

6. Zusammenfassung

Die S-Acylierung, eine hydrophobe, posttranslationale Proteinmodifikation, wurde in dieser Arbeit anhand verschiedener *in-vitro*-Experimente untersucht. Das Interesse lag dabei auf dem Mechanismus der Fettsäureübertragung bzw. der Enzymologie der Modifikation. Diese ist bisher noch weitgehend ungeklärt. Erst mit der Aufreinigung eines Enzymproteins und der molekularen Identifikation wird die Hypothese einer enzymatischen Übertragung bewiesen sein. So war die Etablierung eines leistungsfähigeren *in-vitro*-Systems zum Testen S-acylierender Aktivität mit dem Fernziel der Reinigung der PAT zentrales Anliegen der vorliegenden Arbeit. Die Etablierung neuer Enzymnachweise mit Peptiden und rekombinanten Proteinen als Akzeptoren diente zum einen dazu, neue „tools“ und Methoden für die Anreicherung zur Verfügung zu stellen, zum anderen konnte mit ihrer Hilfe die Palmitoylierung weiter charakterisiert werden. Der biochemischen und zellbiologischen Charakterisierung dienten auch die Lokalisationsversuche.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. An Zellulosemembranen gebundene Peptide, die der Acylierungsregion palmitoylierter Proteine entsprechen, ließen sich im *in-vitro*-PAT-Assay nicht als Akzeptoren verwenden. Zwar wurde Palmitinsäure übertragen, aber die mit dem aus 10 AS der Acylierungsstelle des Glykoproteins E1 (SFV) synthetisierten Peptid erzielten Ergebnisse gaben nicht das Palmitoylierungsverhalten des aus SFV Virushüllen präparierten, deacylierten Proteins E1 wieder. Die Ergebnisse mit diesen Peptiden decken sich mit den in der Literatur beschriebenen *in-vitro*-Untersuchungen der Palmitoylierung mit auf gleiche Weise synthetisierten myristoylierten Yes-Proteintyrosinkinase-Peptiden (Bañó *et al.*, 1998). In diesen Untersuchungen fehlt jedoch der Vergleich mit den Originalproteinen, so daß ihre Aussagekraft aufgrund unserer Ergebnisse neu hinterfragt werden sollte.
2. Es konnte weder mit dem in *E.coli* exprimierten Fusionsprotein GAP-43-GFP-His₆ mit 10 AS des Aminoterminus noch mit dem ebenfalls in *E.coli* exprimierten Protein SNAP-25-His₆ als Akzeptor ein *in-vitro*-PAT-Nachweis etabliert werden, obgleich *in-vivo*-Lokalisationsuntersuchungen anderer Gruppen in Eukaryontenzellen eine Palmitoylierung mit Funktionsrelevanz zeigten. Für die Palmitoylierung ist die exakte Struktur der Polypeptide von Bedeutung. Eventuell kann hier in der Proteinsynthese durch die Fremdexpression in *E.coli* oder aufgrund der Kürze der wiedergegebenen Aminosäuresequenz keine ausreichende Kongruenz erreicht werden.

3. Die Anreicherung von PAT aus Mikrosomen humaner Plazenta wurde mit chromatographischen Methoden angestrebt. Als Aktivitätsnachweis zur Detektion des Enzyms diente der PAT-Assay mit E1-Spikeprotein (SFV). Für die Anreicherung der Aktivität in den Mikrosomen wurde ein Faktor von 225 gegenüber dem Ausgangsgewebehomogenat errechnet. Aus diesen Mikrosomen konnte PAT-Aktivität mit TX-100 solubilisiert werden. Nach chromatographischen Anreicherungs-schritten mit DEAE-Sepharose und blue-Sepharose erhielten wir eine angereicherte, aber äußerst labile Aktivität, die sich nicht weiter reinigen ließ.
4. Untersucht wurde die subzelluläre Verteilung der PAT-Aktivität, welche p59^{fyn} palmitoyliert. Die Fraktionen Plasmamembran, Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum aus Rattenlebergewebe wurden auf PAT-Aktivität untersucht. Es zeigte sich, daß die Aktivität für die eingesetzten Akzeptorproteine nur in Golgi- und Plasmamembranen, nicht aber in endoplasmatischem Retikulum zu finden war. Weitere Experimente zeigten, daß sich die Solubilisierungseigenschaften der membrangebundenen Aktivitäten in Plasmamembran und Golgi unterscheiden. So ließ sich die PAT-Aktivität aus Golgi nur mit 100 mM Na₂CO₃ lösen, nicht aber mit KCL in unterschiedlichen Konzentrationen. Aus den Plasmamembranen hingegen ließ sie sich durch eine einstündige Schüttelinkubation in physiologischem Puffer solubilisieren. Diese unterschiedlichen Eigenschaften sprechen für die Existenz unterschiedlicher Enzyme.

Obwohl das Ziel einer Enzymreinigung nicht erreicht wurde, können die Ergebnisse dieser Arbeit einen Beitrag zur aktuellen Diskussion der Palmitoylierung liefern. Sie zeigen, daß die Wahl des Enzymnachweises von kritischer Bedeutung ist. Ein Vergleich von synthetisch gewonnenen Akzeptoren mit den nativen Acylproteinen im Test stellt eine wichtige Kontrolle dar. Die gewonnenen Daten können die Theorie eines enzymatischen Mechanismus der Fettsäureübertragung stützen, da sie eine membranassoziierte S-Acylierungs-Aktivität zeigen, welche an Proteine gebunden zu sein scheint. Die subzelluläre Verteilung der Aktivität mit unterschiedlichen Solubilisierungseigenschaften läßt vermuten, daß es sich dabei um unterschiedliche Enzyme einer Enzym-Familie handelt.