

# Synaptotagmin I: Palmitoylierung und intrazelluläre Prozessierung



Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Dr. rer. nat. (Doctor rerum naturalium)

eingereicht am Fachbereich  
Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

ULRICH HEINDEL  
Lebensmittelchemiker aus Bautzen

Berlin 2001

---

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Konrad Seppelt  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ferdinand Hucho  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael FG Schmidt  
  
Tag der Disputation: 13. September 2001

---

---

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immunologie und Molekularbiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin angefertigt. Ich danke Herrn Prof. Dr. M.F.G. Schmidt für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen, die stets gewährte fachliche und menschliche Unterstützung und sein Engagement zum Gelingen dieser Arbeit.

Initiiert und gefördert wurde diese Arbeit von Herrn Dr. Michael Veit. Ihm danke ich besonders für die Überlassung des Themas, die zur Verfügung gestellten finanziellen Mittel und die unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. F. Hucho danke ich herzlich für seine Bereitschaft, mich am Fachbereich Biologie, Pharmazie, Chemie der FU Berlin zu vertreten und diese Arbeit zu begutachten.

Frau Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger danke ich für die Bereitstellung der BON-Zellen und die fachliche Beratung.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Paul Foley und Herrn Prof. Klaus Überla für die freundliche Bereitstellung der PC12-Zellen, die anregenden fachlichen Gespräche und die einzigartige Möglichkeit, einen Teil der Experimente für diese Arbeit, vor allem konfokale Fluoreszenzuntersuchungen, am Institut für Virologie der Universität Leipzig durchführen zu können.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Immunologie und Molekularbiologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und die stets freundliche und kollegiale Atmosphäre. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Evgeni Ponimaskin, der mich geduldig in für mich neue gentechnologische Arbeitstechniken eingeführt hat, Frau E. Lyhs, Frau I. Poese und Frau K. Ullrich für ihre ausgezeichnete technische Unterstützung sowie Bettina Kammer für die unzähligen Motivierungsversuche und Frau I. Grunwald für das kritische Lesen und Korrigieren des Manuskriptes.

---

---

# INHALT

<b>1</b>	<b>EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK</b>	<b>1</b>
1.1	Einleitung	1
1.2	Synaptotagmine und ihre Funktionen	2
1.3	Synaptotagmin I	6
1.4	Hydrophobe Proteinmodifikationen	9
1.4.1	Myristoylierung	9
1.4.2	Modifikation mit Glykolipiden	10
1.4.3	S-Acylierung	10
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
3.1	Material	17
3.1.1	Chemikalien/Enzyme/“Kits“	17
3.1.2	Zelllinien/Gene/Antiseren	18
3.1.2.1	Zelllinien	18
3.1.2.2	Bakterienstämme	18
3.1.2.3	Gene	18
3.1.2.4	Antiseren	18
3.1.3	Geräte/Dokumentation	19
3.1.4	Lösungen / Medien	19
3.2	Methoden	20
3.2.1	Zellkultur	20
3.2.2	Molekularbiologische Arbeiten	21
3.2.2.1	Umklonierung	21
3.2.2.1.1	Restriktionsendonuklease-Verdau	21
3.2.2.1.2	Phosphatase-Behandlung	21
3.2.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	22
3.2.2.1.4	Reinigung der DNA aus Agarosegelen	22
3.2.2.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten	23
3.2.2.1.6	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	23
3.2.2.1.7	Transformation von Bakterienzellen	23

