

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Medizinischen Universitätsklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger

**Expression und Targeting
des kanalikulären Gallensalztransporters BSEP
in HepG2-Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Gerrit Sütfels

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Univ.-Professor Dr. med. Dr. rer. nat. B. Nürnberg

Referent: Univ.-Professor Dr. med. D. Häussinger

Korreferent: Professor Dr. rer. nat. K. Köhrer

Widmung

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern,
die mich immer unterstützt und gefördert haben.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater,
Herrn Professor Dr. med. D. Häussinger,
für die Überlassung des Themas
und meinem Betreuer,
Herrn Priv.-Doz. Dr. med. R. Kubitz,
für die hervorragende Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
2.	Grundlagen	8
2.1	Hepatozyten: Biologische Charakterisierung und Funktionen	
2.2	HepG2-Zellen: Modell zur Untersuchung von hepatobiliären Transportvorgängen	
2.3	<i>Bile Salt Export Pump</i> (BSEP): Struktur, Funktion und Regulation	
2.3.1	Struktur von BSEP	
2.3.2	Funktion von BSEP	
2.3.3	Regulationsmechanismen von BSEP	
2.4	Fragestellung	
3.	Materialien und Methoden	23
3.1	Kultivierung der HepG2-Zellen	
3.2	³ H-Taurocholat-Uptake-Messung in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen	
3.3	Nachweis von BSEP-RNA in HepG2-Zellen mittels RT-PCR	
3.4	Nachweis von BSEP-Protein in HepG2-Zellen mittels Western Blot	
3.5	Durchführung der Lokalisierungs- und Stimulationsexperimente in HepG2-Zellen	
3.6	Immunfluoreszenz in humanen und Ratten-Leberschnitten	
3.7	Immunfluoreszenz in isolierten Rattenhepatozyten	
3.8	Statistische Auswertung	
4.	Ergebnisse	41
4.1	Nachweis von BSEP in HepG2-Zellen	
4.2	Targeting von BSEP in HepG2-Zellen	
4.3	Golgi-Lokalisation von BSEP in isolierten Rattenhepatozyten	

5.	Diskussion	72
5.1	Nachweis und Lokalisation von BSEP in HepG2-Zellen	
5.2	Signalwege des BSEP-Targetings in HepG2-Zellen bei Stimulation mit Tauroursodeoxycholat (TUDC)	
5.3	Stimulationseffekte von Taurocholat und Tauroolithocholat auf das BSEP-Targeting	
5.4	Entleerung des BSEP-Pools im Golgi und Stimulation des BSEP-Targetings durch Cycloheximid in HepG2-Zellen	
5.5	Speicherung von BSEP im Golgi-Apparat in isolierten Rattenhepatozyten	
5.6	Kritische Wertung	
5.7	Modellvorstellung des Targetings von BSEP	
6.	Zusammenfassung	87
7.	Abkürzungsverzeichnis	88
8.	Literaturverzeichnis	90
9.	Anhang: Farbtafeln	106
10.	Lebenslauf	110

1. Einleitung

Die Produktion von Galle und deren Sekretion in die Canaliculi biliferi (Gallekanälchen) ist eine wichtige Funktion der Leber. Eine Störung dieses komplexen Prozesses führt zur Cholestase, d.h. zur Abnahme des kanalikulären Galleflusses, und damit zum Anstau von toxischen Stoffwechselprodukten im Organismus.

Man unterscheidet zwei Formen der Cholestase {148, 181}. Die häufigste ist die obstruktive bzw. posthepatische Cholestase, die extrahepatisch zumeist durch Gallensteine, Tumoren im Bereich der Gallenwege bzw. des Pankreas oder seltener durch Gallengangsstrikturen wie zum Beispiel bei der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) verursacht wird. Die nicht-obstruktiven Cholestase-Formen sind dagegen intrahepatisch lokalisiert. Wichtige Ursachen der primären nicht-obstruktiven Cholestase sind Medikamente (v.a. Östrogene, Immunsuppressiva, Phenothiazine, Antibiotika, Antiarrhythmika und Thyreostatika), Toxine sowie selten familiäre Erkrankungen wie die idiopathische Schwangerschaftscholestase {244, 264} und die progressive familiäre intrahepatische Cholestase (PFIC) mit einem angeborenen Defekt von kanalikulären Transportproteinen {275}. Sekundär kann eine Cholestase durch alle schweren Lebererkrankungen bedingt sein, so z.B. durch Virus- und Alkohol-Hepatitis, primär biliäre Zirrhose (PBC), Sepsis sowie hepatische Speicherkrankheiten.

An der Gallesekretion in der Leber sind verschiedene Transportproteine beteiligt, die Substrate zum einen aus dem portalvenösen Blut aufnehmen und zum anderen an der kanalikulären Membran in die Gallenwege sezernieren.

Während es bei der obstruktiven Cholestase erst sekundär zu einer Beeinträchtigung dieser Transportsysteme kommt, ist dies bei den nicht-obstruktiven Formen die Ursache der Krankheitsentstehung. Wie bestimmte Noxen, Therapeutika oder pathologische Veränderungen der Leber die Gallesekretion beeinflussen, ist noch nicht genau geklärt.

2. Grundlagen

2.1 Hepatozyten: Biologische Charakterisierung und Funktionen

Leberparenchymzellen (Hepatozyten) sind polar differenzierte, polyedrische Epithelzellen, die als Leberzellplatten strahlenförmig entlang der Lebersinusoiden angeordnet sind. Sie grenzen mit ihrer basalen Seite an den Dissé-Raum (perisinusoidaler Spalt), der von Blutplasma aus den Sinusoiden durchflossen wird. Untereinander stehen die Leberzellen durch Nexus und Desmosomen der lateralen Membranen in Verbindung. Diese beiden Zellmembranabschnitte werden funktionell als basolaterale Membran zusammengefasst, der die apikale bzw. kanalikuläre Membran gegenübergestellt wird. Sie bildet zwischen zwei Hepatozyten die Wand eines Gallenkanälchens (Canaliculus biliferus), das zum basolateralen Funktionsbereich hin durch Zonulae occludentes (*tight junctions*) abgetrennt wird. In das Lumen der Canaliculi ragen kurze Microvilli, die Aktin, Villin und verschiedene ATPasen enthalten, weshalb sie histochemisch gut anfärbbar sind.

Hepatozyten zeichnen sich durch eine starke metabolische Aktivität aus. Sie haben die Funktion, Bilirubin auszuscheiden, Proteine und Glukose herzustellen, Triglyzeride, Glykogen und einige Vitamine zu speichern, Aminosäuren und toxische Substanzen zu metabolisieren und vor allem Gallensalze aus dem Blut aufzunehmen, in die Galle auszuscheiden oder neu zu synthetisieren.

Gallensalze sind Cholesterinmetabolite, die über die basolaterale Membran aus dem Portalblut aufgenommen bzw. in der Leber gebildet werden. Beim Menschen dominieren Cholat und Chenodeoxycholol (CDC) als primäre C₂₄-Gallensalze {11}. In der Leber wird der überwiegende Anteil der Gallensalze mit Glycin oder Taurin konjugiert, wobei beim Menschen die Glycin-Konjugate überwiegen {121}. Im Darmlumen entstehen durch Einwirkung bakterieller Enzyme die sekundären Gallensalze, aus CDC wird durch Dehydroxylierung Lithocholat und aus Cholat wird Deoxycholol {97}. Gallensalze sind potenziell zytotoxisch. Diese Zytotoxizität ist mit der relativen Hydrophobizität korreliert {51}, kann aber durch Konjugation bzw. durch Aktivierung bestimmter anti-apoptischer Signalwege reduziert werden {217}.

Gallensalze bilden gemischte Mizellen und sind damit für die Löslichkeit von Cholesterin und Lecithin in der Galle sowie für die Lipidabsorption im Darm verantwortlich.

Ein wichtiger Faktor, der den Gallefluss reguliert, ist der enterohepatische Kreislauf der konjugierten Gallensalze. Nur etwa 5 % der in die Galle ausgeschiedenen Gallensalze entstehen *de novo*.

Für den Transport von Gallensalzen durch die Zellmembran besitzen die Hepatozyten verschiedene Membranproteine, die meist spezifisch an einer der beiden Zellmembranabschnitte vorkommen (Abb. 1). So sind der Na⁺-Taurocholat-Cotransporter (NTCP) {104} und mehrere Isoformen der polyspezifischen organischen Anionen-Transportproteine (OATP) {127, 158}, die für die Aufnahme von konjugierten bzw. unkonjugierten Gallensalzen aus dem Blut zuständig sind, basolateral lokalisiert, während die Gallensalzexportpumpe (BSEP = *Bile Salt Export Pump*) und das *Multidrug Resistance Associated Protein* (MRP2), die Gallensalze aus der Zelle in die Gallekanälchen ausschleusen, apikal exprimiert werden (Abb. 1).

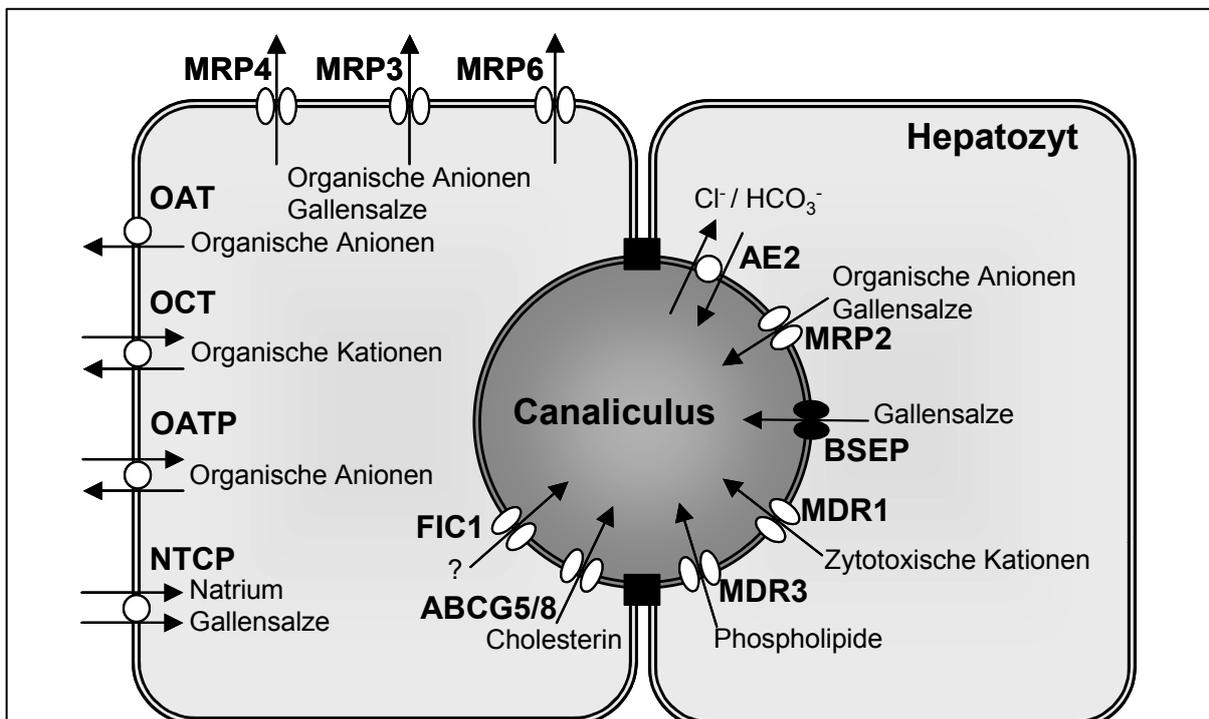


Abb. 1: Hepatozelluläre Transportproteine mit ihren Substraten:

Die basolateralen Transporter sind das Natrium-Taurocholat-Cotransport-Polypeptid (NTCP), das Organische-Anionen-Transportprotein (OATP), die Organische-Kationen- bzw. -Anionen-Transporter (OCT und OAT) sowie die *Multidrug Resistance Associated*-Proteine (MRP3, MRP4 und MRP6). Die wichtigsten kanalikulären Transportproteine sind das *Multidrug Resistance*-Genprodukt MDR1 und MDR3, die *Bile Salt Export Pump* (BSEP), das *Multidrug Resistance Associated Protein* MRP2 sowie der Anionen-Austauscher AE2. Erst kürzlich entdeckte kanalikulären Transportproteine sind FIC1 und ABCG5/8.

Abbildung nach Kullak-Ublick {157} und Häussinger {109}.

2.2 HepG2-Zellen: Modell zur Untersuchung von hepatobiliären Transportvorgängen

HepG2-Zellen {147} sind eine gut differenzierte humane Hepatoma-Zelllinie (Abb. 2), die wie Hepatozyten eine Polarisierung aufweisen. Sie sind in der Lage, Strukturen zu bilden, die den Gallekanälchen der Hepatozyten entsprechen. Diese sog. Pseudocanaliculi sind runde Strukturen mit Microvilli {58, 239}, die zwischen zwei oder mehr benachbarten Zellen ausgebildet und durch *tight junctions* abgedichtet werden. Sie enthalten Aktin, Villin {239, 292} und spezifische apikale Proteine, weswegen sie ebenso wie die Gallekanälchen der Hepatozyten mittels Immunfluoreszenz gut anfärbbar sind.

Der Metabolismus der HepG2-Zellen ist in der Literatur gut beschrieben. So sind hier einige Leber-spezifische Funktionen wie die Verstoffwechslung von Phospholipiden {100}, Cholesterin und Gallensalzen {11, 63, 84, 130}, die Synthese von hepatischen Proteinen {33, 147} sowie die für Hepatozyten typischen Sekretionswege {283, 292} nachgewiesen worden. Es wurde außerdem die Expression von ABC-Transportern wie MRP2 {49} und MDR3 {170} nachgewiesen.

Es gibt aber auch Funktionen, die sich von den Hepatozyten unterscheiden. So exprimieren HepG2-Zellen kein basolaterales Natrium-Taurocholat-Cotransport-Polypeptid (NTCP) {37, 156}, das normalerweise für 80 % der Aufnahme von konjugierten Gallensalzen verantwortlich ist {157}. Stattdessen können Gallensalze nur über einen Na⁺-unabhängigen Transporter in die Zellen gelangen {156, 178}.

Die Syntheserate von Gallensalzen in HepG2-Zellen beträgt 33 % derjenigen der normalen humanen Leber {63}. Es werden große Mengen an Vorstufen in die

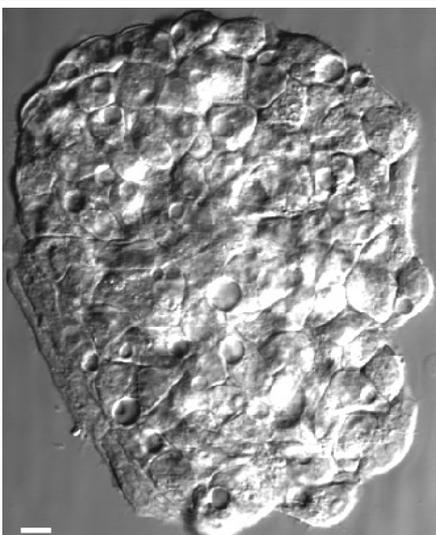


Abb. 2: HepG2-Zellen

HepG2-Zellen sind eine gut differenzierte humane Hepatoma-Zelllinie, die wie Hepatozyten eine Polarisierung aufweisen. Sie sind in der Lage, Strukturen zu bilden, die den Gallekanälchen der Hepatozyten entsprechen.

Phasenkontrastmikroskopie von subkonfluenten HepG2-Zellen. Der Balken ist 10 µm lang.

Pseudocanaliculi sezerniert {83}. Des Weiteren ist die Konjugation von Gallensalzen in HepG2-Zellen stark vermindert, so dass mehr als 65 % {63} bzw. 90 % {84} der Gallensalze unkonjugiert sezerniert werden. Chenodeoxycholat ist das Hauptgallensalz der HepG2-Zellen, Cholat wird nur in geringeren Mengen synthetisiert {84}.

HepG2-Zellen sind somit - unter gewissen Einschränkungen - ein gutes Modell zum Studium der Gallensalzproduktion und -sekretion. Der Nachweis von kanalikulären Gallensalztransportern in HepG2-Zellen ist allerdings bisher noch nicht erbracht worden.

2.3 Bile Salt Export Pump (BSEP): Struktur, Funktion und Regulation

2.3.1 Struktur von BSEP

Die *Bile Salt Export Pump* (BSEP, ABCB11, cBAT), früher auch *Sister of P-Glycoprotein* (SPGP) genannt, gehört zur Superfamilie der *ATP-Binding-Cassette*-(ABC-) Transporter, der ebenfalls das *Multidrug Resistance Associated Protein 2* (MRP2, cMOAT), das P-Glykoprotein MDR1 (PGP) und die Phospholipid-Flippase MDR3 angehören {118, 195}. Alle diese Transporter besitzen das ABC-Motiv, das für die Bindung von ATP verantwortlich ist.

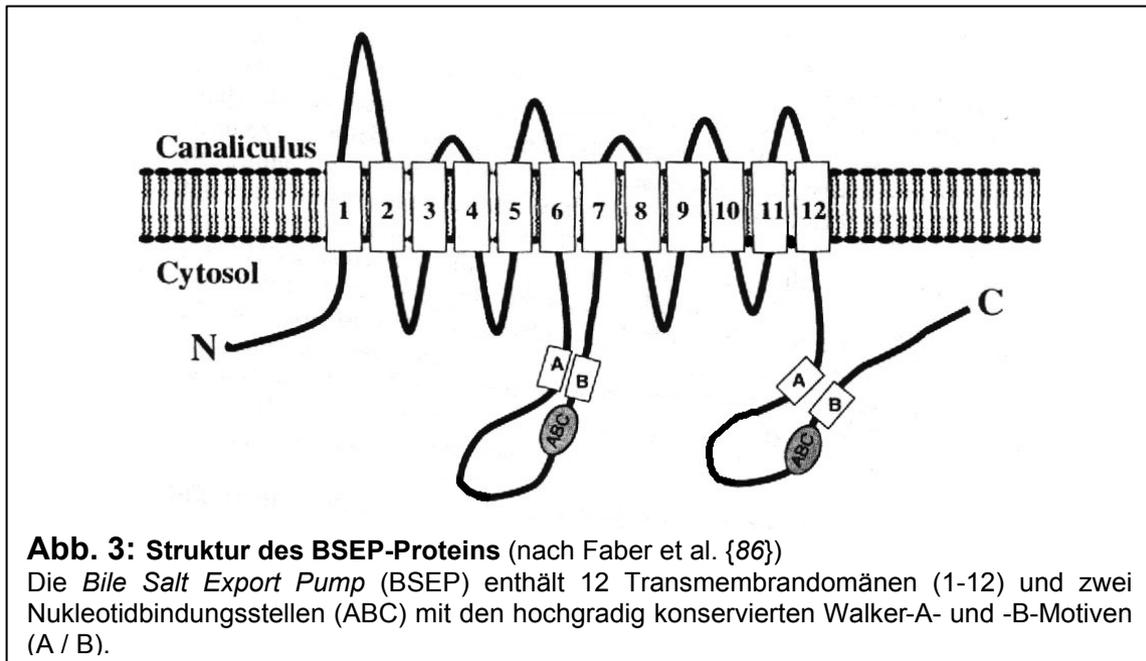
1991 wurde erstmals von Gatmaitan, Arias et al. {198} in der Rattenleber ein ATP-abhängiger kanalikulärer Gallensalztransporter beschrieben. Das Gen von BSEP wurde 1995 im Rahmen von Studien über Zytostatika-Resistenzen in einer Schweine-DNA-Datenbank entdeckt und als *Sister of P-Glycoprotein* (Spgp) bezeichnet {56}. Erst 1998 wurde seine Identität mit dem kanalikulären Gallensalztransporter (cBAT) bzw. der *Bile Salt Export Pump* (BSEP) festgestellt {99}. Die vollständige Klonierung des humanen BSEP erfolgte erstmals 2002 durch Noé et al. {203} bzw. durch Byrne et al. {47}.

Die humane BSEP-cDNA enthält 3.966 kodierende Basenpaare bei einer Transkriptionslänge von 5.036 bp {157} und verschlüsselt ein 1321 Aminosäuren langes Polypeptid {249} mit einer Molekularmasse von 140-170 kDa {46}.

Das BSEP-Protein besteht - wie alle ABC-Transporter - aus zwei homologen, durch die Linker-Region miteinander verbundenen Hälften mit je sechs Transmembrandomänen und je einer Nukleotidbindungsstelle {86} (Abb. 3). Die Nukleotidbindungsstellen ermöglichen durch die Hydrolyse von ATP die Energie zum transmembranä-

ren Transport. Ihre Walker-A- und -B-Motive {274} sind in verschiedenen ATP-abhängigen Enzymen hochgradig konserviert. Die Transmembrandomänen sind für die Substratbindung verantwortlich {253}.

BSEP konnte in den meisten Säugetierlebern nachgewiesen werden (Ratte {99}, Maus {102, 169} und Mensch {249}), aber auch bei Hühnern, Schildkröten {99}, Rochen {13}, Flundern und in verwandter Form auch in Hefepilzen (BAT1). Die Identität des humanen Gens mit Ratten- und Mäuse-BSEP beträgt 80-90 % {99, 102, 169}.



2.3.2 Funktion von BSEP

Die *Bile Salt Export Pump* (BSEP) ist der wichtigste apikale Gallensalztransporter und kommt in Hepatozyten ausschließlich an der kanalikulären Membran vor {99}, konnte aber auch im Hirngewebe (graue Substanz) und in der Darmmukosa nachgewiesen werden {169, 260}. BSEP bewirkt in einem ATP-abhängigen Prozess {245} die Sekretion von Gallensalzen in die Canaliculi biliferi (Gallekanälchen), zu denen vor allem Taurochenodeoxycholat (TCDC), Taurocholat (TC), Tauroursodeoxycholat (TUDC), Glykocholat (GC) und Cholat (in absteigender Transportrate bzw. ansteigender K_m) gehören {99, 203}. Es handelt sich hierbei um den die Ausscheidungsrate bestimmenden Schritt in der Gallensalzsekretion {184}, da ein großer Konzentrationsgradient (100-1000fach {159}) zwischen Sinusoidalblut und Galle überwunden werden muss. Es konnte durch Lecureur et al. {168, 169} auch eine Beteiligung von

BSEP an der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Zytostatika nachgewiesen werden, jedoch in geringerem Ausmaß als bei anderen ABC-Transportern {168}.

BSEP wird - wie andere Proteine auch - im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat synthetisiert bzw. modifiziert und dann in Vesikeln zur kanalikulären Membran transportiert. Möglicherweise ist der Gallensalztransporter bei diesem Vorgang bereits aktiv und führt zur Aufnahme von Gallensalzen, die dann bei Fusion der Vesikel mit der kanalikulären Membran in die Canaliculi biliferi sezerniert werden {110}.

Eine hohe intrazelluläre Gallensalzkonzentration induziert Zellnekrose und mitochondriale Dysfunktionen aufgrund einer Detergenz-ähnlichen Wirkung.

Genetische Veränderungen der BSEP bedingen die progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2 (PFIC-2) {146, 249}, eine autosomal-rezessiv vererbte schwere cholestatische Lebererkrankung, die sich bereits im ersten Lebensjahr manifestieren kann. Sie zeichnet sich durch eine Senkung der totalen Gallensalzsekretionsrate auf etwa 1 % {129} bei normalem Cholesterin und normaler γ -Glutamyltransferase (γ GT) im Serum aus {284}. Innerhalb der ersten Lebensjahre führt diese Erkrankung zu einer letalen cholestatischen Leberzirrhose. Der Defekt ist auf Chromosom 2q24 lokalisiert {250}. Bislang sind mindestens 15 BSEP-Mutationen bekannt {257, 275}. Es konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass diese Erkrankung auf einem Fehlen von BSEP an der kanalikulären Membran beruht {139, 194}.

BSEP spielt des Weiteren eine Rolle bei durch Medikamente {183, 244}, Sepsis {30, 193} und Schwangerschaft induzierter {31, 244} Cholestase sowie bei entzündlichen Leber- und Gallenwegserkrankungen {295}. Außerdem handelt es sich bei dem BSEP-Gen um ein zur Gallensteinentwicklung prädisponierendes Gen, das zu den sog. Lith-Genen gehört {165, 166}.

2.3.3 Regulationsmechanismen von BSEP

Die Menge der Gallensalztransporter in der apikalen Membran wird durch den physiologischen Bedarf der Gallesekretion gesteuert. Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden bislang vor allem am Rattenlebermodell untersucht.

Auf der Langzeitebene wird das BSEP-Angebot an der apikalen Membran über verstärkte bzw. verminderte Transkription und damit Proteinneusynthese reguliert. Stimulierend auf die BSEP-Expression wirken über den nukleären Farnesoid-X-Rezeptor (FXR bzw. BAR = *Bile Acid Receptor*) {233} konzentrationsabhängig vor allem die

Gallensalze Ursodeoxycholat, Chenodeoxycholat und Deoxycholat, in geringerem Ausmaß auch Cholat {89, 208, 229}. Dieser Vorgang läuft mit einem Maximum nach 24 Stunden ab. Ebenfalls stimulierend auf die BSEP-Transkription wirken Hypoosmolarität {278} und Glukokortikoide {278}, letztere über das *Glucocorticoid Responding Element* (GRE) in der Promotorregion von BSEP {5}.

Ein nachgewiesener Inhibitor des FXR ist Lithocholat {290}. In experimentellen Cholestase-Modellen konnte gezeigt werden, dass Endotoxine {30, 172, 193, 263, 271} und Gallengangsligationen {172, 173} die BSEP-Expression herunterregulieren. Des Weiteren führt Hyperosmolarität (Zellschrumpfung) zu einem verringerten mRNA-Level für BSEP {278}. Zollner et al. {295} wiesen in Leberbiopsien von Patienten mit cholestatischen Lebererkrankungen eine Reduktion des BSEP-mRNA-Levels um 34 Prozent nach.

In der Kurzzeitebene findet die Regulation posttranskriptionell durch allosterische oder kovalente Proteinmodifikation (z. B. durch Phosphorylierung), vermehrtes Targeting sowie durch Ein- und Ausbauvorgänge der Transporter an der kanalikulären Membran statt.

Direkte Modifikationen der BSEP erfolgen vor allem durch Phosphorylierung. Hier konnten einige mögliche Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase A (PKA) und Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Kinase II nachgewiesen werden {202}.

Bei der Regulation der Transporterpräsenz an der kanalikulären Membran gelangen die Proteine durch Endozytose innerhalb von Minuten in subapikale Vesikel {268, 269}, die bei Bedarf wieder mit der Membran verschmelzen können (Exozytose) {226}. Etwa 10 % des Galleflusses wird durch Vesikelfusion mit der Membran der Canaliculi gebildet, wobei möglicherweise auch Gallebestandteile entleert werden, die zuvor über Transporter in der Vesikelmembran aufgenommen wurden {67}. Der überwiegende Anteil wird aber über die Transportproteine in der kanalikulären Membran direkt in das Lumen der Gallekanälchen sezerniert.

Während apikale Proteine wie die 5'-Nukleotidase {221}, die Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP IV) {16, 281}, der polymerische IgA-Rezeptor {237, 240} und das kanalikuläre Zelladhäsionsmolekül cCAM105 über einen indirekten Transportweg vom Golgi-Apparat über die basolateralen Membran an den apikalen Zellpol gelangen {16, 101}, ist für BSEP ein direkter Transportweg wahrscheinlich {99, 273}. Dabei wird BSEP -

wie auch MDR1 {218} und MDR2 - in Vesikeln entlang von Microtubuli {12, 240} vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zum Gallekanälchen transportiert.

Das BSEP-Targeting erfolgt über einen intrazellulären Pool als Zwischenstation {143}. Dieser Pool enthält große Mengen an Transportproteinen (wahrscheinlich sechsmal mehr als in der kanalikulären Membran) und ermöglicht durch Exo- bzw. Endozytose an der kanalikulären Membran den Ein- bzw. Ausbau der BSEP. Er könnte damit den perikanalikulären vesikulären Strukturen (subapikales Kompartiment {268}) entsprechen, in denen der Gallensalztransporter mittels Immunogold-Färbungen und Elektronenmikroskopie {99} sowie konfokaler Laserscan-Mikroskopie {226} gefunden wurde. Auch für andere apikale Plasmamembranproteine wurden Vesikel-abhängige Ein- und Ausbaurvorgänge nachgewiesen, so z.B. für den IgA-Rezeptor {15}. Kipp et al. postulieren das Vorliegen von zwei verschiedenen Pools: einen cAMP- und einen Taurocholat-abhängigen Pool (Abb. 4).

Der Einbau von BSEP in die apikale Membran wird beschleunigt durch hypoosmotische oder Glutamin-induzierte Zellschwellung {40, 105, 107, 226}, durch Dibutyryl-cAMP {96, 112, 143, 186, 214} (wahrscheinlich über einen PKA-abhängigen Mechanismus) sowie durch Gallensalze {38} wie Taurocholat (TC) {96, 143, 214} und Tauroursodeoxycholat (TUDC) {142, 164, 223}. TUDC soll auf drei Wegen den Gallefluss fördern: 1. durch Ca^{2+} -Mobilisation {23, 24, 34} und folgende PKC-Aktivierung {24, 28, 35}, 2. durch MEK-Erk1/2-Kaskaden-Aktivierung {201} und schließlich Microtubuli-abhängige vesikuläre Exozytose {110, 150} sowie 3. durch Aktivierung der $p38^{MAPK}$ {164}.

Der Ausbau von Gallensalztransportern aus der kanalikulären Membran wird dagegen durch hyperosmotische Zellschrumpfung {226}, Endotoxine (Lipopolysaccharide) {30, 155, 193, 271}, experimentelle Gallengangsligation {206}, Phalloidin (ein Mikrofilament-Inhibitor) {216}, Östradiol {71} und Tauroolithocholat (TLC) {25} gefördert. Mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie wurde BSEP infolgedessen in einem subapikalen Kompartiment gefunden {271}.

Des Weiteren scheint BSEP eine entscheidene Rolle in der Medikamenten-induzierten Cholestase zu spielen. So bewirken das Immunsuppressivum Cyclosporin A {134, 244}, der Sulfonylharnstoff Glibenclamid {244} und der Insulin-Sensitizer Troglitazon {93} die cis-Inhibition bzw. Östradiol {31, 172, 244} die trans-Inhibition von BSEP.

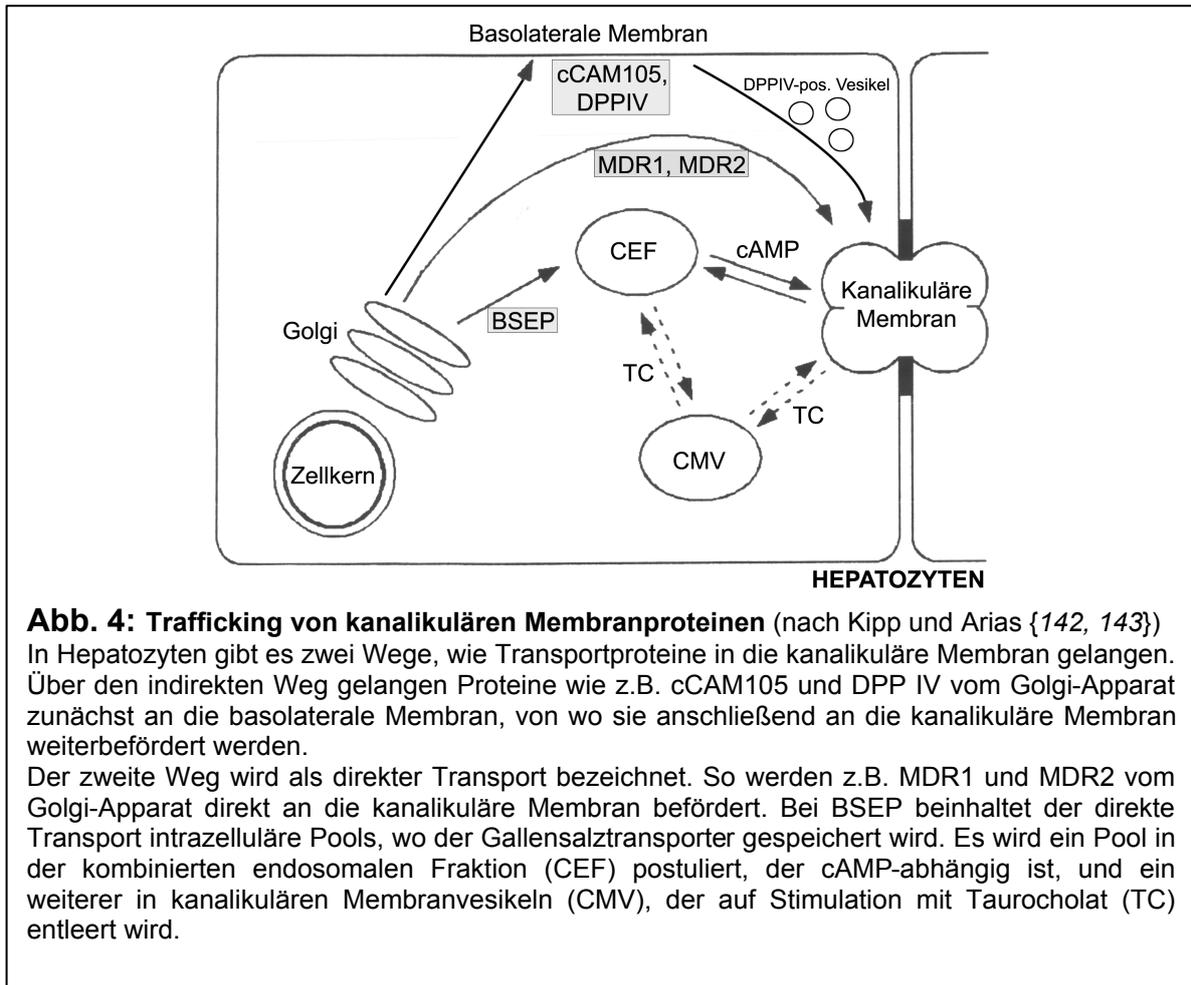


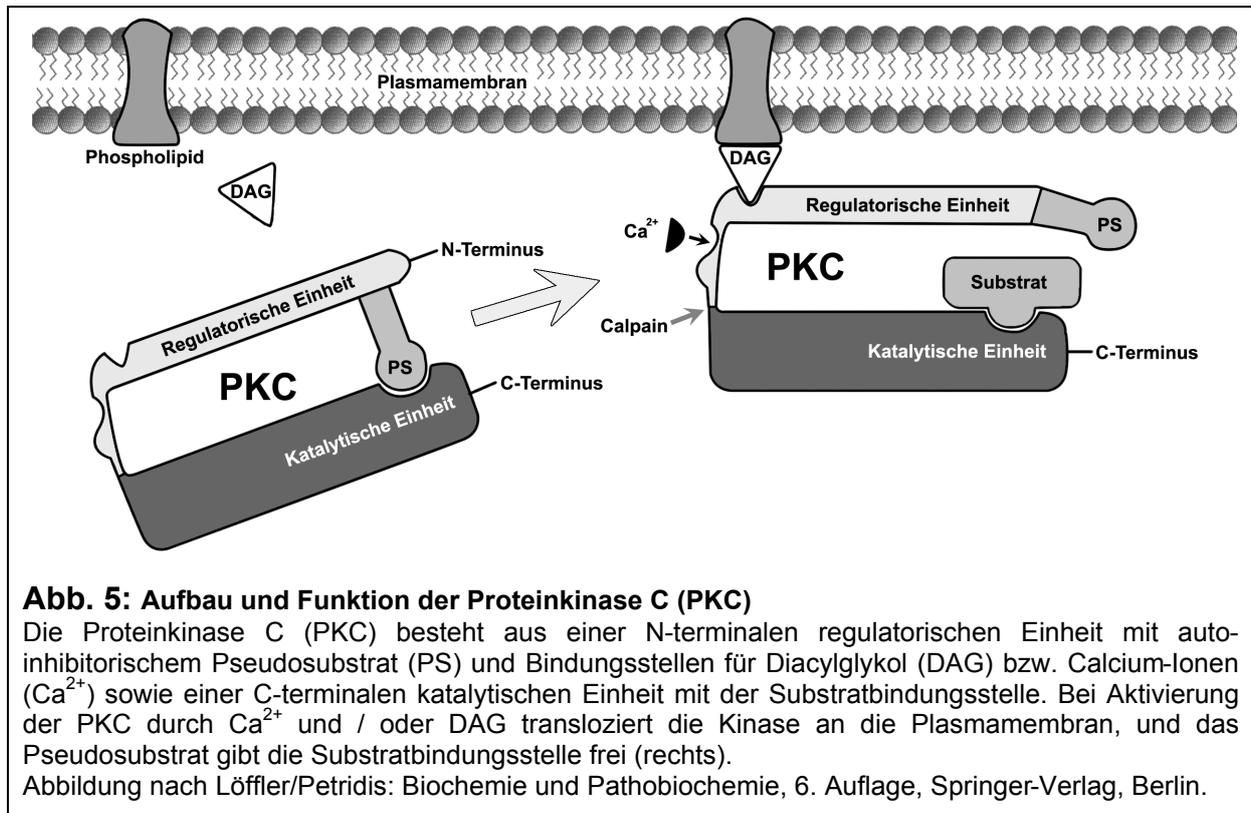
Abb. 4: Trafficking von kanalikulären Membranproteinen (nach Kipp und Arias {142, 143})
 In Hepatozyten gibt es zwei Wege, wie Transportproteine in die kanalikuläre Membran gelangen. Über den indirekten Weg gelangen Proteine wie z.B. cCAM105 und DPP IV vom Golgi-Apparat zunächst an die basolaterale Membran, von wo sie anschließend an die kanalikuläre Membran weiterbefördert werden.
 Der zweite Weg wird als direkter Transport bezeichnet. So werden z.B. MDR1 und MDR2 vom Golgi-Apparat direkt an die kanalikuläre Membran befördert. Bei BSEP beinhaltet der direkte Transport intrazelluläre Pools, wo der Gallensalztransporter gespeichert wird. Es wird ein Pool in der kombinierten endosomalen Fraktion (CEF) postuliert, der cAMP-abhängig ist, und ein weiterer in kanalikulären Membranvesikeln (CMV), der auf Stimulation mit Taurocholat (TC) entleert wird.

Es wurden bislang verschiedene Kinasen und Zellkomponenten untersucht, die am Targeting der BSEP beteiligt sein sollen. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Faktoren kurz charakterisiert.

2.3.3.1 Proteinkinase C (PKC)

Die Proteinkinase C (PKC) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das vor allem Mitose- und Sekretionssignalwege reguliert. In Anwesenheit von Calcium-Ionen bzw. Diacylglykol (DAG) werden Serin- und Threonin-Reste verschiedener Peptide bei relativ geringer Substratselektivität phosphoryliert (Review: {197}).

Die PKC wurde 1982 von Nishizuka et al. {52, 199} als Rezeptor der das Tumorstromung fördernden Phorbolster erstmals beschrieben und isoliert. Zur Zeit sind 12 Isoformen bekannt, die in drei Gruppen eingeteilt werden: die konventionellen Ca^{2+} - und Diacylglykol-(DAG)-abhängigen cPKC (α , β_I , β_{II} und γ), die „neuen“ Ca^{2+} -unabhängigen - aber DAG erfordernden - nPKC (δ , ϵ , η , θ und μ) sowie die Ca^{2+} - und DAG-unabhängigen sogenannten atypischen aPKC (ζ , ι und λ). Hepatozyten



{28, 35, 213, 251} und HepG2-Zellen {77, 161, 230} exprimieren zumindest die PKC-Isoformen α , β , δ , ϵ und ζ .

Die Proteinkinase C setzt sich aus zwei Einheiten zusammen (Abb. 5). Die N-terminale regulatorische Einheit besteht aus dem autoinhibitorischen Pseudosubstrat, der C1-Region mit den Bindungsstellen für DAG und Phosphatidylserin sowie der C2-Region mit den Bindungsstellen für Ca^{2+} und Phosphatidylserin. Die C-terminale katalytische Einheit enthält die Substrat- (C4) und ATP-Bindungsstelle (C3) sowie drei Phosphorylierungsmöglichkeiten. C3 und C4 sind in allen Isoformen konserviert {197}, die C2-Region fehlt in den neuen Ca^{2+} -unabhängigen PKC-Isoformen.

In ihrer inaktiven Form liegt die PKC an Zellmembranen und an verschiedenen Ankerproteinen (RICK = Rezeptor für inaktivierte C-Kinase) {189} gebunden vor, die Substratbindungsstelle ist frei. Mittels Phosphorylierung durch die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) wird die PKC ins Zytosol freigegeben {59, 81, 167}, und das Pseudosubstrat blockiert die Substratbindungsstelle {124}. Die Aktivierung der PKC erfolgt in Anwesenheit von DAG {144}, Phorbolestern {52} (strukturelle Ähnlichkeit zu DAG) und / oder Ca^{2+} {199} mit nachfolgender Translokation an die Plasmamembran {132} oder andere intrazelluläre Elemente {190}, wobei das Pseudosubstrat durch Konformationsänderung des Proteins von der katalytischen Einheit abgelöst wird und somit die Substratbindungsstelle freigibt {204}. Für die spezifische

Translokation und damit für die Selektivität der PKC-Isoformen ist eine Gruppe von Ankerproteinen verantwortlich, die sogenannten Rezeptoren für die aktivierte C-Kinase (RACK) {189, 191}.

Die Proteinkinase C kann durch Gallensalze ohne Benutzung der DAG-/PMA-Bindungsstelle {125} aktiviert werden. Diesbezüglich wurden verschiedene Wirkmechanismen untersucht (Review: {36}).

Gallensalze können die Translokation der PKC an die Zellmembran einleiten {120, 251} und die Konzentration von membrangebundenem DAG {28, 211} bzw. von intrazellulärem Ca^{2+} {7, 23, 34, 185} fördern, die als Aktivatoren bestimmter PKC-Isoformen wirken. Die Wirkung auf DAG geschieht möglicherweise durch die Stimulation der Phospholipase C {254}. Auch die Nachahmung des Effekts von Phosphatidylserin durch Gallensalze wurde beschrieben {91, 277}.

Bisher sind die Ergebnisse über den Effekt der PKC-Aktivierung in Hepatozyten widersprüchlich. In der isoliert perfundierten Rattenleber wurde eine Abnahme der Gallesekretion unter PKC-Stimulation beobachtet {65, 151, 152}, aber auch eine Zunahme der Exozytose von Meerrettich-Peroxidase aus intrazellulären Vesikeln {41}.

2.3.3.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) phosphoryliert Phosphoinositide an der 3-Position des Inositolrings, wobei Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI-3-P) {285}, Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PI-3,4-P₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI-3,4,5-P₃) {265} entstehen. Phosphoinositide besitzen vier Phosphorylierungsstellen und sind maßgeblich an der Regulation von Transport- und Stoffwechselfvorgängen in eukaryonten Zellen verantwortlich. Phosphatidylinositol (PI) macht in der Leber 6 % der Plasmamembranlipide aus {61}.

