

5. DISKUSSION

Es gibt inzwischen viele Computer-Programme, mit denen das Auftreten von Protein-Modifikationen vorausgesagt werden kann. Diese Voraussagen stützen sich auf Konsensus-Sequenzen oder das Auftreten bestimmter Aminosäure-Motive, wie beispielsweise einer Anhäufung hydrophober Reste vor einer modifizierbaren Aminosäure.

Unter den hydrophoben Modifikationen lassen sich auf diese Weise mit ausreichender Sicherheit die Isoprenylierung und die Myristoylierung anhand ihrer Konsensus-Sequenzen voraussagen. Bei der Isoprenylierung erfolgt die Bindung von Geranyl-Geranyl oder Farnesyl C-terminal am Cystein-Rest der so genannten "CAAX-Box" über eine Thioetherbindung, nachdem die drei terminalen Aminosäuren (AAX) proteolytisch abgespalten wurden [Gelb et al., 1998], während Proteine, die myristoyliert werden sollen, die Konsensus-Sequenz Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr tragen und nach Abspaltung des Met₁ am Gly₂ die Myristinsäure durch eine Amidbindung binden [Gordon et al., 1991].

Die strukturellen Voraussetzungen für die Palmitoylierung von Proteinen sind bisher nur wenig verstanden. Im Unterschied zur Isoprenylierung oder zur Myristoylierung gibt es für die Palmitoylierung weder eine Konsensus-Sequenz noch eine allen palmitoylierten Proteinen gemeinsame Palmitoylierungsstelle. Eine Voraussage der Palmitoylierung kann mit Abstrichen nur für periphere Membranproteine getroffen werden, die als Voraussetzung der S-Acylierung zuvor am C-Terminus isoprenyliert oder am N-Terminus myristoyliert worden sind, aber auch hier wird nicht jedes Protein palmitoyliert, das zuvor auf diese Arten hydrophob modifiziert wurde.

Auffällig ist, dass in den meisten Fällen membran-nahe oder anderweitig Membran-assoziierte Cystein-Reste palmitoyliert werden, was mit der Erreichbarkeit durch die Protein-Acyl-Transferase (PAT) begründet wird. Da sich bislang aber lediglich aus der Primärstruktur eines Proteins keine Voraussage über dessen Palmitoylierung treffen lässt, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Strukturen zu definieren, die für die Palmitoylierung von Transmembranproteinen entscheidend sein können.

5.1 DER EINFLUSS DER TRANSMEMBRANREGION AUF DIE PALMITOYLIERUNG

Die Palmitoylierung ist durch die Wahrscheinlichkeit der Cystein-Interaktion mit der Membran-assoziierten Protein-Acyl-Transferase (PAT) bedingt, wobei die Cystein-Reste in optimaler Position im Verhältnis zum Enzym vorliegen müssen. Bislang hat es nur wenige

Veröffentlichungen über die strukturellen Anforderungen für die Palmitoylierung Membran-spannender Proteine gegeben, wobei der Schwerpunkt der Publikationen in den meisten Fällen auf den Einfluss der cytoplasmatischen Domäne gelegt wurde [Kennedy und Limbird, 1994; Schweizer et al., 1995; Belanger et al., 2001; Bizzozero et al., 2001; ten Brinke et al., 2001; ten Brinke et al., 2002; Navarro-Lerida et al., 2002; Yik und Weigel, 2002]. So ist nicht nur die Zahl der Aminosäuren zwischen Cystein-Resten und der Transmembranregion entscheidend, sondern auch der tatsächliche Abstand, der abhängig vom Vorhandensein hydrophober oder positiv geladener Aminosäuren ist, was zu einer schleifenartigen Membranassoziation der Proteinkette führt. Durch dieses Phänomen lassen sich auch die großen Variationen in der Anzahl der Aminosäuren zwischen Membran-Grenze und acyliertem Cystein-Rest erklären, die zwischen einer und 14 Aminosäuren liegt, in Ausnahmefällen aber auch sehr viel höher sein kann. Ohne das Vorhandensein solcher Schleifen hätte das Einfügen zusätzlicher Aminosäuren in den Teil zwischen Membran und Cystein-Rest einen wesentlich größeren Effekt. Die Bedeutung der Transmembranregion und der dort lokalisierten Aminosäuren für die Palmitoylierung wurde bislang allerdings nur vereinzelt erörtert.

In intensiven Versuchen mit dem Vorläufer des Surfactant-Proteins C (proSP-C) wurden die Anforderungen für die Palmitoylierung speziell von proSP-C umfassend analysiert. Hierbei wurde proSP-C leistungsfähig und unabhängig von der Art der Aminosäuren zwischen den Cystein-Resten und der Transmembranregion palmitoyliert. Auch nach Austausch der Transmembranregion des proSP-C gegen artifizielle Transmembran-Sequenzen, bestehend aus bis zu vierfacher Wiederholung der Sequenz Leu-Ala-Ala-Ala-Leu oder Leu-Leu-Ala-Leu-Leu, wurde Palmitoylierung in gleichem Maß wie für das Wildtyp-Protein beobachtet, sofern die Länge der Sequenz in etwa der Stärke der Membran entsprach. Hieraus wurde abgeleitet, dass die Transmembranregion keine Signal-Sequenz für die Palmitoylierung enthält [Ten Brinke et al, 2002]. In einer weiteren Publikation derselben Arbeitsgruppe wurde allerdings für die erwähnten proSP-C-Chimären eine Induktion von Membran-Kompartimenten mit abweichender Morphologie beschrieben, so dass die reguläre Sequenz Einfluss auf Membran-Formation und Morphologie zu haben scheint [Ten Brinke et al., 2003]. Diese Beobachtung lässt also offen, ob es einen *in vivo*-Effekt der Transmembran-Region auf die Acylierung von proSP-C gibt.

