

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

Expression und Trafficking verschiedener Isoformen und Mutationen der
humanen Phospholipidfloppase MDR3

Dissertation

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

vorgelegt von
Doris Marie Linnemann
2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ralf Kubitz

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kluth M, Stindt J, Dröge C, Linnemann D, Kubitz R, Schmitt L. A mutation within the extended X loop abolished substrate-induced ATPase activity of the human liver ATP-binding cassette (ABC) transporter MDR3. J Biol Chem 2015; 290(8):4896–90

Zusammenfassung

MDR3 (ABCB4) ist eine Phosphatidylcholinfloppase an der kanalikulären Membran der Hepatozyten. MDR3 transportiert Phosphatidylcholin zur Bildung gemischter Mizellen mit Cholesterin und Gallensalzen über die Membran in den Gallenkanalikulus. Neben der Isoform A von MDR3 wurden 1987 zwei weitere MDR3 *Splice*-Varianten - Isoform B und C - entdeckt, deren Funktion bisher nicht bekannt ist. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Isoform B in der Zellkultur exprimiert und deren subzelluläre Lokalisation untersucht. Die Isoform B zeigte sich nach Expression in HEK293- und HepG2-Zellen im Vergleich zu der Isoform A zu einem größeren Teil intrazellulär lokalisiert und kolokalisierte mit dem Degradations-Marker Ubiquitin. Eine rein intrazelluläre Funktion, ebenso der vorzeitige Abbau als funktionsloses Protein werden diskutiert.

Mutationen im MDR3-Gen sind mit verschiedenen zum Teil schwerwiegenden Krankheiten assoziiert. Die krankheitsverursachenden Mechanismen und der Einfluss von MDR3-Mutationen auf die Funktion des Proteins sind in vielen Fällen nicht bekannt. Defekte des intrazellulären *Traffickings* des Proteins sind eine mögliche, schwerwiegende Auswirkung von Mutationen, welche die physiologische Funktion des aus dem betroffenen Allel resultierenden Proteins aufheben können. Die Mutationen S27G, S1076N, Q1174E und H1231Y wurden bei Patienten mit cholestatischen, MDR3-Defekt-assoziierten Krankheitsbildern gefunden. In einem zweiten Teil der Arbeit sollten die Mutationen hinsichtlich von Expressions- und *Trafficking*-Defekten in der Zellkultur untersucht werden. Die Mutationen wurden in einem Expressionsvektor - N-terminal YFP-getagged - erstellt, in HEK293- und HepG2-Zellen exprimiert und über konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie mit dem Wildtyp verglichen. Als Kontrolle für einen *Trafficking*-Defekt wurde die bereits als *Trafficking*-Defekt Mutante charakterisierte Mutante I541F ebenfalls in einem Vektor erstellt und zur Kontrolle exprimiert. Zur untersucherunabhängigen Bewertung der Membrankolokalisation der Mutanten wurde ein Arbeitsablauf zur Detektion von *Trafficking*-Defekten weiterentwickelt. Weder nach initialer Durchmusterung der Präparate noch nach Auswertung der untersucherunabhängigen Kolokalisationsanalyse konnte ein *Trafficking*-Defekt der Mutanten S27G, S1076N, Q1174E und H1231Y vergleichbar mit I541F festgestellt werden. Die Mutationen wurden hinsichtlich ihrer Lokalisation im MDR3-Homologiemodell analysiert. Unter Berücksichtigung aktueller Studien und der Lokalisation in der Nähe der Nukleotidbindedomänen scheint ein Funktionsdefekt der Mutationen S1076N, Q1174E und H1231Y wahrscheinlich. Da die Aminosäure S27 im verwendeten Homologiemodell nicht abgebildet ist, ist die Bedeutung der Mutation S27G schwer vorherzusehen. Vorangegangene Studien erbrachten Hinweise auf einen *Splicing*-Defekt (1). Die Untersuchungen ergaben Hinweise auf eine stärkere Expression oder verminderte Degradation der Mutante S1076N.

Abstract

The phosphatidylcholine floppase MDR3 (ABCB4) transports phosphatidylcholine from the inner to the outer leaflet of the membrane of the hepatocytes to form mixed micelles with bile salts and cholesterol in the bile canaliculi. In 1987 two additional splice variants – isoform B and C - of MDR3 have been identified. The function of the isoforms B and C are not yet known.

In the first part, isoform B was expressed in cell culture and its subcellular localization was examined. After expression in HEK293 and HepG2 cells, Isoform B, compared to isoform A, was found to be located intracellularly to a large extent and colocalized with the degradation marker ubiquitin. It is possible that isoform B has no function as a protein or is degraded in a premature form. An intracellular function of the variant B is also discussed.

Mutations in the MDR3 gene are associated with various, partly serious diseases. In many cases, the disease-causing mechanisms and the influence of MDR3 mutations on the function of the protein are not known. Defects in intracellular trafficking of the protein are a possible, serious effect of mutations which can negate the physiological function of the protein resulting from the affected allele. The mutations S27G, S1076N, Q1174E and H1231Y were found in patients with cholestatic, MDR3-defect-associated liver diseases. In a second part of the thesis, the mutations were examined regarding expression and trafficking defects. The mutations were created in an expression vector - N-terminal YFP-tagged -, expressed in HEK293 and HepG2 cells and compared with the wild type by confocal laser scanning microscopy. As a control for a trafficking defect, the mutant I541F, already characterized as a trafficking defect mutant, was also created in a vector and expressed in the cells. A workflow for the detection of trafficking defects was further developed for the independent evaluation of the membrane colocalization of the mutants.

A trafficking defect comparable to I541F was not detected in the mutants S27G, S1076N, Q1174E and H1231Y neither after initial screening of the specimens nor after evaluation of the investigator-independent colocalization analysis. The mutations were analyzed for their location in the MDR3 homology model. Taking current studies into account and the location near the nucleotide binding domains, a functional defect of the mutations S1076N, Q1174E and H1231Y seems likely. Since the amino acid S27 is not shown in the homology model used, the meaning of the mutation S27G is difficult to predict. Previous studies indicated a splicing defect (1). The investigations showed evidence of a higher expression or reduced degradation of the mutant S1076N.

Abkürzungen

-/-	homozygoter <i>Allel-knockout</i>
+/-	heterozygoter <i>Allel-knockout</i>
*	signifikant ($0,01 < p \leq 0,05$)
**	stark signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$)
***	hochsignifikant ($p \leq 0,001$)
Abb.	Abbildung
ABC	<i>adenosintriphosphate binding cassette</i>
AK	Antikörper
APS	<i>ammonium persulfate</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pair</i>
BRCP	<i>breast cancer resistance protein</i>
BRIC	<i>benign recurrent intrahepatic cholestasis</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
BSEP	<i>bile salt export pump</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
D	Asparaginsäure
dest.	destilliert
DIC	<i>drug induced cholestasis</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphate</i>
DREAM	<i>Directed Recombination Assisted Mutagenesis</i>
DTT	Dithiotreitol
E	Glutaminsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EB	<i>elution buffer</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Endkonz.	Endkonzentration
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
F	Phenylalanin
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FXR	<i>farnesoid X receptor</i>
G	Glycin
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GS	Gallensalz
H	Histidin

HEK	<i>human embryonal kidney</i>
HepG2	<i>Human Hepatoma Cell Line G2</i>
I	Isoleucin
ICP	<i>intrahepatic cholestasis of pregnancy</i>
kb	<i>kilo base</i>
kDa	<i>kilo dalton</i>
Ktrl.	Kontrolle
L	Lysin
LB	<i>lysogeny broth</i>
Leu	Leucin
LPAC	<i>low phospholipid associated cholelithiasis</i>
LSLB	<i>low salt lysogeny broth</i>
MDR	<i>multidrug resistance protein</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
n	Anzahl
N	Asparagin
n.d.	nicht definiert
NBD	<i>nucleotide binding domain</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
Ori	<i>origin of replication</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PFIC	<i>progressive familial intrahepatic cholestasis</i>
PPAR α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor α</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	<i>room temperature</i>
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
S	Serin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s.u.	siehe unten
SDM	<i>site-directed mutagenesis</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>

TBS(-T)	<i>tris-buffered saline (-Tween)</i>
TEMED	<i>NN,N',N' - tetramethylethylenediamine</i>
TMD	<i>transmembrane domain</i>
TRIS	<i>tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
UDCA	<i>ursodeoxycholic acid</i>
V	<i>Valin</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/o	<i>without</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
Y	<i>Tyrosin</i>
YNB	<i>yeast nitrogen broth</i>
YPD	<i>yeast extract peptone glucose</i>
YOB	<i>year of birth</i>
γ-GT	<i>Gamma-Glutamyltransferase</i>

SI-Einheiten wurden nicht aufgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Hepatobiliärer Transport	1
1.2 Multidrug resistance protein 3 (MDR3)	2
1.3 MDR3-Defekt assoziierte Erkrankungen	3
1.3.1 Progressive familial intrahepatic Cholestasis type 3 (PFIC-3)	4
1.3.2 Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy (ICP).....	5
1.3.3 Low-Phospholipid associated Cholelithiasis (LPAC)	6
1.3.4 Weitere mit MDR3-Defekten assoziierte Erkrankungen	6
1.4 Molekularer Aufbau von MDR3	6
1.5 MDR3-Mutationen	8
1.6 Expression und intrazelluläres Trafficking von MDR3.....	9
1.7 MDR3-Isoformen.....	9
2 Ziele der Arbeit.....	11
3 Material und Methoden.....	12
3.1 Material	12
3.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Detergenzien, Antibiotika, Proteine, Zellkulturmedien	12
3.1.2 Kits	13
3.1.3 Antikörper	13
3.1.4 Plasmide.....	14
3.1.5 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme.....	14
3.1.6 Oligonukleotide.....	15
3.1.7 Verbrauchsmaterialien.....	16
3.1.8 Technische Hilfsmittel.....	17
3.2 Methoden	18
3.2.1 Molekular- und mikrobiologische Methoden	18
3.2.1.1 Plasmidgewinnung in E. coli	18
3.2.1.2 Plasmidgewinnung in Saccharomyces cerevisiae	19
3.2.1.3 Transformation von E. coli	21
3.2.1.4 Herstellung kompetenter S. cerevisiae	22
3.2.1.5 Transformation von S. cerevisiae	23
3.2.1.6 Plasmidpräparation aus S. cerevisiae	23
3.2.1.7 Plasmidpräparation aus E. coli	23
3.2.1.8 Restriktionsenzymverdau und Gelelektrophorese.....	24
3.2.1.8.1 Restriktionsenzymverdau	24
3.2.1.8.2 Gelelektrophorese	24
3.2.1.9 Sequenzierung.....	25
3.2.1.10 Polymerase Chain Reaction (PCR)	25
3.2.1.11 Klonierung und Mutagenese	27
3.2.1.11.1 Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)	27
3.2.1.11.2 Directed Recombination assisted <i>Mutagenesis</i> (DREAM)	29
3.2.1.12 Na ⁺ -Azetat-Ethanol-fällung.....	30
3.2.2 Zellkultur	30
3.2.2.1 Zellkulturbedingungen	30
3.2.2.2 Einfrieren von HEK293-Zellen.....	31
3.2.2.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	32
3.2.2.4 Methanolfixierung.....	32
3.2.2.5 Immunfärbung	32
3.2.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie.....	33

3.2.3.1 Grundeinstellungen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM)	33
3.2.3.2 Grundeinstellungen für die Kolokalisationsanalysen	33
3.2.3.3 Einstellung von Detector Gain und Amplifier Offset	34
3.2.3.4 Detektion von Lokalisationsunterschieden und Trafficking-Defekten	34
3.2.3.5 Berechnung der Kolokalisation	35
3.2.3.6.1 Kolokalisationsanalyse der MDR3-Isoformen	36
3.2.3.6.2 Statistik MDR3-Isoformen	37
3.2.3.7 Kolokalisationsanalyse der MDR3-Mutanten	37
3.2.3.7.1 Standardisierte Bildaufnahme	37
3.2.3.7.2 Einstellung der Schwellenwerte	38
3.2.3.7.3 Regions of Interest (ROI)	39
3.2.3.7.4 Qualitätskontrolle der Zellen vor der Auswertung	41
3.2.3.7.5 Statistik MDR3-Mutationen	42
3.2.4 Proteinbiochemische Methoden	42
3.2.4.1 Proteinlysate	42
3.2.4.2 Bradfordassay	42
3.2.4.3 SDS-Page und Western Blot	43
3.2.4.4 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	44
3.2.4.5 Western Blot	45
3.2.4.5.1 Antikörper für den Western Blot	45
3.2.4.5.2 Detektion	46
4 Ergebnisse	47
4.1 <i>Expression und subzelluläre Lokalisation der Isoform B</i>	47
4.1.1 Statistische Kolokalisationsanalyse der MDR3-Isoformen	51
4.1.2 Kolokalisationsexperiment mit Ubiquitin	52
4.2 <i>Expression und subzelluläre Lokalisation der MDR3-Mutanten</i>	53
4.3 <i>Statistische Kolokalisationsanalyse der MDR3-Mutanten</i>	55
4.3.1 Arbeitsablauf der standardisierten Kolokalisationsanalyse	55
4.3.2 Statistische Auswertung	57
4.3.2.1 Kolokalisationskoeffizient M1	57
4.3.2.2 Kolokalisationskoeffizient M2	59
4.3.2.3 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-assoziierte Intensität	60
4.3.2.4 Zellfläche	62
4.3.2.5 MDR3-assoziierte Intensität	63
4.3.2.6 Ergebnisse der standardisierten Kolokalisationsanalyse der Mutationen	65
4.4 <i>Proteinexpression der MDR3-Isoformen und Mutationen</i>	66
4.4.1 Western Blot der MDR3-Isoformen	66
4.4.2 Western Blot der MDR3-Mutationen und Isoformen	66
4.4.3 Korrelation von Western Blot und Kolokalisationsanalyse	67
4.5 <i>Zusammenhang der Parameter der Kolokalisationsanalyse</i>	68
4.5.1 Kolokalisationskoeffizient M1 und MDR3-assoziierte Intensität	68
4.5.2 Korrelation von M1 mit Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-assoziiierter und MDR-assoziiierter Intensität	69
4.5.3 Die Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-assoziierte und MDR3-assoziierte Gesamtintensität der Experimentalsets im Vergleich	70
5 Diskussion	72
5.1 <i>MDR3-Isoformen</i>	72
5.1.1 Lokalisationsunterschied der MDR3-Isoformen	72
5.1.2 Diskussion einer möglichen Funktion der Isoform B	73
5.2 <i>MDR3-Mutationen</i>	74
5.2.1 Ergebnisse der standardisierten Kolokalisationsanalyse	75
5.2.2 Diskussion der Methodik	76

5.2.3 In silico Analysen der MDR3-Mutationen	78
5.2.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.....	80
5.2.4.1 Die Mutation S27G	82
5.2.4.2 Die Mutationen S1076N, Q1174E und H1231Y	83
5.2.4.3 Schlussfolgerungen der Genotyp-Phänotyp Analyse	85
6. Schlussfolgerungen	86

1 Einleitung

1.1 Hepatobiliärer Transport

Der Transport von Gallenbestandteilen über die kanalikuläre Membran der Hepatozyten wird durch ein System primär aktiver Membranpumpen mediert (2). Gallensalze, Phosphatidylcholin und Cholesterin sind Hauptbestandteile der Gallenflüssigkeit. Gallensalze werden über die *bile salt export pump* (BSEP, ABCB11) in den kanalikulären Raum sezerniert (3–5). Phosphatidylcholin wird durch das *multidrug resistance protein 3* (MDR3, ABCB4) in das äußere Blatt der Phospholipiddoppelschicht gefloppt (6–8) und dort zur Extraktion durch Gallensalze exponiert (9–11). Cholesterin wird über ABCG5/G8 durch die Membran transportiert (12–14). Weitere organische Anionen und Kationen werden über die Transporter MRP2 (ABCC2) (15–17), MDR1 (ABCB1) (18,19) und BCRP (ABCG2) (20) transportiert. Unter ATP-Verbrauch wird durch die transportierten Solute ein 100 bis 1000-facher Konzentrationsgradient gegenüber dem Plasma aufgebaut. Wasser und Elektrolyte folgen parazellulär über semipermeable *tight junctions*, sowie transmembranär über Aquaporine in den Kanalikulus (2,21). Zur Stabilisierung der Membranasymmetrie transportiert FIC1 (ATP8B1) Aminophospholipide vom äußeren in das innere Blatt der Phospholipiddoppelschicht (22,23)(**Abb. 1**).

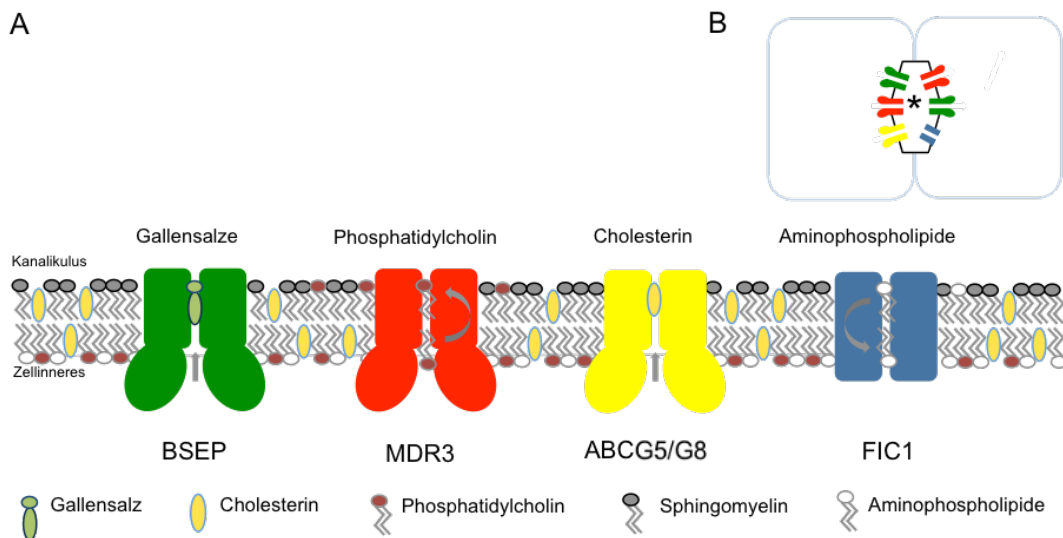


Abb. 1 A Ausgewählte Transportproteine an der kanalikulären Membran der Hepatozyten. BSEP, MDR3 und ABCG5/G8 transportieren Gallensalze, Phosphatidylcholin und Cholesterin über die kanalikuläre Membran der Hepatozyten. Zur Stabilisierung der Membranasymmetrie transportiert FIC1 Aminophospholipide vom äußeren ins innere Blatt der Phospholipiddoppelschicht. Abbildung angelehnt an eine Abbildung von Elferink und Paulusma et al. (24) **B Hepatozytendoublett mit Lokalisation der Transporter an der kanalikulären Membran.** * = Kanalikulus

1.2 Multidrug resistance protein 3 (MDR3)

Multidrug resistance protein 3 (MDR3) ist eine Phosphatidylcholinfloppase (6–8) welche bei Menschen nahezu ausschließlich an der kanalikulären Membran der Hepatozyten exprimiert wird (25). MDR3 transportiert Phosphatidylcholin vom inneren in das äußere Blatt der Phospholipiddoppelschicht. Dort exponiertes Phosphatidylcholin wird durch Gallensalze zur Bildung gemischter Mizellen aus der Membran gelöst (10,11,24) (**Abb. 2 A**). Gallensalze sind starke Detergenzien, welche durch Phosphatidylcholin in gemischten Mizellen gebunden werden. Gemischte Mizellen halten zudem hydrophobe Gallenbestandteile wie Cholesterin in Lösung und erleichtern deren Absorption im Dünndarm bzw. deren Ausscheidung mit der Gallenflüssigkeit (24,26,27). Sinkt der Anteil an Phosphatidylcholin in der Gallenflüssigkeit, bilden sich vermehrt einfache Mizellen und die Konzentration freier Gallensalze im Kanalikulus steigt (28). Einfache Mizellen und freie Gallensalze lösen verstärkt Phospholipide aus den Membranen der Gallenwege, wodurch die Membranen der Gallenwege geschädigt werden können (24,29). Durch einen geringeren Anteil an Phosphatidylcholin in der Gallenflüssigkeit sinkt bei MDR3-Defekten zudem die Löslichkeit von Cholesterin wodurch die Bildung von Cholesterinsteinen begünstigt wird (21,26,30) (**Abb. 2 B**).

Die Funktion von MDR3 und die pathologischen Mechanismen bei MDR3-Defekt wurden erstmals anhand der *Mdr2-knockout*-Maus beschrieben (8). Der *knockout* des MDR3-Homologen *Mdr2* (31) führte bei den Mäusen zu einer Reduktion von Phosphatidylcholin in der Gallenflüssigkeit (8). Bei der *Mdr2-knockout*-Maus drangen Gallensalze im Verlauf der Schädigung über durchlässige *tight junctions* in die Portalfelder ein und lösten periduktale Inflammation, Fibrogenese und somit eine obliterative Cholangitis aus (8,32). Durch die Expression von humanem MDR3 in der *Mdr2-knockout*-Maus konnte die Phosphatidylcholinexkretion der Mäuse wieder hergestellt werden (33). Mäuse, welche *Mdr2*- und *Fic1*-defizient gezüchtet wurden, zeigten einen milderen Phänotyp als alleinige *Mdr2-knockout*-Mäuse (23). Die Störung der Membranasymmetrie wird daher als Teil des Pathomechanismus bei MDR3-Defekt diskutiert (34).

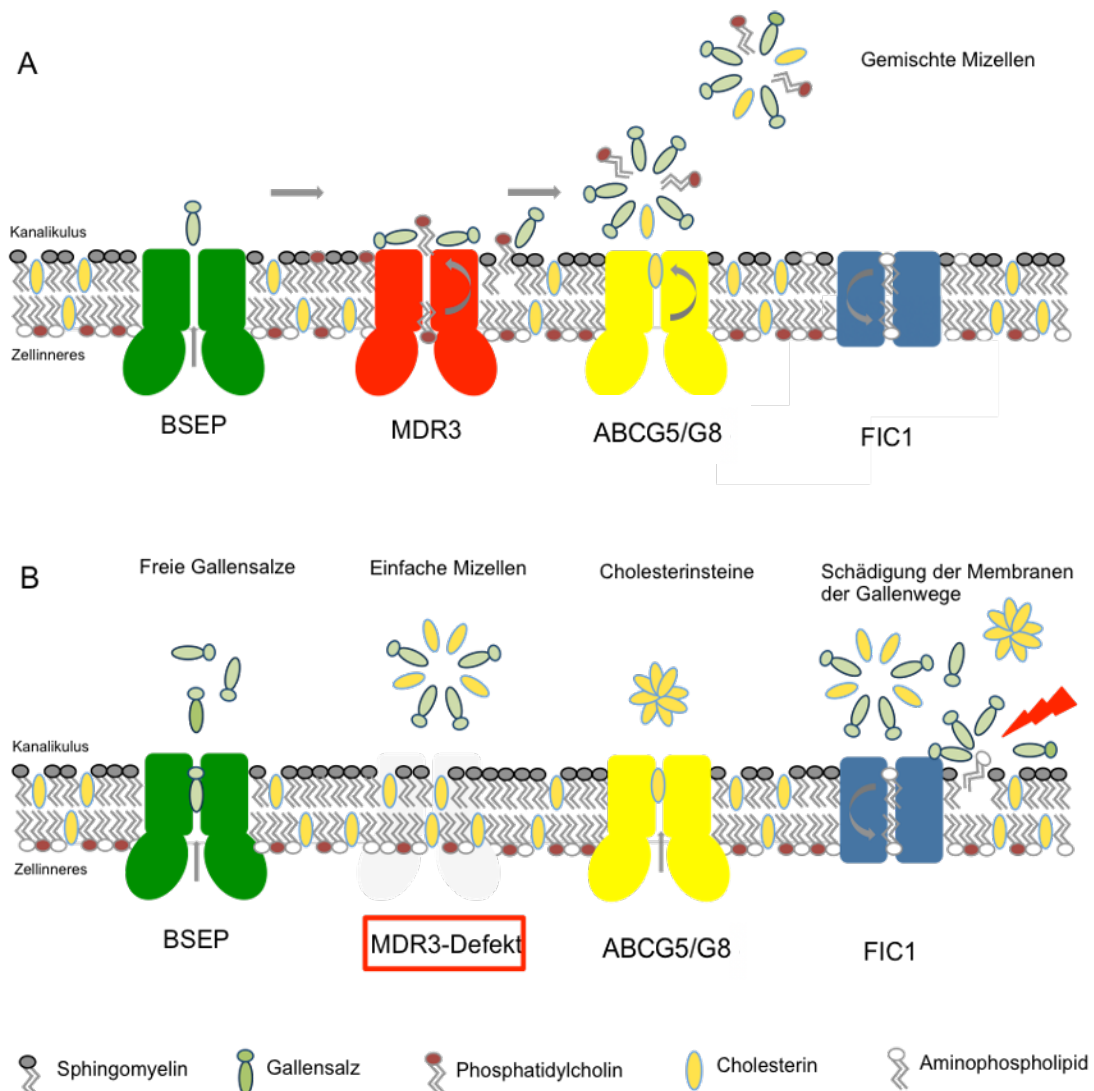


Abb. 2 A Vereinfachte Darstellung der Bildung von gemischten Mizellen aus Gallensalzen, Phosphatidylcholin und Cholesterin. MDR3 transportiert Phosphatidylcholin von der inneren in die äußere Membrandoppelschicht der Gallenkanalikul der Hepatozyten. Phosphatidylcholin wird dort exponiert und von Gallensalzen zur Bildung gemischter Mizellen gelöst. Cholesterin kann durch gemischte Mizellen gut in Lösung gehalten werden. Abbildung angelehnt an (24,27). **B Vereinfachte Darstellung der pathologischen Mechanismen bei MDR3-Defekt.** Durch MDR3-Defekt erhöht sich der Anteil freier Gallensalze und einfacher Mizellen in der Gallenflüssigkeit. Freie Gallensalze lösen verstärkt Phospholipide aus den Membranen der Gallengänge. Cholesterin ist in einfachen Mizellen weniger löslich. Es kommt verstärkt zur Ausbildung von Cholesterinsteinen (21) und einer Schädigung der Gallenwege.

1.3 MDR3-Defekt assoziierte Erkrankungen

Das Spektrum der Erkrankungen welche bisher mit MDR3-Defekten assoziiert wurden ist groß (35–38). Sehr wahrscheinlich findet sich ein fließender Übergang zwischen den Krankheitsbildern (1,39–41), abhängig von der Schwere des zugrundeliegenden MDR3-Funktionsdefekts und somit der zugrunde liegenden Mutation von MDR3 (42,43). Einzelne *Missense*-Mutationen können in

heterozygoter Form milde cholestatische Erkrankungen und in homozygoter oder *compound* heterozygoter Form schwere klinische Manifestationen bedingen (1). Darüber hinaus gibt es Allelvarianten und *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), welche nicht zu einer messbaren Erkrankung führen und als benigne Polymorphismen angesehen werden können (44) oder möglicherweise einen leichten Funktionsdefekt bewirken, welcher sich erst bei Exposition mit weiteren cholestatischen Noxen manifestiert (29).

1.3.1 Progressive familial intrahepatic Cholestasis type 3 (PFIC-3)

Die Erkrankung PFIC-3 kann am deutlichsten auf Mutationen im MDR3-Gen zurückgeführt werden (36) und zeigt von den MDR3-assoziierten Erkrankungen den schwersten Verlauf. Im Mausmodell konnte ein *knockout* des MDR3-homologen *mdr2* einen progressiven Leberschaden auslösen, welcher hinsichtlich der Histologie und des Krankheitsverlaufs gut mit dem klinischen Erscheinungsbild von Patienten mit MDR3-Defekt bzw. PFIC-3 korreliert (8,45). PFIC-3 ist eine seltene und nach Stammbaumanalysen autosomal rezessiv vererbte Erkrankung (OMIM Nr. 602347). Die Häufigkeit von PFIC-3 ist aufgrund einer geringen Datenlage schwer zu schätzen. Eine *Multi-Center*-Studie ergab eine geschätzte Häufigkeit von eins zu 50.000 in der italienischen Bevölkerung (46). Die Erkrankung manifestiert sich meist in einem Alter von einem Monat bis hin zu 20,5 Jahren als progressive cholestatische Lebererkrankung. Unbehandelt schreitet die Krankheit fort und es entwickelt sich eine Leberzirrhose, portale Hypertension und Leberversagen, sodass es bei etwa der Hälfte der Fälle zu einer Transplantationsbedürftigkeit kommt (35,36). Die primäre Therapie besteht in der Gabe von Ursodeoxycholsäure (UDCA) (35). Charakteristischer Laborbefund der Patienten ist meist eine deutlich erhöhte γ -GT kombiniert mit erhöhten Transaminasen und erhöhten Gallensalzen im Serum. PFIC-3 weist eine hohe allelische Heterogenität auf. Verursachende Mutationen sind über die gesamte Länge der 27 kodierenden Exone verteilt (46). Schon häufiger wurden bei PFIC-3 Patienten gleichzeitig mehrere MDR3-assoziierte Erkrankungen in kontinuierlichem Übergang gefunden (39). Eine Studie von 2001 an 31 Patienten mit einem PFIC-3 Phänotyp konnte nur in 17 Fällen einen MDR3-Defekt nachweisen. Zwölf Patienten waren homozygot betroffen, fünf Patienten heterozygot (35). In einer italienischen Studie von 2011 mit 96 PFIC-3-Patienten wurde bei 28 Patienten ein MDR3-Defekt festgestellt. Zwanzig Patienten trugen einen homozygoten Defekt, acht waren heterozygot (47). Somit kann nur bei etwa einem Drittel der PFIC-3-Patienten ein MDR3-Defekt nachgewiesen werden. Von dem betroffenen Drittel zeigen zwei Drittel eine homozygote Mutation und ein Drittel eine heterozygote Mutation (35,47). Es scheint, dass noch andere Einflussfaktoren die Entwicklung eines PFIC-3 Phänotyps triggern. Diskutiert werden intronische Mutationen oder Mutationen in regulatorischen Sequenzen, welche in den meisten Studien nicht sequenziert wurden (9,41,48). Möglicherweise existieren noch weitere Unterformen der PFIC, die phänotypisch

einer PFIC-3 gleichen, aber Gendefekte außerhalb der kodierenden Region des ABCB4-Gens aufweisen.

1.3.2 Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy (ICP)

Zu dem Spektrum der mit MDR3-Mutationen assoziierten Krankheitsbilder gehört die intrahepatische Schwangerschaftscholestase (ICP), welche eine multifaktorielle Ätiologie mit hormonellen, umweltbedingten und genetischen Einflüssen zeigt (38,49). Die ICP ist mit Mutationen in MDR3 und BSEP (48–50) sowie mit geringerer Evidenz mit Mutationen in FIC1 (40,41,49) assoziiert. Die Symptomatik der betroffenen Patientinnen besteht meist in Juckreiz, welcher im dritten Trimester der Schwangerschaft auftritt sowie in erhöhten Serum-Gallensalzen und erhöhten Leberwerten (51–53). Die Patientinnen präsentieren sich zu etwa 80% nach der 30. Schwangerschaftswoche (54,55). Je nach Schwere des Verlaufs besteht für das Kind der betroffenen Mutter die Gefahr der Frühgeburtlichkeit, des intrauterinen Stresses mit Mekonium-gefärbtem Fruchtwasser und des intrauterinen Todes (56–58). Eine hohe Gallensalzkonzentration im Serum der Mutter spricht für einen schweren Verlauf der ICP und eine schlechtere Prognose für das Kind (53,57). Die Therapie erfolgt normalerweise mit UDCA (49) und kann, vor allem bei stark betroffenen Patientinnen, einen Rückgang von Juckreiz, Serum-Gallensalzen und Transaminasen bewirken (49,59,60). Ob hierdurch auch die Geburtskomplikationsrate gesenkt werden kann ist noch nicht abschließend geklärt (49). 30 % der Patientinnen zeigen im Verlauf eine erhöhte γ -GT (61). Häufig finden sich bei diesen Patientinnen mit erhöhter γ -GT MDR3-Mutationen (1,48,50,62–64). Schon häufiger wurden Fälle von ICP und PFIC-3 bei verwandten Individuen beschrieben. Die Mütter von homozygot betroffenen Kindern mit PFIC-3 sind in diesen Fällen heterozygot von MDR3-Mutationen betroffen. Einige dieser Mütter entwickelten eine ICP oder wiesen intermittierend milde cholestatische Symptome auf. Der Erbgang der ICP wird daher auch als autosomal dominant bezeichnet (35,36,62). Sehr wahrscheinlich spielen die hohen Werte von Östrogenen und Progesteronderivaten im letzten Drittel der Schwangerschaft bei der Pathogenese dieser Erkrankung eine Rolle (51,65,66). Durch hohe Östrogenspiegel ändert sich das Expressionsmuster vieler kanalikulärer Transportproteine als Ursache der Cholestase (54,67). Es zeigte sich, dass die Einnahme von oralen Kontrazeptiva bei einer MDR3-Mutation cholestatische Symptome auslösen oder verstärken kann (68). Wahrscheinlich führt ein heterozygoter MDR3-Defekt bei den betroffenen Müttern zu einer transienten Dekompensation der MDR3-Funktion (62).

1.3.3 Low-Phospholipid associated Cholelithiasis (LPAC)

Das klinische Bild der LPAC ist charakterisiert durch das frühe Auftreten von Cholesterinsteinen, häufig schon im jungen Erwachsenenalter. Typischerweise muss daher eine Cholezystektomie bereits vor dem 40. Lebensjahr durchgeführt werden. Ein weiteres Charakteristikum ist das Auftreten intrahepatischer oder intraduktaler Cholesterinsteine nach Cholezystektomie (69). Häufig besteht eine familiäre Häufung cholestatischer Erkrankungen (37). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl heterozygote als auch milde homozygote Defekte bei der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt sind (37,69–71).

1.3.4 Weitere mit MDR3-Defekten assoziierte Erkrankungen

Es gibt Hinweise, dass ein Teil der adulten, kryptogenen Leberzirrhose durch MDR3-Defekte verursacht ist. In einer Kohorte von 32 Patienten mit ungeklärter Cholestase konnten bei 34 % der Patienten MDR3-Mutationen nachgewiesen werden (72).

MDR3-Mutationen konnten darüber hinaus mit der Entwicklung von Cholangiokarzinomen assoziiert werden. In wenigen Fällen heterozygoter, aber nach Mutationsvorhersage schwerwiegender Mutationen, kam es zur Entwicklung cholangiozellulärer Karzinome (73). Die chronische Inflammation des Gallenwegssystems könnte ein Wachstum der Cholangiozyten induzieren und zur Entwicklung von Cholangiokarzinomen prädisponieren (73–75).

Die Transportsysteme an der kanalikulären Membran sind bei Neugeborenen noch nicht voll entwickelt (24,76). Heterozygote Mutationen in BSEP (41,50) und auch MDR3 wurden bereits mit neonataler Cholestase assoziiert (1).

Medikamente können die Expression von kanalikulären Transportern beeinflussen und eine medikamenteninduzierte Cholestase (DIC) verursachen. Fälle medikamenteninduzierter Cholestase wurden bereits mit heterozygoten Mutationen in BSEP und MDR3 assoziiert (67). Es wurden verschiedene Medikamente beschrieben, welche die MDR3-Funktion inhibieren können wie Digoxin, Paclitaxel, Vinblastin, Verapamil und Cyclosporin A (77,78).

1.4 Molekularer Aufbau von MDR3

Das Gen für MDR3 (ABCB4) liegt auf Chromosom 7q21.1 (79). MDR3 gehört zur Superfamilie der ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter welche in sieben Unterfamilien ABCA bis ABCG gegliedert ist (79). Der Name *Multidrug resistance protein 3* entwickelte sich aus der hohen Sequenzähnlichkeit von 78 % zu dem Multidrogentransporter MDR1 (p-Glykoprotein) sowie einer hohen Entsprechung zu dem dritten p-Glykoprotein, welches beim Hamster gefunden wurde (Osim Entry 171060) (80). MDR3 und MDR1 ähneln sich zu großen Teilen in ihrer Domänenorganisation und scheinen aus der Genduplikation eines gemeinsamen Vorfahrens entstanden zu sein (46,81).

