



Doctoral Thesis

## **Novel interaction partners of creatine kinase isoenzymes in the brain**

**Author(s):**

Bürklen, Tanja Simone

**Publication Date:**

2005

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005068168> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss ETH No. 16215

# **Novel interaction partners of Creatine Kinase isoenzymes in the brain**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of

**Doctor of Natural Science**

Presented by

**Tanja Simone Bürklen**

Dipl.-Biologin, University of Konstanz, Germany

German citizen

accepted on recommendation of:

Prof. Dr. Theo Wallimann, examiner

Prof. Dr. Ulrike Kutay, co-examiner

Zürich, August 2005

## 1. Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Erforschung der zellulären Zusammenhänge zwischen der Kreatin Kinase (CK) und potentiellen Interaktionspartnern im Gehirn.

CK ist ein Schlüsselenzym, welches für die Bereitstellung und den Transport von Energie in eukaryotischen Geweben mit hohem und wechselndem Energiebedarf verantwortlich ist. CK ist in den Zellen isoenzym-spezifisch an Stellen der Energieproduktion und des Energieverbrauchs lokalisiert. Es gibt vier verschiedene Isoformen, welche alle die gleiche reversible Reaktion katalysieren, nämlich den Phosphotransfer von ATP auf das Substrat Kreatin, um die energiereiche Verbindung Phosphokreatin und ADP herzustellen. Die beiden zytosolischen Formen sind die „brain-type“ CK (BCK) im Gehirn und anderen Geweben und die „muscle-type“ CK (MCK) in Muskelgeweben. Zwei weitere Isoformen sind in den Mitochondrien lokalisiert, die ubiquitäre (uMtCK) und die sarkomerische CK (sMtCK).

Diese Arbeit ist in zwei große Themenbereiche unterteilt, wobei sich das erste mit der BCK und das zweite mit der uMtCK beschäftigt.

BCK spielt eine wesentliche Rolle beim Transport von Neurotransmittern in Neuronen und von Ionen in Astrozyten durch die Regeneration von ATP. Es ist wenig bekannt über eine direkte Kopplung der BCK an Enzyme, die für die Gehirnfunktionen wichtig sind.

Ziel des Kapitels 1 ist daher die Identifizierung von Interaktionspartnern für die BCK im Gehirn. Dazu wurde mit Hilfe der „Yeast two-hybrid“ (Y2H) Methode in einer humanen Gehirn cDNA Bibliothek nach potentiellen Interaktionspartnern von BCK gesucht.

Dabei wurde das Golgi Matrix Protein GM130 als Interaktionspartner identifiziert. Diese Interaktion wurde mit biochemischen, mikrobiologischen und zellbiologischen Experimenten bestätigt. Überdies konnte die Assoziation von BCK mit GM130 bei immunhistologischen Experimenten einer speziellen Phase des Zellzyklus zuordnen, der frühen Prophase der Mitose.

GM130 ist ein zytoplasmatisches Protein, welches fest an die Membranen des Golgi Apparates gebunden ist. Dort ist GM130 Teil eines größeren oligomeren Proteinkomplexes, der aus dem „Golgi reassembly stacking protein“ GRASP65, p115 und

Giantin besteht. Die genaue Aufgabe dieses Komplexes ist noch unklar, wahrscheinlich ist jedoch eine stützende Wirkung auf die Struktur des Golgi Apparates. GM130 spielt eine Rolle bei der Golgifragmentierung während der Mitose. Dabei wird GM130 von der Cdc2 Kinase phosphoryliert, was die Bindung zu p115 auflöst. Diese Phosphorylierung ist synchron mit der Umformung der Golgi Cristae in kleine Vesikel, was vermuten lässt, dass dies der erste Schritt zur Golgifragmentierung ist. Die Regulierung der Mitose und den damit zusammenhängenden Signalkaskaden benötigt Energie, welche durch die BCK Reaktion zur Verfügung gestellt werden könnte. Eine Beteiligung der BCK am Initialschritt zur Golgifragmentierung zu Beginn der Mitose scheint daher logisch. Die Identifizierung von GM130 als neuer Interaktionspartner von BCK ist daher höchst interessant und gibt einen neuen Aspekt der Energiebereitstellung durch das CK System für die Gewährleistung der lebenswichtigen Zellteilung.

Die Kapitel zwei und drei befassen sich mit der ubiquitären mitochondrialen CK (uMtCK). Mittels biochemischer Affinitätschromatographie konnte die Interaktion von uMtCK mit der Amyloid Precursor Proteinsuperfamilie (APSF) gezeigt werden.

