

Institut für Molekularbiologie und Biochemie
des Fachbereichs für Humanmedizin
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. med. W. Reutter

Institut für Immunologie und Molekularbiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. M.F.G. Schmidt

Lipid and Lipoprotein Research Group
Department of Cell Biology, Department of Biochemistry
Faculty of Medicine
University of Alberta, Edmonton, Canada
Arbeitsgruppe Luc Berthiaume, Ph.D., Assistant Professor

Anreicherung und biochemische Charakterisierung einer Proteinacyltransferase (PAT) aus mikrosomalen Membranen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs
Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Heckelmann
aus München

Berlin 2001

Referent: Prof. Dr. med. W. Reutter
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Ch. Harteneck
Tag der Promotion: 13. Dezember 2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien
Universität Berlin

Meinen Eltern

Inhalt

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	7
Abkürzungen	9
1. Einführung in die Thematik	11
1.1 Einleitung.....	11
1.2 Einordnung der S-Acylierung als hydrophobe Proteinmodifikation.....	11
1.3 Palmitoylierte Proteine	13
1.3.1 Glykopolypeptid E1 des Semliki Forest Virus	15
1.3.2 Tyrosinkinase p59 ^{fyn}	16
1.3.3 Rhodopsin.....	17
1.3.4 GAP-43 / Neuromodulin (Growth cone Protein, Growth associated Protein) .	17
1.3.5 SNAP-25.....	18
1.4 Funktion der Palmitoylierung.....	19
1.5 Enzymatische versus nicht-enzymatische Palmitoylierung.....	22
1.6 Fettsäuren übertragende Enzymaktivitäten	24
1.7 Enzymtests: PAT-Assays.....	26
1.8 Akzeptoren für PAT-Assays.....	27
1.8.1 Rekombinante Proteine und Proteinreinigung über Hexahistidin (His ₆) und Affinitätschromatographie mit komplex gebundenen Metallionen.....	27
1.8.2 Peptide als Akzeptorproteine.....	28
2. Problemstellung	29
3. Material und Methoden	30
3.1 Material.....	30
3.1.1 Chemikalien / Enzyme / “Kits”	30
3.1.2 Zelllinien / Viren / Gene / Gewebe.....	31
3.1.2.1 Zelllinien.....	31
3.1.2.2 Viren	31
3.1.2.3 Gene / Plasmide.....	31
3.1.2.4 Gewebe	31
3.1.3 Besondere Geräte / Dokumentation.....	32
3.2 Methoden.....	33
3.2.1 Präparation der Akzeptoren.....	33
3.2.1.1 Präparation von E1-Glykoprotein aus der Hülle des Semliki Forest Virus	33
3.2.1.1.1 Gewinnung von Semliki Forest Viren.....	33
3.2.1.1.2 Präparation und Deacylierung der Glykoproteine E1 und E2.....	34
3.2.1.2 Herstellung rekombinanten GAP-43-GFP-His ₆ Fusionsproteins.....	34
3.2.1.2.1 Gentechnische Herstellung eines Vektors für die Proteinchimäre GAP-43-fyn-GFP-His ₆	34
3.2.1.2.1.1 Enzymatischer Verdau des Vektors und der cDNA des Fusionsproteins.....	35
3.2.1.2.1.2 Ligation der cDNA-Stücke.....	37