Auch für eine Chimäre des palmitoylierten Proteins p63, in der die Transmembranregion von p63 durch die Transmembranregion des Plasmamembranproteins Dipeptidylpeptidase IV ersetzt worden war, konnten keine Unterschiede in der Palmitoylierung im Vergleich zum originären p63 beobachtet werden [Schweizer et al., 1995]. Allerdings ist nicht bekannt, ob

diese Dipeptidylpeptidase IV eventuell auch palmitoyliert vorliegt, demnach selber die nötigen Motive für eine Palmitoylierung enthält. Denkbar wäre auch, dass das Protein p63 nur durch den Einfluss seiner cytoplasmatischen Domäne ausreichend palmitoyliert werden kann [Ponimaskin und Schmidt, 1995, 1998].

Demgegenüber erfolgt eine drastische Abnahme der Palmitoylierung nach Austausch der Transmembranregion des Hämagglutinins durch die entsprechende Domäne des nicht-palmitoylierbaren Sendaivirus F-Proteins [Ponimaskin und Schmidt, 1998]. Dieses Ergebnis entspricht auch den Resultaten der vorliegenden Arbeit. Für das mutierte Fusionsprotein des Sendaivirus, in das ein Cystein-Rest in der typischen Palmitoylierungsregion der cytoplasmatischen Domäne eingefügt worden war, wurde bereits zuvor gezeigt, dass es nicht palmitoyliert wird [Ponimaskin und Schmidt, 1998]. Der Austausch von Transmembranregion und cytoplasmatischer Domäne zusammen durch die korrespondierenden Domänen acylierbarer Proteine führte – unabhängig von den verwendeten Proteinen - zu einem deutlichen Einbau von [³H]-Palmitinsäure in die Chimärenproteine, aber auch Ersatz der Transmembranregion des Fusionsproteins allein ermöglichte noch eine deutliche Acylierung, wenn auch auf signifikant niedrigerem Niveau (*Kapitel 4.1.2*). Auch ein für diese Arbeit durchgeführter Vergleich der Aminosäure-Anordnung in der Membran-spannenden α -Helix und der Hydrophobizität der betreffenden Aminosäuren zeigt bei den palmitoylierten Proteinen deutliche Abweichungen, indem sich in der strikt hydrophoben Sequenz Bereiche nicht-hydrophober Aminosäuren zeigen, was die starre Helix flexibler werden lässt (*Kapitel 4.1.4*).

Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass auch die Transmembranregion entscheidend für die Palmitoylierung ist. Der Austausch allein der Transmembranregion eines nicht-palmitoylierten Proteins vermag es, dieses zu palmitoylieren, auch wenn weitere Informationen dazu in der cytoplasmatischen Domäne beherbergt liegen. Eine nahe liegende Erklärung für die Bedeutung der Transmembranregion über die Verankerung des Proteins in der Membran hinaus wäre, dass diese das Protein in der Membran orientieren soll, so dass auf diese Weise die zu palmitoylierenden Cystein-Reste in der cytoplasmatischen Domäne mit der Membran-assoziierten Palmitoyltransferase interagieren können.

5.2 UNTERSCHIEDE IN DER PROZESSIERUNG UND FUNKTION

Die in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Unterschiede zwischen den Chimären aus acylierten und nicht-acylierbaren Proteinen hinsichtlich deren Palmitoylierungsniveau geben allerdings noch keinen Anhaltspunkt dafür, ob diese tatsächlich auf den Einfluss der Aminosäure-Sequenzen

in den substituierten Domänen zurückzuführen sind oder eher durch die Palmitoylierung selbst verursacht werden. Durch Acylierung mit verbundener Steigerung der Hydrophobizität kann sich der Charakter eines Polypeptids ändern, was neue Reaktionseigenschaften wie Membran-Interaktionen und Konformationsänderungen ermöglicht. So wiesen Studien am Vorläufer des Surfactant-Proteins C (proSP-C) nach Substitution der juxtamembranär in der cytoplasmatischen Domäne gelegenen basischen Aminosäuren Lys₃₄ und Arg₃₅ zunächst darauf hin, dass diese einen entscheidenden Einfluss auf die Acylierung haben, da das Palmitoylierungsniveau deutlich abfiel. Weitere Versuche zeigten aber, dass der Austausch dieser Aminosäuren die zelluläre Lokalisation des Proteins beeinflusst, diese also keinen direkten Effekt auf die Palmitoylierung von proSP-C haben [Ten Brinke et al., 2001].

Aus diesem Grund wurden Kontrollversuche durchgeführt, um zu erfahren, ob die weitere Prozessierung der Proteine nach der Fettsäure-Modifikation und ihr Transport an die Zellmembran gestört wurden. In dieser Arbeit konnten allerdings keine Auswirkungen der Palmitoylierung auf die Prozessierung oder den Transport der Proteine beobachtet werden (*Kapitel 4.1.3*). Allerdings wurden unsere Chimärenproteine einheitlich nur nach einer Expressionszeit von fünf Stunden kontrolliert. Um nicht nur eine ernsthafte Störung von Transport oder Prozessierung, sondern auch verzögerte Abläufe nachweisen zu können, müssten die Chimären und Mutanten zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen werden. Weiterhin zeigte die Analyse der Oberflächenexpression im Durchflusszytometer mit relativen Werten um die 26 % eine ziemlich niedrige Präsentation aller Proteine an der Zellmembran an (*Kapitel 4.1.3.2*), was allerdings auch bei den Vergleichsproteinen in gleicher Weise zutrifft. Dieses Vergleichsprotein ist im Falle der Kontrolle der Acylierungs-Chimären (*Kapitel 4.1.1*) allerdings selbst ein mutiertes Protein. Für die erstellten Mutanten (*Kapitel 4.2.2*) dienen die Ausgangs-Chimären aus Fusionsprotein und acyliertem Protein als Bezugswert. Vielleicht hätten sich Unterschiede in der Oberflächenexpression ergeben, wenn als Vergleichsprobe das Wildtyp-Protein gemessen worden wäre.

