

5. Diskussion

In-vitro-Test-Systeme für PAT-Aktivität

Zur Erforschung des Vorgangs, der Regulation und der Funktion der Acylierung als hydrophobe Proteinmodifikation sind *in-vitro*-Systeme ein wichtiges Werkzeug. Hier können gezielt verschiedene Substrate, Akzeptorproteine und Enzymquellen eingesetzt werden, um Dynamik, Wechselwirkungen und Funktionen vergleichend zu untersuchen (Bhatnagar und Gordon, 1997; Schmidt, 1989,1982). Wesentliche Bedeutung kommt der Klärung der Frage zu, ob Palmitoylierung ein enzymatischer oder chemischer Vorgang ist. Daher steht die Reinigung und biochemische Charakterisierung einer Protein-Acyltransferase oder Palmitoyltransferase (PAT) hier im Mittelpunkt (Berger u. Schmidt, 1984b; Dunphy *et al.*, 1981). Für die Enzymanreicherung und Reinigung sind Enzymnachweise, wie der *in-vitro*-PAT-Assay Voraussetzung. Insbesondere wäre ein schneller und gut reproduzierbarer Test von Vorteil, mit dem routinemäßig auch eine größere Zahl von Proben untersucht werden kann. **Tabelle 5.1** faßt die Ergebnisse der *in-vitro*-Enzymtests dieser Arbeit zusammen.

Akzeptor	Enzymquelle	Ergebnis
Synthetische Peptide an Zellulosemembran	Mikrosomen aus humaner Plazenta, und DEAE-Fractionen aus Mikrosomen	unspezifische Palmitoylierung, Autoacylierung
Protein aus E. coli – Expression: SNAP-25-His ₆		unspezifische Palmitoylierung, Autoacylierung
Fusionsprotein aus E. coli – Expression: GAP-43-GFP-His ₆		unspezifische Palmitoylierung, Autoacylierung
Trunkiertes Protein aus E.coli - Expression: FynSH432His ₆		<u>nur</u> spezifische, enzymatische* Palmitoylierung
Virale Proteine (E1 aus SFV)		<u>nur</u> spezifische, enzymatische* Palmitoylierung
Rhodopsin (aus Ochsenaugen)		Autoacylierung und enzymatische* Palmitoylierung

Tabelle 5.1: Ergebnisse der in-vitro-PAT-Assays mit verschiedenen Akzeptorproteinen

*Enzym bisher nicht nachgewiesen. Einstufung als enzymatisch aufgrund Kinetik und Charakterisierung der Übertragungsreaktion.

Weder mit synthetischen Peptiden noch mit rekombinanten Proteinen aus E. coli – Expression konnten neue Enzymtest für PAT entwickelt werden. Die Palmitoylierung des viralen Proteins E1 aus SFV sowie des trunkierten, myristoylierten p59^{fyn} zeigte sich als spezifisch

und von einer Enzymquelle abhängig (Berger und Schmidt, 1984b; Berthiaume und Resh, 1995). Rhodopsin zeigte zwei Acylierungswege: eine stärkere enzymatische Acylierung und Autoacylierung (Veit *et al.*, 1998; O'Brien und Zatz, 1984).

E1 aus SFV als Akzeptorprotein im in-vitro- Enzymtest

Die Verwendung der viralen Membranproteine E1 aus mit SFV infizierten Zellkulturen ist gut etabliert (Schmidt, 1989; Berger und Schmidt, 1984; Schmidt *et al.*, 1979). Wenn auch die Virushülle nur wenige verschiedene Proteine enthält und die Ausbeute bei der Isolierung recht hoch ist, so ist doch die Anzucht der Zellen und die Präparation des Glykoproteins arbeits- und kostenaufwendig. Man erhält außerdem nach den Methoden der Virusanzucht in BHK-Zellen zwar genuine E1 Proteine, diese sind jedoch in den Eukaryontenzellen schon palmitoyliert und somit für den Assay der enzymatischen Palmitinsäure-Übertragung unbehandelt nicht verwendbar. Die Deacylierung der Proteine mit Hydroxylamin stellt einen kritischen Punkt dar, da hier nicht überprüft werden kann, ob weitere, ungewollte Modifikationen am Protein stattfinden (Philipp *et al.*, 1995; Lambrecht und Schmidt MF, 1986). Die *in-vitro*-Palmitoylierung von E1 ist abhängig von der Anwesenheit einer Enzymquelle. Deren PAT-Aktivität läßt sich durch Hitze und durch proteolytische Behandlung mit Trypsin inhibieren.

Verwendung rekombinanter Proteine

Eine effiziente und kostengünstige Gewinnung von Proteinen stellt die Technik der Fremdexpression von rekombinanten Proteinen in Bakterien dar. Um solche Proteine von den bakterieneigenen Proteinen zu trennen, steht mittels einer inklonierten Hexahistidinsequenz mit der Affinitäts-Chromatographie eine effiziente Methode zur Verfügung. Ein weiterer Vorteil der Proteingewinnung aus *E.coli* Bakterien ist, daß sie in diesen Zellen nicht palmitoyliert werden und somit ohne weitere Behandlung im Test eingesetzt werden können. Für die vorliegende Arbeit wurden zwei Enzyme mit rekombinanten Proteinen untersucht: GAP-43-GFP-His₆ und SNAP-25.