MDR3 besteht aus zwei homologen Hälften mit zwei sich entsprechenden Sequenzmotiven von 610 Aminosäuren, welche jeweils eine Transmembrandomäne (TMD) und eine Nukleotidbindedomäne (NBD) enthalten. Die Transmembrandomänen bestehen aus sechs α -Helices und werden alternierend extrazellulär und intrazellulär über *extracellular loops* (EC) und *intracellular loops* (IC) verbunden. Die erste Nukleotidbindedomäne wird über die 60 Aminosäuren lange *linker*-Region mit der zweiten TMD verbunden. Die NBDs, welche zwischen verschiedenen ABC-Transportern hoch konserviert wurden, liefern durch ATP-Bindung und Hydrolyse die Energie für den Substrattransport (46,82,83). Sie enthalten hoch konservierte Sequenzmotive: Dem Walker-A-Motiv, C-loop - auch ABC-Signatur (LSGGQ) genannt - und dem Walker-B-Motiv (84), folgen der D-loop und ein hoch konserviertes Histidin, welches für die ATP-Hydrolyse relevant ist (85) (**Abb. 3**). Für den Substrattransport durch MDR3 wurden bisher mehrere Modelle vorgeschlagen (86–88). Es wird angenommen, dass die NBDs während jedes katalytischen Zyklus durch die Bindung von zwei ATP ein Dimer bilden (87). Jedes ATP wird durch die Cis- und die Trans-site an der ersten und zweiten NBD gebunden. Die Cis-site besteht aus dem Walker-A- und B-Motiv sowie dem H- und dem D-loop. Die Trans-site besteht aus dem C-loop (89–92). Während des katalytischen Zyklus wechselt der Transporter durch die ATP-Bindung und Hydrolyse zwischen einer nach innen offenen Konformation und einer nach innen geschlossenen Konformation. Die nach innen geschlossene Konformation entsteht durch ATP-NBD-Dimer-Bildung. Durch den Übergang in die nach innen geschlossene Konformation wird das Substrat, welches zuvor über die Transmembrandomänen gebunden wurde über die Membran transportiert. Durch ATP-Hydrolyse wird der Transporter erneut in die nach innen offene Konformation zurückversetzt (86,91). Die beiden Konformationen wurden in Kristallstrukturen von murinem MDR1 (93) und bakteriellem Sav1866 (94) sichtbar gemacht. Die Kristallstruktur von MDR3 wurde bisher nicht gelöst. Sav1866 dessen Kristallstruktur 2006 in hoher Auflösung aufgeklärt wurde, liefert ein gutes Modell für die 3D-Struktur von MDR3 (94) und ermöglicht die Abschätzung der Auswirkungen von *Missense*-Mutationen durch Analyse ihrer Lokalisation in diesem Modell.

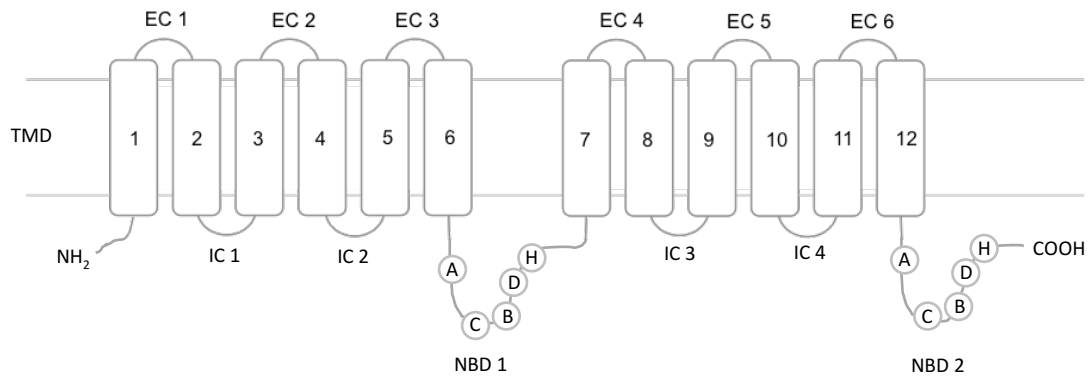


Abb. 3 Schematischer Domänenbau von MDR3. MDR3 ist ein Homodimer bestehend aus zwei mal sechs Transmembrandomänen (TMD) und zwei Nukleotidbindedomänen (NBD). EC = *extracellular-loop*. IC = *intracellular-loop*. Die Nukleotidbindedomänen enthalten hochkonservierte Domänen, unter anderem: Walker-A (A)- und Walker-B (B)-Motiv (84) sowie die ABC-Signatur, auch als C-loop bezeichnet (C) (81) zudem den D-loop (D) und ein hochkonserviertes Histidin (H-loop) Abbildung vereinfacht in Anlehnung aus (43,46).

1.5 MDR3-Mutationen

MDR3-Mutationen können verschiedene Auswirkungen auf das resultierende Protein haben. Die Insertion, Deletion oder der Austausch von Basen kann zur Entstehung eines *Stop-Codons* führen und einen Abbruch der Translation bewirken (*Nonsense-Mutation*). Bewirkt der Nukleotidaustausch nur den Austausch einer einzelnen Aminosäure (*Missense-Mutationen*) ist die pathogenetische Auswirkung sehr variabel. Führt ein Nukleotidaustausch nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz (*Synonymous-Mutationen*) (95) wird die pathogenetische Relevanz meist als gering erachtet (*Silent-Mutation*) (96). Bisher konnten für einzelne *Missense-Mutationen* Defekte der MDR3-Expression (42,43,48), des intrazellulären *Traffickings* (43,48,97,98), des Substrattransports (42,43,98–100) und der Stabilität (100) von MDR3 *in vitro* nachgewiesen werden. Auf der Basis charakterisierter Mutationen konnte eine funktionelle Einteilung vorgeschlagen werden: *Nonsense-* oder *Frameshift-Mutationen* werden als Mutationen der Klasse I bezeichnet. Mutationen mit einem Einfluss auf die Faltung des Proteins werden als Klasse II Mutationen bezeichnet. Mutationen, welche einen Aktivitätsdefekt verursachen werden als Klasse III Mutationen bezeichnet und Mutationen, welche zu einer verminderten Stabilität des Proteins führen als Klasse IV Mutationen. Ist die Auswirkung nicht bekannt können sie als Klasse V-Mutationen bezeichnet werden (100).

1.6 Expression und intrazelluläres Trafficking von MDR3

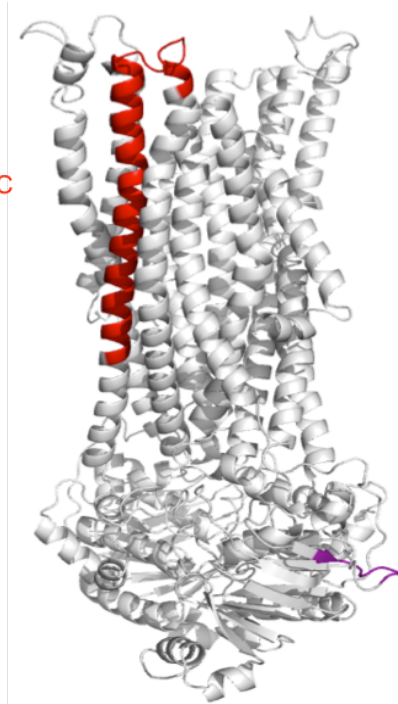
Hinsichtlich der Expression von MDR3 ist die Regulation durch die Kernrezeptoren FXR (101–103) und PPAR α (104–106) bekannt, welche jeweils ein Heterodimer mit RXR bilden (107). Gallensalze sind als Liganden von FXR bekannt und führen unter anderem zu einer vermehrten mRNA-Expression von MDR3 (101,102).

Das *Trafficking* verschiedener ABC-Transporter wurde bisher in der Rattenleber und in HepG2-Zellen untersucht (108,109). Nach der Translation wird MDR3 vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zur Plasma-Membran transportiert (110,111). Der *Receptor for activated C-Kinase 1* (RACK1), könnte eine Rolle für die Expression und Lokalisation von MDR3 spielen, da die Inhibition von (RACK1) über RNAi in der Zellkultur zu intrazellulärer Retention und verminderter Expression von MDR3 führte (112). Die genauen Mechanismen des *Traffickings* von MDR3 sind noch weitgehend unklar. Mikrodomänen der Membran scheinen eine Rolle zu spielen (111).

1.7 MDR3-Isoformen

1987 wurden von van der Bliek et al. zwei weitere MDR3-Isoformen in humanen Leber-cDNA-Banken gefunden. Die Isoformen entstehen durch alternatives *splicen* aus der prä-mRNA von MDR3. Die Isoform B enthält einen Einschub von sieben Aminosäuren zwischen Exon 24 und 25 in der zweiten Nukleotidbindedomäne. Die Isoform C zeigt die komplette Deletion von Exon 22, welches einer Transmembrandomäne entspricht (80) (**Abb. 4**). Die Funktion der Isoformen B und C ist bisher nicht geklärt.

Exon 22 fehlt in Isoform C



Insertion von sieben Aminosäuren
zwischen Exon 24 und 25
in Isoform B (FVDFGFQ)

Abb. 4 MDR3 Homologiemodell auf Basis der Kristallstruktur von Sav1866. MDR3 Isoform A und die *Splice*-Varianten B und C. Isoform B unterscheidet sich von der Isoform A durch eine Insertion von sieben Aminosäuren (FVDFGFQ) zwischen Exon 24 und Exon 25. Der Isoform C fehlt das Exon 22. Anteile einer Abbildung von C. Droege (113).

2 Ziele der Arbeit

Cholestatische Lebererkrankungen sind häufig und können auf vielfältige erworbene und angeborene Ursachen eines gestörten Galleflusses zurückgeführt werden. Da die Bedeutung der Isoform B von MDR3, welche 1987 entdeckt wurde, noch nicht ausreichend geklärt ist, sollte diese im ersten Teil der Arbeit kloniert, in der Zellkultur exprimiert und hinsichtlich des *Traffickings* mit der Isoform A von MDR3 verglichen werden.

Bisher wurden über 300 MDR3-Mutationen identifiziert (100) und mit einem Spektrum cholestatischer Erkrankungen assoziiert (114). Die einzelnen Erkrankungen scheinen aus einer unterschiedlich starken Beeinträchtigung der Funktion und Expression von MDR3 durch Mutationen hervorzugehen und somit Teil eines kontinuierlichen Spektrums an klinischen Manifestationen zu sein (24,43,114,115). Aufgrund komplexer und häufig *compound*-heterozygoter Genotypen (42,47,71) ist es schwer, die Auswirkungen von *Missense*-Mutationen *in vivo* abzuschätzen. Daher werden *Missense*-Mutationen zunehmend in funktionellen Studien untersucht (42,43,118,45,48,97–100,116,117). Mutationen, welche einen alleinigen Faltungsdefekt und daraus resultierende intrazelluläre-Retention bewirken, konnten durch den Einsatz chemischer Chaperone wieder an die Membran gebracht werden (43,100,116). Die Identifikation von *Trafficking*-Defekt-Mutanten ist daher ein wichtiger Schritt, um in Zukunft mögliche Therapiestrategien an Faltungsdefektmutanten zu erproben (119). Um die Auswirkungen der MDR3-Mutationen S27G, S1076N, Q1174E und H1231Y näher zu charakterisieren, sollte im zweiten Teil der Arbeit das *Trafficking* und die Expression dieser Mutationen in der Zellkultur untersucht werden. Hierzu wurde eine standardisierte Methode weiterentwickelt, die untersucherunabhängig die Quantifizierung von *Trafficking*-Defekten ermöglichte. Im Western Blot wurde die Expression der Mutationen untersucht. Zudem wurde die Lokalisation der Mutationen im MDR3-Homologiemodell des bakteriellen Transporters Sav1866 (94) analysiert, um *in silico* eine mögliche Beeinträchtigung der Transporterfunktion durch die Mutanten abzuleiten. Die Ergebnisse wurden mit den klinischen Verläufen der betroffenen Patienten korreliert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Detergenzien, Antibiotika, Proteine, Zellkulturmedien

Substanz	Hersteller
<i>Acrylamid 4K Solution</i> (30%) Mix 29:1 (PAA)	<i>AppliChem</i>
Agar	<i>AppliChem</i>
Agarose	<i>Lonza</i>
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	<i>Carl Roth</i>
Aqua ad iniectabilia	<i>DeltaSelect</i>
Benzonase	<i>Novagen</i>
<i>Bovine serum albumine Fraction V</i> (BSA)	<i>Carl Roth</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Coomassie Brilliant Blue G250</i>	<i>Carl Roth</i>
Dithiotreitol (DTT)	<i>ICN LabSolutions</i>
<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i> (DMEM)/ <i>Ham's F-12</i> (1:1) mit stabilem Glutamin, endotoxinarm	<i>Biochrom</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i> (DMEM) mit 3,7 g/l NaHCO ₃ , mit 1 g/l, D-Glukose mit stabilem Glutamin, endotoxinarm	<i>Biochrom</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>AppliChem</i>
Essigsäure	<i>Merck</i>
Ethanol	<i>VWR</i>
Ethidiumbromid	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	<i>Biochrom</i>
Glukose	<i>Ceasar & Loretz</i>
Glycerol	<i>Sigma-Aldrich</i>
Hefe-Extrakt	<i>Sigma-Aldrich</i>
Isopropanol	<i>Merck</i>
Kanamycin	<i>Sigma-Aldrich</i>
L-Aminosäuren	<i>Sigma-Aldrich/Carl Roth</i>
Lithiumacetat	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Lysing Enzymes from trichoderma harzianum</i> <i>L1412</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
Methanol	<i>VWR</i>
Milchpulver	<i>AppliChem/Carl Roth</i>
NaPO ₄	<i>Carl Roth</i>
Natriumacetat	<i>Sigma-Aldrich</i>
Natriumchlorid	<i>J.T.Baker</i>

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Opti-Modified Eagle Media (MEM)	Life Technologies
Phosphat buffered saline (PBS) Dulbecco ohne Calcium ohne Magnesium 9,55 g/l	Biochrom
Pepton aus Casein	Merck
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Biozymes Scientific
Polyethylenglycol 4000	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Tabletten (EDTA frei)	Roche
SmartLadder MW-1700-02	Eurogentec
Sorbitol	Carl Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Thermus aquaticus (Taq) DNA Polymerase	Qiagen
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich
Trypanblau 0,5 % (w/v)	Biochrom
Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (1 x)	CytoGen
Tween 20/80	Carl Roth
Xylene Cyanol	Sigma-Aldrich
Yeast Nitrogen base (YNB)	Difco
Ammoniumsulfat	J.T.Baker

3.1.2 Kits

Kit	Hersteller
<i>HiSpeed Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen
<i>QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Agilent Technologies
<i>X-tremeGENE HP DNA Transfection</i>	Roche

3.1.3 Antikörper

Antikörper (AK)	Herkunft	Ziel	Firma	Verwendung
Anti-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase IgG	Maus	α-1-Untereinheit Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Millipore	1.-AK Immunfluoreszenz
<i>Cy3-conjugated-Anti mouse IgG</i>	Ziege	F(ab') ₂ Fragment Maus IgG (H+L)	Jackson	2.-AK Immunfluoreszenz
<i>FITC-conjugated-Anti mouse IgG</i>	Ziege	F(ab') ₂ Fragment Maus IgG (H+L)	Jackson	2.-AK Immunfluoreszenz

Anti- β -Aktin IgG	Maus	β -Aktin	Abcam	1.-AK Western Blot
<i>HRP-coupled-Anti mouse IgG</i>	Ziege	Maus IgG	Sigma-Aldrich	2.-AK Western Blot
Anti-C219 IgG	Maus	C219 MDR1/MDR3	Abcam	1.-AK Western Blot
Anti-Ubiquitin IgG	Maus	Ubiquitin	Abcam	1.-AK Immunfluoreszenz
<i>HRP-coupled Anti-GFP/YFP IgG</i>	Hase	GFP/YFP	Abcam	1.-AK Western Blot

3.1.4 Plasmide

Plasmid	Herkunft
pEYFP-N1-MDR3-Isoform A (8547 bp)	PD Dr. med. V. Keitel
pEYFP-N1-OriLeu-MDR3-Isoform A (11833 bp)	Dr. rer. nat. J. Stindt
pmCherry-N1-OriLeu-MDR3-Isoform A (11810)	S. Cajani
pEYFP-N1-OriLeu-MDR3-Isoform B (11854)	Im Rahmen dieser Arbeit
pmCherry-N1-OriLeu-MDR3-Isoform B (11831)	Im Rahmen dieser Arbeit
pEYFP-N1-OriLeu-MDR3-S27G (11833 bp)	Im Rahmen dieser Arbeit
pEYFP-N1-MDR3-I541F (8547 bp)	Im Rahmen dieser Arbeit
pEYFP-N1-MDR3-S1076N (8547 bp)	Im Rahmen dieser Arbeit
pEYFP-N1-MDR3-Q1174E (8547 bp)	Im Rahmen dieser Arbeit
pEYFP-N1-MDR3-H1231Y (8547 bp)	Im Rahmen dieser Arbeit

3.1.5 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme

Zelllinie	
HEPG2	Humane Hepatomzelllinie, ATCC Nummer: HB-8065
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie (120)
Stamm	
XL1-Blue	E.coli, Bakterienstamm. Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI ^q ZAM15 Tn10 (Tet ^r) <i>Stratagene</i>
Δ pp	S.cerevisiae, Hefestamm. MATa; ura3–52; trp1-1; leu2–3,112; his3–11,15; ade2-1; pdr1–3; Δ PDR5::TRP (121)

3.1.6 Oligonukleotide

Primer für Mutagenese von	Richtung	Oligonukleotid
S1076N	<i>sense</i>	GTGGCTGTGGGAAGAGCACGGTGGTCC
S1076N	<i>sense</i>	GCTACAGTGAAGAGGGGCTGAAGCC
Q1174E	<i>sense</i>	GGAGATAAGGGGACTCAGCTCTCAGGAGG
Q1174E	<i>sense</i>	GCTACAGTGAAGAGGGGCTGAAGCC
H1231Y	<i>sense</i>	GCATTGTGATTGCTCACCGCCTGTCCACC
H1231Y	<i>sense</i>	GCTACAGTGAAGAGGGGCTGAAGCC
I541F	<i>sense</i>	GCAGAAGCAGAGGTTCCGCCATTGCAC
I541F	<i>sense</i>	GCTACAGTGAAGAGGGGCTGAAGCC

Primer für	Richtung	Oligonukleotid
Mutagenese von S27G	<i>sense</i>	CGAGCGCGGAGGGCGACTTTGAACTGGGCATCAGCGGCAAACAAAAAGG
	<i>antisense</i>	AGTCGCCGTTTGTCTTTTCTTTTCTTTTCTGCTTCTGTCACTTTTACTAACC
Mutagenese von Isoform B	<i>sense</i>	GTTTGTGGACTTTGGTTTTTCAGCTTCTCGATGGTCAAGAAGCAAAG
	<i>antisense</i>	TGAAAACCAAAGTCCACAAACACTGTCCCCGCCAAGGGGTCGTAGAAC
Sequenzierprimer 1	<i>sense</i>	TCAGAGGATGGAAGCTCACC
Sequenzierprimer 2	<i>sense</i>	ATCCTAATTGGAGCTTTCAGTG
Sequenzierprimer 3	<i>sense</i>	GCCTTGATGTGGAAACCG
Sequenzierprimer 4	<i>sense</i>	AACTATCTGAGGGAAATCAT
Sequenzierprimer 5	<i>sense</i>	CTGGAAAGATTGCAACATAGCC
Sequenzierprimer 6	<i>sense</i>	CAGAGCTCAACTCGGAATCG
Sequenzierprimer 7	<i>sense</i>	TCCAGGCTGGGACACAGAAC
Sequenzierprimer 8	<i>antisense</i>	TCTCTGAAGCGCATATG

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
<i>Amersham Hybond-P (Polyvinylidenfluoride Transfer Membrane)</i>	<i>GE Healthcare</i>
<i>Cellstar Cell Culture Flasks, 75 cm², 250 ml steril</i>	<i>Greiner</i>
<i>Cellstar Tubes, steril, 15 ml</i>	<i>Greiner</i>
<i>Cellstar Tubes, steril, 50 ml</i>	<i>Greiner</i>
<i>CryoTube Vials 1,8 ml</i>	<i>Thermo Fischer Scientific</i>
<i>Deckgläser für Mikroskopie 18 mm</i>	<i>Engelbrecht</i>
<i>Erlenmeyerkolben verschiedene Größen</i>	<i>Schott-Duran</i>
<i>Examination Gloves, Latex, puderfrei</i>	<i>Siam Sempermed</i>
<i>Feather Disposable Scalpel No. 11</i>	<i>Feather Safety Razor Co.</i>
<i>Fluorescent Mounting Medium</i>	<i>Dako</i>
<i>Incidur Spray</i>	<i>Ecolab</i>
<i>Klarlack quick dry, topcoat</i>	<i>Essence</i>
<i>Kosmetiktücher</i>	<i>WEPA Professional</i>
<i>Microliter Syringe</i>	<i>Hamilton</i>
<i>Microtiterplatte 96-well, nicht steril</i>	<i>Greiner</i>
<i>Microtube Tough-Tags</i>	<i>Diversified Biotech</i>
<i>Mikro-Schraubröhre, 2 ml</i>	<i>Sarstedt</i>
<i>Multiwell (12 Well)</i>	<i>Becton Dickinson Labware</i>
<i>Nitrates No Sterile Examination Gloves</i>	<i>Ansell</i>
<i>Nitrocellulose Membranen</i>	<i>Schleicher und Schüll</i>
<i>Objektträger 76 x 26 mm, mattrandig</i>	<i>Engelbrecht</i>
<i>Omnifix Einmalspritzen 10 ml</i>	<i>B. Braun</i>
<i>Original-Perfusor Syringe 50 ml Luer Lock</i>	<i>B. Braun</i>
<i>Parafilm Laboratory film</i>	<i>Pechiney Plastic Packaging</i>
<i>Pasteurpipetten</i>	<i>Carl Roth</i>
<i>PCR SoftTubes, farblos, DNA-, DNase-, RNase frei, 0,2 m</i>	<i>Biozym Scientific</i>
<i>Petrischale</i>	<i>Carl Roth</i>
<i>Polypropylen Round-Bottom Tube 14 ml</i>	<i>BD Biosciences</i>
<i>Precision Plus Protein Standard</i>	<i>Bio-Rad</i>
<i>SafeSeal Reaktionsgefäße 1,5 ml</i>	<i>Sarstedt</i>
<i>Sterican 0,9 x 40 mm, 20 G x 1½</i>	<i>B. Braun</i>
<i>Sterilfilter Filtropur S 0,2</i>	<i>Sarstedt</i>
<i>Sterilium classic pure</i>	<i>Bode</i>
<i>Stripette 10 ml</i>	<i>Costar</i>
<i>Stripette 25 ml</i>	<i>Costar</i>
<i>Stripette 5 ml</i>	<i>Costar</i>
<i>TipOne 10 µl Graduated, Filter Tip, steril</i>	<i>Starlab</i>
<i>TipOne 1000 µl Graduated, Filter Tip, steril</i>	<i>Starlab</i>
<i>TipOne 200 µl Graduated, Filter Tip, steril</i>	<i>Starlab</i>

<i>Tissue Culture Dish</i> 60 mm	<i>BD Biosciences</i>
<i>Tissue Culture Dish</i> , 100 mm	<i>BD Biosciences</i>
<i>Western Lightning Ultra</i>	<i>PerkinElmer</i>
Whatman 3mm Filterpapier	<i>Sigma-Aldrich</i>
Zellschaber	<i>BD Biosciences</i>

3.1.8 Technische Hilfsmittel

Technisches Hilfsmittel	Hersteller
<i>Autoklav</i> VX65	<i>Systec</i>
<i>Axiovert</i> 40 C (Durchlichtmikroskop)	<i>Carl Zeiss</i>
<i>AxioVision Release 4,8</i> (Digitale Bildverarbeitungssoftware, Fluoreszenzmikroskop)	<i>Carl Zeiss</i>
Blot-Kammer für den Halbtrockentransfer	<i>Bio-Rad</i>
<i>Vortex</i> CAT VM3 (vibrierender Schüttler)	<i>CAT</i>
<i>Centrifuge</i> 5415 (Zentrifuge)	<i>Eppendorf</i>
<i>Centrifuge</i> 5424 (Zentrifuge)	<i>Eppendorf</i>
<i>Centrifuge</i> Rotina 420R (Zentrifuge)	<i>Hettich Lab-Technology</i>
<i>ChemiGenius2 imaging system</i> (Bildentwicklung)	<i>Syngene</i>
<i>Citavi</i> (Literaturverarbeitungsprogramm)	<i>Swiss Academic Software</i>
<i>Clone Manager Suite 8</i> (Planungssoftware Klonierung)	<i>Sci-Ed Software</i>
<i>Cryo 1 °C Freezing Container</i> (Gefriergefäß)	<i>Nalgene</i>
Elektrophoresekammern	<i>Peqlab/Biorad</i>
<i>FinchTV</i> (Sequenzalignmentprogramm)	<i>Geospiza</i>
<i>GeneSnap</i> (Bildaufnahmesoftware)	<i>Syngene</i>
<i>Gradient Cyclers Peltier Thermal Cyclers</i> PTC-200	<i>MJ Research</i>
Heizbecken Medigen E5	<i>Medigen</i>
Heizgerät F30	<i>Julambo</i>
<i>Integra Pipetboy</i> (Pipettierhilfe)	<i>Integra</i>
<i>LSM 510 Meta</i> (Laserscanning-Mikroskop)	<i>Carl Zeiss</i>
Magnetrührgerät RCT basic	<i>IKA Labortechnik</i>
<i>NanoDrop</i> 1000 Spectrophotometer	<i>Peqlab</i>
Neubauer-Zählkammer	<i>Brand</i>
Pipetten Eppendorf Research 0,5 - 10 µl	<i>Eppendorf</i>
<i>Power Supply Standard Power Pack</i> P25	<i>Biometra</i>
Präzisionswaage Kern 440-49N	<i>Kern</i>
Präzisionswaage Kern 770	<i>Kern</i>
<i>Prism</i> (Statistiksoftware)	<i>GraphPad Software</i>
Rollschüttler <i>Roller Mixer</i> SRT6	<i>Stuart</i>
Schüttelinkubator GFL 3031	<i>GFL</i>
<i>SDS-PAGE</i> -Apparat	<i>Bio-Rad</i>
<i>Sterile Cleanbench Lamin Air</i> LB-48-C	<i>Heraeus</i>
<i>T3000 Thermocycler</i>	<i>Biometra</i>

Taumel-Schüttler GFL 3011	GFL
Thermomixer compact	Eppendorf
Vilber Lourmat IPCF01.SD (Geldokumentation)	Peqlab
Zellkulturinkubator	Binder

3.2 Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurde für den Ansatz von Puffern destilliertes Wasser verwendet.

3.2.1 Molekular- und mikrobiologische Methoden

Mikrobiologische Arbeiten mit *E. coli* erfolgten in der Umgebung einer Bunsenbrennerflamme, Arbeiten mit *S. cerevisiae* wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

3.2.1.1 Plasmidgewinnung in *E. coli*

E. coli wurde je nach benötigter Menge in belüfteten 500 ml Erlenmeyerkolben (200 ml Kulturen) oder 14 ml Polypropylen *Round-Bottom Tubes* (3 ml Kulturen) kultiviert. Als Nährmedium wurde *Low-Salt-LB* (LSLB) verwendet. Entsprechend des Resistenzgens des verwendeten Ausgangsvektors (pEYFP-N1) wurden 50 µg/ml Kanamycin als Selektionsantibiotikum zugesetzt. Mit sterilen Pipettenspitzen wurden einzelne Kolonien, welche das gewünschte Konstrukt exprimierten von den Selektivagarplatten gepickt und in das Medium eingebracht. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C, um ein möglichst langsames Wachstum der Kulturen zu erreichen (121). Zur Belüftung der Kulturen wurde bei 200-220 rpm inkubiert.

LSLB-Medium

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
ad 1000 ml	H ₂ O dest.

Kanamycin-Stocklösung (50 µg/ml)

0,5 mg	Kanamycin
ad 10 ml	H ₂ O dest.

LSLB-Kanamycin-Agar

7,5 g	Agar
ad 250 µl	LSLB-Medium

Bakterien-Medien wurden angesetzt und direkt autoklaviert. Zur Herstellung von LSB-Kanamycin-Agar-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 3 %

(w/v) Agar zugesetzt. Autoklavierte Medienflaschen wurden bei RT gelagert. Zur Herstellung von Agar-Platten wurden 250 ml Agar-haltiges Medium in einem Mikrowellengerät langsam erhitzt. In flüssigem Zustand wurde die Mischung auf 50 °C abgekühlt und 50 µg/ml Kanamycin zugegeben. Mit einem Magnet-Rührgerät wurden Luftblasen entfernt und Kanamycin mit dem Medium vermischt. Die Flüssigkeit wurde unter einer Sterilbank in Petrischalen gegossen. Die Platten wurden abgekühlt und mit dem Deckel nach unten bei 4 °C maximal vier Wochen gelagert.

Zur längerfristigen Lagerung von Klonen wurden 500 µl Bakteriensuspension in einem 1,8 ml Cryogefäß mit 50 % Glycerol (w/v) versetzt, in flüssigen Stickstoff eingebracht und bei -80 °C gelagert. Zum Auftauen gelagerter Klone wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Material aus dem Cryogefäß entnommen und eine Kultur beimpft.

3.2.1.2 Plasmidgewinnung in *Saccharomyces cerevisiae*

Mit *Saccharomyces cerevisiae*-Kulturen (*S. cerevisiae*) wurde wie in (121) beschrieben verfahren. *S. cerevisiae* wurden bei 200 rpm in Schikanekolben kultiviert. Als Nährmedium wurde YPD (*yeast extract peptone dextrose*) – Medium verwendet. Zur Herstellung von YPD-Medium wurden YP-Medium und 20 % (w/v) Glukose getrennt hergestellt und autoklaviert. YP und Glukose wurden unter der Sterilbank zu YPD verbunden.

YP (*yeast extract peptone*)

20 g/l	Trypton/Pepton aus Casein
10 g/l	Hefeextrakt
ad 900 ml	H ₂ O dest.

20 % (w/v) Glukose

20 g	Glukose
ad 100 ml	H ₂ O dest.

YPD (YP + 2 % (w/v) Glukose)

900 ml	YP
100 ml	20 % (w/v) Glukose

YPD-Agarplatten wurden aus autoklaviertem YP-Agar durch Zusatz von autoklavierter Glukose 2 % (w/v) hergestellt.

YP-Agar

18 g	Agar
ad 900 ml	YP

YPD-Agar

100 ml	20 % (w/v) Glukose
ad 900 ml	YP-Agar

Zur Kultivierung und Selektion von pEYFP-N1-OriLeu transformierten *S. cerevisiae*-Klonen wurden, entsprechend der mit dem Vektor übertragenen Leucin Auxotrophie, Leucin-depletierte Agarplatten hergestellt. Es wurde ein Aminosäuremix sowie ein 100 x-Stock der Aminosäuren Histidin, Tryptophan und Uracil hergestellt. Der Tryptophan-Stock wurde über einen 0,4 µm Filter steriltfiltriert. Der Histidin- und der Uracil-Stock wurden autoklaviert. Die 100 x-Stocks wurden bei 4 °C gelagert. Präzipitate wurden durch leichtes Erhitzen in einem Mikrowellengerät entfernt.

Aminosäuremix (14,5 g)

0,4 g Adenin
0,2 g L-Arginin
0,3 g L-Tyrosin
0,3 g L-Isoleucin
0,5 g L-Phenylalanin
1 g L-Glutamat
1 g L-Aspartat
2 g L-Threonin
4 g L-Serin
1,5 g L-Valin
1,5 g L-Methionin
1,8 g L-Lysin

100 x Histidin-, Tryptophan- oder Uracil- Stock

0,6 g	Histidin oder
0,4 g	Tryptophan oder
0,4 g	Uracil
je ad 100 ml	H ₂ O dest.

Als Basis für Leucin-depletiertes Medium und Agar wurde 2 x *Dropout stock medium* nach Protokoll hergestellt und Aminosäuren, Glukose und Agar nachträglich zugegeben. Leucin-depletierte Selektivagarplatten wurden entsprechend den LSLB-Platten gegossen.

2 x Dropout stock medium (740 ml)

3,4 g	<i>Yeast Nitrogen Base (YNB)</i>
2,86 g	Aminosäuremix
5 g	Ammoniumsulfat
ad 740 ml	H ₂ O dest.
pH Einstellung auf 5,6 durch KOH und autoklaviert	

Leucin-depletiertes Selektivmedium (Agar)

185 ml	<i>2 x Dropout stock medium</i>
5 ml	100 x Histidin-Stock
5 ml	100 x Tryptophan-Stock
5 ml	100 x Uracil-Stock
50 ml	20 % (w/v) Glukose
ad 250 ml	H ₂ O dest. steril (+ 4 % w/v Agar)

3.2.1.3 Transformation von E. coli

Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* nach Hanahan (122) hergestellt und in 100 µl Aliquots bei -80 °C gelagert oder *XL1-Blue Competent Cells* direkt dem Kit entnommen. Unmittelbar vor der Transformation wurden *E. coli* zehn Minuten auf Eis angetaut. *E. coli* wurden mit 1,7 µl β-Mercaptoethanol versetzt und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde der Ansatz alle zwei Minuten sanft mit einer sterilen Pipettenspitze durchmischt. Dem Ansatz wurden 10-100 ng DNA in maximal 5 µl H₂O zugesetzt. Der Ansatz wurde erneut sanft durchmischt und die Zellen eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 45-60 Sekunden. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen zwei Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 700 µl LSLB-Medium zugegeben. Die Ansätze wurden eine Stunde bei 200-220 rpm und 30 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge für 15 Sekunden bei 8000 rpm an den Boden zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen vorsichtig in dem verbliebenen Medium resuspendiert. Zum Ausstreichen der Bakterien wurden über dem Bunsenbrenner geformte Pasteurpipetten und vorgewärmte LSLB-Agarplatten verwendet. Die ausgestrichene Bakteriensuspension wurde auf den Platten zunächst für zehn Minuten bei 30 °C im Inkubator angetrocknet und anschließend mit dem Deckel nach unten für 36-48 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 3 ml LSLB-Kulturen übertragen. Für eine spätere Präparation weiterer Klone wurden Agarplatten bei 4 °C bis zu vier Wochen gelagert. Die 3 ml Kulturen wurden ca. 16 Stunden bei 30 °C und 200-220 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden 1,5 ml der Flüssigkulturen bei 4 °C gelagert und 1,5 ml der Flüssigkultur direkt präpariert. Wie unten beschrieben wurden die korrekten Plasmidsequenzen einzelner Klone

über analytischen Verdau, Gelelektrophorese und anschließende externe Sequenzierung (*GATC Biotech*) verifiziert.

3.2.1.4 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*

Kompetente *S. cerevisiae* wurden wie bei J. Stindt (121) beschrieben hergestellt. Die Zelldichte der *S. cerevisiae* Kulturen wurde bei 600 nm in speziellen Küvetten in einem Densitometer gemessen. Wasser wurde als Leerwert verwendet und die zu messende Zellsuspension 1:10 mit Wasser verdünnt.

10 x LiAc

1 M Lithiumacetat pH 7,5

10 x TE

100 mM TRIS pH 7,5 EDTA

LATE-Puffer

1 ml	10 x TE
1 ml	10 x LiAc
8 ml	H ₂ O dest.

PLATE-Puffer

1 ml	10 x TE
1 ml	10 x LiAc
8 ml	50 % (w/v) PEG 4000

Zur Herstellung kompetenter Hefen wurden 5 ml YPD mit einigen Kolonien *S. cerevisiae* unter der Sterilbank beimpft. Die Kultur wurde über Nacht inkubiert und anschließend die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) gemessen. 5 ml Vorkultur wurden zu einer OD₆₀₀ von 0,2 auf 50 ml mit YPD aufgefüllt und anschließend bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 - 1 vermehrt.

Die Hefezellen wurden in einer Megazentrifuge für fünf Minuten bei 4 °C und 4000 rpm pelettiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 20 ml sterilem, destillierten Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde erneut wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml LATE-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge für 15 Sekunden bei 800 rpm erneut pelettiert und 50 µl LATE-Puffer pro 10 OD₆₀₀-Äquivalent zugegeben.

Die kompetenten Zellen wurden in Aliquots von 30 µl bei 4 °C bis zur Transformation gelagert. Für die Experimente wurden kompetente Zellen kurz vor der Transformation hergestellt.

3.2.1.5 Transformation von *S. cerevisiae*

Zur chemischen Transformation von *S. cerevisiae* wurden 30 µl kompetente Zellen mit einigen hundert Nanogramm linearer, gefällter Plasmid-DNA vermischt. Es wurden 180 µl PLATE-Puffer zu den Zellen gegeben und vorsichtig durch pipettieren vermischt. Es folgte eine Inkubation von 20 Minuten bei 30 °C und daraufhin ein Hitzeschock von 20 Minuten bei 42 °C im Heizblock. Die Transformationsansätze wurden während des Hitzeschocks alle fünf Minuten invertiert. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen 15 Sekunden bei 800 rpm pelettiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Zellen in 100 µl sterilem, destillierten Wasser resuspendiert und auf einer Leucin-depletierten Selektivagarplatte ausplattiert. Die Hefen wurden bei 30 °C zwei bis drei Tage inkubiert bis Kolonien auf der Platte vorhanden waren. Um die Ausbeute an transformierten Hefen zu erhöhen, wurden bis zu 12 Hefekolonien einzeln gepickt, auf einer weiteren Leucin-depletierten-Agar-Platte erneut ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Platten wurden bis zur Präparation der Plasmide bei 4 °C gelagert.

3.2.1.6 Plasmidpräparation aus *S. cerevisiae*

8 ml *Rescue Buffer* (RB)

4,8 ml	2 M Sorbitol
0,8 ml	1 M Na ₃ PO ₄ pH 7,4
16 µl	1 M DTT
80 mg	<i>Lysing Enzyme</i>
ad 8 ml	H ₂ O dest.

Jeweils 125 µl RB wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Mit einer gebogenen, sterilen Pipettenspitze wurden *S. cerevisiae* eines Klons einer bewachsenen Leucin-depletierten Selektivagarplatte in RB resuspendiert. Jedem Ansatz wurden 125 µl P1-Puffer aus dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* zugegeben. Die Suspension wurde für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit dem zweiten Schritt, entsprechend dem Protokoll des *QIAprep Spin Miniprep Kits* weiter verfahren. Zur Elution von der Säule wurden 30 µl *Elution Buffer* (EB) verwendet. Zur Vermehrung und Analyse der Plasmid-DNA folgte eine Transformation in *E. coli*. Es wurden 10 µl der Hefe-DNA-Präparation verwendet.