Die APSF besteht aus drei hochkonservierten transmembranären Glykoproteinen, deren genaue Funktionen noch weitgehend unklar sind. Zur APSF gehören neben dem „Amyloid Precursor Protein“ (APP) das „Amyloid Precursor-like Protein“ 1 und 2 (APLP1, APLP2). Die APSF bestehen aus einem größeren extrazellulären und einem kleineren intrazellulären Bereich, welche durch eine Transmembrandomäne voneinander getrennt sind. Nur APP besitzt die Struktur für das A-beta Peptid (A $\beta$ ), welches die Hauptkomponente der senilen Plaques in der Alzheimer Demenz (AD) ist. Alle Proteine der APSF besitzen in ihrer intrazellulären C-terminalen Domäne eine kurze Sequenz, das NPXY Motiv. Für die biochemische Charakterisierung der Interaktion wurde für die APSF ein synthetisch hergestelltes Peptid verwendet, bestehend aus den 18 C-terminalen Aminosäuren von APLP1 inklusive des NPXY Motivs. Zusammen mit rekombinanter uMtCK konnten *in vitro* gezeigt werden, dass diese Interaktion direkt und von hoher Affinität ist (175 nM) ist. Obwohl sich die zytosolischen und die mitochondrialen CKs strukturell nur wenig unterscheiden, ist die Interaktion mit dem APLP1 Peptid isoform-spezifisch für uMtCK. Bei Co-Transfektion-Experimenten mit uMtCK und diversen Konstrukten der APSF, hauptsächlich jedoch mit dem C-Terminus des APP (C31), wurde das Erscheinen einer

hoch molekularen uMtCK Bande (HMW uMtCK, normal ca. 45 kDa) beobachtet. In der Literatur wird berichtet, dass CK sehr sensitiv mit reaktiven Substanzen, wie z.B. freien Radikalen, reagiert. Es ist daher möglich, dass CK durch eine oxidative Modifikation, ausgelöst durch die Co-Transfektion der APSF, ein erhöhtes molekulares Gewicht bekommt. Die Resultate der Oxyblot-Analyse konnten diese Annahme jedoch nicht bestätigen. Im Gegenteil scheint eine Überexpression von APLP1 eher eine schützende Wirkung auf oxidative Schädigung von zellulären Proteinen zu haben. Daher wurde die HMW uMtCK Bande durch Massenspektroskopie analysiert und als uMtCK inklusive mitochondrialer Importsequenz identifiziert. Außerdem war die Akkumulation der HMW uMtCK abhängig von der Menge des co-transfizierten C31. Um die Funktion der Interaktion von APSF und uMtCK zu untersuchen, wurde folgende Arbeitshypothese aufgestellt. Wenn man davon ausgeht, dass die Interaktion von APSF und uMtCK im Zytoplasma stattfindet, könnten die APSF Proteine entweder eine „abfangende“ oder „begleitende“ Funktion auf uMtCK haben. Dies wurde mit subzellulärer Fraktionierung von APLP1 überexprimierenden Zellkulturen untersucht. Im Falle der „abfangenden“ Funktion sollte bei APLP1-Überexpression weniger uMtCK in die Mitochondrien gelangen, während bei der „begleitenden“ Funktion eine Erhöhung der Proteinmenge in den Mitochondrien zu erwarten wäre. Die Überexpression von APLP1 hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge in der ganzen Zelle und Lokalisierung der uMtCK in den Mitochondrien. Eine Co-Lokalisation von uMtCK und APLP1 wurde jedoch in der Mitochondrien Fraktion nachgewiesen. Interessanterweise wurde eine erhöhte enzymatische Aktivität der uMtCK in den Mitochondrien gemessen. Meine Hypothese konnte also nicht bestätigt werden und eine neue Interpretation der gefundenen Resultate wird in der folgenden Arbeit diskutiert.

## 2. Summary

The subjects of this dissertation are the cellular correlations between creatine kinase (CK) and its potential interaction partners in the brain.

CK is a key enzyme for providing and transporting energy in eukaryotic tissues that have a high and fluctuating energy turnover. CK is located, in an isoenzyme-specific manner, at subcellular sites of energy production and consumption. There are four different isoforms that all catalyze the same reversible reaction, namely the transfer of the  $\gamma$ -phosphoryl group of ATP to the substrate creatine (Cr) to build phosphocreatine (PCr) and ADP.

There are two cytosolic isoforms; the brain-type (BCK) in the brain and other tissues and the muscle-type CK (MCK) in muscle tissues. Two mitochondrial isoforms are located in the cristae and the intermembrane space of mitochondria; the ubiquitous mitochondrial (uMtCK) and the sarcomeric mitochondrial CK (sMtCK).