Während andere Enzymtests mit rekombinanten Proteinen wie FynSH432His₆ durchaus erfolgreich zur Detektion von PAT-Aktivität eingesetzt wurden (Berthiaume und Resh, 1995), konnte mit den hier untersuchten rekombinanten Proteinen kein Testsystem etabliert werden. FynSH432His₆ stellt ein Polypeptid, ein trunkiertes p59^{fyn} mit zusätzlicher Hexahistidinsequenz dar. GAP-43-GFP-His₆ ist ein Fusionsprotein, wobei die Acylierungsstelle mit den zehn N-terminalen Aminosäuren über einen Abstandhalter an das mit einer Hexahistidinsequenz versehene GFP-Protein fusioniert ist. Im Fall von SNAP-25 wurde das gesamte Protein mit zusätzlicher Hexahistidinstruktur (His₆) in *E.coli* exprimiert.

Eventuell mögen Unterschiede in den Anforderungen dieser Polypeptide an die Protein-Synthesemaschinerie die Erklärung sein, weshalb GAP-43-GFP-His₆ und SNAP-25 nach Expression in Bakterien nicht im *in-vitro*-PAT-Assay palmitoyliert werden.

GAP-43 –GFP-His₆ rekombinantes Fusionsprotein

So könnte etwa die Tertiärstruktur des GAP-43 Proteins für die Palmitoylierung von Bedeutung sein, welche aufgrund der Verkürzung auf zehn Aminosäuren und der Expression in Bakterienzellen, einem Fremdsystem, von der in Eukaryontenzellen biosynthetisierten ursprünglichen Proteinform abweichen dürfte. Interessanterweise erreichen nämlich McCabe und Berthiaume (1999) palmitoylierungsabhängige Ergebnisse in *in-vivo*-Untersuchungen mit GAP-43-GFP. Diese zeigen Unterschiede in der Verteilung auf die zellulären Membranen bzw. Zellorganellen der neu synthetisierten Proteine GFP, GAP-43-GFP und dem nicht-palmitoyliertem GAP-43(C3,4S)-GFP (die Palmitoylierungsstellen Cystein 3 und 4 sind gegen Serin ausgetauscht) in COS-7 Zellen. Während sich das doppelt palmitoylierte Chimärenprotein GAP-43-GFP nach der Zellfraktionierung zu über 90% in der Membranfraktion befindet, sind GFP und die unpalmitoylierte Mutante zu über 90% im Cytoplasma gelöst. Die Proteine mit Palmitoylierungsstelle folgen also nach der Synthese einem anderen Verteilungsmuster als die, denen die Palmitoylierungsstelle fehlt. Im Unterschied zu myristoylierten und palmitoylierten Chimären, welche N-terminale Sequenzen verschiedener Tyrosinkinasen enthalten und subzellulär an Plasmamembranen und Endosomen lokalisiert sind, werden GAP-43-GFP-Proteine nicht an Endosomen, sondern an Golgi- und Plasmamembranen gelenkt. Bei diesen Versuchen wurden die Chimärenproteine jedoch in den Eukaryontenzellen COS-7, in unseren Experimenten dagegen in Bakterienzellen exprimiert. Das legt nahe, daß die Proteinsynthese in den Bakterienzellen den Anforderungen der Fremdproteine nicht gerecht wird, so daß letztere aufgrund von Strukturunterschieden nicht palmitoyliert werden können. Dies spricht für eine enzymatische Fettsäureübertragung, für die die korrekte Feinstruktur der Acylproteine essentiell ist.

Liu *et al.* (1994) fanden Hinweise darauf, daß die N-terminalen Aminosäuren 11-20 entscheidend für die Palmitoylierung des GAP-43-Proteins sind. Sie stellten verschiedene rekombinante Fusionsproteine aus GAP-43 und β -Galactosidase her. Die Anzahl der Aminosäuren des GAP-43-Protein-Aminoterminus, welcher an das Protein β -Galactosidase kloniert wurde, variierten. So wurden Chimärenproteine mit 10, 20 und 68 AS, sowie dem gesamten, 234 AS großen GAP-43-Protein miteinander verglichen. Untersucht wurde die subzelluläre Verteilung der Proteine, welche in COS-7-Zellen exprimiert wurden. Die Chimären mit 20 oder mehr Aminosäuren des GAP-43 N-Terminus, verteilten sich wie das Fusionsprotein mit der gesamten GAP-43-Struktur. Demgegenüber zeigten die Fusions-

proteine, welche nur die AS 1-10 des GAP-43-Proteins enthielten, ein für GAP-43 untypisches Verteilungsmuster, das dem des β -Galactosidase-Proteins entspricht.

