

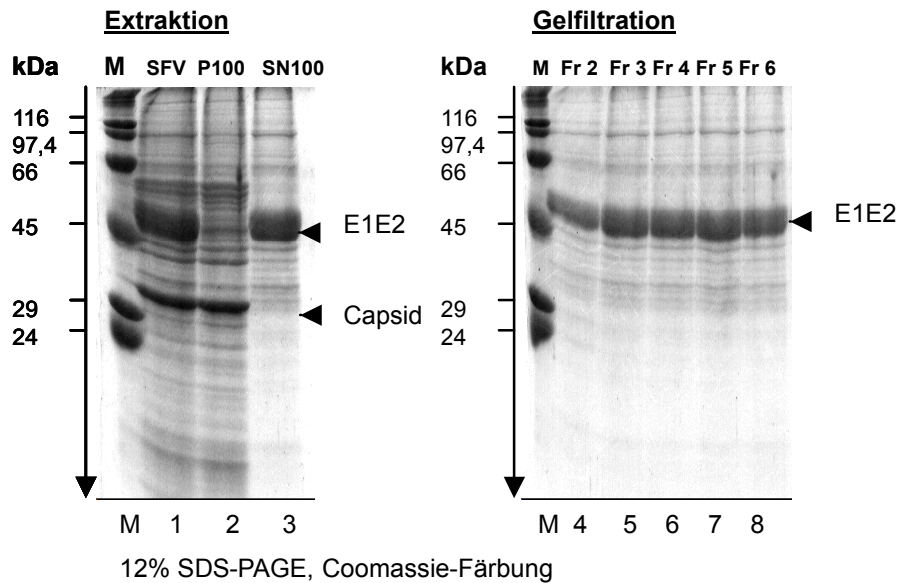
### 4. Ergebnisse

#### 4.1 PAT-Assay mit transmembranem Glykoprotein E1 aus Semliki Forest Virus

Zur Charakterisierung eines Enzyms sowie zur Enzymanreicherung ist ein reproduzierbarer, standardisierter Enzymtest Voraussetzung. Das Spike Protein E1 des Semliki Forest Virus ist als *in vivo* palmitoyliertes Glykoprotein bekannt (Schmidt et al., 1979; Berger und Schmidt, 1984a) und als Akzeptorprotein in einem *in-vitro*-Assay zur Detektion von palmitinsäureübertragender Enzymaktivität beschrieben (Berger und Schmidt 1984b). Für diesen Enzymtest müssen die Proteine gereinigt, in möglichst nativer Form, aber ohne gebundene Fettsäuren, also deacyliert, vorliegen. Sie werden dann in definierter Menge im PAT-Assay eingesetzt, wo sie als Akzeptorprotein für die Fettsäure und somit als Reporterprotein für die Enzymaktivität dienen. Dieser Assay wurde bei einem Großteil der hier vorgestellten Forschungsarbeiten als Standard- oder Vergleichsassay genutzt. Im folgenden werden die erzielten Ergebnisse der Akzeptor- sowie der Fettsäuresubstrat-Präparation zu diesem Assay beschrieben.

##### 4.1.1 Präparation des deacylierten viralen Glykoproteins E1

Es gelang entsprechend der von Berger und Schmidt (1984) beschriebenen Methode, E1 Glykoprotein aus der Hülle des Semliki Forest Virus zu präparieren. Die Virusanzucht erfolgte in Baby-Hamster-Kidney-Zellen (BHK). Nach der Virusernte aus dem Zellkulturmedium nach Standardmethoden der Virologie konnten die E1- und E2-Spike-Glykopolypeptide durch Inkubation des SFV-Konzentrats in 1%igem nicht-ionischem Detergens (Triton X-100) und nach Ultrazentrifugation aus der Virushülle gelöst werden. Mittels einer 30-minütigen Inkubation in neutralem 1 M Hydroxylamin-Puffer (pH 7) wurden die Proteine deacyliert. Hydroxylamin mußte dann durch Gelfiltration (PD-10) wieder entfernt werden, da diese Substanz im Assay eine Acylierung verhindern würde. **Abb. 4.1** dokumentiert die Proteinanalyse per SDS-PAGE.

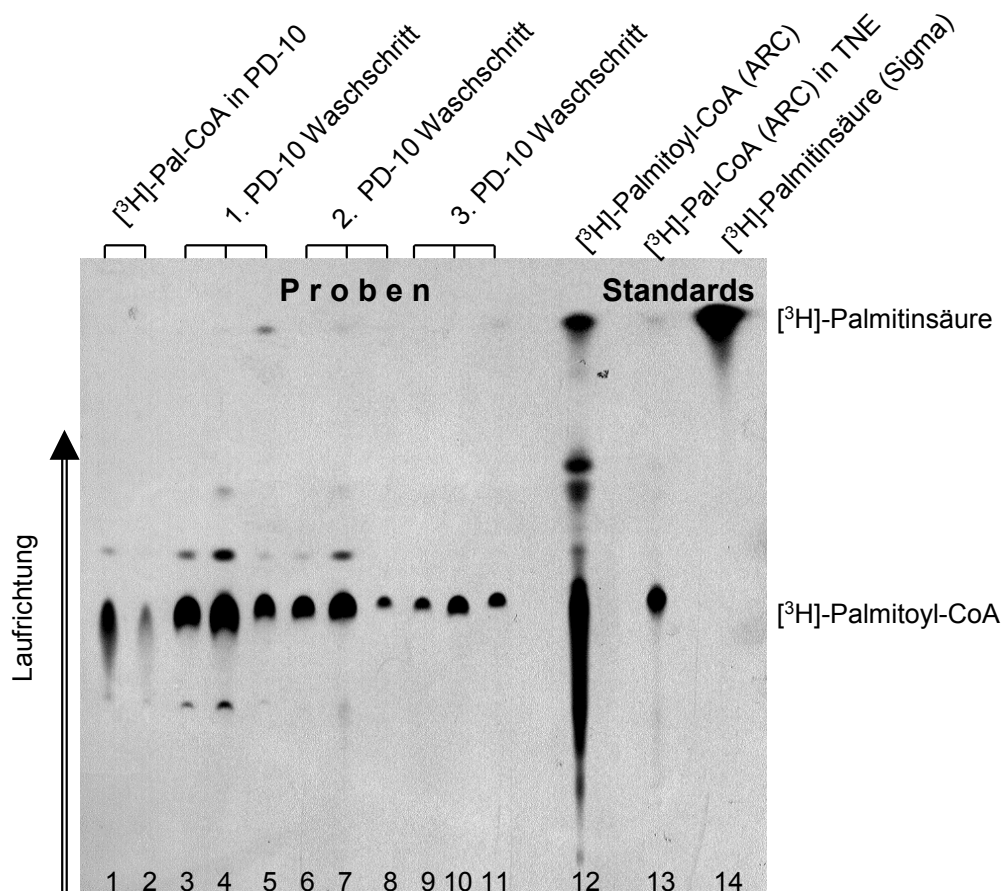


- M: Molekulargewichtsmarker  
 SFV: Virusgesamtlysat  
 P100: Sediment (Pellet) nach TX-100 Extraktion und Zentrifugation  
 SN100: Überstand (Supernatant) nach TX-100 Extraktion und Zentrifugation  
 Fr.2-6: Fraktionen nach Hydroxylaminbehandlung und PD-10 Gelfiltration  
 E1E2: SFV Glykopolypeptide E1 und E2 (unter Verwendung reduzierender Probenpuffer stellen sich die beiden Proteine als eine Bande in SDS-PAGE dar)  
 Capsid: SFV Capsidprotein

**Abbildung 4.1: Gewinnung von gereinigten, deacylierten SFV Glykoproteinen E1 und E2:** Die Abbildung der 12% SDS-PAGE zeigt verschiedene Schritte der Präparation: **Spur 1 (SFV)** zeigt das Lysat des Viruskonzentrats nach der Ernte aus BHK-Zellen. **Spur 2 und 3** zeigen die Auftrennung in gelöste (**SN100**) und membranassoziierte (**P100**) Proteine. Während das Capsidprotein sedimentiert, bleiben E1 und E2 nach Extraktion aus der Membran durch eine einstündige Inkubation in TX-100 und anschließender Ultrazentrifugation (100.000 g, 1 h) im Überstand. In den **Spuren 4 bis 8** sind die Fraktionen nach der Gelfiltration, zur Entfernung des Hydroxylamins dokumentiert.

#### 4.1.2 Präparation von Tritium-markiertem Palmitoyl-CoA als Fettsäuresubstrat

Um die Fettsäure nach Inkubation im PAT-Assay detektieren und quantifizieren zu können, wurde Tritium-Palmitoyl-Co-Enzym A ( $[^3\text{H}]\text{-Pal-CoA}$ ) verwendet. Dieses wurde enzymatisch mittels Acyl-CoA-Synthetase aus  $[^3\text{H}]\text{-Palmitinsäure}$  und Co-Enzym A hergestellt. Die Präparation wurde mit Dünnschichtchromatographie (DC) und nachfolgender Fluorographie auf ihre Reinheit untersucht (**Abb. 4.2**). Die durch Auswaschungen mit PD-10 Puffer erhaltenen Fraktionen (**Spuren 3-10**) zeigen eine hohe Konzentration an  $[^3\text{H}]\text{-Pal-CoA}$ .



**Abbildung 4.2: Analyse der  $[^3\text{H}]$ -Palmitoyl-CoA Präparation mit Hilfe von Dünnschicht-Chromatographie (TLC) und Fluorographie:** Die verschiedenen Proben aus der Präparation der  $[^3\text{H}]$ -Palmitoyl-CoA wurden zu routinemäßigen Kontrollen auf eine Platte zur Dünnschichtchromatographie aufgetragen. Als Standards wurden  $[^3\text{H}]$ -Palmitinsäure (Sigma; **Spur 14**) und  $[^3\text{H}]$ -Pal-CoA (bezogen von American Radiolabeled Chemicals, ARC) verwendet (**Spuren 12 und 13**).  $[^3\text{H}]$ -Pal-CoA (ARC) zeigt, ohne TNE-Verdünnung aufgetragen (**Spur 12**) einen großen Teil an freier Palmitinsäure, sowie andere Verunreinigungen. In der Verdünnung 1:10 mit TNE (**Spur 13**) können sie nicht mehr dargestellt werden.

Den höchsten Anteil an  $[^3\text{H}]$ -Pal-CoA weisen die Proben der ersten beiden Auswaschungen mit PD-10 Puffer A1-A3 (**Spuren 3-5**) und B1-B3 (**Spuren 6-8**) auf. Sie zeigen geringe Verunreinigungen, aber keinen Anteil an nicht aktivierter (nicht Co-Enzym A gebundener) Fettsäure. Die  $[^3\text{H}]$ -Pal-CoA Substrate der Präparation (**Spur 1**) und der PD-10 Waschungen (**Spuren 2-11**) wurden zur Standardisierung vereinigt und zur Verwendung in den PAT-Assays portioniert.

