H, Le Dreau MA, Schäfer HL (1997a) Topological photoaffinity labeling of the rabbit ileal Na<sup>+</sup>/bile-salt-cotransport system. *Eur J Biochem* 249:456-464.
- Kramer W, Wess G, Enhsen A, Falk E, Hoffmann A, Neckermann G, Schubert G, Urmann M (1997b) Modified bile acids as carriers for peptides and drugs. *J Control Release* 46:17-30.
- Kramer W, Stengelin S, Baringhaus KH, 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 cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J Lipid Res* 40:1604-1617.
- Kramer W, Girbig F, Glombik H, Corsiero D, Stengelin S, Weyland C (2001a) Identification of a ligand-binding site in the Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporting protein from rabbit ileum. *J Biol Chem* 276:36020-36027.
- Kramer W, Sauber K, Baringhaus KH, Kurz M, Stengelin S, Lange G, Corsiero D, Girbig F, König W, Weyland C (2001b) Identification of the bile acid-binding site of the ileal lipid-binding protein by photoaffinity labeling, matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, and NMR structure. *J Biol Chem* 276:7291-7301.
- Kramer W, Glombik H (2006) Bile acid reabsorption inhibitors (BARI): novel hypolipidemic drugs. *Curr Med Chem* 13:997-1016.
- Kullak-Ublick GA, Glasa J, Boker C, Oswald M, Grutzner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G, Paumgartner G (1997) Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 113:1295-1305.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120:525-533.

- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ (2004) Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 126:322-342.
- Kurata H, Suzuki S, Ohhata Y, Ikeda T, Hasegawa T, Kitayama K, Inaba T, Kono K, Kohama T (2004) A novel class of apical sodium-dependent bile acid transporter inhibitors: the amphiphilic 4-oxo-1-phenyl-1,4-dihydroquinoline derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 14:1183-1186.
- Kuss E (1994) The fetoplacental unit of primates. *Exp Clin Endocrinol* 102:135-165.
- Laatikainen T, Laitinen EA, Vihko R (1971) Secretion of free and sulfate-conjugated neutral steroids by the human testis. Effect of administration of human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 32:59-64.
- Labrie F (1991) Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 78:C113-C118.
- Labrie F, Bélanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B (1997) Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2396-2402.
- Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J (2001) DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 22:185-212.
- Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C (2005) Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrinol* 187:169-196.
- Landrier JF, Eloranta JJ, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA (2006) The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter- $\alpha$  and - $\beta$  genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G476-G485.
- Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, Levine S, Dawson PA, LaRusso NF (1997) Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 100:2714-2721.
- Lazaridis KN, Tietz P, Wu T, Kip S, Dawson PA, LaRusso NF (2000) Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11092-11097.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2001) *Lehninger Biochemie*, 3. Auflage. Springer-Lehrbuch, Berlin, ISBN 3-540-41813-X.
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:216-237.
- Leslie EM, Watkins PB, Kim RB, Brouwer KL (2007) Differential inhibition of rat and human Na<sup>+</sup>-dependent taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP/SLC10A1) by Bosentan: A mechanism for species differences in hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 321:1170-1178.
- Leuthold S, Hagenbuch B, Mohebbi N, Wagner CA, Meier PJ, Stieger B (2009) Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C570-C582.
- Lewis MC, Brieady LE, Root C (1995) Effects of 2164U90 on ileal bile acid absorption and serum cholesterol in rats and mice. *J Lipid Res* 36:1098-1105.
- Li H, Xu G, Shang Q, Pan L, Shefer S, Batta AK, Bollineni J, Tint GS, Keller BT, Salen G (2004) Inhibition of ileal bile acid transport lowers plasma cholesterol levels by inactivating hepatic farnesoid X receptor and stimulating cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. *Metabolism* 53:927-932.

