

Birgit Stöckel

Dr. sc. hum.

Transkriptionelle Regulation der Konjugat-Exportpumpen MRP2 und MRP3

Geboren am 31.07.1972 in Landau/Pfalz

Reifeprüfung am 04.06.1991

Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1991 bis SS 1996

Vordiplom am 21.10.1993 an der Universität Kaiserslautern

Diplom am 28.08.1996 an der Universität Kaiserslautern

Institut: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. D. Keppler

Das Multidrug Resistance-Protein 1 (MRP1) (Symbol ABCC1) wurde ursprünglich aufgrund seiner Überexpression in Tumorzellen identifiziert und später auch in normalen Geweben nachgewiesen. In unserer Arbeitsgruppe wurden zwei Isoformen von MRP1, nämlich MRP2 (Symbol ABCC2) und MRP3 (Symbol ABCC3), kloniert und charakterisiert. MRP2 und MRP3 sind ATP-abhängige Konjugat-Exportpumpen und vermitteln eine Resistenz von Zellen gegenüber verschiedenen Zytostatika. Beide Proteine werden besonders in Hepatozyten exprimiert, wobei MRP2 in der kanalikulären (apikalen) Membran und MRP3 in der basolateralen Membran lokalisiert ist. *MRP2*-mRNA wird unter normalen Bedingungen stark exprimiert, während die *MRP3*-Expression unter diesen Bedingungen niedrig ist. MRP3 wird jedoch induziert, wenn die Sekretion durch *MRP2* über die apikale Membran vermindert ist oder ausfällt. Dies gilt unter Bedingungen der Cholestase oder bei hereditärem Ausfall des MRP2-Proteins, wie beim Dubin-Johnson-Syndrom des Menschen.

Bisher war über die Regulation der humanen *MRP2*- und *MRP3*-Expression wenig bekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Teil der 5'-regulatorischen Region des humanen *MRP2*-Gens aus einer genomischen DNA-Bibliothek isoliert, 1229 Nukleotide sequenziert und die dort befindlichen Promotorelemente teilweise charakterisiert. Mit mehreren *MRP2*-Promotor-Deletionskonstrukten wurden Luciferase-Reporterassays in HepG2-Zellen durchgeführt. Hierdurch wurde gezeigt, daß die Elemente zwischen den Nukleotiden -517 und -197, ausgehend vom ATG-Startcodon, für die basale *MRP2*-Expression verantwortlich sind. Weiterhin wurden 1287 Nukleotide der bereits bekannten 5'-flankierenden Region des

MRP3-Gens kloniert und Reporteragenassays analog zu denen am *MRP2*-Gen durchgeführt. Die Promotoraktivität von *MRP3* in HepG2-Zellen betrug unter gleichen Bedingungen nur 4 % der für *MRP2* gemessenen Aktivität. Die Wirkung verschiedener Substanzen auf die *MRP2*- und *MRP3*-Expression wurde untersucht: Der Histondesacetylase-Inhibitor Trichostatin A verminderte die *MRP2*-Reporteragenaktivität und die Menge von endogenem *MRP2*-Protein und *MRP2*-mRNA. Nocodazol, ein Hemmstoff der Polymerisation von Tubulin, verminderte die *MRP2*-Reporteragenaktivität, die mRNA- und Protein-Expression und die Anzahl von *MRP2*-positiven apikalen Vakuolen in HepG2-Zellen. Eine Änderung der *MRP3*-Protein-Expression nach Nocodazol-Behandlung war nicht nachweisbar, wobei die *MRP3*-Reporteragenaktivität stark anstieg und auch die mRNA-Expression zunahm. 2-Acetyl-aminofluoren verminderte die Aktivität des *MRP2*-Promotors im Reporteragenassay, steigerte jedoch die *MRP3*-Promotoraktivität. Weiterhin verursachte 2-Acetyl-aminofluoren einen Anstieg von *MRP2*- und *MRP3*-Protein- und mRNA-Expression. Diese Daten zeigen, daß die Regulation der Expression der untersuchten ATP-abhängigen Konjugat-Exportpumpen der MRP-Familie in HepG2-Zellen nicht koordiniert, sondern zumindest teilweise invers abläuft. Die inverse Regulation beider MRP-Isoformen steht im Einklang mit ihrer unterschiedlichen mRNA-Expression unter normalen und cholestatischen Bedingungen und mit ihrer unterschiedlichen Lokalisation in polarisierten Zellen.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit liefern die Voraussetzung für eine vertiefte Charakterisierung einzelner Promotorelemente, die für die Basalexpression von *MRP2* und für die Vermittlung der Wirkung von Induktoren und Hemmstoffen von Bedeutung sind. Die Daten dienen dem Verständnis der Regulation von zwei MRP-Isoformen, die unter anderem zur Resistenz gegenüber Zytostatika führen können.