#### 4.2 Anreicherung spezifischer PAT-Aktivität

Viel Bedeutung in der Erforschung der Proteinacylierung kommt der Aufklärung der Enzymatik zu. Hier ist es ein wichtiger Schritt, ein Protein mit PAT-Enzymaktivität zu isolieren. Zu den Möglichkeiten der Anreicherung gehören die Präparation von enzymhaltigen Membranen aus dem Gewebe, die Extraktion des Membranproteins aus den Membranen und Versuche der chromatographischen Anreicherung. Da das Ausgangsmaterial,

humane Plazenta, biologisches Material mit individuellen Eigenschaften ist, wurden auch bei genauer Einhaltung desselben Versuchsprotokolls leicht varierende Ergebnisse erzielt. Ein typischer Verlauf wird hier dokumentiert.

#### 4.2.1 Anreicherung der PAT-Aktivität in Mikrosomen

Probe	Gesamtprotein <sup>a</sup>	Anteil am Gesamtprotein <sup>b</sup>	Spezifische PAT-Aktivität <sup>c</sup>	Relat. spezif. PAT-Aktivität <sup>d</sup>	Anreicherungs-faktor <sup>e</sup>
[Einheit]	[mg]	[%]	[dens.area/mg]	[%]	vielfaches
Homogenat	20000	100%	3,38	100,00%	1
SN15	12480	62%	6,69	197,86%	3
SN15*	1350	7%	2,67	78,90%	12
SN25	13520	68%	46,12	1364,59%	20
SN100	12350	62%	51,54	1524,81%	25
P100	952	5%	25,79	763,10%	160
P190	972	5%	20,64	610,65%	151
Mikrosomen	810	4%	34,23	1012,82%	225

**Proben:** siehe **Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Mikrosomenpräparation

<sup>a</sup>**Gesamtprotein:** Wurde aus Volumen und Proteinkonzentration errechnet:

Vol. x [Proteinkonz.]. Vol. wurde gemessen, die Proteinkonzentration nach der Lowry-Methode (Bio-Rad) bestimmt. BSA diente als Standard.

<sup>b</sup>**Anteil am Gesamtprotein:**  $\frac{\text{Gesamtprotein der Fraktion}}{\text{Gesamtprotein des Ausgangshomogenats}}$

<sup>c</sup>**Spezifische PAT-Aktivität:**  $\frac{\text{Markierung des Akzeptorproteins}}{\text{Gesamtprotein}}$

Die Palmitoylierung des Akzeptorproteins (E1 aus SFV) wurde nach PAT-Assay, wie im Methodenteil beschrieben, durch Analyse der Fluorographie mittels computergestützter Densitometrie ermittelt und dem Gesamtprotein der getesteten Probe gegenübergestellt:

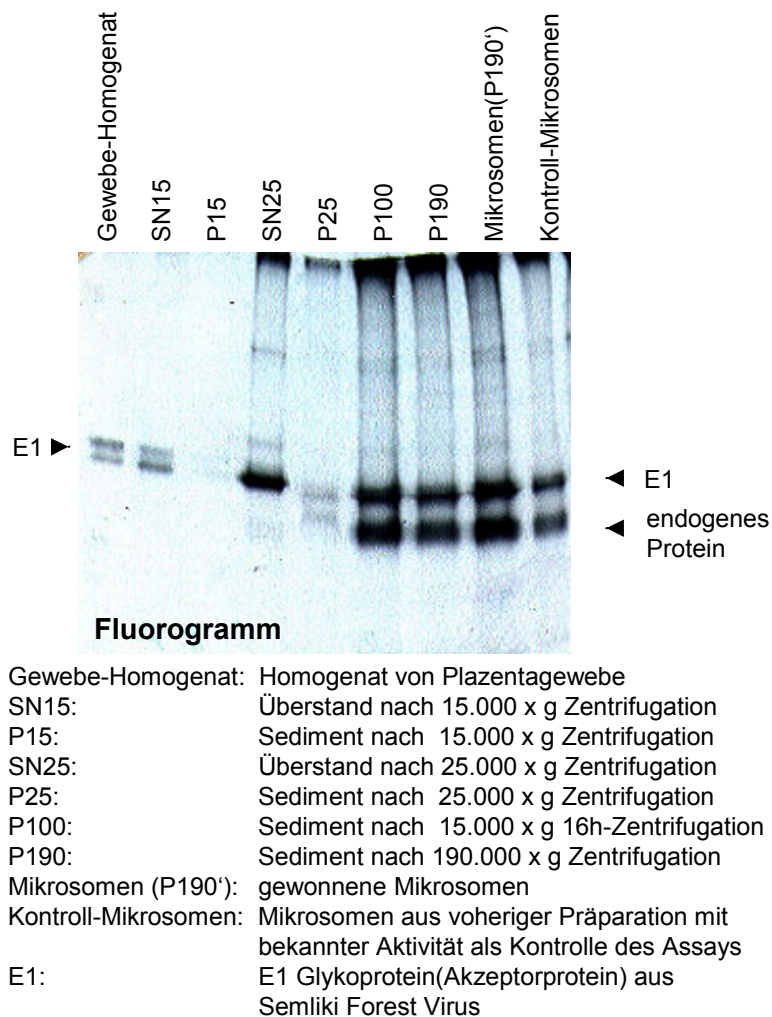
<sup>d</sup>**Relative spezifische PAT-Aktivität:**  $\frac{\text{Spezifische PAT-Aktivität}}{\text{PAT-Aktivität des Homogenats}} \times 100$ .

<sup>e</sup>**Anreicherungs-faktor:**  $\frac{\text{Relative spezifische PAT-Aktivität}}{\text{Anteil am Gesamtprotein}} \left[ \frac{\%}{\%} \right]$

**Tabelle 4.1: Anreicherung der relativen spezifischen PAT-Aktivität um das 225fache in Mikrosomen.**

Durch die Präparation von Mikrosomen aus dem Plazentagewebe konnte eine Anreicherung um das ca. 225fache erzielt werden. Hierzu dienten Zentrifugationsschritte und verschieden grobe und feine Zellaufschluß- und Homogenisierungsmethoden, wie sie in der Literatur beschrieben sind (Schmidt und Burns, 1989). Mit einem Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry, 1951) wurde der Proteingehalt in Zwischenprodukten und in den Mikrosomen bestimmt. **Abbildung 4.3** zeigt den Vergleich der biologischen Aktivität der einzelnen Fraktionen in der Palmitoylierung von E1 Glykoprotein (SFV) in der Fluorographie

nach PAT-Assay und SDS-PAGE. Die Enzymaktivität wurde durch Densitometrie der Fluorographie aus dem Einbau von [<sup>3</sup>H]-Palmitinsäure in E1-Glykoprotein bestimmt. In **Tabelle 4.1** wurde die so ermittelte PAT-Aktivität der jeweiligen Proteinkonzentration gegenübergestellt, und so die relative, spezifische Enzymaktivität sowie der Anreicherungs-faktor errechnet.



**Abbildung 4.3: Anreicherung von PAT-Aktivität in der Mikrosomenpräparation.**

Verschiedene Zwischenprodukte der Mikrosomenpräparation aus humaner Plazenta im PAT-Assay mit E1(SFV). Gezeigt ist die Fluorographie (Expositionszeit: 4 d) der SDS-PAGE-Analyse, in welcher sich [<sup>3</sup>H]-Palmitoyl, das an Proteine gebunden ist, als Schwärzung darstellt. Im Assay waren Fraktionen mit gleichem Gesamtproteingehalt eingesetzt. Nach den Zentrifugationen mit 15.000 und 25.000 x g findet sich die an die mikrosomalen Membranen gebundene Aktivität im Überstand (**SN15**, **SN25**). Ab der Zentrifugation mit 100.000 x g sind diese Membranen mit der PAT-Aktivität im Sediment (**P100**, **P190**, **Mikrosomen**). Ab der Fraktion P25 (stärker ab P100) tritt ein palmitoylierbares endogenes Protein (ca. 45kDa) auf.

#### 4.2.2 Lokalisierung der PAT in den Mikrosomen mittels Trypsinverdau

PAT-Aktivität in Mikrosomen kann durch Zugabe der Protease Trypsin bei 1% Triton-X100-Konzentration inhibiert werden (Dunphy *et al.*, 1996). Dies stellt einen weiteren Hinweis darauf dar, daß die Aktivität an ein Enzymprotein gebunden ist. Der Leitgedanke dieses Lokalisationsversuchs ist, daß das Enzym mit PAT-Aktivität in Mikrosomen Trypsin zugänglich sein muß, um durch die proteolytische Wirkung inhibiert zu werden. Da sich die Membranbruchstücke in den Mikrosomen zu blasenähnlichen Strukturen aus Doppel-lipidmembranen anordnen, können hier nur die in den nach außen gewandten Membrananteile gelegenen Proteine von dem hydrophilen Trypsin erreicht werden. Die Membranen richten sich in den Mikrosomen mit der cytosolischen Seite nach außen und der luminalen Seite nach innen aus.

Unter der Zugabe von Detergens wie dem nicht-ionischen Triton X-100 zu 1% werden die Mikrosomenstrukturen aufgebrochen. Ihre geschlossene Blasen- oder Tropfenform wird der Protease so auch von der Innenseite aus zugänglich.

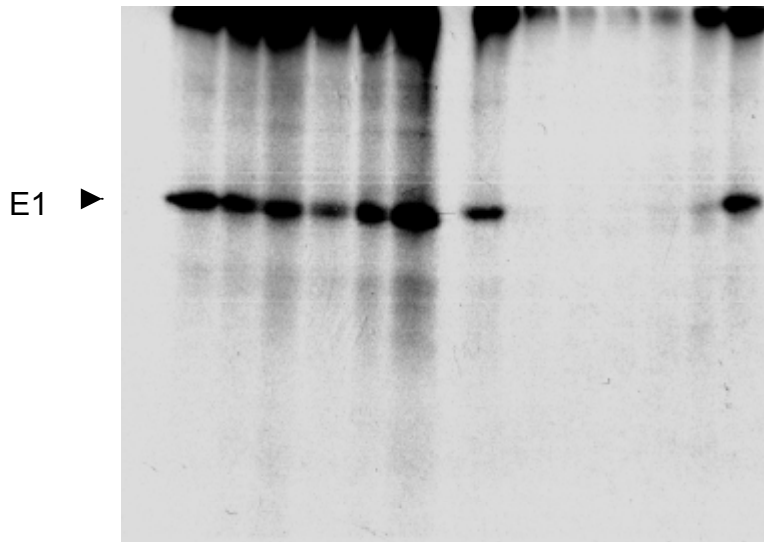
In dem in **Abb. 4.4** dokumentierten Versuch zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Inaktivierung der PAT-Aktivität durch Trypsin zwischen den Proben mit (**Spuren 9-13**) und ohne (**Spuren 2-7**) TX-100. Die Inaktivierung der PAT-Aktivität ist der Wirkung des Trypsins zuzuschreiben, denn unter Anwesenheit des Proteaseninhibitors Aprotinin kommt es nicht zum Verlust der PAT-Aktivität der Membranen (**Spur 8 u. 14**).

