
1 Einführung in die Thematik

1.1 Einleitung

Neuronale Kommunikation erfordert spezifische Wechselwirkungen im Millisekundenbereich zwischen Milliarden von Neuronen. Dabei konzentrieren sich die Herangehensweisen verschiedener Teildisziplinen der Neurowissenschaften auf die Synapse als kontinuierliche Verbindung zwischen Neuronen. Eine Reizung der entsprechenden Nervenzellen durch ein Aktionspotential bewirkt, daß, abhängig vom jeweiligen Synapsentypus, bestimmte Transmittermoleküle, wie Noradrenalin, Catecholamin oder auch ATP, in den synaptischen Spalt freigesetzt und an der postsynaptischen Seite von spezifischen Rezeptoren registriert werden. Bei vielen Transmittern und Hormonen ist Ca^{2+} für die Freisetzung erforderlich, was auf das Vorhandensein hocheffektiver Ca^{2+} -Sensoren hindeutet.

Der vesikuläre Zyklus beginnt mit der Ausstülpung synaptischer Vesikel aus post-Golgi-Strukturen und der Beladung dieser mit entsprechenden Transmittermolekülen. Nach dem Transport zur Plasmamembran erfolgt ein „Andocken“ der Vesikel an spezielle Strukturen, worauf es nach Ca^{2+} -Einstrom zum Verschmelzen der Vesikel mit der Plasmamembran und damit zum Ausschütten der Transmittermoleküle in den extrazellulären Raum kommt. Durch Einstülpung der Plasmamembran erfolgt dann ein sogenanntes "Recycling" und damit der Rücktransport der spezifischen Proteinkomponenten aus der Plasmamembran.

Seit einigen Jahren sind die Proteine bekannt, die sowohl für die Erkennung zwischen vesikulärer und Plasmamembran, den Docking-Prozeß als auch für die Fusion beider Membranstrukturen verantwortlich sein sollen. Aufgrund ihrer Interaktionen mit NSF und SNAP-Proteinen werden sie als SNAP-Rezeptoren (SNAREs) bezeichnet, wobei, entsprechend ihrer Lokalisation, ein v (vesicle SNARE) oder ein t (target SNARE) vorangestellt wird. Als v-SNARE ist Synaptobrevin 2 an der Bildung des präfusionalen SNARE-Komplexes beteiligt, von der Seite der t-SNAREs sind dies Syntaxin und SNAP-25.

Ein weiteres wichtiges Protein während des synaptischen Zyklus ist das vesikuläre Protein Synaptotagmin, das nicht direkt an der Ausbildung des Komplexes beteiligt ist, aber durch seine Ca^{2+} -bindenden Eigenschaften in diesen Vorgängen als vermutlicher Ca^{2+} -Sensor eine große Bedeutung besitzt. Durch Wechselwirkung mit einer Vielzahl von neuronalen Komponenten kommt diesem Protein eine Schlüsselrolle bei der regulierten Neurotransmittersekretion zu.

1.2 *Synaptotagmine und ihre Funktionen*

Synaptotagmine sind eine Familie von Membranproteinen, die in neuronalen und anderen Geweben weit verbreitet sind. Sie wurden durch systematische Charakterisierung der Proteine an der Oberfläche kleiner synaptischer Vesikel (SSV, small synaptic vesicles) isoliert und scheinen wichtige Funktionen im intrazellulären Protein- und Transmittertransport innezuhaben. In Säugerzellen sind inzwischen 13 Isoformen in jeweils spezifischen Geweben beschrieben worden, wobei durch unterschiedliche Spleiß-Varianten der RNA noch weitere Varianten entstehen können (Craxton und Goedert 1999). Synaptotagmin 13, der zuletzt beschriebene Vertreter dieser inzwischen sehr großen Proteinfamilie, entspricht in seiner gewebsspezifischen Verteilung den Isoformen III, IV, VI, VII, IX und XI und ist nach dem gleichen Schema aufgebaut (von Poser und Südhof, 2000). Kein Mitglied dieser Proteinfamilie konnte allerdings in Hefen gefunden werden, wodurch zu vermuten ist, daß Synaptotagmine an fundamentalen Membrantransport-Vorgängen nicht beteiligt sind. Alle Proteine dieser Gruppe sind charakterisiert durch eine Transmembranregion und eine große cytoplasmatische Domäne, die den Hauptteil der Proteinmasse ausmacht. Abbildung 1 zeigt schematisch eine Zusammenstellung der Strukturbestandteile der Synaptotagmine sowie die Sequenzen der Transmembranbereiche bisher bekannter Synaptotagmine und die potentiellen Fettsäurebindungsstellen. Der cytosolische Abschnitt aller Synaptotagmine enthält zwei Kopien einer Calcium- und Phospholipid-bindenden Region, der sogenannten C2-Domäne, die erstmals in der Protein-Kinase C entdeckt und später in einer Vielzahl von Proteinen, wie Phospholipasen, Lipidkinasen und Perforin, beschrieben wurde. Während die membrannähe C2-Domäne mit Phospholipiden sowie mit dem t-SNARE Syntaxin interagiert, ist die andere unter an-

