

Claudia Ditzen
Dr. med.

Charakterisierung des Wilson Proteins in SY5Y-Zellen und Interaktion mit dem Amyloid Vorläuferprotein

Geboren am 22.09.1976 in Mainz.
Staatsexamen am 18.06.2003 an der Universität Heidelberg.

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. W. Stremmel

Das Wilson Protein wird in SY5Y-Zellen exprimiert. Untersuchungen an SY5Y-Zellen, als Abkömmling einer humanen Neuroblastomzelllinie, dienen der Erforschung grundlegender neuronaler Stoffwechselfvorgänge. Folglich kann dieses Ergebnis dazu dienen, ein Modell für neuronale WDP Expression zu etablieren .

Die Proteinmenge des Wilson Proteins in SY5Y-Zellen ist unabhängig von der Kupferkonzentration. Eine veränderte Kupferkonzentration führt weder zu einem intrazellulären Anstieg noch zu einer Abnahme des Proteins. Auch andere Metallionen wie Eisen (III) oder Zink (II) beeinflussen die Expression des Wilson Proteins nicht.

Die Lokalisation des Wilson Proteins in Neuronen ist kupferkonzentrationsabhängig. Unter Normalbedingungen ist das Protein größtenteils im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert, während es sich bei erhöhter Kupferkonzentration in ein cytoplasmatisches vesikuläres Kompartiment reversibel umverteilt. Diese Ergebnisse stimmen mit in Leberzellen und –gewebe beobachteten Redistributionseffekten des Proteins überein.

Um eine mögliche Interaktion zwischen Wilson Protein und Amyloid Vorläuferprotein zu untersuchen, wurden SY5Y-Zellen mit zwei verschiedenen Isoformen des Amyloid Vorläufer- proteins (APP 695 und APP 770) transient und stabil transfiziert. Der erfolgreiche Transfektionsvorgang wurde durch Immunpräzipitation eines Markerepitopes (c-myc Epitop) in den transfizierten Plasmiden erkennbar. Eine Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen APP zeigte in den transfizierten Zelllinien eine Überexpression von APP. Eine durch Transfektion bewirkte zelluläre Überexpression von APP 695 und APP 770 in SY5Y- Zellen verändert die Wilson Protein Expression auf Western Blot Ebene. In den transfizierten Zelllinien verringerte sich die durch Immunoblot erfassbare Proteinmenge. Bei Überexpression der 770-Isoform ist die Abnahme dabei ausgeprägter als bei vermehrter Bildung der 695- Isoform.

Eine zelluläre Überexpression der APP 695- und APP 770-Isoformen hat keinen Einfluß auf die intrazelluläre Lokalisation des Wilson Proteins in neuronalen Zellen. Das WDP findet

sich, wie unter Normalbedingungen, in einem perinukleären Bereich der Zelle, vor allem dem TGN zu-gehörig.

Die Expression des APP wurde in vivo an Lebergewebe von APP knock-out-, Wilson knock-out- und Kontrollmäusen untersucht. Bei Wilson k.o. Tieren ist die APP Expression in der Leber höher als bei Kontrolltieren. Die APP-Banden im Western Blot waren von deutlich stärkerer Intensität als die der Vergleichsproben. Eine vermehrte Bildung des APP, um den Funktionsverlust des Wilson Proteins bei Wilson k.o. Tieren zu kompensieren, wird diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit konnten Interaktionen zwischen dem Wilson Protein und dem Amyloid Vorläuferprotein demonstriert werden. Ein Fehlen des WDP wird möglicherweise durch vermehrte Bildung des APP ausgeglichen, um dessen Funktion zum Teil zu übernehmen. Das Wilson Protein seinerseits reagiert in unserer Studie auf ein verändertes APP Vorkommen insofern, dass seine Gesamtmenge bei zellulärer APP-Überexpression abnimmt. Welche Einzelschritte zu diesen Veränderungen führen und inwiefern das eine Protein die Rolle des anderen in der Erhaltung der Körperkupferhomöostase zu übernehmen vermag, scheint in zukünftigen Untersuchungen klärenswert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch in neuronalen Zellen das Wilson Protein exprimiert wird und dort offensichtlich denselben Regulationsmechanismen unterliegt wie in Leberzellen. Ob auch die Dysfunktion des Proteins in Nervenzellen maßgeblich zu den neurologischen Symptomen beim Morbus Wilson beiträgt und letztere nicht nur durch die allgemeine systemische Kupferanreicherung aus übersättigtem Lebergewebe hervorgerufen werden, sollte durch weitere Forschung auf diesem Gebiet geklärt werden.