

AUS DER KLINIK FÜR GASTROENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE UND INFEKTILOGIE  
HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF  
PROFESSOR DR. MED. DIETER HÄUSSINGER

## REGULATION HEPATOBILIÄRER TRANSPORTPROTEINE

**HABILITATIONSSCHRIFT  
FÜR DAS FACH INNERE MEDIZIN**

**VORGELEGT VON**

DR. MED. RALF KUBITZ

**DÜSSELDORF 2004**

---

Der Inhalt dieser Habilitationsschrift ist in folgenden Publikationen veröffentlicht worden (siehe Anhang #1 bis #12):

1. Kubitz R, D'Urso D, Keppler D, Häussinger D. Osmodependent dynamic localization of the multidrug resistance protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology* 1997; 113:1438-1442.
2. Kubitz R, Wettstein M, Warskulat U, Häussinger D. Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 1999; 116:401-410.
3. Kubitz R, Warskulat U, Schmitt M, Häussinger D. Dexamethasone- and osmolarity-dependent expression of the multidrug-resistance protein 2 in cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 1999; 340:585-591.
4. Warskulat U, Kubitz R, Wettstein M, Stieger B, Meier PJ, Häussinger D. Regulation of bile salt export pump mRNA levels by dexamethasone and osmolarity in cultured rat hepatocytes. *Biol Chem* 1999; 380:1273-1279.
5. Dombrowski F, Kubitz R, Chittattu A, Wettstein M, Saha N, Häussinger D. Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochem J* 2000; 348:183-188.
6. Häussinger D, Schmitt M, Weihergräber O, Kubitz R. Short-term regulation of bile-secretion. *Sem Liv Dis* 2000; 20:307-321.
7. Schmitt M, Kubitz R, Wettstein M, vom Dahl S, Häussinger D. Retrieval of the mrp2 gene encoded conjugate export pump from the canalicular membrane contributes to cholestasis induced by tert-butyl hydroperoxide and chloro-dinitrobenzene. *Biol Chem* 2000; 381:487-495.
8. Schmitt M, Kubitz R, Lizun S, Wettstein M, Häussinger D. Regulation of the dynamic localization of the rat Bsep gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology* 2001; 33:509-518.
9. Kubitz R, Huth C, Schmitt M, Horbach A, Kullak-Ublick GA, Häussinger D. Protein kinase C-dependent distribution of the Multidrug Resistance Protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology* 2001; 34:340-350.
10. Mühlfeld A, Kubitz R, Dransfeld O, Häussinger D, Wettstein M. Taurine supplementation induces Mrp2 and Bsep expression in rats and prevents endotoxin-induced cholestasis. *Arch Biochem Biophys* 2003; 413:32-40.
11. Kubitz R, Sütfels G, Köhlkamp T, Kölling R, Häussinger D. Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP Kinase. *Gastroenterology* 2004; 126:541-553.
12. Kubitz R, Saha N, Köhlkamp T, Dutta S, vom Dahl S, Wettstein M, Häussinger D. Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C-isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol Chem* 2004; 279:10323-10330.

---

## DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt *Herrn Professor Dr. Dieter Häussinger*, der mich viele Jahre wissenschaftlich angeleitet hat. Viele Ideen, die diese Arbeit ausmachen, sind in gemeinsamen Gesprächen gereift. Ich habe sowohl wissenschaftlich als auch klinisch sehr viel von ihm gelernt.

An dieser Stelle danke ich auch *Herrn Professor Dr. Rainer Greger*, ehemaliger Leiter des Physiologischen Institutes der Universität Freiburg. Durch ihn ist die Zuneigung zu wissenschaftlichem Arbeiten geweckt worden.

Ich möchte mich bei *PD Dr. Ulrich Warskulat, Prof. Dr. Matthias Wettstein, Prof. Dr. Stephan vom Dahl, PD Dr. Freimut Schliess* und *Dr. Marcus Schmitt* für die wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere gilt mein herzlicher Dank *Dr. Johannes Bode*, der als Weggefährte und Freund in wichtigen Situationen zur Seite stand. Ich möchte mich auch bei den ehemaligen und derzeitigen Doktoranden, *Dr. Roland Reinehr, Clemens Huth, Sabine Lizun, Gerrit Sütfels, Youssef Bernali* und *Angelika Helmer* bedanken. Es war eine Freude, durch Experimente und in Diskussionen mit ihnen zu neuen Erkenntnissen zu gelangen. Mein Dank gilt auch *Nicole Eichhorst* und *Claudia Holneicher*, Begleiterinnen der ersten Stunde, ohne deren Hilfe einige der Arbeiten nicht entstanden wären. Ebenso gilt mein Dank *Markus Mroz*. Besonders anregend waren die vielen Gespräche mit *Dr. Thomas Kühlkamp*, durch die sich neue Themengebiete erschlossen haben, vielen Dank. Eine schöne Zeit war die Zusammenarbeit mit *Prof. Nirmalendu Saha* von der North-East University in Shillong, Indien – thank you, ebenso auch ein Dank an *Supiya Dutta* für ihren Einsatz.

Ein herzlicher Dank gilt *Herrn Professor Dr. Dietrich Keppler* vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg, ohne dessen immer sehr großzügige Bereitstellung von Antikörpern die vorliegende Arbeit nicht denkbar wäre. Ich bin froh, aufgrund der initialen Fügungen in das spannende Gebiet des hepatobiliären Transports gelangt zu sein. Ebenso möchte ich *Prof. Dr. Werner Reutter* (Berlin), *Prof. Dr. Gerd Kullak-Ublick* (Zürich), *Dr. Bruno Stieger* (Zürich), *Prof. Dr. Peter Meier-Abt* (Zürich) und *Prof. Dr. Frank Dombrowski*, (Magdeburg) für die Zusammenarbeit danken.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einführung</b>	<b>6</b>
1.1 Physiologische Bedeutung der Gallesekretion	6
1.2 Cholestase als klinisches Problem	7
1.3 Hepatobiliäre Transportproteine und ihre Substrate	8
1.4 Regulation hepatobiliärer Transporter	13
<b>2. Fragestellungen und Zielsetzung</b>	<b>15</b>
<b>3. Methoden</b>	<b>16</b>
3.1 Leberperfusion	16
3.2 Zellisolation	16
3.3 Transportstudien in isolierten Zellen	16
3.4 Western Blot Analysen	17
3.5 Northern Blot Analysen	17
3.6 Immunfluoreszenz und Konfokale Mikroskopie	17
3.7 Densitometrische Quantifizierung von Immunfluoreszenzen	18
3.8 Elektronenmikroskopie und Morphometrie	18
3.9 Antikörper-Generierung	19
3.10 Reverse Transkription- Polymerase Kettenreaktion	19
3.11 Klonierung und Plasmidkonstruktion von Protein Kinase C Isoformen	20
3.12 Zelltransformation	20
3.13 Translokationsuntersuchungen von PKC und MARCKS	20
3.14 Differentielle Zentrifugation	21
<b>4. Ergebnisse eigener Arbeiten</b>	<b>22</b>
4.1 Endo- und Exozytose kanalikulärer ABC- Transporter	22
4.2 Cholestase- Entstehung in der Sepsis, Einfluss von Dexamethason	23
4.3 <i>Trafficking</i> der Gallensalzpumpe vom Golgi- Apparat zur kanalikulären Membran	25
4.4 Cholestase durch Aktivierung von Protein Kinase C- Isoformen	26

---

<b>5. Diskussion</b>	<b>28</b>
5.1 Therapeutische Ansätze bei Cholestasen	28
5.2 Transporterein- und -ausbau: ein neuer Regulationsmechanismus hepatobiliärer Sekretion	30
5.3 Physiologische Bedeutung des Transporterein- und -ausbaus für die hepatobiliäre Sekretion	38
5.4 Weitere posttranskriptionelle Regulationsmechanismen hepatobiliärer Sekretion	40
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>42</b>
<b>7. Eigene Publikationen</b>	<b>43</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>47</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>61</b>
<b>10. Anhang: Die der Habilitationsschrift zugrunde liegenden Publikationen</b>	<b>62</b>

---

## 1. Einführung

### 1.1 Physiologische Bedeutung der Gallesekretion

Die Gallebildung ist ein osmotischer Prozess, der durch die aktive Sekretion löslicher Bestandteile in die zwischen benachbarten Leberparenchymzellen liegenden Gallenkanalikuli angetrieben wird. Das Lumen der Gallenkanalikuli und -gänge ist vom Blut durch sogenannte *tight junctions* funktionell getrennt. Wasser folgt den gelösten Substanzen auf trans- oder parazellulärem Wege, zum Teil wird der Wassereinstrom durch Wasserkanäle (sogenannte Aquaporine) ermöglicht (1).

Gallensalze stellen den größten Anteil gelöster Substanzen in der Galle und bilden den Hauptantrieb für den Gallenfluss, der als Gallensalz- abhängiger Gallenfluss bezeichnet wird (BSDF; *bile salt dependent bile flow*). Der durch die übrigen löslichen Gallebestandteile bewirkte Gallenfluss wird als Gallensalz- unabhängiger Gallenfluss bezeichnet (BSIDF; *bile salt independent bile flow*). Einer der Hauptbestandteile des Gallensalz- unabhängigen Gallenflusses ist Glutathion (2;3). Die Cholangiozyten können bis zu 40% zum Gallensalz- unabhängigen Gallenfluss beitragen, indem sie unter dem Einfluss von Sekretin oder vasoaktivem intestinalen Polypeptid (VIP)  $\text{HCO}_3^-$  in die Galle sezernieren (4-7).

Die hepatische Gallebildung dient mehreren wichtigen Funktionen. Cholesterin wird fast ausschließlich über die Galle ausgeschieden, entweder in unveränderter Form oder nach enzymatischer Umwandlung in Gallensalze. Die Ausscheidung von Cholesterin über die Galle ist, wie die Aufnahme von Cholesterin über die Nahrung oder dessen Neusynthese, essentiell für die Cholesterin- Homöostase. Chronische Lebererkrankungen mit gestörter Gallebildung gehen daher häufig mit einer Störung des Fettstoffwechsels einher (8-10).

Die Gallensalze sind nicht nur Endprodukt des Cholesterin- Metabolismus, sondern sie ermöglichen zusammen mit Phospholipiden (11) die Cholesterin-Sekretion, indem sie Cholesterin in Lösung bringen. Ebenso solubilisieren sie Nahrungsfette und fettlösliche Vitamine im Dünndarm und ermöglichen dadurch deren Resorption.

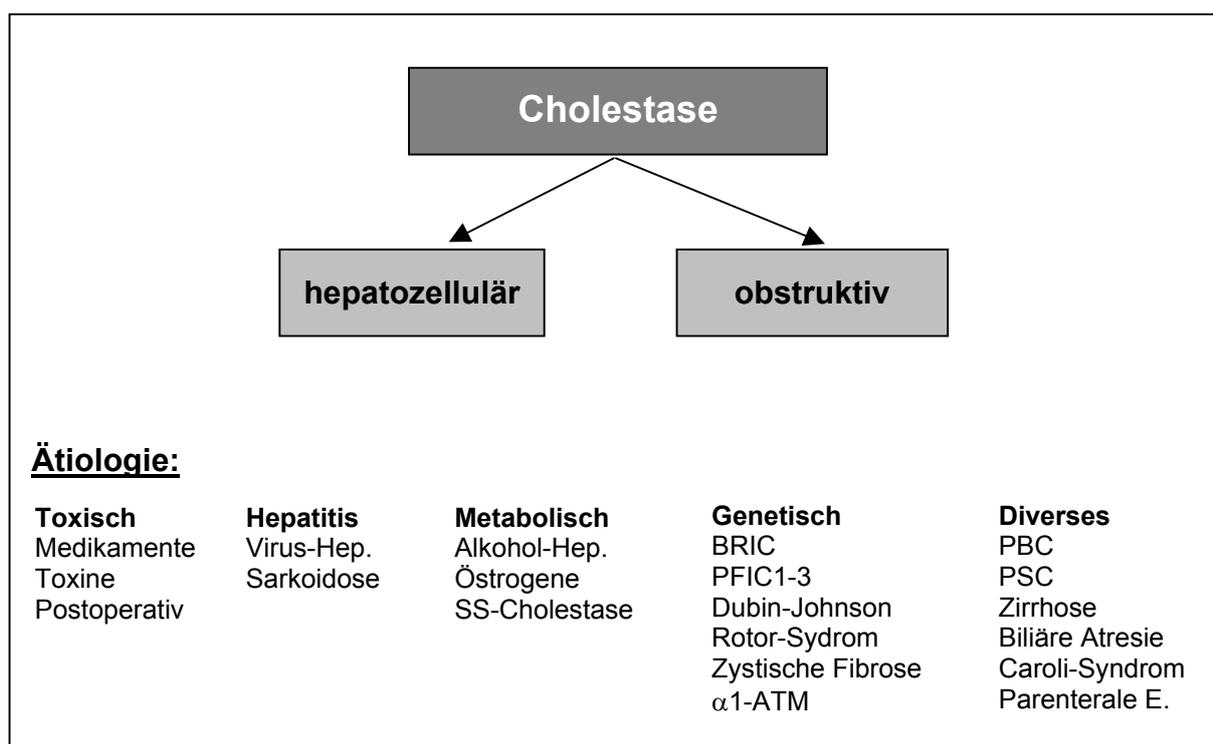
Auch unter toxikologischen und pharmakologischen Gesichtspunkten spielt die Gallesekretion eine wichtige Rolle: Zahlreiche endogene (z.B. Bilirubin) und exogene Substanzen (z.B. Schwermetalle, Medikamente) werden über die Galle ausgeschieden, häufig nach chemischer Umwandlung (Oxidation oder Konjugation

mit hydrophilen Molekülen) im Rahmen der Phase I und II des hepatischen Metabolismus.

## 1.2 Cholestase als klinisches Problem

Die Cholestase bezeichnet eine Verminderung (bis hin zum Versiegen) der Gallebildung. Die Diagnose "Cholestase" lässt sich laborchemisch schon frühzeitig anhand der Retention gallepflichtiger Substanzen und klinisch aufgrund von Symptomen wie Ikterus, Pruritus oder Stuhlfärbung stellen. Pathologisch-mikroskopisch kann eine Cholestase anhand von Bilirubin- oder Gallethromben in den Gallenkapillaren diagnostiziert werden.

Cholestasen können angeboren sein; die meisten Cholestase- Formen sind jedoch erworbene Störungen der Gallebildung (12). Unter mechanistischen Aspekten kann man Cholestasen in hepatozelluläre und obstruktive Cholestasen einteilen (Abb. 1).



### Abbildung 1: Ursachen der Cholestasen

Verschiedenste Ursachen können zu einer Störung der Gallesekretion führen. Die Ursachen der Cholestasen können nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden. Unter klinischen Gesichtspunkten werden hepatozelluläre Cholestasen, bei denen Funktionen der Leberparenchymzellen gestört sind, von obstruktiven Cholestasen unterschieden, bei denen die Galleableitung über die intra- oder extrahepatischen Gallengefäße gestört ist.

Abkürzungen: SS-Cholestase: Schwangerschaftscholestase, BRIC: benigne rekurrende intrahepatische Cholestase, PFIC: progressive familiäre intrahepatische Cholestase,  $\alpha$ 1-ATM:  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel, PBC: primär biliäre Zirrhose, PSC: primär sklerosierende Cholangitis.

---

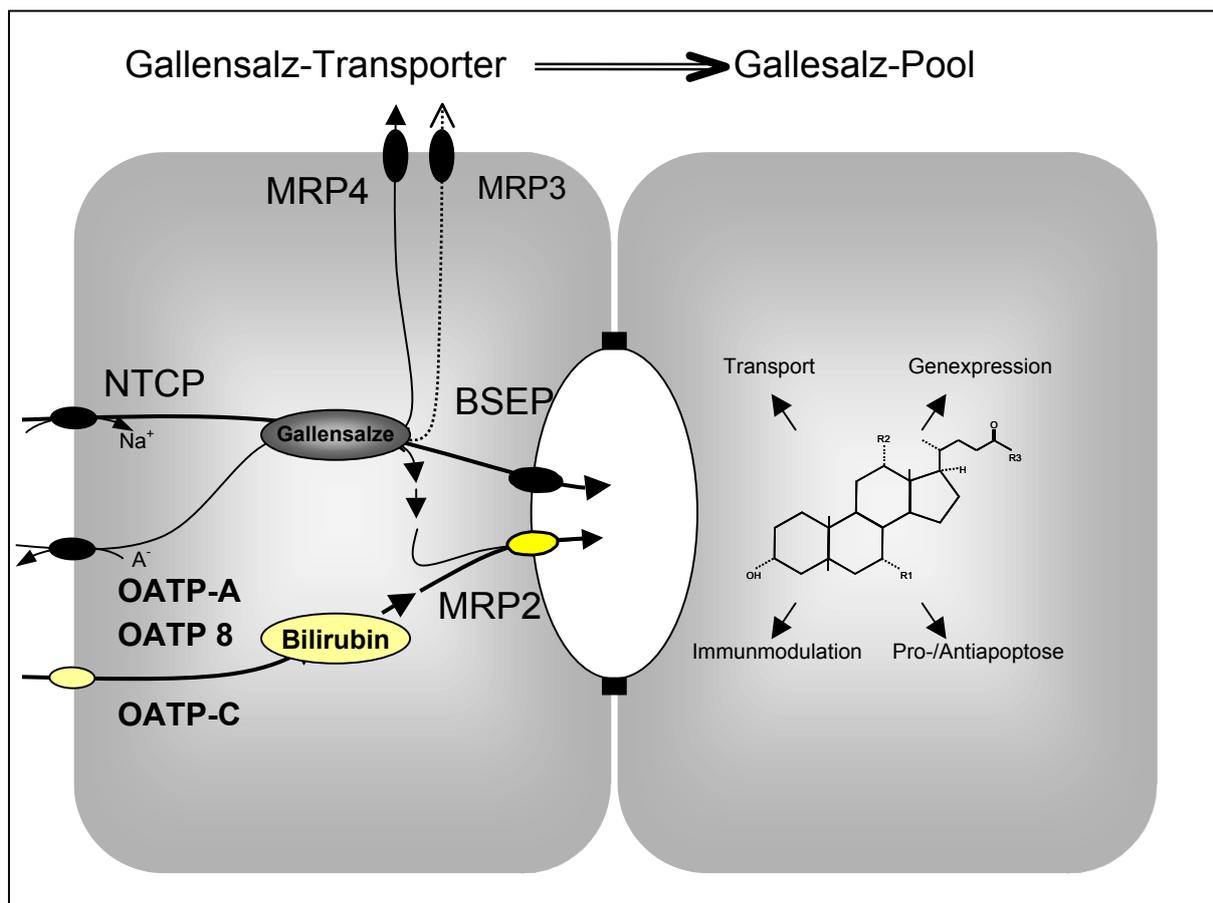
Häufige Ursachen einer obstruktiven Cholestase sind Gallengangsverschlüsse durch Gallensteine oder Tumoren (13;14). Hepatozelluläre Cholestasen treten auf bei Virushepatitiden, im Rahmen einer Sepsis (Sepsis-assoziierte Cholestase) (14-16), bei medikamentös-toxischen Leberschäden (17-19), in der Schwangerschaft bei entsprechender Prädisposition (*cholestasis in pregnancy*) (20;21) oder bei kompletter parenteraler Ernährung (*total parenteral nutrition-associated cholestasis*) (22-24). Die den verschiedenen Cholestasen zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen sind nur teilweise bekannt.

### 1.3 Hepatobiliäre Transporter und ihre Substrate

Leberparenchymzellen exprimieren eine große Anzahl verschiedener Transportproteine. Diese sind asymmetrisch auf die sinusoidale (= basolaterale) und die kanalikuläre (= apikale) Membran verteilt, als Voraussetzung für einen gerichteten Stofftransport vom Blut in die Galle (Abb. 2). Die Namen dieser Proteine werden beim Menschen mit großen Buchstaben, bei Tieren hingegen mit einem großen, gefolgt von kleinen Buchstaben abgekürzt. Es existieren zum Teil mehrere systematische oder unsystematische Abkürzungen für die Transporter, die im folgenden Abschnitt in Klammern aufgeführt sind:

In der sinusoidalen Membran befinden sich mehrere sekundär aktive Transportproteine, die eine Substrataufnahme unter Ausnutzung des von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufgebauten  $\text{Na}^+$ - Gradienten ermöglichen, wie z. B. das  *$\text{Na}^+$ -taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP, Slc10A1) (25-27). NTCP hat Affinitäten zu unkonjugierten und konjugierten Gallensalzen (28-30) und zu Östron-3-Sulfat (30). NTCP ist das wichtigste Aufnahmesystem für Gallensalze in der Leber (31).

