

1. Einführung in die Thematik

1.1 Einleitung

Proteine haben in der Zelle wichtige Funktionen als Transporter, in der Signaltransduktion sowie in der Stoffwechsel- und Wachstumsregulation. Um derart vielen Funktionen gerecht zu werden, sind neben der spezifischen Faltung der Proteine dynamische Eigenschaftsänderungen von grundlegender Bedeutung. Eine mit wachsender Intensität erforschte Proteinmodifikation von zunehmender Bedeutung stellt die Proteinacylierung (engl. auch Lipidation) dar, die kovalente Bindung von Lipiden an Proteine. Diese wurde von Schmidt und Schlesinger erstmals 1979 als solche beschrieben, nachdem Folch-Pi und Lees ca. 30 Jahre zuvor das Vorkommen von Protein-Fett-Verbindungen entdeckt haben, die sie „Proteolipids“ genannt haben (Folch-Pi und Lees, 1951).

1.2 Einordnung der S-Acylierung als hydrophobe Proteinmodifikation

Während und nach der Proteinbiosynthese werden die Proteine auf verschiedene Arten modifiziert, was ihre Eigenschaften und Funktionsweisen sehr stark ändern kann (Wold, 1981). Beispiele für andere bekannte Modifikationen sind neben der Acylierung etwa die proteolytische Spaltung, die Glykosylierung oder die Phosphorylierung.

Bei der Acylierung von Proteinen kommt es zur kovalenten Bindung von Fettsäuren, also zu einer hydrophoben Proteinmodifikation. Die drei Hauptformen der Lipidation stellen die (Fett-) Acylierung (engl. fatty acylation; Schlesinger *et al.*, 1993), die Isoprenylierung (Gelb, 1997; Zhang und Casey, 1996) und die Membranverankerung mittels Glykophospholipiden (engl. Glypiation; Ferguson und Williams, 1988; Udenfriend und Kodukula, 1995) dar. Diese Kategorien entsprechen den kovalenten Modifikationen mit Fettsäuren, Isoprenylgruppen und Glykosylphosphatidylinositolstrukturen. Eine Übersicht geben **Abb. 1.1** und **Tabelle 1.1**.

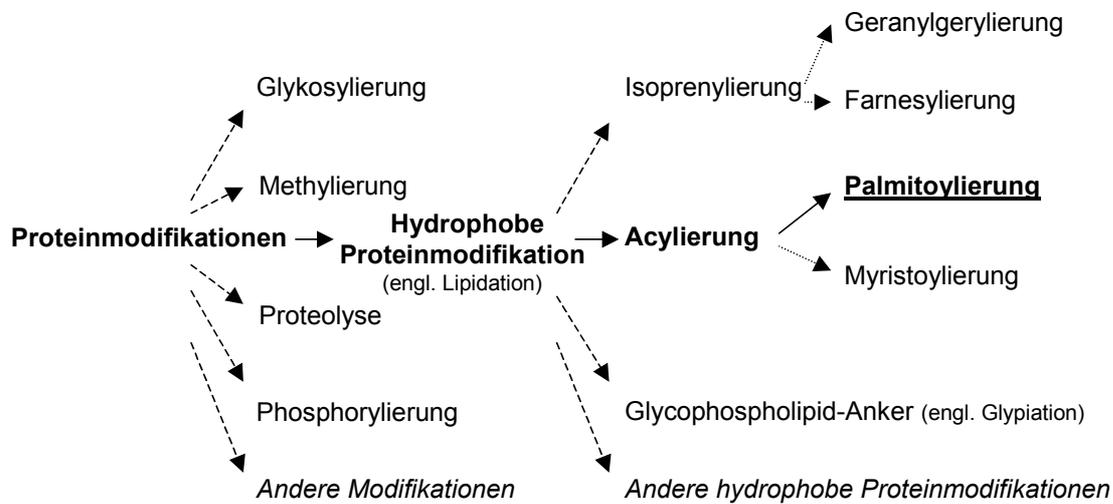


Abbildung 1.1: Systematische Einordnung hydrophober Proteinmodifikationen

Acylierung	Bindung	Substrate
<p>S-Palmitoylierung:</p> $\text{CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)SCH}_2\text{-R}$ <p>(C16)</p>	<p>Thioesterbindung; vorwiegend Palmitoyl-CoA, an Cystein; reversibel</p>	<p>Membranassoziiertes Protein (posttranslational)</p>
<p>N-Myristoylierung:</p> $\text{CCCCCCCCCCCC(=O)NCH}_2\text{-R}$ <p>(C14)</p>	<p>Amidbindung; an Glycin irreversibel</p>	<p>Myristoyl-CoA, Co-translationale Modifikation</p>

Tabelle 1.1: Die Bindungseigenschaften S-Palmitoylierung und N-Myristoylierung

Die Acylierung erfolgt durch kovalente Fettsäureanlagerung über Amidbindung (N-Acylierung) oder Thioesterbindung (S-Acylierung). Die N-Acylierung ist bereits weitestgehend erforscht (Towler *et al.*, 1988). Hier wird die gesättigte 14kettige Fettsäure Myristinsäure (C14:0) kotranslational über eine Amidbindung an einen aminoterminalen Glycinrest gebunden (Myristoylierung). Für die N-Myristoylierung ist spezifisch Myristoyl-CoA der Fettsäuredonator. Ein monomeres, cytosolisches Enzym, die N-Myristoyltransferase (Nmt), überträgt die Fettsäure auf das Protein, nachdem eine zelluläre Methionylaminopeptidase den initialen Methioninrest entfernt hat (Fütterer *et al.*, 2001; Bhatnager *et al.*, 1999; McIlhinney, 1995; Johnson *et al.*, 1994; Gordon *et al.*, 1991). Die Konsensus-Sequenz für die

Myristoylierung ist: MGXXXS/CX (M=Methionin, G=Glycin, S=Serin, C=Cystein, X=nicht definierte Aminosäure). Die Myristoylierung ist bis auf einige Ausnahmen (da Silva und Klein, 1990) eine irreversible Modifikation des Proteins.

Die vollständige Charakterisierung der S-Acylierung hingegen ist noch nicht gelungen. Weder der Mechanismus noch die genaue Funktion dieser Proteinmodifikation sind bisher vollends aufgedeckt.

Fettsäuresubstrat für S-Acylierungen können verschiedene langkettige Fettsäuren sein. So finden sich neben der am häufigsten vorkommenden 16kettigen Palmitinsäure (C16:0) auch Myristinsäure (C14:0), Stearinsäure (C18:0) und Arachidonsäure (C20:4) in Thioesterbindung an zellulären Proteinen (Dunphy und Linder, 1998; van Cott *et al.*, 1997; Hallak *et al.*, 1994). Ich werde hier, wie in der Literatur weitgehend üblich, vereinfachend den Begriff Palmitoylierung synonym mit S-Acylierung verwenden (Dunphy und Linder, 1998; Casey, 1995). Die Thioesterbindung erfolgt an Cysteinresten der Proteine. Palmitoylierte Cysteine befinden sich oft in der Nähe von Prenylierungs- oder Myristoylierungsstellen und können am Amino- oder Carboxyl-Terminus sowie innerhalb eines Polypeptids (Bhatnager und Gordon, 1997) liegen. Bei transmembranen Proteinen liegen sie meist innerhalb von vierzehn Aminosäuren juxtamembranär (Reverey, 1996; Ponimaskin und Schmidt, 1995; Schmidt *et al.*, 1988). Im Gegensatz zu anderen Proteinmodifikationen, wie etwa der Myristoylierung oder Isoprenylierung (stabile Thioetherbindung an Cysteine mit Farnesyl und/oder Geranylgeranyl), stellt die Palmitoylierung bis auf einige Ausnahmen (Parat und Fox, 2001) eine reversible Modifikation dar (Casey, 1995). Damit könnte diese Eigenschaftsänderung zellulären Regulator- oder Modulatorfunktionen dienen (Dunphy und Linder, 1998; Milligan *et al.*, 1995), wodurch ihr besondere Bedeutung zukommt.

