

Judith Wurz  
Dr. med.

## **Extrahepatische Lokalisation und Gewebeexpression von ATP7B in der Maus und funktionelle Analyse der kupferabhängigen Translokation von ATP7B im Zellmodell**

Geboren am 08.12.1979 in Rastatt

Staatsexamen am 04.06.2008 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.- Doz. Dr. rer. nat. Joachim Füllekrug

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde die Lokalisation und Expression des endogenen Wilson Proteins ATP7B im murinen Gastrointestinaltrakt unter Anwendung verschiedenster Techniken untersucht.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzen konnte gezeigt werden, dass das Wilson Protein sowohl in der Epithelschicht der Magendrüsen als auch in den Enterozyten des Dünndarms exprimiert wird. Der Hauptanteil ließ sich in den Zotten und Krypten des Duodenums und Jejunums nachweisen, wohingegen in den Krypten des Ileums lediglich eine schwache Expression ersichtlich war. Kofärbungen von ATP7B mit apikalen, basolateralen und Golgi-Markern konnten aufdecken, dass sich das Wilson Protein perinucleär im Golgi-Netzwerk konzentrierte. Im gesamten Dickdarm ließ sich das Protein nicht nachweisen.

Auch Western-Blot-Analysen bestätigten die Expression von ATP7B im oberen Gastrointestinaltrakt der Maus. Weiterhin korrelierten die Daten der quantitativen Messung der ATP7B-Expression im Gewebe mittels LC-PCR exakt mit den Ergebnissen der IF, denn auch hier wurde die Hauptmenge des Proteins in Duodenum, Jejunum und im Magen der Maus aufgedeckt, wohingegen es im Ileum nur gering, und im Kolon nicht nachzuweisen war. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Wilson Protein ATP7B neben seiner bekannten Hauptlokalisierung in der Leber zur Regulierung der biliären Kupferexkretion auch in relevanten Mengen im Magen und Dünndarm exprimiert wird. Hieraus lassen sich folgende funktionelle Rollen für ATP7B ableiten. Es wäre denkbar, dass das Protein im Gastrointestinaltrakt wie auch in der Leber den Kupfereinbau in Coeruloplasmin vermittelt oder sich an der Synthese eines anderen Cuproenzym, wie z.B. Hephaestin beteiligt. Eine weitere Rolle könnte ATP7B im Darm bei der Kupferhomöostase zukommen. Zum einen könnte die Kupferaufnahme bereits auf Ebene der Resorption durch die Enterozyten reguliert werden, sobald die Zellen eine Kupferüberladung aufweisen. Dies wäre z.B. möglich durch

den vorübergehenden Einbau von Kupfer in Metallothionein mittels ATP7B oder durch Translokation von ATP7B zur apikalen Membran, um überschüssiges Kupfer zurück ins intestinale Lumen zu pumpen. Zum anderen wäre es auch denkbar, dass ATP7B durch seine Expression in vielen Geweben und Zellen eine Art housekeeping Funktion besitzt, um den Organismus vor einer Kupferüberladung zu bewahren.

Eine Koexpression von ATP7A und ATP7B sowohl im Gastrointestinaltrakt als auch in anderen extrahepatischen Geweben legt auch die Möglichkeit nahe, dass sowohl ATP7A als auch ATP7B an der zellulären und systemischen Kupferhomöostase beteiligt sein könnten und die intestinale Kupferabsorption durch unterschiedliche funktionelle Aufgaben regulieren. ATP7A scheint die Kupferabgabe über einen direkten Transport zur basolateralen Membran zu ermöglichen, wohingegen ATP7B die Kupferabgabe durch apikalen oder kanalikulären Transport zu begünstigen scheint.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurden die Vorgänge der Redistribution und Relokalisation von ATP7B an verschiedenen polarisierten Zelllinien untersucht und ein quantitativer Assay zur Messung der Translokation etabliert. Dieser wurde validiert und zeigte erwartungsgemäß, dass es sich bei der Translokation von ATP7B um einen temperaturabhängigen Transportprozess handelt. Außerdem wurde ersichtlich, dass dieser Vorgang unabhängig von einer Proteinneusynthese ist, und vielmehr durch bereits vorhandene ATP7B-Transporter bewerkstelligt wird.

In die Betrachtungen mit einbezogen wurde eine intestinale Zelllinie (CaCo2-Zellen), eine hepatische Karzinomzelllinie (HepG2-Zellen) sowie eine Nierenzelllinie (MDCK-Zellen). In allen drei Zelllinien zeigte sich, dass die Translokation des Wilson Proteins durch Kupfer induzierbar ist, da sich das perinucleäre Signal unter Kupferexposition abschwächte und sich stattdessen vesikulär im Cytoplasma verteilte.

Ein ähnlicher, wenn auch etwas geringerer Effekt wie unter Kupfer ließ sich auch durch Zink und Cisplatin hervorrufen. Die Analyse der ATP7B-Expression in Tumoren könnte somit für die Wahl des richtigen Therapieverfahrens relevant sein, da ATP7B-positive Tumoren vermutlich in der Lage sind, eine Resistenz gegenüber Cisplatin zu erzeugen.

Mit Hilfe des von uns etablierten Assays ließ sich die Translokation von ATP7B unter Kupfer- Zink- und Cisplatinexposition zu verschiedenen Zeitpunkten quantitativ erfassen. Im weiteren Verlauf konnte eine Translokationsdynamik zu verschiedenen Expositionszeiten ermittelt und analysiert werden.