

Yunhai Cui  
Dr. sc. hum.

## **Expression und Charakterisierung des apikalen Multidrug Resistance-Proteins, MRP2, in Säugetier-Zelllinien**

Geboren am 06.07.1970 in Shanghai, VR China  
Reifeprüfung am 12.07.1991 in Heidelberg  
Studiengang Chemie (Diplom) von WS 1991 bis WS1995  
Vordiplom am 19.07.1993 an der Universität Stuttgart  
Diplom am 06.02.1996 an der Universität Stuttgart

Institut: Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung Tumorbiochemie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. D. Keppler

Mehrere Mechanismen der Mehrfachresistenz (MDR) von Tumorzellen gegenüber Zytostatika wurden bis heute identifiziert. Unter anderem führt eine Überexpression des Multidrug Resistance-Proteins MRP1, einer Konjugat-Export-Pumpe der ABC-Transporter-Superfamilie, zur vermehrten Ausscheidung verschiedener Zytostatika und somit zur Mehrfachresistenz. Unsere Arbeitsgruppe hat vor kurzem das *MRP2*-Gen, welches für eine Isoform von MRP1 kodiert, kloniert und sequenziert. Untersuchungen mit MRP2-defizienten Mutanten-Ratten ergaben, daß beide Transporter ein ähnliches Substratspektrum aufweisen. Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten aber, daß MRP2, im Gegensatz zum basolateral lokalisierten MRP1, ausschließlich in der apikalen Membran von polaren Epithelzellen lokalisiert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die *MRP2*-cDNA von Ratte und Mensch in verschiedene Säugetierzelllinien (COS7, HEK293 und MDCK II) stabil transfiziert. Die Expression des entsprechenden Proteins in diesen Transfektanten wurde durch Behandlung mit Natriumbutyrat und Trichostatin A, beides Inhibitoren der Histon-Deacetylase, signifikant gesteigert. In transfizierten HEK293-Zellen ist das rekombinante MRP2 überwiegend in intrazellulären Membranen lokalisiert. Das Protein ist jedoch voll glykosyliert und funktionell aktiv. In MDCK-Zellen, einer polar wachsenden Zelllinie, wurde sowohl MRP2 der Ratte als auch humanes MRP2 in die apikale Membran eingebaut. Eine Behandlung mit Tunicamycin, die zur Hemmung der N-Glykosylierung des MRP2 in den Transfektanten führte, beeinflusste die apikale Lokalisation des MRP2 in diesen Zellen nicht. Mit dem Antikörper MDK, der gegen den Amino-Terminus des Ratten-MRP2 gerichtet ist, konnte das rekombinante Protein in der apikalen Membran von nicht-permeabilisierten MDCK-Zellen erfaßt werden. Dies belegt eine extrazelluläre Lokalisation des Amino-Terminus von MRP2.

Der von rekombinantem MRP2 vermittelte Transport wurde an isolierten Membranvesikeln aus transfizierten HEK293-Zellen gemessen. Der  $K_m$ -Wert des humanen MRP2 betrug für Leukotrien C<sub>4</sub>  $1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$  und für  $17\beta$ -Glucuronosyl-estradiol  $7,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$ . Im Vergleich dazu weist humanes MRP1 für LTC<sub>4</sub> einen  $K_m$ -Wert von  $0,1 \pm 0,02 \mu\text{M}$  und für  $17\beta$ -Glucuronosyl-estradiol einen  $K_m$ -Wert von  $1,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$  auf. Demnach unterscheiden sich MRP1 und MRP2 nicht nur in ihrer zellulären Lokalisation, sondern auch in ihren kinetischen Eigenschaften.

Die MRP2-vermittelte Resistenz gegenüber Zytostatika wurde ebenfalls in stabil transfizierten HEK293- und MDCK-Zellen mit dem MTT-Zellviabilitätstest untersucht. Die Expression von Ratten- bzw. Human-MRP2 steigerte die Resistenz von MDCK-Zellen gegenüber Etoposid um das 3,8- bzw. 5-fache und gegenüber Vincristin um das 6- bzw. 2,3-fache. Die MRP2-vermittelte Resistenz gegenüber diesen beiden Zytostatika konnte durch

Buthioninsulfoximin verringert werden, was eine Beteiligung des intrazellulären Glutathions an der Resistenz nahelegt. In den HEK293-Zellen führte die Überexpression von humanem MRP2 durch Transfektion zur gesteigerten Resistenz gegenüber Etoposid (4-fach), Cisplatin (10-fach), Doxorubicin (7,8-fach) und Epirubicin (5-fach). Diese Ergebnisse zeigen erstmals, daß MRP2 eine Resistenz gegenüber diesen zytostatisch wirksamen Substanzen vermitteln kann.