

Miriam Bortfeld

Dr. sc. hum.

## **Expression, Lokalisation und funktionelle Charakterisierung des humanen Multidrug Resistance-Proteins ABCC11**

Geboren am 9.10.1977 in München

Diplom der Fachrichtung Biologie am 15.08.02 an der Universität Marburg/Lahn

Promotionsfach: Biochemie (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dietrich Keppler

Das ABCC11-Protein gehört zu den Multidrug Resistance-Proteinen (MRPs) der ABC-Transporter-Superfamilie. Die Kenntnisse über die Funktion und Lokalisation der Mitglieder der ABC-Superfamilie haben einen wichtigen Beitrag zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Zytostatika-Resistenz geleistet und darüber hinaus neue Einsichten in den Substanztransport über Zellmembranen geliefert.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war wenig über die Substratspezifität und die physiologische Funktion von ABCC11 bekannt. Die vorliegenden Untersuchungen hatten daher sowohl eine umfassende funktionelle Charakterisierung des ABCC11-Proteins als auch dessen Lokalisation in humanen Geweben zum Ziel. Es wurden mehrere Antikörper gegen verschiedene Epitope des humanen ABCC11-Proteins hergestellt, von denen einer das ABCC11-Protein spezifisch erkannte. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte ABCC11 durch Kolo-kalisation mit Neurofilamenten erstmals in Axonen von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde die *ABCC11*-cDNA entsprechend der Referenzsequenz kloniert und eine Säugetierzelllinie (MDCKII-ABCC11) etabliert, welche die humane *ABCC11*-mRNA stabil exprimiert. In diesen polar wachsenden MDCKII-Zellen war das rekombinante ABCC11-Protein in der apikalen Membran-Domäne lokalisiert. Eine apikale Lokalisation von ABCC11 wurde auch nach transienter Transfektion von humanen Hepatoblastom-HepG2-Zellen beobachtet. Diese apikale Lokalisation in polaren Zellen steht im Einklang mit dem Vorkommen von ABCC11 in der axonalen Membran von Neuronen.

Untersuchungen mit isolierten Membranvesikeln aus *ABCC11*-exprimierenden MDCKII-Zellen zeigten, dass rekombinantes ABCC11 den Transport von sulfatierten Steroiden vermittelte,

insbesondere von Dehydroepiandrosteron-3-sulfat (DHEAS) und Estron3sulfat ( $E_13S$ ). Der  $K_m$ Wert des humanen ABCC11 für DHEAS betrug  $21 \mu M$ . Im Vergleich dazu war die Affinität von  $E_13S$  für ABCC11 mit einem  $K_m$ Wert von  $180 \mu M$  wesentlich geringer. Das Arylaminobenzoat NPPB und der Sulfonylharnstoff Glibenclamid erwiesen sich als wirksame Hemmstoffe des ABCC11-vermittelten Transports von DHEAS.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beschreiben erstmals die Lokalisation des ABCC11-Proteins in den Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems. Die Lokalisation von ABCC11 und seine Substratspezifität zeigen, dass ABCC11 für den Export von Neurosteroiden, beispielsweise von DHEAS, aus Neuronen verantwortlich sein kann. Neurosteroiden spielen eine zentrale Rolle bei der Modulation von ligandengesteuerten Ionenkanälen, insbesondere des  $GABA_A$ -Rezeptors. Die von uns durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie gezeigte unmittelbare Nachbarschaft von ABCC11 und  $GABA_A$ -Rezeptoren deutet auf eine Beteiligung von ABCC11 an der Regulation von Neurotransmitter-Rezeptoren hin.