Daneben sind zahlreiche Transporter beschrieben, die Substrate durch Ionen-Austausch transportieren. Zu diesen Transportproteinen gehören die *Organic anion transporting peptides* (OATP), von denen in menschlichen Leberzellen vor allem folgende vier OATPs exprimiert werden: OATP-A (OATP1A2/SLC21A3) (32), OATP-C (OATP1B1/SLC21A6), OATP8 (OATP1B3/SLC21A8) und OATP-B (OATP2B1/SLC21A9) (33;34) (Abb. 2). OATPs können Substrate bidirektional transportieren (35). OATPs nutzen Bicarbonat (36) oder Glutathion (37) als Gegenion für die Aufnahme von Anionen. OATP-C ist u.a. für die Aufnahme von unkonjugiertem Bilirubin in Leberzellen zuständig (38).



### Abbildung 2: Hepatobiliäre Transportproteine

Zwei Leberparenchymzellen bilden zusammen eine sekretorische Einheit. Die sinusoidale Membran wird durch die *tight junctions* von der kanalikulären Membran getrennt. An der Gallensalzaufnahme sind in der sinusoidalen Membran das  $\text{Na}^+$ -taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) und verschiedene *organic anion transporting peptides* (OATPs) beteiligt. Die Gallensalzausscheidung wird v.a. durch die kanalikuläre *bile salt export pump* (BSEP) bewirkt. Zum Teil werden Gallensalze (nach Konjugation) auch durch das kanalikuläre *multidrug resistance associated protein 2* (MRP2) und sinusoidales MRP4 und MRP3 ausgeschieden. Der Gallensalz-Pool hat direkt oder indirekt Einfluss auf hepatische und extrahepatische Funktionen (siehe rechte Zelle). Bilirubin wird durch OATP-C aufgenommen und nach Glutathion-Konjugation durch MRP2 ausgeschieden.

Daneben finden sich primär aktive Transportproteine aus der Super-Familie der *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter in der sinusoidalen Membran, wie das *multidrug resistance associated protein 3* (Mrp3/ ABCC3) (39;40), das *multidrug resistance associated protein 4* (ABCC4/ Mrp4) (41) und das *multidrug resistance associated protein 6* (ABCC6/ Mrp6) (42), die den Transport von Substanzen aus den Leberzellen zurück ins Blut erlauben. Sie haben z.T. Bedeutung bei cholestatichen Leberfunktionsstörungen, bei denen sie den Ausfall anderer Transporter kompensieren (41;43-45).

---

An der kanalikulären Membran befinden sich ebenfalls mehrere ABC-Transporter (Abb. 2). Diese Proteine transportieren unter ATP- Hydrolyse Substrate gegen den elektrochemischen Gradienten in die Galle hinein. Dazu gehören das *multidrug resistance associated protein 2* (MRP2, cMOAT, ABCC2) (46;47), die *bile salt export pump* (BSEP, SPGP, ABCB11) (48), das *P-glycoprotein multidrug resistance protein 1* (MDR1, ABCB1) (49) und die Phospholipid- Flippase *multidrug resistance protein 3* (beim Menschen: MDR3, ABCB4; bei der Maus: Mdr2) (21;50). Die Funktion des MDR1 besteht in der Exkretion verschiedener Kationen, darunter zahlreiche Xenobiotika. MDR3 transportiert Phosphatidylcholin in die Galle, welches etwa 20% der gelösten Substanzen in der Galle ausmacht. Mutationen im MDR3-Gen führen zur progressiven familiären intrahepatischen Cholestase Typ 3 (PFIC3) (50-52).

Am Transport von Gallensalzen in der Leber sind mehrere Transportproteine beteiligt: die Gallensalz-Aufnahme an der sinusoidalen Membran wird hauptsächlich durch NTCP bewirkt, welches nur sinusoidal exprimiert wird (31;53) und gleichmäßig über den gesamten Leberazinus verteilt ist (25). Ferner können auch OATPs Gallensalze aufnehmen. Von den vier, in Leberzellen exprimierten OATPs nehmen OATP-A, OATP-C und OATP8 Gallensalze auf (Abb. 2). Die Gallensalz-Ausscheidung über die kanalikuläre Membran wird vor allem durch die Gallensalzexportpumpe BSEP mediiert. Zu einem deutlich geringeren Teil transportiert auch MRP2 Gallensalze in die Galle, nachdem diese glukuronidiert oder sulfatiert wurden (54). Gallensalze können aber auch zurück in den Blutkreislauf durch MRP4 (41) (oder MRP3 (55)) transportiert werden. Möglicherweise ist unter physiologischen Bedingungen der Gallensalz- Transport über die kanalikuläre Membran der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Gallensalz-Ausscheidung (56;57).

Über viele Jahre hinweg wurde über den intrazellulären Transport von Gallensalzen diskutiert und lange Zeit bestand die Hypothese, dass Gallensalze über einen vesikulären Transportprozess von der sinusoidalen zur kanalikulären Membran gelangen (58). Wahrscheinlich jedoch kommt es nur zu einer intrazellulären Bindung der Gallensalze an zytosolische *bile salt binding proteins*. Zu den wichtigsten Proteinen dieser Gruppe gehört in Hepatozyten die 3 $\alpha$ OH-Steroid-Dehydrogenase, die in sehr hohen Konzentrationen in Hepatozyten vorhanden ist (58;59). Die

---

intrazelluläre Bindung von Gallensalzen an solche Proteine dient dem Schutz der Zellen vor den amphiphilen und damit fettlösenden Eigenschaften der Gallensalze sowie vor den Apoptose-induzierenden Eigenschaften, die bereits in niedrigen Konzentrationen bestimmter Gallensalze auftreten können (60;61).

MRP2 transportiert neben glukuronidierten und sulfatierten Gallensalzen (54) vor allem konjugiertes Bilirubin (welches weniger als 0.5% der gelösten Substanzen in der Galle ausmacht), reduziertes und oxidiertes Glutathion, Glutathionkonjugate und eine große Anzahl weiterer organischer Anionen (62). Mutationen von MRP2 sind die Ursache des humanen Dubin-Johnson-Syndroms (63;64), welches sich durch eine konjugierte Hyperbilirubinämie auszeichnet.

BSEP transportiert quantitativ die meisten Gallensalze in die Galle, die mit 60 bis 70% den Hauptanteil der in der Galle gelösten organischen Stoffe ausmachen. Die Affinitätskonstanten ( $K_m$ -Werte) des Ratten-Bsep bzw. des humanen BSEP liegen für die verschiedenen Gallensalze zwischen 2 bis 5  $\mu\text{mol/l}$  (33) bzw. 4 bis 8  $\mu\text{mol/l}$  (65;66) und nehmen in der Reihenfolge Taurochenodeoxycholat, Taurocholat, Tauroursodeoxycholat, Glycocholat und Cholat ab (48;65;66).

Aufgrund des enterohepatischen Kreislaufs passieren Gallensalze täglich sechs bis zehn mal die Leber (33), dies entspricht einer hepatischen Gallensalz-Ausscheidung von 15 bis 25 g/Tag. Weniger als 1 g/Tag verlassen den menschlichen Organismus über Stuhl und Urin. Weniger als 1% des Gallensalz-Pools befindet sich in der systemischen Zirkulation (67).

Es sind eine Reihe von Mutationen des BSEP bekannt, die zu einer rasch progredienten Leberstörung und Ausbildung einer Leberzirrhose bereits im Kindesalter führen und als progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2 (PFIC2) bezeichnet werden (68). Diese Mutationen des BSEP gehen mit einer verminderten Sekretion von Gallensalzen in die Galle einher (69), was je nach Mutation auf einem gestörten *Targeting* des BSEP an die kanalikuläre Membran, auf einer verminderten Transportaktivität oder auf einem verstärkten Abbau des Proteins bereits auf der Ebene des endoplasmatischen Retikulums (ER) im Rahmen der ER-assoziierten Qualitätskontrolle und Degradation (70) beruht. Eine verminderte Aktivität des BSEP führt zur Retention von Gallensalzen mit direkter Auswirkung auf die Leberfunktion.

---

Kommt es zum Beispiel bei chronisch-cholestatischen Lebererkrankungen zur Retention von Gallensalzen, kann sich die normale Konzentration zirkulierender Gallensalze von  $< 8 \mu\text{mol/l}$  um das 10- bis 15-fache steigern auf Werte  $> 125 \mu\text{mol/l}$  (71;72). Ein veränderter Gallensalzpool kann über verschiedene Gallensalz-sensitive nukleäre Rezeptoren die Expression von Genen direkt oder indirekt regulieren (73). Der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) wird zum Beispiel durch das primäre Gallensalz Chenodeoxycholat oder durch die sekundären (im Darm durch Dehydroxylierung entstandenen) Gallensalze Deoxycholat und Lithocholat stimuliert (74;75). FXR steigert direkt die Expression der Gallensalzexportpumpe BSEP (76;77). Hingegen werden die Expression des Gallensalz-Aufnahmesystem Ntcp (78) und der  $7\alpha$ -Hydroxylase (Cyp7A1), das Schrittmachereenzym der Cholesterinbiosynthese, indirekt über den *small heterodimer partner 1* (SHP-1) durch FXR reguliert (79;80). FXR reguliert zudem die am Lipidtransport beteiligten Proteine *phospholipid transfer protein* (PLTP) (81) und hat somit auf mehreren Ebenen einen direkten Einfluss auf die Cholesterinhomöostase (9;82-84).

Ebenso wie FXR hemmt der Pregnenolen-X-Rezeptor (PXR) die Expression der  $7\alpha$ -Hydroxylase (Cyp7A1) und vermindert auf diese Weise die Cholesterin- und Gallensalz-Neusynthese (85). Des weiteren fungiert auch der Vitamin D- Rezeptor (VDR) als Gallensalz- Sensor für das sekundäre Gallensalz Lithocholat und induziert die Expression des Cytochrom P-450 Cyp3A4, welches die Metabolisierung des toxischen Gallensalzes Lithocholat bewirkt (86).

Von klinischer Relevanz ist der differentielle Einfluss von Gallensalzen auf das Überleben von Leberparenchymzellen (Pro-/ Antiapoptose): hydrophile Gallensalze wie das therapeutisch eingesetzte Tauroursodeoxycholat haben einen antiapoptotischen Effekt, während hydrophobe Gallensalze proapoptotische Eigenschaften haben (87;88).

Patienten mit einer Cholestase haben häufig eine gestörte Immunabwehr, welche mit einer Erhöhung der Gallensalze im Plasma korreliert (89;90). Eine Veränderung der Immunabwehr durch Gallensalze wird u.a. durch Stimulation des von Makrophagen und anderen Blutzellen exprimierten Gallensalz- sensitiven, G-Protein- abhängigen Rezeptors (*G-protein coupled bile acid receptor*, TGR5) (91) bewirkt. Ein weiterer Mechanismus der veränderten Immunabwehr besteht darin, dass z.B. Chenodeoxycholat die Interferon- induzierte Expression antiviraler Proteine wie der

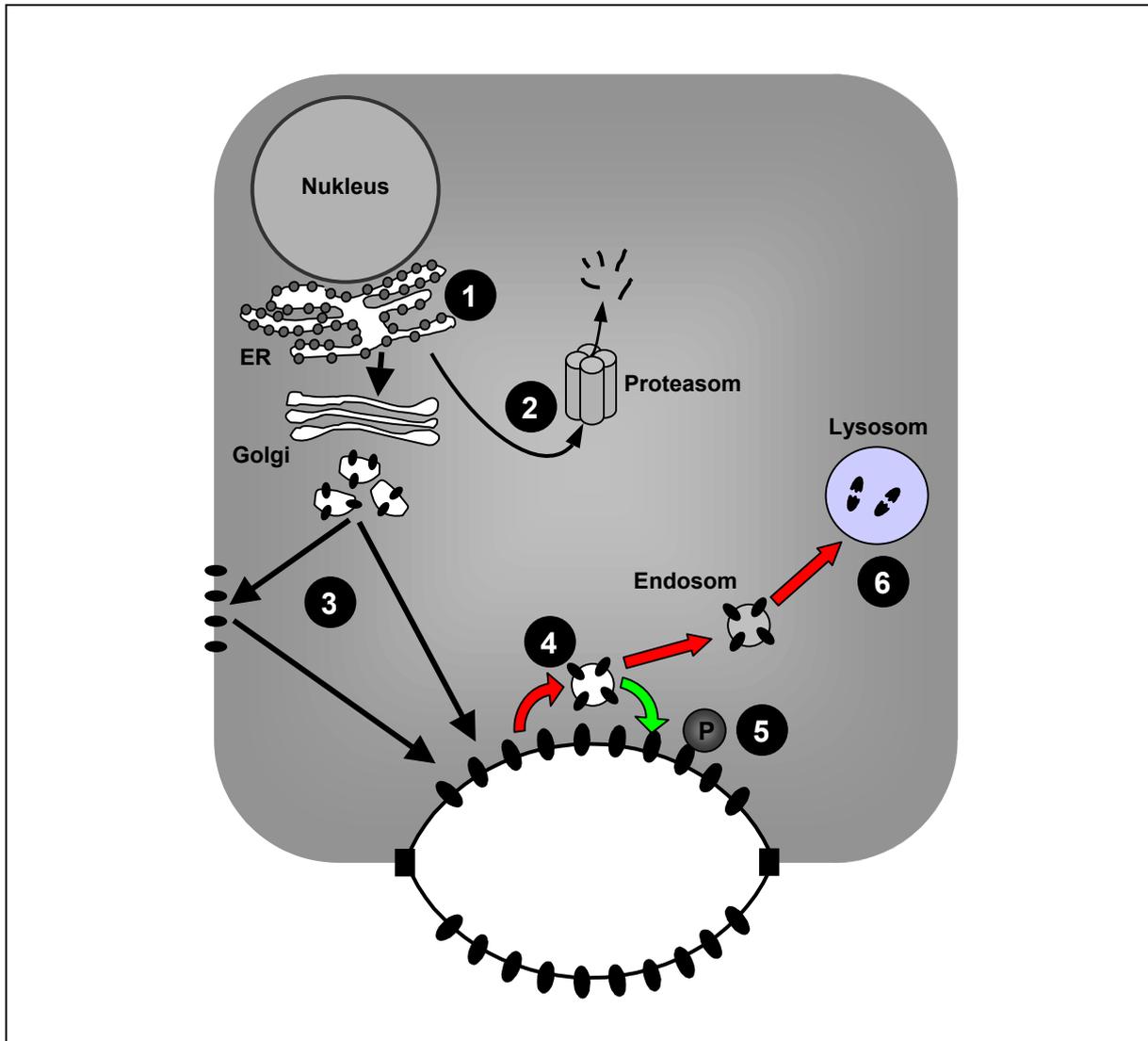
---

Oligoadenylat- Synthetase (OAS p100) und MxA (aus der Klasse der Myxovirus-Resistenz Proteine) hemmen kann (92).

#### 1.4 Regulation hepatobiliärer Transporter

Bei verschiedenen Formen der Leberschädigung wie bei der Gallengangsobstruktion (93;94), der Leberteileresektion (95), der Sepsis (15;93;96-102), viralen Hepatitiden (103), der primär biliären Zirrhose (PBC) (103-106), der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) (107-109) und der Zirrhose unterschiedlicher Ätiologie (103) kommt es zu Expressionsveränderungen hepatobiliärer Transportproteine. Einzelne Transportproteine werden auch durch Medikamente wie z.B. Dexamethason (101;110-113), Rifampicin (114) oder durch Schwermetalle (115) in ihrer Expression reguliert.

Für die Funktion hepatobiliärer Transporter ist letztendlich die funktionelle Menge des jeweiligen Proteins an seiner Zielmembran ausschlaggebend. Diese Größe wird von verschiedenen Parametern bestimmt (Abb. 3, die Ziffern beziehen sich auf die Abbildung.): (1) der Neusyntheserate, (2) der Abbaurrate der Proteine durch das Proteasom im Rahmen der Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum (die sogenannte ER- assoziierte Degradation (ERAD)), (3) dem *Targeting* der Transportproteine an ihre entsprechende Zielmembranen, (4) dem Recycling der Transportproteine zwischen Membran und endosomalen Kompartimenten, (5) kovalenten Modifikationen mit möglichen Auswirkungen auf die Transportaktivität und (6) dem endgültigen (lysosomalen) Abbau der Transporter.



### Abbildung 3: Posttranslationale Prozessierung hepatobiliärer Transportproteine

Die Menge funktioneller Transportproteine wird bestimmt durch (1) Neusyntheserate, (2) die Abbaurrate bei der Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum (ER), (3) das *Targeting* an die Zielmembran, (4) das vesikuläre Recycling an der Zielmembran, (5) konvalente Modifikationen (z.B. Phosphorylierung oder Ubiquitinierung) und (6) die endgültige Degradation (z.B. durch lysosomalen Abbau oder limitierte Proteolyse).

---

## 2. Fragestellungen und Zielsetzung

In früheren Untersuchungen wurde beobachtet, dass es unter Zellvolumenänderungen der Leberparenchymzellen zur schnellen Zu- oder Abnahme der Gallensalzsekretion kommt (116-118). Diese Zu- oder Abnahme wird begleitet von einer gleichsinnigen Änderung des Transportmaximums  $V_{\max}$  für Gallensalze ohne Veränderung der Affinitätskonstante  $K_m$ , d.h. ohne dass sich die Affinität der Gallensalztransportsysteme zu den Gallensalzen ändert. Die maximale Transportkapazität  $V_{\max}$  hängt von der Anzahl aktiver Transportmoleküle ab, und es wurde die Hypothese formuliert, dass rasche Änderungen der Gallensalzsekretion durch den dynamischen Austausch von Transportmolekülen zwischen intrazellulären Kompartimenten und der sinusoidalen und/ oder kanalikulären Membran bedingt sind.

Bevor die ersten Transportproteine kloniert waren, war das Wissen über die Regulation der Gallesekretion auf molekularer Ebene begrenzt. Mit Hilfe von Antikörpern ließen sich Transportproteine erstmals direkt in Zellen nachweisen. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, unter Verwendung Transporter- spezifischer Antikörper die Lokalisation von Transportmolekülen als mögliche Regulationsgröße der Transportfunktion in Leberparenchymzellen und im intakten Organ zu untersuchen.

Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Stellt der Transporterein- und -ausbau ein regulatorisches Prinzip hepatobiliärer Transportproteine dar?
2. Wie gelangen neu synthetisierte hepatobiliäre Transportproteine an ihre Zielmembranen?
3. Welcher Regulation unterliegen hepatobiliäre Transporter bei cholestatischen Lebererkrankungen?

### 3. Methoden

Im Nachfolgenden werden die der Habilitationsschrift zugrunde liegenden Methoden zusammenfassend dargestellt. Ausführliche Beschreibungen finden sich in den im Anhang befindlichen Publikationen, auf die jeweils verwiesen wird.

#### 3.1. Leberperfusion (#1, #2, #4, #5, #7, #8, #9, 10, #12)

Zur Untersuchung der biliären Sekretion von Gallensalzen oder Substraten des *multidrug resistance associated protein 2* (Mrp2) wurden Lebern von männlichen Wistar- Ratten nicht- rezirkulierend mit Carbogen- gesättigtem Krebs- Henseleit Puffer, dem radioaktiv markierte Gallensalze, Chlorodinitrobenzen oder Bromsulphalein zugesetzt waren, bei 37°C perfundiert. Es wurden der pH-Wert und die Kalium- Konzentration kontinuierlich sowie die LDH- Konzentration in Intervallen im Effluat bestimmt. Die Galle wurde nach Kanülierung des Ductus choledochus in 2- bis 5- minütigen Intervallen gesammelt, die Menge wurde gravimetrisch bestimmt. Die Gallensalz- Konzentration wurde szintillatorisch und Mrp2- Substrate wurden photometrisch gemessen.

#### 3.2. Zellisolation (#1, #3, #4, #9, #10, #11, #12)

Leberparenchymzellen wurden aus Lebern von männlichen Wistar- Ratten bzw. aus kleinen Resektionsstücken humaner Lebern mit der Kollagenase- Perfusions- Methode isoliert. Dazu wurden die Portalvene (der Rattenlebern) bzw. einzelne Portalvenenäste der Resektate kanüliert, mit Calcium- freiem Medium vorperfundiert und anschließend mit Kollagenase- haltigem Medium zur Auflösung der Zellverbände perfundiert. Die Parenchymzellen wurden aus den daraus resultierenden Zellsuspensionen durch mehrfache Niedriggeschwindigkeitszentrifugation angereichert. Dadurch wurde eine Reinheit von über 95% mit einer Vitalität der Zellen von mehr als 90% erreicht. Anschließend wurden die Zellen in Kollagen- beschichteten Kulturschalen oder auf Deckgläsern bis zu 5 Tagen kultiviert.