Bei dem hier vorgestellten *in-vitro*-Test mit GAP-43-GFP-His₆ wurden nur die AS 1-11 des N-Terminus verwendet. Die AS-Positionen 12-18 wurden jedoch besetzt von den entsprechenden Aminosäuren der ebenfalls palmitoylierten PTK p59^{fyn}. Diese dienen als hydrophiles Verbindungsstück. Die Chimärenkonstruktion wurde auch von McCabe und Berthiaume (1999) in ihren *in-vivo*-Studien verwendet. Daraus ergibt sich die Frage, ob die AS 11-20 des GAP-43 für die Palmitoylierung Voraussetzung sind und ob sie - im Gegensatz zu den *in-vivo* Untersuchungen - bei *in-vitro*-Palmitoylierung der rekombinanten Fusionsproteine nicht ausreichend durch das hydrophile Verbindungsstück aus p59^{fyn} ersetzt werden.

Komplettes SNAP-25 als rekombinantes Protein in E.coli exprimiert

Unsere Ergebnisse mit SNAP-25-His₆ bestätigen die in der Literatur beschriebene schwache Autoacylierung (Duncan und Gilman, 1996). Unter Enzymanwesenheit zeigte sich keine verstärkte Palmitoylierung. Somit konnte kein Enzymtest mit SNAP-25-His₆ etabliert werden.

Dennoch ist SNAP-25 für die Untersuchung der Palmitoylierung ein sehr interessantes Protein. Die oben beschriebenen Ergebnisse gelten für das ungebundene SNAP-25 Protein. Bei der Bindung an Syntaxin kommt es jedoch zu einer Konformationsänderung (Fasshauer *et al.*, 1996). Wie weiterführende Untersuchungen zeigen (Veit, 2000), bindet es *in vitro* in diesem Komplex unabhängig vom Enzym etwa 100fach mehr Palmitat, einer Autoacylierung entsprechend. Für die *in-vivo*-Palmitoylierung hingegen ist die Bindung an Syntaxin keine Voraussetzung (Gonzalo *et al.*, 1999). Dies legt die Hypothese verschiedener Palmitoylierungswege nahe (Veit, 2000), zeigt aber auch, daß *in-vitro*-Systeme sorgfältig darauf geprüft werden müssen, ob sie die *in-vivo*-Verhältnisse wiedergeben.

Synthetische, membrangebundene Peptide als Akzeptoren

Die Ergebnisse unserer Enzymtests mit auf Zellulose immobilisierten, synthetischen Peptiden machen deutlich, daß dieser Test zur Identifikation von PAT-Aktivität nicht geeignet ist. Entscheidend für diese Beurteilung ist der Vergleich des Peptids mit dem ursprünglichen Protein, dessen Acylierungsstelle es wiedergibt, im Enzymtest.

Die Resultate, welche wir mit SPOT-Peptiden erzielen konnten, decken sich zwar weitestgehend mit anderen *in-vitro*-Palmitoylierungsuntersuchungen, die mit Peptiden durchgeführt wurden (Bañó *et al.*, 1998), geben aber nicht die mit den kompletten, natürlichen Proteinen erzielten Ergebnisse wieder.

Das Palmitoylierungsverhalten des gesamten E1-Proteins, aus der Virushülle des SFV präpariert und deacyliert, ist bereits gut bekannt (Schmidt und Burns, 1991). E1 wurde nur in Anwesenheit einer Enzymquelle (mikrosomale Membranfraktion aus Plazenta) palmitoyliert. Wurde die Enzymquelle durch Erhitzen für 5 Minuten auf 60°C inaktiviert oder mehreren Gefrier-Tau-Zyklen ausgesetzt, war die S-Acylierungsaktivität reduziert bzw. ganz aufgehoben.

Wir setzten bei unseren Versuchen SPOT-Peptide ein, welche zehn Aminosäuren des C-Terminus des E1-Glykoproteins (SFV) repräsentieren und die Palmitoylierungsstelle dieses Proteins beinhalten. Es kam auch zur Übertragung von Palmitinsäure, allerdings war hier der stärkste Radioaktivitätseinbau, ausgehend von markiertem [³H]-Pal-CoA, in der Inkubation ohne Enzymquelle zu finden. Diese Übertragungsaktivität kann damit keinem Membranprotein zugeschrieben werden. Der Einbau war in Anwesenheit hitzeinaktivierter Membranen stärker als in der Inkubation mit nativer Enzymquelle.

In den Acylierungstests mit Peptiden läßt sich dennoch an dem unterschiedlichen Einbau von [³H]-Pal-CoA eine gewisse Spezifität solcher Peptide, die Acylproteine wiedergeben, gegenüber Peptidstrukturen ohne Acylierungssequenzen erkennen. Der Einbau war beim E1- und GAP-43-Peptid ca. drei- bis viermal höher als beim unspezifischen Peptid. Daß dieser Unterschied sowohl für die Ansätze mit Enzymquelle als auch für die enzymfreie Reaktion gilt, mag darauf zurückzuführen sein, daß die Peptide, welche als unspezifische Kontrollen verwendet wurden, keine Cysteinreste enthielten. Palmitinsäure bindet vorwiegend an Cysteine.

Da die Versuche mit den Peptiden insgesamt nicht zu den Ergebnissen führen, welche mit den nativen Proteinen erreicht wurden, ist davon auszugehen, daß ein „solid phase Testsystem“ mit synthetischen Peptiden als Akzeptorproteine in dieser Form den S-Acylierungsprozeß *in vitro* nicht wiedergibt und somit in keiner Weise den *in-vivo*-Verhältnissen entspricht.