Die funktionellen Auswirkungen des Transmembranregion-Austauschs wurden für vier der in dieser Arbeit erstellten Chimärenproteine, F-CD4-CD4, F-CD4-F_{Cys}, F-HA'-HA und F-HA'-F_{Cys} (*Kapitel 4.1.1*), in einer anderen Arbeitsgruppe weiter untersucht [Baljinnyam et al., 2003]. Auch hier wurde der Wildtyp des Fusionsproteins des Sendai-Virus oder seine Chimären in CV1-Zellen exprimiert (*Kapitel 3.2.3.2*). Um eine proteinvermittelte Zell-Zell-Fusion zu vermitteln, war die Co-Expression der Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) des Sendai-Virus notwendig. Zur Untersuchung der Fusionsaktivität der exprimierten Proteine wurden Erythrozyten verwendet, die mit dem Membran-Marker R18 und dem Cytoplasma-Marker Calcein markiert worden waren.

Sowohl der Fusionsprotein-Wildtyp als auch seine vier Chimären waren in der Lage, eine Membranfusion von CV1-Zellmembran und Erythrozytenmembran zu vermitteln, was durch Lipid-Austausch mit Übertritt des Membran-Markers R18 dargestellt wurde. Die Bildung von kleinen wässrigen Fusionsporen wurde durch Cytoplasma-Austausch mit Übertritt des Calceins für den Wildtyp und alle Chimären außer F-CD4-CD4 gezeigt [Baljinnyam et al., 2003].

Die Fusions-Aktivitäten der F-Protein-Chimären mit ausgetauschten Domänen gegen die korrespondierenden Regionen des Influenza A-Hämagglutinins zeigten nur geringgradige Verminderungen im Vergleich zum F_{Wt}-Protein, woraus geschlossen wurde, dass die Substitution von Transmembranregion oder cytoplasmatischer Domäne des Fusionsproteins durch die entsprechende Domäne eines viralen Proteins mit der gleichen Funktion die Fusionsaktivität des Fusionsproteins kaum beeinflusst.

Ähnliche Resultate wurden auch in früheren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe gefunden, bei denen Chimären des Hämagglutinins mit ausgetauschten Domänen gegen die des Fusionsproteins erstellt wurden. Austausch von cytoplasmatischer Domäne oder Transmembranregion beeinflussten weder die vollständige Membranfusion mit Lipid-Austausch und die Bildung von Fusionsporen, noch zeigten sie Unterschiede in der Vergrößerung der Fusionspore [Schroth-Diez et al. 1998; Kozerski et al., 2000]. Auch HA-Chimären mit Domänen anderer fusogener Virus-Proteine wiesen die gleichen biologischen Funktionen wie HA_{Wt} auf [Roth et al., 1986].

Auch die erstellte F-CD4-F_{Cys}-Chimäre vermittelte wie erwähnt sowohl Lipidvermischung als auch die Öffnung von Fusionsporen, auch wenn CD4 ein nicht-virales, nicht-fusogenes Protein darstellt [Baljinnyam et al., 2003], was auch für HA-CD4-HA-Chimären [Kozerski et al., 2000] und andere nicht-virale Membranproteine [Melikyan et al., 1999] nachgewiesen werden konnte. Durch Austausch der Transmembranregion allein konnten keine Auswirkungen auf die Fusionsfähigkeit beobachtet werden [Schroth-Diez et al., 2000], da sich vermutlich die Eigenschaften der Transmembranregionen hinsichtlich Hydrophobizität oder Länge ähneln; lediglich eine Verkürzung der TMR unter 17 Aminosäuren behindert die Funktion, indem es nur zur Hemifusion kommt [Armstrong et al., 2000].

Im Gegensatz dazu konnte in der Chimäre F-CD4-CD4 trotz Lipid-Mischung keine Bildung von Fusionsporen beobachtet werden. Obwohl also eine Strukturumwandlung des Chimären-Proteins stattgefunden haben muss, kommt es nur zur Hemifusion, was entweder

durch Wechselwirkungen von TMR und CPD während der Membranfusion oder allein auf die Substitution der cytoplasmatischen Domäne zurückzuführen ist.

Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Chimären HA-CD4-CD4 und HA-HA-CD4 zwar eine Fusionsporenbildung, nicht aber die Porenerweiterung induzieren können [Kozerski et al., 2000]. Als Ursache hierfür wurde basierend auf dem *elastic coupling model* [Melikyan et al., 1995] die stark hydrophile Aminosäure-Sequenz des CD4 unmittelbar nach der Transmembranregion vermutet, wohingegen die meisten viralen Fusionsproteine dort strikt hydrophobe Sequenzen aufweisen. Die Hydrophilie scheint das Eintauchen der CPD in die zu fusionierende Membran zu erschweren und kann so durch Verhinderung der Positionsverschiebung der Transmembranregion die vollständige Fusion verhindern.

5.3 DIE BEDEUTUNG DER AMINOSÄURE GLYCIN FÜR DIE PALMITOYLIERUNG

Wie bereits zuvor dargestellt wurde, scheint die Palmitoylierung integraler Membranproteine mehr von der Wahrscheinlichkeit der Cystein-Interaktion mit der Membran-gebundenen Palmitoyltransferase als von spezifischen Sequenzmotiven abzuhängen.

Ein Vergleich der Aminosäure-Anordnung in der Membran-spannenden α -Helix zeigt bei den in dieser Arbeit verwendeten acylierten Proteinen CD4, CD8 und Hämagglutinin jeweils Bereiche nicht-hydrophober Aminosäuren in der sonst strikt hydrophoben Sequenz. Davon ausgehend, dass nur Aminosäuren entscheidend sind, die relativ nahe zur cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran gelegen sind, stellen sich die interessierenden nicht-hydrophoben Aminosäuren im Hämagglutinin (Gly₂₀) und im CD4 (Gly₁₆ und Gly₁₈) als Glycin-Reste heraus. Lediglich im CD8-Protein bilden Thr₁₅, Asn₁₉ und His₂₀ die nicht-hydrophoben Aminosäuren (*Kapitel 4.1.4*).

Sequenz-Analysen der Transmembranregionen bekannter palmitoylierter Proteine ergaben als einziges signifikantes Merkmal die Aminosäure Glycin in der Nähe der Cytoplasma-Grenze (*Kapitel 4.2.1*), woraus zusammen mit den zuvor erwähnten Ergebnissen auf eine entscheidende Rolle des Glycin-Rests für die Palmitoylierung geschlossen werden kann.

