

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

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Tom Lüdde

**Untersuchungen krankheitsassoziierter Mutationen  
der Bile Salt Export Pump  
in HEK293-Zellen**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Katharina Adomaitis

2024

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

gez.: apl. Prof. Dr. med. Ralf Kubitz

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ralf Kubitz

Zweitgutachterin: PD Dr. rer. nat. Doreen M. Floß

## Widmung

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:  
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,  
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,  
wieder wegzuwerfen.

- Albert Einstein -

Meiner Familie

# Zusammenfassung

Die *Bile Salt Export Pump* (BSEP)- ein ABC- Transporter lokalisiert in der apikalen Membran von Hepatozyten- stellt als effektiver Transporter für Gallensalze den Gallefluss sicher.

Gallensalze sind essenziell für die Bildung gemischter Mizellen, mit deren Hilfe die Resorption von fettlöslichen Vitaminen und Fettsäuren im Dünndarm möglich wird und spielen eine wichtige Rolle bei der Elimination von Cholesterin.

Eine mutationsbedingte Fehlfunktion von BSEP führt zu einer Abnahme des kanalikulären Galleflusses d.h. zur Cholestase und dadurch folgend zu einer Akkumulation von Gallensalzen in den Hepatozyten und schließlich auch im Blut. Aufgrund ihrer Wirkung als Detergenzien sind Gallensalze in hohen Konzentrationen toxisch und aktivieren proapoptotische Signalwege. Klinisch zeigt sich dies dann in Erkrankungen wie der progressiven intrahepatischen Cholestase Typ 2 (*PFIC-2*), der benignen rekurrenden intrahepatischen Cholestase Typ 2 (*BRIC-2*) oder der Schwangerschaftscholestase (*intrahepatic cholestasis of pregnancy /ICP*).

Welchen Einfluss die Mutationen p.W342G, p.N591S, p.G648V und p.R698H auf die Expression, das *Trafficking* bzw. die subzelluläre Lokalisation und die Transportaktivität von BSEP ausüben, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Hierfür wurde die Mutation-tragende cDNA von BSEP mittels *Directed Recombination-Assisted Mutagenesis (DREAM)* realisiert und durch transiente Transfektion in HEK293-Zellen exprimiert. Die subzelluläre Lokalisation und Expression von BSEP wurde in fünf verschiedenen Sets anhand eines C-terminal fusionierten *enhanced Yellow Fluorescent Proteins* (EYFP) per konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Transportaktivität der BSEP-Mutationen wurde über einen [<sup>3</sup>H]-Taurocholat-Transportassay auf der Basis von HEK293-Gesamtmembranvesikeln gemessen.

Hierbei zeigte sich, dass die Mutationen p.W342G und p.G648V einen Effekt auf die Expression (60% bzw. 49% im Vergleich zum Wildtyp) nicht jedoch auf die subzelluläre Lokalisation bzw. das *Trafficking* von BSEP ausüben. Durch die Mutationen p.N591S und p.R698H scheint BSEP dagegen weder in Expression noch im *Trafficking* beeinflusst zu werden. Diese beiden Mutationen weisen jedoch eine um jeweils 50% verminderte Transportaktivität im Vergleich zum Wildtyp auf. Auch bei p.G648V erwies sich die Transportaktivität von BSEP als stark vermindert, durch p.W342G wurde die Aktivität hingegen kaum beeinflusst (28% bzw. 74% Transportaktivität im Vergleich zum Wildtyp). Dies veranschaulicht, dass den Erkrankungen und Mutationen unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde liegen und entsprechend angepasste Therapieansätze notwendig sind.

Hierfür stehen zum einen der Proteasom-Inhibitor MG132 oder das als Chaperon dienende 4-Phenylbutyrat zur Verfügung um mutationsbedingte Protein- Fehlfaltungen, welche sich wie beispielsweise bei p.W342G mit einer isolierten Expressionsminderung präsentieren, zu verbessern bzw. ihren verfrühten Abbau in den Proteasomen zu verhindern.

Um eine verminderte BSEP-Aktivität wie bei p.N591S und p.R698H durch quantitativ mehr vorhandenes BSEP ausgleichen zu können, käme eine Therapie mit Ursodeoxycholsäure (UDCA) oder den FXR-Agonisten wie beispielsweise Obeticholsäure in Frage.

Wirkungsweise und -effizienz der genannten Therapeutika müssten jedoch noch in weiterführenden Studien untersucht werden.

## Summary

The bile salt export pump localized at the apical membrane of hepatocytes is one of the effective transport systems which ensure bile acid excretion.

Arrived in the gut lumen bile acids are essential for formation of mixed micelles with those resorption of liposoluble vitamins and fatty acids as well as the removal of cholesterol becomes possible.

Dysfunction of BSEP can lead to cholestasis and thereby to accumulation of bile salts in hepatocytes and finally in blood. Because of their detergent effect the accumulation of bile salts is toxic and activates proapoptotic signaling pathways. Through this cholestasis can result in liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2), benign recurrent cholestasis type 2 (BRIC2), and intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) are hereditary diseases of varying severity caused by cholestasis due to BSEP mutations.

To gain insight the correlation between point mutation and severity of the described hereditary diseases and to identify the different pathomechanisms the BSEP mutations p.W342G, p.N591S, p.G648V, and p.R698H were analysed with respect to protein expression, localization and bile salt transport.

Therefore BSEP mutations were introduced into a plasmid and tagged to the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) for transient expression in HEK293 cells. Localization and expression levels of BSEP mutants were compared to wildtype BSEP by quantitative confocal laser scanning microscopy analysis using the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a membrane marker. Transport activity of BSEP mutations was measured with a [<sup>3</sup>H]-taurocholate transport assay using HEK293 total membrane vesicles.

Compared to wildtype BSEP, the PFIC-associated mutation p.W342G and the BRIC-related variant p.G648V showed reduced expression of 60% and 49%, respectively, while relative plasma membrane localization was practically unchanged. Localization and expression of the ICP-associated mutation p.N591S and p.R698H, also found in PFIC patients, were not affected, while their transport activity was reduced to 50%. p.W342G and p.G648V resulted in reduced transporter activity of 74% and 28%, respectively.

While p.W342G showed a decreased expression level but robust transport, the p.N591S and p.R698H mutations did not decrease expression but impaired transport. The p.G648V mutant was both less expressed and less transport active. These findings illustrate the involvement of different pathomechanisms in BSEP-disease. This may help to select more specific therapies for BSEP-associated cholestasis for example the possibility of therapy with ursodeoxycholic acid (UDCA) or FXR-agonists like obeticholic acid (OCA). Both bile acids lead to increased BSEP expression and could therefore compensate, by unimpaired trafficking, the reduced activity caused by for example by p.N591S and p.R698H. 4-Phenylbutyrate which functions as chaperone could potentially stabilize mismatched folding of proteins like caused by p.W342G and p.G648V which influences BSEP-Expression. However, this should be investigated in further studies.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
1 Einleitung.....	- 1 -
1.1 Gallensalz-Synthese und enterohepatischer Kreislauf .....	- 1 -
1.2 Aufgaben der Gallensalze .....	- 5 -
1.3 Funktion, Aufbau und Regulation von BSEP .....	- 8 -
1.4 BSEP-assoziierte Erkrankungen .....	- 12 -
1.4.1 <i>Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2)</i> .....	- 12 -
1.4.2 <i>Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 (BRIC2)</i> .....	- 14 -
1.4.3 <i>Intrahepatic cholestasis of pregnancy- ICP</i> .....	- 15 -
2 Problemstellung.....	- 17 -
3 Material und Methoden.....	- 18 -
3.1 Material .....	- 18 -
3.1.1 Chemikalien und Oligonukleotide für die DREAM-Mutagenese.....	- 18 -
3.1.2 SDS-PAGE und Western-Blot .....	- 20 -
3.1.3 Puffer.....	- 21 -
3.1.4 Kulturen und Medien.....	- 23 -
3.1.5 Marker und Antikörper .....	- 24 -
3.1.6 Technische Geräte.....	- 24 -
3.1.7 Verbrauchsmaterial .....	- 26 -
3.2 Methoden.....	- 27 -
3.2.1 BSEP-Mutagenese mittels <i>Directed- Recombination-Assisted Mutagenesis (DREAM)</i> .....	- 27 -
PCR und DNA-Fällung.....	- 29 -
Transformation der cDNA in Hefe ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	- 29 -
3.2.2 Transiente Transfektion/Expression von BSEP in HEK293-Zellen ....	- 30 -
3.2.3 Fixieren der HEK293-Zellen und Immunfluoreszenzfärbung.....	- 30 -
3.2.4 Mikroskopische Beurteilung und statistische Auswertung von BSEP-Expression und - Kolokalisation .....	- 31 -
3.2.5 Transiente Transfektion, Membranpräparation und Proteinbestimmung nach Bradford .....	- 35 -
3.2.6 Western Blot und densitometrische Auswertung .....	- 36 -
3.2.7 <sup>3</sup> H-Taurocholat-Uptake-Messung.....	- 38 -
4 Ergebnisse .....	- 40 -
4.1 Die untersuchten BSEP-Mutationen.....	- 40 -

4.2	Expression und Trafficking der BSEP-Mutationen in HEK293-Zellen.....	- 46 -
4.3	Aktivität der BSEP-Mutationen.....	- 47 -
5	Diskussion .....	- 49 -
5.1	Expression und Aktivität im Vergleich mit.....	- 49 -
	vorbeschriebenen BSEP-Mutationen .....	- 49 -
5.2	BSEP- Aktivität abhängig von Expression und Lebensdauer des Proteins?.	- 52 -
	-	
5.3	Therapieansätze.....	- 53 -
6	Schlussfolgerung .....	- 55 -
7	Literatur- und Quellenverzeichnis .....	- 57 -
8	Danksagung.....	- 66 -

# Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette	ICP	intrahepatic cholestasis of pregnancy
ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter	MAPK	mitogen-activated protein kinase
ATP	adenosine triphosphate	mg	milligram
BRIC	benign recurrent intrahepatic cholestasis	µg	microgram
BSA	bovine serum albumine	mRNA	messenger ribonucleic acid
BSEP	bile salt export pump	MRP2	multidrug resistance protein 2
CAR	constitutive androstane receptor	MRP3	multidrug resistance protein 3
CIC	contraceptive induced cholestasis	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium/Kalium -ATPase
Cryo EM	<i>cryogenic electron microscopy</i>	NBD	ATP-binding domain
DNA	deoxyribonucleic acid	NTCP	sodium-taurocholate-cotransporting-polypeptide
dNTP	deoxynucleotide triphosphate	OATP	organic- anion-transporting-polypeptides
DILI	drug induced liver injury	OCA	obeticholic acid
DREAM	directed- recombination-assisted- mutagenesis	OST	organic solute transporter
E. coli	Escherichia coli	PAGE	poly acrylamide gel electrophoresis
ER-pathway	endoplasmic reticulum associated Pathway	PCR	polymerase chain reaction
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein	PFIC2	progressive familial intrahepatic cholestasis type 2
FXR	farnesoid X receptor	PKC	protein kinase C
HEK	human embryonal kidney	pKs	Säurekonstante
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	PXR	pregnane X Receptor
HLPC	high performance liquid chromatography	rpm	revolutions per minute
HRP	horse-radish peroxidase	RXR	retinoic X receptor
		S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae

SDS	Sodium- Dodecyl-Sulfate	TMD	transmembrane domain
SNP	single nucleotide polymorphism	UDCA	Ursodeoxycholic acid
T(D)C	tauro(deoxy)cholic acid	VDR	vitamin D receptor
TEMED	tetramethylethylenediamine	YNB	yeast nitrogen broth
TGR 5	G protein-coupled receptor 5	YPD	yeast peptone dextrose
Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminoethane		

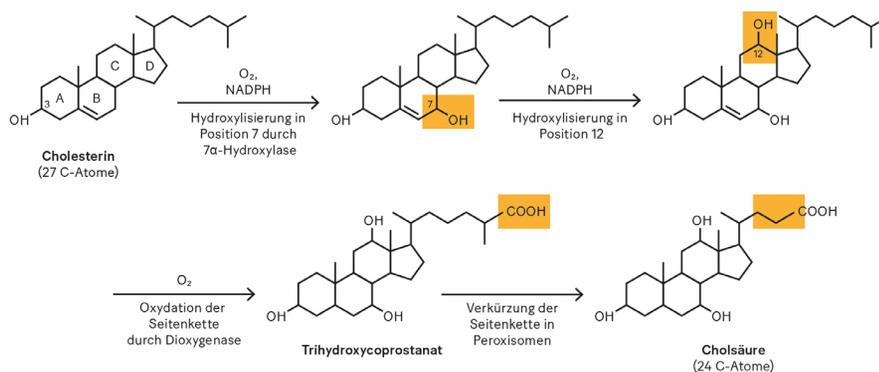
# 1 Einleitung

## 1.1 Gallensalz-Synthese und enterohepatischer Kreislauf

Gallensalze werden in der Leber aus Cholesterin synthetisiert. Durch ihre amphiphile Eigenschaft sind sie ein wichtiger Bestandteil des Lipidstoffwechsels. So halten sie beispielsweise einerseits Cholesterin in der Galle in Lösung und verhindern damit die Ausbildung von Gallensteinen, andererseits fördern Gallensalze durch Bildung gemischter Mizellen im Dünndarmlumen die Verdauung von Lipiden und stimulieren die Resorption von Cholesterin, fettlöslichen Vitaminen und Fettsäuren <sup>1</sup>.

Die 7 $\alpha$ -Hydroxylase katalysiert im klassischen Weg der Gallensalzsynthese im glatten endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gallensalzsynthese aus Cholesterin. Durch weitere Hydroxylierungen und die Abspaltung der Seitenkette von Cholesterin durch die mitochondriale 27 $\alpha$ -Hydroxylase entstehen aus Cholesterin zunächst die Gallensäuren Cholsäure (3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -Trihydroxycholansäure) und Chenodesoxycholsäure (3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -Dihydroxycholansäure). Im alternativen Weg der Gallensäuresynthese wird zu Beginn die Seitenkette von Cholesterin abgespaltet und anschließend das Spaltprodukt weiter hydroxyliert <sup>2, 3</sup>. Jedoch werden nur ca. 10% aller Gallensalze über den alternativen Syntheseweg produziert <sup>4</sup>.

Im nächsten Schritt werden die Gallensäuren mit Acetyl-CoA aktiviert, um anschließend mit Glycin oder Taurin konjugiert werden zu können. Aus den Gallensäuren werden dadurch weniger hydrophobe und damit weniger toxische primäre Gallensalze generiert. Die Verbindung der Gallensäuren mit Glycin oder Taurin bewirkt außerdem eine Verminderung des pKs-Wertes (von 5 auf ca. 4 durch die Konjugation mit Glycin und ca. 2 durch die Konjugation mit Taurin), was die Mizellenbildung im sauren Milieu des Duodenums erleichtert <sup>4, 5</sup>. Eine Übersicht zur Synthese primärer Gallensalze zeigt hierzu Abbildung 1.



**Abbildung 1:** Strukturmodell-Darstellung der einzelnen Schritte der Synthese primärer Gallensalze. Angelehnt an die Grafik aus „Duale Reihe; Biochemie“; 2. Auflage von 2008<sup>6</sup>.

## Einleitung

Unkonjugierte und damit hydrophobere und unvollständig ionisierte Gallensäuren können durch die Zellmembran der Hepatozyten diffundieren, konjugierte Gallensalze benötigen dagegen spezifische Transporter wie die *Bile Salt Export Pump* (BSEP) oder das *Multidrug Resistance Protein 2* (MRP2), die mit Hilfe von ATP die primären Gallensalze von den Hepatozyten über die apikale kanalikuläre Membran in die Gallekanälchen transportieren<sup>7,8</sup>.

Von den Gallekanälchen gelangt die Galle über die Gallengänge nun zunächst in die Gallenblase, um dort zwischengespeichert und konzentriert zu werden. Neben dem Hauptbestandteil Wasser (82%) besteht der restliche Anteil der Galle zu 80% aus Gallensalzen, zu 15% aus Phosphatidylcholin (Lecithin), zu 5% aus Cholesterin sowie aus konjugiertem Bilirubin, Proteinen (IgA), Elektrolyten, Muzinen und entgifteten Stoffwechselprodukten wie zum Beispiel Medikamenten<sup>9,10</sup>.

Kommt es zur Aufnahme von fettreicher Nahrung, so wird aus den enteroendokrinen Zellen der Mukosa von Duodenum, Jejunum und proximalem Ileum Cholezystokinin ausgeschüttet. Es induziert zum einen die Kontraktion der glatten Muskulatur der Gallenblase und der Gallenwege und zum anderen die Relaxation des Musculus sphincter Oddi. Die Galle kann so nun ins Lumen des Duodenums gelangen. Im Duodenum unterstützen die primären Gallensalze durch Mizellenbildung den Abbau von Lipiden durch die Pankreaslipase und die Resorption von Fettsäuren, fettlöslichen Vitaminen und Cholesterin<sup>11</sup>.

Die bakterielle Flora (z.B. *E. coli* und *Bifidobacterium spec.*) in Ileum und Colon bewirkt den Umbau der primären Gallensalze zu sekundären Gallensalzen. Dabei werden die primären Gallensalze zunächst durch bakterielle Hydrolasen dekonjugiert, bevor sie anschließend durch die anaerobe bakterielle Flora  $7\alpha$ -dehydroxyliert werden. Aus Cholsäure (CA) entsteht so Desoxycholsäure (DCA) und aus Chenodesoxycholsäure (CDCA) Lithocholsäure (LCA)<sup>12</sup>. Aus CDCA kann über Epimerisierung der  $7\alpha$ -Hydroxylgruppe zu  $7\beta$ - mit Hilfe von Bakterien des Phylums *Clostridium* jedoch auch Ursodeoxycholsäure (UDCA) entstehen<sup>5</sup>.

Je weniger Hydroxylgruppen ein Gallensalz besitzt um so hydrophober und zytotoxischer ist es. Der „Hydrophobic-Index (HI)“ dient dabei als Maß für die Hydrophobie eines Gallensalzes. Ermittelt wird er, basierend auf dem hydrophoben bzw. hydrophilen Leistungs- und Fassungsvermögen eines Gallensalzes, mittels Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)<sup>13,14</sup>.

Beim Hydrophilic-Hydrophobic-Index (HHI)“ wird hingegen der hydrophile oder hydrophobe Charakter des jeweiligen Gallensalzes mit Cholsäure (CA) verglichen. Ein kleinerer HHI als der von CA bedeutet, dass das jeweilige Gallensalz (z.B. UDCA) weniger hepatotoxisch ist. Bei einem HHI > CA wird dem jeweiligen Gallensalz (z.B. LCA oder DCA) eine hepatotoxische Wirkung zugesprochen<sup>13-15</sup>.

Dekonjugierte, lipophilere Gallensalze können über passive Diffusion im oberen Dünndarm reabsorbiert werden. Der größte Anteil der Gallensalze (95%) wird jedoch im terminalen Ileum über einen apikalen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Gallensalztransporter (ASBT) in die Enterozyten transportiert. Von den Enterozyten gelangen die Gallensalze über den an der basolateralen Membran befindlichen *Organic Solute Transporter  $\alpha/\beta$*  (OST  $\alpha/\beta$ ) sowie über das *Multidrug-Resistance-Protein 3* (MRP3) in das Blut der Vena portae<sup>16,17</sup>. MRP3 transportiert hierbei, neben Estradiol und Bilirubin, besonders Taurocholat, Glycocholat und sulfatierte

## Einleitung

Gallensalze<sup>4,18</sup>, OST  $\alpha/\beta$  hingegen vor allem mit Taurin- und Glycin-konjugierte Gallensalze<sup>8</sup>.

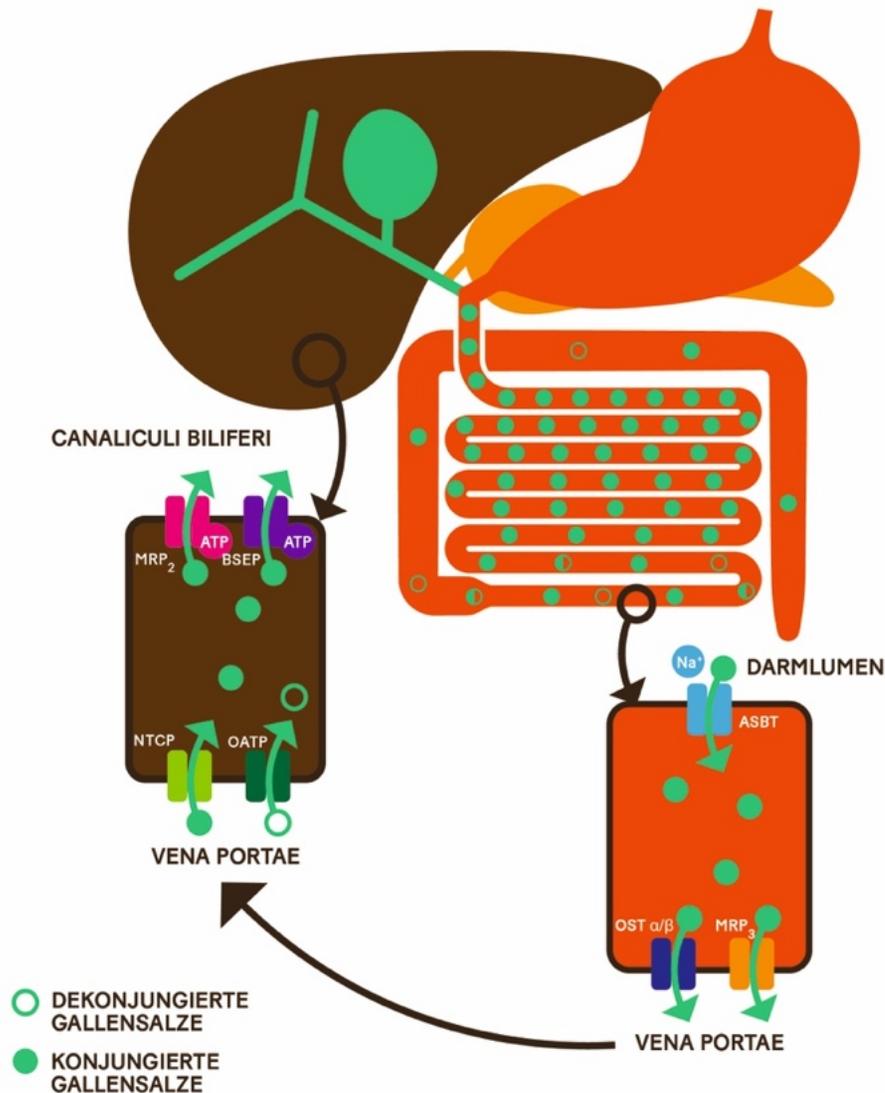
Mit der Zirkulation über die Pfortader werden die hauptsächlich an Albumin gebundenen Gallensalze zurück zu den Hepatozyten befördert. Konjugierte Gallensalze werden dort über den sekundär-aktiven Na<sup>+</sup>-Symporter (Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptides (NTCP)), unkonjugierte Gallensäuren über sogenannte Organic-Anion-Transporting-Polypeptides (OATP) wieder aufgenommen. Die sekundären Gallensalze werden nun in der Leber rekonjugiert und anschließend wieder in die Galle sekretiert<sup>19,20</sup>.

Da LCA aufgrund seiner ausgeprägten Hydrophobizität zytotoxisch ist, wird es außerdem im Rahmen der Biotransformation der Hepatozyten am Kohlenstoffatom C-3 sulfatiert, an C-24 N-acetyliert um anschließend über den ABC-Transporter MRP2 in die Galle sekretiert werden zu können. ASBT als Gallensalztransporter der Enterozyten hat jedoch keine Affinität für sulfatierte Gallensalze und so wird das sulfatierte LCA anschließend nicht mehr im Darm absorbiert, sondern über die Faeces ausgeschieden<sup>21</sup>.

Von den übrigen Gallensalzen werden nur ca. 5% über die Faeces ausgeschieden. Der Rest der Gallensalze zirkuliert ca. 4-12 mal pro Tag im enterohepatischen Kreislauf, um u.a. die Verdauung von Lipiden im Darm gewährleisten zu können<sup>1</sup>. Manche Gallensalze gelangen über OST  $\alpha/\beta$  oder das Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4) jedoch auch wieder zurück ins Blut, um dann über den Urin, also renal, ausgeschieden zu werden<sup>7,8,22</sup>.

Eine übersichtliche Darstellung des enterohepatischen Kreislaufes der Gallensalze zeigt Abbildung 2.

## Einleitung



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des enterohepatischen Kreislaufs. Über BSEP und MRP<sub>2</sub> gelangen die Gallensalze (Gallefluss und Gallensalze in grün dargestellt) in die Gallekanälchen und über den Gallefluss nach z.B. Verzehr einer fettreichen Nahrung in das Duodenum. Dort bilden sie zusammen mit Phosphatidycholin und Cholesterin gemischte Mizellen. Während Ihrer weiteren Zirkulation wird ein Teil der Gallensalze durch die bakterielle Flora von Ileum und Colon zu sekundären Gallensalzen dekonjugiert und dehydroxyliert. Ca. 95% aller Gallensalze werden dann im terminalen Ileum über ASBT in die Enterozyten reabsorbiert und gelangen anschließend, nach Sekretion durch OST und MRP<sub>3</sub> in das Blut der V. portae, mit dem Blutfluss zurück zur Leber. Dort werden die Gallensalze über NTCP und OATP wieder in die Hepatozyten aufgenommen und rekonjugiert. Nur ca. 0,5g des Gallensalzpools von ca. 2-4g wird über den Faeces ausgeschieden. Insgesamt zirkulieren die Gallensalze ca. 4-12x täglich<sup>23</sup>.

## 1.2 Aufgaben der Gallensalze

Als Detergenzien ermöglichen Gallensalze die Lösung, Verdauung und Absorption von Nahrungslipiden und fettlöslichen Vitaminen, und dank ihrer amphiphilen Struktur können sie Cholesterin in der Galle in Lösung halten und damit eine Gallensteinbildung verhindern. Die Ausscheidung über Galle/Faeces stellt dabei ein Haupteliminationsweg für Cholesterin dar.

Neben den vielfältigen Funktionen aufgrund ihrer chemischen Struktur spielen Gallensalze jedoch auch eine wichtige Rolle als endokrine Hormone. Durch die direkte oder indirekte Interaktion mit fünf unterschiedlichen Rezeptoren (FXR, TGR5, VDR, PXR und CAR) kommt es zu Veränderungen im Gallensalzmetabolismus, der Glukose-Homöostase, im Fett- und Lipoproteinmetabolismus, im Energiehaushalt, der Darmmotilität und von bakteriellem Wachstum und Inflammation<sup>1, 24-26</sup>. In ihrer Rolle als endokrine Hormone begünstigen Gallensalze außerdem Zellproliferation und Leberregeneration, können jedoch auch den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren<sup>27,28</sup>.

Über den ligandenabhängigen Transkriptionsfaktor *farnesoid X receptor* (FXR) regulieren die Gallensalze zum einen ihre eigene Biosynthese durch Inhibition der  $7\alpha$ -Hydroxylase im negativen Feedbackmechanismus<sup>29, 30</sup> und zum anderen ihre eigene Sekretion und Reabsorption. Während bei erhöhter Gallensalzkonzentration in den Hepatozyten bzw. Enterozyten die Sekretion der Gallensalze durch eine Stimulation der Synthese von BSEP und OST  $\alpha/\beta$  gesteigert wird<sup>30, 31</sup>, wird die Aufnahme durch Inhibition der Synthese von ASBT, NTCP und OATP unterbrochen<sup>32-34</sup>. Eine intrazelluläre Gallensalzzakkumulation wird dadurch verhindert. Als endokrine Hormone sind die Gallensalze über FXR außerdem an der Glukose- und Lipidhomöostase beteiligt. Durch Minimierung der Glukoneogenese bei gesteigerter Glykogensynthese reduzieren die Gallensalze über FXR den Blutglukosespiegel und verbessern damit die Insulinsensitivität<sup>35-38</sup>. Zu einem verbesserten Lipidstoffwechsel im Sinne eines antiarteriosklerotischen Serumspiegels von Triglyceriden und Apolipoproteinen trägt die gallensalzabhängige Aktivierung von FXR<sup>30, 35</sup> und die dadurch folgende Inhibition der Triglycerid- und Fettsäuresynthese bei gesteigerter Fettsäureoxidation bei<sup>39</sup>. FXR-abhängig kommt es dabei zur Aktivierung von PPAR $\alpha$ , was wiederum zu einer gesteigerten Fettsäureoxidation in den Adipozyten und Muskelzellen führt<sup>36</sup> sowie die Expression von Apolipoprotein CII<sup>40</sup> stimuliert und gleichzeitig die Expression von CIII reduziert<sup>41</sup>. Weitere wichtige Funktionen üben die Gallensalze über die Aktivierung von FXR außerdem bei der Enteroprotektion (Verhinderung von bakterieller Überwucherung und Erhalt der Membranintegrität<sup>42</sup>) sowie der Leberregeneration<sup>28</sup> aus.

