

## Die Funktion der Externen Loops von humanem Coeruloplasmin in der Kupferbeladung durch ATP7B und Ccc2p

Coeruloplasmin ist eine für die korrekte Eisenhomöostase notwendige Multi-Kupfer-Oxidase. Bislang haben wir eine Coeruloplasmin-Mutante identifiziert, die mit der Eisenüberladungs-Krankheit Acaeruloplasminämie assoziiert ist. Diese Mutante war nicht dazu in der Lage Kupfer von der Säugetier-Pumpe ATP7B aufzunehmen, konnte aber in enzymatisch aktiver Form in Hefe produziert werden. Hier berichten wir über die Expression von rekombinantem Coeruloplasmin in der Hefe *Pichia pastoris* und die Untersuchung der Funktion von fünf an der Oberfläche liegenden Loops bei der Kupferaufnahme durch einen Effizienzvergleich zwischen Säugetier-ATP7B und Hefe-Ccc2p. Die Möglichkeit die Säugetier- und Hefe- Multi-Kupfer-Oxidasen und Kupfer-ATPasen miteinander zu vermischen kann Einblicke in die dem Kupferbeladungsprozess zugrundeliegenden molekularen Mechanismen geben.

Coeruloplasmin (Cp) ist ein komplexes, in Wirbeltieren vorkommendes Protein, das zur Familie der Multi-Kupfer-Oxidasen gehört. Diese Proteine können die Oxidation eines einzelnen Elektrons eines Substrates an die komplette Reduktion von Disauerstoff zu Wasser koppeln. Multi-Kupfer-Oxidasen haben mehrere Kupferbindungsstellen mit unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften; Typ 1 (blaues) Kupfer ist der primäre Elektronenakzeptor vom Substrat, während ein aus Typ 2 und binuklearem Typ 3 Kupfer bestehendes trinukleares Cluster die Sauerstoffbindungsstelle und die Reduktionsstelle bildet (1). Cp ist ein Multidomänenprotein aus sechs Plastocyanin-ähnlichen Domänen, wobei die Verbindung zwischen den Domänen 6 und 1 das katalytisch erforderliche trinukleare Kupfercluster beherbergt und die Domänen 2, 4 und 6 jeweils eine Typ 1 Kupferstelle besitzen. Hauptsächlich wird Cp von den Hepatozyten freigesetzt, in welchen die P-Typ ATPase ATP7B während des Transports durch das trans-Golgi-Netzwerk das Kupfer in Apo-Cp inkorporiert. Außerdem wurde eine Form von Cp mit GPI-Anker (Cp-GPI) identifiziert, welche vor allem im Gehirn vorkommt, wo es auf der Plasmamembran von Astrozyten anzufinden ist (3). Diese Isoform wird durch alternatives Spleißen synthetisiert, was den Austausch der fünf C-terminalen Aminosäuren des freigesetzten Proteins durch 30 alternative Reste, die zur Addition des GPI-Ankers führen, verursacht (4). Die Ferroxidase-Aktivität von Cp ist für die richtige Eisenhomöostase notwendig; ein Mangel an oxidierendem Cp führt zur Internalisierung und zum Abbau von Ferroportin (Fpn), dem einzigen in Säugetieren bekannten Eisenexportprotein. Des weiteren können Gendefekte des Cp-Gens zu Acaeruloplasminämie führen, einer seltenen autosomalen Erbkrankheit der Eisenüberladung mit klinischen Manifestationen; darunter Netzhautdegeneration, Diabetes mellitus und neurologische Symptome, einschließlich Ataxie, unwillkürlichen Bewegungen und Demenz (6). Mit Acaeruloplasminämie assoziierte Missense-Mutanten von Cp werden langsam charakterisiert und können grob in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, entsprechend ihrer Fähigkeit Fpn auf der Plasmamembran von Zellen mit stillgelegtem endogenem Cp-GPI-Gen zu stabilisieren. Nichtfunktionale Mutanten sind auf Grund der Retention im endoplasmatischen Retikulum oder Absonderung als Apo-Cp ohne Kupfer inaktiv und teilweise oder komplett funktionelle Mutanten sind enzymatisch aktiv. Cp-Mutante R701W ist untypisch dadurch, dass sie in einem ungewöhnlich jungem Patienten in heterozygoter Form gefunden wurde (7).

