

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

**Untersuchungen der Distribution
des Gallensalzaufnahmetransporters Ntcp
mittels Durchflusszytometrie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Angelika Helmer
2016

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ralf Kubitz

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kühlkamp T, Keitel V, Helmer A, Häussinger D, Kubitz R. Degradation of the sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) by the ubiquitin-proteasome system. *Biological Chemistry*, **2005**; 386:1065-1074

Kubitz R, Helmer A, Häussinger D. Biliary Transport Systems: Short Term Regulation. *Methods in Enzymology*, **2005**; 400:542-557

Stross C*, Helmer A*, Weissenberger K, Görg B, Keitel V, Häussinger D, Kubitz R. Protein Kinase C induces endocytosis of the sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **2010**; 299:G320-G328.

*** geteilte Erstautorenschaft**

Mühlfeld S, Domanova O, Berlage T, Stross C, Helmer A, Keitel V, Häussinger D, Kubitz R. Short-term feedback regulation of bile salt uptake by bile salts in rodent liver. *Hepatology*, **2012**; 56:2387-2397

I Zusammenfassung

Die Produktion und Sekretion von Galle gehört zu den Hauptfunktionen der Leber. Hierzu verfügen Hepatozyten über eine Reihe von Transportproteinen, die diese Prozesse regulieren. Endo- und Exozytose spielen hierbei insbesondere bei der kurzfristigen Adaptation auf stetig wechselnde äußere Bedingungen eine wichtige Rolle. Der Gallensalztransporter Natrium-Taurocholat-Cotransporter (Ntcp) ist der Hauptaufnahmetransporter für Gallensalze aus dem portalvenösen Blut in den Hepatozyten. Während es zum kurzfristigen Einbau in die basolaterale Membran bereits eine Reihe Studien gibt, existieren zum kurzfristigen Ausbau bislang nur wenige Daten. Um dies zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die den membranständigen Anteil von Ntcp im Vergleich zu seiner Gesamtmenge mittels Durchflusszytometrie messbar macht und so ermöglicht, den Einfluss verschiedenster Substanzen auf den Ein- und Ausbau von Ntcp in einem Hochdurchsatzverfahren zu messen.

Hierzu wurde ein Ntcp-Konstrukt erstellt, welches an seinem intrazellulären C-Terminus ein fluoreszierendes Protein (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP) und am extrazellulären N-Terminus ein FLAG-Tag trägt. An nicht permeabilisierten Zellen kann so nach Anfärbung des FLAG-Tags die Menge des membranständigen Ntcp im Verhältnis zur Gesamtmenge (EGFP-Fluoreszenz) gemessen werden. An HepG2-Zellen, die dieses Konstrukt stabil exprimieren, konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Proteinkinase C zum Ausbau von Ntcp aus der basolateralen Membran bei gleichbleibender Gesamtmenge führt. In einem zweiten Schritt konnte gezeigt werden, dass bei unveränderter Gesamtmenge die hydrophoben Gallensalze TCDC und TLCS, nicht aber TC und TUDC zu einem Ausbau von Ntcp aus der Membran führen.

Ein derartiger Feedback-Mechanismus kann im Rahmen einer Adaptation auf kurzfristig steigende portalvenöse Gallensalzkonzentrationen durch Drosselung der Gallensalzaufnahme einen Schutzmechanismus des Hepatozyten vor toxischen intrazellulären Gallensalzmengen darstellen. Die hier etablierte Methode stellt eine Möglichkeit dar, den Einfluss verschiedenster Substanzen auf die kurzfristige Regulation von Ntcp an einer Vielzahl einzelner Zellen schnell zu messen und kann so als Screening-Methode vor weiteren, detaillierteren Untersuchungen dienen.

II Abkürzungsverzeichnis

@	Anti
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BAAT	<i>Bile Acid Coenzym A: Amino acid N-acetyltransferase</i>
BSEP	<i>Bile Salt Export Pump</i> (Gallensalzexportpumpe)
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
°C	Grad Celsius
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
Cy3	Cyanin 3
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	3´-Desoxy-Nukleosid-5-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , eingetragenes Warenzeichen der Firma Becton Dickinson
FCS	Fötales Kälberserum
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
FXR	Farnesoid X-aktivierter Rezeptor
g	Gravitationskonstante (9,897 m/s ²)
GLUT4	Glucosetransporter Typ 4
Gö 6850	Bisindolylmaleimide I
h	Stunde
H ⁺ -ATPase	Protonenpumpe
HCl	Chlorwasserstoff
H ₂ O	Wasser

HepG2	Humane Hepatomazelllinie
IU	Internationale Einheiten
kDa	KiloDalton
l	Liter
LB	Luria Bertoni (Medium/-Agar)
M	Mol/Liter
MDR 1,2,3	<i>Multidrug Resistance Protein 1,2,3</i>
mg	Milligramm
MG-132	Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol/l
ml	Milliliter
mM	Millimol/l
mmol	Millimol
MRP 2,3,4	<i>Multidrug Resistance Associated Protein 2,3,4</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na⁺K⁺-ATPase	Natrium-Kalium-Pumpe
nm	Nanometer
Ntcp	Natrium-Taurocholat-Cotransport-Polypeptid der Ratte
NTCP	Natrium-Taurocholat-Cotransport-Polypeptid des Menschen
OATP	Organische Anionen transportierendes Polypeptid
OSTα/β	<i>Organic Solute Transporter Alpha/Beta</i>
p38^{MAPK}	Mitogen-abhängige Proteinkinase vom p38-Typ
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFIC 2	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2
pH	pH-Wert, der negative dekadische Logarithmus der molaren Wasserstoffionenaktivität
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase

PIP₂	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKM	Proteinkinase M
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pmol	Pikomol
PP2B	Protein Phosphatase 2B
RACK	Rezeptor für aktivierte C-Kinase
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde
SHP	<i>Small Heterodimer Partner</i>
SOC	Salzoptimiertes Medium mit Glucose (<i>Salt Optimized + Carbon</i>)
SSC	<i>Side Scatter</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TC	Taurocholat
TCDC	Taurochenodeoxycholat
TLCS	Taurolithocholat-Sulfat
TJP2	<i>Tight Junction Protein 2</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ttx	Thymeleatoxin
TUDC	Tauroursodeoxycholat
U	Einheiten
V	Volt

III Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	2
2.1 Hepatozellulärer Transport von Gallensalzen	2
2.2 NTCP	4
2.3 Gallensäuren	7
2.4 Proteinkinase C	9
2.5 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	11
3. Material und Methoden	13
3.1 Herstellung des FLAG-Ntcp-EGFP Plasmids	13
3.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden	22
3.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	24
3.4 Durchflusszytometrie	25
4. Ergebnisse	30
4.1 Herstellung des beidseitig getaggten Ntcp	30
4.2 Expression des FLAG-Ntcp-EGFP in HepG2-Zellen	30
4.3 Validierung mittels Durchflusszytometrie	32
4.4 Messungen zum Einfluss der Proteinkinase C	40
4.5 Messungen zum Einfluss von Gallensalzen	43
5. Diskussion und Schlussfolgerungen	48
6. Literaturverzeichnis	56
7. Danksagung	74

1. Einleitung

Eine der Hauptfunktionen der Leber ist die Bildung und die Sekretion von Galle. Über verschiedene Transportproteine werden einerseits Substrate aus dem portalen Blut in den Hepatozyten aufgenommen und andererseits an der kanalikulären Membran in die Gallenwege sezerniert. Eine Störung dieser Prozesse führt zur Cholestase, also zu einer Abnahme des Galleflusses. Die häufigste Form, die obstruktive Cholestase, ist meist durch extrahepatische Faktoren wie beispielsweise Gallensteine oder Tumore, welche die Gallenwege verlegen, bedingt, seltener sind Gallenwegsstrikturen eine Ursache. Bei den nicht-obstruktiven Cholestaseformen liegt die Ursache intrahepatisch: Verschiedene Toxine und Medikamente können zu einer primären, nicht obstruktiven Cholestase führen. Hereditäre Cholestasen, die mit einem Mangel oder Defekt der hepatozellulären Transporter einhergehen, fallen ebenso in diese Gruppe. Eine nicht-obstruktive, intrahepatische Cholestase kann auch sekundär bei einer Vielzahl von Lebererkrankungen auftreten, so beispielsweise im Rahmen einer Virushepatitis oder einer Sepsis. Bei diesen intrahepatischen Cholestaseformen ist eine Störung der hepatozellulären Transportprozesse im Gegensatz zur obstruktiven Cholestase nicht eine sekundäre Folge der Erkrankung, sondern zum Teil ursächlich an der Krankheitsentstehung beteiligt.

2. Grundlagen

2.1 Hepatozellulärer Transport von Gallensalzen

Hepatozyten sind polarisierte Epithelzellen, die zwei unterschiedliche Membrandomänen ausbilden: Mit ihrer basalen Membran grenzen sie an den Dissé-Raum und stehen somit in direktem Kontakt zum Blutplasma aus den Lebersinusoiden. Zusammen mit der lateralen Membran, an der die Hepatozyten durch Nexus und Desmosomen miteinander verbunden sind, wird die funktionelle Einheit der basolateralen Membran gebildet. Auf der apikalen Seite grenzen zwei bis drei Hepatozyten aneinander und bilden die Wand der Gallenkanälchen (Canaliculi biliferi). Die apikale bzw. kanalikuläre Membran bildet so eine eigene Funktionseinheit. Die differentielle Expression von verschiedenen Transportproteinen an der basolateralen und apikalen Membran ist entscheidend für den gerichteten Transport von im portalvenösen Blut gelösten Substanzen in die Galle.

Transporter an der basolateralen Membran lassen sich in natriumabhängige und -unabhängige Systeme teilen. Die Aufnahme von Gallensalzen, dem wesentlichen organischen Bestandteil der Galle, erfolgt hauptsächlich über den natriumabhängigen Taurocholat-Cotransporter NTCP, zu einem geringen Anteil auch über die natriumunabhängigen organischen Anionentransporter OATP (Jaquemin et al., 1994), (Kullak-Ublick et al., 1995). Für die Sekretion von Gallensalzen an der apikalen Hepatozytenmembran sind im Wesentlichen die Gallensalzexportpumpe BSEP (*Bile Salt Export Pump*, ABCB11) und in geringerem Maße MRP2 (*Multidrug resistance associated protein 2*, ABCC2) (Gerloff et al., 1998), (Akita et al., 2001) zuständig. Daneben ist ein Rücktransport aus dem Hepatozyten in das sinusoidale Blut über die Transportproteine MRP3 (ABCC3), MRP4 (ABCC4) und OST α/β beschrieben (Hirohashi et al., 2000), (Rius et al., 2003), (Ballatori et al., 2009) (Abb.1).

All diese Transporter unterliegen einer bedarfsgerechten Regulation, die letztlich die funktionelle Menge des jeweiligen Transporters an der Membran bestimmt. Langfristig erfolgt dies über vermehrte oder verminderte Transkription, kurzfristig über posttranslationale Prozesse wie Proteinmodifikationen (z.B. Phosphorylie-

rungen oder Glykosylierungen), vermehrtes *Targeting* oder endo- und exozytotische Prozesse.

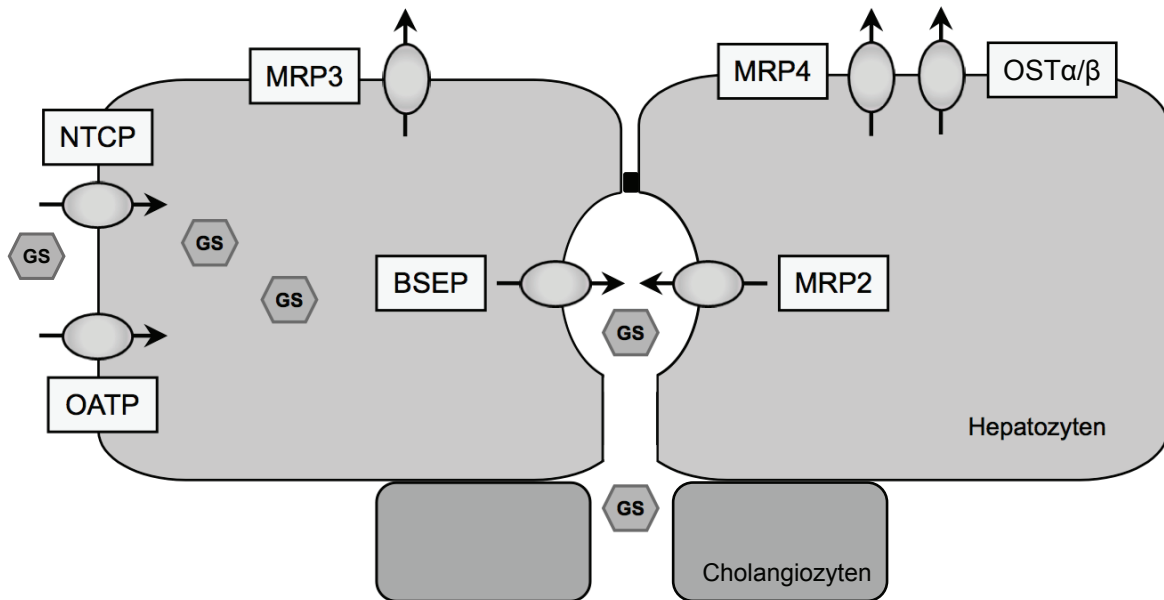


Abb. 1: Hepatozellulärer Transport von Gallensalzen

Gallensalze (GS) werden hauptsächlich durch NTCP, in geringerer Menge auch durch die verschiedenen OATPs aus dem portalvenösen Blut in den Hepatozyten transportiert. Der Transport aus dem Hepatozyten heraus in die Galle erfolgt im Wesentlichen über die Gallensalzexportpumpe BSEP, in geringerem Maße über MRP2. Die Transportproteine MRP3, MRP4 und OSTα/β sind zudem in der Lage, Gallensalze aus dem Hepatozyten zurück ins sinusoidale Blut zu transportieren.

Im Rahmen einer Cholestase kommt es zu einer Reihe von komplexen adaptiven Vorgängen. Eine mangelnde Adaptation oder gar das Fehlen eines Transporters kann aber auch Ursache für eine Erkrankung sein: So beispielsweise bei der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase Typ 2 (PFIC 2). Verschiedene Genmutationen führen hierbei zu einer verminderten Expression oder Aktivität von BSEP an der kanalikulären Membran, wodurch die Gallensäuren nur unzureichend sezerniert werden. Die Folge ist eine schwere cholestatische Lebererkrankung, die sich bereits in den ersten Lebensjahren manifestieren und innerhalb kurzer Zeit zur Leberzirrhose führen kann. (Strautnieks et al., 1998, 2008), (Jansen et al., 1998, 1999)

2.2 NTCP

NTCP (*Sodium taurocholate cotransporting polypeptide*, *Solute Carrier family 10, Member A1*, SLC10A1) ist der Haupttransporter für Gallensalze aus dem portalvenösen Blut in den Hepatozyten. Es ist damit ein zentraler Bestandteil des enterohepatischen Kreislaufs von Gallensalzen.

Ntcp wurde zunächst aus Rattenhepatozyten kloniert und charakterisiert: Es besteht aus 362 Aminosäuren, liegt glykosyliert mit einer molekularen Masse von etwa 51 kDa vor, ist an der basolateralen Hepatozytenmembran lokalisiert und verfügt über 7 oder 9 transmembranäre Domänen, wobei der C-Terminus intrazellulär und der N-Terminus extrazellulär gelegen ist (Hagenbuch et al., 1990, 1991), (Ananthanarayanan et al., 1994), (Stieger et al., 1994). Außer in Hepatozyten konnte Ntcp in der Ratte auch in der apikalen Membran von Azinuszellen des Pankreas nachgewiesen werden (Kim et al., 2002) (Abb. 2).

Das humane Protein besteht aus 349 Aminosäuren und ist zu 77% mit dem der Ratte identisch. Funktionell weisen Ntcp und NTCP sehr ähnliche Eigenschaften auf, wobei für das humane NTCP im Vergleich zu dem der Ratte oder Maus eine höhere Affinität für Taurocholat beschrieben wurde (Hagenbuch et al., 1994).

Ntcp transportiert über 80% der konjugierten Gallensalze im stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 (Na⁺:Gallensalz) aus dem portalvenösen Blut in den Hepatozyten und nutzt hierbei den durch die Na⁺K⁺-ATPase aufgebauten Natriumgradienten (Hagenbuch et al., 1996), (Weinman 1997). Neben den hauptsächlich transportierten Taurin- und Glycin-konjugierten Gallensalzen (Boyer et al., 1994), (Hagenbuch et al., 1994) können zu einem deutlich geringeren Anteil auch unkonjugierte oder sulfatierte Gallensalze transportiert werden (Hata et al., 2003), (Mita et al., 2005, 2006), (Craddock et al., 1998). Darüber hinaus wurde der Transport von einer Reihe unterschiedlicher Substanzen beschrieben, darunter Östrogenkonjugate (z.B. Estron-3-Sulfat), Bromosulfophtalein, Dehydroepiandrosteronsulfat, die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin und Thyroxin sowie an Taurocholat konjugierte Substanzen wie Chlorambucil-Taurocholat (Schroeder et al., 1998), (Meier et al., 1997), (Friesema et al., 1999), (Kullak-Ublick et al., 1997). Schließlich sind

Interaktionen mit diversen Pharmaka beschrieben, was nahelegt, dass Ntcp auch bei der Ausscheidung mancher Pharmaka und ihrer Metaboliten eine wichtige Rolle spielen könnte (Kim et al., 1999), (Mita et al., 2006), (Leslie et al., 2007).

Kürzlich wurde NTCP als *Entry*-Rezeptor für Hepatitis B- und D-Viren beschrieben (Yan et al., 2012).

Im Gegensatz zu einigen anderen hepatozellulären Transportern ist bisher kein genetischer Defekt von NTCP beschrieben, der mit einer Erkrankung assoziiert ist. Zwar wurden verschiedene Polymorphismen, die *in vitro* mit einer zum Teil sehr deutlichen Verminderung der Transportaktivität einhergingen, beschrieben, diesen konnten jedoch keine klinischen Phänotypen zugeordnet werden (Ho et al., 2004). Bei Patienten mit angeborener Hypercholanaemie, die man im Rahmen eines NTCP-Defekts erwarten würde, wurden Mutationen im *Tight Junction Protein 2* (TJP2), BAAT (*Bile Acid Coenzym A: Amino acid N-acetyltransferase*) (Carlton et al., 2003) und Claudin-1 nachgewiesen (Hadj-Rabia et al., 2004).

Im Rahmen einer Cholestase zeigt sich jedoch ein signifikanter Effekt auf die Regulation von NTCP. So konnte beispielsweise bei Patienten mit einer extrahepatischen Gallengangsatriesie im Lebergewebe ein deutlich reduzierter NTCP-mRNA-Level gezeigt werden, der nach chirurgischer Korrektur der biliären Drainage mittels Portoenterostomie anstieg (Shneider et al., 1997). Bei Patienten mit Progressiver familiärer intrahepatischer Cholestase (PFIC) Typ 2 und 3, welche durch Mutationen der Gallensalzexportpumpe BSEP (Typ 2) oder der Phospholipidfloppase MDR3 (Typ 3) hervorgerufen wird, fand sich eine fünfzigprozentige Reduktion der NTCP-Menge auf Proteinebene bei im Vergleich zur Kontrollgruppe unveränderter mRNA-Menge (Keitel et al., 2005). Im Tiermodell führen sowohl Endotoxin- wie auch Östrogen-induzierte Cholestase, obstruktive Cholestase durch Gallengangsligation sowie eine partielle Hepatektomie zu einer deutlichen Reduktion von Ntcp sowohl auf Protein- wie auch auf mRNA-Ebene (Lee et al., 2000).

2.3 Gallensäuren

Die Synthese, Sekretion und das Recycling von Gallensäuren gehören zu den zentralen Funktionen von Hepatozyten. Die aktive Sekretion von Gallensäuren entgegen einem deutlichen Konzentrationsgefälle über die apikale Hepatozytenmembran führt zu einem passiven Einstrom von Wasser in die Galle und bildet so eine treibende osmotische Kraft für Gallebildung und -fluss.

Gallensäuren werden über verschiedene Wege aus Cholesterol synthetisiert. Auf dem klassischen Weg wird Cholesterol zunächst von der Cholesterol-7 α -Hydroxylase an der 7 α -Position hydroxyliert und dann durch die microsomale Sterol-12 α -Hydroxylase an Position 12 α hydroxyliert (Eggertsen et al., 1996). Nach einigen weiteren Schritten entsteht schließlich Cholat. Auf dem alternativen Weg werden zunächst verschiedene Oxysterole gebildet, bevor sie 7 α -hydroxyliert werden und schließlich Chenodeoxychololat entsteht. Bei Menschen ist der klassische Weg dominant, nur etwa 10% der Gallensäureproduktion läuft über den alternativen Weg. Durch bakterielle Biotransformation im Darm entstehen die hydrophoben sekundären Gallensäuren Deoxychololat aus Cholat und Lithochololat aus Chenodeoxychololat; aus Chenodeoxychololat wird zudem durch bakterielle Epimerisation Ursodeoxychololat. Hierbei wird Chenodeoxychololat zunächst an der 7 α -Hydroxylgruppe oxidiert, wodurch 7-Ketolithochololat entsteht, und dann stereospezifisch mit Entstehung einer 7 β -Hydroxylgruppe reduziert (Lepercq et al., 2004).