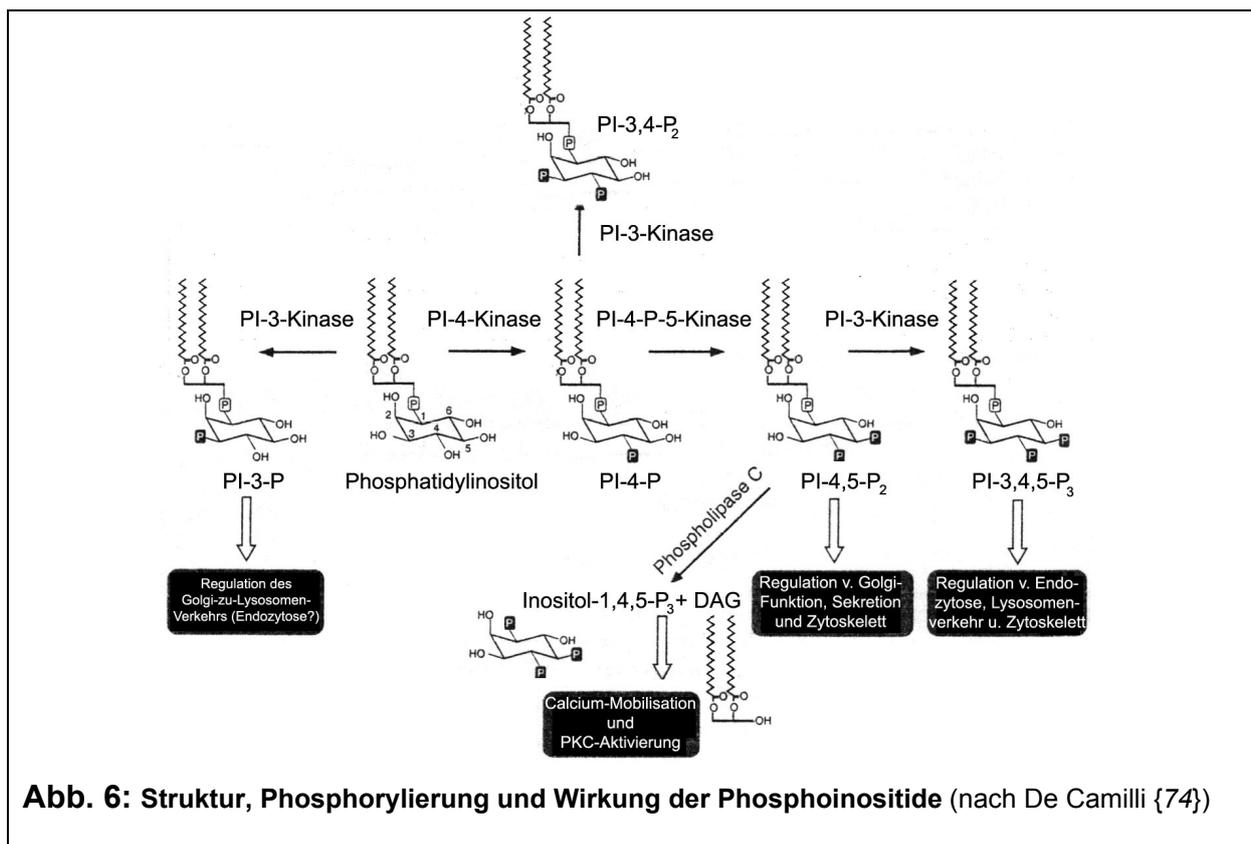
Es wurden drei PI3K-Subtypen beschrieben: Typ I kann Phosphatidylinositol (PI), PI-4-P und PI-4,5-P₂ phosphorylieren, Typ II PI und PI-4-P und Typ III nur PI (Review: {259, 267}). Die Typ-I-PI3K besteht aus einer katalytischen p110- und einer regulatorischen p85-Untereinheit.

Während PI-3-P in der Zelle ständig präsent ist, werden die Phosphoinositide PI-3,4-P₂ und PI-3,4,5-P₃ erst bei Stimulation mit bestimmten Agonisten freigesetzt {10}.

Es ist bekannt, dass sie den gerichteten vesikulären Transport {74, 259} vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) sowohl zur Plasmamembran {14, 236} als auch in Endosomen {74} und Lysosomen {270} regulieren. Außerdem interagieren sie mit dem Zytoskelett

{74}. Durch die PI-4-phosphat-5-Kinase kann PI-4,5-bisphosphat generiert werden. Dieses Phosphoinositid ist an der Regulation der Exozytose beteiligt {74} und kann durch die Phospholipase C in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglykol (DAG) umgewandelt werden {85}, welche eine Ca²⁺-Mobilisation {256} bzw. PKC-Aktivierung {144, 200} bewirken können. *In vitro* wurde auch für PI-3,4-P₂ und PI-3,4,5-P₃ eine PKC-aktivierende Wirkung nachgewiesen, wobei dies speziell für die Ca²⁺-unabhängigen Isoformen ε und η {258} sowie für die atypische PKC-ζ {196, 242} gezeigt wurde. Dafür verantwortlich gemacht wird neben der direkten Aktivierung der PKC die Stimulation der PI-3,4,5-P₃-abhängigen Proteinkinase 1 (PDK-1) {3} sowie die Fähigkeit der Phosphoinositide, PKC-Substrate an der Plasmamembran bereitzustellen {176}.

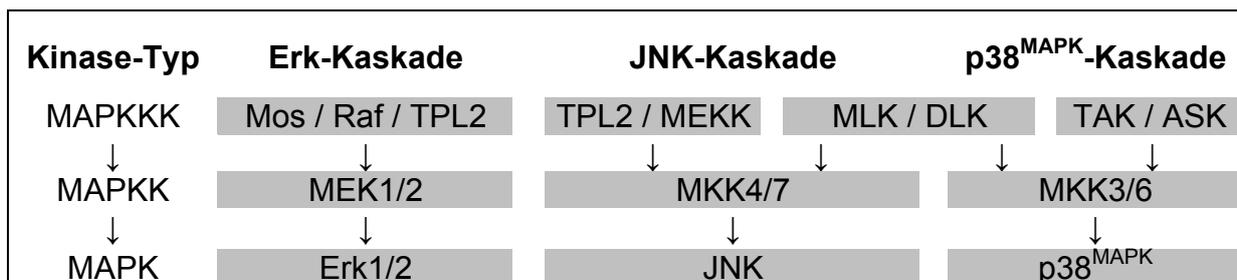
PI3K-Produkte können des Weiteren eine Aktivierung des Guanosintriphosphat-bindenden Proteins Ras bewirken {74}, das für die Endozytose an der Plasmamembran und für die Fusion von frühen Endosomen verantwortlich gemacht wird {42}, aber auch an der Signalkaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) beteiligt ist. Sipeki et al. {235} zeigten an HepG2-Zellen, dass die PI3K zur Aktivierung der MAPK vom Erk-Typ führt. Es wurde aber auch eine direkte Interaktion der PI3K-Produkte mit Transportproteinen nachgewiesen {17, 75, 232}.



2.3.3.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) wurden erstmals in den 80er-Jahren bei der Untersuchung der Wirkmechanismen von Wachstumsfaktoren {64} und Insulin {212} beschrieben. Sie sind in allen Eukaryonten gut konserviert {287} und repräsentieren einen wichtigen intrazellulären Signalweg, der zu so unterschiedlichen Reaktionen wie Zellproliferation, Differenzierung, Inflammation und Apoptose führen kann (Review: {220, 231, 287}).

Es gibt mindestens drei Typen von Signalwegen (Tab. 1), in denen Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) vertreten sind: extrazellulär-regulierte Kinase 1 bzw. 2 (Erk1/2, p44/p42^{MAPK}) {32}, p38^{MAPK} {94, 171} und c-Jun N-terminale Kinase (JNK) {103}. Jeder Signalweg besteht aus drei Kinasen, die sich sequentiell aktivieren: das sogenannte 3-Kinasen-Modul {70}. Oberhalb der MAPK liegt jeweils die relativ unspezifische MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), die zum Teil verschiedene MAPK-Kinasen (MAPKK) aktivieren kann. Diese führen dann allerdings zur spezifischen Phosphorylierung und damit Aktivierung einer bestimmten MAPK (Erk1/2, p38^{MAPK} oder JNK). Die MAPK phosphorylieren letztendlich Prolin-gesteuert Serin- und Threonin-Reste ihrer spezifischen Substrate {4}. Die physiologischen Antworten der einzelnen Signalwege sind dabei abhängig vom Zelltyp.



Tab. 1: Die drei Signalkaskaden der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)

Es gibt mindestens drei Typen von Kaskaden: die extrazellulär-regulierte Kinase (Erk), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die p38^{MAPK}. Jede Kaskade besteht aus drei Ebenen, die MAPK, oberhalb davon die MAPK-Kinase (MAPKK) und zu oberst die MAPKK-Kinase (MAPKKK)

Das Substrat der MAPK bindet bereits vor der Enzymaktivierung an die C-terminale Substratbindungsstelle {48}. Am N-Terminus befindet sich eine Domäne, an der Agonisten ansetzen und die Kinase zu einem spezifischen Aktivator führen können. Die Aktivierung der Kinase durch zweifache Phosphorylierung {6, 48} bewirkt dann mittels Änderung der Proteinkonformation die Öffnung der Bindungsstelle für Prolin, das vorzugsweise an der (+)1- bzw. bei Erks auch an der (-)3-Position des potenziellen Substrats liegt {238}. Die Spezifität der Signalgebung wird jedoch erst durch so-

nannte *scaffold*-Proteine gegeben {286}, welche die Kinasen der jeweiligen Kaskade und die Substrate in Form von Multienzym-Komplexen räumlich zusammenhalten. Wichtig ist auch die enge Verflechtung der verschiedenen MAPK-Kaskaden, die sich gegenseitig beeinflussen und sogar downstream konvergieren können {220}. So kann zum Beispiel die MAPK-integrierende Kinase 1 (MNK1) {92} von Erk1/2 und p38^{MAPK} aktiviert werden {280}. Ein weiteres MAPK-Substrat, vor allem der Erk1/2, sind Microtubuli-assoziierte Proteine wie MAP-1, -2, -4 und Tau {231}.

2.3.3.4 Zytoskelett

Bestandteile des Zytoskeletts wie Aktin-haltige Microfilamente und Microtubuli sorgen nicht nur für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur, sondern sind auch maßgeblich am Trafficking von Membranvesikeln beteiligt {182}.

Microtubuli bilden dabei die Leitschiene für den direkten Transportweg vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur apikalen Membran, während das Trafficking vom Golgi-Apparat zur basolateralen Membran Microtubulus-unabhängig abläuft {39, 82, 293}.

In anderen Studien wurden allerdings sowohl Microtubuli-abhängige {38, 126, 219} als auch Microtubuli-unabhängige {38} indirekte Transportvorgänge nachgewiesen. Roelofsen et al. zeigten, dass in frisch isolierten Rattenhepatozyten Microtubuli im Rahmen des Rearrangements für die Transzytose des kanalikulären ABC-Transporters MRP2 von der basolateralen zur apikalen Membran erforderlich sind {214}.

Aktin-haltige Microfilamente sind vor allem für die Polarisierung epithelialer Zellen verantwortlich {76} und bilden dichte Netzwerke sowie die Kernstruktur der Microvilli am apikalen (kanalikulären) Zellpol. Sie sind an der Transzytose von der basolateralen zur kanalikulären Membran {293} und an der apikalen Exozytose über das Aktin-bindende Motorprotein Myosin-1 {87} beteiligt. Den direkten Transportweg beeinflussen sie dagegen nicht {293}.

An der Rattenleber konnte gezeigt werden, dass bei Inhibition der Mikrofilament- bzw. Microtubulus-Bildung durch Cytochalasin D {133} bzw. Colchicin {110} der Gallensäure-Efflux abnimmt. Stimulierend auf den Microtubuli-abhängigen vesikulären Transportweg wirken zyklische Adenosinmonophosphate (cAMP) {123, 133} und Gallensalze {68}.

2.4 Fragestellung

Um die Pathomechanismen cholestatischer Reaktionen verstehen und neue Therapiemöglichkeiten, z.B. mit choleretischen Gallensalzen, entwickeln zu können, ist es notwendig, das Targeting der beteiligten Transportproteine in der Leber zu untersuchen.

Diese Studie soll aufklären, welche Signalwege am Targeting des Gallensalztransporters BSEP an die kanalikuläre Membran beteiligt sind und somit zu einem erhöhten Galleefflux führen. Als Stimulans des Targetings wurde das therapeutisch einsetzbare Gallensalz Tauroursodeoxycholat (TUDC) sowie der Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid benutzt.

Obwohl bereits einige Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht wurden, fehlen bislang Untersuchungen an humanen Leberzellen. Deswegen wurde hier die humane Hepatoma-Zelllinie HepG2 verwendet.

Zunächst galt jedoch nachzuweisen, dass diese Zellen ausreichend BSEP exprimieren, was bislang zum Teil sogar bestritten wurde {57}. Ferner sollte untersucht werden, in welchen intrazellulären Kompartimenten BSEP in HepG2-Zellen lokalisiert ist.

3. Materialien und Methoden

3.1 Kultivierung der HepG2-Zellen

Die HepG2-Zellen (ATCC, Manassas, USA) wurden in Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) bei 5 % CO₂ und 37° C kultiviert. Als Nährmedium wurde Dulbecco s modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose und 80 mg/l nicht-essentiellen Aminosäuren (Gibco BRL, Karlsruhe) verwendet, dem 10 % fetales Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin) sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom) zugefügt wurden. Dreimal pro Woche wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Bei Subkonfluenz wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin (Biochrom) gesplittet und in neue Kulturflaschen ausgesät.

Außerdem wurden transfizierte HepG2-Zellen verwendet, die ein Fusionsprotein aus dem Natrium-Taurocholat-Cotransport-Polypeptid der Ratte (Ntcp) und dem grün-fluoreszierenden Protein (*enhanced green fluorescence protein*, EGFP) stabil exprimieren {160}. Das Ntcp-EGFP-Plasmid enthält eine Geniticin-Resistenz. Diese Zellen wurden unter gleichen Bedingungen wie die untransfizierten HepG2-Zellen kultiviert, jedoch unter Zugabe von 400 mg/l Geniticin (Gibco BRL, Karlsruhe).

3.2 ³H-Taurocholat-Uptake-Messung in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen

Zur Untersuchung des ³H-Taurocholat-Uptakes wurden untransfizierte und Ratten-Ntcp-transfizierte HepG2-Zellen in 30mm-Kulturschalen kultiviert. Bei Subkonfluenz wurden die Zellen von je drei Kulturschalen in 1000 µl Medium, das 20 nmol Taurocholat/³H-Taurocholat enthielt, 30, 60, 120 bzw. 300 Sekunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit eiskalter Phosphat-gepufferter Kochsalz-Lösung (PBS) gewaschen.

Die Zellen wurden in 500 µl Lösung aus 0,5 mol/l NaOH und 0,05 % Natrium-Dodecylsulfat (SDS) lysiert und die Lysate mit 4 ml Ultima-Gold-Szintillationslösung (Canberry Packard, Frankfurt) vermischt. Die Radioaktivität der Proben wurden

einzel in einer Szintillationskammer (Packard Instruments, Frankfurt) gezählt und dann der Mittelwert der entsprechenden Proben errechnet.

Um die unspezifische Taurocholat-Bindung abzuschätzen, wurde zwei zusätzliche Zellproben für zwei Sekunden in eiskaltes Inkubationsmedium gegeben und dann wie oben beschrieben weiter behandelt. Der Mittelwert dieser beiden Proben wurde als Hintergrundstrahlung von den Werten der übrigen Proben abgezogen.

Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mit dem Advanced-Protein-Assay (Cytoskeleton, Denver, USA) ermittelt.

Die Taurocholat-Aufnahme in pmol pro Kulturschale sowie die Taurocholat-Aufnahme in nmol pro Kulturschale und Minute wurde mit folgenden Formeln bestimmt:

$$\text{TC-Uptake (in pmol) / Kulturschale} = \frac{\frac{\text{mg Protein}}{\text{Kulturschale}} \cdot \frac{\text{Zerfälle}}{\text{mg Protein}}}{\frac{\text{Zerfälle}}{\text{nmol TC}}}$$

$$\text{TC-Uptake (in pmol) / Kulturschale / Min.} = \frac{\frac{\text{pmol TC-Aufnahme}}{\text{Kulturschale}}}{\frac{\text{Sek. Inkubationszeit}}{60 \text{ Sek.}}}$$

3.3 Nachweis von BSEP-RNA in HepG2-Zellen mittels RT-PCR

3.3.1 Extraktion von RNA aus HepG2-Zellen

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus HepG2-Zellen wurden die Zellen auf 10cm-Kulturschalen ausgesät und bei Subkonfluenz mit Trypsin (Biochrom, Berlin) gelöst. Anschließend wurde die Zellkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) bestimmt. Die Zellsuspension wurde 3 Minuten bei 500 upm zentrifugiert und aus dem entstandenen Pellet die totale RNA gemäß Protokoll mit dem QIAgen RNA Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Homogenisierung durch den QIAshredder (Qiagen) isoliert.

Die gewonnene RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm mit einem Ultrospec-2100-pro-Spektralphotometer (Amersham, Buckinghamshire, GB) bestimmt. Die Ausbeute betrug 1,5-2,5 µg/ml RNA in 50 µl.

Zur Extraktion von *messenger*-RNA (mRNA) aus HepG2-Zellen wurde das Oligotex Direct mRNA Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die Homogenisierung fand ebenfalls mit dem QIAshredder (Qiagen) statt.

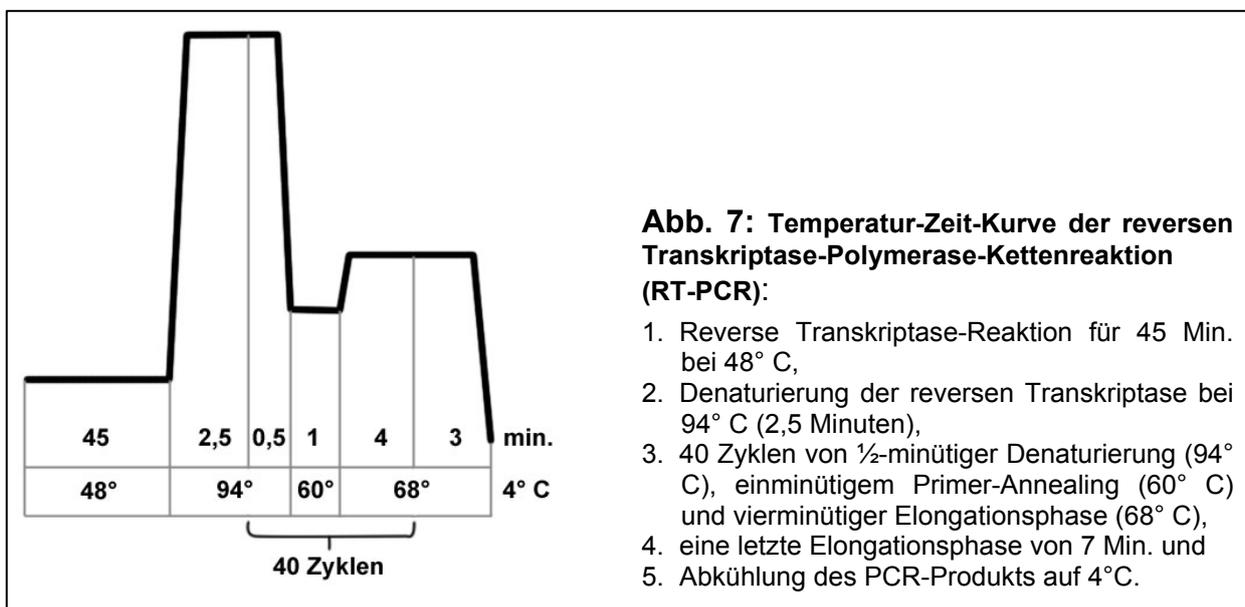
3.3.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde in einem PCR-Thermocycler PTC-200 (MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA) mit Enzymen und Puffern des Access-RT-PCR-Systems (Promega, Mannheim) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden zwei Primer-Paare hergestellt (MWG Biotech, Ebersberg), deren Sequenz nur in BSEP, nicht aber in verwandten ABC-Transportern wie MRP2 oder MDR3 vorkommt (Tab. 2). Der Forward-Primer 1 ist in Exon 17 und 18 von BSEP lokalisiert, der Reverse-Primer 1 in Exon 22. Forward- und Reverse-Primer 2 liegen in Exon 28.

Das RNA-Lysat wurde 45 Minuten bei 48° C zur reversen Transkription inkubiert (Abb. 7). Anschließend wurde zur Denaturierung der reversen Transkriptase 2,5 Minuten eine Temperatur von 94° C erzeugt. Dann folgte die Polymerase-Kettenreaktion in 40 Zyklen mit Denaturierung (0,5 Minuten bei 94° C), Primer-Annealing (eine Minute bei 60° C) und Elongation (4 Minuten bei 68° C). Die letzte Elongation dauerte 7 Minuten bei 68° C. Zuletzt wurde die Lösung auf 4° C abgekühlt.

Typ	Sequenz	Basenpaar in BSEP	Exon
Forward-Primer 1	5'-GGAGCTACCAGGATAGTTTAAG*GGCTTCCA-3'	2180 - 2210	17 * 18
Reverse-Primer 1	5'-TGTGTGGCTCCTGATAAAGCCAAGAAGGGG-3'	2879 - 2850	22
Forward-Primer 2	5'-CTAATTTCTAATGGCCTTCCATAATAATTCTGC-3'	4254 - 4286	28
Reverse-Primer 2	5'-CAGCCCTAANTGGAAAGCTCATGNTAATAC-3'	4730 - 4701	28

Tab. 2: Sequenz und Lokalisation der für die RT-PCR verwendeten Primer-Paare.
Das Sternchen markiert die Grenzstelle in Forward-Primer 1 zwischen Exon 17 und 18.



3.3.3 Gelelektrophorese

Zur Identifizierung der hergestellten komplementären DNA-Fragmente erfolgte im Anschluß an die RT-PCR eine Gelelektrophorese auf einem 0,8%igen Agarose-TAE-Gel (40 mmol/l Tris-Acetat, 1 mmol/l EDTA) unter Zusatz des Fluoreszenzstoffes Ethidiumbromid (5 µg/ml, Sigma, Deisenhofen). Als Laufpuffer wurde TAE verwendet, als Auftragspuffer eine Lösung aus 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylen-cyanol und 6,67 % Sucrose in destilliertem Wasser. Als DNA-Molekulargewichtsmarker wurden 5 µl SmartLadder (Eurogentec, Liege, Belgien) aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief zwei Stunden bei 80 V. Dann konnten die aufgetrennten DNA-Banden über einer UV-Lampe bei 234 nm beurteilt und die Größe mit Hilfe des Molekulargewichtsmarkers bestimmt werden.

3.3.4 Klonierung in einen Vektor

Für die Klonierung wurde das PCR-Produkt des Primer-Paares 2 fünf Minuten mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Vektor enthält eine Sequenz, die eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin kodiert.

3.3.5 Transformation und Bakterienkultur

Die Transformation des Vektors mit dem BSEP-DNA-Fragment in Top10F One Shot kompetente E.coli-Bakterien erfolgte mit dem Top10-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) laut Angaben des Herstellers.

Die Bakterien wurde auf Ampicillin-haltigen (50 ng/ml) Agar-Platten aus Luria-Bertani-(LB-)Medium (10 g/l Bacto-Tryptone-Peptide, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt (Becton Dickinson, Heidelberg) und 5 g/l NaCl in Aqua dest. bei pH 7,0) über Nacht bei 37° C bebrütet. Am folgenden Tag wurden die entstandenen Klone (in Form von Bakterienkolonien) in Reagenzgläser mit flüssigem LB-Bakterienmedium und Ampicillin-Zusatz gegeben und nochmals über Nacht bei 37° C inkubiert.

Die Plasmid-DNA wurde dann mit Hilfe des QIAquick Mini Kits (Qiagen, Hilden) aus den Bakterien extrahiert. Das BSEP-Insert wurde anschließend in einem Restriktionsverdau von zwei Stunden bei 37° C mit dem Enzym EcoRV (Roche, Grenzach-Wyhlen) ausgeschnitten und durch eine Gelelektrophorese aufgereinigt.

3.3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte mit einem ABI-Prism-310-Sequenzier (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung eines M13-forward- und eines M13-reverse-Primers.

Im NCBI Blast 2 Sequences (www.pubmed.com) wurden die erhaltenen Sequenzen des RT-PCR-Produkts mit dem Genom der humanen BSEP verglichen.

3.4 Nachweis von BSEP-Protein in HepG2 mittels Western Blot

3.4.1 Proteingewinnung aus HepG2-Zellen

Zur Proteingewinnung wurden in 6-Loch-Platten (*6-wells*, Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesäte HepG2-Zellen verwendet. Bei Subkonfluenz der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend auf Eis gestellt (zur Hemmung der Protease-Aktivität). Unter Zugabe von 100 µl Lysispuffers (20 mmol/l Tris, 100 mmol/l NaCl, 1 % Nonidet-Detergenz (Sigma, Deisenhofen) und 1 Tablette Complete Protease Inhibitor (Roche, Grenzach-Wyhlen) pro 50 ml) wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze von der Kulturplatte abgekratzt und in ein Plastikgefäß aufgenommen. Es wurden 50 µl Lysis-Puffer ohne Protease-Inhibitor hinzugegeben und die Lösung 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation von 5 Minuten bei 13.000 g und 4° C, wonach sich das Zelllysate im Überstand befand. Daraus wurde mit dem Advanced Proteine Assay (Cytoskeleton, Denver, USA) die Proteinmenge bestimmt.

Für die Gelelektrophorese wurden 120 µg bzw. 60 µg HepG2-Protein mit Auftragspuffer (als Endkonzentration: 55 mmol/l Tris/HCl (pH 7,8), 2,3 % Natrium-Dodecylsulfat (SDS), 0,4 mol/l Sucrose, 5 mmol/l Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 20 mmol/l Dithiothreitol (DTT), 0,03 % Bromphenolblau) verdünnt und in einem Heizblock bei 95° C für 5 Minuten denaturiert.

3.4.2 Western Blot

In eine Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen) wurde ein 8%iges Polyacrylamid-(PAA-)Natrium-Dodecylsulfat-(SDS-)Gel gegossen und mit 10%igem Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylenediamin (TEMET) polymerisiert. Als Elek-

trophoresepuffer wurde eine Lösung aus 192 mmol/l Glycin, 25 mmol/l Tris-Base und 0,1 % SDS bei einem pH-Wert von 8,3 verwendet.

Die Proteinproben und ein Standard-Proteinmarker (Rainbow Marker RPN 800, Amersham Life Science, Buckinghamshire, GB) wurden in die Geltaschen gegeben und anschließend bei 120 Volt über 2 Stunden aufgetrennt.

Zur Übertragung der aufgetrennten Proteinbanden auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Schleicher & Schuell) wurde das Gel für 2 Stunden bei 160 mA in eine Semi-Dry-Blotting-Kammer (Biometra) gegeben.

Danach wurde die Nitrozellulosemembran eine Stunde lang in 5 ml TBS-T-Puffer (TBS aus 20 mM Tris-Base und 150 mM NaCl unter Zusatz von 0,1 % Tween20 [Merck, Darmstadt] bei pH 7,50) mit 5 % Rinderserumalbumin (BSA) geblockt. Dann wurde die eine Hälfte der Membran mit dem BSEP-Antikörper K165 (1:100 verdünnt in TBS-T-Puffer + 5% BSA + Natriumacid) über Nacht bei 4° C inkubiert, der anderen Membranhälfte zusätzlich das Peptid, das zur Herstellung des Antikörpers verwendet wurde, zur Blockierung im Überangebot hinzugefügt (sog. "Blocking-Peptid", 1 µg/µl). Am nächsten Tag wurden die beiden Membranen dreimal für 15 Minuten mit TBS-T gewaschen und dann für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper (1:10.000 verdünnt in TBS-T-Puffer + 5 % BSA) inkubiert, einem gegen Kanichen-IgG gerichteten Ziegenantikörper, der Peroxidase-gekoppelt war.

Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T-Puffer wurden die Nitrozellulosemembranen mittels Chemolumineszenz unter Verwendung von ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham, Buckinghamshire, GB) und Hyperfilm ECL (Amersham) detektiert. Die Größe des Proteins wurde durch Vergleich der entstandenen Schwärzung des Films mit den Markierungen des Proteinmarkers auf der Nitrozellulosemembran bestimmt.

3.5 Durchführung der Lokalisierungs- und Stimulationsexperimente in HepG2-Zellen

3.5.1 Zellkultivierung und Stimulation

Die HepG2-Zellen wurden auf Deckgläsern (Durchmesser: 12 mm) in 24-Loch-Plastik-Kulturplatten (*24-wells*, Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesät und wie oben beschrieben versorgt.

Für die Stimulationsexperimente wurde bei subkonfluenten Zellkulturen das Nährmedium abgesaugt und durch frisches Medium mit Zusatz der entsprechenden Stimulatoren bzw. Inhibitoren ersetzt. Es wurden jeweils 4 Versuchsbedingungen erstellt: "Kontrolle", "Inhibitor", "Stimulans" sowie "Stimulans + Inhibitor". Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in Methanol bei einer Temperatur von -20° C für 10 Minuten auf den 12mm-Deckgläsern fixiert und anschließend mit der phosphatgepufferten Salzlösung PBS (Biochrom, Berlin) dreimal gewaschen. Beim dritten Waschschrift wurde dem Puffer 1 % Rinderserumalbumin (BSA = Bovine Serum Albumine, PAA, Linz, Österreich) zugefügt, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper abzublocken, und die Zellen darin über Nacht bei 4° C inkubiert.

Für die Lokalisierungsexperimente wurde das Nährmedium bei Subkonfluenz der Zellen abgesaugt und anschließend die Methanolfixierung wie oben beschrieben durchgeführt.

3.5.2 Stimulatoren und Inhibitoren

Für die Stimulationsexperimente wurden folgende Substanzen verwendet:

Substanz	Hersteller	Lösungsmittel	Konzentration im Experiment
Stimulatoren			
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen	Ethanol	100 µmol/l
Taurocholat (TC)	Sigma, Deisenhofen	Wasser	100 und 500 µmol/l
Taurolithocholat (TLC)	Sigma, Deisenhofen	Wasser	100 und 500 µmol/l
Tauroursodeoxycholat (TUDC)	Sigma, Deisenhofen	Wasser	10 bis 500 µmol/l
Inhibitoren			
Cytochalasin D	Sigma, Deisenhofen	Ethanol	0,5 und 1,0 µmol/l
Gö 6850	Calbiochem, Bad Soden	DMSO	1 µmol/l
Gö 6976	Calbiochem, Bad Soden	DMSO	1 µmol/l
Nocodazol	Sigma, Deisenhofen	DMSO	33 µmol/l
PD 098059	Calbiochem, Bad Soden	DMSO	5 µmol/l
SB 202190	Alexis, Grünberg	DMSO	0,5 und 1,0 µmol/l
Wortmannin (KY 12420)	Biomol, Hamburg	DMSO	100 nmol/l
Tab. 3: Stimulatoren und Inhibitoren der Stimulationsexperimente			

Die genannten Substanzen wurden für die Experimente in das Kulturmedium (37° C) pipettiert und vermischt.

3.5.2.1 Cycloheximid

Cycloheximid ist ein Hemmstoff der Peptidylsynthetase in eukaryonten Ribosomen; es hemmt also die Proteinbiosynthese auf dem Niveau der Peptid-Elongation {88,

243}. Es ist jedoch auch bekannt, dass Cycloheximid die MAP-Kinasen p38^{MAPK} {138, 141, 294} und Erk {141, 175} aktiviert.

3.5.2.2 Taurochololat (TC)

Taurochololat (TC) ist ein Trihydroxy-Gallensalz, das vornehmlich choleretisch wirkt {89, 228} und den Microtubuli-unabhängigen vesikulären Transport von Meerrettich-Peroxidase fördert {113}. Je nach Versuchsbedingungen konnten aber auch cholestatische Wirkungen von Taurochololat dargestellt werden {137, 145}. Es ist unklar, ob Taurochololat zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt {28, 252}.

3.5.2.3 Taurolithochololat (TLC)

Taurolithochololat (TLC) ist das Taurin-Konjugat des cholestatisch wirkenden Monohydroxy-Gallensalzes Lithochololat, das *in vivo* durch bakterielle 7 α -Dehydroxylierung des primären Gallensalzes Chenodeoxychololat entsteht {157}. Im normalen Gallenpool wird es nur in sehr geringen Konzentrationen gefunden, steigt aber zum Beispiel bei durch parenterale Ernährung bedingter oder schwerer neonataler Cholestase deutlich an {185}.

Die TLC-abhängige Cholestase wird durch Aktin-Akkumulation {255} und Verlust von Microvilli am Canaliculus {135} sowie durch Hemmung von Vesikeltransport {179} bzw. -fusion {20} erklärt. Die genauen Wirkmechanismen sind aber noch wenig erforscht.

3.5.2.4 Tauroursodeoxychololat (TUDC)

Tauroursodeoxychololat (TUDC) ist das Taurin-Konjugat des Dihydroxy-Gallensalzes Ursodeoxychololat (UDC), einem Stereoisomer des beim Menschen dominierenden Gallensalzes Chenodeoxychololat. Es macht beim Menschen allerdings nur 3 % des Gallensalzpools aus und wurde ursprünglich aus der Gallenblase von chinesischen Kragenbären gewonnen {207}. UDC wird *in vivo*, zum Beispiel bei therapeutischem Einsatz, schnell mit Taurin zu TUDC konjugiert {122}.

TUDC und UDC sind sehr hydrophil und damit die am wenigsten toxischen Gallensalze {36, 188}, was auf eine geringere Bindungsfähigkeit an Zellmembranen zurückzuführen ist {116}. UDC und TUDC wirken hepatoprotektiv {95, 114, 115, 266}, weswegen sie erfolgreich in der Therapie von chronisch entzündlichen und cholestatischen Lebererkrankungen wie der primär biliären Zirrhose (PBC) {90, 205, 209}, der

primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) {26, 248} und der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase (PFIC) {128} eingesetzt werden (Reviews: {22, 207}).

TUDC wirkt dabei der Apoptose entgegen {19}, schützt die mitochondriale Energieproduktion {174} und verändert den Gallensalz-Pool zu einer deutlich hydrophileren Zusammensetzung {247}, unter anderem durch verminderte ileale Reabsorption von Gallensalzen {246}. Außerdem wirken TUDC und UDC choloretisch {66, 131} durch erhöhte Expression {89}, verstärktes Targeting {21, 24, 164} und direkte Aktivierung {202} von kanalikulären Transportproteinen.

In Rattenhepatozyten bzw. in der perfundierter Rattenleber wurde nachgewiesen, dass TUDC die PI-3-Kinase {163}, die Erk-Typ-MAPK {223}, die p38^{MAPK} {164} und die PKC {28} aktiviert. Außerdem soll TUDC über eine Leberzellschwellung zu einer verstärkten Gallensalzsekretion führen {108}.

Es wurde bereits gezeigt, dass die hier hauptsächlich verwendete TUDC-Konzentration von 500 µmol/l die Lebensfähigkeit von Leberzellen nicht einschränkt {164, 223}. Erst bei einer 24stündigen Inkubation von HepG2-Zellen mit 800 µmol/l TUDC wurde eine leichte Transaminasen-Erhöhung festgestellt {50}.

3.5.2.5 Cytochalasin D

Cytochalasin D spaltet das Aktin der Mikrofilamente {9, 276} und blockiert damit die Bildung von kanalikulären Sekretionsvakuolen {215} sowie die Transzytose des indirekten, jedoch nicht direkten Transportwegs {293}.

3.5.2.6 Gö 6850

Das Bisindolylmaleimid Gö 6850 (GF 109203X, BIM 1) ist ein Inhibitor aller Ca²⁺-abhängigen und -unabhängigen Isoformen der Proteinkinase C (PKC). Die Selektivität für die Hemmung der PKC ist hochgradig {98, 261}. Die Potenz der Hemmwirkung erfolgt in der Reihenfolge α (IC₅₀ 8,4 ± 2,6 nM) > β_1 (IC₅₀ 18 ± 0,6 nM) > ϵ (IC₅₀ 132 ± 20 nM) > δ (IC₅₀ 210 ± 71 nM) > ζ (IC₅₀ 5800 ± 1095 nM) {180}. Es konnten keine intrinsischen Effekte auf das kanalikuläre Targeting des ABC-Transporters MRP2 gezeigt werden {151}.

3.5.2.7 Gö 6976

Das Indolocarbazol Gö 6976 ist ein spezifischer Inhibitor der Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoformen α (IC₅₀: 2,3 ± 0,42 nM) und β_1 (IC₅₀: 6,2 ± 1,1 nM) {180}, das kompetitiv mit

der ATP-bindenden Domäne des Enzyms reagiert. Es zeigt auch in mikromolaren Konzentrationen keinen inhibitorischen Effekt auf die nicht-Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoformen δ , ϵ und ζ {282}. Außerdem zeichnet es sich durch eine hohe Selektivität aus, indem es andere Kinasen wie die cGMP- bzw. cAMP-abhängigen Proteinkinasen mit über 300fach geringerer Aktivität hemmt als andere PKC-Inhibitoren (z.B. Staurosporin) {210}.

Bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ ist es ein suffizienter Hemmstoff der PMA-induzierten Veränderung der MRP2-Lokalisation in HepG2-Zellen (R. Kubitz, N. Saha und D. Häussinger, 2003; unveröffentlicht).

3.5.2.8 Nocodazol

Nocodazol führt zur Depolymerisation von Tubulin der Microtubuli. Es hemmt den direkten Vesikeltransport zur apikalen Membran {39, 82, 293} und zum Teil auch den indirekten Weg {126, 219}. Außerdem werden das vesikuläre Targeting der Gallensalz-transportierenden Ecto-ATPase sowie der kanalikuläre Gallensalz-Efflux in isolierten Ratten-Hepatozyten blockiert {38}.

3.5.2.9 PD 098059

PD 098059, ein 2'-Amino-3'-Methoxyflavon, ist ein selektiver Inhibitor der MEK1 (= MAP-Kinase/Erk-Kinase = MAP-Kinase-Kinase) {78}, die oberhalb der extrazellulär regulierten Kinase Erk1/2 liegt und diese durch Phosphorylierung aktiviert. Eine Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$ bewirkt in Rattenhepatozyten keine Zytotoxizität {223}.

3.5.2.10 SB 202190

SB 202190, das 4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-Hydroxyphenyl)-5-(4-Pyridyl)1H-Imidazol, {1, 234} ist ein spezifischer Inhibitor der Mitogen-aktivierten Proteinkinase vom p38-Subtyp (p38^{MAPK}).

3.5.2.11 Wortmannin

Der Pilz-Metabolit Wortmannin (KY 12420) ist ein Hemmstoff der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) {8}, der die katalytische Einheit des Enzyms kovalent modifiziert {289}. Konzentrationen von 50 bis 100 nmol/l sind spezifisch für die Blockierung der PI-3-Kinase Typ I {8, 163, 186, 187, 218}.

3.5.3 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden folgende Antikörper verwendet:

Antikörper	Hersteller	Ursprung	Antigen	Verdünnung
Primäre Antikörper				
Anti-Occludin	Zymed, San Francisco, USA	Maus	Occludin	1:200
Anti-Villin	Chemicon, Temecula, USA	Maus	Villin	1:50
Anti-ZO1	Biozol, Eching	Ratte	ZO1 (Maus)	1:50
CD26	Dianova, Hamburg	Maus	DPP IV (Ratte)	1:20
Anti-GM130	Becton Dickinson, Heidelberg	Maus	cis-Golgi-Protein {359}	1:40
K12	Gerloff, Stieger et al. {211}, Zürich	Kaninchen	Bsep (Ratte)	1:200
K165	Kubitz et al. {153}, Düsseldorf	Kaninchen	BSEP (Mensch)	1:50
LVT90	Kipp et Arias {142}, Boston, USA	Kaninchen	Bsep (Ratte)	1:10
M ₂ I4	Scheper et al. {119}, Amsterdam; Alexis, Grünberg	Maus	Mrp2 (Ratte)	1:20
Mdr3-IgM	Alexis, Grünberg	Maus	Mdr3	1:50
Sekundäre Antikörper				
Anti-IgM-CY3	Jackson, West Grove, USA	Ziege	Maus-IgM	1:300
goat@mouse-CY3	Jackson, West Grove, USA	Ziege	Maus-IgG	1:500
goat@mouse-FITC	Jackson, West Grove, USA	Ziege	Maus-IgG	1:100
goat@rabbit-CY3	Jackson, West Grove, USA	Ziege	Kaninchen-IgG	1:500
goat@rabbit-FITC	Jackson, West Grove, USA	Ziege	Kaninchen-IgG	1:100
goat@rabbit-CY5	Jackson, West Grove, USA	Ziege	Kaninchen-IgG	1:200
goat@rat-FITC	Jackson, West Grove, USA	Ziege	Ratten-IgG	1:100
Tab. 4: Antikörper für die Lokalisierungs- und Stimulationsexperimente (@ steht für "anti")				

Die Antikörper wurden in oben genannter Verdünnung in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gelöst.

Die auf Deckgläsern mit Methanol fixierten Zellen wurden in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4° C mit zwei primären Antikörper-Lösungen inkubiert (z.B. K12 und Anti-Villin), dann dreimal 20 Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (gelöst in PBS) für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläser mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit DAPI (Vector, Burlingame, USA) beträufelt, mit der Zellseite nach unten auf Objektträger (76 x 26 mm) gelegt und mit handelsüblichem Nagellack fixiert.

Die jeweilige Versuchsbedingung wurde durch zufällig verteilte Zahlen kodiert auf den Objektträgern vermerkt.

3.5.4 Charakterisierung der BSEP-Antikörper

Als Antikörper gegen BSEP wurden K12, LVT90 und K165 verwendet.

Der polyklonale Antikörper K12 wurde aus Kaninchen gewonnen, die mit dem 13 Aminosäuren langen Oligopeptid KGAYYKLVTTGAPIS des C-terminalen Ratten-Bsep immunisiert wurden {271}. Die korrespondierenden Stellen sind mit 11 der 13 Aminosäuren identisch. Die Sequenz des K12-Antikörpers hat keine Homologie zu Mrp1, Mrp2, Mdr1 oder Mdr2 {271}.

LVT90 ist ein polyklonaler Antikörper gegen ein 90 Aminosäuren langes Fragment aus der Linker-Region der Ratten-Bsep (Aminosäure 653-742), der aus Kaninchen-Serum gewonnen wurde {142}. Diese Aminosäuresequenz zeigt nur wenige Homologien mit anderen MDR-Transportern {142}.

Der BSEP-Antikörper K165 wurde für diese Studie neu generiert. Es handelt sich um einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der gegen ein 15 Aminosäuren langes Oligopeptid gerichtet ist, das den Aminosäuren 20 bis 34 des N-Terminus der humanen BSEP entspricht. Das Oligopeptid war über ein Cystein an das *Keyhole Limpet Hemocyanin* gekoppelt. Das Kaninchen wurde nach Standardmethoden dreimal geboostert (Peptide Speciality Labor, Heidelberg).

Die Übereinstimmung des Oligopeptids mit entsprechenden Regionen des humanen MDR1 und MDR3 beträgt zwei bzw. eine Aminosäuren, so dass Kreuzreaktionen mit den nächsten verwandten Proteinen der BSEP nicht zu erwarten sind (Abb. 8). Zur Ratten-Bsep besteht eine Übereinstimmung von 13 Aminosäuren.

Der K165-Antikörper wurde mittels Epoxy-aktivierter Sepharose 6B (Sigma) aufgereinigt {153}.

20–FESDKSYNNDKKSRL–34 humane BSEP

AKKKNFFKLNNKSEK **humanes MDR1**

TSAEGDFELGISSKQ **humanes MDR3**

FESDGSHNNDKKSRL **Ratten-Bsep**

Abb. 8: BSEP-Antikörper K165

Aminosäuresequenz des Oligopeptids der humanen BSEP, aus dem der Kaninchen-Antikörper K165 generiert wurde, und korrespondierende Sequenzen des humanen MDR1 und MDR3 sowie der Ratten-Bsep.

3.5.5 Lokalisierungsexperimente

Zum Nachweis und zur Lokalisierung von BSEP in HepG2-Zellen wurde ein Immunfluoreszenzverfahren mit Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen BSEP und gegen andere zelluläre Proteine benutzt.

Gegen BSEP wurden die Kaninchen-Antikörper K12, K165 und LVT90 angewendet. Sie wurden mit einem sekundären Cyanin3-(CY3-)gekoppelten Ziegen-Antikörper gegen Kaninchen-IgG markiert.

Zur Markierung zellulärer Strukturen wurden die Antikörper Anti-Occludin, Anti-Villin, Anti-ZO1, CD26, GM130 und M₂I4 benutzt. Sie wurden mit einem sekundären Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC-)gekoppelten Ziegen-Antikörper gegen Maus- bzw. Ratten-IgG (goat@mouse-FITC bzw. goat@rat-FITC) markiert.

Zum Nachweis der Co-Lokalisation von BSEP und MDR3 wurden K12 mit einem FITC-gekoppelten Ziegen-Antikörper gegen Kaninchen-IgG (goat@rabbit-FITC) und Anti-Mdr3 mit Anti-IgM-CY3 kombiniert.

Nach immunzytochemischer Färbung wurden die auf Objektträgern fixierten Zellproben auf einem Leica DM IRB invertierten Mikroskop mit einem Leica TCS-NT konfokalen Laser-Scanning-System mit Argon-Krypton-Laser (Leica, Bensheim) eingelesen. Die Visualisierung der Proben erfolgte über zwei Kanäle der Wellenlänge 488 nm für FITC und 568 nm für CY3.