Mit diesen Beobachtungen übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der Acylierung von Peptiden berichten, wie schon erwähnt, Bañó *et al.* (1998). Unter Verwendung von ebenfalls mittels Fmoc-Chemie synthetisierten Peptiden haben sie sehr ähnliche Versuche durchgeführt. Die von ihnen verwendeten Peptide stellen das Yes-Protein, ein NRTK der Src-Familie, dar und sind im Unterschied zu den hier beschriebenen Experimenten nicht an Membranen gebunden, sondern frei im Enzymtest eingesetzt worden. Nach der Reaktionszeit von zehn Minuten wurde von diesen Autoren eine definierte Menge (50 µl) des Inkubationsansatzes mit den Peptiden auf Phosphorzellulose-Filterpapier übertragen. So wurden die Peptide an die Filtermembran gebunden und konnten leicht weiterbehandelt und

analysiert werden, ähnlich den schon von vornherein an Membranen gebundenen Peptiden in den von uns durchgeführten Versuchen. Nachdem Bañó *et al.* (1998) die Spezifität der Übertragung auf das myristoylierte Yes-Peptid mit einem Cysteinrest an der dritten Position nachgewiesen hatten, nahm unter Zugabe von mikrosomalen Membranen die Bindung von [³H]-Palmitat gegenüber der enzymfreien Reaktion ab. Zudem konnten Bañó *et al.* (1998) zwischen Reaktionen unter Zugabe nativer mikrosomaler Membranen als PAT-Enzymquelle und hitzeinaktivierter mikrosomaler Membranen keinen Unterschied in der Palmitat-Übertragung feststellen. Beide Resultate stimmen mit den hier beschriebenen Experimenten überein. Die Autoren ziehen aus diesen Ergebnissen Schlüsse, die das Modell einer nicht-enzymatischen Palmitoylierung stützen. Sie beschreiben die Eigenschaften der beobachteten *in-vitro*-Palmitoylierungsvorgänge (Zeit-, pH-, Temperatur- und Substrat-Konzentrationsabhängigkeit) als repräsentativ für die *in-vivo*-Vorgänge. Allerdings zeigen sie keinen Vergleich mit einem *in-vitro*-Assay, bei dem das Yes-Protein, welches *in vivo* vorliegt, selbst als Akzeptor eingesetzt wurde. Die von uns beschriebene Differenz zwischen den Enzymtests mit präparierten Proteinen und mit den Peptiden, die ihre Aminosäuresequenz im Acylierungsbereich wiedergeben, deutet allerdings im Falle des E1 Glykoproteins der SFV-Virushülle eher darauf hin, daß der Peptid-Assay nicht die physiologischen Eigenschaften der Proteinpalmitoylierung wiedergibt.

Versuch der Anreicherung und Reinigung von PAT

In unseren Versuchen war der Enzym- bzw. Aktivitätsnachweis für PAT mit deacylierten nativen E1-Glykoprotein aus SFV und mit bovinem Rhodopsin (Veit *et al.*, 1998) als Akzeptorprotein am zuverlässigsten, daher wurden diese bei dem Versuch der Anreicherung verwendet. PAT-Aktivität ist in Membranen verschiedenster Gewebe gefunden worden. So wurden bei bisherigen Reinigungsversuchen bovines Hirn (Berthiaume und Resh, 1995), Rattenleber (Liu *et al.*, 1996) und Erythrozytenmembran (Basi *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1995) als Ausgangsmaterial beschrieben. In den hier vorgestellten Versuchen wurde, wie von Schmidt und Burns (1989), humane Plazenta verwendet. Erhebliche Vorteile dieser Enzymquelle sind die relativ große Gewebemenge und die höhere PAT-Aktivität von Mikrosomen aus Plazenta im Vergleich zu Präparationen anderer Gewebe und Zellen (Schmidt und Burns, 1991). In unseren Untersuchungen erreichten wir allein durch die Präparation der Mikrosomen aus dem Gewebehomogenat eine ca. 225fache Anreicherung der Enzymaktivität (**Tabelle 4.1**). Aus diesen Mikrosomen wurde dann mittels einer einstündigen Inkubation in 1% Triton X-100 die Aktivität aus den Membranen extrahiert und in der DEAE-Chromatographie fraktioniert. In dem von uns verwendeten Puffer (20 mM Tris pH 8,0; 0,1% TX-100; 2 mM β -Mercaptoethanol; 0,5 mM PMSF) blieb die Aktivität an die Säulenmatrix gebunden und wurde bei einer NaCl-Konzentration von ca. 100-130 mM (**Abb. 4.13**) eluiert. Es konnte

also eine Anreicherung der PAT-Aktivität in diesen Fraktionen erreicht werden. Mit den entsprechenden vereinigten Fraktionen (Fr. 42-52) wurde dann ein Chromatographie-Schritt mit „Blue-Sepharose“ als Matrix angeschlossen. Die gefundene Aktivität wurde bei einer Konzentration von ca. 1,1-1,2 mM „Cibachrom-Blue“ eluiert. Die erhaltene PAT-Aktivität war jedoch sehr labil und erlosch bei 4°C schon wenige Stunden nach der Trennung sowie bei schon einem Gefrier-Auftau-Zyklus. Ähnliche Probleme mit der geringen Stabilität dieser Enzymaktivität beschrieben auch Berthiaume und Resh (1995) bei ihren Reinigungsversuchen der PAT, welche die Tyrosinkinase p59^{tyr} palmitoyliert.