3.2.1.2.2	Herstellung kompetenter Zellen	37
3.2.1.2.3	Transformation der Bakterienzellen und Analyse der Umklonierung	37
3.2.1.2.4	Expression des GAP-43 - GFP-His ₆ Fusionsproteins in E.coli	38
3.2.1.2.5	Native Präparation des Fusionsproteins	38
3.2.1.3	Präparation rekombinanten SNAP-25 Proteins	39
3.2.1.3.1	Transformation von E.coli mit SNAP-25 Plasmiden	39
3.2.1.3.2	Expression von SNAP-25 Proteinen in E.coli	40
3.2.1.3.3	Native Reinigung der rekombinanten SNAP-25 Proteine	40
3.2.2	Präparation von [³ H]-Palmitoyl-Coenzym A als Fettsäuresubstrat	41
3.2.2.1	Enzymatische Herstellung der [³ H]-Pal-CoA	41
3.2.2.2	Untersuchung des Fettsäure-Derivats mit Hilfe von TLC	41
3.2.3	Präparation von PAT-Enzymquellen und Anreicherung der Enzymaktivität ..	42
3.2.3.1	PAT aus humaner Plazenta	42
3.2.3.1.1	Herstellung von Mikrosomen aus Plazenta	42
3.2.3.1.2	Membranextraktion mit Triton X-100	44
3.2.3.1.3	Chromatographische Anreicherung der PAT mit DEAE-Säule	45
3.2.3.1.4	Säulenchromatographie mit Blue Sepharose	45
3.2.3.2	Mikrosomen aus verschiedenen tierischen Geweben	45
3.2.3.3	Präparation verschiedener Membranfraktionen aus Rattenleber	46
3.2.3.4	Mikrosomenpräparationen aus Zellkulturen	49
3.2.4	PAT-Assays und Analysen	49
3.2.4.1	PAT- Assay mit SFV Glykoprotein E1	49
3.2.4.2	PAT-Assay mit auf Zellulosemembran immobilisierten Peptiden	50
3.2.4.3	PAT- Assay mit Rhodopsin	51
3.2.4.4	PAT- Assay mit fynSH432His ₆ und GAP-43-GFP-His ₆	51
3.2.4.5	PAT-Assay mit SNAP-25 Proteinen	51
3.2.4.6	Austesten verschiedener Membranfraktionen aus Rattenleber	52
3.2.4.7	Trypsinverdau der PAT-enthaltenden Mikrosomen	52
3.2.4.8	Testen des Einflusses von Trypsin auf PAT-Aktivität in Membranen	52
3.2.4.9	SDS-PAGE, Fluorographie, Phosphor-Imager Technik	52
4.	Ergebnisse	54
4.1	PAT-Assay mit transmembranem Glykoprotein E1 aus Semliki Forest Virus	54
4.1.1	Präparation des deacylierten viralen Glykoproteins E1	54
4.1.2	Präparation von Tritium-markiertem Palmitoyl-CoA als Fettsäuresubstrat	55
4.2	Anreicherung spezifischer PAT-Aktivität	56
4.2.1	Anreicherung der PAT-Aktivität in Mikrosomen	57
4.2.2	Lokalisierung der PAT in den Mikrosomen mittels Trypsinverdau	59
4.2.3	Anreicherung der PAT-Aktivität durch Membranextraktion	61
4.2.4	Anreicherung der PAT-Aktivität durch Säulenchromatographie	61
4.2.4.1	DEAE-Sepharose	61
4.2.4.2	Blue-Sepharose Chromatographie	63
4.3	Entwicklung alternativer Enzymtests	63
4.3.1	PAT-Assay mit membrangebundenen synthetischen Peptiden	63

4.3.2	Rekombinantes Fusionsprotein GAP-43-GFP-His ₆ aus <i>E.coli</i> Expression.....	66
4.3.2.1	Expression und Reinigung von GAP-43-GFP-His ₆ und GFP-His ₆	66
4.3.2.2	PAT-Assay mit rekombinantem GAP-43-GFP-His ₆	68
4.3.3	Rekombinantes SNAP-25.....	70
4.3.3.1	Expression von SNAP-25 in <i>E.coli</i> und Reinigung des Proteins.....	70
4.3.3.2	PAT-Assay mit SNAP-25.....	71
4.4	Subzelluläre Lokalisation der Palmitoyl-Acyltransferase, die myristoyliertes p59 ^{fyv} palmitoyliert.....	74
4.4.1	Trennung der Rattenleber in Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum und Plasmamembran angereicherte Fraktionen.....	74
4.4.2	Testen der Fraktionen auf PAT-Aktivität.....	74
4.4.3	Membranassoziation von PAT in Golgi-Apparat und Plasmamembran.....	75
4.4.4	Einfluß der Salzkonzentration auf die Extraktion von PAT-Aktivität aus den Membranen.....	76
5.	Diskussion.....	78
5.1	Ausblick.....	88
6.	Zusammenfassung.....	91
7.	Summary.....	93
8.	Literatur.....	95
	Lebenslauf.....	112

