

# Untersuchung der Funktion der Palmitoylierung von SNAP-25

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

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

vorgelegt von

BETTINA KAMMER  
Diplom-Chemikerin aus Berlin

Berlin 2002

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. Konrad Seppelt

Erster Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Zweiter Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt

Tag der Disputation:

03. Februar 2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
1.1 Der SNARE-Komplex.....	11
1.2 SNAP-25.....	17
1.3 Hydrophobe Proteinmodifikationen .....	19
1.3.1 Palmitoylierung.....	20
1.4 Palmitoylierung von SNAP-25.....	26
<b>2 PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>30</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>31</b>
3.1 Material .....	31
3.1.1 Chemikalien.....	31
3.1.2 Enzyme, Proteine, Kits, Zellkultur und Antikörper.....	32
3.1.3 Zelllinien.....	33
3.1.4 Bakterienstämme.....	33
3.1.5 Vektoren/Gene.....	33
3.1.6 Geräte/Dokumentation/Zubehör.....	34
3.1.7 Häufig benutzte Puffer.....	35
3.1.8 Medien.....	35
3.2 Methoden.....	36
3.2.1 Gentechnologische Methoden.....	36
3.2.2 Expressionssysteme.....	41
3.2.3 Reinigung der rekombinanten Proteine.....	43
3.2.4 Proteincharakterisierung.....	46
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>55</b>
4.1 Mutanten.....	55
4.2 SNAP-25 in Insektenzellen.....	56
4.3 Proteolytische Spaltung .....	57
4.4 SNAP-25 aus Insektenzellen ist palmitoyliert.....	59
4.5 Hydrophobizität der Proteine .....	61
4.6 Quartäre Proteinstruktur.....	62
4.7 Charakterisierung der Oligomergemische.....	64
4.8 Charakterisierung der Struktur .....	68
4.9 SNAP-25 im SNARE-Komplex .....	72

4.10	Quantifizierung der Bindung von SNAP-25 zu Syntaxin .....	74
4.11	Eigenschaften des SNARE-Komplexes.....	75
4.12	SNAP-25 bindet an Membranen .....	78
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>80</b>
5.1	Palmitoylierung.....	80
5.2	Auswirkung der Palmitoylierung auf die Proteinstruktur .....	82
5.3	Keine Auswirkung auf Interaktionen mit anderen SNAREs .....	87
5.4	Palmitoylierung korreliert mit Membranbindung .....	89
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>96</b>

## **ANHANG**

## Abkürzungsverzeichnis

2D-Gel	Zweidimensionales Gel
AKAP	A-Kinase anchored protein
APS	Ammoniumpersulfat
APT	Acylproteinthioesterase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Zirkulärer Dichroismus
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CPE	zytotoxischer Effekt
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CV	Clathrin-ummantelte Vesikel
Da	Dalton
DCV	dense core vesicles = Dichte-Kern-Vesikel
Del	Deletionsmutante von SNAP-25
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTSP	Dithiobis[succinimidyl propionat]
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Bakterienzellen)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	early endosomes = „frühe“ Endosomen
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Fluorographie
FKS	fetales Kälberserum
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
FT	flow through=Durchlauf
G	(Silber)Gel
GST	Glutathion-S-Transferase
IC	Zwischenkompartiment
IPTG	Isopropylthiogalaktosid

## Abkürzungsverzeichnis

---

LE	late endosomes = späte Endosomen
M	Proteinmarker
M1+2, M3+4, M1-4	Mutanten von SNAP-25
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MALLS	Multi Angle Laser Light Scattering
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MOI	multiplicity of infection=Infektionsmultiplizität
N	Zellkern
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NSF	NEM sensitives Fusionsprotein
OD	Optische Dichte
P	Pellet
PAT	Proteinacyltransferase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PFU	Plaques formende Einheiten
PPT	Proteinpalmitoylthioesterase
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
red.	reduzierend
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sf9</i> -Zellen	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Insektenzellen)
SN	supernatant = Überstand
SNAP	Soluble NSF Attachment Protein
SNAP-25	Synaptosomal assoziiertes Protein, 25 kDa
SNARE	SNAP-Rezeptor
TCA	Trichloressigsäure
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMR	Transmembranregion
TNE-Puffer	Tris-NaCl-EDTA-Puffer
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
WT	Wildtyp