1.3 Palmitoylierte Proteine

Seit der Beschreibung der Proteinpalmitylierung an viralen Glykoproteinen (Schmidt *et al.*, 1979; Schmidt und Schlesinger, 1979) ist eine rasch steigende Zahl verschiedener Proteine entdeckt worden, die ebenso palmitoyliert werden. Dabei sind in allen untersuchten eukaryontischen Zellen (Hefe-, Insekten- und Vertebratenzellen) palmitoylierte Proteine gefunden worden, ebenso in Viren, die in diesen Zellen gezüchtet wurden (Veit und Schmidt, 1998). Im Gegensatz zu myristoylierten Proteinen, die oft auch cytosolisch vorliegen, sind palmitoylierte Proteine meist membrangebunden. Untersuchungen der thermodynamischen Wechselwirkungen acylierter Proteine an Membranen zeigen, daß die Membranaffinität eines

Proteins durch Palmitoylierung etwa 15 mal höher ist als durch Myristoylierung (Peitzsch und McLaughlin, 1993).

Marylin D. Resh (1999) schlägt die in **Tabelle 1.2** wiedergegebene Einteilung der palmitoylierten Proteine in vier Gruppen vor. In der ersten Gruppe faßt sie Transmembranproteine zusammen, die an juxtamembranär oder im transmembranen Bereich liegenden Cysteinen acyliert sind. Die zweite Gruppe bilden die Proteine der Ras-Familie. Diese sind in der C-terminalen Region palmitoyliert, nachdem sie zuvor an Cysteinresten in der "CAAX-box" prenyliert worden sind. In den beiden anderen Gruppen befindet sich die Palmitoylierungsstelle in der Nähe des N-Terminus. Dabei besteht die dritte Gruppe aus Proteinen, bei denen ein oder mehrere Cysteinreste innerhalb der ersten 10-20 N-terminalen Aminosäuren liegen. Proteine der vierten Gruppe sind zweifach acyliert und beinhalten eine "mini-Konsensus"-Sequenz: Met-Gly-Cys am Aminoterminus. Glycin an Position 2 wird myristoyliert und Cystein an Position 3 palmitoyliert, wobei die Myristoylierung Voraussetzung für die Palmitoylierung zu sein scheint (Alland *et. al.*, 1994; Mumby *et al.*, 1994).

Typ I: Transmembranproteine, integrale oder periphere Membranproteine

TGF α	...EKPSALLKGRTA <u>CC</u> HSETVV
Transferrin-Rezeptor	...KANVTKPKR <u>C</u> SGSICYGT...
P-Selectin	...KDDGK <u>C</u> PLNPHS
CD4	...GIFF <u>C</u> VRCRHHRRRQ...
CD36	MG <u>C</u> DRN <u>C</u> <u>C</u> ACRSKTIK
Caveolin-1	...VPCIKSFLIEIQ <u>C</u> ISRVSIIYVHTF <u>C</u> DPFF...
Band 3	...FTGIQI <u>C</u> LAVLWVV...
SNAP-25	...LGKFC <u>C</u> GL <u>C</u> V <u>C</u> PC <u>C</u> NKLKSSDA...
Virale Proteine	
Influenza HA ₁ Subtyp	...M <u>C</u> SNGSLQ <u>C</u> RICI
Sindbis virus E2 Protein	...PTSLALL <u>C</u> CVRSAANA
Sindbis virus 6K Protein	...R <u>C</u> CCSCCLPF
VSV G Protein	...RVGIHL <u>C</u> IKLKHTKK...
HIV-1 gp160	...DDLRS <u>L</u> CLFSYHRLRD...
Rift valley fever virus G2	...FSSIAH <u>C</u> LAVL...
Rezeptorproteine mit sieben Transmembranregionen (Seven transmembrane receptors)	
α 2A Adrenalin Rezeptor	...RRAFKKIL <u>C</u> RGDRKRIV
β 2 Adrenalin Rezeptor	...FQELL <u>C</u> LRRSSLK...
Dopamin D1Rezeptor	...LGCYRLCPAT...
LH/hCGRezeptor	...LLSRFG <u>C</u> CKRRAELYRRK...
Endothelin A Rezeptor	...FQS <u>C</u> L <u>C</u> CC <u>C</u> YQSKS...
Endothelin B Rezeptor	...KRFKNCFKSC <u>L</u> CC <u>W</u> CQSFE...
Vasopressin Rezeptor	...SVSSELRSLL <u>C</u> CARGRTPPS...
Neurokinin B Rezeptor	...RAGFKRAFRW <u>C</u> PFIQVSSYD...
Serotonin Rezeptor	...HKLIRFKCTS
Somatostatin Rezeptor 5	...FRQSFQKVL <u>C</u> LRKGSQAKDA...
Rhodopsin	...MVTTL <u>C</u> CGKNPLGD...

(Fortsetzung nächste Seite)

Type II: Prenylierte, palmitoylierte Proteine

H-Ras	...SGPG <u>C</u> MS <u>C</u> KCVLS
N-Ras	...GTQG <u>C</u> MGLPCVVM
K-Ras(A)	...TPG <u>C</u> VKIKKCVIM
Paralemmin	...DMKKHR <u>C</u> K <u>C</u> CSIM

Type III: Palmitoylierung im Bereich des N- oder C-terminus

Gα Untereinheiten	
αs	MG <u>C</u> LGNSKTEDQRNE
αq	MTLESIMAC <u>C</u> CLSEEAKEA
α12	MSGVVRTL <u>S</u> R <u>C</u> LLPAEAG
α13	MADFLPSRSV <u>C</u> FP <u>G</u> C <u>V</u> LTN
α16	MARSLRWR <u>C</u> CPW <u>C</u> LTEDEKKA
GAP-43	ML <u>C</u> CMRRTKQVEKNDDDDQKIEQDGI
Ca ²⁺ Kanal β2a Untereinheiten	MQ <u>C</u> CGLVHRRRV
PSD-95	MD <u>C</u> LCIVTTK KYRYQDEDTP
RGS4	M <u>C</u> KGLAGLPA <u>S</u> CLRSAKDMK
GRK6	...FSRQD <u>C</u> CGN <u>C</u> SDSEE ELPTRL

Type IV: Myristoylierte, palmitoylierte Proteine

Tyrosinkinasen der Src Familie	
Yes	MG <u>C</u> IKSKEDKGPAMKY
Fyn	MG <u>C</u> VQ <u>C</u> KDKEATKLTE
Lyn	MG <u>C</u> IKSKRKDNLNDDE
Lck	MG <u>C</u> VCSNPEDDWMEN
Hck	MG <u>C</u> MKSKFLQVGGNTG
Fgr	MG <u>C</u> VF <u>C</u> KKLEPVATAK
Yrk	MG <u>C</u> VH <u>C</u> KEKISGKGQG
Gα Untereinheiten	
α1	MG <u>C</u> TLSAEDKAAVERS
αo	MG <u>C</u> TLSAEERAALERS
αz	MG <u>C</u> ROSSEEKEAARRS
AKAP18	MGQL <u>C</u> CFPSRDEGK
eNOS	MGNLKS ^V GQEPGPP <u>C</u> GLGLGLGLGL <u>C</u> GK

Tabelle 1.2: Einteilung Palmitoylierter Proteine nach Resh (1999)

(Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Proteine sind durch **Fettschrift** hervorgehoben, palmitoylierte Cysteinpositionen sind **unterstrichen und in Fettschrift**.)