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1.1: Systematische Einordnung hydrophober Proteinmodifikationen	12
Abbildung 1.2: „Kinetic membrane trapping model“ am Beispiel myristoylierter und palmitoylierter Proteine (nach Bhatnagar und Gordon, 1997).....	22
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus der membrangebundenen Peptide. ...	28
Abbildung 3.1: Design des Vektors pETGAP-43-GFP-His ₆ zur gleichzeitigen Expression der Proteinchimäre GAP-43-GFP-His ₆ und dem Enzym humane N-Myristoyl-Transferase.	36
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Mikrosomenpräparation	43
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Präparation verschiedener Membranfraktionen (Golgi, endoplasmatisches Retikulum u. Plasmamembran) aus einem Gewebe.....	48
Abbildung 4.1: Gewinnung von gereinigten, deacylierten SFV Glykoproteinen E1 und E2 ...	55
Abbildung 4.2: Analyse der [³ H]-Palmitoyl-CoA Präparation mit Hilfe von Dünnschicht-Chromatographie (TLC) und Fluorographie.....	56
Abbildung 4.3: Anreicherung von PAT-Aktivität in der Mikrosomenpräparation.	58
Abbildung 4.4: Das PAT-Enzym ist in den Mikrosomen teilweise vor der Protease Trypsin geschützt. Nach Auflösen der Mikrosomen mit Detergens TX-100 wird PAT durch Trypsin inaktiviert.	60
Abbildung 4.5: Anreicherung der Enzymaktivität durch Säulenchromatographie. Triton-X100-extrahierte PAT-Aktivität aus Mikrosomen wurde der Chromatographie mit DEAE-Sepharose unterzogen. PAT-Aktivität konnte bei einer Konzentration von 125-175 mmol NaCl eluiert werden.....	62
Abbildung 4.6: PAT-Aktivität konnte in der Chromatographie mit Blue-Sepharose bei einer Cibachrom-Blue-Konzentration von 1,1-1,2 mMol eluiert werden.....	63
Abbildung 4.7: [³ H]-Palmitinsäure wird im PAT-Assay deutlich stärker in E1- und Gap-43-Peptiden eingebaut als in unspezifischen Peptiden und Leermembran.	64
Abbildung 4.8: Durch Vorinkubation mit Palmitinsäure (nicht radioaktiv markiert) kann der Unterschied des spezifischen Einbaus von [³ H]-Pal-CoA unter Enzymzugabe bei den Peptiden GAP43 und E1 gegenüber der Leermembran und dem unspezifischen Peptid vergrößert werden.....	65
Abbildung 4.9: Kein Unterschied im PAT-Assay mit angereichertem Enzym und hitzeinaktiviertem angereichertem Enzym.	66
Abbildung 4.10: Reinigung des rekombinanten GAP-43-GFP-His ₆ und GFP-His ₆	67

Abbildung 4.11: Das Fusionsprotein GAP-43-GFP-His ₆ wird nicht spezifisch durch PAT-Aktivität palmitoyliert und läßt sich nicht im Test als Reporter-Protein verwenden.....	69
Abbildung 4.12: Expression und Reinigung von SNAP-25-wt-His ₆	70
Abbildung 4.13: Im PAT-Assay ließ sich keine enzymatische Palmitoylierung des rekombinanten Proteins SNAP-25wt-His ₆ nachweisen.....	72
Abbildung 4.14: Rekombinantes SNAP-25wt-His ₆ zeigt keine enzymatische Palmitoylierung in Anwesenheit von Zellmembranen von CV1-Zellen.	73
Abbildung 4.15: Golgi- und Plasmamembran zeigen PAT-Aktivität, endoplasmatisches Retikulum nicht.....	75
Abbildung 4.16: Unterschiedliches Extraktionsverhalten der PAT-Aktivität in Golgi- und Plasmamembran bei Salzextraktion.....	77
Abbildung 5.1: Modell der Lokalisation der PAT in mikrosomalen Membranen mittels proteolytischer Inaktivierung.....	85
 Tabellen	
Tabelle 1.1: Die Bindungseigenschaften S-Palmitoylierung und N-Myristoylierung.....	12
Tabelle 1.2: Einteilung Palmitoylierter Proteine nach Resh (1999).....	15
Tabelle 4.1: Anreicherung der relativen spezifischen PAT-Aktivität um das 225fache in Mikrosomen.....	57
Tabelle 5.1: Ergebnisse der in-vitro-PAT-Assays mit verschiedenen Akzeptorproteinen.....	78
Tabelle 5.2: Übersicht: Subzelluläre Verteilung der PAT-Aktivität gegenüber p59fyn im Vergleich mit anderen PAT-Aktivitäten und Verteilungsmustern palmitoylierter Proteine.....	87