---

---

3.2.2.1.8	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	24
3.2.2.1.9	Analytischer Enzymverdau	26
3.2.2.2	Ortsgerichtete Mutagenese	26
3.2.2.2.1	Overlap-Extention-PCR	26
3.2.2.2.2	DNA Oligonukleotide	28
3.2.2.3	DNA-Sequenzierung	28
3.2.2.4	Herstellung von Synaptotagmin-Deletionsmutanten	30
3.2.3	<i>Vacciniavirus-Expression</i>	32
3.2.4	<i>Proteincharakterisierung</i>	33
3.2.4.1	Radioaktive Markierung	33
3.2.4.2	Immunpräzipitation	34
3.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
3.2.4.4	Pulse-Chase, Endo-H- und PNGase-F-Verdau	34
3.2.4.5	Zellfraktionierung im Saccharose-Gradienten	35
3.2.4.6	Indirekte Immunfluoreszenz	36
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
4.1	<b>Ortsgerichtete Mutagenese des Synaptotagmin-Gens</b>	<b>38</b>
4.2	<b>Expression des Synaptotagmin-Gens in Säugerzellen</b>	<b>41</b>
4.3	<b>Glykosylierung</b>	<b>43</b>
4.4	<b>Expression der Synaptotagmin-Mutanten in Säugerzellen</b>	<b>44</b>
4.5	<b>Palmitoylierung der Synaptotagmin-Mutanten</b>	<b>45</b>
4.6	<b>Pulse-Chase Experimente von Wildtyp und Mutante syt mut47</b>	<b>47</b>
4.7	<b>Einfache Zellfraktionierung</b>	<b>50</b>
4.8	<b>Umklonierung des Synaptotagmin-Gens</b>	<b>52</b>
4.9	<b>Indirekte Immunfluoreszenz</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>82</b>

---

---

## ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinder-Serumalbumin)
Ci	Curie
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> (Alkalische-Phosphatase)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
Endo H	Endoglykosidase H
FKS	fötales Kälberserum
LZ	Laborzentrifuge
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Verhältnis Viren/Zellen bei Infektion)
mut	Mutante
NGF	<i>nerve growth factor</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFU	<i>plaque forming units</i> (Plaque bildende Einheiten)
PNGaseF	Peptid-N-Glykosidase F
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SYT	Synaptotagmin
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
UpM	Umdrehungen pro Minute
vTF7-3	rekombinanter Vaccinia Virusstamm (enthält das Gen für die T7-RNA-Polymerase)
V	Volt
WT	Wildtyp

---

---

## 6 Zusammenfassung

Die Palmitoylierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen, bei der Palmitinsäurereste (C16:0) über Cysteine kovalent an Polypeptidketten gebunden werden. Diese Art der Modifikation wurde bereits bei einer Vielzahl zellulärer und viraler Proteine beschrieben, allerdings konnten bisher nicht alle strukturellen und funktionellen Aspekte dieser Fettsäureanlagerung geklärt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Voraussetzungen für die Bindung der Fettsäuren an die Cysteinreste des vesikulären Membranproteins Synaptotagmin I zu untersuchen. Außerdem sollte geklärt werden, welche Auswirkungen das Fehlen der Fettsäurereste auf die intrazelluläre Prozessierung und die Funktion des Proteins hat. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden Mutanten des Synaptotagmin-Gens erzeugt und mittels Vaccinia-T7-System bzw. durch Transfektion mit kationischen Lipiden (Lipofektin) in verschiedenen Zellkulturen exprimiert. Die Charakterisierung der exprimierten Proteine erfolgte entweder durch metabolische Markierung mit Radionukliden oder durch die Detektion mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

A) Alle fünf in der Acylierungsregion von Synaptotagmin I vorhandenen Cysteinreste sind direkt oder indirekt an der Palmitoylierung beteiligt. Nur die Mutante, bei der alle fünf Cysteine durch Serine ersetzt wurden (Syt mut), zeigte in CV1-Zellen keinen metabolischen Einbau von  $^3\text{H}$ -markierter Palmitinsäure. Die selektive Löschung einzelner Cysteinreste senkte die Einbaurate von  $^3\text{H}$ -Palmitinsäure auf jeweils etwa 40% des Wildtyp-Proteins.

