



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Physikalische und funktionelle Charakterisierung der
Promotorregion des humanen membranständigen putativen
Progesteron-Rezeptorgens *hpr6.6***

Autor: Sabine Bernauer
Institut / Klinik: Institut für Klinische Pharmakologie
Doktorvater: Prof. Dr. M. Wehling

Die physiologische Wirkung von Steroidhormonen wird über spezifische Interaktionen mit speziellen Steroidhormon-Rezeptoren determiniert. Steroidhormone können aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften durch Diffusion die zelluläre Plasmamembran passieren und sowohl an zytoplasmatische, als auch an nukleäre Rezeptoren binden. Der gebildete Rezeptor-Ligand-Komplex wirkt als Transkriptionsfaktor und stimuliert oder inhibiert auf diese Weise in Abhängigkeit von einem Hormonsignal die Transkription bestimmter Zielgene. Durch diese sogenannten genomischen Steroid-Effekte werden langanhaltende physiologische Veränderungen vermittelt, die durch Hemmung der Transkription und der Translation experimentell nachgewiesen werden können und frühestens nach ca. 10 Minuten auftreten.

Neben diesen genomischen Steroid-Effekten sind auch schnelle, nichtgenomische Effekte bekannt, die bereits im Sekunden- bis Minutenbereich nachweisbar sind, nicht durch Hemmung der Transkription- und Translation beeinflusst werden und somit nicht mit dem Mechanismus der klassischen, genomischen Effekte in Einklang gebracht werden können. Diese nichtgenomischen Effekte werden vermutlich durch spezifische Membran-Rezeptoren und eine nachgeschaltete *second messenger*-Signaltransduktion vermittelt, wobei aber bislang noch kein funktionelles Protein identifiziert werden konnte. Gleichzeitig wird ein „cross-talk“ zwischen diesen beiden Mechanismen der Steroidwirkung diskutiert. Unserer Arbeitsgruppe gelang es, in Membranen aus Leber von Schwein Bindungsstellen für Progesteron zu identifizieren, und mit HPR6.6 ein entsprechendes Protein zu charakterisieren, welches als membranständiger Rezeptor fungieren könnte, der nichtgenomische Progesteron-Effekte vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, in welchem regulatorischen Zusammenhang das *hpr6.6* Gen exprimiert wird. Dazu wurde die genomische Stromaufwärtsregion des *hpr6.6*-Gens physikalisch und funktionell charakterisiert. Ausgehend von der cDNA-Sequenz wurden genomische Klone von *hpr6.6* isoliert, aus denen anschließend durch ein „genomic walking“ die Stromaufwärtsregion dieses Locus kloniert und sequenziert wurde. In dieser Region wurde der Transkriptionsstartpunkt 233 bp stromaufwärts des Translationsstarts determiniert. Die Region des Transkriptionsstartpunkts zeigt auf Sequenzebene sehr starke Homologie zu einer sogenannten Initiatorregion, die als Initiationsstelle der RNA-Polymerase-II fungieren kann. Diese Befunde argumentieren für eine tatsächliche Relevanz des ermittelten Transkriptionsstartpunkts. Mittels der erhaltenen Sequenzinformation über die genomische Stromaufwärtsregion von *hpr6.6* konnte -durch Vergleich mit einem humanen HTGS-Klon- die Exon-Intron-Struktur des Gens ermittelt werden. Demnach besteht das *hpr6.6* Gen aus drei Exons von 559, 156 und 1314 Basenpaaren. Die vermutliche Transmembran-Domäne von *hpr6.6* wird komplett vom ersten Exon kodiert, was auf eine mögliche Korrelation von Exon-Intron-Grenzen und Proteindomänen hindeuten könnte. Die Größe der beiden Introns beträgt 3616 bzw. 2686 Basenpaare. Damit erstreckt sich der genomische Locus über mindestens 8,3 Kilobasenpaare.

Durch Datenbankvergleiche wurden auf der *hpr6.6*-Stromaufwärtssequenz *cis*-regulatorische Elemente identifiziert, die Transkriptionsfaktoren binden und genregulatorisch wirken können. Die funktionelle Bedeutung dieser *cis*-Elemente wurde diskutiert, so daß ein Modell der transkriptionellen Regulation von *hpr6.6* entwickelt werden konnte. In diesem Modell wird die Transkription von *hpr6.6* zum einen in Abhängigkeit von genomischen Glukokortikoid- (und eventuell Progesteron-) Effekten beeinflusst. Zum anderen werden auch „Feedback-Regulationen“ über einen nichtgenomischen Progesteron-Weg und den putativen membranständigen Progesteron-Rezeptor *hpr6.6* diskutiert. In

diesen „cross-talk“ könnten sowohl die nukleären Progesteron- und Glukokortikoid-Rezeptoren (genomische Effekte) als auch die Leber-spezifischen Transkriptionsfaktoren der HNF-Familie, cAMP-bindende Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsfaktoren im RAS-Signaltransduktionsweg (nicht-genomische Effekte) involviert sein, für die alle putative Bindestellen im regulatorischen Bereich von *hpr6.6* detektiert wurden.

Ein weiterer Mechanismus, über den höchstwahrscheinlich die Expression von *hpr6.6* reguliert wird, ist die Induzierbarkeit durch Xenobiotika wie Dioxin. Im Promotor von *hpr6.6* wurden mehrere putative Bindestellen für den Dioxin-Rezeptor AhR gefunden, was zusammen mit der beschriebenen Dioxin-Induzierbarkeit des orthologen Gens *25-Dx* aus der Ratte stark für einen regulatorischen Einfluß von Xenobiotika auf die Transkription von *hpr6.6* spricht.

Funktionell wurde der klonierte *hpr6.6*-Promotor in einem Reporter-gen-Assay untersucht. Dazu wurden verschieden deletierte DNA-Fragmente des Promotors mit einem GFP-Reporter-gen fusioniert und in CHO-Zellen transfiziert. Die Expression dieser *hpr6.6*-Promotor-GFP-Fusionsgene wurde mit Hilfe von Laser-Scanning-Mikroskopie quantifiziert und so die Kinetik der transienten Expression und Unterschiede zwischen der Expressivität der verschiedenen Fusionsgene ermittelt.