Diss. ETH Nr. 11728

Bindungseigenschaften einer fettsäure-acylierten Subpopulation von Spektrin

Abhandlung zur Erlangung des Titels
Doktorin der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

Gabriella M. Staltner

Dipl. nat. sc. ETH
geboren am 13. 3. 1967
von Zürich

Angenommen auf Antrag von:
Prof. Dr. G. Semenza, Referent
Dr. Hans. U. Lutz, Korreferent
Prof. Dr. K. Winterhalter, Korreferent

1996

Zusammenfassung

Spektrin, das häufigste Zytoskelettprotein menschlicher Erythrozyten, kommt in zwei Subpopulationen vor. Eine beinhaltet rund 90% aller Spektrinmoleküle, wird mit Puffer tiefer Ionenstärke als Dimer aus der Membran extrahiert und wurde bereits ausführlich charakterisiert. Die andere Subpopulation von Spektrin, die ebenfalls aus Bande 1 und 2 besteht, macht weniger als 10% aller Spektrinmoleküle aus, ist resistent gegenüber Extraktion mit Puffer sowohl tiefer als auch hoher Ionenstärke und wurde aufgrund dieser Eigenschaft als TMA-Sp (tightly membrane-associated spectrin) bezeichnet. Bande 2 von TMA-Sp baut als einziges hochmolekulares Zytoskelettprotein [^{3}H]-Palmitat zwar nur in substöchiometrischen Mengen ein, wenn menschliche Erythrozyten mit [^{3}H]-Palmitat inkubiert werden. Isolierte Bande 2 von TMA-Sp aus menschlichen Erythrozyten war dagegen in stöchiometrischen Mengen fettsäure-acyliert, enthielt vor allem Oelsäure und nur halbsoviel Palmitin- und Stearinsäure. Bande 2 von TMA-Sp band bei tiefer Konzentration, 0°C und hoher Salzkonzentration 10 mal besser als Spektrin Bande 2 an zytoskelett-freie Vesikelmembranen. Die Bindung von TMA-Sp Bande 2 an Vesikel wurde durch kovalent gebundene Fettsäuren vermittelt, denn durch eine vorgängige Hydroxylamin-Behandlung des Proteins konnte die Bindung um bis zu 70% unterdrückt werden. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein peripheres Membranprotein in einer metabolisch kontrollierbaren Weise mit der Membran assoziert. Die Existenz einer in vivo fettsäure-acylierten Subpopulation von Spektrin eröffnet neue Perspektiven für die Verankerung des Zytoskeletts in der Membran, und könnte sowohl in der Ontogenese der Membran, als auch bei der durch ATP-Verarmung induzierten Vesikulierung eine Bedeutung haben.

Summary

Spectrin, the main cytoskeletal protein in human erythrocytes exists in two subpopulations. The major one, comprising 90% of all spectrin molecules, can be extracted from the membrane by low ionic strength buffer as a dimer and has been extensively characterized. The second spectrin subpopulation also consists of band 1 and band 2, but comprises less than 10% of all spectrin molecules and is resistent to low and high ionic strength extraction. For this reason we call it tightly membrane-associated spectrin, TMA-spectrin. Band 2 of TMA-Sp was [^{3}H]-palmitoylated as the only high molecular cytoskeletal protein, but only in substoichiometric amounts, when human red cells were incubated with [^{3}H]-palmitate. Isolated band 2 of TMA-Sp was found to be fatty acid acylated in stoichiometric amounts and carried mainly oleate and only half as much stearate and palmitate. At low concentration, 0°C and in the presence of high salt concentration band 2 of TMA-Sp bound ten times better to cytoskeleton-stripped membranes than spectrin band 2. Binding was mediated by spectrin band 2 bound fatty acids, since pretreatment of TMA-Sp band 2 with hydroxylamine inhibited its binding by up to 70%. These results show that the association of a peripheral membrane protein with the membrane can be metabolically controlled. The existence of an in vivo fatty acid acylated subpopulation of spectrin opens new perspectives in understanding the binding of the cytoskeleton to the membrane. It is likely that TMA-Sp plays an important role in the cell membrane ontogenesis and also in spontaneous vesiculation of ATP-depleted erythrocytes.