#### 3.3. Transportstudien in isolierten Zellen (#3, #4, #9, #11, #12)

Zur Bestimmung der Transport- Aktivität der Gallensalzaufnahme wurden isolierte Leberparenchymzellen oder humane HepG2 Hepatoma- Zellen, die das *Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide* (Ntcp) der Ratte stabil exprimierten (119), mit

---

radioaktiv markiertem Taurocholat inkubiert. Zur Bestimmung der halbmaximalen Transportaktivität wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen inkubiert, zur Bestimmung der Linearität der Gallensalzaufnahme wurden die Zellen bei supramaximaler Taurocholat- Konzentration unterschiedlich lange inkubiert. Die aufgenommene Taurocholat- Menge wurden szintillatorisch bestimmt.

Für die Bestimmung der Transport- Aktivität der kanalikulären Transporter wurden fluoreszierende transporterspezifische Substrate verwendet. Mittels des Gallensalzsäurederivates Cholyllysyl- Fluorescein (CLF) konnte die Aktivität der Gallensalz- Exportpumpe BSEP nachgewiesen werden. Chloromethylfluorescein-Diacetat stellt nach Abspaltung der Acetat- Reste und Konjugation an Glutathion (GS-CMF) ein spezifisches Mrp2- Substrat dar. Die Akkumulation von CLF und GS-CMF in den Gallenkanalikuli wurde mittels konfokaler Laserscanning- Mikroskopie gemessen.

#### **3.4. Western Blot Analysen (#3, #9, #10, #11, #12)**

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Zelllysate wurden durch 6 bis 8%ige Polyacrylamid- Gele elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose- Membranen transferiert. Proteine wurden durch spezifische Antikörper mit Hilfe der Chemilumineszenz selektiv detektiert.

#### **3.5. Northern Blot Analysen (#2, #3, #4, #10)**

Zur quantitativen Bestimmung spezifischer *messenger* RNAs (mRNA) wurden Gewebe oder isolierte Zellen in Guanidinium Thiocyanat Puffer homogenisiert. Nach Aufreinigung der Gesamt- RNA, elektrophoretischer Auftrennung in Agarose-/ Formaldehyd- Gelen und Transfer auf Nylon- Membranen wurden mRNAs mit radioaktiv markierten spezifischen Sonden autoradiographisch detektiert und densitometrisch quantifiziert.

#### **3.6. Immunfluoreszenz und Konfokale Mikroskopie (#1- #5, #7 - #12)**

Mittels spezifischer Antikörper wurde die subzelluläre Lokalisation von Proteinen in Gewebsschnitten oder isolierten Zellen nachgewiesen. Dazu wurden Gewebsschnitte/ Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Protein- spezifischen Antikörpern inkubiert. Diese "Erst- Antikörper" wurden mit Fluorochrom- gekoppelten

---

Anti- Immunglobulin- Antikörpern ("Zweit- Antikörper") markiert. Die subzelluläre Lokalisation wurde gleichzeitig von bis zu drei Proteinen durch konfokale Laserscanning- Mikroskopie (BioRad Confocal Laser Scanning Microscope, Leica TCS-NT oder Zeiss LSM 510) dargestellt unter Berücksichtigung des möglichen *cross talks* ("Durchbluten") der verschiedenen Fluorochrome.

### **3.7. Densitometrische Quantifizierung von Immunfluoreszenzen (#1, #2, #6, #7, #8, #10)**

Quantitative Aussagen aufgrund von Immunfluoreszenzen sind schwierig. Für die Bestimmung der an kanalikuläre Transporter gekoppelten, Antikörper- gebundenen Fluoreszenz wurde eine Methode entwickelt, die eine semiquantitative Aussage zulässt. Ausschnitte aus Fluoreszenz- markierten Gewebsschnitten wurden mit einer digitalen Kamera oder mit der konfokalen Laserscanning- Mikroskopie aufgenommen. Die Intensität der Fluoreszenz wurde durch den Wert der Pixel kodiert, wobei jeder Pixel einen Wert zwischen Null und 255 annehmen konnte (entsprechend der 8-bit Tiefe). Die Pixelwerte wurden auf Linien senkrecht zu den Kanalikuliachsen jeweils 4 µm beiderseits des Kanalikuli bestimmt. Die Pixelwerte dieser Linien ergaben in der Regel Normalverteilungen. Die zusammengehörigen Verteilungskurven eines Bildausschnittes wurden gemittelt. Es wurden zum Vergleich verschiedener Untersuchungsbedingungen mindestens 10 Bildausschnitte pro Versuchsbedingung geblindet ausgemessen. Die Varianzen der gemittelten und normalisierten Verteilungskurven wurden statistisch verglichen. Eine ausführliche Beschreibung der Methode findet sich in Kubitz et al. 1999, Gastroenterology 116:401-410 (#2).

### **3.8. Elektronenmikroskopie und Morphometrie (#5)**

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden Lebern mit 3%iger Paraformaldehyd/ 0,2%iger Glutaraldehyd- Lösung perfundiert. Leberstücke wurden in Lowicryl eingebettet und dehydriert. Nach UV-Polymerisation wurden Schnitte mit einem Ultramikrotom hergestellt. Mrp2 wurde mit Hilfe eines Anti- Mrp2- Antikörpers und eines Goldpartikel gekoppelten Anti- Immunglobulin- Antikörpers markiert.

In den Leberschnitten wurden mit dem Elektronenmikroskop Kanalikuli primär bei 8.900-facher Vergrößerung aufgesucht. Schließlich wurden Bilder bei 40.000- facher Vergrößerung aufgenommen. Um die Kanalikuli wurde ein 1 µm breiter Saum

---

gezeichnet und ein Gitternetz mit 12 x 12 Linien gelegt. Die Anzahl der Kreuzungspunkte innerhalb der Kanalikuli bzw. innerhalb des 1 µm breiten perikanalikulären Saums wurde als relatives Maß für die Fläche der kanalikulären Membran bzw. des perikanalikulären Volumens verwendet. Gold-Partikel, die mit der kanalikulären Membran assoziiert waren oder im Zytoplasma lagen, wurden ausgezählt. Mit den so gewonnenen Werten ließ sich die Verteilung von Mrp2 zwischen kanalikulärer Membran und intrazellulärem Kompartiment berechnen.

### **3.9. Antikörper-Generierung (#10, #11)**

Für die humane Gallensalzexport- Pumpe BSEP (ABCB11) existierten bisher keine kommerziell erhältlichen Antikörper. Daher wurden für diese Arbeit zwei Antikörper generiert, die Epitope am N-Terminus (Antikörper K165) bzw. in der sogenannten Linker-Region (Antikörper K168) des BSEP erkennen. Es wurde auf hohe Immunogenität und auf extrazelluläre Lokalisation der Epitope geachtet. Ferner wurden Aminosäuresequenzen gewählt, die mit den nächsten in der Leber exprimierten Verwandten von BSEP, nämlich MDR1 (ABCB1) und MDR3 (ABCB4), eine möglichst geringe Sequenzhomologie aufwiesen. Umgekehrt waren die gewählten Sequenzen identisch (K168) bzw. 87% homolog (K165) mit Bsep der Ratte. Die jeweils 15 Aminosäuren langen Peptide waren über ein Cystein an *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) gekoppelt. Zur Generierung eines Hyperimmunserums wurden Kaninchen 3-malig mit den Peptiden geboostert.

### **3.10. Reverse Transkription- Polymerase Kettenreaktion (#11)**

Mittels der Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) lassen sich spezifische mRNAs nachweisen. Nach Aufreinigung von Gesamt- RNA bzw. totaler mRNA wurde mit Hilfe der *Avian Myeloblastosis Virus* reversen Transkriptase (der Firma Promega) und BSEP- spezifischen Rückwärtsprimern die gesuchte mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. In einer weiteren Reaktion wurde mit Hilfe der *Termus flavus* DNA Polymerase die cDNA amplifiziert in Anwesenheit der entsprechenden Vorwärts- und Rückwärts- Primer. Die PCR- Produkte wurden mit Agarose- Gelen analysiert und nach Klonierung in einen PCR- Vektor durch Sequenzierung überprüft.

---

### **3.11. Klonierung und Plasmidkonstruktion von Protein Kinase C Isoformen (#12)**

Für Untersuchungen der spezifischen Aktivierung von Protein Kinase C (PKC) Isoformen wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{PKC}\alpha$  des Menschen (aus Gesamt- RNA von HepG2-Zellen) sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige  $\text{PKC}\epsilon$  der Ratte (aus Gesamt- RNA aus Rattenastrozyten) kloniert. Hierzu wurde die mRNAs mit Oligo-T Primern in cDNA umgeschrieben. Die PKC-Isoformen wurden mit spezifischen Primern aus der cDNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einen PCR-Vektor kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Nach Propagierung in *E. coli* wurden die PKC-Sequenzen in den Zielvektor EYFP-N1 (der Firma Clontech) umklontiert unter Beachtung des Leserasters, so dass am C- Terminus der PKC- Isoform das *enhanced yellow fluorescent protein* (YFP) exprimiert wurde.

### **3.12. Zelltransformation (#12)**

Für die Expression von an fluoreszierende Proteine gekoppelten Transportproteinen oder PKC- Isoformen in HepG2- Zellen wurden Vektoren (wie unter 3.11 beschrieben) mit Lipotransfektion in die Zellen transfiziert. Als Lipofektationsreagenz wurde das kommerziell erhältliche Lipofectamine 2000 der Firma Invitrogen eingesetzt. 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für Experimente verwendet.

### **3.13. Translokationsuntersuchungen von PKC und MARCKS (#12)**

PKCs sowie das PKC- Substrat *myristilated alanine- rich C kinase substrate* (MARCKS) zeigen eine Abhängigkeit ihrer subzellulären Lokalisation vom Aktivierungszustand (PKC) bzw. Phosphorylierungszustand (MARCKS). Die an das gelb fluoreszierende Protein (YFP) gekoppelten PKC Isoformen bzw. das an das grün fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelte MARCKS wurden daher für Untersuchungen der PKC- Aktivierung bzw. MARCKS- Phosphorylierung verwendet. Vitale PKC-YFP exprimierende HepG2- Zellen wurden mit Hilfe der Laserscanning- Mikroskopie in Intervallen von 15 Sekunden aufgenommen und dabei durch verschiedene PKC- aktivierende Substanzen stimuliert. Die Lokalisation von GFP- MARCKS wurde in HepG2- Zellen unter dem Einfluss verschiedener PKC- Aktivatoren und Hemmstoffe untersucht.

---

### **3.14. Differentielle Zentrifugation (#12)**

Nicht aktivierte PKC- Isoformen befinden sich im Zytoplasma der Zellen, während Aktivierung zu nicht-kovalenter Bindung der PKCs an Membranen führt. Aus Lebern, die mit PKC- Aktivatoren behandelt wurden, wurden Membranvesikel- Präparationen hergestellt. Die Membranvesikel wurden durch Ultrazentrifugation vom Zytoplasma abgetrennt, die Menge der PKCs im Zytosol und in der Membranfraktion wurde mittels Western Blot Analysen und Densitometrie quantifiziert.

---

## 4. Ergebnisse eigener Arbeiten

### 4.1 Endo- und Exozytose kanalikulärer ABC- Transporter (#1, #5, #6, #7, #8)

In Gefrierschnitten der Leber lassen sich die Transportproteine unter Einsatz Transporter- spezifischer Antikörper innerhalb der Zellen lokalisieren. In der Immunfluoreszenz findet sich Mrp2 unter normalen Bedingungen zu einem großen Teil in der kanalikulären Membran (#1), während sich Bsep zu einem größeren Teil bereits in einem intrazellulären Kompartiment befindet (#8). In semiquantitativen elektronenmikroskopischen Untersuchungen ließ sich jedoch zeigen, dass auch Mrp2 bereits unter normalen Bedingungen zu gut 50% intrazellulär lokalisiert ist (#5).

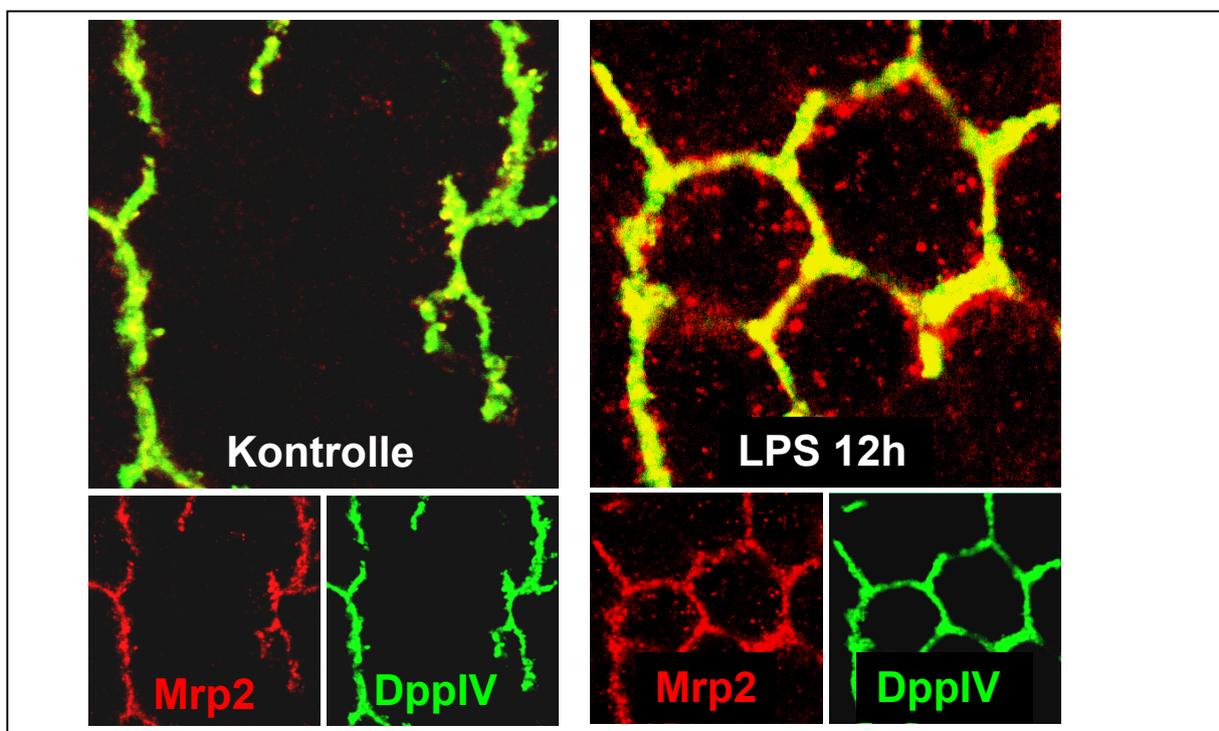
Bestimmte Aminosäuren und Hormone bewirken eine Veränderung des Zellvolumens um  $\pm 10\%$  (116-118). Diese Volumenänderungen können in der isoliert perfundierten Rattenleber durch Änderung der normalen Perfusat-Osmolarität von 305 mosmol/l (Normoosmolarität) auf 205 mosmol/l (Hypoosmolarität) und auf 405 mosmol/l (Hyperosmolarität) nachgeahmt werden. Werden Lebern hyperosmolar perfundiert, kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer Abnahme der biliären Sekretion der Mrp2- Substrate Glutathion- Bromsulphalein (GS-BSP) und S-2,4-Dinitrophenol- Glutathion (GS-DNP) (#5) und des Bsep- Substrates Taurocholat. Nach etwa 15 Minuten wird ein neues Gleichgewicht der Sekretion erreicht. Parallel zur Sekretionsabnahme kommt es zu einer veränderten Lokalisation der Transportproteine: Mrp2 findet sich zu einem größeren Teil innerhalb der Zelle und es lassen sich vesikelartige Strukturen in direkter Nachbarschaft oder auch in einigem Abstand zum Kanalikulus finden (#1, #5). In hyperosmolar perfundierten Lebern fand sich eine Verbreiterung der Mrp2- und Bsep- gekoppelten Fluoreszenzverteilung. Mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie konnte insbesondere eine Zunahme der Transporter- gekoppelten Fluoreszenz beiderseits der kanalikulären Membran, d.h. innerhalb der Zellen (#1, #8) dargestellt werden. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen fand sich parallel dazu eine signifikante Zunahme des intrazellulär lokalisierten Mrp2 (#5). Die Korrelation der veränderten Transporter- Lokalisation und verminderten Transporter- Funktion legt nahe, dass die schnelle Inaktivierung von Transportern durch eine Umverteilung der Proteine von der kanalikulären Membran in ein intrazelluläres Kompartiment geschieht (#6).

Dass Lokalisation und Funktion eng miteinander verknüpft sind, wird durch die Reversibilität des Prozesses unterstrichen. Sowohl die Hyperosmolaritäts- induzierte

Sekretionsabnahme als auch die Umverteilung der Transportproteine kann durch anschließende Perfusion mit hypoosmolarem Medium rückgängig gemacht werden (#1, #5). Eine weitere wichtige Beobachtung stellt die Selektivität dieses Prozesses dar: Das ebenfalls kanalikulär lokalisierte Ekto-Enzym Dipeptidylpeptidase IV (DppIV) fand sich nach hyperosmolarer Perfusion nicht wie Mrp2 in den intrazellulären Vesikeln (#5).

#### 4.2 Cholestase- Entstehung in der Sepsis, Einfluss von Dexamethason (#2, #3, #4, #5, #10)

In der Sepsis kommt es häufig zu einer Cholestase unterschiedlichen Ausprägungsgrades (15). Das Krankheitsbild der Sepsis lässt sich im Tiermodell durch eine ein- oder mehrmalige Endotoxin- Injektion (= Lipopolysaccharid) nachahmen. Nach Endotoxin- Gabe kommt es regelmäßig zu einer Herunterregulation der mRNA verschiedener hepatobiliärer Transporter, wie der Mrp2- mRNA (#2, #10) und der Bsep- mRNA (#4, #10). Diese Herunterregulation ist aber erst nach mindestens 6 Stunden messbar. Interessanterweise kommt es aber bereits 3 Stunden nach Endotoxin- Gabe zu einer signifikant verminderten



**Abbildung 4: Verteilung kanalikulärer Proteine unter dem Einfluss von Endotoxin/ LPS**

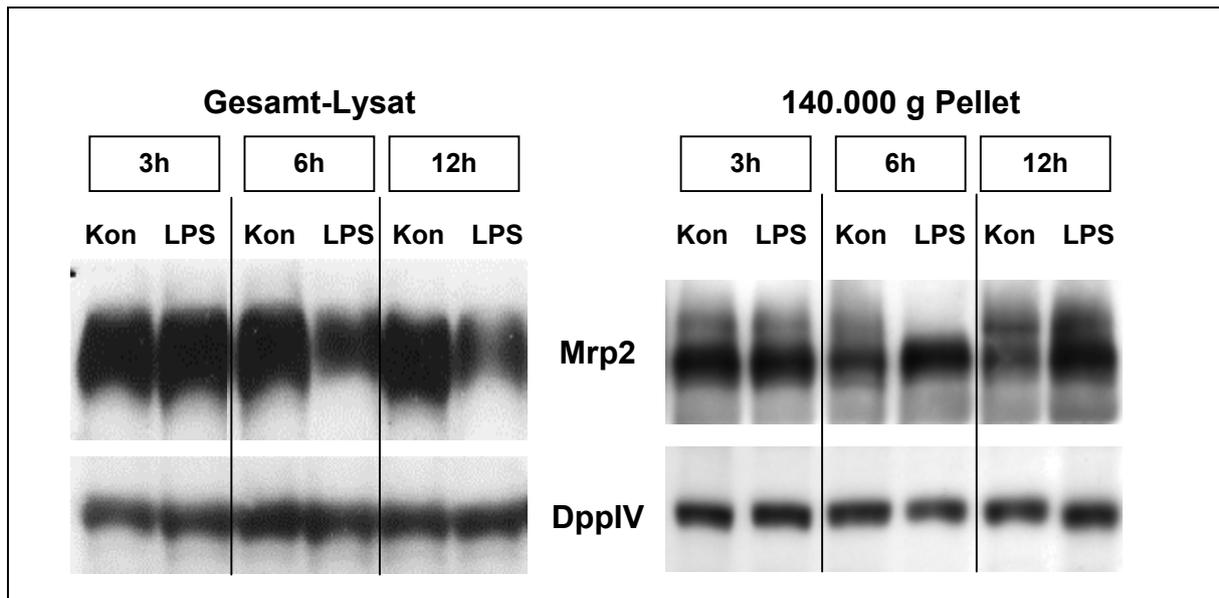
In normalen Lebern der Ratte befindet sich die Immunreaktivität für das *multidrug resistance associated protein 2* (Mrp2) fast komplett in der kanalikulären Membran in Kolokalisation mit der Dipeptidylpeptidase IV (DppIV). Bei Endotoxin/ LPS- behandelten Tieren findet sich eine selektive Umverteilung von Mrp2 in ein intrazelluläres/ endosomales Kompartiment. (aus Kubitz et al., Gastroenterology 1999)

---

Gallensalzsekretion. Diese frühe, Endotoxin- induzierte Cholestase ist noch reversibel: Durch Induktion einer Zellvolumenzunahme (hyposmolare Leberperfusion) kann die verminderte Gallensalzsekretion fast wieder vollständig normalisiert werden (#2). Parallel zur Entstehung einer Cholestase beobachtet man das Auftreten Transporter- enthaltender Vesikel in den Leberzellen (#2, #5, #10). Diese vesikelartigen Strukturen beinhalten Mrp2 (Abb. 4) und Bsep, nicht jedoch die bereits oben erwähnte Dipeptidylpeptidase IV (DppIV), ein transmembranäres Markerprotein der kanalikulären Membran (Abb. 4, #2). Somit scheint der Prozess der Transporter- Endozytose auch bei der Sepsis- assoziierten Cholestase selektiv für bestimmte Proteine zu sein. Die Umverteilung des Mrp2 lässt sich auch mittels differentieller Zentrifugation darstellen: Während sich in Gesamtlysaten aus Lebern eine Abnahme des Mrp2 bei LPS- behandelten Tieren gegenüber nicht- behandelte Tiere findet (Abb. 5), ist im sogenannten 140.000 g Pellet (Protein- Niederschlag, der bei Zentrifugation mit 140.000- facher Erdbeschleunigung entsteht), welches die Endomembranen (also z.B. endozytotische Vesikel) enthält, in den LPS- behandelten Proben mehr Mrp2 vorhanden. Dieser Befund spricht ebenfalls für das Vorhandensein eines Kompartiments, in das kanalikuläre Transportproteine endozytiert werden.