## 4 Ergebnisse

<b>Vorbehandlung</b>	1	2	3	4	5*	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Trypsin [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	-	-	10	2,5	1	0,25	0,1	10	10	2,5	1	0,25	0,1	10
Aprotinin [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	20
TX-100 [%]	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1

<b>Assay (TX-100: 0,07%)</b>	1	2	3	4	5*	6	7	/	8	9	10	11	12	13	14
Mikrosomen	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+



**Abbildung 4.4: Das PAT-Enzym ist in den Mikrosomen teilweise vor der Protease Trypsin geschützt. Nach Auflösen der Mikrosomen mit Detergens TX-100 wird PAT durch Trypsin inaktiviert.** Gezeigt ist eine Fluorographie einer SDS-PAGE zur Proteinanalyse nach PAT-Assay. Schwärzungen zeigen  $^3\text{H}$ -Markierung an. Unterschiedliche Vorbehandlungen wurden verglichen.

**Spur 1** zeigt einen Assay ohne Mikrosomenzusatz als Negativkontrolle. Hier ist kein  $^3\text{H}$ -Pal-Einbau zu erkennen, während in der Positivkontrolle (**Spur 2**) eine deutliche Palmitoylierung zu sehen ist. Die **Spuren 3-8** zeigen verschiedene Trypsin-Verdau-Ansätze ohne Detergenszusatz, wohingegen während des Trypsinverdaus in den Ansätzen der **Spuren 9-14** 1% TX-100 die Mikrosomen auflöst. In den **Spuren 8 und 14** ist die proteolytische Wirkung des Trypsins mittels Aprotinin antagonisiert. Je stärker die Schwärzung des E1-Proteins in der Fluorographie, je stärker also die Palmitoylierung, desto weniger Protein mit PAT-Aktivität wird von Trypsin gespalten und inaktiviert.

Die Trypsinbehandlung der Mikrosomen ohne Detergens inhibiert die PAT-Aktivität kaum. Besonders starke Palmitoylierung ist bei geringen Trypsin-Konzentrationen (**Spuren 6 u. 7**) zu sehen. Bei Solubilisierung der Mikrosomen mit 1% TX-100 kommt es zur fast vollständigen Inhibierung der PAT-Aktivität. In den Ansätzen mit geringen Trypsin-Konzentrationen (**Spuren 12 u. 13**) ist die Palmitoylierung nicht ganz erloschen. Aprotinin verhindert den Verdau der PAT durch Trypsin (**Spuren 8 u. 14**).

\* **Spur 5:** Das schwache Signal ist vermutlich ein Artefakt.

### 4.2.3 Anreicherung der PAT-Aktivität durch Membranextraktion

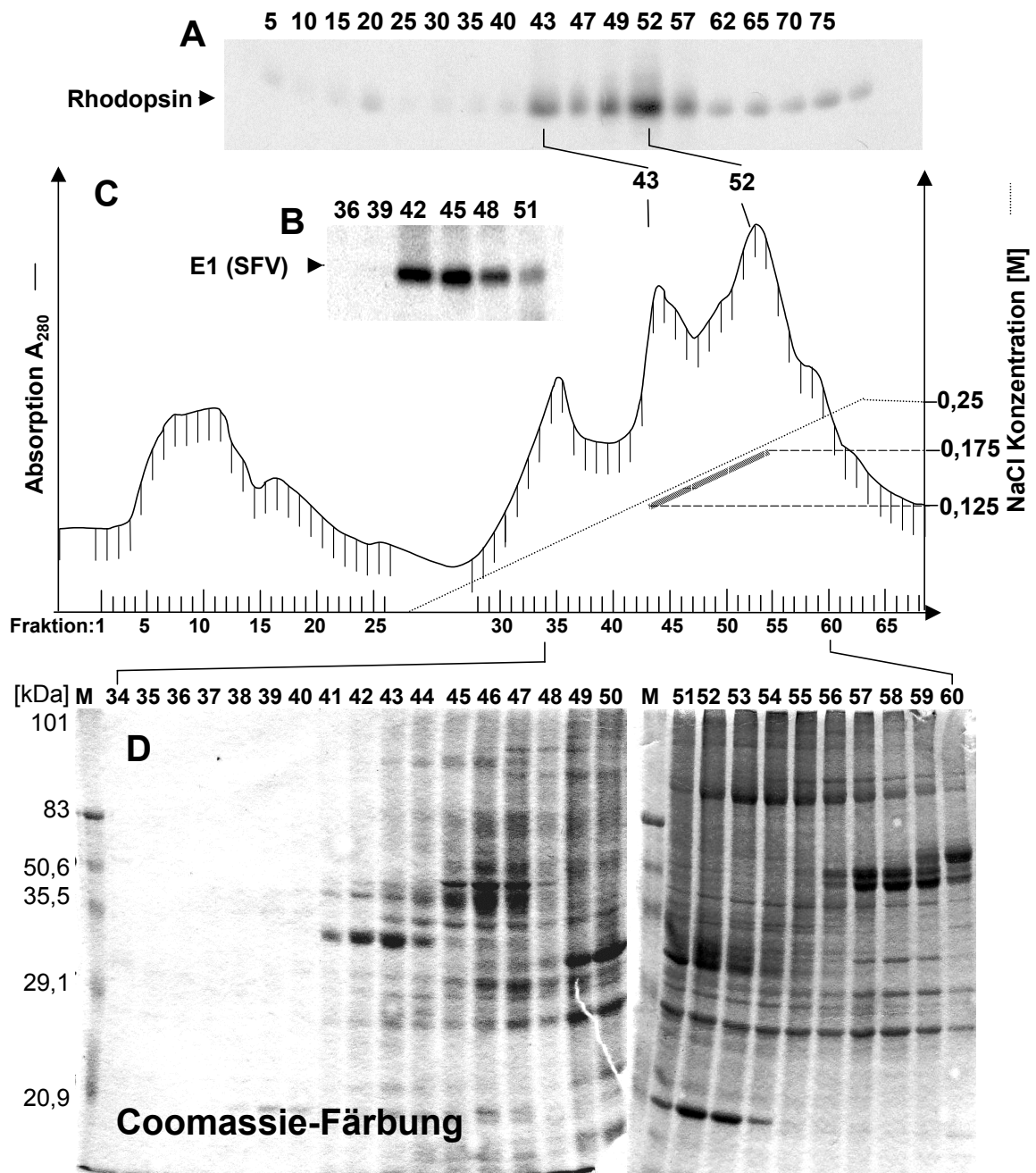
Die Solubilisierung der PAT-Aktivität aus den Membranen wurde von Schmidt und Burns (1989) systematisch untersucht und das nicht-ionische Detergens Triton X-100 als Solubilisierungsdetergens der Wahl eruiert. Nach einer einstündigen Inkubation in 1% TX-100 und anschließender Ultrazentrifugation befindet sich die PAT-Aktivität im Überstand. Diese Methode zur Solubilisierung wurde von uns mit gleichem Ergebnis (nicht dokumentiert) verwendet, um die Palmitoylacyltransferase aus den Mikrosomen der weiteren Aufreinigung mit Hilfe der Chromatographie zuzuführen.

### 4.2.4 Anreicherung der PAT-Aktivität durch Säulenchromatographie

#### 4.2.4.1 DEAE-Sepharose

Wie in **Abb. 4.5 (A, B u. C)** zu erkennen ist, läßt sich die PAT-Aktivität bei einer Salzkonzentration von 100 mM bis 130 mM NaCl von der Matrix der „DEAE-Sepharose *fast flow*“ (Pharmacia Biotech, Freiburg), bei pH 8,0 eluieren. Die Absorption bei 280 nm ( $A_{280}$ ; **Abb. 4.5 C**) zeigt, daß bei dieser NaCl-Konzentration ein Großteil der Proteine eluiert worden ist, so daß die PAT-Aktivität nicht einem einzelnen Elutionsgipfel zuzuordnen ist. In vergleichenden Enzymtests auf PAT-Aktivität mit Rhodopsin (**A**) und Glykoprotein E1 (SFV) (**B**) als Akzeptor zeigt sich, daß die biologische Aktivität für Palmitoyl-Bindung an beide Akzeptorproteine ungefähr im gleichen Bereich zu finden ist. **Abb. 4.5 D** gibt die Proteinauftrennung wieder, die mit der DEAE-Chromatographie erzielt wurde. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden jeweils in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit *Coomassie*-Färbung zur Darstellung gebracht.

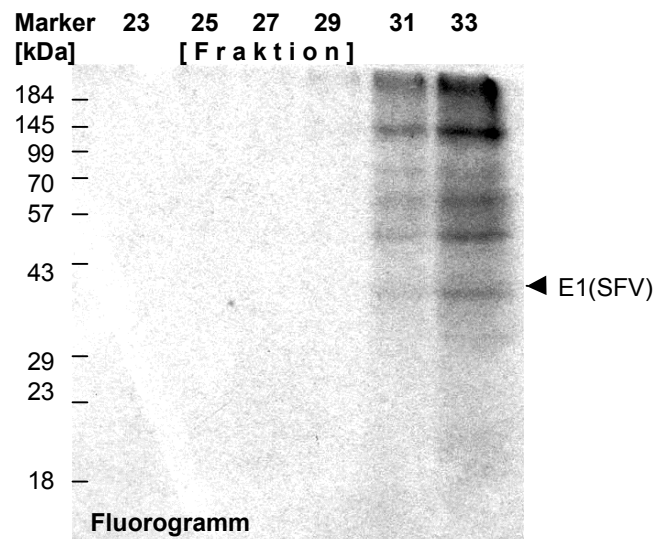




**Abbildung 4.5:** Anreicherung der Enzymaktivität durch Säulenchromatographie. Triton-X100-extrahierte PAT-Aktivität aus Mikrosomen wurde der Chromatographie mit DEAE-Sephrose unterzogen. PAT-Aktivität konnte bei einer Konzentration von 125-175 mmol NaCl eluiert werden: **A** Fluorographie PAT-Assay der Fraktionen mit Rhodopsin. **Fraktionen 43 bis 57** zeigen PAT-Aktivität **B** Fluorographie des PAT-Assays mit E1(SFV), in welchem die **Fraktionen 42 bis 48** PAT-Aktivität zeigen. **C** Proteingehalt der Fraktionen durch Absorption ( $A_{280}$ ) gemessen und gegen die Salzkonzentration (NaCl) und Fraktionen aufgetragen, der markierte Bereich (125-175 mmol) zeigt den Bereich, in dem PAT-Aktivität eluiert werden konnte. **D** Proteinauftrennung in Coomassie-Färbung der 12% SDS-Page.

