
5 Diskussion

Das synaptische Vesikelprotein Synaptotagmin I gilt als möglicher Ca^{2+} -Sensor in der schnellen synaptischen Signalübertragung. Veit und Mitarbeiter (1996) wiesen nach, daß dieses Protein während seiner Synthese in der Zelle über eine relativ labile Thioester-Bindung mit Palmitinsäureresten modifiziert wird. Bei anderen palmitoylierten Proteinen zeigten Deletionsmutanten entweder eine defekte Lokalisation (SNAP-25 bei Veit et al., 1996) oder eine verminderte Interaktion mit anderen Proteinen der zellulären Signalkette (verschiedene G-Protein-Untereinheiten bei Wedegaertner et al., 1993). Für Synaptotagmin wurde bisher weder gezeigt, welche der fünf an der Grenze zwischen membranspannender und cytoplasmatischer Domäne befindlichen Cysteine an der Palmitoylierung beteiligt sind, noch welche Funktion diese Fettsäurereste für das Protein besitzen.

Alle fünf Cysteine sind an der Palmitoylierung beteiligt

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß alle fünf Cysteine in der potentiellen Palmitoylierungsregion des Synaptotagmin I direkt oder indirekt an der Palmitoylierung beteiligt sind. Die Substitution eines einzelnen Cysteins reduzierte den Einbau an Palmitinsäure auf unter 40% des Fettsäureanteils des unveränderten Proteins, egal ob es sich dabei um ein relativ weit innerhalb der Transmembranregion oder am Beginn der cytoplasmatischen Region angesiedeltes Cystein handelt. Nur die Substitution aller Cysteine zu Serinen verhinderte den Einbau radioaktiv markierter Palmitinsäure.

Zu einem anderen Ergebnis kamen Caballero und Mitarbeiter (1998) dagegen für das Fusionsprotein des Masern-Virus (MV F), das ebenfalls fünf Cysteine an der Grenze zwischen Transmembranbereich und cytoplasmatischer Domäne enthält. Hier schei-

nen die Cysteine, die einerseits weit im Inneren der Transmembranregion und andererseits nahe am Cytoplasma liegen, den größten Beitrag zur Palmitat-Inkorporation zu leisten, während den dazwischen liegenden Cysteinen weniger Einfluß zugeschrieben bzw. davon ausgegangen wird, daß sie nicht palmitoyliert seien. Auch einige periphere synaptische Proteine wie die Cystein-String-Proteine (Csps) besitzen mehrere Cysteinreste, die anscheinend nicht palmitoyliert werden (Chamberlain und Bourgoyne, 1998). Von den 14 Cysteinresten, die in dem sogenannten Cystein-String zusammengefaßt werden, mußten lediglich die zentralen sieben Cysteinreste deletiert werden, um eine Fettsäure-Inkorporation zu verhindern.

Bei den meisten siebenfach-transmembranspannenden Rezeptoren erfolgt die Acylierung an allen in der Nähe der letzten Transmembrandomäne vorhandenen Cysteinreste und trägt dabei zur Ausbildung eines reaktiven Loops bei (z.B. bei Rhodopsin, Ovchinnikov et al., 1988). Der Rezeptor CD36 ist sowohl an seinem C-Terminus als auch am N-Terminus an jeweils 2 Cysteinresten palmitoyliert, was zu der Annahme führte, daß beide Protein-Enden auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert sind (Tao et al., 1996).