3.5.6 Stimulationsexperimente

Bei den Stimulationsexperimenten wurden überwiegend Ntcp-transfizierte HepG2-Zellen verwendet. Es wurden jeweils vier Versuchsbedingungen erstellt: "Kontrolle", "Inhibitor", "Stimulans" und "Stimulans + Inhibitor". Die Darstellung der BSEP erfolgte mit K12 über sekundäre Cyanin5-(CY5-)gekoppelte Ziegen-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (goat@rabbit-CY5) und die Darstellung der Pseudocanaliculi mit Anti-Villin {239, 292} über Cyanin3-(CY3-)gekoppelte Ziegen-anti-Maus-IgG-Antikörper (goat@mouse-CY3).

Mit einem Axioscop 100 M invertierten Mikroskop und LSM 510 META Confocal System (Zeiss, Oberkochen) wurden pro Versuchsbedingung zehn Gesichtsfelder von 250 x 250 µm aufgenommen (40x-Objektiv, 0,9facher Zoom). Es wurden jeweils Gesichtsfelder ausgesucht, in denen mehrere Pseudocanaliculi (Anti-Villin/CY3) zu sehen waren, ohne in den Kanal für BSEP (K12/CY5) umzuschalten. Die Visualisierung der Proben erfolgte über zwei Kanäle der Wellenlänge 568 nm für CY3 und

647 nm für CY5. Die gescannten Aufnahmen wurden im RGB-Modus (rot-grün-blau) als tif-Dateien gespeichert. Für alle Versuche wurden die gleichen Einstellungen am Mikroskop und Laserscan-System verwendet (Laserstärke, Filterkombination, *Pinhole*-Weite, Linse, Spannung an den Photomultipliern).

Die Auswertung erfolgte über Zählen der Villin-haltigen Pseudocanaliculi pro Gesichtsfeld im roten Kanal (CY3) mit Hilfe von Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, USA). Die Pseudocanaliculi wurden anhand ihrer typischen runden Form und der Lokalisation zwischen zwei oder drei benachbarten Zellen erkannt {239}. Anschließend wurde der Anteil der BSEP-positiven an den Villin-positiven Pseudocanaliculi im blauen Kanal (CY5) ausgezählt. Ein Gesichtsfeld enthielt 100 bis 250 Zellen und 8 bis 40 Pseudocanaliculi.

Es wurden jeweils 10 Gesichtsfelder pro Versuchsbedingung untersucht. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal an verschiedenen Tagen wiederholt ($n \geq 3$). Versuche, bei denen die Pseudocanaliculi nicht sicher auszumachen waren bzw. bei denen keine 10 Gesichtsfelder mit Pseudocanaliculi gefunden werden konnten (z.B. bei schlechter Fixation oder Färbung), wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Vor dem Laserscannen wurde eine Blindung der Experimente durch Kodierung der Versuchsbedingungen mit nach Zufall verteilten Zahlen vorgenommen. Erst nach Auszählen einer vollständigen Experimentenserie wurden die Zahlen-Codes der Versuchsbedingungen aufgelöst und die Ergebnisse zugeordnet.

3.6 Immunfluoreszenz in humanen und Ratten-Leberschnitten

Zur Testung der BSEP-Antikörper wurden Menschen- und Ratten-Leberschnitte verwendet. Die humanen Leberstücke waren aufgrund einer metastatischen Lebererkrankung chirurgisch entfernt worden. Die Rattenleberstücke stammten von männlichen Wistar-Ratten.

Die gefrorenen Leberstücke wurden mit Hilfe eines Kryotoms (CM 3050, Leica, Bensheim) in 7 µm dicke Scheiben geschnitten, auf Objektträgern eine Stunde lang luftgetrocknet und mit reinem Methanol (-20° C, 10 Minuten) fixiert. Unspezifische Bindungen wurden durch einstündige Inkubation mit 1%igem BSA in PBS blockiert.

Die Immunfärbungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Als BSEP-Antikörper dienten K12 und K165, als kanalikulärer Marker der MRP2-Antikörper M₂I4.

3.7 Immunfluoreszenz in isolierten Rattenhepatozyten

Primäre Rattenhepatozyten wurden wie bei Kubitz et al. {154} beschrieben mittels der Kollagenase-Perfusionsmethode aus Lebern männlicher Wistar-Ratten gewonnen. Sie wurden auf mit Kollagen Typ VII (Sigma) beschichteten Glasplättchen angezüchtet. Als Nährmedium wurde Williams-E-Medium unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 nmol/l Dexamethason und 100 nmol/l Insulin verwendet. Nach 16-stündiger Kultivierung wurde das Medium durch frisches, FCS-freies Medium ersetzt, dem Gö6850 (1 µmol/l), SB202190 (500 nmol/l) oder DMSO (als Kontrolle) hinzugefügt war. Nach 8-stündiger Inkubationszeit erfolgte die Fixierung der Zellen mit Methanol und die Immunfluoreszenz-Färbungen wie oben beschrieben.

Zum Nachweis der Polarisierung der isolierten Rattenhepatozyten wurde Mrp2 mit dem Kaninchen-Antikörper EAG15 (Prof. D. Keppler, DKFZ, Heidelberg {43}) und dem fluoreszierenden Mrp2-Substrat Chloromethylfluorescein-Diacetat (CMFDA, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) sowie Bsep mit dem K12-Antikörper und dem fluoreszierenden Gallensalz Cholyl-Lysylfluorescein (CLF, Dr. C. Mills, Birmingham, Großbritannien {288}) morphologisch und funktionell dargestellt.

3.8 Statistische Auswertung

3.8.1 Kruskal-Wallis-Test mit multiplen Vergleichstest nach Dunn

Bei den Stimulationsexperimenten wurde der Prozentsatz der BSEP-positiven an den durch Villin markierten Pseudocanaliculi (= Gesamtzahl der Gallekanälchen) in Excel-Tabellen (Microsoft) errechnet. Die Werte wurden auf die 3. Nachkommastelle gerundet und dann in die Statistikprogramme JMP (SAS Institute Inc.) und InStat 3 (GraphPad Software, San Diego, USA) übertragen, wo der Mittelwert und die Standardabweichung aller gleichen Bedingungen (mindestens 3 unabhängige Versuchswiederholungen mit je 10 Gesichtsfeldern) berechnet wurden. Es gab vier Versuchsbedingungen (Stichproben): "Kontrolle", "Inhibitor", "Stimulans" und "Stimulans + Inhibitor".

Es sollte nachgewiesen werden, ob die Inhibitoren (z.B. Gö 6850) den stimulierenden Effekt von TUDC bzw. Cycloheximid auf das BSEP-Targeting reduzieren. Dazu wurden in erster Linie die Versuchsbedingungen "Stimulans" und "Stimulans + Inhibi-

tor" verglichen. Ein signifikanter Unterschied sprach für die Beteiligung derjenigen Kinase am Targeting von BSEP, die durch den Inhibitor gehemmt wurde. Des Weiteren war wichtig, dass der Inhibitor nicht selbst das BSEP-Targeting beeinflusst hat, weswegen zusätzlich die Bedingungen "Kontrolle" und "Inhibitor" verglichen wurden, wobei das Fehlen eines signifikanten Unterschieds gegen einen Eigeneffekt des Hemmstoffs sprach. Zum Nachweis des stimulierenden Effekts von TUDC bzw. Cycloheximid in der entsprechenden Versuchsserie wurde außerdem die Gruppe "Stimulans" der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Als erstes sollte gezeigt werden, dass die Unterschiede in den vier Stichproben nicht auf einer zufälligen Variabilität beruhten. Es wurde also die Nullhypothese geprüft, dass die Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammten. Da es sich um mehr als drei stetig verteilte, unabhängige Stichproben handelte, die nicht durchgehend normalverteilt waren, wurde die nicht-parametrische Varianzanalyse (ANOVA) nach Kruskal und Wallis, der sogenannte H-Test, angewendet (InStat 3, GraphPad Software) {44, 72, 149}. Zunächst wurden Rangzahlen für die Einzelwerte ermittelt und anschließend die Prüfgröße H nach folgender Formel berechnet:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \left[\sum_{i=1}^k \frac{1}{n_i} (r_{*i} - E(R_{*i}))^2 \right] \frac{1}{K}$$

H = Kruskal-Wallis-Prüfgröße

n = Gesamtzahl der Werte

n_i = Anzahl der Werte der Stichprobe i

r_{*i} = Rangsumme der Stichprobe i

$E(R_{*i})$ = Erwartungswert = erwarteter Mittelwert der Rangsummen bei gleicher Verteilung der Werte = $n_i (n + 1) / 2$

K = Korrekturfaktor für Bindungen (*ties*)

$$K = 1 - \frac{1}{n^3 - n} \sum_{j=1}^r (t_j^3 - t_j)$$

r = Anzahl der Bindungsgruppen

t_j = Anzahl der Bindungen in der Gruppe j ($1 \leq j \leq r$)

Aus der Prüfgröße H wurde mittels des Chi-Quadrat-Tests der P-Wert abgeschätzt {44, 272}:

$$H \leq \chi^2_{k-1; 1-\alpha}$$

k = Anzahl der Stichproben (k-1 = Freiheitsgrade)

α = Irrtumswahrscheinlichkeit

Bei einem P-Wert $\leq 0,05$ wurde die Nullhypothese verworfen, und es folgten die sechs Stichprobenvergleiche, nämlich

"Stimulans + Inhibitor"	vs.	"Stimulans",
"Inhibitor"	vs.	"Kontrolle"
"Stimulans"	vs.	"Kontrolle"
"Stimulans + Inhibitor"	vs.	"Kontrolle"
"Stimulans + Inhibitor"	vs.	"Inhibitor" und
"Stimulans"	vs.	"Inhibitor".

Um signifikante Unterschiede in den genannten Stichproben zu ermitteln, wurde der multiple Vergleichstest nach Dunn (Kruskal-Wallis-Post-Test) durchgeführt {45, 72, 79}. Er berechnete den P-Wert für die oben genannten Vergleiche nach folgender Formel:

$$|\bar{R}_i - \bar{R}_j| \leq z_{(1-[\alpha/k(k-1)])} \sqrt{\frac{n(n+1)}{12} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}\right)}$$

\bar{R}_i = Mittelwert der Ränge der Stichprobe i

\bar{R}_j = Mittelwert der Ränge der Stichprobe j

$z_{(1-[\alpha/k(k-1)])}$ = Kritischer Wert von α (unter Berücksichtigung der Anzahl der durchgeführten Vergleiche)

α = Gesamt-Irrtumswahrscheinlichkeit

k = Anzahl der Stichproben

n = Gesamtzahl der Werte

n_i = Anzahl der Werte der Stichprobe i

n_j = Anzahl der Werte der Stichprobe j

Als Irrtumswahrscheinlichkeit α wurde wiederum 0,05 eingesetzt. Wenn der linke Teil der Formel größer als der rechte war, wurde die Nullhypothese, dass beide Stichproben aus dergleichen Grundgesamtheit stammten, verworfen und der Unterschied zwischen beiden Stichproben auf dem Niveau von α als signifikant (*) betrachtet.

3.8.2 **Mann-Whitney-Test (U-Test)**

Beim Vergleich von Cycloheximid-stimulierten mit unstimulierten HepG2-Zellen wurde der für genau zwei unabhängige Stichproben gültige, zweiseitige Mann-Whitney-Test (U-Test, Wilcoxon-Rangsummentest) angewendet. Das Statistik-Programm InStat 3 (GraphPad Software) vergab Rangzahlen an die Beobachtungs-

werte (Anteil der BSEP-positiven an den Gesamt-Pseudocanaliculi). Mittels der beiden folgenden Formel wurde die Prüfgrößen U_1 und U_2 berechnet:

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

U = Prüfgröße

n_1 = Anzahl der Werte in Stichprobe 1

n_2 = Anzahl der Werte in Stichprobe 2

R_1 = Rangsumme von Stichprobe 1

R_2 = Rangsumme von Stichprobe 2

Aufgrund des großen Stichprobenumfangs wurde der P-Wert mittels der Normalverteilung abgeschätzt:

$$z^* < -z_\alpha$$

$$z^* = \frac{U_2 - \mu}{\sigma} \quad \mu = \frac{n_1 n_2}{2} \quad \sigma = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}$$

z_α = Kritischer Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit α

4. Ergebnisse

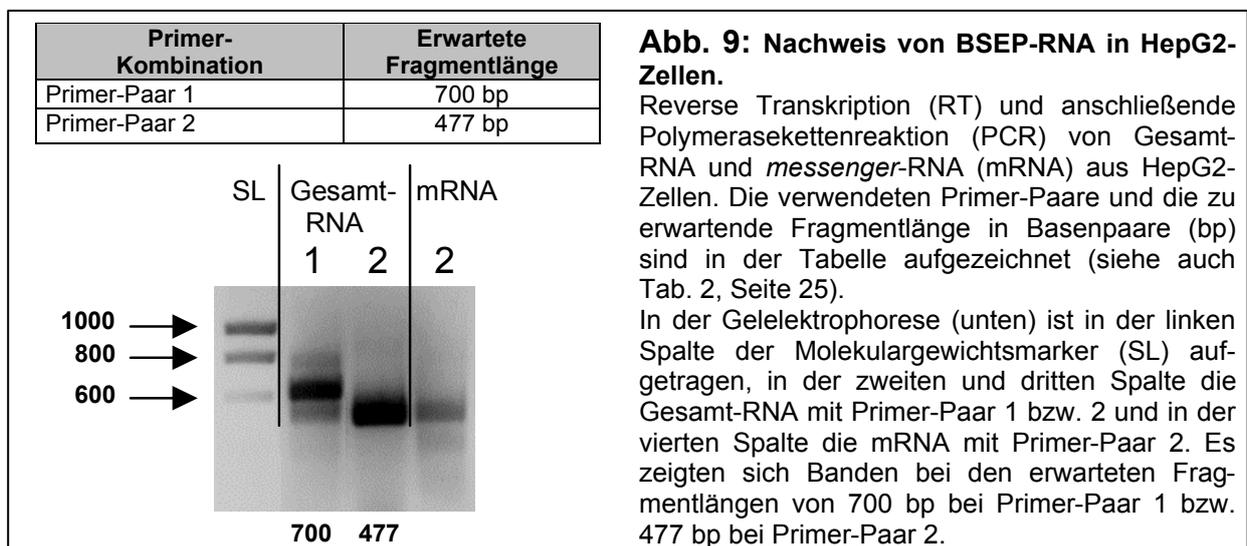
4.1 Nachweis von BSEP in HepG2-Zellen

4.1.1 Nachweis von BSEP-RNA mittels RT-PCR und Sequenzierung

Die Expression von BSEP in HepG2-Zellen wurde auf dem RNA-Level durch reverse Transkription (RT) gefolgt von einer Polymerasekettenreaktion (PCR) untersucht. Dazu wurden BSEP-spezifische Primer und aus HepG2-Zellen extrahierte Gesamt-RNA bzw. *messenger*-RNA (mRNA) verwendet. Das Produkt der RT-PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese separiert. Anhand eines mitlaufenden Molekulargewichtsmarkers (*smart ladder* = SL) konnte die Größe der entstandenen cDNA-Fragmente bestimmt werden.

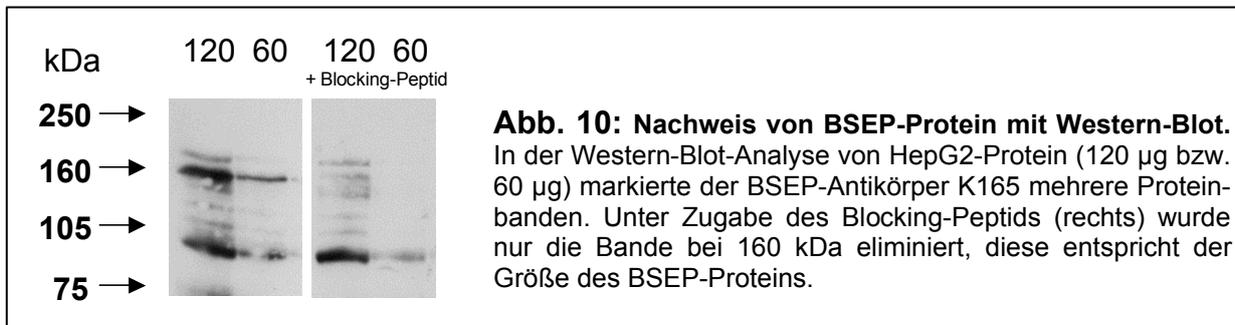
Das erste Primer-Paar liegt in Exon 17/18 bzw. 22, das zweite Paar in Exon 28 des humane BSEP (Tab. 2, Seite 25). Es wurde ein Molekulargewicht von 700 Basenpaaren (bp) für das erste und von 477 bp für das zweite Primer-Paar erwartet (Abb. 9). Diese Größen wurden sowohl für die Gesamt-RNA (Primer-Paar 1 und 2) als auch für die mRNA (Primer-Paar 2) erreicht (Abb. 9). Da der erste Forward-Primer das Exon 17 und 18 überspannt und der Reverse-Primer im Exon 22 liegt, wird hier sichergestellt, dass nur mRNA und nicht genomische DNA detektiert wurde.

Die cDNA, die mit Hilfe des zweiten Primer-Paares aus Gesamt-RNA hergestellt worden war, wurde in einen PCR-Vektor kloniert und sequenziert. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß, dass das Fragment mit dem entsprechenden BSEP-Bereich identisch war.



4.1.2 Nachweis von BSEP-Protein mittels Western Blot

Die Expression des BSEP-Proteins in HepG2-Zellen wurde mittels Western-Blot-Analyse dargestellt. HepG2-Zelllysate wurden im SDS-Gel aufgetrennt. Der polyklonale BSEP-Antikörper K165 markierte mehrere Proteinbanden (Abb. 10, linke Spalte), allerdings konnte nur die bei etwa 160 kDa gelegene Bande durch Zugabe des Blocking-Peptids, d.h. des zur Antikörper-Herstellung benutzten Proteins, eliminiert werden (Abb. 10, rechte Spalte). Dies entspricht der Größe des BSEP-Proteins und weist die Gallensalzexportpumpe in HepG2-Zellen nach.

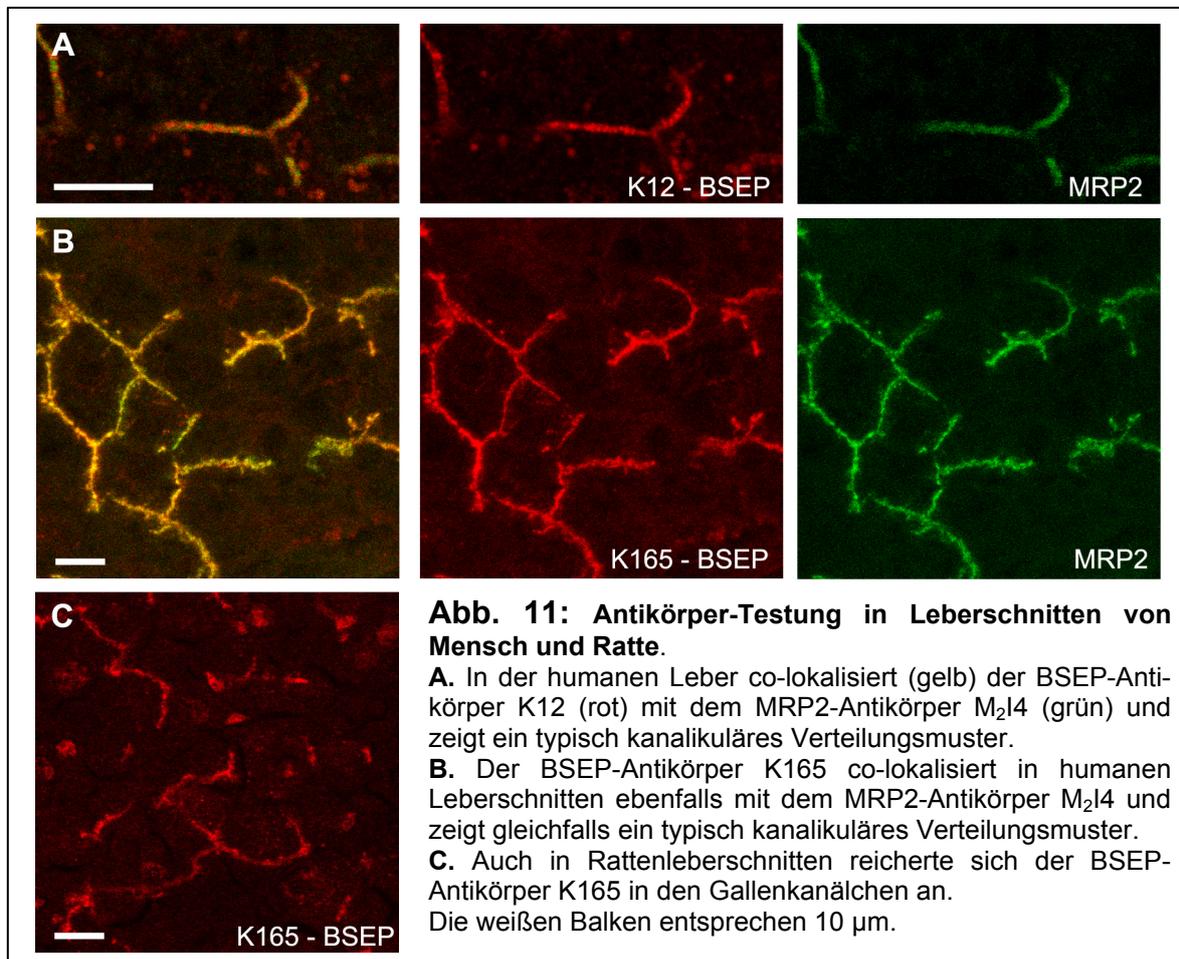


4.1.3 Nachweis und Lokalisierung von BSEP mittels Immunfluoreszenz

Der Nachweis von BSEP-Protein in HepG2-Zellen erfolgte außerdem durch Immunfärbungen. Dazu wurden drei verschiedene BSEP-Antikörper verwendet. K12 ist ein in Kaninchen generierter Antikörper gegen ein 13 Aminosäuren langes, C-terminales Oligopeptid des Ratten-Bsep, das in 11 Aminosäuren mit dem humanen BSEP übereinstimmt. K165 ist ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen ein 15 Aminosäuren langes, N-terminales Fragment des humanen BSEP, das mit 13 Aminosäuren des Ratten-Bsep übereinstimmt. Bei LVT90 handelt es sich um einen in Kaninchen produzierten Antikörper gegen ein 90 Aminosäuren langes Fragment des Ratten-Bsep, das aus der Linker-Region stammt.

Die beiden Antikörper K12 und K165 wurden zunächst an humanen Leberschnitten getestet. Dabei zeigten sie ein typisch kanalikuläres Verteilungsmuster sowie eine Co-Lokalisation mit dem kanalikulären Transportprotein MRP2 (Abb. 11 A und B). Auch in Rattenleberschnitten konnte eine Anreicherung von K165 in den Canaliculi beobachtet werden (Abb. 11 C).

Bei mit Methanol auf Glasplättchen fixierten HepG2-Zellen zeigten K12 und K165 eine deutliche Immunreaktivität in einer perinukleären Verteilung sowie in einigen Pseudocanaliculi.



Das pseudokanalikuläre Vorkommen von BSEP wurde durch die Co-Lokalisation mit typischen kanalikulären Markerproteinen demonstriert (Abb. 12 und 13). Als Markerproteine wurden das in Microvilli enthaltene Protein Villin (Abb. 12 A), die Transportpeptide MRP2 (Abb. 12 B), DPPIV (Abb. 12 C) und MDR3 (Abb. 12 F) sowie die *Tight-junction*-Proteine ZO1 (Abb. 12 D) und Occludin (Abb. 12 E) verwendet. Es zeigten sich jeweils deutliche Co-Lokalisationen.

In 20 Passagen von HepG2-Zellen wurde der Anteil der BSEP-positiven (K12) an der Gesamtzahl der Pseudocanaliculi (Villin) in je zehn Gesichtsfeldern ausgezählt. Demnach enthielten nur $14,7 \pm 7,4$ % der Villin-positiven Pseudocanaliculi auch BSEP.

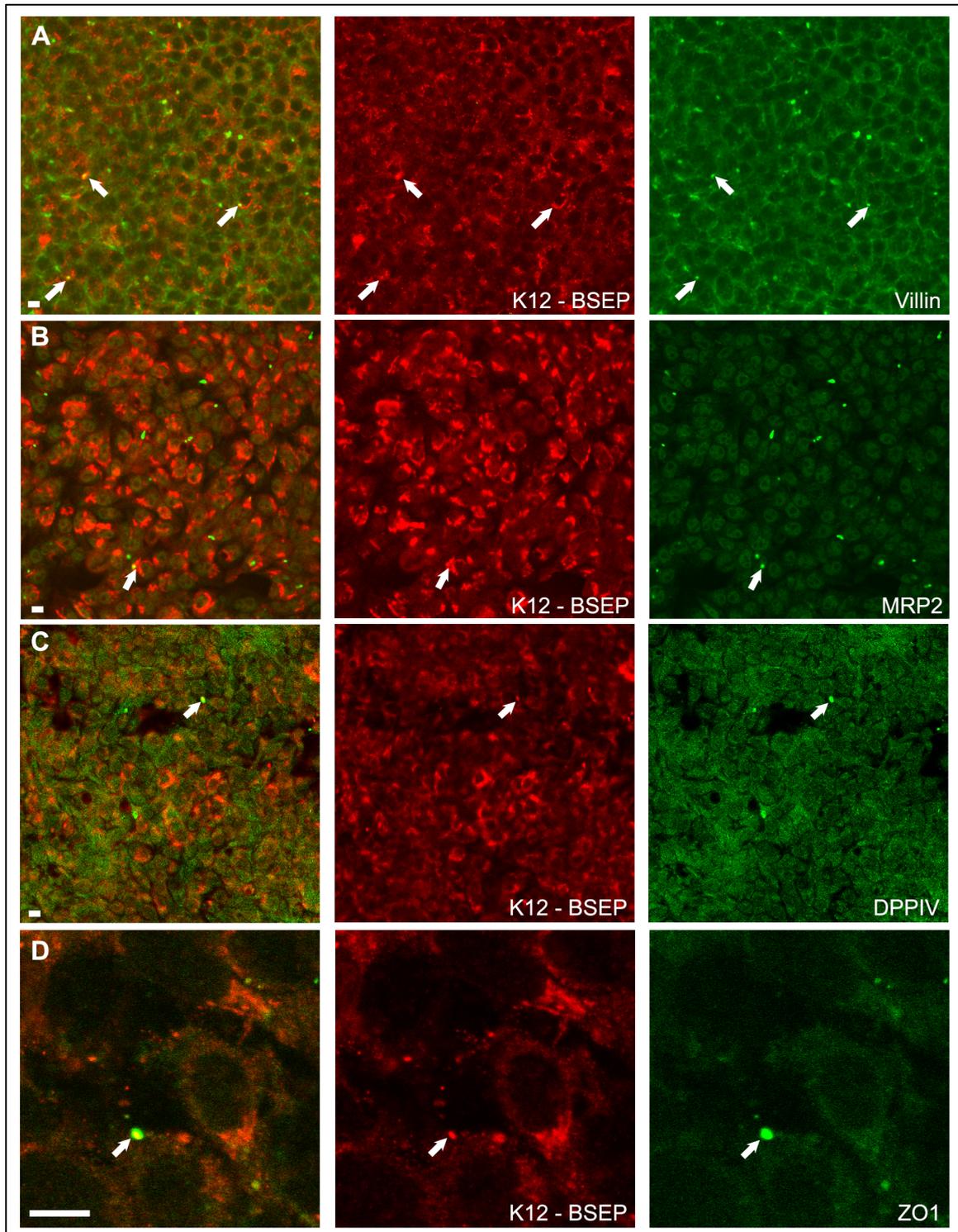
Der dritte getestete BSEP-Antikörper, LVT90, hatte insgesamt eine deutlich schwächere Sensibilität als K12 oder K165 (Abb. 15) und wurde deshalb für weitere Experimente nicht verwendet.

Die sowohl mit K12 als auch mit K165 beobachtete perinukleäre BSEP-Anreicherung co-lokalisierte zu einem großen Teil mit dem Golgi-Marker GM130 (Abb. 14). Wahrscheinlich reichert sich also BSEP im Golgi-Apparat der HepG2-Zellen an. Zum Ausschluß einer unspezifischen Antikörper-Bindung wurde bei der Immunfluoreszenzfärbung das BSEP-Fragment, aus dem der jeweilige Antikörper generiert wurde, als

Blockierungspeptid hinzugefügt. Erwartungsgemäß wurde die Immunreaktivität für K12 bzw. K165, die mit GM130 co-lokalisierte, komplett geblockt (Abb. 14 B und D), was für die Spezifität der Antikörper-Bindung spricht.

Ein basolaterales Vorkommen von BSEP wurde bisherigen Erkenntnissen entsprechend nicht beobachtet.

Der Gallensalztransporter BSEP kommt also in HepG2-Zellen im Golgi-Apparat und in knapp 15 % der Villin-positiven Pseudocanaliculi vor.



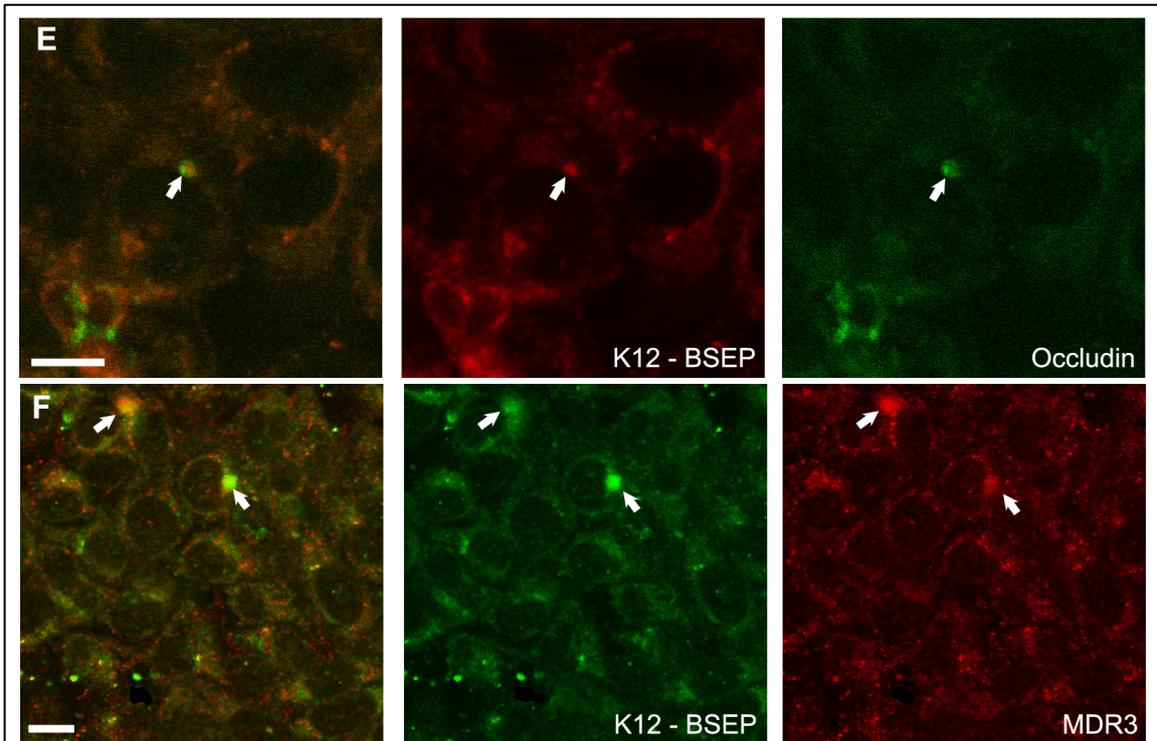


Abb. 12: Immunzytochemischer Nachweis der kanalikulären Lokalisation von BSEP in HepG2-Zellen mit dem K12-Antikörper.

Co-Lokalisation (jeweils linkes Bild) von BSEP (K12-Antikörper) mit folgenden kanalikulären Markern (in Klammern: Antikörper): **A.** Villin (Anti-Villin), **B.** MRP2 (M₂I4), **C.** DPPIV (CD26), **D.** ZO1 (Anti-ZO1), **E.** Occludin (Anti-Occludin), **F.** MDR3 (Mdr3-IgM). Die weißen Pfeile markieren Stellen der Co-Lokalisation. Die weißen Maßstabslinien entsprechen 10 µm.

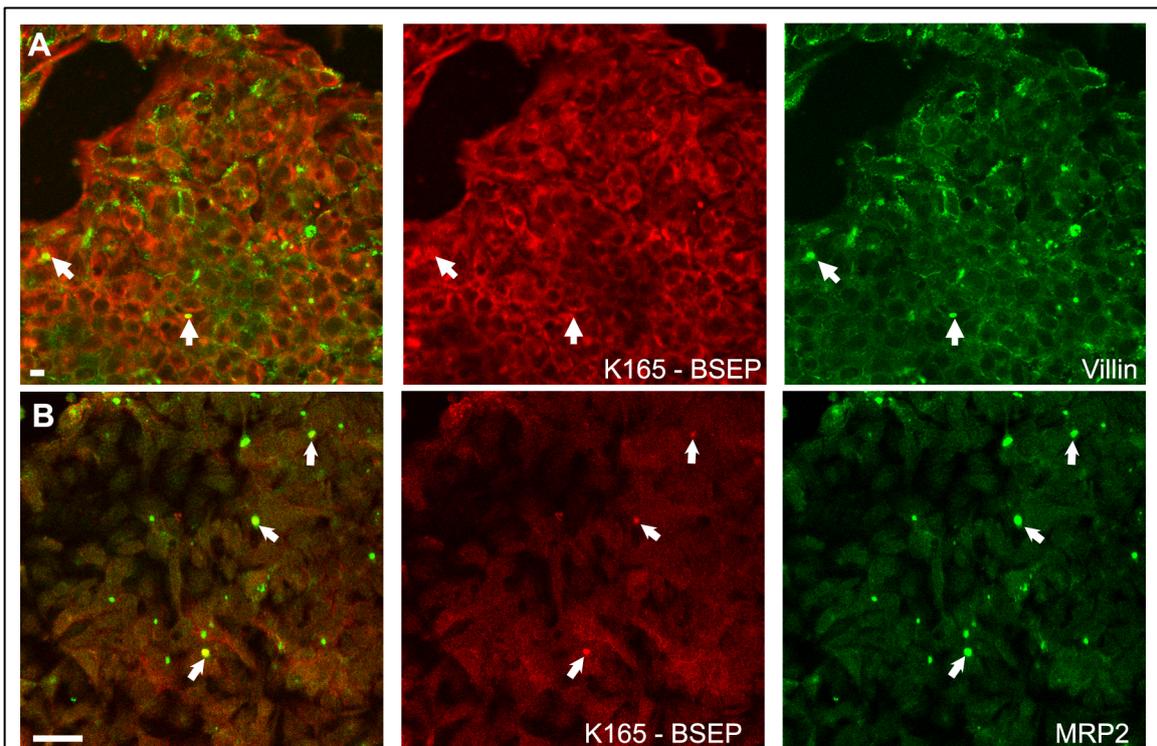


Abb. 13: Immunzytochemischer Nachweis der kanalikulären Lokalisation von BSEP in HepG2-Zellen mit dem K165-Antikörper.

Co-Lokalisation (jeweils linkes Bild) von BSEP (K165-Antikörper) mit folgenden kanalikulären Markern (in Klammern: Antikörper): **A.** Villin (Anti-Villin), **B.** MRP2 (M₂I4). Die weißen Pfeile markieren Stellen der Co-Lokalisation. Die weißen Maßstabslinien entsprechen 10 µm.

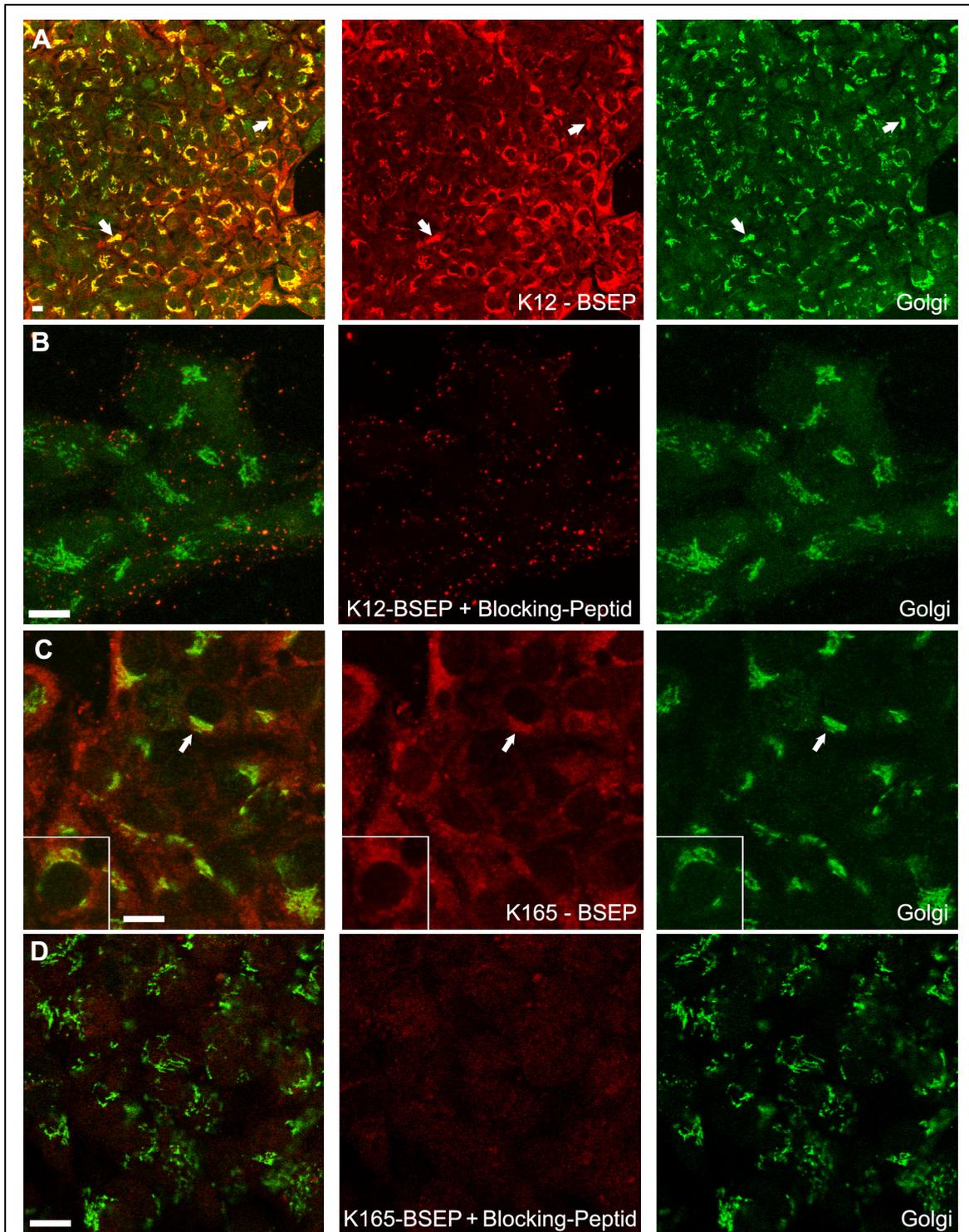
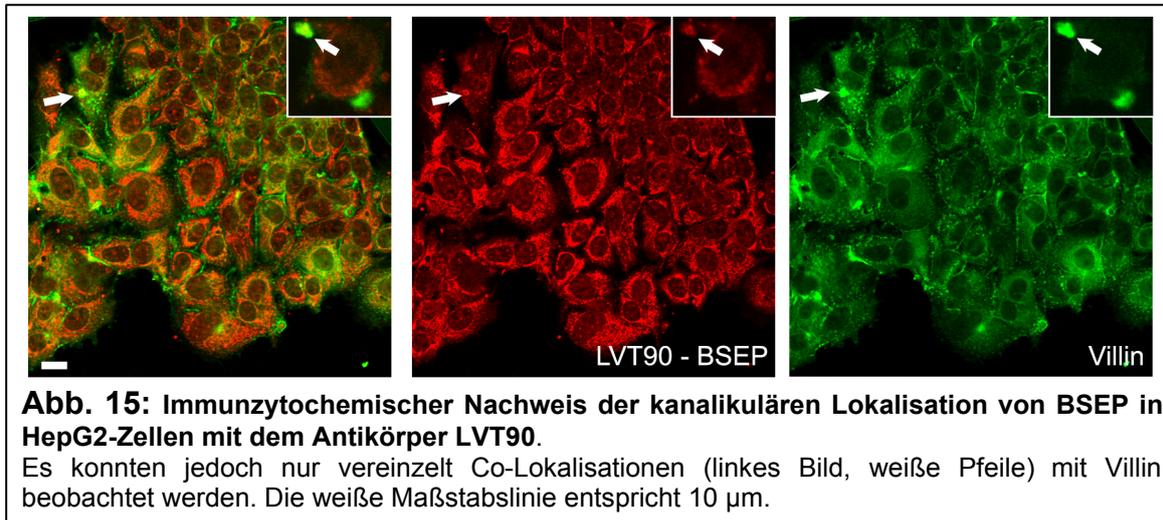


Abb. 14: Immunzytochemischer Nachweis der Lokalisation von BSEP im Golgi-Apparat von HepG2-Zellen.

Co-Färbung der BSEP-Antikörper K12 (A., rot) und K165 (C., rot) mit dem Antikörper gegen das Golgi-Protein GM130 (Anti-GM130; grün). Die weißen Pfeile markieren beispielhaft Stellen der Co-Lokalisation (gelb). Zum Ausschluß einer unspezifischen Antikörper-Bindung wurde das Peptid, aus dem der jeweilige Antikörper generiert wurde, bei den Färbeschritten hinzugefügt (Blocking-Peptid). Erwartungsgemäß wurde sowohl bei K12 (B.) als auch bei K165 (D.) die Immunreaktivität durch das Blocking-Peptid komplett gehemmt. Die weißen Maßstabslinien entsprechen 10 μm .



4.2 Targeting von BSEP in HepG2-Zellen

4.2.1 ³H-Taurocholat-Uptake in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen

Da HepG2-Zellen weitgehend defizient in der Expression des basolateralen Transporters von konjugierten Gallensalzen, dem Natrium-Taurocholat-Cotransport-Polypeptid (NTCP), sind, wurden für die Untersuchung des BSEP-Targetings durch das Gallensalz TUDC Ntcp-transfizierte HepG2-Zellen benutzt {160}. Zunächst wurde durch Bestimmung des ³H-Taurocholat-Uptakes untersucht, in welchem Maße die transfizierten Zellen Taurocholat aufnehmen.

Es konnte gezeigt werden, dass Ntcp-transfizierte HepG2-Zellen eine 6,4-fach höhere Taurocholat-Aufnahme als nicht-transfizierte Zellen erzielen. Damit konnte eine ausreichende Expression von Ntcp und damit eine genügende Gallensalz-Aufnahme für die Stimulationsexperimente nachgewiesen werden.

4.2.2 Stimulation des BSEP-Targetings durch TUDC

In Immunfluoreszenz-Färbungen sollte untersucht werden, ob das Gallensalz Tauroursodeoxycholat (TUDC) das Targeting von BSEP an die kanalikuläre Membran fördert. Dazu wurde in HepG2-Zellen der Anteil der BSEP-positiven (K12-Antikörper) an der Gesamtzahl der Pseudocanaliculi, die mit einem Villin-Antikörper markiert wurden, bestimmt.

Zunächst wurde untersucht, ob die Lösungsvermittler DMSO und Ethanol, in denen die Stimulanzen und Inhibitoren gelöst wurden, einen Eigeneffekt auf das BSEP-Targeting haben (Abb. 16). Während in der Kontrollgruppe $17,0 \pm 7,8$ % aller

Pseudocanaliculi BSEP enthielten, sind es bei DMSO (1 ‰) $15,1 \pm 6,7$ % und bei Ethanol (1 ‰) $18,1 \pm 7,2$ %. Der Unterschied zur Kontrollgruppe ist im Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Vergleichstest in beiden Fällen nicht signifikant (ns), so dass davon ausgegangen werden kann, dass ein Eigeneffekt der Lösungsvermittler nicht vorliegt.