- Lischka K, Starke D, Failing K, Herling A, Kramer W, Petzinger E (2003) Hepatobiliary elimination of bile acid-modified oligodeoxynucleotides in Wistar and TR<sup>-</sup> rats: evidence for mrp2 as carrier for oligodeoxynucleotides. *Biochem Pharmacol* 66:565-577.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Maeda Y, Tanaka E, Fujiwara M, Watanabe R, Furusawa H, Matsu T, Nakahara H, Nanba K, Higashi S, Setoguchi T (2002) Accumulation of 4- and 5-ene steroid sulfates in human breast cyst fluids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81:249-253.
- Mareninova O, Shin JM, Vagin O, Turdikulova S, Hallén S, Sachs G (2005) Topography of the membrane domain of the liver Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter. *Biochemistry* 44:13702-13712.
- Marin JJG, Romero MR, Vallejo M, Perez MJ, Briz O (2005) Emerging interest in bile acid transporters in pathophysiology and pharmacology. *Medical Hypothesis and Research* 2:425-448.
- Martel C, Melner MH, Gagne D, Simard J, Labrie F (1994) Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 isomerase (3 $\beta$ -HSD), 17 $\beta$ -HSD 5 $\alpha$ -reductase and aromatase activities in the rhesus monkey. *Mol Cell Endocrinol* 104:103-111.
- Martel CL, Lara PN (2003) Renal cell carcinoma: current status and future directions. *Crit Rev Oncol Hematol* 45:177-190.
- Meerkamp K, Zaichuk T, Ugele B, Petzinger E, Geyer J (2008) Expression of steroid sulfatase (STS) and sodium-dependent organic anion transporter (SOAT) in breast cancer. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377 Suppl 1:11.
- Meier PJ (1995) Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am J Physiol* 269:G801-G812.
- Meier PJ, Stieger B (2002) Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64:635-661.
- Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C, Hidaka K, Shiotsu Y, Kusaka H, Sasano H (2002) Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5760-5768.
- Miller WL (1998) Steroid hormone biosynthesis and actions in the materno-feto-placental unit. *Clin Perinatol* 25:799-817, v.
- Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, Sugiyama Y (2006) Inhibition of bile acid transport across Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug Metab Dispos* 34:1575-1581.
- Miyoshi Y, Ando A, Shiba E, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S (2001) Involvement of up-regulation of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers. *Int J Cancer* 94:685-689.
- Montagnani M, Love MW, Rössel P, Dawson PA, Qvist P (2001) Absence of dysfunctional ileal sodium-bile acid cotransporter gene mutations in patients with adult-onset idiopathic bile acid malabsorption. *Scand J Gastroenterol* 36:1077-1080.
- Montagnani M, Abrahamsson A, Gälman C, Eggertsen G, Marschall HU, Ravaioli E, Einarsson C, Dawson PA (2006) Analysis of ileal sodium/bile acid cotransporter and related nuclear receptor genes in a family with multiple cases of idiopathic bile acid malabsorption. *World J Gastroenterol* 12:7710-7714.

- Mukhopadhyay S, Ananthanarayanan M, Stieger B, Meier PJ, Suchy FJ, Anwer MS (1997) cAMP increases liver Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransport by translocating transporter to plasma membranes. *Am J Physiol* 273:G842-G848.
- Nakagawa M, Setchell KD (1990) Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid. *J Lipid Res* 31:1089-1098.
- Nakahara M, Furuya N, Takagaki K, Sugaya T, Hirota K, Fukamizu A, Kanda T, Fujii H, Sato R (2005) Ileal bile acid-binding protein, functionally associated with the farnesoid X receptor or the ileal bile acid transporter, regulates bile acid activity in the small intestine. *J Biol Chem* 280:42283-42289.
- Neimark E, Chen F, Li X, Shneider BL (2004) Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* 40:149-156.
- Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I (2004a) Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. *J Pharmacol Exp Ther* 308:438-445.
- Nozawa T, Suzuki M, Takahashi K, Yabuuchi H, Maeda T, Tsuji A, Tamai I (2004b) Involvement of estrone-3-sulfate transporters in proliferation of hormone-dependent breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 311:1032-1037.
- Nozawa T, Suzuki M, Yabuuchi H, Irokawa M, Tsuji A, Tamai I (2005) Suppression of cell proliferation by inhibition of estrone-3-sulfate transporter in estrogen-dependent breast cancer cells. *Pharm Res* 22:1634-1641.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22:289-318.
- Oelkers P, Dawson PA (1995) Cloning and chromosomal localization of the human ileal lipid-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1257:199-202.
- Oelkers P, Kirby LC, Heubi JE, Dawson PA (1997) Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2á). *J Clin Invest* 99:1880.
- Pasqualini JR, Gelly C, Nguyen BL, Vella C (1989) Importance of estrogen sulfates in breast cancer. *J Steroid Biochem* 34:155-163.
- Pasqualini JR, Chetrite G, Nguyen BL, Maloche C, Delalonde L, Talbi M, Feinstein MC, Blacker C, Botella J, Paris J (1995) Estrone sulfate-sulfatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities: a hypothesis for their role in the evolution of human breast cancer from hormone-dependence to hormone-independence. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:407-412.
- Pasqualini JR, Chetrite G, Blacker C, Feinstein MC, Delalonde L, Talbi M, Maloche C (1996) Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1460-1464.
- Pasqualini JR, Cortes-Prieto J, Chetrite G, Talbi M, Ruiz A (1997) Concentrations of estrone, estradiol and their sulfates, and evaluation of sulfatase and aromatase activities in patients with breast fibroadenoma. *Int J Cancer* 70:639-643.
- Pasqualini JR (2004) The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochim Biophys Acta* 1654:123-143.