Im Synaptotagmin-Molekül könnten somit einerseits alle Cysteinreste direkt mit einem Molekül Palmitinsäure verknüpft sein, andererseits wäre es auch denkbar, daß es sich um eine kooperative Bindung handelt, bei der die Löschung eines Cysteins die Bindungsfähigkeit der anderen behindert. Eine Klärung dieses Sachverhaltes sollte über die Bestimmung der Anzahl der mit einer Kopie des Synaptotagmins verankerten Fettsäuremoleküle mittels Massenspektrometrie möglich sein. Solche quantitativen Analysen waren allerdings aus verschiedenen Gründen im Rahmen der Arbeit nicht realisierbar. Es ist ebenfalls denkbar, daß durch die Substitution einzelner Cysteine durch Serine der hydrophobe Charakter der Transmembranregion geändert wird bzw. diese Domäne sterisch eine leichte Konformationsänderung erfährt, was zu einer Beeinflussung der Palmitoylierung anderer Cysteine führen könnte. Künftige Substitutionen mit anderen unpolaren Aminosäuren, wie z.B. Alanin oder Valin, könnten zur Klärung dieser Hypothese beitragen.

Bisher konnte in Sequenzvergleichen acylierter Membranproteine keine Konsensussequenz für die S-Acylierung festgestellt werden. Die Anwesenheit eines oder mehrerer Cysteinreste innerhalb des vermuteten Acylierungsbereiches reicht allein für die Bindung von Fettsäuren allerdings nicht aus, wie Untersuchungen am F-Protein des Sendaivirus gezeigt haben. In dieses Protein, das im Gegensatz zu anderen Membranglykoproteinen der Paramyxoviren nicht acyliert wird und auch keine Cysteine in der potentiellen Acylierungsregion besitzt, wurden an verschiedenen Stellen der für die Acylierung wichtigen Region der cDNA Cysteinreste eingefügt, ohne daß das exprimierte Protein mit radioaktiven Fettsäuren markiert werden konnte (Ponimaskin, 1994; Ponimaskin und Schmidt, 1995).

Neue Untersuchungen zu proteinvermittelter Membranfusion legen nahe, daß für die Multimerisierung zu komplexen Superstrukturen, zur Stabilisierung der SNARE-Komplexe sowie für den letzten Schritt vor der Membranverschmelzung zur Überwindung der elektrostatischen Abstoßungskräfte der Membranen die Interaktionen der Transmembrandomänen der beteiligten Proteine Bedeutung besitzen (Laage et al., 2000). Durch zellfreie Fusionsassays mit modifizierten Transmembranfragmenten könnten auch für Synaptotagmin Interaktionspräferenzen ermittelt werden.

Fettsäurefreies Synaptotagmin zeigt verlangsamte intrazelluläre Prozessierung

Als Konsequenz aus der Beobachtung, daß die Totalmutante nicht palmitoyliert wird, drängt sich die Frage auf, ob diese fettsäurefreie Form des Proteins in ihrer Reifung oder ihrem intrazellulären Transport geschädigt ist. Es konnte dabei gezeigt werden, daß die fehlende Palmitoylierung die intrazelluläre Reifung und/oder den Transport des Proteins beeinflusst.

Proteine durchlaufen während ihrer Synthese vielfältige Modifizierungsschritte (Glykosylierung, Phosphorylierung, Abspaltung von endständigen AS, Acylierung), wobei die Anlagerung von verschiedenen Zuckerresten als Marker für unterschiedliche Sta-

dien intrazellulärer Reifung angesehen wird. Die Verknüpfung von Glykoproteinen mit Kohlenhydraten beginnt im endoplasmatischen Retikulum, um in den verschiedenen Kompartimenten des Golgi-Apparates durch vielfältige Modifizierung dieser Zuckerseitenketten ihre Fortsetzung zu finden. Spaltungen mit Endonukleasen wie Endo-H oder PNGase-F führen zu unterschiedlichen Produkten, so daß eine Aussage über den momentanen Stand der erfolgten Modifizierung gemacht werden kann. Rekombinante Endonuklease H spaltet nur High-Mannose- oder Hybrid-Oligosaccharide, also Zuckerketten, die relativ früh im endoplasmatischen Retikulum angefügt wurden, während Peptid-N-Glykosidase F nahezu alle Typen N-glykosidischer Seitenketten von Polypeptidketten abspaltet. Stellt sich somit eine Form des untersuchten Proteins als Endo-H-resistent heraus, handelt es sich um das hochglykosylierte und damit reife Stadium, das in der Regel auch der physiologisch aktive Zustand ist.