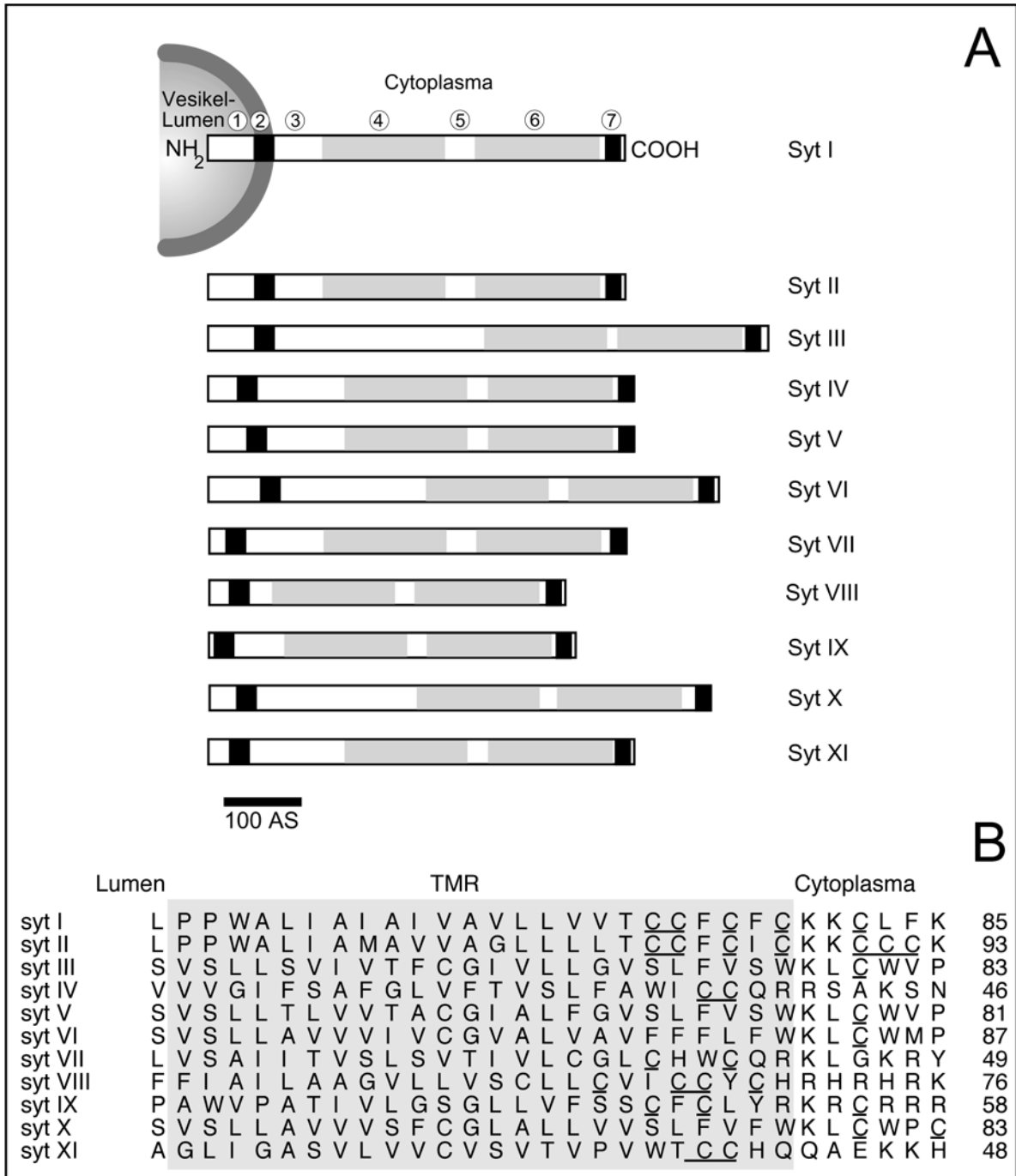


Abbildung 1: Schematische Gegenüberstellung der Synaptotagmin-Isoformen

A: Strukturmerkmale der Syt-Isoformen, Einteilung in 7 funktionelle Domänen: (1) intraluminal, (2) Transmembranregion (TMR), (3) nicht konservierter Bereich, (4) C2A Domäne, (5) Verbindungsregion, (6) C2B Domäne, (7) konservierter C-Terminus (modifiziert nach Schiavo et al., 1998). Der Balken entspricht etwa 100 Aminosäureresten **B:** Sequenzvergleich der Synaptotagmin-Transmembranbereiche; Sequenzen von Syt-I - Syt-VII aus Ratte, alle anderen aus Maus; vermutliche Transmembranregion grau hinterlegt, potentiell palmitoylierte Cysteinreste unterstrichen, die Ziffern geben die Positionen der TMR-Cytoplasmaübergänge an.

derem für Wechselwirkungen mit Komponenten des Hüll-Komplexes (Clathrin AP-2) sowie für die Homodimerisierung verantwortlich. Die C2-Domänen an sich sowie die Unterschiede in den Funktionen der beiden Domänen sind in den verschiedenen Isoformen hoch konserviert, wohingegen die intravesikuläre, die membranspannende sowie die cysteinreiche Region wenig Übereinstimmung zeigen.

In Neuronen haben Synaptotagmine eine sehr spezifische Verteilung, wobei die höchsten Konzentrationen in den Axon-Enden (Matthew et al., 1981; Matteoli et al., 1991) und in der Golgi-Region (Matteoli et al., 1991; Hou et al., 1997) festgestellt wurden. In neuronal differenzierten PC12-Zellen konnten mit synaptotagminspezifischen Antikörpern Proteine mit einer ähnlichen räumlichen Verteilung detektiert werden (Elferink et al., 1993; Marxen et al., 1997). Krasnov und Enikolopov (2000) konnten zeigen, daß die carboxyterminale Domäne und dort speziell die Aminosäurereste W405 und L408 für die korrekte Zielsteuerung zu den Axonenden unverzichtbar sind.