- Pasqualini JR, Chetrite GS (2005) Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93:221-236.
- Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA, Meier PJ (2005) Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *J Hepatol* 43:342-357.
- Payne AH (1972) Gonadal steroid sulfates and sulfatase. V. Human testicular steroid sulfatase: partial characterization and possible regulation by free steroids. *Biochim Biophys Acta* 258:473-483.
- Pellicoro A, Faber KN (2007) Review article: The function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport. *Aliment Pharmacol Ther* 26 Suppl 2:149-160.
- 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 rats. *Hepatology* 30:1257-1268.
- Petzinger E, Kramer W (2003) Drug-targeting der Leber mittels Gallensäuren. *BIOforum* 26:514-516.
- Pizzagalli F, Varga Z, Huber RD, Folkers G, Meier PJ, St-Pierre MV (2003) Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3902-3912.
- Plass JR, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PL, Müller M (2002) Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* 35:589-596.
- Platia MP, Fencel MD, Elkind-Hirsch KE, Canick JA, Tulchinsky D (1984) Estrone sulfatase activity in the human brain and estrone sulfate levels in the normal menstrual cycle. *J Steroid Biochem* 21:237-241.
- Platte HD, Honscha W, Schuh K, Petzinger E (1996) Functional characterization of the hepatic sodium-dependent taurocholate transporter stably transfected into an immortalized liver-derived cell line and V79 fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 70:54-60.
- Rainey WE, Rehman KS, Carr BR (2004) The human fetal adrenal: making adrenal androgens for placental estrogens. *Semin Reprod Med* 22:327-336.
- Rao A, Haywood J, Craddock AL, Belinsky MG, Kruh GD, Dawson PA (2008) The organic solute transporter  $\alpha$ - $\beta$ , Ost $\alpha$ -Ost $\beta$ , is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3891-3896.
- Redinger RN (2003) Nuclear receptors in cholesterol catabolism: molecular biology of the enterohepatic circulation of bile salts and its role in cholesterol homeostasis. *J Lab Clin Med* 142:7-20.
- Reed MJ, Purohit A, Woo LW, Newman SP, Potter BV (2005) Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr Rev* 26:171-202.
- Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M, Bates SE (2009) ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 61:3-13.
- Rochira V, Granata AR, Madeo B, Zirilli L, Rossi G, Carani C (2005) Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years? *Asian J Androl* 7:3-20.

- Root C, Smith CD, Winegar DA, Brieady LE, Lewis MC (1995) Inhibition of ileal sodium-dependent bile acid transport by 2164U90. *J Lipid Res* 36:1106-1115.
- Root C, Smith CD, Sundseth SS, Pink HM, Wilson JG, Lewis MC (2002) Ileal bile acid transporter inhibition, CYP7A1 induction, and antilipemic action of 264W94. *J Lipid Res* 43:1320-1330.
- Rost D, König J, Weiss G, Klar E, Stremmel W, Keppler D (2001) Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. *Gastroenterology* 121:1203-1208.
- Rost D, Mahner S, Sugiyama Y, Stremmel W (2002) Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G720-G726.
- Ruder HJ, Loriaux L, Lipsett MB (1972) Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *J Clin Invest* 51:1020-1033.
- Russell DW (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72:137-174.
- Saeki T, Matoba K, Furukawa H, Kirifuji K, Kanamoto R, Iwami K (1999) Characterization, cDNA cloning, and functional expression of mouse ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biochem (Tokyo)* 125:846-851.
- Saeki T, Munetaka Y, Ueda K, Iwami K, Kanamoto R (2007) Effects of Ala substitution for conserved Cys residues in mouse ileal and hepatic Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporters. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1865-1872.
- Sakamoto S, Suzuki H, Kusuhara H, Sugiyama Y (2006) Efflux mechanism of taurocholate across the rat intestinal basolateral membrane. *Mol Pharm* 3:275-281.
- Santner SJ, Feil PD, Santen RJ (1984) *In situ* estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance versus the aromatase pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 59:29-33.
- Santner SJ, Leszczynski D, Wright C, Manni A, Feil PD, Santen RJ (1986) Estrone sulfate: a potential source of estradiol in human breast cancer tissues. *Breast Cancer Res Treat* 7:35-44.
- Sasano H, Frost AR, Saitoh R, Harada N, Poutanen M, Vihko R, Bulun SE, Silverberg SG, Nagura H (1996) Aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4042-4046.
- Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, Keppler D (1997) Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 8:1213-1221.
- Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dorsam J, Staehler G, Storkel S, Thon WF, Keppler D (1999) Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 10:1159-1169.
- Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Scheingart CD, Hofmann AF, Meier PJ, 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:G370-G375.
- Schuler G, Greven H, Hoffmann B, Döring B, Geyer J (2008) Expression of the sodium-dependent organic anion transporter (SOAT) in bovine placentomes. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 1:30.