**Internationale Abkürzungen der Aminosäuren**

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

**Internationale Abkürzungen der Nukleotide**

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

## 6 Zusammenfassung

Die synaptosomalen SNARE-Proteine VAMP2, Syntaxin1 und SNAP-25 bilden einen SNARE-Komplex, der die Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran auslöst. Die Bildung und die enzymatische Spaltung des SNARE-Komplexes wurden weitestgehend mit rekombinanten, aus *E.coli* gereinigten Proteinen untersucht. Jedoch fehlen diesen Proteinen die Proteinmodifikationen, die für eukaryotische Zellen beschrieben sind.

Eine wichtige Modifikation der SNARE-Proteine ist die kovalente Bindung von Fettsäuren an SNAP-25. Palmitoylierung findet in einem Cluster von vier Cysteinen statt und ist vermutlich der Anker des intrinsisch hydrophilen Proteins mit der präsynaptischen Plasmamembran.

In der vorliegenden Arbeit sind SNAP-25 Wildtyp und Mutanten mit sowohl Substitutionen gegen Serin oder Alanin als auch einer Deletion über einen Bereich von 13 Aminosäuren in der Palmitoylierungsregion als rekombinante Proteine mit Hexahistidinresten in Insektenzellen mit dem Baculovirus-System exprimiert worden. Die SNAP-25 Proteine konnten bis zur offensichtlichen Homogenität in einem einzigen Reinigungsschritt über Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt werden. Es wurde mittels metabolischen Einbaus von <sup>3</sup>H-Palmitinsäure dargestellt, dass SNAP-25 in Insektenzellen tatsächlich palmitoyliert wird und auch die Mutanten mit Doppelsubstitutionen der Cysteine noch 20-30% palmitoyliert vorliegen. Das beweist, dass beide Cysteinpaare direkt oder indirekt an der Palmitoylierung beteiligt und für eine vollständige Palmitoylierung notwendig sind. Durch Phasentrennung mit Triton X-114 konnte ein Anstieg des Hydrophobizitätsanteils von SNAP-25 durch Palmitoylierung auf 30% beobachtet werden. Im Gegensatz dazu befindet sich nicht acyliertes SNAP-25 ausschließlich in der wässrigen Phase. Dieser Hydrophobizitätsanstieg zeigt, dass ein signifikanter Anteil der SNAP-25 Moleküle palmitoyliert sein muss.

Überraschenderweise zeigten sich große Oligomere von palmitoyliertem und nicht palmitoyliertem SNAP-25 im Elektronenmikroskop. Oligomere des palmitoyliertem sind wesentlich stabiler als die des nicht palmitoyliertem SNAP-25. Sie können außerdem unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und unter reduzierenden, aber nicht-denaturierenden Bedingungen in Zweidimensionaler Gelelektrophorese detektiert werden. Die Oligomere konnten nach einem weiteren Reinigungsschritt mit Anionenaustauscherchromatographie nicht mehr beobachtet werden. Es bleibt also unklar, ob die SNAP-25-



Oligomere eine Eigenschaft von palmitoyliertem SNAP-25 sind oder durch eine im Coomassie-Gel nicht sichtbare Verunreinigung ausgelöst werden können.

Aus Insektenzellen gereinigtes SNAP-25 bindet an die anderen neuronalen SNARE-Proteine Syntaxin1 und VAMP2. Der Palmitoylierungsgrad hat keinen bedeutenden Einfluss auf die SNARE-Komplex-Bildung. Der ternäre SNARE-Komplex mit palmitoyliertem SNAP-25 aus Insektenzellen besitzt die gleichen Eigenschaften wie der Komplex mit nicht palmitoyliertem SNAP-25. Er ist resistent gegen Behandlung mit SDS und lässt sich durch NSF und  $\alpha$ -SNAP in Gegenwart von Adenosintriphosphat enzymatisch dissoziieren.