Auch wenn alle Isoformen des Synaptotagmins im Nervensystem anzutreffen sind, gibt es Unterschiede in der lokalen Anreicherung. Die fünf Isoformen Syt I, II, III, V und X werden ausschließlich in Neuronen und endokrinen Zellen exprimiert, wohingegen die Vertreter VI, VII und VIII primär in nichtneuronalem Gewebe wie Herz, Nieren und Darm vorkommen. Eine nichtneuronale Isoform, von den Autoren ebenfalls Synaptotagmin V genannt, aber in späteren Publikationen unter Nummer XI eingestuft, konnte in Nieren-, Lungen- und Herzgewebe der Ratte sowie im Gehirn und PC12-Zellen nachgewiesen werden (Hudson et al., 1995). Im Gegensatz zu anderen synaptischen Proteinen wie Synaptobrevin und Syntaxin scheint Synaptotagmin nicht phylogenetisch konserviert zu sein, denn es wurden in niedrigeren Organismen als *Caenorhabditis (C.) elegans* keine homologen Proteine gefunden. In *Drosophila (D.) melanogaster* wurden vier Synaptotagmine beschrieben, in *C. elegans* ebenfalls vier und drei im See-Rochen *Discopyge ommata*. Marquéze et al. (2000) entwickelten einen phylogenetischen Stammbaum, der hilfreich sein könnte, um vermeintliche Funktionen der verschiedenen Synaptotagmine zu diskutieren, zumal viele knock-out-Versuche in *Drosophila* und *C. elegans* durchgeführt wurden (Reist et al., 1998; DiAntonio und Schwarz, 1994).