#### 4.2.4.2 Blue-Sepharose Chromatographie

Eine weitere Auftrennung der Proteine erfolgte, indem DEAE-Fractionen mit PAT-Aktivität (Fraktionen 42-48 in **Abb. 4.5**) auf eine Chromatographie-Säule mit „Blue-Sepharose“-Matrix geladen wurden. Eluiert wurde mit einem stufenlosen Gradienten von 0 mM bis 2 mM Cibachrom-Blue über 40 ml. **Abb. 4.6** zeigt PAT-Aktivität in den Fraktionen 31 bis 33, die bei einer Cibachrom-Blue-Konzentration von ca. 1,1 bis 1,2 mM eluieren. Aufgrund der Färbung mit Cibachrom-Blue kann hier keine Absorption bei 280 nm zur Bestimmung des Proteingehaltes gemessen werden. Die PAT-Aktivität in diesen Fraktionen ist sehr labil und hält sich nur wenige Stunden unter Kühlung (4°C). Nach Einfrieren (-20°C, -80°C) und Tauen (+4°C) ließ sich keine PAT-Aktivität mehr nachweisen, so daß keine weiteren Auftrennungsschritte unternommen werden konnten.



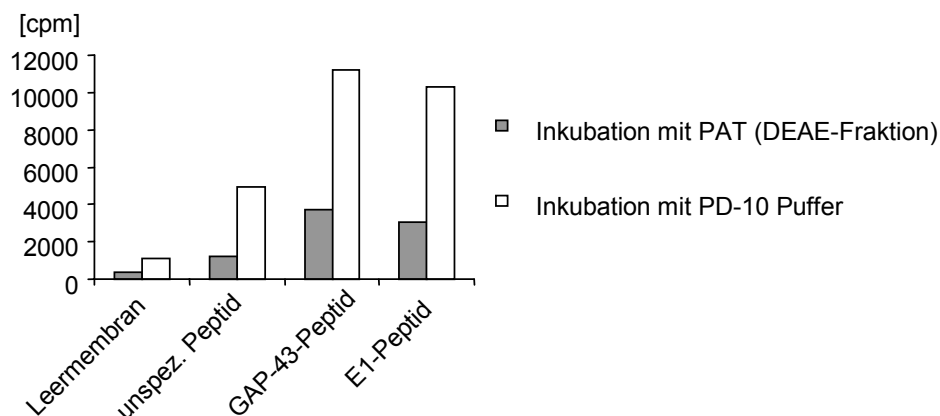
**Abbildung 4.6: PAT-Aktivität konnte in der Chromatographie mit Blue-Sepharose bei einer Cibachrom-Blue-Konzentration von 1,1-1,2 mMol eluiert werden.** Gezeigt wird die Fluorographie der 12% SDS-PAGE-Analyse nach Testen der Fraktionen im PAT-Assay mit E1(SFV). Neben dem E1-Protein sind noch weitere palmitoylierte Proteine tritiummarkiert. Die Fraktionen 31 und 33 zeigen Aktivität im PAT-Assay.

### 4.3 Entwicklung alternativer Enzymtests

#### 4.3.1 PAT-Assay mit membrangebundenen synthetischen Peptiden

Um einen vereinfachten Enzymnachweis zu etablieren, bei dem an Zellulosemembranen gebundene Peptidstrukturen als Akzeptoren bei der PAT-vermittelten Palmitoylübertragung verwendet werden, wurde eine Versuchsreihe mit einem modifizierten PAT-Assay durchgeführt. Dabei wurden Peptide, die die Palmitoylierungsstelle der Proteine GAP-43 und

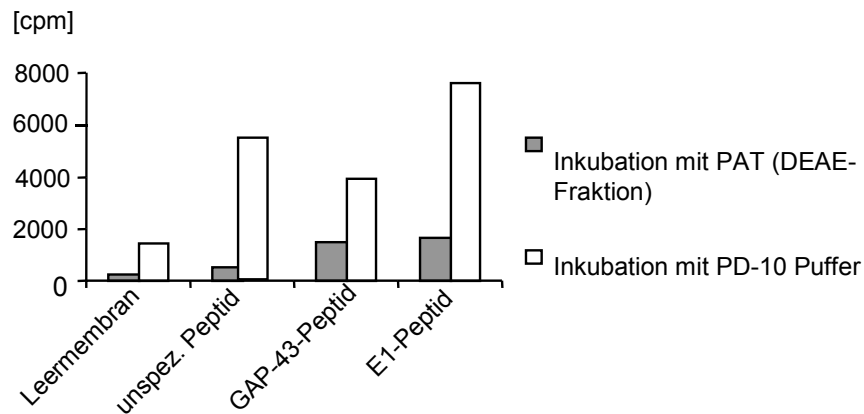
E1(SFV) wiedergeben, benutzt und unspezifischen Peptidstrukturen sowie Membranen ohne Peptid gegenübergestellt. Die Übertragung der Fettsäureketten auf die Peptidstrukturen wurde gemessen, indem nach der Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]-Pal-CoA die Einlagerung von Tritium durch Szintilationsmessung detektiert wurde. Es zeigte sich, daß es zu einer starken unspezifischen Anlagerung von [ $^3\text{H}$ ]-Palmitinsäure kommt. Diese konnte in fünf Waschschrinen mit 100% Methanol und darauf folgenden fünf Waschschrinen mit PD-10 Puffer reduziert werden, während kovalent gebundenes Palmitoyl-CoA an den Peptiden sich nicht weiter reduzieren ließ und über die Tritiummarkierung nachzuweisen war. Der Einbau an den Membranen, die Peptide mit den Aminosäuresequenzen des Glykoproteins E1(SFV) und GAP-43 trugen, war deutlich stärker als bei unspezifischen Peptiden und Leermembranen. Allerdings wurde bei sonst gleichen Bedingungen ohne Zugabe einer Enzymquelle (d.h. ohne Zugabe angereicherter PAT in DEAE-Fraktionen) ein stärkerer Einbau ermittelt als unter Enzymzugabe (**Abb. 4.7**).



**Abbildung 4.7:** [ $^3\text{H}$ ]-Palmitinsäure wird im PAT-Assay deutlich stärker in E1- und Gap-43-Peptiden eingebaut als in unspezifischen Peptiden und Leermembran. Die graphische Darstellung zeigt die Radioaktivität (als Zählimpulse pro Minute: cpm) der unterschiedlichen Zellulosemembranen nach den Inkubationen im PAT-Assay. Gegenüber der Leermembran, bei welcher sich nur eine geringe Radioaktivität messen läßt, ist in den mit Peptiden beladenen Membranen deutlich mehr Radioaktivität eingebaut, auch unterscheiden sich die Peptide ohne spezifische Bindungsstelle für Palmitinsäure von den Peptiden, die die Bindungssequenzen der Proteine E1 von SFV (**E1-Peptid**) und GAP-43 (**GAP-43-Peptid**) wiedergeben. Diese weisen einen stärkeren Einbau auf. Zu beobachten ist zudem ein verstärkter Einbau im Ansatz ohne die Zugabe angereicherter Enzyms.

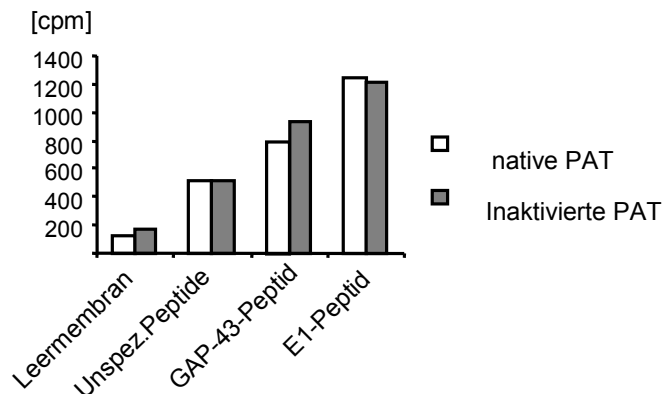
Der „radioaktive Hintergrund“ durch unspezifisch angelagerte, radioaktive Fettsäure konnte durch Vorinkubation mit nicht markierter Palmitinsäure niedriger gehalten werden (**Abb. 4.8**). Dabei stellte sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem PAT-Assay und den Kontrollversuchen ohne Enzym dar. Während im Enzymtest die unspezifischen Bindungen an

Leermembranen und unspezifische Peptide gegenüber dem Einbau von Radioaktivität in die Akzeptorproteine E1 und GAP-43 deutlich geringer waren, ließ sich in den Assays ohne Enzym keine Spezifität für den Einbau erkennen. Deutlich wurde dies auch bei einer Vorinkubation mit unmarkiertem Pal-CoA (nicht dokumentiert).



**Abbildung 4.8:** Durch Vorinkubation mit Palmitinsäure (nicht radioaktiv markiert) kann der Unterschied des spezifischen Einbaus von  $[^3\text{H}]$ -Pal-CoA unter Enzymzugabe bei den Peptiden GAP43 und E1 gegenüber der Leermembran und dem unspezifischen Peptid vergrößert werden. In dieser Graphik wird der Einbau von Radioaktivität (in Zählleinheiten pro Minute: cpm) der einzelnen Membranen verglichen. In dem Versuch wurde der eigentlichen Inkubation im Enzymtest eine Inkubation mit nicht markierter Fettsäure vorgeschaltet. Der Testreihe, in welcher angereichertes Enzym (DEAE-Fraktionen) verwendet wurde, wurde eine parallel durchgeführte Reihe ohne Enzym gegenübergestellt. Ohne Enzym kommt es zu einem stärkeren Einbau, und es zeigt sich keine Spezifität für die GAP-43- und E1-Peptide.

Um die Fettsäureübertragung als abhängig von einem biologisch aktiven Enzym (PAT) zu charakterisieren, wurden native und hitze-inaktivierte DEAE-Fraktionen einander gegenübergestellt. Zur Inaktivierung wurde von derselben DEAE-Fraktion, die als native Enzymquelle diente, ein Teil für 5 Minuten im Wasserbad einer Temperatur von  $60^\circ\text{C}$  ausgesetzt, so daß die Proteine denaturierten. Dadurch sollte ihre Enzymaktivität inhibiert werden. Der Test ergab, daß zwischen den Palmitoylierungs-Aktivitäten der beiden Fraktionen, nativ und inaktiviert, kein Unterschied besteht (**Abb. 4.9**). Der Einbau des Palmitinsäurederivats steigt allerdings von Leermembranen über unspezifische Peptide zu den Peptiden E1 und GAP-43 an. Dieses Ergebnis erwartet man für enzymatisch-spezifischen Einbau, der an bestimmte Proteinstrukturen gebunden ist.