Sowohl die Spaltung mit Endonuklease H als auch mit PNGase F reduzierte das innerhalb der ersten 30 min exprimierte Protein auf eine niedrigmolekulare Form, die damit als unglykosyliert angesehen werden kann. Erst nach längeren Inkubationszeiten von mehr als einer Stunde entstand eine Endo-H-resistente Form von Wildtyp-Synaptotagmin, die also eine komplexe Glykosylierung aufweist und die intrazelluläre Reifung zu einem großen Teil durchlaufen hat. Markant ist der Unterschied zwischen dem Wildtyp-Protein und der fettsäurefreien Mutante. Pulse-Chase-Versuche zeigten, daß die hochglykosylierte und ausgereifte Form des Proteins auch nach zwei Stunden, einem für die zelluläre Proteinsynthese relativ langen Zeitraum, nicht sichtbar geworden ist. Es liegt also eine starke Verlangsamung der intrazellulären Reifung durch die fehlende Palmitoylierung vor.

Diese Beobachtung, daß die Palmitoylierung Einfluß auf die Prozessierung eines Proteins nach der Synthese hat, steht im Gegensatz zu Ergebnissen früherer Arbeiten bei viralen palmitoylierten Proteinen, wie dem HA des Influenza A Virus oder dem HEF-Protein der Influenza C-Viren (Veit, 1990; Reverey et al., 1996). Dort konnte zwischen der fettsäurefreien Mutante und dem Wildtyp-Protein keinerlei Unterschied

in der intrazellulären Prozessierung und der Geschwindigkeit zellulärer Transportvorgänge festgestellt werden.

Eine komplette Blockade des Transportes fettsäurefreien Synaptotagmins konnte nicht nachgewiesen werden

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, inwiefern eine gebremste Glykosylierung die Ursache für das beobachtete Phänomen ist, oder der unter Umständen verlangsamte Transport zu einer Beeinflussung der Prozessierung des Proteins führt. Zellfraktionierungsexperimente sollten Aufschluß darüber geben, ob tatsächlich der Transport verlangsamt oder ob primär die verzögerte Reifung Ursache für die Unterschiede in den Bandenverteilungen der Fluorographien ist. Dabei wurde zur einfacheren Vergleichbarkeit eine Zellfraktionierungsmethode angewendet, die im Labor von Frau Prof. Ahnert-Hilger am Institut für Anatomie der Charité schon mehrfach für