Schwarz LR, Burr R, Schwenk M, Pfaff E, Greim H (1975) Uptake of taurocholic acid into isolated rat-liver cells. *Eur J Biochem* 55:617-623.

Seward DJ, Koh AS, Boyer JL, Ballatori N (2003) Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OST $\alpha$ -OST $\beta$ . *J Biol Chem* 278:27473-27482.

Shneider BL, Dawson PA, Christie DM, Hardikar W, Wong MH, Suchy FJ (1995) Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 95:745-754.

Shneider BL, Fox VL, Schwarz KB, Watson CL, Ananthanarayanan M, Thevananther S, Christie DM, Hardikar W, Setchell KD, Mieli-Vergani G, Suchy FJ, Mowat AP (1997) Hepatic basolateral sodium-dependent-bile acid transporter expression in two unusual cases of hypercholanemia and in extrahepatic biliary atresia. *Hepatology* 25:1176-1183.

Shneider BL (2001) Intestinal bile acid transport: biology, physiology, and pathophysiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 32:407-417.

Siiteri PK, MacDonald PC (1966) Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 26:751-761.

Simpson ER (2003) Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:225-230.

Splinter PL, Lazaridis KN, Dawson PA, LaRusso NF (2006) Cloning and expression of SLC10A4, a putative organic anion transport protein. *World J Gastroenterol* 12:6797-6805.

Srivastava A, Kreiger N (2004) Cigarette smoking and testicular cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:49-54.

St-Pierre MV, Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Meier PJ (2001) Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues. *J Exp Biol* 204:1673-1686.

St-Pierre MV, Hagenbuch B, Ugele B, Meier PJ, Stallmach T (2002) Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1856-1863.

Stengelin S, Apel S, Becker W, Maier M, Rosenberger J, Bewersdorf U, Girbig F, Weyland C, Wess G, Kramer W (1996) The rabbit ileal lipid-binding protein. Gene cloning and functional expression of the recombinant protein. *Eur J Biochem* 239:887-896.

Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Höchli M, Schroeder A, Meier PJ (1994) *In situ* localization of the hepatocytic Na<sup>+</sup>/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 107:1781-1787.

Strauss JF, III, Martinez F, Kiriakidou M (1996) Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol Reprod* 54:303-311.

Suchy FJ, Ananthanarayanan M (2006) Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43 Suppl 1:S10-S16.

Sun AQ, Ananthanarayanan M, Soroka CJ, Thevananther S, Shneider BL, Suchy FJ (1998) Sorting of rat liver and ileal sodium-dependent bile acid transporters in polarized epithelial cells. *Am J Physiol* 275:G1045-G1055.

Sun AQ, Swaby I, Xu S, Suchy FJ (2001) Cell-specific basolateral membrane sorting of the human liver Na<sup>+</sup>-dependent bile acid cotransporter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1305-G1313.