Bisher ist noch kein Protein mit PAT-Aktivität beschrieben worden. Die Schwierigkeiten mit diesem Protein sind sicher durch die Membranbindung zu erklären. Eventuell bestehen PAT-Proteine aus mehreren Untereinheiten, welche bei der Aufreinigung getrennt werden. Dadurch würde das Enzym seine Aktivität einbüßen und könnte nicht detektiert werden.

Trypsin-Verdau: Inaktivierte PAT in Detergens-solubilisierten Mikrosomen

Einen Hinweis auf die Lokalisation des PAT-Proteins innerhalb der mikrosomalen Membranen erhält man mit Hilfe eines Trypsin-Verdau. Serin-Protease Trypsin spaltet bevorzugt die Aminosäuren Lysin und Arginin am Carboxylende eines Proteins (Methews und van Holde, 1990; Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1984). Wir konnten zeigen, daß eine Trypsininkubation der Mikrosomen vor dem Einsatz im Assay die PAT-Aktivität hemmt (**Abb. 4.4**). Dies allein legt nahe, daß für die Palmitoylierung ein Protein, also ein Enzym, notwendig ist. Die inhibierende Wirkung von Trypsin ist ohne Zusatz von Detergens sehr gering und durch Aprotinin aufzuheben. Unter Anwesenheit von 1% TX-100 während des Trypsin-Verdau wird hingegen die PAT-Aktivität in unserem Ansatz ab einer Konzentration von 2,5 µg/µl völlig aufgehoben. Trypsin hat also erst bei Auflösung der Mikrosomenvesikel durch Anwesenheit von Detergens Zugang zu dem Carboxyl-Terminus der Proteine, die PAT-Aktivität tragen. Demnach müssen die Proteinabschnitte, die für die PAT-Aktivität verantwortlich sind, in den intakten Mikrosomen vor der Protease Trypsin geschützt sein. Das heißt, daß diese Abschnitte der PAT entweder intramembranös gelegen oder überwiegend nur vom Lumen der Mikrosomenvesikel aus zu erreichen sind. Das Modell, das sich daraus für uns ergibt, ist in **Abb. 5.1** wiedergegeben. Diese Ergebnisse stimmen mit den bekannten Beobachtungen überein, wonach es sich bei der PAT um ein membranassoziiertes Protein handelt (Schmidt und Burns, 1989). Die Ergebnisse des Trypsinverdau lassen auf ein stark in der Membran verankertes Protein, wenn nicht gar ein Transmembranprotein schließen.