Proteine, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht wurden, sollen hier kurz vorgestellt werden:

1.3.1 Glykopolypeptid E1 des Semliki Forest Virus

Das Glykopolypeptid E1 bildet zusammen mit zwei weiteren Glykopolypeptiden E2 und E3 einen Spike-Glykoproteinkomplex, welcher an der Lipidmembran des Semliki Forest Virus (SFV) in großer Anzahl (Garoff und Simons, 1974; Garoff *et al.*, 1974) vorliegt und für die Penetration der Wirtszelle durch das Virus von essentieller Bedeutung ist (Schlesinger, 1985; Fries und Helenius, 1979; Uterman und Simons, 1974). Das Molekulargewicht des E1 Glykopolypeptids beträgt 49 kDa, die cDNA ist bekannt (Garoff *et al.*, 1980). Über kurze hydro-

phobe Segmente sind die Proteine E1 und E2 in der Membran verankert, während E3 außen an der Virushülle liegt und keine Transmembranregion aufweist.

Schmidt *et al.* identifizierten 1988 als einzige Palmitoylierungsstelle des E1 Proteins Cystein an Position 433, welches fünf Aminosäuren entfernt vom Carboxyl-Terminus und damit im transmembranen Bereich liegt (Garoff *et al.*, 1980). Nach der Einteilung von Resh würde es demnach in die Gruppe I der palmitoylierten Proteine gehören.

1.3.2 Tyrosinkinase p59^{fyn}

Als palmitoyliertes Protein der Gruppe IV mit der minimalen Konsensus-Sequenz Met-Gly-Cys (Alland *et al.*, 1994) am N-Terminus wird p59^{fyn} doppelt acyliert. Zunächst katalysiert die N-Myristoyltransferase eine Amidbindung am Glycinrest, bevor es zur Palmitoylierung der Cysteinreste an Position 3 und 6 kommt. Das 59 kDa große Protein gehört zur Src-Familie der non-Rezeptor Tyrosin Proteinkinasen (NRTK), welche alle eine extensive Sequenzhomologie mit dem Protoonkogen p60^{src} verbindet. Die neun Mitglieder Src, Yes, Lck, Fyn, Lyn, Yrk, Blk, Hck und Frg beinhalten in vier Regionen ähnliche Sequenzen, die Src homologen (SH) Domänen. Darunter die COOH-terminale Tyrosinkinase (SH1) und die internen Domänen SH2, welche die Phosphotyrosinbindungsstelle beinhaltet, und SH3, in welcher eine prolinreiche Bindungsstelle liegt. Die vierte homologe Sequenz, SH4, ist am NH₂-Terminus gelegen und diejenige, die für die hydrophobe Modifikation der Proteine von Bedeutung ist. Sie trägt die Aminosäuresequenzen, welche für die Bindung der Fettsäuren Myristinsäure und gegebenenfalls Palmitinsäure Voraussetzung sind (van't Hof und Resh, 1997; Yurchack und Sefton, 1995). Die verschiedenen Tyrosinkinasen der Src-Familie haben unterschiedliche Acylierungsmuster. Während p60^{src} und p61^{hck} nur myristoyliert werden, wird p59^{hck} zusätzlich an Cys-3 palmitoyliert und p56^{lck} sowie p59^{fyn} neben der Myristoylierung an zwei Cysteinen, Cys-3 und Cys-5, palmitoyliert.

Um für Enzymtests ausreichend große Mengen p59^{fyn} zur Verfügung zu haben, konstruierten Berthiaume und Resh (1995) ein rekombinantes Polypeptid, das den N-Terminus des Proteins wiedergibt. **FynSH432His₆-Protein** stellt ein Proteinfsegment dar, das, vom Aminoterminus ausgehend, die Src homologen (SH) Domänen SH4, SH3 und SH2 enthält. Nach der SH2 Domäne bricht **FynSH432His₆** in der Fyn-Aminosäuresequenz ab und ist zur erleichterten affinitätschromatographischen Reinigung mit sechs Histidinresten versehen. Mit dem gentechnisch konstruierten Plasmid **pETFyn432hNMT** kann **FynSH432His₆** in *Escherichia coli* (*E.coli*) Bakterien überexprimiert werden. Dieser Vektor codiert auch das Enzym hNMT, das bei gleichzeitiger Expression die Myristoylierung des Polypeptids, welche für die

Palmitoylierung Voraussetzung ist, in den Bakterienzellen gewährleistet (Duronio *et al.*, 1990).

Als Polypeptid, bei dem durch Verhindern der Myristoylierung auch die spezifische Palmitoylierung nicht möglich ist, konstruierten Berthiaume und Resh (1995) auch eine Mutante, bei der Glycin an Position 2 gegen Alanin ausgetauscht wurde (G2A). Damit ist die Konsensussequenz für die N-Myristoyltransferase nicht vorhanden, und eine Myristoylierung kann nicht stattfinden (Koegl *et al.* 1994). Die Mutante **p59^{fy}n (G2A)** wurde in den Versuchen dem Wildtyp **p59^{fy}n (wt)** gegenübergestellt bzw. als Negativkontrolle eingesetzt (Berthiaume und Resh, 1995).

1.3.3 Rhodopsin

Dieses transmembranöse Glykoprotein ist das Hauptprotein der äußeren Stäbchenzellsegmente (rod outer segment, ROS), welche als Photorezeptoren auf der Netzhaut zur Absorption von Licht dienen und durch Weiterleitung von Energie zur Hyperpolarisation der Plasmamembran führen. Rhodopsin gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptorproteinen (Helmreich und Hofmann, 1996) und weist sieben transmembrane Bereiche auf. 1984 wurde von O'Brien und Zatz die Palmitoylierung von bovinem Rhodopsin erstmalig beschrieben. Die Cysteinreste Cys-322 und Cys-323, welche als Palmitoylierungsstellen von Ovchinnikov *et al.* (1988) biochemisch und von Papac *et al.* (1992) mittels Tandem-Massenspektroskopie nachgewiesen wurden, befinden sich 14 Aminosäuren entfernt vom letzten C-terminalen Transmembranbereich. Die durch die Palmitoylierung bewirkte weitere Verankerung des Proteins in der Lipiddoppelmembran soll der Bildung einer vierten cytosolischen Schleife (loop) dienen. Die Tertiärstruktur des Proteins, welche lichtabhängigen Änderungen unterliegt, weist eine hohe Komplexität auf, wobei besonders die Sequenz um die Palmitoylierungsstellen von Bedeutung ist (Altenbach *et al.*, 1999). In der lichtinduzierten Signalübertragung über den chromophorischen Liganden 11-cis-Retinal kommt der Palmitoylierung nach bisherigen Studien keine funktionelle Bedeutung zu. In der Funktion Rhodopsins als Chemorezeptor hat sich die Aktivierung des Aporezeptors Opsin durch All-*trans*-Retinal als abhängig von der Palmitoylierung des Opsin-All-*trans*-Retinal-Komplexes erwiesen (Sachs *et al.*, 2000).