**Abbildung 4.9: Kein Unterschied im PAT-Assay mit angereicherterem Enzym und hitze-inaktiviertem angereicherterem Enzym.** Zum Vergleich wurden Inkubationen der verschiedenen Membranen und Peptide mit nativem und inaktiviertem Enzym (60°C, 5 min) gegenübergestellt. Die Radioaktivität (in cpm) weist jeweils vergleichbare Werte auf. Der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Pal-CoA in die spezifischen Peptide E1 und GAP-43 liegt deutlich über dem der Leermembran und des unspezifischen Peptids.

#### 4.3.2 Rekombinantes Fusionsprotein GAP-43-GFP-His<sub>6</sub> aus *E.coli* Expression

Im Vergleich zur Präparation viraler Hüllproteine stellt die Reinigung rekombinanter Polypeptide aus *E.coli* Überexpression eine einfache und ökonomische Alternative der Gewinnung von Akzeptorproteinen dar. Auch kann man durch genetische Modifikation der Peptide noch weitere Fragen adressieren, die der Charakterisierung des Enzyms dienen. Hier sollte die Möglichkeit überprüft werden, ein rekombinantes, an Green Fluorescent Protein (GFP) gebundenes Fusionsprotein mit der bekannten Palmitoylierungsstelle des neuronalen Polypeptids GAP-43 im PAT-Assay einzusetzen.

##### 4.3.2.1 Expression und Reinigung von GAP-43-GFP-His<sub>6</sub> und GFP-His<sub>6</sub>

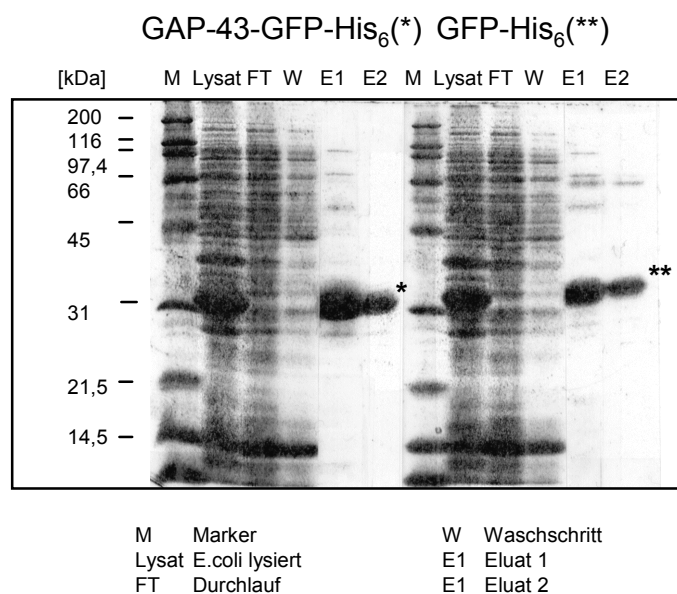
Die Proteine GAP-43-GFP-His<sub>6</sub> und GFP-His<sub>6</sub> wurden in *E.coli* (Stamm: ENS ams-; Iost und Dreyfus, 1994, 1995; Lopez *et. al*, 1994) innerhalb von 16 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur exprimiert. Unter diesen Bedingungen konnte eine hohe Expression der Proteine erreicht werden. Gemäß der elektrophoretischen Mobilität weisen die rekombinanten Proteine ein Molekulargewicht von ca. 32 kDa auf.

Nach Zellyse und Zentrifugation konnte ein Teil der GFP-Fusionsproteine im Überstand gefunden werden, was darauf hindeutet, daß sie in den Bakterienzellen in gelöster Form im Cytosol vorlagen. Der andere Teil des exprimierten rekombinanten Proteins fand sich nach der Zentrifugation mit den Membranbestandteilen der Zellen im Sediment. Dies läßt sich durch den bekannten Mechanismus erklären, daß Zellen überexprimierte Proteine in

Einschlußkörperchen (inclusion bodies) verpacken können, aus denen diese dann nicht mehr nativ zu reinigen sind.

Die Verteilung von cytosolisch gelösten und in Einschlußkörperchen verpackten GAP-43-GFP-His<sub>6</sub> Proteinen scheint abhängig von der Expressionstemperatur zu sein. Bei Raumtemperatur exprimiert fanden sich 60-70% der rekombinanten Proteine im Cytosol, während sich bei 37°C 60-70% nicht gewinnen ließen.

Die Reinigung der cytosolischen GFP-Fusionsproteine erfolgt über Metallchelate-Affinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-Chelat-Matrix (Ni<sup>2+</sup>-chelating-beads). Dabei ließen sich die Proteine zu hoher Reinheit aus dem Zellysat gewinnen. **Abbildung 4.10** zeigt die SDS-PAGE Analyse nach Expression und verschiedenen Reinigungsschritten.

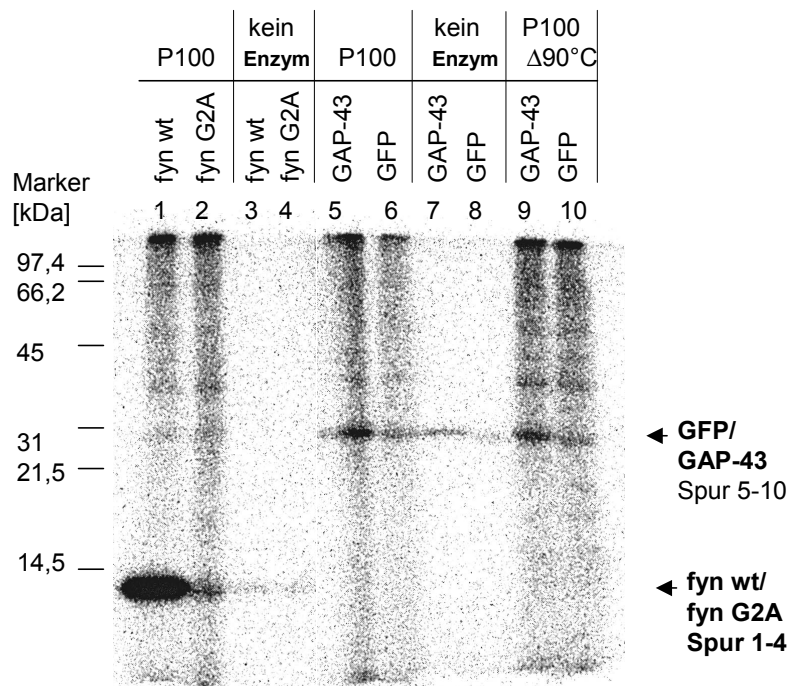


**Abbildung 4.10: Reinigung des rekombinanten GAP-43-GFP-His<sub>6</sub> und GFP-His<sub>6</sub>.** Gezeigt ist ein SDS-Gel (12%), Protein-Färbung mit *Coomassie-Brillant-Blue*. Die inklonierten Proteine werden von den Bakterien überexprimiert und lassen sich gut über die Affinitätschromatographie reinigen. Sie liegen im Lysat der Bakterienzellen als quantitativ größter Anteil an Proteinen vor, binden an die NTA-Matrix, so daß sie nicht im Durchlauf enthalten sind. Ohne starke Verunreinigung durch andere Proteine lassen sich die rekombinanten Proteine dann mit Imidazol eluieren.

### 4.3.2.2 PAT-Assay mit rekombinantem GAP-43-GFP-His<sub>6</sub>

GAP-43-GFP-His<sub>6</sub> und GFP-His<sub>6</sub> wurden als Akzeptorproteine im *in-vitro*-PAT-Assay eingesetzt. GFP-His<sub>6</sub> hat keine spezifische Palmitoylierungsstelle, deshalb diente es in den Assays zur Kontrolle, um unspezifische Fettsäureübertragung auszuschließen. Mit dem rekombinanten Protein GAP-43-GFP-His<sub>6</sub> konnte kein Test für den Nachweis einer Proteinacyltransferase etabliert werden. In den Assays wurde [<sup>125</sup>I]Iodo-Palmitoyl-CoA als Fettsäuresubstrat verwendet. Verschiedene Zellmembranen wurden auf Proteinacyltransferase-Aktivität, die GAP-43 palmitoyliert, untersucht. So wurden Gewebehomogenate und Mikrosomen aus Rattenhirn und -leber, Mäusehirn, Rinderhirn, sowie Membranfraktionen aus COS-7-Zellkulturen eingesetzt. Verschiedene Reaktionspuffer und Detergenskonzentrationen (Triton X-100) wurden getestet. Im Test unter Standardbedingungen (0,3% TX-100) konnte keine spezifische Enzymaktivität festgestellt werden (**Abb. 4.11, Spur 5 u. 6**).

Für rekombinantes GAP-43-GFP-His<sub>6</sub> konnte eine „Autopalmitoylierung“ festgestellt werden, die sich sowohl zeigte, wenn keine Enzymquelle hinzugegeben wurde (**Abb. 4.11, Spur 7**), als auch bei Zugabe von durch Hitze inaktivierter Enzymfraktion (**Abb. 4.11, Spur 9**). Das Peptid FynSH432His<sub>6</sub> wurde als positive Kontrolle im Assay mitgetestet und zeigte eine starke und spezifische Markierung nur unter Zugabe von Membranfraktionen als Enzymquelle (**Abb. 4.11, Spur 1-4**).



Enzymquelle (PAT): Plasmamembranenpräparation aus COS-7 Zellen

**Verwendete Fraktionen:**

P100: Sediment der 100.000 x g Zentrifugation = Plasmamembranen

P100  $\Delta 90^\circ\text{C}$ : P100 hitzeinaktiviert bei  $90^\circ\text{C}$  für 5 Minuten

**Akzeptorproteine:**

fyn wt: FynSH432His<sub>6</sub> trunkiertes p59<sup>fyn</sup> Wildtyp

fyn G2A: FynSH432His<sub>6</sub> trunkiertes p59<sup>fyn</sup> Mutante mit fehlender Myristoylierungsstelle (Negativkontrolle)

GAP-43: GAP-43-GFP-His<sub>6</sub> Fusionsprotein

GFP: GFP-His<sub>6</sub> = Green-Fluorescent-Protein (Negativkontrolle)

Puffer: 100 mM Imidazol pH 7, 0,3% Triton-X100

**Abbildung 4.11: Das Fusionsprotein GAP-43-GFP-His<sub>6</sub> wird nicht spezifisch durch PAT-Aktivität palmitoyliert und läßt sich nicht im Test als Reporter-Protein verwenden.** Die Signale, welche die Palmitoylierung anzeigen, sind für GAP-43 stärker als für GFP, jedoch zeigt sich kein deutlicher Unterschied zwischen den Inkubationen mit und ohne Enzymzusatz (**Spur 5** bzw. **Spur 7**) bzw. mit inaktiviertem Enzym (**Spur 9**). Somit konnte keine spezifische Enzymreaktion nachgewiesen werden.

