

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	V
Verzeichnis der Tabellen	VIII
Abkürzungen	IX
Darstellung der allgemeinen Gallensäure- bzw. Steroidstruktur	XII
Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren	XIII
Der genetische Code.....	XIII
Vorsätze im Dezimalsystem.....	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Membrantransport.....	1
1.2 Die SLC10- Familie	3
1.3 Das Na ⁺ /Taurocholat Cotransporting Polypeptide (NTCP, SLC10A1).....	5
1.3.1 Substratspektrum und Transporteigenschaften	5
1.3.2 Gewebeexpression und Funktion.....	5
1.3.3 Pharmakologische Bedeutung des NTCP/Ntcp	6
1.4 Der Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter (ASBT, SLC10A2)	7
1.4.1 Substratspektrum und Transporteigenschaften	7
1.4.2 Gewebeexpression und Funktion.....	7
1.4.3 Pharmakologische Bedeutung des ASBT/Asbt.....	9
1.5 Der enterohepatische Kreislauf	10
1.6 Der Sodium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT, SLC10A6).....	13
1.6.1 Substratspektrum und Transporteigenschaften des SOAT.....	13
1.6.2 Gewebeexpression und mögliche Funktion	13
1.6.3 Steroidsulfate und deren enzymatische Umwandlung	14
1.7 Weitere Mitglieder der SLC10-Familie	15
1.7.1 SLC10A3	15
1.7.2 SLC10A4	15
1.7.3 SLC10A5	16
1.7.4 SLC10A7	16
1.8 Zielsetzung.....	17
2 Material	18
2.1 Materialien für die Molekularbiologie	18
2.1.1 Primer	18
2.1.2 Enzyme.....	18
2.1.3 Vektoren	19
2.1.4 Bakterienstämme.....	21
2.1.5 qPCR	21
2.1.6 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien	22
2.1.7 Puffer und Medien	23
2.2 Agarose-Gelelektrophoresen.....	23
2.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese (DNA)	23
2.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (RNA)	24
2.2.3 Längenstandards.....	24
2.3 Zellkultur	25
2.3.1 Zelllinien	25
2.3.2 Zellkulturmedien	25
2.3.3 Antibiotika	26
2.4 Transportmessungen an eukaryotischen Zellen	26
2.4.1 Puffer und Lösungen	26
2.4.2 Proteinbestimmung.....	26

2.5	Dünnschichtchromatographie	27
2.6	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	27
2.7	Immunfluoreszenz	28
2.7.1	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen	28
2.8	Immunhistochemie	28
2.8.1	Material, Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie	29
2.9	Proteinanalyse	30
2.9.1	Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteine)	30
2.9.2	Puffer und Lösungen für Western Blot	30
2.9.3	Filmentwicklung	31
2.9.4	Kommerziell erhältliche Kits	31
2.9.5	Längenstandards	31
2.10	Chemische Substanzen	32
2.10.1	Reagenzien	32
2.10.2	Feinchemikalien	34
2.10.3	Radioaktiv-markierte Substanzen	36
2.11	Geräte	37
2.12	Verbrauchsmaterial	38
2.13	Bioinformatische Programme und Datenbanken	39
3	Methoden	42
3.1	Allgemeine Methoden in der Molekularbiologie	42
3.1.1	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	42
3.1.2	Native Agarose-Gelelektrophorese	42
3.1.3	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	43
3.1.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	43
3.1.5	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA	43
3.1.6	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab	44
3.1.7	Plasmid-Präparationen im Midi-Maßstab	44
3.2	Isolierung und Aufarbeitung von RNA	45
3.2.1	Mäuse und Organentnahme	45
3.2.2	Isolierung von Total-RNA aus Geweben	45
3.2.3	Isolierung von Total-RNA aus Zellen	46
3.2.4	Aufreinigung von polyA ⁺ -RNA aus Total-RNA	47
3.2.5	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	47
3.2.6	DNase Verdau	48
3.2.7	cDNA-Synthese aus Total- und poly A ⁺ -RNA	49
3.2.8	Laser-assisted cell picking (LACP) und Extraktion von RNA	49
3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
3.3.1	Allgemeine Regeln zur Primerauswahl	51
3.3.2	PCR-Reaktionsansatz	52
3.3.3	Touchdown-PCR	53
3.3.4	Nested-PCR	53
3.3.5	RACE-PCR	53
3.3.6	Quantitative Real-Time PCR	54
3.4	DNA-Klonierung	56
3.4.1	TOPO-Klonierung	56
3.4.2	Transformation	56
3.4.3	Die Tetrazyklin-regulierte Proteinexpression	57
3.5	Sequenzierung und Auswertung der Sequenzspuren	57
3.6	Zellbiologische Methoden	58
3.6.1	Passagieren und Aussäen der Zellen	58
3.6.2	Einfrieren der Zellen	58
3.6.3	Auftauen der Zellen	58
3.7	Transportmessung an HEK293-Zellen	59
3.7.1	Versuchsvorbereitung	59
3.7.2	Transportmessung	59
3.7.3	cis-Hemmung und Ermittlung der IC ₅₀ -Werte	60
3.7.4	Flüssigszintillationsmessung	60
3.7.5	Proteinbestimmung	61