Die Aktivierung von TGR5, einem G-Protein gekoppeltem Rezeptor, durch Gallensalze führt zur Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus ATP durch die Adenylatcyclase. Über eine Konzentrationssteigerung von cAMP wird nachfolgend die Proteinkinase A aktiviert<sup>43, 44</sup>. Dieser Signalweg führt zu vielfältigen Veränderungen in den TGR5-exprimierenden Zellen des braunen Fettgewebes, den Sinusendothel- und Kupferzellen sowie Cholangiozyten der Leber als auch in den Skelettmuskelzellen und CD14-positiven Monozyten. Neben Veränderungen im Glukose- und Lipidmetabolismus über FXR tragen die Gallensalze auch über TGR5 zu einer verbesserten Insulinsensitivität und -aktivität

## Einleitung

bei. Dies zeigt sich beispielsweise in der TGR5-abhängig gesteigerten Produktion von GLP1 (Glucagon-like Peptide 1) in einer enteroendokrinen Zelllinie in Mäusen<sup>45</sup>. Zusätzlich üben die Gallensalze über die TGR5-abhängige Aktivierung der Deiodase vom Typ 2 in den Zellen von braunem Fettgewebe und Skelettmuskelzellen und dem dadurch gesteigerten Energieumsatz dieser Zellen einen positiven Effekt auf Adipositas und Insulinresistenz aus<sup>46</sup>. In der Leber haben die Gallensalze über TGR5 einen Einfluss auf die Mikrozirkulation, die Zytokinproduktion und die Apoptose. In den sinusoidalen Endothelzellen führt die TGR5-Aktivierung zu einer erhöhten Aktivität der NO-Synthase mit nachfolgend gesteigerter NO-Produktion und Vasodilatation<sup>47</sup>. In den Kupffer-Zellen, den CD14-positiven Monozyten, und den alveolären Makrophagen wird über TGR5 die Lipopolysaccharid-induzierte Zytokinproduktion verhindert<sup>44, 48</sup>. Das Ausmaß der Leberschädigung bei z.B. sepsisassoziiertes oder obstruktiver Cholestase kann durch diesen Mechanismus reduziert werden.

Eine erhöhte cAMP-Konzentration in den Hepatozyten scheint außerdem den proapoptotischen und toxischen Effekt hydrophober Gallensalze wie der Tauroolithocholsäure (TLCS) aufzuheben. cAMP-abhängig kommt es in den Hepatozyten zur Ser-/Thr-Phosphorylierung des CD95-Rezeptors und Inhibition seiner Tyr-Phosphorylierung, wodurch die Apoptose der Hepatozyten verhindert wird<sup>27</sup>.

Für alle drei Phasen der in der Leber stattfindenden Metabolisierung und Entgiftung von exogenen und endogenen Substraten spielen die Rezeptoren *vitamin D receptor* (VDR), *pregnane X receptor* (PXR) und *constitutive androstane receptor* (CAR) eine wichtige Rolle. Diese drei Rezeptoren werden beispielsweise bei einer Cholestase, also einem eingeschränkten oder stillstehendem Gallefluss, durch Gallensalze gezielt aktiviert, um die Expression der an Abbau, Konjugation und Transport von Gallensalzen beteiligten Enzyme zu steigern und die Leber damit vor Inflammation und Schädigung durch die hydrophoben, toxisch wirkenden, Gallensalze wie beispielsweise Lithocholsäure (LCA) zu schützen<sup>26, 49-51</sup>.

Der Rezeptor CAR kann hierbei zwar nicht direkt durch Gallensalze aktiviert werden, als Transkriptionsfaktor bindet er jedoch an das gleiche *response element* des Zielgenpromotors wie PXR, welcher wiederum direkt durch das toxische Gallensalz LCA aktiviert werden kann<sup>49</sup>. Durch die synergistische Wirkung der beiden Rezeptoren kann so beispielsweise die 7 $\alpha$ -Hydroxylase inhibiert und damit die weitere Gallensalzsynthese bei bestehender Cholestase gestoppt werden. Eine weitere Schutzfunktion für die Leber erfolgt außerdem über die CAR- und PXR-abhängige verminderte Aktivität von NTCP und OATP2 und der daraus folgenden geringeren Aufnahme toxisch wirkender Gallensalze in die Hepatozyten<sup>50, 52</sup>.

Der Rezeptor VDR ist als Gallensalzsensoren des Magendarmtraktes vor allem für den Schutz des Darms vor den toxisch und dort auch kanzerogen wirkenden Gallensalzen verantwortlich. Besonders über Lithocholsäure kann VDR dabei aktiviert werden<sup>53</sup>. VDR-abhängig kommt es dann zum Abbau von Lithocholsäure über CYP3A11 und zur Initiierung der Gallensalz-Sulfatierung (über Sult2a2)<sup>53, 54</sup> sowie zur Elimination der toxisch wirkenden Gallensalze aus dem Magendarmtrakt über MRP3 zur Leber<sup>55</sup>. Auch die Elimination der Gallensalze über ASBT erfolgt VDR-abhängig. Als VDR-Ligand fungiert hier jedoch 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, also aktiviertes Vitamin D selbst<sup>56</sup>.

## Einleitung

Die vielfältigen endokrinen Funktionen der Gallensalze über die nukleären Rezeptoren FXR, PXR, CAR und VDR sowie den G-Protein gekoppelten Rezeptor TGR5 eröffnen neue Möglichkeiten für die Therapie von z.B. Cholestase und Diabetes sowie der positiven Beeinflussung der Entwicklung von Kolonkarzinomen<sup>57</sup>.

Die Rifampicin-abhängige Aktivierung von PXR führt beispielsweise zur Inhibition der Lysophospholipase D (Autotaxin) und damit zur verringerten Synthese von Lysophosphatsäure, einem Abbauprodukt von Phospholipiden<sup>58</sup>. Symptom der Akkumulation von Lysophosphatsäure ist ein starker Juckreiz, unter dem viele Cholestase-Patienten leiden. Über die PXR-Agonisten, zu denen neben Rifampicin auch das Johanniskraut mit seinem Wirkstoff Hyperfarin zählt, kann durch einen Synthese- und Absorptionsstopp zudem die Konzentration hydrophober Gallensalze in den Hepatozyten reduziert und über eine CYP3A4-Induktion außerdem der Abbau, der durch die Cholestase bedingten intrahepatisch akkumulierten Gallensalze, initiiert werden. Cholestasepatienten profitieren also aufgrund von vermindertem Juckreiz, geringerer Akkumulation von Gallensalzen und dadurch bedingter reduzierter intrahepatischer Inflammation von PXR-Agonisten<sup>59, 60</sup>. Eine weitere effektive therapeutische Option stellt die Behandlung der Cholestase mit FXR-Agonisten wie z.B. der sehr potenten Obeticholsäure dar<sup>61, 62</sup>. Neben den vielfältigen positiven Auswirkungen der FXR-Aktivierung auf z.B. die Gallensalzsekretion durch eine Stimulation der BSEP-Expression oder der negativen Feedback-Hemmung durch Inhibition der 7 $\alpha$ -Hydroxylase verschiebt UDCA zusätzlich das Gleichgewicht des Gallensalzpools hin zu den hydrophilen Gallensalzen. Über die Gabe von UDCA können so die inflammatorischen und membranmodulierendenq Effekte der hydrophoben Gallensalze wie z.B. LCA und DCA gemindert werden. Zu den weiteren FXR-Agonisten mit potenziell positivem Effekt auf Cholestase und Gallensalzproduktion zählen außerdem Fibrate und Statine<sup>7, 59, 60</sup>.

Auch bei der Prävention von Kolonkarzinomen könnte die Entdeckung der endokrinen Funktion von Gallensalzen über ihre verschiedenen Rezeptoren eine Rolle spielen<sup>63</sup>, denn eine durch fettreiche Ernährung erhöhte Konzentration von Gallensalzen im Kolon scheint mit einem gehäuften Auftreten von Kolonkarzinomen zu korrelieren<sup>64, 65</sup>. VDR-abhängig stimulieren Gallensalze die Proliferation der Kolonzellen und damit die Entwicklung von Kolonkarzinomen, während eine VDR-Aktivierung durch Vitamin D die  $\beta$ -Catenin Aktivität der Kolonzellen unterbricht und damit die Entwicklung von Kolonkarzinomen verhindert<sup>66</sup>. So konnte sowohl in epidemiologischen als auch in experimentellen Studien gezeigt werden, dass die Einnahme von Calcium und Vitamin D die Inzidenz von Kolonkarzinomen reduziert<sup>67, 68</sup>.

## 1.3 Funktion, Aufbau und Regulation von BSEP

Dass ein ATP-abhängiges System verantwortlich für den Transport von Taurocholol sein muss, wurde erstmals 1991 beobachtet<sup>69</sup>. Vier Jahre später wurde dies zum einen bestätigt und zum anderen erkannt, dass der Gallensalztransport durch ein Protein aus der Gruppe der ABC-Transporter erfolgt. Im selben Jahr konnte außerdem erstmals die Gensequenz dieses ABC-Transporters isoliert werden<sup>70</sup>. Aufgrund einer Ähnlichkeit von 61% zu p-Glykoprotein wurde der ABC-Transporter zunächst „sister of p-Glycoprotein“ (sPgp) genannt<sup>71</sup>. Nachdem unter anderem durch Gerloff *et al.* die solitäre Funktion dieses neu charakterisierten ABC-Transporters als Gallensalztransporter bewiesen wurde, erfolgte eine Umbenennung von „sister of p-Glykoprotein“ in „bile salt export pump (BSEP)“<sup>72</sup>.

Der Transport von sowohl primären und sekundären Gallensalzen als auch von UDCA und seinen Konjugaten durch das an der apikalen Membran von Hepatozyten gelegene BSEP stellt eine wichtige Schnittstelle des Galleflusses dar. Durch die Aufrechterhaltung der Gallensalzzirkulation mit Hilfe von BSEP können Zellen vor Nekrose und Apoptose bewahrt, Nahrungslipide und fettlösliche Vitamine resorbiert und Cholesterin sowie fettlösliche Medikamentenderivate und deren Abbauprodukte eliminiert werden<sup>23</sup>. Die Affinität von BSEP zu den verschiedenen Gallensalzen beträgt hierbei TCDC (Taurochenodeoxycholol) > TC (Taurocholol) > TUDC (Tauroursodeoxycholol) > GC (Glycholol)<sup>73</sup>.

Bestehend aus 27 kodierenden Exons, welche einem untranslatierten Exon folgen, bildet BSEP mit insgesamt 1321 Aminosäuren eine molekulare Masse von 146,5 kDa. Die Gensequenz ABCB11 der zur Untergruppe B der ABC-Transporter gehörenden bile salt export pump liegt auf dem langen Arm des 2. Chromosoms (2q24)<sup>7,74</sup>.

Auf molekularer Ebene besteht BSEP aus zwei Transmembran- und zwei Nukleotidbindedomänen. Die Transmembrandomänen (TMD) gliedern sich wiederum in jeweils sechs Transmembran-alpha-helices. An sie angegliedert ist jeweils eine Nukleotidbindedomäne (NBD)<sup>7,75</sup>.

Während die Transmembrandomänen mit Hilfe ihrer porenähnlichen Struktur den Substrattransport erleichtern und der Substraterkennung dienen, stellen die Nukleotidbindedomänen durch die Hydrolyse von ATP die Energie für den Gallensalztransport bereit. Die für die Familie der ABC-Transporter charakteristischen Sequenzmotive wie *Walker A-* und *Walker B-*Motiv sowie der sogenannte *C-Loop* oder *ABC-signature motif*, welcher 90 Aminosäuren nach dem *Walker A-*Motiv und 30 Aminosäuren vor dem *Walker B* Motiv gelegen ist, sind ebenfalls Bestandteile der Nukleotidbindedomänen. Hierdurch werden die NBDs in eine katalytische, *Walker A -* und *- B* Motiv enthaltende, und eine helikale, durch den *C-Loop* charakterisierte, Domäne unterteilt. Verbunden werden beide Domänen durch Q- und Pro-Loops. Wird ATP gebunden, bilden die beiden Nukleotidbindedomänen ein Dimer. Dabei verbinden sich *Walker A-* und *- B*-Motiv der einen mit dem *C-Loop* der gegenüberliegenden Seite. Durch die Dimerisierung entsteht wiederum mechanische Energie, welche zur Substrattranslokation an die Transmembrandomäne weitergegeben wird. Die Dimerisierung stellt also eine weitere Energiequelle für den Transport der Gallensalze dar. Nach der ATP-Hydrolyse dissoziieren ADP und P<sub>i</sub> von der

## Einleitung

Nukleotidbindedomäne und die NBDs nehmen wieder ihren ursprünglichen monomeren Strukturzustand ein <sup>76-78</sup>.

Wie der Substrattransport an sich funktioniert, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Es existieren hierfür zwei grundsätzliche Modelle:

das sogenannte „*simple allosteric model*“ und das „*ATP-switch-model*“ <sup>74</sup>.

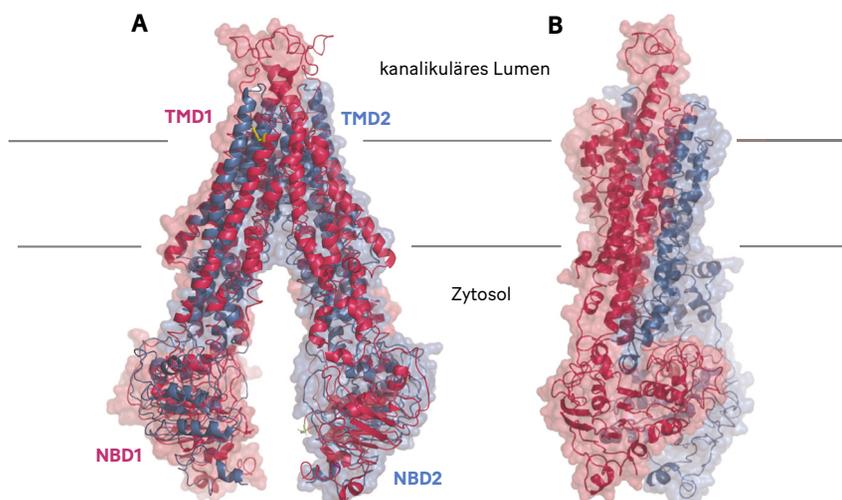
Das „*simple allosteric model*“ geht von zwei unterschiedlichen Grundformen aus:

- Einer nach innen gerichteten Form, bei der die Proteinstruktur zum Zytosol hin geöffnet ist und das Substrat nur vom Zytosol aus gebunden werden kann
- Einer nach außen geöffneten Form mit einer Substratbindungsstelle, welche eine niedrige Affinität aufweist.

Mit Hilfe der Energie aus der Hydrolyse von ATP kann das Protein im „*simple allosteric model*“ von der einen in die andere Grundform wechseln <sup>79</sup>.

Im „*ATP-switch-model*“ wird von einer von nach innen gerichteten Grundform des Proteins mit monomeren NBDs und hoher Affinität der Bindungsstelle der TMD zum Substrat ausgegangen. Die Dimerisierung der NBDs wird in diesem Modell allein durch die Bindung von ATP an die NBD initiiert. Durch die NBD-Dimerisierung kommt es anschließend zur Konformationsänderung der Transmembrandomänen, sodass die Substratbindungsstelle nun exponiert zum extrazellulären Raum ist. Ihre Affinität zum Substrat sinkt hierdurch, das Substrat löst sich. Mit Hilfe der Hydrolyse von ATP gelangt das Protein nach Substratabgabe anschließend wieder zurück in seine Grundform. <sup>80</sup>.

Die durch Wang *et al.* 2020 erstmals bestimmte *Cryo-EM-Struktur* von BSEP zeigt zur weiteren Übersicht Abbildung 3 <sup>81</sup>.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der BSEP- Struktur in einer nach Innen geöffneten Konformation. BSEP besteht aus zwei Transmembrandomänen (TMD) mit jeweils sechs Transmembranhelices sowie zwei Nukleotidbindedomänen (NBD). Die vier am extrazellulären Loop zwischen TMD1 und TMD2 jeweils am Asparagin gebundenen Glykosylierungen spielen eine wichtige Rolle für das Trafficking und die Funktionalität von BSEP. NBD1 sowie Transmembranhelix 1-6 werden in Magenta, NBD2 sowie Transmembranhelix 7-12 in blau dargestellt. **A:** BSEP-Darstellung von vorne. **B:** seitliche BSEP-Darstellung. Angelehnt an <sup>81</sup>.

## Einleitung

Ein einziges Gallensalz-molekül durchläuft den enterohepatischen Kreislauf bis zu zehnmal täglich. Wie bereits erwähnt ist diese Zirkulation wichtig für die Aufnahme der fetthaltigen Bestandteile einer Mahlzeit und dient gleichzeitig der Elimination von Substanzen wie Bilirubin, Xenobiotika oder überschüssigem Cholesterin. Zudem führt eine Akkumulation von Gallensalzen aufgrund ihres Detergenzieneffektes zur Zerstörung von Membranen und damit zur Zellapoptose bzw. Nekrose<sup>23</sup>. Der Gallensalztransport und damit die Expression von BSEP an der apikalen Membran der Hepatozyten muss sich also rasch an Veränderungen des Zellvolumens bzw. an Veränderungen von Gallensalz- und Hormonkonzentrationen wie der von Insulin oder steroidhaltiger Hormone anpassen können<sup>82-84</sup>.

Kurzfristig, wie beispielsweise nach einer Mahlzeit, kann die BSEP-Insertion mit Hilfe der *mitogen activated protein kinase* p38 und Erk sowie mit Hilfe einer Isoform der Proteinkinase C reguliert werden<sup>7, 74</sup>. Die mittels gemischter Mizellen aufgenommenen Fettsäuren, fettlöslichen Vitamine und Gallensalze wie beispielsweise Taurocholat (TC) führen hierbei zur Zellschwellung. Das Anschwellen der Zelle wird wiederum durch Integrine ( $\alpha 5 \beta 1$ ) registriert. Diese bewirken die Aktivierung von Adhäsionskinasen wie c-Src und EGFR, die in der Folge dann die MAP-Kinasen p38 und Erk aktivieren<sup>85</sup>. Dabei müssen beide MAP-Kinasen gleichzeitig aktiv sein, um anschließend die BSEP-Insertion und damit einen verbesserten Gallefluss zu bewirken. Die Integrine und somit der eben beschriebene Signalweg zur BSEP-Insertion können dabei jedoch auch direkt durch Tauroursodesoxycholat (TUDCA) aktiviert werden<sup>86, 87</sup>.

Die Transkriptionsfaktoren FXR (*farnesoid x receptor*), Lrh1 (*liver receptor homolog 1*) sowie Nrf2 (*erythroid 2-related factor 2*) regulieren die BSEP-Expression dagegen langfristig<sup>88-90</sup>. Sind die genannten Transkriptionsfaktoren an den BSEP-Promotor gebunden, wird das Ablesen des BSEP-Gens und damit die BSEP-Produktion stimuliert.

Natürlicher Agonist des Transkriptionsfaktors FXR ist das Gallensalz Chenodesoxycholsäure (CDCA), Lithocholsäure (LCA) hingegen ist ein natürlicher Antagonist von FXR<sup>88, 91, 92</sup>. Neben der direkten FXR-Aktivierung erleichtert CDCA über die Rekrutierung des FXR-Coaktivatorkomplexes ASCOM (ein *steady state* – Komplex genannt *activating signal cointegrator-2 (ASC-2) - containing complex*) zusätzlich eine verbesserte Lesbarkeit bzw. Aktivierung der BSEP-Promotorregion. Mithilfe der in ASCOM enthaltenen Coaktivatoren NCOA6 und Histon-H3K4-Methyltransferase MLL3 kommt es zur epigenetischen Modifikation der Promotorregion von BSEP in Form von Methylierung und Acetylierung. Dies führt wiederum zur Aktivierung des BSEP-Promotors und induziert die Bindung der im Transkriptionskomplex enthaltenen RNA-Polymerase II<sup>93</sup>.

Eine Promotor-Acetylierung kann außerdem mit Hilfe der intrinsischen Acetyltransferase von SRC2 (*steroid receptor coactivator 2*) über die AMPK-SRC2/FXR-BSEP-Kaskade erfolgen. Mangelt es einer Zelle an Energie, können mit Hilfe der Proteinkinase AMPK neue Energieträger beispielsweise in Form von Fett- und Aminosäuren in die Zelle gelangen. Hierfür deaktiviert die Proteinkinase AMPK Prozesse, welche ATP verbrauchen, aktiviert dafür jedoch ATP-produzierende Prozesse durch Stimulation der Phosphorylierung von SRC2. Der Coaktivator SRC2 verbindet sich nun wiederum mit FXR. Hierdurch wird die Promotorregion von BSEP acetyliert und aktiviert<sup>7</sup>. Es kommt zu einer gesteigerten BSEP-Expression.

## Einleitung

Gallensalze können nun vermehrt ins Darmlumen gelangen, Fette können dadurch verstärkt absorbiert und schließlich zu den Hepatozyten transportiert werden. Der Energiegehalt der Leberzelle steigt <sup>94</sup>.

Lrh1 ist zwar Schlüsselregulator der  $7\alpha$ -Hydroxylase, dem Schlüsselenzym der Gallensalzsynthese, fördert jedoch zusammen mit FXR auch den Abtransport der Gallensalze durch Aktivierung des BSEP-Promotors. Hierfür bindet und aktiviert Lrh1 dosisabhängig direkt den BSEP-Promotor über ein eigenes *response element*. Eine maximale Induktion der BSEP-Expression entsteht dabei, wenn Lrh1 zusammen mit FXR an den BSEP-Promotor bindet <sup>89</sup>.

Auch der Transkriptionsfaktor Nrf2 stellt einen positiven Regulator der BSEP-Expression über Bindung an den BSEP-Promotor dar. Als Sensor für oxidativen Stress stimuliert er im Negativfeedbackmechanismus die Elimination der den oxidativen Stress verursachenden toxischen Gallensalze <sup>90</sup>. Nrf2 kann außerdem auch direkt durch UDCA aktiviert werden, was die therapeutische Rolle von UDCA bei cholestatischen Lebererkrankungen erklärt und unterstreicht <sup>95</sup>.

Eine kurzfristige BSEP-Rückgewinnung bzw. -Internalisierung erfolgt bei hyperosmotischen Bedingungen bzw. geschrumpften Zellzuständen unter anderem durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase. Dabei wird der osmotische Zustand durch Endosomen registriert. Ein hyperosmotischer Zellzustand führt über die *acidic sphingomyelinase* zur Proteinkinase C $\zeta$ -Aktivierung, wodurch es zur Phosphorylierung von p47<sup>phox</sup> kommt. Mit Hilfe des phosphorylierten p47<sup>phox</sup> kann dann die NADPH-Oxidase aktiviert werden. Der resultierende oxidative Stress führt in der Folge zur Aktivierung der *Src family kinase* Fyn, welche dann über eine Cortactin-Phosphorylierung die BSEP-Internalisierung vermittelt <sup>96,97</sup>.

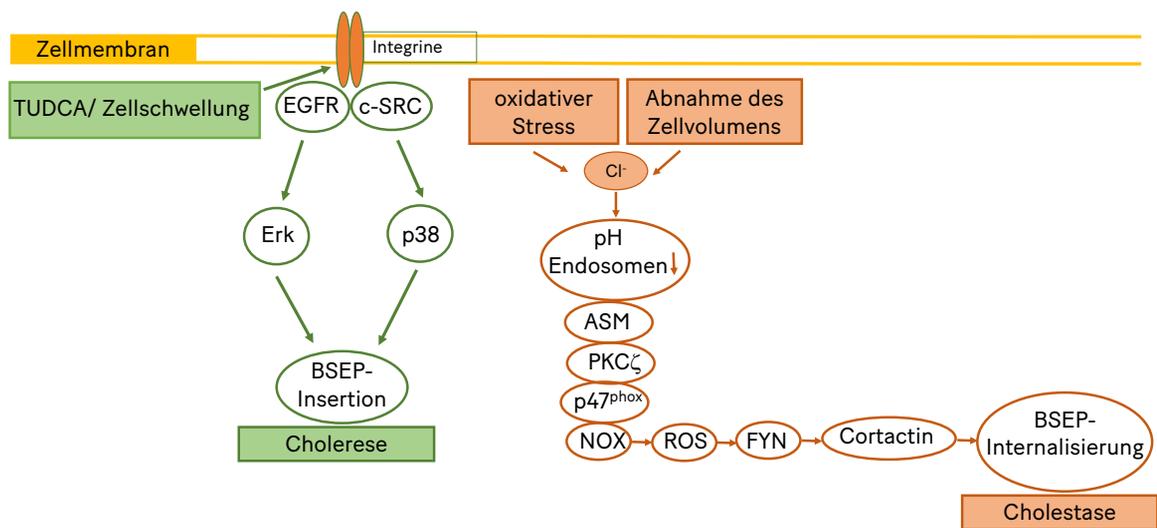
Für die von Zellschrumpfung bzw. oxidativem Stress abhängige Endozytose von BSEP interagiert das phosphorylierte und damit aktivierte Cortactin mit Dynamin. Cortactin stellt damit eine wichtige Verbindung zwischen externem Stimulus und BSEP-Endozytose dar <sup>98</sup>. Über ein C-terminales Sequenzmotiv kann BSEP jedoch auch direkt, über Aktivierung des AP2-Adaptor-Komplexes, in die Dynamin-Clathrin-abhängige Endozytose überführt werden <sup>99,100</sup>.

Zudem kann die BSEP-Insertion auch über die Aktivierung von PKC-Isoformen durch Tauroursodesoxycholat (TUDCA), Taurolithocholat (TLCA) sowie  $17\beta$ -Estradiol stimuliert werden <sup>101-103</sup>.

Abbildung 4 fasst die kurzfristigen, zellhydratationsabhängigen, Regulationsmechanismen der BSEP-Internalisierung und -Insertion in einer Übersicht noch einmal zusammen.

Unabhängig von den lang- und kurzfristigen Regulationsmechanismen spielt jedoch auch eine intakte kanalikuläre Membran für die Aktivität von BSEP eine Rolle. Geschützt vor dem Detergenzieneffekt der hydrophoben Gallensalze wird die kanalikuläre Membran hierbei u.a. durch FIC1, eine Flippase, welche Phosphatidylserin von der Außenseite der Plasmamembran an die Innenseite transportiert. <sup>104-106</sup>.

## Einleitung



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der kurzfristigen, hydrationsabhängigen BSEP-Insertion und -Internalisierung. Eine z.B. nach einer Mahlzeit folgende Zellschwellung wird durch Integrine registriert. Diese triggern die Aktivierung der Adhäsionskinasen c-Src und EGFR sowie in der Folge dann der MAP-Kinasen p38 und Erk. Hierdurch kann anschließend die Insertion des in Vesikeln unterhalb der kanalikulären Membran gelegenen BSEPs erfolgen. Eine Abnahme des Zellvolumens wird wiederum durch eine chloridabhängige Ansäuerung in den Endosomen registriert. Hierdurch wird zunächst die acidic sphingomyelinase (ASM), dann die Proteinkinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) aktiviert. Das dabei entstandene nun phosphorylierte p47<sup>phox</sup> aktiviert schließlich die NADPH-Oxidase NOX. Der resultierende Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS= reactive oxygen species) führt wiederum zur Aktivierung der Src family kinase Fyn, welche über eine Cortactin-Phosphorylierung die BSEP-Internalisierung bewirkt.

## 1.4 BSEP-assoziierte Erkrankungen

### 1.4.1 Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2)

Mit einer weltweiten Inzidenz von 1/50 000 bis 1/100 000 Geburten gehört die Gruppe der PFIC 1-3-Erkrankungen zu den seltenen Krankheitsleiden. Jedoch stellt die autosomal rezessiv vererbte Gruppe der PFIC 1-3-Erkrankungen in 10-15% der Fälle die Ursache für eine Cholestase im Säuglings- und Kindesalter dar<sup>107</sup>.

Während eine beeinträchtigte Funktion der ATP8B1- Flippase (oder progressive familial intrahepatic cholestasis 1- Protein) zur PFIC1 führt, erkranken Patienten mit einem genetischen Defekt der BSEP (ABCB11) an einer PFIC2<sup>7, 107-110</sup>. Eine insuffiziente ABCB4/MDR3- Funktion verursacht wiederum eine PFIC3<sup>107, 111</sup>.

