

Christoph Michalski
Dr. med.

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung einer natürlich vorkommenden Mutation im *SLC21A6*-Gen

Geboren am 09.06.1977 in Heidelberg

Reifeprüfung am 20.06.1997 in Wiesloch

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1998/1999 bis zum WS 2004/2005

Physikum am 06.09.2000 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Durham, USA; Heidelberg; Rheinfelden/Basel, Schweiz

Staatsexamen am 09.11.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dietrich Keppler

Das Transportprotein für organische Anionen SLC21A6 (auch OATP1B1, OATP2, OATP-C oder LST-1 genannt) ist am hepatozellulären Aufnahmetransport verschiedener endogener und xenobiotischer organischer Anionen und Pharmaka wie Gallensäuren, unkonjugiertem Bilirubin und Pravastatin beteiligt. Aufgrund des breiten Substratspektrums und der selektiven Expression in Hepatozyten ist es von großem Interesse für pharmakologische und pharmakogenomische Studien. Wir haben in dieser Arbeit 81 humane Leberproben mittels Immunblot-Analyse untersucht und dabei eine Leberprobe mit einer stark reduzierten Menge an SLC21A6-Protein gefunden, was eine Mutation im *SLC21A6*-Gen nahe legte. Die *SLC21A6*-cDNA dieser Probe enthielt fünf Basenpaar-Substitutionen in einem Allel; drei dieser Austausche sind kodierend und haben Aminosäure-Austausche zur Folge: A388G führt zu Asn130Asp, genannt SLC21A6-N130D; C463A führt zu Pro155Thr, genannt SLC21A6-P155T; T578G führt zu Leu193Arg, genannt SLC21A6-L193R. Die ersten beiden sind Polymorphismen (bezeichnet als SLC21A6*1b und SLC21A6*4) mit einer Häufigkeit von je 16%, beziehungsweise 30%. Die Mutation *SLC21A6-T578G* (kodierend für das Protein SLC21A6-L193R) konnte hingegen nur in einer von über 300 Proben genomischer DNA gefunden werden und ist somit die erste natürlich vorkommende Mutation, die in einem Allel des *SLC21A6*-Gens identifiziert wurde und den Transport organischer Anionen *in vitro* beeinträchtigt. Wir führten jede dieser Mutationen mittels gerichteter Mutagenese in die

SLC21A6-cDNA ein und etablierten stabil transfizierte HEK293- und MDCKII-Zellen, die das jeweilige mutierte *SLC21A6*-Protein exprimierten. Die semiquantitative Analyse der *SLC21A6*-mRNA-Expression in den stabil transfizierten Zellen zeigte vergleichbare Mengen an *SLC21A6*-mRNA sowohl für die Wildtyp- als auch die mutierten mRNAs, was die Vergleichbarkeit der synthetisierten Proteine ermöglichte. Es wurden Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Transport-Messungen mit prototypischen Substraten des *SLC21A6*-Proteins durchgeführt, um die Lokalisation und die Transportaktivität der mutierten Proteine zu untersuchen. Beide Proteine mit den Polymorphismen *SLC21A6*-N130D und *SLC21A6*-P155T wurden wie der *SLC21A6*-Wildtyp an die laterale Membran der MDCK-Zellen sortiert, sie zeigten jedoch veränderte Transportaktivitäten für Cholyltaurin und 17 β -Glucuronosyl-Estradiol. Die ausgeprägtesten Veränderungen zeigte das Protein, das die Mutation *SLC21A6*-L193R trug. Ein Großteil dieses mutierten Proteins wurde intrazellulär retiniert und dieser einzelne Aminosäure-Austausch führte zum vollständigen Ausfall der Transportaktivität *in vitro* für alle getesteten Substanzen. Somit kann die Untersuchung von Mutationen und Polymorphismen im *SLC21A6*-Gen dazu beitragen, Störungen im Prozeß der hepatobiliären Elimination organischer Anionen besser zu verstehen.