Es wurde als nächstes eine Zeit- und Konzentrationsreihe (Abb. 17) erstellt, durch die für HepG2-Zellen die optimale Inkubationszeit bzw. Konzentration von TUDC ermittelt werden sollte. Dazu wurden acht Zeitpunkte (10 und 30 Minuten sowie 1, 2, 4, 6, 8 und 16 Stunden) und vier TUDC-Konzentrationen (0, 50, 100 und 500 µmol/l) gewählt. Bei allen 32 Bedingungen wurden jeweils 10 Gesichtsfelder von drei unabhängigen Experimenten ausgezählt. Die Auswertung ergab in den drei TUDC-stimulierten Gruppen (im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne TUDC) einen Anstieg der Anzahl der BSEP-positiven Pseudocanaliculi schon in der 30. Inkubationsminute, einen steilen Anstieg bis zur 2. Stunde, dann eine flachere Zunahme bis zur 6. Stunde und ab dort ein deutliches Absinken der kanalikulären BSEP-Expression. Dabei zeigte die TUDC-Konzentration von 500 µmol/l nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden mit einem Anstieg der BSEP-positiven Pseudocanaliculi auf das 1,9-fache im Vergleich zur Kontrolle den deutlichsten Effekt.

Demnach wurde für alle folgenden Experimente eine Inkubationszeit von 6 Stunden und eine TUDC-Konzentration von 500 µmol/l gewählt.

In einer weiteren Experimenten-Serie wurde das TUDC-abhängigen BSEP-Targeting in Ntcp-transfizierten mit dem in nicht-transfizierten HepG2-Zellen verglichen (Abb. 18). In vier unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den (unstimulierten) Kontrollgruppen: $14,2 \pm 5,8$ % der Villin-positiven Pseudocanaliculi in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen enthielten BSEP im Vergleich zu $15,5 \pm 9,6$ % in nicht-transfizierten Zellen. Bei Inkubation mit 100 bzw. 500 µmol/l TUDC stieg dagegen der Anteil der BSEP-positiven Pseudocanaliculi in Ntcp-transfizierten Zellen auf $21,9 \pm 10,4$ % bzw. $23,9 \pm 10,8$ % an, während der Wert in nicht-transfizierten HepG2-Zellen bei $13,7 \pm 6,8$ % bzw. $14,5 \pm 7,6$ % lag. Der Unterschied ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,01$ bzw. $P < 0,001$ in der Varianz-Analyse nach Kruskal-Wallis und nachfolgendem multiplen Vergleichstest nach Dunn signifikant.

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test		
Kontrolle	17,0	7,8	zu Kontrolle	H = 2,441 P = 0,295 nicht signifikant	
DMSO (1 ‰)	15,1	6,7	> 0,05		ns
Ethanol (1 ‰)	18,1	7,2	> 0,05		ns

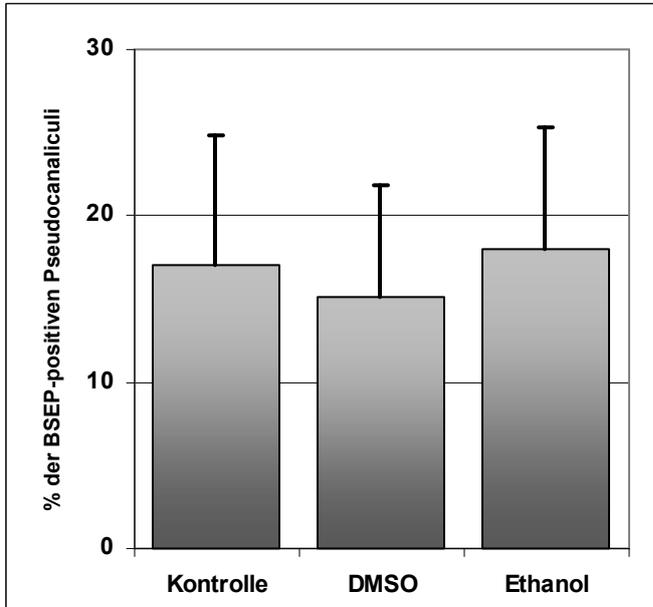


Abb. 16: Effekt der Lösungsvermittler DMSO (1 ‰) und Ethanol (1 ‰) auf das BSEP-Targeting.

Bei Hinzufügen von DMSO bzw. Ethanol zum Inkubationsmedium zeigte sich nach 6 Stunden in HepG2-Zellen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der BSEP-positiven Pseudocanaliculi. Die Ergebnisse entstammen 3 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen.

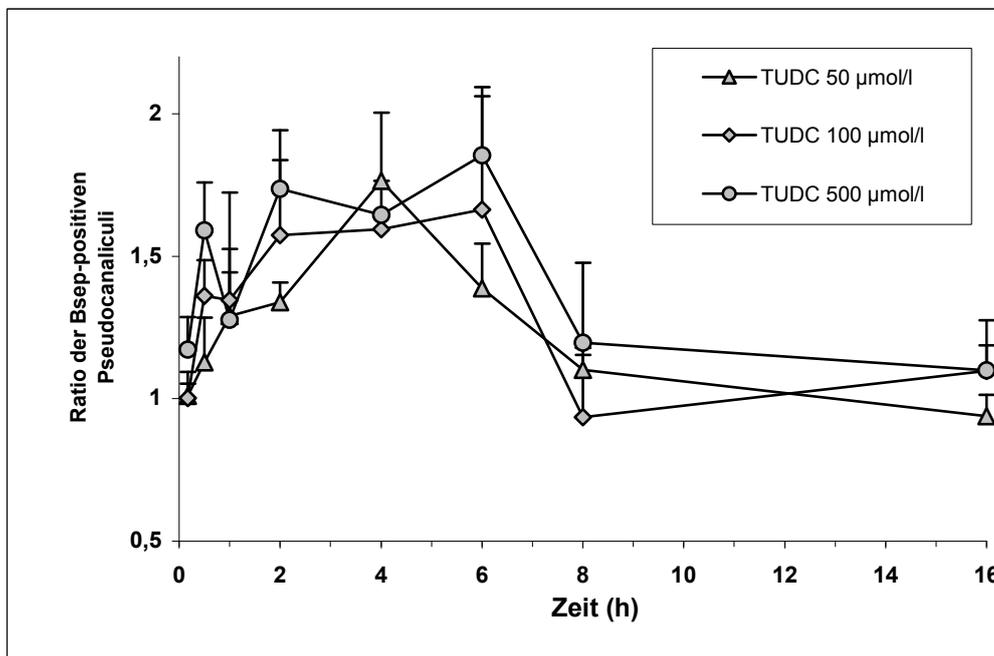


Abb. 17: Zeit- und Konzentrationsreihe zur TUDC-abhängigen Stimulation der kanalikulären BSEP-Expression in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen.

Es wurden acht Zeitpunkte und drei TUDC-Konzentrationen verwendet: 50 µmol/l (Dreiecke), 100 µmol/l (Rauten) und 500 µmol/l (Kreise). Der Anteil der BSEP-positiven an den Villin-haltigen Pseudocanaliculi wurde ausgezählt. Die Mittelwerte aller Bedingungen wurden durch die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollgruppe geteilt, so dass eine *Ratio* entstand, die die Steigerung der kanalikulären BSEP-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe ($y = 1,0$) angibt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte (MW) aus jeweils 10 Auszählungen (Gesichtsfelder) in drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung (SD) ist als Balken angegeben.

Vergleich der TUDC-Stimulation in nicht- bzw. Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen	Nicht-transfizierte HepG2-Zellen		Ntcp-transfizierte HepG2-Zellen		Ntcp-transfizierte > nicht-transfizierte HepG2 Dunn-Vergleichstest		
	MW	SD	MW	SD	P	Sign.	Ntcp-HepG2: zu Kontrolle
Kontrolle	15,5	9,6	14,2	5,8	> 0,05	ns	
TUDC 100 µmol/l	13,7	6,8	21,9	10,4	< 0,01	*	< 0,05 *
TUDC 500 µmol/l	14,5	7,6	23,9	10,8	< 0,001	*	< 0,001 *

Kruskal-Wallis-Test: H = 37,80 P < 0,0001

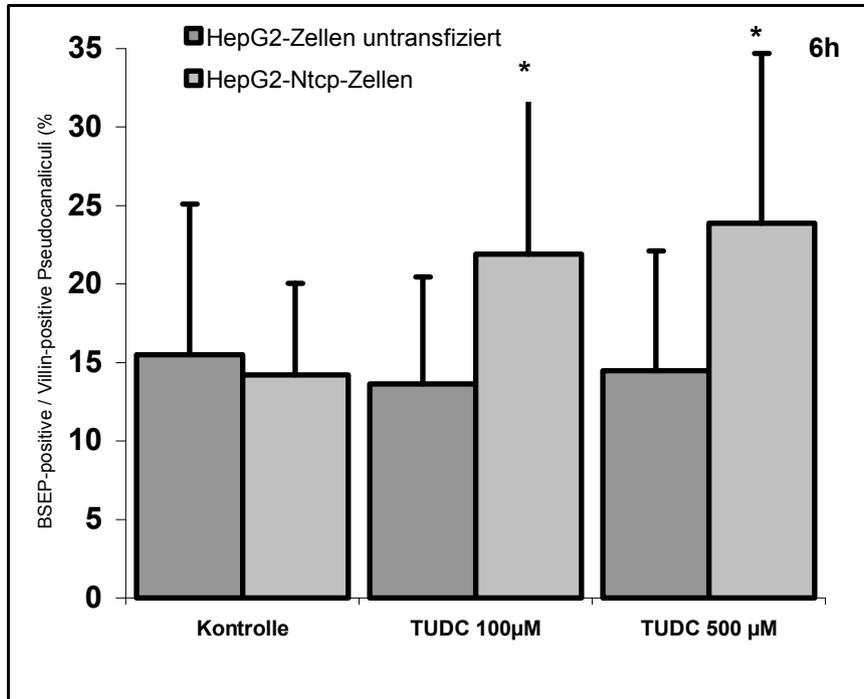


Abb. 18: Vergleich der TUDC-abhängigen Stimulation des BSEP-Targetings in Ntcp-transfizierten bzw. untransfizierten HepG2-Zellen.

Auszählung des Anteils der BSEP-positiven an den Villin-positiven Pseudocanaliculi nach 6-stündiger Inkubation mit TUDC 100 µmol/l bzw. 500 µmol/l in Ntcp-transfizierten (hellgraue Balken) und nicht-transfizierten HepG2-Zellen (dunkelgraue Balken). Im Diagramm sind die Mittelwerte (MW) aus 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils 10 Zählungen sowie die Standardabweichungen (SD) angegeben. Aus der Tabelle können die Zahlenwerte von MW und SD sowie die Irrtumswahrscheinlichkeiten (P) und Signifikanzen (Sign.) zwischen beiden Zelltypen gemäß Kruskal-Wallis- und Dunn-Vergleichstest entnommen werden (ns = nicht signifikant, * = signifikant).

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des BSEP-Targetings unter TUDC-Stimulation in Ntcp-transfizierten, jedoch nicht in untransfizierten HepG2-Zellen.

Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Transporteffizienz für TUDC in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen ausreichend ist, um eine Steigerung des BSEP-Targetings in die kanalikuläre Membran zu bewirken, dass untransfizierte HepG2-Zellen jedoch keine ausreichende Transportkapazität für Gallensalze besitzen. Außerdem legen die Ergebnisse nahe, dass TUDC zur Entfaltung seiner Wirkung auf das BSEP-Targeting erst in die Zellen aufgenommen werden muss.

In Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen wurde nachfolgend in 7 unabhängigen Experimenten mit jeweils 10 ausgezählten Gesichtsfeldern der Effekt von TUDC in zwei Konzentrationen (100 µmol/l und 500 µmol/l) auf das BSEP-Targeting zur kanalikulä-

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test	
Kontrolle	15,6	8,1	zu Kontrolle	H = 42,714 P < 0,001
TUDC 100 µmol/l	24,2	9,4	< 0,001	zu TUDC 100 µM
TUDC 500 µmol/l	25,0	10,1	< 0,001	> 0,05

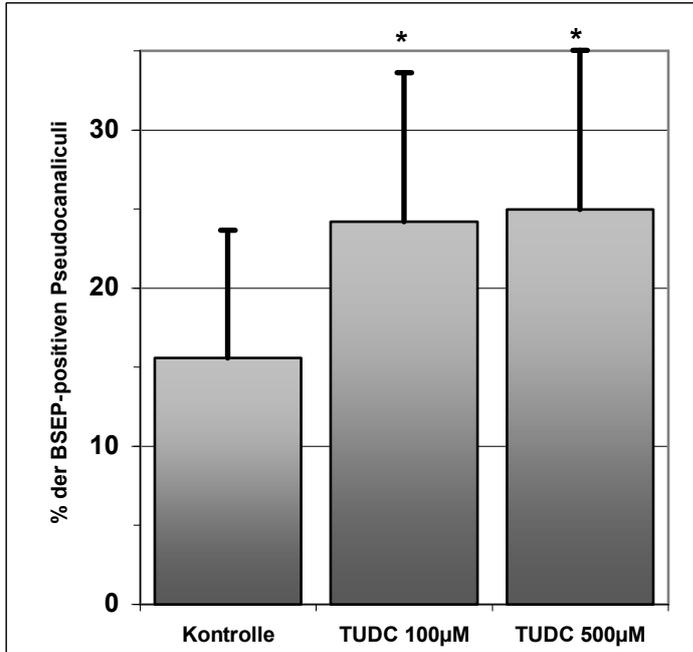


Abb. 19: Stimulation des BSEP-Targetings zur kanalikulären Membran durch TUDC in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen.

In 7 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen zeigte sich eine signifikante Vermehrung von BSEP (K12) in den Pseudocanaliculi (Villin) bei 6-stündiger Inkubation mit 100 bzw. 500 µmol/l TUDC.

MW = Mittelwert.

SD = Standardabweichung.

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

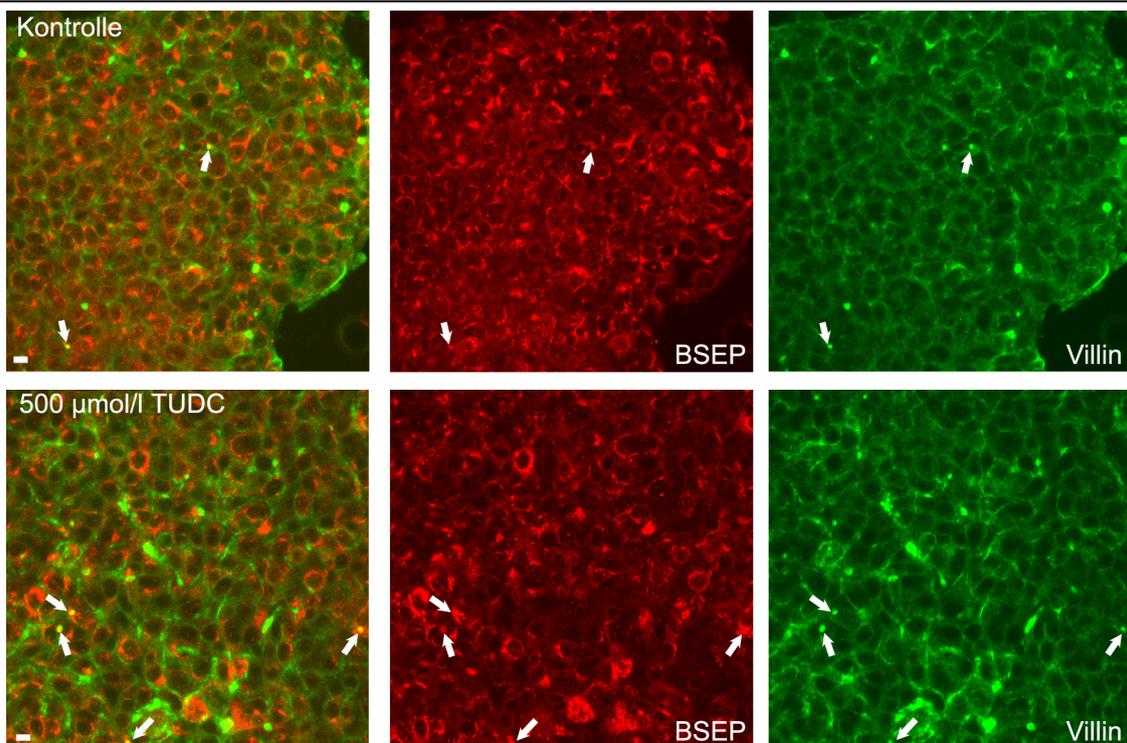


Abb. 20: Stimulation des BSEP-Targetings an die kanalikuläre Membran durch TUDC.

Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen mit dem BSEP-Antikörper K12 und dem Villin-Antikörper zeigen eine deutliche Zunahme der kanalikulären Expression von BSEP nach 6-stündiger Inkubation mit 500 µmol/l TUDC im Vergleich zur Kontrollgruppe. BSEP-positive Pseudocanaliculi sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die weißen Maßstabslinien entsprechen 10 µm.

ren Membran quantifiziert (Abb. 19 und 20). Während nur $15,6 \pm 8,1$ % der Pseudocanaliculi (Villin) in Kontroll-Zellen BSEP-positiv (K12) waren, waren dies $24,2 \pm 9,4$ % in mit $100 \mu\text{mol/l}$ TUDC stimulierten und $25,0 \pm 10,1$ % in mit $500 \mu\text{mol/l}$ TUDC stimulierten Ntcp-HepG2-Zellen. Dies ist ein signifikanter ($P < 0,001$) Anstieg auf das 1,5-fache bei $100 \mu\text{mol/l}$ TUDC bzw. auf das 1,6fache bei $500 \mu\text{mol/l}$ TUDC. Zwischen den beiden TUDC-Konzentrationen ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($P = 0,403$).

Somit führt TUDC in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen eindeutig zu einer vermehrten Lokalisation von BSEP in den Pseudocanaliculi.

4.2.3 Bedeutung verschiedener Signalwege und des Zytoskeletts für das TUDC-abhängige BSEP-Targeting

Nachdem das TUDC-induzierte Targeting von BSEP zur kanalikulären Membran gezeigt worden war, sollte untersucht werden, welche intrazellulären Signalwege daran beteiligt sind. Es wurden folgende Signalübertragungssysteme mit Hilfe von entsprechenden Inhibitoren untersucht: Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) mit Wortmannin, Proteinkinase C (PKC) mit Gö6850 und Gö6976, Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 ($p38^{\text{MAPK}}$) mit SB202190, MAPK/Erk-Kinase (MEK) mit PD098059, Microtubuli mit Nocodazol und Mikrofilamente mit Cytochalsin D. Dabei wurde nach 6-stündiger Inkubation von Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen mit $500 \mu\text{mol/l}$ TUDC, den Inhibitoren bzw. der Kombination von TUDC und Inhibitor der Anteil der BSEP-positiven (K12) an den Villin-positiven Pseudocanaliculi ausgezählt (Farbtafel 2 im Anhang). Um die Signifikanz der Hemmwirkung der Inhibitoren zu bestimmen, wurde die approximative nicht-parametrische Varianzanalyse nach Kruskal und Wallis (H-Test) mit anschließendem multiplen Vergleichstest nach Dunn verwendet.

4.2.3.1 Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)

Zur Untersuchung, ob die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) am TUDC-abhängigen BSEP-Targeting beteiligt ist, wurde der PI3K-Inhibitor Wortmannin in einer Konzentration von 100 nmol/l verwendet. In insgesamt 40 Auszählungen bei 4 unabhängigen Experimenten wurde gezeigt, dass Wortmannin zwar den Prozentsatz BSEP-positiver Pseudocanaliculi von $24,5 \pm 11,1$ % bei alleiniger Stimulation mit TUDC $500 \mu\text{mol/l}$ auf $20,6 \pm 7,1$ % (Stimulation mit TUDC in Anwesenheit von Wortmannin) senkt, der Unterschied aber statistisch nicht signifikant ist ($P > 0,05$, Abb. 21).

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test			
Kontrolle	15,7	7,7	zu Kontrolle		H = 30,45	
Wortmannin 100 nmol/l	14,7	6,8	> 0,05	ns	P < 0,0001	
TUDC 500 µmol/l	24,5	11,1	< 0,001	*	zu TUDC	
TUDC + Wortmannin	20,6	7,1	< 0,05	*	> 0,05	ns

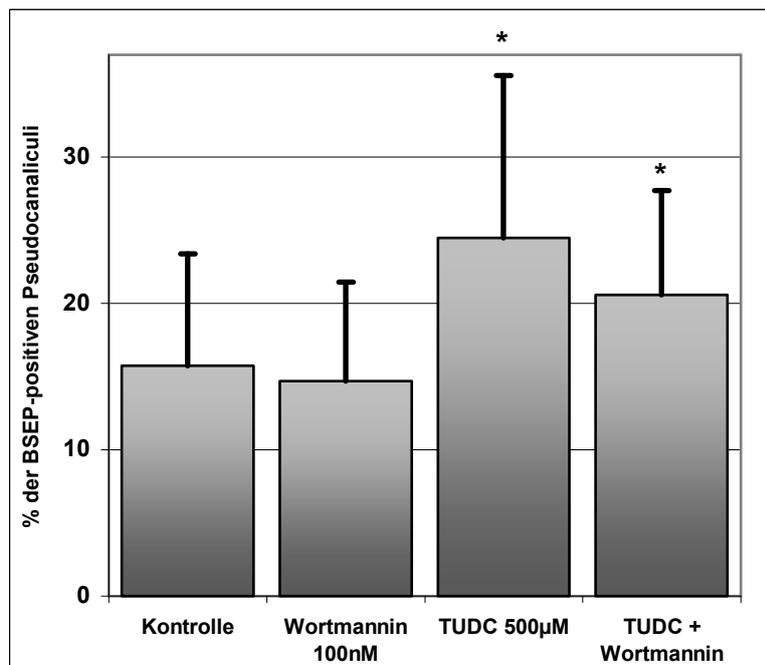


Abb. 21: Untersuchung des TUDC-abhängigen BSEP-Targetings unter Inhibition der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) mit Wortmannin.

Bei der Untersuchung, ob das TUDC-abhängige BSEP-Targeting in HepG2-Zellen durch die PI3K vermittelt wird, wurde in 4 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen gezeigt, dass sich der Anteil der BSEP-positiven Pseudocanaliculi unter 6-stündiger Inkubation mit TUDC und Wortmannin, einem PI3K-Inhibitor, zwar im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit TUDC vermindert, dieser Unterschied aber nicht signifikant ist.

* = signifikant zur Kontrolle.

4.2.3.2 Proteinkinase C (PKC)

Die Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) am BSEP-Targeting wurde mit dem spezifischen Inhibitor Gö6850 untersucht, der in der verwendeten Konzentration die Aktivität aller Ca^{2+} -abhängigen und unabhängigen PKC-Isoformen hemmt. Es wurden insgesamt 40 Auszählungen in 4 unabhängigen Experimenten vorgenommen (Abb. 22). Gö6850 zeigte in der verwendeten Konzentration keinen Eigeneffekt auf unstimulierte HepG2-Zellen, denn es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ($17,6 \pm 8,3$ %) und der Gruppe mit alleiniger Zugabe von Gö6850 ($17,4 \pm 10,4$ %). Unter Zugabe von $1 \mu\text{mol/l}$ Gö6850 zu TUDC in das Inkubationsmedium sank der Anteil der BSEP-positiven Pseudocanaliculi von $28,0 \pm 11,7$ % (TUDC) auf $19,3 \pm 10,6$ % (TUDC + Gö6850). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($P < 0,01$). Es scheinen folglich PKC-Isoformen am BSEP-Targeting zur kanalikulären Membran beteiligt zu sein.

Um herauszufinden, welche Gruppe der PKC-Isoformen am TUDC-abhängigen Einbau von BSEP in die kanalikuläre Membran beteiligt ist, wurde eine Serie von Stimulationsexperimenten mit dem Inhibitor Gö6976 durchgeführt, der mit hoher Selektivität Ca^{2+} -abhängige PKC-Isoformen hemmt (Abb. 23). Die Auszählungen ergaben keinen signifikanten Unterschied der Anzahl BSEP-positiver Pseudocanaliculi

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test			
Kontrolle	17,6	8,3	zu Kontrolle		H = 27,06	
Gö6850 1 µmol/l	17,4	10,4	> 0,05	ns	P < 0,0001	
TUDC 500 µmol/l	28,0	11,7	< 0,001	*	zu TUDC	
TUDC + Gö6850	19,3	10,6	>0,05	ns	< 0,01	*

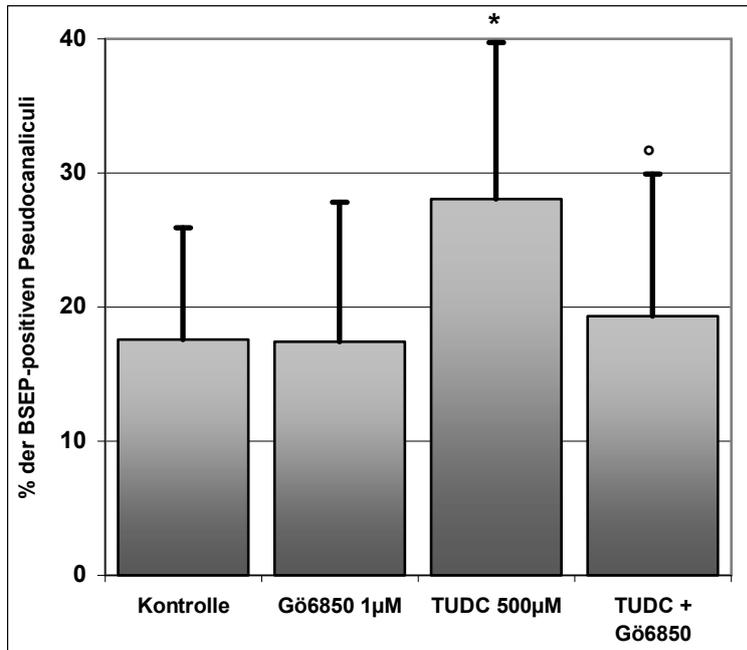


Abb. 22: Untersuchung des TUDC-abhängigen BSEP-Targetings unter Inhibition aller PKC-Isoformen mit Gö6850.

Die Beteiligung der PKC am TUDC-abhängigen BSEP-Targeting wurde in 4 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen pro Bedingung gezeigt. Die Anzahl der BSEP-haltigen Pseudocanaliculi nahm nach Zugabe von 1 µmol/l Gö6850, einem PKC-Hemmstoff, im Vergleich zu TUDC stimulierten Zellen signifikant ab (6 Stunden Inkubationszeit).

* = signifikant zur Kontrolle.

° = signifikant zu TUDC 500 µmol/l.

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test			
Kontrolle	11,3	4,2	zu Kontrolle		H = 19,75	
Gö6976 1 µmol/l	12,4	6,8	> 0,05	ns	P = 0,0002	
TUDC 500 µmol/l	18,2	7,8	< 0,01	*	zu TUDC	
TUDC + Gö6976	17,1	7,2	< 0,01	*	> 0,05	ns

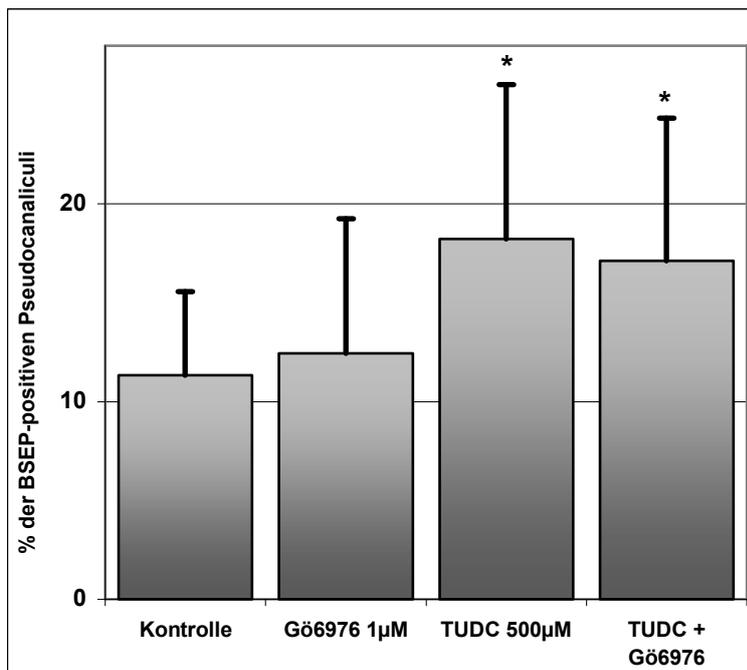


Abb. 23: Untersuchung des TUDC-abhängigen BSEP-Targetings unter Inhibition der Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoformen mit Gö6976.

Der Inhibitor der Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoformen Gö6976 führte nach 6-stündiger Inkubation zu keiner signifikanten Hemmwirkung auf die TUDC-abhängige Stimulation des BSEP-Targetings zur kanalikulären Membran. Die Auszählung erfolgte in 3 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen pro Bedingung.

* = signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test			
Kontrolle	15,6	7,9	zu Kontrolle		H = 23,09	
SB202190 0,5 µmol/l	16,0	7,7	> 0,05	ns	P < 0,0001	
TUDC 500 µmol/l	24,5	11,1	< 0,001	*	zu TUDC	
TUDC + SB202190 0,5 µmol/l	15,2	8,3	> 0,05	ns	< 0,001	*

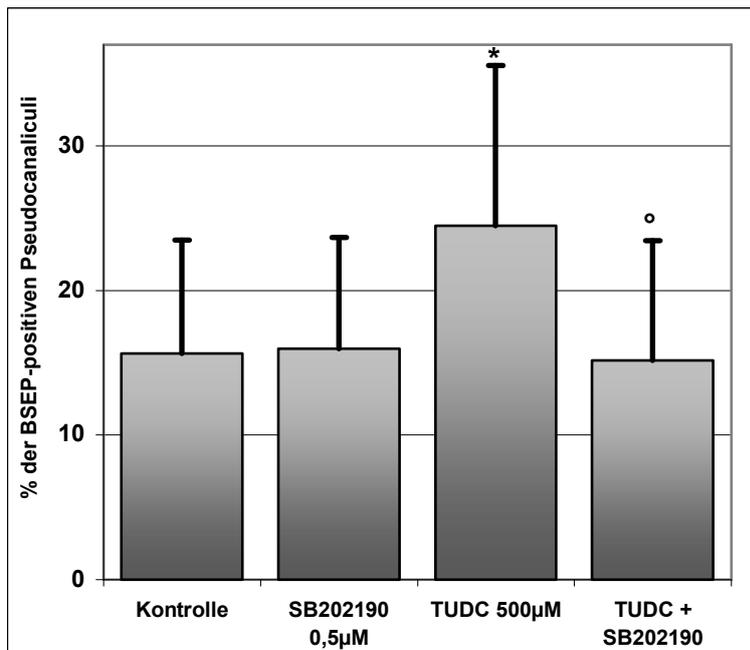


Abb. 24: Untersuchung des TUDC-abhängigen BSEP-Targetings unter Inhibition der MAPK vom p38-Typ mit 0,5 µmol/l SB202190.

Der Inhibitor der p38^{MAPK} SB202190 hemmte in einer Konzentration von 0,5 µmol/l nach 6-stündiger Inkubation signifikant die TUDC-abhängige Stimulation des BSEP-Targetings in Ntcp-HepG2-Zellen. Die Auszählung erfolgte in 4 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen pro Bedingung.

* = signifikant zur Kontrolle.

° = signifikant zu TUDC 500 µmol/l.

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test			
Kontrolle	15,5	7,2	zu Kontrolle		H = 18,60	
SB202190 1,0 µmol/l	15,2	7,6	> 0,05	ns	P = 0,0003	
TUDC 500 µmol/l	25,7	12,6	< 0,01	*	zu TUDC	
TUDC + SB202190 1,0 µmol/l	16,4	7,6	> 0,05	ns	< 0,05	*

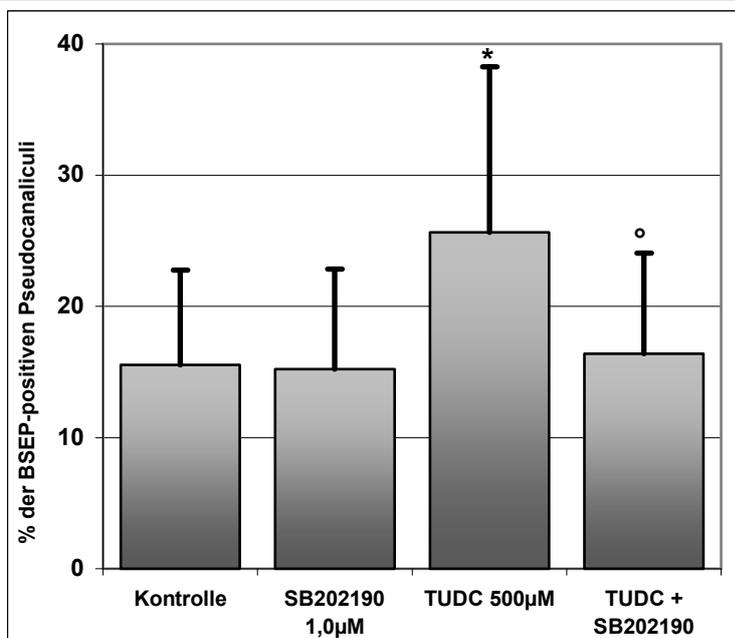


Abb. 25: Untersuchung des TUDC-abhängigen BSEP-Targetings unter Inhibition der MAPK vom p38-Typ mit 1,0 µmol/l SB202190.

Der Inhibitor der p38^{MAPK} SB202190 hemmte in einer Konzentration von 1,0 µmol/l nach 6-stündiger Inkubation signifikant die TUDC-abhängige Stimulation des BSEP-Targetings in Ntcp-HepG2-Zellen. Die Auszählung erfolgte in 3 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen pro Bedingung.

* = signifikant zur Kontrolle.

° = signifikant zu TUDC 500 µmol/l.

nach TUDC-Inkubation ($18,2 \pm 7,8$ %) im Vergleich zur Inkubation zusammen mit Gö6976 ($17,1 \pm 7,2$ %). Demnach ist eine Beteiligung von Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen am BSEP-Targeting in HepG2-Zellen unwahrscheinlich. Vielmehr scheinen eine oder mehrere der Ca^{2+} -unabhängigen PKC-Isoformen für das Targeting von BSEP verantwortlich zu sein.

4.2.3.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) vom p38-Typ (p38^{MAPK})

Eine Beteiligung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 (p38^{MAPK}) sollte mit dem Hemmstoff SB202190 untersucht werden. Es wurden zwei Inhibitor-Konzentrationen verwendet, $0,5 \mu\text{mol/l}$ (Abb. 24) und $1,0 \mu\text{mol/l}$ (Abb. 25). Es wurden 4 bzw. 3 unabhängige Experimente mit je 10 ausgezählten Gesichtsfeldern pro Bedingung ausgewertet. In beiden Konzentrationen hemmte SB202190 signifikant das durch TUDC bewirkte BSEP-Targeting. Bei $0,5 \mu\text{mol/l}$ SB202190 sank der BSEP-Anteil in den Pseudocanaliculi von $24,5 \pm 11,1$ % auf $15,2 \pm 8,2$ % ($P < 0,001$), bei $1,0 \mu\text{mol/l}$ SB202190 von $25,7 \pm 12,6$ % auf $16,4 \pm 7,6$ % ($P < 0,05$). Diese Werte zeigen keinen signifikanten Unterschied zu den Mittelwerten der Kontrollgruppe ($15,6 \pm 7,9$ % bzw. $15,5 \pm 7,2$ %), so dass von einer vollständigen Hemmwirkung auszugehen ist.

4.2.3.4 MAPK vom Typ der extrazellulär regulierten Kinasen (Erk)

Es wurde untersucht, ob auch die Signalkaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) vom Erk-Typ für das TUDC-abhängige BSEP-Targeting eine Rolle spielt. Dazu wurde PD098059 ($5 \mu\text{mol/l}$), ein Hemmstoff der oberhalb der Erk gelegenen MAPK/Erk-Kinase (MEK), benutzt. Dieser Inhibitor führte jedoch zu einer geringfügigen Steigerung der BSEP-haltigen Pseudocanaliculi von $26,1 \pm 10,9$ % unter TUDC allein auf $28,5 \pm 13,5$ % unter TUDC und PD098059 (Abb. 26), was gegen die Teilnahme des MEK-/Erk-Signalwegs am BSEP-Einbau in die kanalikuläre Membran spricht.

4.2.3.5 Microtubuli

Nocodazol zerstört die Struktur der Microtubuli und wurde hier in einer Konzentration von $33 \mu\text{mol/l}$ verwendet. In 4 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen konnte dargestellt werden, dass intakte Microtubuli notwendig für das TUDC-abhängige BSEP-Targeting in HepG2-Zellen sind. Bei kombinierter Inkubation mit TUDC und Nocodazol sank nämlich der Anteil der BSEP-positiven Pseudocanaliculi von

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test			
Kontrolle	17,4	7,5	zu Kontrolle		H = 21,97	
PD098059 5 µmol/l	21,1	12,5	> 0,05	ns	P < 0,0001	
TUDC 500 µmol/l	26,1	10,9	< 0,01		* zu TUDC	
TUDC + PD098059	28,5	13,4	< 0,001	*	> 0,05	ns

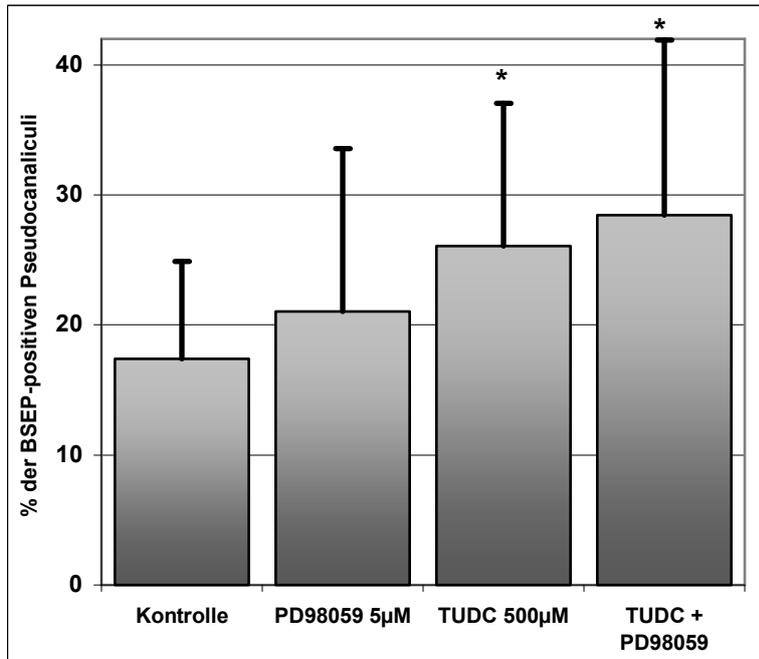


Abb. 26: Untersuchung des TUDC-abhängigen BSEP-Targetings unter Inhibition der MAPK vom Erk-Typ mit PD098059.

PD098059, der Inhibitor des Erk-Signalwegs, führte nach 6-stündiger Inkubation nicht zu einer Hemmung des TUDC-abhängigen BSEP-Targetings in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen. Die Auszählung erfolgte in 4 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen pro Versuchsbedingung.

* = signifikant zur Kontrolle.

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test			
Kontrolle	15,9	7,4	zu Kontrolle		H = 21,21	
Nocodazol 33 µmol/l	17,7	10,6	> 0,05	ns	P < 0,0001	
TUDC 500 µmol/l	25,5	10,9	< 0,001		* zu TUDC	
TUDC + Nocodazol	18,1	9,4	> 0,05	ns	< 0,01	*

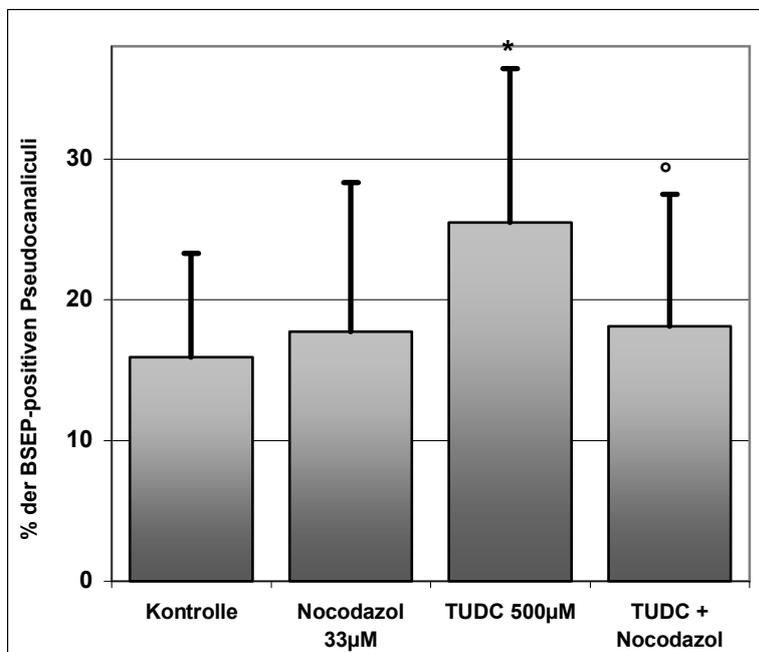


Abb. 27: Untersuchung des TUDC-abhängigen BSEP-Targetings unter Inhibition der Microtubuli mit Nocodazol.

Mit Nocodazol wird die Struktur der Microtubuli zerstört. Nach 6-stündiger Inkubation zusammen mit TUDC war das BSEP-Targeting im Vergleich zur Inkubation mit TUDC alleine gehemmt. Es konnte dadurch gezeigt werden, dass das TUDC-abhängige BSEP-Targeting über Microtubuli vermittelt wird. Die Auszählung erfolgte in 4 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen pro Bedingung.

* = signifikant zur Kontrolle.

° = signifikant zu TUDC 500 µM.

25,5 ± 10,9 % (unter TUDC allein) auf 18,1 ± 9,4 % ab (Abb. 27). Diese Differenz ist statistisch signifikant ($P < 0,01$).

4.2.3.6 Mikrofilamente

Ob Mikrofilamente als weiterer Zytoskelettbestandteil ebenfalls am BSEP-Targeting unter TUDC beteiligt sind, konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden, da der Mikrofilament-Inhibitor Cytochalasin D in der verwendeten Konzentration von 1 µmol/l die Struktur der HepG2-Zellen derartig veränderte (Abb. 28), dass eine Auszählung der Pseudocanaliculi anhand ihrer Villin-Färbung nicht möglich war. Auch eine Reduktion der Konzentration auf 0,5 µmol/l erlaubte nicht die übliche Zählmethode.

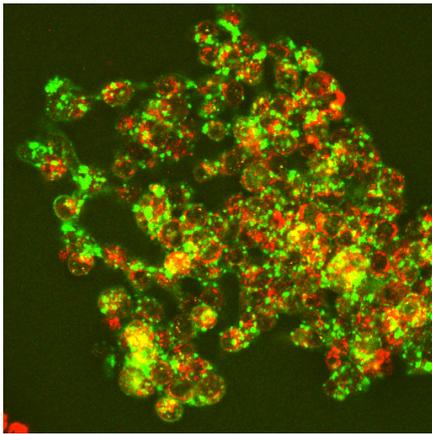


Abb. 28: Untersuchung des TUDC-abhängigen BSEP-Targetings unter Inhibition der Mikrofilamente mit Cytochalasin D.

Cytochalasin D, ein Hemmstoff der Mikrofilamente, führte in HepG2-Zellen zur Agglomeration von Villin, so dass eine Auszählung der Pseudocanaliculi in der Immunfluoreszenz-Färbung nicht möglich war. Villin ist grün, BSEP (K12) rot dargestellt.

4.2.4 Effekt von Taurochololat und Tauroolithochololat auf das BSEP-Targeting

In einer weiteren Experimenten-Serie sollte der Effekt von zwei anderen Gallensalzen auf das BSEP-Targeting in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen gezeigt werden. Es wurden das wichtige humane Gallensalz Taurochololat (TC) sowie das stark cholestatisch wirkende Tauroolithochololat (TLC) jeweils in Konzentrationen von 100 und 500 µmol/l verwendet (Abb. 29).

Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden zeigte sich unter Taurochololat ein leichter Anstieg des Anteils der BSEP-haltigen Pseudocanaliculi von 15,0 ± 7,8 % (Kontrollgruppe) auf 20,5 ± 11,0 % bei einer Konzentration von 100 µmol/l bzw. auf 19,2 ± 9,2 % bei einer Konzentration von 500 µmol/l. Beide Werte sind im Kruskal-Wallis-Test und anschließenden Dunn-Vergleichstest signifikant verschieden zur Kontrollgruppe. Tauroolithochololat führte ebenfalls zu einem geringfügigen Anstieg der BSEP-positiven Pseudocanaliculi von 14,8 ± 7,7 % (Kontrollgruppe) auf 20,4 ± 13,2 % bei einer Konzentration von 100 µmol/l bzw. 17,9 ± 7,6 % bei einer Konzentration von 500 µmol/l. Der Unterschied ist statistisch signifikant.

Die cholestatischen Gallensalze Taurocholat und Tauroolithocholat führen demnach in HepG2-Zellen zu einem leichten Anstieg des BSEP-Targetings.

4.2.5 Funktion des Golgi-Apparats beim BSEP-Targeting - Stimulation des Targetings durch Cycloheximid

Zur Untersuchung der im Golgi-Apparat gespeicherten BSEP wurde in HepG2-Zellen 6 Stunden lang die Proteinsynthese mit 100 µmol/l Cycloheximid inhibiert. Dann sollte in Immunfluoreszenz-Färbungen von BSEP (K12-Antikörper) und Golgi-Apparat (GM130-Antikörper) bzw. von BSEP und Pseudocanaliculi (Villin-Antikörper) gezeigt werden, ob der Golgi-Apparat eine Zwischenstation auf dem Weg des BSEP-Targetings zum Canaliculus darstellt.

Die BSEP-Menge im Golgi-Apparat verminderte sich unter Inkubation mit Cycloheximid (Abb. 30 A und B). Allerdings konnte gleichzeitig eine deutliche Vermehrung von BSEP in den Pseudocanaliculi beobachtet werden (Abb. 31), was vermuten

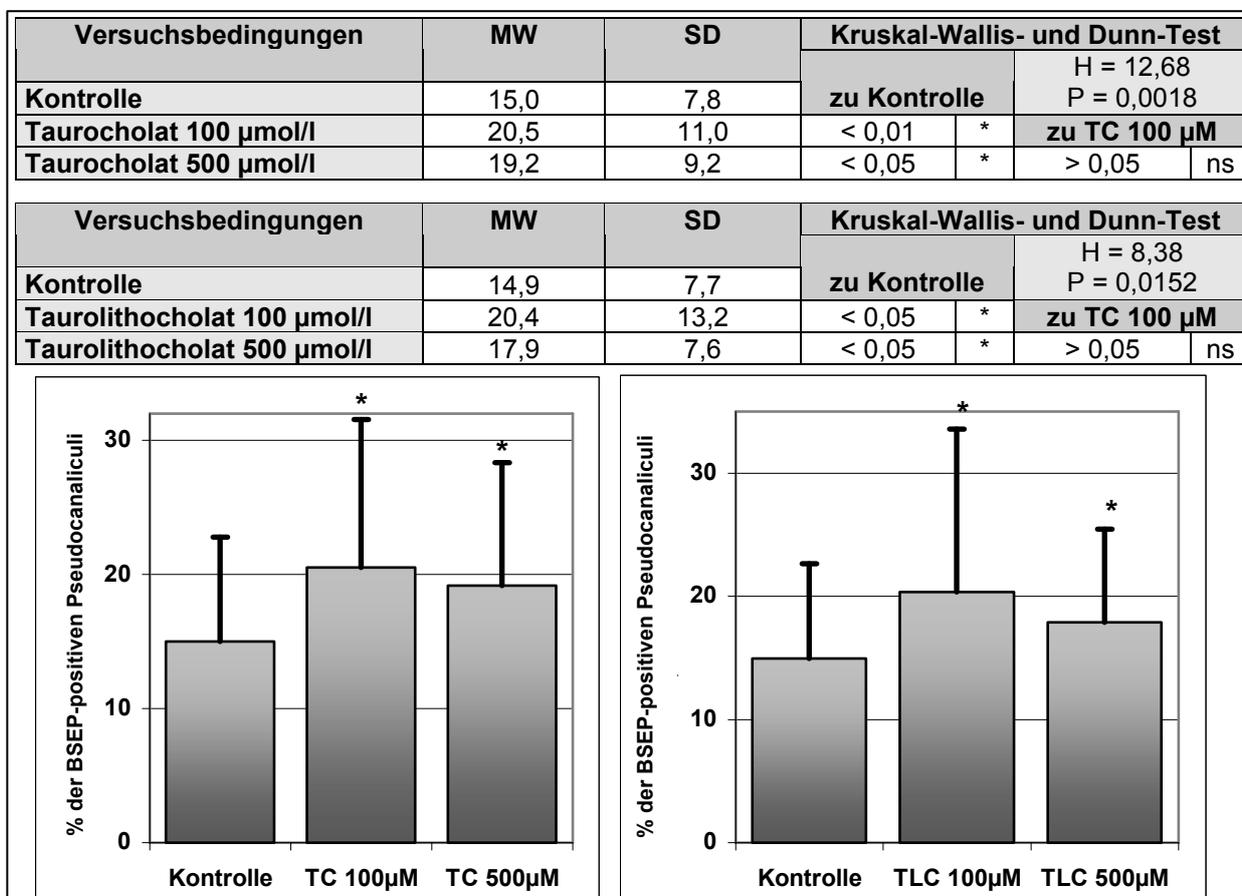


Abb. 29: Stimulation des BSEP-Targetings in Ntcp-HepG2-Zellen durch Taurocholat (TC) und Tauroolithocholat (TLC).

Nach 6-stündiger Inkubation mit Taurocholat bzw. Tauroolithocholat konnte ein diskreter Anstieg der BSEP-positiven Pseudocanaliculi beobachtet werden. Es wurden bei Taurocholat 8 und bei Tauroolithocholat 7 unabhängige Experimente mit je 10 Auszählungen durchgeführt.

* = signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.

lässt, dass Cycloheximid das Targeting von BSEP aus dem Golgi in die kanalikuläre Membran fördert. Da Cycloheximid auch als Stimulator der $p38^{MAPK}$ gilt, wurde ein spezifischer Inhibitor dieser Kinase, SB202190 (0,5 $\mu\text{mol/l}$), eingesetzt, um ihre Beteiligung am BSEP-Targeting durch Cycloheximid zu untersuchen. Es zeigte sich in der Co-Färbung mit K12- und GM130-Antikörpern, dass unter Hemmung der $p38^{MAPK}$ das Cycloheximid-abhängige BSEP-Targeting aus dem Golgi-Apparat vermindert wurde, so dass deutliche Co-Lokalisationen in Immunfluoreszenz-Färbungen erhalten blieben (Abb. 30 C).

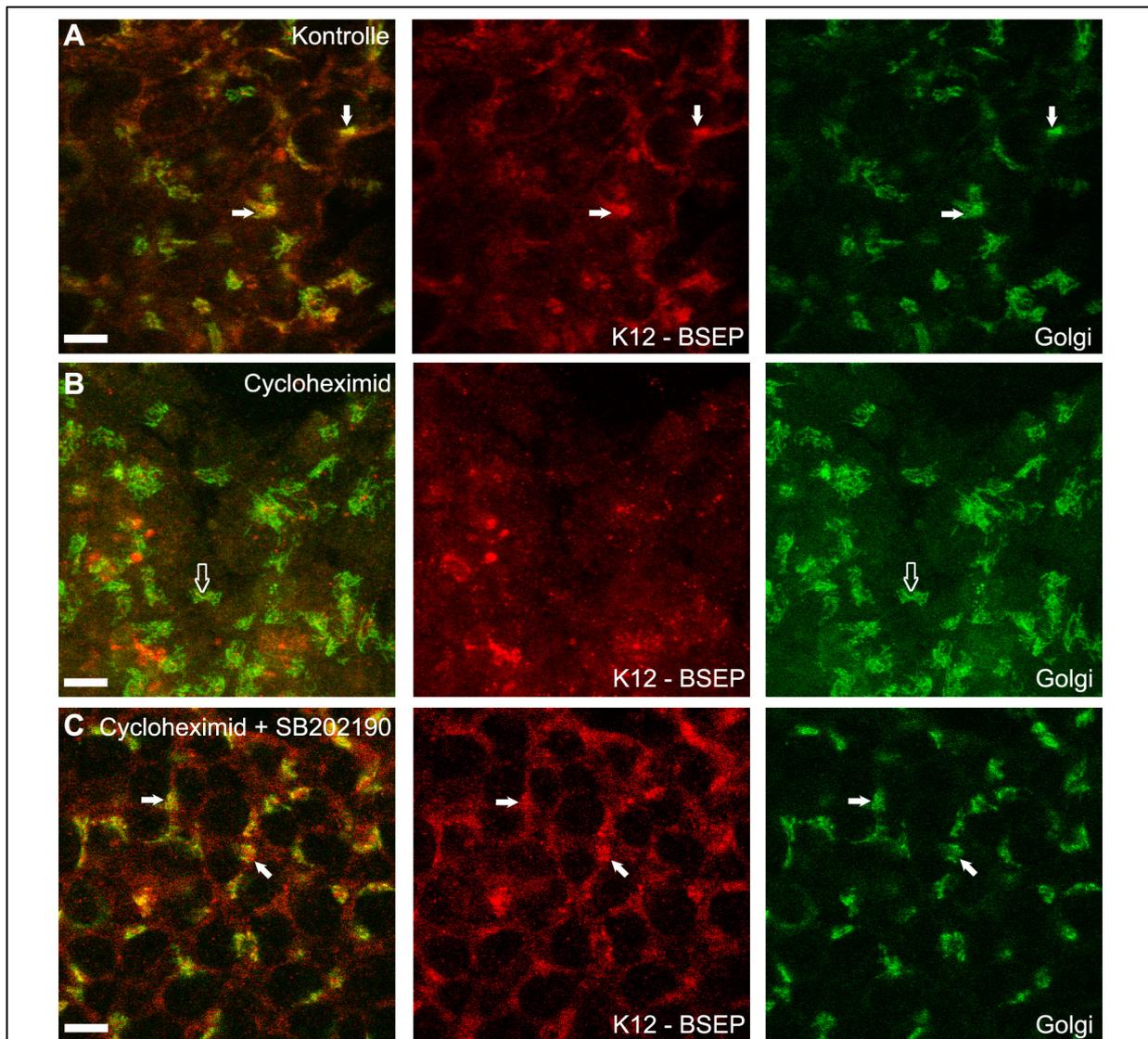


Abb. 30: Darstellung des Cycloheximid-abhängigen BSEP-Targetings aus dem Golgi-Apparat sowie dessen Hemmung durch den $p38^{MAPK}$ -Inhibitor SB202190.

Immunfluoreszenz-Färbung in HepG2-Zellen, bei der BSEP mit dem K12-Antikörper (rot) und der Golgi-Apparat mit dem GM130-Antikörper (grün) markiert wurde. Die weißen Maßstablinien entsprechen 10 μm . **A.** In Kontrollzellen zeigte sich eine deutliche Co-Lokalisation von BSEP und Golgi-Protein GM130 (Pfeile). **B.** Nach 6-stündiger Inkubation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Cycloheximid fanden sich deutlich reduzierte Co-Lokalisationen (leerer Pfeil). In der Überlagerung erscheint der Golgi deshalb mehr grün (GM130) als gelb (GM130 + BSEP). **C.** Unter gleichzeitiger Inkubation mit Cycloheximid und dem $p38^{MAPK}$ -Inhibitor SB202190 (0,5 $\mu\text{mol/l}$) ergab sich wieder eine deutliche Golgi-Lokalisation von BSEP (Pfeile) mit einer vermehrten Gelbfärbung in der Überlagerung von GM130 und BSEP.

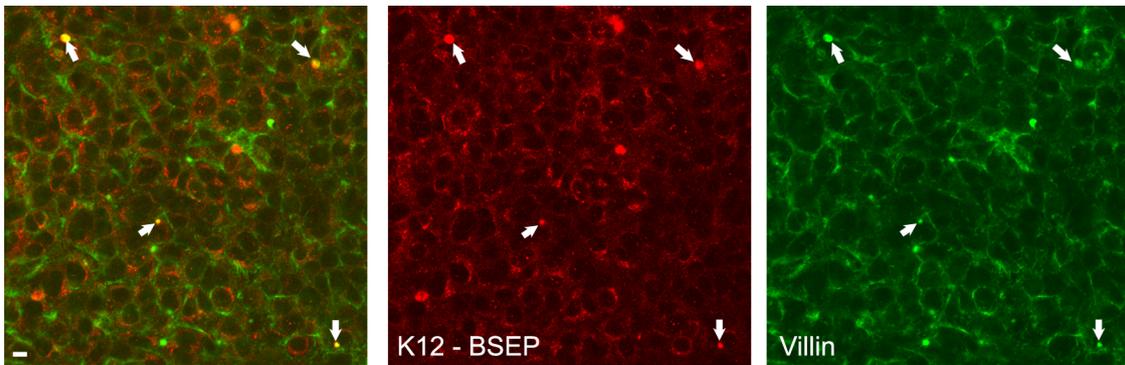


Abb. 31: Stimulation des BSEP-Targetings an die kanalikuläre Membran durch Cycloheximid. Nach 6-stündiger Stimulation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Cycloheximid zeigte sich ein im Vergleich zur Kontrollgruppe (vgl. Abb. 20) vermehrtes Vorkommen von BSEP (K12, rot) in den Pseudocanaliculi (Villin, grün) von HepG2-Zellen. Die weißen Pfeile markieren BSEP-positive Canaliculi. Die weiße Maßstablinie entspricht 10 μm .

Anhand von Stimulationsexperimenten sollte dieser Effekt quantifiziert werden. Zunächst wurde eine Zeitreihe ausgeführt, bei der HepG2-Zellen für 10 und 30 Minuten sowie 1, 2, 4, 6, 8 und 16 Stunden mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Cycloheximid inkubiert wurden (Abb. 32). Es zeigte sich, dass schon nach 30 Minuten die Menge an BSEP in den Pseudocanaliculi deutlich zunimmt, bis zur 2. Stunde steil und dann bis zur 6. Stunde noch mäßig ansteigt, um bis zur 16. Stunden auf Werte nahe der Kontrollgruppe abzufallen. Für die folgenden Experimente wurde dann für Cycloheximid eine Inkubationszeit von 6 Stunden verwendet.

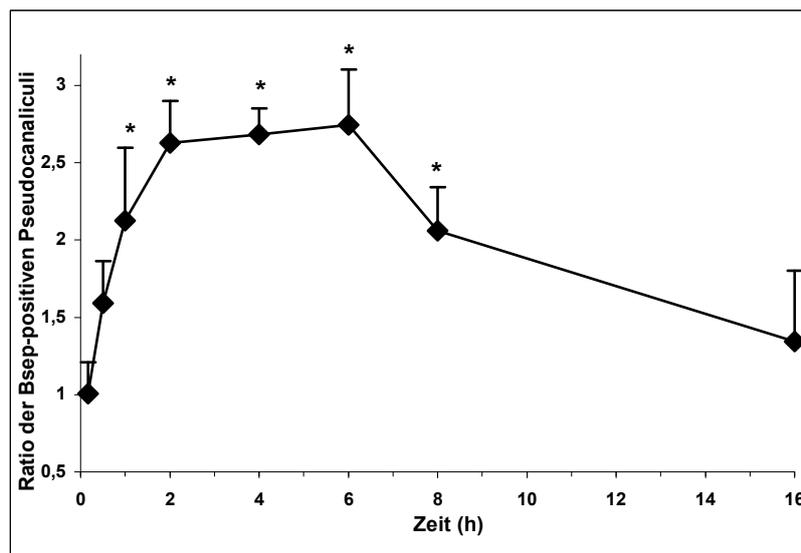
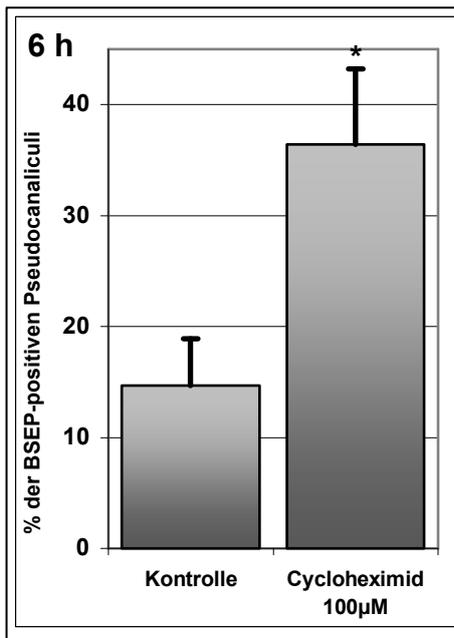


Abb. 32: Zeitreihe zur Cycloheximid-abhängigen Stimulation der kanalikulären BSEP-Expression in HepG2-Zellen.

Der Anteil der BSEP-positiven an den Villin-haltigen Pseudocanaliculi wurde ausgezählt. Für jeden Zeitpunkt wurde die Kontrolle = 1 gesetzt. Die Mittelwerte (MW) aller Bedingungen wurden durch die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollgruppe geteilt, so dass eine *Ratio* entstand, die die Steigerung der kanalikulären BSEP-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe angibt. Die Ergebnisse bestehen aus jeweils 10 Auszählungen (Gesichtsfelder) pro Zeitpunkt und Bedingung in drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung (SD) ist als Balken angegeben. Die Sternchen (*) markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe.



Versuchsbedingungen	MW	SD	U-Test
Kontrolle	14,7	7,4	zu Kontrolle
Cycloheximid 100 µmol/l	36,4	12,7	< 0,0001 *

Abb. 33: Stimulation des BSEP-Targetings durch Cycloheximid.

In 20 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen pro Bedingung wurde der Anteil der BSEP-positiven (K12) an den Gesamt-Pseudocanaliculi (Villin) ausgezählt. Cycloheximid (100 µmol/l, 6 h) führte zu einem deutlichen Anstieg des BSEP-Vorkommens an der kanalikulären Membran. Im Mann-Whitney-Rangtest zeigte sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit von < 0,0001.

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

Vergleich der Cycloheximid-Stimulation in nicht- bzw. Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen	Nicht-transf. HepG2		Ntcp-transf. HepG2		Ntcp-transfizierte > nicht-transfizierte HepG2		Kruskal-Wallis- und Dunn-Test
	MW	SD	MW	SD	P	Sign.	
Kontrolle	15,5	9,6	14,2	5,8	> 0,05	ns	H = 87,55 P < 0,0001
Cycloheximid 100 µmol/l	35,5	15,6	38,3	11,7	> 0,05	ns	

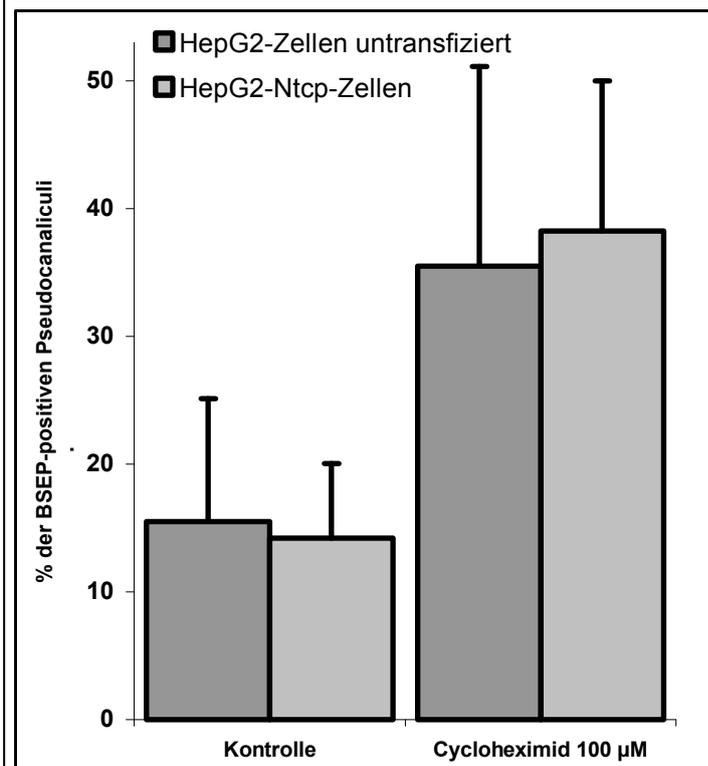


Abb. 34: Cycloheximid-abhängiges BSEP-Targeting an die kanalikuläre Membran im Vergleich von untransfizierten mit Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen.

Es wurde der prozentuale Anteil der BSEP-positiven (K12) an den Villin-positiven Pseudocanaliculi in 4 unabhängige Experimente mit je 10 Auszählungen ausgewertet. Die statistische Analyse im Kruskal-Wallis-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied ($P > 0,05$) der Stimulation des BSEP-Targetings zwischen transfizierten und untransfizierten HepG2-Zellen nach 6 Stunden Inkubationszeit.

In 20 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen wurde dann der Unterschied zwischen unstimulierten und mit Cycloheximid stimulierten HepG2-Zellen dargestellt (Abb. 33). Es zeigte sich, dass unter Cycloheximid die Anzahl der BSEP-positiven Pseudocanaliculi auf das 2,5-fache anstieg. Während in der Kontrollgruppe $14,7 \pm 7,4$ % der Pseudocanaliculi BSEP enthielten, waren es bei den mit Cycloheximid stimulierten Zellen $36,4 \pm 12,7$ %. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,0001$ im Mann-Whitney-Rangtest (U-Test) hoch signifikant. Auffällig war zudem, dass im Vergleich zu TUDC-stimulierten Zellen sich die Pseudocanaliculi deutlich intensiver mit K12 anfärben ließen, was auf eine höhere BSEP-Anreicherung in der kanalikulären Membran schließen lässt.

In einem Vergleich zwischen Ntcp-transfizierten und untransfizierten HepG2-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied im Stimulationseffekt von Cycloheximid auf die BSEP-Expression an der kanalikulären Membran festgestellt werden (Abb. 34).

4.2.6 Wirkung verschiedener Inhibitoren auf das Cycloheximid-abhängige BSEP-Targeting

Um Signalwege zu identifizieren, die am Stimulationseffekt von Cycloheximid beteiligt sind, wurden die gleichen Kinasen und Zytoskelettbestandteile mit ihren Hemmstoffen untersucht wie bei der TUDC-Versuchsreihe: Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase C (PKC), Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 ($p38^{MAPK}$), MAPK/Erk-Kinase (MEK), Microtubuli und Mikrofilamente. Dabei wurde nach 6-stündiger Inkubation von Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen mit $100 \mu\text{mol/l}$ Cycloheximid, den Inhibitoren bzw. der Kombination von Cycloheximid und Inhibitor der Anteil der BSEP-positiven (K12) an den Villin-positiven Pseudocanaliculi ausgezählt (Tafel 3). Um die Signifikanz der Hemmwirkung der Inhibitoren zu bestimmen, wurde die approximative nicht-parametrische Varianzanalyse nach Kruskal und Wallis mit anschließendem Dunn-Vergleichstest verwendet.

4.2.6.1 Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)

Wortmannin (100 nmol/l), der Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), bewirkte in 5 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen keine Hemmung des durch Cycloheximid gesteigerten Targetings von BSEP an die kanalikuläre

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test		
Kontrolle	17,0	9,2	zu Kontrolle		H = 98,31
Wortmannin 100 nmol/l	18,5	9,0	> 0,05	ns	P < 0,0001
Cycloheximid 100 µmol/l	36,5	15,0	< 0,001	*	zu Cycloheximid
Cycloheximid + Wortmannin	40,7	13,0	< 0,001	*	> 0,05
					ns

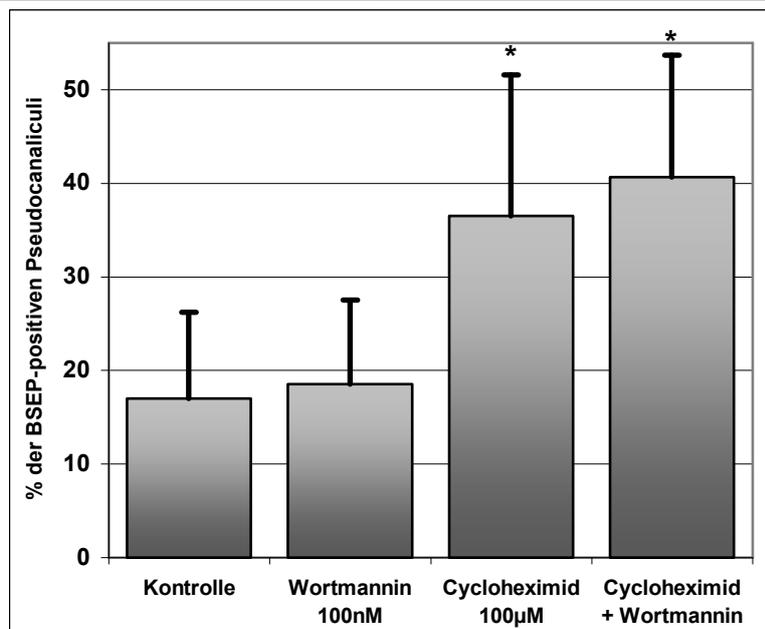


Abb. 35: Cycloheximid-abhängiges BSEP-Targeting unter Inhibition der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) mit Wortmannin.

Wortmannin, ein Hemmstoff der PI-3-Kinase, führte nach 6-stündiger Inkubation nicht zu einer Inhibition des Cycloheximid-induzierten BSEP-Targetings. Es wurden 5 unabhängige Experimente mit je 10 Auszählungen pro Bedingung durchgeführt und ausgewertet.

* = signifikant zur Kontrollgruppe.

Membran. Während die Inkubation mit Cycloheximid alleine den Anteil BSEP-haltiger Pseudocanaliculi von $17,0 \pm 9,2$ % (Kontrollgruppe) auf $36,5 \pm 15,1$ % an hob, lag der Wert bei gleichzeitiger Inkubation von Cycloheximid und Wortmannin bei $40,7 \pm 13,0$ % (Abb. 35). Diese leichte Steigerung ist statistisch nicht signifikant.

4.2.6.2 Proteinkinase C (PKC)

Eine Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) am Cycloheximid-abhängigen BSEP-Targeting wurde mittels zweier spezifischer Inhibitoren untersucht. Der Hemmstoff aller PKC-Isoformen Gö6850 (1 µmol/l; Abb. 36) bewirkte in 8 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen pro Bedingung eine signifikante Reduktion der BSEP-positiven Pseudocanaliculi von $36,9 \pm 11,8$ % unter alleiniger Inkubation mit Cycloheximid auf $28,2 \pm 12,3$ % unter kombinierter Inkubation.

Um herauszufinden, welche Gruppe der PKC-Isoformen am BSEP-Targeting beteiligt ist, wurde eine weitere Experimentenserie mit Gö6976 (1 µmol/l) durchgeführt, einem selektiven Inhibitor der Ca^{2+} -abhängigen Isoformen. Die Ergebnisse (Abb. 37) zeigten, dass mit diesem Hemmstoff das Cycloheximid-induzierte Targeting nicht beeinflusst werden kann. Die alleinige Inkubation mit Cycloheximid ergab einen Anteil der BSEP-positiven Pseudocanaliculi von $32,8 \pm 11,1$ %, die Inkubation mit Cycloheximid

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test		
Kontrolle	14,4	7,1	zu Kontrolle		H = 155,61
Gö6850 1 µmol/l	15,4	8,6	> 0,05	ns	P < 0,0001
Cycloheximid 100 µmol/l	36,9	11,8	< 0,001	*	zu Cycloheximid
Cycloheximid + Gö6850	28,0	12,3	< 0,001	*	< 0,01

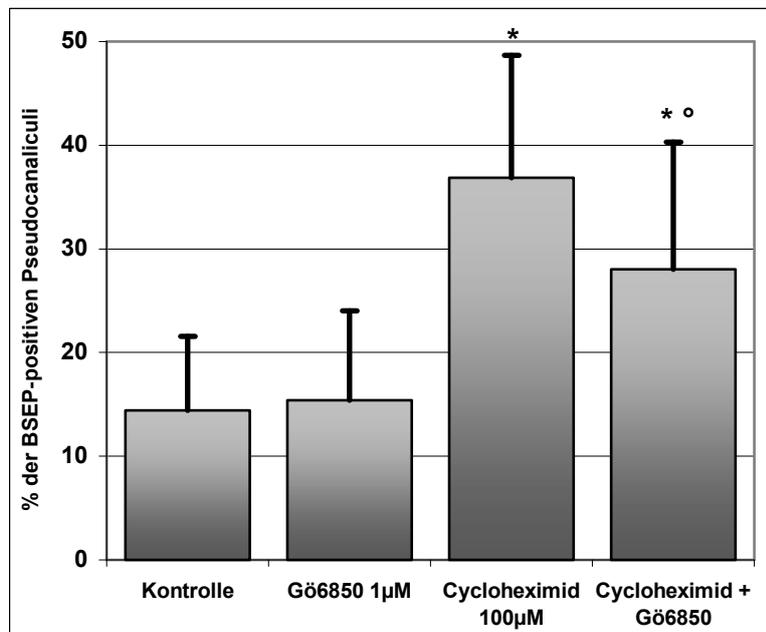


Abb. 36: Cycloheximid-abhängiges BSEP-Targeting unter Inhibition aller PKC-Isoformen mit Gö6850.

Gö6850, ein Inhibitor aller PKC-Isoformen, bewirkte nach 6-stündiger Inkubation eine Reduktion des Cycloheximid-abhängigen Targetings von BSEP. Es wurden 8 unabhängige Experimente mit je 10 Auszählungen durchgeführt. * = signifikant zur Kontrollgruppe. ° = signifikant zu Cycloheximid.

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test		
Kontrolle	10,7	5,3	zu Kontrolle		H = 68,25
Gö6976 1 µmol/l	12,7	7,3	> 0,05	ns	P < 0,0001
Cycloheximid 100 µmol/l	32,8	11,1	< 0,001	*	zu Cycloheximid
Cycloheximid + Gö6976	32,3	15,3	< 0,001	*	> 0,05

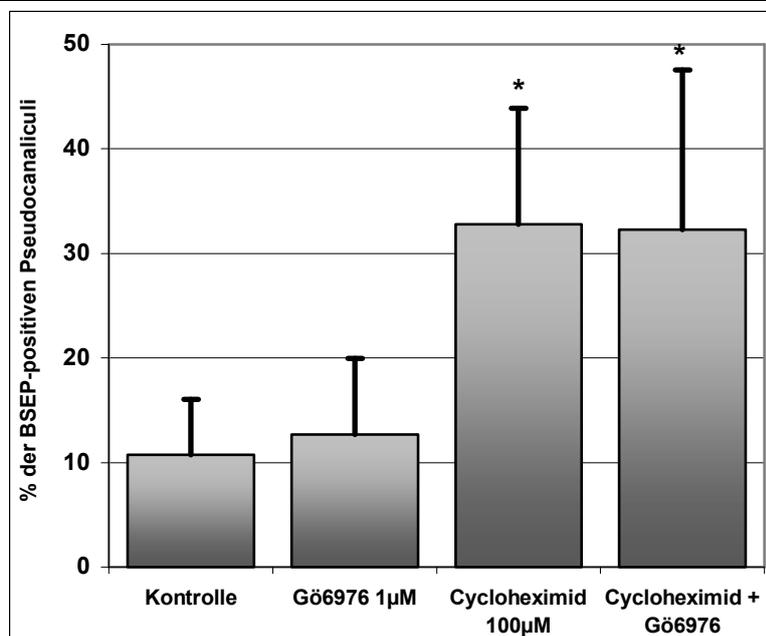


Abb. 37: Cycloheximid-abhängiges BSEP-Targeting unter Inhibition der Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoformen mit Gö6976.

Der selektive Inhibitor der Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoformen bewirkt nach 6-stündiger Inkubation keine Hemmung der Cycloheximid-abhängigen Stimulation des BSEP-Targetings. Es wurden 3 unabhängige Experimente mit je 10 Auszählungen pro Versuchsbedingung durchgeführt. * = signifikant zur Kontrollgruppe.

und Gö6976 einen Anteil von $32,3 \pm 15,3$ %. Der Unterschied ist nicht signifikant. Somit scheinen am ehesten die Ca^{2+} -unabhängigen PKC-Isoformen am BSEP-Targeting unter Cycloheximid-Gabe beteiligt zu sein.

4.2.6.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) vom p38-Typ (p38^{MAPK})

Der selektive Inhibitor der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) vom p38-Typ (p38^{MAPK}), SB202190, führte in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{mol/l}$ zu einer signifikanten Senkung der kanalikulären BSEP-Expression bei gleichzeitiger Stimulation mit Cycloheximid. Cycloheximid alleine bewirkte eine Steigerung des BSEP-Vorkommens in den Pseudocanaliculi von $17,0 \pm 8,2$ % (Kontrollgruppe) auf $38,6 \pm 13,2$ %. Bei der Kombination von Cycloheximid und SB202190 waren dann nur noch $30,3 \pm 11,3$ % der Pseudocanaliculi BSEP-positiv (Abb. 38). Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug $P < 0,01$.

Dies spricht für eine Beteiligung der p38^{MAPK} bei der Stimulation des BSEP-Targetings durch Cycloheximid.

4.5.6.4 MAPK vom Typ der extrazellulär regulierten Kinasen (Erk)

PD098059 wurde als Inhibitor der MEK, einer Kinase der Erk-Signalkaskade, in einer Konzentration von $5 \mu\text{mol/l}$ verwendet. Es zeigte sich schon bei alleiniger Gabe von PD098059 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung des BSEP-Vorkommens in den Pseudocanaliculi von $17,8 \pm 8,7$ % auf $25,4 \pm 11,3$ %. Die Kombination von Cycloheximid und PD098059 ergab im Vergleich zu Cycloheximid alleine einen nicht signifikanten Anstieg von $40,2 \pm 13,7$ % auf $42,0 \pm 14,1$ % (Abb. 39). Folglich fördern die Erk / MEK nicht das durch Cycloheximid induzierte Targeting von BSEP, sondern scheinen eher einen inhibitorischen Effekt zu haben.

4.2.6.5 Microtubuli

Der Microtubuli-Hemmstoff Nocodazol führte nach 6-stündiger Inkubation zu einer Reduktion des BSEP-Targetings von $38,0 \pm 12,6$ % unter Cycloheximid auf $26,1 \pm 11,0$ % unter der Kombination von Cycloheximid mit Nocodazol ($P < 0,01$; Abb. 40). Nocodazol alleine ergab keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (5 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen).

Insofern kann davon ausgegangen werden, dass Microtubuli eine wichtige Rolle beim Cycloheximid-vermittelten BSEP-Targeting spielen.

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test			
Kontrolle	17,0	8,2	zu Kontrolle		H = 190,56	
SB202190 0,5 µmol/l	16,3	8,1	> 0,05	ns	P < 0,0001	
Cycloheximid 100 µmol/l	38,6	13,2	< 0,001		* zu Cycloheximid	
Cycloheximid + SB202190	30,3	11,3	< 0,001	*	< 0,01	*

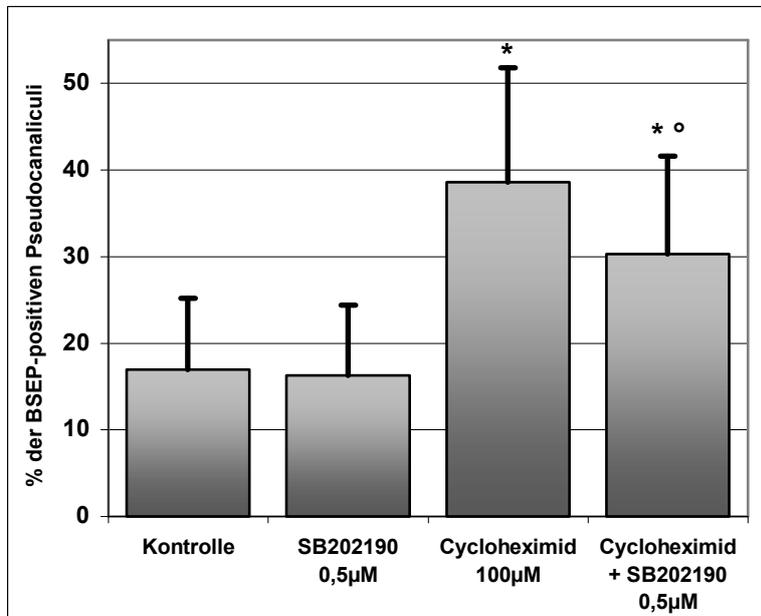


Abb. 38: Cycloheximid-abhängiges BSEP-Targeting unter Inhibition der MAPK vom p38-Typ mit SB202190.

SB202190, der Hemmstoff der p38^{MAPK}, reduzierte nach 6-stündiger Inkubation signifikant den Stimulationseffekt von Cycloheximid auf das BSEP-Targeting. Es wurden 10 unabhängige Experimente mit je 10 Auszählungen pro Versuchsbedingung ausgewertet.

* = signifikant zur Kontrolle.

° = signifikant zu Cycloheximid.

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test			
Kontrolle	17,8	8,7	zu Kontrolle		H = 126,62	
PD098059 5 µmol/l	25,4	11,3	< 0,01	*	P < 0,0001	
Cycloheximid 100 µmol/l	40,2	13,7	< 0,001		* zu Cycloheximid	
Cycloheximid + PD098059	42,0	14,1	< 0,001	*	> 0,05	ns

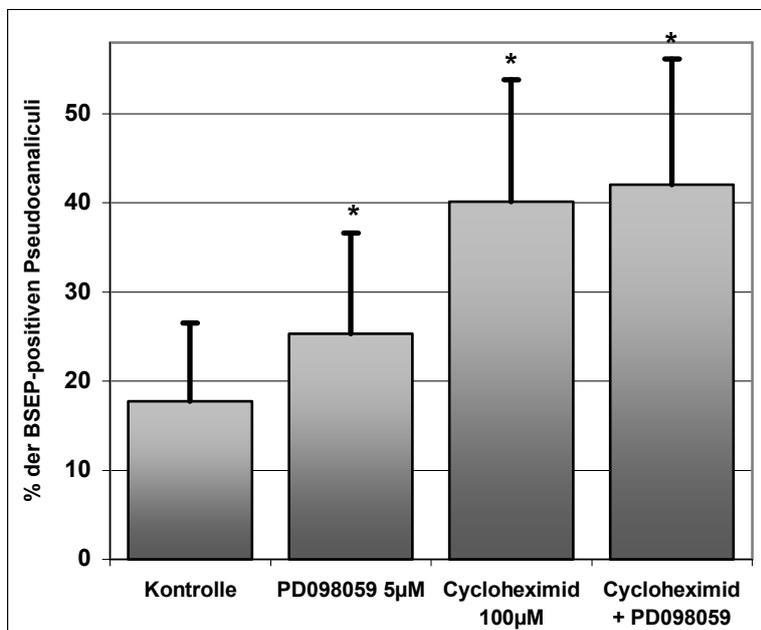


Abb. 39: Cycloheximid-abhängiges BSEP-Targeting unter Inhibition der MAPK vom Erk-Typ mit PD098059.

PD098059 als Inhibitor der Erk-Signalkaskade hemmte nach 6-stündiger Inkubation nicht das Cycloheximid-abhängige BSEP-Targeting. Folglich sind die Erk / MEK nicht am durch Cycloheximid induzierten Targeting von BSEP beteiligt. Es wurden 7 unabhängige Experimente mit je 10 Auszählungen pro Bedingung ausgewertet.

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test		
Kontrolle	15,0	7,3	zu Kontrolle		H = 79,64
Nocodazol 33 µmol/l	18,5	10,7	> 0,05	ns	P < 0,0001
Cycloheximid 100 µmol/l	38,0	12,6	< 0,001	*	zu Cycloheximid
Cycloheximid + Nocodazol	26,1	11,0	< 0,001	*	< 0,01

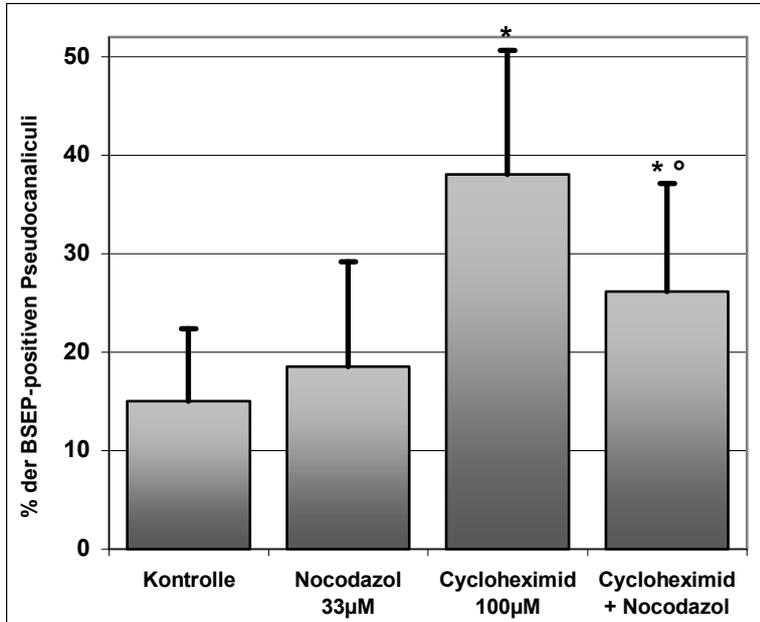


Abb. 40: Cycloheximid-abhängiges BSEP-Targeting unter Inhibition der Microtubuli mit Nocodazol.

Der Microtubuli-Hemmstoff Nocodazol bewirkte nach 6-stündiger Inkubation eine Reduktion des durch Cycloheximid induzierten BSEP-Targetings. Insofern können die Microtubuli eine wichtige Rolle beim Cycloheximid-vermittelten BSEP-Targeting spielen. Es wurden 5 unabhängige Experimente mit je 10 Auszählungen pro Bedingung durchgeführt und ausgewertet.

* = signifikant zur Kontrolle.

° = signifikant zu Cycloheximid.

Versuchsbedingungen	MW	SD	Kruskal-Wallis- und Dunn-Test		
Kontrolle	12,8	4,4	zu Kontrolle		H = 86,50
Gö6850 + SB202190	14,8	6,7	> 0,05	ns	P < 0,0001
Cycloheximid 100 µmol/l	29,1	6,0	< 0,001	*	zu Cycloheximid
Cyclohex. + Gö6850 + SB202190	26,2	10,1	< 0,001	*	> 0,05

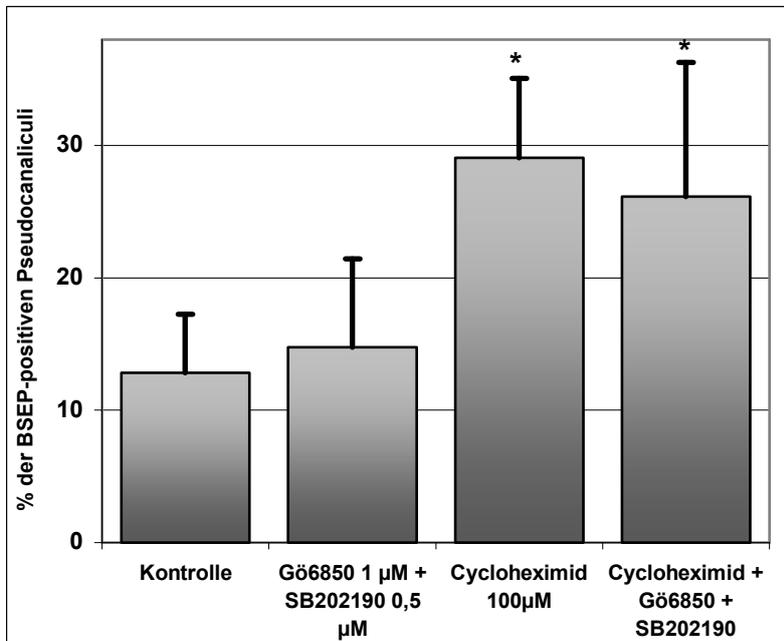


Abb. 41: Cycloheximid-abhängiges BSEP-Targeting unter gleichzeitiger Inhibition der PKC und der p38^{MAPK} mit Gö6850 bzw. SB202190.