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACBP	Acyl-CoA bindende Proteine (acyl-CoA binding proteins)
BHK	Nephrözyten Zelllinie (Baby-Hamster-Kidney)
COS-7	Nephrözyten Zelllinie (Cercopithecus aethiops, African green monkey)
CPE	Zytopathogener Effekt (cytopathogenic effect)
cpm	Zähleinheiten pro Minute (counts per minute)
CV1	Nephrözyten Zelllinie (Cercopithecus aethiops, African green-Monkey)
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl (weak anion exchanger / schwarzer Anionentauscher)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
E1, E2	Hüll-Glycoproteine (envelope glycoproteins) des SFV
Fyn	NRTK der Src-Familie, p59 ^{fyn} (59 kDa Protein)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GAP-43	growth-associated Protein (43 kDa)
GFP	Green fluorescent Protein
His₆	Hexahistidinsequenz
hNMT, NMT	(humane) N-Myristoyltransferase
IPTG	Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid
Lck	NRTK der Src-Familie, p56 ^{lck} (56 kDa Protein)
NRTK	non-Rezeptor Tyrosin Kinase
NTA	Nitrilotriessigsäure (Nitrilotriacetic acid)
Pal-CoA	Palmitoyl-Coenzym A
PAT	Palmitoylo-acylo-transferase, S-Acyltransferase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPT	Protein Palmityltransferase
PTK	Protein Tyrosinkinase
ROS	Äußeres Segment der Stäbchenzellen (rod outer segment)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)

Abkürzungen

RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SFV	Semliki Forest Virus
SH1 - SH4	Src homologe Domäne 1 - 4
SNAP-25	synaptosomal-associated protein (25 kDa Protein)
SNARE	SNAP-Rezeptor
Sp-C	Surfactant Protein C
Src	NRTK, Protoonkogen, p60 ^{src} (60 kDa Protein)
STI	Trypsin Inhibitor aus der Sojabohne (from soybean)
t-SNARE	target-membrane SNARE
TX-100	Triton X-100, nichtionisches Detergens
TZ	Tischzentrifuge
TPCK	n-Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethyl-Keton
UpM	Umdrehung pro Minute
wt	Wildtyp

Herrn Prof. Dr. med. Werner Reutter danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die hilfsbereite Betreuung der Arbeit. Auch bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael F.G. Schmidt, Leiter des Instituts für Immunologie und Molekularbiologie und Dekan des Fachbereichs für Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, unter dessen motivierender Leitung die vorliegende Arbeit entstanden ist, möchte ich mich für die stets gewährte menschliche und wissenschaftliche Unterstützung herzlich bedanken.

Herrn Dr. Michael Veit danke ich für die äußerst hilfreichen fachlichen Gespräche über den theoretischen Hintergrund und die guten strategischen Ratschläge zur Versuchsplanung und praktischen Laborarbeit.

Herrn Dr. Evgeni Ponimaskin danke ich für die Unterstützung im Bereich der Chromatographie.

Besonderer Dank gebührt Frau Palissa, Frau Lyhs, Frau Poese und Frau Kinder für die sorgfältige Heranführung an verschiedene Arbeitstechniken und technische Unterstützung im Labor. Hervorzuheben sind Frau Lyhs' tatkräftige Hilfe bei vielen Präparationen und Versuchen sowie Frau Kinders engagierte Hilfe bei der Überarbeitung des Manuskripts.

Luc G. Berthiaume, PhD, Assistant Professor, danke ich für die Möglichkeit der Forschung innerhalb der „Lipid & Lipoprotein Research Group“ (D.E. Vance) der Abteilung für Biochemie der Medizinischen Fakultät der „University of Alberta“ in Edmonton, Kanada. Der siebenmonatige Aufenthalt in Edmonton bedeutete für mich eine außerordentliche fachliche und persönliche Erfahrung. Ich verdanke ihm u.a. die Einführung in molekulargenetisches Arbeiten und Proteinexpression. Ich möchte mich bei Yang Zhao, Craig Garen, James McCabe, Christine Mattar und Carrie Soltys aus seiner Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Robert Scott Kiss, PhD, sowie David Shields und Richard Lehner, PhD, danke ich herzlich für die unermüdlichen fachlichen Erörterungen für mich neuer Methoden während der Zeit in Edmonton.