Der menschliche Gallensäurepool besteht zu etwa 50% aus Cholat, weitere 20% aus dem sekundären Deoxychololat. Chenodeoxychololat macht etwa 30% aus, der Anteil von Lithochololat ist gering (Kullak-Ublick et al., 1995). Ursodeoxychololat macht ebenfalls nur einen sehr geringen Anteil von etwa 1% aus. Diese Zusammensetzung verändert sich im Laufe des Lebens und wird beispielsweise auch durch die individuelle Ernährung beeinflusst (Maillette de Buy Wenninger und Beuers, 2010).

Im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufs werden Gallensäuren, nachdem sie in die Galle sezerniert und so in den Darm gelangt sind, zu etwa 90% im terminalen Ileum, geringe Mengen auch im oberen Dünndarm, wieder resorbiert und mit dem portalvenösen Blut zur Leber zurücktransportiert. Daneben werden kleine Anteile vom biliären Epithel absorbiert und zu Hepatozyten zurückgeführt (Cholehe-

patischer Shunt). Nur etwa 5% der Gallensäuregesamtmenge wird ausgeschieden und stets neu synthetisiert.

Gallensäuren sind amphipathische Moleküle, weisen also sowohl hydrophobe wie auch hydrophile Eigenschaften auf; während ihrer Synthese erfolgen alle Hydroxylierungen an einer Seite. Nach der Synthese in Hepatozyten werden die Gallensäuren zum größten Teil mit Taurin oder Glycin konjugiert und liegen dann bei physiologischem pH in Galle und Blut als anionische Salze vor. Sie sind so wasserlöslicher und bessere Emulgatoren. Die Formation von gemischten Mizellen ermöglicht ihre Funktion als physiologische Detergentien: Lipide werden solubilisiert und können dann über die Galle in den Darm ausgeschieden werden. Nahrungslipide werden solubilisiert und dann resorbiert.

Desweiteren haben Gallensalze eine wichtige Funktion als Signalmoleküle. Verschiedene intrazelluläre Signalwege werden mittels transkriptioneller und posttranskriptioneller Mechanismen modifiziert, so vermitteln Gallensalze beispielsweise eine Insertion des Glukose 4-Transporters GLUT4 in die Plasmamembran, wodurch ihnen eine insulinähnliche Wirkung durch Regulation der Glukoseaufnahme aus dem Blut in den Hepatozyten zukommt (Nguyen und Bouscarel, 2008). Desweiteren zeigen Gallensalze Effekte auf hormonelle Signalwege und das zelluläre Immunsystem (Houten et al., 2006), (Keitel et al., 2008), (Yamazaki et al., 2001).

Im Rahmen einer Cholestase kommt es zu einer Akkumulation von hydrophoben Gallensalzen, welche dann toxische Effekte zeigen: Sie wirken membranschädigend insbesondere an Mitochondrien und in sehr hohen Konzentrationen auch an der Plasmamembran, desweiteren können sie Apoptose induzieren.

Auch ein therapeutischer Nutzen von Gallensalzen ist möglich: Ursodeoxycholsäure wirkt unter anderem über eine Insertion von BSEP und MRP2 in die kanalikuläre Membran choloretisch, also den Gallefluss fördernd, zeigt antiapoptotische und generell zytoprotektive Effekte und wird daher bei cholestatischen Syndromen eingesetzt (Maillette de Buy Wenniger und Beuers, 2010).

2.4 Proteinkinase C

Bei der Familie der Proteinkinase C-Isoenzyme handelt es sich um ubiquitär vorkommende Enzyme, die für die Weiterleitung rezeptorvermittelter Signale zuständig sind und damit eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Funktionen und Signalwegen spielen (Newton 2001, 2010), (Battaini et al., 2007).

Erstmalig beschrieben wurde die Proteinkinase C (PKC) 1977 als eine proteolytisch aktivierte Kinase in Hirngewebe (zunächst genannt PKM, aufgrund des zur Aktivierung benötigten Magnesiums), die dann als phospholipid-abhängig und durch Calcium aktiviert charakterisiert wurde. Später wurde Diacylglycerol als ein essentieller Aktivator der PKC beschrieben. Die Entdeckung der PKC als „Rezeptor“ für die das Tumorstadium fördernden Phorbolster führte zu einer Vielzahl von Untersuchungen zur intrazellulären Signaltransduktion (Nishizuka, 1984).

Inzwischen sind 10 verschiedene Isoformen der Proteinkinase C bekannt, die gemäß ihres Aufbaus und der daraus resultierenden Abhängigkeit von Kofaktoren in drei Gruppen eingeteilt werden: die „konventionellen“ (*conventional*) cPKC α , β I, β II und γ , die „neuen“ (*novel*) nPKC δ , ϵ , η und θ , sowie die „atypischen“ (*atypical*) aPKC ζ und ι .

Alle Isoenzyme besitzen eine konservierte c-terminale Kinasedomäne, die über die Substrat- und ATP-Bindungsstelle sowie verschiedene Phosphorylierungsstellen verfügt. Diese katalytische Einheit ist über ein flexibles „Gelenksegment“ mit der regulatorischen Einheit verbunden. Der Aufbau dieser regulatorischen Einheit unterscheidet sich je nach Isoenzymgruppe: Die konventionellen PKC-Isoformen besitzen zwei Tandem-C1-Domänen (C1A und C1B), welche Diacylglycerol und Phosphatidylserin binden (Hurley et al., 1997), (Johnson et al., 2000). Phorbolster binden kompetitiv zu Diacylglycerol ebenfalls an die C1-Domäne (Sharkey et al., 1984). Desweiteren verfügen die konventionellen PKCs über eine C2-Domäne, die in Abhängigkeit von Calcium anionische Phospholipide bindet. Dabei besteht eine Präferenz für Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂), was eine entscheidende Rolle für das *Targeting* der konventionellen PKCs an die Plasmamembran spielt (Corbalan-Garcia et al., 2007), (Evans et al., 2006), (Marin-Vicente et al., 2008).

Die neuen PKC-Isoformen besitzen ebenfalls eine Tandem C1-Domäne, die Diacylglycerol bindet. Ihre C2-Domäne ist jedoch eine Variante (*novel C2*), die Calcium nicht binden kann und somit diesem gegenüber insensitiv ist. Die nPKCs werden nur via Diacylglycerol reguliert und besitzen diesem gegenüber eine im Vergleich zu den konventionellen PKCs deutlich erhöhte Affinität (Giorgione et al., 2006).

Die regulatorische Einheit der atypischen PKC-Isoformen wiederum besteht aus einer Variante der C1-Domäne (*atypical C1*), welche eine veränderte Ligandenbindende Tasche aufweist, die weder Diacylglycerol noch Phorbol ester bindet (Kazanietz et al., 1994), (Pu et al., 2006). Die Regulation der atypischen PKCs findet auch nicht über Calcium statt, sondern über Protein-Protein-Interaktionen, wofür die aPKCs über eine weitere Domäne, PB1, verfügen (Lamark et al., 2003).

Ein weiterer Bestandteil der regulatorischen Einheit ist ein autoinhibitorisches Pseudosubstrat, dessen Aminosäuresequenz für die jeweilige Isoform spezifisch ist. Es besetzt die substratbindende Tasche der Kinasedomäne und hält so die PKC im inaktiven Zustand. Aktivierung der PKC führt, unabhängig davon, ob diese durch Bindung von Cofaktoren oder Cofaktor-unabhängigen Substanzen erfolgt, zu einer Freisetzung des Pseudosubstrats (House et al., 1987), (Makowske et al., 1989), (Orr et al., 1992, 1994) (Abb.3).

Eine Aktivierung der PKC geht mit einer Translokation des individuellen aktivierten Isoenzym an die Plasmamembran, Bestandteile des Zytoskeletts, den Nucleus oder andere subzelluläre Strukturen einher. Für diese spezifische Translokation sind Ankerproteine (RACKs, *Receptors for activated C-kinase*) verantwortlich, welche die PKC binden (Gopalkrishna et al., 1986), (Mochly-Rosen et al., 1990, 1991). Auf den gleichen Stimulus hin können individuelle PKC-Isoformen an unterschiedliche subzelluläre Strukturen translozieren, wo dann wiederum selektive Substratphosphorylierungen zu den verschiedenen, auch gegensätzlichen Funktionen führen.

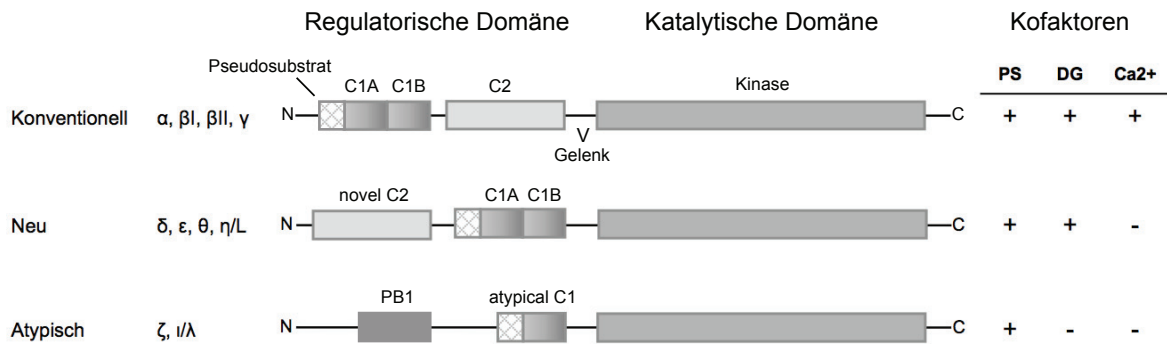


Abb. 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Isoformen der Proteinkinase C

Alle drei Gruppen der PKC-Isoformen besitzen eine C-terminale Kinasedomäne, welche durch ein Gelenksegment mit der regulatorischen Domäne verbunden ist. Konventionelle und neue PKCs verfügen über eine Tandem-C1 Domäne, welche Phosphatidylserin (PS) und Diacylglycerol (DG) bindet. Die atypischen Isoformen hingegen verfügen über eine C1-Variante, die Diacylglycerol nicht binden kann. Sie besitzen stattdessen eine weitere Domäne, PB1, worüber sie mittels Protein-Protein-Interaktionen reguliert werden. Die konventionellen Isoformen verfügen desweiteren über eine C2-Domäne, die in Abhängigkeit von Calcium anionische Phospholipide bindet; die C2-Variante der neuen PKCs kann hingegen Calcium nicht binden. Alle Isoformen verfügen über ein Isoform-spezifisches autoinhibitorisches Pseudosubstrat (nach Newton, 2010).

Gallensalze können wahrscheinlich einzelne PKC-Isoformen auf einem Weg unabhängig von der Diacylglycerol-/Phorbolsterbindungsstelle aktivieren (Beuers et al., 1996), (Stravitz et al., 1996).

2.5 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Hepatozelluläre Transportsysteme unterliegen strengen Regulationsmechanismen, die adaptive Reaktionen auf wechselnde Bedingungen darstellen. Langfristige Adaptationen erfolgen auf der Ebene der Transkription. Da sich die portalvenösen Gallensalzkonzentrationen rapide ändern können (beispielsweise postprandial), existieren verschiedene posttranslationale Mechanismen, die eine kurzfristige Adaptation ermöglichen. Hierzu gehören Modifikationen des Protein-Targetings mit unterschiedlicher Dichte eines Transporters an der Plasmamembran,

welche durch Änderungen des Phosphorylierungsgrades vermittelt wird (Anwer et al., 2005).

In dieser Arbeit sollte die kurzfristige Regulation von Ntcp untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte zunächst eine Methode etabliert werden, die es ermöglicht, den membranständigen Anteil von Ntcp im Verhältnis zu seiner Gesamtmenge mittels Durchflusszytometrie zu messen. Dieses System sollte unter Anwendung verschiedener potentieller Effektoren (PKC, Gallensalze) validiert werden. Es sollte insbesondere die Frage beantwortet werden, ob es Effektoren gibt, die eine Endozytose von Ntcp bewirken können.

3. Material und Methoden

3.1 Herstellung des FLAG-Ntcp-EGFP Plasmids

In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde ein Ntcp-EGFP-Fusionsprotein erstellt, welches in HepG2 Zellen stabil exprimiert, korrekt lokalisiert und als funktionsidentisch zu Ntcp charakterisiert wurde. Hierzu wurde eine für das Ntcp der Ratte kodierende Nukleotidsequenz in den kommerziell erhältlichen pEGFP-N1-Vektor (Clontech Corporation, Heidelberg) einkloniert. Das resultierende Plasmid kodiert für ein Ntcp, welches am intrazellulären C-Terminus mit einem grün fluoreszierenden Protein (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP) versehen ist (Kullak-Ublick et al., 2000).

Dieses Plasmid enthält am 5'-Ende des Ntcp eine Schnittstelle für die Endonuklease Van911 (Abb.4), die für die Einklonierung des FLAG-Tag kodierenden Oligonukleotids genutzt wurde.

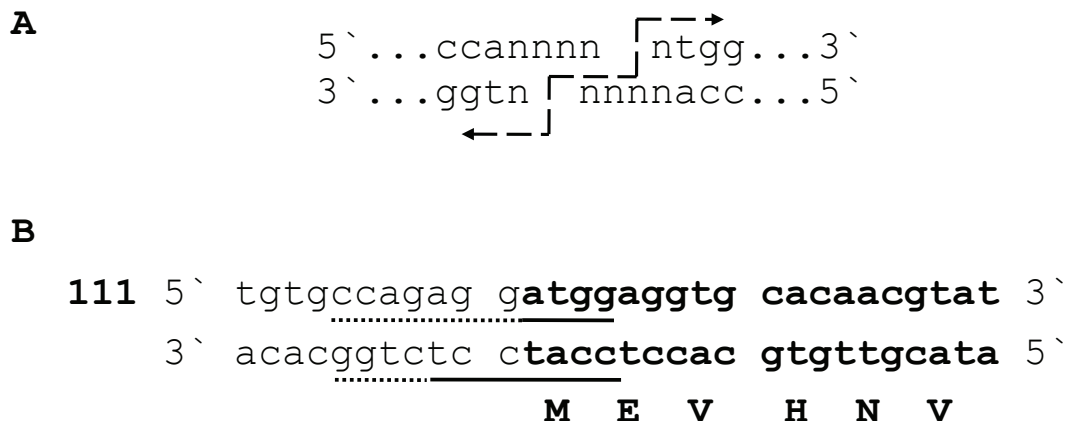


Abb.4: Van911

A) Erkennungssequenz der Endonuklease Van911 (n=jedes mögliche Nukleotid und Pfeil=Schnittstelle) sowie B) ihre Position in der Ntcp-Sequenz (fett = translatierter Bereich); das Ntcp-Startcodon bleibt erhalten.

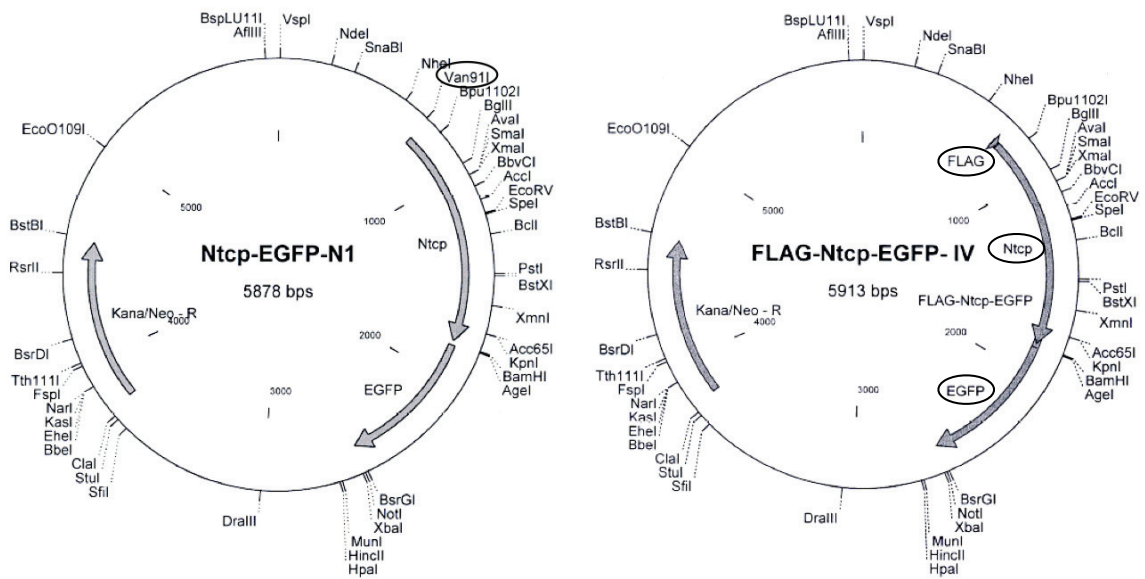


Abb. 5: Vektorkarten der verwendeten Plasmide

Karten des Ausgangsplasmids, welches die Ntcp-EGFP-Sequenz und an deren 5'-Ende die Van911-Schnittstelle enthält (Ntcp-EGFP-N1), sowie des Zielplasmids, welches die Sequenz für FLAG-Ntcp-EGFP enthält (FLAG-Ntcp-EGFP-IV).

Beim FLAG-Tag handelt es sich um ein Oktapeptid (DYKDDDDK), welches durch spezifische monoklonale Antikörper erkannt wird (Hopp et al., 1988).

Das resultierende Plasmid kodiert für ein Ntcp-Fusionsprotein, welches am extrazellulären N-Terminus den FLAG-Tag und am intrazellulären C-Terminus ein EGFP trägt (Abb.5).

Erstellung des FLAG-Tags

Zur Herstellung des FLAG-Tags wurden partiell überlappende Oligonukleotide synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg). Dabei wurden verschiedene Sequenzen verwendet: Das erste Primerpaar FLAG-Ntcp-for1 und FLAG-Ntcp-rev2 kodiert für ein Startcodon gefolgt von dem klassischen FLAG-Tag (DYKDDDDK). Aufgrund des nach Aufschneiden des Vektors mit Van911 erhaltenen bleibenden Ntcp-Startcodons wurde das zweite Primerpaar FLAG-Ntcp-for4 und FLAG-Ntcp-rev4 so

gewählt, dass es für einen FLAG-Tag mit gemäß der Kozak-Sequenz optimiertem Startcodon (Kozak, 1986 und 1987) kodiert (Tabelle 1).

Zum *Annealing* wurden je 20 µl Primerlösung (100 pmol/µl) mit dem jeweiligen Partnerprimer für 2 Minuten bei 93°C inkubiert und dann langsam auf < 30°C abgekühlt. Die freien Enden des Produkts waren komplementär zur Restriktionsstelle der Endonuklease Van91I.

Primer für die Plasmidkonstruktion	
Bezeichnung	Sequenz
FLAG-Ntcp-for1	5'-ATG GAC TAC AAG GAC GAT GAC GAT AAG AGG-3'
FLAG-Ntcp-rev2	5'-CTT ATC GTC ATC GTC CTT GTA GTC CAT CCT-3'
FLAG-Ntcp-for4	5'-CC GCC ATG GAC TAC AAG GAC GAT GAC GAT AAG AGG-3'
FLAG-Ntcp-rev4	5'-CTT ATC GTC ATC GTC CTT GTA GTC CAT GGC GGC CT-3'

Tabelle 1: Zur Erstellung des FLAG-Tags verwendete Primer

Restriktionsverdau des Vektors Ntcp-EGFP-N1 mit Van91I

Der Ntcp-EGFP-N1-Vektor wurde mit der Restriktionsendonuklease Van91I (Roche, Mannheim) aufgeschnitten. Hierzu wurden 2 µg des Vektors mit 5 IU Van91I und dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Gelelektrophorese

Zur Identifizierung des linearisierten Vektors wurde eine Gelelektrophorese in einem 1% Agarosegel durchgeführt. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose (Cambrex, Rockland, USA) mit 1xTAE-Puffer (40 mmol/l Tris-Acetat, 1 mmol/l

EDTA) aufgeköcht, nach Abkühlen mit 5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen) vermischt und in eine Gelapparatur gegossen. Das polymerisierte Gel wurde in einer Gelkammer mit 1xTAE-Puffer überschichtet. 2 µl des Restriktionsverdaus und 0,5 µl des unverdauten Vektors wurden mit 5 µl Bromphenolblau-Ladepuffer gemischt. Zur Beurteilung der Größe der DNA-Fragmente wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker (SmartLadder, Eurogentec, Köln) aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 150 V und wurde bei Erreichen des Gelrandes beendet. Anschließend wurde das Gel unter einem UV-Leuchttisch ausgewertet und zur Dokumentation fotografiert.

Gelextraktion

Der im Agarosegel aufgetrennte linearisierte Vektor wurde auf dem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion erfolgte mit Hilfe des QIAquick-Gelextraktionskits (Qiagen, Hilden) gemäß der Anleitung des Herstellers. Die Elution des Produkts erfolgte im letzten Schritt in 30 µl des mitgelieferten Elutionspuffers.

Dephosphorylierung der Plasmid-DNA

Beim Aufschneiden des Vektors mit Van91I entstanden kohäsive Enden, die sich in einer Ligationsreaktion wieder miteinander verbinden können. Um dies zu verhindern und so die Einschleusung eines DNA-Fragments zu erleichtern, wurde die linearisierte Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase behandelt. Diese entfernt die Phosphatreste am freien 5'-Ende der DNA, eine Autoligation des Vektors wird so verhindert. 0,5 µl CIAP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, Roche, Mannheim) und 2 µl des mitgelieferten 10x Puffers wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl zur DNA gegeben, bei 37°C für 1 Stunde inkubiert und dann bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert.