Laborchemisches Charakteristikum von PFIC1 und PFIC2 sind niedrige  $\gamma$ GT-Werte sowie normale Cholesterin- und erhöhte Gallensalzwerte im Serum<sup>7, 107, 110, 112</sup>. Die für eine

## Einleitung

cholestatische Erkrankung untypisch normwertigen  $\gamma$ GT-Level erklären sich durch die niedrige bis nicht vorhandene Gallensalzkonzentration in den Gallekanälen. Hierdurch fehlt die toxische bzw. apoptotische Wirkung der hydrophoben Gallensalze auf die Cholangiozyten. Die  $\gamma$ GT-Level bleiben also normwertig.

Klinisch präsentieren sich sowohl PFIC1 als auch PFIC2 bereits innerhalb des ersten Lebensjahres mit Ikterus, Pruritus und Wachstumsverzögerung. Da die Phospholipid-Flippase ATP8B1 jedoch auch in weiterem epitheliale Gewebe vorhanden ist, weisen an PFIC1 erkrankte Patienten zusätzlich extrahepatische Symptome wie chronische Diarrhoe, Pankreatitis und Hörverluste auf. Zudem zeigt sich der Ikterus bei diesen Patienten anfänglich noch rekurrend<sup>107, 109, 110, 112, 113</sup>. Permanenter Ikterus und die rasche Entstehung eines Leberversagens (häufig innerhalb des ersten Lebensjahres) sind hingegen Kennzeichen einer PFIC2 und machen häufig eine bereits frühe Lebertransplantation notwendig<sup>7, 114</sup>. Darüber hinaus entwickelten viele der an PFIC2 erkrankten Patienten innerhalb der ersten Lebensjahre ein hepatozelluläres Karzinom<sup>115, 116</sup>. Bei Erstmanifestation weisen die Kinder außerdem häufig bereits schwere Defizite an fettlöslichen Vitaminen auf und präsentieren sich hierdurch teilweise mit schweren (zerebralen) Hämorrhagien<sup>7, 110</sup>. Sowohl PFIC1- als auch PFIC2-Patienten haben zudem ein erhöhtes Risiko Gallensteine zu entwickeln, da die Gallensalze fehlen um z.B. Cholesterin in der Galle in Lösung zu halten<sup>110, 112</sup>.

Die durch eine MDR3-Defizienz ausgelöste PFIC3 manifestiert sich im Gegensatz zu PFIC1 und 2 meist erst im Kleinkind- und Kindesalter, teilweise sogar erst im jugendlichen Alter. Charakteristisch für die PFIC3 ist eine bei Diagnosestellung meist schon manifeste und ausgeprägte Leberfibrose mit portaler Hypertension, weshalb sich PFIC3-Patienten häufig erstmals mit einer oberen gastrointestinalen Blutung präsentieren. Pruritus und Ikterus stehen bei diesen Patienten dagegen nicht im Vordergrund<sup>107</sup>. Ein weiteres Charakteristikum der PFIC3 sind erhöhte  $\gamma$ GT-Level. Sie entstehen durch die Gallensalz-induzierte Apoptose der Cholangiozyten, denn im Gegensatz zur PFIC1 und PFIC2 bleibt die BSEP-Aktivität bei der PFIC3 unbeeinträchtigt. Es gelangen also weiterhin Gallensalze in das Lumen der Gallekanälchen, werden dort aber aufgrund der durch die MDR3-Defizienz bedingte Minderung der Phospholipide in der Galle nicht ausreichend in gemischten Mizellen gebunden und führen nach entsprechender Akkumulation durch ihre Detergenzwirkung zur Apoptose und Nekrose der Cholangiozyten<sup>107, 111</sup>.

Zu den Krankheitsbildern PFIC4, PFIC5 und PFIC6 gibt es aufgrund des insgesamt sehr seltenen Vorkommens bisher nur wenige klinische Daten<sup>114, 117-121</sup>. Ursache für die Cholestase bei PFIC4 ist ein Funktionsverlust des *tight junction protein-2*. Hierdurch wird die Zellpolarisierung der Hepatozyten beeinträchtigt. Es kommt zu einer Störung der hepatischen Barrierefunktion und - hinsichtlich der Entwicklung einer Cholestase noch wichtiger - Auflösung der hepatischen Zellarchitektur und - struktur mit gestörter Ausbildung der canaliculären Membran und konsekutiver Fehlregulation der für die Gallebildung wichtigen Transportproteine<sup>118, 122, 123</sup>.

Ursächlich für die PFIC5 ist eine Mutation im NR1H4-Gen, welches für den *farnesoid x receptor* (FXR) kodiert<sup>119</sup>. Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, wird über FXR sowohl die Gallensalzsynthese und -konjugation als auch deren Transport über BSEP reguliert, weshalb

## Einleitung

ein Ausfall von FXR zur Entwicklung einer frühen und ausgeprägten intrahepatischen Cholestase führt<sup>124, 125</sup>. Die bisher neueste Entdeckung einer hereditären cholestatischen Erkrankung ist die PFIC6. Hierbei ist eine Missense-Mutation in MYO5B (*motor protein myosin Vb*) für die Entwicklung der Cholestase verantwortlich<sup>120, 121</sup>. Sie verursacht eine intrazelluläre Akkumulation der unterhalb der kanalikulären Membran der Hepatozyten in Vesikeln gelegenen Transportproteine wie BSEP, welche wichtig sind für die Galleentstehung<sup>126</sup>.

Für die letztendliche Diagnose einer PFIC sind zunächst laborchemische Parameter wie erhöhte oder erniedrigte  $\gamma$ GT-Level, Transaminasen, Gallensalze, Cholesterin und fettlösliche Vitamine wegweisend. Mittels Sonographie der Leber und Cholangiographie kann anschließend eine Differenzierung zwischen intra- und extrahepatischer Cholestase sowie der Ausschluss einer differenzialdiagnostisch ebenfalls in Frage kommenden Gallengangsatriese erfolgen. Erhärtet sich durch diese Diagnostik der Verdacht auf eine PFIC ist im nächsten Schritt die Entnahme von Lebergewebsproben notwendig, um diese histologisch auf das Vorliegen einer intrahepatischen Cholestase, das Vorhandensein der Gallekanälchen, eine intrazelluläre Akkumulation von Transportproteinen und den Grad der Leberfibrose untersuchen zu können. Außerdem können die entnommenen Gewebsproben auf die Expression von FIC1, BSEP und MDR3 untersucht werden. Zur Diagnosesicherung stehen anschließend inzwischen Analysen der Gensequenz für FIC1, BSEP, MDR3, *tight junction protein 2*, NR1H4 und MYO5B zur Verfügung<sup>116, 127, 128</sup>. Typische PFIC2- Mutationen wären hierbei dann beispielsweise p.D482G und p.E297G<sup>75, 127</sup>.

Im weiteren Follow-Up sollte besonders bei PFIC2-Patienten eine regelmäßige Bestimmung des Alphafetoproteins, einem Tumormarker, welcher von hepatischen Karzinomzellen vermehrt freigesetzt wird, erfolgen um frühzeitig Hinweise auf ein möglicherweise entstandenes hepatozelluläres Karzinom zu erhalten. Zusätzlich stellt die Bestimmung des Alphafetoproteins eine Diagnosehilfe zur PFIC5 dar<sup>107, 113, 114</sup>.

Die Therapie der an PFIC erkrankten Patienten erfolgte bisher, teilweise mit mäßigem Erfolg, mit UDCA oder einer chirurgischen Intervention wie der *partial biliary diversion*. Häufig ist jedoch bereits in den ersten Lebensjahren eine Lebertransplantation notwendig, die die einzige derzeit verfügbare kurative Behandlung mit gutem bis sehr gutem Outcome darstellt<sup>7, 107, 110, 113, 114</sup>.

### **1.4.2 Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 (BRIC2)**

Ursächlich für die benigne rekurrende Cholestase sind entweder Funktionsdefizite der Flippase FIC1 oder des Gallensalztransporters BSEP<sup>108, 129</sup>. Analog zur PFIC wird die BRIC, welche durch Mutationen und dadurch Funktionsstörungen in FIC1 hervorgerufen wird als BRIC1 bezeichnet, eine durch Mutationen in BSEP hervorgerufene BRIC als BRIC2<sup>129</sup>.

Charakteristisch für die BRIC sind sich abwechselnde Episoden von Cholestase mit Pruritus, Ikterus, Müdigkeit sowie teilweise Übelkeit und komplett symptomfreien Intervallen. Während

## Einleitung

der symptomfreien Phasen können dann weder laborchemisch noch klinisch noch in entnommenen Leberbiopsien Auffälligkeiten festgestellt werden<sup>129-134</sup>. Bei der BRIC1 kann es während der cholestatischen Episoden aufgrund des ubiquitären Vorkommens dieses Proteins analog zur PFIC1 begleitend ebenfalls zu Diarrhoe, Pankreatitis und Hörstörungen kommen<sup>129</sup>. Laborchemisch können zum Zeitpunkt der Cholestase erhöhte Werte von Bilirubin und Gallensalzen bei gleichzeitig normwertigen  $\gamma$ GT-Leveln festgestellt werden<sup>129, 131, 133, 134</sup>.

Bei beiden Erkrankungsformen variieren die Zeitpunkte der Erstmanifestation sowie Dauer und Häufigkeit der cholestatischen Episoden. BRIC 1 und 2 manifestieren sich im Mittel vor dem 2. Lebensjahrzehnt, der Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns kann jedoch sowohl bereits in den ersten Lebensmonaten als auch erst im 4. Lebensjahrzehnt liegen. Die Dauer einer cholestatischen Episode reicht von mehreren Wochen bis zu sechs Monaten, die symptomfreien Phasen können wenige Monaten bis mehrere Jahre andauern<sup>129, 131, 133</sup>. Bei cholestatischen Episoden von langer Dauer zeigen die Patienten zusätzlich häufig aufgrund der Malabsorptionsstörung einen ausgeprägten Gewichtsverlust. Trigger für cholestatische Episoden sind häufig virale Infektionen, beispielsweise der oberen Atemwege<sup>129-131</sup>. An BRIC erkrankte Patienten entwickeln im Verlauf trotz zeitweise häufig rekurrierender cholestatischer Episoden jedoch weder Zeichen einer chronischen Leberschädigung wie eine Leberfibrose noch maligne hepatozelluläre Veränderungen<sup>129, 133</sup>. Neben der typischen Klinik von sich abwechselnden Phasen von Cholestase mit klinisch und laborchemisch völlig blanden Intervallen, eignet sich nur die genetische Testung, um die Diagnose einer BRIC1 oder BRIC2 stellen zu können<sup>129</sup>. Häufig mit einer BRIC2 wären beispielsweise die Mutationen p.A570T und p.R1050C assoziiert<sup>75, 135</sup>. Therapeutisch profitierten die Patienten zumeist von einer Therapie mit UDCA<sup>130</sup>.

### **1.4.3 Intrahepatic cholestasis of pregnancy- ICP**

Bereits 1883 wurde der Zusammenhang von Schwangerschaft und Cholestase durch Ahlfeld beschrieben. Bis zur Kenntnis der genauen Pathophysiologie der nun als intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) bezeichneten Erkrankung dauerte es dann jedoch noch über hundert Jahre<sup>136</sup>. Die familiäre Häufung und die Variabilität der weltweiten Zahl an Neuerkrankungen, mit beispielsweise einer Inzidenz von 15% in Chile im Gegensatz zu 2% in den skandinavischen Ländern und 0,2% im übrigen Europa, lies jedoch früh eine genetische Ursache der Erkrankung vermuten<sup>7, 136-138</sup>.

Klinisches Kennzeichen der ICP ist ein ausgeprägter und für die Patientinnen quälender Pruritus, welcher meist ab dem dritten Trimenon der Schwangerschaft (im Mittel ab der 32.SSW) auftritt. Ikterus als typisches Zeichen einer Cholestase entwickelt sich nur fakultativ. Nach der Entbindung kommt es innerhalb eines Monats, meist jedoch innerhalb weniger Tage, zu einer vollständigen Rekonvaleszenz der Patienten<sup>7, 136-140</sup>. Durch den für die Erkrankung verantwortlichen eingeschränkten Gallensalztransport kann es während der cholestatischen Phase außerdem zur Steatorrhoe mit der Folge einer Resorptionsstörung, besonders was fettlösliche Vitamine betrifft, kommen<sup>136</sup>. Neben der durch den Pruritus

## Einleitung

eingeschränkten Lebensqualität der Schwangeren ist die ICP jedoch besonders für das noch ungeborene Kind folgenschwer. Ab einem Gallensalzlevel von mehr als 40  $\mu\text{mol/l}$  steigt die Wahrscheinlichkeit für fetale Komplikationen wie Frühgeburtlichkeit, das fetale Distress-Syndrom bis hin zum intrauterinen Fruchttod <sup>138, 139</sup>.

Laborchemisch ist eine erhöhte Gallensalzkonzentration im Serum typisch für die ICP. Alkalische Phosphatase und (gesamt-) Bilirubin als Zeichen einer Cholestase sind nur fakultativ erhöht. Zudem weisen die Patientinnen nur selten erhöhte  $\gamma\text{GT}$ -Werte auf <sup>136, 139, 140</sup>. Analog zur PFIC3 weist bei der ICP die Erhöhung der  $\gamma\text{GT}$  auf eine Dysfunktion von MDR3 hin <sup>141-143</sup>. Dies stellt jedoch eine sehr seltene Variante der ICP dar, normalerweise finden sich bei an ICP erkrankten Patientinnen normwertige  $\gamma\text{GT}$ -Werte. Nach der Entbindung zeigen sich alle zuvor erhöhten laborchemischen Parameter vollständig rückläufig. Lichtmikroskopisch weisen die Leberproben von an ICP erkrankten Patientinnen ein bis auf eine leichte Cholestase normales histopathologisches Bild auf <sup>7, 136, 140</sup>.

Pathophysiologisch ist eine östrogengetriggerte Dysfunktion von BSEP ursächlich für die Entwicklung einer ICP. Die im dritten Trimenon ihren Peak erreichenden Östrogene blockieren, nach ihrem Transport durch Mrp2 (multidrug resistance protein 2) in die Galle, von der Innenseite der Canaliculi biliferi die BSEP-Funktion <sup>144</sup>. Zudem induzieren sie die Endozytose von BSEP <sup>145</sup>. Bei einer Gemini-Schwangerschaft besteht daher durch den nochmals um ein Vielfaches erhöhten Östrogenserumspiegel ein fünffach höheres Risiko, eine ICP zu entwickeln <sup>136, 146</sup>.

Therapeutisch kann UDCA zu einer Verbesserung des Pruritus der an ICP erkrankten Frauen und Verminderung des fötalen Risikos führen. Eine Therapie mit Colestyramin erwies sich hingegen hier nicht als erfolgreich <sup>7, 139, 140</sup>.

## 2 Problemstellung

Für die Gallensalzhomöostase ist unter anderem eine uneingeschränkte BSEP-Expression und -Funktion notwendig. Dysfunktionen führen zum Rückstau von Gallensalzen und nachfolgend zur Cholestase. Apoptose und Nekrose der Hepatozyten induziert durch die hydrophoben Gallensalze sind die Folge<sup>23, 147, 148</sup>. Hierdurch münden fulminante Verläufe einer Cholestase bzw. eine stark eingeschränkte BSEP- Funktion in einer Leberfibrose. Zudem kann durch die chronische Leberfibrose ein hepatozelluläres Karzinom entstehen<sup>7, 114, 115</sup>.

Die unterschiedlichen Schweregrade der Leberfunktionsbeeinträchtigung spiegeln sich in verschiedenen durch BSEP-Dysfunktionen verursachten Krankheitsbildern wider. Während bei PFIC2-Patienten eine rasche Progression zu Leberfibrose und Leberversagen zu beobachten ist, weisen BRIC2-Patienten in den symptomfreien Intervallen eine völlig intakte Leberfunktion auf<sup>107, 131, 133</sup>. Auch bei den ICP-Patientinnen können nach der Entbindung weder klinisch noch laborchemisch oder histologisch Auffälligkeiten, die Leberfunktion oder ihre Morphologie betreffend, festgestellt werden<sup>136</sup>.

Allen Krankheitsbildern gemein ist jedoch die beeinträchtigte Funktion von BSEP. Bereits mehr als 150 Mutationen (sowohl *Missence*- als auch *Frameshift*- und *Splice-Site-Mutationen*) konnten von Patienten, welche typische klinische Symptome einer der genannten cholestatischen Erkrankungen aufwiesen, isoliert werden<sup>7, 149</sup>. Eine Genotyp-Phänotyp-Beziehung ist bisher nur für einen kleinen Teil der Mutationen geklärt, so dass weiterhin einige Fragen offen sind: Warum haben unterschiedliche Punktmutationen des gleichen Proteins so unterschiedliche phänotypische Ausprägungen zur Folge? Kann die Lokalisation der Mutation im Strukturmodell von BSEP einen Aufschluss über den Schweregrad der BSEP-Beeinträchtigung geben? Führen Punktmutationen zu Fehlfaltungen und aufgrund des daraus folgenden verfrühten BSEP-Abbaus zu einer reduzierten BSEP-Expression? Oder beeinträchtigen Punktmutationen die BSEP-Aktivität? Ist die Kombination verschiedener Pathomechanismen für eine fulminantere Verlaufsform wie der PFIC2 verantwortlich?

Um eine genauere Kenntnis über die Wechselwirkung von Mutation und phänotypischer Ausprägung zu erlangen und daraus wiederum spezifische Therapiestrategien entwickeln zu können, wurden in dieser Arbeit die Punktmutationen pW342G, pN591S, pG648V und pR698H auf Ihre zugrunde liegenden Pathomechanismen genauer untersucht. Hierfür wurde die BSEP cDNA mittels *Directed-Recobination- Assisted Mutagenesis* (DREAM) realisiert und mittels transienter Transfektion in HEK293-Zellen transfiziert. Anhand eines C-terminal fusionierten *enhanced Yellow Fluorescent Protein* (EYFP) konnten anschließend Expression und Trafficking der BSEP-Mutationen durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie analysiert werden. Mit Hilfe eines [<sup>3</sup>H]- Taurocholat- Transportassays wurde die Aktivität der BSEP-Mutationen in HEK293-Gesamtmembranvesikeln gemessen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Oligonukleotide für die DREAM-Mutagenese

Name	Verwendung	Hersteller	Ort	Land
5x HF-Puffer	PCR	QIAGEN	Hilden	DE
10mM dNTP (Nukleotid-Mix)		Roche	Basel	CH
Primer A		Eurofins Genomic	Ebersberg	DE
Primer B		Eurofins Genomic	Ebersberg	DE
BSEP- Wildtyp- Plasmid		Eurofins Genomic	Ebersberg	DE
Phusion HiFi DNA-Polymerase		ThermoFisher Scientific	Waltham, Massachusetts	USA
1% Agarosegel		Gelelektrophorese	VWR-Chemicals (BDH Prolabo)	Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich (E8751)		St. Louis, Missouri	USA
Natriumacetat	Fällung der DNA	MERCK	Darmstadt	DE
100% Ethanol		VWR-Chemicals (BDH Prolabo)	Darmstadt	DE
70% Ethanol		VWR-Chemicals (BDH Prolabo)	Darmstadt	DE
<b>PLATE- Puffer:</b>	Transformation von DNA in Hefe			
1mL 10x TE (100mM Tris pH 7,5)		Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe	DE
1mL 10x LiAc (1M LiAc pH 7,5)		Sigma-Aldrich	St. Louis	USA
8mL 50% PEG4000		FLUKA Honeywell International	Morristown, New Jersey	USA
<b>LATE- Puffer:</b>	Transformation von DNA in Hefe			
1mL 10x TE (100mM Tris pH 7,5)		Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe	DE
1mL 10x LiAc (1M LiAc pH 7,5)		Sigma-Aldrich	St. Louis	USA
8mL H2O				
<b>Rescue-Puffer:</b>	Transformation von DNA in Bakterien			
4,8mL 2M Sorbitol		SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg	DE
0,8mL 1M NaPO <sub>4</sub> pH7,4 mit ddH2O auf 8mL bringen		MERCK	Darmstadt	DE
16mikroliter 1M DTT		Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe	DE

## Material und Methoden

10mg/mL lysierende Enzyme aus <i>Trichoderma harzianum</i> lyophilized powder	<b>Transformation von DNA in Bakterien</b>	Sigma-Aldrich	St. Louis	USA
<b>Low-Salt-LB:</b> 10g/l Trypton/Pepton 5g/l Hefeextract	<b>Transformation von DNA in Bakterien zum Gießen von Wachstumsplatten für <i>E. coli</i></b>	Merck (1.02239.0500)	Darmstadt	DE
5g/l NaCl		Fluka Analytical (70161-500G) nun Honeywell	Seelze	DE
1l H <sub>2</sub> O		VWR-Chemical (BDH Prolabo)	Darmstadt	DE
Agar (1,5%)		AppliChem (A0949.0500)	Darmstadt	DE
<b>Oligonukleotide zur BSEP-Sequenzierung</b>				
BseqFOR1	CATGTGTGAATAACACC ATTGTA	Eurofins Genomic	Ebersberg	DE
BseqFOR2	TAGGAGAATAATGAGAA TGGA			
BseqFOR3	TTACGGACTATGAGCTG AAG			
BSEP-FWD-Seq3	CCATCGCTTGCCACCA TCC			
BseqFOR4	AGTGTCATAGTAGGAGC TT			
BseqFOR5	TAGAGATCAGATTGGGA TA	Eurofins Genomic	Ebersberg	DE
BseqFOR6	AGAGCTGCAGATACCAT CAT			
BseqFOR7	CATTAGCTGTTGTAGAT CATA			
BseqFOR8	GAGCATGACAACAAGA CTT			
BseqFOR9	GATGTTGACAGGATTTG C			
BseqFOR10	GTGATCTCTGCAGTTGT AC			

### 3.1.2 SDS-PAGE und Western-Blot

Name	Verwendung	Hersteller	Ort	Land
1mL Acrylamid	<b>5% Sammelgel</b>	AppliChem GmbH	Darmstadt	DE
0,8mL Tris HCL 0,5M pH6,8		VWR Chemicals	Darmstadt	DE
1,4mL 60% Saccarose		FLUKA Honeywell International	Morristown, New Jersey	USA
2,6mL H2O				
3µl Tetramethylethylen- diamin (TEMED)		Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri	USA
15µl APS (Ammonium persulfat)		SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg	DE
1,87mL Acrylamid		AppliChem GmbH	Darmstadt	DE
2,24mL Tris HCL 0,5M (pH6,8)	VWR Chemicals	Darmstadt	DE	
3,89mL H2O	<b>7% Trenngel</b>			
5µl TEMED		Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri	USA
25µl APS		SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg	DE
SDS	<b>SDS-PAGE</b>	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri	USA
Marker für SDS-PAGE		Bio-Rad	Hercules, Kalifornien	USA
(5x-Loading-Puffer s. Tabelle "Puffer")				
Filterpapier (Whatman TM-Papier)		GE Healthcare	Buckimhamshire	UK
Nitrocellulosemembran		GE Healthcare	Buckimhamshire	UK
Tris/HCl 20mM pH8	<b>TBS(T) zum Blocken</b>	VWR Chemicals	Darmstadt	DE
NaCl 250mM		VWR Chemicals	Darmstadt	DE
(Tween 20 0,1% v/v)		MERCK	Darmstadt	DE
Milchpulver	<b>zum Blocken</b>	AppliChem GmbH	Darmstadt	DE
		A0830,1000		
Ponceau S	<b>Färbung des Blots/ Detektion der Proteinbanden</b>	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri	USA

### 3.1.3 Puffer

Puffername	Verwendung	Zusammensetzung	Hersteller	Ort	Land
<b>Hypoosmolarer Puffer</b>		Lösung 1			
		34,4mg NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	MERCK	Darmstadt	DE
	Zellaufschluss/ Membran- präparation für Aktivitäts- untersuchung	19mg EDTA pH 5,1  500mL H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH und Co.KG	Karlsruhe	DE
		Lösung 2			
		44,6mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	MERCK	Darmstadt	DE
		19mg EDTA  500mL H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH und Co.KG	Karlsruhe	DE
		>500mL Lösung 2 vorlegen; mit Lösung 1 auffüllen bis pH 7			
<b>Resuspensions-Puffer</b>		50mM HepesTris	Sigma-Aldrich/ VWR Chemicals	St.Louis/ Darmstadt	USA/ DE
	Membran- präparation	100mM KnO <sub>3</sub>	MERCK	Darmstadt	DE
	für Aktivitäts- untersuchung	50mM Sucrose	SIGMA life science (84097- 1KG)	St. Louis; Missouri	USA
		auf pH 7,4 mit Tris (hydroxymethylami noethane)	VWR chemicals BDH Prolabo	Langenfeld	DE
<b>Bradford Reagenz</b>	Photometrische und quantitative Protein- bestimmung der Membran- präparationen		Bio-Rad  Cat.No: 500- 0006	München	DE
<b>5x Loadingpuffer</b>		147µl 1.5M Tris/HCL	VWR chemicals	Darmstadt	DE
		450µl 0.5M EDTA	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe	DE
		4.5mL 29%SDS	Bio-Rad	Hertfordshire	UK
	SDS-PAGE	6.16g Sucrose	SIGMA life science (84097-1KG)	St. Louis; Missouri	USA
		"Spatelspitze" Bromophenol Blue	MERCK	Darmstadt	DE

## Material und Methoden

Puffername	Verwendung	Zusammensetzung	Hersteller	Ort	Land
<b>Assay-Mix</b>		2mL 10mM HEPES-Tris, pH 7,4	Sigma-Aldrich/ VWR Chemicals	St.Louis/ Darmstadt	USA/ DE
		1mL 1M KNO <sub>3</sub> -Lösung	MERCK	Darmstadt	DE
	3H-Taurocholat-Uptake-Messung	1mL 0.1M Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Lösung 6mL Wasser	MERCK	Darmstadt	DE
		0,171g Sucrose	SIGMA life science (84097-1KG)	St. Louis; Missouri	USA
<b>0,2M Mg-ATP-Lösung</b>		2,2g ATP	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri	USA
		0,813g MgCl <sub>2</sub>	QIAGEN	Hilden	DE
	3H-Taurocholat-Uptake-Messung	10mL Wasser			
		auf pH von 7.0 mit 1,7M Tris-Lösung dann mit Wasser auf ein Endvolumen von 20mL	VWR Chemicals	Darmstadt	DE
<b>1.7M Tris-Lösung</b>	3H-Taurocholat-Uptake-Messung	20,587g Tris-Base 100mL Wasser	VWR Chemicals	Darmstadt	DE
<b>10mM HEPES-Tris</b>		0,24g HEPES in 80mL Wasser	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri	USA
	3H-Taurocholat-Uptake-Messung	auf pH 7,4 mit 1,7M Tris-Lösung mit Wasser auf Gesamtvolumen von 100mL	VWR- Chemicals	Darmstadt	DE
<b>Waschlösung</b>		50mL 100mM Tris- HCL, pH 7,4	VWR-Chemicals	Darmstadt	DE
	3H-Taurocholat-Uptake-Messung	50mL 1M KNO <sub>3</sub> -Lösung 400mL Wasser	MERCK	Darmstadt	DE
<b>100mM Tris-HCL</b>		1,21g Tris-Base in 80mL Wasser	VWR-Chemicals	Darmstadt	DE
	3H-Taurocholat-Uptake-Messung	auf pH 7.4 mit 5-10M HCL-Lösung mit Wasser auf ein Endvolumen von 100mL	VWR-Chemicals	Darmstadt	DE
<b>3H-Taurocholat</b>	3H-Taurocholat-Uptake-Messung		Perkin Elmer	Waltham, Massachusetts	USA