So wurde auch für periphere Membranproteine die Notwendigkeit von Glycin für eine Palmitoylierung postuliert. Die endotheliale Stickstoffsynthase (eNOS) ist durch Myristoylierung des Gly₂ und durch Palmitoylierung der Cystein-Reste an den Positionen 15 und 26 modifiziert [Liu et al., 1995]. Die Sequenz zwischen diesen beiden Cystein-Resten enthält fünf Wiederholungen der Abfolge Glycin – Leucin, die unbedingt notwendig für die Palmitoylierung und dadurch die Lokalisation des Proteins sind [Liu et al., 1996], nicht aber

für die N-Myristoylierung, Membran-Assoziation und Aktivität der Stickstoffsynthese [Liu et al., 1997]. Es ist aber zu vermuten, dass in der fünffachen Wiederholung des Gly-Leu-Motivs eher die Aminosäure Leucin durch Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen mit der Membran verantwortlich dafür ist, die beiden Cystein-Reste der eNOS an die Membran und damit zu Interaktion mit der Palmitoyl-Transferase zu bringen.

Auch im proSP-C hat die Substitution der vier N-terminal der palmitoylierten Cysteine von proSP-C liegenden Aminosäuren Phe-Gly-Ile-Pro durch Alanin-Reste einen drastischen Einfluss auf das Palmitoylierungsniveau, wobei diese Verringerung der Palmitoylierung hauptsächlich durch den Ersatz des Isoleucins verursacht wurde [Ten Brinke et al., 2002]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass in diesem Bereich Aminosäuren anwesend sein müssen, die mit der Membran interagieren können, wie die stark hydrophoben Aminosäuren Phenylalanin und Isoleucin; die Hydrophobizität des Alanins scheint dafür zu schwach zu sein. Allerdings zeigte eine gerichtete Mutagenese der Aminosäure-Reste₉₉₋₁₀₅ im p63-Protein, dass die Aminosäuren um das palmitoylierte Cystein nicht bedeutsam für die Palmitoylierung sind, diese also ohne ein primäres Sequenzmotiv aufzutreten scheint [Schweizer et al., 1995].

Wie zuvor gezeigt, führt der Austausch der Transmembranregion der nicht-palmitoylierbaren Fusionsprotein-Mutante gegen die korrespondierende Region acylierter Proteine zur Palmitoylierung (*Kapitel 4.1.2*). Sogar der Austausch einzelner Aminosäuren im cytoplasmatischen Teil der Transmembranregion gegen die entsprechenden Aminosäuren des Influenza A-Hämagglutinins kann die Palmitoylierung des Fusionsproteins bewirken. So führte das Einfügen der letzten sieben Aminosäuren (Gly-Leu-Val-Phe-Ile-Ile-Val) zu einer relativen Palmitoylierung von ungefähr 20 % im Vergleich zum Wildtyp-Hämagglutinin, die letzten sechs Aminosäuren zeigten eine Acylierungsrate von 10 %, und die Mutante mit ausgetauschten vier Aminosäuren zeigte immerhin noch eine Palmitoylierung von 4,5 % [Ponimaskin und Schmidt, 1998]. Ein Glycin-Rest in der Transmembranregion nahe des Cytoplasmas scheint demnach eine große Bedeutung für die Palmitoylierung zu haben, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Austausch der Aminosäure Glycin an Position 18 durch Isoleucin führte zu einem höchst signifikanten Abfall der Palmitoylierung im Vergleich zu der ursprünglichen F-CD4-F_{Cys}-Chimäre. Auch die Substitution beider Glycin-Reste an Position 16 und 18 zusammen zeigte einen höchst signifikanten Einbruch der Palmitoylierung, wobei aber überraschenderweise das Palmitoylierungsniveau bei Austausch beider Glycin-Reste geringfügig höher als bei Austausch nur eines Rests lag (*Kapitel 4.2.2.1*).

Eine Substitution von Gly₂₀ durch Valin in der Chimäre F-HA'-F_{Cys} führte ebenso zu einem höchst signifikanten Abfall des Palmitinsäure-Levels der Mutante auf gerade noch knapp 8 % der Palmitoylierung der originären Chimäre F-HA'-F_{Cys}. Interessanterweise kam es bei gemeinsamer Substituierung von Gly₂₀ und dem gegenüberliegenden Phe₂₃ zwar ebenfalls zu einem höchst-signifikantem Einbruch in der Palmitoylierung, der relative Wert lag mit 14 % aber fast doppelt so hoch wie für den Austausch des Glycin-Rests allein. Auch ein Ersatz des Phenylalanins an Position 23 führte zu einer signifikanten Verminderung der Acylierung auf gut 50 % der Ursprungs-Chimäre.

Glycin ist unter den Aminosäuren durch das Fehlen einer Seitenkette einzigartig. In löslichen Proteinen werden Glycin-Reste häufig in den Loop-Regionen und β -Turns gefunden, da sie durch das Fehlen sterischer Interaktionen und der hohen entropischen Kosten nur begrenzt in helicalen Sekundärstrukturen eingesetzt werden. Tatsächlich ist Glycin im Allgemeinen als "Helix-Brecher" bekannt und rangiert in den meisten Publikationen an ähnlicher Position wie Prolin in der Helix-Voraussage [O'Neil und De Grado, 1990; Pace und Scholtz, 1998]. Dennoch tritt Glycin häufig in Transmembran-Helices der Membranproteine auf [Landolt-Marticorena et al., 1993], was durch starke Wasserstoffbrückenbindungen der Amide und Carbonyle des Proteinrückgrates ermöglicht wird. Das vermehrte Vorkommen von Glycin-Resten in Transmembran-Helices schlägt eine strukturelle Rolle vor, die sich von der in den löslichen Proteinen unterscheidet [Li und Deber, 1992], indem es beispielsweise in einigen Transmembranproteinen Protein-Dimerisierungen durch spezifische Interaktionen vermittelt [Lemmon et al., 1994]. So konnte für Glycophorin A gezeigt werden, dass Gly₇₉ und Gly₈₃ am Dimerisierungs-Motiv aus sieben Aminosäure-Resten beteiligt ist, wobei Substitution entweder von Gly₇₉ oder von Gly₈₃ mit größeren hydrophoben Aminosäuren die Dimerisierung stört [Lemmon et al., 1992]. Durch Röntgenstrukturanalysen konnte aufgedeckt werden, dass beide Glycin-Reste einen engen Kontakt mit Seitenketten des Valins auf der entgegengesetzten Seite der Helix durch Van der Waals-Kräfte ausbilden [Smith und Bormann, 1995; MacKenzie et al., 1997].