Phosphorylierung der Oligonukleotide nach dem *Annealing*

Um die den FLAG-*Tag* kodierenden Oligonukleotide und den aufgeschnittenen und dephosphorylierten Vektor ligieren zu können, mussten die Oligonukleotide phosphoryliert werden. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

100 pM Oligonukleotide	1 µl
Tris/HCl pH 8	3 µl
0,2 M MgCl ₂	1,5 µl
0,1 M DTT	1,5 µl
1 mM ATP	13 µl
T4-Polynukleotid-Kinase (10 U)	1 µl
H ₂ O	9 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C und dann zur Inaktivierung der Kinase für 15 Minuten bei 65°C inkubiert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der Oligonukleotide und des Vektors wurde mittels T4-Ligase (Roche, Mannheim) nach Protokoll des Herstellers unter Verwendung des mitgelieferten Puffers durchgeführt. Vektor und *Insert* wurden dabei in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor: *Insert*) eingesetzt und die Ligationsreaktion in einem Endvolumen von 20 µl bei 4°C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde der Ligationsansatz direkt zur Transformation eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

Kultivierung von Bakterienstämmen

Zur Anzucht der hier verwendeten TOP10F' One Shot E.coli (Invitrogen, Darmstadt) wurde LB-Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-Tryptone-Peptide, 5 g/l Hefeextrakt, Aqua dest.) mit 25 mg/l Kanamycin gemischt. Desweiteren wurden aus

32 g/l LB-Agar (Invitrogen, Darmstadt) gegossene und ebenfalls mit 25 mg/l Kanamycin versetzte Platten verwendet.

Für Übernachtskulturen wurden 3 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie oder -Suspension beimpft und unter Schütteln bei 37°C bebrütet. Aus der so entstandenen Suspension wurde entweder Plasmid-DNA isoliert oder eine weitere, größere Bakterienkultur angesetzt. Hierzu wurden 150 ml Kanamycin-haltiges LB-Medium inokuliert und ebenfalls über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Zum Ansatz von Dauerkulturen wurden 800 µl Bakteriensuspension mit 200 µl Glycerol vermischt und bei -80°C eingefroren.

Transformation in kompetente Bakterien

Zum Einbringen des ligierten Plasmids in chemisch-transformationskompetente E.coli wurde der TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Hierbei wurden 2 µl des Ligationsansatzes und TOP10F' One Shot E.coli sowie das mitgelieferte SOC-Medium gemäß des Protokolls des Herstellers für „One Shot chemische Transformation“ eingesetzt.

Zuletzt wurden 10 - 20 µl der E.coli-Bakteriensuspension aus der Transformation auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob die auf der Agarplatte gewachsenen Bakterienkolonien das Plasmid enthielten, wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Als Primer dienten hierbei der jeweilige FLAG-Forwardprimer sowie ein Rückwärtsprimer, der im Bereich des Stopcodons des Ntcp bindet (Tabelle 2).

Primer für die Kolonie-PCR	
Bezeichnung	Sequenz
FLAG-Ntcp-for1	5'-ATG GAC TAC AAG GAC GAT GAC GAT AAG AGG-3'
FLAG-Ntcp-for4	5'-CC GCC ATG GAC TAC AAG GAC GAT GAC GAT AAG AGG-3'
Ntcp-STOP-rev1	5'-CTA ATT TGC CAT CTG ACC AGA ATT CAG-3'

Tabelle 2: Zur Kolonie-PCR verwendete Primer

Für die PCR wurde Taq-Polymerase (Invitrogen, Darmstadt) sowie die mitgelieferten Puffer und Nukleotide benutzt. Die zu untersuchenden Klone wurden mit der Pipettenspitze angepickt, markiert und direkt in den Reaktionsansatz verbracht:

10x PCR Puffer	0,9 µl
dNTP (10 mM)	0,2 µl
5'Oligonukleotid (3 µM)	1,5 µl
3'Oligonukleotid (3 µM)	1,5 µl
H ₂ O	5,8 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl

Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tabelle 3):

Denaturierung	5 min	94°C	
Denaturierung	15 sec	92°C	30 Zyklen
Annealing	30 sec	58°C	
Elongation	2 min 15 sec	68°C	
Extension	7 min	68°C	
Abkühlen	∞	4°C	

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen der Kolonie-PCR

Anschließend wurden die Proben auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, analysiert und dokumentiert.

Positive Klone wurden von der Agarplatte gepickt und über Nacht in Kanamycin-haltigem LB-Medium bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Hierzu wurde das Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Aufreinigung größerer Bakterienkulturen wurde das Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll eingesetzt.

Der DNA-Gehalt der so erhaltenen Lösung wurde in einer Quarzküvette mittels Spektrometrie ermittelt. Hierzu wurde eine 1:100 Verdünnung der Lösung erstellt und der Nukleinsäuregehalt in einem UV-Spektrometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Freiburg) bei 260 nm bestimmt.

Sequenzierung

Um die korrekte Insertion des FLAG-*Tags* in den Plasmidvektor zu prüfen, wurden die DNA-Plasmide sequenziert. Hierzu wurde der 5'Oligonukleotidprimer des FLAG-*Tags* sowie ein reverser Ntcp-Sequenzierungsprimer verwendet, der die Nukleotide 346-327 des Ntcp komplementär bindet (Tabelle 4). Die Sequenzierung wurde am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt (Sanger Sequenzierung).

Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels NCBI Blast 2 Sequences (www.pubmed.com) mit der Referenzsequenz des Ntcp-Gens (NM_017047.1) verglichen (Abb.6).

Primer für die Plasmid-Sequenzierung	
Bezeichnung	Sequenz
FLAG-Ntcp-for1	5'-ATG GAC TAC AAG GAC GAT GAC GAT AAG AGG-3'
FLAG-Ntcp-for4	5'-CC GCC ATG GAC TAC AAG GAC GAT GAC GAT AAG AGG-3'
Ntcp-seq2-rev	5'-AGC GAG GGG CAT GAT GCC AA-3'

Tabelle 4: Zur Sequenzierung eingesetzte Primer

```

1  cagccacatt ttgtccacaa actctgtcct gaaaggggac tgactgaaga aaacatccag
61  caagctctgg gcaaggaagg acagcagcag agagcgaggg ccgtgttcgc tgtgccagag
121 gatggaggtg cacaacgat cagcccttt caatttctcc ctgccgctg gctttggcca
181 ccgggccaca gacaaggcg ttagcatcat cctggtgtta atgttgctgc ttatcatgct
241 ctcactgggc tgcaccatgg aattcagcaa gatcaaggct cacttgtgga agcccaaagg
301 ggtgatcgtt gccttgggtg cccagtttg catcatgccc ctcgctgctt ttcttctcgg
361 caagatcttt cacctgagca acattgaagc tctggccatc ctcatctgtg gctgctctcc
421 cggggggaa ttgtccaacc tcttcacct ggccatgaag ggggacatga acctcagcat
481 cgtgatgacc acctgctcca gcttcagtgc cttgggcatg atgccactcc tcttatacgt
541 ctacagcaaa ggcatctacg atggagacct taaggacaag gtgccctaca aaggcattat
601 gatataccta gtcatagttc tcattccttg caccataggg atcgtcctca agtccaaaag
661 gcacactat gtaccctaca tcctcaaggg aggcatgatc atcaccttcc tcctctctgt
721 ggctgtcaca gcctctctg tcatcaatgt gggcaacagc atcatgttcg tcatgacacc
781 acacttactg gctacctcct ccctgatgcc ctttctctggc tttctgatgg gttacattct
841 cttctgctct ttccaactca atccaagctg cagacgcacc atcagcatgg aacaggatt
901 ccaaaacatt caactctgtt ctaccatcct caatgtgacc ttccccctg aagtcattgg
961 gcacttttc tttcttctc tcctctacat gattttccag cttgcagaag gacttctcat
1021 catcattatc ttccggtgct atgagaaaa caagcctcca aaggaccaa caaaaattac
1081 ctacaaagct gctgcaactg aggatgctac tccagcagct ctggaaaaag gtaccacaaa
1141 tgggaatatt cctcctctcc aacctggtcc ttccccta ggcctgaatt ctggtcagat
1201 ggcaaattag aatgtgaaac ttcgaagcag caagaaaagg aacgaacgtc gacgttgccg
1261 gaatgtttgt ctagcacttc gggcaaacca tcagaacat ggagccatga actgagacag
1321 aagggcatct atctatccag taactgtaac ccataccaat ttgcttttgt ttaaattttc
1381 tatttaaaag ataaacaaga attaggcaaa aatgttctg cctataatcc cgatgctcag
1441 aaactcaaga tcaaccttaa gtatacaaaa cagactgtc tcaagaaacc aaaaacactt
1501 ttcagtggct atgaactcta tgaaagctga accaaacagc ttcatctgat aacattaac
1561 ttcactattt ccaaaacttc cagtaagcag gtgttttgtt cattaaacat ccacaacctg
1621 cttcatgtta ctcaaaatga aataaaagtgc aactcctagt tct

```

Abb.6: Referenzsequenz des Ntcp-Gens der Ratte
(Accession NM_017047.1, mRNA); fett = translatierter Bereich

3.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden

Kultivierung von HepG2-Zellen

Die Kultivierung von HepG2-Zellen (ATCC, Manassas, USA) erfolgte in Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) bei 37°C und 5% CO₂. Als Nährmedium diente Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium Nutrimix F12 (DMEM, Invitrogen, Darmstadt), dem 10% foetales Kälberserum (PAA, Cölbe) zugeführt wurde.

Alle 3 Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt, bei Subkonfluenz wurden die Zellen mit 0.05% Trypsin/EDTA (Cytogen, Sinn) gesplittet und in neue Kulturflaschen ausgesät. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin überschichtet. Nach etwa 7 Minuten bei 37°C lösten sich die Zellen ab und konnten mit einer Pipette abgenommen werden. Ein Anteil der Zellsuspension wurde mit frischem Medium vermischt und in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Transfektion und Selektion stabiler Zelllinien

Die Transfektion des FLAG-Ntcp-EGFP-Plasmids in HepG2-Zellen erfolgte mittels Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Darmstadt) gemäß Herstellerangaben im Verhältnis 1:3 DNA/Lipofectamine.

HepG2-Zellen wurden trypsinisiert und abgelöst, dann 3 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert, das Trypsin abgenommen und die Zellen in DMEM ohne FCS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit der DNA/Lipofectaminesuspension vermischt und in 6 cm-Platten ausgesät. Nach 24 h erfolgte eine Passage in 10 cm-Schalen und reguläres Medium.

Zur Kultivierung einer Zelllinie, welche FLAG-Ntcp-EGFP stabil exprimiert, wurden die Zellen 48 h nach Transfektion in Medium mit Zusatz von 250 mg/l Genitacin (Gibco, Invitrogen, Darmstadt) kultiviert. Das transfizierte Plasmid trägt eine Resistenz gegenüber Genitacin, so dass Transfektanten dem Selektionsdruck standhalten, während nicht-transfizierte Zellen absterben. In den nächsten Wochen wurden die Zellen so weiter kultiviert. Zwischenzeitlich wurden mittels Fluoreszenzmikro-

skopie (Axioskop, Zeiss) einzelne EGFP-exprimierende Klone markiert, mit sterilen Pipettenspitzen gepickt, in 24 well-Platten ausgesät und weiter kultiviert. Zur Beurteilung der Expression des FLAG-Ntcp-EGFP wurden die selektierten Klone auf Deckgläschen kultiviert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden Klone, welche eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von EGFP an der Plasmamembran zeigten, ausgewählt und für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Anlage von Dauerkulturen

Die das FLAG-Ntcp-EGFP-Konstrukt stabil exprimierenden Klone wurden zur Konservierung eingefroren. Hierzu wurden die Zellen bei Konfluenz trypsinisiert, abgelöst und zur Inaktivierung des Trypsins in Medium aufgenommen. Die Suspension wurde bei 4°C für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Cryomedium (17 ml DMEM, 2,5 ml DMSO, 2,5 ml FCS, steril filtriert) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein kältestabiles Röhrchen verbracht und dieses zunächst für 1 h bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die eingefrorenen Zellen bei -80°C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut, 1ml der Zellsuspension zu 9 ml frischem Kulturmedium gegeben und in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Absetzen der Zellen am Flaschenboden erfolgte ein Wechsel des Mediums.

Kultivierung in Gegenwart von Aktivatoren/Hemmstoffen

Für Immunfluoreszenzstudien mittels Mikroskopie und Durchflusszytometrie wurden die Zellen in 12 well-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) und auf Deckgläschen in 24 well-Platten ausgesät. Bei Subkonfluenz wurde das Medium ausgetauscht, die jeweiligen Aktivatoren, Hemmstoffe und Gallensalze frischem Medium zugesetzt und die Zellen weiter für die jeweiligen Stimulationszeiten bei 37°C kultiviert (Tabelle 5).

Substanz	Konzentration	Inkubationszeit	bezogen von
Gö 6850	1 µmol/l	1 h	Calbiochem, Bad Soden
Ro 31-8220	5 µmol/l	1 h	Calbiochem, Bad Soden
Chelerythrine	20 µmol/l	1 h	Calbiochem, Bad Soden
Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA)	100 nmol/l	1 h	Calbiochem, Bad Soden
Thymeleatoxin (Ttx)	100 nmol/l	1 h	Calbiochem, Bad Soden
Bafilomycin A	100 nmol/l	1 h, 16 h	Alexis, Grünberg
MG-132	2 µmol/l	16 h	Sigma, Deisenhofen
Taurocholat (TC)	100 µmol/l	1 h	Sigma, Deisenhofen
Taurochenodeoxycholat (TCDC)	100 µmol/l	1 h	Sigma, Deisenhofen
Tauroursodeoxycholat (TUDC)	100 µmol/l	1 h	Sigma, Deisenhofen
Taurolithocholat-Sulfat (TLCS)	100 µmol/l	1 h	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 5: Eingesetzte Substanzen

3.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die stabil transfizierten HepG2-Zellen wurden auf 12 mm-Deckgläschen in 24 well-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesät und wie oben beschrieben versorgt.

Für die Anfärbung von extrazellulären Strukturen wurden die Deckgläschen auf Eis gelegt und für 1 h in einer feuchten Kammer mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal (1 min, 10 min, 10 min) mit eiskaltem PBS gewaschen und dann für 5 Minuten in eiskaltem Methanol (100%, -20°C) fixiert. Zur Rehydrierung erfolgte ein weiterer Waschschrift. Zur Anfärbung von intrazellulär gelegenen Strukturen wurden die Zellen direkt in Methanol fixiert und damit permeabilisiert, dann ebenfalls mit dem Primärantikörper inkubiert und mit PBS gewaschen.

Primärantikörper		
Antikörper	Verdünnung	bezogen von
mouse@FLAG M2	1:500	Sigma, Deisenhofen
mouse@EGFP	1:25	Santa Cruz, Heidelberg
Sekundärantikörper		
goat@mouse Cy3	1:500	Jackson, West Grove, USA

Tabelle 6: Zur Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzte Antikörper

Anschließend wurden die auf den Deckgläschen fixierten Zellen mit dem Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten feuchten Kammer inkubiert (Tabelle 6).

Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf einen mit einem Tropfen Fluoreszenz Mounting Medium (Dako, Hamburg) versehenen Objektträger gelegt und mit handelsüblichem Nagellack fixiert.

Nach dem Trocknen erfolgte die Mikroskopie mit einem Leica TCS-NT konfokalem Laserscanning-System auf einem Leica DM IRB inversem Mikroskop (Leica, Bensheim). Die Detektion erfolgte dabei bei 488 nm (EGFP) und 568 nm (Cy3).

Die Immunfluoreszenzbilder wurden zudem mit freundlicher Hilfe von Frau PD Dr. Keitel mit einem konfokalen Laserrastermikroskop (LSM 510, Zeiss, Oberkochen) aufgenommen.

3.4 Durchflusszytometrie

Vorbereitung der Zellen

Untransfizierte HepG2 Zellen sowie die FLAG-Ntcp-EGFP stabil exprimierenden Zellen wurden in 12 well-Platten ausgesät und bei Subkonfluenz zur Messung eingesetzt.

Nach Stimulation der Zellen (siehe oben) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Zum Ablösen aus der 12 well-Platte wurden die Zellen entweder mit Accutase (Millipore, Schwalbach) bedeckt und für 4 Minuten, oder mit Trypsin/EDTA bedeckt für 7 Minuten, bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem PBS aufgenommen und in 1,5 ml Tubes gegeben.

Um die Intaktheit der Zellmembran zu gewährleisten, wurden die Messungen an unfixierten Zellen durchgeführt. Zur Hemmung des Zellstoffwechsels erfolgten daher alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis. Statt eines fluoreszierenden Sekundäran-tikörpers wurde ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Fab-Fragment markierter Primäran-tikörper verwendet. Die Markierung des @FLAG M2 Antikör-per erfolgte mit dem Zenon Labeling Kit nach Protokoll des Herstellers in einem Verhältnis von 1:3 (Antikörper:Fab-Fragment) (Tabelle 7) (Abb. 7).

Verwendete Antikörper		
Antikörper	Verdünnung	bezogen von
@FLAG M2	1:2500	Sigma, Deisenhofen
Alexa Fluor 647 R-Phycoerythrin Zenon IgG Labeling Kit		Invitrogen, Darmstadt

Tabelle 7: Zur Durchflusszytometrie eingesetzte Antikörper

Die Zellsuspension wurde mit dem markierten Antikörper vermischt und bei 4°C in einem Schüttler für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die Zellen bei 4500 x g für 30 Sekunden zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Es erfolgten 2 weitere Waschschrirte (jeweils 10 Minuten).

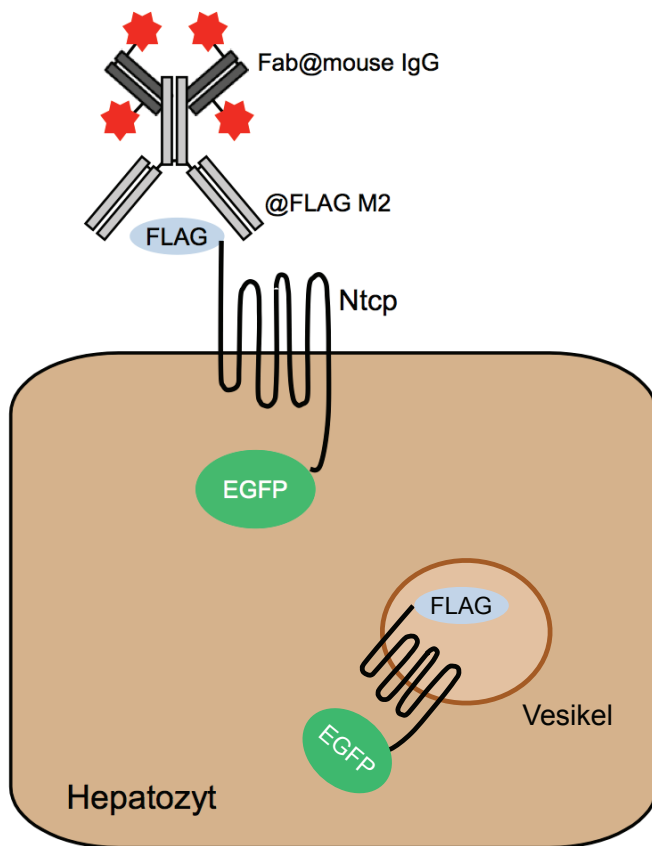


Abb.7: Schematische Darstellung des angefärbten FLAG-Ntcp-EGFP

An nicht permeabilisierten Zellen bindet der direkt mit einem an Alexa Fluor 647 R-Phycoerythrin (rot) gekoppelten Fab-Fragment markierte Anti-FLAG-M2-Antikörper an den extrazellulär gelegenen FLAG-Tag.

Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit einem FACS Calibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Hierbei wird die Zellsuspension in eine hochpräzise Messküvette geleitet, wobei die Zellen vereinzelt durch einen Laserstrahl geführt und dann das entstehende Streulicht sowie Fluoreszenzsignale jeder einzelnen Zelle detektiert werden.

Das von den transfizierten Zellen exprimierte EGFP wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, und die entstehende Fluoreszenz konnte bei 530 ± 30 nm (Band Pass Filter) gemessen werden. Aufgrund der Ausstattung des Zytometers mit nur einem Exzitationslaser musste für den @FLAG M2-Antikörper ein Farbstoff gefunden werden, welcher wie EGFP bei 488 nm anregbar ist, dessen Emissionsspektrum sich jedoch weit genug unterscheidet, so dass Nebensignaleffekte (*cross-talk*) vermieden werden können. Somit kam Alexa Fluor 647 R-Phyco-

erythrin zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um ein Tandemkonjugat, welches sich auf molekularer Ebene einen Energietransfer zunutze macht (FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*): R-Phycoerythrin wird bei 488 nm angeregt und transferiert wiederum seine Energie zum Akzeptormolekül Alexa Fluor 647, welches bei 600 nm angeregt wird. Dieses Konstrukt hat ein Emissionsmaximum bei 667 nm, so kann die Fluoreszenz im Long Pass Filter bei > 670 nm gemessen werden.

Die gefärbten und gewaschenen Zellen wurden durch eine 70 µm Filtermembran (Becton Dickinson) gegeben, um die Zellen zu vereinzeln und Verklumpungen zu vermeiden. Die Zellsuspension wurde mit 1 ml FACS Flow-Lösung (Becton Dickinson) vermischt und zur Messung eingesetzt.

Gemessen wurden die Fluoreszenzintensitäten der grünen (530 nm) und roten (> 670 nm) Farbstoffe sowie Zellgröße (*Forward Scatter*) und Granularität (*Side Scatter*). Je Versuchsansatz wurden etwa 20.000 einzelne Zellen gemessen, die Messungen der verschiedenen Versuchsansätze wurden mit identischen Einstellungen des Durchflusszytometers durchgeführt.

Auswertung der Daten

Die Auswertung der mit dem Durchflusszytometer generierten Rohdaten erfolgte mit FCS Express (De Novo Software, Los Angeles, USA).