- Sun AQ, Balasubramanian N, Chen H, Shahid M, Suchy FJ (2006) Identification of functionally relevant residues of the rat ileal apical sodium-dependent bile acid cotransporter. *J Biol Chem* 281:16410-16418.
- Suzuki T, Moriya T, Ariga N, Kaneko C, Kanazawa M, Sasano H (2000) 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in human breast carcinoma: a correlation to clinicopathological parameters. *Br J Cancer* 82:518-523.
- Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y (2003a) ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* 278:22644-22649.
- Suzuki T, Miki Y, Nakata T, Shiotsu Y, Akinaga S, Inoue K, Ishida T, Kimura M, Moriya T, Sasano H (2003b) Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in normal human tissue and breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:449-454.
- Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, Abe M, Satoh F, Unno M, Nunoki K, Suzuki M, Hishinuma T, Goto J, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T (2003c) Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Mol Endocrinol* 17:1203-1215.
- Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N, Sasano H (2005) Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12:701-720.
- Swaan PW, Hillgren KM, Szoka FC, Jr., Oie S (1997a) Enhanced transepithelial transport of peptides by conjugation to cholic acid. *Bioconjug Chem* 8:520-525.
- Swaan PW, Szoka FC, Jr., Oie S (1997b) Molecular modeling of the intestinal bile acid carrier: a comparative molecular field analysis study. *J Comput Aided Mol Des* 11:581-588.
- Takashima K, Kohno T, Mori T, Ohtani A, Hirakoso K, Takeyama S (1994) The hypocholesterolemic action of TA-7552 and its effects on cholesterol metabolism in the rat. *Atherosclerosis* 107:247-257.
- Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A (2000) Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 273:251-260.
- Tamai I, Nozawa T, Koshida M, Nezu J, Sai Y, Tsuji A (2001) Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm Res* 18:1262-1269.
- Telford DE, Edwards JY, Lipson SM, Sutherland B, Barrett PH, Burnett JR, Krul ES, Keller BT, Huff MW (2003) Inhibition of both the apical sodium-dependent bile acid transporter and HMG-CoA reductase markedly enhances the clearance of LDL apoB. *J Lipid Res* 44:943-952.
- Tolle-Sander S, Lentz KA, Maeda DY, Coop A, Polli JE (2004) Increased acyclovir oral bioavailability via a bile acid conjugate. *Mol Pharm* 1:40-48.
- Tollefson MB, Vernier WF, Huang HC, Chen FP, Reinhard EJ, Beaudry J, Keller BT, Reitz DB (2000) A novel class of apical sodium co-dependent bile acid transporter inhibitors: the 2,3-disubstituted-4-phenylquinolines. *Bioorg Med Chem Lett* 10:277-279.
- Tollefson MB, Kolodziej SA, Fletcher TR, Vernier WF, Beaudry JA, Keller BT, Reitz DB (2003) A novel class of apical sodium co-dependent bile acid transporter inhibitors: the 1,2-benzothiazepines. *Bioorg Med Chem Lett* 13:3727-3730.
- Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633-671.

Tremont SJ, Lee LF, Huang HC, Keller BT, Banerjee SC, Both SR, Carpenter AJ, Wang CC, Garland DJ, Huang W, Jones C, Koeller KJ, Kolodziej SA, Li J, Manning RE, Mahoney MW, Miller RE, Mischke DA, Rath NP, Fletcher T, Reinhard EJ, Tollefson MB, Vernier WF, Wagner GM, Rapp SR, Beaudry J, Glenn K, Regina K, Schuh JR, Smith ME, Trivedi JS, Reitz DB (2005) Discovery of potent, nonsystemic apical sodium-codependent bile acid transporter inhibitors (Part 1). *J Med Chem* 48:5837-5852.

Ugele B, Simon S (1999) Uptake of dehydroepiandrosterone-3-sulfate by isolated trophoblasts from human term placenta, JEG-3, BeWo, Jar, BHK cells, and BHK cells transfected with human steryl sulfatase-cDNA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 71:203-211.

Ugele B, St-Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P (2003) Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E390-E398.

Ugele B, Bahn A, Rex-Haffner M (2008) Functional differences in steroid sulfate uptake of organic anion transporter 4 (OAT4) and organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) in human placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 111:1-6.

Van Aubel RA, Smeets PH, Peters JG, Bindels RJ, Russel FG (2002) The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J Am Soc Nephrol* 13:595-603.

Vicens M, Macias RI, Briz O, Rodriguez A, El Mir MY, Medarde M, Marin JJ (2007a) Inhibition of the intestinal absorption of bile acids using cationic derivatives: mechanism and repercussions. *Biochem Pharmacol* 73:394-404.

Vicens M, Medarde M, Macias RI, Larena MG, Villafaina A, Serrano MA, Marin JJ (2007b) Novel cationic and neutral glycocholic acid and polyamine conjugates able to inhibit transporters involved in hepatic and intestinal bile acid uptake. *Bioorg Med Chem* 15:2359-2367.