3.2.1.7 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Für Präparationen wurden Qiagen Mini- und Maxiprep Kits entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Für Minipreparationen wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur eine Minute bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Für Maxipreparationen wurden 300 ml einer Übernachtskultur mindestens 24

Stunden inkubiert, um eine ausreichende Dichte zu erhalten. Die Elution erfolgte in 30 µl bzw. 750 µl *elution buffer* (EB). Zur Erhöhung der Ausbeute wurde dieser Schritt zweifach wiederholt und die Säule mindestens drei Minuten inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 50 ml *Falcons* in einer Megazentrifuge pelletiert. Die Pellets wurden direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert. Die Menge und Reinheit der DNA wurde mithilfe eines *NanoDrop* 1000 Spectrophotometer gemessen.

3.2.1.8 Restriktionsenzymverdau und Gelelektrophorese

3.2.1.8.1 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsendonukleasen wurden von *New England Biolabs* bezogen und entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Für einen analytischen Verdau wurden 10 µl Gesamtvolumen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt. Pro Ansatz wurden 0,3 Units Restriktionsenzym verwendet. Vor der Inkubation wurden die Ansätze durch vorsichtiges auf und ab pipettieren gut durchmischt.

Restriktionsenzymverdau 10 µl-Ansatz

100 ng	DNA
0,3 µl	Enzym (10 U/µl)
1 µl	10 x BSA (falls erforderlich)
1 µl	10 x Puffer
ad 10 µl	H ₂ O dest.

Soweit nicht anders angegeben wurden die Ansätze für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.8.2 Gelelektrophorese

EDTA Stock

0,5 M EDTA pH 8

TAE Puffer (50 x)

2 M Tris

1 M Essigsäure

100 mM EDTA

pH 8,1

6 x DNA Probenpuffer

40 % (v/v)	Glycerol
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	<i>Xylene cyanol</i>
in 10 x TAE Puffer	

Zur Analyse und Aufreinigung verdauter und präparierter DNA wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. 100 ml TAE-Puffer wurden mit 1 % (w/v) Agarose versetzt und die Mischung in einem Mikrowellengerät zwei Minuten bei 900 W erhitzt. Für die Auftrennung größerer Plasmide wurde ein 0,8 % (w/v) Agarosegel hergestellt. Flüssige Agarose-TAE-Lösung wurde mit 5 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Es wurde ein passender Geltaschenkamm eingehängt und die Lösung zur Polymerisation 15 Minuten bei 4 °C gelagert. Die aufzutrennenden Proben wurden eins zu sechs mit 6 x DNA Probenpuffer verdünnt. Als Größenstandard wurde die *SmartLadder* MW 1700 02 von *Eurogentec* verwendet. Die Elektrophoresekammern wurden mit TAE-Puffer gefüllt und die Proben bei 135 V (13,5 V/cm) in 45-60 Minuten aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und ein Bild aufgenommen. Für die Exzision von DNA-Fragmenten aus dem Gel wurde die Belichtungszeit so kurz wie möglich gehalten, um Schäden an der DNA zu vermeiden. Zur Aufreinigung der DNA wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* verwendet. Die Elution von der Säule erfolgte mit *Elution Buffer* (EB), drei Minuten Inkubationszeit und dreifacher Wiederholung des Elutionsschrittes.

3.2.1.9 Sequenzierung

Nach der Analyse der Plasmide durch Elektrophorese oder Restriktionsenzymverdau wurden die MDR3-kodierenden Sequenzen der Plasmide inklusive der Promotorregion sequenziert. Sequenzierungen erfolgten extern bei der Firma *GATC*. Die erhaltenen Sequenzen wurden über *NCBI* oder das Programm *FinchTV* mit den entsprechenden MDR3 Referenzsequenzen verglichen. Isoform A: NM_000443.3, Isoform B: NM_018849.2.

3.2.1.10 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Zur Analyse und Rekombination von DNA wurde die PCR-Technik verwendet (123). Für PCR-Reaktionen wurden die gewünschten Primer mithilfe der Software *Clone Manager Suite 8* designt und von *Eurofins MWG* hergestellt. Die Ansätze wurden in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis pipettiert. Analytische PCRs wurden mit Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus* DNA-Polymerase) (124) entsprechend den Herstellerangaben angesetzt. Für präparative PCR-Ansätze wurde *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase in Anlehnung an die Herstellerangaben verwendet, da diese über eine 3' → 5' Exonuklease-Aktivität

zur Korrektur von DNA-Sequenzen verfügt. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden bei Bedarf DMSO und MgCl_2 eingesetzt.

30 μl PCR-Ansatz

6 μl	5 x HF Puffer (1.5 mM Mg^{2+} Endkonz.)
0,6 μl	10 mM dNTPs
0,9 μl	DMSO (optional)
0,6 μl	50 mM MgCl_2 (optional)
je 1,8 μl	Primer (10 pmol/ μl)
10-50 ng	<i>template</i>
ad 29,7 μl	H_2O dest.
0,3 μl	<i>Phusion Polymerase</i>

50 μl PCR-Ansatz

10 μl	5 x HF Puffer (1,5 mM Mg^{2+} Endkonz.)
1 μl	dNTPs
1,5 μl	DMSO (optional)
1 μl	50 mM MgCl_2 (optional)
je 3 μl	Primer (10 pmol/ μl)
10-50 ng	<i>template</i>
ad 49,5 μl	H_2O dest.
0,5 μl	<i>Phusion Polymerase</i>

Die Polymerase wurde dem Ansatz zuletzt hinzugefügt. Für Rekombinations-Experimente wurde die Polymerase nach Aufheizen des Ansatzes im *Thermocycler (hot start)* zugegeben.

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	45 s	1
Denaturierung	95 °C	45 s	
<i>Annealing</i>	50-60 °C	45 s	25-30
Extension	72 °C	60-600 s	
Finale Extension	72 °C	600 s	1

Die Extensionszeit wurde nach der Größe des zu amplifizierenden Fragments eingestellt: 2 kb/min (PFU), 1 kb/min (Taq).

3.2.1.11 Klonierung und Mutagenese

Die Mutagenese erfolgte mithilfe des *QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene und bei Mutageneseschwierigkeiten nach dem Protokoll zur homologen Rekombination (DREAM) (125).

3.2.1.11.1 Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)

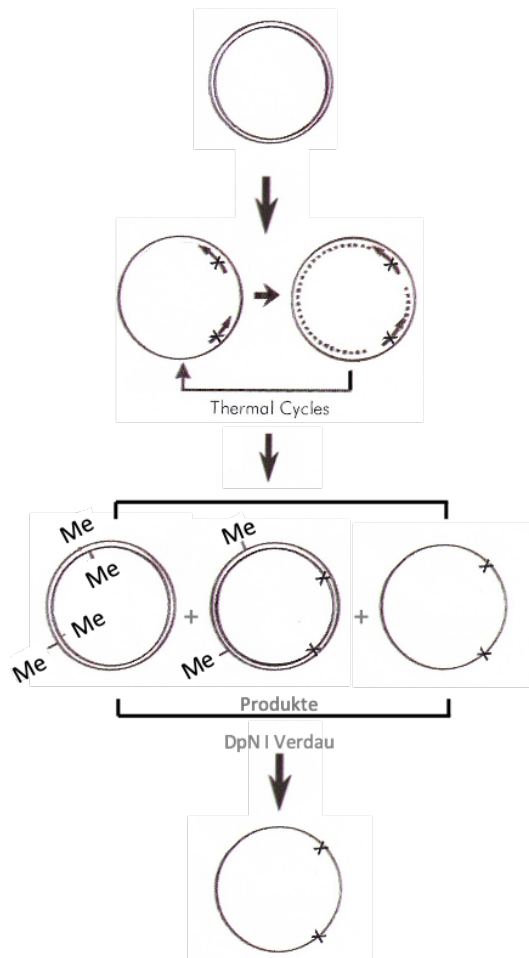


Abb. 5 Prinzip der QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Kit). *QuikChange Multi-Site Directed Mutagenesis* erlaubt in einem PCR-Reaktionsschritt das Einbringen mehrerer Mutationen in ein Template. Die Primer binden am selben Strang. Nach der Amplifikation werden die DNA-Enden durch eine im Enzymmix enthaltene Ligase verbunden. Das Produkt der PCR ist ein Gemisch aus doppelsträngiger, methylierter Template DNA, halb methylierter doppelsträngiger DNA und – vorherrschend – einzelsträngigem unmethyliertem PCR Produkt. Es folgt ein DpnI – Verdau. Methylierte DNA wird verdaut, unmethylierte, DNA bleibt erhalten. Me = Methylierung. Die Abbildung ist aus dem Manual des Kits adaptiert.

Die Mutagenese-PCR erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (**Abb. 5**). Dem fertigen 25 µl Ansatz wurde nach der PCR unter vorsichtigem pipettieren 1 µl DpN I Restriktionsenzym zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde in einer Tischzentrifuge für einige Sekunden zentrifugiert und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

Mutagenese-PCR 25 µl Ansatz

2,5 µl	<i>10 x QuikChange Multi reaction buffer</i>
0,5 µl	<i>Quik Solution</i>
100 ng	<i>template plasmid</i>
100 ng	Mutagenese Primer 1 (<i>forward</i>)
100 ng	Mutagenese/beliebiger Primer 2 (<i>forward</i>)
1 µl	dNTP Mix
1 µl	<i>QuikChange Multi enzyme blend</i>
ad 25 µl	H ₂ O dest.

Programm *Multi-SDM*

1 Min.	95 °C
1 Min.	95 °C
1 Min.	55 °C
17 Min.	65 °C
5 Min.	65 °C

×30

DpN I-Verdau

1 µl	DpN I
25 µl	PCR Produkt

3.2.1.11.2 Directed Recombination assisted *Mutagenesis* (DREAM)

Zum Austausch und Einschub von einem oder mehreren Nukleotiden in Plasmide und zur Klonierung der Isoform B wurde die hefebasierte Klonierungsstrategie DREAM angewendet (125). Die Methode basiert auf homologer Rekombination. Durch eine PCR-Reaktion mit 50 bp langen Primern entsteht lineare doppelsträngige DNA, welche an beiden Enden eine identische Sequenz von mindestens 20 Nukleotiden aufweist. Das *forward*- und *reverse*- Primerpaar (S1/S2) wird so designt, dass eine zueinander homologe Nukleotidsequenz jeweils am 5'-Ende zu liegen kommt und in etwa 20 bp lang ist. Um eine Mutation einzufügen wurde im mittleren Bereich der Überlappung ein Nukleotid in beiden Primern ausgetauscht. Für eine Insertion wurden die zusätzlichen Nukleotide an das 5'-Ende der Primer gelegt. 30 bp jedes Primers wurden nicht homolog designt und dienten dem Annealing der Primer am Ursprungsvektor. Für die DREAM-PCR wurde Phusion Polymerase verwendet (**Abb. 6**).

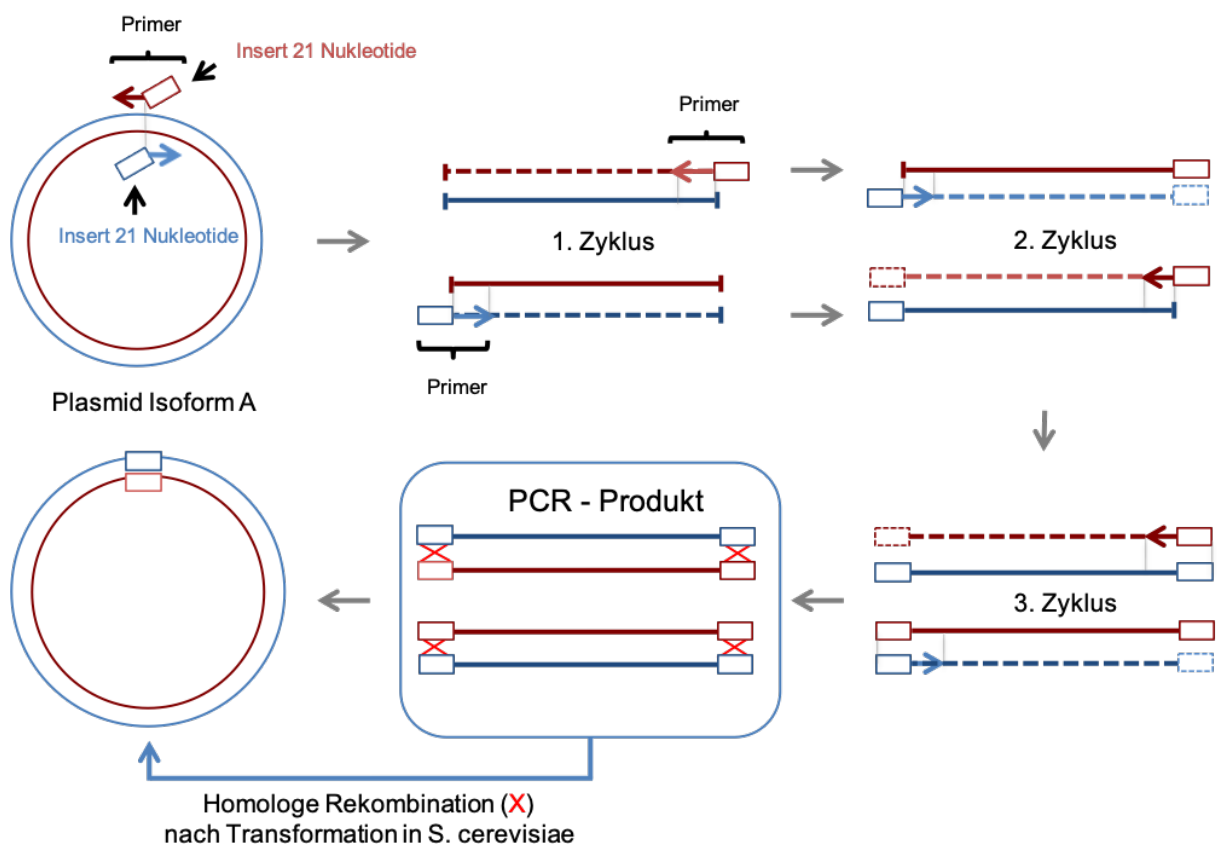


Abb. 6 Klonierungsstrategie der Isoform B von MDR3. Zur Klonierung der Isoform B wurde die *Directed Recombination assisted Mutagenesis* (DREAM) (125) verwendet. Zwei Primer S1 und S2 (rot und blau) wurden jeweils mit 21 bp homologer Sequenz am 5'-Ende der Primer designt. Durch homologe Rekombination in der Hefe wurden die 21 zusätzlichen Nukleotide der Isoform B in den Vektor integriert.

DREAM-PCR

10 µl	5 × HF Puffer
10 ng	Template Plasmid
100 ng	Primer S1
100 ng	Primer S2
1 µl	dNTP Mix
1,5 µl	DMSO
ad 94,5 µl	H ₂ O
0,5 µl	Phusion Polymerase

PCR Programm für DREAM

2 Min.	98°C	
50 Sek.	98°C	} × 18
50 Sek.	60°C	
16 Min.	68°C	
10 Min.	68°C	

3.2.1.12 Na⁺-Azetat-Ethanol-fällung

Zur Aufreinigung der DNA für die Hefetransformation wurden die Proben einer Na⁺-Azetat-Ethanol-fällung unterzogen. DNA präzipitiert bei niedrigen Temperaturen nach Zugabe von Ethanol und Salz, da keine ausreichende Hydrathülle um die DNA gebildet werden kann. Die DNA-Proben wurden für die Fällung zu einem Zehntel des Volumens mit 3 M Na⁺-Azetat versetzt. Dem Ansatz wurde das zweifache Volumen 100 % Ethanol (-20 °C) hinzugefügt und die Proben für mindestens eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben 30 Minuten bei 4 °C und 1300 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl -20 °C kaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und die Proben zehn Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Transformation wurden 30 µl kompetente Hefen direkt auf jedes Pellet gegeben.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Zellkulturbedingungen

Die HEK293- und HepG2-Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Kulturmedien MEM (*Minimum Essential Medium*) und DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) wurden mit 5 % FCS versetzt. HEK293-Zellen wurden alle 3-4 Tage in einem Verhältnis von 1:5 – 1:10, HepG2-Zellen wurden alle 3-4 Tage in einem Verhältnis von

1:3 – 1:4 mit frischem Medium versetzt. Vor dem Umsetzen in ein neues Kulturgefäß wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden Oberflächenproteine der Zellen mit 1 ml Trypsin gespalten, sodass sich die Zellen von dem Boden der Kulturschale und voneinander lösten. Um die Zellmembranen nicht zu stark zu schädigen, wurde auf eine möglichst kurze Inkubation mit Trypsin geachtet und das Trypsin mit frischem Medium inaktiviert.

Für die Transfektionen wurden autoklavierte, runde 18 mm Objektgläschen in die Vertiefungen von 12-Well Platten gelegt. Nach dem Passagieren der Zellen wurde die Zellzahl pro ml Suspension bestimmt, um eine genau definierte Anzahl von Zellen auf den Objektgläschen auszusetzen. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 75 µl Trypanblau wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 25 µl der Zellsuspension zugegeben (Verhältnis 1:4). Das Deckglas der Neubauer-Zählkammer wurde mit Wasserdampf befeuchtet und auf die Trägerstreben der Neubauer-Zählkammer gedrückt, sodass *Newtonsche* Ringe zwischen den Gläsern sichtbar wurden. Die Kammer wurde seitlich mit einer Pipette über Kapillarkräfte befüllt, bis das definierte Standardvolumen unter dem Objektträger erreicht war. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurden die lebenden Zellen pro Quadrat (L) mit einem Hand-Klick-Zähler ausgezählt. Die Berechnung der Konzentration der Zellen in der Suspension erfolgte anhand der Formel für die Neubauer Zählkammer. $L_1 + L_2 + L_3 + L_4 = L_{\text{gesamt}}$

$$L_{\text{gesamt}} : 4 = L_{\text{Mittelwert}}$$

$$L_{\text{Mittelwert}} \times \text{Vorverdünnung} (4) \times 10^4 = \text{Zellen pro ml}$$

(10^4 = Kammerfaktor. Dieser ergibt sich aus dem Volumen der Kammer)

3.2.2.2 Einfrieren von HEK293-Zellen

Subkonfluente Zellen möglichst geringer Passage wurden für spätere Experimente geerntet und eingefroren. Vierundzwanzig Stunden vor dem Einfrieren wurde das Medium gewechselt. Es wurde ein Einfriermedium mit 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO (steril) hergestellt. FCS wurde vor der Verwendung sterilfiltriert. Einfriermedium und 1,25 ml Cryoröhrchen wurden auf Eis gestellt. Die einzufrierenden Zellen wurden in T175er Kulturflaschen zwei Mal mit 20 ml PBS (4 °C) gewaschen und daraufhin kurz mit 1 ml Trypsin inkubiert. Die Zellen wurden auf 10 ml mit Standard Medium aufgefüllt und in 15 ml *Falcon Tubes* transferiert. Die Zellen wurden bei 800 rpm und 4 °C zehn Minuten abzentrifugiert und sofort auf Eis gestellt. Das Medium im Überstand wurde abgesaugt und jedem *Falcon Tube* 2 ml Einfriermedium zugegeben. Die Zellen wurden durch auf- und abpipettieren resuspendiert und die Cryoröhrchen mit jeweils 1 ml befüllt. Anschließend wurden die Cryoröhrchen in ein mit Isopropanol gefülltes Einfriergefäß gestellt, um eine Abkühlrate von -1 °C pro Stunde zu ermöglichen. Das Einfriergefäß wurde im -80 °C-Schrank bis zum nächsten Tag abgekühlt. Durch DMSO und FCS als Kryoprotektiva wird die Kristallbildung in den Zellen inhibiert. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen in -196 °C kaltem flüssigen Stickstoff überführt. Bei einer

Lagerung unterhalb von -130 °C finden keine biochemischen Reaktionen statt. Eine Bildung von schädigenden Eiskristallen ist nicht möglich (126).

3.2.2.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Für die Transfektion von HEK293-Zellen wurden nach der Passagierung 100.000 Zellen pro *Well* ausgesät. Die Zellen wurden ausgesät und nach 24-36 Stunden bei einer Konfluenz von 25-30 % transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* für Lipotransfektion von Roche.

3.2.2.4 Methanolfixierung

Die Zellen wurden 24 - 48 Stunden nach der Transfektion mit Methanol fixiert. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Pro *Well* wurde 1 ml Methanol (-20 °C) zugegeben und die Zellen für 60 Sekunden inkubiert. Methanol löst Lipide aus Zellmembranen und fixiert die Zellen auf dem Glasobjektträger. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS. Zum Schutz der Fluorophore wurden die 12-*Well*-Platten bis zur Färbung dunkel gelagert.

3.2.2.5 Immunfärbung

Zur Immunfärbung wurde eine Feuchtkammer vorbereitet. Eine Petrischale wurde mit feuchtem Filterpapier ausgelegt und rechteckig geschnittener Parafilm als Unterlage für die Präparate verwendet. Die fixierten Präparate in den *Wells* wurden jeweils mit 1 ml PBS und 5 % BSA (v/v) für eine Stunde geblockt um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren und Antikörperfehlbindungen zu vermeiden. Nach der Inkubation wurden die Präparate erneut mit PBS gewaschen und mithilfe einer Pinzette und einer Kanüle auf den Parafilm der Feuchtkammer gelegt. Pro Präparat wurden 60 µl Erstantikörper in PBS angesetzt (Na⁺/K⁺-ATPase 1:100, Ubiquitin 1:100) und die Lösung vorsichtig auf die Präparate pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Präparate aus der Kammer in PBS überführt und drei Mal zehn Minuten mit PBS gewaschen. Für jedes Präparat wurden 60 µl Zweitantikörper angesetzt (Cy3 1:500, FITC 1:250). Für eine Kernfärbung wurde Hoechst 33580 1:10.000 zugesetzt. Die Präparate wurden erneut in die Feuchtkammer gelegt und jeweils mit 60 µl der Zweitantikörperlösung überzogen. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Präparate drei Mal zehn Minuten mit PBS und abschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Fixierung der Präparate auf Glasobjektträgern wurde DAKO *Fluorescent Mounting Medium* verwendet. Die Präparate wurden aus dem Wasser entnommen und überschüssiges Wasser mit Filterpapier seitlich von dem Präparat gesaugt. Ein Tropfen *Mounting Medium* wurde auf die Zellseite der Objektgläser getropft und verbliebenes Wasser durch leichtes seitliches Schwenken verdrängt. Das Objektglas wurde mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger gelegt und überschüssiges *Mounting Medium* seitlich mit Filterpapier entfernt.

Die Objektträger wurden zur Trocknung des *Mounting Mediums* über Nacht bei 4 °C gelagert. Zur sicheren Fixierung wurden die Objektgläser seitlich mit durchsichtigem Nagellack auf dem Objektträger befestigt. Die Präparate wurden in Pappmappen bei 4 °C gelagert.

3.2.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop (*LSM 510 Meta*, Zeiss) (127). Diese Technik ermöglicht Auflösungen im Bereich von 200 nm mit einer Tiefenauflösung von 100 nm. Über eine Punktlichtquelle (Laser) wird Licht einer bestimmten Wellenlänge mithilfe von Linsen und Spiegeln auf das Präparat fokussiert. Fluoreszierende Objekte im Strahlengang mit entsprechender Anregungsfrequenz emittieren Licht einer charakteristischen Wellenlänge. Das emittierte Licht wird über weitere Spiegel- und Linsensysteme durch eine Lochblende (*Pinhole*) zum Photomultiplier geleitet, welcher das optische Signal in ein elektrisches Signal umwandelt. Durch diese Anordnung gelangt nur Licht eines kleinen Objektpunktes zum Photomultiplier. Das Präparat wird in XY-Ebene Punkt für Punkt durch den Laser erfasst wodurch sequenziell ein digitales Bild entsteht (128,129).

3.2.3.1 Grundeinstellungen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM)

Die verwendeten Fluorophore - Hoechst 33580 (blau), YFP (grün), FITC (grün), mCherry (rot) und Cy3 (rot) - wurden je nach Kombination im Präparat sequentiell angeregt und detektiert (*Multi-Track-Modus*). Es erfolgte eine Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen mit möglichst unterschiedlichem Spektrum in Anregungs- und Emissionsfluoreszenz. Die Aufnahme blauer Fluoreszenz erfolgte mit einer Wellenlänge von 405 nm bei einem Detektionsbereich (*beam pass*, *BP*) von 420-480 nm, die Aufnahme grüner Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 488 nm, *BP* 505-530 nm. Die Aufnahme roter Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 543 nm, *BP* 560-615 nm.

3.2.3.2 Grundeinstellungen für die Kolokalisationsanalysen

Für die Kolokalisationsanalysen wurden detektierte Pixel zweier Kanäle hinsichtlich ihrer Kolokalisation untersucht. Die Grundeinstellungen des Mikroskops wurden innerhalb und bei der Reproduktion der Experimente nicht verändert. Die Aufnahme erfolgte über das *Achromat 63x/1,4 Oil DIC* Objektiv mit 512 x 512 Pixel entsprechend einer Fläche von 146,2 µm x 146,2 µm. Die Pixelgröße betrug 0,29 µm x 0,29 µm. Die Aufnahme erfolgte mit 8 Bit (256 Graustufen), die Pixelzeit betrug 1,6 µs. Die Empfindlichkeit des Detektors und die Signalverstärkung wurde über *Detector Gain* und *Amplifier Offset*, bzw. *Amplifier Gain* bei jedem Experimentalsatz entsprechend den Empfehlungen des Zeiss Manuals eingestellt (128).

3.2.3.3 Einstellung von Detector Gain und Amplifier Offset

Detector Gain und *Amplifier Offset* wurden für jedes Experimentalsset entsprechend den Empfehlungen des Zeiss Manuals optimal eingestellt (128). Hierzu wurden drei durchschnittliche Aufnahmen des Wildtyppräparates bzw. ungefärbte Präparate eines Experimentalsets verwendet. Nach der optimalen Einstellung der Helligkeit (*Detector Gain*) und des Hintergrunds (*Amplifier Offset*) an drei Bildausschnitten wurde der mittlere Wert jedes Parameters als Einstellung für das ganze Experimentalset verwendet. *Detector Gain* und *Amplifier Offset* wurden für jeden Kanal einzeln im Anzeigemodus „*Range Indicator*“ der „*Color Palette*“ eingestellt.

Pixel einer Intensität über der Graustufe 255 werden im „*Range Indicator*“ Modus rot dargestellt. Wird die Detektorsensitivität erhöht, steigt die Zahl der roten Pixel und somit derer, welche die höchste detektierbare Intensitätsstufe überschreiten. Um die Intensitäten dieser Pixel noch zu unterscheiden, wurde die Detektorsensitivität soweit reduziert, dass nur noch wenige Prozent der Pixel des Bildes rot angezeigt wurden und somit die Intensitätsstufe von 255 überschritten. Rote Bereiche wurden nur an Zell-Zellkontakten zugelassen. Das *Amplifier Offset* legt den Beginn der 256 Intensitätsstufen fest. Pixel, für welche bei gegebenem *Amplifier Offset* ein Nullwert gemessen wird, werden im Modus „*Range Indicator*“ blau dargestellt. Das *Amplifier Offset* wurde zunächst erhöht und dann soweit reduziert, bis gerade einzelne blaue Pixel im „*Range Indicator*“ angezeigt wurden.

3.2.3.4 Detektion von Lokalisationsunterschieden und Trafficking-Defekten

Lokalisationsunterschiede und *Trafficking*-Defekte der MDR3-Varianten in den Zellen sollten über den Vergleich der Kolokalisation der Fluoreszenz von MDR3 mit der Membran erfolgen. Als Markerprotein für die Membran wurde die Na^+/K^+ -ATPase mit einem Zweitantikörper markiert. Die MDR3-Varianten wurden an ein Fluorophor gekoppelt transfiziert.

Für die Kolokalisationsanalysen wurden zwei nacheinander aufgenommene Bilder (*multi-track*) über die Kanäle Ch2-T1 (grün) und Ch2-T2 (rot) hinsichtlich ihrer Überlappung (Kolokalisation) untersucht. Die Kolokalisation wurde für jede Zelle berechnet, welche über eine *Region of Interest* (ROI) markiert wurde (**Abb. 7**).

Über die Software *AxioVision* (Zeiss) oder die integrierte Software des LSM können Daten zu Pixelintensitäten und Häufigkeiten in ROIs ausgegeben werden.

Jedes Pixel der übereinandergelegten Bilder enthält Daten zur Fluoreszenzintensität (0-256) in beiden Kanälen. In einem Streudiagramm (*scattergram*) (**Abb. 7**) werden die zwei Fluoreszenzintensitätswerte jedes Pixels einer ROI gegeneinander aufgetragen und die Häufigkeit unterschiedlich stark fluoreszierender Pixel über die Farbe kodiert. Für beide Kanäle wurden Schwellenwerte (*thresholds*) ermittelt, für die Fluoreszenz, ab welcher ein Pixel für die spätere Auswertung als fluoreszierend erkannt wurde. Hierdurch wurde zufällige Kolokalisation von Hintergrundfluoreszenz aus der Auswertung genommen. Bei Pixeln, bei denen in beiden Kanälen der *threshold* überschritten wurde, wurde von einer Kolokalisation der beiden Fluorochrome

ausgegangen. Zur Bestimmung der der Schwellenwerte, wurden untransfizierte Zellen verwendet, welche nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden.

Im Streudiagramm (**Abb. 7**) werden die Schwellenwerte über ein Fadenkreuz dargestellt, welches die Fläche in drei Bereiche teilt. In Area 1 überschreitet nur die grüne Fluoreszenz den Schwellenwert, das heißt MDR3-YFP (grün fluoreszierend) wird exprimiert. In Area 2 überschreitet die rote Fluoreszenz den Schwellenwert, hier wird die Na^+/K^+ -ATPase detektiert bzw. exprimiert. In Area 3 überschreitet jedes Pixel beide Schwellenwerte, hier kann von einer Kolokalisation von MDR3-YFP und Na^+/K^+ -ATPase ausgegangen werden. In Area 4 sind alle Pixel als Hintergrund definiert.

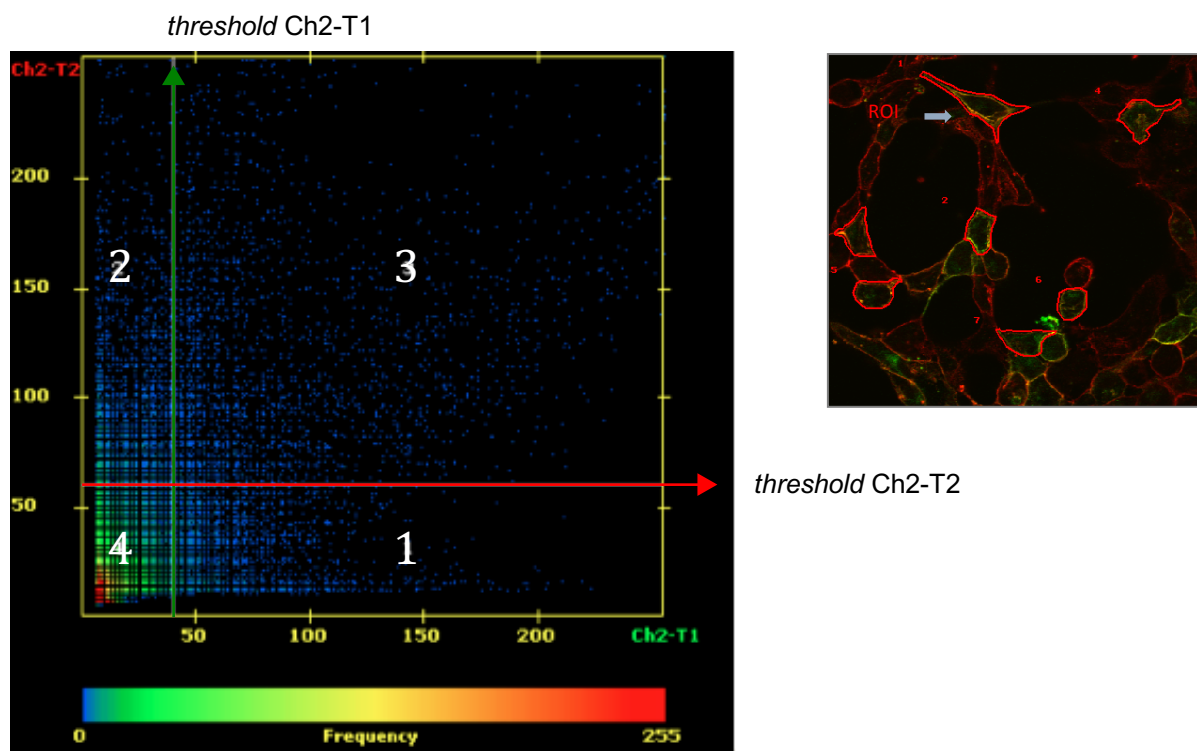


Abb. 7 Streudiagramm mit Pixelverteilung im grünen (Ch2-T1) und roten Kanal (Ch2-T2) einer **Region of Interest (ROI)**. Die Häufigkeit der Pixel mit definierter Kombination der Fluoreszenzintensität in beiden Kanälen wird über die Farbe kodiert. Über ein Fadenkreuz (rote und grüne Pfeile) wird ein Fluoreszenzschwellenwert (*threshold*) für jeden Kanal festgelegt, über welchem Pixel oberhalb der Hintergrundfluoreszenz liegen. Die Diagrammfläche wird durch die Fluoreszenzschwellenwerte in 4 Areale unterteilt (1-4). Area 1: Nur grüner Kanal positiv, das heißt MDR3-YFP wird exprimiert. Area 2: Nur roter Kanal positiv: hier wird die Na^+/K^+ -ATPase detektiert bzw. exprimiert. Area 3: Hier kolokalisieren MDR3-YFP und Na^+/K^+ -ATPase.

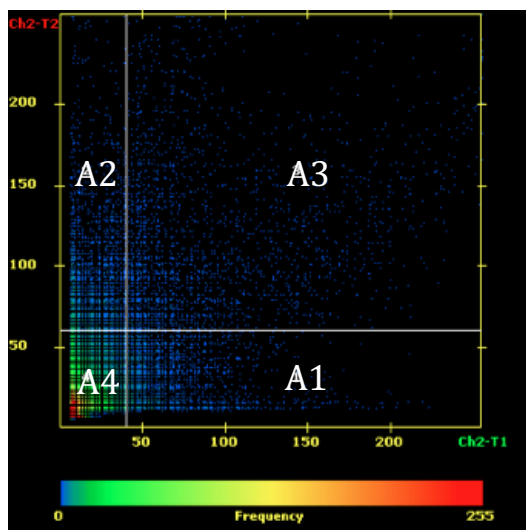
3.2.3.5 Berechnung der Kolokalisation

Um die intrazelluläre Lokalisation (membranständig oder intrazellulär) des markierten MDR3 zwischen den Varianten vergleichen zu können, wurde für jede ROI die Kolokalisation von roter und grüner Fluoreszenz berechnet. Die Kolokalisation wurde über den Kolokalkulationskoeffizienten nach Manders (130) berechnet. Der Kolokalkulationskoeffizient eines Kanals beschreibt das Verhältnis der Summe der

kolokalisierten Fluoreszenz dieses Kanals zur Summe der gesamten Fluoreszenz des entsprechenden Kanals in der ROI. Kolokalisationskoeffizienten können für den grünen Kanal (M1) oder den roten Kanal (M2) berechnet werden. Der Kolokalisationskoeffizient M1 entspricht somit dem Verhältnis von membranständiger MDR3-assoziiierter (kolokolisierter) Fluoreszenz der ROI zur gesamten MDR3-assoziierten Fluoreszenz der ROI (Zelle). Der Kolokalisationskoeffizient M2 entspricht dem Verhältnis der mit MDR3 kolokalisierten Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierten Intensität zur gesamten Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierten Intensität der ROI (**Abb. 8**). Für die Berechnung der Kolokalisation der MDR3 Varianten mit der Membran wurde primär M1 berechnet und verglichen.

$$M1 = \frac{\sum G_{i,coloc}}{\sum G_i} \quad M2 = \frac{\sum R_{i,coloc}}{\sum R_i}$$

Abb. 8 Berechnung der Kolokalisationskoeffizienten M1 und M2 A Kolokalisationskoeffizienten M1 und M2. $R_{i,coloc}$: Pixelintensität im roten Kanal, wenn grüne Fluoreszenz vorhanden ist; $G_{i,coloc}$: Pixelintensität im grünen Kanal, wenn rote Fluoreszenz vorhanden ist. Die Kolokalisation wurde in dieser Arbeit über M1 verglichen. M2 wurde zusätzlich berechnet. Adaptiert nach Adler et al 2010 (131).



$$M1 = \frac{\sum G_{i,coloc}}{\sum G_i} = \frac{A3 \times I_{A3}}{A1 \times I_{A1} + A3 \times I_{A3}}$$

Abb. 9 Darstellung der Berechnung des Kolokalisationskoeffizienten M1 anhand des Streudiagramms $G_{i,coloc}$: Pixelintensitäten im grünen Kanal, wenn rote Fluoreszenz vorhanden ist. G_i : Pixelintensitäten des grünen Kanals. A3: Pixelzahl Area 3. A1: Pixelzahl Area 1. I_{A3} : Mittlere Intensität Area 3. I_{A1} : Mittlere Intensität Area 1.