Zunächst wurde anhand der Kriterien Zellgröße, gemessen im *Forward Scatter*, und Granularität, gemessen im *Side Scatter*, ein *Dot-Blot* erstellt und die zu analysierende Zellpopulation identifiziert und markiert.

Die Darstellung der gemessenen Werte der so markierten Zellen erfolgte in kumulativen Histogrammen. Hierbei werden die gemessenen Werte auf der X-Achse nicht nebeneinander dargestellt, sondern aufaddiert. Ein Wert im kumulativen Histogramm entspricht somit immer der Summe aller darunter liegenden Werte. Die hieraus entstehenden sigmoiden Kurven aus unterschiedlichen Versuchsbedingungen lassen sich dadurch leicht vergleichen.

Statistik

Die Experimente wurden in mindestens 3 unabhängigen Zellpräparationen und mit beiden Plasmidvarianten durchgeführt.

Zur statistischen Auswertung wurden die gemessenen Werte der 25., 50. und 75. Perzentile verwendet. Um Vergleichbarkeit der einzelnen Zellpräparationen zu ermöglichen, wurden die Werte auf den Maximalwert des jeweiligen Experiments normalisiert, das heißt jeder Wert einer Messung wurde durch den Maximalwert der jeweiligen Messung dividiert.

Die so erhaltenen Werte wurden im einseitigen Student's t-Test für unabhängige Stichproben analysiert, wobei $p = < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung des beidseitig getaggtten Ntcp

In das bereits existente Ntcp-EGFP-N1-Plasmid (Kullak-Ublick et al., 2000) wurde am 5'Ende des Ntcp ein Oligonukleotid inseriert, welches für den klassischen FLAG-*Tag* oder für einen FLAG-*Tag* mit gemäß Kozak-Sequenz optimiertem Startcodon kodiert. Die korrekte und vollständige Insertion des Oligonukleotids wurde mittels Sequenzierung überprüft und bestätigt. Das resultierende Plasmid kodiert für ein Ntcp-Fusionsprotein, welches am extrazellulären N-Terminus einen FLAG-*Tag* und am intrazellulären C-Terminus ein grün fluoreszierendes Protein (EGFP) trägt.

4.2 Expression des FLAG-Ntcp-EGFP in HepG2-Zellen

Zur Untersuchung der Endozytose von Ntcp an der Plasmamembran wurde das für FLAG-Ntcp-EGFP kodierende Plasmid in HepG2-Zellen transfiziert. Mittels Immunfluoreszenz wurde zunächst untersucht, ob das Fusionsprotein in den Zellen stabil exprimiert und ob es korrekt an die basolaterale Zellmembran lokalisiert wird. Tatsächlich fand sich eine signifikante Menge Ntcp an der Plasmamembran. Ebenfalls fanden sich einzelne intrazelluläre Ansammlungen grüner Fluoreszenz, die wahrscheinlich vesikulären Strukturen innerhalb der Zelle zuzuordnen sind (Abb. 8, Pfeile), was für die Lokalisation von Ntcp in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten spricht. Bei Anfärbung von nicht permeabilisierten Zellen mit einem gegen EGFP gerichteten Antikörper war keine Fluoreszenz nachweisbar, was für die streng intrazelluläre Lokalisation des am C-Terminus des Ntcp befindlichen EGFP spricht (Abb.8 A-C). Wurden die Zellen dagegen permeabilisiert, so war das intrazelluläre EGFP anfärbbar. Die durch den Antikörper vermittelte rote Fluoreszenz korrelierte mit der Eigenfluoreszenz des EGFP, so dass von einer spezifischen Bindung des Antiköpers ausgegangen werden konnte (Abb.8 D-F).

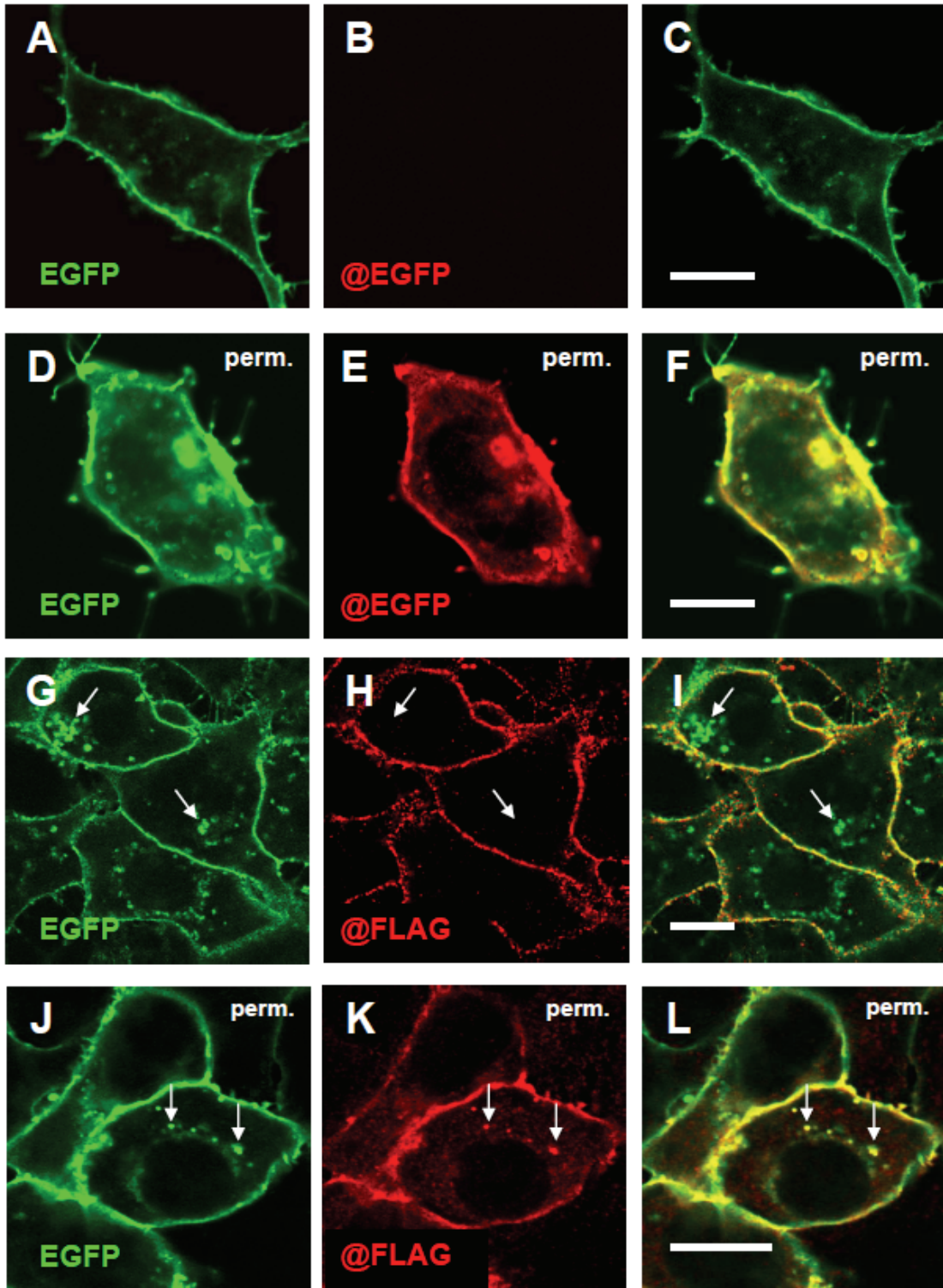


Abb. 8: Orientierung von FLAG-Ntcp-EGFP in HepG2-Zellen

Bei korrekter Lokalisation an die basolaterale Zellmembran ist FLAG-Ntcp-EGFP in unpermeabilisierten Zellen mit einem @-EGFP-Antikörper nicht zu detektieren (A-C), in permeabilisierten Zellen kommt es hingegen bei Färbung mit @EGFP zu einer nahezu kompletten Kolokalisation der grünen EGFP und der roten @-EGFP-Fluoreszenz (D-F). In unpermeabilisierten Zellen ist bei Färbung mit einem @-FLAG-Antikörper lediglich membranständiges, nicht aber in intrazellulären Vesikeln gelegenes FLAG-Ntcp-EGFP (Pfeile) detektierbar (G-I), während es auch hier in permeabilisierten Zellen zur Kolokalisation kommt (J-L). Balken = 10 μm (aus Stross, Helmer et al., 2010)

Wurden nicht permeabilisierte Zellen mit einem gegen den FLAG-*Tag* gerichteten Antikörper angefärbt, so zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz entlang der Plasmamembran, die einzelnen durch die Fluoreszenz des EGFP markierten Vesikel innerhalb der Zelle wurden jedoch ausgespart, was für die extrazelluläre Lokalisation des durch den FLAG-*Tag* markierten N-Terminus des Ntcp spricht. Auch korrelierte die @FLAG-vermittelte rote Fluoreszenz an der Plasmamembran gut mit der EGFP-bedingten grünen Fluoreszenz (Abb.8 G-I). Wurden permeabilisierte Zellen mit dem @-FLAG-Antikörper angefärbt, so waren die intrazellulären Strukturen anfärbbar, auch hier zeigte sich eine gute Korrelation von EGFP- und FLAG-vermittelter Fluoreszenz (Abb.8 J-L).

Insgesamt konnte also davon ausgegangen werden, dass der beidseitig getaggte Ntcp in den HepG2-Zellen sowohl stabil exprimiert wie auch korrekt lokalisiert wird. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den mit den unterschiedlichen Plasmiden transfizierten Zellen.

Zum Nachweis der Funktion des Ntcp-Fusionsproteins wurden von der Arbeitsgruppe Messungen des Taurocholat-*Uptakes* durchgeführt, die eine normale Transportfunktion des Konstrukts nachweisen konnten (Stross, Helmer et al., 2010).

Insgesamt konnte von einer normalen Expression, Lokalisation und Funktion des Ntcp-Fusionsproteins in HepG2-Zellen ausgegangen werden.

4.3 Validierung mittels Durchflusszytometrie

Im nächsten Schritt konnten die transfizierten HepG2-Zellen zur Durchflusszytometrie eingesetzt werden. Dazu müssen die Zellen vereinzelt in Suspension vorliegen. Es zeigte sich bei Messung im *Forward Scatter*, welcher die Zellgröße misst, dass nach einer Inkubationszeit von 7 Minuten für Trypsin und 4 Minuten für Accutase bei jeweils 37°C eine gute Ablösung aus der Kulturschale und Vereinzelung der Zellen zu erreichen war. Da Ntcp extrazellulär drei potentielle Schnittstellen für Trypsin aufweist und die längere Inkubationszeit weitere Zellstoffwechselforgänge begünstigen könnte, wurde aufgrund der kürzeren Inkubationszeit für die weiteren Experimente Accutase verwendet.

Die gemessene Zellpopulation wurde anhand der Kriterien Zellgröße und Granularität identifiziert und zur weiteren Auswertung markiert (Abb.9).

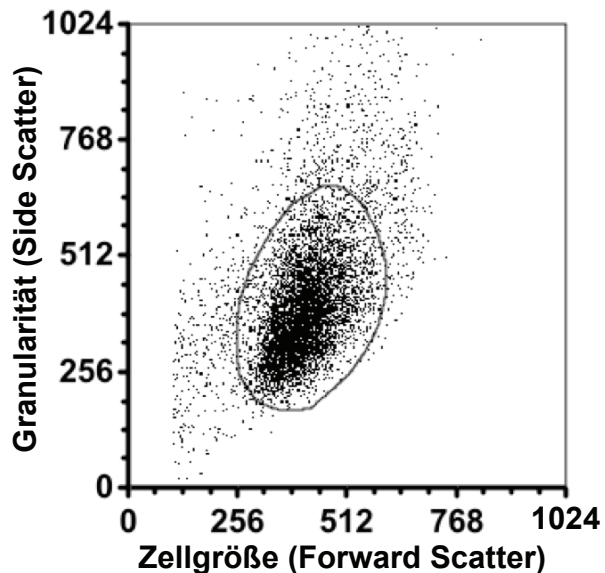


Abb. 9: Dot-Blot der gemessenen Zellpopulation

Nach den Kriterien Größe und Granularität wurden die gemessenen Zellen identifiziert und zur weiteren Auswertung über ein „Gate“ (umrandeter Bereich) selektiert.

An diesen markierten Zellen wurden dann die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für FLAG und EGFP ausgewertet.

Zunächst war zu untersuchen, ob die Fluoreszenzen für EGFP und den angefärbten FLAG-Tag klar messbar und zu unterscheiden waren.

Während bei Messung der transfizierten Zellen ein deutliches Signal im EGFP-Kanal detektierbar war, zeigten untransfizierte HepG2-Zellen eine um mehr als das zehnfache geringere natürliche Fluoreszenz in diesem Bereich. Bei Messung im FLAG-Kanal war eine minimale natürliche Fluoreszenz messbar, bei Anfärbung der nicht permeabilisierten, transfizierten Zellen mit dem Anti-FLAG-Antikörper zeigten sich jedoch deutlich höhere Werte, so dass hier eine klare Abgrenzung möglich war. Es stellte sich eine Konzentration des anti-FLAG-Antikörpers von 1:2500 zur Anfärbung der Zellen als optimal heraus, um einerseits ein deutliches Signal zu erzeugen und andererseits unspezifische Bindungen zu vermeiden. Der

Anti-FLAG-Antikörper erzeugte im EGFP-Kanal kein messbares Signal, ebenso wenig führte EGFP im FLAG-Kanal zu einem signifikanten Signal (Abb.10).

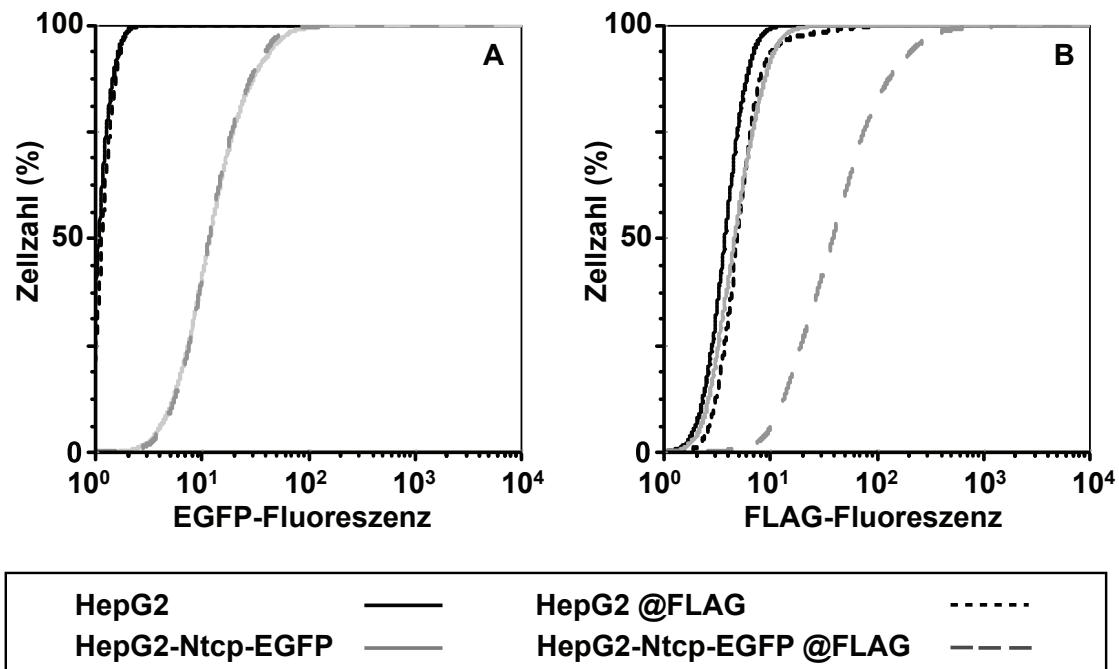


Abb. 10 Untransfizierte und Ntcp-EGFP exprimierende HepG2-Zellen

Untransfizierte HepG2-Zellen zeigen weder gefärbt noch ungefärbt im FLAG- (B) oder im EGFP-Kanal (A) eine signifikante Fluoreszenz, eine unspezifische Antikörperbindung findet somit nicht statt. Klar abgrenzbar ist hingegen die EGFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen, auch nach Färbung mit @FLAG (gestrichelte Linie) ist ein deutlicher Unterschied zur minimalen Eigenfluoreszenz der Zellen im FLAG-Kanal messbar.

Ziel war es, den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Membranständigkeit von Ntcp in der Durchflusszytometrie messbar zu machen. Dieses setzt voraus, dass die eingesetzten Substanzen selbst innerhalb der Zellen nicht fluoreszieren. Nach Inkubation von untransfizierten HepG2-Zellen mit den zellpermeablen Proteinkinase C-Inhibitoren Gö 6850 (orange), Ro 31-8220 (rot) und Chelerythrine (gelb) zeigten sich deutlich detektierbare Signale im FLAG-Kanal, für Chelerythrine auch im EGFP-Kanal. Dieses Signal war vom FLAG-Antikörpersignal kaum zu unterscheiden oder überstrahlte dieses sogar, so dass eine Beurteilung dieser Messungen hinsichtlich der Membranständigkeit von Ntcp nur eingeschränkt oder gar nicht möglich war (Abb. 11).

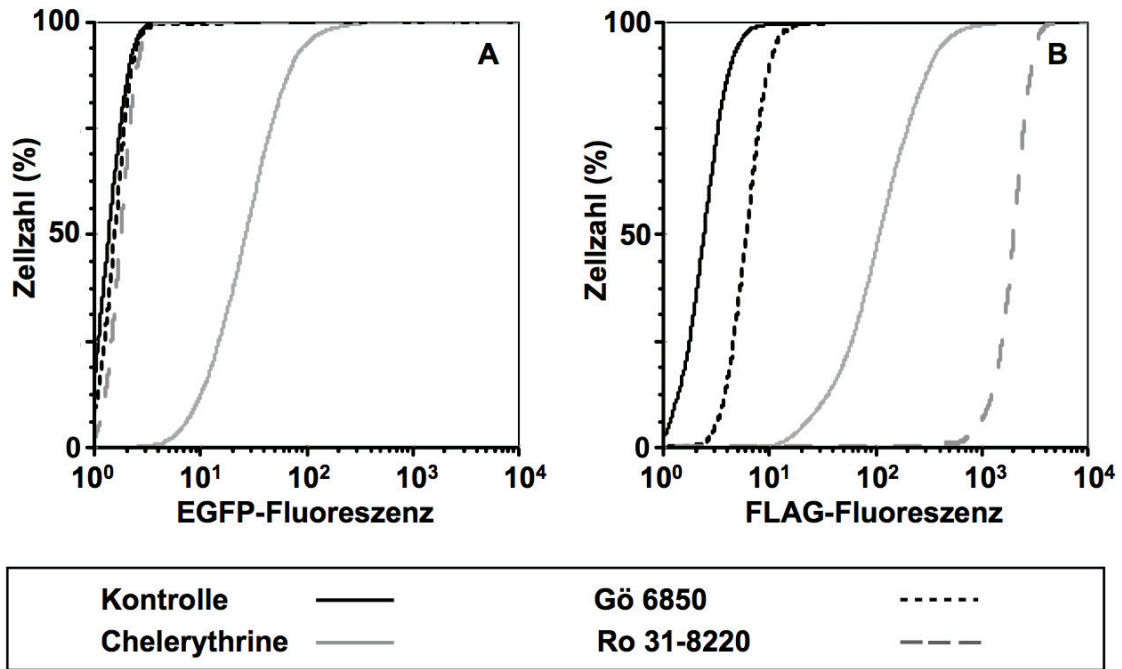


Abb. 11: Eigenfluoreszenz der Proteinkinase C-Inhibitoren

In ungefärbten, untransfizierten HepG2-Zellen zeigte Chelerythrine im EGFP-Kanal (A) und ebenso wie Gö 6850 und Ro 31-8220, im FLAG-Kanal (B) eine deutliche Eigenfluoreszenz.

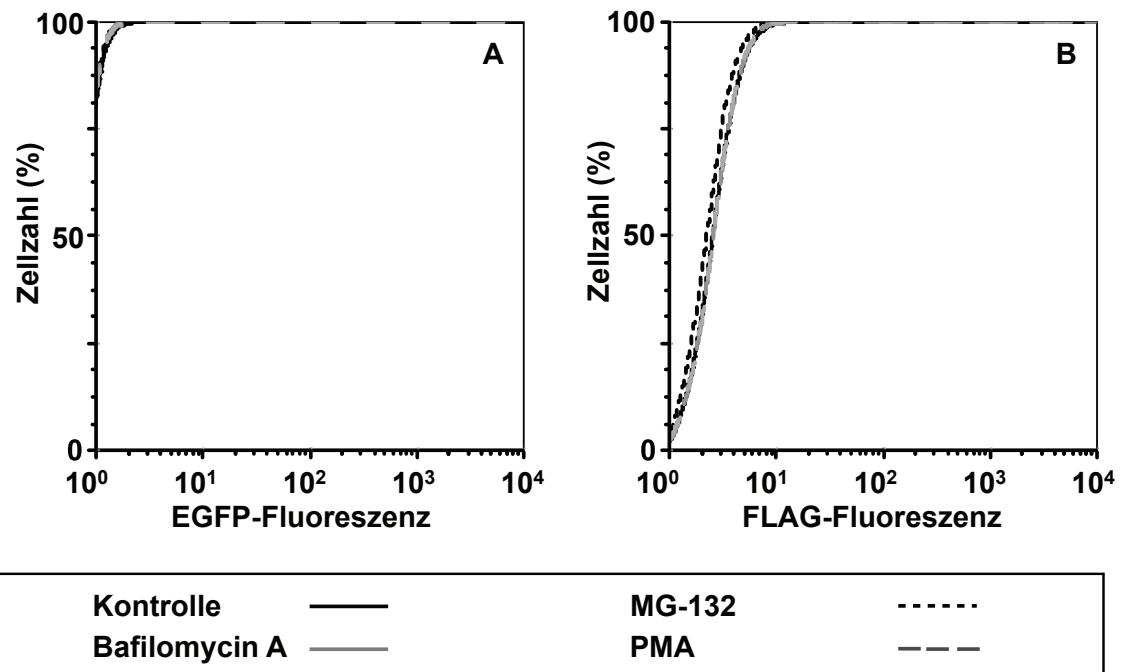


Abb. 12: Kontrollmessung der Substanzen MG-132, Bafilomycin A und PMA

An ungefärbten, nicht transfizierten HepG2-Zellen zeigten die eingesetzten Substanzen MG-132, Bafilomycin A und PMA keine Eigenfluoreszenz.