Diese Van der Waals-Kräfte bilden zusammen mit den Dipol-Interaktionen des Protein-Rückgrates die strukturelle Grundlage dafür, wie sich Proteine in den Membranen falten. Die meisten Membranproteine überspannen die Lipid-Doppelschicht mit langen α -helicalen Strukturen der Aminosäuren. Die Helix-Formation wird eher durch enthalpische als entropische Abhängigkeiten bedingt, wobei der hydrophobe Effekt, der eine dominierende Rolle in der Faltung löslicher Proteine spielt, nicht bedeutend zur Helix-Assoziation in Membranproteinen beiträgt, sobald die Helix in die Lipid-Doppelschicht eingelagert ist [Aurora et al., 1997; Torres et al., 2001].

Die Zusammenlagerung der Transmembran-Helices ist bereits gut für Dimere der Single-Membran-Proteine beschrieben worden [Bormann et al., 1989]. Glycin-Reste scheinen Helix-Helix-Interaktionen zu unterstützen, da das Fehlen einer Seitenkette eine große Oberfläche für Zusammenlagerungen bietet und gleichzeitig das polare Rückgrat der Proteine freiliegt.

Während die beobachteten Kreuzungswinkel in löslichen Protein-Dimeren 23° und 252° für linkshändige und rechtshändige *Coiled Coils* betragen, ist im Gegensatz dazu die Abweichung der Kreuzungswinkel in Transmembran-Helices durch die geringe Größe der Glycin-Reste an der Helix-Schnittstelle und die dadurch übertragene Lagerungsflexibilität der Helices sehr bedeutend, so dass sich beispielsweise in der Cytochrom C-Oxidase Winkel zwischen 8° und 55° ergeben können [Javadpour et al., 1999; Eilers et al., 2002]. Generell wird die Meinung vertreten, dass kleine Aminosäure-Reste, sowohl polar als auch hydrophob, in Helix-Helix-Schnittstellen bevorzugt werden [Lyu et al., 1990; Bowie, 1997; Ballesteros et al., 2000]. Besonders Glycin als kleinste Aminosäure scheint eine entscheidende strukturelle Rolle in Membranproteinen zu haben. Im Gegensatz zu seiner Rolle in löslichen Proteinen stört Glycin in der Transmembranregion nicht die Sekundärstruktur der Helix, sondern wirkt eher als molekulare Einkerbung, die eine Zusammenlagerung mehrerer Helices erleichtert [Shah et al., 1996; Javadpour et al., 1999].

Die besondere Bedeutung des Glycins in der Transmembran-Helix auf die Palmitoylierung integraler Membranproteine könnte also in seiner nur geringen Seitenkettenausdehnung begründet sein. Während es wie eben dargelegt in löslichen Proteinen eher ein „*Helix-Breaker*“ ist, kann es in integralen Membranproteinen die Interaktion mehrerer Helices vermitteln. Durch das Eingehen von Helix-Helix-Interaktionen wird das Protein somit in der Membran aus seiner ursprünglichen Lage geringfügig abgelenkt (*helical tilt*) [Torres et al., 2000], was den Kontakt zwischen dem zu acylierenden Cystein mit der Palmitoyltransferase erleichtern könnte. Auch das oben erwähnte Phänomen, bei dem der Austausch des Gly₁₈ in der Chimäre F-CD4-F_{Cys} allein einen größeren Abfall des Palmitoylierungsniveaus bedingt, als wenn sowohl Gly₁₆ als auch Gly₁₈ substituiert wurden (4.2.2.1), lässt sich mit diesen Lage-Veränderungen der Helix erklären. Die Struktur der α -Helix der CD4-Transmembranregion mit überwiegend strikt hydrophoben Aminosäuren wird durch die beiden nahezu gegenüberliegenden Glycin-Reste stabilisiert und in der Membran ausgerichtet. Der Austausch beider Glycin-Reste gegen die hydrophobe Aminosäure Isoleucin sollte außer einer gewissen Streckung der Helix keine weiteren Auswirkungen auf die Helix-Achse zeigen, wobei aber genau diese Streckung eine optimale Interaktion der zu palmitoylierenden Proteine mit der PAT verhindern könnte, was zum Absinken des Palmitoylierungsniveaus führt. Im Gegensatz dazu könnte der Austausch von lediglich einem

Glycin-Rest durch eine größere Aminosäure zu einem Abknicken der Helixstruktur und gestörter Interaktion mit anderen Helices führen, was wiederum eine andere Ausrichtung des Proteins in der Membran und dadurch gestörte Interaktion mit der PAT bedingen könnte.

5.4 GIBT ES EINE KONSENSUS-SEQUENZ?

Bei peripher liegenden Membranproteinen kann die Palmitoylierung an Cystein-Resten an drei verschiedenen Lokalisationen innerhalb des Proteins auftreten (*Kapitel 1.2.1*). Bei vielen dieser Proteine, die keine membranspannende Region besitzen, scheint durch hydrophobe Modifikationen anderer Art oder eine Reihe hydrophober Aminosäuren eine Assoziation mit dem inneren Blatt der Membran Voraussetzung für die S-Acylierung zu sein. Hierbei liegen die palmitoylierten Cysteine oft in der Nähe von Prenylierungs- oder Myristoylierungsstellen, wobei hydrophobe Modifikationen aber nicht in jedem Fall Voraussetzung für eine S-Acylierung nicht-integraler Proteine sind. Bei peripheren Membranproteinen gibt es also außer des N-terminalen MGC-Motives bei vorheriger Myristoylierung und der C-terminalen „CAAX-Box“ für die vorangehende Isoprenylierung keine übereinstimmenden Sequenzen für die Palmitoylierung.

