



Doctoral Thesis

Identification, isolation and functional reconstitution of the canalicular bile salt transport system in rat liver

Author(s):

Ruetz, Stephan

Publication Date:

1988

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000502318> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**IDENTIFICATION, ISOLATION AND
FUNCTIONAL RECONSTITUTION OF THE
CANALICULAR BILE SALT
TRANSPORT SYSTEM IN RAT LIVER**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences
presented by
STEPHAN RUETZ

Zurich 1988

8. SUMMARY

To maintain efficient enterohepatic circulation, the liver must continuously secrete bile salts into the bile canaliculi. This canalicular excretion is the rate limiting step in overall transport of bile salts from blood into bile (66). Furthermore, kinetic transport studies with isolated canalicular rat liver plasma membrane (cLPM) vesicles show that taurocholate, the major conjugated bile salt in the rat, is secreted by a saturable transport system which can be blocked by the anion transport inhibitor DIDS (4,4-diisothiocyano-2,2'-disulfonic acid stilbene) (45,67). This carrier mediated process is in part driven by the physiologic intracellular negative potential of -30 to -40mV (67).

To directly identify and isolate the canalicular bile salt transport protein, cLPM vesicles were incubated with the photolabile bile salt derivative (7,7-azo-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -[3 β -³H]-cholan-24-oyl-2-aminoethanesulfonic acid (1 μ M, 23.1 Ci/mmol). Photolysis resulted in the predominant labeling of an integral membrane protein (Mr of 100,000 Da). This protein was not detectable in basolateral membrane vesicles. The labeling of the domain specific 100kDa polypeptide was dependent on label concentration and could be inhibited by taurocholate (0.15mM) and DIDS (1mM).

Photoaffinity labeled cLPM vesicles were solubilized with 50mM octyl glucoside and subjected to DEAE-cellulose and then to wheat germ lectin affinity chromatography. The purified protein was a single band on SDS-PAGE with an apparent Mr of 100,000 corresponding to ~5% of total cLPM protein.

Polyclonal, monospecific antibodies (anti-100kDa antiserum) raised against the 100kDa bile salt binding protein not only decreased the photoaffinity labeling, but also inhibited both taurocholate uptake into and taurocholate efflux from cLPM vesicles. Canalicular secretion of bile salts thus seems to be a mediated transport, probably by the 100kDa glycoprotein.

Functional reconstitution of the canalicular bile salt binding protein into artificial proteoliposomes (cPLP) by a new reconstitution procedure was possible. Preloading of the cPLP with 100 μ M taurocholate during vesicle formation resulted in a 5-fold stimulation of [³H]taurocholate uptake in cPLP containing the 100kDa protein, but not

in cPLP without it. This transstimulatable taurocholate transport was sensitive to the anion inhibitor DIDS. Furthermore, incorporation of the immunoprecipitated 100kDa protein into liposomes resulted in a reconstitution not only of DIDS sensitive transstimulatable but also electrogenic taurocholate anion transport.

In conclusion, the presented data of this thesis prove that canalicular bile salt secretion in rat liver is a carrier dependent process mediated by a domain specific 100kDa membrane glycoprotein.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Um den enterohepatischen Kreislauf aufrecht zu erhalten, muss die Leber kontinuierlich Gallensalze in die Gallenkanälchen ausscheiden. Diese Sekretion stellt den geschwindigkeitslimitierenden Schritt innerhalb des Gesamttransportes von Gallensalzen aus dem Blut in die Galle dar. Kinetische Transportstudien, durchgeführt mit isolierten kanalikulären Plasmamembranvesikeln von Rattenleber, haben gezeigt, dass die Ausscheidung von Taurocholat von einem saturierbaren Transportsystem abhängig ist (45,67), das durch den Anionentransportinhibitor DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure) gehemmt werden kann. Dieser "Carrier" abhängige Prozess wird teilweise durch das intrazelluläre, negative Potential von ungefähr -30 bis -40mV (65) getrieben.

Um dieses kanalikuläre Gallensalztransportsystem identifizieren zu können, wurden kanalikuläre Plasmamembranvesikel mit der photolabilen Verbindung (7,7-Azo-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -[3 β -³H]-cholan-24-oyl-2-aminoethansulfonat inkubiert. Durch diese Photoaffinitätsmarkierung wurde ein einzelnes Protein mit einem Molekulargewicht von 100,000 gelabelt. In der basolateralen Membranfraktion konnte dieses Protein nicht identifiziert werden. Die spezifische Markierung des Proteins war von der Konzentration des eingesetzten Labels abhängig und konnte zudem durch die Zugabe von Taurocholat (0.15mM) oder DIDS (1mM) vollständig gehemmt werden.

Photomarkierte kanalikuläre Membranvesikel wurden mit 50mM Octylglucosid solubilisiert und das 100kDa Protein wurde mittels einer DEAE-Zellulose- und einer anschliessenden Affinitätssäule gereinigt.

Mittels polyklonalen Antikörpern, die gegen das 100kDa Protein gerichtet sind, konnte nicht nur die Photoaffinitätsmarkierung unterdrückt, sondern auch die Taurocholataufnahme in und der Taurocholatausfluss aus kanalikulären Membranvesikeln gehemmt werden. Die kanalikuläre Sekretion von Gallensalzen scheint somit von einem 100kDa Transportprotein abhängig zu sein.

Dies konnte bewiesen werden, indem es gelang, das postulierte Gallensalze transportierende 100kDa Protein in künstlichen Liposomen funktionell zu rekonsti-

tuieren. In Proteoliposomen, die das 100kDa Protein enthielten, konnte eine 5-fache Stimulation von [³H]Taurocholataufnahme gemessen werden. Dieser Transport war ebenfalls durch Zugabe von DIDS hemmbar. Wurde zudem immunpräzipitiertes 100kDa Protein in Liposomen eingebaut, konnte nicht nur DIDS sensitive Transstimulation sondern auch elektroden getriebener Transport von Taurocholat bestimmt werden.

Zusammengefasst erbringen die Daten der vorgelegten Dissertation den Beweis, dass die kanalikuläre Sekretion von Gallensalzen von einem spezifischen 100kDa Transportprotein abhängig ist.