### 3.1.4 Kulturen und Medien

Kulturname	Verwendung	Zusammensetzung	Hersteller	Ort	Land
<b>YPD</b>	Hefemedium	100mL sterile Glucose (20%)	Caesar & Loretz GmbH	Hilden	DE
		1,3g Leucin auf 50mL	MERCK	Darmstadt	DE
		0,3g Histidin auf 50mL	SIGMA-Aldrich	St.Louis, Missouri	USA
		0,2g Uracil auf 50mL	SIGMA-Aldrich	St.Louis, Missouri	USA
		0,4g Tryptophan auf 50mL	MERCK	Darmstadt	DE
		10g/l Yeast extract	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe	DE
		20g/l Trypton/Pepton 900mL H2O	MERCK	Darmstadt	DE
<b>Dropout-Medium</b>	für Hefemedium	3,4g Bacto- Yeast nitrogen base (YNB)	Difco Laboratories	Detroit, Michigan	USA
		2,86g Aminosäuren- Mix (jeweils höchster Reinheitsgrad)	SIGMA-Aldrich	St.Louis, Missouri	USA
		10g Ammoniumsulfat	J.T. Baker	Phillipsburg, New Jersey	USA
		700mL H2O			
<b>Low-Salt-LB</b>	Bakterien- medium	10g/l Trypton/ Pepton	Merck (1.02239.0500)	Darmstadt	DE
		5g/l Hefeextrakt	Fluka Analytical (70161-500G) nun Honeywell	Seelze	DE
		5g/l NaCl	VWR-Chmical (BDH Prolabo)	Darmstadt	DE
		1l H2O Agar (1,5%)	AppliChem (A0949.0500)	Darmstadt	DE
<b>Opti-MEM</b>	Zellkultur- medium		Gibco ThermoFisher Scientific(51985- 026)	Schwerte	DE
<b>FCS (fetal bovine serum)</b>	Zellkultur		HyClone ThermoFisher Scientific (SV30160.03)	Schwerte	DE
<b>Dulbecco`s MEM</b>	Zellkultur/ Transfektion von HEK293- Zellen		Biochrom AG	Berlin	DE
<b>Trypsin</b>	Zellkultur (Lyse)		CytoGen GmbH	Sinn	DE
<b>PBS Dulbecco</b>	Puffer um die HEK293- Zellen zu Waschen		Biochrom AG	Berlin	DE
<b>Extreme Gene HP</b>	DNA- Transfektions- reagenz		Sigma-Aldrich Chemie GmbH/ Merck Millipore	München/Darm stadt	DE

## Material und Methoden

Kulturname	Verwendung	Zusammensetzung	Hersteller	Ort	Land
Methanol	Fixieren der HEK293-Zellen		Carl Roth GmbH+ Co.KG	Karlsruhe	DE

### 3.1.5 Marker und Antikörper

Name	Verwendung	Hersteller	Ort	Land
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase-Antikörper, Herkunft: Maus	Immunfluoreszenzfärbung der HEK293-Zellen:	Merck Millipore	Darmstadt	DE
Anti-Mouse, Cy3-gekoppelt (1:500)		Jackson Immuno Research	West Grove, Pennsylvania	USA
Höchst 33580 (1:20000)		Invitrogen/ ThermoFisher scientific	Waltham, Massachusetts	USA
DAKO Fluoscent Mounting Medium		Agilent	Santa Clara	USA
BSEP-F6-Mouse-Antikörper	Western-Blot-Färbung	Santa Cruz Biotechnology inc.	Dallas, Texas	USA
Anti-Mouse-IgG-HRP				

### 3.1.6 Technische Geräte

Name	Hersteller/Marke	Ort	Land
Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf/ Eppendorf-research	Hamburg	DE
T3000 Thermocycler (für PCR)	Biometra	Göttingen/ Jena	DE
Eppendorf Zentrifuge 5415D Zentrifuge (mit Kühlung z.B. für Membranpräparation)	Eppendorf	Hamburg	DE
Ultrazentrifuge mit Kühlung z.B. für Membranpräparation oder DNA-Transformation in E-Coli	Beckman Coulter	Brea, Kalifornien	USA

## Material und Methoden

Name	Hersteller/Marke	Ort	Land
Ultrazentrifuge J-20xP (z.B. für DNA- Transformation in Saccharomyces cerevisiae)	Beckman Coulter	Brea, Kalifornien	USA
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen	DE
NanoDrop 1000 (z.B. zur Messung des DNA- Gehalts einer Probe)	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen	DE
DNA-Gelkammern und UV-Tisch für Gelelektrophorese	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen	DE
Brutschrank für die HEK293-Zellen	Fa. BINDER GmbH	Tuttlingen	DE
Vortexer L46 für die Transfektion der HEK 293-Zellen	Labinco	Breda	NL
Pipetboy	Integra Biosciences	Biebertal	DE
sterile Sicherheitswerkbank	Heraeus	Hanau	DE
horizontaler Inkubatorschüttler GFL3031	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel	DE
Brutschrank	Memmert GmbH und Co.KG	Büchenbach	DE
Glas-Teflon-Potter	Kontes Glass Inc.	Vineland, NJ	USA
Multiskan Spektrum (für die Messung des Proteingehalts einer Probe nach Bradford)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts	USA
Gelkammer und Elektrophoresekammer für SDS-PAGE und Western-Blot	Biometra	Göttingen	DE

## Material und Methoden

Name	Hersteller/Marke	Ort	Land
ChemiGenius2 Imaging System	Syngene	Bangalore/ Cambridge	IN/UK
Software: Gene Tools (zur Detektion und Densitometrie des Blots)	Syngene	Bangalore/ Cambridge	UK
LSM-Mikroskop (Laserscanning Microscope) 510 META	Carl Zeiss™	Oberkochen	DE
1225-Vielfach-Filtrationsgerät (für 3H-Taurocholat-Uptake-Messung)	MERCK Millipore	Darmstadt	DE
Liquid scintillation Analyzer Tri-Carb 2900TR	Perkin Elmer/Packard	Waltham, Massachusetts	DE

### 3.1.7 Verbrauchsmaterial

Name	Verwendung	Hersteller	Ort	Land
Eppendorf Safe-Lock Tubes (0,5mL)	PCR, Transformation in Hefe/E-Coli Zellkultur, Western-Blot, Activity-Assay	Eppendorf	Hamburg/Wesseling-Berzdorf	DE
50mL Falcon-Tubes	E-Coli-Kultur/ Mini- und Maxi-Präparation	Falcon	Berlin	DE
15mL Falcon-Tubes	E-Coli-Kultur/ Mini- und Maxi-Präparation	Falcon	Berlin	DE
Erlenmeier Schüttelkolben 500mL	E-Coli-Kultur	Schott AG	Mainz	DE
Petrischalen	Hefe-/Bakterienkultur	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	DE
12-Well-Platte	Zellkultur/ Färbung + Transformation von HEK293-Zellen	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	DE
75mL-Zellkulturflasche	Zellkultur (HEK 293-Zellen)	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	DE
Deckgläschen	Färbung transient transfizierter HEK-293-Zellen	VWR	Darmstadt	DE

## Material und Methoden

Name	Verwendung	Hersteller	Ort	Land
Objektträger 76x26mm	Färbung transient transfizierter HEK-293- Zellen	Engelbrecht	Edermünde	DE
145mm Zellkulturschalen	Membranpräparation für Aktivitätsuntersuchung	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	DE
Filterpapier	BSEP-Aktivitätsmessung mittels 3H-Taurocholat	MERCK Milipore	Darmstadt	DE
Szintillationsdöschen	BSEP-Aktivitätsmessung mittels 3H-Taurocholat	Perkin Elmer	Waltham, Massachusetts	USA
Pipetten (10mL und 25mL)	Zellkultur, Membranpräparation	Corning	New York	USA
Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	sämtliche durchgeführte Versuche	Eppendorf/Eppendorf- research	Hamburg	DE
Mini- und Maxi- Preparation	DNA-Präparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>E. Coli</i> -Kultur	QIAGEN	Hilden	DE

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 BSEP-Mutagenese mittels *Directed-Recombination-Assisted Mutagenesis (DREAM)*

Um die in unserem Cholestaselabor (Universitätsklinik Düsseldorf) zum einen neu entdeckten (p.W342G und p.G648H) und zum anderen gehäuft vorkommenden (p.N591S und p.R698H) Mutationen bezüglich mRNA- und Proteinexpression sowie Trafficking und Aktivität in HEK293-Zellen genauer untersuchen zu können, wurde durch Mutagenese des Wildtyp-BSEP-Plasmids die jeweilige Mutante generiert. Hierfür wurde die Methode der *directed recombinated assisted Mutagenesis (DREAM)* verwendet<sup>150</sup>. In einem ersten Schritt wurde dabei die jeweilige Mutation in die cDNA von BSEP mittels PCR eingefügt. Neben der jeweiligen BSEP-Mutation enthält das verwendete Plasmid einen *origin of replication (Ori)*, einen Selektionsmarker (Leucin Prototrophie-Marker) für *Saccharomyces cerevisiae*, einen weiteren Selektionsmarker für *E. coli* in Form einer Antibiotikaresistenz für Kanamycin und einen *eYFP-Tag* am C-terminalen Ende des BSEP-Proteins. Mit Hilfe des eYFP-Tags kann die jeweilige BSEP-Variante später fluoreszenzmikroskopisch in HEK293-Zellen erkannt werden. Das mittels DREAM-PCR erhaltene und gezielt mutierte Plasmid (in linearer Form) wurde zunächst durch die Zugabe von doppelt-destilliertem Wasser auf ein Volumen von 100µl gebracht, um dann mit Hilfe von 10µl Natriumacetat und 200µl von 100% Ethanol, Kühlen über eine Stunde bei -20°C, anschließendem Zentrifugieren über 30 Minuten in der Kaltzentrifuge sowie Lösen des Überstands nun in 70% Ethanol mit anschließendem Zentrifugieren über 10 Min gefällt, dann getrocknet und letztendlich in 100 µl doppelt-

destilliertem Wasser rekonstituiert zu werden. Anschließend wurde das entstandene Plasmid bezüglich Größe und Intaktheit per Gelelektrophorese nach Standardprotokoll überprüft<sup>151</sup>. Hierfür wurde eine Spannung von 140V verwendet. Entsprechend der Größe des gewonnenen linearen Plasmids (12kbp), wurde es anschließend in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert, um aus dem linearen Plasmid ein intaktes zirkuläres Plasmid zu generieren. Der Weg über die Hefe wurde gewählt, da u.a. durch Noe und Stieger et al. 2002 bereits herausgefunden wurde, dass BSEP für Bakterienkulturen toxisch ist, durch Bakterien also kein intaktes, zirkuläres und vermehrungsfähiges Plasmid gewonnen werden kann<sup>152-154</sup>. Nach zwei bis sechs Tagen im 30°C Brutschrank wurde das Hefewachstum überprüft und von den gewachsenen Hefeklonen das nun generierte zirkuläre Plasmid extrahiert. Hierfür wurden die Hefeklonen zunächst erneut, nun auf in zwölf Quadranten untergliederte Selektions-Platten (Dropout-Leu-Platte) ausgestrichen. Dabei wurde pro Quadrant jeweils ein Hefeklon ausgestrichen um anschließend genug Material für die Plasmid Rescue zu haben. Die dann pro Quadrant gewachsene Hefe wurde schließlich in ein Eppendorf-Tube mit jeweils 125µl Rescue-Puffer (bestehend aus Sorbitol, NaPO<sub>4</sub>, DTT und 10mg/mL *Lysing Enzymes*) und 125µl P1-Puffer des Qiagen Minipräparation-Kits gegeben. Um die Zellwand der Hefen anzudauen, wurden die Suspension anschließend 45Min in einem Brutschrank mit 37°C inkubiert, bevor das Plasmid dann nach Protokoll der Qiagen Minipräparation gewonnen wurde.

Da Hefen zwar aus linearer cDNA ein intaktes Plasmid, hiervon quantitativ jedoch nur wenig generieren, wurde das Plasmid anschließend in Bakterien (*E. coli*) transformiert. Hierfür wurde 5µl der mittels Minipräparation aus den Hefen gewonnenen DNA zu 45µl chemokompetenter *E. coli* gegeben und diese damit für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Transformation durch Hitzeschock über eine Minute bei 42°C wurden die Bakterien zwei Minuten auf Eis gekühlt um dann nach Zugabe von 700µl vorgewärmtem Low-Salt-LB 90 Minuten bei 30°C geschüttelt zu werden. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 6.000xg sedimentiert und nach Dekantieren des Überstandes im Rücklauf resuspendiert, auf LB-Kanamycin-Platten ausplattiert und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert, bis neue Kolonien gewachsen waren. Mit diesen wurden jeweils 3mL LB-Kan-Kulturen angeimpft, welche anschließend über Nacht bei 30°C inkubiert wurden. Dabei wurden die Kulturen 200fach/Min geschüttelt. Aus 2mL dieser Kulturen wurden Plasmid-Minipräparationen angefertigt und ein Aliquot per analytischer Agarose-Gelelektrophorese auf die korrekte Größe überprüft. Positive Klone wurden dann mit Hilfe der BSEP-Sequenzierprimer sequenziert, und mit dem Rest der Minikultur von sequenzverifizierten Klonen (keine unerwünschten Mutationen neben der eingefügten) wurde nun eine Maxi-Kultur mit 400mL Low-Salt-LB mit Kanamycin über zwei bis drei Tage bei 30°C und 200fachem Schütteln/Min hochgezogen. Für die Maxi-Präparation wurden die *E. coli* der Kultur bei 4°C und 8.000xg geerntet. Das Plasmid wurde dann mittels des Qiagen-Maxipräparation-Kits aus dem Pellet bzw. den *E. coli* nach Herstellerangaben gewonnen und nochmals sequenzverifiziert. Generell wurde die BSEP-cDNA in den Plasmiden aus Effizienzgründen zunächst nur mit den ersten vier Primern (for65, for1-3) sequenziert; nur Plasmide ohne unerwünschte Sequenzänderungen wurden dann vollständig durchsequenziert.

## PCR und DNA-Fällung

Für die Mutagenese- PCR wurden zu 35,5µl H<sub>2</sub>O

- 10µl 5fach HF-Puffer
- 1µl 10mM dNTP
- 1µl 1:10 Primer A (der gewünschten Mutation)
- 1µl 1:10 Primer B (der gewünschten Mutation)
- 1µl 10ng/µl BSEP-Wildtyp-Plasmid

gegeben, wobei *Primer A* und *Primer B* sich jeweils überlappen. Erst nach einem „hot start“ von zwei Minuten auf 98°C Temperatur wurde 0,5µl *Phusion-HiFi-DNA-Polymerase* hinzugefügt. Anschließend wurde das *DREAM*-Programm der PCR (weitere 50 Sekunden bei 98°C, dann zum *Annealing*, also der Anlagerung der Primer an das 3'Ende der DNA, weitere 50 Sekunden bei 60°C und für die *Extension*, der Anlagerung komplementärer Basen durch die DNA-Polymerasen vom 3' zu 5' Ende und damit der die Vervielfältigung des DNA-Fragments schließlich 18mal für 16 Minuten bei 68°C) initiiert. Das *Polishing* und damit die Reinigung der 3'- und 5'- Enden von evtl. angehängten DNA-Fragmenten erfolgte zum Schluss über 10 Minuten ebenfalls bei 68°C.

Für die Fällung wurden die jeweiligen PCR-Produkte mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf insgesamt 100µl Probenvolumen gebracht und anschließend 10µl Natriumacetat sowie 200µl 100% Ethanol hinzugegeben. Danach wurde die jeweilige Probe für mindestens 1h bei -20°C gekühlt bevor sie über 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert wurde. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 500µl von 70% Ethanol resuspendiert, um letzte Salzreste zu entfernen. Diese Lösung wurde anschließend erneut über eine Minute zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen und das entstandene Pellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet bevor es in 100µl doppelt destilliertem Wasser rekonstituiert und zum Schluss bei -20°C gelagert wurde.

## Transformation der cDNA in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Die Transformation der cDNA in *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte, um aus der linearen cDNA ein zirkuläres Plasmid zu generieren. In einem ersten Schritt wurden dabei 30µl kompetente Hefen auf das DNA-Pellet gegeben. Mit Hilfe von 180µl PLATE-Puffer wurde dann aus Hefe und DNA eine Suspension hergestellt, welche anschließend über 20 Minuten bei 30°C inkubiert wurde. Danach wurde die Suspension über weitere 20 Minuten nun aber bei 42°C inkubiert. Hierbei wurde die Lösung alle fünf Minuten invertiert, um ein Absetzen der Hefe zu verhindern. Um den PLATE-Puffer nun wieder zu eliminieren wurde die Lösung schließlich über 10 Minuten bei 500xg zentrifugiert und das verbleibende Pellet dann mit 100µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Auf Dropout-Leu-Platten ausgestrichen, wurden die Hefen bei 30°C für 2-6 Tage im Brutschrank zum Schluss inkubiert, bevor das dann mit Hilfe der Hefen entstandene zirkuläre Plasmid per Qiagen-Minipräparation gewonnen werden konnte.

Die für die Transformation benötigten kompetenten *Saccharomyces cerevisiae*-Hefen wurden folgendermaßen hergestellt:

- 1 Hefekolonie wurde in 5mL YPD bei 30°C über Nacht geschüttelt
- Messen der OD (optischen Dichte) der Übernachtskultur am nächsten Morgen, denn auf 50mL YPD sollte pro mL eine OD von 0,3 der Übernachtskultur hinzugegeben werden um ein optimales Verhältnis von Hefen und Nährmedium (YPD) zu erhalten
- Zentrifugieren der 50mL YPD mit 0,3 OD Hefe über 5 Minuten bei 4.000xg um die Zellen zu ernten
- Resuspension der Hefezellen in 1 mL LATE-Puffer
- Erneutes Zentrifugieren nun über 5 Minuten bei 2.800xg
- Resuspension des Pellets mit 50 µl/10 OD LATE-Puffer und bis zur Verwendung im Kühlschrank lagern (Haltbarkeit ca. 7 Tage)

### **3.2.2 Transiente Transfektion/Expression von BSEP in HEK293-Zellen**

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitsarbeitswerkbank durchgeführt. Hierfür wurden zunächst jeweils 100µl serumfreies OPTIMem mit jeweils 2µg zu transfizierender DNA versetzt, kurz gevortext und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen erfolgte ein Mediumwechsel der tags zuvor gesplitteten und auf sterilen Deckgläschen in einer 12well-Platte ausgesetzten sowie mit DMEM/10%FBS-Medium inkubierten HEK293-Zellen. Hierbei wurde das „alte“ Medium (Dulbecco's MEM von Biochrom) abgesaugt und 500µl neues Medium hinzugegeben. Nach der 5-Minuten-Inkubation des OPTIMem- DNA-Gemischs wurden jeweils 6µl Extreme-Gene-HP (3µl pro µl DNA) hinzugegeben, die Mischung dann ebenfalls kurz gevortext und schließlich für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das jeweilige OPTIMEM-DNA-Gemisch auf die Zellen eines Wells getropft, bevor die 12well-Platten mit den Deckgläschen für weitere 4-6h inkubiert wurden. Nach dieser Zeit erfolgte ein erneuter Medienwechsel und pro Well bzw. Deckgläschen wurde 1mL frisches und vorgewärmtes Medium (D-MEM mit 10%FCS) hinzugegeben. Die nun transfizierten HEK-293-Zellen können nach weiterer 48h Inkubation im Brutschrank fixiert und gefärbt werden.

### **3.2.3 Fixieren der HEK293-Zellen und Immunfluoreszenzfärbung**

Um die transient mit der jeweils zu untersuchenden BSEP-Mutation transfizierten HEK293-Zellen färben und anschließend mikroskopisch bezüglich Expression und Trafficking von BSEP untersuchen zu können, wurden die Zellen zunächst auf den zuvor in der 12well-Platte ausgelegten Deckgläschen fixiert. Hierfür wurde das Medium, mit dem die transfizierten Zellen nun 48h inkubiert waren, abgesaugt und jeweils zweimalig mit 1mL PBS/well

gewaschen. Anschließend wurden die Zellen über 30 Sekunden mit jeweils 500 $\mu$ L von -20°C gekühltem Methanol fixiert und erneut zweimalig mit jeweils 1mL PBS gewaschen. Die so fixierten Zellen wurden für 30 Minuten mit 5% FCS in PBS (Blocklösung) inkubiert. Für die Färbung wurden die Deckgläschen zunächst mit 30 $\mu$ L des ersten Antikörpers, dem mouse-anti-human-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase- Antikörper (1:100 in einer Blocklösung bestehend aus 1ml PBS + 50 $\mu$ L FCS verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in jeder humanen Zellmembran wurde der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Antikörper hierbei als Zellmembranmarker verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit 1ml PBS über jeweils 10 Minuten wurde zum einen in einer Konzentration von 1:500 der sekundäre Antikörper für die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Anti-Mouse-IgG, Cy3-gekoppelt) und zum anderen Höchst 33580 in einer Verdünnung von 1:20000 für die Anfärbung der Zellkerne, wieder in 30 $\mu$ L Blocklösung gelöst, auf die Deckgläschen gegeben und ebenfalls für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut dreimalig mit PBS gewaschen. Auch hierbei wurden die Deckgläschen pro Waschgang jeweils über 10 Minuten mit PBS inkubiert. Zum Schluss wurde das jeweilige *Well* mit jeweils 1mL destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach Abtropfen der Deckgläschen auf Filterpapier wurden sie auf einen zuvor mit jeweils einem Tropfen DAKO Fluorescent Mounting Medium vorbereitetem Objektträger gegeben. Nach weiteren 10 Minuten wurde das überschüssige Eindeckelmedium entfernt und die Objektträger mit den fixierten und gefärbten HEK293-Zellen bei 4°C und im Dunkeln bis zur mikroskopischen Analyse gelagert.

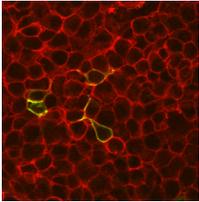
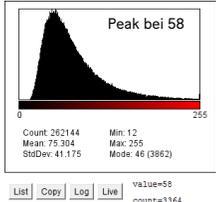
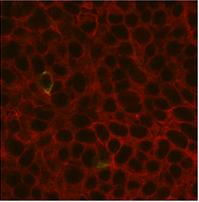
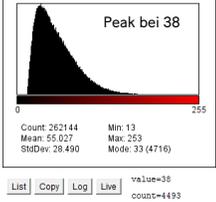
### **3.2.4 Mikroskopische Beurteilung und statistische Auswertung von BSEP-Expression und -Kokalisation**

Für die Auswertung bezüglich Expression, Trafficking und Kokalisation von BSEP mit der Zellmembran wurden die transient transfizierten und mit Hilfe der Immunfluoreszenz gefärbten Zellen mit einem konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop mikroskopiert. Für die spätere Auswertung wurden insgesamt fünf, an jeweils fünf unterschiedlichen Tagen transfizierte und schließlich fixierte bzw. gefärbte Sets eingeschlossen. Ein Set bestand aus jeweils einer Zellreihe, welche jeweils an einem Tag transfiziert und zwei Tage später gefärbt wurde. Es beinhaltete jeweils BSEP-Wildtyp, p.W342G, p.N591S, p.G648V und p.R698H. Mit Hilfe der AxioVision-Software von Zeiss (Version Release 4.8.2 SP2 06-2012) wurden am Lasermikroskop mit einem 40x -Okular pro Mutation jeweils 30 Bilder mit 512x512 Pixeln erstellt. Kriterien, um das Set in die spätere Auswertung einschließen zu können, waren Intaktheit der Zellen, vereinzelt liegende Zellen (nicht in Gruppen bzw. übereinander gelegene Zellen um Überlagerungen der Färbung bzw. Expression ausschließen zu können), gleichmäßige Färbung, gleichmäßiges Fixieren und gleichmäßige Verteilung des Eindeckelmediums sowie eine für alle Bedingungen gleiche mittlere Zellgröße. Bei der Mikroskopie wurde jeweils ein einheitlicher *Scan Speed* von „neun“ verwendet, um ein zu schnelles Ausbleichen der Zellen zu vermeiden. Außerdem wurde jede Zelle jeweils achtmal vom Laser abgetastet, also stets ein achtfacher Scan benutzt. Zudem wurde die Lochblende mit einer *Airy Unit* eingestellt um eine optimale Auflösung zu erzielen. Die Laserstärke wurde

an die Intensität bzw. Qualität der Zellfärbung des jeweiligen Sets angepasst, um es numerisch auswertbar zu machen und Rauschsignale zu minimieren. Sie betrug für „grün“, also für BSEP-EYFP, 67,3- 70,3% und für „rot“, also den Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Antikörper, 37,6-42,5%. Innerhalb eines Sets wurde für jede Bedingung jedoch die gleiche Laserstärke verwendet. Die Sensitivität des Mikroskopdetektors bzw. die vom Detektor aufgenommenen und in das Bild eingeschlossenen Pixel wurden mittels *Detector Gain* und *Amplifier Offset* reguliert. Mit Hilfe des *Detector Gains* wurde das obere Intensitätslimit gesetzt, was die maximale Pixelintensität bedeutet, bis zu dem Pixel erkannt und in das Bild aufgenommen wurden. Der *Detector Gain* betrug für rot 828-943 und für grün 903-938. Der *Amplifier Offset*, mit welchem die minimale Pixelintensität festgelegt wird, welche vom Detektor noch aufgenommen wird, betrug für alle fünf Sets 0,1. Die Einstellung für Laserstärke, *Detector Gain* und *Amplifier Offset* wurden für jeweils ein Set passend festgelegt und waren innerhalb des jeweiligen Sets für jede Bedingung, also für jede BSEP-Mutation, gleich.

Mit Hilfe der Software AxioVision LE (Version Release 4.8.2 SP2 (06-2012)) von Zeiss konnten die Pixelintensitäten der auf die beschriebene Weise angefertigten Bilder anschließend analysiert, quantifiziert und aus den verschiedenen Farbkanälen in Beziehung gesetzt werden. Dabei ist die Pixelintensität ein Maß für die Expression und die Überlagerungen der Intensitäten wiederum ein Maß für die Kolo-kalisation, wodurch sich wiederum Aussagen zum Trafficking ableiten ließen. Pro in AxioVision hochgeladenem Bild wurden hierfür um einzeln liegende Zellen mit intakter Zelle-membran, welche transfiziert waren (an der grünen Färbung des EYFP-Tags erkennbar), manuell eine ROI (*region of interest*) festgelegt. Für diese ROI wurde durch AxioVision dann die Anzahl der grünen Pixel, also dem eYFP-Tag von BSEP, die Anzahl der roten Pixel, also der NaK-ATPase-Färbung der Plasmamembran, sowie die Anzahl der Pixel, in denen sich grün und rot überlagern, BSEP also mit der Plasmamembran kolokalisiert (gelb), ermittelt. Zudem wurde durch AxioVision die jeweilige Zellgröße und Pixelintensität ermittelt. Welche Pixel als rot, welche als grün und welche als gelb in welcher Anzahl erkannt und damit in der späteren Auswertung verrechnet wurden, wurde mit Hilfe des selbst zu setzenden Fadenkreuzes (*Threshold*) festgelegt. Da die grünen Pixel den EYFP-Tag und damit BSEP repräsentieren, sind die grünen Pixel zwar abhängig vom Maß der Expression der jeweiligen Variante, jedoch unabhängig von der jeweiligen Färbung. Der *Threshold* für die grüne Pixelintensität ab welcher also grüne Pixel als grün zählten und nicht als Hintergrundrauschen wurde deshalb für alle Bedingungen und alle Sets gleichermaßen auf einen Wert (Intensität) von 35 gesetzt. Ab einem Wert bzw. einer Intensität von <40 würden ansonsten auch sehr dunkle Pixel, die dann zunehmend dem Hintergrundrauschen entsprechen, mit in die Bewertung aufgenommen werden. Um gleichzeitig aber alle grünen, ja nur von der BSEP-Expression abhängigen, Pixel zu erfassen und zu bewerten wurde die Grenze für die grünen Pixel trotzdem entsprechend niedrig gewählt. Die roten Pixel spiegeln hingegen die Bildqualität und Färbung wider (bei dunklen Bildern liegt die mittlere Pixelintensität für rot bei Intensitäten von ca. 40 bei helleren Bildern bei ca. 70), weshalb der *Threshold* für die roten Pixel pro Bedingung bzw. Mutation ermittelt und damit für BSEP-Wildtyp, p.W342G, p.N591S, p.G648V und p.R698H jeweils unterschiedlich gesetzt wurde. Hierfür wurde pro Bedingung zunächst mit Hilfe der Software ImageJ die mittlere Pixelintensität der roten Pixel pro Bild ermittelt. Anschließend wurde der Mittelwert aus den pro Bild ermittelten mittleren Pixelintensitäten für rot gebildet und dieser Wert schließlich mit 1,5 multipliziert. Die Multiplikation erfolgte aufgrund der per se höheren Pixelintensität,

ab welcher die Farbe Rot auch als solche erkannt wird. Eine Pixelintensität mit Frequenzen von  $<40$  weist überwiegend sehr dunkle Pixel auf, sodass bei einem zu niedrig gesetzten *Threshold* nicht nur die rot gefärbte Zellmembran, sondern auch „Hintergrundrauschen“ in die Berechnung mit einfließen würde. Der so ermittelte Wert wurde dann pro Bild einer Bedingung verwendet, es wurde also für BSEP-Wildtyp, p.W342G, p.N591S, p.G648V und p.R698H jeweils ein unterschiedlicher *Threshold* für rot gesetzt. Eine übersichtliche Darstellung zur Berechnung der *Threshold*-Grenze, ab welcher rote Pixel also als rot gezählt wurden, zeigt Abbildung 5.

