



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

**Studien zur Metallionenhomöostase des Amyloid-Vorläuferproteins
und des Prion-Proteins *in vivo***

Autor: Carina Treiber
Institut / Klinik: Institut für Molekularbiologie und Zellkulturtechnik
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Sowohl bei der Alzheimer Krankheit als auch bei Übertragbaren Spongiformen Enzephalopathien ist das zugrunde liegende Protein (Amyloid-Vorläuferprotein (APP) bzw. Prion-Protein (PrP)) ein Metallbindendes Protein, dessen jeweilige biologische Funktion nur unzureichend geklärt ist. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die Rolle der beiden Proteine bzgl. ihrer Beteiligung an der zellulären Metallionenhomöostase in eukaryontischen Zellen untersucht werden.

Als Modellsystem für die rekombinante Expression von APP und PrP wurde die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* verwendet. Dabei wurde die N-terminale kupferbindende Domäne von APP (APP18-350) der humanen Sequenz und das glykosylierte Vollängen-Prion-Protein (PrP23-230) der murinen Sequenz aus dem Hefemedium bzw. den Zellen gereinigt.

Für beide Proteine konnte eine Beteiligung an der zellulären Kupferhomöostase gezeigt werden. Die Expression von APP18-350 führte zu einem um 40 % reduzierten intrazellulären Kupferspiegel, während intrazelluläres PrP23-230 den zellulären Kupferspiegel verdoppelte und den Mangan- bzw. Kobaltspiegel halbierte. Dies zeigt, dass die extrazelluläre Domäne in APP die treibende Kraft für den Kupferexport darstellt, während PrP23-230 in Hefen wahrscheinlich durch die Bindung von Kupfer den Export dieses Metallions blockiert. Dass die Expression dieser Proteine einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Kupfer hat, konnte anhand der Messung der zytoplasmatischen Superoxiddismutase-Aktivität bestimmt werden. Diese korrelierte in beiden Fällen mit dem intrazellulären Kupferspiegel.

Überdies konnten durch einen Überschuss an Kupfer im Kulturmedium die Kupferexporteigenschaften von APP18-350 ebenfalls nachgewiesen werden. Bei PrP23-230 exprimierenden Zellen wurde unter Kupferstressbedingungen die intrazelluläre Kupferkonzentration im Vergleich zu Leervektor transfizierten Zellen um ein Drittel herunterreguliert. Zusätzlich nimmt PrP23-230 unter dem Einfluss von Kupfer eine SOD-ähnliche Funktion an und schützt die Zelle vor oxidativem Stress. Diese veränderten bzw. zusätzlichen Funktionen von PrP23-230, die spezifisch bei Kupferstress auftraten, setzen die Bildung eines PK-resistenten Intermediates voraus, das auch durch Zugabe von Manganionen zum Medium, nicht aber durch Kobaltionen, induziert werden konnte. Die Tatsache, dass die Zugabe von EDTA zum Zellysat den PK-resistenten Zustand dieser Proteine nicht revertieren konnte, macht deutlich, dass die Metallionen in ihrer reduzierten Form während der Proteinfaltung *in vivo* die Struktur von PrP23-230 massgeblich beeinflussen. Zusammenfassend sprechen die Daten dafür, dass PrP unter verschiedenen physiologischen Bedingungen multiple Funktionen einnehmen kann. Zur Untermauerung dieser Daten wurden die Bindungsstellen und die Kinetik der Bindung dieser drei Metallionen mittels „Surface Plasmon-Resonance“ (SPR) bestimmt.

Die in der Literatur beschriebene kontroverse Beobachtung, dass sich sowohl die Verabreichung des Kupferchelators Clioquinol (CQ) sowie auch die Gabe von Kupfer vorteilhaft auf Modelle der Alzheimerkrankheit auswirkt, wurde hier auf molekularer Ebene mittels des oben beschriebenen Expressionssystems ohne endogenen Hintergrund analysiert. Während die Supplementierung des Induktionsmediums mit CQ lethale Wirkung hatte, erhöhte die Zugabe von CQ/Kupfer-Komplexen die intrazelluläre Kupferkonzentration drastisch. Damit ergibt sich die völlig neuartige Hypothese, dass CQ als Transporter fungiert und somit von therapeutischem Nutzen ist, indem er die Kupferaufnahme erleichtert.