Die Kombination von PKC-Inhibitor Gö6850 und p38^{MAPK}-Hemmstoff SB202190 ergab nach 6-stündiger Inkubation keinen signifikanten Hemmeffekt auf das Cycloheximid-abhängige BSEP-Targeting. Es wurden Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten mit je 10 Auszählungen pro Versuchsbedingung verwertet.

* = signifikant zur Kontrolle.

4.2.6.6 Mikrofilamente

Der Mikrofilament-Hemmstoff Cytochalasin D führte - wie bereits oben erwähnt - zu starken Zellveränderungen, so dass die mit Villin markierten Pseudocanaliculi nicht sicher auszuzählen waren. Deshalb konnte die mögliche Rolle der Mikrofilamente beim BSEPTargeting nicht untersucht werden.

4.2.6.7 Kombination von PKC-Inhibitor Gö6850 und p38^{MAPK}-Hemmstoff SB202190

Um einen möglichen additiven Effekt von PKC und p38^{MAPK} auf das BSEP-Targeting festzustellen, wurden HepG2-Zellen mit einer Kombination der Hemmstoffe beider Kinasen, Gö6850 (1 µmol/l) und SB202190 (0,5 µmol/l), inkubiert. Es zeigte sich jedoch nur eine geringe Hemmung des Cycloheximid-induzierten Targeting von 29,1 ± 6,0 % auf 26,2 ± 10,1 % (Abb. 41). Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

Insofern scheint der Effekt von PKC und p38^{MAPK} nicht additiv zu sein. Möglicherweise stellen die Proteinkinase C und die MAPK vom p38-Typ Teile einer gemeinsamen Signalkaskade dar.

4.3 Golgi-Lokalisation von BSEP in isolierten Rattenhepatozyten

Um in einem weiteren Zellmodell zu untersuchen, ob BSEP auf seinem Weg zur kanalikulären Membran im Golgi-Apparat gespeichert und sein Targeting durch bestimmte Kinasen stimuliert werden kann, wurden isoliert kultivierte Rattenhepatozyten verwendet.

Zunächst wurde dargestellt, dass die Zellen nach einer 24-stündigen Kultivierung noch polarisiert waren, d.h. funktionsfähige Gallekanälchen ausbildeten. Dazu wurden sie mit den fluoreszierenden Substraten für Mrp2, Chloromethylfluorescein (CMFDA), bzw. für Bsep, Cholyllysyl-Fluorescein (CLF), inkubiert. Es resultierte eine deutliche Anreicherung der Substrate in einem kanalikulären Verteilungsmuster (Abb. 42 A und C). Eine Anfärbung des kanalikulären Transportproteins Mrp2 mit dem Antikörper EAG15 oder der Bsep mit K12 zeigte eine entsprechende kanalikuläre Lokalisation der Transporter (Abb. 42 B).

Anschließend wurden isolierte Rattenhepatozyten sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Inkubation mit den Hemmstoffen der PKC (Gö6850 1 µmol/l) bzw. der p38^{MAPK} (SB202190 0,5 µmol/l) mit dem Bsep-Antikörper K12 und dem Golgi-

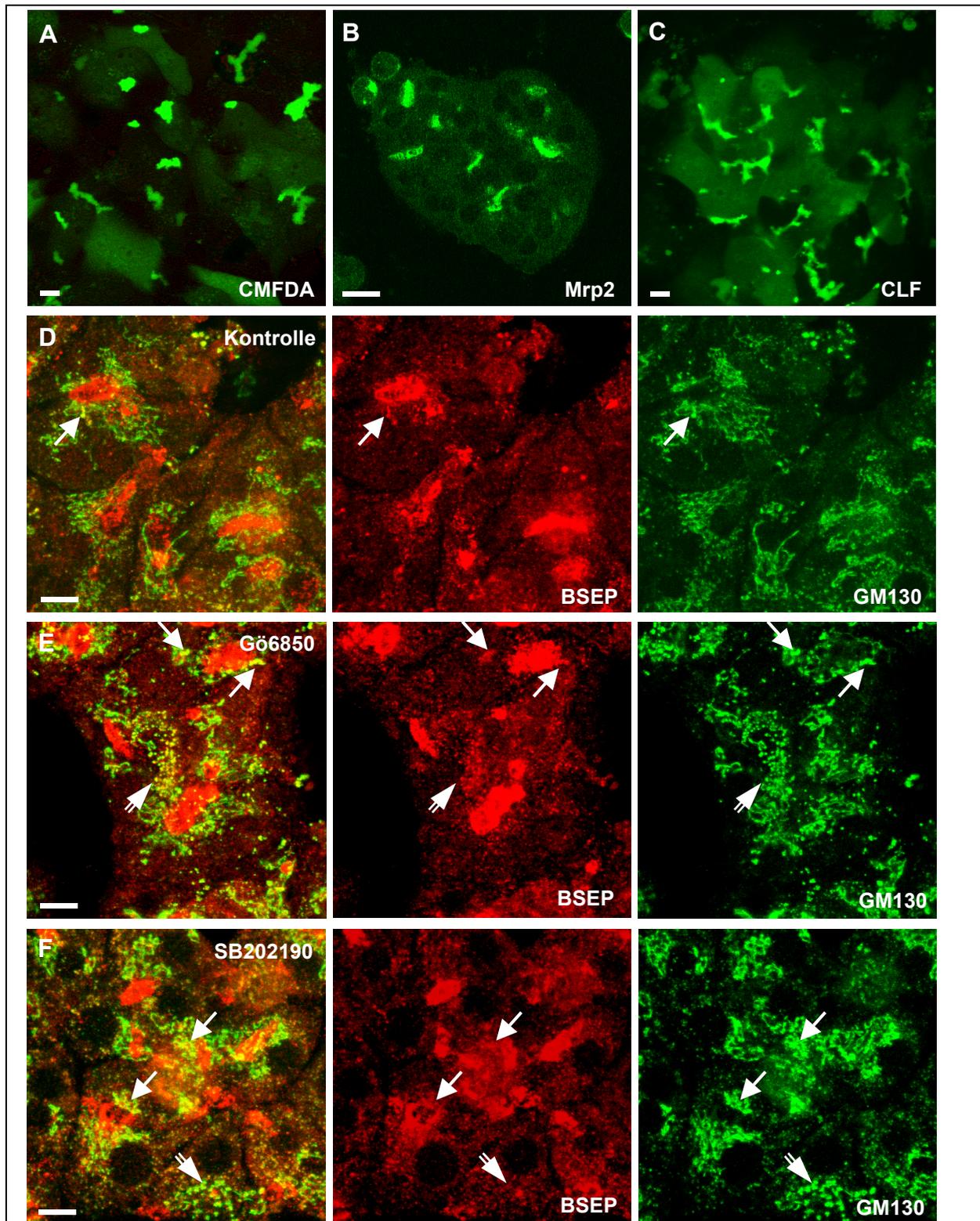


Abb. 42: Bsep-Lokalisation in isolierten Rattenhepatozyten.

A: Nach 24-stündiger Kultivierung waren isolierte Rattenhepatozyten polarisiert und sezernierten das Mrp2-Substrat Chloromethylfluorescein-Diacetat (CMFDA, grün) in die Gallenkanälchen. **B:** Die Immunfluoreszenz-Färbung von Mrp2 mit dem Antikörper EAG15 (grün) zeigte ein kanalikuläres Verteilungsmuster. **C:** Kultivierte Rattenhepatozyten sezernierten außerdem das Bsep-Substrat Cholyllysyl-Fluorescein (CLF, grün) in die Canaliculi. **D:** Unter Kontrollbedingungen co-lokalisierte (gelb, Pfeile) Bsep (K12, rot) nur selten mit dem Golgi-Protein GM130 (grün). **E/F:** Der PKC-Inhibitor Gö6850 (1 $\mu\text{mol/l}$, **E**) bzw. der p38^{MAPK}-Hemmstoff SB202190 (0,5 $\mu\text{mol/l}$, **F**) induzierten nach 8-stündiger Inkubation eine partielle Co-Lokalisation von Bsep (rot) und GM130 (grün) in tubulären (gelb, Pfeile) und vesikulären (gelb, Doppelpfeile) Strukturen. Die Maßstablinien entsprechen 10 μm .

Antikörper Anti-GM130 angefärbt. Unter Kontrollbedingungen war Bsep nur wenig im Golgi-Apparat lokalisiert (Abb. 42 D). Bei Inhibition der Kinasen, die für das BSEP-Targeting in HepG2-Zellen verantwortlich waren, wurde jedoch eine vermehrte Co-Lokalisation von Bsep mit GM130 in tubulären und vesikulären Strukturen beobachtet (Abb. 42 E und F).

5. Diskussion

5.1 Nachweis und Lokalisation von BSEP in HepG2-Zellen

In dieser Arbeit wurde BSEP in HepG2-Zellen durch Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), Western Blot und Immunfluoreszenz nachgewiesen.

Plass et al. {208} konnten zeigen, dass unter Stimulation mit Gallensalzen BSEP-mRNA in HepG2-Zellen nachweisbar ist. In der vorliegenden Studie konnte BSEP-mRNA mittels RT-PCR und folgender Gelelektrophorese jedoch auch in nicht-stimulierten HepG2-Zellen gefunden werden. Der Nachweis des BSEP-Proteins erfolgte durch Western-Blot-Analyse mit dem neu generierte humanen BSEP-Antikörper K165. Mittels Immunfluoreszenz-Färbungen konnte die Lokalisation von BSEP in HepG2-Zellen bestimmt werden. Sowohl die Ratten-Antikörper K12 und LVT90 als auch durch der humane Antikörper K165 detektierten BSEP in den Pseudocanaliculi. Allerdings war BSEP nur in 15 % der Pseudocanaliculi enthalten.

In menschlichen Leberschnitten zeigte K165 ein typisches kanalikuläres Verteilungsmuster und co-lokalisieren mit dem apikalen Transportprotein MRP2. In Lebern von Kindern mit PFIC-2 fehlte die kanalikuläre BSEP-Färbung mit K165 als Zeichen dafür, dass die Gallensalzpumpe bei diesem Krankheitsbild nicht exprimiert wird {139}. Ferner konnte in dieser Arbeit eine Kreuzreagibilität mit dem Ratten-Bsep in Rattenleberschnitten beobachtet werden.

Neben der kanalikulären Verteilung von BSEP konnte in HepG2-Zellen eine perinukleäre Anreicherung beobachtet werden, die auch bei anderen ABC-Transportern wie MDR1 {218} beschrieben ist. Ein basolaterales Vorkommen von BSEP wurde jedoch nicht festgestellt. Dies spricht für die Hypothese von Kipp und Arias {142}, die in der Rattenleber ein direktes Targeting von BSEP beschrieben. Soroka et al. {237, 240} hatten dagegen zuvor einen indirekten Transportweg beobachtet, bei dem BSEP zusammen mit dem polymerischen IgA-Rezeptor über die basolaterale in die apikale Membran gelangt.

5.2 Signalwege des BSEP-Targetings in HepG-Zellen bei Stimulation mit Tauroursodeoxycholol (TUDC)

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Menge funktioneller Gallensalztransporter am Canaliculus zu regulieren: (1.) die Regulation über die Genexpression und Proteinsynthese, (2.) die Steuerung über das Targeting zur Membran, (3.) Ein- und Ausbaurvorgänge der Transporter an der kanalikulären Membran, (4.) die Aktivierung bzw. Inaktivierung der Transportproteine in der Canaliculusmembran, z.B. durch kovalente Modifikation mittels Phosphorylierung, und (5.) Abbauvorgänge.

In dieser Arbeit wurde der unter Punkt 2 genannten Vorgang, also das Targeting von BSEP an die kanalikuläre Membran, untersucht.

Tauroursodeoxycholol (TUDC) ist ein hydrophiles, anticholestatisch wirkendes Gallensalz {36, 95, 114, 115, 188, 266}, das bei Lebererkrankungen mit Gallesekretionsstörungen therapeutisch eingesetzt wird {22, 207}. In der perfundierten Rattenleber bzw. in isolierten Ratten-Hepatozyten verhindert TUDC die TLC- {227, 228, 255} und TC-induzierte {137, 145} Cholestase und Toxizität. Es wurde außerdem gezeigt, dass es den Einbau von BSEP in die kanalikuläre Membran stimuliert {164}. In der perfundierten Rattenleber wird Bsep unter Stimulation mit TUDC aus der subkanalikulären Region in die kanalikuläre Membran umverteilt {164}. Verschiedene Kinasen werden in der Rattenleber durch TUDC aktiviert, so vor allem die PI3-Kinase {163}, die MAP-Kinasen vom Erk-Typ {223}, die p38^{MAPK} {164} und die PKC {28}. Die Bedeutung dieser Signalwege für das Targeting von BSEP in humanen Leberzellen ist bisher dagegen wenig untersucht.

In dieser Arbeit führte TUDC in Ntcp-transfizierten, nicht jedoch in untransfizierten HepG2-Zellen zu einer Zunahme von BSEP in der kanalikulären Membran. Folglich wirkt TUDC erst nach Aufnahme in die Leberzellen stimulierend auf das BSEP-Targeting. Es wurde ferner gezeigt, dass das durch TUDC induzierte BSEP-Targeting von der p38^{MAPK} und der Proteinkinase C sowie von der Integrität des mikrotubulären Systems abhängig ist. Dagegen bewirkte die Hemmung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) bzw. der MAP-Kinasen vom Erk-Typ keine signifikante Reduktion des TUDC-abhängigen BSEP-Targetings.

5.2.1 Beteiligung von MAP-Kinasen am TUDC-induzierten BSEP-Targeting

In der perfundierten Rattenleber wurde bereits durch Kurz et al. {164} die Bedeutung der p38^{MAPK} für die durch TUDC induzierte Choleresese dargestellt. Die unter Perfusion mit TUDC beobachtete Umverteilung von Bsep in die kanalikuläre Membran wurde durch Hemmung der p38^{MAPK} unterdrückt. Häussinger et al. {111} zeigten, dass in der perfundierten Rattenleber auch bei hypoosmolarer Zellschwellung, die eine vermehrte Choleresese zur Folge hat, eine Aktivierung der p38^{MAPK} ohne vorangegangene Stimulation der PI3-Kinase bzw. des GTP-bindenden Proteins Ras erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde dargestellt, dass die p38^{MAPK} in HepG2-Zellen zu einer Anreicherung von BSEP an der kanalikulären Membran führt. Bei gleichzeitiger Inkubation mit TUDC und dem p38^{MAPK}-Inhibitor SB202190 sank der Anteil der BSEP-positiven Pseudocanaliculi auf die Werte der Kontrollgruppe ab. Insofern liegt die Hypothese nahe, dass über die p38^{MAPK} das Targeting von BSEP vom Golgi-Apparat an die apikale Membran beeinflusst wird.

Bezüglich der MAP-Kinase vom Erk-Typ zeigten Schliess et al. {223, 224} in der perfundierten Rattenleber eine Gallensalz-abhängige Stimulation mit nachfolgend verstärkter Taurocholat-Sekretion in die Gallenwege. TUDC, das als starker Erk-Aktiva-tor bekannt ist {223}, soll über die PI3-Kinase und die GTP-bindenden Proteine Ras/Raf {163} die Erk1 und Erk2 stimulieren. Dieser Effekt konnte durch PD098059, einen Inhibitor der MEK (MAP-Kinase/Erk-Kinase, eine MAPKK), und bei Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cAMP gehemmt werden, nicht aber durch Inhi-bition der Proteinkinase C (PKC), Tyrosinkinase oder G-Protein-Funktion {223}.

In der vorliegenden Studie führte TUDC jedoch nicht über die Aktivierung der Erk-Typ-MAPK zu einer erhöhten Transporterpräsenz in der kanalikulären Membran von HepG2-Zellen. Der Inhibitor des Erk-Signalweges, PD098059, reduzierte nämlich nicht den Anteil der BSEP-positiven Pseudocanaliculi.

Möglicherweise bewirkt TUDC über die Erk eine Aktivierung der bereits in der Membran befindlichen Transporter oder einen Einbau von Transporter aus dem subapika-len Kompartement, der hier aufgrund der geringen Auflösung des Versuchsaufbaus nicht nachvollziehbar war, und beeinflusst nicht das Targeting von BSEP aus dem Golgi-Apparat an die Membran. Andererseits könnte es sich aber auch um Unter-schiede zwischen den Signalwegen in der Rattenleber (Schliess et al. {223}) und in humanen Hepatozyten handeln. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Hemmwirkung des in dieser Arbeit verwendeten MEK-Inhibitors, PD098059, auf-

grund eines gleichzeitigen aktivierenden Effekts auf das GTP-bindende Protein Raf {163}, das weiter oberhalb in der Signalkaskade gelegen ist, ausgeblieben ist {2}.

Es wurde bereits die Hypothese aufgestellt {164}, dass die p38^{MAPK} und die Erk zwei getrennte Signalwege zur Cholerese darstellen, wobei bereits die Blockierung einer der beiden Kinasen zur Hemmung des choleretischen Effekts führt. Auch die hypoosmotische oder Glutamin-induzierte Zellschwellung von Hepatozyten bewirkt über bestimmte Sensoren, die Integrine, eine Aktivierung der beiden MAPK-Signalwege und schließlich eine verstärkte Cholerese {107, 111, 201, 225, 226}. Hier erfolgt die Erk-Aktivierung jedoch im Gegensatz zu TUDC über einen G-Protein- und Tyrosinkinase-abhängigen und ebenfalls PKC-unabhängigen Weg {201}.

Möglicherweise konvergieren die Signalwege beider Kinasen erst am Canaliculus, indem die p38^{MAPK} für das verstärkte Targeting und die Erk für die Aktivierung bzw. den Einbau der Transportproteine verantwortlich ist.

5.2.2 Beteiligung der Proteinkinase C am TUDC-induzierten BSEP-Targeting

Es ist bereits ausführlich untersucht worden, dass choleretische Dihydroxy-Gallensalze wie TUDC die Proteinkinase C (PKC) aktivieren. Welche PKC-Isoformen jedoch durch welches Gallensalz stimuliert werden, ist umstritten {36, 125, 211}.

Es konnte in isolierten Rattenhepatozyten gezeigt werden, dass TUDC bzw. UDC die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöhen und damit die Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoformen wie die PKC- α aktivieren {24, 185}. Außerdem soll die PKC- α selektiv an die Hepatozytenmembran transloziert {27, 35, 251}, die DAG-Konzentration erhöht {28} und die membrangebundenen PKC- α aktiviert werden {28, 35}. Funktionelle Messungen, die eine Cholerese als Folge der PKC- α -Aktivierung zeigen, wurden jedoch in den genannten Studien nicht durchgeführt.

In der perfundierten Rattenleber führte eine unselektive Aktivierung der PKC zu einer erhöhten Exozytose-Rate {41}. Ähnliche Ansätze zeigten jedoch auch eine PKC-abhängige Hemmung der Gallensalzsekretion {65, 152}. In HepG2-Zellen bewirkt laut Westermann et al. {283} die Stimulation von PKC- α und - ζ durch den Phorbolster PMA eine Translokation der Kinasen an die Golgi-Membran und damit eine vermehrte Bildung von Transportvesikeln.

Die cholestatischen Monohydroxy-Gallensalze wie Taurolithocholat (TLC) sollen in isolierten Rattenhepatozyten dagegen eine selektive Translokation der Ca²⁺-unabhängigen PKC- ϵ , jedoch nicht der PKC- α , - δ und - ζ {25} bewirken. Der Anteil der

membrangebundenen PKC- α {21} und der Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran {24} sollen zusätzlich durch TLC gesenkt werden. In der perfundierten Rattenleber sorgte TUDC für eine Wiederherstellung des unter TLC reduzierten Gallenflusses und des verminderten Anteils der membrangebundenen PKC- α {21}.

Die meisten dieser Studien befassen sich jedoch nur mit der Lokalisation und dem Aktivierungszustand der PKC und leiten dann Folgen dieses Prozesses, wie z.B. eine erhöhte Gallensalzsekretion, ab, ohne dies untersucht zu haben. Außerdem erfolgten die meisten Studien, die den choleretischen Effekt von TUDC in einer Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen sahen, in isolierten Rattenhepatozyten, die ein spezielles System darstellen, nämlich sich neu organisierende Einzelzellen, deren Funktion nicht unmittelbar auf einen physiologischen Leberzellverband übertragbar ist.

In der isoliert perfundierten Rattenleber, ein Modell, das die physiologischen Leberfunktionen besser darstellen lässt, führt die Aktivierung der PKC zu einem Rückgang der Gallensekretion {65}. So sank der Gallefluss unter Perfusion mit PMA auf 15 % ab {151}, die Taurocholat-Exkretion auf 22 % {152}.

Die unselektive Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen und -unabhängigen PKC-Isoformen durch den Phorbolster PMA sowie die selektive Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen durch Thymeleatoxin (Ttx) bewirkte eine deutliche Cholestase mit Rückzug der apikalen Transportproteine in ein subkanalikuläres Kompartiment {106, 152}; die Effekte beider PKC-Stimulatoren konnten durch den selektiven Inhibitor der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen, Gö6976, komplett bzw. weitgehend geblockt werden.

Roma et al. {215} konnten in Rattenhepatozyten-Couplets nachweisen, dass die Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen das Vesikeltargeting zur apikalen Membran hemmen. Zegers und Hoekstra {292} stellten in HepG2-Zellen eine Hemmung des vesikulären Sphingolipid-Transports zur apikalen Membran bei Aktivierung der PKC mit PMA fest. Außerdem soll die PKC Aktinfilamente depolymerisieren {292}, die eine Art "Brücke" zwischen den Microtubuli als Leitstruktur der Vesikel und der apikalen Membran bilden {29} und somit für das Andocken der Vesikel erforderlich sind {182}.

Kubitz et al. {151} fanden in HepG2-Zellen, dass eine Stimulation der PKC mit dem Phorbolster PMA zum Ausbau des ABC-Transporters MRP2 aus der apikalen Membran und zu einem Retargeting an die basolaterale Membran führte, wobei dieser Vorgang durch den PKC-Inhibitor Gö6850 hemmbar war. Auch das baso-

laterale Transportprotein MRP3 wurde in der isoliert perfundierten Rattenleber, nicht aber in humanen Hepatozyten unter PKC-Stimulation mit PMA aus der basolateralen Membran ausgebaut {54}. In weiteren Studien an Rattenleberschnitten konnte nachgewiesen werden, dass PMA und Thymeleatoxin zum Ausbau von Mrp2 und Bsep führen und dieser Prozess durch die Blockade der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen mittels Gö6976 reversibel ist {152}.

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass in HepG2-Zellen die Hemmung aller PKC-Isoformen mit Gö6850 zu einer Reduktion des TUDC-induzierten BSEP-Targetings an die kanalikuläre Membran führt, während die selektive Inhibition der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen mit Gö6976 das Targeting nicht blockiert. Insofern scheinen hier die Ca^{2+} -unabhängigen PKC-Isoformen für das BSEP-Targeting zur apikalen Membran verantwortlich zu sein. Die Translokation und Aktivierung der PKC- α durch TUDC {27, 28} scheint demnach nicht den choloretischen Effekt dieses Gallensalzes zu vermitteln, sondern wird vielmehr durch die p38^{MAPK} -induzierte Gallensekretion überlagert.

Für eine Bestätigung dieser Theorie müssen jedoch weitere Untersuchungen folgen. Die abweichenden Ergebnisse bezüglich der beteiligten PKC-Isoformen könnten auf einer unterschiedlichen Expressionsrate in den verschiedenen Zellmodellen beruhen {241}. Außerdem kann der häufig benutzte PKC-Aktivator PMA z.B. bei längerer Inkubation in isolierten Rattenhepatozyten selektiv die PKC- α herunterregulieren {213}. Auch in HepG2-Zellen wurde eine Herunterregulation der Proteinkinase C beobachtet {80}. Der noch immer verwendete PKC-Inhibitor H-7 hat eine so geringe Spezifität, dass er auch in deutlichem Maße cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen hemmt {117, 210}. Ferner sollte der wenig spezifische Inhibitor Staurosporin für Untersuchungen an der Proteinkinase C nicht mehr benutzt werden {261}.

5.2.3 Microtubuli sind am TUDC-induzierten Targeting von BSEP beteiligt

Es ist seit längerem bekannt, dass Bestandteile des Zytoskeletts an vesikulären Transportvorgängen beteiligt sind {182}.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein intaktes mikrotubuläres System für die Exozytose des kanalikulären ABC-Transporters MRP2 (*Multidrug Resistance Protein 2*) {150}, der Gallensalz-transportierenden Ecto-ATPase {38} und des hepatozellulären $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers {18} sowie für den verstärkten transzellulären Taurocholat-Transport bei hypoosmotischer Leberzellschwellung {110} und den direkten

Transport von Sphingolipiden zur apikalen Membran {293} erforderlich ist. Bei Störung der Integrität der Microtubuli durch Nocodazol wird ferner der kanalikuläre Gallensalz-Efflux in isolierten Rattenhepatozyten gehemmt {38}. Der Hemmeffekt ist dabei unter Gallensalz-Stimulation deutlich stärker als unter basalen Bedingungen {240}. Crawford et al. {69} gehen davon aus, dass die basale Gallensalzsekretion unabhängig von den Microtubuli verläuft, während aber der durch Gallensalze stimulierte Gallefluss der Integrität der Microtubuli bedarf. Wakabayashi et al. {273} konnten darstellen, dass intakte Microtubuli für alle intrazellulären Umverteilungsvorgänge von BSEP zwischen verschiedenen Kompartimenten erforderlich sind.

Für Ratten-Bsep ist bekannt, dass es in frisch isolierten Rattenhepatozyten mit dem ABC-Transporter Mrp2 und dem IgA-Rezeptor in Microtubuli-assoziierten Vesikeln transportiert wird {240}.

In der vorliegenden Studie wurde das unter Inkubation mit TUDC auftretende BSEP-Targeting durch Zugabe des Microtubuli-Inhibitors Nocodazol nahezu vollständig gehemmt. Microtubuli sind folglich am TUDC-induzierten Signalweg beteiligt, wahrscheinlich *downstream* der MAP-Kinasen {110, 222}. Sie wirken möglicherweise über Microtubuli-assoziierte Proteine wie Tau {73, 279} oder über Proteinkinasen wie die MAPK-integrierende Proteinkinase (MNK1) {220} auf die Microtubulus-Dynamik ein.

5.2.4 Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ist vermutlich nicht am durch TUDC induzierten Targeting von BSEP beteiligt

In dieser Studie konnte eine Beteiligung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) am Targeting von BSEP in HepG2-Zellen nicht gefunden werden. Es sank zwar der Anteil der BSEP-positiven Pseudocanaliculi unter Inhibition der PI3-Kinase durch Wortmannin bei gleichzeitiger Stimulation mit TUDC, jedoch nicht in signifikantem Ausmaß.

Dies ist insofern bemerkenswert, als dass es sich bei der PI3K um einen bekannten Aktivator des gerichteten vesikulären Transports handelt {74, 259}. In WIF-B-Zellen {218}, in der perfundierten Rattenleber und *in vivo* {96} erhöhten PI3K-Produkte den Gallefluss, und der PI3K-Inhibitor Wortmannin blockierte in der Rattenleberperfusion die Taurocholat-induzierte Transporteraktivierung und Choleresese {186}, während nach Zugabe von PI3K-Lipidprodukten in kanalikulären Membranvesikeln die Choleresese wiederhergestellt wurde {187}.

Misra et al. {186} konnten zeigen, dass das Gallensalz Taurocholat zwar die PI3-Kinase stimuliert und folglich zu einer Aktivierung der kanalikulären Transporter führt, was in einer erhöhten Galleflussrate messbar wird, aber nicht zu einem vermehrten Einbau von BSEP in die apikale Membran beiträgt. Direkte Interaktionen der PI3K-Produkte mit verschiedenen Transportproteinen wurden bereits nachgewiesen {17, 75, 232}.

Da in der vorliegenden Studie nur eine Erhöhung der Anzahl der Transporter in den Pseudocanaliculi gemessen wurde, jedoch nicht deren Aktivität, widersprechen diese Ergebnisse nicht einer Beteiligung der PI3-Kinase an der Gallensalz-induzierten Cholerease, welche möglicherweise über eine Transporteraktivierung läuft {186}. Andererseits ist auch denkbar, dass die PI3-Kinase den Einbau BSEP-haltiger subkanalikulärer Vesikel in die Membran der Gallekanälchen bewirkt, was aufgrund der geringeren Auflösung in dem hier untersuchten Modell nicht darstellbar war. Wakabayashi et al. {273} konnten jedoch darlegen, dass die PI3-Kinase bei perikanalikulären Umverteilungsmechanismen nicht beteiligt ist.

Des Weiteren kann die PI3-Kinase sowohl zur Stimulation der Proteinkinase C {258} als auch der MAP-Kinasen vom Erk-Typ {235} führen. Inwiefern dies auf die oben beschriebene Aktivierung des BSEP-Targetings durch die PKC Einfluss nimmt, ist noch nicht näher untersucht worden. Die Stimulation der Erk über eine PI3K-abhängige Ras-Aktivierung durch TUDC und Taurocholat {163} scheint demnach eher für eine direkte Erhöhung der Transportaktivität bzw. für einen vermehrten Transportereinbau aus einem subapikalen Kompartiment mit nachfolgender Cholerease verantwortlich zu sein {223}.

5.3 Stimulationseffekte von Taurocholol und Tauroolithocholol auf das BSEP-Targeting

Das Trihydroxy-Gallensalz Taurocholol (TC), das Taurin-Konjugat des wichtigen humanen Gallensalzes Cholol {11}, hat überwiegend choleretische Eigenschaften {228}. Es fördert den Einbau des ABC-Transporters MRP2 in die apikale Membran {143}, kann zur Hochregulation der BSEP-Expression führen {89} und stimuliert den Microtubuli-unabhängigen vesikulären Transport von Meerrettich-Peroxidase {113}. Im Gegensatz zu TUDC bewirkt es keine Ca^{2+} -Mobilisation {24, 34}. Taurocholol führt wie TUDC zu einer Aktivierung von Erk1/2, aber in deutlich geringerem Ausmaß {223}. Es ist unklar, ob Taurocholol zu einer Aktivierung der PKC führt {28, 252}. Es konnten allerdings auch cholestatische Effekte für Taurocholol nachgewiesen werden {145}.

In dieser Studie konnte in Ntcp-transfizierten HepG2-Zellen eine geringgradige Stimulation des BSEP-Targetings durch Taurocholol gezeigt werden. So erhöhte sich nach 6-stündiger Inkubationszeit der Anteil der BSEP-positiven Pseudocanaliculi von 15 % (unter Kontrollbedingungen) auf 20 %.

Ein ähnlicher Stimulationseffekt konnte für das Monohydroxy-Gallensalz Tauroolithocholol (TLC) dargestellt werden, das sonst durchgehend als cholestatisch beschrieben wurde. Diese cholestatische Wirkung soll unter anderem durch Aktin-Akkumulation {255} und Verlust von Microvilli am Canaliculus {135} sowie durch Hemmung von Vesikeltransport {179} bzw. -fusion {20} entstehen. Tauroolithocholol soll ferner selektiv die Ca^{2+} -unabhängige PKC-Isoform ϵ aktivieren {25}.

Aufgrund des geringen Stimulationseffekts wurde der Einfluss der beiden genannten Gallensalze auf das BSEP-Targeting hier nicht weiter untersucht.

5.4 Entleerung des BSEP-Pools im Golgi und Stimulation des BSEP-Targetings durch Cycloheximid in HepG2-Zellen

Cycloheximid sollte zur Blockierung der Proteinneusynthese eingesetzt werden, um zu untersuchen, ob das Targeting von BSEP aus intrazellulären Speichern oder aus neu synthetisiertem Protein erfolgt.

Es konnte in dieser Studie mittels Immunfärbungen gezeigt werden, dass BSEP unter Kontrollbedingungen in einem perinukleären Pool angereichert wird, der mit dem Marker GM130 als Golgi-Apparat identifiziert wurde. Unter Blockade der Proteinneusynthese durch Cycloheximid entleerten sich diese BSEP-Pools. Gleichzeitig wurde jedoch ein vermehrtes Targeting von BSEP an die kanalikuläre Membran festgestellt. Bei Cycloheximid handelt es sich also um einen Stimulator des BSEP-Targetings. Auch Wakabayashi et al. {273} fanden in WIF-B9-Zellen, die mit BSEP-exprimierenden Adenoviren infiziert worden waren, eine perinukleäre Anreicherung von BSEP, lokalisierten diese jedoch außerhalb des Golgi-Apparats.

Eine genauere Untersuchung der Wirkung von Cycloheximid anhand von Immunfärbungen in stimulierten HepG2-Zellen zeigte, dass sich sowohl in Nctp-transfizierten als auch in untransfizierten Zellen die Anzahl der BSEP-haltigen Pseudocanaliculi deutlich erhöht.

Ein solcher Stimulationseffekt wurde bislang weder in Bezug auf das Targeting von hepatozellulären Transportproteinen noch auf den Gallefluss beschrieben. Allerdings kann Cycloheximid zur Superinduktion von Proteinen {60, 177} führen und bestimmte Kinasen, so z.B. die $p38^{\text{MAPK}}$ {138, 141, 294} und die MAPK vom Erk-Typ {141, 175}, aktivieren.

In dieser Studie sollte deshalb untersucht werden, ob Cycloheximid über einen ähnlichen Signalweg auf das BSEP-Targeting einwirkt wie das Gallensalz TUDC. Es konnte gezeigt werden, dass Cycloheximid das BSEP-Targeting ähnlich wie TUDC über die Ca^{2+} -unabhängigen PKC-Isoformen, die $p38^{\text{MAPK}}$ und die Microtubuli fördert. Eine Inhibition der $p38^{\text{MAPK}}$ mit SB202190 führte bei gleichzeitiger Inkubation mit Cycloheximid nicht zu einer Entleerung des BSEP-Pools im Golgi-Apparat, wie sie unter alleiniger Inkubation mit Cycloheximid beobachtet wurde. Jedoch führte weder SB202190 als Hemmstoff der $p38^{\text{MAPK}}$ noch Gö6850 als Hemmstoff der PKC zu einer vollständigen Inhibition des BSEP-Targetings. Eine gleichzeitige Hemmung von $p38^{\text{MAPK}}$ und PKC bewirkte keine weitere Reduktion der BSEP-positiven Pseudocanaliculi. Diese Beobachtung lässt die Möglichkeit zu, dass beide Systeme in Reihe geschaltet sind.

PI3K- und Erk-Inhibitoren konnten das Cycloheximid-abhängige BSEP-Targeting nicht hemmen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Cycloheximid wie TUDC das BSEP-Targeting vom Golgi-Apparat zur kanalikulären Membran unabhängig von der Pro-

teinneusynthese auf einem PKC-, p38^{MAPK}- und Microtubuli-abhängigen Signalweg stimuliert.

5.5 Speicherung von BSEP im Golgi-Apparat in isolierten Rattenhepatozyten

Als zweites Zellmodell zur Untersuchung der Speicherung von BSEP im Golgi-Apparat wurden isolierte Rattenhepatozyten verwendet. Zunächst wurde gezeigt, dass sie funktionsfähige Gallekanälchen ausbilden. Anschließend wurden Immunfärbungen durchgeführt, bei denen - im Gegensatz zu den HepG2-Zellen - das Ratten-Bsep unter Kontrollbedingungen kaum im Golgi-Apparat vorgefunden wurde. Unter Hemmung des Bsep-Targetings durch Inhibitoren der p38^{MAPK} bzw. der Proteinkinase C ließ sich jedoch ein vermehrtes Vorkommen von Bsep im Golgi-Apparat beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass der Golgi-Apparat vor allem unter cholestatischen Bedingungen - wie sie in HepG2-Zellen vorliegen, da ihre Pseudocanaliculi keinen Galleabfluss erlauben - als Speicher für Gallensalztransporter fungiert. Als möglichen Interaktionspartner für BSEP konnte das Golgi-assoziierte Protein GRASP55 (*Golgi Reassembling Stacking Protein 55*) identifiziert werden {192}, das auch maßgeblich am selektiven Transport von Membranproteinen beteiligt ist {162}. Zaal et al. {291} haben bereits gezeigt, dass der Golgi-Apparat in HepG2-Zellen und isolierten humanen Hepatozyten über die Bildung von Microtubuli-gesteuerten Vesikeln eine wichtige Rolle bei der Formation von Gallekanälchen und bei der Gallesekretion spielt. Außerdem ist bekannt, dass der Golgi-Apparat mit den Microtubuli interagiert {136}, die als Leitstruktur für den vesikulären Transport dienen {68, 273} und - wie hier gezeigt wurde - auch für das BSEP-Targeting von Bedeutung sind. Sai et al. {218} konnten in WIF-B-Zellen nachweisen, dass der ABC-Transporter Mdr1 bei Absinken der Inkubationstemperatur auf 15° C im Golgi-Apparat gespeichert wird. Ein Targeting erfolgte erst bei Anheben der Temperatur. Dieser Transportmechanismus war jedoch stets unidirektional, das heißt, es wurde kein Rücktransport des ABC-Transporters von der Membran in den Golgi beobachtet.

Eine neuere Arbeit von Chan et al. {53} stellt dar, dass Myosin II am BSEP-Targeting beteiligt ist, indem es den Einbau von Transporter-haltigen Vesikeln in die apikale

Membran ermöglicht. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass im Immunoblot BSEP an Golgi-Vesikel von Rattenlebern gebunden wird.

Insofern kann man davon ausgehen, dass der Golgi-Komplex eine wichtige Station beim Transport von BSEP an die kanalikuläre Membran darstellt und unter bestimmten Bedingungen sogar als Speicher für Gallensalztransporter auf dem Weg zur kanalikulären Membran fungieren kann.

5.6 Kritische Wertung

HepG2-Zellen eignen sich gut als Modell für die humane Leberzelle. Sie erfüllen die meisten Hepatozyten-typischen Funktionen, jedoch in sehr verschiedenem Maße {33}. So konnte bereits von Kubitz et al. {151} gezeigt werden, dass HepG-Zellen deutlich weniger kanalikuläre Strukturen ausbilden als normale Leberzellen (ein Pseudocanaliculus pro 10 Zellkerne).

HepG2-Zellen sind primär cholestatische Leberzellen. Dies erleichtert die Untersuchung der Signaltransduktion, bringt aber möglicherweise die Schwierigkeit, die Ergebnisse auf Hepatozyten unter basalen Bedingungen zu übertragen. Der Vergleich mit isolierten Rattenhepatozyten in dieser Arbeit zeigte die Beteiligung der gleichen Signalwege, so dass die hier beschriebenen Regulationsvorgänge nicht auf die Hepatomazellen beschränkt bleiben.

Der Vorteil des HepG2-Modells ist jedoch, dass hier erstmals Signalwege in humanen Zellen verfolgt wurden, während zuvor fast ausschließlich mit der Rattenleber experimentiert wurde.

5.7 Modellvorstellung des Targetings von BSEP

Der Gallensalztransporter BSEP wird im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, dann im Golgi-Apparat modifiziert und - wie diese Studie zeigt - unter bestimmten Bedingungen wie z.B. der Cholestase auch gespeichert.

Das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) stellt die wichtigste Sortierungsstation für neu synthetisierte Proteine dar {262}. Von hier werden die Proteine - so auch BSEP - in Vesikeln an die entsprechenden Membrankompartimente transportiert. Dabei dienen

Bestandteile des Zytoskeletts, vor allem Microtubuli, als wichtige Leitstrukturen {62, 182}. In epithelialen Zellen wie den Hepatozyten unterscheidet man basolaterale von apikalen Transportprozessen. Während Proteine vom Golgi-Apparat direkt an die basolaterale Membran transportiert werden, wurde in Leberzellen für apikale Proteine lange Zeit ein indirekter Transport über die basolaterale Membran angenommen {16, 140}. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass vor allem für ABC-Transporter ein direktes Targeting zur kanalikulären Membran erfolgt {142}.

Für BSEP werden verschiedene intrazelluläre Speicher angenommen, von denen aus das Transportprotein bei Bedarf an die kanalikuläre Membran gebracht werden kann. Von Kipp und Arias {143} wurden in der Rattenleber zwei verschiedene Pools nachgewiesen: ein cAMP- und ein Taurocholat-abhängiger Pool (Abb. 4, Seite 16). Der cAMP-Pool wird durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) mobilisiert und könnte aus Recycling-Endosomen bestehen. BSEP erreicht diesen Pool direkt aus dem Trans-Golgi-Network (TGN). Von hier aus kann BSEP bei Bedarf in die kanalikuläre Membran gelangen und wahrscheinlich auch in den Taurocholat-Pool (TC-Pool). Der TC-Pool wird durch Taurocholat (TC) aktiviert. BSEP gelangt in diesen Pool nicht direkt aus dem TGN, sondern über den cAMP-Pool oder über Endozytose aus der kanalikulären Membran.

In einer weiteren Arbeit konnten Arias und Wakabayashi {273} zeigen, dass es in WIF-B9-Zellen drei mögliche Speicher für BSEP gibt: perinukleäre globuläre Strukturen, die nicht dem Golgi-Apparat entsprechen, tubulo-vesikuläre Bereiche und die kanalikuläre Region. Zwischen allen drei Pools erfolgten Umverteilungen, jedoch ohne Beeinflussbarkeit von Taurocholat oder cAMP. In der vorliegenden Arbeit wurde der Golgi-Apparat in HepG2- und isolierten Rattenleberzellen unter cholestatischen Bedingungen als BSEP-Speicher gesehen. Es wurden bereits mögliche Interaktionspartner für BSEP an den Golgi-Membranen gefunden {192}. Die bisherigen Daten verschaffen jedoch keine umfassende Klarheit darüber, wann diese Speichermöglichkeit benutzt und von welchen Kinasen sie gesteuert wird.

Die vorliegende Studie beschreibt, dass in humanen HepG2-Zellen die MAP-Kinase vom p38-Typ ($p38^{\text{MAPK}}$), die Ca^{2+} -unabhängigen Proteinkinase-C-Isoformen (nPKC) sowie die Microtubuli für das Targeting von BSEP zur kanalikulären Membran unter Einfluss des Gallensalzes Tauroursodeoxycholat bzw. des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid verantwortlich sind. Die Beteiligung der $p38^{\text{MAPK}}$ {164}, der Proteinkinase C (PKC) {41, 55, 151, 152, 283} und des mikrotubulären Systems {38, 110, 150}

am Transporter-Targeting bzw. Galleefflux wurde bereits in der Literatur beschrieben. Umstritten ist jedoch, welche PKC-Isoformen die TUDC-induzierte Choleresese bewirken. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für die Ca^{2+} -unabhängigen Isoformen, die sogenannten nPKC, zu denen u.a. die PKC- ϵ gehört. Die Ca^{2+} -abhängige PKC- α scheint dagegen eher das BSEP-Targeting zu hemmen, z.B. indem für das Vesikel-Andocken wichtige Aktin-Brücken zwischen Microtubuli und Zellmembran gespalten werden {29, 152, 215, 292}.

Ob die PKC und die p38^{MAPK} bei der Regulation des Targetings hintereinander oder parallel geschaltet sind, bleibt unklar. In dieser Studie konnte die gleichzeitige Inhibition beider Kinasen keinen additiven Effekt bezüglich des BSEP-Targetings zur apikalen Membran zeigen. Andere Studien legen nahe, dass die PKC unabhängig von den MAP-Kinasen arbeitet {283} und dass es verschiedene parallele Transportwege vom TGN zur Zellmembran gibt, die unabhängig voneinander moduliert werden können {140}.

Eine Beteiligung der MAP-Kinase vom Erk-Typ sowie der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) am BSEP-Targeting konnte in dieser Studie nicht dargestellt werden. Es liegt nahe zu spekulieren, dass diese beiden Kinasen eher kanalikuläre Einbauvorgänge oder die Transporteraktivität durch direkte Modifikation regulieren und nicht das Targeting. Außerdem ist bekannt, dass die PI3-Kinase unter Stimulation mit TUDC das GTP-bindende Protein Ras aktiviert {163}, das in der Signalkaskade oberhalb der Erk-Typ-MAP-Kinasen liegt {223, 235}. Es könnte sich also hierbei um einen alternativen Signalweg für die Stimulation der Choleresese handeln. Verbindungen der beiden Wege scheinen über die PKC zu laufen, die sowohl von der PI3-Kinase stimuliert werden kann {258} als auch die Gallensalzpumpe BSEP durch kovalente Modifikation aktivieren kann {202}.