Beispielbild einer Bedingung	Histogramm des Beispielbilds	mittlere Pixelintensität dieses Bildes für Rot	Mittelwert (MW) aller Pixelintensitäten dieser Bedingung für Rot	gesetzter Threshold für Rot der ges. Bedingung (= 1,5 x MW aller Pixelintensitäten)
		75	75	113
		55	70	106

**Abbildung 5:** Um den *Threshold* für Rot, also die NaK-ATPase, so zu setzen, dass keine Bildinformationen im Sinne NaK-ATPase positiver Pixel verloren gehen, aber auch kein „Hintergrundrauschen“ in die spätere Berechnung mit einfließt, wurde pro Bedingung ein an die Qualität der Färbung und Helligkeit des Bildes angepasster *Threshold* ermittelt. Hierfür wurde zunächst ein Mittelwert der mittleren Pixelintensitäten pro Bedingung und Bild gebildet und dieser anschließend mit 1,5 multipliziert. Der so ermittelte *Threshold*wert wurde dann pro Bedingung für alle 30 Bilder verwendet.

Um aus der so pro 512x512 großem Bild generierten Pixelzahl und Pixelintensität nun eine Aussage bezüglich der BSEP-Expression und des BSEP-Traffickings treffen zu können und um zu beurteilen, welchen Effekt die jeweilige Mutation auf BSEP hat, wurden in einem letzten Schritt innerhalb der Software *AxioVision* eine *Region of interest* (ROI) um eine intakte und BSEP-enhaltende Zelle gebildet. Anschließend wurden die pro ROI enthaltenden Bildinformationen in Form der Pixelanzahl für Rot, Grün und Kolokalisiert (also gelb) sowie für eine gewichtete Wertung der jeweiligen Pixelintensität, miteinander verrechnet.

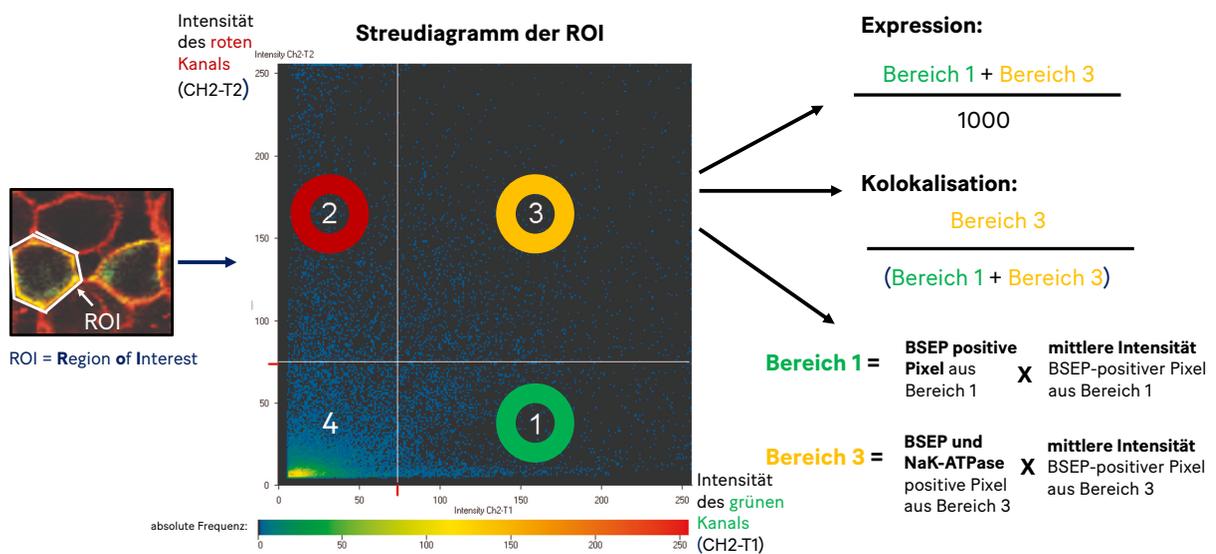
Repräsentiert in einem Streudiagramm ergeben sich für die unterschiedlichen Farbräume jeweils ein Bereich für Grün (Bereich 1), Rot (Bereich 2) und Gelb (Bereich 3). Im Bereich 4 findet sich das Hintergrundrauschen des jeweiligen Bildes. Festgelegt wurde der jeweilige Bereich durch den *Threshold* wie oben beschrieben.

Zur Ermittlung der pro Bedingung, also pro Mutation, in der Zelle erfolgten Expression von BSEP wurden der Bereich 1 und der Bereich 3 (Abb. 6), jeweils multipliziert mit der mittleren

Pixelintensität für BSEP, zusammenaddiert und schließlich durch 1000 dividiert, um ein Ergebnis pro Mille zu erhalten.

Um die Kolokalisation von BSEP mit der Zellmembran bewerten und dadurch auch einen Rückschluss auf das *Trafficking* der jeweiligen BSEP-Mutation ziehen zu können, wurden die Gesamtzahl der Pixel des Bereichs 3 durch die Summe der Gesamtzahl an Pixel von Bereich 1 und Bereich 3 dividiert (Abb. 6). Hierbei wurden für eine gewichtete Wertung die jeweiligen Pixelintensitäten mitberücksichtigt.

Eine Übersicht zur Berechnung von Expression und Kolokalisation sowie zu den unterschiedlichen, die Farbräume Rot, Grün und Gelb repräsentierenden Bereiche gibt Abbildung 6.



**Abbildung 6:** Ermittlung von BSEP-Expression und -Kolokalisation über die Pixelanzahl und -intensität für Rot und Grün pro Region of Interest (ROI), welche eine mit BSEP transfizierte Zelle markiert. Rot gefärbt und repräsentiert im roten Kanal findet sich die NaK-ATPase, also die Zellmembran. Als Grün zeigt sich der EYFP-Tag von BSEP. Im Streudiagramm repräsentiert der Bereich 1 die Pixel mit hohen grünen Intensitäten und niedrigen roten Intensitäten, Bereich 2 die Pixel mit hohen roten und niedrigen grünen Intensitäten, Bereich 3 die Pixel mit hohen Intensitätsgraden in beiden Kanälen (Rot und Grün) und damit gelb. Bereich 4 dagegen repräsentiert die Pixel niedriger Intensität in beiden Kanälen, diese Pixel beziehen sich also auf den Hintergrund bzw. das Hintergrundrauschen.

In einem letzten Schritt wurden für ein vergleichendes Endergebnis der gewichteten Kolokalisation und - Expression des BSEP-Wildtyps jeweils 100% zugeordnet und die Gesamtexpression- und Kolokalisationsergebnisse der verschiedenen Mutationen der verschiedenen (insgesamt fünf) Sets dazu ins Verhältnis gesetzt. Aus den so generierten fünf unterschiedlichen, in Prozent zu BSEP-Wildtyp gesetzten, Ergebnissen jeweils einer Mutation wurde anschließend der Mittelwert gebildet und dieser schließlich mittels T-Test mit zweiseitiger Verteilung aus Stichproben ungleicher Varianz auf seine Signifikanz in Bezug auf den BSEP-Wildtyp überprüft. Das Signifikanzlevel betrug dabei 5%.

### 3.2.5 Transiente Transfektion, Membranpräparation und Proteinbestimmung nach Bradford

Ziel der im Folgenden beschriebenen transienten Transfektion von HEK293-Zellen mit sowohl dem BSEP-Wildtyp als auch den vier verschiedenen untersuchten BSEP-Punktmutationen, deren Membranpräparation, quantitativer Proteinmengenbestimmung, Western Blot und densitometrischen Auswertung war es den Einfluss der Mutationen auf die BSEP-Aktivität in einem vergleichbaren Versuchsaufbau zu untersuchen.

Um Zellmembranen zu erhalten, welche sowohl den BSEP-Wildtyp als auch die Mutationen p.W342G, p.N591S, p.G648V, p.R698H exprimieren, wurden pro Mutation und BSEP-Wildtyp drei 15cm-Schalen mit jeweils 1,5mL HEK293-Zellen einer Zellreihe in 13mL Zellmedium (Dulbecco's MEM von Biochrom) über 48h inkubiert. Anschließend wurden die HEK-293-Zellen nach dem unter „transiente Transfektion von HEK 293-Zellen“ bereits beschriebenen Schema pro Schale mit 20µg DNA in 1,2mL OPTIMem und 40µl Transfektionsreagenz (Extrem Gene HP) transfiziert. Nach zwei Tagen Inkubation im Brutschrank erfolgte dann die Membranpräparation der transient transfizierten HEK293-Zellen. Hierfür wurden die Zellschalen jeweils dreimalig mit 15mL PBS gewaschen bevor die transfizierten HEK293-Zellen mit Hilfe von 15mL eines hypoosmolaren Puffers (bestehend aus  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  und EDTA) aufgeschlossen wurden. Die Zellen wurden dabei, auf Eis liegend, Schale für Schale, in den hypotonen Puffer gekratzt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem Falcontube rollend über 15 Minuten im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Durch das nun darauf folgende 10fache „Pottern“ mit einem Glas-Teflon-Potter wurden die im hypotonen Puffer angeschwollenen Zellen mechanisch aufgeschlossen. Die hierdurch nun „frei“ im hypotonen Puffer liegenden Membranen bilden, da energetisch am günstigsten, Vesikeln aus. Durch das Fehlen zweiwertiger Metallkationen im Aufschlusspuffer entstehen dabei sogenannte „Inside-out-Vesicle“. Um die nun so erhaltenen zu „Inside-Out-Vesicle“ zusammengeschlossenen Membranen isolieren zu können wurden die jeweiligen Proben zunächst 10 Minuten bei 400xg, dann 10 Minuten bei 1.000xg und zuletzt eine Stunde 4.000xg zentrifugiert. Das so entstandene und isolierte Membranpellet wurde zum Schluss mit erneuter Hilfe des Potters in 700µl Resuspensions- bzw. Assay- Puffer (50mM Hepes/Tris,  $\text{KNO}_3$  und 0,017% Sucrose mit einem pH von 7,4) resuspendiert und entweder mit Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt oder direkt weiterverwendet.

Wurde die Versuchsreihe direkt weitergeführt, erfolgte im Anschluss die quantitative Proteinmengenbestimmung pro die jeweilige Mutation bzw. den Wildtyp enthaltender Vesikelsuspension mittels photometrischer Bradford-Bestimmung<sup>155</sup>. Hierbei wurden zu jeweils 10µl Vesikelsuspension oder 10µl Bradford-Standardlösung jeweils 300µl von 1:5 verdünntem und gebrauchsfertigem Bradfordreagenz gegeben und die Extinktion schließlich bei 595nm gemessen. Die Vesikelsuspensionen wurden hierfür jeweils 1:30 und 1:60 mit  $\text{H}_2\text{O}$  vorverdünnt.

### 3.2.6 Western Blot und densitometrische Auswertung

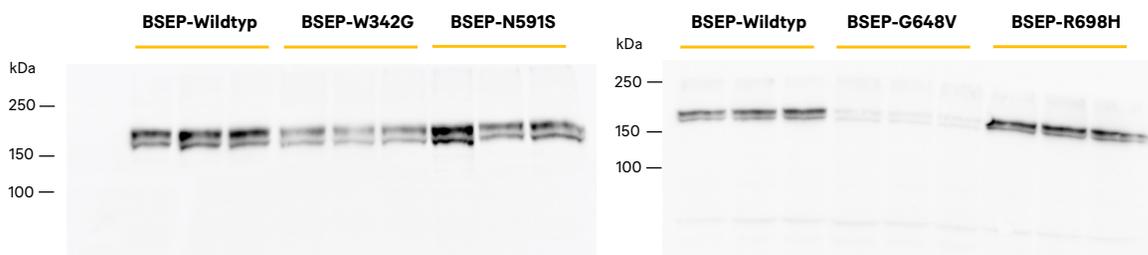
Bevor die BSEP – Aktivität der nun so generierten Vesikelsuspensionen jedoch ermittelt werden konnte, mussten zuvor noch drei verschiedene Fragen mittels Western Blot geklärt werden:

1. Wie viel BSEP ist durch bzw. während der transienten Transfektion der HEK293-Zellen an die Membran gelangt und damit nun Teil der Aktivitätsmessung? Wie viel der zuvor per Bradford-Bestimmung festgestellten Proteinmenge ist also BSEP? Ist die Transfektion gelungen? <sup>156, 157</sup>
2. Um die Aktivität der verschiedenen Mutationen einschließlich des Wildtyps miteinander vergleichbar machen zu können – wie viel quantitatives BSEP enthalten die verschiedenen Vesikelsuspensionen?  
Hierfür wurden die einzelnen Western-Blot-Banden densitometrisch miteinander verglichen und zu BSEP-Wildtyp ins Verhältnis gesetzt. Die Menge an verwendeter Vesikelsuspension wurde im Aktivitäts-Versuch dann entsprechend der densitometrischen Signalstärke angepasst <sup>158</sup>.
3. Um eine Aussage bezüglich des Grunds einer möglichen verminderten BSEP-Aktivität treffen zu können- zeigt sich BSEP im *Western Blot* nur kern- oder vollglykosyliert?

Für die Auftrennung der Proteine bzw. Detektion von BSEP in der Vesikelsuspension mittels SDS-PAGE wurden ein 5%-Sammelgel und ein 7%-Trenngel verwendet. Ein aufzutrennender Probenansatz bestand aus je 5µl Vesikelsuspension, 12µl SDS (10%) und 18µl H<sub>2</sub>O. Zur Denaturierung des Proteins und Anlagerung des SDS an das Protein wurde dieser Ansatz für 10 Minuten bei 37°C inkubiert bevor 10µl des *Loading*-Puffers (5x-Puffer) hinzugegeben wurden. Anschließend wurde dieser Probenansatz für 15 Minuten, nun bei 65°C, inkubiert. Kurz vor dem Auftragen der Probe auf das Gel (von jeder Probe wurden 25µl aufgetragen) wurden jeweils 5µl Marker hinzugefügt. Bis die Proben im Trenngel detektiert werden konnten, wurde an das Gel eine Spannung von 80V angelegt. Anschließend wurden die Membranlösungen für weitere zwei Stunden bei 120V aufgetrennt. Die so aufgetrennten Proteine aus der Vesikelsuspension wurden dann in einer *Semidry-Western Blot*-Kammer über 90 Minuten bei 120mA auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierfür wurden Gel und Nitrocellulosefolie von außen mit jeweils sechs Schichten an Filterpapier umgeben. Ob dabei ein gleichmäßiger Transfer der Membranproteine, in diesem Fall von BSEP, stattgefunden hat, wurde anschließend mittels Ponceau S-Färbung überprüft. Nach der Ponceaufärbung wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht in einer Blocklösung aus 2,5g Milchpulver und 50mL TBST inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung an die Membran während der anschließenden Immundetektion zu minimieren. Die Immundetektion von BSEP erfolgte am nächsten Tag zuerst mit 20µl BSEP- F6- Antikörper (in einer Konzentration von 1:1000) in 20mL TBST mit 1g Milchpulver über eine Stunde und anschließend mit 4µl *Anti-Mouse-HRP* in 10mL TBST mit ebenfalls 1g Milchpulver. Vor und nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Nitrocellulosefolie jeweils zweimalig über fünf Minuten mit TBST gewaschen sowie zum Schluss einmalig über fünf Minuten mit TBS.

Für die schlussendliche BSEP-Darstellung und den quantitativen Vergleich per Densitometrie wurde die Nitrocellulosefolie mit Hilfe eines ECL – Kits (*enhanced chemiluminescence detection kit*) entwickelt. Das ECL-Kit enthält sowohl Luminol als auch Peroxid, welche die Substrate der HRP (*Horse-Radish-Peroxidase*) darstellen. Mit Hilfe des Peroxids wird das

Luminol durch die HRP in seine oxidierte und damit angeregte Form versetzt. Während des Verfalls in seinen Grundstatus sendet das Luminal anschließend Licht aus, wodurch der an BSEP gebundene und die HRP enthaltende Antikörper detektiert werden kann. Die hierdurch entstanden Banden wurden nach dem Scannen der Folie mit einem Standardscanner mit Hilfe von ImageJ quantitativ, also bezüglich ihrer densitometrischen Stärke, verglichen<sup>158</sup>. Abbildung 7 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines Western-Blots mit Membranen von BSEP-Wildtyp sowie den untersuchten Mutationen. Dabei stellt die jeweilige obere Bande die natur- bzw. vollglykosylierte, die jeweilige untere Bande die kernglykosylierte Form von BSEP dar. Gemessen an der densitometrischen Stärke überwiegt dabei die vollglykosylierte BSEP-Form, sodass bei der späteren Aktivitätsmessung stets eine ausreichende Proteinstabilität vorlag und die Aktivitätsdaten nicht durch eine verminderte Proteinstabilität aufgrund einer nur vorliegenden Kernglykosylierung beeinflusst wurden.

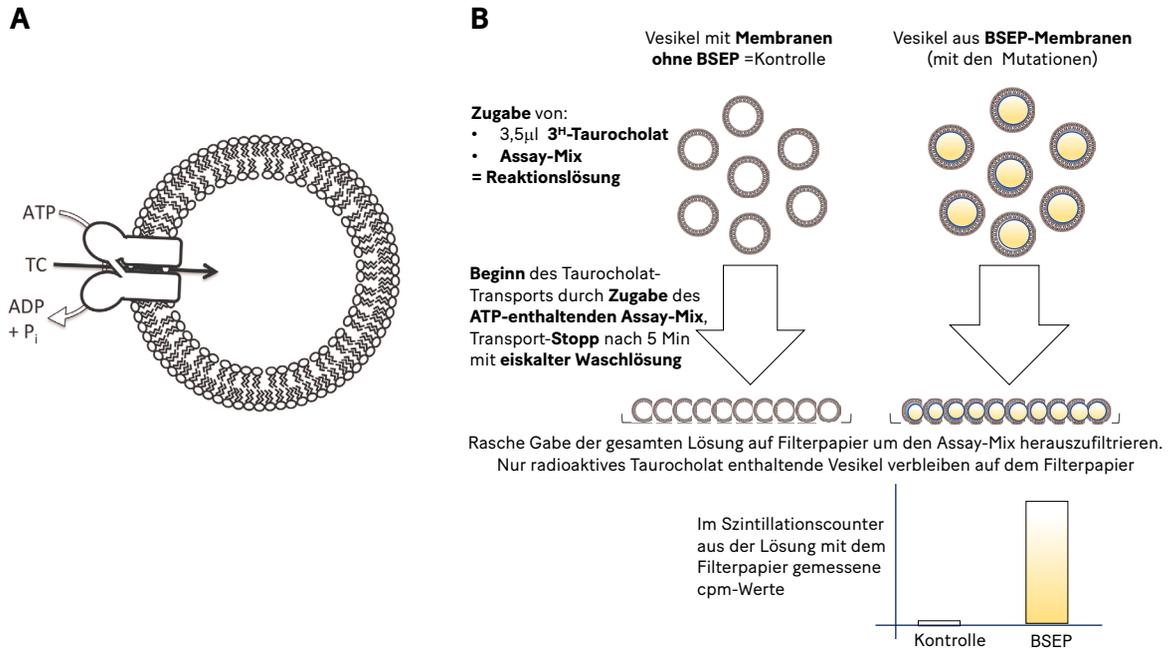


**Abbildung 7:** Western-Blot von den Membranen der mit den jeweiligen Mutationen transfizierten HEK-293-Zellen

### 3.2.7 <sup>3</sup>H-Taurocholat-Uptake-Messung

Ob und ggfs. welchen Einfluss die untersuchten Mutationen p.W342G, p.N591S, p.G648V und p.R698H auf die Transportaktivität von BSEP haben, wurde mittels einer <sup>3</sup>H-Taurocholat-Uptake-Messung untersucht. Grundlage dieser Messung ist die Präparation von Inside-out Membranvesikeln aus mit BSEP-transfizierten HEK293-Zellen, bei welchen die zytosolische Lipidschicht der Plasmamembran die Vesikelaußenseite bildet. Ein BSEP-vermittelter Transport von Gallensalzen findet daher ins Vesikelinnere statt. Stimuliert man nun die Aktivität der Transportproteine, wird das jeweilige Substrat, in diesem Falle Taurocholat, für welches BSEP die höchste Substratspezifität hat (Km-Wert von humanem BSEP für Taurocholat 6.2µM), in die Vesikel transportiert<sup>7</sup>. Die Menge des in den Membranvesikeln vorhandenen Taurocholats erlaubt dann einen Rückschluss auf die Transportaktivität von BSEP. Für die Messung wurde das verwendete Taurocholat radioaktiv markiert. Aufbau, Ablauf und Zusammensetzung der einzelnen Versuchsmischungen für die <sup>3</sup>H-Taurocholat-Uptake-Messung orientieren sich an dem technischen Merkblatt für „*human BSEP, expressed in Sf9-cells, membrane preparation, for Vesicular Transport*“ von SIGMA-ALDRICH<sup>159</sup>. Zudem wurde die verwendete Methodik bereits für die Untersuchung der BSEP-Mutationen pT919del und p.G1032R, welche ebenfalls zuvor mittels DREAM kloniert und in HEK293-Zellen transfiziert wurden, entwickelt und etabliert (veröffentlicht in dem Paper von Dr. rer. nat. P. Ellinger 2017<sup>160</sup>). Veranschaulicht werden das Prinzip der <sup>3</sup>H-Taurocholat-Uptake-Messung sowie die entstandenen Membranvesikel in Abbildung 8.

Für die Uptake-Messung wurde zunächst die sogenannte „Reaktionslösung“ mit einem Gesamtvolumen von 350µl vorbereitet. Die Reaktionslösung beinhaltete in jeder Versuchsprobe 3,5µl <sup>3</sup>H-Taurocholat, Membranlösung der aus den transfizierten HEK293-Zellen präparierten Membranen und eine Prüfmischung bzw. sogenannter „Assay-Mix“. Für BSEP-Wildtyp und die Kontrolle (Membranpräparation aus nicht transfizierten HEK293-Zellen) wurden stets 50µl Membranlösung verwendet. Die Menge der Membranlösung der unterschiedlichen BSEP-Mutationen wurde im Verhältnis zur densitometrischen Auswertung des Western-Blots angepasst. Es wurde jedoch nicht mehr als 200µl Membranlösung verwendet, da sonst das Verhältnis von Lipiden zu Assay-Mix zu gering und der Taurocholat-Uptake durch BSEP nicht mehr detektiert werden konnte. Die Menge des Assay-Mixes wurde dann pro Probe an die Menge der Membranlösung angepasst, sodass sich zusammen mit den 3,5µl <sup>3</sup>H-Taurocholat ein Gesamtvolumen von 350µl ergab. Pro Bedingung, also pro Mutation, Wildtyp und Kontrolle wurden jeweils drei Proben mit und drei Proben ohne ATP, also ohne dass die Aktivität von BSEP gestartet wurde, gemessen um die jeweilige Hintergrundaktivität detektieren zu können. Parallel zum Ansetzen der Reaktionslösung auf Eis wurden für jede Bedingung dreimalig 175µl Assay-Mix ohne und dreimalig 164,5µl Assay-Mix mit 10,5µl Mg-ATP-Lösung über fünf Minuten bei 37°C inkubiert und die Filter mit Waschlösung befeuchtet sowie der Filterapparat eingeschaltet. Nach den fünf Minuten Inkubation wurden zu jeder Reaktionslösungsprobe entweder 175µl Assay-Mix oder 164,5µl Assay-Mix mit 10,5µl Mg-ATP gegeben. Die Gesamtlösung wurde kurz gevortext und anschließend erneut für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion mit 1mL eiskalter Waschlösung gestoppt und auf das im Filterapparat vorbereitete Filterpapier gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit je 1mL Waschlösung wurden die Filterpapiere erst vollständig getrocknet, bevor sie in die Szintillationsdöschen zusammen mit 5mL Szintillationslösung gegeben wurden. Die cpm-Werte wurden anschließend im Szintillationscounter gemessen.



**Abbildung 8:** Während der Membranpräparation der transient mit BSEP und den BSEP-Mutationen transfizierten HEK293-Zellen entstehen sogenannte „Inside-Out-Vesikel“. Die vorherige Außenseite der Membranen ist bei diesen Vesikeln nun nach innen gerichtet. Wird der BSEP-Transport durch ATP stimuliert, transportiert BSEP sein Substrat, in diesem Falle Taurocholat, in das Innere der Membranvesikel. Die Menge des in den Vesikeln vorhandenen Taurocholats kann dann Aufschluss über die Transportaktivität von BSEP geben. A: schematische Darstellung eines Inside-Out-Vesikels. B: Veranschaulichung des Prinzips der  $^3\text{H}$ -Taurocholat-Uptake-Messung

## 4 Ergebnisse

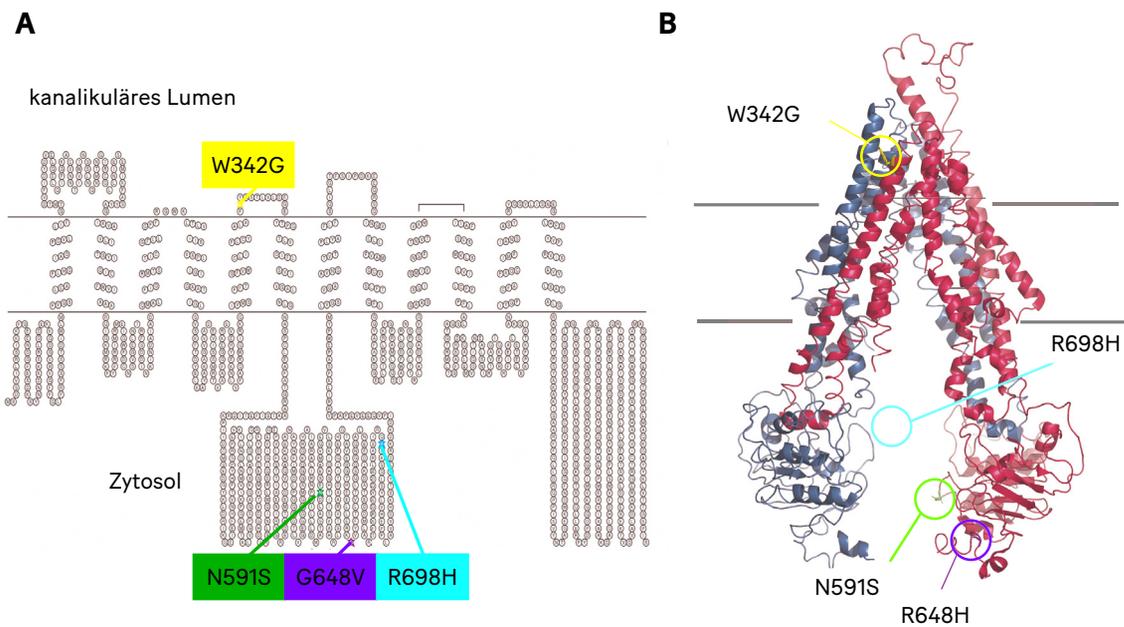
### 4.1 Die untersuchten BSEP-Mutationen

Durch ihre Funktion als Gallensalztransporter spielt die zur Unterfamilie B der ABC-Transporter gehörende *Bile Salt Export Pump* (BSEP) wichtige Rollen beim Lipidstoffwechsel, der Gallensteinbildung sowie der Resorption von fettlöslichen Vitaminen und Fettsäuren<sup>1,135,161</sup>. Lokalisiert ist das *ABCB11*-Gen auf dem Chromosom 2q24. Es besteht aus einem nicht kodierenden Exon am 5'-Ende sowie 27 kodierenden Exons, welche zu 1321 Aminosäuren translatiert werden und ein Protein mit einer molekularen Masse von 160 kDa bzw. 142,5 kDa ohne posttranslationale Modifikation bilden<sup>127</sup>.