Wird zusammen mit Endotoxin das Glucocorticoid Dexamethason verabreicht, kann die Endotoxin- induzierte Cholestase im Tiermodell verhindert werden. Durch Dexamethason wird sowohl die expressionelle Herabregulation der Transportproteine verhindert (#2, #4) als auch die Endozytose der Transportproteine (#2). Es ist zu beachten, dass Dexamethason einen direkten Effekt auf die Mrp2- und Bsep- Expression hat: In isolierten Hepatozyten führt Dexamethason zu einer gesteigerten Expression der Mrp2- und Bsep- mRNA/Proteine, ein Effekt, der durch hyposmolare Zellvolumenzunahme noch gesteigert werden kann (#3, #4).

Von anderen Gruppen wurden mittlerweile gleichartige Befunde erhoben, und es konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel auch die Östrogen- induzierte Cholestase mit einem vesikulären Ausbau von Bsep und Mrp2 aus der kanalikulären Membran verbunden ist (120;121).



**Abbildung 5: Mrp2- Menge und -Verteilung in der LPS- induzierten Cholestase**

Innerhalb weniger Stunden nach Endotoxin/ LPS- Behandlung kommt es zu einer Abnahme der Mrp2- Gesamtmenge (Gesamt- Lysat). Nach Entfernung kanalikulärer Membranen durch Zentrifugation mit niedriger g-Zahl lassen sich im sog. 140.000 g Pellet endosomale Membranen anreichern. Trotz der Abnahme der Gesamt- Mrp2- Menge findet sich in den LPS- behandelten Lebern ein größerer Anteil des Mrp2 in dieser Fraktion. Die DppIV- Menge ist in den Fraktionen jeweils konstant.

#### 4.3 Trafficking der Gallensalzpumpe vom Golgi- Apparat zur kanalikulären Membran (#9, #11)

In humanen HepG2-Zellen werden unter normalen Zellkulturbedingungen in mindestens 20% der Zellen das MRP2 in der kanalikulären Membran gefunden (#9). Die Expression der Gallensalzpumpe BSEP in HepG2-Zellen ist zwar bekannt gewesen, aber noch nicht genauer untersucht worden. Im Gegensatz zu MRP2 belegen unsere Untersuchungen, dass BSEP zwar von vielen Zellen exprimiert wird, aber nur in wenigen Zellen bis zur kanalikulären Membran gelangt. Nur etwa 10% der MRP2-haltigen kanalikulären Domänen enthalten zusätzlich BSEP (#11), während der Großteil des BSEP im Golgi- Apparat lokalisiert ist, was mithilfe eines C-terminal gerichteten Antikörpers und eines selbstgenerierten N-terminal gerichteten Antikörpers nachgewiesen wurde (#11). Aktivierung des  $p38^{\text{MAP}}$ - Kinase-Signalweges führte zur Mobilisierung von BSEP aus dem Golgi- Apparat und zu vermehrter Nachweisbarkeit in der kanalikulären Membran. Dieser Befund ist insofern von besonderem Interesse, als dass gezeigt werden konnte, dass das therapeutisch eingesetzte Gallensalz Tauroursodeoxycholat (TUDC) ebenfalls zu einer Aktivierung der  $p38^{\text{MAP}}$ - Kinase führt (122). Da in HepG2-Zellen die BSEP-

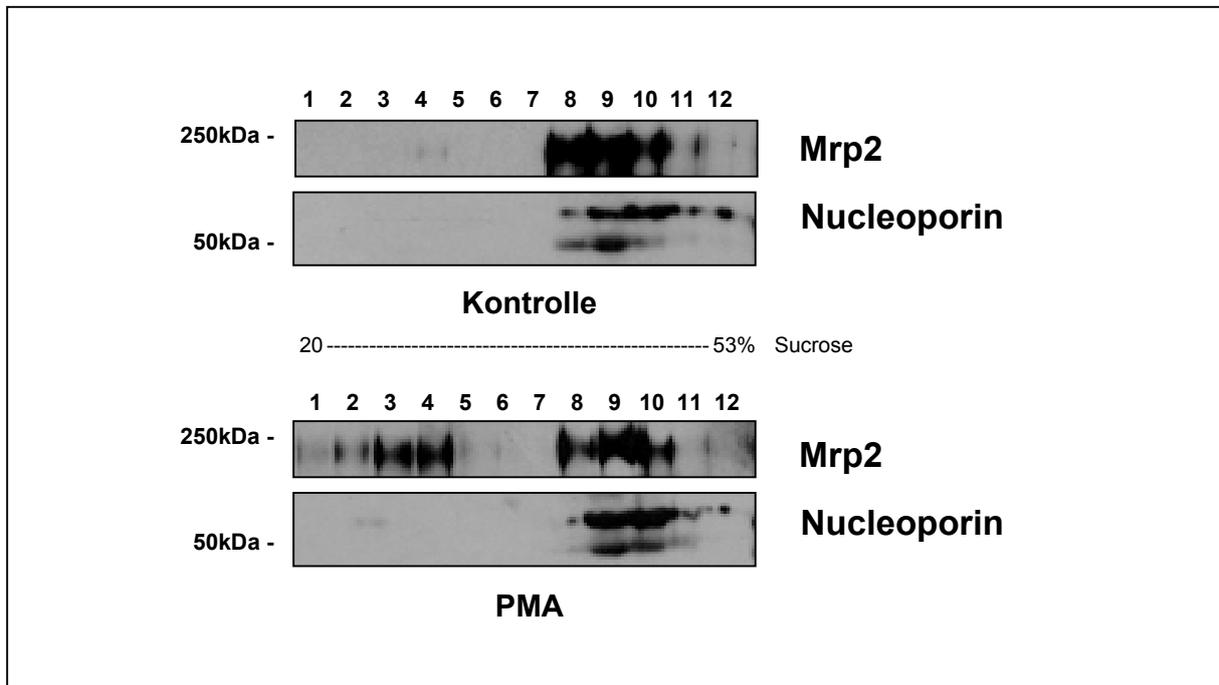
Mobilisierung durch TUDC induzierbar war, liefert dieser Befund einen Erklärungsansatz für den choleretischen Effekt und damit für die therapeutische Wirkung von TUDC. In frisch isolierten Hepatozyten, die im Gegensatz zu HepG2-Zellen polarisiert sind und eine asymmetrische Verteilung der Transportproteine zeigen, konnte darüber hinaus gefunden werden, dass Bsep unter normalen Bedingungen nicht im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Hemmt man jedoch die basale p38<sup>MAP</sup>-Kinase Aktivität, so findet sich auch in diesen Zellen Bsep zu einem Teil im Golgi-Apparat.

#### 4.4 Cholestase durch Aktivierung von Protein Kinase C Isoformen (#9, #12)

Der Ein- und Ausbau kanalikulärer Transportproteine wird durch intrazelluläre Signalwege reguliert. Diese Signalwege beinhalten verschiedene Proteinkinasen (123-125) Übersicht in: (57). An der Regulation der Gallesekretion durch Hormone und Gallensalze sind u.a. Kinasen aus der Protein Kinase C (PKC)-Familie beteiligt (126-135). Zur PKC-Familie zählen mindestens 10 Isoformen, welche in drei Gruppen eingeteilt werden: in die Ca<sup>2+</sup>-abhängigen, *classical* cPKC  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_{II}$ , und  $\gamma$ ; die Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen, *novel* nPKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  und  $\theta$  und die atypischen aPKCs  $\iota$  und  $\zeta$ . In Rattenhepatozyten werden die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_{II}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$  exprimiert (136;137).

In der isoliert perfundierten Rattenleber führt der Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA), ein potenter Aktivator der cPKCs und nPKCs, nicht jedoch der aPKCs, zu einer schnellen Cholestase (#9, #12). Diese Cholestase ist verbunden mit der Endozytose von Mrp2 und Bsep. Diese Transporterendozytose lässt sich sowohl morphologisch mit der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (#12), als auch quantitativ mit Hilfe von Dichtegradienten nachweisen, bei denen es zu einer Verschiebung von Mrp2 aus Fraktionen großer Dichte in Fraktionen kleinerer Dichte kommt (Abb. 6). Begleitend zur Transporterendozytose gelang es erstmals in der Rattenleber und in humanen HepG2-Zellen zu zeigen, dass kanalikuläre Proteine wie das Mrp2/MRP2 unter dem Einfluss einer PKC-Stimulation von der kanalikulären Membran direkt an die basolaterale Membran gelangen können (#9). Andere Gruppen haben diesen Befund mittlerweile bestätigt und konnten zeigen, dass bei bestimmten Medikamenten-induzierten Ikterusformen beim Menschen MRP2 an die sinusoidale Membran gelangt (138). Ebenso wurde bereits Ende der 90iger Jahre berichtet, dass bei der obstruktiven Cholestase eine Umverteilung einer elektrogenen

Taurocholol- Transportaktivität von der kanalikulären an die basolaterale Membran stattfindet (139).



#### Abbildung 6: PKC-induzierte Umverteilung des Mrp2

Membranvesikel aus Vesikelpräparationen von Kontroll- und PMA- behandelten Lebern wurden mittels Sukrose- Gradienten (20 – 53%) nach ihrer Dichte aufgetrennt. Während in Kontroll- Lebern Mrp2 fast ausschließlich in schweren Fraktionen auftaucht, befindet sich in PMA- behandelten Lebern ein großer Teil in leichteren Fraktionen, bei denen es sich z.B. um Endosomen handeln kann. Andere Proteine, wie etwa Nucleoporin, ein Protein der Zellkernmembran, ändern ihre Verteilung nicht.

Phorbolster stimulieren sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ - abhängige als auch  $\text{Ca}^{2+}$ - unabhängige PKC Isoformen. Mit Hilfe cPKC- selektiver Aktivatoren und Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ - abhängige cPKC Isoformen zu einer Cholestase führen und dass der cholestatische Effekt der Phorbolster vor allem durch  $\text{Ca}^{2+}$ - abhängige cPKC Isoformen ausgelöst wird (#12). Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass das therapeutisch eingesetzte Gallensalz Tauroursodeoxycholol seinen Gallenfluss- steigernden Effekt nicht über Aktivierung der PKC $\alpha$  ausübt, wie bisher angenommen wurde (#12), vgl. (133;140;141).

---

## 5 Diskussion

Die mit einer Raute versehenen Zitate finden sich im Anhang

### 5.1 Therapeutische Ansätze bei Cholestasen

Die Cholestase ist ein Zustand, der eigenständig oder begleitend zu anderen Erkrankungen auftritt. In den zurückliegenden Jahren hat das Verständnis verschiedener Cholestaseformen stark zugenommen. Es ist unter anderem möglich geworden, die Wirkprinzipien von Medikamenten wie z.B. Tauroursodeoxycholat (32;122;133) oder Rifampicin (114;142;143), die bisher empirisch bei Cholestasen eingesetzt wurden, auf molekularer Ebene zu verstehen. Aus dem zunehmenden physiologischen und pathophysiologischen Verständnis der Gallebildung und ihrer Transportprozesse werden sich neue Ansatzpunkte für die Therapie cholestatischer Zustände ergeben. Dabei wird es von Bedeutung sein, zwischen Veränderungen des hepatobiliären Transportes zu differenzieren, die einen krankheitsfördernden Mechanismus oder aber einen Adaptationsmechanismus mit Schutzfunktion darstellen. Beispielsweise kommt es beim humanen Dubin- Johnson Syndrom, bei dem Mutationen des kanalikulären MRP2 mit einer konjugierten Hyperbilirubinämie verbunden sind (siehe 1.3), zu einer ausgeprägten Heraufregulation des sinusoidal lokalisierten MRP3 (Abb. 2) (144). Ebenso kommt es auch im Tiermodell bei der obstruktiven Cholestase zu einer Heraufregulation des Mrp3 (43;44;145), welches eine überlappende Substratspezifität zu Mrp2 hat (146;147). Bei verschiedenen krankhaften Zuständen scheint es also eine Gegenregulation von MRP2/Mrp2 zu MRP3/Mrp3 zu geben (148), die sich bereits auf Promoter-Ebene in einer inversen Regulation von MRP2 und MRP3 widerspiegelt (149). Die Heraufregulation von Mrp3 bei der obstruktiven Cholestase (im Tiermodell) hat einen protektiven Effekt (150), da die erhöhte Mrp3-Expression zu einer verstärkten Sekretion von Gallensalzen aus den Leberzellen zurück ins Blut (55) führt. Es ist anzunehmen, dass die bei humanen Lebererkrankungen beobachtete erhöhte MRP3-Expression ebenfalls protektiv wirkt (103). Unter therapeutischen Aspekten wäre es daher anzustreben, den krankheitsfördernden, nicht aber den protektiven Mechanismen bei cholestatischen Erkrankungen entgegenzuwirken.

In dieser Arbeit wurden unter anderem therapeutische Implikationen untersucht. Bei der Endotoxin- induzierten Cholestase der Ratte konnte durch eine einzelne Gabe des Glukokortikoids Dexamethason die Cholestase nahezu vollständig verhindert

---

werden. Sowohl der durch Endotoxin induzierten Herunterregulation der Transporter-mRNAs von Mrp2 und Bsep, als auch der veränderten Lokalisation dieser Transporter konnte durch Dexamethason wirksam entgegengewirkt werden, so dass eine normale Gallebildung und Taurocholatsekretion erhalten blieb (101;111)/(#2,#4). Bei der Endotoxin- vermittelten Reaktion des Organismus kommt es zur Bildung von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Diese Akut- Phase Zytokine werden durch Endotoxin- stimulierte Makrophagen bzw. Kupffer'sche Zellen gebildet (151-156). Möglicherweise wirkt Dexamethason bereits auf Ebene der Zytokinbildung dem Endotoxin entgegen (157). Die Wirkung von Dexamethason auf die Bildung von Zytokinen ist jedoch nicht die einzige Möglichkeit des anticholestatischen Effektes dieses Glukokortikoids. In unseren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Dexamethason einen direkten Effekt auf die Transkription von Mrp2 und Bsep bei der Ratte hat (110;111)/(#3,#4). Unter dem Einfluss von Dexamethason konnte die Expression der *messenger*- RNA und der Proteine dieser beiden kanalikulären Transporter gesteigert werden. Diese von uns in kultivierten Leberzellen erhobenen Befunde wurden durch andere Gruppen bestätigt (112) und auch im intakten Organismus, d.h. bei Dexamethason-behandelten Ratten nachgewiesen (113). Bei diesen Tieren kam es auch zu einer gesteigerten Expression von Mdr1 (Pgp), dem ebenfalls in der kanalikulären Membran lokalisierten Transporter für Kationen (113).

Glukokortikoide binden intrazellulär an den Glukokortikoid- Rezeptor (GR), dieser Komplex bindet an spezifische Nukleotid- Sequenzen, den *Glucocorticoid response elements* (GRE) innerhalb der Promotoren verschiedener Gene (158). Der Effekt von Dexamethason auf die Expression von Mrp2 der Ratte ist in guter Übereinstimmung mit dem Nachweis mehrerer GREs im Mrp2- Promoter, d.h. innerhalb der 1073 Basenpaare der 5'-flankierenden Region des Start- Kodons von Mrp2 (159). Eines der GREs liegt dabei in einer der beiden Regionen (Basenpaare -307 bis -290 und -250 bis -214, bezogen auf das Start- Kodon), die für die basale Expression von Mrp2 essentiell sind (159).

Auch die Bsep- Expression konnte in kultivierten Rattenhepatozyten durch Dexamethason stimuliert werden (111)/(#4). Im Promoter des Ratten- Bsep findet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur TATA- Box ein GRE (Accession-Nummer des Bsep Promoters der Ratte: AF452071; Promoter- Analyse mit MATCH<sup>TM</sup>, [www.generegulation.com](http://www.generegulation.com)). Jedoch zeigte sich der klonierte, in HepG2- Zellen

transfizierte Ratten- Bsep Promoter gegenüber Dexamethason und Hydrokortison unempfindlich (160). In dieser Studie wurden sehr hohe Konzentrationen von Dexamethason eingesetzt (5 mmol/l) (160), während in unseren Untersuchungen die Effekte von Dexamethason auf die endogene Bsep- mRNA in Ratten- Hepatozyten bereits bei Konzentrationen von 100 nmol/l auftraten (111)/(#4). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass in kultivierten Ratten- Hepatozyten die Bsep- mRNA und -Protein Expression indirekt durch Dexamethason reguliert wird.

Von den bekannten GREs (158;161;162) findet sich im humanen MRP2- Promoter ebenfalls eine Kopie (149). Ob dieses GRE funktionell relevant ist, muss noch gezeigt werden, eigene (nicht-veröffentlichte) Untersuchungen an isolierten humanen Hepatozyten zeigen im Gegensatz zu isolierten Rattenhepatozyten keine Regulierbarkeit des MRP2- Proteins durch Dexamethason (R. Kubitz und D. Häussinger, 1999). Dennoch werden Glukokortikoide bei cholestatischen Erkrankungen des Menschen empirisch eingesetzt. Sie haben z.B. bei der primär biliären Zirrhose (PBC) (163;164) oder bei cholestatischen Störungen von Kindern mit Panhypopituitarismus (165-167) einen günstigen Einfluss auf den Verlauf der Cholestase.

## **5.2 Transporterein- und -ausbau: ein neuer Regulationsmechanismus hepatobiliärer Sekretion**

Die Induktion der Transporter- Expression durch Dexamethason stellt ein Beispiel für die langfristige Regulation dar, die von kurzfristigen Regulationsmechanismen unterschieden werden kann (57). Während langfristige Regulationsmechanismen Änderungen der transkriptionellen Transporterexpression beinhalten, d.h. vor allem auf der Ebene der Gentranskription stattfinden, setzen kurzfristige Regulationsmechanismen auf posttranskriptioneller Ebene an (siehe Abb. 3). Zu den wichtigsten Erkenntnissen dieser Arbeit gehört, dass die funktionelle Menge hepatobiliärer Transportproteine verschiedenen posttranskriptionellen Regulationsmechanismen unterliegt. Es konnte der rasche Ein- und Ausbau von Transportproteinen in bzw. aus den entsprechenden Membran- Kompartimenten als ein dominierender Mechanismus der Kurzzeit- Regulation identifiziert werden: Durch den Ein- und Ausbau kann es innerhalb weniger Minuten zu einer Änderung der absoluten Anzahl von Transportermolekülen in der sinusoidalen oder kanalikulären Membran kommen (101;168-172)/(#1,#2,#5,#7,#8,#12), verbunden mit einer

---

Verminderung der maximalen Transportkapazität  $V_{\max}$ . Aufgrund der anatomischen Besonderheiten der Leber sind Untersuchungen zur Regulation kanalikulärer (apikaler) Proteine erschwert. Während in anderen polarisierten Epithelien, wie z.B. der Niere oder dem Darm, die apikale Membran relativ leicht zugänglich ist, entzieht sich die kanalikuläre Membran einer direkten Untersuchung (z.B. mittels der *patch clamp* Technik). Der morphologische Nachweis des Transporterein- und -ausbaus als Regulationsmechanismus gelang daher erstmals 1997 mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie und durch den Einsatz eines Transporter- spezifischen Antikörpers (46), der gegen das Mrp2 der Ratte gerichtet war (168)/(#1). Später konnte der Befund durch elektronenmikroskopische Untersuchungen untermauert werden (169)/(#5). Schließlich gelang es, den Mechanismus auch im Modell der Sepsis- assoziierten Cholestase nachzuweisen (101)/(#2) und die Reversibilität dieses Vorgangs aufzuzeigen (101)/(#2). Nach wie vor ist die zugrunde liegende Signaltransduktion nicht vollständig aufgeklärt, jedoch konnten wir die Einbindung  $Ca^{2+}$ - abhängiger Protein Kinase C- Isoformen in einen entsprechenden *Retrieval*- Mechanismus nachweisen (172)/(#12). Die Bedeutung dieses Mechanismus konnte von uns auch für andere kanalikuläre Transporter, wie zum Beispiel den Bsep, nachgewiesen werden (171)/(#8). Andere Gruppen haben ebenfalls unter zu Hilfenahme der von uns etablierten semiquantitativen Messmethoden (siehe Abschnitt 3.7) diesen Mechanismus in anderen Cholestase- Modellen nachgewiesen (120;121). Im gleichen Zeitraum wurde von weiteren Arbeitsgruppen nachgewiesen, dass ein ähnlicher Mechanismus auch Transportproteine der sinusoidalen Membran, wie z.B. den Ntcp, regulierten (129;173;174).