Abgesehen von Synaptotagmin I, sind die Funktionen der Synaptotagmine noch nicht vollständig geklärt, aber es ist sehr wahrscheinlich, daß sie neben der vermuteten

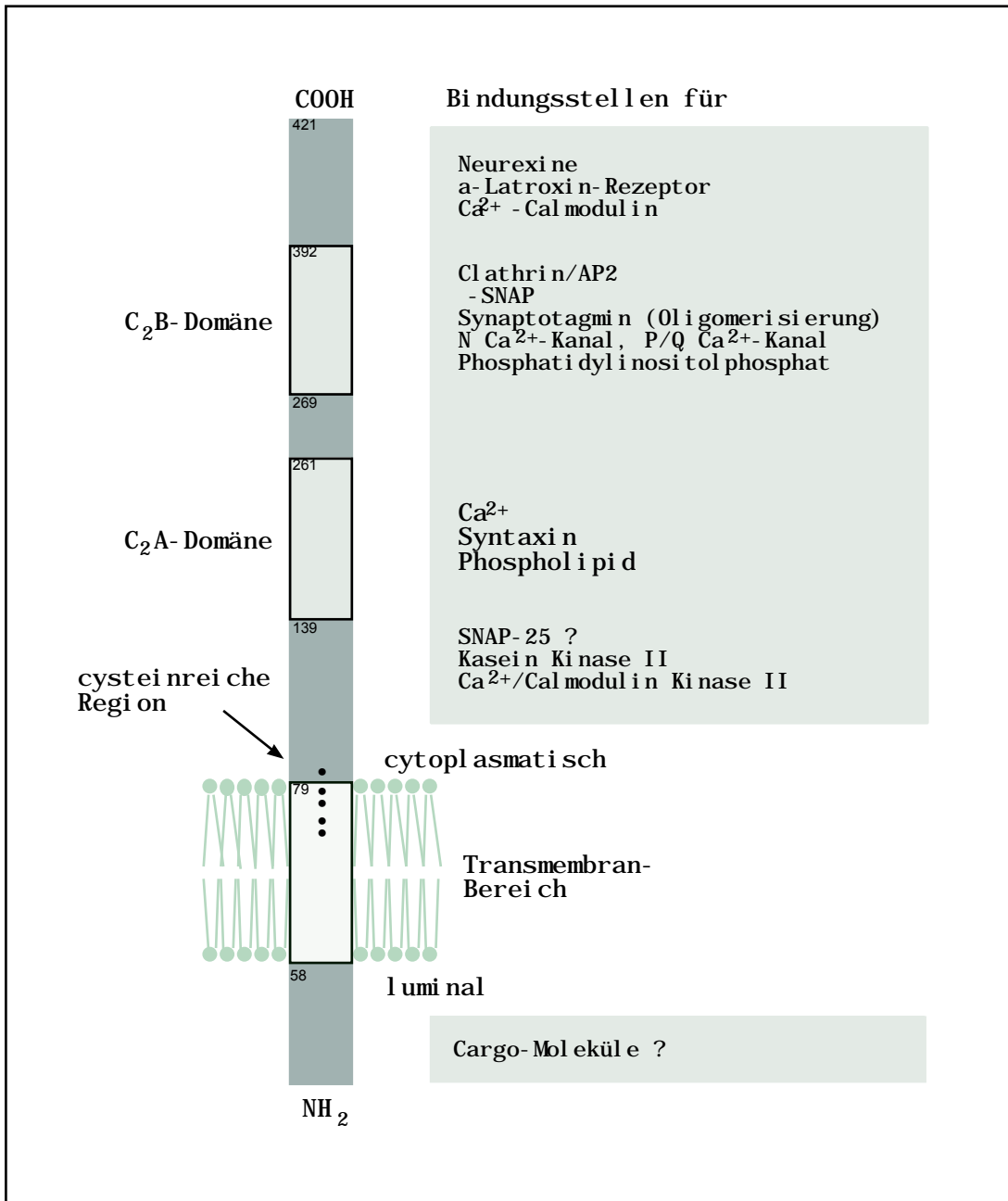


Abbildung 2: Struktur des Synaptotagmin-I-Proteins

Schematische Darstellung, die Ziffern kennzeichnen die jeweilige Aminosäure-Position,
 • Cysteine, wichtigste Bindungspartner grau hinterlegt

Rolle als Calcium-Sensor der Neuroexozytose auch als Vermittler von Lipid-Protein- und Protein-Protein-Wechselwirkungen dienen. Da die meisten Vertreter als Bindungspartner für das Clathrin-Adaptor-Protein (AP-2) gelten, ist eine Beteiligung an der Clathrin-vermittelten Endozytose und damit an der Rückgewinnung von Membranproteinen wahrscheinlich. Außerdem können sie an der zielgesteuerten Insertion von Proteinen in Membranen mitwirken, wie für die insulinstimulierte Insertion des Glukosetransporters GLUT4 in adipozytische und myozytische Membranen vermutet wird (Pessin et al., 1999).