3.2.3.6.1 Kolokalisationsanalyse der MDR3-Isoformen

Die MDR3-Isoformen wurden in zwei Experimentvarianten entweder mit einem YFP- (grün) oder mCherry-Fluoreszenztag (rot) verbunden. Die Zellmembranen wurden mittels Immunfärbungen über die Na⁺/K⁺-ATPase mit FITC- (grün) oder Cy3- (rot) gekoppelten Zweitantikörpern gefärbt.

Für den Vergleich der subzellulären Lokalisation der MDR3-Isoformen wurde eine zuvor in der Arbeitsgruppe entwickelte Auswertungsstrategie verwendet, die auf die Daten der Kolokalisationssoftware des *LSM 510 Meta* zurückgreift. Gesichtsfelder der Präparate wurden zufällig ausgewählt und verblindet aufgenommen. Je Variante wurden mehrere Aufnahmen der Präparate gemacht und 50 Zellen markiert, welche nach subjektiver Einschätzung das Markerprotein Na^+/K^+ -ATPase durchschnittlich exprimierten und wenn die Zellen ihre typische polygonale Zellform aufwiesen. Weitere Voraussetzung war, dass die jeweilige MDR3-YFP Variante exprimiert wurde. Die Daten der ROIs wurden für statistische Berechnungen in eine Excel-Tabelle übertragen.

3.2.3.6.2 Statistik MDR3-Isoformen

Die Kolokalisation wurde für jede Isoform über die mittleren Kolokalisationskoeffizienten $M1$ berechnet. Die Mittelwerte der Kolokalisationskoeffizienten der Isoformen wurden bei fehlender Normalverteilung über den nonparametrischen *Mann-Whitney U Test* miteinander verglichen.

3.2.3.7 Kolokalisationsanalyse der MDR3-Mutanten

3.2.3.7.1 Standardisierte Bildaufnahme

Bei der Kolokalisationsanalyse der MDR3-Mutanten mit der Membran wurde MDR3 EYFP-*getagged* transfiziert und die Na^+/K^+ -ATPase als Markerprotein der Membran mit Cy3-gekoppeltem Zweitantikörper rot gefärbt.

Für den Vergleich der MDR3-Mutanten wurde die verwendete Auswertungsstrategie weiter standardisiert. Die Auswahl der Bildausschnitte (**Tabelle 1**) und Zellen (**Tabelle 2**) sollte nach festgelegten Kriterien erfolgen, um auch geringere Unterschiede zwischen den Mutanten untersucherunabhängig detektieren zu können.

Standardisierte Bildaufnahme

1. Beginnend am längsten horizontalen Durchmesser des Objektglases wurden benachbarte Bildausschnitte meanderförmig aufgenommen.
2. Enthielt ein Bildausschnitt weniger als zwei transfizierte Zellen oder mehr als 50% offensichtlich zerstörte Zellen, wurde er übersprungen.
3. Die Fokusebene wurde für den Kanal, der die Färbung der Na^+/K^+ -ATPase abbildete, optimal eingestellt, sodass die Mehrheit der Zellen im mittleren Durchmesser getroffen wurde.

Tabelle 1 Standardisierte Bildaufnahme von Gesichtsfeldern.

3.2.3.7.2 Einstellung der Schwellenwerte

Für den Vergleich der MDR3-Mutanten wurde zur Auswertung die Software *AxioVision* verwendet. Auch in *AxioVision* wurden nach der Bildaufnahme für beide Kanäle Schwellenwerte (*thresholds*) des minimalen Signals der Fluoreszenzintensität festgelegt. Durch den Ausschluss von Pixeln mit schwacher Fluoreszenz (=Rauschen) aus der Analyse werden falsch-positive Kolokalisationen eliminiert (**Abb. 10**).

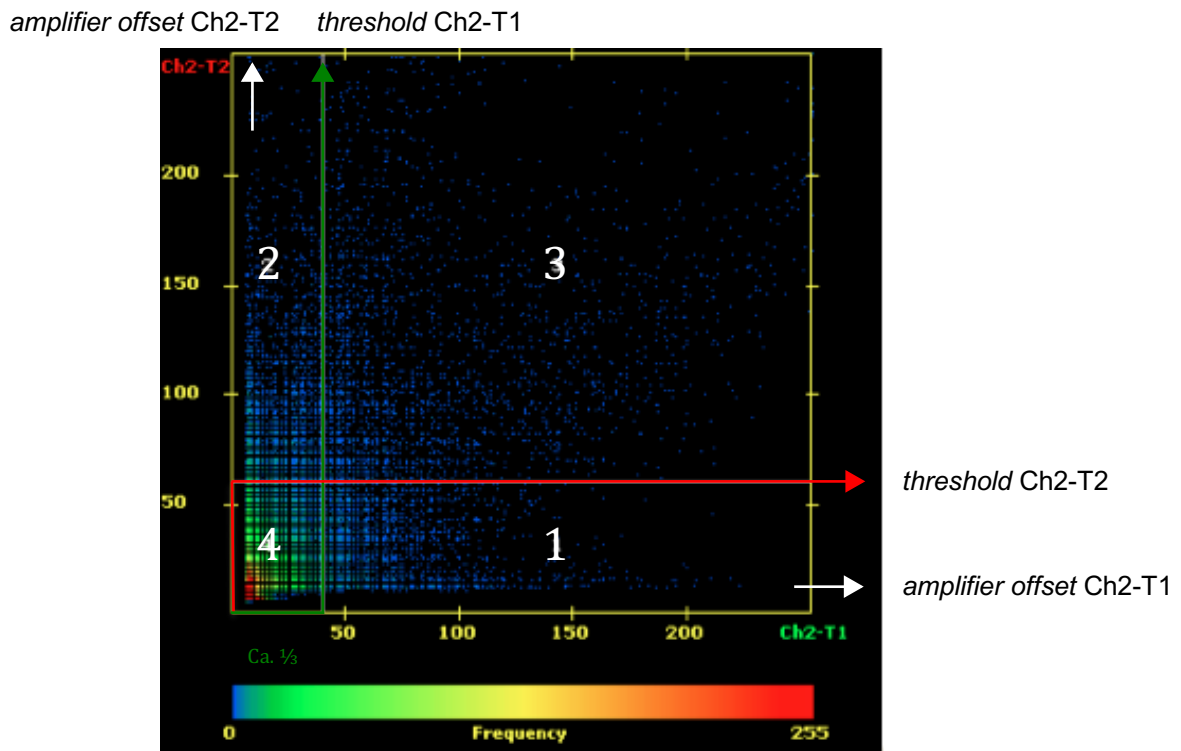


Abb. 10 Schwellenwerte (*thresholds*) am Streudiagramm (*scattergram*) einer Aufnahme des Wildtyps. Amplifier Offset (weißer Pfeil).

Ziel der Einstellung der Schwellenwerte war eine plausible Erfassung der Membrankolokalisation beim Wildtyppräparat. Die Anpassung der Schwellenwerte wurde durch visuelle Kontrolle der von *AxioVision* registrierten Kolokalisation überprüft. Fünfzehn Wildtypzellen mittlerer MDR3-Fluoreszenz wurden auf den ersten vier Gesichtsfeldern als Standardzellen ausgewählt. Jedes Gesichtsfeld wurde gleichzeitig in zwei separaten Anzeigefenstern von *AxioVision* aufgerufen. Im ersten Fenster wurden alle MDR3-entsprechenden Pixel grün angezeigt. Im zweiten Fenster wurden nur die als kolokalisiert detektierten Pixel in violett dargestellt. Der Schwellenwert des grünen Kanals wurde pro Gesichtsfeld soweit erniedrigt, dass bei den ausgewählten Zellen die violetten, kolokalisierten Pixel soweit wie möglich mit den sichtbar an der Membran lokalisierten grünen Pixeln übereinstimmten (**Abb. 11**). Durch diese Anpassung sollte eine dem visuellen Eindruck entsprechende und möglichst plausible Erfassung der Kolokalisationswerte des Wildtyps erreicht werden. Bei Zellen mittlerer MDR3-Expression sollte für das menschliche Auge als

membranständig erkennbares MDR3-Protein von *AxioVision* als kolokalisiert erkannt werden. Es wurden für beide Kanäle Werte ermittelt, welche auf allen vier Bildausschnitten zu einer ausreichenden Übereinstimmung führten. Für die drei Experimentalsets (Experimentwiederholungen) wurde der Schwellenwert bei 40 für den grünen Kanal (Ch2-T1) und bei 60 für den roten Kanal (Ch2 T2) eingestellt (**Abb. 10**).

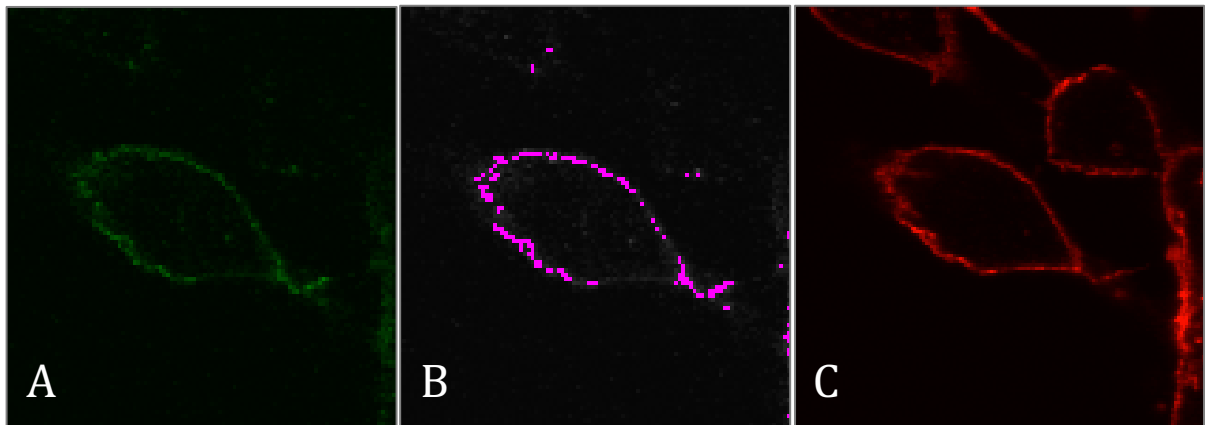


Abb. 11 Einstellung der Schwellenwerte. Beispiel einer Zelle, an welcher die Einstellung der Schwellenwerte erfolgte. **A** grüne Pixel zeigen die MDR3-Fluoreszenz **B** Violette Pixel zeigen die Kolokalisation von Na^+/K^+ -ATPase-Fluoreszenz und MDR3-Fluoreszenz. **C** Rote Pixel zeigen die Fluoreszenz der Na^+/K^+ -ATPase.

3.2.3.7.3 Regions of Interest (ROI)

Um eine unbewusste Bevorzugung bestimmter Zellen in einem Präparat zu vermeiden, wurde bei der Auswertung ein standardisiertes Vorgehen zur Auswahl der Zellen festgelegt.

Jede intakte, transfizierte Zelle, welche festgelegte Kriterien erfüllte (**Tabelle 2**) wurde mit einer ROI versehen (**Abb. 12**) und in die Auswertung aufgenommen.

Standardisierte Markierung von ROIs

1. Zur Markierung der ROIs wurden Bilder in dreifacher Vergrößerung benutzt.
2. Die erste ROI wurde um die erste Zelle in der linken oberen Bildecke gelegt, welche die unten aufgeführten Kriterien erfüllte.
3. Weitere ROIs wurden um alle den Kriterien entsprechenden Zellen derselben horizontalen Reihe gelegt. Nach Erreichen des rechten Bildrandes wurde die nächste Zeile, entsprechend den unten aufgeführten Kriterien mit ROIs versehen.
4. Es wurden nur transfizierte Zellen mit ROIs versehen. Eine Zelle wurde als transfiziert angesehen, wenn im Programm *AxioVision* mindestens ein grünes Pixel über dem Schwellenwert erkannt wurde.
5. War die Membran im roten Kanal nicht vollständig sichtbar wurde unter Zuhilfenahme des grünen Kanals den geschätzten Zellgrenzen gefolgt. Eine Zelle wurde nur gewählt, wenn mindestens 50% der Membran im roten Kanal sichtbar war.
6. Zellen, welche im Bildausschnitt nur angeschnitten waren wurden nicht markiert.
7. Teilten sich zwei Zellen eine Membran aufgrund von Zell-Kontakten oder geringen Zellüberlappungen, wurde nur eine Zelle markiert. Hierbei wurde die weiter oben und weiter links gelegene Zelle bevorzugt. War eine Zelle zu mehr als 50% überlappt, wurde sie nicht ausgewählt. Auf diese Weise wurde vermieden, dass sich zwei ROIs tangieren.

Tabelle 2 Standardisierte Markierung von ROIs. Zellauswahlkriterien zum manuellen Einzeichnen von ROIs.

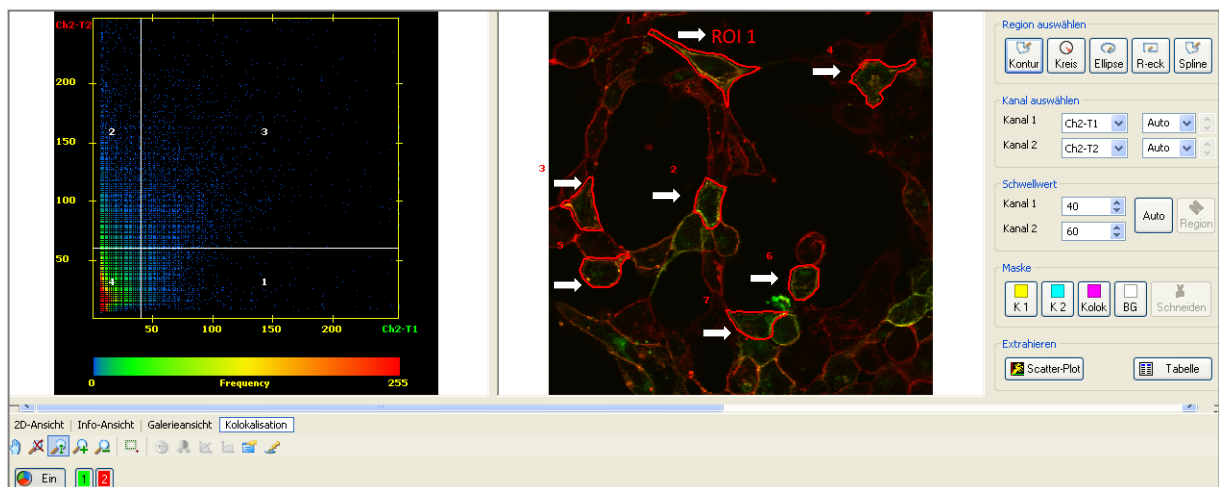


Abb. 12 Darstellung des Menüfensters von AxioVision. ROIs (weiße Pfeile) wurden mithilfe des Kontur-Tools um die Zellen gelegt. Hierbei wurde den Zellgrenzen - angezeigt durch die rote Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierte Fluoreszenz - gefolgt.

3.2.3.7.4 Qualitätskontrolle der Zellen vor der Auswertung

Durch die standardisierte Bildaufnahme und ROI-Markierung für den Lokalisationsvergleich der MDR3-Mutationen sollte eine möglicherweise verfälschende, untersucherabhängige Selektion der Zellen hinsichtlich der Zellgröße, der Expression des Markerproteins oder der MDR3-Expression vermieden werden. Die Kriterien zur manuellen ROI-Markierung wurden hierzu bewusst mit hoher Toleranz gewählt, um verfälschende subjektive Einschätzungen des Untersuchers zu vermeiden. Die Selektion der Zellen erfolgte nachträglich durch Ausschluss von Zellen ober- oder unterhalb von festgelegten Quantilen der Mittelwerte der Parameter Zellfläche, Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierte Intensität und MDR3-assoziierte Intensität. Der Ausschluss der Zellen erfolgte nachdem die Daten der aufgenommenen Bilder in eine Excel-Tabelle übertragen wurden. Die Ausschlussquantile wurden über alle Experimente beibehalten (**Tabelle 3**).

Selektionskriterium	Ausgewählte Zellpopulation
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-assoziierte Intensität	> 20% Quantil bis < 80% Quantil
Zellfläche	> 10% Quantil bis < 90% Quantil
MDR3-assoziierte Intensität	> 25% Quantil bis < 75% Quantil

Tabelle 3 Selektionskriterien der Zellen zur Kolokalisationsanalyse der MDR3-Mutationen.

Die Quantile für die Zellgröße und die Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierte Intensität wurden so gewählt, dass die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine möglichst ähnliche Expression der Na⁺/K⁺-ATPase zeigten. Die Stichprobengröße sollte hierdurch nicht zu stark reduziert werden. Zellen mit einer Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierten Intensität unterhalb des 20%- und oberhalb des 80%-Quantils wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Um Zellen eines möglichst ähnlichen Entwicklungsstadiums zu selektionieren wurden Zellen einer Zellfläche unterhalb des 10%- und oberhalb des 90%-Quantils aus der Auswertung ausgeschlossen. Das Quantil zum Ausschluss der Zellen hinsichtlich der MDR3-assoziierten Intensität wurde aus mehreren Gründen festgelegt. Extrem gering MDR3-exprimierende Zellen sollten aus der Auswertung ausgeschlossen werden um die Auswertung nicht durch sehr geringe Kolokalisationskoeffizienten zu verzerren. Stark transfizierte Zellen mit intrazellulären Proteinaggregaten sollten ausgeschlossen werden, da diese in Plasmamembrannähe zu Membranüberstrahlungen führen können. Aufgrund der Abhängigkeit des Kolokalisationskoeffizienten M1 von der Gesamtexpression in der Zelle, sollten Zellen mit möglichst ähnlicher MDR3-Expression selektiert werden, um die Varianz des Kolokalisationskoeffizienten zu reduzieren. Die Quantile für die MDR3-assoziierte Intensität wurden auf 25% und 75% gesetzt, sodass noch ausreichend Zellen zur Endauswertung verblieben.

3.2.3.7.5 Statistik MDR3-Mutationen

Die Mittelwerte der Kollokalisationskoeffizienten M1 und M2 sowie die Mittelwerte der Zellfläche, der Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierten Intensität und der MDR3-assoziierten Intensität der MDR3-Varianten wurden jeweils mit den Mittelwerten des Wildtyps verglichen. Berechnungen erfolgten mit der Statistiksoftware *Prism*. Bei nicht normalverteilten Daten und kleinen Stichprobengrößen einzelner Mutanten wurden für alle Experimente nonparametrische Tests verwendet. Für Vergleiche zwischen den Gruppen wurde der *Kruskal-Wallis Test* verwendet. Post-hoc-Analysen erfolgten über *Dunn's multiple comparison test*.

3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1 Proteinlysate

Für Proteinlysate wurden die Zellen am Vortag auf 6 cm Zellkulturschalen ausgesetzt. Die Transfektion erfolgte mit *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent*. Es wurden 8 µg DNA und 16 µl Transfektionsreagenz verwendet. Nach 48 Stunden wurden die Zellen auf Eis geerntet. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS (4 °C) gewaschen und jeder Zellkulturschale 200 µl Lysepuffer zugegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Schale gezogen und in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt. Jedem Ansatz wurden 2 µl Benzonase zugegeben und die Suspension gut gemischt. Die Proben wurden fünf Minuten auf einem Rollschüttler bei RT inkubiert und anschließend in flüssigen Stickstoff eingebracht. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Lysepuffer modifiziert (200 µl)

20 µl	SDS 10 %
1 µl	MgCl ₂ (2 M)
179 µl	PBS + Proteaseinhibitor

PBS + Proteaseinhibitor

25 ml	PBS
1 x	Proteaseinhibitortablette

3.2.4.2 Bradfordassay

Um gleiche Proteinmengen auf den Western Blot aufzutragen, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford mithilfe des Protein-Assay Kits von *Biorad* durchgeführt (132,133). Die Proteinbestimmung beruht auf der Bindung von *Coomassie-Brilliant Blue G250* an das Protein. Bei der Bindung in saurer Lösung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschoben

(134,135). Die Zunahme der Absorption wird bei 595 nm bestimmt. Gefrorene Proben wurden aufgetaut und zur Entfernung von Präzipitaten kurz bei 65 °C im Inkubator erwärmt. Für die Messung wurden die Proben zunächst 1:10 – 1:20 mit H₂O dest. verdünnt, um die Proteinkonzentrationen der Proben in die Spanne des BSA-Standards zu senken. Aus jeder Probe wurden 40 µl Verdünnung für eine Dreifachbestimmung angesetzt. Pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden je 10 µl der Proben, des BSA-Standards bzw. des Leerwertes (Lysepuffer) vorgelegt. Das *Coomassie*-Reagenz wurde nach Herstellerangaben 1:5 verdünnt und 300 µl zu jedem Well zugegeben. Luftblasen wurden abgeflammt. Zur Ausbildung stabiler Protein-Farbstoffkomplexe wurde die Platte vor der Messung mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 595 nm gemessen. Aus der Dreifachbestimmung der Proben wurde jeweils ein Mittelwert errechnet und der gemessene Leerwert abgezogen. Über die Funktion der BSA-Eichkurve wurde die Proteinkonzentration der Probe aus der Extinktion bestimmt.

3.2.4.3 SDS-Page und Western Blot

Als Probenpuffer wurde reduzierender SDS-Probenpuffer verwendet.

Reduzierender SDS-Probenpuffer

960 µl	5 x SDS Spezial Probenpuffer
40 µl	1 M DTT

Zu lagern bei -20 °C.

5 x SDS Spezial Probenpuffer

10 ml	Sammelgelpuffer
10 ml	16 % (w/v) SDS
5 ml	0,2 % (w/v) Bromphenolblau
	Harnstoff (Konz. in 50 ml
8 M	Endvolumen)
Ad 50 ml	Glycerol

Die Komponenten wurden in einem 50 ml *Falcon* gemischt. Harnstoff wurde zugesetzt.

Sammelgelpuffer

4 g/l	SDS
0,5 M pH 6,8	Tris-HCl

Jede Tasche des Western Blots wurde mit 20 µg Protein beladen. Die entsprechende Probenmenge wurde mit H₂O dest. auf 20 µl aufgefüllt und 5 µl reduzierender SDS-Probenpuffer zugesetzt. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.4.4 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Für den Western Blot und die Auftrennung der Proteine wurden vertikale SDS-Polyacrylamidgele hergestellt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt fast ausschließlich nach dem Molekulargewicht, da SDS durch seine negative Ladung die Eigenladung der Proteine überdeckt (136).

Zur Gelelektrophorese wurde ein System von *Biorad* verwendet. Die Glasplatten wurden nach Herstellerangaben zusammengefügt.

2 x Trenngel 7 %

14,8 ml	H ₂ O dest.
7 ml	PAA 30 %
7,6 ml	1,5M Tris pH 8,8
300 µl	SDS 10 %
300 µl	APS 10 %
18 µl	TEMED

APS und TEMED bewirken die Polymerisation und werden zuletzt zugegeben.

2 x Sammelgel 4,5 %

7 ml	H ₂ O
1,5 ml	PAA 30 %
1,26 ml	1 M Tris pH 6,8
100 µl	SDS 10 %
100 µl	APS 10 %
10 µl	TEMED

Das Trenngel wurde bis ca. zwei Taschenlängen unter den Unterrand der kurzen Glasplatte in die Kammern gegossen. Zur Begradigung der Phasengrenze wurde etwas Isopropanol aufgegossen. Das Gel wurde 30 Minuten zur Polymerisation inkubiert. Nach der Polymerisation wurde Isopropanol abgegossen und Reste mit Filterpapier abgesaugt. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und ein passender Kamm eingesteckt. Nach einer weiteren Polymerisationszeit von 30 Minuten wurde der Kamm vorsichtig unter Wasser herausgezogen, um den Unterdruck zu minimieren. Die Gummiabdichtung wurde entfernt und das Gel mit zwei Klemmen an der Elektrophoresekammer fixiert. Die Kammern wurden mit Elektrophoresepuffer gefüllt.

10 x Elektrophoresepuffer

60 g	Tris
300,28 g	Glycin
20 g	SDS
ad 2 l	H ₂ O dest.

Als Proteinstandard wurden fünf Mikroliter *Precision Plus Protein Standard* verwendet. 25 µl Probe wurden mit einer Mikroliter-Spritze in die Taschen pipettiert. Um eine gerade Lauffront zu erzielen, wurden 5 µl Probenpuffer in jede leere Geltasche pipettiert.

Die Proteinauftrennung im Gel erfolgte zunächst für eine halbe Stunde bei 80 V, anschließend bis zum Erreichen der Phasengrenze bei 120 V und danach bei 150 – 170 V bis zu einer ausreichenden Auftrennung der Proteine (Gesamtlaufzeit ca. drei Stunden).

3.2.4.5 Western Blot

Blotting-Puffer

200 ml	10 x Elektrophoresepuffer
400 ml	Methanol
ad 2 l	H ₂ O dest.

Nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel wurden die Proteine über Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose- oder eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran geblottet. Hierzu erfolgte eine luftblasenfreie Schichtung der *Blotting*-Membranen im Puffer. Filterpapierrechtecke wurden zunächst in *Blotting*-Puffer eingelegt. Es folgte eine luftblasenfreie Schichtung der Membranen des Western Blots. Zunächst fünf Blätter passend geschnittenes Filterpapier, darauf Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membran, darauf das rechteckig zugeschnittene Elektrophoresegel und darauf wiederum fünf Lagen passend geschnittenes Filterpapier. Pufferreste wurden mit Zellstoff abgesaugt. Der Proteintransfer erfolgte für 1½ Stunden bei 96 mA (Kantenlänge x Kantenlänge des Gels x 0,8) und 7 Volt. Anschließend wurden die Membranen in TBS-T mit 5 % Milchpulver und 0,05 % NaN₃ geblockt. Je nach Versuchsplanung erfolgte die Inkubation 30 Minuten auf dem Rollschüttler oder bei 4 °C über Nacht und anschließend erneut 30 Minuten auf dem Rollschüttler.

TBS(-T)

20 mM	TRIS/HCl pH 8
250 mM	NaCl
(0,1 % (v/v))	Tween 20

3.2.4.5.1 Antikörper für den Western Blot

Die Erstantikörper wurden in 20 ml TBS-T mit 5 % Milchpulver und 0,05 % NaN₃ in entsprechender Verdünnung angesetzt: Anti-C219 1:1000, Anti-β-Aktin 1:2000, Anti-GFP-HRP 1:2000. Nach einer Stunde Inkubationszeit auf dem Rollschüttler wurde der Primärantikörper zur Wiederverwendung abgeschüttet und bei 4 °C gelagert. Die Membran wurde dreimal fünf Minuten mit TBS-T gewaschen. Der Blot wurde mit dem Erstantikörper eine Stunde auf einem Rollschüttler inkubiert. Um C-219 und Anti-β-Aktin über Chemilumineszenz nachweisen zu können, wurde ein HRP-gekoppelter

Zweitantikörper verwendet. Der Blot wurde mit dem Zweitantikörper eine Stunde inkubiert und drei mal zehn Minuten mit TBS-T gewaschen.

3.2.4.5.2 Detektion

Die Detektion der Antikörper erfolgte über die gekoppelte HRP (*Horseradish Peroxidase*). Der Blot wurde in 2 ml Luminol getränkt und auf die Detektionsfläche eines *Syngene*-Detektionsgerätes gelegt. Die Oxidation von Luminol durch die Antikörper-gekoppelte Peroxidase löst eine Chemilumineszenz aus. Mit dem Programm *GeneSnap* wurde die Blende eingestellt und ein Bild des Blots mit fünf Minuten Belichtungszeit aufgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Expression und subzelluläre Lokalisation der Isoform B

Zur Charakterisierung der Isoform B und zum Vergleich der Isoform B mit der bereits beschriebenen Isoform A sollten beide Varianten in der Zellkultur exprimiert und hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation über konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie verglichen werden.

Ein Expressionsplasmid der Isoform B wurde aus einem bereits vorliegenden – N-terminal mit einem *YFP-tag* verbundenen - Expressionsplasmid der Isoform A erstellt. Auf Basis einer hefebasierten Mutagenese-strategie (125) wurden die 21 zusätzlichen Nukleotide der Isoform B in den Vektor pEYFP-N1-MDR3-OriLeu und den Vektor pmCherry-N1-OriLeu-MDR3 kloniert (OriLeu zur Leucin-Auxotrophie in *S. cerevisiae*) (**Abb. 13 A**). Isoform A und Isoform B wurden zunächst im Vektor pEYFP-N1-OriLeu-MDR3 in HEK293- und HepG2-Zellen exprimiert und 48 Stunden nach der Transfektion fixiert. Die Zellmembran wurde über eine Immunfärbung der Na⁺/K⁺-ATPase als rote Fluoreszenz sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33580 blau gefärbt.

In mehrfachen Experimenten zeigte sich die Isoform B im Gegensatz zur Isoform A deutlich intrazellulär lokalisiert. Isoform A zeigte eine deutliche Kolo-kalisation von roter Membranfärbung und grüner MDR3-Fluoreszenz entlang der Plasmamembran. Isoform B dagegen zeigte eine diffuse bis aggregierte Akkumulation von grüner Fluoreszenz im Zytoplasma der Zellen und kaum Membran-kolokalisierte Bereiche. Auch die Isoform A zeigte Proteinakkumulationen im Zytoplasma, jedoch deutlich geringer ausgeprägt als bei der Isoform B (**Abb. 13 B**).

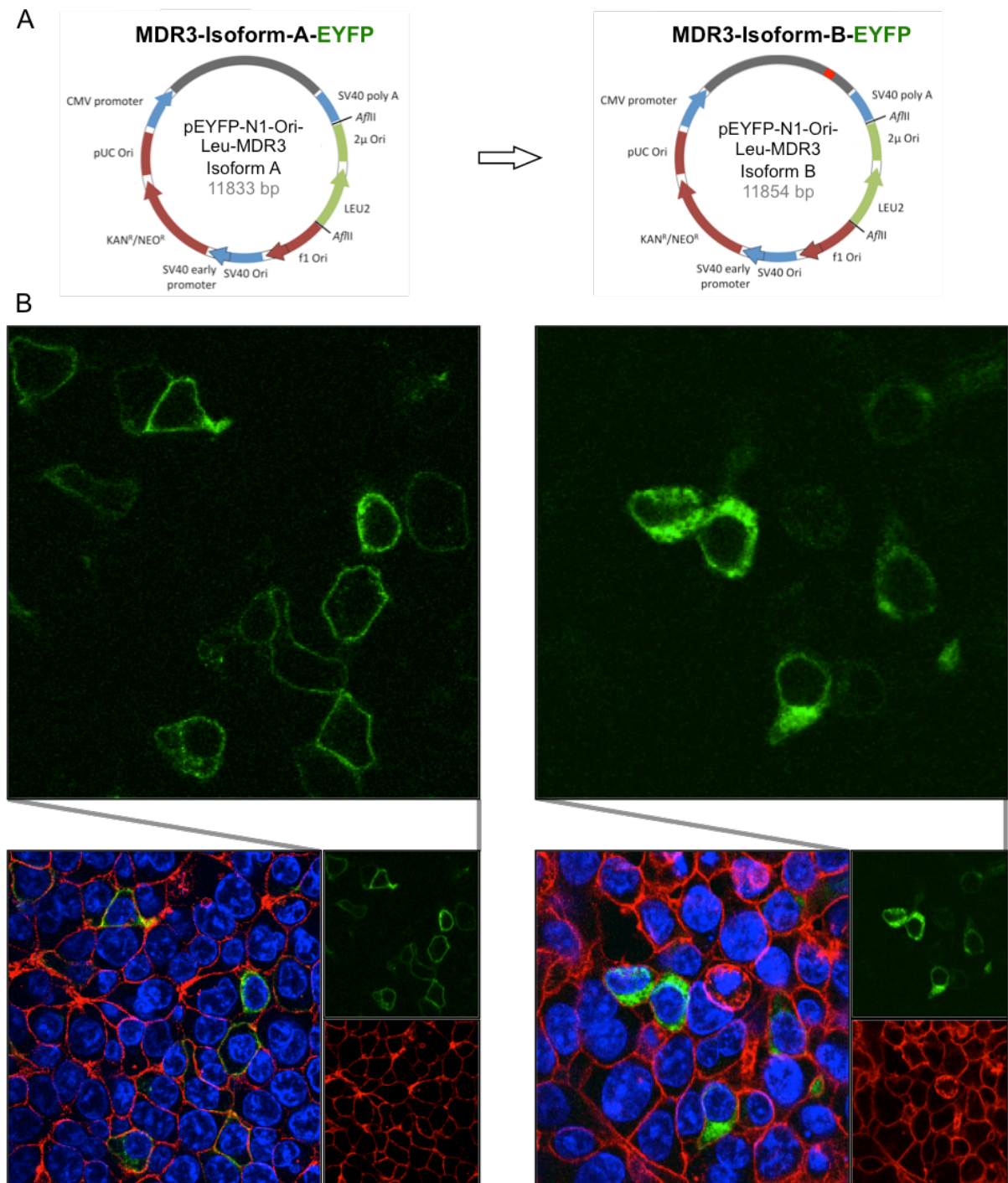
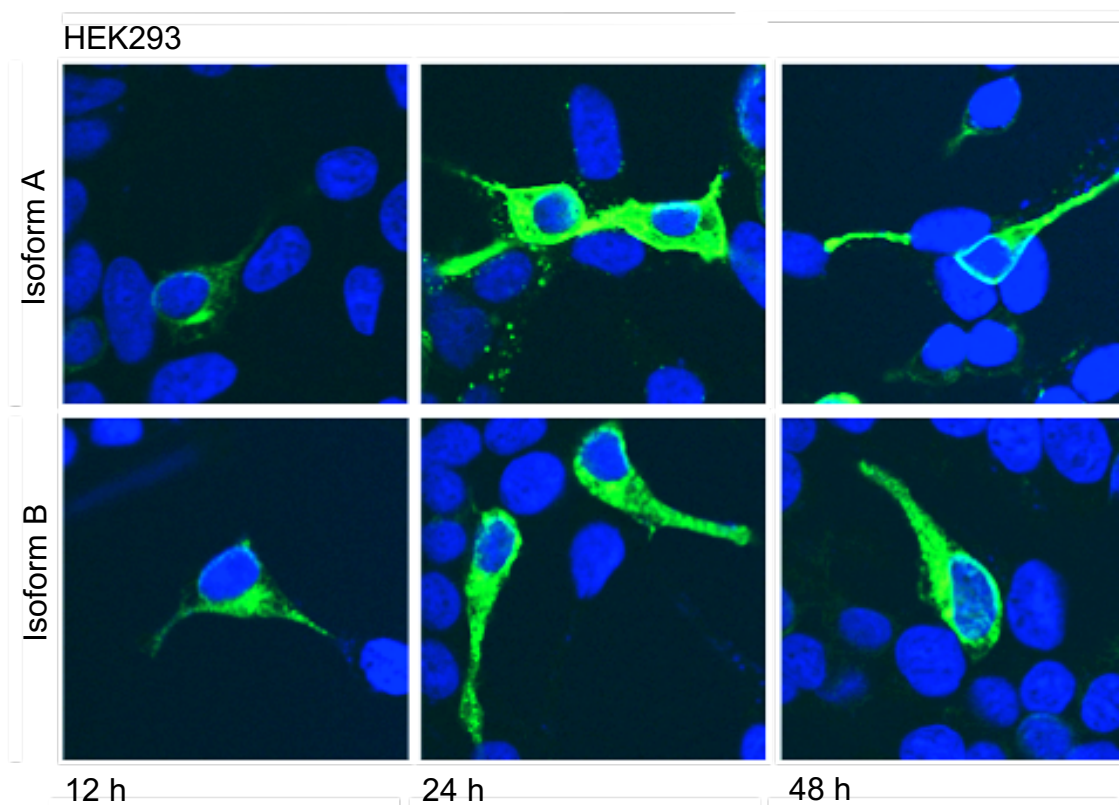


Abb. 13 A pEYFP-N1-MDR3-OriLeu und Klonierung der Isoform B nach (121,125). **B Expression** von MDR3 Isoform A und B (grün) in HEK293-Zellen fixiert nach 48 Stunden, visualisiert über konfokale Laserscanning-Mikroskopie. Zellkernfärbung Höchst 33580 (blau). Plasmamembran (rot), visualisiert über Na⁺/K⁺-ATPase.

Der Unterschied in der Lokalisation der Isoformen wurde zu verschiedenen Fixierungszeitpunkten untersucht. HEK293- und HepG2-Zellen wurden mit Isoform A und Isoform B transfiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert. In HEK293-Zellen konnte 12 Stunden nach der Transfektion noch kein Unterschied zwischen den Isoformen festgestellt werden. Ab dem Zeitpunkt 24 Stunden nach der Transfektion zeigte Isoform A in HEK293- und HepG2-Zellen eine deutlich intensivere, grüne Fluoreszenz im Bereich der Plasmamembran der Zellen. HEK 293- und HepG2-Zellen,

welche mit der Isoform B transfiziert wurden zeigten keine Fluoreszenz im Bereich der Plasmamembran, sondern zu allen Zeitpunkten eine diffuse Fluoreszenz im Zytoplasma mit zum Teil starker intrazellulärer Aggregatbildung (**Abb. 14**). Das Verhältnis von membranständigem zu intrazellulärem MDR3 war bei Isoform A achtundvierzig Stunden nach der Transfektion am höchsten. Diese, auch häufig in der Literatur angegebene (42,43), Inkubationszeit wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

HEK293- und HepG2-Zellen unterschieden sich hinsichtlich der subzellulären Lokalisation der Isoform A und B in den Versuchen nicht. Da HEK293-Zellen eine Transfektionseffizienz von bis zu 60 % im Vergleich zu HepG2 mit 5-10 % zeigten, wurden in den folgenden Versuchen HEK293-Zellen verwendet.