Wie bereits von uns berichtet, ist Cp R701W nicht fähig durch ATP7B mit Kupfer beladen zu werden, kann das prosthetische Metall aber von der Hefe-Kupfer-ATPase Ccc2p annehmen. Zudem ist diese Mutante dominant gegenüber dem Cp Wildtyp und veranlasst die Zerteilung des Golgi-Komplexes und Relokalisierung von ATP7B (8). Arg701 ist in einem großen, freiliegenden Loop, der Domänen 4 und 5 verbindet, gelegen. Entsprechende Loops verbinden auch die anderen Domänen von Cp. Trotz eines nur geringen Grades an Sequenzhomologie beginnen all diese Loops mit einem CX(R/K)-Motiv, wobei der Cystein-Rest durch die Bildung einer Disulfidbrücke den Loop stabilisiert (Abb. 1 und ergänzende Abb. S1). Vor kurzem haben wir gezeigt, dass die Mutation von Cps basischen Resten Lys340 oder Arg883 auf zwei dieser Loops den raschen Abbau von Fpn bewirkt. Im Gegensatz zu der homologen Mutante R701W wurden die K340W und R883W Mutanten aber als nicht über den Cp Wildtyp dominant befunden. Andererseits sind alle drei Mutanten (R701W, K340W und R883W) enzymatisch aktiv, wenn sie in Hefe produziert werden (8). Durch diese Ergebnisse wird nahegelegt, dass Cp Loops eine entscheidende Rolle in der Kupferaufnahme spielen könnten und dass der Prozess der Kupferbeladung in Hefe strukturell weniger anspruchsvoll ist als in Säugetieren.

Die heterologe Expression von Multi-Kupfer-Oxidasen ist generell recht schwierig; begutachtet man die bestehende Literatur, zeigt sich, dass Bakterien nur für die Expression von prokaryotischen Multi-Kupfer-Oxidasen zu gebrauchen sind. In Hefe-, Säugetier- und Insektenzellen wurden die eukaryotischen Enzyme mit unterschiedlichem Erfolg exprimiert. Humanes Cp wurde in der methylophilen Hefe *Pichia pastoris* unter Kontrolle des induzierbaren AOX1-Promoters produziert (9). Aber nicht nur war die Ausbeute deutlich unter 1mg/Liter, sondern die ganze Prozedur war recht kompliziert und dauerte mehrere Tage. In dieser Arbeit haben wir ein neues System erschaffen, welches auf einem genetisch verändertern *P. pastoris* Stamm mit einem inaktivierten Gen für endogene Ferroxidase Fet3p basiert ist. Dabei haben wir den starken konstitutiven Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Promoter verwendet, um die Expression von rekombinantem Cp zu steuern. Der Grund für die Verwendung eines fet3A Stammes war das Verhindern einer Kontamination des rekombinanten Cps durch die endogene Hefe-Ferroxidase.

Die Expression von Cp-Mutanten in diesem System hat es uns ermöglicht, unsere Forschung auf eine ungewöhnliche dominante negative Cp-Mutante zu erweitern, die in Assoziation zu Acaeruloplasminämie steht, sprich R701W. Des weiteren wurde die Rolle aller an der Oberfläche liegenden Loops in der Kupferaufnahme analysiert, indem die Fähigkeit von Hefe-ATPase Ccc2p und ihrem Säugetier-Homolog ATP7B, Kupfer an Cp zu liefern, verglichen wurde. Die Möglichkeit die Säugetier- und Hefe-Ferroxidasen und Kupfer-ATPasen zu vermischen kann Einblicke in den molekularen Ablauf der Kupferinkorporation in komplexe Proteine, wie z. B. die Multi-Kupfer-Oxidasen, ermöglichen.