Eine wichtige Regulationsgröße für den raschen Ein- und Ausbau von Transportermolekülen stellt dabei der Hydratationszustand der Leberzellen dar (57;117;175). In der perfundierten Leber induziert Zellschwellung eine Zunahme und Zellschrumpfung eine Abnahme der Taurocholatssekretion, unabhängig davon, ob die Zellvolumenänderungen durch Änderungen der Umgebungsmolarität oder indirekt durch die Wirkung von Hormonen (wie Insulin), kumulative Aminosäureaufnahme oder Ethanol bewirkt wird (57;117). Dabei führen Änderungen des Zellvolumens von nur 10% bereits zu Veränderungen der maximalen Taurocholeat- Transportkapazität auf das Doppelte (175). Colchicin, ein Hemmstoff der Mikrotubuli, hemmt diese Zellschwellungs- induzierte Zunahme der Taurocholatssekretion, wodurch die Notwendigkeit intakter Zytoskelettstrukturen nachgewiesen wurde (118). Dieser

---

wichtige Befund ist sehr gut vereinbar mit dem Mechanismus des Transporterein- und -ausbaus (168;169;171)/(#1,#5,#8), da ein Vesikeltransport nur bei intaktem Zytoskelett möglich ist.

Eine bisher ungeklärte Beobachtung ist die inverse Sekretion von Konjugaten bei der Hyperosmolaritäts- induzierten Cholestase: Es kommt nicht nur zu einer verminderten Sekretion von Mrp2- Substraten (wie z.B. Chlorodinitrobenzen) in die Galle, sondern diese werden verstärkt über die sinusoidale Membran zurück in den Blutkreislauf transportiert (169)/(#5). Obwohl eine Umverteilung des Mrp2 von der kanalikulären an die sinusoidale Membran prinzipiell möglich ist (128;138)/(#9), konnte eine derartige Transporterumverteilung bei hyperosmolarer Perfusion nicht beobachtet werden. Es ist jedoch denkbar, dass andere Mitglieder aus der Mrp-Familie, wie z.B. Mrp3 oder Mrp4, diesen Rücktransport bewirken. Vor allem Mrp4, welches im Gegensatz zu Mrp3 bereits unter Kontrollbedingungen in allen Hepatozyten exprimiert wird und submembranär lokalisiert ist (41), könnte diesen Transport mediiieren. Diese Konstellation wäre insofern von besonderer Bedeutung, da dadurch eine weitere Determinante des Stofftransportes vom Blut in die Galle bestünde. Damit würde die Netto- Sekretion von Substanzen in die Galle nicht nur von der Aufnahme über die sinusoidale und die Ausscheidung über die kanalikuläre Membran abhängen, sondern Aufnahme und Abgabe über die sinusoidale Membran würden kompetitive Größen darstellen. Bei der obstruktiven Cholestase ist Mrp4 hochreguliert (45), die Bedeutung dieser Hochregulation ist allerdings bisher nicht verstanden.

Der Mechanismus des Hyperosmolaritäts- induzierten Transporterausbaus hat möglicherweise auch klinische Korrelate. So wurde spekuliert, dass die mit der totalen parenteralen Ernährung assoziierten Cholestase (*total parenteral nutrition (TPN) associated cholestasis*) durch die Hypertonizität der eingesetzten Nährlösungen bedingt sein könnte und die gleichen Mechanismen wie in den oben beschriebenen Tiermodellen greifen (56). Möglicherweise stellen aber auch eine Veränderung der Darmflora während der parenteralen Ernährung mit einer daraus resultierenden verstärkten Zirkulation von Endotoxin und eine vermehrte Produktion von Lithocholsäure weitere Ursachen der TPN- assoziierten Cholestase dar (176), zumindest kann diese v.a. bei Kindern auftretende Störung der Leberfunktion durch TNF-Antikörper gemildert werden (177).

Funktionelle Daten aus der perfundierten Rattenleber haben bereits seit längerer Zeit nahegelegt, dass Transportproteine aus intrazellulären Kompartimenten schnell, d.h. innerhalb weniger Minuten, rekrutierbar sind (116;118;124). Mittlerweile ist gezeigt worden, dass sich ein- und derselbe Transporter (z.B. Bsep) in verschiedenen rekrutierbaren intrazellulären Kompartimenten befindet (178-181). Diese Kompartimente sind durch ihre Rekrutierbarkeit durch verschiedene Stimuli charakterisierbar: z.B. kann Bsep durch Zellvolumen- oder Tauroursodeoxycholsäure- vermittelte Aktivierung der MAP- Kinasen vom Erk- Typ und der p38<sup>MAP</sup>- Kinase (122;124) oder durch cAMP- vermittelte Aktivierung der Protein Kinase A (178) in die kanalikuläre Membran eingebaut werden. Rekrutierung von Bsep an die kanalikuläre Membran direkt durch Taurocholat (178) wird möglicherweise auch über die Zellvolumen- sensitive Signaltransduktion vermittelt (182). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass der Schwellungs- induzierten Insertion von Transportproteinen in die kanalikuläre Membran die sequenzielle Aktivierung von Integrinen, src-Typ- Kinasen und MAP- Kinasen vorausgeht (183).

Neben diesem schnell zugänglichen intrazellulären Kompartiment konnte im Rahmen dieser Arbeit noch ein weiteres Kompartiment für BSEP identifiziert werden. In humanen HepG2- Zellen dient der Golgi- Apparat als Speicher für BSEP. Von hier kann BSEP durch Aktivierung einer p38<sup>MAP</sup>- Kinase Isoform oder einer Ca<sup>2+</sup>- unabhängigen Protein Kinase C Isoform an die kanalikuläre Membran geschleust werden (184). HepG2- Zellen exprimieren eine Reihe weiterer kanalikulärer Transmembranproteine, wie z.B. MRP2 (128;185;186), MDR1 (185) oder Dipeptidylpeptidase IV (128)/(#9), und basolateral lokalisierte ABC- Transporter wie MRP1 (185;187), MRP3 (143), MRP4 (41), MRP5 (143) und MRP6 (185). Interessanterweise fand sich aber keiner dieser Transporter zu einem signifikanten Anteil im Golgi- Apparat. Lediglich in WIF-B9- Zellen, einer polarisierten Hybridom- Zelllinie, fand sich transfiziertes Mdr1 zu einem größeren Anteil im Golgi- Apparat.

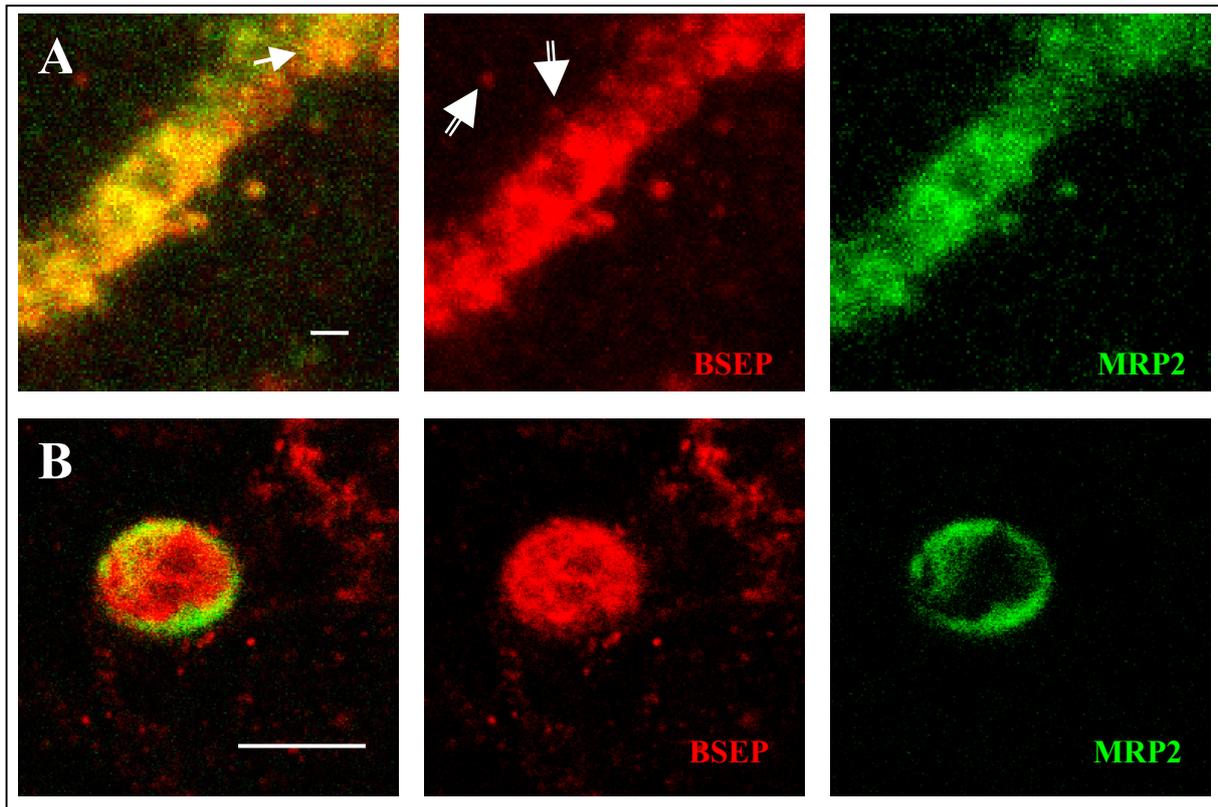
Dass in HepG2-Zellen BSEP, nicht aber andere, bisher untersuchte ABC-Transporter einen eigenen "Speicherort" besitzen, deutet auf eine differentielle Prozessierung der Transporter bereits zu einem frühen Zeitpunkt im Lebenszyklus der Transportproteine hin. Weitere Beobachtungen unterstützten die Annahme einer differentiellen posttranskriptionellen Regulation kanalikulärer Transporter:

(1) Radixin ist ein Protein der ERM- Familie (Ezrin- Radixin- Moesin) und ist für die Quervernetzung von integralen Membranproteinen mit Aktin, einem essentiellen

---

Bestandteil des Zytoskeletts, notwendig. Radixin- *Knockout* führt bei Mäusen ähnlich wie beim humanen Dubin- Johnson- Syndrom zu einer konjugierten Hyperbilirubinämie (188). Interessanterweise liegt selektiv für MRP2 ein Störung des *Targetings* an die kanalikuläre Membran zugrunde, während andere Proteine der kanalikulären Membran, wie z.B. Bsep, Mdr1, Mdr2 und Dipeptidylpeptidase IV nicht betroffen sind (188). Möglicherweise existieren für die anderen kanalikulären Transporter entsprechende Adapter- Proteine, die jedoch noch identifiziert werden müssen.

(2) Die verschiedenen kanalikulären Transmembranproteine gelangen auf unterschiedlichem Wege an die kanalikuläre Membran. Es werden ein indirektes und ein direktes *Targeting* unterschieden (189-192). Beim indirekten *Targeting* gelangen die Proteine vom trans- Golgi zunächst an die basolaterale (sinusoidale) Membran, um von dort transzytotisch (d.h. durch die Zelle) an die apikale (kanalikuläre) Membran zu gelangen (190). Dieser Pfad wird in Leberzellen z.T. durch die 5'-Nucleotidase oder die Dipeptidylpeptidase IV (DppIV) genutzt (128;180;193)/(#9). Beim direkten *Targeting* gelangen die Proteine unter Umgehung der basolateralen Membran vom Golgi- Apparat aus direkt zur apikalen Membran über den klassischen sekretorischen Weg. Bezüglich des *Targetings* der kanalikulären Transportproteine gibt es widersprüchliche Befunde. In isolierten Zellen wurden Mrp2 und Bsep in Vesikeln gefunden, die den Immunglobulin A Rezeptor als typischen Marker von transzytotischen Vesikeln enthielten (194). Hingegen wurden nach radioaktiver Markierung der Transporter in *in vivo* Experimenten Mrp2, Bsep und Mdr1 im Gegensatz zu der ebenfalls kanalikulär lokalisierten DppIV und dem *cell-cell adhesion molecule 105* nicht in der sinusoidalen Membran gefunden (180). Eigene Beobachtungen in humanen HepG2- Zellen führten ebenfalls zu dem Schluss, dass MRP2 auf direktem Wege zur kanalikulären Membran gelangt. Während die DPPIV sowohl an der sinusoidalen als auch der kanalikulären Membran gefunden wurde, konnte MRP2 nur in intrazellulären Vesikeln oder in der kanalikulären Membran nachgewiesen werden (128)/(#9). Außerdem wurden die DPPIV und MRP2 nie in den gleichen Vesikeln gefunden, was ebenfalls für ein unterschiedliches *Targeting* dieser beiden Proteine spricht.



**Abbildung 7: Verteilung von ABC-Transportern in "Domänen"**

**A:** Ausschnitt eines Kanalikus einer Rattenleber. Bsep (rot) und Mrp2 (grün) zeigen eine inhomogene Verteilung im Kanalikus, erkennbar an den verschiedenen Gelbfärbungen (Pfeil). Einige Vesikel enthalten beide Transportproteine, während andere nur Bsep enthalten (Doppelpfeile). **B:** Ein einzelner Pseudokanalikus zweier benachbarter HepG2-Zellen zeigt eine domänen-artige Verteilung von BSEP (rot) und MRP2 (grün), die perikanalikulären Vesikel enthalten nur BSEP.

(3) Auch bei der Endozytose kanalikulärer Transporter handelt es sich wahrscheinlich nicht um einen "Massenprozess", sondern um einen Transporter-spezifischen Vorgang. In Lebern, die mit hyperosmolarem Medium perfundiert wurden, wurden sowohl Bsep als auch Mrp2 von der kanalikulären Membran endozytiert. Interessanterweise finden sich jedoch in den intrazellulären Vesikel zu  $61 \pm 4$  % nur Bsep, zu  $24 \pm 3$  % nur Mrp2 und lediglich in  $15 \pm 4$  % beide Transportproteine (171)/(#8). In der kanalikulären Membran findet sich unter diesen Bedingungen eine ungleiche Verteilung von Bsep und Mrp2 (Abb. 7A und *Figure 4* der Arbeit #8). Es kann spekuliert werden, dass sich die Transportproteine in "Domänen" befinden als Voraussetzung für einen Transporter-selektiven Endozytose-Mechanismus. Diese Annahme, dass Transporter in Domänen verteilt sein können, wird durch Beobachtungen in HepG2-Zellen untermauert, bei denen mittels hochauflösender konfokaler Laserscanning-Mikroskopie eine deutlich asymmetrische Verteilung von BSEP und MRP2 gefunden werden kann (siehe Abb. 7A). Während sowohl Bsep als

---

auch Mrp2 zu signifikanten Anteilen endozytiert wurden, behielt die DppIV ihre Lokalisation in der kanalikulären Membran bei der Endotoxin- und Hyperosmolaritäts-induzierten Cholestase bei (101;169)/(#2,#5), was die Selektivität des Endozytose-Mechanismus unterstreicht.

(4) ABC-Transporter der kanalikulären Membran haben in Rattenlebern unter Kontroll- Bedingungen Halbwertszeiten zwischen 3 bis 5 Tagen (178). Nach Induktion einer Cholestase durch Endotoxin (93;101;195)/(#2) oder Gallengangsligatur (94;196;197) sinkt die Menge an Mrp2 rasch auf Werte unter 20 % innerhalb von 16 Stunden (vgl. Abb 5), Bsep wird auf Werte um 50 % herunterreguliert, während Mdr1 (Pgp) bei der Endotoxin- induzierten Cholestase unverändert bleibt oder beim Gallengangsverschluss sogar heraufreguliert wird (197). Diese Befunde zeigen, dass neben der bekannten Regulation der Transporter auf Transkriptionsebene bei der Endotoxin- induzierten Cholestase posttranskriptionelle Mechanismen eine entscheidende Rolle bei der Adaptation der Mrp2- und Bsep- Mengen spielen und dass die Transporter offensichtlich verschieden stark reguliert werden. Aufgrund der eigenen Daten (101)/(#2) wird davon ausgegangen, dass es neben dem vesikulären Ausbau der Transporter zu einer Induktion des proteolytischen Abbaus von Transportproteinen kommt. Gleiche Überlegungen wurden für die Regulation des sinusoidal lokalisierten Ntcp angestellt, bei dem Endotoxin eine fast vollständige Herabregulation der mRNA innerhalb weniger Stunden bewirkt und die Proteinmenge trotz einer langen Halbwertszeit des Ntcp ebenso rasch vermindert wird (96).

Die Bedeutung der apikalen (kanalikulären) Endozytose in Leberzellen wurde für andere kanalikuläre Transmembranproteine weiter untersucht (198;199). In polarisierten WIF-B Hybridoma-Zellen zeigte sich, dass indirekt an die kanalikuläre Membran beförderte Proteine (d.h. über Transzytose) von der basolateralen Membran über das sogenannte subapikale Kompartiment (SAC) zum Kanalikulus und von dort in einem Phosphoinositid-3 (PI-3) Kinase- abhängigen Schritt in einen lysosomalen Abbauweg gelangen. Die im apikalen Endozytose- Weg befindlichen Proteine zeigten keine Überschneidung mit den im SAC lokalisierten Proteinen. Daraus wurde abgeleitet, dass eine strikte Trennung der zu- und abführenden Wege zur und von der kanalikulären Membran existiert, obwohl bei der basolateralen

---

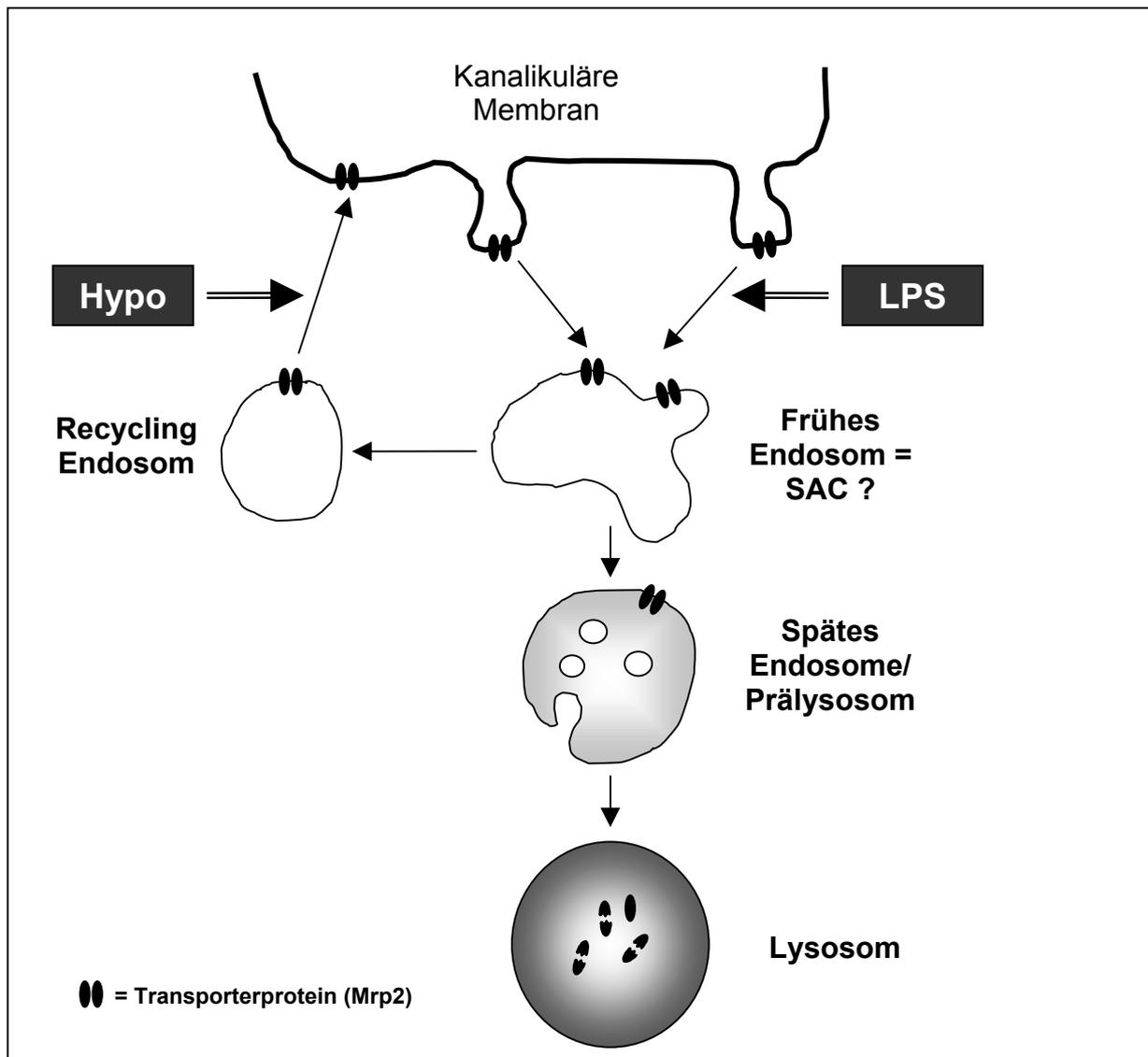
Endozytose (die den ersten Schritt der Transzytose darstellt) als auch bei der apikalen Endozytose das *early endosomal antigen 1* (EEA1) den Mediator der PI-3 Kinase- Aktivität darstellt (199). Dieses Konzept wurde jedoch aufgrund von *in vivo* Experimenten in Frage gestellt (200). Bereits nach 5-minütiger retrograder Infusion von Endozytose- Markern (z.B. *horseradish peroxidase*) kolokalisierten diese mit SAC- Markern (wie z.B. rab11 oder endolyn 78 (201)), was darauf hindeutet, dass der transzytotische und der apikal-endozytotische Weg sich möglicherweise im SAC überschneiden (200).