A

B

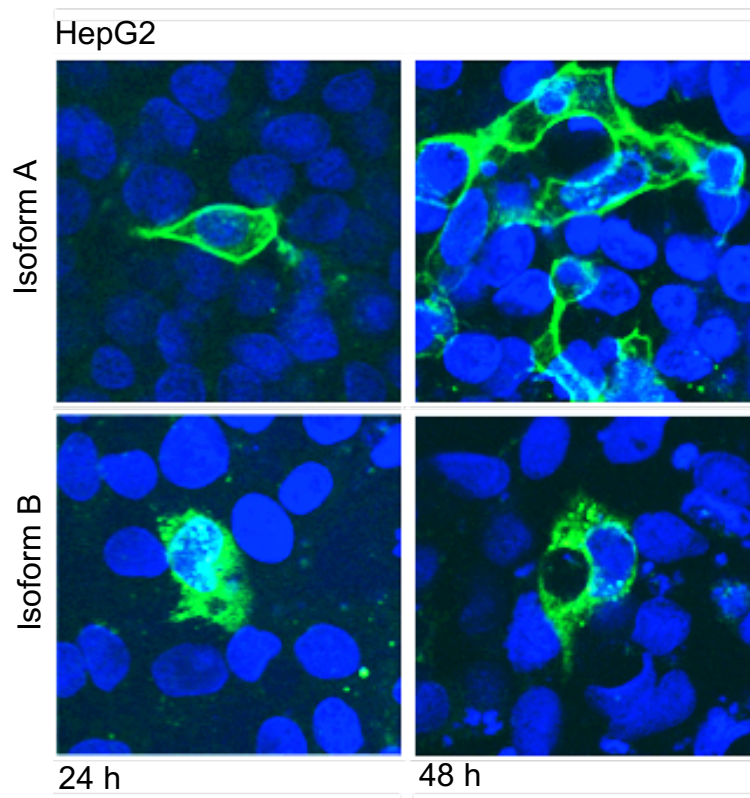


Abb. 14 Expression von MDR3-Isoform A und B in HEK293- und HepG2-Zellen, visualisiert über konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie (grün). Zellkerne Hoechst 33580 (blau). **A** HEK293-Zellen, fixiert 12, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion. **B** HepG2-Zellen, fixiert 24 und 48 Stunden nach der Transfektion. Isoform B unterschied sich ab dem Zeitpunkt 24 Stunden nach der Transfektion in HEK293- und HepG2-Zellen deutlich von der Isoform A: Isoform B war im Gegensatz zu Isoform A nicht an der Plasmamembran lokalisiert.

4.1.1 Statistische Kolokalisationsanalyse der MDR3-Isoformen

Um das Verhältnis der unterschiedlichen Membranlokalisation der MDR3-Isoformen statistisch vergleichen zu können, wurde eine vereinfachte Kolokalisationsanalyse mit Hilfe der Kolokalisationssoftware des *LSM 510 Meta* durchgeführt.

Die subzelluläre Lokalisation der Isoformen wurde über den Kolokalisationskoeffizienten M1 (siehe Kap. 3.2.3.5) verglichen, welcher dem Verhältnis von mit dem Membranmarker kolokalisierter MDR3-assoziiierter-Fluoreszenz zur gesamt MDR3-Fluoreszenz der Zelle entspricht. Das Experiment wurde mit YFP- (pEYFP-N1-OriLeu-MDR3) und mCherry verbundenem MDR3 (pmCherry-N1-OriLeu-MDR3) durchgeführt.

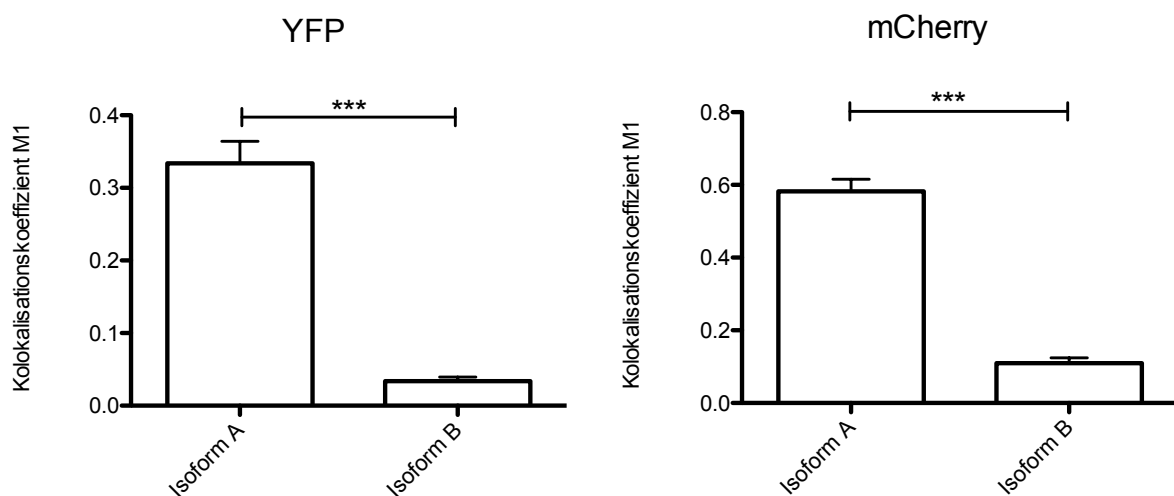


Abb. 15 Vergleich der Kolokalisation der MDR3 Isoformen A und B. Der Kolokalisationskoeffizient M1 der Isoform A unterscheidet sich unter Verwendung beider Fluoreszenz-tags hochsignifikant von dem Kolokalisationskoeffizienten der Isoform B. Isoform A (n=50), Isoform B (n=50). Mittelwert $\pm$ SEM.

Nach statistischer Auswertung zeigte die Isoform A sowohl mit YFP- (**Abb. 15**) als auch mit mCherry-Fluoreszenz-tag (**Abb. 15**) einen höheren Kolokalisationskoeffizienten als die Isoform B. In beiden Experimenten unterschieden sich die Isoformen hochsignifikant voneinander ($p < 0,0001$, *Mann-Whitney U Test*, zweiseitig getestet). In Experimenten mit dem Fluoreszenztag YFP war die Isoform A im Mittel 8,7-fach stärker an der Membran kolokalisiert als die Isoform B. Mit dem Fluoreszenztag mCherry war die Isoform A 5,3-fach stärker kolokalisiert. Das unterschiedliche Niveau des Kolokalisationskoeffizienten ist durch die zwei unterschiedlichen Fluoreszenztags und die dadurch bedingten Unterschiede in den Grundeinstellungen bedingt.

Durch die vereinfachte statistische Kolokalisationsauswertung konnte der subjektive visuelle Eindruck beim Vergleich der Präparate in Zahlen gefasst und der Lokalisationsunterschied der Isoformen A und B bestätigt werden.

4.1.2 Kolokalisationsexperiment mit Ubiquitin

Es ist beschrieben worden, dass fehlgefaltete Proteine in ubiquitinreiche Aggregate, sogenannte Aggresomen, in der Zelle eingeschlossen werden (137). In einem Experiment wurden die MDR3-Isoformen in HEK293-Zellen exprimiert und Ubiquitin mithilfe eines Antikörpers sichtbar gemacht. Ubiquitin markierte Aggregate fanden sich häufiger bei der Isoform B als bei der Isoform A (**Abb. 16**). Ubiquitin konnte nicht in allen sichtbaren Proteinaggregaten der Isoformen detektiert werden. Bereiche dicht akkumulierten Proteins bei der Isoform A wiesen ebenfalls eine Kolokalisation mit Ubiquitin auf. Ubiquitin konnte nur in transfizierten Zellen detektiert werden.

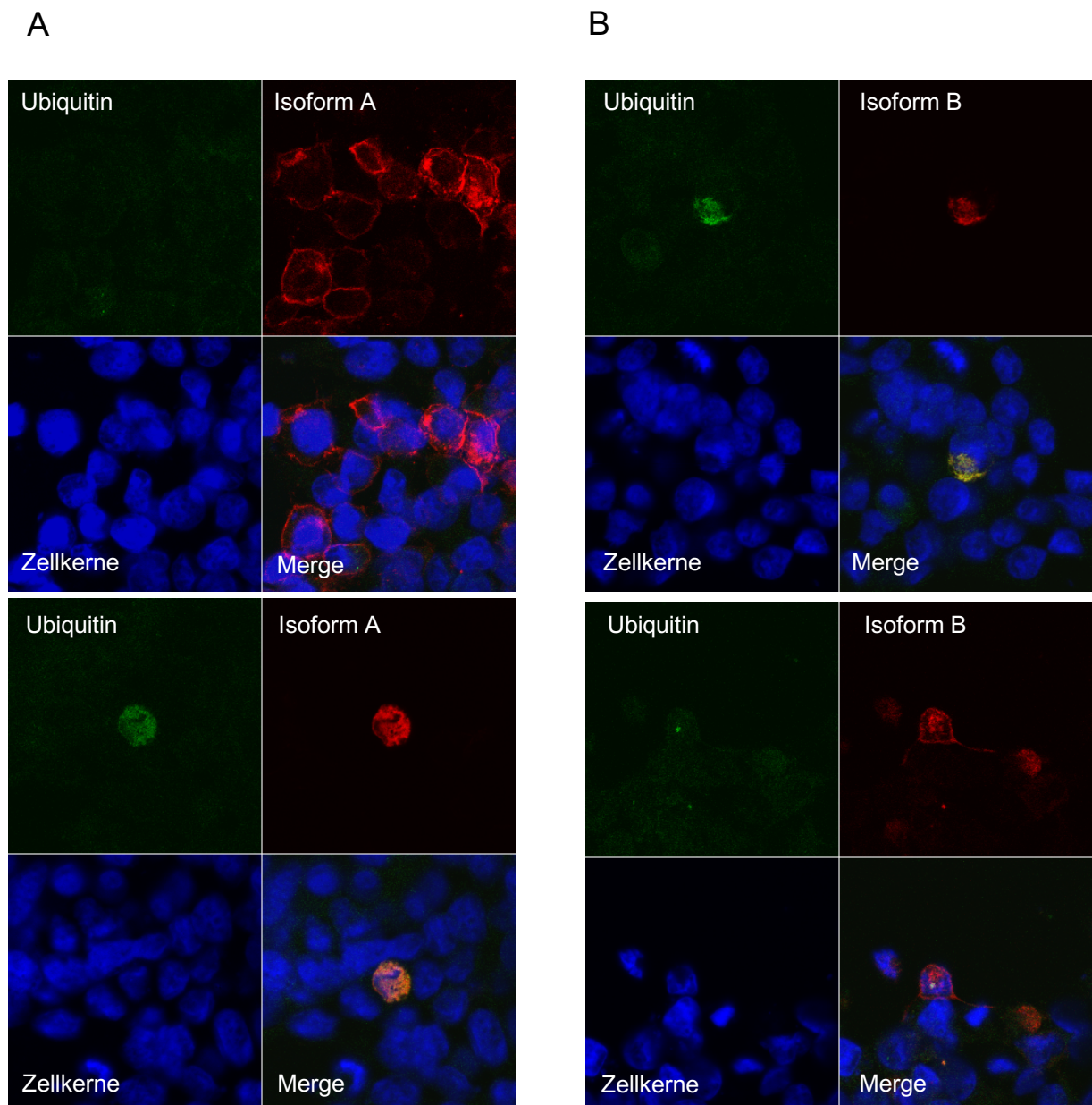


Abb. 16 Kolokalisation von Isoform A (A) und Isoform B (B) mit Ubiquitin. Isoform A und B transfiziert in HEK293-Zellen über pmCherry-N1-OriLeu-MDR3 (rot). Ubiquitin-Färbung über FITC (grün). Zellkerne über Hoechst 33580 (blau). Bereiche dicht aggregierten MDR3-Proteins der Isoform B zeigten eine Kolokalisation mit Ubiquitin.

4.2 Expression und subzelluläre Lokalisation der MDR3-Mutanten

Die MDR3-Mutanten mit dem Austausch der Aminosäuren S27G, S1076N, Q1174E und H1231Y sollten in der Zellkultur hinsichtlich ihrer Lokalisation an der Zellmembran untersucht werden. Die Mutationen wurden über gezielte Mutagenese (*Site-directed Mutagenesis*) in der cDNA der Vektoren pEYFP-N1-MDR3-Isoform A (S1076N, Q1174E und H1231Y) und pEYFP-N1-OriLeu-MDR3-Isoform A (S27G) erzeugt und in der Zellkultur exprimiert. Die MDR3 Variante I541F wurde bereits als *Trafficking*-Defekt Variante beschrieben (97) und wurde als Kontrolle ebenfalls in den Vektor pEYFP-N1-MDR3-Isoform A kloniert. Als Wildtyp Kontrolle wurde die Isoform A im Vektor pEYFP-N1 verwendet. HEK293-Zellen wurden transient transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion fixiert. Die Na⁺/K⁺-ATPase wurde als Membranmarker gefärbt.

Nach Durchmusterung der Präparate konnte kein eindeutiger qualitativer Unterschied der subzellulären Lokalisation der MDR3-Mutanten S27G, S1076N, Q1174E und H1231Y im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Die Mutanten zeigten sich vergleichbar mit dem Wildtyp an der Plasmamembran lokalisiert und wiesen einen vergleichbaren intrazellulären Proteinanteil auf. Die Mutante I541F zeigte sich, wie in der Literatur beschrieben (97) im Zytoplasma lokalisiert mit stärkeren intrazellulären Aggregaten als der Wildtyp (**Abb. 17**).

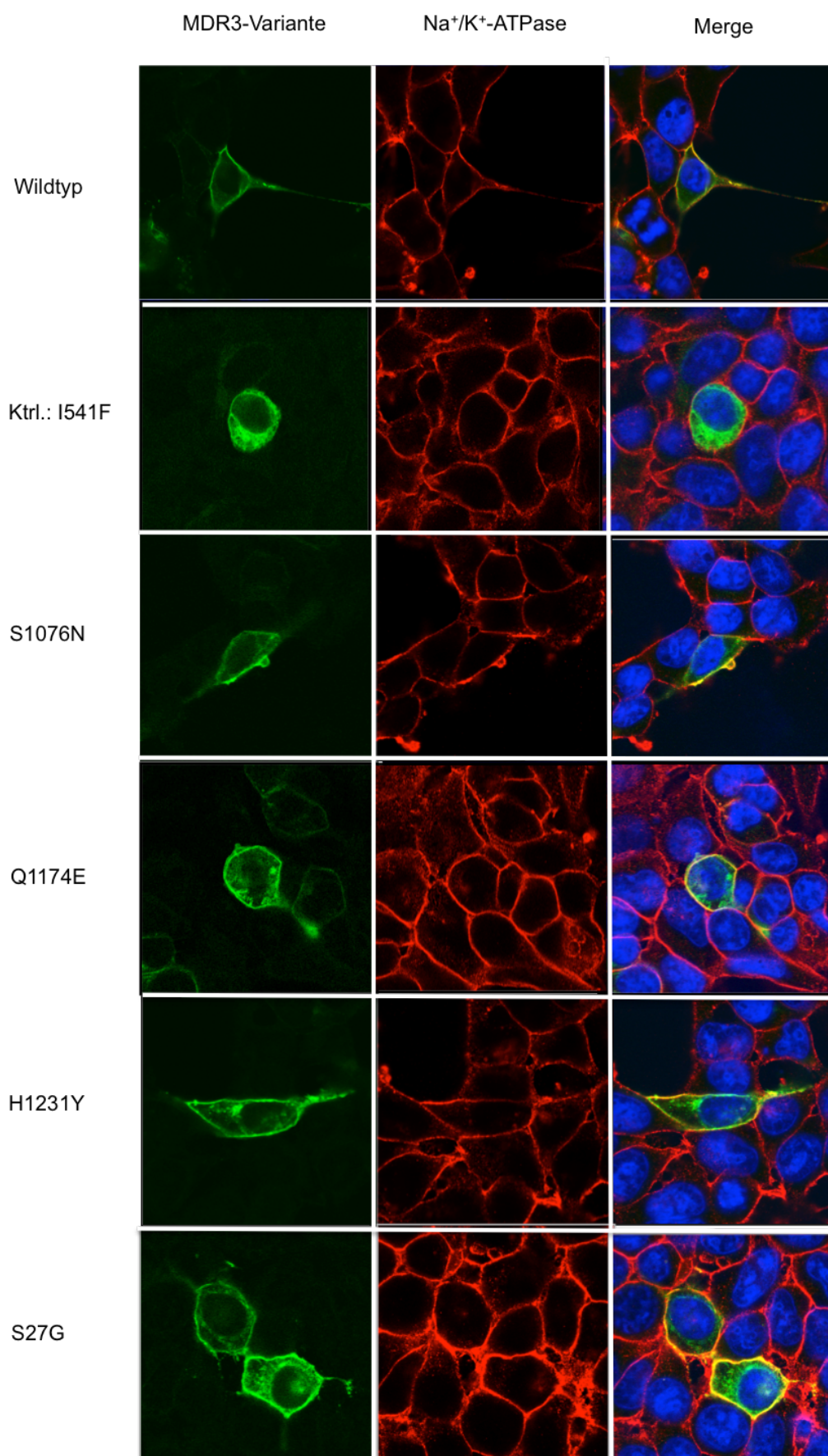


Abb. 17 Expression und subzelluläre Lokalisation der generierten MDR3-Mutanten in HEK293-Zellen. Aufnahmen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Die *Trafficking*-Defekt Kontroll-Mutante

I541F zeigte sich intrazellulär lokalisiert (97), die Mutanten S1076N, Q1174E und H1231Y zeigten sich wie der Wildtyp an der Membran lokalisiert, mit vergleichbarem Anteil an intrazellulärem Proteinaggregat. Die Mutante S27G im Vektor pEYFP-N1-OriLeu (3286 bp größerer Vektor) zeigte keinen sichtbaren Unterschied zu den anderen untersuchten Mutanten und dem Wildtyp.

4.3 Statistische Kolokalisationsanalyse der MDR3-Mutanten

Der Grad der heterologen Proteinexpression schwankte sowohl bei den MDR3-Mutanten als auch bei den MDR3-Isoformen zwischen den Zellen eines Präparates abhängig vom Transfektionsgrad und Zellzyklus. So zeigten sowohl mit MDR3-Wildtyp als auch mit MDR3-Mutanten transfizierte Zellen eine hohe Variabilität des intrazellulären Proteingehalts und erschwerten einen objektiven Vergleich der Membranlokalisation. Um ähnlich stark exprimierende Zellen der Präparate möglichst untersucherunabhängig auszuwählen und zu vergleichen, wurde ein Protokoll zur strukturierten Auswertung der Präparate weiterentwickelt (**Abb. 18**). Als Maß für die Membranlokalisation einer MDR3-Mutante wurden die intensitätsgewichteten Kolokalisationskoeffizienten M1 und M2 bestimmt (**Abb. 19**).

4.3.1 Arbeitsablauf der standardisierten Kolokalisationsanalyse

Die Auswertung wurde mit standardisierten aufgenommenen, konfokalen Bildausschnitten der Präparate durchgeführt (**Abb. 18**). Die Pixelverteilung im grünen (MDR3-assoziierten) und roten (Na^+/K^+ -ATPase-assoziierten) Kanal wurde mit der Software *AxioVision* (Carl Zeiss) gemessen und ausgewertet. Für die standardisierte Aufnahme von Bildausschnitten, wurde zunächst das Mikroskop (*LSM 510 Meta*), entsprechend den Herstellerangaben optimal eingestellt. Um eine unbewusste Bevorzugung bestimmter Bildausschnitte bei der Bildaufnahme zu vermeiden, wurden die Präparate verblindet. Die Aufnahme erfolgte entsprechend eines vorher festgelegten Protokolls (**Abb. 18 A**). Für jeden Kanal wurde zunächst ein Schwellenwert der minimalen Pixelintensität festgelegt um eine zufällige Kolokalisation von Hintergrundfluoreszenz in beiden Kanälen zu vermeiden (**Abb. 18 B**). Die anhand von Wildtypaufnahmen festgelegten Schwellenwerte wurden für alle Auswertungen beibehalten. Mithilfe von *AxioVision* wurden Zellen der Bildausschnitte über *Regions of Interest* (ROI) markiert.

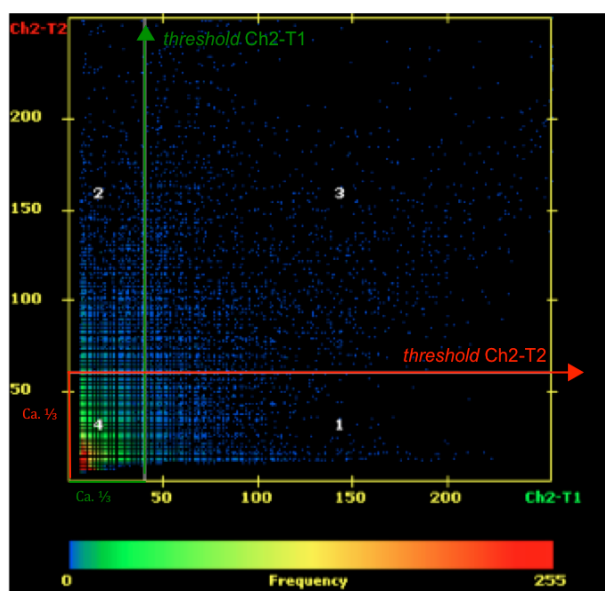
Um eine zufällige Variabilität bei der Zellauswahl zu vermeiden, erfolgte die Markierung von transfizierten Zellen ebenfalls standardisiert nach einem vorher festgelegten Protokoll (**Abb. 18 C**). Eine zu intensive MDR3-Expression der stark transfizierten Zellen könnte - vor allem im Fall einer zufällig schwachen Membranfärbung der Zelle - zu Membranüberstrahlungen durch intrazellulär gelegene Proteinaggregate führen. Durch Überstrahlungen könnte sich die ohnehin schon große Streubreite des Kolokalisationskoeffizienten erhöhen. Durch Selektion nach dem Kriterium der mittleren MDR3-assoziierten Intensität sollten diese stark überexprimierenden Zellen aus der Auswertung genommen werden. Die festgelegten Selektionsintervalle wurden für alle Experimente beibehalten. Zellen mit sehr hohen oder sehr niedrigen Werten in den messbaren Parametern: Zellfläche, Intensität der MDR3-Expression und Intensität der Membranfärbung, wurden nachträglich nach

Quantilen der Mittelwerte dieser Parameter aus der Auswertung genommen. Zellen einer Zellfläche unterhalb des 10%- und oberhalb des 90%-Quantils wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Zellen mit einer Intensität unterhalb des 20%- und oberhalb des 80%-Quantils der Na^+/K^+ -ATPase-assoziierten Intensität wurden aus der Auswertung ausgeschlossen; Zellen mit einer MDR3-assoziierten Intensität unterhalb des 25%-Quantils und oberhalb des 75%-Quantils wurden aus der Auswertung ausgeschlossen (**Abb. 18 D**).

A

Standardisierte Bildaufnahme
1. Beginnend am längsten horizontalen Durchmesser des Objektglases wurden benachbarte Bildausschnitte meanderförmig aufgenommen.
2. Enthielt ein Bildausschnitt weniger als zwei transfizierte Zellen oder mehr als 50% offensichtlich zerstörte Zellen, wurde er übersprungen.
3. Die Fokusebene wurde für den Kanal, der die Färbung der Na^+/K^+ -ATPase abbildete optimal eingestellt, sodass die Mehrheit der Zellen im mittleren Durchmesser getroffen wurde.

B



C

Standardisierte Markierung von ROIs
1. Zur Markierung der ROIs wurden Bilder in dreifacher Vergrößerung benutzt.
2. Die erste ROI wurde um die erste Zelle in der linken oberen Bildecke gelegt, welche die unten aufgeführten Kriterien erfüllte.
3. Weitere ROIs wurden um alle den Kriterien entsprechenden Zellen derselben horizontalen Reihe gelegt. Nach Erreichen des rechten Bildrandes wurde die nächste Zeile, entsprechend den unten aufgeführten Kriterien mit ROIs versehen.
4. Es wurden nur transfizierte Zellen mit ROIs versehen. Eine Zelle wurde als transfiziert angesehen, wenn im Programm AxioVision mindestens ein grünes Pixel über dem Schwellenwert erkannt wurde.
5. War die Membran im roten Kanal nicht vollständig sichtbar wurde unter Zuhilfenahme des grünen Kanals den geschätzten Zellgrenzen gefolgt. Eine Zelle wurde nur gewählt, wenn mindestens 50% der Membran im roten Kanal sichtbar war.
6. Zellen, welche im Bildausschnitt nur angeschnitten waren wurden nicht markiert.
7. Teilten sich zwei Zellen eine Membran aufgrund von Zell-Kontakten oder geringen Zellüberlappungen, wurde nur eine Zelle markiert. Hierbei wurde die weiter oben und weiter links gelegene Zelle bevorzugt. War eine Zelle zu mehr als 50% überlappt, wurde sie nicht ausgewählt. Auf diese Weise wurde vermieden, dass sich zwei ROIs tangieren.

D

Selektionskriterium	Ausgewählte Zellpopulation nach Quantilen der Mittelwerte
Na^+/K^+ -ATPase-assoziierte Intensität	> 20% Quantil bis < 80% Quantil
Zellfläche	> 10% Quantil bis < 90% Quantil
MDR3-assoziierte Intensität	> 25% Quantil bis < 75% Quantil

Abb.18 A Protokoll der standardisierten Bildaufnahme. **B** Einstellung des Schwellenwertes Streudiagramm einer standardisiert aufgenommenen Aufnahme. Das Streudiagramm zeigt alle registrierten Pixel mit Häufigkeit und Intensität im grünen (Ch2-T1) und roten (Ch2-T2) Kanal. Die Schwellenwerte (Pfeile) wurden eingestellt, um niedrig fluoreszierende Hintergrund-Pixel in beiden Kanälen aus der Auswertung zu nehmen und zu verhindern, dass eine stochastisch scheinbare Kolokalisation gemessen wird. Die Schwellenwerte wurden an Aufnahmen des Wildtyps eingestellt. **C** Protokoll der standardisierten ROI-Markierung. **D** Selektionskriterien zum nachträglichen Ausschluss von Zellen nach bestimmten Quantilen der Mittelwerte.

$$M1 = \frac{\sum G_{i,coloc}}{\sum G_i} \quad M2 = \frac{\sum R_{i,coloc}}{\sum R_i}$$

Abb.19 Kolokalisationskoeffizienten M1 und M2 nach Manders (130) $R_{i,coloc}$: Pixelintensität im roten Kanal, wenn grüne Fluoreszenz vorhanden ist; $G_{i,coloc}$: Pixelintensität im grünen Kanal, wenn rote Fluoreszenz vorhanden ist.

Für jedes Experiment wurden als Maß für die subzelluläre Lokalisation die mittleren Kolokalisationskoeffizient M1 und M2 jeder MDR3-Variante berechnet (**Abb. 19**). Die Experimente wurden dreifach wiederholt. Die Mutante S27G wurde in der standardisierten Kolokalisationsauswertung nicht berücksichtigt, da sie in einem anderen Vektor kloniert vorlag und eine Beeinflussung des *Traffickings* durch den 3286 bp größeren Vektor nicht ausgeschlossen werden kann.

4.3.2 Statistische Auswertung

Die Mittelwerte der Parameter der MDR3-Varianten wurden innerhalb eines Experiments mit dem Wildtyp verglichen. Für statistische Vergleiche wurde der *Kruskal-Wallis* Test gerechnet und Unterschiede zwischen den Gruppen über *Dunn's multiple Comparison* Test bestimmt. Hierbei gilt: * = signifikant ($0,01 < p \leq 0,05$), ** = stark signifikant ($0,001 < p \leq 0,01$), *** = hochsignifikant ($p \leq 0,001$). Aufgrund der zum Teil niedrigen Stichprobengrößen und unterschiedlich großen Stichproben wurden nonparametrische Tests verwendet

4.3.2.1 Kolokalisationskoeffizient M1

Der Kolokalisationskoeffizient M1 der Kontrollmutante I541F unterschied sich in allen drei Wiederholungen des Experiments hochsignifikant vom Wildtyp. Die Mutante S1076N unterschied sich in Experimentalset 2 und 3 signifikant vom Wildtyp. Keine zu untersuchende Mutante zeigte einen mit I541F vergleichbaren Lokalisationsunterschied zum MDR3-Wildtyp (**Abb. 20-22**).

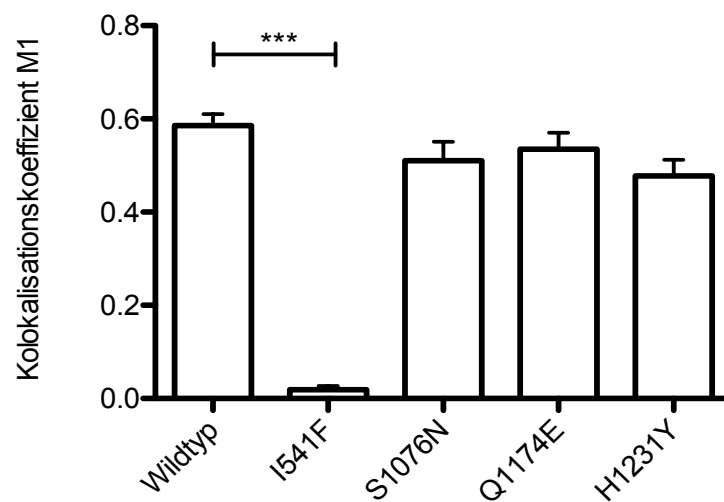


Abb. 20 Kolokalisationskoeffizient M1 in Experimentalset 1. Der Kolokalisationskoeffizient M1 der Mutanten S1076N, Q1174E und H1231Y unterscheidet sich nicht signifikant vom Wildtyp. Der Wildtyp unterscheidet sich hochsignifikant von der Kontrollmutante I541F. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp n = 66; I541F n = 9; S1076N n = 19; Q1174E n = 26; H1231Y n = 39.

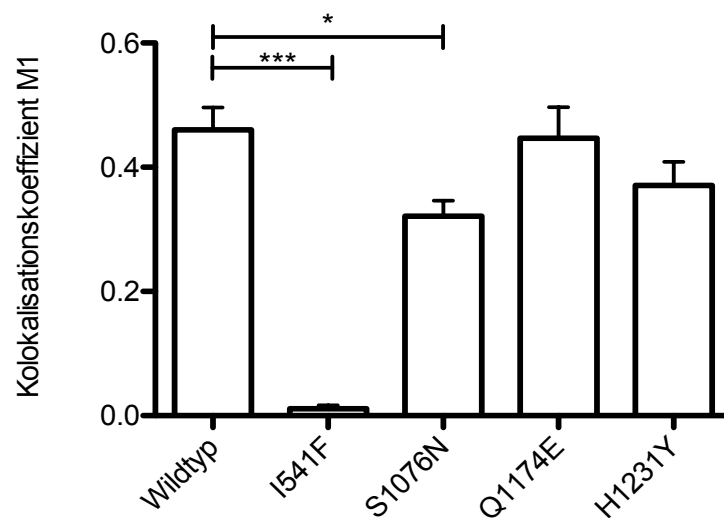


Abb. 21 Kolokalisationskoeffizient M1 in Experimentalset 2 Im Unterschied zu Experimentalset 1 zeigt die Mutante S1076N einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp n = 21; I541F n = 6; S1076N n = 32; Q1174E n = 19; H1231Y n = 25.

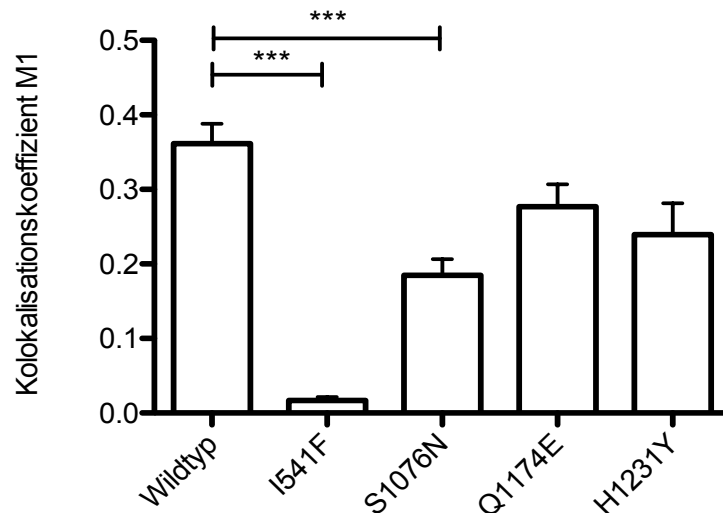


Abb. 22 Kolokalisationskoeffizient M1 in Experimentalsset 3 Im Unterschied zu Experimentalsset 2 wurde der Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante S1076N noch stärker signifikant. Alle anderen Vergleiche reproduzierten das Ergebnis von Experimentalsset 1 und 2. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp n = 50; I541F n = 29; S1076N n = 49; Q1174E n = 53; H1231Y n = 19.

4.3.2.2 Kolokalisationskoeffizient M2

Der Kolokalisationskoeffizient M2 der Kontrollmutante I541F unterschied sich vergleichbar mit dem Kolokalisationskoeffizienten M1 in allen drei Wiederholungen des Experiments stark bis hochsignifikant vom Wildtyp. In der dritten Experimentwiederholung zeigte die Mutante S1076N einen signifikant höheren Kolokalisationskoeffizienten im Vergleich zum Wildtyp.

Auch in Bezug auf den Kolokalisationskoeffizienten M2 zeigte keine der untersuchten Mutationen eine vergleichbar niedrige Membrankolokalisation wie I541F (**Abb. 23-25**).

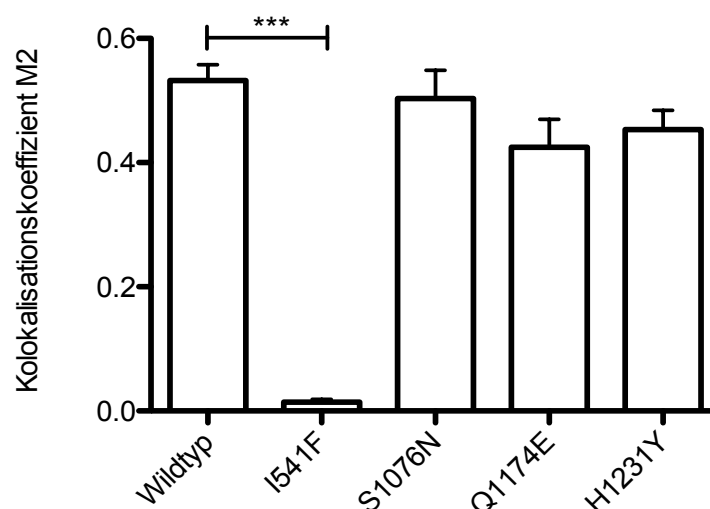


Abb. 23 Kolokalisationskoeffizient M2 in Experimentalsset 1. Der Kolokalisationskoeffizient M2 der Mutanten S1076N, Q1174E und H1231Y unterscheidet sich nicht signifikant vom Wildtyp. Der Wildtyp

unterscheidet sich wie der Kolokalisationskoeffizient M1 hochsignifikant von der Kontrollmutante I541F. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp $n = 66$; I541F $n = 9$; S1076N $n = 19$; Q1174E $n = 26$; H1231Y $n = 39$.

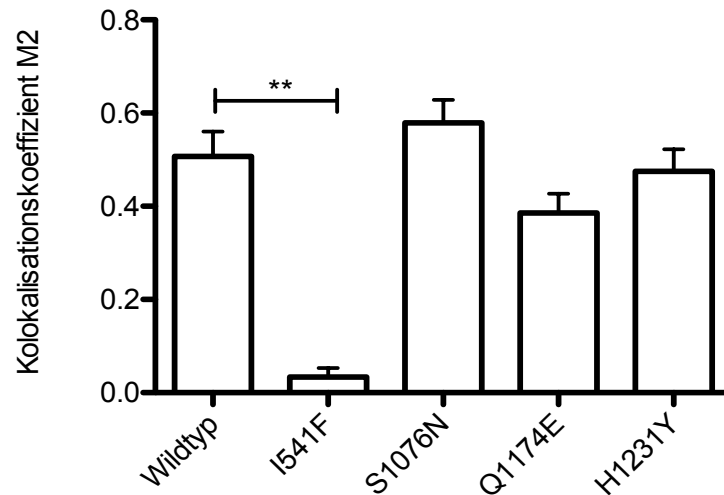


Abb. 24 Kolokalisationskoeffizient M2 in Experimentalsatz 2 In der ersten Experimentwiederholung zeigt sich die Mutante I541F weiterhin signifikant verschieden vom Wildtyp. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp $n = 21$; I541F $n = 6$; S1076N $n = 32$; Q1174E $n = 19$; H1231Y $n = 25$.