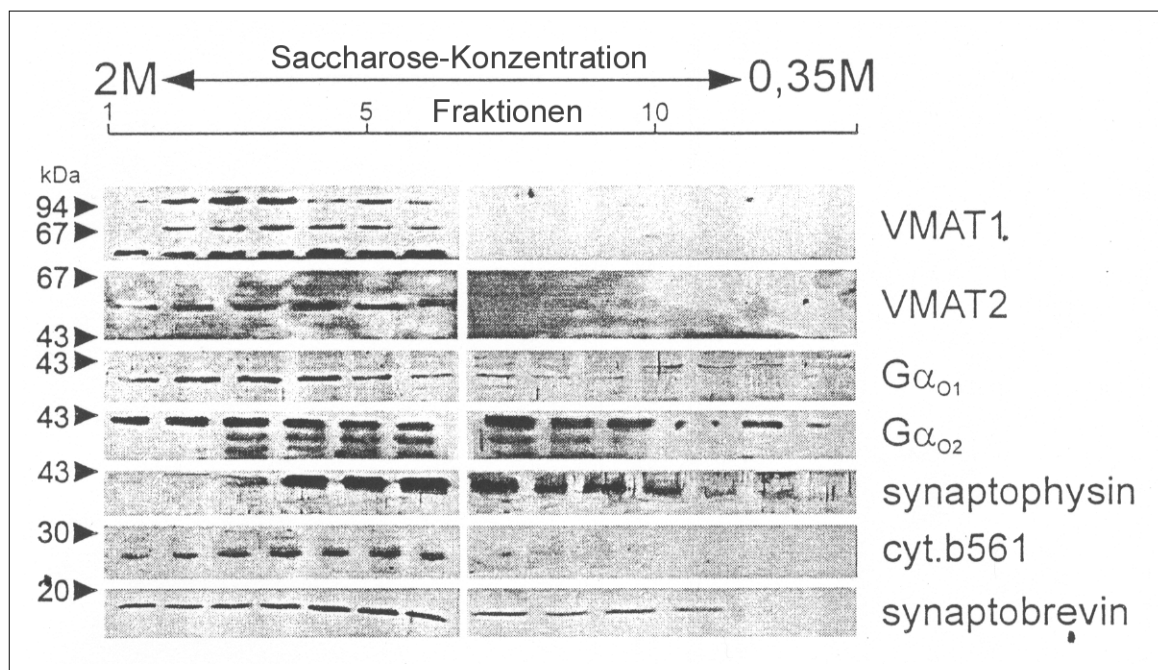


Abbildung 23: Einfache Zellfraktionierung von BON-Zellen (Daten: Prof. Ahnert-Hilger)
Detektion verschiedener zellulärer Markerproteine mittels Western Blot in fraktionierten BON-Zell-lysaten nach Auftrennung in der SDS-PAGE. Die Blot-Ergebnisse für selektierte Ausschnitte der SDS-Gele sind gezeigt.

eine humane, Serotonin sekretierende neuroendokrine Pankreas-Tumorzelllinie (BON) angewendet wurde. Diese Zelllinie vereint die von COS-7- bzw. CV-1-Zellen bekannte einfache Kultivierbarkeit mit der Fähigkeit zur regulierten Sekretion verschiedener Transmitter, wie sie die eigentlich für diese Studie obligatorischen PC-12-Zellen zeigen.

Die Ergebnisse machen deutlich, daß das fettsäurefreie Synaptotagmin in seiner Verteilung im Saccharose-Gradienten etwas vom Wildtyp-Protein abweicht (vergleiche Abb. 18). Bei der niedermolekularen Bande des Wildtyp-Proteins (Bande a, oben) handelt es sich vermutlich um die unglykosylierte Form des Proteins. Diese liegt etwa in den gleichen Fraktionen vor wie die Bande der fettsäurefreien Mutante (Bande a, unten). Die höhermolekulare und damit vermutlich einfach glykosylierte Bande (Bande b) des Synaptotagmin-wt erscheint allerdings in Fraktionen, die einer geringeren Saccharose-Dichte und damit leichteren Membranfragmenten entsprechen.

Ahnert-Hilger und Mitarbeiter haben verschiedene Markerproteine in dieser Zelllinie im Saccharose-Gradienten getrennt und mittels Western Blot bestimmt (Abbildung 23). Die für Synaptotagmin gefundene Verteilung (Abbildung 18) entspricht etwa der von Synaptophysin, dem charakteristischen Vertreter synaptischer Vesikel. Die vesikulären Monoamintransporter VMAT1 und 2 sind dagegen typische Vertreter der Membranen Peptid-enthaltender sekretorischer Granula und damit bedeutend schwererer vesikulärer Membrankomponenten. Die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine regulieren die Aktivität dieser Transporter und sind hauptsächlich mit ihnen assoziiert. Allerdings konnte G_{o2} ebenso auf kleinen synaptischen Vesikeln serotoninerger Nervenendungen identifiziert werden, was erklärt, weshalb es ebenfalls in den Fraktionen 6 bis 9 und höher zu finden ist. Synaptophysin, zwar ein "Nicht-SNARE-Protein", aber dennoch Bindungspartner von SNARE-Proteinen, ist demgegenüber ein typischer Vertreter der sogenannten kleinen synaptischen Vesikel (SSV, *small synaptic vesicle*), deren Hauptanteil somit in den Fraktionen 3 - 10 zu finden ist.