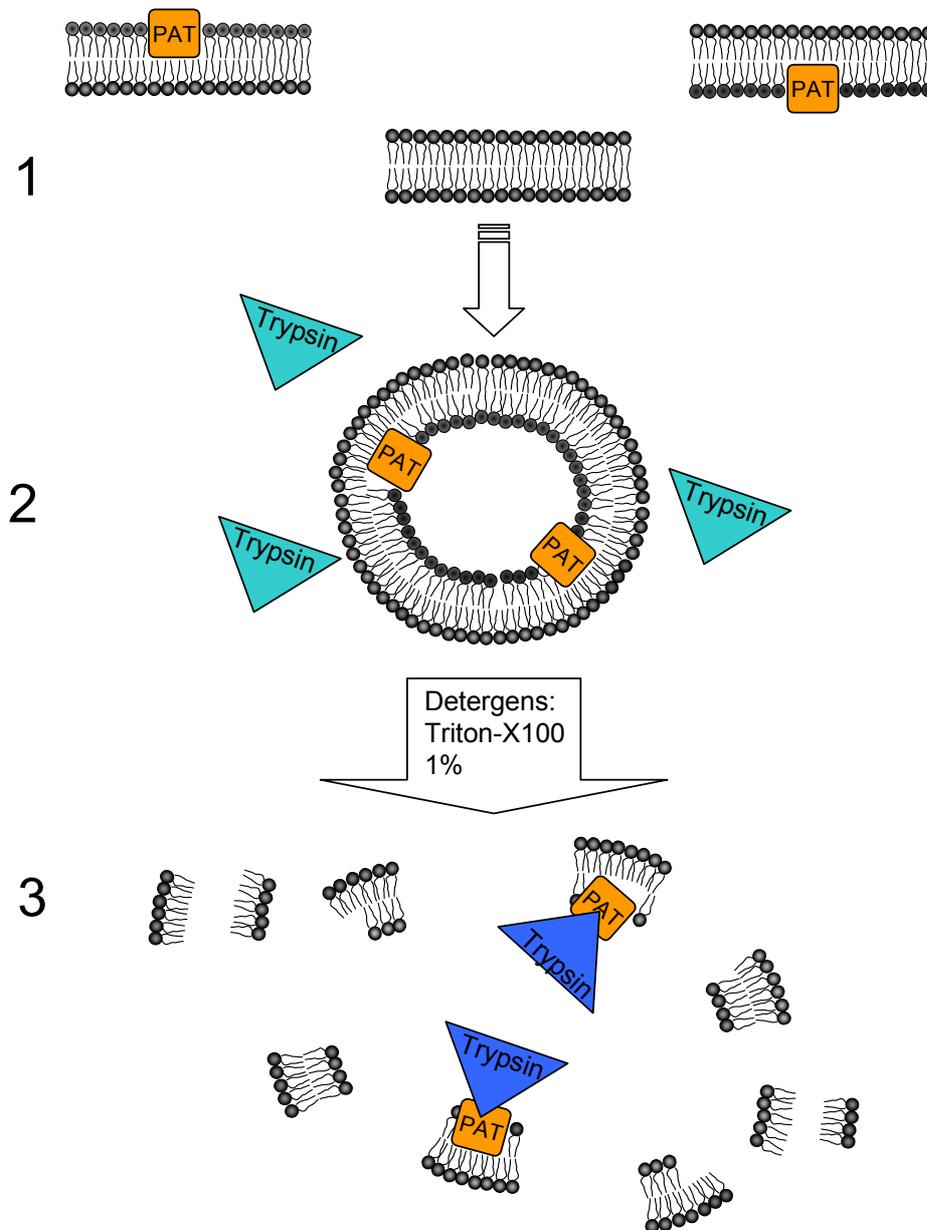


Abbildung 5.1: Modell der Lokalisation der PAT in mikrosomalen Membranen mittels proteolytischer Inaktivierung. (1) Membranbruchstücke (Lipiddoppelmembranen) aus der Mikrosomenpräparation lagern sich zu tropfen- und blasenförmigen Strukturen zusammen, in denen sich die Membranen gleichseitig ausrichten. (2) Mikrosomenmicelle zweidimensional im Schnitt dargestellt. PAT-Enzym ist im Inneren vor der Protease Trypsin geschützt. (3) Durch das Detergens Triton X-100 wird die Micellenstruktur der Mikrosomen aufgebrochen, so daß Trypsin PAT auflösen kann.

Diskussion der Lokalisationsversuche

Für die Funktion der PAT ist ihre Lokalisation innerhalb der Zelle von Bedeutung. Bei der Vielzahl der palmitoylierten Acylproteine mit ihren unterschiedlichen Eigenschaften und Funktionen ist anzunehmen, daß Enzyme mit PAT-Aktivität ubiquitär vorkommen. Dies ist

für verschiedene Gewebe schon gezeigt worden (Berger und Schmidt, 1986). Es stellt sich nun die Frage, ob diese Enzymaktivitäten einem einzigen Enzym oder einer Enzymfamilie mit spezifischen Eigenschaften zuzuordnen sind. Dies gilt auch für die Verteilung der PAT-Aktivität in der Zelle.

So, wie über den genauen Mechanismus der Palmitoylierung relativ wenig bekannt ist, ist auch der Ort der Palmitoylierung innerhalb der Zelle noch nicht geklärt. Basierend auf Ergebnissen aus Studien der Kinetik und Zell-Fraktionierung, wurden bisher für einige virale und zelluläre Membranproteine die S-Acylierungs-Orte Golgi und endoplasmatisches Retikulum vorgeschlagen (Schlesinger *et al.*, 1993; Schmidt 1989; Berger und Schmidt, 1985). Viele S-acylierte Proteine sind jedoch mit der Plasmamembran assoziiert, was bei der dynamischen Eigenschaft dieser Modifikation auch nahelegt, daß die Palmitoylierung in diesen Membranen bzw. in eng mit ihnen interagierenden Membranen stattfindet (Schroeder *et al.*, 1996; Bouvier *et al.*, 1995a+b; Degtyarev, 1993; Linder *et al.*, 1993).

Die hier vorgestellten Experimente wurden mit den Zellmembran-Fractionen Plasmamembran, Golgi-Apparat und endoplasmatischem Retikulum aus einem Rattenleber-Gewebehomogenat durchgeführt. Es wurde die PAT-Aktivität untersucht, welche p59^{fyn} (bzw. das myristoylierte Peptid FynSH432His₆) palmitoyliert. Die Ergebnisse (**Tab. 5.2**) zeigen, daß PAT-Aktivität nur in der Plasmamembran und dem Golgi zu finden ist, nicht aber im ER (**Abb. 4.15**). Es ist trotz der Verwendung eines etablierten Verfahrens (Croze und Morre, 1984) mit einer gewissen Kreuzkontamination der Fraktionen zu rechnen.