Es gibt allerdings auch N-terminal palmitoylierte Proteine, die nicht gleichzeitig auch myristoyliert sind. Hierzu zählen bestimmte α -Untereinheiten der G-Proteine, wie $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ [Ponimaskin et al., 1998; Ponimaskin et al., 2000], und das Gerüstprotein PSD95 [Topinka und Bredt, 1998; El Hussein et al., 2000], die vermutlich durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran gelenkt werden. Für die Palmitoylierung des in neuronalen Wachstumszapfen gefundenen nicht-myristoylierten Proteins GAP43 sind dagegen die basischen Aminosäuren im Umfeld immens wichtig [Skene und Virag, 1989; Liang et al., 2002]. Für eine Myristoylierungs-defiziente nicht acylierte Mutante der G-Protein-Untereinheit α_1 konnte allerdings bei Co-Expression mit den β - und γ -Untereinheiten und einer dadurch erzielten Membranlokalisation über die isoprenylierte γ -Untereinheit Palmitinsäure-Bindung beobachtet werden [Degtyarev et al., 1994].

Das Signal für die Palmitoylierung peripherer Membranproteine ist aber offenbar weniger komplex als bei integralen Membranproteinen, denn Übertragung der ersten 15 Aminosäuren von GAP-43 oder $G\alpha$ an andere periphere, normalerweise nicht acylierte Proteine führt zu deren Palmitoylierung [Galbiati et al., 1999].

Für C-terminal palmitoylierte periphere Proteine gilt gewissermaßen die Konsensus-Sequenz für die Isoprenylierung, die so genannten "CAAX-Box" (Konsensus-Sequenz Cystein –

aliphatische Aminosäure - aliphatische Aminosäure – beliebige Aminosäure), wobei der betreffende Cystein-Rest über eine Thioetherbindung isoprenyliert wird, nachdem die drei terminalen Aminosäuren (AAX) proteolytisch abgespalten wurden [Casey, 1994; Gelb et al., 1998]. An weiteren Cystein-Resten kann dann die Palmitoylierung erfolgen. Ähnlich wie bei N-terminal palmitoylierten Proteinen die Myristoylierung, ist die Isoprenylierung eine Voraussetzung für die nachfolgende C-terminale Palmitoylierung [Jung et al., 1995]. Einzig das Protein K-Ras-B wird nicht palmitoyliert, da sich eine polybasische Region an Stelle der zu palmitoylierenden Cysteine befindet, die durch Bindung an negativ-geladene Phospholipide die Membrananker-Funktion der Fettsäuren ersetzen kann [Resh, 1999].

Die Palmitoylierung von Transmembranproteinen findet an Cystein-Resten statt, die entweder in der Transmembranregion oder in der Cytoplasma-Domäne lokalisiert sind. Obgleich nur bestimmte Cystein-Reste palmitoyliert werden, schwankt ihre Position beträchtlich in unterschiedlichen Acylproteinen. Die einzige Übereinstimmung in der Aminosäure-Sequenz von palmitoylierten integralen Membranproteinen ist somit die Lage der betreffenden Cysteine in der cytoplasmatischen Domäne nahe der Transmembranregion oder in der Transmembran-Domäne selbst [Schlesinger et al., 1983; Sefton und Buss, 1987], in den meisten Fällen innerhalb von vierzehn Aminosäuren juxtamembranär [Ponimaskin und Schmidt, 1995; Reverey, 1996; Schmidt et al., 1988]. Eine Palmitoylierung von Cysteinen, die mitten in der TMR oder in der CPD weit vom membranspannenden Segment entfernt sind, findet nicht statt. Diese Topologie weist auf die Protein-Acyl-Transferase (PAT) als membrangebundenes zelluläres Enzym mit einer Orientierung des aktiven Zentrums zum Zytoplasma hin, weshalb ein Cystein-Rest, der zu tief in der Transmembranregion oder zu weit entfernt in der cytoplasmatischen Domäne liegt, von der PAT nicht erreicht werden kann.

Beispielsweise wurde für das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Typ II-Membranprotein p63 gezeigt, dass das Palmitoylierungs-Niveau strikt von seinem Abstand von exakt sechs Aminosäuren von der TMR abhängt, da Änderung der Spacer-Länge von einer oder mehreren Aminosäuren mehr oder weniger den kompletten Verlust der Palmitoylierung bedeutete [Schweizer et al., 1995]. Auch im Surfactant-Protein C zeigte sich eine reziproke Wechselbeziehung zwischen der Länge des Spacers und dem Palmitoylierungsniveau [Ten Brinke et al., 2002], und die H1-Untereinheit des humanen Asialoglycoprotein-Rezeptors lag nicht palmitoyliert vor, wurde die Acylierungsstelle weitere 30 Aminosäuren von der Membrangrenze entfernt [Yik und Weigel, 2002].

Eine generelle, wenn auch sehr ungenaue Konsensus-Sequenz für die Lokalisation der Cysteine in palmitoylierten Proteinen wurde nach Computer-assistiertem Sequenz-Alignment bekannter palmitoylierter integraler Membranproteine als TMDX₁₋₁₂AA(C)A beschrieben, wobei TMD für die Transmembran-Domäne, X für beliebige und A für aliphatische Aminosäuren steht; C bedeutet palmitoyliertes Cystein [Grosenbach et al., 1997]. Eine Publikation derselben Arbeitsgruppe führte dann zu einer abgewandelten Variante dieser Sequenz, *Hydro*^{*}AA(C)A, die für alle palmitoylierten Membranproteine gelten soll, wobei *Hydro*^{*} für einen hydrophoben Anteil eines Proteins steht, der entweder durch eine hydrophobe Abfolge von Aminosäuren, eine zuvor erfolgte hydrophobe Modifizierung oder eine ein bis zwölf Aminosäuren weit entfernte Transmembranregion repräsentiert wird [Hansen et al., 1999]. In dieser Sequenz wird das Auftreten palmitoylierter Cysteine in der Transmembranregion gänzlich vernachlässigt. Diese Konsensus-Sequenz trifft für keines der in dieser Arbeit untersuchten Proteine Sendai-Virus-Fusionsprotein, Hämagglutinin, CD4 oder CD8 zu.