Jede in diesem System eingesetzte Substanz muss also zunächst an untransfizierten Zellen getestet werden, um derartige Effekte auszuschließen oder diese zumindest in die Beurteilung der Messungen miteinbeziehen zu können. Keine der im Weiteren verwendeten Substanzen zeigte eine derartige Eigenfluoreszenz (Abb. 12).

Als Nächstes war zu untersuchen, ob Veränderungen der membranständigen Menge Ntcp, gemessen durch die FLAG-Tag assoziierte Fluoreszenz, im Verhältnis zu eventuellen Änderungen der Gesamtmenge von Ntcp in der Zelle, gemessen durch die EGFP-Fluoreszenz, mit dem Durchflusszytometer messbar sind. Daher wurden zunächst Substanzen eingesetzt, bei denen mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Effekt auf Menge und Verteilung von Ntcp zu erwarten war.

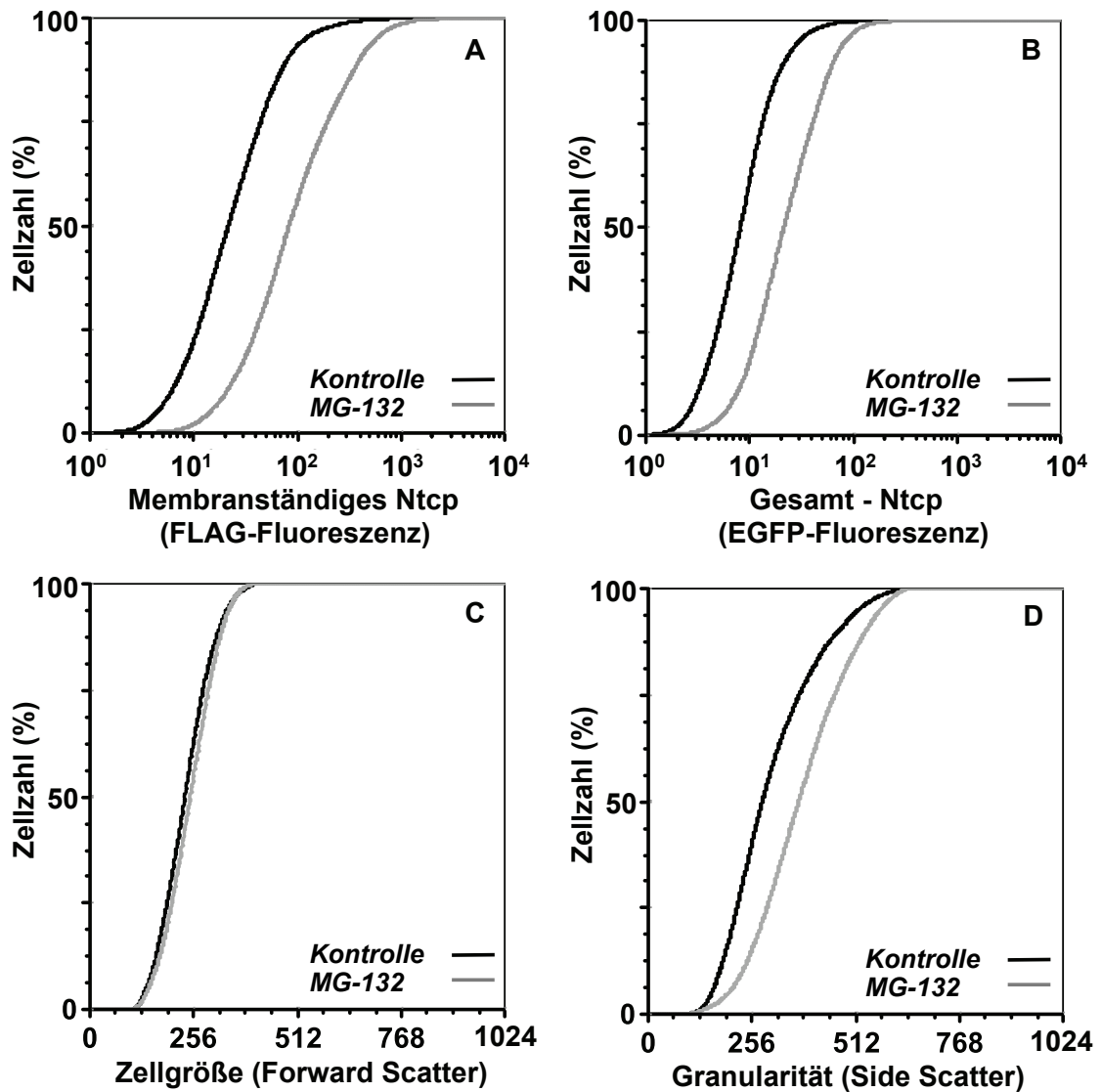
In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Ntcp durch das Ubiquitin-Proteasomen-System abgebaut wird und die Inhibition von Proteasomen durch den Hemmstoff MG-132 zu einer intrazellulären Akkumulation von Ntcp führt (Kühlkamp et al., 2005). Erwartungsgemäß fand sich nach sechzehnständiger Inkubation der transfizierten Zellen mit MG-132 eine deutliche Zunahme der Ntcp-Gesamtmenge in der Zelle, gemessen an der deutlichen Zunahme der EGFP-Fluoreszenz. Zudem fand sich ebenfalls eine Zunahme des membranständigen Ntcp (FLAG-Fluoreszenz). Auch die Granularität der Zellen nahm zu. Alle diese Änderungen waren statistisch signifikant. Die Zellgröße änderte sich nicht (Abb. 13).

Ein weiterer Weg der Degradation von Proteinen der Plasmamembran erfolgt über Lysosomen. Daher wurde als Nächstes der Effekt von Bafilomycin A, einem Makrolidantibiotikum, welches die vesikuläre H⁺-ATPase hemmt, dadurch den pH-Wert in Lysosomen anhebt und die Proteindegradation in Lysosomen behindert, untersucht.

Es zeigte sich nach sechzehnständiger Inkubation mit Bafilomycin A eine signifikante Zunahme der EGFP-Fluoreszenz und somit der Ntcp-Gesamtmenge. Im Unterschied zu MG-132 führte Bafilomycin A aber nicht zu einer Zunahme, sondern zu einer signifikanten Abnahme des membranständigen Ntcp. Dieser Effekt war bereits nach kurzzeitiger Inkubation (1 h) zu beobachten und zeigte bei längerer Inkubationszeit keine weitere Veränderung.

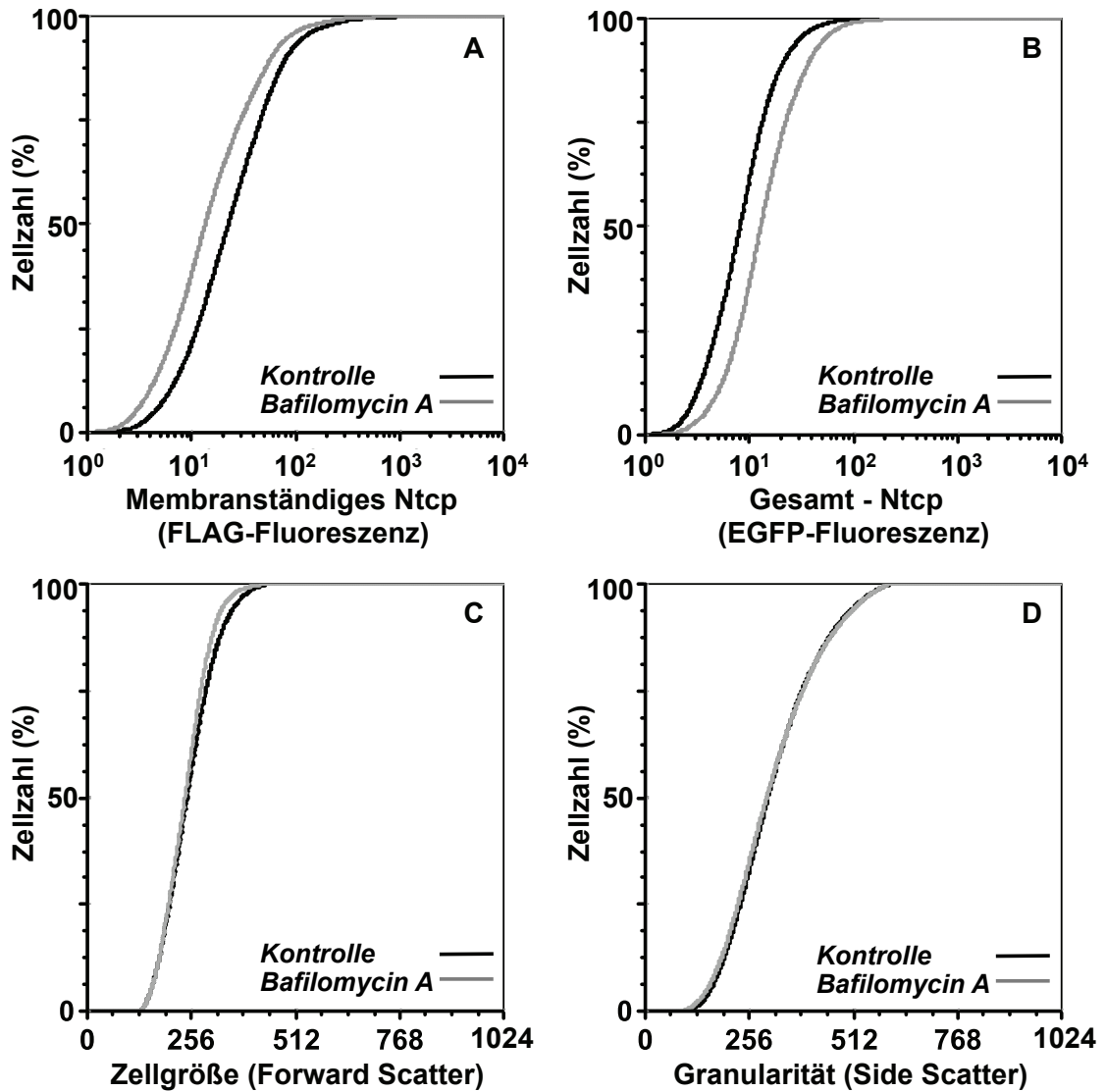
Die Zellgröße veränderte sich auf der 25. und 50. Perzentile nicht signifikant, lediglich bei den größten Zellen (75%) war eine minimale Schrumpfung zu beobachten. Auch die Granularität der Zellen änderte sich nicht (Abb. 14).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass diese Methode geeignet ist, unterschiedliche Zustände der Gesamtmenge und des membranständigen Anteils von Ntcp zu erfassen.



T-Test	FLAG	EGFP	FSC	SSC
p (25%)	< 0,001 *	< 0,001 *	> 0,05	< 0,01 *
p (50%)	< 0,001 *	< 0,001 *	> 0,05	< 0,01 *
p (75%)	< 0,001 *	< 0,001 *	> 0,05	< 0,001 *

Abb. 13: MG-132 bewirkt eine Zunahme von Gesamt- und membranständigem Ntcp
 Sechzehnständige Stimulation mit MG-132 führte zu einer statistisch signifikanten (*) Zunahme der Gesamtmenge an Ntcp in der Zelle (B) und dabei auch zu einer Zunahme des membranständigen Anteils (A). Desweiteren zeigte sich eine Zunahme der Granularität (D), die Zellgröße veränderte sich hingegen nicht (C).



T-Test	FLAG	EGFP	FSC	SSC
p (25%)	0,028 *	< 0,001 *	> 0,05	> 0,05
p (50%)	< 0,01 *	< 0,001 *	> 0,05	> 0,05
p (75%)	< 0,001 *	< 0,001 *	< 0,01 *	> 0,05

Abb. 14: Bafilomycin A bewirkt eine Zunahme der Ntcp-Gesamtmenge bei Abnahme des membranständigen Anteils

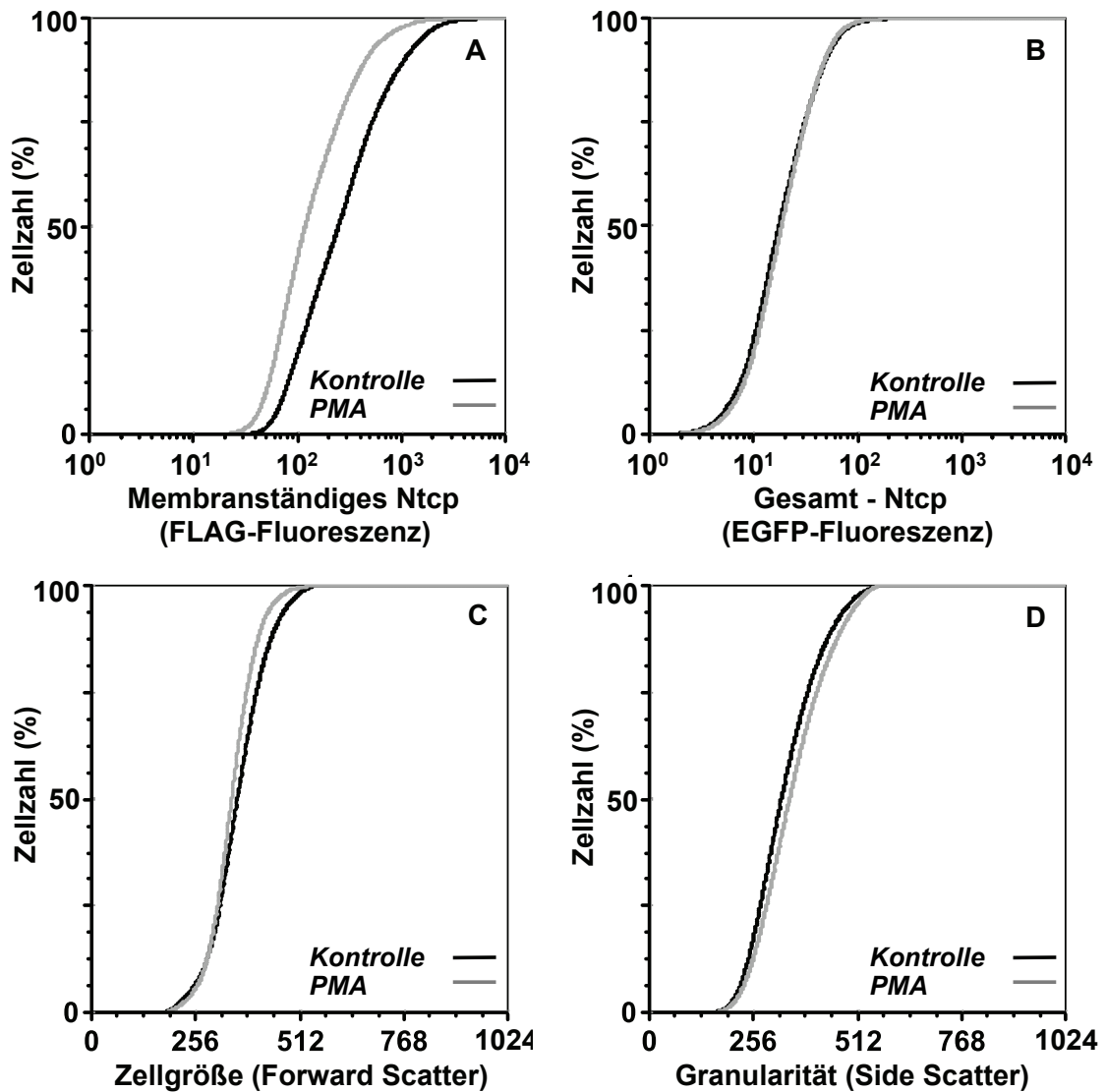
Sechzehnständige Inkubation mit Bafilomycin A führte zu einer Abnahme des membranständigen Ntcp (A) bei gleichzeitiger Zunahme der Gesamtmenge (B). Bei den größten Zellen (75. Perzentile) war eine minimale, aber statistisch signifikante (*) Schrumpfung zu beobachten (C), die Granularität änderte sich nicht (D).

4.4 Messungen zum Einfluss der Proteinkinase C

Die verschiedenen Isoformen der Proteinkinase C besitzen eine zentrale Bedeutung bei der zellulären Signaltransduktion. Inwiefern sie auch bei der Translokation von Ntcp eine Rolle spielen, sollte im Weiteren untersucht werden. Zunächst wurde der Effekt von PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetat), einem potenten Aktivator der Proteinkinase C (ausgenommen der atypischen PKC-Isoformen (aPKCs)), untersucht. Nach einstündiger Inkubation zeigte sich eine deutliche, statistisch signifikante Abnahme des membranständigen Ntcp, die Gesamtmenge blieb in diesem Zeitraum jedoch unverändert. Minimale Änderungen hinsichtlich der Zellgröße waren nur auf der 75. Perzentile signifikant, die Granularität zeigte keine statistisch signifikanten Änderungen (Abb. 15).

Um weiter einzugrenzen, welche PKC-Isoformen für diesen Effekt verantwortlich sind, wurde der Einfluss von Ttx (Thymeleatoxin), welches selektiv die calciumabhängigen PKC-Isoformen aktiviert, untersucht. Einstündige Inkubation führte auch hier zu einer statistisch signifikanten Abnahme des membranständigen Ntcp ohne Änderung der Gesamtmenge. Ebenso zeigten Zellgröße und Granularität keine statistisch signifikanten Änderungen (Abb. 16).

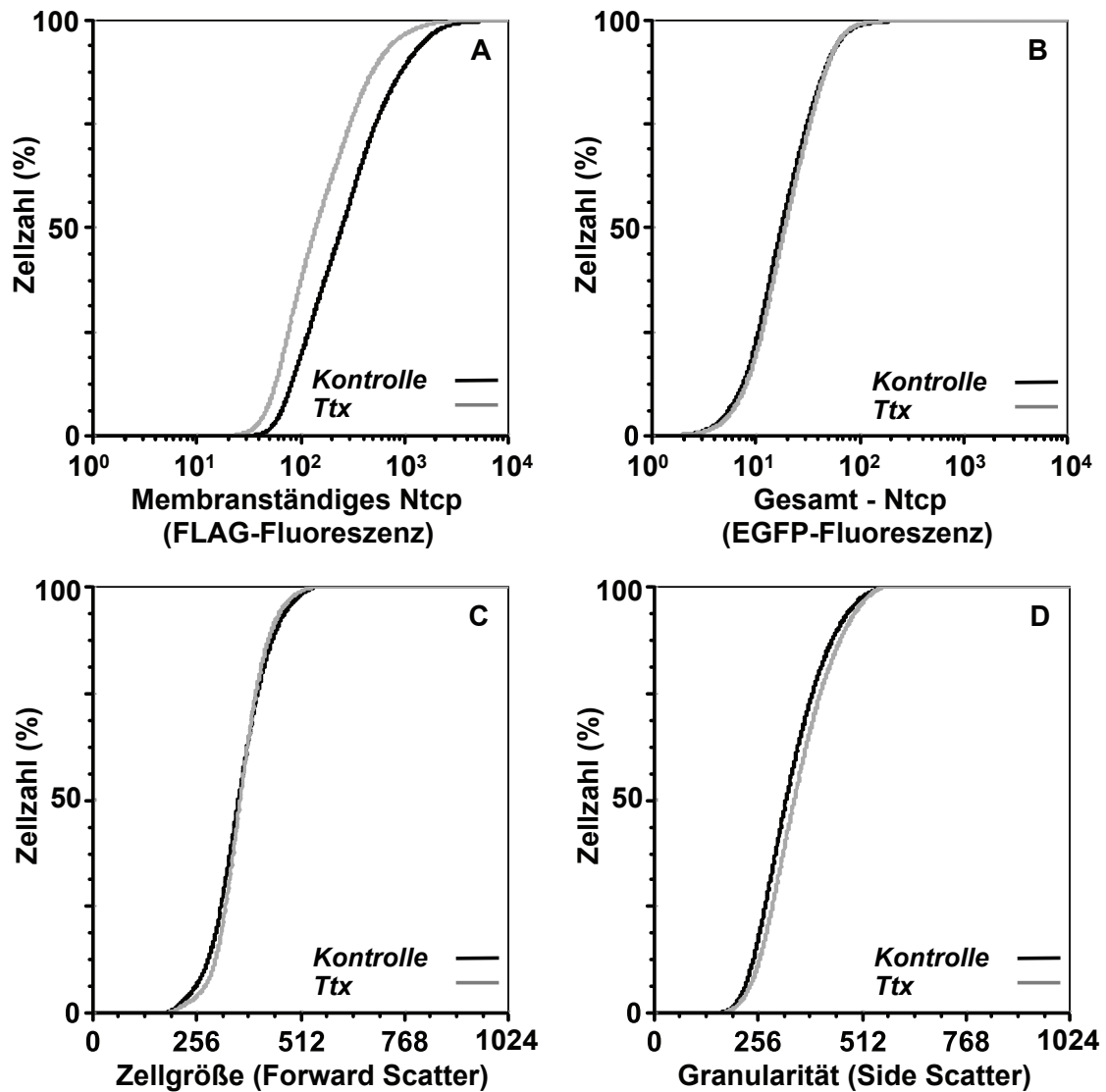
Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden Messungen mit dem PKC-Inhibitor Gö 6850 (Bisindolylmaleimide I) durchgeführt, welcher die meisten calciumabhängigen und -unabhängigen PKC-Isoformen hemmt. Hierzu wurden die Zellen zunächst für 30 min mit Gö 6850 vorinkubiert, dann für 1h mit PMA bzw. Ttx stimuliert. Gö 6850 zeigte einen inhibitorischen Effekt auf die PMA- bzw. Ttx-induzierte Translokation von Ntcp, aufgrund der Eigenfluoreszenz von Gö 6850 war dieses Ergebnis jedoch in diesem Messsystem nur eingeschränkt zu beurteilen. Eine ähnliche Problematik zeigten die weiteren PKC-Hemmstoffe Ro 31-8220 (Bisindolylmaleimide IX) und Chelerythrine (siehe Abb. 11).