1.3 *Synaptotagmin I*

Synaptotagmin I ist ein integrales Membranprotein an der Oberfläche synaptischer Vesikel. Es wurde erstmals als 65-kDa-Protein beschrieben, das mittels spezifisch an synaptischen Nervenenden bindenden monoklonalen Antikörpern aus Präparationen synaptischer Membranen gereinigt werden konnte (Matthew et al., 1981). Es ist eine Hauptkomponente synaptischer Vesikel (Perin et al., 1991) und großer kerndichter Vesikel (Walch-Solimena et al., 1993), ist außerdem anwesend in neuroendokrinen Vesikeln des Nebennierenmarks (Matthew et al., 1981), in endokrinen sekretorischen Granula pankreatischer β -Zellen (Lang et al., 1997) und Endothelzellen der humanen Nabelschnur-Vene sowie NIH 3T3-Zellen (Tarantini et al., 1998).

Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der Struktur des Synaptotagmin I. Die kurze luminaire Domäne (57 AS) trägt eine Bindungsstelle zur N-Glykosylierung, ansonsten wurde dieser Region bisher keine spezielle Funktion zugewiesen, zumal ihre Sequenz in den verschiedenen Isoformen sehr variabel ist. Die Transmembranregion (22 AS) trägt an ihrer Grenze zur cytoplasmatischen Domäne 4 Cysteinreste (C74, C75, C77, C79), der fünfte Cysteinrest (C82) wird zur relativ variablen, hochgeladenen cytoplasmatischen Region gezählt. An diesen Bereich schließt sich die C2A-Domäne an, die Ca^{2+} -Ionen mit einer Affinität binden kann, wie sie für die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Exozytose beschrieben wurde (Heidelberger et al., 1994). Außerdem werden dieser Region Ca^{2+} -abhängige Interaktionen mit Membran-Phospholipiden und dem t-SNARE Syntaxin zugeschrieben (Li et al., 1995; Ullrich et al., 1994). Nach

einer kurzen Übergangsregion folgt die C2B-Domäne, die unter anderem für die Ca^{2+} -abhängige Oligomerisierung (Sugita et al., 1996) sowie für Interaktionen mit dem am Clathrin-Coating beteiligten AP-2 (Zhang et al., 1994) und mit t-SNAP verantwortlich ist (Schiavo et al., 1995). Für den kurzen C-terminalen Bereich wurden Wechselwirkungen mit Neurexinen und speziell mit dem hochaffinen α -Latrotoxin-Rezeptor beschrieben (Perin, 1994). Kürzlich wurde ein in Synaptotagminen konserviertes WHXL-Motiv im C-Terminus beschrieben, welches sich als essentiell für Docking-Vorgänge an aktive Zonen der großen Synapse des Tintenfisches herausstellte (Fukuda et al., 2000).

Die genaue molekulare Funktionsweise des Synaptotagmin I in der Neurotransmitterfreisetzung ist noch weitgehend unklar, es ist jedoch wahrscheinlich, daß der Schlüssel zu diesem Problem in der Untersuchung der Wechselwirkungen mit seinen Bindungspartnern liegt. Es konnte festgestellt werden, daß die erste C2-Domäne (C2A) ebenso wie das komplette Synaptotagmin Ca^{2+} -Ionen in physiologischen Konzentrationen bindet und daß diese Calcium-Bindung die Fähigkeit zur Interaktion mit Membranlipiden erhöht (Brose et al., 1992). Außerdem stimuliert Ca^{2+} die Zielsteuerung von Synaptotagmin in die Nähe des ternären SNARE-Komplexes nahe der Transmembranregion von Syntaxin sowie in Liposomen (Davis et al., 1999). Die Interaktion mit t-SNAREs der Plasmamembran könnte dabei durch ein Phosphorylierungs-Dephosphorylierungsgleichgewicht reguliert werden (Verona et al., 2000). Es ist denkbar, daß Synaptotagmin nicht nur Änderungen in der synaptischen Ca^{2+} -Konzentration erkennen, sondern auch die Fusion von Vesikel und Plasmamembran beeinflussen kann. Mittels Mutanten, die einen Defekt in der Oligomerisierungsregion C2B tragen, konnte in *Drosophila* gezeigt werden, daß die Oligomerisierung von Synaptotagmin zu einem verstärkten "cross-linking" der SNARE-Komplexe in Dimere und andere Cluster-Formen führt (Littleton et al., 2001). Eine direkte Interaktion der C2B-Domäne von Synaptotagmin I mit dem Synprint-Peptid von N-Typ- Ca^{2+} -Kanälen impliziert außerdem einen Einfluß des Synaptotagmins auf die Zielsteuerung der synaptischen Vesikel in die Nähe von Ca^{2+} -Einstromstellen (Sheng et al., 1997). Weitere Hinweise auf eine maßgebliche Beteiligung an der regulierten Sekretion lieferten die Bindungsexperimente des C-terminalen Bereiches an Neurexine (Perin, 1994) sowie Mutations-Analysen an Synaptotagmin in *Drosophila* (Littleton et al., 1993).