Die Anwesenheit eines Cystein-Rests in dieser so genannten Acylierungsregion ist allerdings nicht die einzige Voraussetzung für eine Palmitoylierung, da sich der Sequenzkontext in dieser Region als ebenfalls bedeutsam herausgestellt hat. So gibt es integrale Membranproteine, wie das kleine hydrophobe Protein des humanen Respiratorischen Synzytialvirus mit einem Cystein-Rest in verhältnismäßig kurzem Abstand von der TMR, die nicht palmitoyliert werden können [Collins und Mottet, 1993].

Allein mutagene Einfügung von Cystein-Resten in diese empirische Acylierungsregion des nicht-palmitoylierten Fusionsproteins des Sendaviruses reicht nicht zur Palmitoylierung aus [Ponimaskin und Schmidt, 1995], Einfügen von TMR oder CPD des Hämagglutinins in das nicht-acylierte Fusionsprotein führte zu dessen Palmitoylierung. Auch die Substitution der letzten sieben Aminosäuren (Gly-Leu-Val-Phe-Ile-Ile-Val) führte zu einer relativen Palmitoylierung von ungefähr 20 % im Vergleich zum Wildtyp-Hämagglutinin, die letzten sechs Aminosäuren zeigten eine Acylierungsrate von 10 %, und die Mutante mit ausgetauschten vier Aminosäuren zeigte immerhin noch eine Palmitoylierung von 4,5 % [Ponimaskin und Schmidt, 1998].

Die Aminosäuren in der Nähe der Acylierungsstelle in der cytoplasmatischen Domäne haben sich als sehr bedeutend erwiesen. Zusammenlagerungen hydrophober und basischer Aminosäuren um die Acylierungsstelle herum wurden als optimales Motiv für eine Palmitoylierung beschrieben, auch wenn dieses Sequenzmuster nicht in allen palmitoylierten integralen Membranproteinen vorkommt. Generell kann aber geschlossen werden, dass

basische und hydrophobe Aminosäuren durch ihre Interaktion mit der Membran die Acylierung fördern, während saure Aminosäuren durch Abstoßung ihrer negativen Ladungen von den negativ-geladenen Kopfgruppen der Membran-Phospholipide die Palmitoylierung vollständig hemmen [Belanger et al., 2001]. In einer anderen Studie mit 26 synthetischen Peptiden zeigten diejenigen mit basischen und aromatischen Aminosäure-Resten nahe der Cystein-Reste die höchste S-Acylierungsrate. Da generell die Palmitoylierungsregionen vieler Proteine von basischen Aminosäuren umgeben sind, könnte das ein Ansatz sein, die vermeintliche Spezifität der Akzeptor-Sequenz bei nicht-enzymatischen Prozessen zu erklären [Bizzozero et al., 2001].

Die zwei juxtamembranär-liegenden positiv-geladenen Aminosäuren Lys₃₄ und Arg₃₅ im Vorläufer des Surfactant-Proteins C zeigten keinen direkten Effekt auf die Palmitoylierung von proSP-C, beeinflussten aber die zelluläre Lokalisation des Proteins [Ten Brinke et al., 2001]. Die Aminosäuren, die zwischen den palmitoylierten Cystein-Resten und der Transmembranregion liegen, enthalten kein Signal für die Palmitoylierung von proSP-C [Ten Brinke et al., 2002]. Der Ersatz der vier N-terminal der palmitoylierten Cysteine von proSP-C liegenden Aminosäuren Phe-Gly-Ile-Pro durch Alanin-Reste hatte allerdings einen drastischen Einfluss auf das Palmitoylierungsniveau von proSP-C. Diese Verringerung der Palmitoylierung wurde hauptsächlich durch den Ersatz von Isoleucin verursacht, wohingegen eine Deletion dieser vier Aminosäure überraschenderweise keine Auswirkung auf die Acylierung hatte, da die jetzt N-terminal der Cystein-Reste liegende Aminosäuresequenz Pro-Arg-Gly-Arg, ursprünglich die letzten vier Aminosäuren des N-terminalen Propeptids, nun das positiv geladene Arginin anstelle der hydrophoben Phenylalanin- und Isoleucin-Reste enthielt [Ten Brinke et al., 2002]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass in diesem Bereich Aminosäuren anwesend sein müssen, die mit der Membran interagieren können, wie das positiv geladene Arginin oder die hydrophoben Aminosäuren. Dies war nicht der Fall bei Austausch dieser Aminosäuren durch Alanin, was selbst eine nur schwache Hydrophobizität zeigt. In einigen Spezies wurde in Position 24 ein Leucin-Rest anstelle des Phenylalanins und in Position 25 ein Arginin-Rest anstelle eines Glycins gefunden, was die Vermutung stützt, dass N-terminale hydrophobe und / oder basische Reste neben dem Cystein für eine Palmitoylierung vorteilhaft sind, indem sie möglicherweise Interaktionen mit der Membran vermitteln.

Eine gerichtete Mutagenese der Aminosäure-Reste₉₉₋₁₀₅ im p63-Protein zeigte allerdings, dass die Aminosäuren um das palmitoylierte Cystein nicht bedeutsam für die Palmitoylierung sind, diese also ohne ein primäres Sequenzmotiv aufzutreten scheint [Schweizer et al., 1995]. Auch in anderen Proteinen wie im Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor scheint es

keine Notwendigkeit für cytoplasmatische Strukturen gleich welcher Art zu geben, wobei in dieser Untersuchung allerdings die potentielle Rolle der Transmembran-Domäne dieses Proteins völlig außer Acht gelassen wurde [van't Hof und Crystal, 2002].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Sequenz-Analysen der Transmembran-Regionen bekannter palmitoylierter Proteine durchgeführt, Aus diesen Analysen konnte keine Konsensus-Sequenz abgeleitet werden. Mittels des Programms NOMAD konnte ein signifikant häufiges Auftreten von Glycin-Resten am Ende eines Rahmens von zwölf Aminosäuren in der Transmembranregion beobachtet werden. Auch die Aminosäuren Alanin am Anfang des Rahmens, Leucin an den Positionen 5-8 sowie die Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin an den Positionen 8-11 kamen vermehrt in der Transmembranregion vor, wenn auch nicht in signifikantem Ausmaß. Auch eine Analyse mit dem Programm MULTALIN bestätigt, dass es in den untersuchten Proteinen keine Konsensus-Sequenz in der Transmembranregion gibt, aber auch hier wurde ein häufiges Auftreten von Glycin-Resten nahe der Grenze zum Cytoplasma beobachtet (*Kapitel 4.2.1*). Die Rolle der Transmembranregion und dort speziell der Aminosäure Glycin für die Palmitoylierung wurde bereits ausführlich erörtert (*Kapitel 5.1 und 5.3*).