T-Test	FLAG	EGFP	FSC	SSC
p (25%)	< 0,001 *	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (50%)	< 0,001 *	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (75%)	< 0,001 *	> 0,05	< 0,001 *	> 0,05

Abb. 15: PMA bewirkt eine Abnahme des membranständigen Ntcp

Einstündige Inkubation mit PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetat) führt zu einer signifikanten (*) Abnahme des membranständigen Ntcp (A) ohne Änderung der Gesamtmenge(B); auf der 75% Perzentile zeigt sich eine geringe Abnahme der Zellgröße (C) , die Granularität der Zellen änderte sich nicht (D).



T-Test	FLAG	EGFP	FSC	SSC
p (25%)	0,010 *	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (50%)	< 0,001 *	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (75%)	< 0,001 *	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Abb. 16: Ttx bewirkt eine Abnahme des membranständigen Ntcp

Einstündige Inkubation mit Ttx (Thymeleatoxin) führte zu einer statistisch signifikanten (*) Abnahme des membranständigen Ntcp (A) ohne eine Änderung der Gesamtmenge (B). Auch Zellgröße (C) und Granularität (D) zeigten keine signifikanten Änderungen.

4.5 Messungen zum Einfluss von Gallensalzen

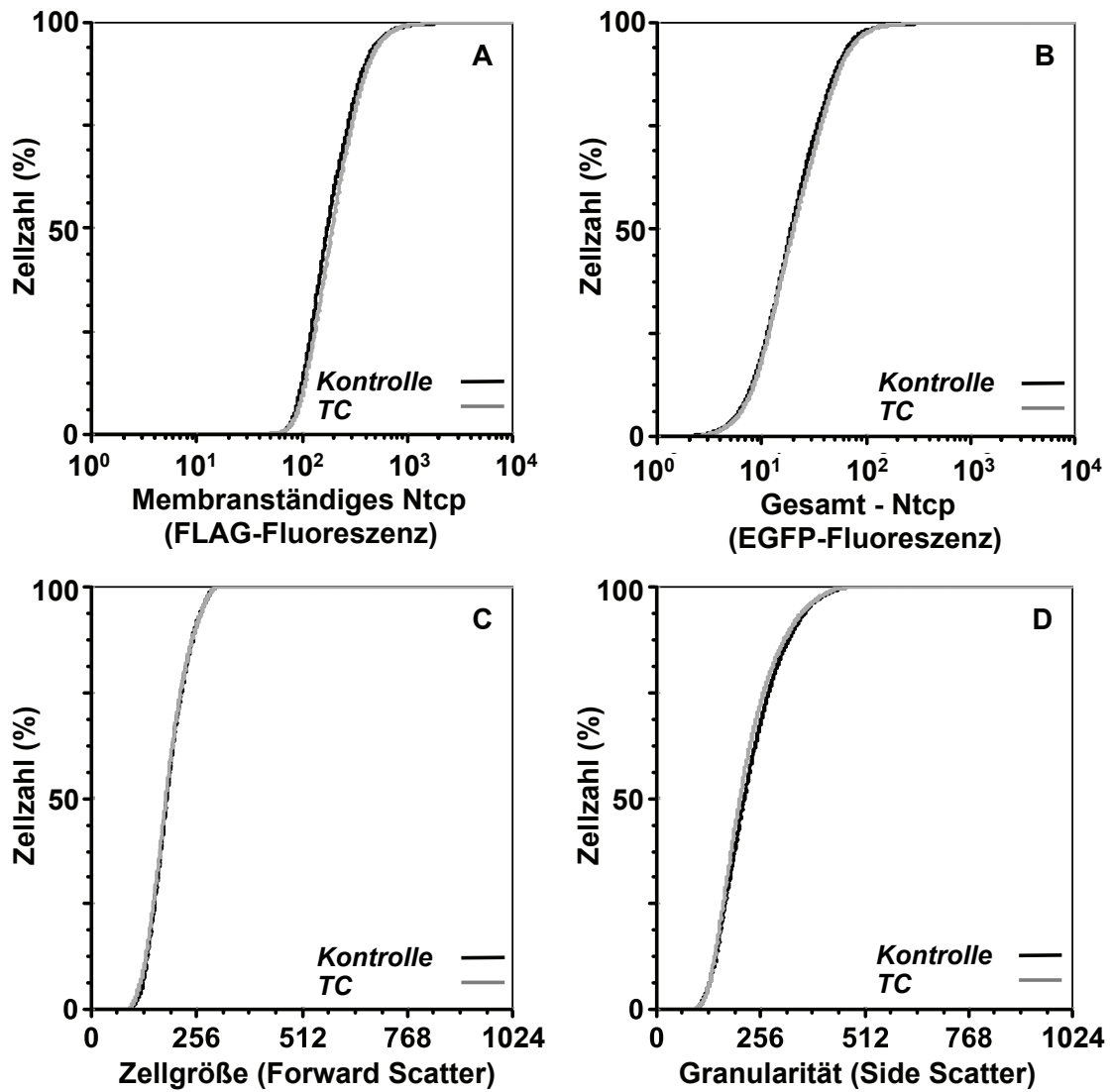
Unter cholestatischen Bedingungen und damit einem erhöhten Gehalt an Gallensalzen im portalvenösen Blut wird die Expression von Ntcp herabreguliert. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, welchen kurzfristigen, posttranslationalen Effekt die verschiedenen Gallensalze auf Ntcp und seine Lokalisation haben.

Zunächst wurde der Einfluss der konjugierten primären Gallensäuren Taurocholat und Taurochenodeoxycholat untersucht. Nach einstündiger Inkubation mit Taurocholat zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt auf die Menge des membranständigen Ntcp oder die Ntcp- Gesamtmenge. Auf Zellgröße und Granularität hatte TC ebenfalls keinen Einfluss (Abb. 17).

Anders zeigte sich der Effekt von Taurochenodeoxycholat. Einstündige Inkubation führte hier zu einer statistisch signifikanten Internalisation von Ntcp bei unveränderter Gesamtmenge, Zellgröße und Granularität (Abb.18).

Desweiteren wurde der Einfluss von Taurolithocholat-Sulfat, dem sulfatierten Taurinkonjugat von Lithocholat, das in vivo durch bakterielle Dehydroxylierung von Chenodeoxycholat entsteht, untersucht. Auch hier ließ sich ein analoger Effekt nachweisen: einstündige Inkubation mit TLCS führte zur Internalisierung von Ntcp ohne Änderung der weiteren Parameter (Abb. 19).

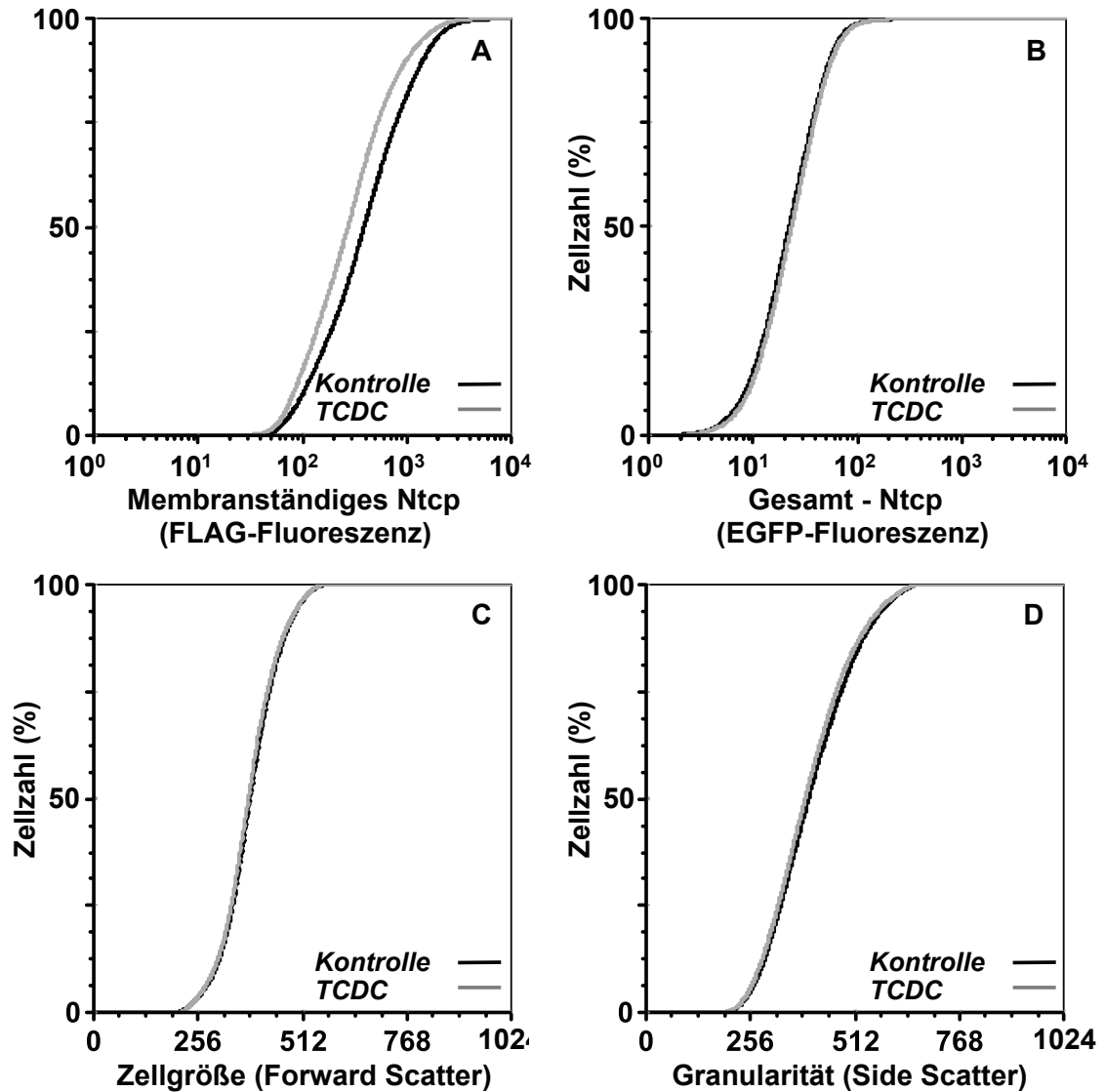
Ein anderes Bild zeigte sich dagegen nach Inkubation mit Tauroursodeoxycholat (TUDC), dem Taurinkonjugat von Ursodeoxycholat, dem hepatoprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden. So zeigte TUDC (analog wie TC) im Gegensatz zu TCDC und TLCS keinen statistisch signifikanten Effekt. Nach einstündiger Inkubation zeigte sich hier eine unveränderte membranständige und gesamte Menge von Ntcp, Zellgröße und Granularität (Abb.20).



T-Test	FLAG	EGFP	FSC	SSC
p (25%)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (50%)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (75%)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Abb. 17: TC bewirkt keine Veränderung

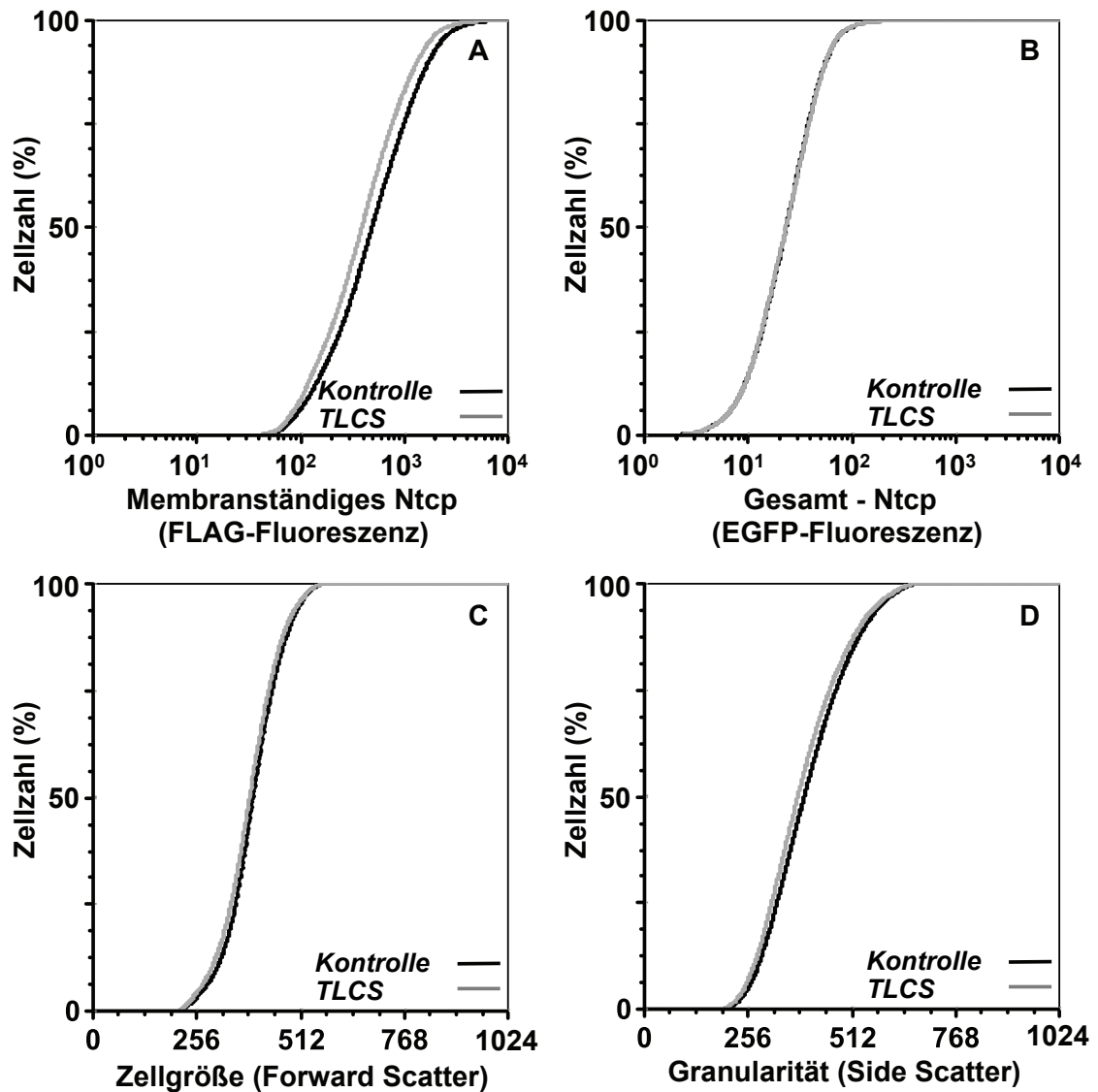
Einstündige Inkubation mit Taurocholat (TC) führte zu keiner Veränderung des membranständigen Ntcp (A). Auf die Ntcp-Gesamtmenge (B), Zellgröße oder Granularität hatte TC ebenfalls keinen statistisch signifikanten Einfluss.



T-Test	FLAG	EGFP	FSC	SSC
p (25%)	0,039 *	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (50%)	< 0,001 *	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (75%)	< 0,001 *	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Abb. 18: TCDC bewirkt eine Abnahme des membranständigen Ntcp

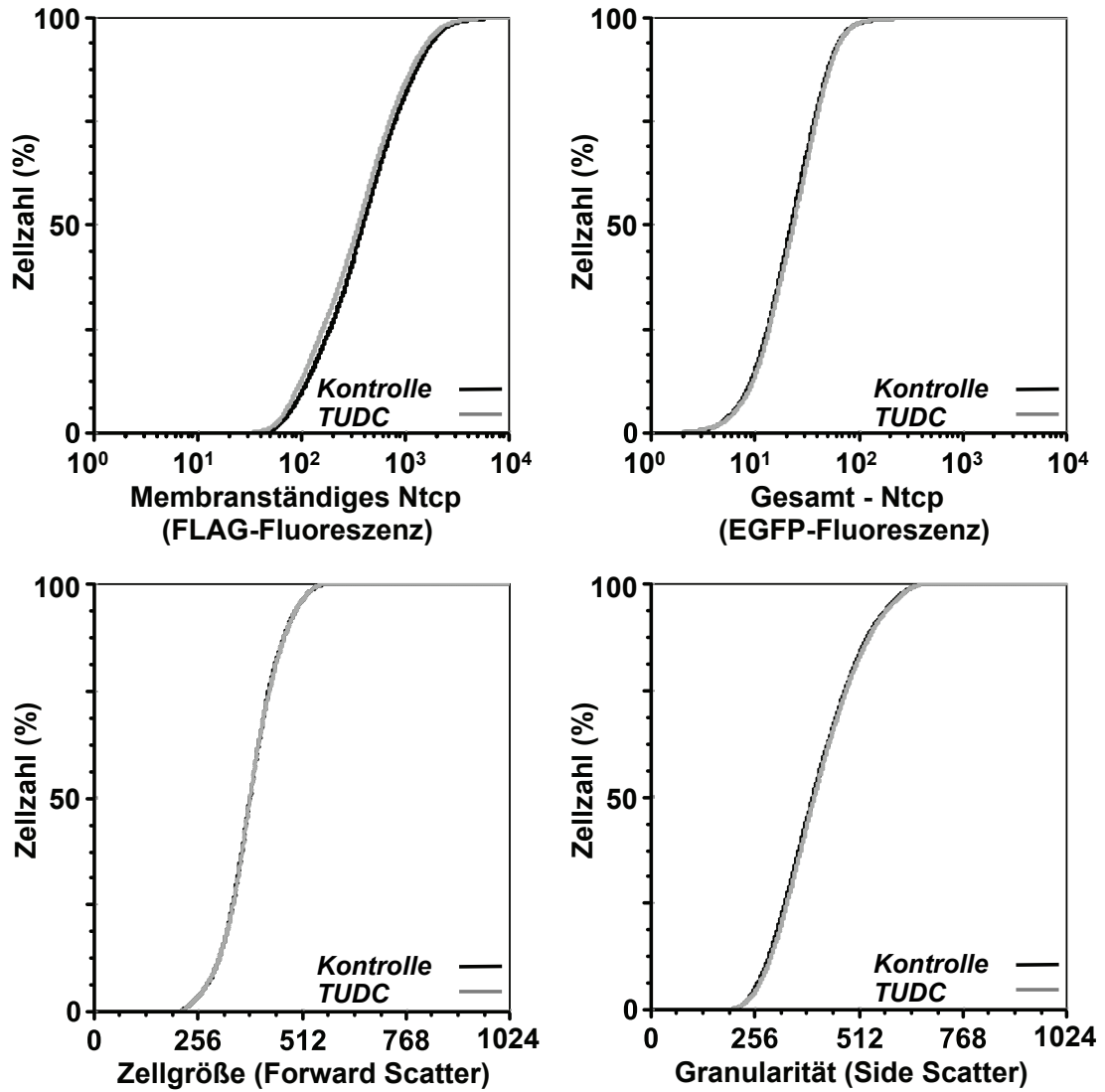
Einstündige Inkubation mit Taurochenodeoxycholat (TCDC) führte zu einer statistisch signifikanten (*) Abnahme des membranständigen Ntcp (A) ohne Änderung der Gesamtmenge (B) bei ebenfalls gleichbleibender Zellgröße (C) und Granularität (D).



T-Test	FLAG	EGFP	FSC	SSC
p (25%)	0,038 *	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (50%)	0,022 *	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (75%)	0,017 *	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Abb. 19: TLCS bewirkt eine Abnahme des membranständigen Ntcp

Einstündige Inkubation mit Taurolithocholat-Sulfat (TLCS) führte zu einer statistisch signifikanten (*) Abnahme des membranständigen Ntcp (A) ohne Änderung der Gesamtmenge (B), auch Zellgröße (C) und Granularität (D) blieben unverändert.



T-Test	FLAG	EGFP	FSC	SSC
p (25%)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (50%)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
p (75%)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Abb. 20: TUDC bewirkt keine Veränderung der Membranlokalisation von Ntcp

Einstündige Inkubation mit Tauroursodeoxycholat (TUDC) führte zu keiner statistisch signifikanten Änderung des Gesamt- (B) oder membranständigen (A) Ntcp, auch Zellgröße (C) und Granularität (D) änderten sich nicht.

5. Diskussion und Schlussfolgerungen

Etablierung der Methode

Hepatozyten sind rasch wechselnden äußeren Bedingungen ausgesetzt, da die Konzentrationen von cholephilen Substanzen insbesondere postprandial im portalvenösen Blut stark schwanken können. Diese schnell wechselnden Bedingungen machen ebenso rasche Adaptationsmechanismen auf Transporterebene erforderlich. Eine Möglichkeit einer solchen posttranslationalen Regulation ist der Ein- und Ausbau von Transportern in die bzw. aus der Plasmamembran. Mittels Endo- und Exocytose kann unter anderem im Rahmen eines endosomalen Recyclings innerhalb kürzester Zeit der Gehalt eines Transportermoleküls in der Plasmamembran variiert werden (Maxfield et al., 2004), (Soldati et al., 2006).