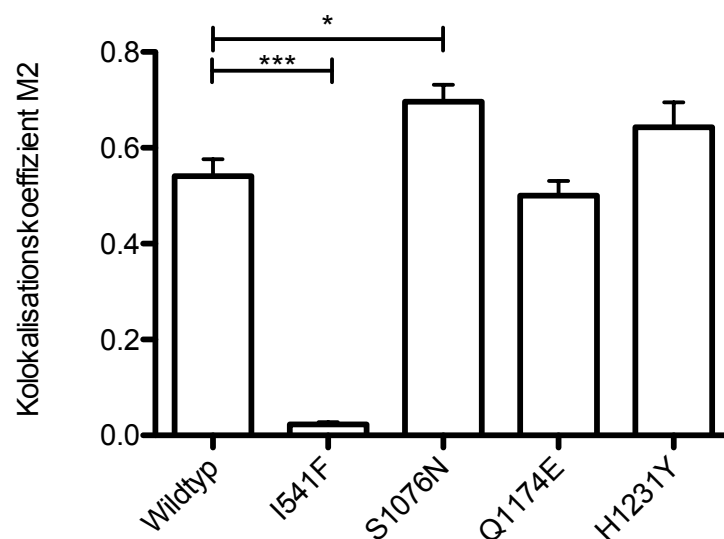


Abb. 25 Kolokalisationskoeffizient M2 in Experimentalsatz 3 Im Unterschied zur ersten und zweiten Experimentwiederholung zeigt sich M2 von I541F und auch M2 von S1076N signifikant verschieden vom Wildtyp. Alle anderen Vergleiche reproduzierten das Ergebnis von Experimentalsatz 1 und 2. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp $n = 50$; I541F $n = 29$; S1076N $n = 49$; Q1174E $n = 53$; H1231Y $n = 19$.

4.3.2.3 Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierte Intensität

Wichtig für die Interpretation des Kolokalisationskoeffizienten zwischen den MDR3-Varianten, ist eine gleichmäßige Intensität der Membranfärbung.

Nur in Experimentwiederholung 2 und 3 bei der Mutante S1076N und Q1174E zeigten sich signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede zum Wildtyp. (**Abb. 26-28**).

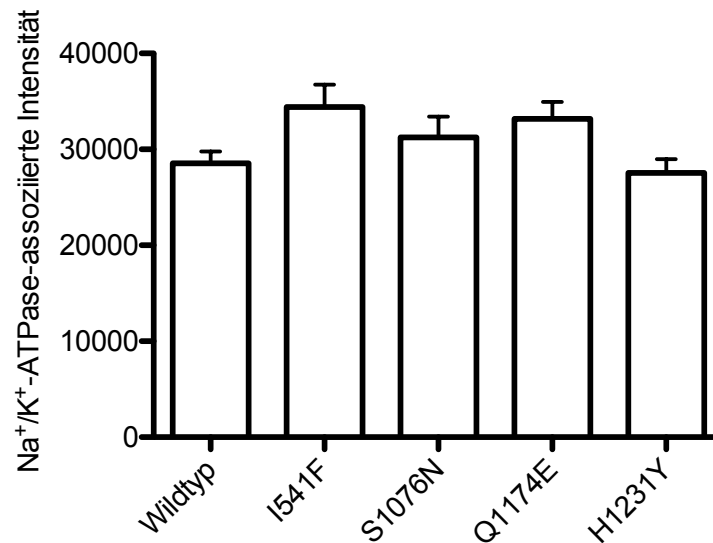


Abb. 26 Na⁺/K⁺-ATPase-assozierte Intensität in Experimentalsatz 1. Die mittlere Na⁺/K⁺-ATPase-assozierte Intensität unterschied sich nicht signifikant zwischen den Mutanten. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp n = 66; I541F n = 9; S1076N n = 19; Q1174E n = 26; H1231Y n = 39.

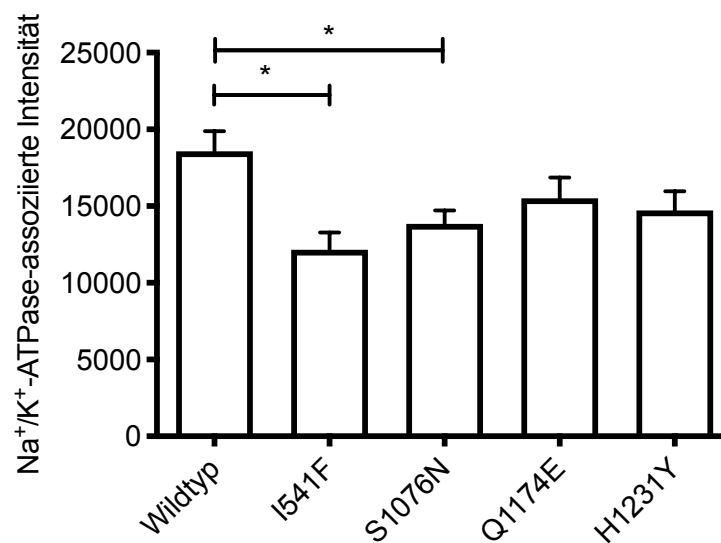


Abb. 27 Na⁺/K⁺-ATPase-assozierte Intensität in Experimentalsatz 2. Die Mutanten I541F und S1076N unterschieden sich signifikant vom Wildtyp. Alle anderen Mutanten wiesen untereinander nicht signifikante Unterschiede der Na⁺/K⁺-ATPase-assozierten Intensität und somit der Membranfärbung auf. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp n = 21; I541F n = 6; S1076N n = 32; Q1174E n = 19; H1231Y n = 25.

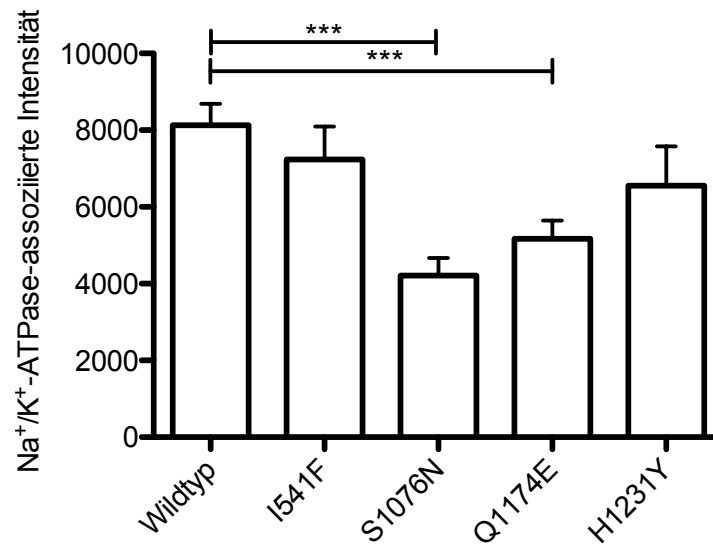


Abb. 28 Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierte Intensität in Experimentalsset 3. Die Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierte Intensität der Mutanten S1076N und Q1174E unterschied sich in Experimentalsset 3 hochsignifikant vom Wildtyp. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp n = 50; I541F n = 29; S1076N n = 49; Q1174E n = 53; H1231Y n = 19.

3.3.2.4 Zellfläche

Durch die nachträgliche Selektion von Zellen anhand ihrer Fläche, sollten möglichst gleich große Zellen ausgewertet werden. Nach der Auswertung ergab sich für die Zellgröße zwischen Q1174E und Wildtyp in Experimentwiederholung 1 und 3 sowie zwischen I541F und Wildtyp in Experimentwiederholung 3 ein signifikanter Unterschied. (**Abb. 29-31**)

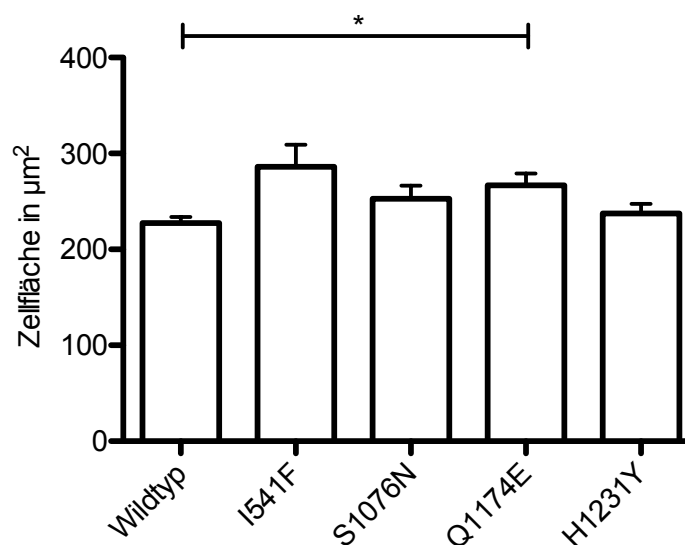


Abb. 29 Mittlere Zellfläche in Experimentalsset 1. Q1174E unterschied sich in Experimentalsset 1 hinsichtlich in der Zellfläche signifikant vom Wildtyp. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp n = 66; I541F n = 9; S1076N n = 19; Q1174E n = 26; H1231Y n = 39.

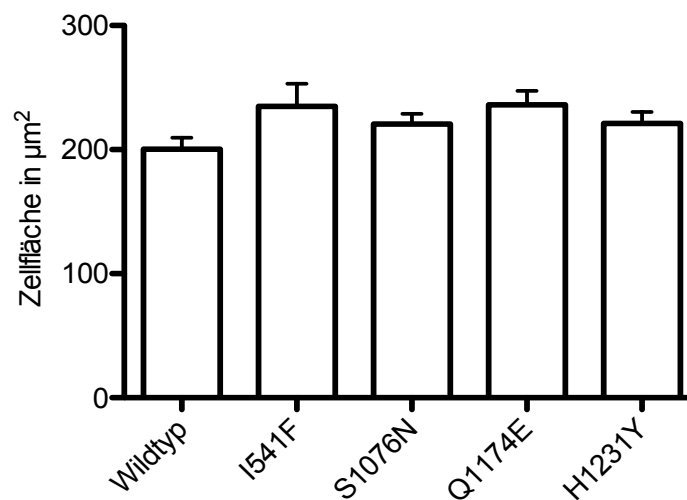


Abb. 30 Mittlere Zellfläche in Experimentalset 2. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellfläche. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp $n = 21$; I541F $n = 6$; S1076N $n = 32$; Q1174E $n = 19$; H1231Y $n = 25$.

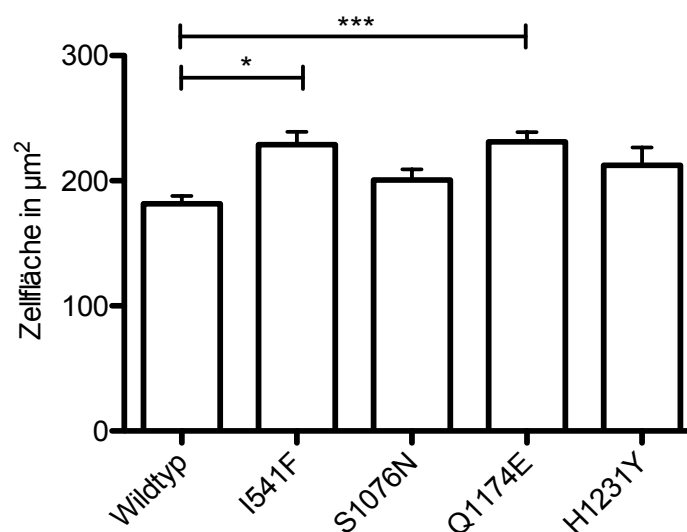


Abb. 31 Mittlere Zellfläche in Experimentalset 3. I541F unterschied sich signifikant vom Wildtyp und hochsignifikant von Q1174E. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp $n = 50$; I541F $n = 29$; S1076N $n = 49$; Q1174E $n = 53$; H1231Y $n = 19$.

4.3.2.5 MDR3-assoziierte Intensität

Bei den transienten Transfektionen schwankte die Expressionsstärke von MDR3 zwischen den transfizierten Zellen einer Mutante. Nach der Selektion der Zellen hinsichtlich ihrer MDR3-assoziierten Intensität sollten Zellen mit ähnlicher Expression ausgewertet werden. Die MDR3-assoziierte Intensität unterschied sich nach Festlegung der Toleranzspannen in Experimentwiederholung 1 und 2 nicht signifikant.

In Experimentalset 3 zeigte sich für die Mutante S1076N ein deutlich signifikanter Unterschied zum Wildtyp (**Abb. 32-34**).

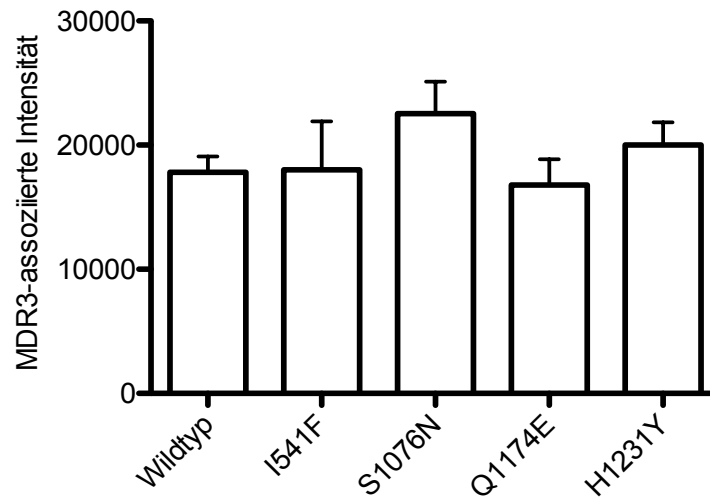


Abb. 32 Mittlere MDR3-assoziierte Intensität Experimentalset 1. Die Mittlere MDR3-assoziierte Intensität zwischen Wildtyp und Mutanten unterschied sich nicht signifikant. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp n = 66; I541F n = 9; S1076N n = 19; Q1174E n = 26; H1231Y n = 39.

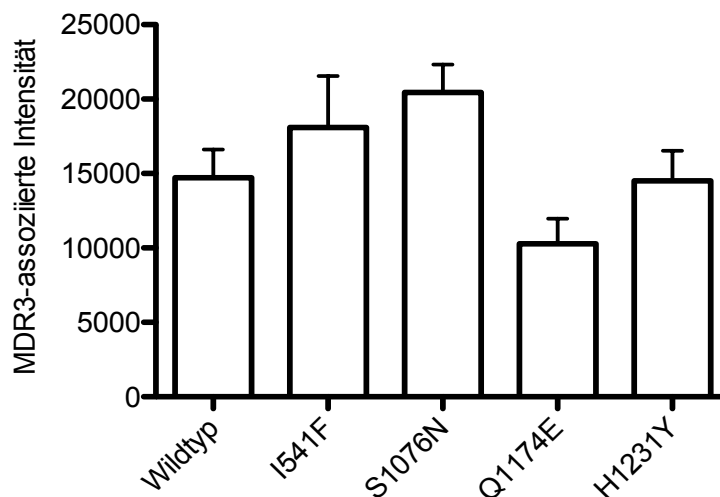


Abb. 33 Mittlere MDR3-assoziierte Intensität Experimentalset 2 Die Mittlere MDR3-assoziierte Intensität zwischen Wildtyp und Mutanten unterschied sich nicht signifikant. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp n = 21; I541F n = 6; S1076N n = 32; Q1174E n = 19; H1231Y n = 25.

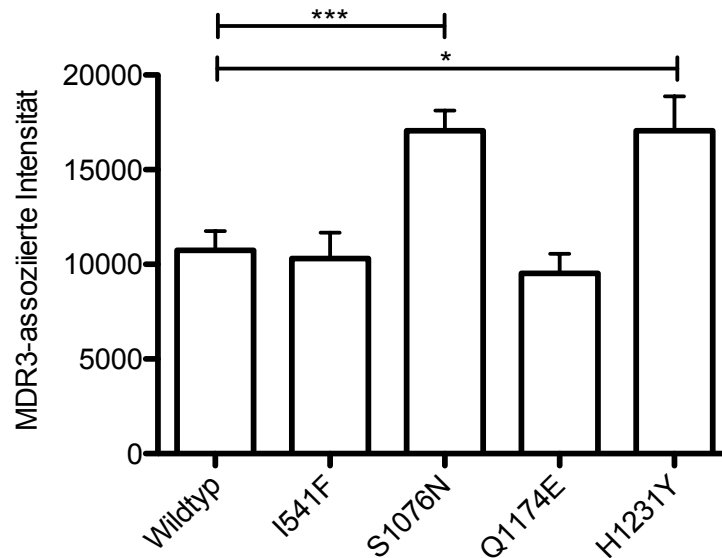


Abb. 34 Mittlere MDR3-assoziierte Intensität Experimentalsset 3 Die MDR3-assoziierte Intensität unterschied sich zwischen Wildtyp und S1076N hochsignifikant und signifikant zwischen Wildtyp und H1231Y. Mittelwerte $\pm$ SEM. Wildtyp n = 50; I541F n = 29; S1076N n = 49; Q1174E n = 53; H1231Y n = 19.

4.3.2.6 Ergebnisse der standardisierten Kolokalisationsanalyse der Mutationen

Auch nach der Selektion von Zellen nach den Parametern MDR3-assoziierte Intensität (Proteinexpression), Na^+/K^+ -ATPase-assoziierte Intensität (Membranfärbung) und Zellfläche zeigten die Mittelwerte dieser Parameter und somit auch die Kolokalisationskoeffizienten M1 und M2 eine starke Varianz. Durch Selektionskriterien sollten homogene Zellpopulationen geschaffen werden. Da sich die Zellzahl pro Bedingung durch die Selektionskriterien in einigen Fällen auf wenige Zellen reduzierte, konnte keine weitere Selektion der Zellen nach den drei Parametern erfolgen, um die Varianzen zu verringern. Trotz der Varianzen in den Parametern Zellfläche, Membranmarker und Transfektionsgrad zeigte sich das System der standardisierten Kolokalisationsauswertung geeignet, den vorher bekannten *Trafficking*-Defekt der Mutante I541F in allen drei Wiederholungen als hochsignifikant zu erkennen. Die Mutante S1076N zeigte in der zweiten und dritten Experimentwiederholung einen geringeren Kolokalisationskoeffizienten M1 als der Wildtyp und in Experimentwiederholung 3 einen höheren Kolokalisationskoeffizienten M2 als der Wildtyp. Insbesondere in Experimentalsset 3 zeigte sich für die Mutante S1076N eine signifikant geringere Intensität des Membranmarkers und eine signifikante höhere Proteinexpression im Vergleich zum Wildtyp.

Durch die standardisierte Kolokalisationsauswertung konnte bestätigt werden, dass keine der untersuchten Mutationen einen *Trafficking*-Defekt vergleichbar mit der Mutante I541F aufweist.

4.4 Proteinexpression der MDR3-Isoformen und Mutationen

In Western Blots von Zelllysaten der transfizierten Zellen sollte der Grad der Proteinexpression der Isoformen und Mutationen gezeigt werden. Es wurden gleiche Mengen Protein aus den Zelllysaten über ein SDS-Gel getrennt. Für Western Blots der Isoformen wurde MDR3 in pmCherry-N1-OriLeu und pEYFP-N1-OriLeu exprimiert und die Blots mit den Antikörpern C219 (intrazelluläres Epitop von MDR3) und Anti-GFP (YFP-tag) inkubiert.

4.4.1 Western Blot der MDR3-Isoformen

In dem Vektor pEYFP-N1-OriLeu-MDR3 schien die Isoform A stärker exprimiert zu werden als die Isoform B, da sich die Bande der Isoform A deutlich intensiver darstellte. Das Molekulargewicht der Isoform B schien geringfügig kleiner zu sein. Um zu zeigen, dass der YFP-tag in den Zellen nicht in großem Ausmaß von MDR getrennt vorlag, wurde im selben Western Blot ein Anti-GFP-Antikörper verwendet. Die Anti-GFP-Färbung ergab eine ähnliche Intensität der entsprechenden Bande mit vergleichbarem Molekulargewicht im Vergleich zu der Färbung mit Anti-C219 (**Abb. 35**).

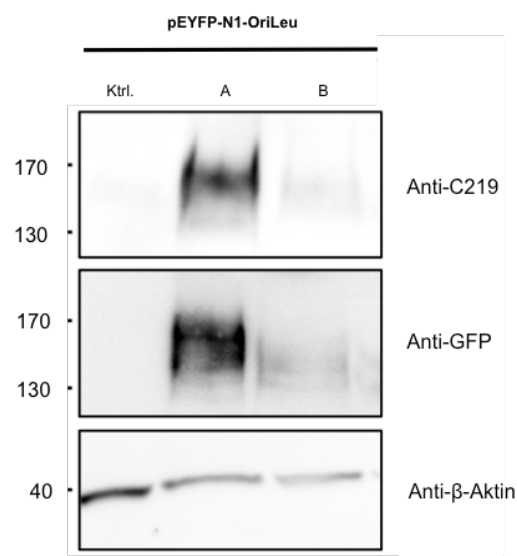


Abb. 35 Western Blot der MDR3 Isoformen in pEYFP-N1-OriLeu. Das Molekulargewicht der Isoform B zeigte sich im Vergleich zur Isoform A geringer. Es zeigte sich kein deutlicher Unterschied der Molekulargewichte bei Verwendung unterschiedlicher Antikörper (C219 (intrazelluläres Epitop von MDR3) und Anti-GFP (YFP-tag)). Die Isoform B scheint zu voller Länge exprimiert und der YFP-tag nicht vom Protein getrennt zu sein.

4.4.2 Western Blot der MDR3-Mutationen und Isoformen

Die MDR3-Mutationen wurden im Vektor pEYFP-N1 exprimiert. Die MDR3-Mutanten unterschieden sich hinsichtlich der Intensität der Bande vom Wildtyp. I541F zeigte die geringste Intensität der Bande. S1076N, Q1174E und H1231Y zeigten eine etwas stärkere Bande, wobei S1076N die stärkste Bande der MDR3-Varianten zeigte. Zusammen mit den MDR3-Mutationen wurden die MDR3-Isoformen in einem Experiment im Vektor pmCherry-N1-OriLeu-MDR3 exprimiert und im Western Blot

aufgetrennt. Die Isoform B zeigte auch in diesem Blot eine leicht schwächere Bande als die Isoform A. Die leicht nach unten auslaufenden Banden der Isoformen suggerieren eine leichte Fragmentation der Isoformen auf diesem Blot (**Abb. 36**).

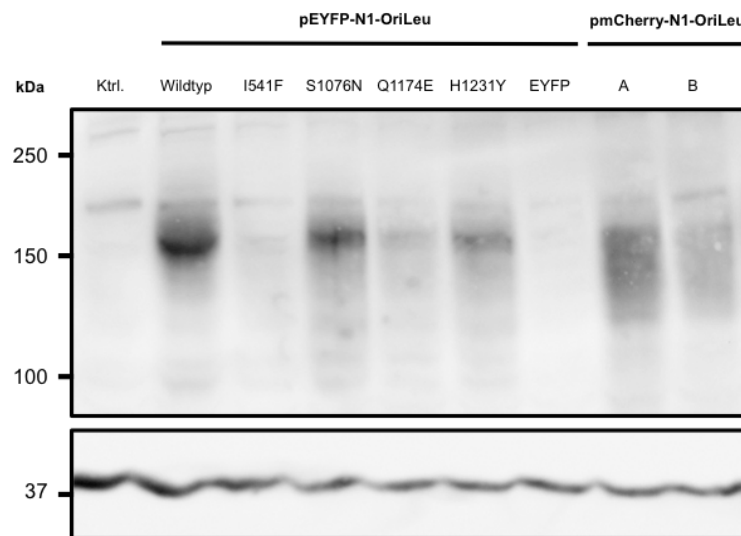


Abb. 36 Western Blot der MDR3-Mutationen und MDR3-Isoformen. Die MDR3-Mutanten schienen geringer exprimiert als der Wildtyp. Die Mutante I541F schien am geringsten exprimiert, die Mutante S1076N am stärksten.

4.4.3 Korrelation von Western Blot und Kolokalisationsanalyse

In der Kolokalisationsanalyse sollte die mittlere MDR3-assoziierte Intensität der Mutanten in etwa der MDR3-Expression in den Zellen entsprechen. Obwohl die Kolokalisationsanalyse nur ausgewählte Zellen einschließt und der Western Blot MDR3-Protein pro Gesamtprotein im Zelllysat darstellt, sollten die Parameter der MDR3-Expression aus Kolokalisationsanalyse und dem Western Blot miteinander korrelieren. Nach Entfernung der Toleranzspannen der Post-hoc Selektion (MDR3-assoziierte Intensität, Zellfläche und Na^+/K^+ -ATPase-assoziierte Intensität) zeigte sich, dass der Wert der mittleren MDR3-assoziierten Intensität der Kolokalisationsanalyse in etwa mit der Intensität der Banden im Western Blot korrelierte. Sowohl im Western Blot als auch in der Kolokalisationsanalyse zeigen sich ähnliche Differenzen in der Expression der MDR3-Mutanten. Von den MDR3-Mutanten zeigte S1076N die stärkste mittlere MDR3-assoziierte Intensität in der Kolokalisationsanalyse und die stärkste Bande im Western Blot, gefolgt von H1231Y, Q1174E und I541F. Die Expression des Wildtyps korrelierte als einzige Variante in der Kolokalisationsanalyse nicht mit der Intensität der Bande im Western Blot (**Abb. 37**).

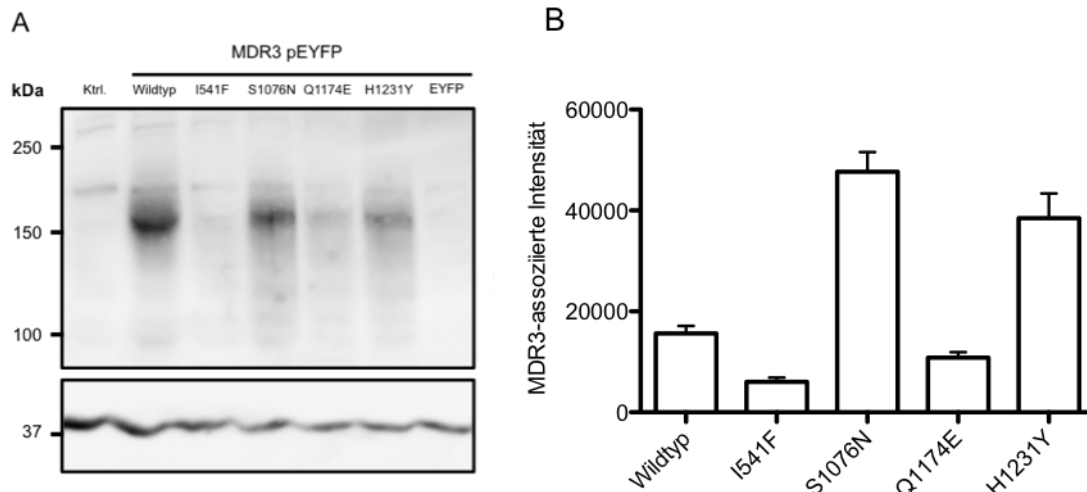


Abb. 37 A Western Blot der MDR3-Isoformen. B Darstellung der MDR-assoziierten Intensität aus der Kolokalisationsanalyse (ohne Post-hoc-Selektion der Zellen, Experimentalsset 3). Mit Ausnahme des Wildtyp-Präparates entsprach die Intensität der Banden im Western Blot der MDR3-assoziierten Intensität der Kolokalisationsanalyse. Die Korrelation zeigte sich am deutlichsten in Experimentalsset 3. Mittelwert $\pm$ SEM. Wildtyp n = 206; I541F n = 88; S1076N n = 221; Q1174E n = 197; H1231Y n = 79.

4.5 Zusammenhang der Parameter der Kolokalisationsanalyse

4.5.1 Kolokalisationskoeffizient M1 und MDR3-assoziierte Intensität

Da die Mutante S1076N sowohl bei der Kolokalisationsanalyse als auch im Western Blot im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert schien, wurde die Auswirkung der stärkeren Expression auf den Kolokalisationskoeffizienten untersucht. Hierzu wurden die Zellen der Mutante S1076N hinsichtlich der MDR3-assoziierten Intensität erneut nach den Quantilen 25% und 75% selektiert und mit den Zellen des Wildtyps, selektiert nach den Quantilen 75% und 100%, verglichen. Somit wurden nur die stark exprimierenden Zellen des Wildtyps mit den Zellen der Mutante S1076N verglichen. Es zeigte sich, dass sich der Kolokalisationskoeffizient M1 bei den stark exprimierenden Wildtypzellen nicht signifikant von S1076N unterschied. Der Kolokalisationskoeffizient M1 der Wildtypzellen wurde durch die Selektion stark exprimierender Zellen deutlich reduziert (**Abb. 38**).

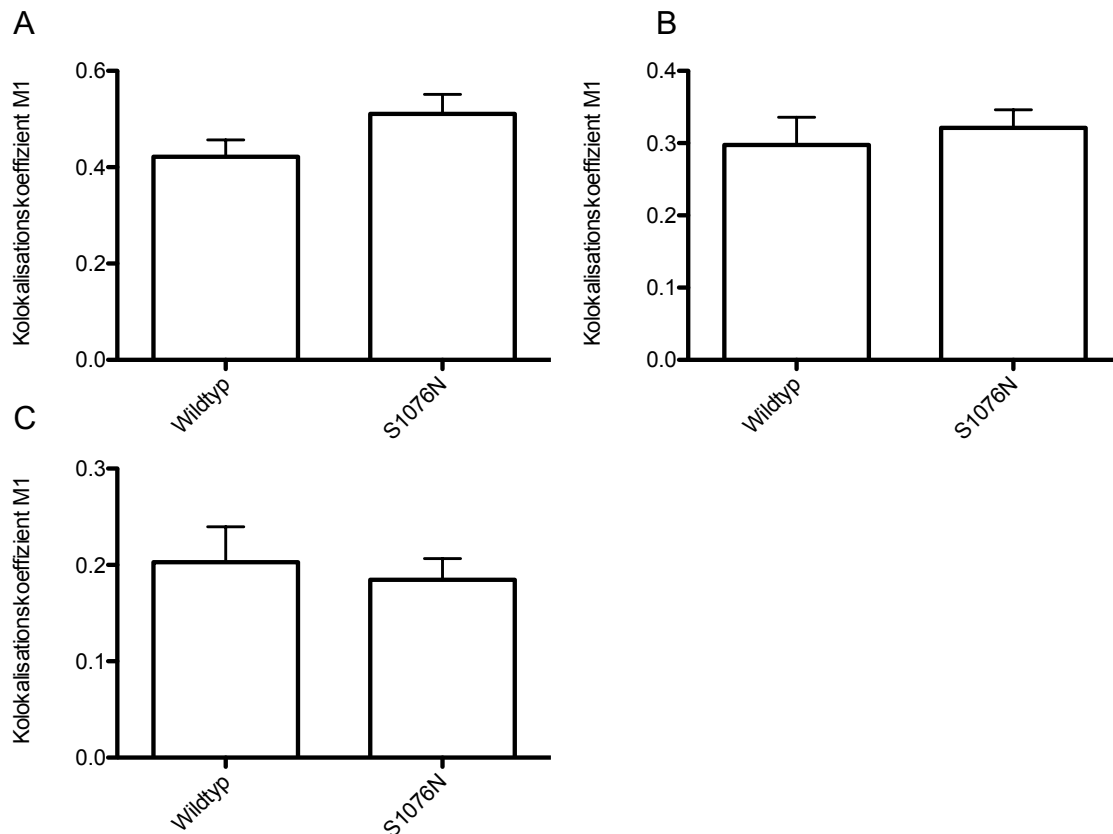


Abb. 38 Vergleich des Kolokalisationskoeffizienten M1 der stark exprimierenden Wildtypzellen mit der Mutante S1076N in den Experimentwiederholungen 1-3 (A-C) Stark exprimierende Wildtypzellen wurden über das 75%-100%-Quantil selektiert. Das Quantil für S1076N wurde weiterhin bei 25%-75% belassen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Kolokalisationskoeffizienten M1. Mittelwert $\pm$ SEM. **A** Wildtyp $n = 18$; S1076N $n = 19$ **B** Wildtyp $n = 8$; S1076N $n = 22$ **C** Wildtyp $n = 14$; S1076N $n = 49$.

4.5.2 Korrelation von M1 mit Na⁺/K⁺-ATPase-assoziiierter und MDR-assoziiierter Intensität

Um zu zeigen, dass die Höhe des Kolokalisationskoeffizienten negativ mit der MDR3-assoziierten Intensität der Zellen und positiv mit der Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierten Intensität korreliert, wurden *Spearman*-Korrelationen der Werte aller Zellen eines Sets gerechnet. Der stärkste Zusammenhang konnte, wie erwartet, in der dritten Experimentwiederholung festgestellt werden. Der Kolokalisationskoeffizient M1 korrelierte positiv mit der Na⁺/K⁺-assoziierten Intensität ($r_s = 0,47$; $p < 0,001$; zweiseitig getestet) und negativ mit der MDR3-assoziierten Intensität ($r_s = -0,36$; $p < 0,001$; zweiseitig getestet) (**Abb. 39**). Auch für die erste und zweite Experimentwiederholung konnte die Tendenz eines positiven und negativen Zusammenhangs von Na⁺/K⁺-ATPase-assoziiierter Intensität und MDR3-assoziiierter Intensität mit M1 festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigten sich jedoch nicht durchgehend signifikant.

Eine *Spearman*-Korrelation von M1 mit M2 zeigte in Experimentalsatz 3 einen negativen Zusammenhang ($r_s = -0,18$; $p = 0,01$; zweiseitig getestet) (**Abb. 40**).

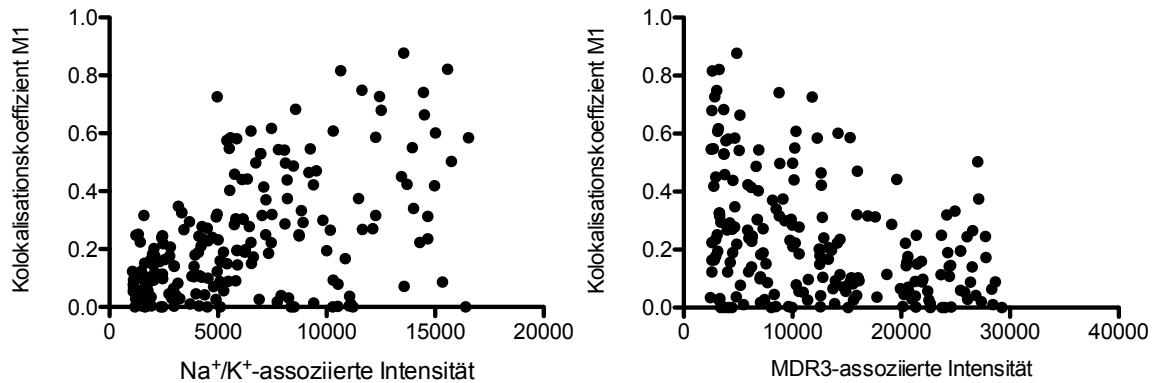


Abb. 39 Spearman-Korrelation des Kolokalisationskoeffizienten M1 mit der Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierte Intensität (positive Korrelation) und der MDR3-assoziierten Intensität (negative Korrelation). Ergebnisse aus Experimentwiederholung 3. N = 200

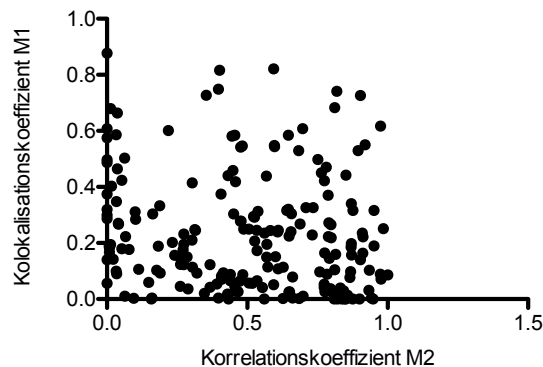


Abb. 40 Spearman-Korrelation des Kolokalisationskoeffizienten M1 mit M2 (negative Korrelation). Ergebnisse aus Experimentwiederholung 3. N = 200

4.5.3 Die Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierte und MDR3-assoziierte Gesamtintensität der Experimentalsets im Vergleich

Trotz exakter Versuchswiederholung können Schwankungen der Intensität von Na⁺/K⁺-ATPase und MDR3-assoziierte Intensität zwischen den Experimentalsets bestehen. Die MDR3-assoziierte Intensität als auch die Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierte Intensität des Wildtyps zeigte sich mit jeder Experimentwiederholung geringer (**Abb. 41**). Für den Vergleich der MDR3-Mutationen und Isoformen wurde daher nur die Relation der Parameter innerhalb eines Experiments betrachtet.