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

von Heijne G (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* 225:487-494.

von Heijne G (1995) Membrane protein assembly: rules of the game. *Bioessays* 17:25-30.

Watkins JB (1983) Placental transport: bile acid conjugation and sulfation in the fetus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2:365-373.

Webster CR, Blanch C, Anwer MS (2002) Role of PP2B in cAMP-induced dephosphorylation and translocation of NTCP. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G44-G50.

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

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

Wess G, Kramer W, Enhsen A, Glombik H, Baringhaus KH, Boger G, Urmann M, Bock K, Kleine H, Neckermann G, Hoffmann A, Pittius C, Falk E, Fehlhaber HW, Kogler H, Friedrich M (1994) Specific inhibitors of ileal bile acid transport. *J Med Chem* 37:873-875.

- West KL, Ramjiganesh T, Roy S, Keller BT, Fernandez ML (2002) 1-[4-[4[(4R,5R)-3,3-Dibutyl-7-(dimethylamino)-2,3,4,5-tetrahydro-4-hydroxy -1,1-dioxido-1-benzothiepin-5-yl]phenoxy]butyl]-4-aza-1-azoniabicyclo[2.2.2]octane methanesulfonate (SC-435), an ileal apical sodium-codependent bile acid transporter inhibitor alters hepatic cholesterol metabolism and lowers plasma low-density lipoprotein-cholesterol concentrations in guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 303:293-299.
- West KL, Zern TL, Butteiger DN, Keller BT, Fernandez ML (2003) SC-435, an ileal apical sodium co-dependent bile acid transporter (ASBT) inhibitor lowers plasma cholesterol and reduces atherosclerosis in guinea pigs. *Atherosclerosis* 171:201-210.
- Wong MH, Oelkers P, Craddock AL, Dawson PA (1994) Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* 269:1340-1347.
- Wong MH, Oelkers P, Dawson PA (1995) Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol Chem* 270:27228-27234.
- Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G (2006) Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol* 12:3553-3563.
- Zhang EY, Phelps MA, Cheng C, Ekins S, Swaan PW (2002) Modeling of active transport systems. *Adv Drug Deliv Rev* 54:329-354.
- Zhang EY, Phelps MA, Banerjee A, Khantwal CM, Chang C, Helsper F, Swaan PW (2004) Topology scanning and putative three-dimensional structure of the extracellular binding domains of the apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2). *Biochemistry* 43:11380-11392.
- Zhou F, Tanaka K, Soares MJ, You G (2003) Characterization of an organic anion transport system in a placental cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1103-E1109.
- Zollner G, Trauner M (2006) Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr* 156:380-385.

## 9 ANHANG

## Transmembrandomänen von NTCP, ASBT und SOAT (Teil 1)

	Transporter	N-Terminus	TMD1	TMD2	TMD3	TMD4	TMD5
<b>Toppred (KD-scale)</b>	NTCP	indifferent	24-44	60-80	(85-105)	123-143	157-177
	ASBT	out	29-49		85-105	131-151	164-184
	SOAT	out	30-50		85-105	130-150	164-184
<b>TMAP</b>	NTCP	----	20-47	59-87		118-146	160-180
	ASBT	in	25-53	71-99		127-152	164-186
	SOAT	----	28-56	69-89	95-115	131-153	159-182
<b>PSORTII</b>	NTCP	in	25-41	63-79		124-140	159-175
	ASBT	in	29-45	70-86	88-104	131-147	165-181
	SOAT	in	32-48	67-83	86-102	131-147	165-181
<b>ConPred II</b>	NTCP	out	24-44	60-80	87-107	120-140	156-176
	ASBT	out	29-49	70-90		129-149	162-182
	SOAT	out	31-51	70-90	96-116	130-150	163-183
<b>MEMSAT</b>	NTCP	out	25-46	60-80	90-111	118-141	158-176
	ASBT	out	29-53	55-90	97-118	125-148	165-182
	SOAT	out	32-53	66-90	97-119	127-148	165-182
<b>TMHMM</b>	NTCP	in	27-46	61-83	90-109	119-141	154-176
	ASBT	in	26-48	68-90	97-119	125-147	160-182
	SOAT	out	30-52	65-87	97-119	132-154	164-186
<b>TMpred</b>	NTCP	out	25-44	60-78	87-109	120-141	159-176
	ASBT	out	29-47	66-86	92-119	129-149	165-182
	SOAT	out	32-55	66-87	94-119	127-147	164-184
<b>Toppred (GES-scale)</b>	NTCP	indifferent	25-45	60-80	(90-110)	118-138	157-177
	ASBT	out	31-51	68-88	92-112	129-149	164-184
	SOAT	out	32-52	72-92	95-115	125-145	164-184
<b>SOSUI</b>	NTCP	----	24-46	60-82	86-108	119-141	156-177
	ASBT	----	28-50	75-97		132-153	
	SOAT	----	30-52	75-97		128-150	162-182
<b>HMMTOP</b>	NTCP	out	25-45	60-79	90-109	118-141	158-176
	ASBT	out	29-53	66-90	97-116	129-148	157-181
	SOAT	out	32-53	66-88	97-119	132-154	165-184
<b>MEMSAT3</b>	NTCP	out	22-46	60-84	89-113	119-143	154-177
	ASBT	out	31-55	67-91	94-117	126-150	160-183
	SOAT	out	30-54	67-91	97-119	124-148	160-183
<b>Predict Protein</b>	NTCP	out	26-43	62-86	91-108	122-140	156-174
	ASBT	out	34-51	69-93	98-116	129-146	163-180
	SOAT	out	33-50	69-93	98-115	130-147	162-180