	Plasmamembran:	Golgi:	Endoplasmatisches Retikulum:
PAT- Aktivität gegenüber p59 ^{fyn} ¹	++ solubilisierbar mit 150 mmol KCl	++ solubilisierbar mit Na ₂ CO ₃ (nicht mit KCl)	--
Subzelluläre Verteilung von p59 ^{fyn} ²	++	(+)	(+)
PAT- Aktivität gegenüber E1 (SFV) ³	--	(+)	++
Subzelluläre Verteilung von Cysteine- acylhaltenden S-acylierten Lipo-Peptid-Strukturen ⁴	++ Ausschließliche Lokalisierung bestimmter Lipo-Peptide	+ Einige Lipo-Peptide sind in Plasmamembran und Golgi zu finden.	--
PAT-Aktivität gegenüber G-Protein α Untereinheiten ⁵	++	(+)	--
¹ Ergebnisse dieser Arbeit ² van't Hof und Resh (1997) ³ Berger und Schmidt (1985)		⁴ Schroeder <i>et al.</i> (1996) ⁵ Dunphy <i>et al.</i> (1996)	

Tabelle 5.2: Übersicht: Subzelluläre Verteilung der PAT-Aktivität gegenüber p59^{fyn} im Vergleich mit anderen PAT-Aktivitäten und Verteilungsmustern palmitoylierter Proteine.

Das Vorfinden der PAT-Aktivität in den Plasmamembranen stimmt mit den bisherigen Berichten in der Literatur überein. So beschrieben Berthiaume und Resh (1995) die Membranassoziation der p59^{fyn}-palmitoylierenden PAT-Aktivität, und Dunphy *et al.* (1996) das angereicherte Vorkommen der die G α -Untereinheit palmitoylierenden PAT-Aktivität in der Plasmamembran. Van't Hof und Resh (1997) zeigen eine Untersuchung der subzellulären Verteilung neu synthetisierter, palmitoylierter p59^{fyn}-Proteine. Danach sind diese überwiegend in den Plasmamembranen vorzufinden und nur in geringem Anteil in den Membranen des Golgi und ER. Die Frage, ob Palmitoylierung eine Voraussetzung oder eine Folge der Membranassoziation ist, blieb bisher ungeklärt. Die hier beschriebenen Resultate lassen aber vermuten, daß, wie im „kinetic membrane trapping model“ (Abb. 1.1) beschrieben, die Assoziation eines Proteins mit der Membran Voraussetzung für dessen Palmitoylierung ist, denn die Membranen enthalten die Palmitoylierungsaktivität. Die Myristoylierung als Voraussetzung für Palmitoylierung dient dann lediglich der Annäherung des Proteins an die Membran, wie von Degtyarev *et al.* (1994) beschrieben.

Nach der Lokalisation der PAT-Aktivität in Golgi und Plasmamembran in den hier beschriebenen Versuchen, war eine Charakterisierung der Membranbindung dieser Aktivität zum Vergleich mit anderen beschriebenen PAT-Aktivitäten (Liu *et al.*, 1996; Berthiaume und Resh, 1995) das sich anschließende Ziel dieser Arbeit. Die Ergebnisse zeigen unterschiedliche Solubilisierungseigenschaften der Aktivität zwischen Golgi und Plasmamembran. Während die Aktivität aus Plasmamembranen schon durch 150 mM KCl

solubilisiert werden kann, gelingt dies aus Golgi-Membranen nur mit Na_2CO_3 (**Abb. 4.17**). Daraus kann geschlossen werden, daß es sich um unterschiedliche Enzymproteine handelt. Die Existenz unterschiedlicher S-Acyltransferasen folgerten auch Schroeder *et al.* (1996) aus ihren umfassenden *in-vivo*-Studien mit cysteinhaltigen Peptiden in Eukaryontenzellen. In ihren Versuchen konnten sie zeigen, daß ein Großteil unterschiedlicher Lipo-Peptide bevorzugt an der Plasmamembran, und ein kleiner Teil Lipo-Peptide an den Golgimembranen palmitoyliert werden.

Weiterführende Versuche, mit welchen in der hier vorgestellten Arbeit eine weitere biochemische Charakterisierung erfolgen sollte, verglichen das Extraktionsverhalten der PAT-Aktivitäten in Plasmamembranen und Golgimembranen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen. Die Aktivität aus Plasmamembranen konnte durch eine einstündige Schüttelinkubation (ohne erhöhte Salzkonzentration) und anschließende Ultrazentrifugation gelöst werden. Dies läßt den Schluß zu, daß die Solubilisierung wahrscheinlich die Folge einer enzymatischen Proteolyse ist, die in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf stattfindet. Auch hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivität aus den Plasma- und der aus den Golgimembranen. Aus der Golgi-Fraktion läßt sich in der einstündigen Inkubation mit keiner der getesteten KCl-Konzentrationen (0 mM, 150 mM, 300 mM und 1 M) Aktivität in das Cytosol übertragen. Dies kann als weiteres Indiz für das Vorliegen unterschiedlicher Enzymproteine einer Familie gesehen werden.

5.1 Ausblick

Die biologische und medizinische Bedeutung der Protein-Acylierung mit langkettigen Fettsäuren zeigt sich in ihrem nahezu ubiquitären Vorkommen in Organismen und Mikroorganismen. Acylproteine sind in den verschiedensten Funktions- und Lokalisationsbereichen beschrieben. Somit wird die Erforschung der Acylierung auch weiterhin für viele Gebiete der Biologie und Medizin von Interesse sein.

Bei der Entdeckung weiterer acylierter Proteine und der Untersuchung ihrer Funktionen bestätigt sich meist, daß die bislang noch nicht gelungene Aufklärung der molekularen Mechanismen der S-Acylierung das zentrale Anliegen auf diesem Gebiet bleibt.