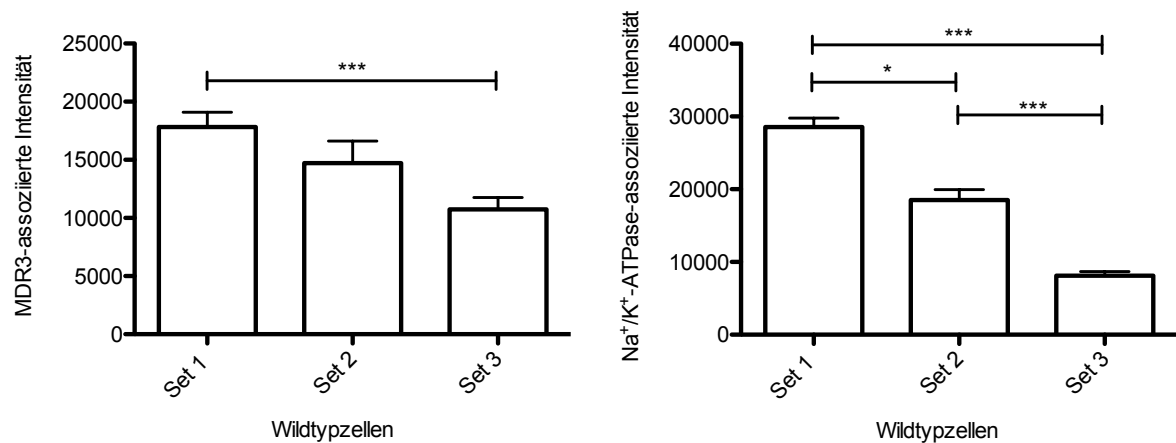


Abb. 41 Vergleich der MDR3-assoziierten und der Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierten Intensität zwischen den Experimentalsets beim Wildtyp. Vergleich der Mittelwerte der Parameter MDR3-assoziierte Intensität und Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierte Intensität. Es wurde der Mittelwert nach der Selektion der Zellen nach den Quantilen verwendet. Die MDR3-Expression und Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierte Intensität zeigten sich mit jeder Experimentwiederholung geringer. Mittelwert $\pm$ SEM. Set 1: n = 66; Set 2: n = 21; Set 3: n = 50.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei Aspekte des ABC-Transporters MDR3 im Zellkulturmodell untersucht: Die Expression und subzelluläre Lokalisation der Isoform B und das *Trafficking* klinisch relevanter Mutationen welche erstmals in Kubitz et al. (1) und Dzaganian et al. (89) beschrieben wurden.

5.1 MDR3-Isoformen

5.1.1 Lokalisationsunterschied der MDR3-Isoformen

Seit 1987 sind drei Isoformen von MDR3 bekannt. Die *Splice*-Varianten A, B und C wurden auf mRNA Basis in cDNA Banken humaner Leberzellen nachgewiesen (80). Isoform B und C wurden bisher nicht hinsichtlich ihrer Expression und subzellulären Lokalisation in der Zellkultur untersucht. Der Unterschied der Isoform A im Vergleich zur Isoform B besteht in einem phenylalaninreichen Nukleotideinschub von sieben Aminosäuren (FVDFGFQ) zwischen Exon 24 und Exon 25.

Auch die Funktion der Isoformen B und C ist bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde die Isoform B näher untersucht.

Die vergleichende Expression der Isoformen A und B im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass die Isoform B in HEK293- und HepG2-Zellen eine andere Lokalisation aufweist, im Vergleich zur Isoform A. Isoform B ist zu einem geringeren Teil an der Plasmamembran lokalisiert und wird intrazellulär retiniert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre Aggregate der Isoform B in HEK293-Zellen mit Ubiquitin kolokalisieren. Da fehlgefaltete Proteine in Zellen zu Ubiquitin-reichen intrazellulären Inklusionen aggregiert werden (137), könnte dies auf eine Fehlfaltung der Isoform B in den Zellen hinweisen. In Western Blots der Isoformen konnten Hinweise auf eine geringere Expression der Isoform B im Vergleich zur Isoform A in den Zellen gefunden werden. Die über das Expressionsplasmid pEYFP exprimierte Isoform B zeigte entgegen der Erwartung ein leicht vermindertes Molekulargewicht im Verhältnis zur Isoform A. Im Expressionsplasmid pmCherry zeigte sich der Unterschied weniger deutlich, wobei in dem entsprechenden Western-Blot beide Isoformen schwächere und auslaufende Banden zeigten, als Hinweis auf mögliche Proteindegradation und schwächere Expression in der Experimentwiederholung in pmCherry. Möglicherweise wird die Isoform B nicht in gleichem Ausmaß wie die Isoform A glykosyliert. Eine unzureichende Glykosylierung bzw. Reifung könnte zur Retention und schließlich Degradation der Isoform B von MDR3 führen. Zur Untersuchung der Glykosylierung und Maturation der Isoform B könnte ein Western Blot der Isoformen nach Behandlung mit Endoglykosidasen wie in (97) beschrieben versucht werden.

5.1.2 Diskussion einer möglichen Funktion der Isoform B

Bei der Proteinfaltung werden hydrophobe Aminosäuren eher ins Innere von Proteinen gelagert (97). Der Nukleotideinschub der Isoform B (FVDFGFQ) liegt nach Vorhersagen anhand des MDR3-Homologiemodells (94) an der Außenseite des Moleküls und besteht zum 4/7 aus unpolaren hydrophoben Aminosäuren. Drei der unpolaren hydrophoben Aminosäuren sind Phenylalanine. Besonders der große unpolare aromatische Rest des Phenylalanins an der Außenseite des Moleküls könnte aufgrund der hydrophoben Eigenschaften die Faltung der Isoform B behindern. Die dadurch bedingte Fehlfaltung der Isoform B könnte zu einer Markierung mit Ubiquitin und folgender Degradation im Rahmen der ER-assoziierten Degradation (ERAD) (138) führen. Hierzu passen die Ergebnisse der Zellkulturexperimente dieser Arbeit mit einer Kolokalisation der Isoform B mit Ubiquitin. Im Laufe der Evolution der ABC-Transporter ist es häufiger zu Veränderungen im Erbgut gekommen. Variable Bereiche änderten sich zur Ausbildung neuer vorteilhafter Eigenschaften (81,139).

In welchem Ausmaß die intrazellulär lokalisierte Isoform B physiologisch als Protein exprimiert und ob sie nach der Translation eine intrazelluläre Funktion hat ist nicht klar. Bisher wurde die Isoform B bei menschlichen Individuen nur auf mRNA-Basis in der Leber nachgewiesen. Ein Beispiel für einen ABC-Transporter mit intrazellulärer Funktion ist TAP1/2 (*Transporter associated with antigen processing 1/2, ABCB2/3*), welcher Peptide zur Antigenpräsentation über die Membran des ER und auf MHC I (*major histocompatibility complex I*) transportiert (140).

Eine physiologische Funktion der Isoform B auf Proteinebene ist trotz der Hinweise auf eine Degradation in der Zellkultur nicht auszuschließen.

In den Zellkulturexperimenten dieser Arbeit kolokalisierten nicht alle intrazellulären Aggregate der Isoform B mit Ubiquitin und auch Aggregate der Isoform A zeigten in einigen Zellen Ubiquitin-Kolokalisationen. Durch die starke Überexpression der Proteine *in vitro* kommt es wahrscheinlich zu allgemein verstärkter Degradation beider Isoformen und zur Kolokalisation mit Ubiquitin. Die Isoform B kolokalisierte etwas stärker mit Ubiquitin, sodass in Verbindung mit den schwächeren Banden der Isoform B im Western-Blot eine verstärkte Degradation oder verminderte Expression diskutiert werden kann. Bei transienter Transfektion können Schwankungen der Transfektionseffizienz die Expressionsstärke zwischen den Experimenten beeinflussen. Der Unterschied der Intensität der Banden von MDR Isoform A und B zeigte sich jedoch auch nach Wiederholung der Experimente nach Transfektion mit verschiedenen DNA-Präparationen und MDR3 kloniert in verschiedene Vektoren.

Eine hypothetische Funktion der Isoform B auf Proteinebene könnte ein Phosphatidylcholintransport über eine Membran im Intrazellularraum der Zellen wie zum Beispiel über eine Membran des Endoplasmatischen Retikulums sein. Möglicherweise könnte der Nukleotideinschub der Isoform B einer Bindungsstelle eines unbekannten Liganden entsprechen, obwohl bisher kein passendes Konsensusmotiv zu den sieben Aminosäuren gefunden werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass MDR3-Isoform A am N-Terminus Phosphorylierungsstellen aufweist (99). Das Aspartat oder das Glutamat des Nukleotideinschubs könnte

möglicherweise ebenfalls einer Phosphorylierungsstelle entsprechen. Ob sich diese Theorie bestätigt und ob die Bindung eines Liganden das *Trafficking* in ein anderes Membrankompartiment bewirkt, müsste in weiteren Studien untersucht werden. Obwohl die heterologe Überexpression von MDR3 in HEK293- und HepG2-Zellen ein etabliertes System darstellt, ergeben sich durch das artifizielle System Interpretationsschwierigkeiten der Ergebnisse dieser Arbeit. Die Lokalisation der Isoform B könnte sich bei einer Expression in humanen Hepatozyten anders darstellen, als in dem hier verwendeten Zellkultursystem.

5.2 MDR3-Mutationen

MDR3-Mutationen wurden bisher mit einem breiten Spektrum cholestatischer Krankheitsbilder assoziiert (35–38,97). Dies scheint Ausdruck eines MDR3-Defekts unterschiedlichen Schweregrades zu sein. Bisher wurden etwa 300 MDR3-Mutationen beschrieben (141). Die bisher bekannten Mutationen, welche als krankheitsauslösend klassifiziert wurden, konnten meist nur bei einzelnen Patienten mit wegweisender klinischer Symptomatik gefunden werden. Häufig sind die gefundenen Mutationen Teil komplexer Genotypen mit mehreren Mutationen im MDR3- oder anderen Transporter- oder Regulatorgenen. Um Hinweise auf die Auswirkungen und die pathophysiologische Relevanz von Punktmutationen zu erhalten und Therapiestrategien zu entwickeln sind Untersuchungen *in vitro* nötig. Bisher wurden für über 35 MDR3-Mutationen funktionelle Studien durchgeführt (42,43,142–144,45,48,97,99,100,116–118). Durch die Erforschung von Pathomechanismen konnten bereits erste Substanzen zur spezifischen Therapie von MDR3-Mutationen vorgeschlagen werden. Ivacaftor konnte als Beispiel in der Zellkultur bei einem MDR3-Funktionsdefekt durch die Mutation S1076C die Funktion von MDR3 verbessern (100). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die MDR3-Mutanten S27G, S1076N, Q1174E und H1231Y näher charakterisiert werden. Hierzu wurden sie in einem Vektor erstellt, im Zellkulturexperiment exprimiert und hinsichtlich ihres *Traffickings* verglichen. Die Mutante I541F konnte im Zellkulturexperiment mithilfe konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie, in Western Blots und Experimenten zur Glykosylierung bereits als *Trafficking*-Defekt-Mutante charakterisiert werden (35,97,100). In dieser Arbeit wurde I541F als Kontroll-Mutante für einen *Trafficking*-Defekt in einem Expressionsvektor erstellt. Der bekannte *Trafficking*-Defekt der Mutante I541F konnte in dieser Arbeit reproduziert werden. Mit dem Ziel auch geringere *Trafficking*-Defekte mithilfe konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie untersucherunabhängig zu finden wurde ein standardisierter Analyseablauf entwickelt. Die zu untersuchenden Mutationen, die Mutante I541F und der Wildtyp wurden in der Zellkultur exprimiert. In den Experimenten konnte kein *Trafficking*-Defekt der Mutanten S27G, S1076N, Q1174E und H1231Y festgestellt werden, welcher auf eine intrazelluläre Retention vergleichbar mit I541F hinweist. Da die Mutationen eine pathogenetische Relevanz haben (sie wurden alle bei Patienten mit einer intrahepatischen Cholestase gefunden (1,89)) ist bei nicht nachweisbaren *Trafficking*-Defekten von einer funktionellen Störung auszugehen.

5.2.1 Ergebnisse der standardisierten Kolokalisationsanalyse

Mithilfe der standardisierten Kolokalisationsanalyse konnte in drei Experimentwiederholungen bestätigt werden, dass die untersuchten MDR3-Mutanten S27G, Q1174E und H1231Y im Vergleich zu dem MDR3-Wildtyp keinen signifikanten *Trafficking*-Defekt aufweisen, welcher mit I541F vergleichbar ist. Lediglich für die Mutante S1076N zeigte sich der Kolokalisationskoeffizient M1 - als Verhältnis aus kolokalisierter MDR3-Intensität zu gesamt MDR3-Intensität - in den Experimentwiederholungen 2 und 3 signifikant geringer als für den Wildtyp.

Nach Analyse der MDR3-Expression und Intensität des Membranmarkers von Wildtyp und S1076N zeigte sich, dass der signifikante Unterschied durch eine verminderte Intensität des Membranmarkers, verbunden mit einer höheren Fluoreszenzintensität bei der Mutante S1076N bedingt war. Nach dem Vergleich von stark exprimierenden Zellen des Wildtyps mit S1076N zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Membranlokalisation. Der Kolokalisationskoeffizient M1 zeigte sich deutlich abhängig von der MDR3-Expression. Bedingt durch die Berechnung des Kolokalisationskoeffizienten M1 zeigte sich in den Experimenten eine negative Korrelation von M1 zur MDR3-Expression und eine positive Korrelation von M1 zur Fluoreszenz des Membranmarkers.

Der Kolokalisationskoeffizient M2 (kolokalisierter Membranmarker zu gesamt Membranmarker) zeigte sich für die Mutante S1076N signifikant höher im Vergleich zum Wildtyp. Auch dieser Befund spricht gegen einen signifikanten *Trafficking*-Defekt von S1076N. In dem betreffenden Experiment 3 zeigte sich über alle Zellen eine leicht negative Korrelation von M1 und M2.

Zur Interpretation von Unterschieden des Kolokalisationskoeffizienten M1 sollte bei Kolokalisationsexperimenten, wie dem hier beschriebenen, die Expressionsstärke von Marker- und Zielprotein beachtet werden, um aus signifikanten Unterschieden von M1 keine falschen Schlüsse zu ziehen.

Ein Lokalisationsunterschied von S1076N und Wildtyp konnte in dem vorliegenden Experiment somit nicht gezeigt werden, jedoch eine höhere Menge intrazellulären Proteins bei S1076N. Denkbar wäre eine vermehrte Proteinexpression oder verminderte Degradation von S1076N. In der Literatur beschrieben ist die als funktionsdefekt charakterisierte Mutante S1076C, welche in HepG2-Zellen ebenfalls vergleichbar mit dem Wildtyp an der Membran lokalisiert vorlag (141).

Die Mutanten S1076N und H1231Y zeigten sich über alle drei Experimentalsätze stärker exprimiert als die Mutanten Q1174E und I541F, was sich ebenfalls mit den Ergebnissen des Western Blots deckte.

Die Mutante Q1174E zeigte sich sowohl in der Kolokalisationsanalyse, als auch im Western Blot geringer exprimiert als der Wildtyp. Auch in Experimenten zur ATPase-Aktivität von MDR3 hatte sich eine schwächere Expression der Mutante Q1174E in *Pichia pastoris* gezeigt (143). Vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Expressionsunterschiede der MDR3-Mutanten in HEK293-Zellen, *Pichia pastoris*, den Western Blots und der Kolokalisationsanalyse sprechen für eine repräsentative initiale Zellauswahl als Basis für die Kolokalisationsanalyse. Durch die Anlage von Selektionsintervallen hinsichtlich der MDR3-assoziierten Intensität konnten die

Unterschiede in der mittleren Expression der Mutanten für eine statistische Kolokalisationsanalyse angeglichen werden und der Einfluss der Expressionsunterschiede auf die Kolokalisationskoeffizienten vermindert, jedoch nicht ganz vermieden werden. Auch die Ursache der geringeren Expression einiger Mutanten ist nicht klar. Möglich wären hier durch die Mutationen bedingte Unterschiede in der Maturation und Proteinstabilität.

5.2.2 Diskussion der Methodik

Die hier verwendete Methode ist geeignet um Mutanten, welche einen deutlichen *Trafficking*-Defekt aufweisen vom Wildtyp zu unterscheiden. Die Membranlokalisierung der MDR3-Varianten wurde mithilfe der Kolokalisationskoeffizienten M1 und M2 nach Manders berechnet (130). Aufgrund der hohen Varianzen bezüglich der MDR3-Expression und des Membranmarkers bei den Zellen ergab sich zwischen den Zellen einer MDR3-Variante eine hohe Varianz der Kolokalisationskoeffizienten. Die Varianz ist systemisch bedingt und auf verschiedene Faktoren zurückzuführen. Die Zellen einer MDR3-Variante eines Experimentalsets befinden sich nicht durchgängig im gleichen Stadium des Zellzyklus, da sie sich bis zur Fixierung nicht immer synchron teilen. Es ist möglich, dass während der Teilung unterschiedliche Mengen des transfizierten Plasmids auf die Tochterzellen aufgeteilt werden, bis das Plasmid schließlich verloren geht. Aufgrund der transienten Transfektion ist es möglich, dass die Zellen durch eine unterschiedliche MDR3-Plasmidkopienzahl unterschiedlich viel Protein exprimieren und so die Transfektionseffizienz schwankt. Auch die Zelldichte in der Kultur kann einen Einfluss auf die Zellteilung und den Zellzyklus haben. Im Experimentaldesign wird versucht Zellen mit ähnlicher MDR3-Gesamtexpression über die mittlere MDR3-assoziierte Intensität jeder Zelle sowie die Zellgröße zu selektionieren. Dies ist nur bedingt möglich. Stark transfizierte Zellen könnten schon in frühem Stadium der Interphase des Zellzyklus viel MDR3 exprimieren und werden in die Auswertung aufgenommen, sobald die Grenzwerte für die Zellgröße und die Na^+/K^+ -ATPase erreicht werden. Durch den hohen intrazellulären MDR3-Anteil sinkt der Kolokalisationskoeffizient von kolokalisiertem MDR3 zu Gesamt-MDR3 der Zelle. Schwach transfizierte Zellen in ausgereiftem Stadium weisen dagegen kaum intrazellulär lokalisiertes Protein und im Verhältnis viel membranlokalisiertes Protein und somit einen hohen Kolokalisationskoeffizienten auf. Somit könnten auch bei ähnlich gemessener MDR3-Expression unterschiedliche Kolokalisationskoeffizienten resultieren. Diese Schwankungen könnten die hohe Standardabweichung des Kolokalisationskoeffizienten sowohl beim Wildtyp als auch bei den Mutanten erklären. Durch eine weitere Verringerung des Selektionsfensters der MDR3-assoziierten Intensität lässt sich die Standardabweichung nicht weiter reduzieren. Durch eine weitere Eingrenzung des Selektionsfensters für die Zellgröße könnten bis zu einem gewissen Grad mehr Zellen des gleichen Entwicklungsstadiums erfasst werden. In den hier durchgeführten Experimenten würde die weitere Verkleinerung des Selektionsfensters der Zellgröße die auswertbare Zellzahl allerdings so stark verringern, dass keine statistische Auswertung mehr möglich wäre. In der vorgelegten Auswertung wurden die Selektionsfenster hinsichtlich der MDR-assoziierten Intensität

und der Na⁺/K⁺-ATPase-assoziierten Intensität so gewählt, dass Zellen, welche stark vom Durchschnitt abweichen durch das Zusammenspiel der Selektionskriterien aus der Auswertung genommen wurden und eine ausreichende Anzahl Zellen zur Auswertung verblieb. Bedingt durch die starke Varianz des Kolokalisationskoeffizienten wird ein möglicher geringer Unterschied der Mutanten hinsichtlich der Membranlokalisation bei geringer Stichprobengröße nicht signifikant. Um auch kleine Mittelwertunterschiede detektieren zu können, müsste die Stichprobe vergrößert und die Selektionsfenster enger eingestellt werden. Durch die eingebauten Selektionsschritte zur Vermeidung einer subjektiv verfälschten Auswertung der Experimente müssten bei der hier vorgestellten Methode initial sehr viel mehr Zellen markiert und nachträglich selektioniert werden. Zur Auswertung einer derart hohen Zahl an Zellen wäre eine computergestützte Methode vorteilhaft. Da der Arbeitsablauf der hier durchgeführten Methode aus vielen Arbeitsschritten besteht, welche sehr anfällig für geringe Schwankungen sind wäre allerdings die Relevanz von geringen Unterschieden schwer zu interpretieren. Eine weitere Methode Zellen gleicher Proteinexpression für eine Auswertung zu erhalten wäre die Etablierung stabil transfizierter Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Erstellung stabil mit MDR3 transfizierter Zellen versucht, gelang jedoch nicht. Trotz der hohen Standardabweichungen hat sich die Methode der standardisierten Kolokalisationsauswertung in dieser Arbeit als sensitiv genug herausgestellt, den visuellen Eindruck, welcher sich bereits bei der mikroskopischen Durchmusterung der Zellpräparate ergab statistisch zu erfassen und darzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutationen S27G, S1076N, H1231Y und Q1231Y keinen *Trafficking*-Defekt vergleichbar mit der Mutante I541F aufweisen. Möglicherweise könnten sich andere Methoden, wie die FACS-Analyse (48) oder eine automatisierte Auswertungsstrategie (145) unter Verwendung stabil transfizierter, polarisierter Zellen sensitiv genug erweisen, um mögliche geringe *Trafficking*-Defekte der Mutationen zu detektieren.

MDR3-Mutationen könnten auch zu einer veränderten Expression des Proteins führen. Es sollte bei der Betrachtung der Daten berücksichtigt werden, dass nach der Selektion der Zellen hinsichtlich der MDR3-assoziierten Intensität die Proteinexpression nicht mehr auf der Basis dieser Daten beurteilt werden kann. Hierzu müssen die Daten ohne Selektion hinsichtlich des Kriteriums der MDR3-assoziierten Intensität betrachtet werden (s. Kapitel 4.4.3 Abb. 3B) Bedingt durch die Expression von cDNA im Rahmen der hier durchgeführten Zellkulturexperimente, kann ein Effekt der Mutationen auf das Splicen *in vivo* nicht beurteilt werden. Mutationen können die Stabilität der mRNA verändern oder zu alternativem Splicen führen. Ein veränderter Anteil an korrekt gespleißter mRNA kann es zu einer veränderten Proteinexpression *in vivo* führen (146).

5.2.3 In silico Analysen der MDR3-Mutationen

In silico können MDR3-Mutationen innerhalb des MDR3 Homologen Sav1866 (94) modelliert werden (**Abb. 42**). Durch diese Technik können mögliche Auswirkungen von Mutationen auf die Proteinfunktion abgeschätzt werden.

Die untersuchten Mutanten S2076N, Q1174E und H1231Y liegen in unmittelbarer Nähe funktionell wichtiger Bereiche des Transporters und machen eine Störung des katalytischen Zyklus und somit einen Funktionsdefekt wahrscheinlich.

S1076 ist die vorletzte Aminosäure des Walker-A-Motivs der zweiten Nukleotidbindedomäne (NBD). Dieses Serin koordiniert nach Strukturvorhersagen die Interaktion der NBD, des Kofaktors Magnesium und des Alpha-Phosphats des ATP. Durch den Austausch von Serin durch Asparagin, wird die Bindung von ATP sehr wahrscheinlich verhindert und damit die Energiebereitstellung für den Phosphatidylcholintransport beeinträchtigt (schriftliche Mitteilung Prof. L. Schmitt, Institut für Biochemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) (92). Die Mutation S1076C (114) zeigt den Austausch von Serin 1076 durch Cystein. Eine 3D-Modellierung nach dem NBD1/NBD2 Heterodimer von MJ0796 (147) ergab bei der Analyse Hinweise darauf, dass das Sauerstoffatom des Serins an beiden NBD mit ATP interagiert (141). In Experimenten konnte über die Messung von Phosphatidylcholin im Medienüberstand von HEK293-Zellen für S1076C auf einen Funktionsdefekt geschlossen werden (141).

Die Aminosäure Q1174 befindet sich im erweiterten X-loop vor dem C-loop der zweiten NBD. Der X-loop ist gemäß der Sav1866 Struktur an der Interaktion der NBD mit den *Coupling*-Helices der Transmembrandomänen (TMD) essentiell beteiligt. Nach Strukturvorhersagen führt der Austausch von Glutamin zu Glutamat dazu, dass die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen Glutamin der NBD und Asparagin im ICL1 der TMD verhindert wird (143). Experimentell konnte bereits gezeigt werden, dass Q1174E eine basale ATPase-Aktivität zeigt, welche sich jedoch nicht durch Phospholipide stimulieren ließ. Der Austausch des Glutamin im X-loops scheint die Interaktion der NBD mit den TMD zu stören und somit eine Funktionsminderung zu erklären (143).

Die Mutante H1231Y wurde hinsichtlich ihrer Lokalisation im Homologiemodell bereits von Dzaganja et. al diskutiert. H1231 entspricht dem Histidin, des in allen ABC-Transporten konservierten H-loops (89). Wie dort beschrieben hatten Studien gezeigt, dass die Mutation dieses Histidins zu jeder anderen Aminosäure die ATPase-Aktivität komplett verhindert und somit für die Funktion der ATPase essentiell ist (85,89,148,149). In der Arbeit von Dzaganja et. al wurde, wie oben beschrieben, diskutiert, dass die Funktionsunfähigkeit einer NBD noch eine Teilfunktion des Transporters zulassen würde, da nur eine der beiden NBDs durch den Austausch des Histidins gestört ist (89). Passend hierzu zeigte sich MDR3-H1231Y sowohl in den *in vitro* Experimenten dieser Arbeit, als auch in den gefärbten Leberschnitten des betroffenen Kindes (89) an der Plasmamembran lokalisiert. Eine Therapie mit UDCA erbrachte eine Verbesserung des klinischen Phänotyps, was für eine Restfunktion des Transporters spricht.

Die Mutation S27G kann in dem Homologiemodell des Transporters Sav1866 (94) nicht modelliert werden, da eine dem N-Terminus von MDR3 entsprechende Sequenz in Sav1866 nicht existiert. Es konnte gezeigt werden, dass MDR3 am N-Terminus phosphoryliert wird und dass die Mutationen T34M und R47G die Funktion von MDR3 durch Beeinträchtigung des Substrattransports vermindern (99). In der Arbeit von Gautherot et. al wurde vermutet, dass den ersten Aminosäuren des N-Terminus eine für MDR3 spezifische Funktion zukommt, da dieser Bereich bei anderen ABC-Transportern nicht konserviert wurde (99). Ob auch S27G die Phosphorylierung des N-Terminus beeinflusst, könnte in weiteren *in vitro* Experimenten überprüft werden. Bei der Analyse der *Splicing*-Wahrscheinlichkeit der mRNA der Mutante S27G hatte sich eine leichte Reduktion der *Splicing*-Wahrscheinlichkeit von 0,96 auf 0,75 ergeben (1). Durch eine Reduktion der *Splicing*-Wahrscheinlichkeit könnte eine verminderte Transporterdichte an der kanalikulären hepatozytären Membran der Patienten erklärt werden, welche in den hier durchgeführten Zellkulturexperimenten nicht entdeckt worden wäre. In einer Leberprobe eines von S27G betroffenen Kindes, welches S27G *compound*-heterozygot mit einer *Non-Sense*-Mutation trägt (**Tabelle 4**), konnte keine MDR3-Immunreaktivität an der Membran festgestellt werden (1), was die Hypothese eines *Splicing*-Defektes mit konsekutiver Verminderung der Proteinexpression unterstützen würde.

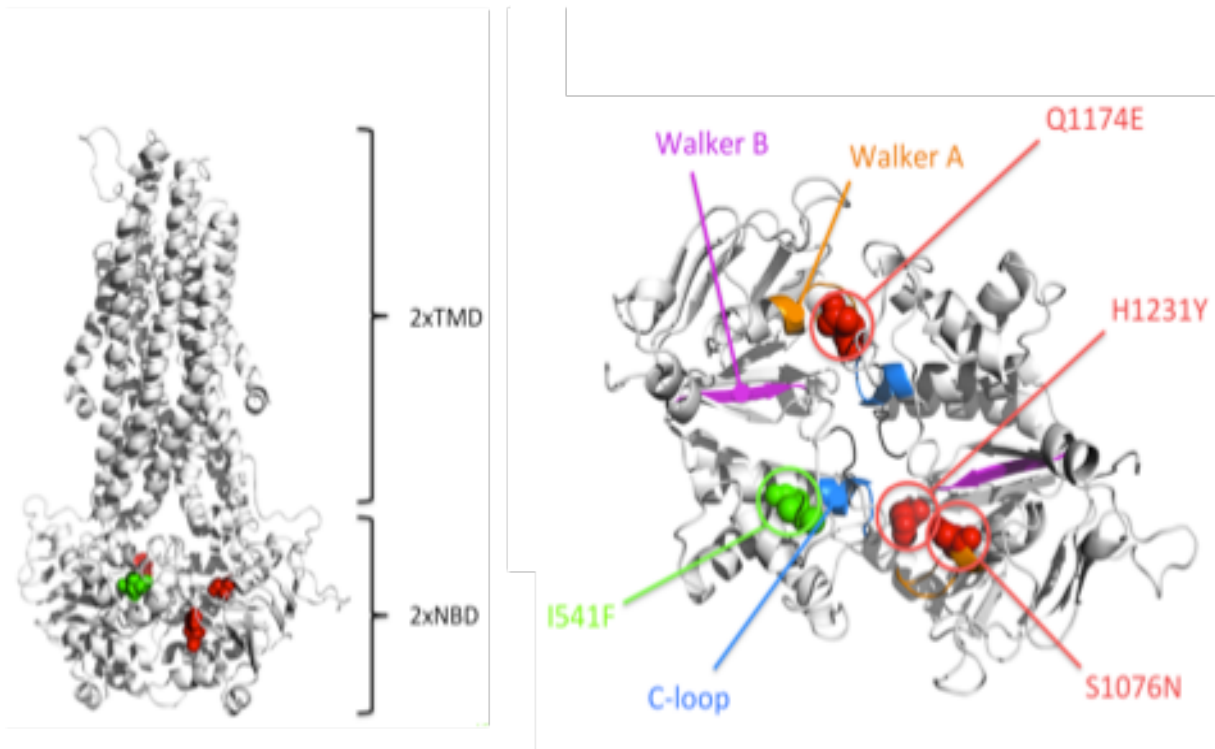


Abb. 42 Lokalisation der MDR3 Mutationen S1076N, Q1174E und H1231Y in der 3D Struktur von Sav 1866 (MDR3-Homologiemodell). Die Sequenz um das Serin an Aminosäureposition 27 von MDR3 ist in Sav1866 nicht konserviert und ist daher im MDR3 Modell nicht dargestellt. Das Serin an Position 1076 ist die vorletzte Aminosäure des Walker-A-Motivs der zweiten NBD. Glutamin 1174 befindet sich im X-loop vor dem C-loop (143). Histidin 1231 ist eine hochkonservierte Aminosäure des H-loops (89). Abbildung übernommen aus (155).

5.2.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Die untersuchten MDR3-Mutationen wurden bei Patienten aus verschiedenen Familien entdeckt (**Tabelle 4**). Die klinischen Daten zu den Patienten sowie Teile der Argumentation wurden aus den Publikationen von Kubitz et. al und Dzaganja et. al entnommen. S27G wurde bisher in zwei nicht verwandten Familien gefunden. Die erste Indexpatientin (S.Z.) zeigte sich *compound*-heterozygot für S27G und S320F. Die zweite Patientin (S.E.H.) zeigte sich *compound*-heterozygot für S27G und die *Frameshift*-Mutation p.Leu23-Hisfs16X. S320F ist eine der am häufigsten gefundenen und funktionell charakterisierten MDR3-Mutationen (42). S320F betrifft eine hochkonservierte Aminosäure in den Nukleotidbindedomänen (150) und wurde heterozygot, *compound*-heterozygot und homozygot bei Patienten mit einem breitem Spektrum MDR3-assoziiierter Erkrankungen gefunden (37,42,46,47,50,64,69,151–153). Funktionelle Studien von Andress et al. und Kim et al. zu S320F konnten *in vitro* eine um 50 % reduzierte Expression von MDR3 als Resultat dieser Punktmutation identifizieren (42,117). Dies konnte *in vivo* durch eine um 50 % reduzierte MDR3-Immunreaktivität in Leberschnitten homozygot betroffener Patienten bestätigt werden (42,47). Homozygot betroffene Patienten zeigten moderate bis schwere Verläufe von Leberfibrose, LPAC und ICP (47,152). Bei heterozygot betroffenen Patienten könnte daher, bei Annahme einer biallelischen Expression, eine um 25 % reduzierte

Expression von MDR3 an der Membran erwartet werden. Heterozygot betroffene Patienten konnten bisher mit leichten Verläufen von LPAC, DIC und ICP assoziiert werden (42). In der Publikation von Andress et al. zur funktionellen Charakterisierung von S320F und anderen Mutationen (42) konnte erstmals ein Schwellenwert von 50 % MDR3-Funktion geschätzt werden, ab welchem mittelschwere klinische Manifestationen auch bei anderen Mutationen zu erwarten sein könnten (42). Eine MDR3-Funktion von unter 25 % könnte die Schwelle für einen schweren PFIC-3 Phänotyp darstellen (42). Vorhersagen der MDR3-Restfunktion und die Vorhersage der klinischen Manifestation auf Basis des Genotyps sind allerdings aufgrund vieler Einflussvariablen mit Unsicherheiten verbunden. Heterozygote MDR3 (+/-) Mäuse zeigen eine Reduktion ihrer Phosphatidylcholinexkretion um 60 % (35). Es wurde bereits postuliert, dass heterozygote MDR3-Defekte einen dominant negativen Einfluss auf die MDR3-Expression haben könnten (41,154). Der Einfluss nicht bekannter oder nicht untersuchter Gene auf die Expression von MDR3-mutierten Allelen (41) erschwert Genotyp-Phänotyp-Korrelationen. So wurden für den homozygoten Genotyp der Mutation S320F auch unterschiedlich starke MDR3-Immunreaktivitäten in Leberschnitten der Patienten gefunden (47,64). Eines von vielen möglichen Genen, welches unterschiedliche Phänotypen bei gleichen MDR3-Genotypen bewirken könnte, ist der häufige Polymorphismus V444A der Gallensalzexport-Pumpe BSEP. V444A kann bei 25 % der Bevölkerung homozygot gefunden werden (64) und bewirkt eine verminderte BSEP Expression (155) mit intrazellulärer Retention von Gallensalzen (1). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von FXR über Chenodeoxycholat die MDR3-Expression steigert (101). Retinierte Gallensalze könnten bei V444A-Polymorphismus zu einer Aktivierung von FXR führen und somit eine gesteigerte Expression von MDR3 bewirken. Dies könnte eine Möglichkeit von vielen darstellen wie sich unterschiedlich starke MDR3-Expressionen an der Membran homozygoter (47,64) oder auch heterozygoter (153) S320F-Träger erklären lassen könnten. Mögliche Varianten im Regulatorgen FXR können ebenfalls eine veränderte Expression von MDR3 bei ähnlichen MDR3-Genotypen bewirken und möglicherweise Erkrankungsfälle von PFIC-3 erklären, bei welchen keine MDR3-Mutation gefunden wurde (41,114).

Patient	Mutationen	Zygosität	Klinik	Referenz
S.E.H.	p.S27G	heterozygot	PFIC-3	Kubitz et al. 2011
	p.Leu23Hisfs16X	heterozygot		
A.E.H. (Vater von S.E.H.)	p.S27G	heterozygot	-	Kubitz et al. 2011
R.E.A. (Mutter von S.E.H.)	p.Leu23Hisfs16X	heterozygot	-	Kubitz et al. 2011
S.Z.	p.S27G	heterozygot	PFIC-3	
	p.S320F	heterozygot		
J.Z. (Mutter von S.Z.)	p.S27G	heterozygot	-	
B.Z. (Vater von S.Z.)	p.S320F	heterozygot	-	
O.Z. (Schwester von S.Z.)	p.S27G	heterozygot	-	
M.Z. (Bruder von S.Z.)	p.S27G	heterozygot	-	
E.W.	p.S1076N	heterozygot	Neonatale Cholestase	Kubitz et al. 2011
A.W. (Mutter von E.W.)	p.S1076N	heterozygot	ICP	Kubitz et al. 2011
L.R.A.	p.Q1174E	heterozygot	PFIC-3	Kubitz et al. 2011
	c 286+1G>A	heterozygot		
F.R. (Onkel von L.R.A.)	c 286+1G>A	heterozygot	LPAC	Kubitz et al. 2011
C.S.R. (Tante von L.R.A.)	c 286+1G>A	heterozygot	BRIC, ICP	Kubitz et al. 2011
A.H.	p.H1231Y	homozygot	PFIC-3	Dzaganian et al. 2012

Tabelle 4 Familienmitglieder der Patienten mit den Mutationen S27G, S1076N, Q1174E und H1231Y. Angabe der im Text diskutierten Mutationen und klinische Präsentation zum Untersuchungszeitpunkt. ABCB4 Referenzsequenz: NM_018849.2

5.2.4.1 Die Mutation S27G

Das Kind S.Z. (**Tabelle 4**) zeigte das klinische Bild eines leichteren PFIC-3-Verlaufs und zeigte sich für S27G und S320F *compound*-heterozygot. Die Diagnose PFIC-3 wurde im Alter von 14 Jahren gestellt. Es zeigten sich erhöhte Gallensalze im Serum, welche auf eine fortgeschrittene Schädigung der Gallenwege bei S.Z. hinwiesen. Die Sequenzierung der Eltern ergab, dass das Kind S.Z. die Mutationen S320F von ihrem Vater (B.Z.) und die Mutation S27G von ihrer Mutter (J.Z.) geerbt hatte. Bei ihrem Vater, welcher S320F heterozygot trägt, wäre bei Annahme keiner weiteren protektiven oder aggravierenden genetischen Veränderungen nach den funktionellen Studien von Andress et al. (42) eine 75% Funktion von MDR3 zu erwarten und somit leichte Symptome einer Cholestase möglich. Bisher war der Vater jedoch asymptomatisch geblieben. Die Mutter (J.Z.) und die Geschwister (O.Z. und M.Z.), welche für S27G heterozygot waren, zeigten sich ebenfalls asymptomatisch, was für eine Restfunktion des Allels S27G von mindestens 50 % sprechen könnte. Bei S.Z. wäre bei PFIC-3-Verlauf eine deutliche und voraussichtlich mehr als 50 % Einschränkung der MDR3-Funktion durch die Kombination von S27G und S320F sowie gegebenenfalls weiterer unbekannter prädisponierender Einflüsse zu erwarten. Geht man auch hier von keiner weiteren Beeinflussung durch andere modifizierende Gene aus, ist es in Anbetracht der Daten von Andress et al. und Kubitz et al. wahrscheinlich, dass bei dem Kind S.Z. S320F und S27G in Kombination die Funktion

oder Expression ihres jeweiligen Allels um jeweils 50% (S320F) (42) und 25-50% (S27G) reduzieren. In der Zellkultur konnte für S27G kein *Trafficking*-Defekt nachgewiesen werden. Eine leichte Reduktion der *Splicing*-Wahrscheinlichkeit um ca. 25% (1) legt allerdings eine hierdurch verursachte, leicht verminderte Konzentration von MDR3 bei S27G nahe. Eine darüber hinaus gehende Funktionseinschränkung von MDR3-S27G könnte, hypothetisch, durch eine verminderte Phosphorylierung des N-Terminus bewirkt werden, wie schon für die Mutanten T34M und R47G gezeigt wurde (99).