B) In CV1- und BON-Zellen zeigte das exprimierte Synaptotagmin I ein charakteristisches Glykosylierungsmuster. Mittels Pulse-Chase-Experimenten konnte gezeigt werden, daß erst nach etwa 2 Stunden die hochglykosylierte und vermutlich physiologisch aktive Form des Proteins in den exprimierenden Zellen vorliegt. Bei der fettsäurefreien Mutante erfolgt dieser Reifungsvorgang bedeutend langsamer. Auch

---

nach zweistündiger Inkubationszeit nach der metabolischen Markierung wird der hochglykosylierte Zustand des Proteins nicht erreicht.

C) Zellfraktionierungsexperimente an BON-Zellen bestätigten, daß der Transport des synthetisierten Proteins innerhalb der Zelle durch die fehlende Palmitoylierung bzw. indirekte Effekte der substituierten Cysteinreste beeinträchtigt ist. Allerdings erbrachten fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Transportvorgänge von Wildtyp und fettsäurefreier Mutante in differenzierten PC12-Zellen nach Langzeitexpression keine Unterschiede in der zellulären Lokalisation. Bei beiden Formen des Proteins erscheint die Zielsteuerung in die Axonenden normal.

Die Ergebnisse zeigen, daß die kovalent an die Polypeptidkette von Synaptotagmin I gebundenen Fettsäurereste wichtig sind für bestimmte intrazelluläre Transportabschnitte von der Synthese des Proteins bis zu seinem Wirkungsort an den synaptischen Vesikeln, auch wenn durch Unterbindung der Acylierung keine komplette Transportblockade erfolgt. Eine exakte Funktion dieser Modifikation konnte allerdings noch nicht ermittelt werden.

---

## 7 Summary

Palmitoylation is a post translational modification of proteins which binds palmitic acid molecules (C16:0) covalently via cysteine residues to the polypeptide chain. This kind of modification has been reported for many viral and cellular proteins but structural and functional aspects of this fatty acid attachment could not be completely clarified yet.

The aim of this work was to examine the molecular requirements for the binding of palmitic acid to cysteine residues of the vesicular membrane protein synaptotagmin I. The consequences of the loss of these fatty acids for intracellular processing and function of this protein were also investigated. To resolve these questions mutants of the synaptotagmin I gene which lack either one or more cysteine within their putative palmitoylation region were constructed. These constructs were expressed in several cell lines using the vaccinia T7 system or by transfection with cationic lipids (lipofectin). The expressed proteins were characterized either by metabolic labelling or by detection with antibodies coupled with a fluorescence dye. The results can be summarized as follows:

A) All five cysteines within the palmitoylation region of synaptotagmin I are either directly or indirectly involved in the attachment of palmitic acid. Only the total mutant in which all cysteines were substituted by serines showed no incorporation of <sup>3</sup>H-labelled palmitic acid. A selective substitution of certain cysteines to serines reduced the rate of incorporation to about 40% of the rate found for wild type synaptotagmin.

B) In CV1 and BON cells the expressed synaptotagmin showed a characteristic pattern of glycosylation products. Pulse chase experiments revealed that the highly glycosylated and presumably physiologically active form of the protein does not appear in the cells until two hours after labelling. The fatty acid free mutant showed a significantly retarded maturation. Even after two hours of incubation the mutant does not reach the highly glycosylated form.

---

C) Cell fractionation experiments confirmed that the lack of palmitoylation and/or the substitution of the cysteins affected the transport of the newly synthesized protein. In differentiated PC12 cells fluorescence microscopic investigation of transport of the wild-type protein and the fatty acid free mutant resulted in no differences in intracellular localisation after long term expression. The targeting of both expression products to the axon terminals seemed normal.

The results of the experiments show that fatty acids covalently attached to the polypeptide chain of synaptotagmin I are important for certain steps in the transport pathway of the protein although no complete block of transport events occurred if acylation was prevented. No distinct function of this modification was found yet.