Als Heptahelix-Transmembranprotein gehört Rhodopsin in die Gruppe I der acylierten Proteine nach Resh.

1.3.4 GAP-43 / Neuromodulin (Growth cone Protein, Growth associated Protein)

Dieses Protein findet sich bei Nervenzellentwicklung, -wachstum und -regeneration in besonders hoher Anreicherung an der cytosolischen Seite der Membran der Wachstums-

fortsätze (Growth cone) von Nervenzellen. Es wurde zuerst 1976 von Zwiers *et al.* beschrieben. Neben vielen anderen Bezeichnungen, wie Neuromodulin, B-50, P-57 oder F1 hat sich der Name Growth associated Protein-43 (GAP-43) durchgesetzt. Die Zahl 43 bezeichnet die nach der Anordnung des Proteins in der SDS-PAGE geschätzte Molekulargröße von 43 kDa. Diese differiert allerdings stark mit der aus der cDNA abgeleiteten Größe von 24 kDa (Basi *et al.*, 1987; Karns *et al.*, 1987). Zu erklären ist der Unterschied durch die sehr geringe Zahl hydrophober Regionen und der damit verbundenen reduzierten SDS Bindung, welche die abnormale Migration in der SDS-PAGE bewirkt (Basi *et al.*, 1987; Jacobsen *et al.*, 1986). Der Funktion des GAP-43 kommt eine zentrale Bedeutung bei der Plastizität der Nervenzellen zu, was aus der hohen Expression des Proteins während axonaler Entwicklung, Wachstum und Regeneration zu schließen ist (Strittmatter *et al.*, 1994, 1992; Fishman, 1989; Skene, 1989; Benowitz und Routtenberg, 1987). Andere Funktionen beinhalten die Bindung und Membranassoziation von Calmodulin (Oestreicher *et al.*, 1997). Die Lokalisation des Proteins, die feste Bindung an die innere Membran der Wachstumsfortsätze, wird bewirkt durch die S-Acylierung der beiden Cysteinreste Cys-3 und Cys-4 (Chapman *et al.*, 1992; Skene und Virág, 1989). Dazu zeigten Liu *et al.* (1993) in *in-vivo*-Untersuchungen, daß die Palmitoylierung eines einzelnen der beiden Cysteine in GAP-43 ausreichend ist für die Membranassoziation, und daß allein die Palmitoylierung diese determiniert. Eine weitere Funktion der Palmitoylierung von GAP-43 stellt der Einfluß auf die G₀-Stimulanz von GAP-43 dar (Sudo *et al.*, 1992). McLaughlin und Denny haben (1999) das „Endoplasmatische-Retikulum-Golgi-Intermediäre Kompartiment“ (ER-Golgi intermediate compartment) und den Golgi-Apparat als ursprüngliche Palmitoylierungsorte des GAP-43 Proteins beschrieben. Nach der Einteilung von Resh gehört das Protein in die Gruppe III der palmitoylierten Proteine, da es an zwei Cysteinresten am N-Terminus S-acyliert ist.

1.3.5 SNAP-25

Das 25 kDa große, Synaptosom-assoziierte Protein (SNAP-25) gehört zu den transmembranösen SNAP Rezeptoren (t-SNARE) der präsynaptischen neuronalen Plasmamembran (Rothman, 1994). Dem evolutionär hoch konservierten Protein, zu welchem sich Homologe in den meisten eukaryotischen Zellen finden, kommt in den Nervenzellen eine essentielle Bedeutung im Prozess der Ca²⁺-regulierten Exozytose, bzw. Vesikelfusion bei der Neurotransmitterfreisetzung an synaptischen Vesikeln zu (Veit, 1999; Burgoyne und Morgan, 1998; Hanson *et al.*, 1997; Mehta *et al.*, 1996). Versuche an *knock-out*-Mäusen (Hess *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1996) lassen erwarten, daß SNAP-25 in der Therapie von Hyperaktivitätserkrankungen hilfreich sein könnte (Hodel, 1998).

SNAP-25 ist ein aus 206 Aminosäuren bestehendes, hydrophiles Protein. Für seine Membranbindung an die cytosolische Seite der Plasmamembran scheint die hydrophobe Modifikation mittels Palmitat an Cysteinresten in der zentralen Region der primären Aminosäuresequenz verantwortlich zu sein (Hess *et al.*, 1992). Die modifizierten Cysteine liegen in der Sequenz -KFCGLCVCPCNKL- (AS Position 83-95), wobei noch nicht sicher ist, welche der vier Cysteine palmitoyliert werden. Ein strukturell für die Palmitoylierung von SNAP-25 wichtiger Abschnitt liegt im Bereich der AS 85-120 (Gonzalo *et al.*, 1999). Veit *et al.* (1996) zeigten mit konstruierten Deletionsmutanten, denen die Region der Palmitoylierungsstellen fehlten, daß ohne die Bindungsmöglichkeit von Palmitat auch die Membranassoziation verloren geht. Gonzalo und Linder (1998) konnten weiter zeigen, daß die Palmitoylierung für die Steuerung des Proteins zur Plasmamembran von Bedeutung ist, nicht aber für die stabile Membranverankerung selbst. SNAP-25 hat keine hydrophobe Region, die einen transmembranösen Bereich darstellt. Die Palmitoylierungsstellen liegen weder COOH- noch NH₂-terminal, und es wird nicht myristoyliert. Somit läßt sich das Protein in der Einteilung nach Resh (1999) schwer zuordnen. Von seiner Lokalisation an der cytosolischen Plasmamembran und der mehrfachen Palmitoylierung würde es am ehesten in die Gruppe III mit dem ebenfalls neuronalen GAP-43 passen.

Das Protein bildet mit zwei weiteren Proteinen, Syntaxin und Synaptobrevin, einen stabilen Komplex, welcher dann für die Ca²⁺-regulierte Exozytose verantwortlich ist. Bei der Bindung von Syntaxin kommt es zu einer Konformationsänderung, α -Helix Strukturen bzw. "coiled coil formation" nehmen zu (Fasshauer *et al.*, 1996).

Aufgrund der noch offenen Fragen in bezug auf die Palmitoylierungsstellen und die Funktionen der Modifikation stellt die Untersuchung der SNAP-25 Palmitoylierung ein interessantes Forschungsgebiet dar. Ein *in-vitro*-Untersuchungssystem kann hierbei sehr hilfreich sein, um die Funktionen einzelner Proteinregionen, insbesondere der Palmitoylierungsstellen, aufzudecken.

1.4 Funktion der Palmitoylierung

Proteine, die palmitoyliert werden, kommen ubiquitär in eukaryotischen Zellen sowie in Virusmembranen vor. Die Frage nach der Bedeutung der Modifikation für die biologische Aktivität oder ihrer Auswirkung auf die strukturelle Funktion der Proteine ist von großem Interesse und Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Dennoch ist vieles ungeklärt.

Durch die Acylierung ändert sich der Charakter eines Polypeptids in vielerlei Hinsicht. So ergeben sich neue Reaktionseigenschaften. Diese betreffen Interaktionen mit Lipid-

membranen, anderen Proteinen oder auch Interaktionen innerhalb eines Polypeptids, etwa Konformationsänderungen. Die Änderung der Hydrophobie bewirkt bei nichtacylierten cytosolischen Proteinen meist eine Membranbindung, wobei die Palmitoylkette die Proteine in der Membran verankert (Bhatnager und Gordon, 1997). Hierbei werden besonders myristoylierte Proteine, die sich aufgrund der erhöhten Hydrophobie durch die Bindung des Myristinsäurerests lose in Membrannähe anlagern, infolge der Palmitoylierung fest in der Membran verankert (Bhatnagar und Gordon, 1997; Alland *et al.*, 1994).