Eine Vorabveröffentlichung im Internet im Januar 2006 stellte ein Programm namens CSS-Palm vor, mit dem Palmitoylierungsstellen in Proteinen vorausgesagt werden können [Zhou et al., 2006, Vorabveröffentlichung im Internet]. Dieses Programm benutzt eine sogenannte *Clustering und Scoring Strategy* (CSS). Die übereinstimmenden Motive von 210 experimentell bestätigten Palmitoylierungsstellen aus 83 Proteinen wurden in drei verschiedenen Clustern aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten gruppiert. Der endgültige Wert jedes möglichen Cysteins wird durch hochgradige Sequenz-Übereinstimmungen definiert. Dieser Algorithmus hat eine angebliche Sensitivität von 82,16 % und eine Spezifität von 83,17 %. Um dieses Programm zu testen, wurden für die Aminosäure-Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proteine (*Kapitel 4.1.1*) Palmitoylierungs-Voraussagen getroffen. Das CD4-Protein ist *in vivo* an zwei Cystein-Resten palmitoyliert. Das Programm CSS-Palm sagte diese beiden Acylierungsstellen korrekt voraus, aber fand daneben noch zwei weitere Palmitoylierungsstellen, die am N-terminalen Ende beziehungsweise in der Mitte des Proteins lokalisiert sein sollten. Für das Hämagglutinin des Influenza A-Virus, das an drei Stellen juxtamembranär palmitoyliert ist, fand CSS-Palm zwei Acylierungsstellen, allerdings an völlig anderer Lokalisation N-terminal. Für das nicht-palmitoylierte Fusions-Protein des Sendai-Virus sagte das Programm korrekt keine Palmitoylierungsstelle voraus, wohingegen es bei der ebenfalls nicht-palmitoylierten Mutante F_{Cys}, bei der ein Cystein-Rest in die Acylierungsregion eingefügt worden war, diesen Rest fälschlicherweise als

Acylierungsort erkannte. Alles in allem scheint das Programm noch nicht ausgereift zu sein, kann aber als Basis für weitere Programme dienen.

5.5 AUSBLICK

Der Vorgang der Palmitoylierung stellt im Gegensatz zur Myristoylierung eine reversible Proteinmodifikation dar. Diese Modifikation weist durch dynamische De- und Repalmitoylierungen der Proteine die Potenz auf, die intrazelluläre Lokalisation und damit auch die biologische Aktivität dieser Proteine zu modulieren, und ist damit von entscheidender Bedeutung für deren Funktion [Paige et al., 1993; Casey, 1994; Wedegaertner und Bourne, 1994; Veit et al., 1994; Milligan et al., 1995; Wedegaertner et al., 1995; Dunphy und Linder, 1998]. Bei diesen Proteinen steigt die Frequenz des Turn-Overs der Fettsäuren an, wenn die Signaltransduktions-Kaskade aktiviert wird, was darauf hinweist, dass die Palmitoylierung durch intrazelluläre Lokalisierung und Aktivitätsbeeinflussung regulierend in die Signaltransduktion eingreift [Milligan et al., 1995]. Gerade für Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, kann daher die Kenntnis über deren Palmitoylierung hilfreich sein.

Das Wissen über die Palmitoylierung bestimmter Proteine bietet sich so als mögliche Basis zur Erstellung von Therapeutika gegen Bakterien, Viren oder Pilze an. Beispielsweise konnte für einen bestimmten Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*, dem das Gen für die depalmitoylierende Acylprotein-Thioesterase (APT) fehlt, gezeigt werden, dass es bei scheinbar normalem Wachstum und Sporulation dennoch zu signifikant verminderter biochemischer Thioesterase-Aktivität bei palmitoylierter $G\alpha_{i1}$ kommt [Duncan und Gilman, 2002]. Basierend auf dieser Prämisse wurden bereits mehrere APT1-Inhibitoren entwickelt [Biel et al., 2006].

Da eine Identifikation von Palmitoylierungsstellen in Proteinen *in vivo* oder *in vitro* sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv ist, wäre die Möglichkeit einer Detektion dieser Lokalisationen *in silico* extrem nützlich. Generell spricht das Vorliegen basischer oder hydrophober Aminosäuren nahe der Cysteine in der cytoplasmatischen Domäne für die Palmitoylierung des Proteins, aber weder aus den experimentell ermittelten Ergebnissen dieser Arbeit noch aus den Resultaten der Literatur-Recherche ließen sich eindeutige Konsensus-Motive formulieren. Aus dieser Arbeit lässt sich aber ableiten, dass Transmembranproteine, die in der normalerweise strikt hydrophoben membran-spannenden α -Helix nicht-hydrophobe zu einer Seite ausgerichtete Reste (*hydrophiler Ellbogen*) aufweisen, vermutlich palmitoyliert werden können. Dies kann durch Interaktionen mit

anderen Helices und damit verbundener Ablenkung in der Membran zu einer Positionsveränderung der zu palmitoylierenden Cystein-Reste führen, die so mit der Membran-gebundenen Protein-Acyl-Transferase in Kontakt treten können. Diese nicht-hydrophoben Aminosäuren scheinen in der überwiegenden Zahl der Fälle Glycin-Reste nahe der Cytoplasma-Grenze zu sein.