Unsere Befunde legen diesbezüglich nahe, dass Transporter aus dem apikal-endozytotischen Weg im Sinne einer reversiblen Endozytose noch zurück in die kanalikuläre Membran gelangen können (101;168)/(#1,#2). Diese Reversibilität des Transporterausbaus war sowohl bei Hyperosmolaritäts- als auch bei der Endotoxin-induzierten Cholestase nur für einen begrenzten Zeitraum nach Stimulusbeginn zu beobachten. Daraus ergibt sich die interessante Hypothese, dass die endozytierten, kanalikulären Proteine vom subkanalikulären Frühen Endosom (*early endosome*) entweder in das Recycling Endosom oder aber über das Späte Endosom (*late endosome*) in den lysosomalen Abbauweg gelangen (Abb. 8). Wahrscheinlich ist das Frühe Endosom/ SAC die Sortierstation, an der je nach eingehenden Signalen (z.B. durch die Protein Kinase A oder C (202)) das Schicksal der Proteine bestimmt wird.

Die Zeit, die benötigt wird, um ein endozytiertes Protein in den lysosomalen Abbauweg einzuschleusen, beträgt wahrscheinlich nur 10 bis 15 Minuten (200). Dieser Zeitraum korreliert gut mit der Zeit, in der die Hyperosmolaritäts- induzierte Cholestase (bei einer Osmolarität von 405 mosmol/l im Vergleich zur physiologischen Osmolarität von 305 mosmol/l) noch reversibel ist. Wurden Rattenlebern länger als 30 Minuten hyperosmolar perfundiert, kam es zu einer irreversiblen Abnahme der Taurocholatsekretion (169)/(#5).

Der endozytotische Ausbau von ABC-Transportern aus der kanalikulären Membran stellt möglicherweise nicht nur einen Kurzzeit- Regulationsmechanismus dar. In Lebern von Patienten mit einer primär biliären Zirrhose (PBC) im Stadium III wurde eine vermehrte intrazelluläre Akkumulation von MRP2 beobachtet (106), als Zeichen eines verschobenen Gleichgewichtes zwischen kanalikulärem und intrazellulärem MRP2. Ob hierbei ein vermehrter Ausbau von MRP2 aus der kanalikulären Membran oder aber ein primär verminderter Einbau die Ursache für die intrazelluläre Akkumulation darstellt, ist nicht geklärt. Bei der PBC nimmt jedoch der Anteil der

cholestatisch wirkenden Chenodeoxycholsäure (CDCA) gegenüber der Cholsäure zu (203). Für CDCA konnte ein direkter hemmender Effekt auf die Mikrotubulus-assoziierte ATPase Kinesin gezeigt werden (204), welche unter anderem beim *Sorting* von Membranproteinen im endozytotischen Weg (siehe Abb. 8) involviert ist (205).



**Abbildung 8: Hypothetisches Modell der LPS- induzierten MRP2-Regulation**

Bei der Endotoxin (LPS)- vermittelten Cholestase kommt es innerhalb kurzer Zeit zum Abbau von Transportproteinen aus der kanalikulären Membran. Durch hypotone Zellschwellung (Hypo) kann diesem Abbau entgegengewirkt werden. Zu späteren Zeitpunkten ist keine Reversibilität mehr nachweisbar, die Proteine werden (wahrscheinlich lysosomal) abgebaut. Möglicherweise stellt das Frühe Endosom eine wichtige Schaltstelle für die Sortierung in den Recycling- oder Abbau- Weg dar.

### 5.3 Physiologische Bedeutung des Transporterein- und -ausbaus für die hepatobiliäre Sekretion

Warum muss in der Leber die Gallesekretion schnell reguliert werden? Bezüglich der Niere ist hinlänglich bekannt, dass die renale Flüssigkeitsausscheidung einer fein

---

abgestimmten und rasch eingreifenden Regulation unterliegt, so dass diese zwischen wenigen Millilitern und mehreren Litern pro Tag (je nach Flüssigkeitszufuhr und -verlust) variiert werden kann. Die Ausscheidungsfunktion der Leber und Niere sind komplementär, d.h. während über die Niere vorwiegend wasserlösliche Substanzen ausgeschieden werden, werden durch die Leber Albumin- gebundene, amphiphile Moleküle und Konjugate ausgeschieden. Die schnelle Regulierbarkeit der Gallebildung zeigt, dass es sich bei der Gallesekretion nicht um einen einfachen, mit immer gleicher Kapazität ablaufenden Prozess handelt. Vielmehr weist die rasche Regulierbarkeit der hepatischen Sekretion auf die Notwendigkeit hin, dass auch die Transportvorgänge in der Leber bei Änderungen der Umgebungsbedingungen entsprechend schnell angepasst werden müssen. Die Stellgrößen der hepatischen Sekretion sind in erster Linie nicht wie bei der Niere die Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase, sondern die Bilirubin-, Gallensalz-, Cholesterin- und Glutathion- Homöostase. Der rasche Ein- und Ausbau ist für eine rasche Adaptation von Transportkapazitäten (und damit für den Erhalt von Gleichgewichten) von Bedeutung, da sich damit Zellen bzw. Organe adäquat an Veränderungen der Umgebung anpassen können. Gerade bei der Leber, die aufgrund ihrer anatomischen Lage stark veränderbarer Umgebungsbedingungen ausgesetzt ist, ist eine derartige Anpassungsmöglichkeit wichtig.

Die Bilirubin- Homöostase ist von Bedeutung, da Bilirubin in physiologischen, d.h. mikromolaren Konzentrationen als Antioxidanz wirkt (206-208). Daher ist verständlich, dass unter Bedingungen des oxidativen Stresses die biliäre Ausscheidung von Antioxidanzen reduziert wird. Dabei spielt nicht nur die Ausscheidung von konjugiertem Bilirubin durch MRP2, sondern auch die Ausscheidung von Glutathion- Konjugaten in die Galle (ebenfalls durch MRP2 mediiert) eine Rolle (147). In den in dieser Arbeit untersuchten Cholestase- Modellen (Cholestase durch Zellschrumpfung, Cholestase durch oxidativen Stress, Sepsis-assoziierte Cholestase) spielt das antioxidative Potential eine wichtige Rolle. So induziert hypertone Zellschrumpfung selbst oxidativen Stress (209). Ebenso ist die Sepsis mit erhöhtem oxidativen Stress verbunden (210;211), dem auch die Leber ausgesetzt ist (212).

Von herausragender Bedeutung ist die Gallensalzhomöostase. Einerseits werden ausreichend hohe Gallensalzkonzentrationen für die Solubilisierung von Cholesterin in der Galle und für die Aufnahme von Lipiden aus dem Darm benötigt, andererseits

---

haben zu hohe Gallensalzkonzentrationen aufgrund ihrer Eigenschaften als Detergenzien ungünstige Effekte z.B. auf biologische Membranen .

#### **5.4 Weitere posttranskriptionelle Regulationsmechanismen hepatobiliärer Sekretion**

Es finden sich zunehmend Hinweise in Tiermodellen und auch beim Menschen, dass noch andere posttranskriptionelle Mechanismen bei der Regulation hepatobiliärer Transporter wichtige Rollen spielen, wobei diese im einzelnen noch nicht vollständig charakterisiert sind.

Bei der Gallengangsligatur der Ratte kommt es beispielsweise zu einer Abnahme der Ntcp- mRNA um 60%, während die Proteinmenge um 90% abnimmt (213). Somit scheinen sich transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen bei der Herunterregulation des Ntcp zu addieren. Bei der Endotoxin- induzierten Cholestase kann durch Induktion einer *heat shock response* (Erwärmung auf 42°C) der LPS- induzierten Ntcp- Herunterregulation auf Protein- Ebene, nicht jedoch auf mRNA- Ebene entgegengewirkt werden (214). Auch bei Mdr2- *Knockout*- Mäusen, die erhöhte Plasmaspiegel für Gallensalze haben, wird eine Dissoziation zwischen mRNA- und Proteinmenge des Ntcp gefunden: Während die mRNA- Spiegel bei der Mdr2-/- Mäusen konstant sind, sind die Ntcp- Protein- Mengen um das 4 bis 6-fache vermindert (215), was ebenfalls auf einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus zurückgeführt wird. Dieser Befund ist insofern bemerkenswert, als dass diese posttranskriptionelle Regulation des Ntcp nicht transient ist, sondern einen Gleichgewichtszustand bei den *Knockout*- Tieren darstellt.

In humanen Lebern zeigt sich, dass es große interindividuelle Unterschiede zwischen dem Verhältnis der mRNA- und Protein- Expression verschiedener Transporter gibt (z.B. Mrp2) und dass unter cholestatischen Bedingungen Transportproteine deutlich herunterreguliert sind, während die entsprechende mRNA- Menge unverändert ist (104). Ebenso deutet eine hohe interindividuelle Variabilität der Ntcp- mRNA- Expression bei gesunden Menschen darauf hin, dass posttranskriptionelle Mechanismen die Aktivität von Transportern entscheidend bestimmen (216). Hierbei könnten die kürzlich identifizierten NTCP- Polymorphismen eine Rolle spielen (217). Einer der vier identifizierten Polymorphismen führt aufgrund eines

---

Nucleotidaustausches von Thymidin in Cytosin zu einem Aminosäureaustausch von Isoleuzin in Threonin an Position 279 innerhalb der 6. transmembranären Domäne. Dieser Aminosäureaustausch ist mit einem signifikant verminderten *Targeting* des Proteins an die sinusoidale Membran verbunden. Es ist denkbar, dass dieser *Targeting*- Defekt durch eine verstärkte mRNA- Expression kompensiert wird.

Umgekehrt zeigen eigene Messungen der mRNAs verschiedener hepatobiliärer Transporter in cholestatischen Lebern eine vergleichsweise geringe Varianz bei ausgeprägten Unterschieden der immunreaktiven Proteinmengen in entsprechenden Leberschnitten (R. Kubitz, V. Keitel, M. Burdelski und D. Häussinger, unveröffentlichte Daten, 2004). In Lebern von Kindern, die einen Defekt des BSEP bzw. MDR3 verbunden mit dem Phänotyp einer progressiven familiären intrahepatischen Cholestase Typ 2 bzw. 3 (PFIC2/3) haben, sind trotz fehlender Proteinexpression die mRNAs der mutierten Transporter im Vergleich zu Kontrollen nicht signifikant verändert. Diese Beobachtung spricht nicht nur für die Bedeutung posttranskriptioneller Mechanismen, sondern deutet auch auf fehlende *feedback*-Regulation der entsprechenden Transporter hin, d.h. trotz Ausfalls der Proteinfunktion kommt es bei den untersuchten Transportern nicht zu einer gegenregulatorischen Zunahme der (mutierten) mRNA. Die Regulation der funktionellen Transportermenge scheint somit weniger auf mRNA- Ebene stattzufinden, sondern muss sich auf anderer Ebene abspielen: In Übereinstimmung mit dieser Annahme finden sich Transportproteine zu einem erheblichen Anteil in intrazellulären Kompartimenten. Beispielsweise konnten wir elektronenmikroskopisch nachweisen, dass sich Mrp2 in der Rattenleber unter Kontroll-Bedingungen zu etwa 50% in intrazellulären Vesikeln befindet (169)/(#5). In gleicher Weise wurde auch Bsep zu gut 60% unter Kontroll-Bedingungen intrazellulär gefunden (218). In anderen Untersuchungen war der Anteil des intrazellulär lokalisierten Bsep sogar sechs mal höher als der in der kanalikulären Membran lokalisierte (181). Die Tatsache, dass sich die kanalikulären Transporter zu einem erheblichen Teil in intrazellulären Kompartimenten befinden (169;181)/(#5), unterstreicht die Bedeutung dieser Kompartimente für die raschen Rekrutierbarkeit der Transportproteine.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit liefert eine Reihe neuer Erkenntnisse zur Regulation hepatobiliärer Transportproteine, die bedeutsam sind für die physiologische Funktion der Leber, aber auch bei krankhaften Zuständen wie der Cholestase zum Tragen kommen.

Es wurde gezeigt, dass die Funktion verschiedener an der Gallebildung beteiligter Transportproteine durch ihre Lokalisation reguliert wird. Transportproteine können aus der kanalikulären Membran in ein vesikuläres Kompartiment wechseln, von dort aus gelangen sie entweder in einen Degradationsweg oder können unter bestimmten Bedingungen an die kanalikuläre Membran zurückkehren. Bei diesen Prozessen sind verschiedene Signalwege eingeschaltet: Die p38<sup>MAP</sup>-Kinase, ein Mitglied der Stresskinasen, führt nach Aktivierung zu einer Vermehrung der Transportproteine in der kanalikulären Membran und damit zu einer verstärkten Gallebildung. Dabei werden Transportproteine sowohl aus schnell rekrutierbaren Kompartimenten als auch einem "langsamen" Kompartiment mobilisiert. Einen gegenteiligen Effekt haben Ca<sup>2+</sup>-abhängige Protein Kinase C- Isoformen. Diese bewirken eine Umverteilung von Transportproteinen aus der kanalikulären Membran in Vesikel und zur basolateralen Membran und führen dadurch zu einer Verminderung der Gallebildung.

Bezüglich der Anwendung von Therapeutika konnte nachgewiesen werden, dass Tauroursodeoxycholat, ein bei cholestatischen Zuständen häufig eingesetztes Medikament, seine choleretischen Effekte über Aktivierung der p38<sup>MAP</sup>-Kinase und nicht über Ca<sup>2+</sup>-abhängige Protein Kinase C- Isoformen ausübt. Dadurch konnte eine bisher strittiger Wirkmechanismus geklärt werden. Ferner wurde gezeigt, dass auch Glukokortikoide einen günstigen Einfluss auf Transportfunktionen der Leber haben. Hierbei spielen zum Teil direkte Effekte auf die Expression von Transportproteinen eine Rolle.

Insgesamt haben die Untersuchungen zu dem Bild geführt, dass die Funktion hepatobiliärer Transportproteine in entscheidender Weise posttranskriptionell reguliert wird, was in jüngster Zeit durch die bisher erst wenigen zur Verfügung stehenden Studien bei Menschen belegt werden konnte.

---

## 7. Eigene Publikationen

### Originalarbeiten:

1. Kunzelmann K, Grolik M, Kubitz R, Greger R. cAMP-dependent activation of small-conductance Cl<sup>-</sup> channels in HT<sub>29</sub> colon carcinom cells. *Pflügers Arch* 1992; 421:230-237.
2. Kunzelmann K, Kubitz R, Grolik M, Warth R, Greger R. Small-conductance Cl<sup>-</sup> channels in HT<sub>29</sub> cells: activation by Ca<sup>2+</sup>, hypotonic cell swelling and 8-Br-cGMP. *Pflügers Arch* 1992; 421:238-246.
3. Kubitz R, Warth R, Allert N, Kunzelmann K, Greger R. Small-conductance chloride channels induced by cAMP, Ca<sup>2+</sup> and hypotonicity in HT<sub>29</sub> cells: ion selectivity, additivity and stilbene sensitivity. *Pflügers Arch* 1992; 421:447-454.
4. Hansen CP, Roch B, Kunzelmann K, Kubitz R, Greger R. Small and intermediate chloride channels in HT<sub>29</sub> cells. *Pflügers Archiv* 1993; 424:456-464.
5. Kunzelmann K, Allert N, Kubitz R, Breuer WV, Cabantchik ZI, Normann C, Schumann S, Leipziger J, Greger R. Forskolin and PMA pretreatment of HT<sub>29</sub> cells alters their chloride conductance induced by cAMP, Ca<sup>2+</sup> and hypotonic cell swelling. *Pflügers Arch* 1994; 428:76-83.
6. Sinning R, Schliess F, Kubitz R, Häussinger D. Osmosignalling in C6 glioma cells. *FEBS Letters* 1997; 400:163-167.
7. Kubitz R, Schreiber R, vom Dahl S, Häussinger D. Ethanol Induced Vesicular Alkalinization in Rat Hepatocytes. *Cell Physiol Biochem* 1997; 7:289-297.
8. Kubitz R, D'Urso D, Keppler D, Häussinger D. Osmodependent Dynamic Localization of the Multidrug Resistance Protein 2 in the Rat Hepatocyte Canalicular Membrane. *Gastroenterology* 1997; 113:1438-1442.
9. Häussinger D, Kubitz R, vom Dahl S, Warskulat U, Kurz K, Schliess F, Keppler D, Bode J, Peters-Regehr T, Wettstein M. Osmoregulated Substrate Transport in Liver. *Nova Acta Leopoldina* 1998; 78:235-242.
10. Reinehr RM, Kubitz R, Peters-Regehr T, Bode J, Häussinger D. Activation of Rat Hepatic Stellate Cells in Culture is Associated with Increased Sensitivity to Endothelin-1. *Hepatology* 1998; 28:1566-1577.

11. Peters-Regehr T, Bode J, Kubitz R, Häussinger D. Organic osmolyte transport in quiescent and activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29:173-180.
12. vom Dahl S, Bode J, Reinehr RM, Mönninghoff I, Kubitz R, Häussinger D. Release of osmolytes from perfused rat liver upon perivascular nerve stimulation: alpha-adrenergic control of osmolyte efflux from parenchymal and non-parenchymal cells. *Hepatology* 1999; 29:195-204.
13. Kubitz R, Wettstein M, Warskulat U, Häussinger D. Regulation of the Multidrug Resistance Protein 2 in the Rat Liver by Lipopolysaccharide and Dexamethasone. *Gastroenterology* 1999; 116:401-410.
14. Kubitz R, Warskulat U, Schmitt M and Häussinger D. Dexamethasone- and osmolarity-dependent expression of the Multidrug Resistance Protein 2 in cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 1999; 340:585-591.
15. Müschen M, Warskulat U, Peters-Regehr T, Bode J, Kubitz R, Häussinger R. Involvement of CD95 (Apo-1/Fas) Ligand Expressed by Rat Kupffer Cells in Hepatic Immunoregulation. *Gastroenterology* 1999; 116:666-677.
16. Warskulat U, Kubitz R, Wettstein M, Stieger B, Meier PJ, Häussinger D. Regulation of the Bile Salt Export Pump mRNA levels by Dexamethasone and Osmolarity in Cultured Rat Hepatocytes. *Biological Chemistry* 1999; 380:1273-1279.
17. Kullak-Ublick G, Ismail M, Kubitz R, Häussinger D, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Paumgartner G. Stable expression and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-Taurocholate cotransporting green fluorescent protein in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Cytotechnology* 2000, 34:1-9.
18. Bode JG, Peters-Regehr T, Kubitz R, Häussinger D. Expression of glutamine synthase in liver macrophages (Kupffer cells). *J Histochem Cytochem* 2000; 48:415-422.
19. Wettstein M, Peters-Regehr T, Kubitz R, Fischer R, Holneicher C, Mönninghoff I, Häussinger D. Release of osmolytes induced by phagocytosis and hormones in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278:G227-G233.
20. Dombrowski F, Kubitz R, Chittattu A, Wettstein M, Saha N, Häussinger D. Electronmicroscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochem J* 2000; 348,183–188.