Das Signal der Palmitoylierung des Kontroll-Proteins fyn wt zeigt sich als stärkstes, und unterscheidet sich sowohl im Vergleich mit dem veränderten Protein fyn G2A, als auch mit dem Ansatz ohne Enzymzusatz. Für fyn wt läßt sich demnach eine enzymatische bzw. P100-abhängige Fettsäureübertragung zeigen.

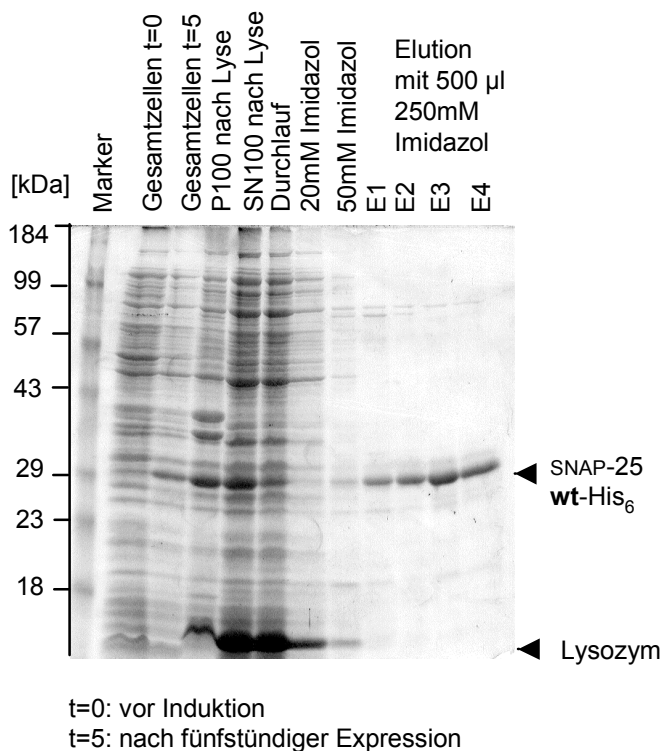


### 4.3.3 Rekombinantes SNAP-25

#### 4.3.3.1 Expression von SNAP-25 in *E. coli* und Reinigung des Proteins

SNAP-25-wt-His<sub>6</sub>, das dem Wildtyp SNAP-25 entspricht, und SNAP-25-del-His<sub>6</sub>, dem die Palmitoylierungsstelle fehlt, konnten in *E. coli* exprimiert werden. Kulturen transformierter *E. coli* zeigten nach Induktion mit IPTG und fünfständiger Inkubation im Schüttler bei 37°C in Proteinanalysen des Zellysats mittels SDS-PAGE ein zusätzliches Protein, das lysierte nicht-induzierte Zellen nicht aufweisen. Die Größe des Proteins ließ sich im Vergleich mit gleichzeitig aufgetrennten Markerproteinen auf ca. 28 kDa bestimmen. Dies entspricht der Größe von SNAP-25 von 25 kDa zuzüglich der Hexahistidinstruktur. Das Zellysate wurde in Zellmembranen und Cytosol getrennt. Etwa 50% des SNAP-25 Proteins war im Cytosol gelöst.

Dieses gelöste Protein ließ sich durch einen affinitätschromatographischen Schritt mit Ni<sup>2+</sup>-Chelat-Matrix über die sechs Histidinreste (His<sub>6</sub>-tag) von den übrigen Proteinen trennen und reinigen. Bei diesen Schritten wurden die Bedingungen so gehalten, daß das Protein während der Prozedur nicht denaturierte. **Abbildung 4.12** zeigt die aufgetrennten Proteine im Verlauf der Reinigung in Färbung nach *Coomassie*.



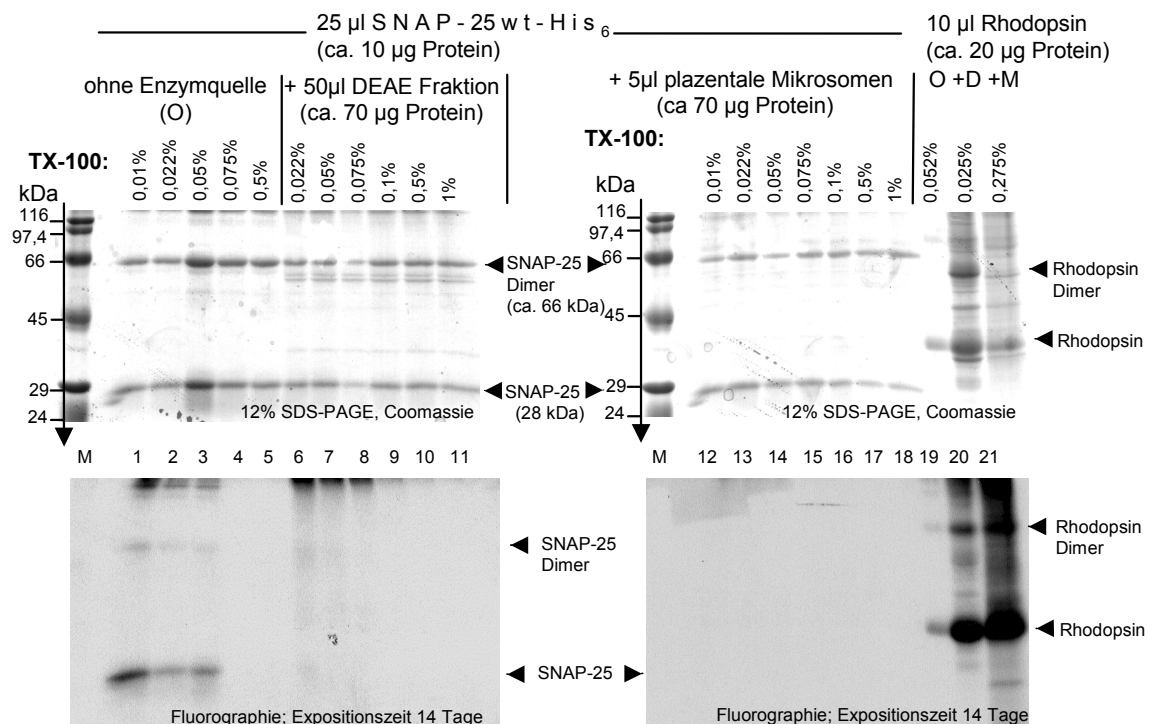
**Abbildung 4.12: Expression und Reinigung von SNAP-25-wt-His<sub>6</sub>.** Gezeigt ist die Proteinanalyse mittels 12% SDS-PAGE, Färbung mit *Coomassie-Brillant-Blue*. SNAP-25 wurde als Wildtyp (**wt**) mit

angehängter Hexahistidinstruktur in *E. coli* exprimiert. Die Reinigung erfolgte über Affinitätschromatographie wie im Methodenteil beschrieben.

#### 4.3.3.2 PAT-Assay mit SNAP-25

Das gereinigte SNAP-25 Protein sollte im *in-vitro*-PAT-Assay als Akzeptorprotein dienen. Der autokatalytische Einbau von [<sup>3</sup>H]-Pal-CoA in SNAP-25 wurde als sehr gering beschrieben (Duncan und Gilman, 1996), so daß mit einer im Vergleich deutlich stärkeren Übertragung unter Anwesenheit einer Enzymquelle ein aussagekräftiger Nachweis einer enzymatischen Reaktion erbracht wäre. Es wurden verschiedene Assay-Bedingungen getestet, wobei immer [<sup>3</sup>H]-Pal-CoA als Fettsäuresubstrat verwendet wurde. Für diese Assays zeigte sich, daß rekombinantes SNAP-25-His<sub>6</sub> nicht als Akzeptorprotein für ein palmitinsäureübertragendes PAT-Enzym fungiert. Vielmehr ließ sich eine schwache Autoacylierung erkennen, wenn keine Enzymquelle wie plazentale Mikrosomen oder daraus hergestellte detergentextrahierte und über DEAE-Sepharose chromatographisch angereicherte PAT hinzugegeben wurde. **Abbildung 4.13** zeigt lediglich eine schwache „Autopalmitoylierung“ von SNAP-25 bei Triton X-100-Konzentrationen von 0,01-0,05% (**Spur 1-3**). Bei höheren Detergens-Konzentrationen (**Spuren 4 u. 5**), sowie bei Zugabe von DEAE-angereicherter PAT (**Spuren 6-11**) oder plazentalen Mikrosomen (**Spuren 12-18**) ließ sich kein Einbau markierter Fettsäuren nachweisen. In den Kontrollansätzen mit Rhodopsin als Akzeptorprotein hingegen ist ein deutlicher Einbau erst in Anwesenheit von Mikrosomen (PAT) zu erkennen. In **Abb. 4.13 (Spuren 1-18)** ist in der SDS-PAGE eine zusätzliche Proteinbande bei ca. 66 kDa zu sehen. Es handelt sich um ein SNAP-25 Dimer, welches durch Disulfid-Brücken entsteht (Sadoul *et al.*, 1997). Die Proben der SNAP-25-Acylierung wurden in nicht-reduzierendem Probenpuffer der SDS-PAGE zugeführt, so daß Disulfid-Brücken nicht aufgebrochen wurden. Auch der wesentlich geringere [<sup>3</sup>H]-Palmitinsäure-Einbau in SNAP-25 Dimere (**Abb. 4.13**, Fluorogramm, **Spur 1-3, 6**) ist beschrieben (Veit, 2000).