Einen physiologischen Beleg dafür, daß Synaptotagmin I die Ca^{2+} -sensitive Komponente der Neurotransmitterfreisetzung sein könnte, erhielt man durch Manipulation der Genexpression. Durch homologe Rekombination hergestellte homozygote Knock-out-Mäuse waren nur maximal 48 Stunden lebensfähig, wobei sie sich aber unmittelbar nach der Geburt noch nicht von Wildtyp-Mäusen unterschieden (Geppert et al., 1994). Studien an hippocampalen Neuronen dieser homozygoten Mutanten zeigten, daß durch das fehlende Synaptotagmin die Ca^{2+} -abhängige synchrone Freisetzung von Neurotransmittern gestört ist, nicht aber die asynchron hervorgerufenen sowie die spontanen Freisetzungsprozesse. Dies spricht für eine Schlüsselfunktion von Synaptotagmin I als „low affinity“ Ca^{2+} -Sensor der gerichteten Neurotransmitterfreisetzung.

Eine Funktion in endozytotischen Vorgängen und somit beim Recycling synaptischer Vesikel lassen Untersuchungen an *C. elegans* (Jorgensen et al., 1995) vermuten. Synaptotagmin wird ebenfalls eine Rolle als Akzeptor für das Clathrin-Adaptor-Protein AP-2 zur Bildung von Clathrin-Komplexen zugeschrieben (Zhang et al., 1994), da gezeigt werden konnte, daß Synaptotagmin durch Peptide mit einem endozytotischen Tyrosin-Motiv zur Rekrutierung von AP-2-Komponenten stimuliert werden konnte (Haucke et al., 1999). Neueste Untersuchungen an Synaptotagmin VII zeigten, daß die Abwesenheit sowohl der C2B-Domäne als auch der Cysteinreste C38 und C41 in der Transmembranregion inhibierend auf Endozytosevorgänge wirkt (von Poser et al., 2000).

Untersuchungen von Fukuda und Mitarbeitern (2000) zeigten, daß Synaptotagmin einen Einfluß auf das Auswachsen von Neuriten in PC12-Zellen und Neuronen hat (Kabayama et al., 1999; Fukuda und Mikoshiba, 2000). Dabei stellte sich heraus, daß eine Blockade der C2A-Domänen von Synaptotagmin I oder II das Auswachsen von Neuriten in DRG-Neuronen (chick dorsal root ganglion neurons) hemmte. In PC12-Zellen führte eine Überexpression von Synaptotagmin I oder II zum Auswachsen von längeren Neuriten als in GFP-exprimierenden Kontrollzellen. Wiederum waren es die C2A-Domänen der beiden Synaptotagmin-Isoformen, deren Deletion dazu führte, daß mit dieser Mutante transfizierte PC12-Zellen Neuriten von geringerer Länge ausbildeten als PC12-Zellen, in denen Wildtyp-Synaptotagmin überexprimiert wurde. Diese Untersuchungen implizieren, daß die C2A-Domäne als Phospholipid- und

Ca²⁺-Bindungsstelle wichtig ist für das Auswachsen von Neuriten und damit für axonale Reparaturprozesse.