21. Schmitt M, Kubitz R, Wettstein M, vom Dahl S, Häussinger D. Retrieval of the mrp2 Gene encoded Conjugate Export Pump from the Canalicular Membrane Contributes to Cholestasis Induced by tert-Butyl Hydroperoxide and Chloro-Dinitrobenzene. *Biol Chem* 2000; 381:487-495.
22. Häussinger D, Schmitt M, Weihergräber O, Kubitz R. Short-term regulation of bile-secretion. *Sem Liv Dis* 2000; 20:307-321.
23. Schmitt M, Kubitz R, Lizun S, Wettstein M, Häussinger D. Regulation of the Dynamic Localization of the Rat Bsep Gene Encoded Bile Salt Export Pump by Anisoosmolarity. *Hepatology* 2001, 33:509-518.
24. Bidmon HJ, Emde B, Oermann E, Kubitz R, Witte OW, Zilles K. Heme oxygenase-1 (HSP-32) and heme oxygenase-2 induction in neurons and glial cells of cerebral regions and its relation to iron accumulation after focal cortical photothrombosis. *Exp Neurol* 2001; 168:1-22.
25. Kubitz R, Huth C, Schmitt M, Horbach A, Kullak-Ublick D, Häussinger D. Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology* 2001; 34:340-350.
26. Mühlfeld A, Kubitz R, Dransfeld O, Häussinger D, Wettstein M. Taurine supplementation induces Mrp2 and Bsep expression in rats and prevents endotoxin-induced cholestasis. *Arch Biochem Biophys* 2003; 413:32-40.
27. Kubitz R, Sütfels G, Kühlkamp T, Kölling R, Häussinger D. Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP Kinase. *Gastroenterology* 2004; 126:541-553.
28. Kubitz R, Saha N, Kühlkamp T, Dutta S, vom Dahl S, Wettstein M, Häussinger D. Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C-isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol Chem* 2004; 279:10323-10330.
29. Häussinger D, Kubitz R, Reinehr RM, Bode JG, Schliess F. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical Hepatology. *JMAM* 2004, im Druck

#### Buchbeiträge:

1. Schliess F, Heinrich S, Kubitz R, vom Dahl S, Kurz AK, Rosnowsky S, Häussinger D. Osmosignalling in the liver. In: Signalling in the Liver. Häussinger D, Heinrich PC (eds.), Kluwer Academic Publishers 1997:129-151.

- 
2. Kubitz R, Reinehr RM, Peters-Regehr T, Bode J, Häussinger D. The ET<sub>A</sub> receptor pathway is upregulated in activated hepatic stellate cells. In: Cells of the hepatic sinusoid, Wisse E, Knook DL, de Zanger R, Fraser R (eds.), The Kupffer Cell Foundation, 1998, 7-10.
  3. Häussinger D, Kubitz R, Schliess F, Wettstein M, Warskulat U, Kurz AK, Saha N, vom Dahl S. Regulation of Canalicular Conjugate Export Pump by Osmolarity, Endotoxin and Glucocorticoids in Rat Liver. In: Bile Acids and Cholestasis. Paumgartner G, Stiehl A, Gerok W, Keppler D, Leuschner U (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 1999:137-141.
  4. Häussinger D, Kubitz R, Graf D, Kurz AK, Fischer R, Schmitt M. Osmoregulation of canalicular transport. In: Hepatobiliary Transport: From Bench to Bedside. Matern S et al. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 2001: 60-67.
  5. Häussinger D, Graf D, Reinehr RM, Kurz AK, Saha N, Wettstein M, Schliess F, vom Dahl S, Kubitz R. Short term regulation of bile secretion. In: Bile acids: From Genomics to Disease and Therapy. Paumgartner G, Keppler D, Leuschner U, Stiehl A (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 2002:133-137.

---

## 8. Literaturverzeichnis

1. Marinelli RA, Tietz PS, Caride AJ, Huang BQ, LaRusso NF. Water transporting properties of hepatocyte basolateral and canalicular plasma membrane domains. *J Biol Chem* 2003; 278(44):43157-43162.
2. Ballatori N, Truong AT. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am J Physiol* 1992; 263(5 Pt 1):G617-G624.
3. Ballatori N, Truong AT. Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am J Physiol* 1989; 256(1 Pt 1):G22-G30.
4. Alvaro D, Mennone A, Boyer JL. Role of kinases and phosphatases in the regulation of fluid secretion and Cl-/HCO<sub>3</sub>- exchange in cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997; 273(2 Pt 1):G303-G313.
5. Schlenker T, Romac JM, Sharara AI, Roman RM, Kim SJ, LaRusso N et al. Regulation of biliary secretion through apical purinergic receptors in cultured rat cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997; 273(5 Pt 1):G1108-G1117.
6. Cho WK, Boyer JL. Vasoactive intestinal polypeptide is a potent regulator of bile secretion from rat cholangiocytes. *Gastroenterology* 1999; 117(2):420-428.
7. Roberts SK, Ludwig J, LaRusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology* 1997; 112(1):269-279.
8. Schramm U, Dietrich A, Schneider S, Buscher HP, Gerok W, Kurz G. Fluorescent derivatives of bile salts. II. Suitability of NBD-amino derivatives of bile salts for the study of biological transport. *J Lipid Res* 1991; 32(11):1769-1779.
9. Oude Elferink RP, Ottenhoff R, van Marle J, Frijters CM, Smith AJ, Groen AK. Class III P-glycoproteins mediate the formation of lipoprotein X in the mouse. *J Clin Invest* 1998; 102(9):1749-1757.
10. Redinger RN. The role of the enterohepatic circulation of bile salts and nuclear hormone receptors in the regulation of cholesterol homeostasis: Bile salts as ligands for nuclear hormone receptors. *Can J Gastroenterol* 2003; 17(4):265-271.
11. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L et al. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993; 75(3):451-462.
12. Malchow-Moller A, Thomsen C, Hilden J, Matzen P, Mindehom L, Juhl E. Survival after jaundice: a prospective study of 1000 consecutive cases. *Scand J Gastroenterol* 1985; 20(2):155-162.
13. Malchow-Moller A, Matzen P, Bjerregaard B, Hilden J, Holst-Christensen J, Staehr JT et al. Causes and characteristics of 500 consecutive cases of jaundice. *Scand J Gastroenterol* 1981; 16(1):1-6.
14. Whitehead MW, Hainsworth I, Kingham JG. The causes of obvious jaundice in South West Wales: perceptions versus reality. *Gut* 2001; 48(3):409-413.
15. Trauner M, Fickert P, Stauber RE. Inflammation-induced cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14(10):946-959.
16. te Boekhorst T, Urlus M, Doesburg W, Yap SH, Goris RJ. Etiologic factors of jaundice in severely ill patients. A retrospective study in patients admitted to an intensive care unit with severe trauma or with septic intra-abdominal complications following surgery and without evidence of bile duct obstruction. *J Hepatol* 1988; 7(1):111-117.

17. Farrel GC. Drug-induced Liver Disease. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.
18. Zimmermann HJ, Maddrey WC. Toxic and drug-induced hepatitis. In: Schiff L, Schiff ER, editors. Schiff's Diseases of the Liver. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher, 1993: 707-783.
19. Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Kim SK, Gerloff T, Kullak-Ublick GA et al. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology* 2003; 38(2):345-354.
20. Reyes H. Review: intrahepatic cholestasis. A puzzling disorder of pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12(3):211-216.
21. Dixon PH, Weerasekera N, Linton KJ, Donaldson O, Chambers J, Egginton E et al. Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking. *Hum Mol Genet* 2000; 9(8):1209-1217.
22. Angelico M, Della GP. Review article: hepatobiliary complications associated with total parenteral nutrition. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14 Suppl 2:54-57.
23. Quigley EM, Marsh MN, Shaffer JL, Markin RS. Hepatobiliary complications of total parenteral nutrition. *Gastroenterology* 1993; 104(1):286-301.
24. Sandhu IS, Jarvis C, Everson GT. Total parenteral nutrition and cholestasis. *Clin Liver Dis* 1999; 3(3):489-508, viii.
25. Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Hoehli M, Schröder A, Meier PJ. In situ localisation of the hepatocytic Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 1994; 107:1781-1787.
26. Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lubbert H, Meier PJ. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(23):10629-10633.
27. Hagenbuch B, Meier PJ. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 1994; 93(3):1326-1331.
28. Kouzuki H, Suzuki H, Ito K, Ohashi R, Sugiyama Y. Contribution of sodium taurocholate cotransporting polypeptide to the uptake of its possible substrates into rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286(2):1043-1050.
29. Kouzuki H, Suzuki H, Stieger B, Meier PJ, Sugiyama Y. Characterization of the transport properties of organic anion transporting polypeptide 1 (oatp1) and Na(+)/taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp): comparative studies on the inhibitory effect of their possible substrates in hepatocytes and cDNA-transfected COS-7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292(2):505-511.
30. Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CD, Hofmann AF et al. Substrate specificity of the rat liver Na(+)-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *Am J Physiol* 1998; 274(2 Pt 1):G370-G375.
31. Meier PJ. Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am J Physiol* 1995; 269(6 Pt 1):G801-G812.
32. Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Schteingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW et al. Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 1995; 109(4):1274-1282.
33. Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 2002; 64:635-661.

34. Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1609(1):1-18.
35. Shi X, Bai S, Ford AC, Burk RD, Jacquemin E, Hagenbuch B et al. Stable inducible expression of a functional rat liver organic anion transport protein in HeLa cells. *J Biol Chem* 1995; 270(43):25591-25595.
36. Satlin LM, Amin V, Wolkoff AW. Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange. *J Biol Chem* 1997; 272(42):26340-26345.
37. Li L, Lee TK, Meier PJ, Ballatori N. Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C<sub>4</sub> as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* 1998; 273(26):16184-16191.
38. Cui Y, König J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 2001; 276(13):9626-9630.
39. Kiuchi Y, Suzuki H, Hirohashi T, Tyson CA, Sugiyama Y. cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett* 1998; 433(1-2):149-152.
40. Uchiumi T, Hinoshita E, Haga S, Nakamura T, Tanaka T, Toh S et al. Isolation of a novel human canalicular multispecific organic anion transporter, cMOAT2/MRP3, and its expression in cisplatin-resistant cancer cells with decreased ATP-dependent drug transport. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252(1):103-110.
41. Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 2003; 38(2):374-384.
42. Kool M, van der LM, de Haas M, Baas F, Borst P. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59(1):175-182.
43. Donner MG, Keppler D. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* 2001; 34(2):351-359.
44. Ogawa K, Suzuki H, Hirohashi T, Ishikawa T, Meier PJ, Hirose K et al. Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278(3):G438-G446.
45. Wagner M, Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Silbert D, Tsybrovskyy O et al. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology* 2003; 125(3):825-838.
46. Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T et al. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 1996; 271(25):15091-15098.
47. Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y. Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol* 1997; 272(1 Pt 1):G16-G22.
48. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J et al. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 1998; 273(16):10046-10050.
49. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986; 47(3):381-389.

50. De Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(1):282-287.
51. Deleuze JF, Jacquemin E, Dubuisson C, Cresteil D, Dumont M, Erlinger S et al. Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 1996; 23(4):904-908.
52. Jacquemin E. Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease: one gene for three diseases. *Semin Liver Dis* 2001; 21(4):551-562.
53. Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 1997; 26(6):1667-1677.
54. Kuipers F, Enserink M, Havinga R, van der Steen AB, Hardonk MJ, Fevery J et al. Separate transport systems for biliary secretion of sulfated and unsulfated bile acids in the rat. *J Clin Invest* 1988; 81(5):1593-1599.
55. Akita H, Suzuki H, Sugiyama Y. Sinusoidal efflux of taurocholate correlates with the hepatic expression level of Mrp3. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299(5):681-687.
56. Koopen NR, Müller M, Vonk RJ, Zimniak P, Kuipers F. Molecular mechanisms of cholestasis: causes and consequences of impaired bile formation. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1408(1):1-17.
57. Häussinger D, Schmitt M, Weiergräber O, Kubitz R. Short-term regulation of canalicular transport. *Semin Liver Dis* 2000; 20(3):307-321.
58. Crawford JM. Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion. *Semin Liver Dis* 1996; 16(2):169-189.
59. Stolz A, Takikawa H, Sugiyama Y, Kuhlenkamp J, Kaplowitz N. 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity of the Y' bile acid binders in rat liver cytosol. Identification, kinetics, and physiologic significance. *J Clin Invest* 1987; 79(2):427-434.
60. Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 1999; 103(1):137-145.
61. Faubion WA, Gores GJ. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* 1999; 29(1):1-4.
62. Keppler D, König J. Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances. *Semin Liver Dis* 2000; 20(3):265-272.
63. Keitel V, Nies AT, Brom M, Hummel-Eisenbeiss J, Spring H, Keppler D. A common Dubin-Johnson syndrome mutation impairs protein maturation and transport activity of MRP2 (ABCC2). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 284((1)):G165-G174.
64. Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 1996; 23(5):1061-1066.
65. Noe J, Stieger B, Meier PJ. Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 2002; 123(5):1659-1666.
66. Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 2002; 123(5):1649-1658.

- 
67. Paumgartner G. Serum bile acids. Physiological determinants and results in liver disease. *J Hepatol* 1986; 2(2):291-298.
  68. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H et al. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1998; 20(3):233-238.
  69. Jansen PL, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Hooiveld GJ et al. Hepatocanicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1999; 117(6):1370-1379.
  70. 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(7):965-972.
  71. Greim H, Trulzsch D, Czygan P, Rudick J, Hutterer F, Schaffner F et al. Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. *Gastroenterology* 1972; 63(5):846-850.
  72. Fischer S, Beuers U, Spengler U, Zwiebel FM, Koebe HG. Hepatic levels of bile acids in end-stage chronic cholestatic liver disease. *Clin Chim Acta* 1996; 251(2):173-186.
  73. Chiang JY. Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284(3):G349-G356.
  74. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999; 284(5418):1365-1368.
  75. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999; 284(5418):1362-1365.
  76. Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 2001; 276(31):28857-28865.
  77. Plass JR, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PL et al. Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* 2002; 35(3):589-596.
  78. Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ et al. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 2001; 121(1):140-147.
  79. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 2000; 6(3):517-526.
  80. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 2000; 6(3):507-515.
  81. Urizar NL, Dowhan DH, Moore DD. The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J Biol Chem* 2000; 275(50):39313-39317.
  82. Niesor EJ, Flach J, Lopes-Antoni I, Perez A, Bentzen CL. The nuclear receptors FXR and LXRA: potential targets for the development of drugs affecting lipid metabolism and neoplastic diseases. *Curr Pharm Des* 2001; 7(4):231-259.
  83. Russell DW. Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism. *Cell* 1999; 97(5):539-542.

84. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002; 277(21):18793-18800.
85. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A 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(6):3369-3374.
86. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 2002; 296(5571):1313-1316.
87. Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *J Hepatol* 2001; 35(1):134-146.
88. Higuchi H, Gores GJ. Bile acid regulation of hepatic physiology: IV. Bile acids and death receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284(5):G734-G738.
89. Drivas G, James O, Wardle N. Study of reticuloendothelial phagocytic capacity in patients with cholestasis. *Br Med J* 1976; 1(6025):1568-1569.
90. Keane RM, Gadacz TR, Munster AM, Birmingham W, Winchurch RA. Impairment of human lymphocyte function by bile salts. *Surgery* 1984; 95(4):439-443.
91. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 2003; 278(11):9435-9440.
92. Podevin P, Rosmorduc O, Conti F, Calmus Y, Meier PJ, Poupon R. Bile acids modulate the interferon signalling pathway. *Hepatology* 1999; 29(6):1840-1847.
93. Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppel TA, Schlosser SF et al. The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 1997; 113(1):255-264.
94. Paulusma CC, Kothe MJ, Bakker CT, Bosma PJ, van B, I, van Marle J et al. Zonal down-regulation and redistribution of the multidrug resistance protein 2 during bile duct ligation in rat liver. *Hepatology* 2000; 31(3):684-693.
95. Gerloff T, Geier A, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Matern S et al. Differential expression of basolateral and canalicular organic anion transporters during regeneration of rat liver. *Gastroenterology* 1999; 117(6):1408-1415.
96. Green RM, Beier D, Gollan JL. Regulation of hepatocyte bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents. *Gastroenterology* 1996; 111(1):193-198.
97. Moseley RH, Wang W, Takeda H, Lown K, Shick L, Ananthanarayanan M et al. Effect of endotoxin on bile acid transport in rat liver: a potential model for sepsis-associated cholestasis. *Am J Physiol* 1996; 271(1 Pt 1):G137-G146.
98. Roelofsen H, Schoemaker B, Bakker C, Ottenhoff R, Jansen PL, Oude Elferink RP. Impaired hepatocanalicular organic anion transport in endotoxemic rats. *Am J Physiol* 1995; 269(3 Pt 1):G427-G434.
99. Roelofsen H, van der Veere CN, Ottenhoff R, Schoemaker B, Jansen PL, Oude Elferink RP. Decreased bilirubin transport in the perfused liver of endotoxemic rats. *Gastroenterology* 1994; 107(4):1075-1084.
100. Trauner M, Arrese M, Lee H, Boyer JL, Karpen SJ. Endotoxin downregulates rat hepatic ntcp gene expression via decreased activity of critical transcription factors. *J Clin Invest* 1998; 101(10):2092-2100.

101. Kubitz R, Wettstein M, Warskulat U, Häussinger D. Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 1999; 116(2):401-410.
102. Mühlfeld A, Kubitz R, Dransfeld O, Häussinger D, Wettstein M. Taurine supplementation induces Mrp2 and Bsep expression in rats and prevents endotoxin-induced cholestasis. *Arch Biochem Biophys* 2003; 413:32-40.
103. Ros JE, Libbrecht L, Geuken M, Jansen PL, Roskams TA. High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J Pathol* 2003; 200(5):553-560.
104. Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsbichler A, Stumptner C, Kenner L et al. Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* 2001; 33(3):633-646.
105. Zollner G, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Marschall HU, Zatloukal K et al. Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 38(6):717-727.
106. Kojima H, Nies AT, König J, Hagmann W, Spring H, Uemura M et al. Changes in the expression and localization of hepatocellular transporters and radixin in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 39(5):693-702.
107. Oswald M, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G, Beuers U. Expression of hepatic transporters OATP-C and MRP2 in primary sclerosing cholangitis. *Liver* 2001; 21(4):247-253.
108. Geier A, Dietrich CG, Lammert F, Orth T, Mayet WJ, Matern S et al. Regulation of organic anion transporters in a new rat model of acute and chronic cholangitis resembling human primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2002; 36(6):718-724.
109. Sheth S, Shea JC, Bishop MD, Chopra S, Regan MM, Malmberg E et al. Increased prevalence of CFTR mutations and variants and decreased chloride secretion in primary sclerosing cholangitis. *Hum Genet* 2003; 113(3):286-292.
110. Kubitz R, Warskulat U, Schmitt M, Häussinger D. Dexamethasone- and osmolarity-dependent expression of the multidrug-resistance protein 2 in cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 1999; 340 ( Pt 3):585-591.
111. Warskulat U, Kubitz R, Wettstein M, Stieger B, Meier PJ, Häussinger D. Regulation of bile salt export pump mRNA levels by dexamethasone and osmolarity in cultured rat hepatocytes. *Biol Chem* 1999; 380(11):1273-1279.
112. Courtois A, Payen L, Guillouzo A, Fardel O. Up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) expression in rat hepatocytes by dexamethasone. *FEBS Lett* 1999; 459(3):381-385.
113. Demeule M, Jodoin J, Beaulieu E, Brossard M, Beliveau R. Dexamethasone modulation of multidrug transporters in normal tissues. *FEBS Lett* 1999; 442(2-3):208-214.
114. Kauffmann HM, Keppler D, Gant TW, Schrenk D. Induction of hepatic mrp2 (cmrp/cmrat) gene expression in nonhuman primates treated with rifampicin or tamoxifen. *Arch Toxicol* 1998; 72(12):763-768.
115. Vernhet L, Seite MP, Allain N, Guillouzo A, Fardel O. Arsenic induces expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (mrp2) gene in primary rat and human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298(1):234-239.
116. Hallbrucker C, Lang F, Gerok W, Häussinger D. Cell swelling increases bile flow and taurocholate excretion into bile in isolated perfused rat liver. *Biochem J* 1992; 281 ( Pt 3):593-595.