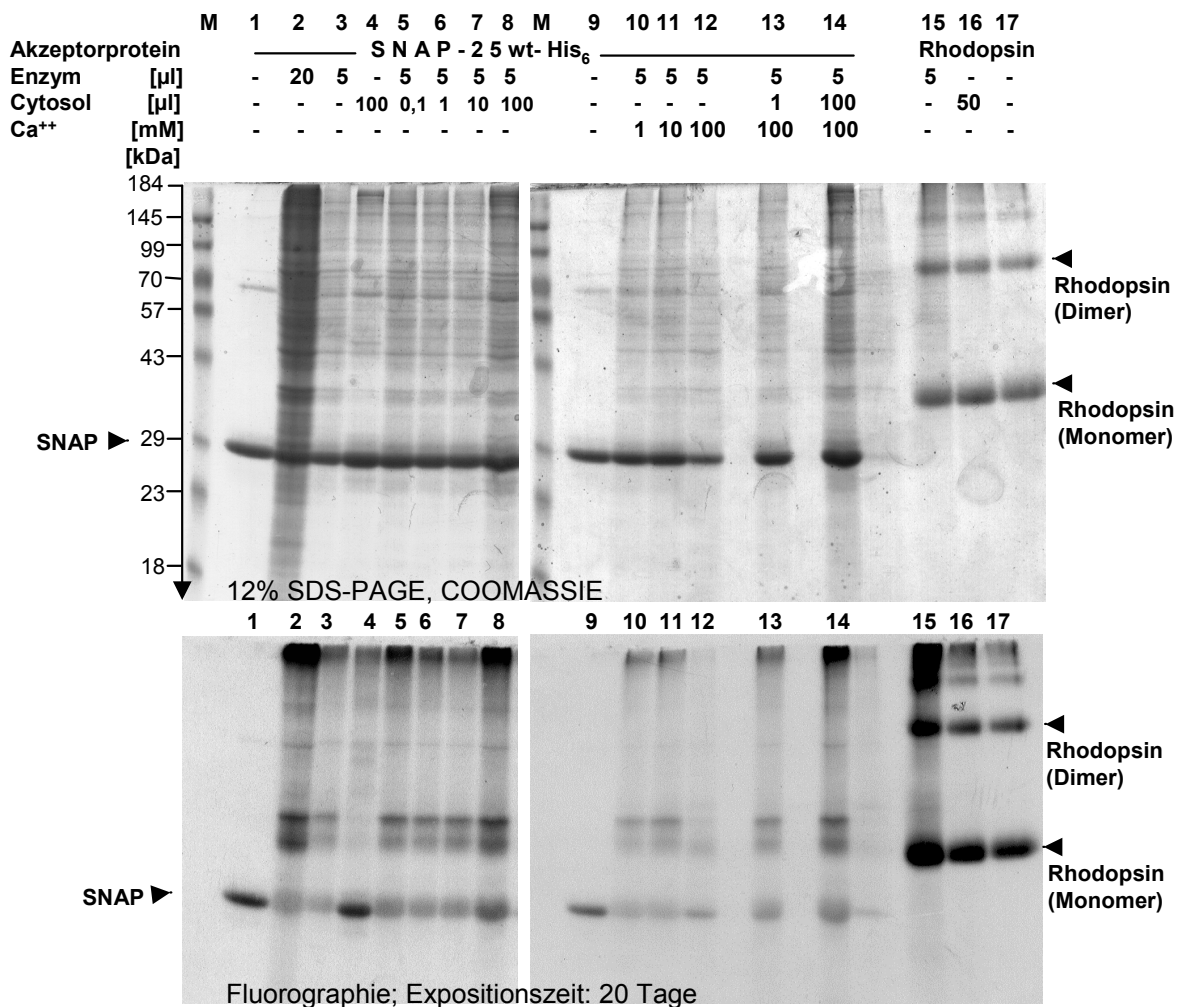
Da die *in-vivo*-Acylierung von SNAP-25 für Eukaryontenzellen CV1 beschrieben ist (Veit *et al.*, 1996), wurden auch Membranen (P100) und Cytosol (SN100) von CV1-Zellkulturen als Enzymquelle untersucht. Wie **Abb. 4.14** darstellt, bewirken diese Fraktionen aber ebenfalls keine Acylierung von SNAP-25 *in vitro*. Vielmehr hemmt die Anwesenheit von Enzymquellen (DEAE-angereicherter PAT) die Palmitoylierung von SNAP-25 im Vergleich zu Ansätzen ohne PAT-Zugabe (**Spuren 2, 3, 5-8, 10-14**). Cytosol zeigte in den Experimenten keinen Einfluß (**Spuren 4-8, 13, 14**). Der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Palmitinsäure in die SNAP-25 Proteine bleibt insgesamt hinter dem enzymatischen Fettsäuretransfer auf Rhodopsin stark zurück (Kontrollen, **Spur 15**).



**Abbildung 4.13:** Im PAT-Assay ließ sich keine enzymatische Palmitoylierung des rekombinanten Proteins SNAP-25wt-His<sub>6</sub> nachweisen. Gezeigt werden 12% SDS-PAGE Gele, nach Coomassie-Brillant-Blue-Färbung und Fluorographien derselben Gele nach Exposition von 14 Tagen. Folgende PAT-Assay-Inkubationen mit steigenden Triton X-100 Konzentrationen wurden untersucht: SNAP-25wt-His<sub>6</sub> als Fettsäureakzeptor ohne Enzymquellenzugabe (**Spuren 1-5**), mit DEAE-chromatographisch angereicherter PAT-Aktivität als Enzymquelle (**Spuren 6-11**), und plazentale Mikrosomen als PAT-Quelle (**Spuren 12-18**). In den **Spuren 19-21** sind Kontrollansätze mit Rhodopsin als Akzeptorprotein analysiert: Autoacylierung ohne Enzymquelle (**0**) (**Spur 19**), DEAE Fraktion (**+D**) (**Spur 20**) und plazentale Mikrosomen (**+M**) als PAT-Quelle (**Spur 21**). In der Fluorographie zeigen die Kontrollen einen deutlichen Unterschied im Fettsäureeinbau zwischen der Autoacylierung (**Spur 19**) und der enzymatischen Palmitoylierung (**Spuren 20, 21**). Die unterschiedlichen TX-100- und Protein-Konzentrationen sind durch die verschiedenen Enzymquellen in dem geringen Assay-Volumen bedingt.

Bei SNAP-25 findet sich nur im Ansatz ohne Enzymzugabe bei Detergens-Konzentrationen von 0,01-0,05% (**Spuren 1-3**) Palmitoylierung.

In der SDS-PAGE ist in den Spuren **1-18** eine zusätzliche Proteinbande zu sehen, welche ein über Disulfid-Brücken gebildetes Dimer von SNAP-25 darstellt, und welches in deutlich geringerem Maße Fettsäure einbaut (Fluorographie **Spur 1-3, 6**).



**Abbildung 4.14: Rekombinantes SNAP-25wt-His<sub>6</sub> zeigt keine enzymatische Palmitoylierung in Anwesenheit von Zellmembranen von CV1-Zellen.** SNAP-25wt-His<sub>6</sub> wurde im PAT-Assay mit CV1-Zellmembranen (P100) und verschiedenen Co-Faktoren eingesetzt: ohne Enzymzugabe (Spur 1 und 9), unter Zugabe von 20 µl (Spur 2) und 5 µl (Spur 3) Membranfraktion (P100) und unter alleiniger Zugabe von 100 µl Cytosol (SN100; Spur 4). In der Fluorographie dieser Gele zeigen sich Signale bei den Ansätzen ohne Enzymzugabe (Autoacylierung) und bei Anwesenheit von Cytosol. In den Ansätzen mit P100 im Assay ist kein Signal für die Palmitoylierung SNAP-25wt-His<sub>6</sub> (SNAP), aber Einbau in Proteine der CV1-Membrane lassen sich erkennen.

In den weiteren Ansätzen wurde getestet, ob für enzymatische Aktivität der SNAP-25 Palmitoylierung in der Membranfraktion Co-Faktoren aus dem Cytosol (Spuren 5-8) oder Ca<sup>++</sup> (Spuren 10-12) oder beides (Spuren 13 und 14) notwendig sind. Die Co-Faktoren sind in unterschiedlichen Konzentrationen den Assays zugesetzt. Keiner dieser Ansätze zeigt in der Fluorographie ein deutliches Signal für Fettsäureeinbau. Die Signale sind schwächer als die der Autoacylierung. Die Spuren 15-17 zeigen die Positivkontrollen des Assays mit Rhodopsin als Akzeptorprotein. Rhodopsin (20 µg Protein) wurde im Versuch mit Gesamtmembran (P100; Spur 15), mit Cytosolzugabe (Spur 16) und ohne Enzymzugabe eingesetzt. Der Unterschied zwischen Autoacylierung (Spur 17) und enzymatischer (Spur 15) ist in der Fluorographie trotz Überexposition noch deutlich zu erkennen. Die *in-vitro*-Palmitoylierung von SNAP-25 ist im Vergleich zu der des Rhodopsins insgesamt wesentlich geringer.

### 4.4 Subzelluläre Lokalisation der Palmitoyl-Acyltransferase, die myristoyliertes p59<sup>fyn</sup> palmitoyliert

#### 4.4.1 Trennung der Rattenleber in Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum und Plasmamembran angereicherte Fraktionen

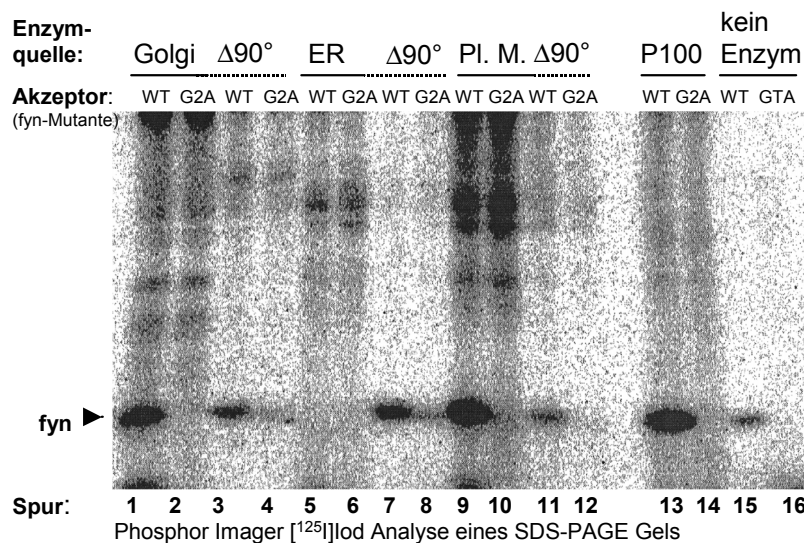
Mit Hilfe von verschiedenen Saccharosegradienten-Zentrifugationen (Croze und Morre, 1984) wurden zwei Rattenlebern homogenisiert und in drei Membranfraktionen aufgeteilt: Golgi-Apparat (Golgi), endoplasmatisches Retikulum (ER) und Plasmamembran (PM). In SDS-PAGE, *Coomassie-Brillant-Blue* gefärbt, konnte man erkennen, daß es sich um unterschiedliche Fraktionen handelte. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden nach der Bradford Methode bestimmt, als Voraussetzung für den Vergleich der Enzymaktivität.