Ein zweiter Patient mit der Mutation S27G ist das Kind S.E.H. (**Tabelle 4**), welches sich *compound*-heterozygot für S27G und die *Frameshift*-Mutation p.Leu23-Hisfs16X zeigte (1). Das Kind S.E.H. präsentierte sich mit einem schweren PFIC-3-Phänotyp, welcher sich früh manifestierte und mit Leberzirrhose und portaler Hypertension einherging. Auch in diesem Fall hatte das Kind die Mutationen von seinen asymptomatischen Eltern, dem Vater A.E.H. (S27G) und der Mutter R.E.A. (p.Leu23-Hisfs16X) geerbt (**Tabelle 4**). Die *Frameshift*-Mutation führt sehr wahrscheinlich zu einem sehr frühen Abbruch der Translation und somit zu einem Funktionsverlust des betroffenen Allels (1). Bei gleichwertiger biallelischer Expression eines heterozygoten Genotyps wäre bei der von der *Frameshift*-Mutation betroffenen Mutter eine Reduktion der MDR3-Funktion auf 50 % und somit eine klinische Symptomatik zu erwarten. Die Mutter zeigte jedoch bisher keine Symptome. Bei dem Kind S.E.H. scheint das Vorliegen von S27G in Kombination mit der *Frameshift*-Mutation p.Leu23-Hisfs16X die Funktion von MDR3 so weit zu reduzieren, dass ein PFIC-3-Phänotyp entsteht. Der schwere Verlauf der Erkrankung bei S.E.H. spricht dafür, dass die Mutation S27G die Funktion des betroffenen Allels um mindestens 50 % vermindert. Bei Annahme einer Reduktion um 50 % durch die Mutation S27G und biallelischer Expression würde sich bei dieser Patientin eine geschätzte MDR3-Restfunktion in der Nähe des von Andress et al. postulierten Schwellenwertes von 25 % ergeben, ab welchem es wahrscheinlich zu einem schweren Phänotyp kommt. Ein niedriger Restanteil von S27G an der Membran wird auch durch die Immunhistochemie einer Leberprobe von S.E.H. unterstützt, in welcher keine MDR3-Immunreaktivität an der Membran nachgewiesen werden konnte (1).

Werden die Fälle beider Patienten (S.Z. und S.E.H.) betrachtet, könnte eine Restfunktion des S27G-betroffenen Allels in der Nähe von 50% geschätzt werden. Genotyp-Phänotyp-Korrelationen sind ohne funktionelle Studien und Kenntnisse über weitere prädisponierende Faktoren allerdings äußerst unsicher und der genaue Mechanismus, welcher bei S27G zur Krankheitsmanifestation führt bleibt unklar.

5.2.4.2 Die Mutationen S1076N, Q1174E und H1231Y

Die Mutation S1076N wurde bei einer Mutter (A.W.) und ihrem Sohn (E.W.) heterozygot gefunden. Der Sohn zeigte einen Verlauf von spontan reversibler, neonataler Cholestase und die Mutter eine intrahepatische Schwangerschaftscholestase (ICP), welche gut auf UDCA ansprach (1). Die Strukturanalyse sagt die Beeinträchtigung einer ATP-Bindestelle durch S1076N

voraus. Geht man bei heterozygotem Genotyp davon aus, dass nur ein Allel zu 50 % funktions-defizient ist, würde dies für eine MDR3-Gesamtfunktion von mindestens 75 % sprechen. Die leichten klinischen Verläufe der beiden betroffenen Patienten und die Reversibilität der Symptomatik unterstützen diese Einschätzung.

Die Mutation H1231Y wurde homozygot bei einem Kind (A.B.) konsanguiner Eltern gefunden (89). Das Kind präsentierte sich mit PFIC-3 ab dem Alter von einem Jahr (89). Wie schon oben und bei Dzagania et al. (89) diskutiert, führt H1231Y wahrscheinlich zu einem Funktionsdefekt jeweils einer Nukleotidbindedomäne jedes MDR3-Transporters (89). Auch hier könnte geschätzt werden, dass die Funktion jedes betroffenen Allels bzw. resultierenden MDR3 somit um mindestens 50 % reduziert wird. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Andress et al. (42) könnte die Beeinträchtigung der betroffenen Allele noch etwas höher als 50 % liegen, da das Kind einen (milderen) PFIC-3-Phänotyp zeigt und eine MDR3-Restfunktion unter 50 % zu erwarten wäre. Im Einklang mit der Immunhistochemie von Leberproben des Kindes (89) konnten die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass MDR3 mit der Mutation H1231Y sehr wahrscheinlich in vergleichbarer Dichte mit dem MDR3-Wildtyp an der kanalikulären Membran exprimiert wird.

Die Mutation Q1174E wurde bei einem einjährigen Kind (L.R.A.) Mit PFIC-3-Phänotyp gefunden. Die Symptomatik begann im Alter von sechs Wochen mit Pruritus und das Kind zeigte mit einem halben Jahr eine inkomplette Leberzirrhose in der Leberbiopsie (1). Die Mutation Q1174E lag *compound*-heterozygot mit der *Splice-Site*-Mutation c.286+1G>A vor, welche die *Splice*-Wahrscheinlichkeit nach Vorhersagen komplett verhindert (1). Bei Onkel (F.R.) und Tante (C.S.R.) des Kindes wurde nur die *Splice-Site*-Mutation heterozygot gefunden (1). Beide präsentierten sich mit milden Manifestationen im Vergleich zu dem Kind (L.R.A.). Die Tante (C.S.R.) zeigte seit dem Alter von sechs Jahren Episoden einer BRIC-ähnlichen Cholestase (*Benign recurrent intrahepatic Cholestasis*) und dauerhaft erhöhte Leberenzyme, welche sich während einer Schwangerschaft noch weiter erhöhten. Zudem wurden bei ihr intra- und extrahepatische Gallensteine gefunden. Der Onkel (F.R.) hatte ebenfalls seit der Kindheit erhöhte Leberwerte und entwickelte schon im Alter von 15 Jahren Gallensteine im Sinne einer LPAC. Im Verlauf zeigte sich bei ihm in der Leberbiopsie eine Leberzirrhose sowie eine leicht verminderte Immunreaktivität von MDR3 welche sehr wahrscheinlich auf die *Splice-Site*-Mutation zurückzuführen ist (1). In Kombination mit einem Wildtyp-Allel könnte die MDR3-Expression an der Membran bei Onkel (F.R.) und Tante (C.S.R.) möglicherweise um bis zu 50 % reduziert sein und die Symptome der Patienten gut erklären. Der weitaus schwerere Phänotyp der Nichte (L.R.A.), welche die *Frameshift*-Mutation ihrer Tante und ihres Onkels in Kombination mit der Mutante Q1174E zeigt, legt nahe, dass die Mutation Q1174E auf dem anderen Allel lokalisiert ist und somit den Krankheitsverlauf der Nichte aggraviert. Obwohl die pathogenetische Bedeutung der Mutante Q1174E aus dem Familienstammbaum nicht ausreichend sicher belegt werden kann, scheint Q1174E für den schwereren Phänotyp der Nichte verantwortlich zu sein. In Kluth et al. wurde Q1174E in *Pichia pastoris* exprimiert und die ATPase-Aktivität gemessen. Q1174E ließ sich durch Phospholipide

im Vergleich zum Wildtyp nicht stimulieren und die *in silico* Analyse weist auf einen Funktionsdefekt in der NBD/TMD Kommunikation hin (143). Bei dem betroffenen Kind L.R.A. könnte durch die *Splice-Site*-Mutation bereits eine Reduktion der MDR3-Funktion von 50% vorliegen, zudem noch der weitere Funktionsverlust durch die Mutation Q1174E, sodass die Restfunktion von MDR3 bei dem betroffenen Kind wahrscheinlich deutlich unter 50% liegt.

5.2.4.3 Schlussfolgerungen der Genotyp-Phänotyp Analyse

Ob sich die Analyse von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen, die Strukturanalyse und die Untersuchung des *Traffickings* und der Expression eignet, die vorliegende Restfunktion von mutiertem MDR3 und die damit verbundene Prognose von Patienten vorherzusagen, kann sich erst zeigen, wenn in Zukunft weitere Patienten mit ähnlichen Genotypen identifiziert werden und weiterhin Mutationen hinsichtlich ihrer Expression, des *Splicens*, der Maturation, der ATPase-Aktivität und des Substrattransportes charakterisiert wurden. Somit kann die Grundlage zur Entwicklung spezifischer Therapien gelegt werden. Das gute Ansprechen nahezu aller beschriebenen Patienten auf UDCA sowie die nach bisherigen Struktur- und Funktionsanalysen eher partiellen Defekte der MDR3-Funktion mit milden- bis asymptomatischen Verläufen, sprechen vor allem bei heterozygotem Vorliegen, für einen vergleichsweise leichten Verlauf MDR3-assoziiierter Erkrankungen basierend auf den Mutationen S27G, S1076N, Q1174E und H1231Y.

6. Schlussfolgerungen

Die MDR3-Isoform B unterscheidet sich nach der Expression in der Zellkultur mit HEK293-Zellen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von der Isoform A. Aufgrund der Kolokalisation mit dem Degradationsmarker Ubiquitin ist es möglich, dass die Isoform B auf Proteinebene vorzeitig abgebaut wird. Eine Funktion der Isoform B auf Proteinebene ist jedoch nicht auszuschließen. Ein Nachweis der Isoform B auf Proteinebene in der menschlichen Leber oder Untersuchungen zur Transportfunktion der Isoform könnten die Bedeutung dieser Isoform in Zukunft klären.

In den hier durchgeführten Experimenten ließ sich kein Hinweis auf einen deutlichen *Trafficking*-Defekt der MDR3-Mutanten S27G, S1076N, Q1174E und H1231Y feststellen. Die Methode der standardisierten Kolokalisationsauswertung ermöglicht einen statistischen Vergleich der Membranlokalisation der MDR3-Mutanten. Aufgrund des hohen Aufwands der Auswertung und aufgrund der Tatsache, dass starke *Trafficking*-Defekte auch ohne die standardisierte Kolokalisationsauswertung durch subjektiven, visuellen Vergleich der Präparate erkennbar sind, müsste die Methode der standardisierten Kolokalisationsauswertung zur Detektion geringer *Trafficking*-Defekte noch weiterentwickelt werden, um einen Vorteil verglichen mit der einfachen visuellen Auswertung zu bieten. In silico Analysen legen einen Funktionsdefekt von MDR3 bei Vorliegen der hier untersuchten Mutationen nahe. Um einen Funktionsdefekt der untersuchten MDR3-Mutanten nachzuweisen, könnten weitere in-vitro Experimente zum Substrattransport oder zur ATP-Hydrolyse durchgeführt werden (98,143)

Literaturverzeichnis

1. Kubitz R, Bode J, Erhardt A, Graf D, Kircheis G, Müller-Stöver I, et al. Cholestatic liver diseases from child to adult: The diversity of MDR3 disease. *Z Gastroenterol*. 2011;49(6):728–36.
2. Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol*. 2013; 3(3):1035–78.
3. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, et al. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem*. 1998;273(16):10046–50.
4. Noé J, Stieger B, Meier PJ. Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology*. 2002;123(5):1659–66.
5. Stieger B, Meier Y, Meier PJ. The bile salt export pump. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2007;453(5):611–20.
6. Ruetz S, Gros P. Phosphatidylcholine translocase: A physiological role for the *mdr2* gene. *Cell*. 1994;77(7):1071–81.
7. Van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, et al. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*. 1996;87(3):507–17.
8. Smit JJM, Schinkel AH, Elferink RPJO, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Homozygous disruption of the murine MDR2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*. 1993; 75(3):451–62.
9. Elferink RPJO, Paulusma CC, Groen AK. Hepatocanalicular transport defects: Pathophysiologic mechanisms of rare diseases. *Gastroenterology*. 2006;130(3):908–25.
10. Morita SY, Kobayashi A, Takanezawa Y, Kioka N, Handa T, Arai H, et al. Bile salt-dependent efflux of cellular phospholipids mediated by ATP binding cassette protein B4. *Hepatology*. 2007;46(1):188–99.
11. Elferink RP, Tytgat GN, Groen AK. Hepatic canalicular membrane 1: The role of *mdr2* P-glycoprotein in hepatobiliary lipid transport. *FASEB J*. 1997;11(1):19–28.
12. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, et al. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest*. 2002;110(5):671–80.
13. Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, et al. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest*. 2002;110(5):659–69.
14. Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, et al. ABCG5 and ABCG8 Are Obligate Heterodimers for Protein Trafficking and Biliary Cholesterol Excretion. *J Biol Chem*. 2003;278(48):48275–82.
15. Keppler D, König J, Büchler M. The canalicular multidrug resistance protein, cMRP/MRP2, a novel conjugate export pump expressed in the apical membrane of hepatocytes. *Adv Enzyme Regul*. 1997;37:321–33.
16. König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: Localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1999;1461(2):377–94.

17. Elferink RPJO, Bakker CTM, Roelofsen H, Middelkoop E, Ottenhoff R, Heijn M, et al. Accumulation of organic anion in intracellular vesicles of cultured rat hepatocytes is mediated by the canalicular multispecific organic anion transporter. *Hepatology*. 1993;17(3):434–44.
18. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *BBA - Biomembr*. 1976;455(1):152–62.
19. Ambudkar S V., Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, Cellular, and Pharmacological Aspects of the Multidrug Transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39(1):361–98.
20. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SPC. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: Biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab*. 2004;5(1):21–53.
21. Trauner M, Fickert P, Halilbasic E, Moustafa T. Lessons from the toxic bile concept for the pathogenesis and treatment of cholestatic liver diseases. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2008;158(19–20):542–8.
22. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, et al. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet*. 1998;20(3):233–8.
23. Groen A, Romero MR, Kunne C, Hoosdally SJ, Dixon PH, Wooding C, et al. Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology* 2011;141(5):1927–1937.
24. Oude Elferink RPJ, Paulusma CC. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2007;453(5):601–10.
25. Smit JJM, Schinkel AH, Mol CAAM, Majoor D, Mooi WJ, Jongsma APM, et al. Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Lab Investig*. 1994; 71(5):638–49.
26. Carey MC, Small DM. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man. *J Clin Invest*. 1978;61(4):998–1026.
27. Small DM. Role of ABC transporters in secretion of cholesterol from liver into bile. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):4–6.
28. Donovan JM, Timofeyeva N, Carey MC. Influence of total lipid concentration, bile salt:lecithin ratio, and cholesterol content on inter-mixed micellar/vesicular (non-lecithin-associated) bile salt concentrations in model bile. *J Lipid Res*. 1991;32(9):1501–12.
29. Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev*. 2003;83(2):633–71.
30. Lammert F, Wang DQH, Hillebrandt S, Geier A, Fickert P, Trauner M, et al. Spontaneous Cholecysto- and Hepatolithiasis in Mdr2-/- Mice: A Model for Low Phospholipid-Associated Cholelithiasis. *Hepatology*. 2004;39(1):117–28.
31. Roninson IB, Chin JE, Choi K, Gros P, Housman DE, Fojo A, et al. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(12):4538–42.
32. Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, et al. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology*. 2004;127(1):261–74.

33. Smith AJ, De Vree JML, Ottenhoff R, Oude Elferink RPJ, Schinkel AH, Borst P. Hepatocyte-specific expression of the human MDR3 P-glycoprotein gene restores the biliary phosphatidylcholine excretion absent in *Mdr2* (-/-) mice. *Hepatology*. 1998;28(2):530–6.
34. Nicolaou M, Andress EJ, Zolnercijs JK, Dixon PH, Williamson C, Linton KJ. Canalicular ABC transporters and liver disease. *Journal of Pathology*. 2012; 226(2):300–15.
35. Jacquemin E. Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease: One gene for three diseases. *Semin Liver Dis*. 2001;21(4):551–62.
36. De Vree JML, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(1):282–7.
37. Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R. MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology*. 2001;120(6):1459–67.
38. Savander M, Ropponen A, Avela K, Weerasekera N, Cormand B, Hirvioja ML, et al. Genetic evidence of heterogeneity in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut*. 2003;52(7):1025–9.
39. Lucena JF, Herrero JI, Quiroga J, Sangro B, Garcia-Foncillas J, Zabalegui N, et al. A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003;124(4):1037–42.
40. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4(1):1–12.
41. Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;36(Suppl.1):26–35.
42. Andress EJ, Nicolaou M, Romero MR, Naik S, Dixon PH, Williamson C, et al. Molecular mechanistic explanation for the spectrum of cholestatic disease caused by the S320F variant of ABCB4. *Hepatology*. 2014;59(5):1921–31.
43. Gordo-Gilart R, Andueza S, Hierro L, Martínez-Fernández P, D'Agostino D, Jara P, et al. Functional analysis of ABCB4 mutations relates clinical outcomes of progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 to the degree of MDR3 floppase activity. *Gut*. 2015;64(1):147–55.
44. Lang T, Haberl M, Jung D, Drescher A, Schlagenhauser R, Keil A, et al. Genetic Variability, Haplotype Structures and Ethnic Diversity of Hepatic Transporters MDR3 (ABCB4) and Bile Salt Export Pump (ABCB11) *Pharmacology*. 2006;34(9):1582–99.
45. Degiorgio D, Corsetto PA, Rizzo AM, Colombo C, Seia M, Costantino L, et al. Two ABCB4 point mutations of strategic NBD-motifs do not prevent protein targeting to the plasma membrane but promote MDR3 dysfunction. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(5):633–9.
46. Degiorgio D, Colombo C, Seia M, Porcaro L, Costantino L, Zazzeron L, et al. Molecular characterization and structural implications of 25 new ABCB4 mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3). *Eur J Hum Genet*. 2007;15(12):1230–8.
47. Colombo C, Vajro P, Degiorgio D, Coviello DA, Costantino L, Tornillo L, et al. Clinical features and genotype-phenotype correlations in children with progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 related to ABCB4 mutations. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;52(1):73–83.

48. Dixon PH. Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking. *Hum Mol Genet.* 2000;9(8):1209–17.
49. Dixon PH, Wadsworth CA, Chambers J, Donnelly J, Cooley S, Buckley R, et al. A comprehensive analysis of common genetic variation around six candidate loci for intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Am J Gastroenterol.* 2014;109(1):76–84.
50. Pauli-magnus C, Lang T, Meier Y, Zodan-marin T, Jung D, Breymann C, et al. Sequence analysis of bile salt export pump (ABCB11) and patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Pharmacogenetics.* 2003;14(2):91–102.
51. Lammert F, Marschall H-U, Glantz A, Matern S. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management. *J Hepatol.* 2000;33(6):1012–21.
52. Tribe RM, Dann AT, Kenyon AP, Seed P, Shennan AH, Mallet A. Longitudinal profiles of 15 serum bile acids in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(3):585–95.
53. Geenes V, Williamson C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J Gastroenterol.* 2009;15(17):2049–66.
54. Williamson C, Geenes V. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2014;124(1):120–33.
55. Kenyon AP, Piercy CN, Girling J, Williamson C, Tribe RM, Shennan AH. Obstetric cholestasis, outcome with active management: A series of 70 cases. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2002;109(3):282–8.
56. Williamson C, Hems LM, Goulis DG, Walker I, Chambers J, Donaldson O, et al. Clinical outcome in a series of cases of obstetric cholestasis identified via a patient support group. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2004;(111):676–81.
57. Glantz A, Marschall HU, Mattsson LÅ. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology.* 2004;40(2):467–74.
58. Rioseco AJ, Ivankovic MB, Manzur A, Hamed F, Kato SR, Parer JT, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: A retrospective case-control study of perinatal outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170(3):890–5.
59. Glantz A, Marschall HU, Lammert F, Mattsson LÅ. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: A randomized controlled trial comparing dexamethasone and ursodeoxycholic acid. *Hepatology.* 2005;40(2):467–74.
60. Chappell LC, Gurung V, Seed PT, Chambers J, Williamson C, Thornton JG. Ursodeoxycholic acid versus placebo, and early term delivery versus expectant management, in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy: Semifactorial randomised clinical trial. *BMJ.* 2012;344(7862):1–16.
61. Milkiewicz P, Gallagher R, Chambers J, Eggington E, Weaver J, Elias E. Obstetric cholestasis with elevated gamma glutamyl transpeptidase: Incidence, presentation and treatment. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18(11):1283–6.
62. Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, Boute O, Hadchouel M. Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet.* 1999;353(9148):210–1.
63. Gendrot C, Bacq Y, Brechot MC, Lansac J, Andres C. A second heterozygous MDR3 nonsense mutation associated with intrahepatic

- cholestasis of pregnancy. *J Med Genet*. 2003;40(3):2–4.
64. Keitel V, Vogt C, Häussinger D, Kubitz R. Combined Mutations of Canalicular Transporter Proteins Cause Severe Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Gastroenterology*. 2006;131(2):624–9.
 65. Reyes H, Simon FR. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: An estrogen-related disease. *Seminars in Liver Disease*. 1993;13(3):289–301.
 66. Sundaram SS, Sokol RJ. The multiple facets of ABCB4 (MDR3) deficiency. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2007;10(6):495–503.
 67. Pauli-Magnus C, Meier PJ, Stieger B. Genetic determinants of drug-induced cholestasis and intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Semin Liver Dis*. 2010;30(2):147–59.
 68. Ganne-Carrié N, Baussan C, Grando V, Gaudelus J, Cresteil D, Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 revealed by oral contraceptive pills. *J Hepatol*. 2003;38(5):693–4.
 69. Rosmorduc O, Hermelin B, Boelle PY, Parc R, Taboury J, Poupon R. ABCB4 gene mutation-associated cholelithiasis in adults. *Gastroenterology*. 2003;125(2):452–9.
 70. Rosmorduc O, Poupon R. Low phospholipid associated cholelithiasis: Association with mutation in the MDR3/ABCB4 gene. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2(1):1–6.
 71. Kubitz R, Brinkmeyer C, Sagir A, Herebian D, Häussinger D. Genetic variants of the bile salt export pump: Inducers and modifiers of liver diseases. *Dig Dis*. 2011;29(1):89–92.
 72. Ziol M, Barbu V, Rosmorduc O, Frassati-Biaggi A, Barget N, Hermelin B, et al. ABCB4 Heterozygous Gene Mutations Associated With Fibrosing Cholestatic Liver Disease in Adults. *Gastroenterology*. 2008;135(1):131–41.
 73. Tougeron D, Fotsing G, Barbu V, Beauchant M. ABCB4/MDR3 gene mutations and cholangiocarcinomas. *J Hepatol*. 2012;57(2):467–8.
 74. Wise C, Pilanthananond M, Perry BF, Alpini G, McNeal M, Glaser SS. Mechanisms of biliary carcinogenesis and growth. *World J Gastroenterol*. 2008;14(19):2986–9.
 75. Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2000;60(1):184–90.
 76. Chen HL, Chen HL, Liu YJ, Feng CH, Wu CY, Shyu MK, et al. Developmental expression of canalicular transporter genes in human liver. *J Hepatol*. 2005;43(3):472–7.
 77. Dröge C, Häussinger D, Keitel V. Genetic variants in adult liver diseases. *Z Gastroenterol*. 2015;53(12):1436–46.
 78. Smith AJ, Van Helvoort A, Van Meer G, Szabó K, Welker E, Szakács G, et al. MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem*. 2000;275(31):23530–9.
 79. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. 2001;42(7):1007–17.
 80. Van der Blik AM, Baas F, Ten Houte de Lange T, Kooiman PM, Van der Velde-Koerts T, Borst P. The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J*. 1987;6(11):3325–31.
 81. Higgins CF. ABC Transporters: From microorganisms to man. *Annu Rev*

- Cell Biol. 1992;8:67–113.
82. Holland IB, A. Blight M. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol.* 1999;293(2):381–99.
 83. Schmitt L, Tampé R. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol.* 2002;12(6):754–60.
 84. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1982;1(8):945–51.
 85. Zaitseva J, Jenewein S, Jumpertz T, Holland IB, Schmitt L. H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J.* 2005;24(11):1901–10.
 86. Janas E, Hofacker M, Chen M, Gompf S, Van der Does C, Tampé R. The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. *J Biol Chem.* 2003;278(29):26862–9.
 87. Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(10):918–26.
 88. Jardetzky O. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature.* 1966;211(5052):969–70.
 89. Dzagania T, Engelmann G, Häussinger D, Schmitt L, Flechtenmacher C, Rtskhiladze I, et al. The histidin-loop is essential for transport activity of human MDR3. A novel mutation of MDR3 in a patient with progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Gene.* 2012;506(1):141–5.
 90. Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, et al. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell.* 2000;101(7):789–800.
 91. Locher KP. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23(6):487–93.
 92. Oswald C, Holland IB, Schmitt L. The motor domains of ABC-transporters: What can structures tell us? *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2006;372(6):385–99.
 93. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Harrell PM, et al. Structure of P-glycoprotein. 2009;323(5922):1718–22.
 94. Dawson RJP, Locher KP. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature.* 2006;443(7108):180–5.
 95. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna Z, Calcagno AM, Ambudkar S, et al. A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science.* 2007;315(11):525–9.
 96. Chamary J V., Parmley JL, Hurst LD. Hearing silence: Non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat Rev Genet.* 2006;7(2):98–108.
 97. Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Delautier D, Rada A, Gautherot J, Jacquemin E, et al. A missense mutation in ABCB4 gene involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 leads to a folding defect that can be rescued by low temperature. *Hepatology.* 2009;49(4):1218–27.
 98. Park HJ, Kim TH, Kim SW, Noh SH, Cho KJ, Choi C, et al. Functional characterization of ABCB4 mutations found in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Sci Rep.* 2016;6(2):1–9.

99. Gautherot J, Delautier D, Maubert MA, Aït-Slimane T, Bolbach G, Delaunay JL, et al. Phosphorylation of ABCB4 impacts its function: Insights from disease-causing mutations. *Hepatology*. 2014;60(2):610–21.
100. Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Dossier C, Falguières T, Gautherot J, Davit-Spraul A, et al. A functional classification of ABCB4 variations causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Hepatology*. 2016;63(5):1620–31.
101. Huang L, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, et al. Farnesoid X Receptor Activates Transcription of the Phospholipid Pump MDR3. *J Biol Chem*. 2003;278(51):51085–90.
102. Ijssennagger N, Janssen AWF, Milona A, Ramos Pittol JM, Hollman DAA, Mokry M, et al. Gene expression profiling in human precision cut liver slices in response to the FXR agonist obeticholic acid. *J Hepatol*. 2016;64(5):1158–66.
103. Liu Y, Binz J, Numerick MJ, Dennis S, Luo G, Desai B, et al. Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *J Clin Invest*. 2003;112(11):1678–87.
104. Chianale J, Vollrath V, Wielandt AM, Amigo L, Rigotti A, Nervi F, et al. Fibrates induce mdr2 gene expression and biliary phospholipid secretion in the mouse. *Biochem J*. 1996;314(3):781–6.
105. Shoda J, Okada K, Inada Y, Kusama H, Utsunomiya H, Oda K, et al. Bezafibrate induces multidrug-resistance P-Glycoprotein 3 expression in cultured human hepatocytes and humanized livers of chimeric mice. *Hepatol Res*. 2007;37(7):548–56.
106. Ghonem NS, Ananthanarayanan M, Soroka CJ, Boyer JL. Peroxisome proliferator-activated receptor α activates human multidrug resistance transporter 3/ATP-binding cassette protein subfamily B4 transcription and increases rat biliary phosphatidylcholine secretion. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):1030–42.
107. Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. Nuclear Receptors and the Control of Metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2003;65(1):261–311.
108. Kipp H, Arias IM. Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. *J Biol Chem*. 2000;275(21):15917–25.
109. Kubitz R, Sütfels G, Köhlkamp T, Kölling R, Häussinger D. Trafficking of the Bile Salt Export Pump from the Golgi to the Canalicular Membrane Is Regulated by the p38 MAP Kinase. *Gastroenterology*. 2004;126(2):541–53.
110. Kipp H, Arias IM. Trafficking of Canalicular ABC Transporters in Hepatocytes. *Annu Rev Physiol*. 2002;64(1):595–608.
111. Slimane TA, Trugnan G, Van IJzendoorn SCD, Hoekstra D. Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains. *Mol Biol Cell*. 2003;14(2):611–24.
112. Ikebuchi Y, Takada T, Ito K, Yoshikado T, Anzai N, Kanai Y, et al. Receptor for activated C-kinase 1 regulates the cellular localization and function of ABCB4. *Hepatol Res*. 2009;39(11):1091–107.
113. Dröge C, Stindt J, Linnemann D, Stross C, Häussinger D, Kubitz R. Expression of different isoforms of MDR3 from human liver. *EASL Barcelona 2012*.

114. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. The spectrum of liver diseases related to ABCB4 gene mutations: Pathophysiology and clinical aspects. *Semin Liver Dis.* 2010;30(2):134–46.
115. Falguières T, Aït-Slimane T, Housset C, Maurice M. ABCB4: Insights from pathobiology into therapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2014;38(5):557–63.
116. Gautherot J, Durand-Schneider AM, Delautier D, Delaunay JL, Rada A, Gabillet J, et al. Effects of cellular, chemical, and pharmacological chaperones on the rescue of a trafficking-defective mutant of the ATP-binding cassette transporter proteins ABCB1/ABCB4. *J Biol Chem.* 2012;287(7):5070–8.
117. Kim TH, Park HJ, Choi JH. Functional Characterization of ABCB4 Mutations Found in Low Phospholipid-Associated Cholelithiasis (LPAC). *Korean J Physiol Pharmacol* 2013;17(6):525-30.
118. Khabou B, Siala-Sahnoun O, Gargouri L, Mkaouar-Rebai E, Keskes L, Hachicha M, et al. In silico investigation of the impact of synonymous variants in ABCB4 gene on mRNA stability/structure, splicing accuracy and codon usage: Potential contribution to PFIC3 disease. *Comput Biol Chem.* 2016;65:103–9.
119. Welch WJ. Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2004; 15(1):31-8.
120. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36(1):59–72.
121. Stindt J. Studies on ABC Transporters from Human Liver in Heterologous Expression Systems. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2010.
122. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983;66:5557-80.
123. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology.* 1992;24:17–27.
124. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487–91.
125. Stindt J, Ellinger P, Stross C, Keitel V, Häussinger D, Smits SHJ, et al. Heterologous overexpression and mutagenesis of the human bile salt export pump (ABCB11) using DREAM (Directed REcombination-Assisted Mutagenesis). *PLoS One.* 2011;6(5):1-8.
126. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.* 1984;247(3 Pt 1):0–4.
127. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning.* 1988;10(4):128–38.
128. Carl Zeiss. LSM 510 Laser Scanning Microscope. Operating Manual. 1998.
129. Jordan P, Simbürger E, Hehl S. Confocal Microscopy. Zeiss LSM 510 and Zeiss LSM 510 Meta. Guided Tour. Edited and complemented by Simbürger E and Hehl S. Carl Zeiss Jena GmbH
130. Manders EMM, Stap J, Brakenhoff GJ, Van Driel R, Aten JA. Dynamics of

- three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci.* 1992;103(3):857–62.
131. Adler J, Parmryd I. Quantifying colocalization by correlation: The pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytom Part A.* 2010;77(8):733–42.
 132. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(72):248–54.
 133. Read SM, Northcote DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem.* 1981;116(1):53–64.
 134. De St. Groth SF, Webster RG, Datyner A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *BBA - Biochim Biophys Acta.* 1963;71:377–91.
 135. Reisner AH, Nemes P, Bucholtz C. The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1975;64(2):509–16.
 136. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5.
 137. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. A Cellular Response to Misfolded Proteins Aggregates : *Cell.* 2012;143(7):1883–98.
 138. Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. ERAD: The long road to destruction. *Nat Cell Biol.* 2005;7(8):766–72.
 139. Chen C jie, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell.* 1986;47(3):381–9.
 140. Eggensperger S, Tampé R. The transporter associated with antigen processing: A key player in adaptive immunity. *Biol Chem.* 2015;396(9–10):1059–72.
 141. Delaunay JL, Bruneau A, Hoffmann B, Durand-Schneider AM, Barbu V, Jacquemin E, et al. Functional defect of variants in the adenosine triphosphate-binding sites of ABCB4 and their rescue by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator, ivacaftor (VX-770). *Hepatology.* 2017;65(2):560–70.
 142. Gordo-Gilart R, Andueza S, Hierro L, Jara P, Alvarez L. Functional rescue of trafficking-impaired ABCB4 mutants by chemical chaperones. *PLoS One.* 2016;11(2):1–14.
 143. Kluth M, Stindt J, Dröge C, Linnemann D, Kubitz R, Schmitt L. A mutation within the extended X loop abolished substrate-induced ATPase activity of the human liver ATP-binding cassette (ABC) transporter MDR3. *J Biol Chem.* 2015;290(8).
 144. Frider B, Castillo A, Gordo-Gilart R, Bruno A, Amante M, Alvarez L, et al. Reversal of advanced fibrosis after long-term ursodeoxycholic acid therapy in a patient with residual expression of MDR3. *Ann Hepatol.* 2015;14(5):745–51.
 145. Domanova O, Borbe S, Mühlfeld S, Becker M, Kubitz R, Häussinger D, et al. Toponomics method for the automated quantification of membrane protein translocation. *BMC Bioinformatics.* 2011;12(1):370.
 146. Byrne JA, Strautnieks SS, Ihrke G, Pagani F, Knisely AS, Linton KJ, et al.

- Missense mutations and single nucleotide polymorphisms in ABCB11 impair bile salt export pump processing and function or disrupt pre-messenger RNA splicing. *Hepatology*. 2009;49(2):553–67.
147. Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ, et al. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell*. 2002;10(1):139–49.
 148. Davidson AL, Sharma S. Mutation of a single MalK subunit severely impairs maltose transport activity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1997;179(17):5458–64.
 149. Shyamala V, Baichwal V, Beall E, Ferro-Luzzi Ames G. Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem*. 1991;266(28):18714–9.
 150. Zimmer V, Müllenbach R, Simon E, Bartz C, Matern S, Lammert F. Combined functional variants of hepatobiliary transporters and FXR aggravate intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Liver Int*. 2009;29(8):1286–8.
 151. Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Köhlkamp T, Keppler D, Häussinger D, et al. Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 2005;41(5):1160–72.
 152. Poupon R, Barbu V, Chamouard P, Wendum D, Rosmorduc O, Housset C. Combined features of low phospholipid-associated cholelithiasis and progressive familial intrahepatic cholestasis 3. *Liver Int*. 2010;30(2):327–31.
 153. Ortiz D, Arias IM. MDR3 mutations: A glimpse into Pandora's box and the future of canalicular pathophysiology. *Gastroenterology*. 2001;120(6):1549–52.
 154. Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM, Klein K, Schaeffeler E, Nussler AK, et al. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology*. 2006;44(1):62–74.
 155. Linnemann, D., Dröge C., Stindt J., Cajani S., Stross C., Häussinger D., Kubitz R. Expression verschiedener MDR3 Isoformen und Mutationen in der Leber. Poster beim Doktorandenkongress der Heinrich-Heine Universität 2012.

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Ralf Kubitz für das Thema der Dissertation und die sehr gute Unterstützung und Betreuung während der gesamten Zeit.

Ich bin dankbar für sein fachliches Wissen, die Korrekturen und die vielen praktischen Methoden, die ich durchführen durfte.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Joachim Schmitt für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Ulrich Germing für seine Bereitschaft als dritter Prüfer an der Prüfung teilzunehmen.

Herrn Prof. Dieter Häussinger danke ich als früherem und Prof. Tom Lüdde als aktuellem Institutsdirektor.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe und allen LabormitarbeiterInnen welche mir immer geholfen und für eine gute Arbeitsatmosphäre im Labor gesorgt haben. Frau Dr. Claudia Stross, danke ich, dass sie mich zu Beginn im Labor sehr gut eingearbeitet und unterstützt hat und Herrn Dr. Jan Stindt danke ich für die sehr gute weitere Betreuung, Motivation und das fachliche Wissen zu allen Zeiten.

Bei den Leitenden und TeilnehmerInnen des Graduierten Kollegs bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in die Gruppe, die lehrreichen Seminare und die schöne Zeit während und nach der Arbeit.

Meinen StudienfreundInnen danke ich für die schöne gemeinsame Zeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern, die immer für mich da waren.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist.

Doris Linnemann