117. Häussinger D, Hallbrucker C, Saha N, Lang F, Gerok W. Cell volume and bile acid excretion. *Biochem J* 1992; 288 ( Pt 2):681-689.
118. Häussinger D, Saha N, Hallbrucker C, Lang F, Gerok W. Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver. *Biochem J* 1993; 291 ( Pt 2):355-360.
119. Kullak-Ublick GA, Ismail M, Kubitz R, Häussinger D, Stieger B, Meier PJ et al. Stable expression and functional characterisation of a Na<sup>+</sup>-Taurocholate cotransporting green fluorescent protein in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Cytotechnology* 2000; 34:1-9.
120. Crocenzi FA, Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Pozzi EJ, Vore M et al. Estradiol-17beta-D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285(2):G449-G459.
121. Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Crocenzi F, Roma MG, Vore M. Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology* 2002; 35(6):1409-1419.
122. Kurz AK, Graf D, Schmitt M, vom Dahl S, Häussinger D. Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* 2001; 121(2):407-419.
123. Noé B, Schliess F, Wettstein M, Heinrich S, Häussinger D. Regulation of taurocholate excretion by a hypo-osmolarity-activated signal transduction pathway in rat liver. *Gastroenterology* 1996; 110(3):858-865.
124. Schliess F, Kurz AK, vom Dahl S, Häussinger D. Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Gastroenterology* 1997; 113(4):1306-1314.
125. Webster CR, Anwer MS. Role of the PI3K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 1):G1165-G1172.
126. Corasanti JG, Smith ND, Gordon ER, Boyer JL. Protein kinase C agonists inhibit bile secretion independently of effects on the microcirculation in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1989; 10(1):8-13.
127. Roelofsen H, Ottenhoff R, Oude Elferink RP, Jansen PL. Hepatocanalicular organic-anion transport is regulated by protein kinase C. *Biochem J* 1991; 278 ( Pt 3):637-641.
128. Kubitz R, Huth C, Schmitt M, Horbach A, Kullak-Ublick GA, Häussinger D. Protein kinase C-dependent distribution of the Multidrug Resistance Protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology* 2001; 34:340-350.
129. Mukhopadhyay S, Ananthanarayanan M, Stieger B, Meier PJ, Suchy FJ, Anwer MS. cAMP increases liver Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransport by translocating transporter to plasma membranes. *Am J Physiol* 1997; 273(4 Pt 1):G842-G848.
130. Milkiewicz P, Roma MG, Elias E, Coleman R. Hepatoprotection with tauroursodeoxycholate and beta muricholate against tauroolithocholate induced cholestasis: involvement of signal transduction pathways. *Gut* 2002; 51(1):113-119.
131. Nathanson MH, Gautam A, Ng OC, Bruck R, Boyer JL. Hormonal regulation of paracellular permeability in isolated rat hepatocyte couplets. *Am J Physiol* 1992; 262(6 Pt 1):G1079-G1086.
132. Rao YP, Stravitz RT, Vlahcevic ZR, Gurley EC, Sando JJ, Hylemon PB. Activation of protein kinase C alpha and delta by bile acids: correlation with bile acid structure and diacylglycerol formation. *J Lipid Res* 1997; 38(12):2446-2454.

133. Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G et al. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 2001; 33(5):1206-1216.
134. Beuers U, Probst I, Soroka C, Boyer JL, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G. Modulation of protein kinase C by tauroolithocholic acid in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1999; 29(2):477-482.
135. Beuers U, Throckmorton DC, Anderson MS, Isales CM, Thasler W, Kullak-Ublick GA et al. Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1996; 110(5):1553-1563.
136. Perletti GP. Partial purification of protein kinase C isoenzymes from rat liver. *J Biochem Biophys Methods* 1994; 28(3):195-204.
137. Croquet F, Brehier A, Gil S, Davy J, Feger J. Five isoenzymes of protein kinase C are expressed in normal and STZ-diabetic rat hepatocytes: effect of phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1315(3):163-168.
138. Milkiewicz P, Chilton AP, Hubscher SG, Elias E. Antidepressant induced cholestasis: hepatocellular redistribution of multidrug resistant protein (MRP2). *Gut* 2003; 52(2):300-303.
139. Fricker G, Landmann L, Meier PJ. Extrahepatic obstructive cholestasis reverses the bile salt secretory polarity of rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1989; 84(3):876-885.
140. Beuers U, Boyer JL, Paumgartner G. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications. *Hepatology* 1998; 28(6):1449-1453.
141. Beuers U, Nathanson MH, Isales CM, Boyer JL. Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca<sup>++</sup> mechanisms defective in cholestasis. *J Clin Invest* 1993; 92(6):2984-2993.
142. Kauffmann HM, Pfannschmidt S, Zoller H, Benz A, Vorderstemann B, Webster JI et al. Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression. *Toxicology* 2002; 171(2-3):137-146.
143. Schrenk D, Baus PR, Ermel N, Klein C, Vorderstemann B, Kauffmann HM. Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicol Lett* 2001; 120(1-3):51-57.
144. König J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 1999; 29(4):1156-1163.
145. Soroka CJ, Lee JM, Azzaroli F, Boyer JL. Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* 2001; 33(4):783-791.
146. Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y. Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem* 1999; 274(21):15181-15185.
147. König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461(2):377-394.
148. Hirohashi T, Suzuki H, Ito K, Ogawa K, Kume K, Shimizu T et al. Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein-like proteins maintained in eisai hyperbilirubinemic rats. *Mol Pharmacol* 1998; 53(6):1068-1075.
149. Stöckel B, König J, Nies AT, Cui Y, Brom M, Keppler D. Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in

- 
- comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *Eur J Biochem* 2000; 267(5):1347-1358.
150. Bohan A, Chen WS, Denson LA, Held MA, Boyer JL. Tumor necrosis factor alpha-dependent up-regulation of Lrh-1 and Mrp3(Abcc3) reduces liver injury in obstructive cholestasis. *J Biol Chem* 2003; 278(38):36688-36698.
  151. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192(2):245-261.
  152. Decker K. The response of liver macrophages to inflammatory stimulation. *Keio J Med* 1998; 47(1):1-9.
  153. Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 1992; 46(1-3):155-168.
  154. Brouwer A, Parker SG, Hendriks HF, Gibbons L, Horan MA. Production of eicosanoids and cytokines by Kupffer cells from young and old rats stimulated by endotoxin. *Clin Sci (Lond)* 1995; 88(2):211-217.
  155. Saad B, Frei K, Scholl FA, Fontana A, Maier P. Hepatocyte-derived interleukin-6 and tumor-necrosis factor alpha mediate the lipopolysaccharide-induced acute-phase response and nitric oxide release by cultured rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1995; 229(2):349-355.
  156. Busam KJ, Bauer TM, Bauer J, Gerok W, Decker K. Interleukin-6 release by rat liver macrophages. *J Hepatol* 1990; 11(3):367-373.
  157. Valledor AF, Ricote M. Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(2):201-212.
  158. Strähle U, Klock G, Schutz G. A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(22):7871-7875.
  159. Kauffmann HM, Schrenk D. Sequence analysis and functional characterization of the 5'-flanking region of the rat multidrug resistance protein 2 (mrp2) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245(2):325-331.
  160. Gerloff T, Geier A, Roots I, Meier PJ, Gartung C. Functional analysis of the rat bile salt export pump gene promoter. *Eur J Biochem* 2002; 269(14):3495-3503.
  161. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989; 56(3):335-344.
  162. Beato M, Chavez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 1996; 61(4):240-251.
  163. Leuschner M, Maier KP, Schlichting J, Strahl S, Herrmann G, Dahm HH et al. Oral budesonide and ursodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis: results of a prospective double-blind trial. *Gastroenterology* 1999; 117(4):918-925.
  164. Leuschner M, Guldutuna S, You T, Hubner K, Bhatti S, Leuschner U. Ursodeoxycholic acid and prednisolone versus ursodeoxycholic acid and placebo in the treatment of early stages of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1996; 25(1):49-57.
  165. Haagen M, Akkurt I, Blunck W. Hypoglycemia and cholestatic jaundice in congenital panhypopituitarism. *Monatsschr Kinderheilkd* 1989; 137(10):678-680.
  166. Steinherz R, Rachmel A, Josephsberg Z, Flasterstein B, Ben Amitai D, Zangen S et al. Hydrocortisone resolves persistent neonatal jaundice in multiple hormone deficiencies. *Helv Paediatr Acta* 1988; 43(3):219-223.

167. Leblanc A, Odievre M, Hadchouel M, Gendrel D, Chaussain JL, Rappaport R. Neonatal cholestasis and hypoglycemia: possible role of cortisol deficiency. *J Pediatr* 1981; 99(4):577-580.
168. Kubitz R, D' Urso D, Keppler D, Häussinger D. Osmodependent dynamic localization of the multidrug resistance protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology* 1997; 113(5):1438-1442.
169. Dombrowski F, Kubitz R, Chittattu A, Wettstein M, Saha N, Häussinger D. Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochem J* 2000; 348 Pt 1:183-188.
170. Schmitt M, Kubitz R, Wettstein M, vom Dahl S, Häussinger D. Retrieval of the mrp2 gene encoded conjugate export pump from the canalicular membrane contributes to cholestasis induced by tert-butyl hydroperoxide and chloro-dinitrobenzene. *Biol Chem* 2000; 381(5-6):487-495.
171. Schmitt M, Kubitz R, Lizun S, Wettstein M, Häussinger D. Regulation of the dynamic localization of the rat Bsep gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology* 2001; 33(3):509-518.
172. Kubitz R, Saha N, Kühlkamp T, Bettermann K, vom Dahl S, Häussinger D. Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C-isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol Chem* 2003; in press.
173. Mukhopadhyay S, Ananthanarayanan M, Stieger B, Meier PJ, Suchy FJ, Anwer MS. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a serine, threonine phosphoprotein and is dephosphorylated by cyclic adenosine monophosphate. *Hepatology* 1998; 28(6):1629-1636.
174. Mukhopadhyay S, Webster CR, Anwer MS. Role of protein phosphatases in cyclic AMP-mediated stimulation of hepatic Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransport. *J Biol Chem* 1998; 273(45):30039-30045.
175. Häussinger D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* 1996; 313 ( Pt 3):697-710.
176. Chung C, Buchman AL. Postoperative jaundice and total parenteral nutrition-associated hepatic dysfunction. *Clin Liver Dis* 2002; 6(4):1067-1084.
177. Forrest EH, Oien KA, Dickson S, Galloway D, Mills PR. Improvement in cholestasis associated with total parenteral nutrition after treatment with an antibody against tumour necrosis factor alpha. *Liver* 2002; 22(4):317-320.
178. Kipp H, Pichetshote N, Arias IM. Transporters on demand. Intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J Biol Chem* 2001; 276(10):7218-7224.
179. Kipp H, Arias IM. Intracellular trafficking and regulation of canalicular ATP-binding cassette transporters. *Semin Liver Dis* 2000; 20(3):339-351.
180. Kipp H, Arias IM. Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. *J Biol Chem* 2000; 275(21):15917-15925.
181. Kipp H, Arias IM. Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes. *Annu Rev Physiol* 2002; 64:595-608.
182. Häussinger D, Kubitz R, Reinehr R, Bode JG, Schliess F. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *JMAM* 2004; 208:in press.

183. Häussinger D, Kurz AK, Wettstein M, Graf D, vom DS, Schliess F. Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis. *Gastroenterology* 2003; 124(5):1476-1487.
184. Kubitz R, Sütfels G, Kühkamp T, Kölling R, Häussinger D. Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP Kinase. *Gastroenterology* 2004; 126:541-553.
185. Lee G, Piquette-Miller M. Influence of IL-6 on MDR and MRP-mediated multidrug resistance in human hepatoma cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79(10):876-884.
186. Cantz T, Nies AT, Brom M, Hofmann AF, Keppler D. MRP2, a human conjugate export pump, is present and transports fluo 3 into apical vacuoles of Hep G2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278(4):G522-G531.
187. Roelofsen H, Vos TA, Schippers IJ, Kuipers F, Koning H, Moshage H et al. Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells. *Gastroenterology* 1997; 112(2):511-521.
188. Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A et al. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet* 2002; 31(3):320-325.
189. Barr VA, Hubbard AL. Newly synthesized hepatocyte plasma membrane proteins are transported in transcytotic vesicles in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology* 1993; 105(2):554-571.
190. Bartles JR, Feracci HM, Stieger B, Hubbard AL. Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J Cell Biol* 1987; 105(3):1241-1251.
191. Maurice M, Schell MJ, Lardeux B, Hubbard AL. Biosynthesis and intracellular transport of a bile canalicular plasma membrane protein: studies in vivo and in the perfused rat liver. *Hepatology* 1994; 19(3):648-655.
192. Schell MJ, Maurice M, Stieger B, Hubbard AL. 5'nucleotidase is sorted to the apical domain of hepatocytes via an indirect route. *J Cell Biol* 1992; 119(5):1173-1182.
193. Weisz OA, Machamer CE, Hubbard AL. Rat liver dipeptidylpeptidase IV contains competing apical and basolateral targeting information. *J Biol Chem* 1992; 267(31):22282-22288.
194. Soroka CJ, Pate MK, Boyer JL. Canalicular export pumps traffic with polymeric immunoglobulin A receptor on the same microtubule-associated vesicle in rat liver. *J Biol Chem* 1999; 274(37):26416-26424.
195. Vos TA, Hooiveld GJ, Koning H, Childs S, Meijer DK, Moshage H et al. Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* 1998; 28(6):1637-1644.
196. Kagawa T, Watanabe N, Sato M, Nakano A, Nishizaki Y, Hosoi K et al. Differential expression of multidrug resistance (mdr) and canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) genes following extrahepatic biliary obstruction in rats. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 44(3):443-452.
197. Lee JM, Trauner M, Soroka CJ, Stieger B, Meier PJ, Boyer JL. Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 2000; 118(1):163-172.

198. Tuma PL, Finnegan CM, Yi JH, Hubbard AL. Evidence for apical endocytosis in polarized hepatic cells: phosphoinositide 3-kinase inhibitors lead to the lysosomal accumulation of resident apical plasma membrane proteins. *J Cell Biol* 1999; 145(5):1089-1102.
199. Tuma PL, Nyasae LK, Backer JM, Hubbard AL. Vps34p differentially regulates endocytosis from the apical and basolateral domains in polarized hepatic cells. *J Cell Biol* 2001; 154(6):1197-1208.
200. Rahner C, Stieger B, Landmann L. Apical endocytosis in rat hepatocytes In situ involves clathrin, traverses a subapical compartment, and leads to lysosomes. *Gastroenterology* 2000; 119(6):1692-1707.
201. Ihrke G, Martin GV, Shanks MR, Schrader M, Schroer TA, Hubbard AL. Apical plasma membrane proteins and endolyn-78 travel through a subapical compartment in polarized WIF-B hepatocytes. *J Cell Biol* 1998; 141(1):115-133.
202. Zegers MM, Hoekstra D. Sphingolipid transport to the apical plasma membrane domain in human hepatoma cells is controlled by PKC and PKA activity: a correlation with cell polarity in HepG2 cells. *J Cell Biol* 1997; 138(2):307-321.
203. Azer SA, Coverdale SA, Byth K, Farrell GC, Stacey NH. Sequential changes in serum levels of individual bile acids in patients with chronic cholestatic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11(3):208-215.
204. Marks DL, LaRusso NF, McNiven MA. Isolation of the microtubule-vesicle motor kinesin from rat liver: selective inhibition by cholestatic bile acids. *Gastroenterology* 1995; 108(3):824-833.
205. Bananis E, Murray JW, Stockert RJ, Satir P, Wolkoff AW. Microtubule and motor-dependent endocytic vesicle sorting in vitro. *J Cell Biol* 2000; 151(1):179-186.
206. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; 235(4792):1043-1046.
207. Stocker R, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(16):5918-5922.
208. Benaron DA, Bowen FW. Variation of initial serum bilirubin rise in newborn infants with type of illness. *Lancet* 1991; 338(8759):78-81.
209. Reinehr R, Schliess F, Haussinger D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. *FASEB J* 2003; 17(6):731-733.
210. Basu S, Eriksson M. Oxidative injury and survival during endotoxemia. *FEBS Lett* 1998; 438(3):159-160.
211. Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Intensive Care Med* 2000; 26(4):474-476.
212. Kozlov AV, Szalay L, Umar F, Fink B, Kropik K, Nohl H et al. Epr analysis reveals three tissues responding to endotoxin by increased formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(12):1555-1562.
213. Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, Schuele S, Nundy S, Soroka CJ et al. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1996; 110(1):199-209.
214. Bolder U, Schmidt A, Landmann L, Kidder V, Tange S, Jauch KW. Heat stress prevents impairment of bile acid transport in endotoxemic rats by a posttranscriptional mechanism. *Gastroenterology* 2002; 122(4):963-973.

- 
215. Koopen NR, Wolters H, Voshol P, Stieger B, Vonk RJ, Meier PJ et al. Decreased Na<sup>+</sup>-dependent taurocholate uptake and low expression of the sinusoidal Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting protein (Ntcp) in livers of mdr2 P-glycoprotein-deficient mice. *J Hepatol* 1999; 30(1):14-21.
  216. Kim RB, Leake B, Cvetkovic M, Roden MM, Nadeau J, Walubo A et al. Modulation by drugs of human hepatic sodium-dependent bile acid transporter (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291(3):1204-1209.
  217. Ho RH, Leake BF, Roberts RL, Lee W, Kim RB. Ethnicity-dependent polymorphism in NTCP (SLC10A1) reveals a domain critical for bile acid substrate recognition. *J Biol Chem* 2003.
  218. Dombrowski F, Stieger B, Beuers U. Tauroursodeoxycholsäure stimuliert die Insertion der Gallensäureexportpumpe Bsep in die kanalikuläre Hepatozytenmembran. *GASL* . 2004. Ref Type: Abstract

## 9. Lebenslauf

Ralf Kubitz, geboren am 02. Mai 1967 in Osterode am Harz, verheiratet, 2 Kinder

### Schule und Studium:

73 - 77	Grundschule, Odenthal
77 - 86	Freiherr- vom- Stein- Gymnasium, Leverkusen
4.88 - 5.95	Studium der Medizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
9.92 - 6.93	Studium an der "Medical School" der "University of Birmingham", England
4.94 - 5.95	Praktisches Jahr: Innere Medizin am Kantonsspital in St.Gallen, Schweiz; Chirurgie und Wahlfach Anästhesie an der Stadtklinik Baden-Baden, Lehrkrankenhaus der Universität Freiburg
5.95	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)

### Doktorarbeit:

4.91 - 7.92	Experimentelle Arbeit (Patch- clamp- Technik) am Physiologischen Institut der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg unter Prof. Dr. R. Greger
11.91	Aufenthalt an der Hebräischen Universität in Jerusalem, Israel
8.92	Promotionskolloquium, Titel: <i>Hormon- und Schwellungsinduzierte Chlorid-Kanäle an HT<sub>29</sub>-Kolon-Karzinom-Zellen</i>
6.95	Verleihung des Dokortitels

### Stipendien:

4.91 - 5.95	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
9.92 - 6.93	Auslands-Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)

### Beruf:

6.95 - 4.96	Arzt im Praktikum am Institut für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Stadtklinik Baden-Baden, Chefarzt: Dr. med. K. van Deyk
seit 4.96	Arzt im Praktikum bzw. Assistenzarzt an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf, Klinikdirektor: Prof. Dr. med. D. Häussinger
1.04	Facharztprüfung für das Fach "Innere Medizin"

### Auszeichnungen:

5.98	Heinz-Kalk-Gedächtnispreis: <i>"Lipopolysaccharide induzieren eine Cholestase durch Verminderung der mRNA- Spiegel des "multidrug resistance protein 2"</i>
3.99	Heinz-Kalk-Gedächtnispreis: <i>"Die Sensitivitätszunahme kultivierter hepatischer Sternzellen gegenüber Endothelin-1 und dessen transformatorische Wirkung sind Endothelin A- Rezeptor- vermittelt."</i>
5.03	Posterpreis der Gesellschaft für Gastroenterologie NRW: <i>"Abbau des Na<sup>+</sup>-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (Ntcp) durch das Ubiquitin-Proteasomen-System in HepG2-Zellen."</i>