Kennzeichen einer Erkrankung, verursacht durch Mutationen in dem für BSEP kodierenden Gen, sind normwertige  $\gamma$ GT-Spiegel, da durch die bei BSEP-Mutationen erniedrigte Gallensalzkonzentration in der Galle keine Schädigung der Gallengänge eintritt. Ob durch die Mutationen jedoch eine BRIC2, ICP oder PFIC2 auftritt ist nicht nur davon abhängig, ob ein oder zwei Allele betroffen sind, sondern welche funktionellen Konsequenzen eine Variante/Mutation hat (beispielsweise gibt es viele PFIC2-Patienten, die zwei heterozygote Varianten haben entsprechend einer „Compound-Heterozygotie“).<sup>127,149,162</sup>

Insgesamt wurden bereits über 200 *Missense*-Mutationen in dem für BSEP kodierendem Gen gefunden, von welchen mehr als 150 mit cholestatischen Erkrankungen assoziiert sind<sup>149</sup>. Pathophysiologisch können *Missense*-Mutationen zu einer fehlerhaften Transkription, mRNA-Instabilität, verminderter Translation, beeinträchtigtem *Trafficking* des Proteins an die apikale Membran der Hepatozyten oder einer gestörten Faltung des Proteins führen. Fehlgefaltete Proteine werden dann vor allem über den *ER-associated degradation pathway* (ERAD) abgebaut, sodass eine verkürzte Aktivitäts- bzw. Lebensdauer der Proteine besteht. Außerdem können Punktmutationen in Regionen der sogenannten „*exonic splicing enhancers*“ liegen und dort die Effektivität der mRNA-Prozessierung beeinträchtigen. Aufgrund der wichtigen Aufgaben wie Substraterkennung, -bindung und -translokation sind Punktmutationen in der Transmembrandomäne zudem häufig mit schweren cholestatischen Erkrankungen wie der PFIC2 assoziiert<sup>7,149</sup>.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Mutationen sind ebenfalls *Missense*- Mutationen, welche mittels DNA-Sequenzierung bei Patienten mit cholestatischen Erkrankungen entdeckt wurden und in Abbildung 9 im BSEP-Modell illustriert werden:

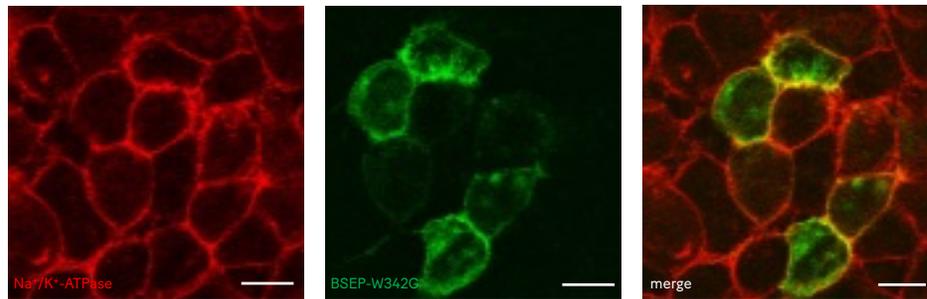


**Abbildung 9:** **A:** 2D-Illustration von BSEP mit Hilfe des TOPO2-tools ([http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open\\_topo2.py](http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open_topo2.py)). Betroffene Aminosäuren sind im Modell als Sternchen markiert und werden im Rechteck mit der entsprechenden Farbe genauer erklärt. Die Information bezüglich der Aminosäuresequenz und der vorhergesagten Transmembranregion wurde von UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot>) übernommen (entry: O95342). **B:** Darstellung der untersuchten Missense-Mutationen im 3D-Modell von BSEP. NBD1 sowie Transmembranhelix 1-6 werden in Magenta, NBD2 sowie Transmembranhelix 7-12 in blau dargestellt. R698H liegt dabei im verbindenden Loop zwischen NBD1 und TMD2. Dieser Loop ist jedoch zu flexibel, um in der Struktur aufgelöst zu sein

### p.W342G

Klinisch präsentierte sich der bei Diagnosestellung 7 Monate alte Patient, bei welchem diese Mutation compound heterozygot vorlag, mit Vitamin-K-Mangel bedingter Blutung sowie Steatorrhoe. Laborchemisch, histologisch, sonographisch sowie in der Elastographie konnte eine Cholestase festgestellt werden. Im weiteren Verlauf entwickelte der Säugling, auf dessen zweiten Allel die Punktmutation p.R575X gefunden wurde, eine PFIC2. Dabei führt die ebenfalls vorliegende Nonsense-Mutation p.R575X durch ein vorzeitiges Stopp-Kodon nach der Aminosäure 575 zu einem vorzeitigen Kettenabbruch der Proteinkette und damit zum Funktionsverlust des besagten zweiten Allels<sup>127</sup>.

Die Mutation p.W342G verursacht einen Austausch von Tryptophan zu Glycin auf dem 9. Exon und liegt topographisch in der 3. extrazellulären Schleife der Transmembrandomäne von BSEP. Laut dieser Arbeit führt sie zu einer um 40% verminderten Expression von BSEP. *Trafficking* und damit Kolokalisation sowie die BSEP-Aktivität bleiben von dieser Mutation weitestgehend unbeeinflusst (s.a. beispielhaft Abbildung 10). Erstmals entdeckt wurde p.W342G im Cholestaselabor der Universitätsklinik Düsseldorf<sup>7, 127</sup>.



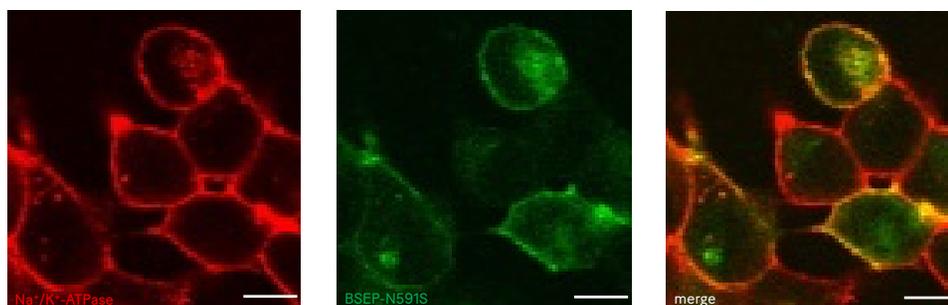
**Abbildung 10:** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Expression und Kollokalisierung von BSEP-W342G in HEK293-Zellen. Die Kollokalisierung zwischen der endogenen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (rot) und BSEP-W342G (grün durch EYFP-Tag) sowie die Expression von BSEP-W342G wurde mittels Fluoreszenzdensitometrie gemessen. Die Kollokalisierung von der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  mit BSEP-W342G stellt sich lasermikroskopisch gelb dar. Die weißen Balken entsprechen eine Länge von  $20\mu\text{m}$ .

### p.N591S

Der Austausch von Asparagin zu Serin wird durch p.N591S im 14. Exon verursacht und stellt eine bereits mehrfach beschriebene Mutation, welche bisher besonders mit dem Auftreten einer ICP assoziiert wurde, dar <sup>7, 140, 154, 163</sup>. Auf Proteinebene führt p.N591S zu einer Veränderung in der Nukleotid-Binde-Domäne. Zuerst beschrieben wurde diese Punktmutation 2004 durch Pauli-Magnus *et al.* <sup>140</sup>. In BSEP-Sequenzanalysen von 252 im Cholestaselabor der Universitätsklinik Düsseldorf untersuchten Patienten konnte diese Mutation insgesamt fünfmalig detektiert werden. Von den vier heterozygoten Trägern der Punktmutation p.N591S waren drei Patienten an einer PFIC2 und ein Patient an einer BRIC erkrankt. Bei den durch die heterozygot vorliegende Mutation p.N591S an PFIC2 erkrankten Patienten zeigte sich auf dem zweiten Allel zusätzlich einmalig heterozygot die SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*)-Variante p.A1028A und zweimalig, ebenfalls heterozygot, die SNP-Variante p.V444A sowie zusätzlich homozygot p.A1028A und heterozygot p.V597V. Dabei ist die sehr häufig vorkommende Variante p.V444A aufgrund einer reduzierten Proteinstabilität mit einer verkürzten BSEP- Lebensdauer assoziiert <sup>140, 149</sup>, die außerdem häufig vorkommende Variante p.A1028A mit Exon-Skipping <sup>154</sup>. Bei dem durch p.N591S verursachten BRIC-Patienten (heterozygot vorliegend) fand sich ebenfalls, jeweils heterozygot, die Variante p.V597V sowie p.V444A und p.A1028A. Der Patient bei dem p.N591S homozygot vorlag, wies eine zusätzliche Punktmutation (p.W330R) auf und war an einer PFIC2 erkrankt <sup>127</sup>. Klinisch präsentierten sich die Patienten mit *Ikterus*, *Pruritus*, Wachstumsstörung, Malabsorption, entfärbtem Stuhl aber auch Diarrhoe und Hämatochezie. Immunhistochemisch konnte in den Leberproben dieser Patienten außerdem eine reduzierte Plasmamembranexpression von BSEP gezeigt werden <sup>149</sup>. Patienten, bei welchen p.N591S heterozygot vorlag und welche eine PFIC2 entwickelten, waren bei Diagnosestellung zwischen

0,2 und 17,6 Jahre alt. Der an einer BRIC2 erkrankte Patient, bei welchem p.N591S ebenfalls heterozygot vorlag, war bei Diagnosestellung 32 Jahre alt. Auch bei den 62 durch Davit-Spraul *et al.* 2010 untersuchten Patienten wurde p.N591S einmal compound heterozygot bei einem an einer PFIC2 erkrankten Patienten detektiert. Die Leberprobe dieses Patienten zeigte in der immunhistochemischen Untersuchung ebenfalls eine fehlende BSEP-Expression <sup>112</sup>.

Mittels der bereits beschriebenen Methodik konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Mutation p.N591S die BSEP-Expression (85% im Vergleich zum Wildtyp-BSEP) und -Kokalisation, also das *Trafficking* (94% im Vergleich zum Wildtyp-BSEP) zwar nur gering beeinträchtigt, aufgrund einer Reduktion der BSEP-Aktivität um 42% und bei einer Multiplikation der Effekte von 46% insgesamt jedoch zu einer deutlichen Beeinflussung der BSEP-Funktion führt. Beispielhaft wird der Effekt von p.N591S auf die BSEP-Expression und -Kokalisation in Abbildung 11 gezeigt.



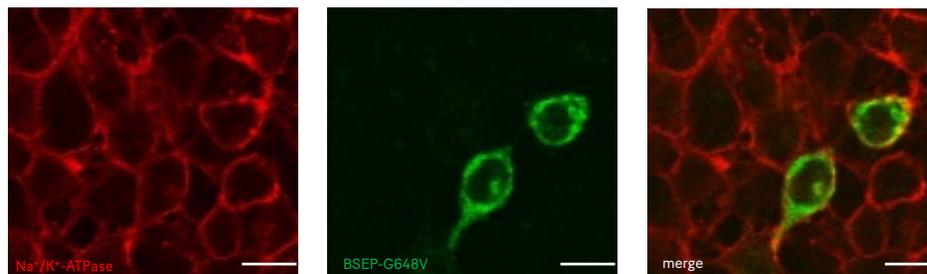
**Abbildung 11:** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Expression und Lokalisation von BSEP-N591S in HEK293-Zellen. Die Kolokalisation zwischen der endogenen Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (rot) und BSEP-N591S (grün durch EYFP-Tag) sowie die Expression von BSEP-N591S wurde mittels Fluoreszenzdensitometrie gemessen. Die Kolokalisation von der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase mit BSEP-N591S stellt sich lasermikroskopisch gelb dar.

### p.G648V

Dieser durch die Mutation p.G648V verursachte Austausch von Glycin zu Valin befindet sich ebenfalls in der Nukleotidbindedomäne und ist auf dem 15. Exon lokalisiert.

Erstmals entdeckt und beschrieben wurde sie ebenfalls in unserem Cholestaselabor (Universitätsklinik Düsseldorf). In der analysierten Patientenprobe lag p.G648V homozygot vor und führte zur Ausprägung einer BRIC2 <sup>127</sup>. Klinisch präsentierte sich der Patient mit Ikterus, sonografisch, histologisch sowie in der Elastographie zeigten sich Zeichen einer Leberfibrose. Der Patient war bei Diagnosestellung 23,3 Jahre alt. Die Symptome mit rekurrendem Ikterus begannen jedoch bereits im Alter von sechs Jahren.

Die Analyse der Auswirkungen von pG648V mittels transient transfizierter HEK293-Zellen, welche beispielhaft in Abbildung 12 dargestellt wird, zeigt eine um 50% reduzierte Expression bei so gut wie unbeeinflusster Kolokalisation (76%). Zudem erwies sich die BSEP-Aktivität als stark (um 60%) reduziert.



**Abbildung 12:** Konfokale Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Expression und Kolokalisation von BSEP-G648V in HEK293-Zellen. Die Kolokalisation zwischen der endogenen Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (rot) und BSEP-G648V (grün durch EYFP-Tag) sowie die Expression von BSEP-G648V wurde mittels Fluoreszenzdensitometrie gemessen. Die Kolokalisation von der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase mit BSEP-G648V stellt sich lasermikroskopisch gelb dar. Der weiße Streifen entspricht 20 µm. Für G648V wurde eine Expression von 49% gegenüber dem Wildtyp und eine Kolokalisation von 76% gemessen.

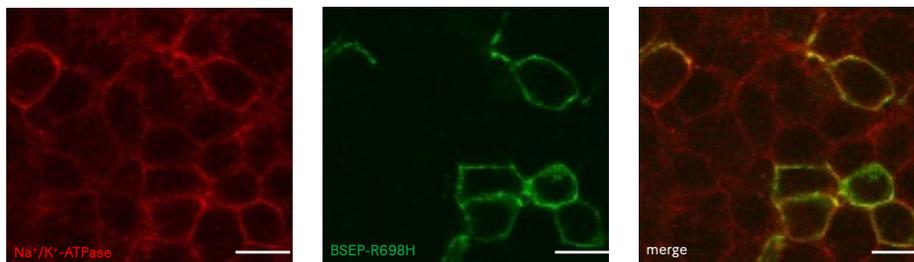
### p.R698H

Die Krankheitsrelevanz des im 17. Exon von BSEP erfolgten Austausches von Arginin zu Histidin ist bisher noch unklar. Diese ebenfalls in der Nukleotidbindedomäne lokalisierte Punktmutation wurde erstmals 2004 von Pauli-Magnus *et al.* im Zusammenhang mit der phänotypischen Ausprägung einer PBC und PSC beschrieben<sup>164</sup>.

Bei den durch Dröge *et al.* 2017 publizierten Untersuchungen von 252 Patienten mit cholestatischen Erkrankungen wurde p.R698H bei insgesamt 7 Familien, davon einmalig *compound*-heterozygot und sechsmalig heterozygot, gefunden. Als phänotypische Ausprägung zeigte sich bei den Familien in den p.R698H heterozygot vorlag sowohl eine BRIC2 als auch eine PFIC2<sup>127</sup>. Der Patient bei welchem p.R698H *compound* heterozygot zusammen mit p.S1120N und c.908+1G>T vorlag entwickelte eine PFIC2. Klinisch präsentierten sich die Patienten mit Ikterus, Pruritus, erhöhten Transaminasen und Serumgallensalzen sowie Hepatosplenomegalie. Die Patienten mit phänotypischer Ausprägung einer PFIC2 waren bei Diagnosestellung 0,9 bis 6,8 Jahre alt, die Patienten mit p.R698H assoziierter BRIC2 14, 23,3 und 23,6 Jahre alt. Die 62 durch Davit-Spraul *et al.* untersuchten Patienten wiesen insgesamt dreimal die Mutation p.R698H, einmal *compound*

heterozygot und zweimal heterozygot, auf. Die Träger dieser Mutation waren alle an einer PFIC2 erkrankt. In den Leberproben dieser Patienten zeigte sich jedoch nur fokal eine fehlende BSEP-Expression<sup>112</sup>.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Auswirkungen von p.R698H auf die BSEP-Expression, das Trafficking von BSEP sowie die BSEP-Aktivität zeigte, dass die Expression nur um 20% gegenüber dem Wildtyp vermindert ist, dass jedoch die Aktivität um 40% sinkt. Das Trafficking von BSEP bleibt mit 93% gegenüber dem Wildtyp unbeeinflusst. Exemplarische Bilder der transient mit p.R698H transfizierten und mittels konfokaler Lasermikroskopie untersuchten HEK293-Zellen zeigt Abbildung 13.



**Abbildung 13:** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Expression und Kolokalisation von BSEP-R698H in HEK293-Zellen. Die Kolokalisation zwischen der endogenen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (rot) und BSEP-R698H (grün durch EYFP-Tag) sowie die Expression von BSEP-R698H wurde mittels Fluoreszenzdensitometrie gemessen. Die Kolokalisation von der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  mit BSEP-R698H stellt sich lasermikroskopisch gelb dar. Der weiße Streifen entspricht  $20\ \mu\text{m}$ . Für R698H wurde eine Expression von 88% gegenüber dem Wildtyp und eine Kolokalisation von 93% gemessen.

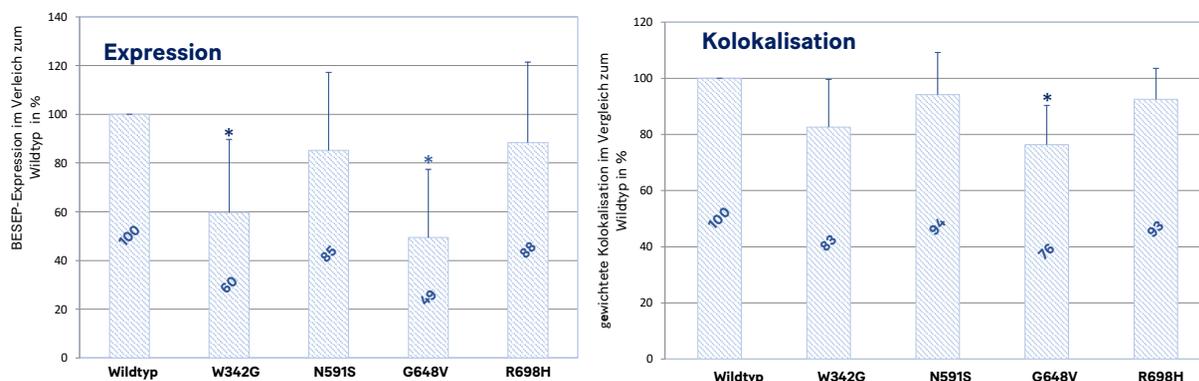
## 4.2 Expression und Trafficking der BSEP-Mutationen in HEK293-Zellen

Um herauszufinden, ob die per Sequenzanalyse bei Patienten mit cholestatischen Erkrankungen gefundenen Mutationen die Expression oder das Trafficking von BSEP beeinflussen, wurden die Mutationen zunächst mittels DREAM-Mutagenese in ein sowohl Hefe- als auch *E. coli*-gängiges und EYFP-Tag tragendes BSEP-Plasmid kloniert. Die erhaltenen, mittels Sequenzanalyse überprüften, BSEP-Mutationen wurden dann transient in HEK293-Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Antikörper (clone c464.6; lot 1974024 von Millipore) gefärbt und lasermikroskopiert. Da die BSEP-Mutationen einen EYFP-Tag tragen, entsprechen die grünen Pixel der BSEP-Expression. Die roten Pixel geben die Lokalisation der mit einem Antikörper gefärbten Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase wieder, die sich ganz überwiegend an der Zellmembran befindet. Die Expression von BSEP bzw. den mutierten Varianten von BSEP wurde pro Zelle mit der oben beschriebenen Methode ermittelt. Die Kolo­kalisierung mit der endogenen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase wurde berechnet und dient als indirektes Maß für das Trafficking von BSEP an die Zellmembran.

Auf diese Weise wurden insgesamt fünf verschiedene Sets mit je 30 Bildern pro Mutation und Wildtyp analysiert. Es sind somit 5 x 5 x 30 Bilder = 750 Bilder in die Analyse eingegangen.

Die beiden im Cholestaselabor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universitätsklinik Düsseldorf entdeckten Mutationen p.W342G und p.G648V führten im Vergleich zum BSEP-Wildtyp jeweils mit 60% bzw. 49% zu einer signifikant geringeren BSEP-Expression (Abb. 13). Mit einer Kolo­kalisierung von 83% (p.W342G) bzw. 76% (p.G648V) mit der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase/ Zellmembran beeinflussten sie das BSEP-Trafficking jedoch kaum. Aufgrund der in unserem Labor außerdem gezeigten und bei allen Mutationen stets starken mRNA-Expression lässt diese Konstellation zwei Möglichkeiten der Pathogenese zu. Zum einen könnte durch p.W342G und p.G648V ein Faltungsdefekt entstanden sein, welcher zu einem verfrühten ER (endoplasmatisches Retikulum)-assoziierten Proteinabbau führt, zum anderen könnte es bedingt durch die Mutationen zu einer verfrühten Internalisierung des Proteins gekommen sein. Trotz der scheinbar ähnlichen Pathogenese unterscheiden sich die jeweiligen phänotypischen Ausprägungen deutlich voneinander. Während die Mutation p.W342G phänotypisch eine PFIC2 zeigte, führte p.G648V zur Ausprägung einer BRIC2. Ursache der unterschiedlichen phänotypischen Ausprägung bei ähnlicher Expression und stabilem Trafficking könnte die bei dem p.W342G tragenden Patienten (PFIC2) die ebenfalls compound heterozygot vorliegende Nonsense- Mutation p.R575X sein, welche zum Funktionsverlust des zweiten Allels führte. Bei dem p.G648V-tragenden Patienten (BRIC2) lag die Mutation hingegen homozygot vor.

Durch die Mutationen p.N591S und p.R698H wurden Expression und Kolo­kalisierung von BSEP kaum beeinflusst (Abb. 14). Die beiden in der Nukleotid-Binde-Domäne lokalisierten Mutationen scheinen also weder eine BSEP-Fehlfaltung noch eine verfrühte BSEP-Internalisierung oder ein reduziertes BSEP-Trafficking zu verursachen. Phänotypisch waren beide Mutationen sowohl mit der Ausprägung einer BRIC2 als auch einer PFIC2 assoziiert. Die Mutation p.N591S wird außerdem mit dem Auftreten einer ICP assoziiert. Das Ergebnis zu den Auswirkungen der Mutation p.N591S auf die Expression und das Trafficking von BSEP entspricht zudem den Untersuchungen durch die Kollegen Lam et al.<sup>165</sup>.



**Abbildung 14:** Ergebnis der Untersuchungen zu BSEP-Expression und – Trafficking der mit den jeweiligen Mutationen transient transfizierten und mit Hilfe von AxioVision ausgewerteten HEK293-Zellen. Die Signifikanz (\*) wurde mit Hilfe eines T-Testes mit angenommenem  $p$ -Wert von  $< 0,05$  ermittelt.

### 4.3 Aktivität der BSEP-Mutationen

Die Präparation einer Zellsuspension aus transient transfizierten HEK-293-Zellen sowie die anschließende Zentrifugation um nicht aufgeschlossenen Pellets und Zellbestandteile herauszufiltern, führt zu sogenannten, dann in der Lösung übrig bleibenden Vesikeln mit einer Outside-Out- und einer Inside-Out-Orientierung (s. Abb.15). Die Menge des im Aktivitäts-Assay anschließend durch BSEP in diese Vesikel transportierten radioaktiv markierten Taurocholats und damit die Höhe der in den Vesikeln vorliegende Radioaktivität beantwortet schließlich die Frage nach der Aktivität der jeweiligen BSEP-Variante. Die Höhe der gemessenen Radioaktivität dient dabei als Maß für die Aktivität der jeweiligen BSEP-Variante.

Insgesamt wurden auf diese Weise sieben verschiedene Membranpräparationen ausgewertet. Wenn es die pro Präparation erhaltene Proteinmenge erlaubte, wurden alle diese Präparationen doppelt gemessen (dies ist pro Mutation bei mindestens drei Membranpräparationen außer für p.G648V erfolgt). Um dabei pro Mutation und Wildtyp jeweils eine äquivalente BSEP-Menge verwenden zu können, wurde zuvor von den Membranpräparationen ein *Western Blot* angefertigt und dieser densitometrisch ausgewertet. Die äquivalente Menge der Negativprobe „Mock“ (Membranen von nicht transfizierten HEK293-Zellen) wurde mit Hilfe einer *Bradford*-Untersuchung bestimmt.

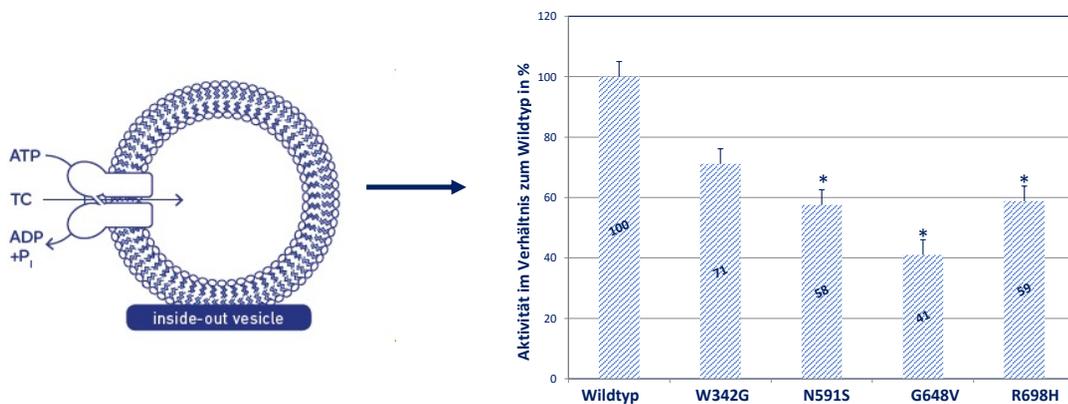
Eine signifikant geringere Transportaktivität zeigten die BSEP-Mutationen p.N591S, p.R698H und p.G648V. Im Falle von p.N591S und p.R698H erklärt sich hiermit die bei unbeeinträchtigter Expression und unbeeinträchtigtem Trafficking assoziierte Ausprägung einer PFIC2. Bezüglich der Mutation p.N591S widersprechen diese Daten jedoch denen von

Lam et al.<sup>165</sup>. Lam und Pearson verwendeten für die Messung der Aktivität jedoch mittels eines rekombinanten Baculovirus stabil transfizierte Sf9-Zellen und stellten das Maß der Aktivität farbmetrisch anhand der Freisetzung des anorganischen Phosphats von ATP fest. Zusätzlich wurde jedoch auch die Menge des aufgenommenen radioaktiv markierten Taurocholats gemessen, welche keine durch die Mutation p.N591S hervorgerufene Verminderung der BSEP-Transportfunktion aufwies.

Während die BSEP-Mutationen p.R698H und p.N591S in dieser Arbeit jedoch nur noch die Hälfte der Transportaktivität von BSEP zeigen, wird die Aktivität, der mit der Ausprägung einer PFIC2 assoziierten Variante p.W342G kaum beeinflusst. Zur Ausprägung dieser schweren Form der Cholestase führt hier wahrscheinlich ein Faltungsdefekt des Proteins in vivo, welcher eine reduzierte Protein-Expression zur Folge hat. Bei der Interpretation des durch p.W342G ausgelösten Pathomechanismus muss jedoch auch die zusätzlich vorliegende Nonsense-Mutation p.R575X mitberücksichtigt werden, welche zum Funktionsverlust des zweiten Allels führte. Der Patient verfügte also nur noch über ein BSEP-exprimierendes und die Missense-Mutation p.W342G tragendes Allel, wodurch die durch die Mutation verursachte Reduktion der Expression und Aktivität bei diesem Patienten nur noch zu einer Gesamtexpression von 30% im Vergleich zur Normalexpression führte und diese wiederum nur 71% der Normalaktivität zeigte.

Eine Aussage über die BSEP- Funktion der Mutation p.G648V kann nur eingeschränkt getroffen werden. Durch die geringere Proteinexpression dieser Mutation war die Verwendung von viel Membransuspension notwendig. Die Lipophilie der Probe und die entsprechend andere Pufferkonzentration führte bei diesen Experimenten zu schwankenden Messergebnissen. Insgesamt ist jedoch von einer geringeren BSEP-Aktivität auszugehen. Phänotypisch führte diese Mutation jedoch in einer homozygoten Konstellation zur Ausprägung einer BRIC2.

Abbildung 15 fasst die Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen der jeweiligen BSEP-Varianten nochmals zusammen.



