

Verena Simone Keitel

Dr. med.

## **Zellbiologische Konsequenzen von Mutationen im *MRP2* (*ABCC2*)-Gen beim Dubin-Johnson-Syndrom**

Geboren am 26.11.1976 in Schwäbisch Hall

Reifeprüfung am 27.06.1996 in Schwäbisch Hall

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1996/97 bis WS 2003/04

Physikum am 10.09.2003 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg und WS 2000/01 sowie SS 2001 am Imperial College, London, GB

Praktisches Jahr: Duke University, Durham, NC, USA (Chirurgie); Schwäbisch Hall (Innere Medizin); National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, GB (Neurologie).

Staatsexamen am 26.11.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Dietrich Keppler

Das Multidrug Resistance Protein MRP2, eine Konjugat-Export-Pumpe der ABC-Transporter-Superfamilie, besitzt ein Molekulargewicht von 190 kDa und ist insbesondere in der apikalen (kanalikulären) Hepatozytenmembran lokalisiert, wo es ATP-abhängig organische Anionen einschließlich zahlreicher Glucuronsäure-Konjugate in die Galle transportiert. Kennzeichnend für das autosomal-rezessiv vererbliche Dubin-Johnson-Syndrom sind eine Störung der hepatobiliären Bilirubinexkretion und eine konjugierte Hyperbilirubinämie. Mutationen im *MRP2*-Gen, die zum Fehlen eines funktionell aktiven MRP2-Proteins in der kanalikulären Hepatozytenmembran führen, stellen die molekulare Grundlage dieser Stoffwechselstörung dar. Gegenwärtig sind mehrere Mutationen im *MRP2*-Gen bekannt, die mit einem Dubin-Johnson-Syndrom einhergehen. Welche zellbiologischen Mechanismen dem Fehlen eines funktionell aktiven MRP2-Proteins zugrunde liegen, war bisher jedoch nicht untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Mutationen im *MRP2*-Gen im Hinblick auf ihre zellbiologischen Konsequenzen analysiert. Der *MRP2* $\Delta$ (R,M)-Mutation liegt eine Deletion von sechs Basenpaaren innerhalb der zweiten Nukleotid-Bindungsdomäne des *MRP2*-Proteins zugrunde. Eine weitere Mutation, *MRP2*I1173F, wurde bei 22 Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom nachgewiesen und ist durch einen Austausch von Isoleucin in Position 1173 durch Phenylalanin gekennzeichnet.

In dieser Arbeit wurde *MRP2*-cDNA mit der jeweiligen Mutation hergestellt und in HEK293-Zellen sowie in HepG2-Zellen zur Expression gebracht. Die humane Hepatomzelllinie HepG2 zeigt in Kultur hepatozytenartige Polarität und Funktion und diente als *In vitro*-Leberzell-System.

Das *MRP2* $\Delta$ (R,M)-Protein wies ein Molekulargewicht von ungefähr 175 kDa auf, das durch Inkubation mit Endoglykosidase-H reduziert werden konnte und der kernglykosylierten Form des *MRP2*-Proteins entsprach. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Elektronenmikroskopie wurde das *MRP2* $\Delta$ (R,M)-Protein ausschließlich in den Zisternen des endoplasmatischen Retikulums sowie in der äußeren Zellkernmembran detektiert. Die Hemmung der proteasomalen Aktivität mit MG132 führte zu einer Akkumulation der mutierten Proteine in Aggresom-ähnlichen Strukturen.

Diese Ergebnisse zeigten, daß das *MRP2* $\Delta$ (R,M)-Protein die posttranslationale Proteinreifung nur unvollständig durchläuft, im endoplasmatischen Retikulum akkumuliert und schließlich proteasomal abgebaut wird. Zu den gleichen Ergebnissen führten Versuche mit einer mutierten *MRP2*-cDNA, die nur die Deletion einer der beiden Aminosäuren enthielt. Folglich reicht bereits das Fehlen einer der beiden Aminosäuren aus, um die beobachtete Störung der Proteinreifung zu bedingen.

Das *MRP2*I1173F-Protein lag ebenfalls hauptsächlich in der kernglykosylierten, 175 kDa Form des *MRP2*-Proteins im endoplasmatischen Retikulum transfizierter HEK293- und HepG2-Zellen vor. Allerdings stellte sich diese Mutation als nicht gleichermaßen schwerwiegend dar wie die *MRP2* $\Delta$ (R,M)-Mutation, denn ein geringer Anteil des *MRP2*I1173F-Proteins durchlief eine vollständige Proteinreifung und war daher als 190 kDa Form in Immunblot-Analysen detektierbar bzw. in der apikalen Membrandomäne von HepG2-Zellen nachweisbar. Die Messung des ATP-abhängigen Transports der Substrate Leukotrien C<sub>4</sub> und 17 $\beta$ -Glucuronosyl-estradiol in Plasmamembranvesikeln bzw. Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums stabiler *MRP2*I1173F-Transfektanten bestätigte die fehlende Transportaktivität des mutierten Proteins und erklärt somit die konjugierte Hyperbilirubinämie dieser Patienten.

Zum ersten Mal beschreiben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die zellbiologischen Konsequenzen von Mutationen im *MRP2*-Gen. Die Kenntnis einer Mutation im *MRP2*-Gen läßt zunächst nur bedingt Rückschlüsse auf die zellulären Mechanismen, die zum Verlust eines funktionell aktiven *MRP2*-Proteins in der kanalikulären Hepatozyten-membran führen, zu. Das in dieser Arbeit verwendete experimentelle Vorgehen stellt die Grundlage zur Untersuchung der Pathomechanismen, die bei einer Mutation im *MRP2*-Gen zur Ausprägung des Dubin-Johnson-Syndrom-Phänotyps führen, dar. Die hier eingesetzten Methoden können zur Charakterisierung von weiteren Mutationen im *MRP2*-Gen und in anderen *ABC*-Genen dienen.