Die Möglichkeit der dynamischen Palmitoylierung und Depalmitoylierung machen so modifizierbare Proteine zu potentiellen Regulatoren zellulärer Prozesse. Daher wurde die Funktion der S-Acylierung im Bereich der Signaltransduktion in den letzten Jahren sehr intensiv untersucht (Dunphy und Linder, 1998; Nakamura *et al.*, 1998; Resh, 1996). In der Tat spielen viele palmitoylierte Proteine in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle, wie z.B. die non-Rezeptor-Protein-Tyrosinkinasen, Rhodopsin und α -Untereinheiten verschiedener heterotrimerer G-Proteine. Kabouridis *et al.* (1997) konnten in einer ausführlichen *in-vivo*-Studie zeigen, daß die S-Acylierung der non-Rezeptor-Protein-Tyrosinkinase p56^{lck} essentiell für die Signalübertragungsfunktion des Proteins in T-Lymphozyten ist. Das Protein p56^{lck} ist am N-Terminus MGCVC- (gepunktete Unterstreichung markiert die Myristoylierungsstelle, durchgängige Unterstreichung die Palmitoylierungsstellen) ähnlich p59^{fyn} dual acyliert. Gentechnische Veränderungen, welche die Palmitoylierung eines oder beider Cysteinreste verhindern, haben sowohl Auswirkungen auf die Lokalisation des Proteins in der Zelle als auch auf seine biologische Aktivität. Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um A.I. Magee (Kabouridis *et al.*, 1997), daß durch Änderung beider Palmitoylierungsstellen das Protein bei Expression in Zellen nicht mehr in die Nähe der inneren Plasmamembran gesteuert wird. Dadurch kann auch keine Interaktion mit dem T-Zell-Antigenrezeptor zustande kommen, und die funktionell essentielle Signalübertragung über diesen Rezeptor ist gestört.

Durch die Palmitoylierung wird regulatorisch eine Zielsteuerung der Proteine an den entsprechenden Wirkort, meist die innere Plasmamembran, bewirkt. Dadurch werden Zellkommunikationssignale übertragen. Wie die Proteine an die Plasmamembran gelenkt werden, haben van't Hof und Resh (1997) am Model von p59^{fyn} in *in-vivo*-Studien untersucht. Sie konnten, ohne die genauen molekularen Mechanismen aufzudecken, zeigen, daß das Protein p59^{fyn} als cytosolisches Protein synthetisiert wird, dann aber schnell mit der inneren Plasmamembran assoziiert („rapid palmitoylation and plasma membrane anchoring“), worauf eine langsame Ansiedelung in detergensresistenten Regionen innerhalb der Plasmamembran folgt („slower partitioning into detergent-insoluble membrane subdomains“). Der Lokalisationsvorgang ist geprägt von der schnellen Kinetik und hebt die Bedeutung der Acylierung nicht nur für die Membranverankerung, sondern auch für die Steuerung neusynthetisierter

Proteine an bestimmte Lokalisationen oder Untereinheiten im Zellsystem hervor. Genetisch veränderte p59^{fyn} Mutanten, welchen die Myristoylierungsstelle oder die Palmitoylierungsstellen fehlten, waren in der Lokalisation gestört. Für die Proteine, die N-terminal dual acyliert, also zunächst myristoyliert und dann palmitoyliert werden, wie p59^{fyn} oder p56^{lck}, ist von verschiedenen Autoren das "kinetic membrane trapping model" (kinetisches Membran-Fallenmodell) postuliert worden (Dunphi und Linder, 1998; van't Hof und Resh, 1997; Shahivian und Silvius, 1995; Hancock *et al.*, 1990). **Abb. 1.2** zeigt schematisch den Ablauf. Dabei wird durch die zunächst stattfindende Myristoylierung das Protein durch die erhöhte Hydrophobie in Membrannähe gesteuert (**Abb. 1.2 a, b**). Dort interagiert es mit einem postulierten membrangebundenen Enzym, der Protein (Palmitoyl) Acyltransferase (PAT), wodurch Palmitoyl-CoA kovalent an einen oder mehrere Cysteinreste des Proteins gebunden wird (**Abb. 1.2 c, d**). Dies erst führt zu einer stabilen Membranbindung des Proteins (Shahinian und Silvius, 1995).

Andere Funktionen der Palmitoylierung bewirken Membran- oder Vesikelfusion bei der Virusinfektion, beispielsweise bei HIV (Rouso *et al.*, 2000) und Masernvirus (Caballero *et al.*, 1998). Berthiaume *et al.* (1994) konnten die Enzymregulation durch Palmitoylierung von aktiven Regionen in den Enzymproteinen Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase (MMSDH) und Glutamat-Dehydrogenase nachweisen.

Weitere Untersuchungen, insbesondere in definierten *in-vitro*-Systemen, könnten mehr Aufschluß über die Funktion der S-Acylierung geben. Auch die Identifizierung eines fettsäureübertragenden Enzyms kann hier eine große Hilfe sein, die Änderung an Proteinen durch Acylierung zu erkennen. Nicht zuletzt könnte, wenn die cDNA eines solchen PAT-Enzyms bekannt wäre, durch Elimination des Gens die Bedeutung der Palmitoylierung für ganze Organismen erforscht werden.

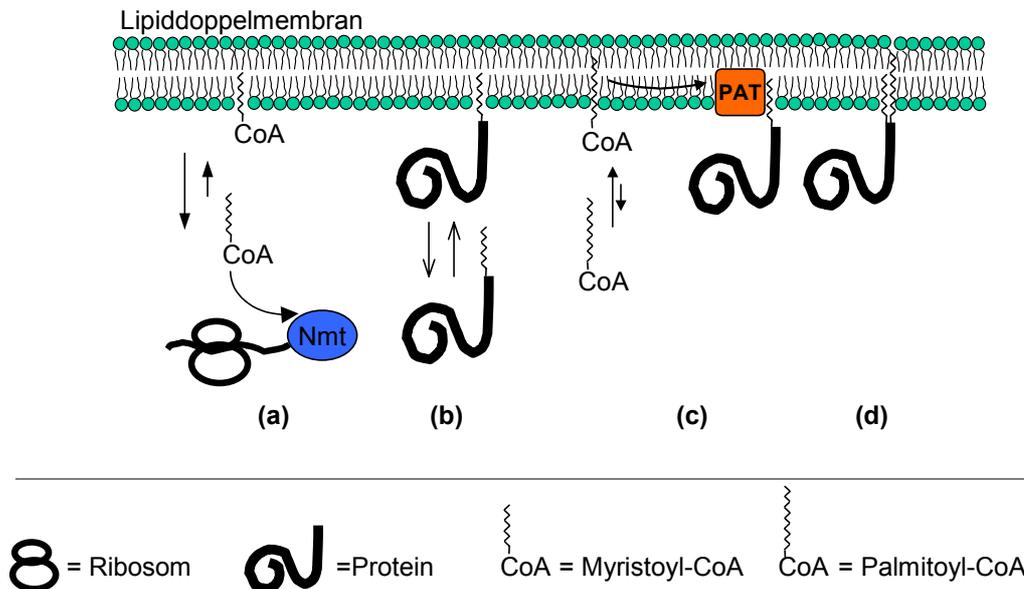


Abbildung 1.2: „Kinetic membrane trapping model“ am Beispiel myristoylierter und palmitoylierter Proteine (nach Bhatnagar und Gordon, 1997)

(a) Das naszente Protein wird co-translational durch die N-Myristoyltransferase (Nmt) myristoyliert. Myristoyl(C₁₄)-CoA, welches als Fettsäuredonator fungiert, liegt cytosolisch vor, so daß es der cytosolischen N-Myristoyltransferase (Nmt) als Substrat zur Verfügung steht.