## Transmembrandomänen von NTCP, ASBT und SOAT (Teil 2)

	Trans- porter	TMD6	TMD7	TMD8	TMD9	C- Terminus
<b>Toppred (KD-scale)</b>	NTCP	190-210	227-247		286-306	indifferent
	ASBT	196-216	227-247		290-310	in
	SOAT	196-216	228-248		289-309	in
<b>TMAP</b>	NTCP	190-210	220-240		275-303	----
	ASBT	195-215	226-246		283-311	out
	SOAT	191-218	220-248		283-307	----
<b>PSORTII</b>			213-229 +			
	NTCP	192-208	230-246		287-303	in
	ASBT	199-215	228-244		291-307	in
	SOAT	199-215	231-247		291-307	in
<b>ConPred II</b>			217-229 +			
	NTCP	188-208	232-244		282-302	in
	ASBT	194-214	225-245		287-307	in
	SOAT	195-215	226-246		287-307	out
<b>MEMSAT</b>	NTCP	190-208	222-246	265-284	291-307	in
	ASBT	192-216	226-245		285-309	out
	SOAT	192-216	224-247		286-308	out
<b>TMHMM</b>	NTCP	186-208	221-243		285-307	in
	ASBT	192-214	226-248		287-309	in
	SOAT	193-215	225-247		289-311	out
<b>TMpred</b>	NTCP	190-208	221-246		278-305	out
	ASBT	196-216	228-245		292-310	out
	SOAT	196-215	229-246		291-308	out
<b>Toppred (GES-scale)</b>	NTCP	190-210	226-246		276-296	indifferent
	ASBT	196-216	225-245		290-310	out
	SOAT	196-216	228-248	(264-284)	287-307	out (in)
<b>SOSUI</b>	NTCP	185-207	220-242		275-297	----
	ASBT	191-213	225-247		287-309	----
	SOAT	193-215	226-248	260-282	286-308	----
<b>HMMTOP</b>	NTCP	191-210	221-240	255-274	287-306	in
	ASBT	196-215	220-244	257-274	283-307	in
	SOAT	197-216	225-247	260-280	289-308	in
<b>MEMSAT3</b>	NTCP	193-217	220-244	253-276	281-305	in
	ASBT	198-222	225-248	259-278	286-310	in
	SOAT	196-220	224-248	258-277	286-310	in
<b>Predict Protein</b>	NTCP	190-208	222-240	261-278	283-301	in
	ASBT	197-215	226-244	266-283	288-306	in
	SOAT	197-214	226-243	266-283	288-306	in

## 10 DANKSAGUNGEN

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Joachim Geyer, welcher mich schon seit der Diplomarbeit auf meiner wissenschaftlichen Laufbahn begleitet. Für die Promotion hat er mir vertrauensvoll „seinen“ SOAT überlassen. Er hat mich jederzeit unterstützt und, wenn es sein musste, aufgemuntert und motiviert. Seine Ideen und die zahlreichen Diskussionen haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Darüber hinaus hat er mir die Möglichkeit gegeben, an weiteren Projekten (SLC10A4, SLC10A5, SLC10A7, „MDR1-Defekt beim Collic“) mitzuwirken und so über den eigenen Tellerrand hinaus zu schauen.

