

Young-Min Anna Lee
Dr. med.

Funktionelle und zellbiologische Charakterisierung einer polymorphen Variante des ABCC3-Transporters (Multidrug Resistance-Protein 3, MRP3/ABCC3)

Geboren am 05.02.1978 in Darmstadt
Staatsexamen am 28.04.2005 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. D. Keppler

Der ABCC3-Transporter (*Multidrug Resistance-Protein 3*, MRP3; Gensymbol *ABCC3*) des Menschen ist ein ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*), welcher den Efflux von verschiedenen Gallensalzen und mehreren konjugierten organischen Anionen aus polarisierten Zellen vermitteln kann. Zu diesen Substanzen zählen z.B. 17 β -D-Glukuronosyl-Estradiol, Leukotrien C₄ und S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion. Zusätzlich kann ABCC3 eine Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika wie Methotrexat, Etoposid und Teniposid vermitteln. ABCC3 trägt außerdem zur Detoxifikation von endogenen und exogenen Substanzen aus Hepatozyten unter Bedingungen bei, unter denen ihre Sekretion in die Galle beeinträchtigt ist (z.B. Dubin-Johnson-Syndrom). Genetische Varianten könnten daher den Transport dieser Substanzen unter den genannten Bedingungen beeinflussen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es (a) genetische Varianten von *ABCC3* zu identifizieren, (b) einen relativ häufigen ABCC3-Polymorphismus funktionell zu charakterisieren, und (c) zu analysieren, ob Bilirubin-Konjugate von ABCC3 transportiert werden.

Durch Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse des *ABCC3*-Gens wurden zwei nicht-synonyme ABCC3-Varianten identifiziert, welche eine Allel-Häufigkeit von 0,003 (1643T>A; ABCC3-Leu⁵⁴⁸Gln) und von 0,08 (3890G>A; ABCC3-Arg¹²⁹⁷His) aufwiesen. Aufgrund der Häufigkeit des 3890G>A Polymorphismus wurde die polymorphe Variante ABCC3-Arg¹²⁹⁷His funktionell analysiert. Dazu wurde der 3890G>A Basenaustausch durch gerichtete Mutagenese in die *ABCC3*-cDNA eingeführt und die daraus resultierende cDNA in die Hundenieren-Zelllinie MDCKII transfiziert. ABCC3-Arg¹²⁹⁷His lokalisierte ebenso wie ABCC3 in der basolateralen Membran der polarisierten MDCKII-Zellen. Für die funktionelle Charakterisierung von ABCC3-Arg¹²⁹⁷His wurden Transportstudien an isolierten Plasmamembranvesikeln dieser transfizierten Zellen durchgeführt. Monoglukuronosyl-Bilirubin, Bisglukuronosyl-Bilirubin und Dehydroepiandrosteron-3-Sulfat (DHEAS) wurden als Substrate sowohl von ABCC3 als auch von ABCC3-Arg¹²⁹⁷His identifiziert. Die prototypischen Substrate Leukotrien C₄ und 17 β -D-Glukuronosyl-Estradiol wurden mit einer ähnlichen Transportkinetik von ABCC3 und ABCC3-Arg¹²⁹⁷His transportiert. Da ABCC3-Arg¹²⁹⁷His korrekt in der basolateralen Membran lokalisiert war und keine signifikanten Transportunterschiede im Vergleich zu ABCC3 aufwies, zeigen Individuen mit der ABCC3-Arg¹²⁹⁷His-Variante wahrscheinlich keinen verminderten Transport von ABCC3-Substraten über die basolaterale Membran von Hepatozyten und anderen polarisierten Zellen. Die hier ausgearbeitete Versuchsanordnung kann als ein sinnvoller Weg zur funktionellen Analyse von polymorphen Varianten von ABCC3 und anderen Membrantransportern dienen. Zum ersten Mal beschreiben diese Untersuchungen die funktionellen Konsequenzen eines häufig vorkommenden ABCC3-Polymorphismus. Es zeigte sich zudem, dass jeder Polymorphismus auch funktionell charakterisiert werden muß, um seine physiologische Bedeutung abschätzen zu können. Erstmals wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Bilirubin-Glukuronoside Substrate für ABCC3 sind.