#### 4.4.2 Testen der Fraktionen auf PAT-Aktivität

Zum Vergleich der PAT-Aktivität wurden in einem Enzymtest je 20 µg Protein der Fraktionen Golgi, ER und PM eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten parallel eingesetzte Proben gleichen Proteingehalts, die zuvor für 5 Minuten auf 90°C erhitzt worden waren. Zur Spezifitätskontrolle wurde als Akzeptorprotein neben FynSH432His<sub>6</sub>-wt (fyn-wt) auch das gezielt gentechnisch veränderte Protein FynSH32His<sub>6</sub>-G2A (fyn-G2A) verwendet. Die übertragene Fettsäure war [<sup>125</sup>I]Iodo-Palmitoyl-CoA, welche sich dann nach Exposition auf einem Phosphorscreen im Phosphorimager detektieren ließ.

Für die Fraktionen, in denen sich die Protein-Acyltransferase befindet, erwartet man radioaktiv markierte fyn-wt Proteine. Auf fyn-G2A-Proteine sollte keine Fettsäure übertragen werden, da die hierfür erforderliche Myristoylierung durch die Mutation der Myristoylierungsstelle verhindert wird. Erhitzte und denaturierte Enzymquellen sollten ebenfalls keine Palmitinsäure auf Proteine übertragen.

**Abbildung 4.15** zeigt anhand der Phosphorimageranalyse, daß sich in Golgi-Apparat (**Spur 1**) und Plasmamembran (**Spur 9**) PAT-Aktivität nachweisen läßt, während das endoplasmatische Retikulum keine Palmitoylierung bewirkt (**Spur 5**).



**Abbildung 4.15: Golgi- und Plasmamembran zeigen PAT-Aktivität, endoplasmatisches Retikulum nicht.** Subzelluläre Lokalisation der PAT im Assay mit trunkiertem fyn-Polypeptid FynSH432His<sub>6</sub> (2 µg Protein). Die Abbildung zeigt die verschiedenen Ansätze im PAT-Assay in der Phosphor-Imager [<sup>125</sup>I]-Iod Analyse nach Proteinauftrennung durch 12%ige SDS-PAGE.

Im PAT-Assay wurden alle drei Membranfraktionen (20 µg Protein) (**Golgi: Spuren 1-4; ER Spuren 5-8; PM 9-12**) viermal getestet, zweimal nativ und zweimal als denaturierte Proben ( $\Delta 90^\circ\text{C}$ ), in welchen jeweils einmal das Polypeptid FynSH432His<sub>6</sub>-wt (**fyn-wt; Spuren 1,3,5**), und einmal, um die Spezifität der Enzymaktivität zu zeigen, die unmyristoylierte Mutante FynSH432His<sub>6</sub>-2GA (**fyn-G2A; Spuren 2,4,6**) als Akzeptor eingesetzt wurden. Als Negativkontrolle dienten zwei Ansätze ohne Enzymquellenzugabe (**Spur 15,16**), welche nur geringe Autoacylierung (**Spur 15**) zeigten. Zwei Ansätze mit bekannter Aktivität (COS-Zellen Mikrosomen; Proteingehalt 20 µg) dienten parallel als positive Kontrolle des Assays (**Spuren 13, 14**) und zeigen ein starkes Signal der Palmitoylierung für fyn-wt (**Spur 13**) und kein Signal für fyn-G2A (**Spur 14**).

Starke Signale als Zeichen für Palmitoylierung zeigen die Assays mit Golgi (**Spur 1**) und Plasmamembran (**Spur 9**). Der Assay mit ER als Enzymquelle (**Spur 5**) zeigt keine Palmitoylierung des fyn-wt Polypeptids. Die durch Erhitzen denaturierten Membranen weisen auch eine geringe Markierung auf (**Spuren 3,7,11**), welche der Stärke nach der Autoacylierung der Negativkontrolle (**Spur 15**) entspricht.

#### 4.4.3 Membranassoziation von PAT in Golgi-Apparat und Plasmamembran

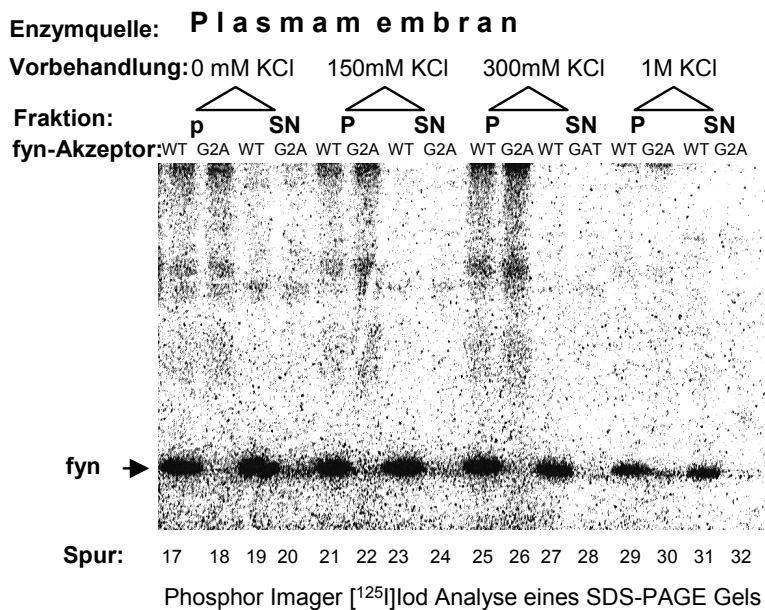
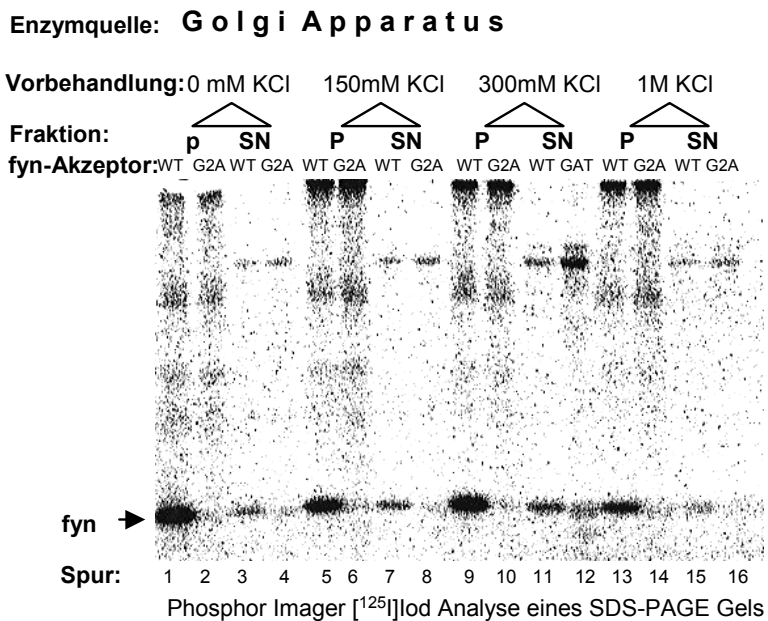
Um die Membranbindung des postulierten PAT-Enzymproteins näher zu charakterisieren, sollte getestet werden, ob sich mit niedrigmolaren Salzkonzentrationen (150 mM KCl und 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) enzymatische Aktivität extrahieren läßt. Dazu wurden Teilmengen der Fraktionen in einem Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4 , 250 mM Sucrose, 1 mM EDTA und 150 mM KCl) für 1 Stunde (vergleiche Liu *et al.*, 1996) und in einem zweiten Versuchsansatz in einem Puffer (10 mM Tris/HCl pH 11,0 250 mM Sucrose 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) für 30 Minuten (vergleiche Berthiaume und Resh, 1995) bei 4°C geschüttelt. Darauf folgte eine Auftrennung in Membranfraktion (Pellet, P) und lösliche Anteile (Überstand, SN) mittels Ultrazentrifugation (100.000 x g, 1 h). Im PAT-Assay wurden der Überstand und das in

entsprechendem Puffervolumen resuspendierte Sediment (membranassoziierte PAT) miteinander verglichen. Die Analyse des Assays zeigte, daß sich die PAT-Aktivität der Plasmamembran durch beide Extraktionsmethoden zur Hälfte in den Überstand solubilisieren ließ, während sich die PAT-Aktivität der Golgimembranen nur durch 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf Sediment und Überstand verteilte (keine Abbildung).

#### **4.4.4 Einfluß der Salzkonzentration auf die Extraktion von PAT-Aktivität aus den Membranen**

Die Beantwortung der Frage, ob bei der Extraktion der PAT-Aktivität die Konzentration des Salzes eine Rolle spielt, sollte weiteren Aufschluß über die Art der Membranbindung geben. Teilmengen der Golgi- und der Plasmamembran-Fractionen wurden auf 0 mM, 150 mM, 300 mM und 1 M KCl im Reaktionspuffer (100 mM Imidazol pH 7 und 0,3% Triton X-100) eingestellt. In diesen Salzkonzentrationen wurden die Proben für eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und dann durch eine Ultrazentrifugation (100.000 x g, 1 h) in Membranen (Pellet, P) und gelöste Anteile (Überstand, SN) getrennt. Im PAT-Assay wurden die verschieden behandelten Fraktionen auf PAT-Aktivität getestet.

Wie **Abbildung 4.16** zeigt, konnte bei keiner Salzkonzentration PAT-Aktivität aus den Golgimembranen solubilisiert werden (**Spuren 1, 5, 9, 13**), während aus den Plasmamembranen auch ohne Salzzugabe Aktivität durch Schüttelinkubation in den Überstand (**Spuren 19, 23, 27, 31**) zu extrahieren war. Hypothetisch läßt sich zu diesen Ergebnissen sagen, daß das mit den Plasmamembranen assoziierte PAT-Enzym unabhängig von Ionenladungen gebunden ist und mit der Zeit etwa durch enzymatische Spaltung von der Membran gelöst wird. Auch in den Golgimembranen ist die Verankerung des PAT-Proteins unabhängig von Ionenbindungskräften, aber im Gegensatz zur Verankerung in den Plasmamembranen stabiler und eventuell gegen proteolytische Degradation geschützt.



**Abbildung 4.16: Unterschiedliches Extraktionsverhalten der PAT-Aktivität in Golgi- und Plasmamembran bei Salzextraktion:** Die Abbildung zeigt die Phosphor-Imager [<sup>125</sup>I]-Iod- Detektion von 12%SDS-PAGE Gelen. Golgi- und Plasmamembran-Fractionen wurden bei verschiedenen Salzkonzentrationen für eine Stunde unter Schütteln inkubiert.

Nach einer Zentrifugation (100.000 x g; 1h) wurden die pelletierten Membranen (P) und der Überstand (SN) im Assay mit FynSH432His<sub>6</sub>-wt und FynSH432His<sub>6</sub>-G2A (Negativkontrolle) einander gegenübergestellt. Während sich aus den Golgi-Fractionen kaum Aktivität in den Überstand solubilisieren ließ, zeigt sich für die Plasmamembran eine etwa 50%ige Solubilisierung schon bei Schütteln ohne Salzzugabe (Vergleich **Spur 17** mit **19**).