**Abbildung 15:** Der Einfluss der Mutationen auf die Aktivität von BSEP wurde mittels eines Activity- Assays anhand mit den Mutationen transient transfizierter HEK-293-Zellen gemessen. Bei der Präparation der HEK-293 Zellen entstehen die hierfür notwendigen Inside-Out-Vesikel. Um die jeweiligen Proben vergleichbar zu machen, wurde zuvor die Proteinmenge der jeweiligen Probe per Western Blot und densitometrischer Auswertung ermittelt. Die Signifikanz (\*) wurde mit Hilfe eines T-Testes mit angenommenem p-Wert von < 0,05 ermittelt

## 5 Diskussion

### 5.1 Expression und Aktivität im Vergleich mit vorbeschriebenen BSEP-Mutationen

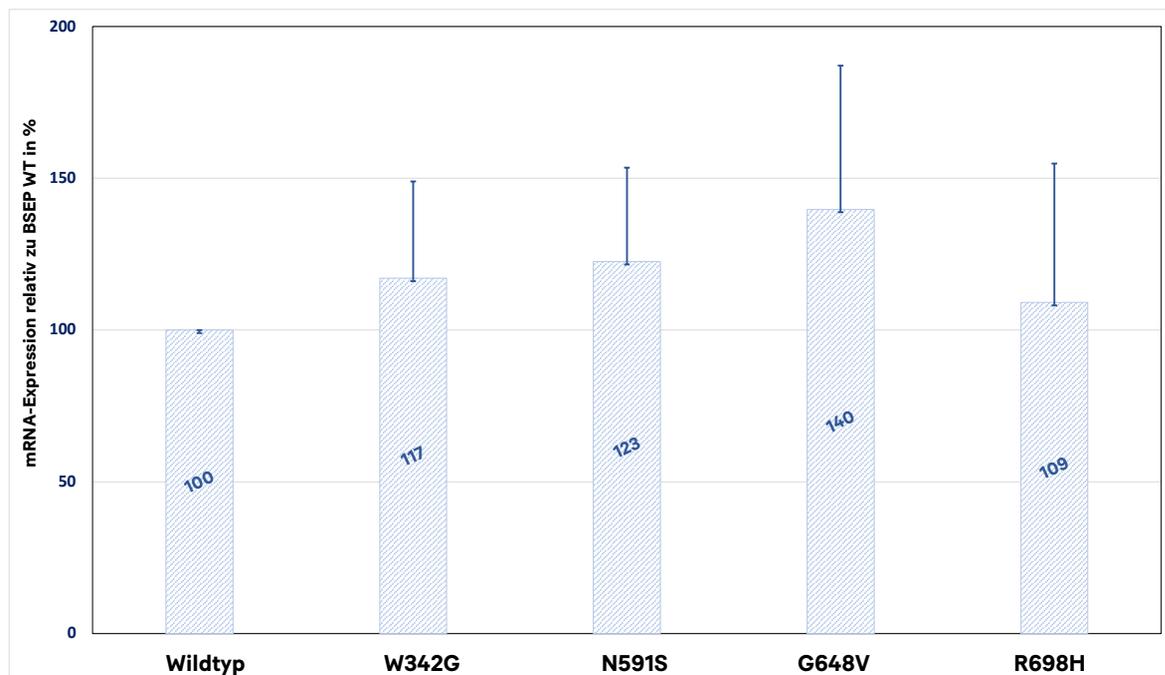
Nach Zusammenfassung der in dieser sowie verschiedenen weiteren Arbeiten *in vitro* untersuchten BSEP-Mutationen (Abb. 16) sind BSEP-Transportmechanismen und -Funktion relevant für eine intakte Leberfunktion. Dabei scheinen im Gegensatz zu Erkrankungen wie beispielsweise der Galaktosämie oder Hämophilie, bei welchen erst eine Restaktivität von weniger als 25% (der Glaktose-1-Phosphat- Uridyltransferase) bzw. 15% (der Protease/des Faktor VIII) zur Ausprägung der Erkrankung führt, bereits weniger als 50% von exprimierter und aktiver *Bile-Salt-Export-Pump* ausreichend für die Entwicklung einer Cholestase und Beeinträchtigung der Leberfunktion zu sein. Bei Verminderung der BSEP-Expression oder -Aktivität um mehr als 50% kommt es zu Erkrankungen wie PFIC2, BRIC2 und ICP. Wahrscheinlich können sich dabei die Effekte bzgl. der Expression und Aktivität addieren. Es ist davon auszugehen, dass die klinische Ausprägung um so stärker ist (ICP < BRIC2 < PFIC2), je größer die Summe der Effekte der Expressions- und Aktivitätsminderung ist. Bull und Thompson haben hingegen vermutet, dass es erst ab einer Expression und Funktion von weniger als 25% zur klinisch fassbaren Störung der Leberfunktion und Cholestase kommt <sup>114</sup>.

Durch die mehr als 200 gefundenen *Missense*-Mutationen werden sowohl BSEP-Funktion als auch Expression beeinträchtigt und die Ausbildung von Cholestase und Leberfunktionsstörung begünstigt. Zusätzlich zu den *Missense*-Mutationen sind jedoch wahrscheinlich weitere Faktoren wie Hormone, Viruserkrankungen, Medikamente und Tumorgenese für die Ausprägung des Krankheitsbildes verantwortlich <sup>75, 114, 130</sup>. Dies zeigt sich daran, dass beispielsweise die Mutationen p.N591S und p.R698H sowie p.E297G und p.A570T sowohl zu einer schweren cholestatischen Erkrankung mit Leberfibrose und erhöhtem Risiko für ein Leberzellkarzinom wie der PFIC2 führen können als auch eine eher mildere Ausprägung wie die zwar häufig rekurrende, jedoch bis auf Ikterus und Pruritus folgenlosen Cholestase der BRIC2 verursachen <sup>75, 116, 154</sup>. Die Mutationen p.E297G und p.N591S sind zudem mit der Ausprägung einer schwangerschaftsinduzierten Cholestase, welche sich besonders durch starken Juckreiz präsentiert und nach dem Ende der Schwangerschaft wieder vollständig ausheilt, assoziiert <sup>149, 163</sup>. Im Falle von p.N591S und p.R698H zeigte sich in den verschiedenen Untersuchungen eine um 50% reduzierte Aktivität bei guter Expression, im Falle von p.E297G eine mit der Expression korrelierende Aktivitätsreduktion von nur noch 10-30% <sup>75</sup> und im Falle von p.A570T eine ebenfalls mit der Expression korrelierende Reduktion der Aktivität von nur noch 50% <sup>75, 154</sup>. Insgesamt weisen also bisher alle genauer auf Expression bzw. Aktivität untersuchten Mutationen, welche eindeutig mit cholestatischen Erkrankungen korrelieren, entweder eine maximale Aktivität oder Expression von 50% oder eine mit der reduzierten Expression korrelierende reduzierte Aktivität von 50% oder weniger auf <sup>f 75, 129, 130, 154, 166, 167</sup>. Eine Übersicht zu verschiedenen BSEP-Varianten und Ihren assoziierten Erkrankungen sowie der hierdurch verursachten Beeinflussung von Expression und Aktivität gibt Abbildung 16.

	Mutationen	Häufigkeit	Lokalisation im Strukturmodell	BSEP-Expression in Leberproben	Expression nach Transfektion	Trafficking	Aktivität
<b>PFIC2</b>	W342G	1x (comp. het.)	TMD	vorhanden	reduziert (60%)	gut	gut (74%)
	N591S	6x (4x het., 1x hom.)	NBD	fehlt (4x n.a.)	gut (85%)	gut	reduziert (58%)
	R698H	7x (6x het., 1x comp.het.)	NBD	vorhanden (4x n.a.)	gut (88%)	gut	reduziert (59%)
	C129Y	häufig (in japan. Bev.)	TMD	n.a.	reduziert	reduziert	reduziert
	D482G	58% (europ. Bev.)	NBD	beides (45% vorhanden)	kaum (26%)	gut	reduziert (32%)
	E297G	58% (europ. Bev.)	TMD	beides (45% vorhanden)	kaum (16%)	gut	reduziert (10,2%)
	K461E	n.a.	NBD	}	}	}	}
	G982R	2x comp.het.	TMD				
	R1153C	} n.a.	NBD				
	R1268Q		NBD				
	R1057X		NBD	}	}	}	}
	N490D	1x het.	NBD				
	V284L	1x het.	TMD	n.a.	gut	gut	keine
A588V	2x het.	NBD	}	}	}	}	
R1231Q	1x hom.	NBD					
			fehlt	reduziert	Keine	n.a.	keine
				reduziert	keine	n.a.	reduziert (27%)
				reduziert	reduziert	reduziert	reduziert
<b>BRIC2</b>	G648V	1x (hom.)	NBD	vorhanden	reduziert (49%)	gut	reduziert (41%)
	N591S	1x (het.)	NBD	}	}	}	}
	R698H	4x (het.)	NBD				
	A570T	1x (hom.)	TMD	n.a.	gut (85%)	gut	reduziert (58%)
	R1050C	2x (1x hom., 1x het.)	NBD	fehlt	gut (88%)	gut	reduziert (59%)
	E186G	2x (het.)	TMD	}	}	}	}
	E297G	2x (hom.)	TMD				
	T923P	1x (het.)	TMD	n.a.	reduziert (51%)	n.a.	reduziert (52%)
	A926P	1x (het.)	TMD	n.a.	reduziert (50%)	n.a.	reduziert (58,7%)
							n.a.
<b>ICP</b>	N591S	2,6%	NBD	}	}	}	}
	R415Q	1,3%	NBD				
	E297G	1,4%	TMD				
				n.a.	gut	gut	gut
					gut	n.a.	n.a.
					kaum	gut	reduziert

**Abbildung 16:** Übersichtstabelle zu Mutationen, welche von an PFIC2, BRIC2 oder ICP erkrankten Patienten isoliert und bezüglich Expression, Trafficking und Aktivität untersucht wurden<sup>75, 112, 116, 127, 128, 130, 140, 154, 163, 166, 167</sup>. Die BSEP-Expression in Leberproben wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (rabbit polyclonal antibody; K168) untersucht. Die Transfektion der in unterschiedliche Trägergene (rat-, mouse-, human- BSEP) klonierten BSEP-Mutationen erfolgte in unterschiedliche Zelllinien (MDCK-, HepG2-, CHO-K1-, Sf9- und HEK293-Zellen). In violett markierte Punktmutationen können sowohl zu schweren cholestatischen Erkrankung wie der PFIC2 führen, jedoch auch mildere Verläufe wie BRIC2 oder ICP verursachen. Abkürzungen: het.: heterozygot, hom.: homozygot, comp.: compound, TMD: Transmembrandomäne, NBD: Nukleotidbindedomäne, n.a.: not available

Auf Transkriptionsebene scheinen hingegen bisher keine der detailliert untersuchten Missense-Mutationen zu einer Dysregulation zu führen<sup>75, 165</sup>. Auch die in dieser Arbeit untersuchten Varianten p.W342G, p.N591S, p.G648V und p.R698H zeigen eine annähernd gleiche Effizienz des Splicings als Teilschritt der Transkription sowie mRNA-Stabilität. Zu diesem bisher noch nicht publiziertem Ergebnis, welches mit freundlicher Genehmigung in Abbildung 17 dargestellt wird, gelangten Dr. rer. nat. C. Dröge und Prof. Dr. med. R. Kubitz mittels Minigene-Assay und real-time PCR. Hierbei wurden die jeweiligen betroffenen Exons (z.B. Exon 9 bei der Mutation p.W342G) jeweils mit und ohne Mutation und mit den jeweils flankierenden Introns mit Hilfe des Minigene Assays in ein sogenanntes „Reporter-gen“ kloniert. Nach transienter Transfektion dieser Minigen-Konstrukte in HEK293-Zellen und anschließender RNA-Extraktion und reverser Transkription konnte die Effizienz des Splicings über die mittels real-time PCR und Gelelektrophorese generierte Menge und Größe der Minigen-Konstrukte bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, dass keine der untersuchten Varianten/ Exons zu einem gestörten oder verminderten Splicing, tendenziell sogar eher zu einer gesteigerten Splicing-Effizienz, führte (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Ergebnis der mittels real-time PCR detektierten Transkriptionsrate von BSEP- Wildtyp im Vergleich zu den BSEP-Mutationen p.W342G (Exon 9), p.N591S (Exon 14), p.G648V (Exon 15) und p.R698H (Exon 17) in Prozent. Die jeweiligen Mutationen wurden hierfür mit Hilfe eines Minigene-Assays in ein sogenanntes „Reporter-gen“ kloniert und anschließend transient in HEK293 Zellen transfiziert. Die dann entstandene RNA wurde hiernach extrahiert und mittels real-time PCR analysiert. Veröffentlichung dieser bisher noch nicht publizierten Daten mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. C. Dröge und Prof. Dr. med. R. Kubitz.

Neben der Transkriptionseffizienz scheint außerdem das *Trafficking*, bis auf die durch Wang *et al.* in MDCK-Zellen untersuchten Mutationen p.E297G, p.G982R, p.R1153C und p.R1268Q durch die verschiedenen BSEP-Varianten nicht beeinflusst zu werden (s. Abbildung 16 und <sup>167</sup>).

Bei guter Expression könnte die Lokalisation der *Missense*-Mutation in der Nukleotidbindedomäne entscheidend für die reduzierte Aktivität und damit Krankheitsausprägung zur PFIC2 wie bei den Beispielen p.N591S, p.R698H und p.R1057X sein <sup>75</sup>. Zusätzlich zeigten J. Stindt *et al.*, dass die Transmembrandomäne und hierbei exklusiv der innerhalb der Membran gelegene Anteil durch ihre Funktion der Substraterkennung, -bindung und Translokation entscheidend für die Krankheitsausprägung sein kann. In diesem Anteil gelegene *Missense*-Mutationen führen bis auf die Mutation p.G374S ausschließlich zur Ausprägung einer PFIC2. Jedoch ging die BRIC2- Erkrankung eines Patienten, bei dem p.G374S homozygot vorlag schließlich ebenfalls in eine PFIC2 über. Bei allen anderen PFIC2- und BRIC2-Mutationen, wie beispielsweise auch den Mutationen p.E297G und p.A570T, welche sowohl zur BRIC2 als auch PFIC2 führen, konnte gezeigt werden, dass diese zwar auch in der Transmembrandomäne, hierbei jedoch nicht in dem innerhalb der Membran gelegenen Anteil lokalisiert sind <sup>168</sup>. Vulnerabel hinsichtlich der phänotypischen Ausprägung einer PFIC2 scheinen also sowohl die Nukleotidbindedomäne als auch der innerhalb der Membran gelegene Anteil der Transmembrandomäne zu sein. Dabei korrelieren die Untersuchungen von J. Stindt *et al.* mit den in Abbildung 16 aufgeführten BSEP- Mutationen verschiedener phänotypischer Ausprägungen.

Als Screening auf eine BSEP-assoziierte Erkrankung eignet sich außerdem die Immunfluoreszenz-Untersuchung der Leberproben von Patienten mit einer cholestatischen Erkrankung<sup>114, 128</sup>. Sowohl die von Keitel *et al.* als auch von Bull und Thompson *et al.* untersuchten Leberproben zeigten einen klaren Zusammenhang zwischen An- und Abwesenheit von BSEP in der Leberprobe und der Ausprägung einer PFIC2/BRIC2. Da jedoch nicht allein die BSEP-Expression in Immunfluoreszenz-Färbungen von Leberproben Rückschlüsse auf den Schweregrad einer Erkrankung (beispielsweise BRIC2 oder PFIC2) zulässt, sind weitere Untersuchungen zur BSEP-Aktivität, BSEP-Proteinexpression und -*Trafficking* wichtig und notwendig, um im Folgenden eine für den jeweiligen Patienten gezielte und passende Therapie auswählen zu können. Nur mit Hilfe einer ganzheitlichen Analyse der BSEP-Varianten können Ansätze dazu gefunden werden, welcher Patient eine medikamentöse Therapie zur Steigerung der Expression, zur Stabilisierung des Proteins, zur Förderung des apikalen Targetings oder zur Aktivitätssteigerung brauchen wird<sup>127, 169</sup>.

## 5.2 BSEP- Aktivität abhängig von Expression und Lebensdauer des Proteins?

Die Untersuchungen von Kagawa *et al.* ergeben bis auf die Mutation p.R1057X einen klaren Zusammenhang zwischen Protein-Lebensdauer bzw. -Expression und der gemessenen Aktivität. Auch bei der hierauf in dieser Arbeit analysierten Missense-Mutation p.G648V besteht eine solche Verbindung. Die Lebensdauer von BSEP wiederum ist nach Kagawa *et al.* unter anderem abhängig von der Glykosylierung des Proteins<sup>75</sup>. Ausschließlich kernglykosylierte Proteine neigten zur Fehlfaltung und damit raschem Abbau im endoplasmatischen Retikulum. Vollglykosyliertes BSEP hingegen (normalerweise vier an den N-Terminus des ersten extrazellulären Loops gekoppelte Glykosylierungen) ist stabiler und wird, wenn aufgrund der zugrunde liegenden Mutation fehlgefaltet, eher in Proteasomen abgebaut<sup>75, 130</sup>. Die Form der Glykosylierung bzw. posttranslationalen Expression von BSEP ist wiederum abhängig davon, in welchen Zelllinien die BSEP-Mutationen exprimiert und untersucht wurden. So ist das in Säugetierzellen untersuchte BSEP aufgrund seiner komplexeren Glykosylierung beispielsweise 20 kDa größer als das in Insektenzellen untersuchte BSEP<sup>75, 154</sup>.

Zusammenfassend zeigte Kagawa *et al.*, dass das Expressionssystem entscheidend für die Aktivitätsmessung ist, was unter anderem mit der Art der Glykosylierung (kern- oder vollglykosyliert) zusammenhängen könnte. Wir haben uns daher, aufgrund der guten Transfizierbarkeit sowie der hierdurch entstehenden überwiegend vollglykosylierten BSEP-Form, für ein Säugetierzellsystem, HEK293-Zellen, entschieden. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben und auf Abbildung 7 gezeigt, entstanden hierbei überwiegend vollglykosylierte und damit stabile BSEP- Varianten. Die gewonnenen Daten zur BSEP-Aktivität der jeweiligen untersuchten BSEP-Mutation sind damit aussagekräftig und vergleichbar.

## 5.3 Therapieansätze

Bei PFIC2-Patienten konnte eine deutliche Reduktion der Gallensalzsekretion festgestellt werden. Die dadurch bedingte Akkumulation hydrophober Gallensalze in den Hepatozyten führt wiederum sowohl zur Induktion inflammatorischer Prozesse und Nekrose der Hepatozyten als auch zur Induktion von Apoptose<sup>60</sup>. Die klinischen Folgen der Cholestase sind zunächst vor allem, wie auch bei ICP und BRIC2, Ikterus und Pruritus. Bei chronischer und fulminant verlaufender Cholestase, wie bei der von PFIC2-Patienten, mündet die chronische Inflammation und Nekrose schließlich in einer Leberfibrose bis hin zur Zirrhose und erhöhten Inzidenz eines Leberzellkarzinoms<sup>7,114</sup>.

Ziel einer Therapie sollte es also sein den Gallefluss zu erhalten oder zu verbessern um die Hepatozyten so vor den toxisch erhöhten intrazellulären Konzentrationen von hydrophoben Gallensalzen schützen zu können.

Für einen ausreichenden Gallefluss scheint, wie bereits in Kapitel 5.1 beschrieben, eine BSEP-Expression von mehr als 50% an der apikalen Membran notwendig zu sein. Eine gesteigerte Expression könnte bei wahrscheinlich fehlgefalteten Proteinen wie z.B. W342G-BSEP und G648V-BSEP über eine Therapie mit 4-Phenylbutyrat erreicht werden. Beide Varianten zeigen bei guter und unveränderter mRNA-Expression eine reduzierte Membran-Expression von 60% bzw. 49%, was wiederum aufgrund von Fehlfaltung des Proteins durch einen verfrühten Abbau über den *ER-Pathway* oder durch ein verfrühtes *Turn-Over* zustande kommen könnte. Das aus der Therapie von angeborenen Harnstoffzyklusdefekten kommende Medikament 4-Phenylbutyrat könnte dabei als Chaperon und somit der Erhaltung einer vollständig entwickelten und funktionierenden BSEP-Form dienen<sup>170</sup>. Durch die mit Hilfe von 4-Phenylbutyrat korrigierte Struktur wird die Expression verbessert und der zuvor durch die Fehlfaltung bestehende verfrühte Abbau des Proteins verhindert<sup>171,172</sup>. Erfolgreich getestet wurde 4-Phenylbutyrat bereits bei PFIC2-Patienten, welche die BSEP-Mutationen p.G982R, p.R1128C, p.T1210P, p.A257V und p.R1231Q trugen. Die Therapie mit 4-Phenylbutyrat führte zu einer verbesserten BSEP-Expression und veränderte zum anderen durch den kaum noch vorhandenen Pruritus die Lebensqualität der Patienten zum Positiven<sup>171,172</sup>.

Die Therapie mit 4-Phenylbutyrat wurde bei vier der fünf Patienten mit Ursodeoxycholsäure (UDCA), einem zur Behandlung cholestatischer Lebererkrankungen etablierten Medikament, welches sich bisher bei allen PFIC-Formen als effizient erwies, kombiniert<sup>59,171</sup>. Das aus CDCA in beta-Stellung durch Hydroxylierung am 7. C-Atom entstandene Gallensalz ist hydrophiler und damit weniger toxisch<sup>15</sup>. Normalerweise hat UDCA einen Anteil von ca. 3% am Gallensalzpool, durch eine Therapie kann dieser Anteil jedoch auf 40% erhöht werden. Hierdurch kann das hydrophilere UDCA die proapoptischen und inflammatorischen Effekte der bei Cholestase ansonsten akkumulierten hydrophoben Gallensalze antagonisieren und diese aus dem Gallensalzpool verdrängen<sup>7,173</sup>. Da UDCA außerdem mit der MHC I/MHC II-Präsentation (MHC= *major histocompatibility complex*) interagiert, hat das Medikament zudem immunmodulatorische Effekte<sup>174</sup>. Hierdurch und durch die Verdrängung der hydrophoben Gallensalze aus dem Gallensalzpool kann die Inflammation, welche u.a. zur Leberfibrose führt, reduziert werden<sup>175</sup>. Die bezüglich der durch Mutationen verursachten BSEP-Defizienz fast wichtigste Wirkung von UDCA besteht jedoch in der Expressionssteigerung von BSEP<sup>7,59,61,173,175,176</sup>. Diese Funktion könnte beispielsweise auch bei

den zu einer reduzierten BSEP-Aktivität führenden Mutationen p.N591S und p.R698H sowie p.R1057X ausgenutzt werden, um Symptome zu verbessern und eine Leberfibrose zu verhindern. Durch das dann quantitativ mehr vorhandene BSEP würde die reduzierte Aktivität ausgeglichen werden.

Eine Therapieergänzung könnten außerdem die FXR-Agonisten 6-Ethyl-Chenodeoxycholat (Obeticholsäure) oder Tropicifexor (=LJN452) darstellen. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors FXR führt ebenfalls zu einer gesteigerten BSEP-Expression. Zeitgleich wird die durch die Cholestase hervorgerufene Akkumulation von Gallensalzen durch eine NTCP-Suppression, welche die Gallensalzaufnahme in die Hepatozyten reduziert, sowie durch Inhibition der  $7\alpha$ -Hydroxylase, was eine Gallensalzneusynthese verhindert, verbessert<sup>59, 60, 173, 177, 178</sup>. Zusätzlich vermindert FGF19 (*fibroblast growth factor 19*), welcher durch Obeticholsäure in den Zellen des terminalen Ileums getriggert wird, die Gallensalzneusynthese<sup>177</sup>, sodass durch Reduktion des Gallensalzpools wiederum auch Inflammation und Nekrose der Hepatozyten verbessert werden. Als Nebenwirkung einer Therapie mit FXR-Agonisten zeigte sich jedoch eine Verschlechterung des Pruritus, insbesondere, wenn Obeticholsäure als Monotherapie, also nicht in Kombination mit beispielsweise UDCA, verabreicht wurde<sup>179</sup>. Der durch eine Therapie mit Obeticholsäure getriggerte Pruritus konnte jedoch zum einen durch eine Titration der Dosierung zum anderen durch die zusätzliche Gabe von Rifampicin gelindert werden<sup>180</sup>. Eine Kombinationstherapie mit Ionenaustauschern wie beispielsweise Colestyramin, welche Gallensalze sequestrieren, empfiehlt sich nicht, da durch diese auch die therapeutische Obeticholsäure vermehrt ausgeschieden wird und eine Wirkung derselben dann nicht mehr gewährleistet werden kann.<sup>180</sup> Weiterführende Studien könnten dabei helfen, den Nutzen der verbesserten BSEP-Expression und Reduktion des Gallensalzpools gegenüber den Nachteilen einer Therapie mit FXR-Agonisten abzuwägen.

Die Therapie mit FXR-Agonisten sollte besonders gegenüber Rifampicin, welches ebenfalls die BSEP-Expression induziert<sup>7</sup> und zusätzlich über eine Induktion der Cyp3A4-Enzyme und Inhibition von Autotaxin auch Pruritus und Ikterus verbessert, abgewogen werden<sup>59, 175, 177</sup>. Zumindest bei Therapiebeginn stellt Rifampicin eine gute Alternative dar. Aufgrund seiner hepatotoxischen Nebenwirkung sollte es jedoch bei bereits bestehender Leberfibrose nicht mehr angewendet werden.

## 6 Schlussfolgerung

Die dargestellten Methoden eröffnen die Möglichkeit die Folgen verschiedener BSEP-Mutationen zu untersuchen und zeigen die Beteiligung verschiedener Pathomechanismen bei BSEP-assoziiierter Cholestase auf.

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mutationen führten entweder zu einer um 50% reduzierten BSEP- Aktivität oder zu einer um 50% reduzierten BSEP-Expression. Trotz dieser eher milden Beeinflussung variierte die phänotypische Ausprägung jedoch von der rasch in einer Leberfibrose mündenden PFIC2 bis hin zur BRIC2 und ICP.

Die Kombination der Effekte (s. Abbildung 18), welche die verschiedenen Varianten auf die BSEP-Expression, -Lebensdauer und -Aktivität haben, ist vermutlich neben weiteren Einflussfaktoren wie Hormonstatus, Medikamente, Zellstress etc. entscheidend für die phänotypische Ausprägung. Für die Entwicklung einer cholestatischen Erkrankung und Leberfunktionsstörung liegt die „Risikogrenze“ dabei bei etwa  $\leq 50\%$ .

Außerdem scheint die Lokalisation der verschiedenen Missense-Mutationen innerhalb von BSEP eine wichtige Rolle zu spielen. Hierbei zeigen sich besonders die Nukleotidbindedomäne, aufgrund der hierdurch beeinflussten BSEP-Aktivität, als auch der innerhalb der Membran gelegene Anteil der Transmembrandomäne, aufgrund seiner Funktion in Substraterkennung, -bindung und Translokation, als besonders vulnerabel für die phänotypische Ausprägung einer PFIC2.

Einen Überblick über die den untersuchten Mutationen zugrundeliegenden Pathomechanismen sowie sich daraus ergebender möglicher Therapieoptionen zeigt Abbildung 18.

	W342G	N591S	G648V	R698H
mRNA-Expression	117%	123%	140%	109%
Protein-Expression	60%	85%	49%	88%
Kolokalisation	83%	94%	76%	93%
Aktivität	71%	58%	41%	59%
multiplizierte Effekte/ Restaktivität	35%	46%	15%	48%
Phänotyp	PFIC2	PFIC2/BRIC2 ICP	BRIC2	PFIC2/BRIC2
mögl. Therapie	4-Phenylbutyrat	UDCA/OCA + Tropifexar	4-Phenylbutyrat	UDCA/OCA + Tropifexar

**Abbildung 18:** Zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse zu den Untersuchungen klinischer Mutationen auf Zellkulturebene (HEK293-Zellen) sowie sich daraus ergebender möglicher Therapieoptionen. Prozentangaben in Relation zum BSEP-Wildtyp. Die Standardabweichung der mRNA-Expression beträgt für die BSEP-Mutationen p.W342G und p.N591S 30%, für die Mutationen p.G648V und p.R698H 45%. Für die BSEP-Protein-Expression der Mutationen beträgt die Standardabweichung im Mittel 30%, für die Kolokalisation im Mittel 15% und für die BSEP -Aktivität für die Mutationen p.W342G und p.N591S 13%, für p.G648V 23% und p.R698H 9%. Die gelb markierten Zahlen weisen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu BSEP-Wildtyp auf, die rot markierten Zahlen heben die letztendlichen, multiplizierten Effekte auf BSEP hervor.