Die Gallesekretion wird demnach sowohl über ein Targeting aus dem Golgi-Apparat als auch über einen Transportereinbau aus subapikalen Kompartimenten sowie über kovalente Proteinmodifikation gesteuert. Kubitz et al. {152} konnten darstellen, dass in der Rattenleber selbst unter kompletter Cholestase Reste von Bsep in den Canaliculi verblieben, so dass hier eine direkter Steuerung der Transporter angenommen werden muss.

Erstaunlich ist jedoch die Tatsache, dass unter Cycloheximid-Einfluss der Anteil von BSEP im Golgi-Apparat deutlich reduziert wird, in den Pseudocanaliculi der HepG2-Zellen aber die Menge der Transporter nicht in gleichem Ausmaß ansteigt. Dies ließe

sich am ehesten dadurch erklären, dass zwar eine PKC- und p38^{MAPK}-abhängige Stimulation des Transports vom TGN in Richtung Zellmembran erfolgt, in HepG2-Zellen als primär cholestatischem Zellmodell jedoch vermehrt der Abbau des Transporters in den Lysosomen initiiert wird. Dabei können möglicherweise Endosomen als Schaltstelle dienen.

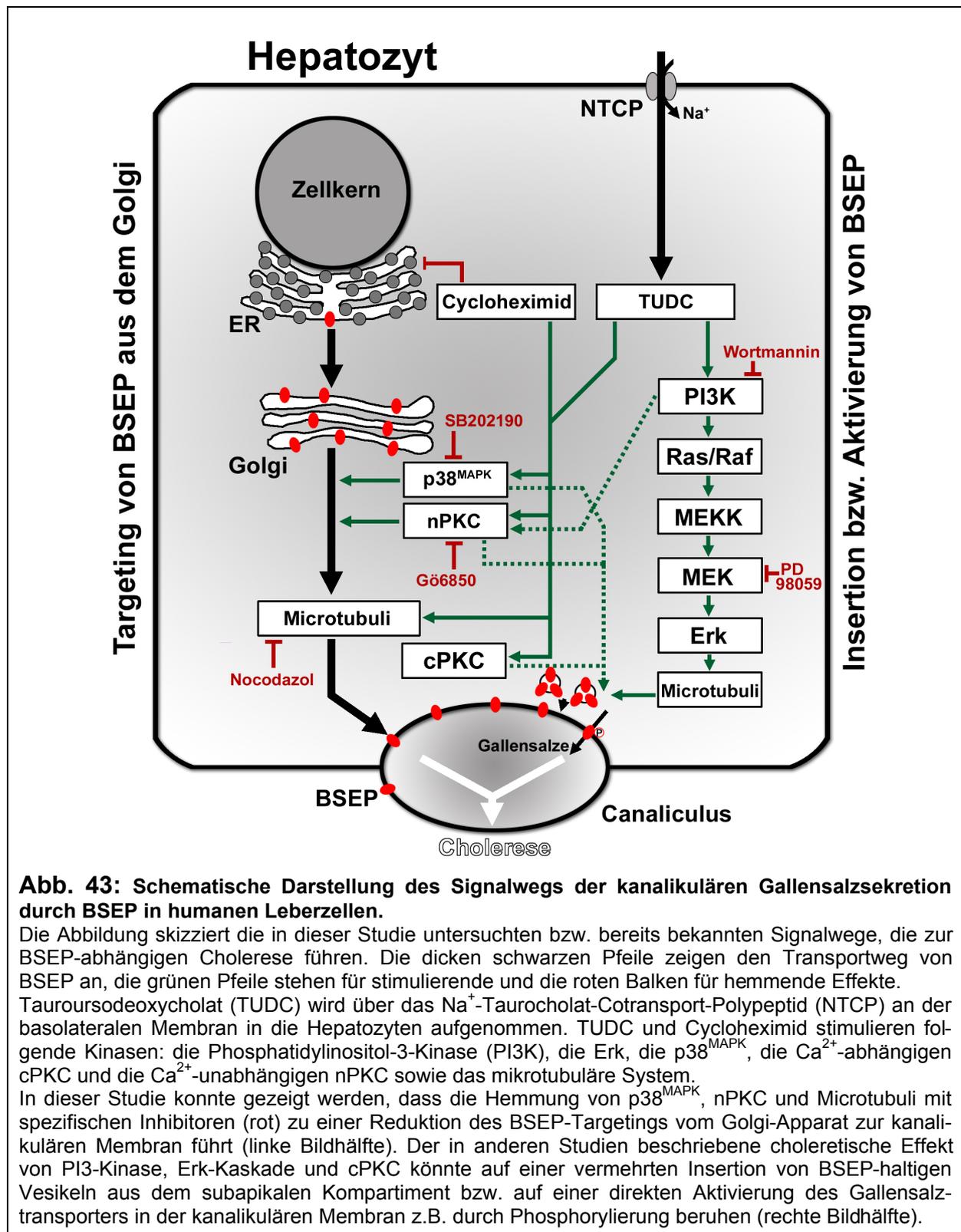


Abb. 43: Schematische Darstellung des Signalwegs der kanalikulären Gallensalzsekretion durch BSEP in humanen Leberzellen.

Die Abbildung skizziert die in dieser Studie untersuchten bzw. bereits bekannten Signalwege, die zur BSEP-abhängigen Cholerease führen. Die dicken schwarzen Pfeile zeigen den Transportweg von BSEP an, die grünen Pfeile stehen für stimulierende und die roten Balken für hemmende Effekte.

Tauroursodeoxycholat (TUDC) wird über das Na⁺-Taurocholat-Cotransport-Polypeptid (NTCP) an der basolateralen Membran in die Hepatozyten aufgenommen. TUDC und Cycloheximid stimulieren folgende Kinasen: die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die Erk, die p38^{MAPK}, die Ca²⁺-abhängigen cPKC und die Ca²⁺-unabhängigen nPKC sowie das mikrotubuläre System.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von p38^{MAPK}, nPKC und Microtubuli mit spezifischen Inhibitoren (rot) zu einer Reduktion des BSEP-Targetings vom Golgi-Apparat zur kanalikulären Membran führt (linke Bildhälfte). Der in anderen Studien beschriebene cholereetische Effekt von PI3-Kinase, Erk-Kaskade und cPKC könnte auf einer vermehrten Insertion von BSEP-haltigen Vesikeln aus dem subapikalen Kompartiment bzw. auf einer direkten Aktivierung des Gallensalztransporters in der kanalikulären Membran z.B. durch Phosphorylierung beruhen (rechte Bildhälfte).

6. Zusammenfassung

Die Produktion von Galle und deren Sekretion in die Gallekanälchen sind wichtige Funktionen der Leber. Eine Störung dieses komplexen Prozesses führt zur Cholestase, d.h. zur Abnahme des kanalikulären Galleflusses, und damit zum Anstau von toxischen Stoffwechselprodukten im Organismus.

An der Gallesekretion in der Leber sind verschiedene Transportproteine beteiligt, die Substrate zum einen aus dem sinusoidalen Blut aufnehmen und zum anderen an der kanalikulären Membran in die Gallenwege sezernieren.

Der wichtigste kanalikuläre Gallensalztransporter ist die *Bile Salt Export Pump* (BSEP). Ihre Regulationsmechanismen wurden bislang vorwiegend im Rattenlebermodell untersucht.

In dieser Studie wurde die Expression und Lokalisation dieses Transportproteins in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 dargestellt. Es wurde beobachtet, dass sich BSEP in den Pseudocanaliculi und dem Golgi-Apparat anreichert. Der BSEP-Pool im Golgi entleerte sich unter Stimulation des BSEP-Targeting zur kanalikulären Membran durch den Proteinsynthesehemmer Cycloheximid.

Ferner wurde gezeigt, dass Cycloheximid und das Gallensalz Tauroursodeoxycholat (TUDC) das Targeting von BSEP aktivieren. Dies geschah in Abhängigkeit von der MAP-Kinase vom p38-Typ (p38^{MAPK}), den Ca²⁺-unabhängigen PKC-Isoformen sowie dem mikrotubulären System. Die Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoformen, die Erk-Kaskade sowie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) scheinen dagegen das BSEP-Targeting nicht zu fördern.

In isolierten Rattenhepatozyten als zweitem Zellmodell konnte Bsep unter Ruhebedingungen nur vereinzelt im Golgi-Apparat beobachtet werden. Unter Hemmung des Bsep-Targetings durch die p38^{MAPK} bzw. die PKC reicherte sich Bsep jedoch vermehrt im Golgi an.

Der Golgi-Apparat scheint also ein wichtiger Speicher-Pool für BSEP zu sein, vor allem unter cholestatischen Bedingungen, wie sie in HepG2-Zellen vorherrschen.

Mit therapeutisch einsetzbaren Gallensalzen wie TUDC können Gallensalztransporter aus intrazellulären Pools rekrutiert und an die kanalikuläre Membran transportiert werden. Dies stellt einen wichtigen Therapiemechanismus bei Cholestase dar.

7. Abkürzungen

ABC-Transporter	ATP-Binding-Cassette-Transporter
ATP	Adenosintrisphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BSEP	<i>Bile Salt Export Pump</i> (kanalikulärer Gallensalztransporter)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CEF	Kombinierte endosomale Fraktion
CLF	Cholyllysylfluorescein
CMFDA	Chloromethylfluorescein-Diacetat
CMV	Kanalikuläre Membranvesikel
CY3 / CY5	Cyanin 3 / 5
DAG	Diacylglycerin
DC	Deoxycholat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP IV	Dipeptidyl-Peptidase IV
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescence Protein</i>
Erk	Extrazellulär regulierte Kinase
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FXR	Farnesoid-X-aktivierter Rezeptor
GM130	Golgi-Protein 130 kDa
GRASP55	<i>Golgi Reassambling Stacking Protein 55</i>
H	Kruskal-Wallis-Prüfgröße (H-Test)
HepG2	Humane Hepatomazelllinie
IC ₅₀	50%ige Hemmkonzentration
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-abhängige Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
MEK	MAPK/Erk-Kinase
MDR	<i>Multidrug Resistance Protein</i>
µM	µmol/l
MRP2	<i>Multidrug Resistance Associated Protein 2</i>
MW	Mittelwert
NTCP	Natrium-Taurocholat-Cotransport-Polypeptid
OATP	Organische Anionen transportierendes Polypeptid
P	Signifikanzwert eines statistischen Tests
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PDK-1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PFIC-2	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2
PI	Phosphatidylinositol

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
p38 ^{MAPK}	Mitogen-abhängige Proteinkinase vom p38-Typ
RACK	Rezeptor für aktivierte C-Kinase (PKC)
RICK	Rezeptor für inaktivierte C-Kinase (PKC)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SAC	Subapikales Kompartiment
SD	Standardabweichung
SPGP	<i>Sister of P-Glycoprotein</i> (= BSEP)
TC	Taurochololat
TCDC	Taurochenodeoxychololat
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TLC	Taurolithochololat
TUDC	Tauroursodeoxychololat
UDC	Ursodeoxychololat
upm	Umdrehungen pro Minute

8. Literaturverzeichnis

1. Ajizian, S. J., English, B. K., und Meals, E. A.: Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect.Dis.* 1999; 179(4): 939-944.
2. Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., und Saltiel, A. R.: PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* 1995; 270: 27489-27494.
3. Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., und Cohen, P.: Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr Biol* 1997; 7(4): 261-269.
4. Alvarez, E., Northwood, I. C., Gonzalez, F. A., Latour, D. A., Seth, A., Abate, C., Curran, T., und Davis, R. J.: Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation, characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *J.Biol.Chem.* 1991; 266: 15277-15285.
5. Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D. J., und Suchy, F. J.: Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid x receptor / bile acid receptor. *J Biol.Chem.* 2001; 276(31): 28857-28865.
6. Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K., und Sturgill, T. W.: Requirement of integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 1990; 343(6259): 651-653.
7. Anwer, M. S., Engelking, L. R., Nolan, K., Sullivan, D., Zimniak, P., und Lester, R.: Hepatotoxic bile acids increase cytosolic Calcium activity of isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1988; 8: 887-891.
8. Arcaro, A. und Wymann, M. P.: Wortmannin is a potent phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor: The role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in neutrophil response. *Biochem J* 1993; 296: 297-301.
9. Aszalos, A., Pine, P. S., Weaver, J. L., und Rao, P. E.: Cytochalasin D modulates CD4 cross-linking sensitive mitogenic signal in T lymphocytes. *Cell Immunol.* 1994; 157(1): 81-91.
10. Auger, K. R., Serunian, L. A., Soltoff, S. P., Libby, P., und Cantley, L. C.: PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* 1989; 57: 167-175.
11. Axelson, M., Mörk, B., und Everson, G. T.: Bile acid synthesis in cultured human hepatoblastoma cells. *J Biol.Chem.* 1991; 27: 17770-17777.
12. Bacallao, R., Antony, C., Dotti, C., Karsenti, E., Stelzer, E. H. K., und Simons, K.: The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J.Cell Biol.* 1989; 109: 2817-2832.
13. Ballatori, N., Rebbeor, J. F., Connolly, G. C., Seward, D. J., Lenth, B. E., Henson, J. H., Sundaram, P., und Boyer, J. L.: Bile salt excretion in skate liver is emdiated by a functional analog of Bsep/Spgp, the bile salt export pump. *Gastrointestinal and Liver Physiology* 2000; 278(1): G57-G63.
14. Bankaitis, V. A., Aitken, J. R., Cleves, A. E., und Dowhan, W.: An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* 1990; 347(6293): 561-562.
15. Barr, V. A. und Hubbard, A. L.: Newly synthesized hepatocyte plasma membrane proteins are transported in transcytotic vesicles in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology* 1993; 105(2): 554-571.
16. Bartles, J. R., Feracci, H. M., Stieger, B., und Hubbard, A. L.: Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J.Cell Biol.* 1987; 105(3): 1241-1251.

17. Baukrowitz, T., Schulte, U., Oliver, D., Herlitz, S., Krauter, T., Tucker, S. J., Ruppertsberg, J. P., und Fakler, B.: PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science* 1998; 282(5391): 1141-1144.
18. Benedetti, A., Strazzabosco, M., Ng, O. C., und Boyer, J. L.: Regulation of activity and apical targeting of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in rat hepatocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994; 91: 792-796.
19. Benz, C., Angermuller, S., und Tox, U.: Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *J Hepatol.* 1998; 28: 99-106.
20. Beuers, U., Bilzer, M., Chittattu, A., Kullak-Ublick, G. A., Keppler, D., und Paumgartner, G.: Inhibition of bile flow, hepatobiliary exocytosis, and mrp2-insertion into the canalicular membrane by tauroolithocholic acid is reversed by tauroursodeoxycholic acid in the perfused rat liver. *Hepatology* 1999; 30: 463A.
21. Beuers, U., Bilzer, M., Chittattu, A., Kullak-Ublick, G. A., Keppler, D., Paumgartner, G., und Dombrowski, F.: Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 2001; 33(5): 1206-1216.
22. Beuers, U., Boyer, J. L., und Paumgartner, G.: Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications. *Hepatology* 1998; 28: 1449-1453.
23. Beuers, U., Nathanson, M. H., und Boyer, J. L.: Effects of tauroursodeoxycholic acid on cytosolic calcium signals in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1993; 104: 604-612.
24. Beuers, U., Nathanson, M. H., Isales, C. M., und Boyer, J. L.: Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular calcium, mechanisms defective in cholestasis. *J Clin Invest* 1993; 92: 2984-2993.
25. Beuers, U., Probst, I., Soroka, C., Boyer, J. L., Kullak-Ublick, G. A., und Paumgartner, G.: Modulation of protein kinase C by tauroolithocholic acid in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1999; 29(2): 477-482.
26. Beuers, U., Spengler, U., Kruis, W., Aydemir, U., Wiebecke, B., Heldwein, W., und Weinzierl, M.: Ursodeoxycholic acid for treatment of primary sclerosing cholangitis: a placebo-controlled trial. *Hepatology* 1992; 16: 707-714.
27. Beuers, U., Throckmorton, D. C., Anderson, M. H., Isales, C. M., und Boyer, J. L.: Tauroursodeoxycholic acid induces translocation of α-, but not δ-, ε- and ζ-protein kinases C in rat hepatocytes. *Hepatology* 1993; 18: 135A.
28. Beuers, U., Throckmorton, D. C., Anderson, M. S., Isales, C. M., Thasler, W., Kullak-Ublick, G. A., Sauter, G., Koebe, H. G., Paumgartner, G., und Boyer, J. L.: Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1996; 110(5): 1553-1563.
29. Bi, G. Q., Morris, R. L., Alderton, J. M., Scholey, J. M., und Steinhardt, R. A.: Kinesin- and myosin-driven steps of vesicle recruitment for Ca²⁺-regulated exocytosis. *J.Cell Biol.* 1997; 138: 999-1008.
30. Bolder, U., Ton-Nu, H. T., Schteingart, C. D., Frick, E., und Hofmann, A. F.: Hepatocyte transport of bile acids and organic anions in endotoxemic rats: impaired uptake and secretion. *Gastroenterology* 1997; 112(1): 214-235.
31. Bossard, R., Stieger, B., O'Neill, B., Fricker, G., und Meier, P. J.: Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *J Clin Invest* 1993; 91: 2714-2720.
32. Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ny, I., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., Depinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H., und Yancopoulos, G. D.: ERKS: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65: 663-675.
33. Bouma, M. E., Rogier, E., Verthier, N., Labarre, C., und Feldmann, G.: Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; 25(3 Pt 1): 267-275.

34. Bouscarel, B., Fromm, H., und Nussbaum, R.: Ursodeoxycholate mobilizes intracellular calcium and activates phosphorylase a in isolated hepatocytes. *Am.J Physiol* 1993; 264: G243-G251.
35. Bouscarel, B., Gettys, T. W., Fromm, H., und Dubner, H.: Ursodeoxycholic acid inhibits glucagon-induced cAMP formation in hamster hepatocytes: a role of PKC. *Am.J Physiol* 1995; 268: G300-G310.
36. Bouscarel, B., Kroll, S. D., und Fromm, H.: Signal transduction and hepatocellular bile acid transport: cross talk between bile acids and second messengers. *Gastroenterology* 1999; 117(2): 433-452.
37. Boyer, J. L., Hagenbuch, B., Ananthanarayanan, M., Suchy, F. J., Stieger, B., und Meier, P. J.: Phylogenetic and ontogenic expression of hepatocellular bile acid transport. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 1993; 90: 435-438.
38. Boyer, J. L. und Soroka, C.: Vesicle targeting to the apical domain regulates bile excretory function in isolated rat hepatocyte couplets. *Gastroenterology* 1995; 109(5): 1600-1611.
39. Breitfeld, P. P., McKinnon, W. C., und Mostov, K. E.: Effect of nocodazole on vesicular traffic to the apical and basolateral surfaces of polarized MDCK cells. *J.Cell Biol.* 1990; 111: 2365-2373.
40. Bruck, R., Haddad, P., Graf, J., und Boyer, J. L.: Regulatory volume decrease stimulates bile flow, bile acid excretion, and exocytosis in isolated perfused rat liver. *Am.J.Physiol* 1992; 262(5 Pt 1): G806-G812.
41. Bruck, R., Nathanson, M. H., Roelofsen, H., und Boyer, J. L.: Effects of protein kinase C and cytosolic Ca²⁺ on exocytosis in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1994; 20(4 Pt 1): 1032-1040.
42. Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., und Zerial, M.: The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 1992; 70(5): 715-728.
43. Büchler, M., König, J., Brom, M., Kartenbeck, J., Spring, H., Horie, T., und Keppler, D.: cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol.Chem.* 1996; 271(25): 15091-15098.
44. Büning, H. und Trenkler, G.: Nichtparametrische statistische Methoden. 1994; Walter de Gruyter & Co., Berlin, 2.: 184-190.
45. Byrkit, D. R.: Statistics today - a comprehensive introduction. 1987; The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA: 626-627.
46. Byrne, J. A., Strautnieks, S. S., Higgins, C. F., Linton, K. J., und Thompson, R. J.: Function of BSEP. *Falk Symposium 129 - Bile Acids: From genomics to disease and therapy* 2003; 99-103.
47. Byrne, J. A., Strautnieks, S. S., Mieli-Vergani, G., Higgins, C. F., Linton, K. J., und Thompson, R. J.: The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 2002; 123(5): 1649-1658.
48. Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H., und Goldsmith, E. J.: Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 1997; 90: 859-869.
49. Cantz, T., Nies, A. T., Brom, M., Hofmann, A. F., und Keppler, D.: MRP2, a human conjugate export pump, is present and transports fluo 3 into apical vacuoles of Hep G2 cells. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2000; 278(4): G522-G531.
50. Carubbi, F., Guicciardi, M. E., Concari, M., Loria, P., Bertolotti, M., und Carulli, N.: Comparative cytotoxic and cytoprotective effects of taurohyodeoxycholic acid (THDCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) in HepG2 cell line. *Biochim.Biophys.Acta* 2002; 1580(1): 31-39.
51. Carulli, N., Bertolotti, M., Carubbi, F., Concari, M., Martella, P., Carulli, L., und Loria, P.: Effect of bile salt pool composition on hepatic and biliary functions. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14(Suppl. 2): 14-18.
52. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., und Nishizuka, Y.: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumour-promoting phorbol esters. *J.Biol.Chem.* 1982; 257(13): 7847-7851.
53. Chan, W., Calderon, G., Swift, A. L., Moseley, J., Li, S., Hosoya, H., Arias, I. M., und Ortiz, D. M.: Myosin II regulatory light chain is required for trafficking of Bile Salt Export Protein to the

- apical membrane in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J.Biol.Chem.* 2005; 280(25): 23741-23747.
54. Chandra, P., Zhang, P., und Brouwer, K. L. R.: Short-term regulation of Multidrug Resistance-Associated Protein 3 (Mrp3/MRP3) in rat and human hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288(6): G1252-G1258.
 55. Chen, Y., Duvvuri, V., Schulman, H., und Scheller, R. H.: Calmodulin and protein kinase C increase Ca(2+)-stimulated secretion by modulating membrane-attached exocytic machinery. *J Biol.Chem.* 1999; 274: 26469-26476.
 56. Childs, S., Yeh, R. L., Georges, E., und Ling, V.: Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer Res.* 1995; 15(55(10)): 2029-2034.
 57. Childs, S., Yeh, R. L., Hui, D., und Ling, V.: Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer Res.* 1998; 58(18): 4160-4167.
 58. Chiu, J. H., Hu, C. P., Lo, S. C., und Chang, C. M.: The formation of bile canaliculi in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 1990; 11(5): 834-842.
 59. Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S., und Toker, A.: Regulation of protein kinase C α by PI 3-kinase and PDK-1. *Current Biology* 1998; 8: 1069-1077.
 60. Cochran, B. H., Zullo, J., Verma, I. M., und Stiles, C. D.: Expression of the c-fos gene and of an fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science* 1984; 226(4678): 1080-1082.
 61. Colbeau, A., Nachbaur, J., und Vignais, P. M.: Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim.Biophys.Acta* 1971; 249: 462-492.
 62. Cole, N. B. und Lippincott-Schwartz, J.: Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1995; 7: 55-64.
 63. Cooper, A. D., Craig, W. Y., Taniguchi, T., und Everson, G. T.: Characteristics and regulation of bile salt synthesis and secretion by human hepatoma HepG2 cells. *Hepatology* 1994; 20(6): 1522-1531.
 64. Cooper, J. A. und Hunter, T.: Identification and characterization of cellular targets for tyrosine protein kinases. *J.Biol.Chem.* 1983; 258: 1108-1115.
 65. Corasanti, J. G., Smith, N. D., Gordon, E. R., und Boyer, J. L.: Protein kinase C agonists inhibit bile secretion independently of effects on the microcirculation in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1989; 10(1): 8-13.
 66. Cotting, J., Lentze, M., und Reichen, J.: Effects of ursodeoxycholic acid treatment on nutrition and liver function in patients with cystic fibrosis and longstanding cholestasis. *Gut* 1990; 31: 918-921.
 67. Crawford, J. M.: Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion. *Semin.Liver Dis.* 1996; 16: 169-189.
 68. Crawford, J. M., Berken, C. A., und Gollan, J. L.: Role of the hepatocyte microtubular system in the excretion of bile salts and biliary lipid: implications for intracellular vesicular transport. *J Lipid Res.* 1988; 29: 144-156.
 69. Crawford, J. M., Strahs, D. C. J., Crawford, A. R., und Barnes, S.: Role of bile salt hydrophobicity in hepatic microtubule-dependent bile salt secretion. *J Lipid Res.* 1994; 35: 1738-1748.
 70. Crews, C. M. und Erikson, R. L.: Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell* 1993; 74: 215-217.
 71. Crocenzi, F. A., Mottino, A. D., Cao, J., Veggi, L. M., Pozzi, E. J. S., Vore, M., Coleman, R., und Roma, M. G.: Estradiol-17 β -D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G449-G459.
 72. Daniel, WW: *Applied nonparametric statistics.* 1978; Houghton Mifflin Company, Boston: 195-222.
 73. Davis, R. J.: The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol.Chem.* 1993; 268: 14553-14556.

74. De Camilli, P., Emr, S. D., McPherson, P. S., und Novick, P.: Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* 1996; 271: 1533-1539.
75. Doige, C. A., Yu, X., und Sharom, F. J.: The effects of lipids and detergents on ATPase-active P-glycoprotein. *Biochim.Biophys.Acta* 1993; 1146(1): 65-72.
76. Drubin, D. G. und Nelson, W. J.: Origins of cell polarity. *Cell* 1996; 84: 335-344.
77. Ducher, L., Croquet, F., Gil, S., Davy, J., Feger, J., und Brehier, A.: Differential expression of five protein kinase C isoenzymes in FAO and HepG2 hepatoma cell lines compared with normal rat hepatocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995; 217(2): 546-553.
78. Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J., und Saltiel, A. R.: A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995; 92: 7686-7689.
79. Dunn, OJ: Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 1964; 6: 241-252.
80. Duronio, V., Huber, B. E., und Jacobs, S.: Partial down-regulation of protein kinase C reverses the growth inhibitory effect of phorbol esters on HepG2 cells. *J.Cell Physiol* 1990; 145(2): 381-389.
81. Dutil, E. M., Toker, A., und Newton, A. C.: Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositid-dependent kinase 1 (PDK-1). *Current Biology* 1998; 8: 1366-1375.
82. Eilers, U., Klumpermann, J., und Hauri, H. P.: Nocodazole, a microtubule-active drug, interferes with apical protein delivery in cultured intestinal epithelial cells (Caco-2). *J.Cell Biol.* 1989; 108: 13-22.
83. Einarsson, C., Ellis, E., Abrahamsson, A., Ericzon, B. G., Bjorkhem, I., und Axelson, M.: Bile acid formation in primary human hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2000; 6(4): 522-525.
84. Everson, G. T. und Polokoff, M. A.: HepG2. A human hepatoblastoma cell line exhibiting defects in bile acid synthesis and conjugation. *J Biol.Chem.* 1986; 261(5): 2197-2201.
85. Exton, J. H.: Role of phosphoinositides in the regulation of liver function. *Hepatology* 1988; 8(1): 152-166.
86. Faber, K. N., Mol, O., Plass, J. R. M., Heegsma, J., Geuken, M., Müller, M., und Jansen, P. L.: Effect of progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC-2) mutations on functioning of the bile salt export pump. *Falk Symposium 129 - Bile Acids: From genomics to disease and therapy* 2003; 128-132.
87. Fath, K. H. und Burgess, D. R.: Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmatic oriented peripheral membrane protein. *J.Cell Biol.* 1993; 120: 117-127.
88. Felicetti, L., Colombo, B., und Baglioni, C.: Inhibition of protein synthesis in reticulocytes by antibiotics. II. The site of action of cycloheximide, streptovitacin A and pactamycin. *Biochim.Biophys.Acta* 1966; 119(1): 120-129.
89. Fickert, P., Zollner, G., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Pojer, C., Zenz, R., und Lammert, F.: Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver. *Gastroenterology* 2001; 121: 170-183.
90. Fisher, M. M. und Paradine, M. E.: Influence of ursodeoxycholic acid on biochemical parameters in cholestatic liver disease. *Gastroenterology* 1986; 90: 1725 (abstract).
91. Fitzer, C. J., O'Brian, C. A., Guillem, J. G., und Weinstein, I. B.: The regulation of protein kinase C by chenodeoxycholate, deoxycholate and several structurally related bile acids. *Carcinogenesis* 1987; 8: 217-220.
92. Fukunaga, R. und Hunter, T.: MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J* 1997; 16(8): 1921-1933.
93. Funk, C., Ponelle, C., Scheuermann, G., und Pantze, M.: Cholestatic potential of Troglitazone as a possible factor contributing to Troglitazone-induced hepatotoxicity: in vivo and in vitro interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in rat. *Mol.Pharmacol.* 2000; 59(3): 627-635.
94. Galcheva-Gargova, Z., Derijard, B., Wu, I. H., und Davis, R. J.: An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* 1994; 265: 806-808.

95. Galle, P. R., Theilmann, L., Raedsch, R., Otto, G., und Stiehl, A.: Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology* 1990; 12: 486-491.
96. Gatmaitan, Z. C., Nies, A. T., und Arias, I. M.: Regulation and translocation of ATP-dependent apical membrane proteins in rat liver. *Am.J.Physiol* 1997; 272(5 Pt 1): G1041-G1049.
97. Gavrilkina, M., Hagey, L. R., und Hofmann, A. F.: Determinants of biliary bile acid composition in mammals: influence of age and gender. *Falk Symposium 108 - Bile Acids and Cholestasis* 1998; 29-41.
98. Gekeler, V., Boer, R., Uberall, F., Ise, W., Schubert, C., Utz, I., Hofmann, J., Sanders, K. H., Schachtele, C., Klemm, K., und Grunicke, H.: Effects of the selective bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitor GF 109203X on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Br.J.Cancer* 1996; 74(6): 897-905.
99. Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A. F., und Meier, P. J.: The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol.Chem.* 1998; 273(16): 10046-10050.
100. Gibbons, G. F., Khurana, R., Odwell, A., und Seelaender, M. C.: Lipid balance in HepG2 cells: active synthesis and impaired mobilization. *J Lipid Res.* 1994; 35(10): 1801-1808.
101. Gibson, A., Futter, C. E., Maxwell, S., Allchin, E. H., Shipman, M., Kraehenbuhl, J. P., Domingo, D., Odorizzi, G., Trowbridge, I. S., und Hopkins, C. R.: Sorting mechanisms regulating membrane protein traffic in the apical transcytotic pathway of polarized MDCK cells. *J.Cell Biol.* 1998; 143: 81-94.
102. Green, R. M., Hoda, F., und Ward, K. L.: Molecular cloning and characterization of the murine bile salt export pump. *Gene* 2000; 241: 117-123.
103. Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Derijard, B., und Davis, R. J.: Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 1996; 15: 2760-2770.
104. Hagenbuch, B., Stieger, B., Foguet, M., Luebbert, H., und Meier, P. J.: Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A* 1991; 88: 10629-10633.
105. Hallbrucker, C., Lang, F., Gerok, W., und Häussinger, D.: Cell swelling increases bile flow and taurocholate excretion into bile in isolated perfused rat liver. *Biochem.J.* 1992; 281 (Pt 3): 593-595.
106. Häussinger, D., Graf, D., Reinehr, R. M., Kurz, A. K., Saha, N., Wettstein, M., Schliess, F., vom Dahl, S., und Kubitz, R.: Short-term regulation of bile secretion. *Falk Symposium 129 - Bile Acids: From genomics to disease and therapy* 2003; 133-137.
107. Häussinger, D., Graf, D., und Weiergraber, O.: Glutamine and cell signaling in liver. *J Nutr* 2001; 131: 2509S-2514S.
108. Häussinger, D., Hallbrucker, C., Saha, N., Lang, F., und Gerok, W.: Cell volume and bile acid excretion. *Biochem J* 1992; 288 (Pt 2): 681-689.
109. Häussinger, D., Kubitz, R., Reinehr, R. M., Bode, J. G., und Schliess, F.: Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *JMAM* 2004; 25(3): 221-360.
110. Häussinger, D., Saha, N., Hallbrucker, C., Lang, F., und Gerok, W.: Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver. *Biochem.J.* 1993; 291 (Pt 2): 355-360.
111. Häussinger, D., Schliess, F., Dombrowski, F., und vom Dahl, S.: Involvement of p38MAPK in the regulation of proteolysis by liver cell hydration. *Gastroenterology* 1999; 116(4): 921-935.
112. Hayakawa, T., Bruck, R., Ng, O. C., und Boyer, J. L.: DBcAMP stimulates vesicle transport and HRP excretion in isolated perfused rat liver. *Am.J Physiol* 1990; 259: G727-G735.
113. Hayakawa, T., Ng, O. C., Ma, A., Boyer, J. L., und Cheng, O.: Taurocholate stimulates transcytotic vesicular pathways labeled by horseradish peroxidase in the isolated perfused rat liver. *Gastroenterology* 1990; 99(1): 216-228.
114. Heuman, D. M., Mills, A., MacCall, J., Hylemon, P. B., Pandak, W. M., und Vlahcevic, Z.: Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts. *Gastroenterology* 1991; 100: 203-211.

115. Heuman, D. M., Pandak, W. M., Hylemon, P. B., und Vlahcevic, Z.: Conjugates of ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts: in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Hepatology* 1993; 14: 920-926.
116. Heumann, D. M., Bajaj, R. S., und Lin, Q.: Adsorption of mixtures of bile salt taurin conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salt toxicity and cytoprotection. *Lipid Res.* 1996; 37: 562-573.
117. Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., und Sasaki, Y.: Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 1984; 23(21): 5036-5041.
118. Higgins, C. F.: ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu .Rev.Cell Biol.* 1992; 8: 67-113.
119. Hipfner, D. R., Gao, M., Scheffer, G., Scheper, R. J., Deeley, R. G., und Cole, S. P.: Epitope mapping of monoclonal antibodies specific for the 190-kDa multidrug resistance protein (MRP). *Br.J.Cancer* 1998; 78(9): 1134-1140.
120. Hirano, F., Tanaka, H., Makino, Y., Okamoto, K., Inaba, M., Miura, T., und Makino, I.: Regulation of the major histocompatibility complex class I mRNA expression by bile acids in cultured human hepatoma cells. *Biochem Biophys.Res.Comm.* 1995; 208(3): 935-942.
121. Hofmann, A. F.: Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids. *Hepatology* 1984; 4 (suppl.): 4S-14S.
122. Hofmann, A. F.: Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug. *Scand J Gastroenterol* 1994; 204 (suppl): 1-15.
123. Hoshino, M., Ohiwa, T., Hayakawa, T., Kamiya, Y., Tanaka, A., Hirano, A., Kumai, T., Katagiri, K., Miyaji, M., und Takeuchi, T.: Effects of dibutyryl cyclic AMP and papaverine on intrahepatic bile acid transport: role of vesicular transport. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 833-838.
124. House, C. und Kemp, B. E.: Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in tis regulatory domain. *Science* 1987; 238(4834): 1726-1728.
125. Huang, X. P., Fan, X. T., Desjeux, J. F., und Castagna, M.: Bile acids, non-phorbol-ester-type tumor promoters, stimulate the phosphorylation of protein kinase C substrates in human platelets and colon cell line HT29. *Int J Cancer* 1992; 52: 444-450.
126. Hubbard, A. L., Stieger, B., und Bartles, J. R.: Biogenesis of endogenous plasma membrane proteins in epithelial cells. *Annu.Rev.Physiol* 1989; 51: 755-770.
127. Jacquemin, E., Hagenbuch, B, Stieger, B., Wolkoff, A. W., und Meier, P. J.: Expression cloning of a rat liver Na⁺-independent organic anion transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994; 91: 133-137.
128. Jacquemin, E., Hermans, D., und Myara, A.: Ursodeoxycholic acid therapy in pedriatic patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 1997; 25: 519-523.
129. Jansen, P. L., Hooiveld, G. J., Jacquemin, E., Sokal, E., Van Goor, H., und Koning, J.: The canalicular bile salt exporting protein BSEP is not expressed in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *Hepatology* 1998; 28: 498A.
130. Javitt, N. B.: HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J* 1990; 4(2): 161-168.
131. Jazrawi, R. P., De Caestecker, J. S., Goggin, P. M., Britten, A. J., Joseph, A. E., Maxwell, J. D., und Northfield, T. C.: Kinetics of hepatic bile acid handling in cholestatic liver disease: effect of tauroursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 1994; 106: 134-142.
132. Johnson, J. E., Giorgione, J., und Newton, A. C.: The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry* 2000; 39: 11360-11369.
133. Kacich, R. L., Raymond, R. H., und Jones, A. L.: Effects of cytochalasin D and colchicine on the uptake, translocation and biliary secretion of horseradish peroxidase and [14C] sodium taurochololat in the rat. *Gastroenterology* 1983; 85: 385-394.
134. Kadmon, M., Klünemann, C., Böhme, M., Ishikawa, T., und Gorgas, K.: Inhibition by cyclosporin A of adenosin triphosphate-dependent transport from the hepatocyte into bile. *Gastroenterology* 1993; 104: 1507-1514.

135. Kakis, G. und Yousef, I. M.: Pathogenesis of lithocholate- and tauroolithocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats. *Gastroenterology* 1978; 75: 595-607.
136. Karecla, P. I. und Kreis, T. E.: Interaction of membranes of the Golgi complex with microtubules in vitro. *Eur J Cell Biol* 1992; 57(2): 139-146.
137. Katagiri, K., Nakai, T., Hoshino, M., Hayakawa, T., Ohnishi, H., Okayama, Y., Yamada, T., Ohiwa, T., Miyaji, M., und Takeuchi, T.: Tauro-beta-muricholate preserves choleresis and prevents taurocholate-induced cholestasis in colchicine-treated rat liver. *Gastroenterology* 1992; 102(5): 1660-1667.
138. Kato, K., Ito, H., Kamei, K., und Iwamoto, I.: Selective stimulation of Hsp27 and alphaB-crystallin but not Hsp70 expression by p38 MAP kinase activation. *Cell Stress.Chaperones*. 1999; 4(2): 94-101.
139. Keitel, V., Brudelski, M., Warskulat, U., Kuhlkamp, T., Keppler, D., Häussinger, D., und Kubitz, R.: Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 2005; 41(5): 1160-1172.
140. Keller, P. und Simons, K.: Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J.Cell Sci*. 1997; 110: 3001-3009.
141. Kim, Y. H., Choi, M. R., Song, D. K., Huh, S. O., Jang, C. G., und Suh, H. W.: Regulation of c-fos gene expression by lipopolysaccharide and cycloheximide in C6 rat glioma cells. *Brain Res*. 2000; 872(1-2): 227-230.
142. Kipp, H. und Arias, I. M.: Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. *J.Biol.Chem*. 2000; 275(21): 15917-15925.
143. Kipp, H., Pichetshote, N., und Arias, I. M.: Transporters on demand. Intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J.Biol.Chem*. 2001; 276(10): 7218-7224.
144. Kishimoto, A., Takai, Y., und Mori, T.: Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J.Biol.Chem*. 1980; 255: 2273-2276.
145. Kitani, K. und Kanai, S.: Tauroursodeoxycholate prevents taurocholate induced cholestasis. *Life Sci* 1982; 30: 515-523.
146. Knisely, A. S.: Progressive familial intrahepatic cholestasis: a personal perspective. *Pediatric and Developmental Pathology* 2000; 3: 113-125.
147. Knowles, B. B., Howe, C. C., und Aden, D. P.: Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980; 209(4455): 497-499.
148. Koopen, N. R., Müller, M., Vonk, R. J., Zimniak, P., und Kuipers, F.: Molecular mechanisms of cholestasis: causes and consequences of impaired bile formation. *Biochim.Biophys.Acta* 1998; 1408: 1-17.
149. Kruskal, W. H. und Wallis, W. A.: Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J.Amer.Statist.Assoc*. 1952; 47: 583-621.
150. Kubitz, R., D'urso, D., Keppler, D., und Häussinger, D.: Osmodependent dynamic localization of the multidrug resistance protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology* 1997; 113(5): 1438-1442.
151. Kubitz, R., Huth, C., Schmitt, M., Horbach, A, Kullak-Ublick, G. A., und Häussinger, D.: Protein kinase C-dependent distribution of the Multidrug Resistance Protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology* 2001; 34: 340-350.
152. Kubitz, R., Saha, N., Kuhlkamp, T., Dutta, S., vom Dahl, S., Wettstein, M., und Häussinger, D.: Ca²⁺-dependent protein kinase C-isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol.Chem*. 2004; 279(11): 10323-10330.
153. Kubitz, R., Sütfels, G., Kuhlkamp, T., Kölling, R., und Häussinger, D.: Trafficking of the Bile Salt Export Pump (BSEP) from the Golgi to the canalicular membran is regulated by the p38 MAP kinase. *Gastroenterology* 2004; 126: 541-553.

154. Kubitz, R., Warskulat, U., Schmitt, M., und Häussinger, D.: Dexamethasone- and osmolarity-dependent expression of the multidrug-resistance protein 2 in cultured rat hepatocytes. *Biochem.J.* 1999; 340 (Pt 3): 585-591.
155. Kubitz, R., Wettstein, M., Warskulat, U., und Häussinger, D.: Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 1999; 116(2): 401-410.
156. Kullak-Ublick, G., Beuers, U., und Paumgartner, G.: Molecular and functional characterization of bile acid transport in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Hepatology* 1996; 23: 1053-1060.
157. Kullak-Ublick, G., Beuers, U., und Paumgartner, G.: Hepatobiliary transport. *J Hepatol.* 2000; 32(suppl. 1): 3-18.
158. Kullak-Ublick, G., Hagenbuch, B, Stieger, B., Scheingart, C. D., Hofmann, A. F., und Wolkoff, A. W.: Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 1995; 109: 1274-1282.
159. Kullak-Ublick, G., Stieger, B., Hagenbuch, B, und Meier, P. J.: Hepatic transport of bile acids. *Semin.Liver Dis.* 2000; 20: 273-292.
160. Kullak-Ublick, G. A., Ismail, M., Kubitz, R., Häussinger, D., Stieger, B., Meier, P. J., Beuers, U., und Paumgartner, G.: Stable expression and functional characterisation of a Na⁺-Taurocholate cotransporting green fluorescent protein in human hepatoblastome HepG2 cells. *Cytotechnology* 2000; 34: 1-9.
161. Kumar, A., Chambers, T. C., Cloud-Heflin, B. A., und Mehta, K. D.: Phorbol ester-induced low density lipoprotein receptor gene expression in HepG2 cells involves protein kinase C-mediated p42/44 MAP kinase activation. *J.Lipid Res.* 1997; 38(11): 2240-2248.
162. Kuo, A., Zhong, C., Lane, W. S., und Derynck, R.: Transmembrane transforming growth factor-alpha tethers to the PDZ domain-containing, Golgi membrane-associated protein p59/GRASP55. *EMBO J* 2000; 19(23): 6427-6439.
163. Kurz, A. K., Block, C., Graf, D., Dahl, S. V., Schliess, F., und Häussinger, D.: Phosphoinositide 3-kinase-dependent Ras activation by tauroursodesoxycholate in rat liver. *Biochem.J.* 2000; 350 Pt 1: 207-213.
164. Kurz, A. K., Graf, D., Schmitt, M., vom, Dahl S., und Häussinger, D.: Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* 2001; 121(2): 407-419.
165. Lammert, F., Beier, D. R., Wang, D. Q. H., und Carey, M. C.: Genetic mapping establishes Sister-P-glykoprotein (Spgp) as candidate for the major gallstone gene (Lith1). *Hepatology* 1997; 26: 358A.
166. Lammert, F., Wang, D. Q. H., Cohen, D. E., Paigen, B., und Carey, M. C.: Functional and genetic studies of biliary cholesterol secretion in inbred mice: evidence for a primary role of sister to P-glykoprotein, the canalicular bile salt export pump, in cholesterol gallstone pathogenesis. *Falk Symposium 93 - Bile acids in hepatobiliary diseases: basic research and clinical application* 1996; 224-228.
167. Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., und Parker, P. J.: Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 1998; 281: 2042-2045.
168. Lecureur, V., Courtois, A., Payen, L., Verhnet, L., Guillouzo, A., und Fardel, O.: Expression and regulation of hepatic drug and bile acid transporters. *Toxicology* 2000; 153: 203-219.
169. Lecureur, V., Sun, D., Hargrove, P., Schuetz, E. G., Kim, R. B., Lan, L. B., und Schuetz, J. D.: Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol.Pharmacol.* 2000; 57: 24-35.
170. Lee, G. und Piquette-Miller, M.: Influence of IL-6 on MDR- and MRP-mediated multidrug resistance in human hepatoma cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79: 876-884.
171. Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemens, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L., und Youg, P. R.: A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; 372: 739-746.