Zwei aktuelle Beispiele, welche auch die zunehmend klinische Relevanz des Themas verdeutlichen, veranschaulichen dies:

Das pulmonale Surfactant-Protein C (SP-C) ist ein wichtiger Bestandteil des Surfactants (aus engl. „surface active agent“ zusammengesetzter Begriff, oberflächenaktive Substanz, Antiatelektasiefaktor). Surfactant erleichtert durch seine filmartige Ausbreitung in den Alveolaren zum einen die Entfaltung der noch vollständig kollabierten Lungen beim Neugeborenen und

wirkt zum anderen als Schutzfilm in den Alveolen (Pschyrembel, 1998). Eine direkt therapeutische Bedeutung kommt der Gabe von (aus Tieren gewonnenem) Surfactant beim „respiratory distress syndrom“ (RDS) zu. SP-C, dessen Struktur bekannt ist, ist doppelt palmitoyliert. Die Palmitoylierung ist essentiell für die α -Helix-Struktur und die Funktion des Proteins (Johansson, 1998; Qanbar *et al.*, 1996). In Vergleichsuntersuchungen von dipalmitoylierten und unpalmitoylierten SP-C Analoga konnten Gustafsson *et al.* (2000) zeigen, daß die Palmitoylierung von SP-C für die physiologischen Eigenschaften von Surfactant, wie der mechanischen Stabilität des Films oder der Ausbreitung des Surfactant-films, Voraussetzung ist. Die genaue Kenntnis der Struktur und Funktion der Surfactantbestandteile ist notwendig, um therapeutische Ansätze zu finden und synthetische Surfactant-Ersatzstoffe für die Applikation zu entwickeln (Palmlblad *et al.*, 2001). Es zeichnet sich ab, daß auch hier die Regulation und der Mechanismus der S-Acylierung des Surfactant-Proteins C eine bedeutende Rolle spielt.

Mit der Bestimmung der Palmitoylierungsstelle des Apolipoproteins B (apoB), einer essentiellen Komponente der Blutfettbestandteile Chylomikronen und Lipoproteine geringer sowie Lipoproteine sehr geringer Dichte („low density lipoproteins“, LDL und „very low density lipoproteins“ VLDL; Übersicht bei Davis und Vance, 1996), eröffnet sich in der Erforschung der Palmitoylierung durch die Gruppe um L. Berthiaume ein Feld großer medizinischer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, daß die Palmitoylierung des Apolipoproteins B eine Voraussetzung für seine intrazelluläre Zuordnung und damit vor allem für den Transport von Cholesterinestern und Triglyceriden darstellt (Zhao *et al.*, 2000). Hohe Konzentrationen von Apolipoprotein B, Cholesterinestern und Triglyceriden im Blut, sind beim Menschen als Risikofaktoren für Arteriosklerose bekannt. Ihre Reduktion geht mit einer niedrigeren Mortalität durch koronare Herzerkrankungen einher. Die Palmitoylierung des Apolipoproteins B, welche die Lokalisation des Lipoproteins in einem Unterkompartiment des endoplasmatischen Retikulums ermöglicht, ist eventuell ein regulatorischer Schlüsselpunkt bei der Bildung des triglycerid- und cholesterinesterreichen Kernpartikels des Apolipoprotein B und dessen Sekretion. Durch die Aufklärung des molekularen Palmitoylierungsmechanismus kann sich eine Möglichkeit des Eingreifens in diesen Prozess von hoher medizinischer Relevanz ergeben (Zhao *et al.*, 2000).

Die Reinigung der PAT bleibt also das zentrale Anliegen in der Erforschung hydrophober Proteinmodifikationen.

Das Erarbeiten eines effizienten *in-vitro*-Systems zum Nachweis von PAT-Aktivität, wie es auch im Rahmen dieser Arbeit versucht wurde, steht weiterhin aus. Dabei ist bei der

Verwendung von Peptiden, welche Acylierungsstellen bestimmter Proteine repräsentieren, Vorsicht geboten. Sie müssen - zumindest in bezug auf die Acylierung - mit den Eigenschaften der Proteine übereinstimmen. Dennoch ist die Verwendung von Peptiden und modifizierten Proteinen ein notwendiges Werkzeug, nicht nur für den Nachweis von Acylierungsaktivität, sondern auch für die gezielte Untersuchung und Charakterisierung der Acylierungseigenschaften.

Neue proteinchemische Ansätze der Enzymreinigung sollten die Ergebnisse der Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der Acylierungsaktivitäten berücksichtigen. Dadurch könnte schon durch vorgeschaltete Anreicherung der Membranstrukturen, mit denen die jeweilige PAT assoziiert ist, eine Anreicherung erreicht werden, bevor durch Solubilisierung, etwa mittels Detergens, das Protein in ein instabiles Milieu gebracht wird.

Letztlich wird erst die molekulare Charakterisierung der PAT bzw. PAT-Familie eine Bestimmung der subzellulären Lokalisation und einen genauen Einblick in die Funktionsregelung palmitoylierter Proteine ermöglichen.