Prof. Dr. Katja Becker danke ich für die Übernahme dieser Arbeit als Erstgutachterin im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement und die schnelle Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke dem geschäftsführenden Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Prof. Dr. Ernst Petzinger, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Promotion an seinem Institut durchzuführen und diese immer unterstützt hat.

Weiterhin danke ich meinen Kollegen José Godoy Berthet, Carla Fernandes, Olga Gavrilova und Katrin Marschner, welche mich während des ersten großen Abschnitts meiner Promotion begleitet haben. Ihre ständige Hilfsbereitschaft, Kollegialität und die gemeinsamen Erlebnisse lassen mich gerne an diese Zeit zurückdenken. Olga, meiner langjährigen Zimmergenossin, danke ich für die vielen angenehmen gemeinsamen Stunden in unserer 628. Carla und José danke ich für ihre Hilfe bei den Immunfluoreszenzen in den Oozyten.

Bei allen Mitgliedern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken. Besonders zu nennen ist hier Dr. Jörg Alber, der immer ein offenes Ohr für experimentelle Probleme hat und mit Rat und Tat zur Seite steht. Stephanie Schmidt danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Generierung der letzten *tag*-Konstrukte sowie Marcela Moncada und der RISE-Praktikantin Vanessa Dawson für ihre Hilfe bei der Erstellung der Mutanten.

Bei Klaus Schuh bedanke ich mich für seine ungemein große Hilfe in der Zellkultur und in der Aufrechterhaltung der Infrastruktur des Labors (Vorräte auffüllen/bestellen, Spülen,

Puffer/Lösungen ansetzen, Substanzen abwiegen u.v.m.). Ich weiß dies sehr zu schätzen, seine Jahresurlaube sind mir noch in „sehr guter“ Erinnerung. Ich danke Regina Leidolf und Anita Neubauer für ihre technische Unterstützung und ihr persönliches Engagement und Interesse für die durchgeführten Versuche. Es macht viel Freude mit ihnen zu arbeiten. Dorothee von Schnakenburg danke ich für ihre Hilfe bei bürokratischen Angelegenheiten und Christoph Zimmermann für die Unterstützung bei allen technischen Problemen.

Vielen Dank sei an dieser Stelle nochmals meinen fleißigen Korrekturlesern Dr. Jörg Alber, Simone Burger und Dr. Elisabeth Bundke gesagt.

Dr. Bernhard Ugele (I. Frauenklinik, München) danke ich ganz besonders für die Generierung der SOAT-HEK293 Zelllinie und für seine Hilfe beim Aufbau der Transportversuche sowie die Bereitstellung des [<sup>3</sup>H]Estron-3β-D-glucuronids.

Vielen Dank an Prof. Dr. Hansrüdi Glatt und Dr. Nadyia Bakhiya (DIfE, Potsdam-Rehbrücke) für die Bereitstellung des Sets sulfatierter Organosulfate und für die Durchführung der Aufnahmemessungen mit 2-SMP und 4-SMP sowie die Bestimmung des K<sub>i</sub>-Wertes für diese Substanzen.

Prof. Dr. Dr. Werner Kramer (Sanofi-Aventis, Frankfurt) danke ich für die Bereitstellung des [<sup>3</sup>H]Taurolithocholat-3-sulfats.

Danke an das Graduiertenkolleg 455 „Molekulare Veterinärmedizin“. Die dort veranstalteten Seminare und vor allem Praktika haben erheblich zur Horizonterweiterung beigetragen und Anregungen für die eigene Arbeit gegeben. Nicht zuletzt hat das Gradkoll mit seiner finanziellen Unterstützung in Form eines Stipendiums und eines eigenen Budgets für Forschung und Reisemittel zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein großer Dank geht an meine Familie und Michael Schätz, welche mein Studium und meine Promotion immer unterstützt haben. Trotz des für sie sehr fremden Fachgebiets haben sie immer versucht meine Arbeit zu verstehen und haben mir in schwierigen Situationen Halt gegeben, mich motiviert, angetrieben und sehr viel Geduld bewiesen.

*Diese Arbeit wurde in den Jahren 2004-2007 durch ein Promotionsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 455 „Molekulare Veterinärmedizin“ an der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie durch das DFG-Projekt Ge1921/1-1 gefördert.*

## Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

### **„Molekulare und funktionelle Charakterisierung des humanen Sodium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT)“**

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

.....

Barbara Döring