This work is divided into two main parts. The aim of chapter 1 in the first part was to identify and characterize novel interaction partners of cytosolic BCK in the brain.

By regenerating ATP, BCK plays an important role in the transport of neurotransmitters in neurons, and ions in astrocytes. Little is known about the direct coupling of BCK to enzymes that are important for brain functions. I therefore used the yeast two-hybrid method to screen a human brain cDNA library for potential interaction partners.

The Golgi Matrix Protein GM130 was identified as an interaction partner for BCK. This interaction was confirmed with biochemical, microbiological and cell biological experiments. Moreover, in our immunohistochemical experiments this interaction was associated to a certain phase of the cell cycle, namely the early prophase.

GM130 is a cytoplasmic protein tightly bound to the membranes of the Golgi apparatus. GM130 is part of a larger oligomeric complex consisting of the Golgi reassembly stacking protein 65 (GRASP65), p115 and giantin. The exact functions of this complex still remain unclear, however it is likely that it exerts a tethering function for the Golgi apparatus. GM130 plays a role in the fragmentation processes of the Golgi apparatus during mitosis. There, it is phosphorylated by the Cdc2 kinase and with that p115 can no longer bind to GM130. Phosphorylation of GM130 and dissociation of p115 are synchronized with the

conversion of Golgi cisternae into small vesicles which suggests that this is the initial step in Golgi fragmentation. It therefore seems logic that BCK participates at this initial step of Golgi fragmentation at the onset of mitosis. It is clear that there are many energy-requiring processes in signalling cascades that regulate mitosis where BCK could be involved in this energy provision. Thus, the results shown here are extremely important and reveal new aspects in the energy provision by the CK system involved in cell division.

The chapter 2 and 3 focus on the uMtCK. Using an affinity chromatography an interaction between uMtCK and the amyloid precursor super family (APSF) proteins was identified. The APSF is composed of three-highly conserved transmembrane glycoproteins; the amyloid precursor protein (APP) and the amyloid precursor-like proteins 1 and 2 (APLP1, APLP2) whose exact functions are still unclear. APSF proteins share a highly conserved large extracellular domain, a single membrane-spanning domain (TMR), and a smaller intracellular domain. APP is the precursor for the A beta peptide (A $\beta$ ), the main component of senile plaques found in brains of Alzheimer's Disease (AD) patients. The APSF proteins have the highly conserved NPXY motif sequence within their intracellular C-terminal domain in common.

For the biochemical characterization of the interaction, a synthetically processed peptide containing the NPXY motif surrounded of 18 amino acid residues corresponding to that of the APLP1 sequence was used. It was shown *in vitro* that the interaction between the peptide and a recombinant purified uMtCK is direct and of a high affinity (175 nM). Although the sequence homology between the cytosolic and the mitochondrial CK isoforms is high, the interaction between uMtCK and the APLP1 peptide is isoform specific and restricted to the uMtCK isoform. During the co-transfection experiments with uMtCK and diverse APSF constructs, mainly the truncated C-terminus of APP (C31), the appearance of a high molecular weight (HMW) band of uMtCK (normally about 45 kDa) was observed. It is reported in the literature that the CKs are highly sensitive to oxydative damage. The idea then was that co-transfection of uMtCK and the APSF leads to oxydative stress and modification of uMtCK in turn leads to a higher molecular weight. However, the results of oxyblot analysis revealed the opposite, namely decreased protein oxidation due to transfection. Then the HMW band of uMtCK was analyzed by mass spectrometry, which revealed the uMtCK sequence including the mitochondria import sequence. Further,

## Summary

---

it was shown that the accumulation of the HMW band of uMtCK was dependent on the concentration of the amount of transfected C31. I proposed the hypothesis that if the interaction takes place in the cytoplasm the APSF proteins could act either as a scavenger or a chaperone for uMtCK. I analyzed this by subcellular fractionation experiments with APLP1 over-expressing HEK 293 cells. In the case of a scavenging function I expected less uMtCK in the mitochondria whereas in the case of a chaperone-like function more uMtCK in the mitochondria fraction. I did not observe any differences in the protein level in the whole cell lysates as well in the cytoplasm or the mitochondrial fraction. However, a co-localization of uMtCK and APLP1 in the mitochondria was observed. Interestingly, an increase of uMtCK activity in the mitochondria due to over-expression of APLP1 was detected. Thus, I could not verify my original hypothesis. However, the experimental results are discussed here within a different framework. The data suggest that the interaction between APLP1/C31 and uMtCK has beneficial effects on the cell by protecting them from oxidative stress and assuring uMtCK function in the mitochondria.