(b) Die erste Modifikation führt zur transienten Membraninteraktion des Proteins. Das N-myristoylierte Protein hat durch die höhere Hydrophobie eine stärkere Affinität zur Membran, welche aber nicht zur thermodynamisch stabilen Bindung ausreicht. Bei Proteinen, welche nicht myristoyliert werden, wird die nötige Membranaffinität durch andere Eigenschaften, wie hydrophobe Regionen oder positive Ladungen von Proteinbereichen erzielt.

(c) Die zweite hydrophobe Modifikation stellt die stabile Membranverankerung dar. Das membran-assoziierte Enzym S-Proteinacyltransferase (PAT) benötigt sowohl das Akzeptorprotein als auch den Fettsäuredonator Palmitoyl(C₁₆)-CoA in Reichweite, um das Protein zu palmitoylieren.

(d) Durch die doppelte hydrophobe Modifikation wurde eine stabile Verankerung des Proteins mit der Doppellipidmembran erreicht.

1.5 Enzymatische versus nicht-enzymatische Palmitoylierung

Der noch unbekannte Mechanismus der Palmitoylierung stellt eine entscheidende Lücke im Verständnis des Phänomens dar. Durch die verschiedenen Experimente zur Proteinpalmitylierung sind bisher unterschiedliche Hypothesen zur Art der Fettsäureübertragung aufgestellt worden. In einigen Arbeiten sind fettsäureübertragende Aktivitäten entdeckt und einem Enzymprotein zugeschrieben worden (Das *et al.* 1997; Dunphy *et al.* 1996; ; Liu *et al.* 1996; Berthiaume und Resh, 1995; Berger und Schmidt, 1986;), während andere Forscher eine nicht-enzymatische Fettsäureübertragung favorisieren (Bañó *et al.*, 1998; Duncan und Gilman, 1996).

Duncan und Gilman (1996) beschreiben die Acylierung der G-Protein Untereinheit $G_{i\alpha 1}$ im *in-vitro*-System unter der Verwendung von in *E.coli* expremiertem $G_{i\alpha 1}$ Polypeptid als Akzeptorprotein. Ohne daß eine Enzymquelle zugegeben wurde, konnte eine Palmitoylierung beobachtet werden, wenn $G_{i\alpha 1}$ myristoyliert vorlag. Die gut beschriebene Abhängigkeit der Palmitoylierung von vorangegangener Myristoylierung (Alland *et al.*, 1994; Mumby *et al.*, 1994; Galbiati *et al.*, 1994; Parenti *et al.*, 1993), welche auch als Wiedererkennungssignal für die PAT postuliert wurde (Berthiaume und Resh, 1995), konnte in diesen enzymfreien Palmitoylierungstests *in vitro* reproduziert werden. Mutanten, bei welchen die Myristoylierungssequenz am N-Terminus verändert wurde (Gly-2 durch Ala-2 ersetzt), waren keine Akzeptoren für Palmitinsäure. Wurde zu $G_{i\alpha 1}$ der G-Protein Untereinheitenkomplex $\beta 1\gamma 2$ hinzugegeben, so daß sich der Komplex $G_{i\alpha 1}\beta 1\gamma 2$ bildete, konnte eine schnellere Kinetik der Reaktion beobachtet werden. Auch war dann die Myristoylierung von $G_{i\alpha 1}$ nicht mehr Voraussetzung. Duncan und Gilman (1996) extrapolierten aus den Ergebnissen dieser *in-vitro*-Studien, daß $G_{i\alpha 1}$ unter physiologischen Bedingungen chemisch autoacyliert wird. Falls dies nicht der Fall sein sollte, stellt sich die Frage, wie in der Zelle die von ihnen beobachtete Autoacylierung verhindert wird, wenn eine enzymatische Acylierung eine regulatorische Funktion haben soll.

Ergebnisse von Bañó *et al.* (1998), welche für die Hypothese der Autoacylierung sprechen, wurden mittels *in-vitro*-Tests mit synthetischen Peptiden, welche die Aminosäuresequenzen der N-terminalen Acylierungsregionen des Proteins c-Yes repräsentieren, erzielt. Yes gehört zu der Src-Familie der Protein-Tyrosinkinase. Systematische Versuche zeigten hier keine Unterschiede in der Acylierung des Peptids mit oder ohne Zugabe potentieller Enzymquellen.

Als solche wurden Präparationen verschiedener Zellfraktionen aus Zellkulturen und tierischem Gewebe eingesetzt. Auch hier konnte die Abhängigkeit der Palmitoylierung von vorangegangener Myristoylierung *in vitro* enzymfrei reproduziert werden. Die Autoren schlagen für die Myristoylierung eine Funktion in der Proteinausrichtung oder -aggregation vor, welche die Interaktion des Proteins mit Palmitoyl-CoA *in vitro* beeinflusst oder überhaupt möglich macht. Insgesamt beschreiben Bañó *et al.* (1998) den Mechanismus der *in-vitro*-Palmitoylierung als pseudoenzymatisch, da die Reagibilität von verschiedenen Faktoren, wie z.B. der Myristoylierung abhängig ist, die an eine enzymatisch katalysierte Reaktion denken lassen. Für die Reaktion *in vivo* postulieren sie eine durch die Myristoylierung erleichterte Interaktion mit den Acyl-CoA Derivaten.

Andere Forschungsgruppen gehen entsprechend ihrer Untersuchungsergebnisse von einer enzymatisch bewirkten Bindung aus. Acylierungsversuche mit viralen Akzeptorproteinen (SFV E1; VSV G-Protein) unter Anwesenheit von Mikrosomen aus Zellkulturen zeigten

palmitoylierende Aktivität in den Zellmembranen (Berger und Schmidt, 1984b). Diese *in-vitro*-Fettsäureübertragung ist zudem abhängig von Temperatur und Konzentration der Mikrosomen, was den Eigenschaften einer enzymgesteuerten Reaktion gleicht (Mack *et al.*, 1986). Ohne Mikrosomenzugabe bzw. in Anwesenheit hitzeinaktivierter Mikrosomen kam es zu keiner bzw. nur äußerst geringen Übertragung von Fettsäuren auf die Proteine (Berger und Schmidt, 1984b). Diese Hinweise auf die Existenz eines enzymatischen Mechanismus werden durch Untersuchungen an zellulären Acylproteinen (Rhodopsin), welche in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Hofmann und unserer Gruppe durchgeführt wurden, gestützt. In diesen Versuchen zeigten wir an demselben Akzeptorprotein, bovinem Rhodopsin, zwei sich deutlich unterscheidende Bindungsreaktionen (Veit *et al.*, 1998). Unter Zugabe von partiell angereicherter PAT aus humaner Plazenta konnte der Einbau von [³H]-Palmityl-CoA in bovines Rhodopsin in der Initialkinetik um das Zehnfache verstärkt werden. Die ohne Zugabe einer Enzymquelle zu beobachtende Autoacylierung folgte einer langsamen, linear verlaufenden Kinetik, während die Enzymzugabe eine beschleunigte Reaktion mit Sättigungskinetik bewirkte. Auch ließ sich die Enzymaktivität in den Membranfraktionen durch Erhitzen über 60°C löschen, was die Beteiligung von Proteinen anzeigt.