Es wurden verschiedene Methoden etabliert, um Transporterendo- und -exozytose zu untersuchen. Diese beinhalten unter anderem die differentielle Zentrifugation, bei der zelluläre Bestandteile durch wiederholte Zentrifugation bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten aufgetrennt werden und so spezifisch die Zellmembran und -organellen untersucht werden können (De Duve et al., 1953), (Yeaman 2003), und die Auftrennung von Membranen mittels (Sucrose-) Gradienten, um einzelne Proteine in den verschiedenen Fraktionen nachzuweisen (de Araujo et al., 2008), (Kölling et al., 1994); möglich ist auch eine kovalente Markierung von Membranproteinen, beispielsweise mittels Biotinylierung von Oberflächenproteinen, die dann mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot analysiert werden (Levy-Toledano et al., 1993). Diese Methoden haben den Nachteil, dass mit ihnen keine einzelnen Zellen, sondern nur die Gesamtheit einer Zellpopulation untersucht werden kann. Daneben existieren einige etablierte Verfahren zur Untersuchung von Endo- und Exozytose in einzelnen Zellen: hierzu gehören unter anderem die Darstellung mittels Elektronenmikroskopie (Traebert et al., 2000), (Dombrowski et al., 2000), Kollisationsstudien mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie (Kubitz et al., 1997, 1999) oder Messungen der Membrankapazität mittels Patch-Clamp-Technik (Greger et al., 1993).

Alle diese Methoden haben den Nachteil, dass sie zum Teil sehr aufwendig sind und dass immer nur wenige Versuchsbedingungen parallel getestet werden können. Die in dieser Arbeit etablierte Methode ermöglicht es, Endo- und Exozytose statt an einer Gesamtmenge von Zellen oder wenigen einzelnen Zellen an einer Vielzahl einzelner Zellen einer Population zu messen. Zudem ist der Einsatz von Zellkultur-Monolayern möglich. Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, viele unterschiedliche Versuchsbedingungen parallel zu testen; die Methode ist damit schnell, so dauert eine einzelne Messung nur wenige Minuten, und prinzipiell automatisierbar. Zudem können die gewonnenen Daten statistisch ausgewertet und quantifiziert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass mehrere Parameter gleichzeitig gemessen werden können: Während hier die FLAG-Fluoreszenz als Maß für den membranständigen Anteil von Ntcp dient, gibt die EGFP-Fluoreszenz gleichzeitig Änderungen der Gesamtmenge an, so dass eine wichtige interne Kontrolle in einem Versuchsansatz mitgemessen wird. Auch die gleichzeitige Messung von Zellgröße und Granularität dient hierzu, beispielsweise können bei gleichbleibender Zellgröße Schrumpfungseffekte als Ursache für einen geringer gemessenen Anteil von membranständigem Ntcp ausgeschlossen werden.

Grundsätzlich kann die Methode auch zur Messung von längerfristigen Effekten auf Expression und Lokalisation von Ntcp angewendet werden. Es wurde gezeigt, dass Ntcp im Rahmen der Endoplasmatisches Reticulum-assoziierten Proteindegradation (ERAD) durch das Ubiquitin-Proteasomen-System abgebaut wird. Die Inhibition von Proteasomen durch den Hemmstoff MG-132 führt zu einer intrazellulären Akkumulation von Ntcp in perinukleären Aggresomen (Kühlkamp et al., 2005). Erwartungsgemäß war auch in dieser Arbeit nach 16 h Inkubationszeit eine deutliche Zunahme der Ntcp-Gesamtmenge messbar, ebenso zeigte sich eine Zunahme des membranständigen Ntcp. Korrespondierend zur beschriebenen Bildung von Aggresomen fand sich eine deutliche Zunahme der Granularität der Zellen.

Ein weiterer Weg der Degradation von Proteinen der Plasmamembran erfolgt über Lysosomen. Bafilomycin A, ein Makrolidantibiotikum, welches hochgradig spezifisch die H⁺-ATPase des vakuolären Typs blockiert (Bowman et al., 1988) und dadurch die vesikuläre Ansäuerung verhindert, behindert den vesikulären Transport und die Proteindegradation in Lysosomen (Yoshimori et al., 1991). Dementspre-

chend zeigte sich auch hier nach 16 h Inkubation eine Zunahme der Gesamtmenge, allerdings zeigten sich Unterschiede im membranständigen Anteil von Ntcp. Während MG-132 zu einer Zunahme sowohl der Gesamtmenge wie auch des membranständigen Anteils von Ntcp führte, führte Bafilomycin A bei einer Zunahme der Gesamtmenge zu einer Abnahme des membranständigen Anteils. Interessanterweise war dieser Effekt bereits nach kurzfristiger Inkubation von 1 h zu beobachten, während die Zunahme der Gesamtmenge erst nach langfristiger Inkubation (16 h) zu verzeichnen war, so dass davon auszugehen ist, dass diese Parameter unabhängig voneinander reguliert werden.

Es ist beschrieben, dass mit steigendem pH-Wert die Fluoreszenzintensität von EGFP zunimmt (Kneen et al., 1998). In Studien an mit Bafilomycin A behandelten A431-Zellen wurde jedoch bereits nach 50 Minuten ein maximaler intralysosomaler pH-Wert von etwa 6,0 erreicht (Yoshimori et al., 1991). Auch zeigten in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe Zellen, die nur EGFP exprimierten, keine Zunahme der Fluoreszenzintensität, so dass anzunehmen ist, dass dieser Effekt nicht durch den intralysosomalen pH-Wert oder die Prozessierung von EGFP, sondern durch Prozessierung von Ntcp verursacht wird.

Wie die Messungen mit den Proteinkinase C-Inhibitoren Gö 6850, Ro 31-8220 und Chelerythrine eindrucksvoll demonstrierten, kann die Eigenfluoreszenz eingesetzter Substanzen eine Limitation der Methode darstellen. Für diese Meßmethode ist es daher erforderlich, dass die Eigenfluoreszenz der Substanzen gemessen und bei der Interpretation der Messergebnisse bedacht wird.

Grundsätzlich ist diese Methode auf viele andere Transmembranproteine anwendbar. Wenn das entsprechende Protein keinen extrazellulären Terminus besitzt, kann der FLAG-*Tag* auch in einen extrazellulären Loop inkloniert werden, wobei sichergestellt sein muss, dass Orientierung, Lokalisation und Funktion des Proteins dadurch nicht beeinträchtigt werden. Die hier durchgeführten Immunfluoreszenzstudien konnten eine korrekte Lokalisation und Orientierung von FLAG-Ntcp-EGFP belegen. Weitere von der Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen konnten zudem eine korrekte Funktion des Proteins zeigen: Messungen der Tau-rocholat-Aufnahme zeigten an FLAG-Ntcp-EGFP-transfizierten HepG2-Zellen einen sättigbaren Transport, wobei sich aus den gemessenen Werten ein Km-Wert von etwa 37,9 $\mu\text{mol/l}$ berechnete, was gegenüber den in der Literatur beschriebe-

nen Werten für nicht-modifiziertes Ntcp geringfügig erhöht ist (Hagenbuch et al., 1991), (Kühlkamp et al., 2005). Demgegenüber zeigten nicht-transfizierte HepG2-Zellen keinen signifikanten Taurocholat-*Uptake* (Stross, Helmer et al., 2010).

Insgesamt konnte von einer normalen Expression, Lokalisation und Funktion des FLAG-Ntcp-EGFP-Fusionsproteins in HepG2 Zellen ausgegangen werden, und die Durchflusszytometrie zeigte sich als geeignete Methode, um verschiedene Zustände des Proteins in der Zelle abzubilden.

Kurzfristige Regulation von Ntcp an der Plasmamembran

An isolierten Rattenhepatozyten konnte gezeigt werden, dass Stimulation mit cAMP zu einer gesteigerten natriumabhängigen Taurocholataufnahme führt (Grüne et al., 1993). Parallel dazu erfolgt eine Translokation von Ntcp aus einem endosomalen Kompartiment an die basolaterale Plasmamembran (Mukhopadhyay et al., 1997). Stimulation mit cAMP führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und somit zu einer Aktivierung der Protein Phosphatase 2 B (PP2B) (Webster et al., 2002), wodurch es zur Dephosphorylierung von Ntcp an Ser226 und damit zur verstärkten Translokation an die Membran kommt (Mukhopadhyay et al., 1998), (Anwer et al., 2005). Die Insertion folgt dabei vesikulären Transportrouten, ist abhängig von intakten Mikrofilamenten und wird durch den Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Protein Kinase B-*Pathway* kontrolliert (Dranoff et al., 1999), (Webster et al., 1999, 2002).

Über eine kurzfristige Translokation von Ntcp aus der Membran heraus in endozytische Vesikel war bislang wenig bekannt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid, welches im Rahmen einer Sepsis zusammen mit proinflammatorischen Zytokinen als Antwort auf eine Lipopolysaccharidexposition freigesetzt wird und eine wesentliche Rolle bei der Cholestaseentstehung spielt (Geier et al., 2006), (Moseley 2004), zu einer Abnahme von membranständigem NTCP bei unveränderter Gesamtmenge führt (Schonhoff et al., 2011).

Aktivierung der Proteinkinase C führt zur Endozytose von Ntcp

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der calciumabhängigen Proteinkinase C-Isoformen zur Cholestase führt (Kubitz et al., 2004).

In dieser Arbeit führte eine Stimulation mit dem Proteinkinase C-Aktivatoren PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat), einem potenten Aktivator der calciumabhängigen sowie -unabhängigen PKC (ausgenommen der atypischen PKC-Isoformen) (Castagna et al., 1981), (Kazanietz et al., 1993), zu einer deutlichen Abnahme des membranständigen Ntcp bei unveränderter Gesamtmenge. Ebenso bewirkte Ttx (Thymeleatoxin), ein Mezerin-Analogon welches selektiv die calciumabhängigen PKC-Isoformen aktiviert (Ryves et al., 1991), eine Internalisierung von Ntcp. Dieser Effekt war durch Gö 6850, einem selektiven Inhibitor der klassischen und neuen PKC-Isoformen (Toullec et al., 1991), hemmbar. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden von der Arbeitsgruppe weiterführende Untersuchungen durchgeführt: Mittels Konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie und Totaler Interner Reflexionsmikroskopie (TIRFM) konnte unter Einfluss von PMA und Ttx eine Reduktion von Ntcp an der Plasmamembran und die Bildung von Ntcp-haltigen vesikulären Strukturen dokumentiert werden, auch hier war dieser Effekt durch Gö 6850 hemmbar. In Zellen, die mit an mCherry gekoppelter PKC α kotransfiziert wurden, induzierte PMA eine rapide Translokation von PKC α an die Plasmamembran, was für eine Aktivierung derselben spricht. Auf die ebenfalls membranständige Na⁺-K⁺-ATPase hatte PMA dagegen keinen Einfluss, was zeigt, dass PMA nicht zur unspezifischen Internalisierung von Membranproteinen führt. Desweiteren führte die Inkubation mit PMA zu einer verminderten Transportkapazität von Ntcp: Der Tau-rocholat-Uptake war im Vergleich zur Kontrolle um etwa 25% reduziert. Die Internalisierung von Ntcp führte ferner zu einem protektiven Effekt gegenüber der Toxizität von Gallensalzen: Während Zellen, die 6 h mit 175 μ M TLCS inkubiert wurden, gegenüber den Kontrollzellen eine 1,9-fach erhöhte Todesrate aufwiesen, konnte diese durch eine einstündige Präinkubation mit PMA auf den 1,1-fachen Wert vermindert werden. Auch dieser protektive Effekt war durch Gö 6850 hemmbar (Stross, Helmer et al., 2010).

Die Effekte verschiedener Gallensalze auf die Lokalisation von Ntcp

Gallensalze spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Ntcp. So dienen sie als Liganden für nukleäre Rezeptoren, welche nicht nur die Synthese von Gallensalzen selbst, sondern auch die ihrer Transporter steuern (Lefebvre et al., 2009).

Der Farnesoid Rezeptor X (FXR) bindet Gallensalze mit hoher Affinität und agiert als Sensor der intrazellulären Gallensalzkonzentration: Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Gallensalzaufnahme, -synthese und Transporterexpression. FXR steuert die Regulation von Ntcp durch einen komplexen Mechanismus über SHP (Small Heterodimer Partner). Eine erhöhte intrazelluläre Gallensalzkonzentration im Rahmen einer Cholestase aktiviert mittels eines FXR-Response-Elements im SHP-Promotor die Expression von SHP, welcher die durch das Heterodimer aus dem Retinolsäurerezeptor (retinoic acid receptor, RAR) mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR) vermittelte Aktivierung der Ntcp-Expression hemmt (Karpen 2002), (Chiang 2003).

Auch die kanalikuläre Gallensalzexportpumpe BSEP wird via FXR durch Gallensalze reguliert (Ananthanarayanan et al., 2001). Hierbei wirken Ursodeoxycholat, Chenodeoxycholat und Deoxycholat sowie in geringerem Maße Cholat stimulierend auf die BSEP-Expression (Fickert et al., 2001), (Plass et al., 2002), (Schuetz et al., 2001), für Lithocholat konnte hingegen eine Expressionshemmung durch einen antagonisierenden Effekt am FXR nachgewiesen werden (Yu et al., 2002). Auch die kanalikulären Transporter MDR3, zuständig für den hepatobiliären Transport von Phospholipiden, und MRP2, welcher hydrophile organische Anionen transportiert, werden direkt durch FXR reguliert, hierbei induzieren Gallensalze eine Steigerung der Expression (Huang et al., 2003), (Kast et al., 2002).

Für kanalikuläre Transporter konnte desweiteren eine gallensalzvermittelte Translokation an die Plasmamembran nachgewiesen werden. So führte Taurocholat zu einer etwa dreifachen Steigerung der Menge von MDR1 (P-glykoprotein), welche organische Kationen transportiert (Kamimoto et al., 1989), sowie der Phospholipid-Flippase MDR2 (Ruetz et al., 1994), (Nies et al., 1996) und BSEP in der kanalikulären Membran, wobei diese vermehrte Insertion nicht durch eine gesteigerte Transkription oder Translation, sondern durch Rekrutierung aus bestehenden intrazellulären Pools zustande kam (Kipp et al., 2001). Tauroursodeoxycholat rekrutiert BSEP über eine Aktivierung der p38 (MAPK) an die Plasmamembran (Kurz et al., 2001) und führt auch zu einer vermehrten Insertion von Mrp2 in die kanalikuläre Membran (Beuers et al., 2001). Lithocholat führt dagegen zu einem *Retrieval* von Bsep aus der kanalikulären Membran in intrazelluläre vesikuläre Strukturen (Crocenzi et al., 2003), ein Effekt, der durch Gabe von Tauroursodeoxycholat

rückgängig gemacht werden kann (Dombrowski et al., 2006). Analog verhält sich auch Mrp2: auch hier führt die Gabe von Tauroolithocholat zu einem *Retrieval* aus der Membran heraus während TUDC einen erneuten Einbau in die kanalikuläre Membran stimuliert (Beuers et al., 2001).

Zum Effekt primärer Gallensalze auf die kurzfristige Regulation von Ntcp gab es bislang keine Untersuchungen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es in Ratten, die einer 90% Hepatektomie unterzogen wurden, bei hierdurch persistent erhöhten Gallensalzen im Serum zu einer Translokation von Ntcp aus der basolateralen Membran in das Zytoplasma kommt. Gleichzeitig nahm die Gesamtmenge an Ntcp ab. Allerdings handelt es sich bei diesen Untersuchungen um längerfristige Effekte, die nach 3 und 7 Tagen beobachtet wurden (Miura et al., 2011).

Es ist bekannt, dass TCDC eine Reduktion der Taurocholataufnahme in die Leber bewirkt (Drew et al., 1979). Auch für Tauroolithocholat konnte eine Inhibition der Taurocholataufnahme nachgewiesen werden, welche in Rattenhepatozyten nicht kompetitiv ist (Schwenk et al., 1977). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass dies mit einer Reduktion des membranständigen Ntcp einhergeht, auf die Gesamtmenge hatte TLC hingegen keinen Einfluss. Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt an mit NTCP transfizierten Huh7-Zellen nicht. Vielmehr war hier die TLC-induzierte Reduktion der TC-Aufnahme kompetitiv, und es zeigte sich kein Effekt auf die Membrantranslokation von NTCP (Schonhoff et al., 2009).

Ein derart unterschiedlicher Effekt auf Ntcp und NTCP konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden. So kommt es unter Einwirkung von Bosentan ebenfalls zu einer Inhibition der TC-Aufnahme, welche beim Menschen kompetitiv, bei der Ratte aber nicht-kompetitiv ist. Die hierfür verantwortlichen Aminosäuresequenzen von Ntcp/NTCP konnten bislang nicht identifiziert werden (Leslie et al., 2007).

In dieser Arbeit konnte eine Translokation von Ntcp aus der Plasmamembran heraus als Reaktion auf eine kurzfristige Stimulation mit den cholestatischen Gallensalzen Taurochenodeoxycholol und Tauroolithocholat-Sulfat gezeigt werden, die auf die Ntcp-Gesamtmenge keinen Einfluss hatte. Dieses kann einen möglichen Mechanismus zum Schutz des Hepatozyten vor toxischen intrazellulären Gallensalzkonzentrationen darstellen. Die weniger toxischen Gallensalze Taurocholol und Tauroursodeoxycholol hatten hingegen keinen derartigen Effekt.

Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten diese Ergebnisse bestätigen: Anhand einer weiteren neu entwickelten Methode, bei der an Schnitten von perfundierten Rattenlebern Ntcp zunächst mittels Immunfluoreszenz angefärbt und die resultierende Fluoreszenzintensität an der Membran dann mit einer automatisierten Messung analysiert wurde, konnte gezeigt werden, dass TCDC, nicht aber TC zur Endozytose von Ntcp in der intakten Leber führt. Analog zeigte sich bei *Uptake*-Messungen eine Inhibition der TC-Aufnahme nach Stimulation mit TCDC und TLC. In beiden Fällen war diese Inhibition nicht kompetitiv (Mühlfeld et al., 2012). Insbesondere diese Ergebnisse aus Untersuchungen im intakten Organ zeigen die Relevanz der in dieser Arbeit erhobenen Befunde auf und legen nahe, dass in beiden Systemen die Endozytose von Ntcp von spezifischen Gallensalzen induziert wird.

Es ist bekannt, dass Gallensalze die Proteinkinase C aktivieren können (Beuers et al., 1996), (Stravitz et al., 1996). So ist beispielsweise beschrieben, dass in Rattenhepatozyten die TLC-induzierte Internalisierung von Mrp2 über eine PI3K-abhängige Aktivierung der Proteinkinase C ϵ vermittelt wird (Beuers et al., 2003). In den Perfusionsexperimenten führte eine Stimulation mit dem PKC-Inhibitor Chelethrythrine zu einer deutlichen Reduktion des TCDC-Effekts auf den TC-Uptake (Mühlfeld et al., 2012). Aufgrund der starken Eigenfluoreszenz der PKC-Inhibitoren war eine Untersuchung der Interaktion zwischen Gallensalzen und PKC-Inhibitoren im FACS nicht zu beurteilen. Welches PKC-Isoenzym für diesen Effekt verantwortlich ist, stellt eine zu untersuchende Fragestellung dar.

Zusammenfassend führt eine Stimulation der calciumabhängigen Proteinkinase C-Isoformen ebenso wie eine Stimulation durch die hydrophoben Gallensalze TCDC und TLCs zu einer kurzfristigen Translokation von Ntcp aus der basolateralen Plasmamembran heraus, was eine mögliche Schutzmaßnahme des Hepatozyten vor toxischen Gallensalzkonzentrationen darstellen könnte. Die kürzliche Identifikation von Ntcp als *Entry*-Rezeptor für Hepatitis B- und D-Viren (Yan et al., 2012) macht weitere Untersuchungen der Internalisation von Ntcp umso bedeutsamer. Die Messung der Membranständigkeit mittels Durchflusszytometrie stellt dabei eine geeignete Screeningmethode dar, um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Endozytose von Ntcp/NTCP in einem prinzipiell automatisierbaren, schnellen Verfahren zu testen.