172. Lee, J. M., Trauner, M., Soroka, C., Stieger, B., Meier, P. J., und Boyer, J. L.: The molecular expression of the bile salt export pump, sister of P-glycoprotein (Spgp), in experimental models of cholestasis. Falk Symposium 93 - Bile acids in hepatobiliary diseases: basic research and clinical application 1997; (Dordrecht, Niederlande): 123-128.
173. Lee, J. M., Trauner, M., Soroka, C., Stieger, B., Meier, P. J., und Boyer, J. L.: The molecular expression of the bile salt export pump, sister of P-glycoprotein (SPGP), is selectively preserved in cholestatic liver injury. *Hepatology* 1998; 24: 429A (abstract).
174. Lim, A. G., Ahmed, H. A., Jazrawi, R. P., Levy, J. H., und Northfield, T. C.: Effect of bil acids on human hepatocyte mitochondria. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6: 1157-1163.
175. Lin, W. W. und Hsu, Y. W.: Cycloheximide-induced cPLA(2) activation is via the MKP-1 down-regulation and ERK activation. *Cell Signal.* 2000; 12(7): 457-461.
176. Lu, P. J. und Chen, C. S.: Selective recognition of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate by a synthetic peptide. *J Biol.Chem.* 1997; 272(1): 466-472.
177. Ma, Q., Renzelli, A. J., Baldwin, K. T., und Antonini, J. M.: Superinduction of CYP1A1 gene expression. Regulation of 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of Ah receptor by cycloheximide. *J.Biol.Chem.* 2000; 275(17): 12676-12683.
178. Marchegiano, P., Carubbi, F., Tiribelli, C., Amarri, S., Stebel, M., Lunazzi, G. C., Levy, D., und Bellentani, S.: Transport of sulfobromophthalein and taurocholate in the HepG2 cell line in relation to the expression of membrane carrier proteins. *Biochem Biophys.Res.Commun.* 1992; 183(3): 1203-1208.
179. Marinelli, R. A., Roma, M. G., Pellegrino, J. M., und Rodriguez Garay, E. A.: Tauroolithocholate-induced inhibition of biliary lipid and protein excretion in the rat. *Biochim.Biophys.Acta* 1992; 8: 44-48.
180. Martiny-Baron, G., Kazanietz, M. G., Mischak, H., Blumberg, P. M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D., und Schachtele, C.: Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *J Biol.Chem.* 1993; 268(13): 9194-9197.
181. Matern, S.: *Hepatology.* 1999; Thiemes Innere Medizin, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1.(3.12): 659-803.
182. Mays, R. W., Beck, K. A., und Nelson, W. J.: Organization and function of the cytoskeleton in polarized epithelial cells: a component of the protein sorting machinery. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1994; 6: 16-24.
183. Meier, P. J., Gerloff, T., Fattinger, K., und Stieger, B.: The role of the canalicular bile salt efflux pump in the pathogenesis of cholestasis. Falk Symposium 93 - Bile acids in hepatobiliary diseases: basic research and clinical application 1997; 11-114.
184. Meier, P. J. und Stieger, B.: Bile salt transporters. *Annu.Rev.Physiol* 2002; 64: 635-661.
185. Milkiewicz, P., Roma, M. G., Elias, E., und Coleman, R.: Hepatoprotection with tauroursodeoxycholate and b muricholate against tauroolithocholate induced cholestasis: involvement of signal transduction pathways. *Gut* 2002; 51: 113-119.
186. Misra, S., Ujhazy, P., Gatmaitan, Z., Varticovski, L., und Arias, I. M.: The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver. *J.Biol.Chem.* 1998; 273(41): 26638-26644.
187. Misra, S., Ujhazy, P., Varticovski, L., und Arias, I. M.: Phosphoinositide 3-kinase lipid products regulate ATP-dependent transport by sister of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein 2 in bile canalicular membrane vesicles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; 96(10): 5814-5819.
188. Miyazaki, K., Nakayama, F., und Koga, A.: Effect of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on isolated adult human hepatocytes. *Dig.Dis.Sci.* 1984; 29: 1123-1130.
189. Mochly-Rosen, D. und Gordon, A. S.: Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J* 1998; 12: 35-42.
190. Mochly-Rosen, D., Henrich, C. J., Cheever, L., Khaner, H., und Simpson, P. C.: A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regul.* 1990; 1: 693-706.
191. Mochly-Rosen, D., Khaner, H., und Lopez, J.: Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991; 88: 3997-4000.

192. Mock, M. R., Meier, P. J., und Stieger, B.: Protein-protein interactions and their importance in the function of the canalicular bile salt export pump (Bsep). *Falk Symposium 141 - Bile acid biology and its therapeutic implications 2004*; 35-36.
193. Moseley, R. H., Wang, W., Takeda, H., Lown, K., Shick, L., Ananthanarayanan, M., und Suchy, F. J.: Effect of endotoxin on bile acid transport in rat liver: a potential model for sepsis-associated cholestasis. *Am.J Physiol* 1996; 271(1 Pt 1): G137-G146.
194. Müller, M., Hooiveld, G. J., Mol, O., Koning, H., Gouw, A., Kuipers, F., Van Goor, H., und Jansen, P. L.: The canalicular bile salt export pump BSEP is not expressed in livers of PFIC-2 patients. *Falk Symposium 93 - Bile acids in hepatobiliary diseases: basic research and clinical application 1996*; 220-223.
195. Müller, M. und Jansen, P. L.: Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am.J Physiol* 1997; 272(6 Pt 1): G1285-G1303.
196. Nakanishi, H., Brewer, K. A., und Exton, J. H.: Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate. *J Biol.Chem.* 1993; 268: 13-16.
197. Newton, A. C.: Protein Kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem.Rev.* 2001; 101: 2353-2364.
198. Nishida, T., Gatmaitan, Z., Che, M., und Arias, I. M.: Rat liver canalicular vesicles contain an ATP-dependent bile acid transport system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991; 88: 6590-6594.
199. Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984; 308(5961): 693-698.
200. Nishizuka, Y.: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986; 233(4761): 305-312.
201. Noe, B., Schliess, F., Wettstein, M., Heinrich, S., und Häussinger, D.: Regulation of taurocholate excretion by a hypoosmolarity-activated signal transduction pathway in rat liver. *Gastroenterology* 1996; 110(3): 858-865.
202. Noé, J., Hagenbuch, B., Meier, P. J., und St-Pierre, M. V.: Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system. *Hepatology* 2001; 1223-1231.
203. Noé, J., Stieger, B., und Meier, P. J.: Functional expression of the canalicular bile salt export pump (BSEP) of human liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1659-1666.
204. Orr, J. W., Keranen, L. M., und Newton, A. C.: Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J Biol.Chem.* 1992; 267(22): 15263-15266.
205. Pares, A., Caballeria, L., Rodes, J., Bruguera, M., Rodrigo, L., Garcia-Plaza, A., und Berenguer, J.: Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. UDCA-Cooperative Group from the the Spanish Association for the Study of the Liver. *J Hepatol.* 2000; 32: 561-566.
206. Paulusma, C. C., Kothe, M. J., Bakker, C. T., Bosma, P. J., van Bokhoven, I., van Marle, J., Bolder, U., Tytgat, G. N., und Oude Elferink, R. P.: Zonal down-regulation and redistribution of the multidrug resistance protein 2 during bile duct ligation in rat liver. *Hepatology* 2000; 31(3): 684-693.
207. Paumgartner, G. und Beuers, U.: Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 2002; 36: 525-531.
208. Plass, J. R. M., Mol, O., Heegsma, J., Geuken, M., Faber, K. N., Jansen, P. L., und Müller, M.: Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* 2002; 35: 589-596.
209. Poupon, R. E., Lindor, K. D., Cauch-Dudek, K., Dickson, E. R., Poupon, R., und Heathcote, E. J.: Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 113: 884-890.
210. Qatsha, K. A., Rudolph, C., Marme, D., Schächtele, C., und May, W. S.: Gö 6976, a selective inhibitor of protein kinase C, is a potent antagonist of human immunodeficiency virus 1 induction from latent/low-level-producing reservoir cells in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; 90: 4674-4678.

211. Rao, Y. P., Stravitz, R. T., Vlahcevic, Z. R., Gurley, E. C., Sando, J. J., und Hylemon, P. B.: Activation of protein kinase C alpha and delta by bile acids: correlation with bile acid structure and diacylglycerol formation. *J Lipid Res.* 1997; 38(12): 2446-2454.
212. Ray, L. B. und Sturgill, T. W.: Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988; 85: 3753-3757.
213. Robles-Flores, M., Alcantara-Hernandez, R., und Garcia-Sainz, J. A.: Differences in phorbol ester-induced decrease of the activity of protein kinase C isozymes in rat hepatocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1991; 1094(1): 77-84.
214. Roelofsen, H., Soroka, C. J., Keppler, D., und Boyer, J. L.: Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J.Cell Sci.* 1998; 111 (Pt 8): 1137-1145.
215. Roma, M. G., Milkiewicz, P., Elias, E., und Coleman, R.: Control by signaling modulators of the sorting of canalicular transporters in rat hepatocyte couplets: role of the cytoskeleton. *Hepatology* 2000; 32(6): 1342-1356.
216. Rost, D., Kartenbeck, J., und Keppler, D.: Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology* 1999; 29(3): 814-821.
217. Rust, C., Karnitz, L. M., Paya, C. V., Moscat, J., Simari, R. D., und Gores, G. J.: The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol.Chem.* 2000; 26: 20210-20216.
218. Sai, Y., Nies, A. T., und Arias, I. M.: Bile acid secretion and direct targeting of mdr1-green fluorescent protein from Golgi to the canalicular membrane in polarized WIF-B cells. *J.Cell Sci.* 1999; 112: 4535-4545.
219. Sakisaka, S., Ng, O. C., und Boyer, J. L.: Tubulovesicular transcytotic pathway in isolated rat hepatocyte couplets in culture. *Gastroenterology* 1988; 95: 793-804.
220. Schaeffer, H. J. und Weber, M. J.: Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2435-2444.
221. Schell, M. J., Maurice, M., Stieger, B., und Hubbard, A. L.: 5'nucleotidase is sorted to the apical domain of hepatocytes via an indirect route. *J.Cell Biol.* 1992; 119(5): 1173-1182.
222. Schliess, F., Heinrich, S., Kubitz, R., vom Dahl, S., Kurz, A. K., Rosnowsky, S., und Häussinger, D.: Osmosignalling in liver. in: *Signalling in liver (Häussinger/Heinrich eds.)* 1998; 129-156.
223. Schliess, F., Kurz, A. K., vom Dahl, S., und Häussinger, D.: Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Gastroenterology* 1997; 113(4): 1306-1314.
224. Schliess, F., Kurz, A. K., vom Dahl, S., und Häussinger, D.: Activation of mitogen-activated protein kinases Erk-1 and Erk-2 mediates the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholat. *Gastroenterology* 2000; 113: 1306-1314.
225. Schliess, F., Schreiber, R., und Häussinger, D.: Activation of extracellular signal related kinases Erk-1 and Erk-2 by cell swelling in H4IIE hepatoma cells. *Biochem J* 1995; 309: 13-17.
226. Schmitt, M., Kubitz, R., Lizun, S., Wettstein, M., und Häussinger, D.: Regulation of the dynamic localization of the rat Bsep gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology* 2001; 33(3): 509-518.
227. Schölmerich, J., Baumgartner, U., und Miyai, K.: Tauroursodeoxycholate prevents tauroolithocholate-induced cholestasis and toxicity in rat liver. *J Hepatol.* 1990; 10: 280-283.
228. Schölmerich, J., Kitamura, S., Baumgartner, U., Miyai, K., und Gerok, W.: Taurohyocholate, taurocholate, and tauroursodeoxycholate but not tauroursocholate and taurodehydrocholate counteract effects of tauroolithocholate in rat liver. *Res Exp Med (Berl)* 1990; 190(2): 121-129.
229. Schuetz, E. G., Strom, S., Yasuda, K., Lecureur, V., Assem, M., Brimer, C., Lamba, J., Kim, R. B., Ramachandran, V., Komoroski, B. J., Venkatarmanan, R., Cai, H., Sinal, C. J., Gonzalez, F. J., und Schuetz, J. D.: Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. *J Biol.Chem.* 2001; 276(42): 39411-39418.

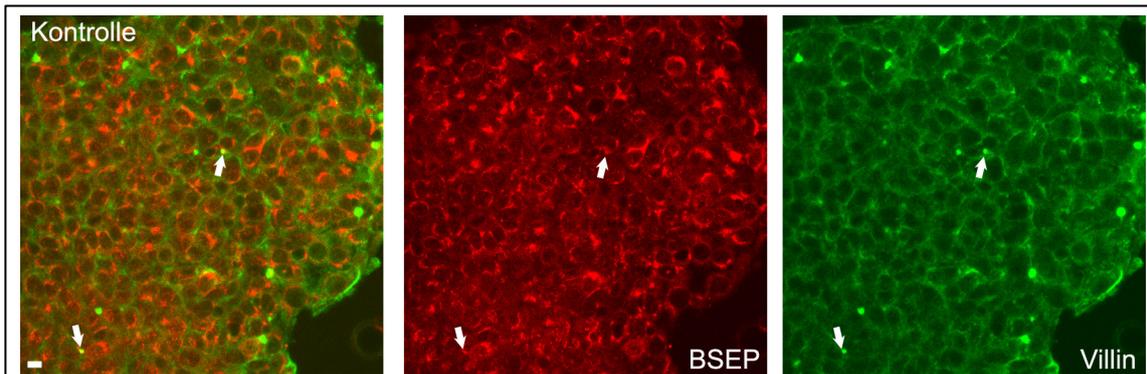
230. Schuringa, J. J., Dekker, L. V., Vellenga, E., und Kruijer, W.: Sequential activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and protein kinase Cdelta is required for interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 phosphorylation and transactivation. *J.Biol.Chem.* 2001; 276(29): 27709-27715.
231. Seger, R. und Krebs, E. G.: The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726-735.
232. Shyng, S. L. und Nichols, C. G.: Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science* 1998; 282(5391): 1138-1141.
233. Sinal, C. J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J. M., Lambert, G., und Gonzalez, G. J.: Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000; 102: 731-744.
234. Singh, R. P., Dhawan, P., Golden, C., Kapoor, G. S., und Mehta, K. D.: One-way cross-talk between p38(MAPK) and p42/44(MAPK). Inhibition of p38(MAPK) induces low density lipoprotein receptor expression through activation of the p42/44(MAPK) cascade. *J Biol.Chem.* 1999; 274(28): 19593-19600.
235. Sipeki, S., Bander, E., Buday, L., Farkas, G., Bacsy, E., Ways, D. K., und Farago, A.: Phosphatidylinositol 3-kinase contributes to Erk1/Erk2 MAP kinase activation associated with hepatocyte growth factor-induced cell scattering. *Cell Signal* 1999; 11(12): 885-890.
236. Slomiany, A., Nowak, P., Piotrowski, E., und Slomiany, B. L.: Effect of ethanol on intracellular vesicular transport from Golgi to the apical cell membrane: role of phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase A2 in Golgi transport vesicles association and fusion with the apical membrane. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22(1): 167-175.
237. Song, W., Apodaca, G., und Mostov, K. E.: Transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor is regulated in multiple intracellular compartments. *J Biol.Chem.* 1994; 269(47): 29474-29480.
238. Songyang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L.-H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D. A., Soderling, T. R., Bartleson, C., Graves, D. J., DeMaggio, A. J., Hoekstra, M. F., Blenis, J., Hunter, T., und Cantley, L. C.: A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol.Cell Biol.* 1996; 16: 6486-6493.
239. Sormunen, R., Eskelinen, S., und Lehto, V. P.: Bile canaliculus formation in cultured HepG2 cells. *Exp.Cell Res.* 1993; 214: 642-653.
240. Soroka, C. J., Pate, M. K., und Boyer, J. L.: Canalicular export pumps traffic with polymeric immunoglobulin A receptor on the same microtubule-associated vesicle in rat liver. *J.Biol.Chem.* 1999; 274(37): 26416-26424.
241. Spitaler, M. und Cantrell, D. A.: Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* 2004; 5: 785-790.
242. Standaert, M. L., Galloway, L., Karnam, P., Bandyopadhyay, G., Moscat, J., und Farese, R. V.: Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. potential role in glucose transport. *J Biol.Chem.* 1997; 272(48): 30075-30082.
243. Stanners, C. P.: The effect of cycloheximide on polyribosomes from hamster cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1966; 22(5): 758-764.
244. Stieger, B., Fattinger, K., Madon, J., Kullak-Ublick, G., und Meier, P. J.: Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 2000; 118: 422-430.
245. Stieger, B., O'Neill, B., und Meier, P. J.: ATP-dependent bile salt transport in canalicular rat liver plasma membrane vesicles. *Biochem J* 1992; 284: 67-84.
246. Stiehl, A., Raedsch, R., und Rudolph, C.: Acute effects of ursodeoxycholic and chenodeoxycholic acid on the small intestinal absorption of bile acids. *Gastroenterology* 1990; 98: 424-428.
247. Stiehl, A., Rudolph, C., und Raedsch, R.: Ursodeoxycholic acid-induced changes of plasma and urinary bile acids in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990; 12: 492-497.
248. Stiehl, A., Walker, S., Stiehl, L., Rudolph, G., Hofmann, W. J., und Theilmann, L.: Effect of ursodeoxycholic acid on liver and bile duct disease in primary sclerosing cholangitis. A 3-year pilot study with a placebo-controlled study period. *J Hepatol.* 1994; 20: 57-64.

249. Strautnieks, S. S., Bull, L. N., Knisely, A. S., Kocoshis, S. A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M. S., Kagalwalla, A. F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N. B., Gardiner, R. M., und Thompson, R. J.: A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat.Genet.* 1998; 20(3): 233-238.
250. Strautnieks, S. S. und et al.: Identification of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis PFIC2 on chromosome 2q24. *Am.J.Hum.Genet.* 1997; 61: 630-633.
251. Stravitz, R. T., Rao, Y. P., Vlahcevic, Z. R., Gurley, E. C., Jarvis, W. D., und Hylemon, P. B.: Hepatocellular protein kinase C activation by bile acids: implications for regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *Am.J.Physiol* 1996; 271(2 Pt 1): G293-G303.
252. Stravitz, R. T., Vlahcevic, Z., Gurley, E. C., und Hylemon, P. B.: Repression of cholesterol 7 α -hydroxylase transcription by bile acids is mediated through protein kinase C in primary cultured rat hepatocytes. *J Lipid Res.* 1995; 36: 1359-1369.
253. Taguchi, Y., Kino, K., Morishima, M., Komano, T., Kane, S. E., und Ueda, K.: Alteration of substrate specificity by mutations at the His61 position in predicted transmembrane domain 1 of human MDR1/P-glycoprotein. *Biochemistry* 1997; 36: 8883-8889.
254. Takenawa, T. und Nagai, Y.: Purification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from rat liver. *J.Biol.Chem.* 1981; 256: 6769-6775.
255. Thibault, N., Maurice, M., Maratrat, M., Cordier, A., Feldmann, G., und Ballet, F.: Effect of tauro-ursodeoxycholate on actin filament alteration induced by cholestatic agents. A study in isolated rat hepatocyte couplets. *J Hepatol.* 1993; 19(3): 367-376.
256. Thomas, A. P., Alexander, J., und Willaimson, J. R.: Relationship between inositol polyphosphate production and the increase of cytosolic free Ca²⁺ induced by vasopressin in isolated hepatocytes. *J.Biol.Chem.* 1984; 259: 5574-5584.
257. Thompson, R. J. und Strautnieks, S. S.: The role of the bile salt export pump BSEP in genetic cholestasis. *Falk Symposium 93 - Bile acids in hepatobiliary diseases: basic research and clinical application* 1997; 115-122.
258. Toker, A.: Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P₂ and OtdIns-3,4,5-P₃. *J Biol.Chem.* 1994; 269: 32358-32367.
259. Toker, A. und Cantley, L. C.: Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH-kinase. *Nature* 1997; 387: 673-676.
260. Torok, M., Gutmann, H., Fricker, G., und Drewe, J.: Sister of P-glycoprotein expression in different tissues. *Biochem.Pharmacol.* 1999; 57(7): 833-835.
261. Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., und Baudet, V.: The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol.Chem.* 1991; 266: 15771-15781.
262. Traub, L. M. und Kornfeld, S.: The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1997; 9(4): 527-533.
263. Trauner, M., Arrese, M., Soroka, C. J., Ananthanarayanan, M., Koepfel, T. A., Schlosser, S. F., Suchy, F. J., Keppler, D., und Boyer, J. L.: The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 1997; 113(1): 255-264.
264. Trauner, M. und Boyer, J. L.: Cholestatic syndroms. *Curr.Opin.Gastroent.* 1999; 15: 217-228.
265. Traynor-Kaplan, A. E., Harris, A. L., Thompson, B. L., Taylor, P., und Sklar, L. A.: An inositol tetrakisphosphate-containing phospholipid in activated neutrophils. *Nature* 1988; 334: 353-356.
266. Tsukahara, K., Kanai, S., Ohta, M., und Kitani, K.: Taurine conjugate of ursodeoxycholate plays a major role in the hepatoprotective effect against cholestasis induced by taurochenodeoxycholate in rats. *Liver* 1993; 13: 262-269.
267. Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G., und Waterfield, M. D.: Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem.Sci.* 1997; 22(7): 267-272.
268. Vega-Salas, D. E., Salas, P. J., und Rodriguez-Boulan, E.: Modulation of the expression of an apical plasma membrane protein of Madin-Darby canine kidney epithelial cells: cell-cell

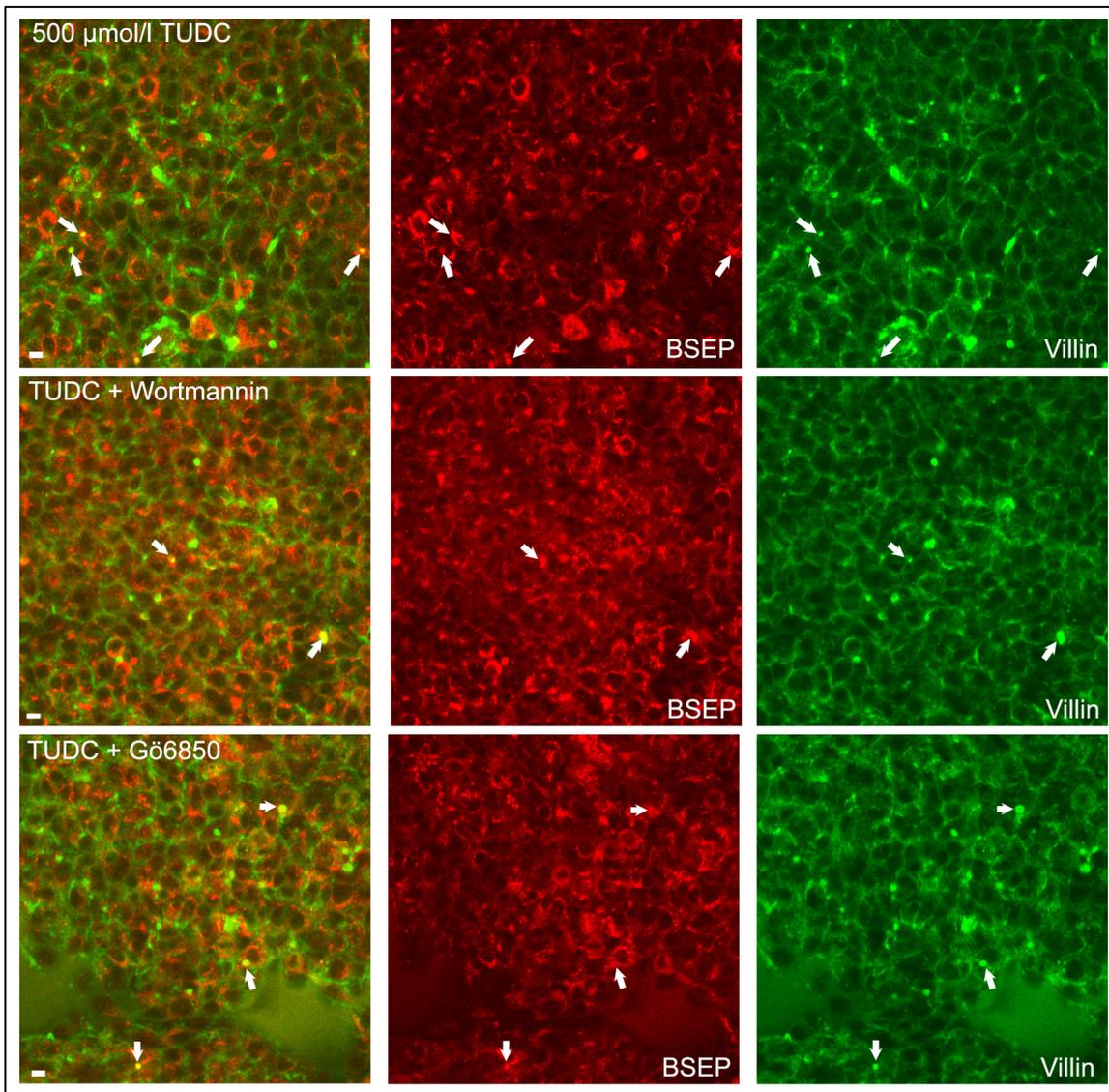
- interactions control the appearance of a novel intracellular storage compartment. *J.Cell Biol.* 1987; 104(5): 1249-1259.
269. Vega-Salas, D. E., Salas, P. J., und Rodriguez-Boulan, E.: Exocytosis of vacuolar apical compartment: a cell-cell contact controlled mechanism for the establishment of the apical plasma membrane domain in epithelial cells. *J.Cell Biol.* 1988; 107(5): 1717-1728.
270. Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., MacDougall, L. K., Stein, R., Zvelebil, M. J., Domin, J., Panaretou, C., und Waterfield, M. D.: A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J* 1995; 14(14): 3339-3348.
271. Vos, T. A., Hooiveld, G. J., Koning, H., Childs, S., Meijer, D. K., Moshage, H., Jansen, P. L., und Muller, M.: Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* 1998; 28(6): 1637-1644.
272. Voß, W.: Taschenbuch der Statistik. 2004; (Carl-Haser-Verlag, Leipzig, 2.): 484-488.
273. Wakabayashi, V. Y., Lippincott-Schwartz, J., und Arias, I. M.: Intracellular trafficking of Bile Salt Export Pump (ABCB11) in polarized hepatic cells: constitutive cycling between the canalicular membrane and rab11-positive endosomes. *Mol.Biol.Cell* 2004; 15: 3485-3496.
274. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., und Gay, N. J.: Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982; 1: 945-951.
275. Wang, L., Soroka, C., und Boyer, J. L.: The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *J Clin Invest* 2002; 110: 965-972.
276. Wang, W. H., Cassola, A., und Giebisch, G.: Involvement of actin cytoskeleton in modulation of apical K channel activity in rat collecting duct. *Am.J.Physiol* 1994; 267(4 Pt 2): F592-F598.
277. Ward, N. E. und O'Brian, C. A.: The bile acid analog fusidic acid can replace phosphatidylserine in the activation of protein kinase C by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat in vitro. *Carcinogenesis* 1988; 9: 1451-1454.
278. Warskulat, U., Kubitz, R., Wettstein, M., Stieger, B., Meier, P. J., und Häussinger, D.: Regulation of bile salt export pump mRNA levels by dexamethasone and osmolarity in cultured rat hepatocytes. *Biol.Chem.* 1999; 380(11): 1273-1279.
279. Waskiewicz, A. J. und Cooper, J. A.: Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1995; 7: 798-805.
280. Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., und Cooper, A. D.: Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases MNK1 and MNK2. *EMBO J* 1997; 16: 1909-1920.
281. Weisz, O. A., Machamer, C. E., und Hubbard, A. L.: Rat liver dipeptidylpeptidase IV contains competing apical and basolateral targeting information. *J.Biol.Chem.* 1992; 267(31): 22282-22288.
282. Wenzel-Seifert, K., Schachtele, C., und Seifert, R.: N-protein kinase C isozymes may be involved in the regulation of various neutrophil functions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1994; 200: 1536-1543.
283. Westermann, P., Knoblich, M., und Maier, O.: Protein kinase C bound to the Golgi apparatus supports the formation of constitutive transport vesicles. *Biochem J* 1996; 320: 651-658.
284. Whittington, P. F., Freese, D. K., Alonso, E. M., Schwarzenberg, S. J., und Sharp, H. L.: Clinical and biochemical findings in progressive familial intrahepatic cholestasis. *J.Pediatric Gastroenterol.Nutr.* 1994; 18: 134-141.
285. Whitman, M., Downes, C. P., Keeler, M., Keller, T., und Cantley, L. C.: Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 1988; 332: 644-646.
286. Whitmarsh, A. J. und Davis, R. J.: Structural organization of MAP kinase signaling molecules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem.Sci.* 1998; 23: 481-485.
287. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., und Johnson, G. L.: Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 1999; 79(1): 143-180.

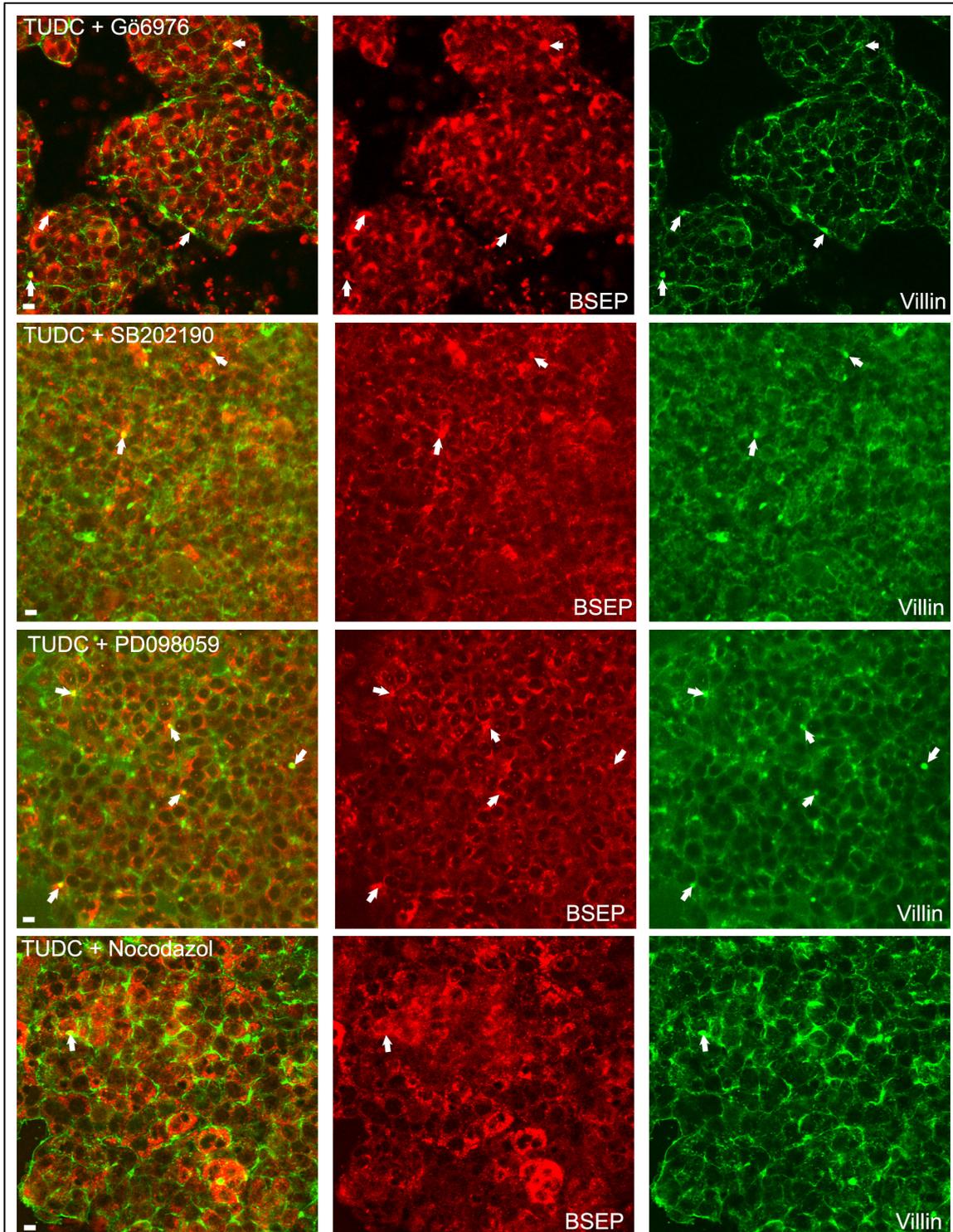
288. Wilton, J. C., Matthews, G. M., Burgoyne, R. D., Mills, C. O., Chipman, J. K., und Coleman, R.: Fluorescent choleric and cholestatic bile salts take different paths across the hepatocyte: transcytosis of glycolithocholate leads to an extensive redistribution of annexin II. *J.Cell Biol.* 1994; 127(2): 401-410.
289. Wymann, M. P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D., und Panayotou, G.: Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* 1996; 16(4): 1722-1733.
290. Yu, J., Lo, J. L., Huang, L., Zhao, A., Metzger, E., Adams, A., Meinke, P. T., Wright, S. D., und Cui, J.: Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity. *J.Biol.Chem.* 2002; 277(33): 31441-31447.
291. Zaal, K. J., Kok, J. W., Sormunen, R., Eskelinen, S., und Hoekstra, D.: Intracellular sites involved in the biogenesis of bile canaliculi in hepatic cells. *Eur J Cell Biol* 1994; 63(1): 10-19.
292. Zegers, M. M. und Hoekstra, D.: Sphingolipid transport to the apical plasma membrane domain in human hepatoma cells is controlled by PKC and PKA activity: a correlation with cell polarity in HepG2 cells. *J.Cell Biol.* 1997; 138(2): 307-321.
293. Zegers, M. M., Zaal, K. J., van IJzendoorn, S. C., Klappe, K., und Hoekstra, D.: Actin filaments and microtubules are involved in different membrane traffic pathways that transport sphingolipids to the apical surface of polarized HepG2 cells. *Mol.Biol.Cell* 1998; 9(7): 1939-1949.
294. Zinck, R., Cahill, M. A., Kracht, M., Sachsenmaier, C., Hipskind, R. A., und Nordheim, A.: Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol.Cell Bio.* 1995; 15(9): 4930-4938.
295. Zollner, G., Fickert, P., Zenz, R., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Kenner, L., Ferenci, P., Stauber, R. E., Krejs, G. J., Denk, H., Zatloukal, K., und Trauner, M.: Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* 2001; 33(3): 633-646.

9. Anhang: Farbtafeln

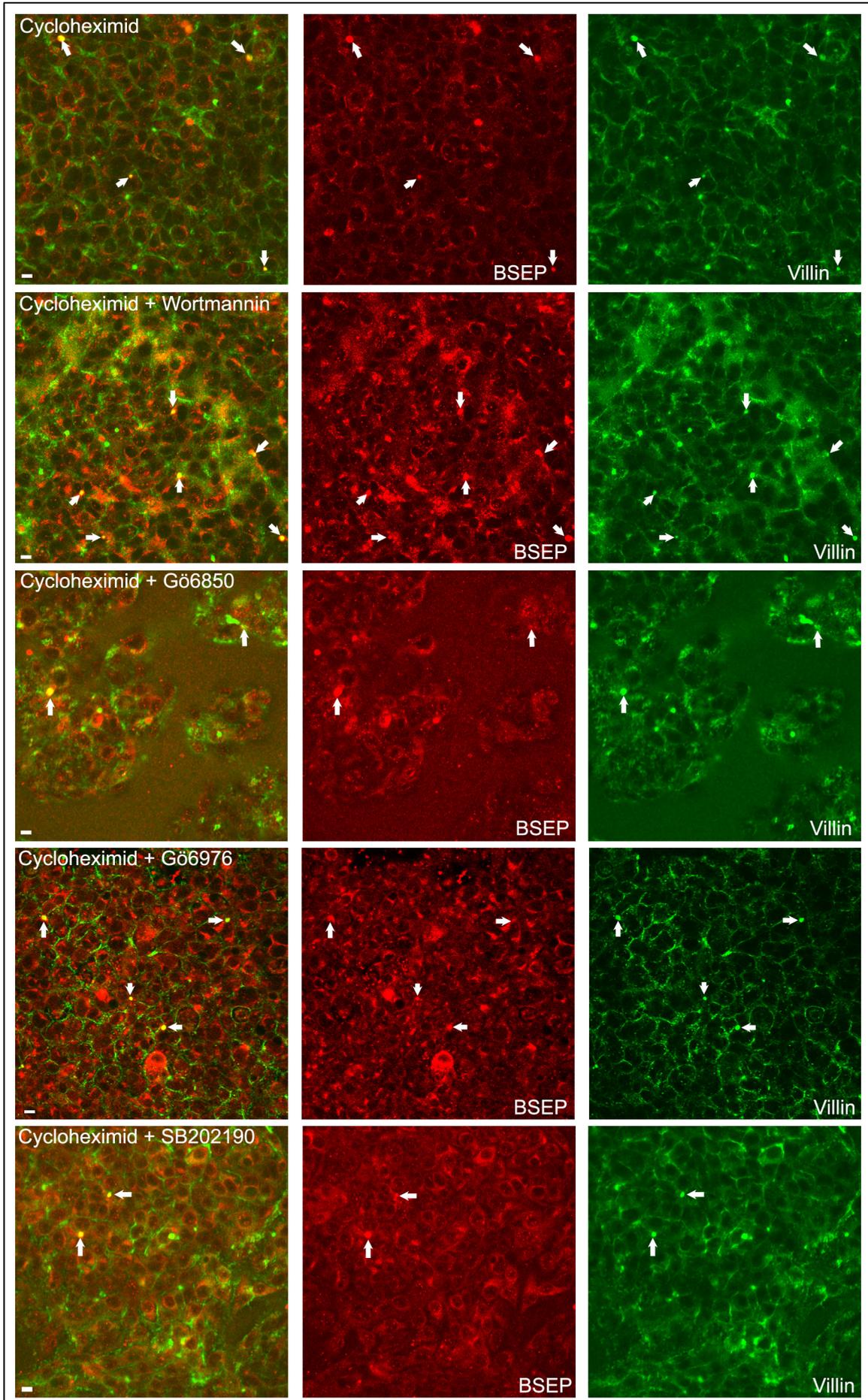


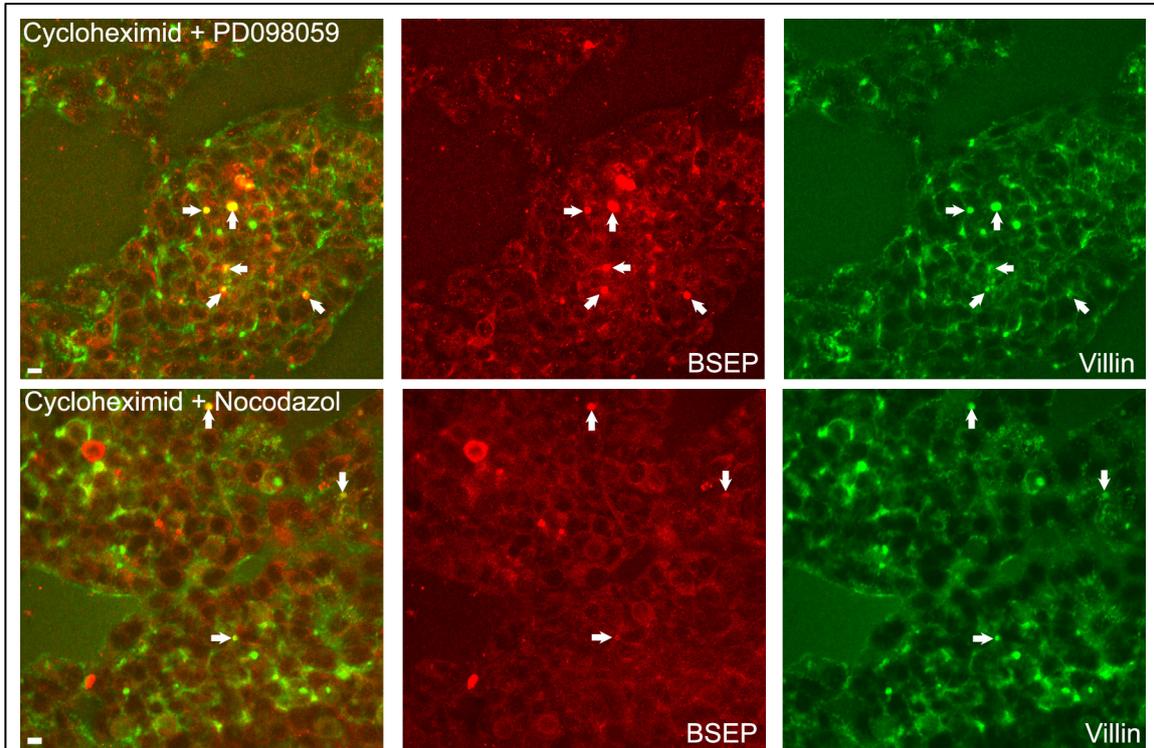
Tafel 1: Ntcp-transfizierte HepG-Zellen unter Kontrollbedingungen, Immunfluoreszenz-Färbung mit den Antikörpern K12 (BSEP; rot) und Anti-Villin (Pseudocanaliculi; grün). Die Pfeile markieren die Co-Lokalisation beider Antikörper, also BSEP-positive Pseudocanaliculi (gelb). Der weiße Balken entspricht 10 μ m.





Tafel 2: Ntcp-transfizierte HepG-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit 500 $\mu\text{mol/l}$ TUDC und den untersuchten Inhibitoren. Immunfluoreszenz-Färbung mit den Antikörpern K12 (BSEP; rot) und Anti-Villin (Pseudocanaliculi; grün). Die Pfeile markieren die Co-Lokalisation beider Antikörper, also BSEP-positive Pseudocanaliculi (gelb). Die weißen Balken entsprechen 10 μm .





Tafel 3: Ntcp-transfizierte HepG-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit 100 µmol/l Cycloheximid und den untersuchten Inhibitoren. Immunfluoreszenz-Färbung mit den Antikörpern K12 (BSEP; rot) und Anti-Villin (Pseudocanaliculi; grün). Die Pfeile markieren die Co-Lokalisation beider Antikörper, also BSEP-positive Pseudocanaliculi (gelb). Die weißen Balken entsprechen 10 µm.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Gerrit Sütfels
Geburtsdatum: 31. Januar 1977
Geburtsort: Münster
Eltern: Manfred Sütfels, Ministerialbeamter
Doris Sütfels, geb. Kazmierczak, Justizbeamtin
Anschrift: Kölner Straße 373, 40227 Düsseldorf

Schulische Ausbildung

1983 - 1984 Katholische Grundschule, Erkrath
1984 - 1987 Brehm-Grundschule, Düsseldorf
1987 - 1996 Humboldt-Gymnasium, Düsseldorf
Abschluss: Abitur

Zivildienst

1996 - 1997 Zivildienst im Evangelischen Krankenhaus, Düsseldorf:
Krankenpflege und Patientenbegleitdienst (13 Monate)

Studium

1997 - 2004 Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität (HHU),
Düsseldorf
August 1999 Ärztliche Vorprüfung
August 2000 1. Staatsexamen
März 2003 2. Staatsexamen
2003 - 2004 Praktisches Jahr (PJ) im Evangelischen Krankenhaus,
Düsseldorf; Wahlfach: Anästhesie
19. April 2004 3. Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

seit August 2004 Arzt im Praktikum bzw. Assistenzarzt in der Klinik für Innere
Medizin, Evangelisches Krankenhaus, Düsseldorf

Publikationen

Januar 2004 Poster-Beitrag zum GASL-Kongress (German Association
for the Study of the Liver), Freiburg
Januar 2004 Sütfels G, Kubitz R, Kühlkamp T, Graf D, Häussinger D:
Das "Trafficking" der Gallensalzexportpumpe (Bsep) an die
kanalikuläre Membran in HepG2-Zellen und Rattenhepato-
zyten wird von MAP-Kinasen und Protein Kinase C vermittelt
(Abstr.). Z Gastroenterol 2004; XLII: 47-111
Februar 2004 Kubitz R, Sütfels G, Kühlkamp T, Kölling R, Häussinger D:
Trafficking of the Bile Salt Export Pump from the Golgi to the
canalicular membrane is regulated by the p38 MAP Kinase.
Gastroenterology 2004; 126: 541-553