Die Arbeitsgruppe um M.E. Linder zeigte in einer Arbeit (Dunphy *et al.*, 2000), daß es wenig wahrscheinlich ist, daß die unkatalysierte Palmitoylierung eine biologisch wichtige Rolle bei Proteinen mit einer hohen „turn-over“-Rate der Acylierung *in vivo* spielt. In ihren Untersuchungen mit Acyl-CoA-bindenden-Proteinen (ACBP), welche in physiologischer Konzentration die chemische Pal-CoA-Übertragung auf Proteine und Peptide, die Autoacylierung, weitgehend unterdrücken (Leventis *et al.*, 1997), zeigte sich nur eine sehr geringe Hemmung der enzymatischen Acylierung von G-Protein α Untereinheiten *in vitro* durch ACBP.

Da die Nichtexistenz eines Enzyms nicht zu beweisen ist, kommt der Reinigung der PAT die entscheidende Bedeutung in der Aufklärung des Mechanismus der Palmitoylierung zu. Verschiedene Gruppen haben S-acylierende Aktivität aus verschiedenen Gewebe- und Zellfraktionen angereichert. Dennoch ist bisher von keinem Enzym mit S-Acyltransferase Aktivität die Primärstruktur bzw. die cDNA bekannt. Bis solche eindeutig vorliegen, muß die Autoacylierung als konkurrierende Hypothese für den Mechanismus weiterverfolgt werden (Baño *et al.*, 1998).

1.6 Fettsäuren übertragende Enzymaktivitäten

Fettsäureübertragende biologische Aktivität wurde erstmals von Berger und Schmidt 1984 beschrieben. Sie charakterisierten eine Protein-S-Acyltransferase (PAT) Aktivität in mikrosomalen Membranen aus BHK Zellkulturen und Rattenlebern (Berger und Schmidt,

1984b), welche virale Polypeptide aus der Hülle des Semliki Forest Virus acylierte. Schmidt und Burns berichteten 1989(a) erstmals über eine Anreicherung dieser Aktivität aus humaner Plazenta durch chromatographische Verfahren. Die Reinigung eines für diese Aktivität verantwortlichen, membrangebundenen Enzyms gelang bisher nicht. Allerdings konnte die Aktivität mit Hilfe nichtionischer Detergenzien aus Membranen solubilisiert werden (Schmidt und Burns, 1989b, 1991). Im Vergleich der acylierenden Aktivitäten in Membranen (Mikrosomen) humaner Plazenta und in Oberflächenmembranen humaner Erythrozyten („erythrocyte ghosts“) zeigten sich diese sehr ähnlich in Bezug auf Palmitoylierung endogener (erythrozytäre Polypeptide) und exogener Acylproteine (virale E1 Proteine aus SFV) (Schmidt *et al.*, 1995). Auch ließen sich in den gleichen Untersuchungen die Proteinacylierungen durch die anderen Proteine gegenseitig hemmen. Diese kompetitive Hemmung spricht dafür, daß für die Palmitoylierung verschiedener Acylproteine dasselbe Enzymprotein verantwortlich ist, das in den unterschiedlichen Membranen lokalisiert ist (Schmidt *et al.*, 1995).

Berthiaume und Resh stellten 1995 die biochemische Charakterisierung einer von ihnen angereicherten Enzymaktivität vor, welche myristoylierte Proteine acyliert. Da sich die Aktivität gegenüber Lagerung und biochemischen Prozeduren äußerst labil zeigte, gelang die weitere Aufreinigung des Enzyms nicht. Die Aktivität ist in mikrosomalen Membranen lokalisiert und weist ähnliche Eigenschaften auf wie die von Schmidt und Mitarbeitern beschriebene Enzymaktivität (1979, 1988, 1991). Dunphy *et al.* zeigten 1996 eine Anreicherung einer G-Protein acylierenden PAT-Aktivität in Plasmamembranen aus Rattenlebern.

Zuletzt beschrieben die Arbeitsgruppen um M.H. Gelb (Liu *et al.*, 1996) und um J. Basu (Das *et al.*, 1997) Reinigungen von PAT Enzymen. Aus Rattenlebermikrosomen reinigten Liu *et al.* (1996) eine Aktivität, die H-Ras acyliert. Sie zeigte sich wiederum membrangebunden, konnte aber im Gegensatz zu den bisher charakterisierten Übertragungsaktivitäten mit Salzkonzentrationen von 150 mM KCl aus Membranen eluiert werden. Andere Aktivitäten ließen sich nur mit Hilfe von Detergens (Schmidt und Burns, 1989b; Berthiaume und Resh, 1995) von den Membranen lösen. In dieser Studie konnten über vier chromatographische Reinigungsschritte zwei Proteinfractionen von ≈ 30 kDa und ≈ 33 kDa Molekulargewicht mit Protein-Palmitoyltransferase-Aktivität (PPT) isoliert werden. Nach Untersuchung der Aminosäuresequenz erwies es sich jedoch als das bekannte Enzym Thiolase A (3-oxo-acyl-CoA Thiolase), welches in der β -Oxidation von Fettsäuren seine Funktion hat und kaum als Kandidat für die physiologische Palmitoylierung *in vivo* angesehen werden kann (Dunphy und Linder, 1998). Somit ist die Hoffnung, durch diese Polypeptide mit PPT-Aktivität den

Mechanismus der Palmitoylierung aufzuklären, geschmälert, wenn auch die Funktion der Thiolase A in diesem Zusammenhang noch weiter geklärt werden muß.

Ähnlich unbefriedigend sind die Ergebnisse von Das *et al.* (1997), welche nach Lösen der Aktivität von der Membran durch erhöhte Salzkonzentration und anschließender chromatographischer Aufreinigung eine einzelne 70 kDa Bande in der SDS-PAGE vorliegen hatten. Diese soll ein Protein mit PAT-Aktivität repräsentieren. Bis heute ist die Entität dieses Proteins, seine Aminosäuresequenz und cDNA noch nicht aufgeklärt, so daß die Beurteilung der Bedeutung dieses Proteins schwerfällt.

Da noch keiner dieser beschriebenen Enzymaktivitäten ein Protein zugeordnet werden konnte, bleibt die Frage nach der physiologischen Bedeutung der beobachteten Aktivitäten offen. So auch die Frage, ob es sich um ein und dasselbe universelle Enzym, eine Enzymfamilie oder sehr unterschiedliche Polypeptide handelt.

1.7 Enzymtests: PAT-Assays

Grundlegende Voraussetzung für die Anreicherung und Charakterisierung eines Enzyms ist ein Test zur Detektion der Aktivität. Unter *in-vitro*-Bedingungen muß das physiologische Milieu des Enzyms durch adäquate Einstellung von pH, Temperatur, Salzkonzentration etc. hergestellt werden. Die benötigten Ausgangsstoffe für die enzymatisch katalysierte Reaktion, Substrate und Akzeptoren müssen in zugänglicher Form vorliegen. Weitere Bedingung ist, daß über einen meßbaren Parameter der Reaktionsablauf nachvollzogen werden kann.