6. Literaturverzeichnis

- Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa dH, Sugiyama Y. Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochimica et biophysica acta*, **2001**; 1511:7-16
- Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ Suchy, FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, **2001**; 276:28857-28865
- Ananthanarayanan M, Ng OC, Boyer JL, Suchy FJ. Characterization of cloned rat liver Na⁺-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **1994**; 267:G637-G643
- Anwer MS, Gillin H, Mukhopadyay S, Balasubramaniyan N, Suchy FJ, Ananthanarayanan M. Dephosphorylation of Ser-226 facilitates plasma membrane retention of Ntcp. *The Journal of Biological Chemistry*, **2005**; 280:33687-33692
- Ballatori N, Li N, Fang F, Boyer JL, Christian WV, Hammond CL. OST alpha-OST beta: a key membrane transporter of bile acids and conjugated steroids. *Frontiers in Bioscience*, **2009**; 14:2829-2844
- Battaini F, Mochly-Rosen D. Happy birthday protein kinase C: past, present and future of a superfamily. *Pharmacological Research*, **2007**; 55: 461-466
- Beuers U, Bilzer M, Chittatu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G, Dombrowski F. Tauroursodeoxychoic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secre-

tion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology*, **2001**; 33:1206-1216

Beuers U, Denk GU, Soroka CJ, Wimmer R, Rust C, Paumgartner G, Boyer JL. Tauroolithocholic acid exerts cholestatic effects via phosphatidylinositol-3 kinase-dependent mechanisms in perfused rat livers and rat hepatocyte couplets. *The Journal of Biological Chemistry*, **2003**; 278:17810-17818

Beuers U, Throckmorton DC, Anderson MS, Isales CM, Thasler W, Kullak-Ublick GA, Sauter G, Koebe HG, Paumgartner G, Boyer JL. Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology*, **1996**; 110:1553-1563

Bowman EM, Siebers A, Altendorf, K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1988**; 85:7972-7976

Boyer JL, Ng OC, Ananthanarayanan M, Hofmann AF, Schteingart CD, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ. Expression and characterization of a functional rat liver Na⁺ bile acid cotransport system in COS-7 cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **1994**; 266:G382-G387

Carlton VE, Harris BZ, Puffenberger EG, Batta AK, Knisely AS, Robinson DL, Strauss KA, Shneider BL, Lim WA, Salen G, Morton DH, Bull LN. Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nature Genetics*, **2003**; 34:91-96

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa u, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry*, **1982**; 257:7874-7851

- Chiang JYL. Bile acid regulation of hepatic physiology III. Bile acids and nuclear receptors. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **2003**; 284:G349-G356
- Corbalan-Garcia S, Guerrero-Valero M, Marin-Vicente C, Gomez-Fernandez JC. The C2-domains of classical/conventional PKCs are specific PtdIns(4,5)P(2)-sensing domains. *Biochemical Society transactions*, **2007**; 35:1046-1048
- Craddock AL, Lowe MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **1998**; 274:G157-G169
- Crocenzi FA, Mottino AD, Sanchez Pozzi EJ, Pellegrino JM, Rodriguez Garay EA, Milkiewicz P, Vore M, Coleman R, Roma MG. Impaired localisation and transport function of canalicular Bsep in tauroolithocholate induced cholestasis in the rat. *Gut*, **2003**; 52:1170-1177
- De Araujo ME, Huber LA, Stasyk T. Isolation of endocytic organelles by density gradient centrifugation. *Methods in Molecular Biology*, **2008**; 424:317-331
- De Duve C, Berthet J. Reproducibility of differential centrifugation experiments in tissue fractionation. *Nature*, **1953**; 172:1142
- Dombrowski F, Kubitz R, Chittattu A, Wettstein M, Saha N, Häussinger D. Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *The Biochemical Journal*, **2000**; 348 Pt 1:183-188
- Dombrowski F, Stieger B, Beuers U. Tauroursodeoxycholic acid inserts the bile salt export pump into canalicular membranes of cholestatic rat liver. *Laboratory Investigation*, **2006**; 86:166-174

- Dranoff JA, McClure M, Burgstahler AD, Denson LA, Crawford AR, Crawford JM, Karpen SJ, Nathanson MH. Short-term regulation of bile acid uptake by microfilament-dependent translocation of rat ntcp to the plasma membrane. *Hepatology*, **1999**; 30:223-229
- Drew R, Priestly BG. Choloretic and cholestatic effects of infused bile salts in the rat. *Experientia*, **1979**; 35:809-811
- Eggertsen G, Olin M, Andersson U, Ishida H, Kubota S, Hellman U, Okuda KI, Bjorkhem I. Molecular cloning and expression of rabbit sterol 12 α -hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, **1996**; 271:32269-32275
- Evans JH, Murray D, Leslie CC, Falke JJ. Specific translocation of protein kinase Calpha to the plasma membrane requires both Ca²⁺ and PIP₂ recognition by its C2 domain. *Molecular biology of the cell*, **2006**; 17:56-66
- Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Pojer C, Zenz R, Lammert F. Effects of ursodeoxycholic acid and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver. *Gastroenterology*, **2001**; 121:170-183
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ. Identification of thyroid hormone transporters. *Biochemical and biophysical research communications*, **1999**; 254:497-501
- Geier A, Fickert P, Trauner M. Mechanisms of disease: mechanisms and clinical implications of cholestasis in sepsis. *Nature Clinical Practice, Gastroenterology and Hepatology*, **2006**; 3:574-585
- Gekeler V, Boer R, Überall F, Ise W, Schubert C, Utz I, Hofmann J, Sanders KH, Schächtele C, Klemm K, Grunicke H. Effects of the selective bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitor GF109203X on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *British Journal of Cancer*, **1996**; 74:897-905

- Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hoffmann AF, Meier PJ. The sister of p-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *The Journal of Biological Chemistry*, **1998**; 273:10046-10050
- Giogione JR, Lin JH, McCammon JA, Newton AC. Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase C delta compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. *The Journal of Biological Chemistry*, **2006**; 281:1660-1669
- Gopalkrishna R, Barsky SH, Thomas TP, Anderson WB. Factors influencing chelator-stable, detergent-extractable, phorbol diester-induced membrane association of protein kinase C. Differences between Ca²⁺-induced and phorbol ester-stabilized membrane bindings of protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, **1986**; 261:16438-16445
- Greger R, Allert N, Fröbe U, Normann C. Increase in cytosolic Ca²⁺ regulates exocytosis and Cl⁻ conductance in HT29 cells. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, **1993**; 424:329-334
- Grüne S, Engelking LR, Anwer MS. Role of intracellular calcium and protein kinases in the activation of hepatic Na⁺/taurocholate cotransport by cyclic AMP. *The Journal of Biological Chemistry*, **1993**; 268:17734-41
- Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, De Prost Y, Munnich A, Hadchouel M, Smahi A. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junctions disease. *Gastroenterology*, **2004**; 127:1386-1390
- Hagenbuch B, Lübbert H, Stieger B, Meier PJ. Expression of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **1990**; 265:5357-5360

- Hagenbuch B, Meier PJ. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *Journal of Clinical Investigation*, **1994**; 93:1326-1331
- Hagenbuch B, Meier PJ. Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Seminars in liver disease*, **1996**; 16:129-136
- Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Luebbert H, Meier PJ. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1991**; 88:10629-10633
- Hata S, Wang P, Eftychiou N, Ananthanarayanan M, Batta A, Salen G, Pang AS, Wolkoff AW. Substrate specificities of rat oatp1 and ntcp: implications for hepatic organic anion uptake. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **2003**; 285:G829-G839
- Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, Sugiyama Y. ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *The Journal of Biological Chemistry*, **2000**; 275:2905-2910
- Ho RH, Leake BF, Roberts RL, Lee W, Kim RB. Ethnicity-dependent polymorphism in Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) reveals a domain critical for bile acid substrate recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, **2004**; 279:7213-7222
- Hopp T, Prickett K, Price V, Libby R, March C, Cerretti D, Urdal T, Conlon P. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Nature Biotechnology*, **1988**; 6:1204-1210
- House C, Kemp BE. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science*, **1987**; 238:1726-1728

- Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. *The EMBO Journal*, **2006**; 25:1419-1425
- Huang L, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, De Pedro N, Royo I, Blevins RA, Pelaez F, Wright SD, Cui J. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *The Journal of Biological Chemistry* **2003**; 278:51085-51090
- Hurley JH, Newton AC, Parker PJ, Blumberg PM, Nishizuka Y. Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Science*, **1997**; 6:477-480
- Jaquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. Expression cloning of a rat liver Na⁺-independent organic anion transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1994**; 91:133-137
- Jansen PL, Hooiveld GJ, Jacquemin E, Sokal E, Van Goor H, 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
- Jansen PL, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal E, Hooiveld GJ, Koning JH, De Jager-Krikken A, Kuipers F, Stellaard F, Bijleveld CM, Gouw A, Van Goor H, Thompson RJ, Müller M. Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology*, **1999**; 117:1370-1379
- Johnson JE, Giogione J, Newton AC. The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidyserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry*, **2000**; 39:11360-11369

- Kamimoto Y, Gatmaitan Z, Hsu J, Arias IM. The function of Gp170, the multidrug resistance gene product, in rat liver canalicular membrane vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*, **1989**; 264:11693-11698
- Karpen SJ. Nuclear receptor regulation of hepatic function. *Journal of Hepatology*, **2002**; 36:832-850
- Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, constitutive androstane receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, **2002**; 277:2908-2915
- Kazanietz MG, Areces LB, Bahador A, Mischak H, Goodnight J, Mushinski JF, Blumberg PM. Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C-isozymes. *Molecular Pharmacology*, **1993**; 44:298-307
- Kazanietz MG, Bustelo XR, Barbacid M, Kolch W, Mischak H, Wong G, Pettit GR, Bruns JD, Blumberg PM. Zinc finger domains and phorbol ester pharmacophore: analysis of binding to mutated form of protein kinase C ζ and the *vav* and *c-raf* proto-oncogene products. *The Journal of Biological Chemistry*, **1994**; 269:11590-11594
- Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Kühlkamp T, Keppler D, Häussinger D, Kubitz R. Expression and Localization of Hepatobiliary Transport Proteins in Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Hepatology*, **2005**; 41:1160-1172
- Keitel V, Kubitz R, Häussinger D. Endocrine and paracrine role of bile acids. *World Journal of Gastroenterology*, **2008**; 14:5620-5629

- Kim RB, Leake B, Cvetkovic M, Roden MM, Nadeau J, Walubo A, Wilkinson GR. Modulation by drugs of human hepatic sodium-dependent bile acid transporter (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) activity. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **1999**; 291:1204-1209
- Kim JY, Kim KH, Lee JA, Namkung W, Sun AQ, Ananthanarayanan M, Suchy FJ, Shin DM, Muallem S, Lee MG. Transporter-mediated bile acid uptake causes Ca²⁺-dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*, **2002**; 122:1941-1953
- Kipp H, Pichetshote N, Arias IM. Transporters on demand. Intrahepatic pools of canalicular ATP Binding Cassette transporters in rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, **2001**; 276:7218-7224
- Kneen M, Farinas J, Li Y, Verkman AS. Green Fluorescent Protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophysical Journal*, **1998**; 74:1591-1599
- Kölling R, Hollenberg CP. The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *The EMBO Journal*, **1994**; 13:3261-3271
- Kozak, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, **1986**; 44:283-292
- Kozak, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*, **1987**; 196:947-950
- Kubitz R, D'Urso D, Keppler D, Häussinger D. Osmodependent dynamic localization of the multidrug resistance protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology*, **1997**; 113:1438-1442

- Kubitz R, Saha N, Kühlkamp T, Dutta S, vom Dahl S, Wettstein M, Häussinger D. Ca²⁺-dependent protein kinase C- isoforms induce cholestasis in rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, **2004**; 279:10323-10330
- Kubitz R, Warskulat U, Schmitt M, Häussinger D. Dexamethasone- and osmolality-dependent expression of the multidrug-resistance protein 2 in cultured rat hepatocytes. *The Biochemical Journal*, **1999**; 340 (Pt 3):585-591
- Kühlkamp T, Keitel V, Helmer A, Häussinger D, Kubitz R. Degradation of the sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) by the ubiquitin-proteasome system. *Biological Chemistry*, **2005**; 386:1065-1074
- Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport. *Journal of Hepatology*, **2000**; 32(1 suppl):3-18
- Kullak-Ublick GA, Glasa J, Boker C, Oswald M, Grutzner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G, Paumgartner G. Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology*, **1997**; 113:1295-1305
- Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Scheingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW. Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology*, **1995**; 109:1274-1282
- Kullak-Ublick GA, Ismail M, Kubitz R, Häussinger D, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Paumgartner G. Stable expression and functional characterization of a Na⁺-taurocholate cotransporting green fluorescent protein in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Cytotechnology*, **2000**; 34:1-9
- Kullak-Ublick GA, Paumgartner G, Berr F. Long term effects of cholecystectomy on bile acid metabolism. *Hepatology*, **1995**; 21:41-45

- Kurz AK, Graf D, Schmitt M, vom Dahl S, Häussinger D. Tauroursodeoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology*, **2001**; 121:407-419
- Lamark T, Perander M, Outzen H, Kristiansen K, Overvatn A, Michaelsen E, Bjorkoy G, Johansen T. Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **2003**; 278:34568-34581
- Lee J, Boyer JL. Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Seminars in liver disease*, **2000**; 20:373-384
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiological Reviews*, **2009**; 89:147-191
- Lepercq P, Gerard P, Beguet F, Raibaud P, Grill JP, Relano P, Cayuela C, Juste C. Epimerization of chenodeoxycholic acid to ursodeoxycholic acid by *Clostridium baratii* isolated from human feces. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, **2004**; 235:65-72
- Leslie EM, Watkins PB, Kim RB, Brouwer KL. Differential inhibition of rat and human Na⁺-dependent taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP/SLC10A1) by bosentan: a mechanism for species differences in hepatotoxicity. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **2007**; 321:1170-1178
- Levy-Toledano R, Caro LH, Hindman N, Taylor SI. Streptavidin blotting: a sensitive technique to study cell surface proteins; application to investigate autophosphorylation and endocytosis of biotin-labeled insulin receptors. *Endocrinology*, **1993**; 133:1803-1808
- Maillete de Buy Wenninger L, Beuers U. Bile salts and cholestasis. *Digestive and Liver Disease*, **2010**; 42:409-418

- Makowske M, Rosen OM. Complete activation of protein kinase C by an antipeptide antibody directed against the pseudosubstrate prototope. *The Journal of Biological Chemistry*, **1989**; 264:16155-16159
- Marin-Vicente C, Nicolas FE, Gomez-Fernandez JC, Corbalan-Garcia S. the PtdIns(4,5)P₂ ligand itself influences the localization of PKC α in the plasma membrane of intact living cells. *Journal of molecular biology*, **2008**; 377:1038-1052
- Maxfield FR, McGraw, TE. Endocytic Recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2004**; 5:121-132
- Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology*, **1997**; 26:1667-1677
- Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, Sugiyama Y. Inhibition of bile acid transport across Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **2006**; 34:1675-1581
- Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, Sugiyama Y. Vectorial transport of unconjugated and conjugated bile salts by monolayers of LLC PK1 cells doubly transfected with human NTCP and BSEP or with rat Ntcp and Bsep. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **2006**; 290:G550-G556
- Mita S, Suzuki H, Akita H, Stieger B, Meier PJ, Hofmann AF, Sugiyama Y. Vectorial transport of bile salts across MDCK cells expressing both rat Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide and rat bile salt export pump. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **2005**; 288:G159-G167

- Miura T, Kimura N, Yamada T, Shimizu T, Nanashima N, Yamana D, Hakamada K, Tsuchida S. Sustained repression and translocation of Ntcp and expression of Mrp4 for cholestasis after rat 90% partial hepatectomy. *Journal of Hepatology*, **2011**; 55:407-414
- Mochly-Rosen D, Henrich CJ, Cheever L, Khaner H, Simpson PC. A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regulation*, **1990**; 1:693-706
- Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1991**; 88:3997-4000
- Moseley RH. Sepsis and cholestasis. *Clinics in liver disease*, **2004**; 8:83-94
- Mühlfeld S, Domanova O, Berlage T, Stross C, Helmer A, Keitel V, Häussinger D, Kubitz R. Short-term feedback regulation of bile salt uptake by bile salts in rodent liver. *Hepatology*, **2012**; 56:2387-2397
- Mukhopadhyay S, Ananthanarayanan M, Stieger B, Meier PJ, Suchy FJ, Anwer MS. cAMP increases liver Na⁺-taurocholate cotransport by translocating transporter to plasma membranes. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **1997**; 273: G842-G848
- Mukhopadhyay S, Ananthanarayanan M, Stieger B, Meier PJ, Suchy FJ, Anwer MS. Sodium taurocholate cotransporting peptide is a serine, threonine phosphoprotein and is dephosphorylated by cyclic adenosine monophosphate. *Hepatology*, **1998**; 28:1629-1636
- Newton AC. Protein Kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical reviews*, **2001**; 101:2353-2364

- Newton AC. Protein Kinase C: Poised to signal. *American Journal of Physiology. Endocrinology and metabolism*, **2010**; 298:E395-E402
- Nguyen A, Bouscarel B. Bile acids and signal transduction: Role in glucose homeostasis. *Cellular Signaling*, **2008**; 20:2180-2197
- Nies AT, Gatmaitan Z, Arias IM. ATP-dependent phosphatidylcholine translocation in rat liver canalicular plasma membrane vesicles. *The Journal of Lipid Research*, **1996**; 37:1125-1136
- Nishizuka, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, **1984**; 308:693-698
- Orr JW, Keranen LM, Newton AC. Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *The Journal of Biological Chemistry*, **1992**; 267:15263-15266
- Orr JW, Newton AC. Intrapeptide regulation of protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, **1994**; 269:8383-8387
- Plass JRM, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PL, 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
- Pu Y, Peach ML, Garfield SH, Wincovitch S, Marquez VE, Blumberg PM. Effects on ligand interaction and membrane translocation of the positively charged arginine residues situated along the C1 domain binding cleft in the atypical protein kinase C isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, **2006**; 281: 33773-33788

- Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology*, **2003**; 38:374-384
- Ruetz S, Gros P. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell*, **1994**; 77:1071-1081
- Ryves WJ, Evans AT, Olivier AR, Parker PJ, Evans FJ. Activation of the PKC-isotypes α , β_1 , γ , δ and ϵ by phorbol esters of different biological activities. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **1991**;288:5-9
- Schonhoff CM, Umadevi R, Anwer MS. Nitric oxide-mediated inhibition of taurocholate uptake involves S-nitrosylation of NTCP. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **2011**; 300:G364-G370
- Schonhoff CM, Yamazaki A, Hohenester S, Webster CR, Bouscarel B, Anwer MS. PKC ϵ -dependent and -independent effects of tauroolithocholate on PI3K/PKB pathway and taurocholate uptake in HuH-NTCP cell line. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **2009**; 297:G1259-G1267
- Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CE, Hofmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B. Substrate specificity of the rat liver Na(+)-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **1998**; 274:G370-G375
- Schwenk M, Schwarz LR, Greim H. Tauroolithocholate inhibits taurocholate uptake by isolated hepatocytes at low concentrations. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, **1977**; 298:175-179
- Sharkey NA, Leach KL, Blumberg PM. Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1984**; 81:607-610

- Shneider BL, Fox VL, Schwarz KB, Watson CL, Ananthanarayanan M, Thevananther S, Christie DM, Hardikar W, Setchell KD, Mieli-Vergani G, Suchy FJ, Mowat AP. Hepatic basolateral sodium-dependent-bile acid transporter expression in two unusual cases of hypercholanemia and in extrahepatic biliary atresia. *Hepatology*, **1997**, 5:1176-1183
- Soldati T, Schliwa M. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2006**; 7:897-908
- Stieger B, Hagenbuch B Landmann L, Hochli M, Schroeder A, Meier PJ. In situ localization of the hepatocytic Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology*, **1994**; 107:1781-1787
- Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nature Genetics*, **1998**; 20:233-238
- Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, Cebecauerová D, Rayner A, Dutton L, Meier Y, Antoniou A, Stieger B, Arnell H, Ozçay F, Al-Hussaini HF, Bassas AF, Verkade HJ, Fischler B, Németh A, Kotalová R, Shneider BL, Cielecka-Kuszyk J, McClean P, Whittington PF, Sokal E, Jirsa M, Wali SH, Jankowska I, Pawłowska J, Mieli-Vergani G, Knisely AS, Bull LN, Thompson RJ. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology*, **2008**; 134:1203-1214
- Stravitz RT, Rao Y-P, Vlahcevic ZR, Gurley EC, Jarvis WD, Hylemon PB, Rao YP. Hepatocellular protein kinase C activation by bile acids: implications for regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **1996**; 271:G293-G303

- Stross C, Helmer A, Weissenberger K, Görg B, Keitel V, Häussinger D, Kubitz R. Protein Kinase C induces endocytosis of the sodium taurocholate cotransporting peptide. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **2010**; 299:G320--g328
- Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D, Kirilovsky J. The Bisindolylmaleimide GF 109203X Is a Potent and Selective Inhibitor of Protein Kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, **1991**; 266:15771-15781
- Traebert M, Roth J, Biber J, Murer H, Kaissling B. Internalization of proximal tubular type II Na-P(i) cotransporter by PTH: immunogold electron microscopy. *American journal of physiology. Renal physiology*, **2000**; 278:F148-154
- Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiological Reviews*, **2003**; 83:633-671
- Webster CR, Anwer MS. Role of the PI3K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **1999**; 40:G1165-G1172
- Webster CR, Blanch C, Anwer MS. Role of PP2B in cAMP-induced dephosphorylation and translocation of NTCP. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **2002**; 283:G44-50
- Webster CR, Srinivasulu U, Ananthanarayanan M, Suchy FJ, Anwer MS. Protein kinase B/Akt mediates cAMP- and cell swelling-stimulated Na⁺/taurocholate cotransport and Ntcp translocation. *The Journal of Biological Chemistry*, **2002**; 277:28578-28583
- Weinman SA. Electrogenicity of Na(+)-coupled bile acid transporters. *Yale Journal of Biology and Medicine*, **1997**; 70:331-340

- Yamazaki K, Gleich GJ, Kita H. Bile acids induce eosinophil degranulation by two different mechanisms. *Hepatology*, **2001**; 33:582-590
- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *elife* **2012**; 1:e00049
- Yeaman C. Ultracentrifugation-based approaches to study regulation of Sec6/8 (exocyst) complex function during development of epithelial cell polarity. *Methods*, **2003**; 30:198-206
- Yoshimori T, Akitsugu Y, Yoshinori M, Futai M, Tashiro Y. Bafilomycin A₁, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **1991**; 26:17707-17712
- Yu J, Lo JL, Huang L, Zhao A, Metzger E, Adams A, Meinke PT, Wright SD, Cui J. Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **2002**; 277:31441-31447

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre stetige Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf Kubitz, Herrn Prof. Dr. Dieter Häusinger, Frau Prof. Dr. Keitel-Anselmino sowie dem gesamten Team der Experimentellen Hepatologie.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, 21.7.2014

Angelika Helmer