Der Unterschied der Verteilung zwischen Wildtyp-Protein und fettsäurefreier Mutante bestätigt, daß sich Proteine gleicher Glykosylierungsstufe in gleichen Zellkompartimenten befinden, da unglykosyliertes wt-Synaptotagmin in den gleichen Fraktionen erscheint wie die unglykosylierte fettsäurefreie Form (vergleiche Abb. 18). Dies impliziert die Annahme, daß durch die fehlenden Fettsäuren die komplette intrazelluläre Reifung inklusive den damit einhergehenden Transportvorgängen verlangsamt wird.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an PC12-Zellen zeigten keine Unterschiede in der endgültigen Zielsteuerung

Zur Bestätigung der Annahme, daß zu einem bestimmten Zeitpunkt der Expression der beiden Konstrukte eine leichte Verschiebung in der intrazellulären Lokalisation vorliegt, wurden die Proteine in transfizierten PC-12-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert und die Zellen unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop fotografiert. Die dazu notwendige Verknüpfung der Gene mit einem spezifischen Epitop erfolgte durch Umklonierung in den kommerziell erhältlichen Vektor pcDNA3.1-*myc*-his A(+), der bereits ein *myc*-Epitop und ein Hexahistidin-Fragment enthält. Nach Löschung des STOP-Signals der betreffenden Gene wird die Synthese über die beiden Sequenzabschnitte fortgesetzt und so das Protein um zwei Epitope verlängert, die mit kommerziell erhältlichen Antikörpern detektiert werden können. So wird ausgeschlossen, daß mit dem Anti-SYT-Antikörper in PC-12-Zellen vorhandenes endogenes Synaptotagmin detektiert wird, und die spezifische Erfassung des neu exprimierten Genproduktes gesichert.

Nach Transfektion und Fixierung der Zellen erfolgte die Detektion mittels anti-*myc* als primärem und anti-Maus-TRITC als Sekundärantikörper. Die so markierten Zellen wurden unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop mittels eines 100fach vergrößernden Öl-Immersionsobjektivs sichtbar gemacht (Abbildungen 20-22). Die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen zeigen eine relativ gleichmäßige Verteilung von

Fluoreszenz im Bereich um den Zellkern und bis in die Axonenden. Der Zellkern selbst sowie Bereiche des endoplasmatischen Retikulums weisen eine signifikant geringere Fluoreszenz auf. Sowohl die mit Wildtyp-Synaptotagmin als auch die mit der fettsäurefreien Mutante transfizierten Zellen zeigten, daß beide Formen innerhalb des Zeitraumes von zwei Tagen, die zur Ausdifferenzierung der PC12-Zellen mindestens notwendig sind, in die Axonenden transportiert wurden. Die fehlende Palmitoylierung des Synaptotagmins wirkt sich somit primär auf eine verzögerte Prozessierung (Glykosylierung) des Proteins aus, was lediglich zu einem u.U. verlangsamten, allerdings nicht komplett blockierten Transport zum Wirkungsort (Vesikel an der Plasmamembran der Axonenden) führt.

Außerdem wurde bei Synaptotagmin-transfizierten PC12-Zellen eine starke Induktion des Neuriten-Wachstums beobachtet. Im Vergleich zu GFP-transfizierten Kontrollzellen (Abbildung 22B) wuchsen die Neuriten Synaptotagmin-transfizierter Zellen im Mittel um mehr als die zweieinhalbfache Länge (Abbildung 22A). Dieser Effekt konnte kürzlich von Fukuda und Mikoshiba (2000) für das Wildtyp-Synaptotagmin in Dorsal-Root-Ganglion-(DRG)-Neuronen gezeigt werden, mit der Beobachtung, daß eine funktionelle Blockade der C2A-Domäne mittels Antikörpern dieses Auswachsen der Neuriten hemmt. Im Gegensatz zur Phospholipid-bindenden Kapazität der C2A-Domäne, der eine bedeutende Rolle für das Auswachsen der Neuriten in neuronalen Zellen beigemessen wird, konnte für die Palmitoylierungsregion keine solche Funktion gezeigt werden, da kein signifikanter Unterschied in den Längen der ausgewachsenen Neuriten zwischen Wildtyp und mutiertem, fettsäurefreiem Protein beobachtet werden konnte (siehe Abb. 20 und 21).