Denn durch die genauere Analyse der Folgen von BSEP-Mutationen auf BSEP-Expression und -Aktivität könnten zukünftig Therapien optimiert bzw. spezifischere Therapiestrategien entwickelt werden. Während Patienten, deren Mutation zu einer reduzierten Expression a.e. aufgrund einer Protein- Fehlfaltung führt, von einer Therapie mit dem Chaperon 4-Phenylbutyrat profitieren könnten, ist für Patienten deren BSEP-Aktivität durch die Mutation beeinflusst wurde wahrscheinlich eine Therapie mit UDCA oder FXR-Agonisten wie Tropicorex und Obeticholsäure geeignet, um die fehlende Aktivität durch quantitativ mehr vorhandenes BSEP ausgleichen zu können.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab* 2013;17:657-69.
2. Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* 2004;40:539-51.
3. Russell DW. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S120-5.
4. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 2004;126:322-42.
5. Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Bile acid signaling through farnesoid X and TGR5 receptors in hepatobiliary and intestinal diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2015;14:18-33.
6. Joachim Rassow KH, Roland Netzker, Rainer Deutzmann. *Duale Reihe Biochemie Thieme* 2008;836 Seiten:197-200.
7. Kubitz R, Droge C, Stindt J, et al. The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36:536-53.
8. Dawson PA, Hubbert ML, Rao A. Getting the mOST from OST: Role of organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta, in bile acid and steroid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:994-1004.
9. Admirand WH, Small DM. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest* 1968;47:1043-52.
10. Ulrich W. *Welsch Lehrbuch Histologie*. München Germany: Elsevier GmbH, 2006.
11. Rassow J, Hauser K, Netzker R, et al. *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart Germany: Georg Thieme Verlag KG,, 2008.
12. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006;47:241-59.
13. Heuman DM. Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions. *J Lipid Res* 1989;30:719-30.
14. Lamcharfi E, Cohen-Solal C, Parquet M, et al. Determination of molecular associations of some hydrophobic and hydrophilic bile acids by infrared and Raman spectroscopy. *Eur Biophys J* 1997;25:285-91.
15. Sipka S, Bruckner G. The immunomodulatory role of bile acids. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;165:1-8.
16. Dawson PA. Role of the intestinal bile acid transporters in bile acid and drug disposition. *Handb Exp Pharmacol* 2011:169-203.
17. Ballatori N, Fang F, Christian WV, et al. Ostalpha-Ostbeta is required for bile acid and conjugated steroid disposition in the intestine, kidney, and liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G179-G186.
18. Inokuchi A, Hinoshita E, Iwamoto Y, et al. Enhanced expression of the human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes. A transcriptional control of a plausible bile acid transporter. *J Biol Chem* 2001;276:46822-9.
19. Agellon LB, Torchia EC. Intracellular transport of bile acids. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:198-209.
20. Rudman D, Kendall FE. Bile acid content of human serum. II. The binding of cholanic acids by human plasma proteins. *J Clin Invest* 1957;36:538-42.
21. Hofmann AF. Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* 2004;36:703-22.

22. Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF, et al. Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G640-9.
23. Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 1999;159:2647-58.
24. Keitel V, Kubitz R, Haussinger D. Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol* 2008;14:5620-9.
25. Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 2009;50:1955-66.
26. Li T, Chiang JY. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacol Rev* 2014;66:948-83.
27. Reinehr R, Haussinger D. Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. *Gastroenterology* 2004;126:249-62.
28. Huang W, Ma K, Zhang J, et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 2006;312:233-6.
29. Goodwin B, Jones SA, Price RR, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 2000;6:517-26.
30. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, et al. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000;102:731-44.
31. Wagner M, Fickert P, Zollner G, et al. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology* 2003;125:825-38.
32. Neimark E, Chen F, Li X, et al. Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* 2004;40:149-56.
33. Denson LA, Sturm E, Echevarria W, et al. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 2001;121:140-7.
34. Wang L, Lee YK, Bundman D, et al. Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production. *Dev Cell* 2002;2:721-31.
35. Zhang Y, Lee FY, Barrera G, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1006-11.
36. Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, et al. The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem* 2006;281:11039-49.
37. Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, et al. Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes* 2004;53:890-8.
38. Ma K, Saha PK, Chan L, et al. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2006;116:1102-9.
39. Watanabe M, Houten SM, Wang L, et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 2004;113:1408-18.
40. Kast HR, Nguyen CM, Sinal CJ, et al. Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol Endocrinol* 2001;15:1720-8.
41. Claudel T, Inoue Y, Barbier O, et al. Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology* 2003;125:544-55.
42. Inagaki T, Moschetta A, Lee YK, et al. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3920-5.
43. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:714-9.

44. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 2003;278:9435-40.
45. Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:386-90.
46. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 2006;439:484-9.
47. Keitel V, Reinehr R, Gatsios P, et al. The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 2007;45:695-704.
48. Keitel V, Donner M, Winandy S, et al. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;372:78-84.
49. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3369-74.
50. Stedman CA, Liddle C, Coulter SA, et al. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2063-8.
51. Xie W, Radominska-Pandya A, Shi Y, et al. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3375-80.
52. Zhang J, Huang W, Qatanani M, et al. The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J Biol Chem* 2004;279:49517-22.
53. Makishima M, Lu TT, Xie W, et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 2002;296:1313-6.
54. Chatterjee B, Echchgadda I, Song CS. Vitamin D receptor regulation of the steroid/bile acid sulfotransferase *SULT2A1*. *Methods Enzymol* 2005;400:165-91.
55. McCarthy TC, Li X, Sinal CJ. Vitamin D receptor-dependent regulation of colon multidrug resistance-associated protein 3 gene expression by bile acids. *J Biol Chem* 2005;280:23232-42.
56. Chen X, Chen F, Liu S, et al. Transactivation of rat apical sodium-dependent bile acid transporter and increased bile acid transport by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 via the vitamin D receptor. *Mol Pharmacol* 2006;69:1913-23.
57. Debryne PR, Bruyneel EA, Li X, et al. The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutat Res* 2001;480-481:359-69.
58. Kremer AE, van Dijk R, Leckie P, et al. Serum autotaxin is increased in pruritus of cholestasis, but not of other origin, and responds to therapeutic interventions. *Hepatology* 2012;56:1391-400.
59. Srivastava A. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4:25-36.
60. Jonker JW, Liddle C, Downes M. FXR and PXR: potential therapeutic targets in cholestasis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012;130:147-58.
61. Beuers U, Trauner M, Jansen P, et al. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond. *J Hepatol* 2015;62:S25-37.
62. Kjærgaard K, Frisch K, Sørensen M, et al. Obeticholic acid improves hepatic bile acid excretion in patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol* 2021;74:58-65.
63. Ridlon JM, Bajaj JS. The human gut sterolbiome: bile acid-microbiome endocrine aspects and therapeutics. *Acta Pharm Sin B* 2015;5:99-105.
64. Kawano A, Ishikawa H, Kamano T, et al. Significance of fecal deoxycholic acid concentration for colorectal tumor enlargement. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010;11:1541-6.

65. Centuori SM, Gomes CJ, Trujillo J, et al. Deoxycholic acid mediates non-canonical EGFR-MAPK activation through the induction of calcium signaling in colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2016.
66. Egan JB, Thompson PA, Vitanov MV, et al. Vitamin D receptor ligands, adenomatous polyposis coli, and the vitamin D receptor FokI polymorphism collectively modulate beta-catenin activity in colon cancer cells. *Mol Carcinog* 2010;49:337-52.
67. Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Calcium and vitamin D. Their potential roles in colon and breast cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 1999;889:107-19.
68. Stubbins RE, Hakeem A, Nunez NP. Using components of the vitamin D pathway to prevent and treat colon cancer. *Nutr Rev* 2012;70:721-9.
69. Muller M, Ishikawa T, Berger U, et al. ATP-dependent transport of taurocholate across the hepatocyte canalicular membrane mediated by a 110-kDa glycoprotein binding ATP and bile salt. *J Biol Chem* 1991;266:18920-6.
70. Brown RS, Jr., Lomri N, De Voss J, et al. Enhanced secretion of glycocholic acid in a specially adapted cell line is associated with overexpression of apparently novel ATP-binding cassette proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5421-5.
71. Childs S, Yeh RL, Georges E, et al. Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer Res* 1995;55:2029-34.
72. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, et al. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 1998;273:10046-50.
73. Hayashi H, Takada T, Suzuki H, et al. Transport by vesicles of glycine- and taurine-conjugated bile salts and tauroolithocholate 3-sulfate: a comparison of human BSEP with rat Bsep. *Biochim Biophys Acta* 2005;1738:54-62.
74. Häussinger K, Kubitz. Hepatobiliary transport in health and disease. Buch erschienen im DE GRUYTER Verlag 2012:23-60.
75. Kagawa T, Watanabe N, Mochizuki K, et al. Phenotypic differences in PFIC2 and BRIC2 correlate with protein stability of mutant Bsep and impaired taurocholate secretion in MDCK II cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G58-67.
76. Schmitt L, Benabdelhak H, Blight MA, et al. Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol* 2003;330:333-42.
77. Schmitt L, Tampe R. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* 2002;12:754-60.
78. Zaitseva J, Jenewein S, Oswald C, et al. A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Biochem Soc Trans* 2005;33:990-5.
79. Jardetzky O. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* 1966;211:969-70.
80. Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:918-26.
81. Wang L, Hou WT, Chen L, et al. Cryo-EM structure of human bile salts exporter ABCB11. *Cell Res* 2020;30:623-625.
82. Haussinger D, Hallbrucker C, Saha N, et al. Cell volume and bile acid excretion. *Biochem J* 1992;288 ( Pt 2):681-9.
83. Schmitt M, Kubitz R, Lizun S, et al. Regulation of the dynamic localization of the rat Bsep gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology* 2001;33:509-18.
84. Schliess F, Reissmann R, Reinehr R, et al. Involvement of integrins and Src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem* 2004;279:21294-301.

85. vom Dahl S, Schliess F, Reissmann R, et al. Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem* 2003;278:27088-95.
86. Haussinger D, Kurz AK, Wettstein M, et al. Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis. *Gastroenterology* 2003;124:1476-87.
87. Kubitz R, Sutfels G, Kuhlkamp T, et al. Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase. *Gastroenterology* 2004;126:541-53.
88. Gerloff T, Geier A, Roots I, et al. Functional analysis of the rat bile salt export pump gene promoter. *Eur J Biochem* 2002;269:3495-503.
89. Song X, Kaimal R, Yan B, et al. Liver receptor homolog 1 transcriptionally regulates human bile salt export pump expression. *J Lipid Res* 2008;49:973-84.
90. Weerachayaphorn J, Cai SY, Soroka CJ, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 is a positive regulator of human bile salt export pump expression. *Hepatology* 2009;50:1588-96.
91. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999;284:1365-8.
92. Yu J, Lo JL, Huang L, et al. Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity. *J Biol Chem* 2002;277:31441-7.
93. Ananthanarayanan M, Li Y, Surapureddi S, et al. Histone H3K4 trimethylation by MLL3 as part of ASCOM complex is critical for NR activation of bile acid transporter genes and is downregulated in cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G771-81.
94. Chopra AR, Kommagani R, Saha P, et al. Cellular energy depletion resets whole-body energy by promoting coactivator-mediated dietary fuel absorption. *Cell Metab* 2011;13:35-43.
95. Okada K, Shoda J, Taguchi K, et al. Ursodeoxycholic acid stimulates Nrf2-mediated hepatocellular transport, detoxification, and antioxidative stress systems in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G735-47.
96. Cantore M, Reinehr R, Sommerfeld A, et al. The Src family kinase Fyn mediates hyperosmolarity-induced Mrp2 and Bsep retrieval from canalicular membrane. *J Biol Chem* 2011;286:45014-29.
97. Reinehr R, Becker S, Braun J, et al. Endosomal acidification and activation of NADPH oxidase isoforms are upstream events in hyperosmolarity-induced hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2006;281:23150-66.
98. McNiven MA, Kim L, Krueger EW, et al. Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol* 2000;151:187-98.
99. Lam P, Xu S, Soroka CJ, et al. A C-terminal tyrosine-based motif in the bile salt export pump directs clathrin-dependent endocytosis. *Hepatology* 2012;55:1901-11.
100. Hayashi H, Inamura K, Aida K, et al. AP2 adaptor complex mediates bile salt export pump internalization and modulates its hepatocanalicular expression and transport function. *Hepatology* 2012;55:1889-900.
101. Beuers U, Probst I, Soroka C, et al. Modulation of protein kinase C by taurolithocholic acid in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1999;29:477-82.
102. Kubitz R, Saha N, Kuhlkamp T, et al. Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol Chem* 2004;279:10323-30.

103. Crocenzi FA, Sanchez Pozzi EJ, Ruiz ML, et al. Ca(2+)-dependent protein kinase C isoforms are critical to estradiol 17beta-D-glucuronide-induced cholestasis in the rat. *Hepatology* 2008;48:1885-95.
104. Ujhazy P, Ortiz D, Misra S, et al. Familial intrahepatic cholestasis 1: studies of localization and function. *Hepatology* 2001;34:768-75.
105. Paulusma CC, Groen A, Kunne C, et al. Atp8b1 deficiency in mice reduces resistance of the canalicular membrane to hydrophobic bile salts and impairs bile salt transport. *Hepatology* 2006;44:195-204.
106. Cai SY, Gautam S, Nguyen T, et al. ATP8B1 deficiency disrupts the bile canalicular membrane bilayer structure in hepatocytes, but FXR expression and activity are maintained. *Gastroenterology* 2009;136:1060-9.
107. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, et al. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:1.
108. Bull LN, van Eijk MJ, Pawlikowska L, et al. A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 1998;18:219-24.
109. Klomp LW, Vargas JC, van Mil SW, et al. Characterization of mutations in ATP8B1 associated with hereditary cholestasis. *Hepatology* 2004;40:27-38.
110. Pawlikowska L, Strautnieks S, Jankowska I, et al. Differences in presentation and progression between severe FIC1 and BSEP deficiencies. *J Hepatol* 2010;53:170-8.
111. Gonzales E, Davit-Spraul A, Baussan C, et al. Liver diseases related to MDR3 (ABCB4) gene deficiency. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:4242-56.
112. Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, et al. ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology* 2010;51:1645-55.
113. Henkel SA, Squires JH, Ayers M, et al. Expanding etiology of progressive familial intrahepatic cholestasis. *World J Hepatol* 2019;11:450-463.
114. Bull LN, Thompson RJ. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Clin Liver Dis* 2018;22:657-669.
115. Knisely AS, Strautnieks SS, Meier Y, et al. Hepatocellular carcinoma in ten children under five years of age with bile salt export pump deficiency. *Hepatology* 2006;44:478-86.
116. Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, et al. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology* 2008;134:1203-14.
117. Carlton VE, Harris BZ, Puffenberger EG, et al. Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nat Genet* 2003;34:91-6.
118. Sambrotta M, Strautnieks S, Papouli E, et al. Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease. *Nat Genet* 2014;46:326-8.
119. Gomez-Ospina N, Potter CJ, Xiao R, et al. Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Commun* 2016;7:10713.
120. Gonzales E, Taylor SA, Davit-Spraul A, et al. MYO5B mutations cause cholestasis with normal serum gamma-glutamyl transferase activity in children without microvillous inclusion disease. *Hepatology* 2017;65:164-173.
121. Qiu YL, Gong JY, Feng JY, et al. Defects in myosin VB are associated with a spectrum of previously undiagnosed low  $\gamma$ -glutamyltransferase cholestasis. *Hepatology* 2017;65:1655-1669.

122. Itoh M, Terada M, Sugimoto H. The zonula occludens protein family regulates the hepatic barrier system in the murine liver. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2021;1867:165994.
123. Wei CS, Becher N, Friis JB, et al. New tight junction protein 2 variant causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 4 in adults: A case report. *World J Gastroenterol* 2020;26:550-561.
124. Giang S, Gordon RL, Haas KB. A Diagnostic Quagmire: PFIC5 Presenting as a Rare Cause of Neonatal Cholestasis. *ACG Case Rep J* 2021;8:e00558.
125. Vitale G, Gitto S, Vukotic R, et al. Familial intrahepatic cholestasis: New and wide perspectives. *Dig Liver Dis* 2019;51:922-933.
126. Overeem AW, Li Q, Qiu YL, et al. A Molecular Mechanism Underlying Genotype-Specific Intrahepatic Cholestasis Resulting From MYO5B Mutations. *Hepatology* 2020;72:213-229.
127. Droge C, Bonus M, Baumann U, et al. Sequencing of FIC1, BSEP and MDR3 in a large cohort of patients with cholestasis revealed a high number of different genetic variants. *J Hepatol* 2017;67:1253-1264.
128. Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, et al. Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 2005;41:1160-72.
129. van Mil SW, van der Woerd WL, van der Brugge G, et al. Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11. *Gastroenterology* 2004;127:379-84.
130. Kubitz R, Keitel V, Scheuring S, et al. Benign recurrent intrahepatic cholestasis associated with mutations of the bile salt export pump. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:171-5.
131. Summerskill WH. THE SYNDROME OF BENIGN RECURRENT CHOLESTASIS. *Am J Med* 1965;38:298-305.
132. Summerskill WH, Walshe JM. Benign recurrent intrahepatic "obstructive" jaundice. *Lancet* 1959;2:686-90.
133. Tygstrup N, Steig BA, Juijn JA, et al. Recurrent familial intrahepatic cholestasis in the Faeroe Islands. Phenotypic heterogeneity but genetic homogeneity. *Hepatology* 1999;29:506-8.
134. Van Berge Henegouwen GP. Benign recurrent intrahepatic cholestasis and Byler's disease: one gene, two diseases? *J Hepatol* 1996;25:395-7.
135. Droge C, Haussinger D, Keitel V. Genetic variants in adult liver diseases. *Z Gastroenterol* 2015;53:1436-46.
136. Reyes H, Simon FR. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: an estrogen-related disease. *Semin Liver Dis* 1993;13:289-301.
137. Kenyon AP, Piercy CN, Girling J, et al. Obstetric cholestasis, outcome with active management: a series of 70 cases. *Bjog* 2002;109:282-8.
138. Glantz A, Marschall HU, Mattsson LA. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology* 2004;40:467-74.
139. Bacq Y, Sapey T, Brechot MC, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a French prospective study. *Hepatology* 1997;26:358-64.
140. Pauli-Magnus C, Lang T, Meier Y, et al. Sequence analysis of bile salt export pump (ABCB11) and multidrug resistance p-glycoprotein 3 (ABCB4, MDR3) in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Pharmacogenetics* 2004;14:91-102.
141. Dixon PH, Weerasekera N, Linton KJ, et al. Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking. *Hum Mol Genet* 2000;9:1209-17.

142. Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, et al. Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet* 1999;353:210-1.
143. Lunzer M, Barnes P, Byth K, et al. Serum bile acid concentrations during pregnancy and their relationship to obstetric cholestasis. *Gastroenterology* 1986;91:825-9.
144. Stieger B, Fattinger K, Madon J, et al. Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 2000;118:422-30.
145. Crocenzi FA, Mottino AD, Cao J, et al. Estradiol-17beta-D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G449-59.
146. Gonzalez MC, Reyes H, Arrese M, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy in twin pregnancies. *J Hepatol* 1989;9:84-90.
147. Reinehr R, Häussinger D. Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. *Gastroenterology* 2004;126:249-262.
148. Song P, Zhang Y, Klaassen CD. Dose-response of five bile acids on serum and liver bile Acid concentrations and hepatotoxicity in mice. *Toxicol Sci* 2011;123:359-67.
149. Kubitz R, Droge C, Kluge S, et al. Genetic variations of bile salt transporters. *Drug Discov Today Technol* 2014;12:e55-67.
150. Stindt J, Ellinger P, Stross C, et al. Heterologous overexpression and mutagenesis of the human bile salt export pump (ABCB11) using DREAM (Directed REcombination-Assisted Mutagenesis). *PLoS One* 2011;6:e20562.
151. Voytas D. Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol* 2001;Chapter 10:Unit 10.4.
152. Noe J, Hagenbuch B, Meier PJ, et al. Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system. *Hepatology* 2001;33:1223-31.
153. Noé J, Stieger B, Meier PJ. Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 2002;123:1659-66.
154. Byrne JA, Strautnieks SS, Ihrke G, 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;49:553-67.
155. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
156. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4.
157. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* 2014;2014:361590.
158. Gallo-Oller G, Ordoñez R, Dotor J. A new background subtraction method for Western blot densitometry band quantification through image analysis software. *J Immunol Methods* 2018;457:1-5.
159. SIGMA-ALDRICH. BSEP, human recombinant, expressed in Sf9 cells, membrane preparation, for Vesicular Transport. Technical-Bulletin.
160. Ellinger P, Stindt J, Droge C, et al. Partial external biliary diversion in bile salt export pump deficiency: Association between outcome and mutation. *World J Gastroenterol* 2017;23:5295-5303.
161. Kong J, Liu BB, Wu SD, et al. Enhancement of interaction of BSEP and HAX-1 on the canalicular membrane of hepatocytes in a mouse model of cholesterol cholelithiasis. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:1644-50.

162. Bull LN, Carlton VE, Stricker NL, et al. Genetic and morphological findings in progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease [PFIC-1] and Byler syndrome): evidence for heterogeneity. *Hepatology* 1997;26:155-64.
163. Dixon PH, van Mil SW, Chambers J, et al. Contribution of variant alleles of ABCB11 to susceptibility to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut* 2009;58:537-44.
164. Pauli-Magnus C, Kerb R, Fattinger K, et al. BSEP and MDR3 haplotype structure in healthy Caucasians, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2004;39:779-91.
165. Lam P, Pearson CL, Soroka CJ, et al. Levels of plasma membrane expression in progressive and benign mutations of the bile salt export pump (Bsep/Abcb11) correlate with severity of cholestatic diseases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C1709-16.
166. Imagawa K, Hayashi H, Sabu Y, et al. Clinical phenotype and molecular analysis of a homozygous ABCB11 mutation responsible for progressive infantile cholestasis. *J Hum Genet* 2018;63:569-577.
167. Wang L, Soroka CJ, Boyer JL. The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *J Clin Invest* 2002;110:965-72.
168. Stindt J, Ellinger P, Weissenberger K, et al. A novel mutation within a transmembrane helix of the bile salt export pump (BSEP, ABCB11) with delayed development of cirrhosis. *Liver Int* 2013;33:1527-35.
169. Mitra S, Das A, Thapa B, et al. Phenotype-Genotype Correlation of North Indian Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type2 Children Shows p.Val444Ala and p.Asn591Ser Variants and Retained BSEP Expression. *Fetal Pediatr Pathol* 2019:1-17.
170. Hayashi H, Sugiyama Y. 4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of wild-type and mutated bile salt export pumps. *Hepatology* 2007;45:1506-16.
171. Gonzales E, Grosse B, Schuller B, et al. Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology* 2015;62:558-66.
172. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006;313:1137-40.
173. Samant H, Manatsathit W, Dies D, et al. Cholestatic liver diseases: An era of emerging therapies. *World J Clin Cases* 2019;7:1571-1581.
174. Calmus Y, Poupon R. Ursodeoxycholic acid (UDCA) in the treatment of chronic cholestatic diseases. *Biochimie* 1991;73:1335-8.
175. Marschall HU, Wagner M, Zollner G, et al. Complementary stimulation of hepatobiliary transport and detoxification systems by rifampicin and ursodeoxycholic acid in humans. *Gastroenterology* 2005;129:476-85.
176. Micheline D, Emmanuel J, Serge E. Effect of Ursodeoxycholic Acid on the Expression of the Hepatocellular Bile Acid Transporters (Ntcp and bsep) in Rats With Estrogen-Induced Cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:185-91.
177. Wagner M, Fickert P. Drug Therapies for Chronic Cholestatic Liver Diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2019.
178. Wagner M, Fickert P, Zollner G, et al. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology* 2003;125:825-838.
179. Fiorucci S, Di Giorgio C, Distrutti E. Obeticholic Acid: An Update of Its Pharmacological Activities in Liver Disorders. *Handb Exp Pharmacol* 2019;256:283-295.
180. Chapman RW, Lynch KD. Obeticholic acid-a new therapy in PBC and NASH. *Br Med Bull* 2020;133:95-104.

## 8 Danksagung

Für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit sowie die finanzielle Unterstützung in Form eines sechsmonatigen Stipendiums während meines ersten Freisemesters möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Dieter Häussinger bedanken.

Freude für die Wissenschaft, viele fruchtbare, wissenschaftliche und klinische Diskussionen sowie die Motivation stets weiterzumachen, habe ich Prof. Dr. Ralf Kubitz zu verdanken. Vielen Dank für Ihr entgegengebrachtes Vertrauen und Ihre Unterstützung sowohl für diese Dissertation als auch bei etlichen klinischen Fragestellungen und letztendlich meiner persönlichen Förderung. Sie waren und sind für mich ein großes Vorbild! Weil Sie jede Menge Input und konstruktive Kritik gegeben haben und sich als lebendes schlechtes Gewissen personifiziert haben, fand diese Arbeit trotz klinischem Arbeitsalltag schließlich doch noch einen positiven Abschluss.

Nur schwer zusammenzufassen, da ich so viel Positives damit verbinde, ist mein Dank an Dr. Jan Stindt. Lieber Jan, ich danke Dir für Deine unermüdliche Geduld und Unterstützung, dein unerschöpfliches Laborwissen und die vielen kritischen wissenschaftlichen (und privaten) Diskussionen!

Unvergessen bleiben die vielen schönen, wenn auch anstrengenden, Stunden im Isolab, nach denen wir uns aufgrund der ein oder anderen Dosis Radioaktivität, die uns zu Kopf gestiegen ist (oder war es nur das versunkene Arbeiten gepaart mit tiefgründigen Gesprächen?), das ein oder andere „Feierabendbier“ wirklich mehr als verdient hatten. Auch deine Ausdauer bei der Lehre sämtlicher Laborgrundlagen meist gepaart mit etwas Humor über die (in meinem Fall anfänglich kaum vorhandene) Fachkenntnis von „Medizinern“ sowie deine helfenden Rettungsversuche, wenn das ein oder andere anfangs vielleicht nicht ganz so geklappt hat wie angenommen, sollen hier nicht unerwähnt bleiben. Und zu guter Letzt: vielen, vielen Dank für deine Mühe beim Korrekturlesen und die konstruktiven Gespräche trotz inzwischen bestehender familiärer Verpflichtungen und beruflicher Projekte! Erst recht nach all den Jahren, die seit meiner „praktischen Zeit“ im Labor vergangenen waren.

Liebe Dr. Carola Dröge, auch bei Dir fällt es mir schwer mal eben 10 Jahre zusammenzufassen – seither ist so viel passiert!

Angefangen von deiner herzlichen Aufnahme in die „AG Kubitz“, dann dein unerschöpfliches Wissen, was die Genetik und im Speziellen die Sequenzierung also in meinem Fall die BSEP-Mutationen betrifft, die mRNA-Expression meiner untersuchten BSEP-Mutationen, die ich von dir verwenden durfte, die Hilfe bei Abbildungen und Formulierungen, deine seelische und moralische Unterstützung und schließlich auch die vielen schönen privaten Abende und Gespräche mit Dir – vielen, vielen Dank für einfach ALLES!

Du hast gezeigt, dass man im richtigen Team Arbeit und Privates ruhig vermischen darf!

Ein bisschen später „zu uns“, der damaligen „AG Kubitz“ ist Paulina Philippski gestoßen. Welch ein Glück! Du hast unseren Laden mal eben kurz auf Vordermann gebracht, alle stets mit Rat und Tat unterstützt und ohne deine Vorbereitung der Membranen für die Aktivitäts-Assays und dein beständiges Nachhören (bei mir und bei Jan) wäre diese Doktorarbeit wohl niemals fertig geworden. Danke, dass du unser Team bereichert hast und stets mit Augen, Ohren und Händen zur Stelle warst!

Gerne möchte ich an dieser Stelle auch unseren externen Partnern danken ohne deren Kooperation diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank Prof. Dr. Lutz Schmitt, dass Sie sowohl die Entstehung „meiner“ BSEP-Mutationen durch die Benutzung der

Saccharomyces cerevisiae - Kulturen und aller notwendiger Labormaterialien und -geräte als auch die Untersuchung der Mutationen auf Ihre Aktivität, ermöglicht haben!

„Vor Ort“, in der Biochemie I, stets mit offenen Ohren als auch mit Rat und Tat war „damals“ außerdem auch noch Dr. Philipp Ellinger. Vielen Dank lieber Philipp für viele praktische Tipps und wissenschaftlichen, lustigen, interessanten und privaten Gespräche bei dem ein oder anderen „Frustbier“ zusammen mit Jan, bei welchem sich die Wogen meist wieder geglättet haben!

Zu guter Letzt ist es dem unermüdlichen Nachfragen, manchmal Schimpfen und meist jedoch Motivieren meines Freundes Jörg, meiner Familie und meiner Freundin Isabel zu verdanken, dass trotz Vollzeitjob als Assistenz- und später Fachärztin diese Arbeit nach und nach Gestalt annahm. Vielen Dank, dass Ihr immer an mich geglaubt habt!