Im Fall der Protein S-Acylierungsaktivität entspricht ein palmitoylierbares, deacyliertes bzw. nicht-palmitoyliertes Protein dem Akzeptor, während aktiviertes Palmitat, Pal-CoA, das Fettsäuresubstrat darstellt (Schmidt, 1984; Berger u. Schmidt, 1984a). Entsprechend den Bedingungen in der Zelle sollte das Milieu einen pH von 7,4 und eine Temperatur von ca. 37°C haben. Zum Erkennen der Aktivität muß an Proteine kovalent gebundenes Palmitat detektierbar sein. Dies wird in der Praxis durch radioisotopisch markierte Fettsäurederivate erreicht, die sich beispielsweise nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine in der Fluorographie darstellen lassen.

Berger und Schmidt stellten 1984 ein *in-vitro*-Testsystem vor, in dem in physiologisch gepuffertem Milieu (20 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7.4) [¹⁴C]Palmitoyl-CoA als Fettsäuresubstrat auf das Glykoprotein E1 aus der Hülle des SFV übertragen wurde (Berger und Schmidt, 1984b). Entsprechende Glykoproteine wurden aus den Virushüllen herausgelöst und deacyliert, bevor sie eingesetzt wurden. In mikrosomalen Fraktionen verschiedener Gewebe konnte nach 30-minütiger Inkubation im Test die übertragende Aktivität anhand der Darstellung der [¹⁴C]-Strahlung der aufgetrennten Proteine durch Fluorographie festgestellt und mittels densitometrischer Messung quantifiziert werden. Zudem konnte die

Quantifizierung des radioaktiven Einbaus über ausgeschnittene Gelbanden sofort mit Hilfe eines Szintillationsmeßgerätes vorgenommen werden. Auf gleiche Art und Weise wurde der Assay mit tritiummarkierter Pal-CoA ($[^3\text{H}]\text{-Pal-CoA}$) durchgeführt (Schmidt und Burns, 1991).

Berthiaume und Resh stellten 1995 einen Assay vor, in welchem $[^{125}\text{I}]\text{Iodopalmitoyl-CoA}$ als Fettsäuresubstrat diente. Dieses konnte nach kurzen Expositionszeiten von 30 Minuten mittels Phosphorimagertechnik detektiert und quantifiziert werden. Die von ihnen durchgeführten Enzymassays nutzten das rekombinante Peptid FynSH432His₆, ein Proteinfragment der Tyrosinkinase p59^{fyn}, als Akzeptorprotein. Als Enzymquelle dienten Mikrosomen aus Rinderhirn. Die 30-minütige Inkubation erfolgte bei 25°C in einem Imidazolpuffer (100 mM Imidazol-HCl, pH 7.0, 0,3% Triton-X100).

1.8 Akzeptoren für PAT-Assays

Die verschiedenen Proteine, die *in vivo* palmitoyliert werden, können als aus Zellen isolierte Proteine für den Enzymtest verwendet werden. Allerdings ist die Präparation dieser Proteine, die oft nur in kleiner Menge in Zellen und Gewebe vorhanden sind, meist aufwendig.

Da man für die PAT-Assays große Mengen definierten und vergleichbaren Akzeptors benötigt, bietet sich in solchen Fällen die Verwendung speziell hergestellter Akzeptoren an.

Virale Hüllproteine haben den Vorteil, daß sie in großer Zahl in den Virushüllen vorhanden und mittels relativ einfacher Reinigungsschritte zu gewinnen sind. Es gibt oft nicht viele verschiedene Proteine in den Virushüllen, so daß die chromatographische Auftrennung nicht aufwendig ist. Zudem sind Viren als Ausgangsmaterial in Zellkulturen in großem Maßstab zu gewinnen.

1.8.1 Rekombinante Proteine und Proteinreinigung über Hexahistidin (His₆) und Affinitätschromatographie mit komplex gebundenen Metallionen

Mit Hilfe klonierter DNA eines Proteins kann dieses als rekombinantes Protein in anderen Zellsystemen exprimiert werden. Die Expression in *E.coli* Bakterien stellt eine einfache und preiswerte Möglichkeit dar. Eine elegante Methode der Gewinnung rekombinanter Proteine bedient sich der Affinität zwischen Nickelionen (Ni^{2+}) und Histidinresten. Die Nickelionen sind dabei über den Chelat-Komplexbildner Nitrilotriessigsäure (Nitrilotriacetic acid, NTA) an einer Matrix immobilisiert. So kann in rekombinanten Peptiden eine terminale Sequenz von sechs Histidinresten (His₆-tag, Hexahistidinsequenz, HHS) einkloniert werden, über welche mittels der Affinität zu den Ni^{2+} -Ionen die Proteine chromatographisch gereinigt werden können (Hochuli *et al.*, 1988, 1987).

1.8.2 Peptide als Akzeptorproteine

Eine andere Möglichkeit bieten synthetisch durch das chemische Fmoc-Verfahren hergestellte Peptide, welche kurze Abschnitte aus Proteinen repräsentieren. So kann eine bestimmte Aminosäuresequenz aus einem Protein, etwa die Acylierungsregionen, isoliert als Peptid verwendet werden. Nach der Herstellung können solche Peptide frei im Test eingesetzt werden. Bañó *et al.* nutzten 1998 solche synthetisierten Peptide als Akzeptoren in ihren Untersuchungen der Palmitoylierung.

Zur besseren Handhabung können die Peptide aber auch gebündelt, punktförmig in definierter Menge auf Zellulosefilter verankert und so im Test eingesetzt werden. **Abbildung 1.3** zeigt den schematischen Aufbau der membrangebundenen Peptide. Für Untersuchungen in anderen Bereichen der Biochemie wurden solche immobilisierten Peptide schon erfolgreich verwendet (Kramer *et al.*, 1993 u. 1994; Malin *et al.*, 1995). Die Verwendung dieser membran-gebundenen synthetischen Peptide bei Acylierungsversuchen ist in der Literatur noch nicht beschrieben.

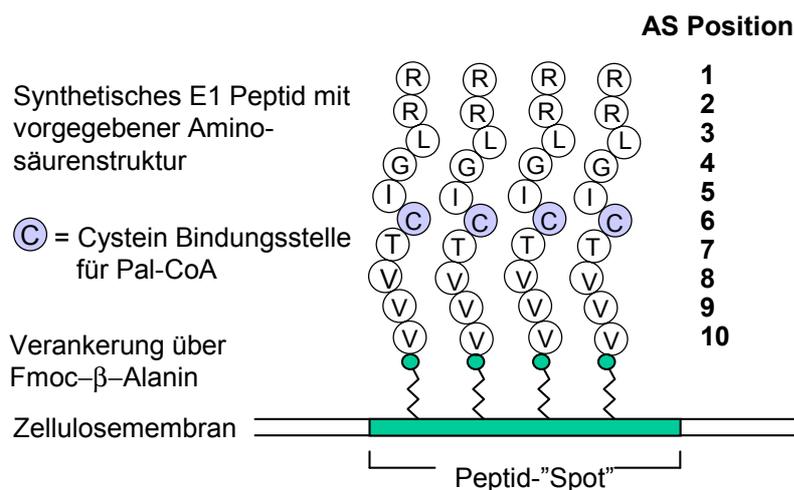


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus der membrangebundenen Peptide. Die hier gezeigte AS-Sequenz VVVTICIGLRR entspricht den letzten 10 AS des C-Terminus des E1 Glykoproteins aus SFV. Die Folge mICCMRRTKQ (nicht gezeigt) repräsentiert entsprechend den N-Terminus des Proteins GAP-43.