Im Gegensatz dazu zeigten Krasnov und Enikolopov (2000), daß für die Zielsteuerung des Synaptotagmins in die Axonenden der PC12-Zellen sowohl die C-terminale Domäne als auch die Transmembranregion von Bedeutung sind. Zwei Aminosäuren (W405 und L408) zeigten sich dabei als essentiell für die korrekte Zielsteuerung, eine

intakte Transmembrandomäne vorausgesetzt. In vielen Transmembranproteinen wirken kurze C-terminale Domänen als Sortier- oder Zielsteuerungssignal, die zu einer spezifischen Ansiedlung der neusynthetisierten Proteine innerhalb der Zelle führen (Rothman und Wieland, 1996). Die membranspannende Region selbst könnte ebenfalls zur Zielsteuerung von Proteinen beitragen, da sich verschiedene Membranstrukturen (ER, Golgi, Plasmamembran) in den Durchmessern ihrer Doppelschicht unterscheiden und membranständige Proteine verschiedener Kompartimente unterschiedlich lange Transmembranbereiche aufweisen. Bei Synaptotagmin stellte sich nun heraus, daß auch die in diesem Bereich verknüpften Fettsäurereste für einen optimalen intrazellulären Transport intakt sein müssen. Es konnte allerdings keine distinkte Funktion dieser Modifikation während der Transportprozesse festgestellt werden.

Problematisch war zum Teil die sehr niedrige Transfektionseffizienz der Lipofektin-Transfektion bei PC12-Zellen, wodurch nur eine geringe Anzahl von transfizierten Zellen zur fotografischen Aufzeichnung zur Verfügung stand. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden PC12-Zellen mit einem GFP-tragenden Vektor transfiziert und die transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Wurden etwa 50.000 Zellen pro Kavität einer 24-Well-Platte ausgesät, konnten 3 Tage nach Lipofektion lediglich 10-20 GFP-exprimierende Zellen gezählt werden.

Voraussetzung für weitere Untersuchungen ist somit eine Steigerung der Expressionsraten in PC12-Zellen. Eine Vorrichtung zum Elektroporieren von eukaryotischen Zellen, wie von Fukuda und Mikoshiba (2000) erfolgreich angewendet, stand nicht zur Verfügung. Beschrieben wurde für PC12-Zellen weiterhin eine Gentransfer-Methode mittels Kalziumphosphat (Chen und Okayama, 1987), bei der die zu transfizierende DNA mit sterilem CaCl_2 gemischt und in HBS-Puffer verdünnt auf die Zellen gegeben wird. Obwohl die Autoren für diese Methode keine Zellschädigung berichtet hatten, konnte dieses Verfahren zur Transfektion von PC12-Zellen bei uns nicht etabliert werden (Foley, persönliche Kommunikation).

