

# Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnis der Abbildungen .....</b>	<b>V</b>
<b>Verzeichnis der Tabellen .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Darstellung der allgemeinen Gallensäure- bzw. Steroidstruktur .....</b>	<b>XII</b>
<b>Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Der genetische Code .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Vorsätze im Dezimalsystem .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Membrantransport .....	1
1.2 Die SLC10- Familie .....	3
1.3 Das $\text{Na}^+$ /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
<b>2 Material .....</b>	<b>18</b>
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 Zellkulturmiedien .....	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-Gelektrophorese (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
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>42</b>
3.1	Allgemeine Methoden in der Molekularbiologie .....	42
3.1.1	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung .....	42
3.1.2	Native Agarose-Gelektrophorese .....	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 <sup>+</sup> -RNA aus Total-RNA .....	47
3.2.5	Denaturierende Agarose-Gelektrophorese .....	47
3.2.6	DNase Verdau .....	48
3.2.7	cDNA-Synthese aus Total- und poly A <sup>+</sup> -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 <sub>50</sub> -Werte .....	60
3.7.4	Flüssigszintillationsmessung .....	60
3.7.5	Proteinbestimmung .....	61

3.7.6 Auswertung der Aufnahmevereuche .....	61
<b>3.8 Immunfluoreszenz.....</b>	<b>61</b>
3.8.1 Herstellung des mSoat <sub>317-331</sub> - und des mSoat <sub>328-344</sub> -Antikörpers.....	62
3.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz mit verschiedenen mSoat-Antikörpern.....	63
3.8.3 Mikroskopie .....	64
<b>3.9 Immunhistochemie .....</b>	<b>64</b>
3.9.1 Herstellung histologischer Schnitte .....	65
3.9.2 Immunhistochemische Aufbereitung und Färbung.....	65
<b>3.10 Western Blot.....</b>	<b>66</b>
3.10.1 Proteinaufbereitung .....	66
3.10.2 Proteinbestimmung.....	67
3.10.3 Gelauf und Blotting .....	67
3.10.4 Blockierung der Membran und Antikörperreaktion .....	68
3.10.5 Detektion .....	68
<b>3.11 Dünnschichtchromatographie .....</b>	<b>69</b>
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1 Funktionelle Charakterisierung des murinen Soat (mSoat).....</b>	<b>71</b>
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 (mAra).....	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 Transports .....	82
4.1.7 Cis-Hemmungen des mSoat .....	85
<b>4.2 Der Soat des Schweins (susSoat) .....</b>	<b>88</b>
4.2.1 Sequenzbestimmung des susSoat .....	88
4.2.2 Quantitative Bestimmung des Soat im Hoden des Schweins .....	90
<b>4.3 Substratvergleich der SLC10-Carrier NTCP, ASBT und SOAT.....</b>	<b>92</b>
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 Aufnahmevereuche mit Taurolithocholat-3-sulfat .....	106
<b>4.4 Generierung eines 3D-QSAR Pharmakophormodeils für SOAT .....</b>	<b>110</b>
4.4.1 Bestimmung von IC <sub>50</sub> -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 <sub>50</sub> -Werte des <i>training set</i> von cASBT und SOAT .....	120
4.4.6 Stimulierende Effekte .....	122
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>124</b>
<b>5.1 Charakterisierung des mSoat .....</b>	<b>124</b>
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
<b>5.2 Der Soat des Schweins .....</b>	<b>132</b>
5.2.1 Verwandtschaftsanalyse der SLC10A6-Familienmitglieder .....	132
5.2.2 Die physiologische Rolle des susSoat .....	134
<b>5.3 Substratvergleich von SOAT, NTCP und ASBT .....</b>	<b>134</b>
5.3.1 Das Substratprofil von SOAT, NTCP und ASBT .....	135
5.3.2 Funktionelle Gruppen der Substraterkennung .....	137
<b>5.4 Vergleich der Pharmakophormodelle und des inhibitorischen Profils von SOAT, ASBT und NTCP .....</b>	<b>140</b>

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
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>156</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>157</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>159</b>
<b>9</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>176</b>