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

1. Veit M, Sachs K, Heckelmann M, Maretzki D, Hofmann KP und Schmidt MFG (1998)
Palmitoylation of rhodopsin with S-protein acyltransferase: enzyme catalyzed reaction versus autocatalytic acylation.
Biochim. Biophys. Acta **1394**: 90-98
2. Veit M, Sachs K, Heckelmann M, Maretzki D, Hofmann KP und Schmidt MFG (1997)
Palmitoylation of rhodopsin with S-protein acyltransferase: enzyme catalyzed reaction versus autocatalytic acylation.
Poster beim Dritten internationalen Kolloquium über „Cellular Signal Recognition and Transduction“ (Freie Universität Berlin, Sonderforschungsbereich 366 und Alexander von Humboldt-Stiftung) in Berlin, 7.-11. Oktober 1997

Lebenslauf

Michael Heckelmann

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 9. August 1971
Geburtsort: München, Bundesrepublik Deutschland
Eltern: Edeltraut Heckelmann (geb. Hotz), Manfred Heckelmann
Familienstand: Ledig, Lebensgemeinschaft mit Maike N. Weber und unserer Tochter Leonie A. Heckelmann (*27.08.2000, Berlin)

Schulbildung

1982-1991 Kaiserin-Friedrich-Schule, Bad Homburg v.d.H. (Gymnasium)
1988 3 Monate Schüleraustausch nach Spruce Grove, Alberta, Kanada (Programm der Regierungspräsidenten der Bundesländer)
06/1991 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Zivildienst

07/1991 - 06/1992 Altenpflege im Altenzentrum Westerland, Sylt
07/1992 - 10/1992 Krankenpflege im Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie der Universitätsklinik der J.W.-Goethe-Universität Frankfurt/Main

Hochschulausbildung

10/1992 - 09/1994 Medizinstudium an der Freien Universität Berlin
04/1995 - 08/1999 Klinische Semester des Medizinstudiums an der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin
08/1999 - 08/2000 Praktisches Jahr (s. Klinische Erfahrung)
04/2001 Teilapprobation als Arzt (Arzt im Praktikum)
07/1993 Immatrikulation Philosophie als Aufbaustudiengang (Magister) an der Freien Universität Berlin
12/2000 Abschluss der Zwischenprüfung in Philosophie

Klinische Erfahrung

- 08/1998 Famulatur, **Pädiatrische Nephrologie** (Prof. Dr. Langman) im **Childrens Memorial Hospital, Northwestern University Medical School, Chicago**
- 09/1998 Famulatur, **Neurochirurgie** (Prof. Dr. K. Post) an der **Mount Sinai School of Medicine, New York**
- 05/1999-03/2001 Extrawache im **Unfallkrankenhaus Berlin - Krankenhaus Berlin-Marzahn**, auf einer **interdisziplinären Intensivstation**
- 08/1999-10/1999 Praktisches Jahr, **Innere Medizin** in der **Franz-Volhard-Klinik, Nephrologie** (Prof. Luft) Berlin-Buch
- 10/1999-12/1999 Praktisches Jahr, **Innere Medizin** im **Inselspital Bern**, Notaufnahme (Leit.Oberarzt Dr. med. Kohler), Bern, Schweiz
- 12/1999-03/2000 Praktisches Jahr, **Chirurgie, Herz-Thorax Chirurgie** am **Groote Schuur Hospital, University of Cape Town**, (Prof. von Oppel, Prof. De Groot), Südafrika
- 03/2000-08/2000 Praktisches Jahr, **Pädiatrie** an der **Kinderklinik der Charité Berlin**, Pädiatrische Onkologie (Prof. Henze) und Aufnahmestation (Prof. Gädicke)
- seit 08/2001 Zur Zeit als Arzt im Praktikum, **Pädiatrie** (Leit. Oberarzt Erik Arthur Andersen) am **Centralsygehuset i Nykøbing Falster**, Dänemark

Labortätigkeit / Dissertation

- 4/1996 - 10/1996 Vollzeitige Forschungstätigkeit auf dem Gebiet der "Enzymologie der Proteinpalmitoylierung" unter der Betreuung von **Prof. M.F.G. Schmidt, Institut für Immunologie und Molekularbiologie (IMB)** des Fachbereichs für Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin. Dort auch Tätigkeit als studentische Hilfskraft (06/97 bis 06/98).
- 10/1996 - 06/1997 Forschungsaufenthalt an der **University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada**, in der Arbeitsgruppe "**Lipid and Lipoprotein**

Research Group" der Medizinischen Fakultät. Projekt zum Thema:
"Protein Palmitoylierung", unter der Betreuung von **Luc Berthiaume,**
PhD., Assistant Professor