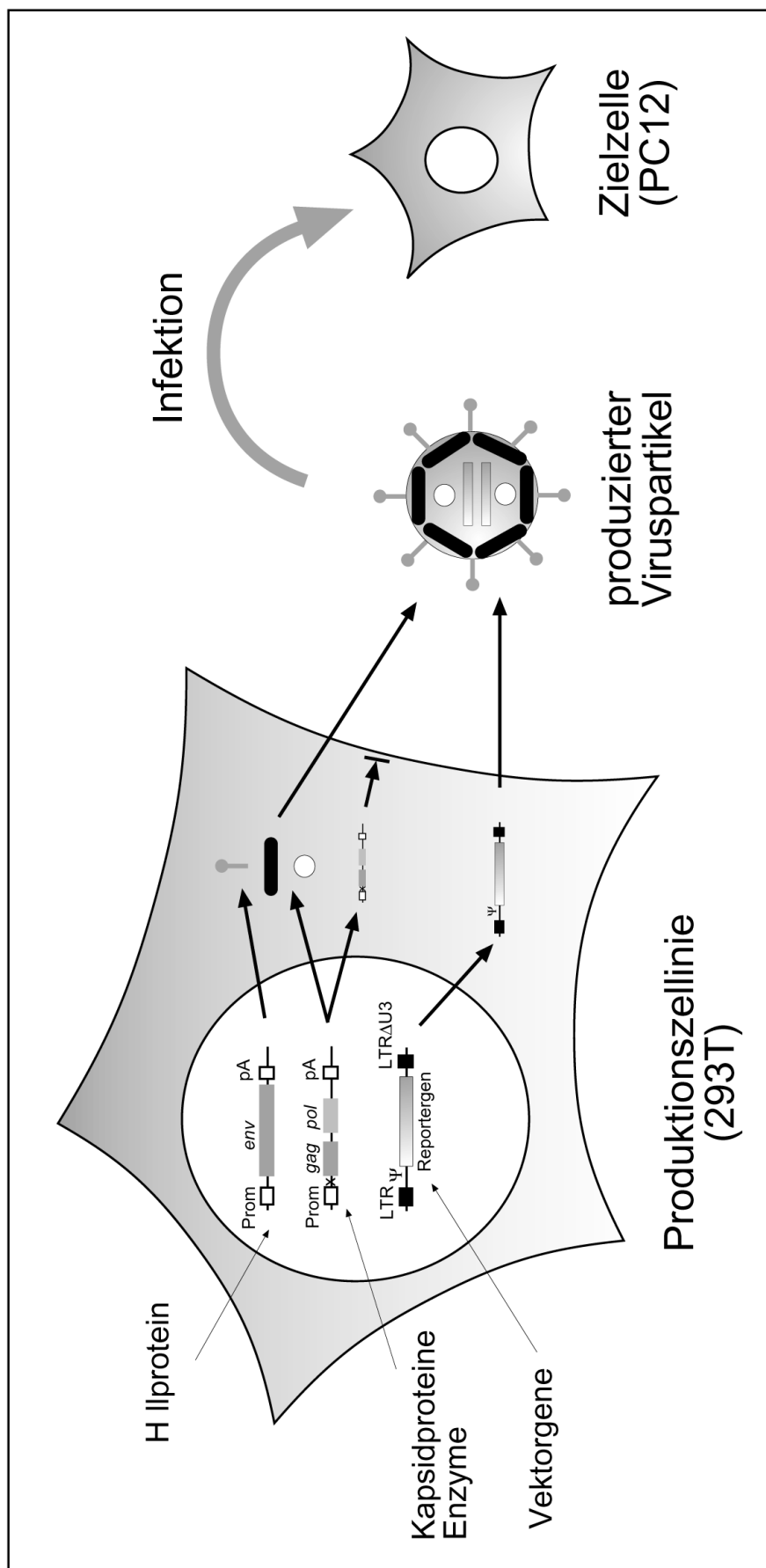


Abbildung 24: Schematische Darstellung eines möglichen retroviralen Gentransfers in PC12-Zellen. Das betreffende Gen wird mit GFP gekoppelt, in einen retroviralen Vektor kloniert und zusammen mit Plasmiden für Hüll- und Kapsidproteine bzw. virale Enzyme in Zellen einer Produktionszelle transfiziert. Die freigesetzten Viruspartikel werden geerntet und damit die Zielzellen infiziert. GFP-positive Zellen werden fluoreszenzmikroskopisch erfasst.