Die Palmitoylierung von SNAP-25 hat eine Auswirkung auf die Bindung an künstliche Membranen. Während palmitoyliertes SNAP-25 zu 75% in Liposomen eingebaut werden kann, ist dies mit nicht palmitoyliertem nur zu einem geringen Prozentsatz (11%) möglich. Dieses Ergebnis unterstützt die postulierte Membranankerfunktion der Fettsäuren.

## 7 Summary

The synaptosomal SNARE-proteins VAMP2, Syntaxin1 and SNAP-25 form a SNARE-complex which triggers fusion of synaptic vesicles with the presynaptic plasma membrane. Assembly and disassembly of the SNARE-complex has been extensively studied *in vitro* with recombinant proteins purified from *E.coli*. However, those proteins lack the authentic protein modifications described for eukaryotic cells.

One important modification of SNARE-proteins is the covalent attachment of fatty acids to SNAP-25. Palmitoylation occurs on a cluster of four cysteines and is thought to anchor this intrinsically hydrophilic protein to the presynaptic plasmam membrane.

In this thesis SNAP-25, the wild-type protein as well as mutants with substitutions and deletions in the palmitoylation domain, were expressed as His-tagged constructs with the baculovirus system in insect cells. SNAP-25 proteins could be purified to apparent homogeneity with a single Ni-affinity chromatography step. Metabolic labeling with <sup>3</sup>H-palmitic acid showed that SNAP-25 purified from insect cells is indeed palmitoylated. SNAP-25 mutants with substitutions of two cysteines are palmitoylated to 20-30% relative to the wild-type protein. This proved that both cysteine pairs are directly or indirectly involved in palmitoylation. In Triton X-114 phase separation experiments palmitoylated SNAP-25 molecules were recovered to 30% from the hydrophobic detergent phase. In contrast, non-acylated SNAP-25 is present exclusively in the hydrophilic phase. This increase in the hydrophobicity suggests that a significant amount of all SNAP-25 molecules are palmitoylated.

Surprisingly, large oligomers of palmitoylated and non-acylated SNAP-25 are visible by electron microscopy. Oligomers of palmitoylated SNAP-25 are more stable compared to non-acylated SNAP-25. They were also detected by SDS-PAGE under non-reducing conditions and by reducing, but non-denaturing 2D-gel-electropheris. They were not present after a further purification step with anion exchange chromatography. Therefore it remains unclear whether oligomer formation is an intrinsic property of SNAP-25 or is induced by contaminating molecules undetectable in a coomassie stained gel.

SNAP-25 purified from insect cells binds to the other neuronal SNARE-proteins Syntaxin1 and VAMP2. Palmitoylation of SNAP-25 has no significant effect on SNARE-complex formation. The ternary SNARE-complex with palmitoylated SNAP-25 from insect cells has

the same properties as the complex with non-acylated SNAP-25. It is resistant to SDS treatment and can be disassembled by NSF and  $\alpha$ -SNAP in the presence of ATP.

Palmitoylation influences binding of SNAP-25 to artificial membranes. Palmitoylated SNAP-25 can be reconstituted to 75% in liposomes, whereas only a small percentage (11%) of non-palmitoylated SNAP-25 molecules could be recovered from the liposome fraction. This result supports the postulated membrane anchor function of the fatty acids.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Nutzung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erarbeitet und verfasst zu haben.

Berlin, 11.11.2002

---

---

## Publikationen

### Tagungsbeiträge

---

- 09/1996                      Poster beim Symposium „Enzymology of Biosynthesis of Natural Products“ in Berlin:  
„Biosynthesis of Taxol: Enzymatic Acylation of 10-Deacetylbaccatin-III to Baccatin-III in Crude Extracts from Roots of *Taxus baccata*“, W. Weckwerth, C. Hacker, B. Kammer, T. Hornbogen, D. Ewald und R. Zocher
- 03/1997-09/1997            Poster beim Workshop für „Peptide Modification by Non-Natural Amino Acids“ in Leipzig und auf der VAAM-Frühjahrstagung in Hamburg:  
„A 33 Kilodalton Peptidyl-Prolyl *Cis-Trans* Isomerase of the European Yew *Taxus baccata* is sensitive to Cyclosporin A“, B. Kammer, A. Stindl, T. Hornbogen und R. Zocher
- 09/2001                      Poster auf der GBM-Herbsttagung in Bochum:  
„Structural studies with palmitoylated and non-acylated SNAP-25 purified from baculovirus-infected insect cells“, B. Kammer, D. Fasshauer, M. F. G. Schmidt und M. Veit

### Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

---

„Biosynthesis of taxol: enzymatic acylation of 10-deacetylbaccatin-III to baccatin-III in crude extracts from roots of *Taxus baccata*“, R. Zocher, W. Weckwerth, C. Hacker, B. Kammer, T. Hornbogen und D. Ewald, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996) , 229:16-20

„Biochemical and functional characterization of palmitoylated and non-acylated SNAP-25 purified from insect cells infected with recombinant baculovirus“, B. Kammer, D. Fasshauer, M. F. G. Schmidt und M. Veit, *Molecular and Cellular Neuroscience*, im Druck

---

---

## Lebenslauf

Geburtsdatum: 22. Juni 1971  
Geburtsort: Berlin  
Eltern: Karola Kammer, geb. Müncheberg  
Rudolf Kammer

### Schulbildung

---

09/77-07/83 Lauterbachgrundschule, Berlin  
09/83-06/90 Bertha-von-Suttner-Gymnasium, Berlin, Abschluss Abitur

### Studium

---

10/90-05/97 Studium der Chemie  
10/93 Vordiplom  
07/96-05/97 Diplomarbeit, Thema: „Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen aus *Taxus baccata*“ am Institut für Biochemie und Molekulare Biologie des Fachbereichs Chemie der TU Berlin

### Beruflicher Werdegang

---

11/95-02/96 Student. Hilfskraft für Proteinreinigung am Institut für Biochemie und Molekulare Biologie des Fachbereichs Chemie der TU Berlin unter der Leitung von Dr. U. Keller  
05/97-09/97 Student. Hilfskraft, Thema „Reinigung der Acyltransferase aus *Taxus baccata*“, Institut für Biochemie und Molekulare Biologie des Fachbereichs Chemie der TU Berlin unter der Leitung von Dr. Zocher  
10/97-11/97 Selbständige Tätigkeit am Institut für Biochemie und Molekulare Biologie des Fachbereichs Chemie der TU Berlin unter der Leitung von Dr. Zocher mit dem Thema: „Literaturrecherche“  
12/97 – 11/01 Wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Immunologie und Molekulare Biologie des Fachbereichs für Veterinärmedizin der FU Berlin unter der Leitung von Prof. M. F. G. Schmidt  
Seit Juli 2002 Kundenberaterin bei der Firma Carl Roth

---

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immunologie und Molekularbiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Michael F. G. Schmidt angefertigt. Ihm danke ich herzlich für die fachlichen sowie anregenden und kritischen Diskussionen während der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. Michael Veit gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die zur Verfügung gestellten finanziellen Mittel und seine wissenschaftliche Unterstützung.

Bei Herrn Dr. Dirk Fasshauer und seinen Kollegen bedanke ich mich für die Kooperation bei der analytischen Charakterisierung des gereinigten Proteins und für fachliche Gespräche. In gleichem Zusammenhang gilt mein Dank Herrn Dr. Hans R. Gelderblom, der ebenfalls elektronenmikroskopische Aufnahmen des gereinigten Proteins angefertigt hat.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Immunologie und Molekularbiologie, insbesondere aber bei Frau Ellen Lyhs und Frau Christiane Palissa, bedanke ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft.

Zusätzlich gilt meine tiefste Dankbarkeit allen Kollegen und Freunden, die mich unermüdlich bestärkt und motiviert sowie die Arbeit kritisch gelesen haben.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft über das Forschungsprojekt VE 141/4-1 finanziell unterstützt.

---