3.7.6	Auswertung der Aufnahmeversuche	61
3.8	Immunfluoreszenz	61
3.8.1	Herstellung des mSoat ₃₁₇₋₃₃₁ und des mSoat ₃₂₉₋₃₄₄ -Antikörpers	62
3.8.2	Indirekte Immunfluoreszenz mit verschiedenen mSoat-Antikörpern	63
3.8.3	Mikroskopie	64
3.9	Immunhistochemie	64
3.9.1	Herstellung histologischer Schnitte	65
3.9.2	Immunhistochemische Aufbereitung und Färbung	65
3.10	Western Blot	66
3.10.1	Proteinaufbereitung	66
3.10.2	Proteinbestimmung	67
3.10.3	Gellauf und Blotting	67
3.10.4	Blockierung der Membran und Antikörperreaktion	68
3.10.5	Detektion	68
3.11	Dünnschichtchromatographie	69
4	Ergebnisse	71
4.1	Funktionelle Charakterisierung des murinen Soat (mSoat)	71
4.1.1	Sequenzanalyse des murinen Soat	71
4.1.2	Membranexpression und -topologie	73
4.1.3	Expression des mSoat und des Androgenrezeptors der Maus (mAr)	75
4.1.4	Immunhistochemischer Nachweis von mSoat in Geweben	79
4.1.5	Zeit- und Natrium-abhängige Aufnahme von mSoat-Substraten	81
4.1.6	Kinetische Bestimmung des mSoat-vermittelten Transportes	82
4.1.7	Cis-Hemmungen des mSoat	85
4.2	Der Soat des Schweins (susSoat)	88
4.2.1	Sequenzbestimmung des susSoat	88
4.2.2	Quantitative Bestimmung des Soat im Hoden des Schweins	90
4.3	Substratvergleich der SLC10-Carrier NTCP, ASBT und SOAT	92
4.3.1	Untersuchung der Expression an stabil transfizierten Zelllinien durch quantitative Real-Time PCR	92
4.3.2	Substratprofil von NTCP, ASBT und SOAT	93
4.3.3	Kinetische Transportbestimmungen für NTCP, ASBT und SOAT	99
4.3.4	Kontrolle der Gallensäuren durch Dünnschichtchromatographie	104
4.3.5	Aufnahmeversuche mit Tauroolithocholat-3-sulfat	106
4.4	Generierung eines 3D-QSAR Pharmakophormodells für SOAT	110
4.4.1	Bestimmung von IC ₅₀ -Werten	110
4.4.2	Initiales Screening	111
4.4.3	Erstellen der SOAT-Pharmakophore	114
4.4.4	Validierung der SOAT-Pharmakophorhypothese	118
4.4.5	Vergleich der IC ₅₀ -Werte des <i>training set</i> von cASBT und SOAT	120
4.4.6	Stimulierende Effekte	122
5	Diskussion	124
5.1	Charakterisierung des mSoat	124
5.1.1	Sequenzanalyse, Membrantopologie und <i>in silico</i> Promotoranalyse von mSoat und SOAT im Vergleich	124
5.1.2	Transporteigenschaften und inhibitorisches Profil von mSoat und SOAT im Vergleich	126
5.1.3	Expression von mSoat und SOAT	128
5.1.4	Physiologische Bedeutung des mSoat/SOAT	129
5.2	Der Soat des Schweins	132
5.2.1	Verwandschaftsanalyse der SLC10A6-Familienmitglieder	132
5.2.2	Die physiologische Rolle des susSoat	134
5.3	Substratvergleich von SOAT, NTCP und ASBT	134
5.3.1	Das Substratprofil von SOAT, NTCP und ASBT	135
5.3.2	Funktionelle Gruppen der Substraterkennung	137
5.4	Vergleich der Pharmakophormodelle und des inhibitorischen Profils von SOAT, ASBT und NTCP	140

5.4.1	Die Bedeutung eines Pharmakophormodells	140
5.4.2	Die Rolle und Erstellung des SOAT- Pharmakophormodells.....	141
5.4.3	Vergleich der Pharmakophoren von SOAT und cAsbt/ASBT	143
5.4.4	Vergleich der Pharmakophoren von SOAT und NTCP bzw. NTCP und ASBT	147
5.4.5	Stimulierende Effekte	148
6	Zusammenfassung	156
7	Summary	157
8	Literaturverzeichnis	159
9	Danksagungen	176