Ein weiterer erfolgversprechender Ansatz wäre das Einschleusen der DNA mittels retroviraler Vektoren. Da man Fremd-DNA in solche Vektoren einbauen kann und Retroviren ihr provirales Genom in das Genom der Zielzelle einbauen, eignen sich diese Vektoren für den Transfer von Genen. Abbildung 24 zeigt schematisch den Ablauf eines retroviralen Gentransfers in PC12-Zellen. Mit dieser Methode können auf Grund der Integrationseigenschaften der Retroviren auch stabil exprimierende Zellen hergestellt werden, deren Etablierung mittels Lipofektion und G418-Selektion der transfizierten Klone bisher nicht erfolgreich war. Mit den am Institut für Virologie der Universität Leipzig vorhandenen Vektoren konnten PC12-Zellen bereits erfolgreich infiziert und so mit Fremd-DNA transfiziert werden, wobei zur Detektion der betreffenden Expressionsprodukte überwiegend GFP-Fluoreszenz eingesetzt wurde.

In der Anwendung eines solchen GFP-Tags zur direkten Detektion der Proteine mittels konfokaler Lasermikroskopie in der Zelle bestünde ein weiterer Optimierungsfaktor. Denkbar ist dabei eine Verknüpfung der Proteinkette mit einer Kopie des GFP- oder eines verwandten Gens mittels kommerziell erhältlicher Vektoren. Dadurch ließen sich Fehlerquellen durch unspezifische Bindungen der fluoreszenzmarkierten Antikörper an Zellstrukturen vermeiden und die Genauigkeit der Lokalisierung der Proteine erhöhen. Die Vorteile der konfokalen Lasertechnik für die Fluoreszenzdetektion könnten dadurch besser genutzt werden als dies mittels indirekter Fluoreszenz möglich war. Durch die Fokussierung des Mikroskopes auf eine exakte Bildebene mit gleichzeitiger Ausblendung von Streulicht darüber- bzw. darunterliegender Bereiche läßt sich eine bedeutend höhere Auflösung und differenziertere Zeichnung der Aufnahmen erreichen.

Über die funktionelle Bedeutung esterartig gebundener Fettsäuren in Transmembranproteinen ist bisher nur wenig bekannt. Bei peripheren acylierten Proteinen konnte bereits mehrfach gezeigt werden, daß ohne diese Modifizierung eine korrekte Zielsteuerung nicht möglich ist (z.B. kürzlich für Oberflächenproteine HASPs in *Leishmania* gezeigt, Denny et al., 2000). Auch neueste Untersuchungen an entsprechenden

Membranproteinen gehen meist über diese Erkenntnis, daß gebundene Fettsäuren für einen funktionierenden Transportvorgang und intakte Interaktionen essentiell sind, nicht hinaus. Das heterodimere T-Zell-Oberflächen-Glykoprotein CD8 benötigt die Palmitoylierung der cytoplasmatischen Region der β -Untereinheit z.B. zur Ansiedlung in Lipid-Rafts und damit zur Interaktion mit der Src-Kinase p56^{lck} (Arcaro et al., 2000). Bei der β -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteinkomplexes wiederum ist die Fettsäuremodifikation bedeutend für die Zielsteuerung zur Plasmamembran, zur Interaktion mit dem Thrombin-Rezeptor sowie für die Aktivierung Rho-abhängiger Signalkaskaden (Ponimaskin et al., 2000; Bhattacharyya und Wedegaertner, 2000). Allerdings geben diese Untersuchungen keine Antwort auf die Frage nach den genauen Funktionen der Fettsäuren in Transmembranproteinen. Eine Verankerungsfunktion, wie sie für periphere Proteine nachgewiesen ist, erübrigt sich in diesem Falle. Sehr wahrscheinlich dagegen ist für palmitoylierte Membranproteine aber ein Beitrag der Fettsäuren zur Vermittlung von Wechselwirkungen ihrer Transmembranbereiche mit anderen Proteinen, was durch Untersuchungen über Heterodimerisierungssignale innerhalb der Transmembranregionen von SNARE-Proteinen bereits angedeutet wurde (Laage et al., 2000).