Yoo und Mitarbeiter (2001) beschrieben bei Patienten, die am sogenannten Down-Syndrom (DS) bzw. an Alzheimer (AD) litten, signifikant niedrige Synaptotagmin I-Mengen in verschiedenen Hirnregionen, wie im temporalen und parietalen Cortex sowie im Thalamus. Es ist somit wahrscheinlich, daß eine Störung der Synaptotagmin-Expression eine der Ursachen für Beeinträchtigungen der Synaptogenese und der neuronalen Signalübertragung in diesen neurodegenerativen Erkrankungen ist.

1.4 *Hydrophobe Proteinmodifikationen*

Viele zelluläre und virale Proteine werden während und nach ihrer Translation an Ribosomen auf vielfältige Weise modifiziert. Die bekanntesten dieser Modifizierungen sind die Glykosylierung, die Phosphorylierung sowie proteolytische Spaltungen, die schon seit langem bekannt und charakterisiert sind und bereits Eingang in einschlägige Lehrbücher gefunden haben. Daneben gibt es noch eine Reihe von Modifikationen, die in ihren Funktionen noch relativ wenig erforscht sind. Dabei handelt es sich unter anderem um die Verknüpfung langkettiger Fettsäuren mit der Polypeptidkette des Proteins, nicht zu Verwechseln mit Proteolipiden, bei denen spezifische Polypeptide nichtkovalent mit Lipiden interagieren und wasserunlösliche Komplexe bilden.

Erste Hinweise auf kovalent gebundene Fettsäuren an Proteinen gab es bereits in den fünfziger Jahren (Folch-Pi et al., 1951), allerdings konnte erst 1977 ein Einbau radioaktiv markierter Fettsäuren am Beispiel des VSV-G-Proteins nachgewiesen werden (Schmidt und Schlesinger, 1979). Es folgte eine intensive Forschung über hydrophobe Proteinmodifikationen, wobei nach und nach auch zelluläre Proteine als acyliert beschrieben wurden (Schlesinger et al., 1980).

Je nach Bindungsart der Fettsäure werden drei verschiedene Formen der Acylierung unterschieden, die Myristoylierung (Schultz et al., 1988), die kovalente Verknüpfung mit Glykolipiden (Cross, 1987) und die S-Acylierung, wobei letztere Gegenstand dieser Arbeit ist und im folgenden ausführlich erläutert wird.

1.4.1 *Myristoylierung*

Bisher am besten untersucht ist die Protein-Myristoylierung, eine kovalent über Amidbindungen erfolgende Verknüpfung von Myristinsäure mit N-terminalen Glycinresten. Während der Translation myristoylierter Proteine wird das N-terminale Methionin enzymatisch entfernt und das so entstandene n-terminale Glycin mit Myristat verknüpft, wobei diese Reaktion durch die N-Myristoyltransferase (NMT) katalysiert wird (Gordon et al., 1991). Seit der Entdeckung der Proteinmyristoylierung in der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (Carr et al., 1982) sowie in der Calcineurin-Untereinheit B (Aitken et al., 1982) wurde inzwischen eine Vielzahl von zellulären und viralen Proteinen als myristoyliert beschrieben. Viele der bekannten myristoylierten Proteine sind ursprünglich löslicher Natur und bekommen durch den Myristat-Rest eine permanente Verankerung in der entsprechenden Membran.

1.4.2 *Modifikation mit Glykolipiden*

Bei dieser Form der Modifikation liegen die Fettsäuren als Bestandteil eines Komplexes mit Ethanolamin, Phosphatidylinositol und Zuckerresten vor und sind nicht direkt mit der Polypeptidkette verbunden. Besitzen Proteine keine Folge von 20 - 30 hydrophoben Aminosäuren, so können sie über einen derartigen Komplex mit der Membran verankert werden.

1.4.3 *S-Acylierung*

Diese Form der Protein-Acylierung, nach der am häufigsten in dieser Bindung vorkommenden Fettsäure auch Palmitoylierung genannt, steht im Mittelpunkt meiner Arbeit. Die Fettsäuremoleküle sind über eine Thioester-Bindung mit Cysteinresten (Abbildung 3) in der Polypeptidkette verknüpft. Anfängliche Zweifel, ob es sich um eine Thioester- oder Oxyesterbindung handelt, konnten mit Hilfe biochemischer (Schmidt et al., 1988; Mack und Kruppa, 1988) und molekularbiologischer Untersuchungen (Gaedigk-Nitschko et al., 1990; Veit et al., 1991) ausgeräumt werden. In den meisten

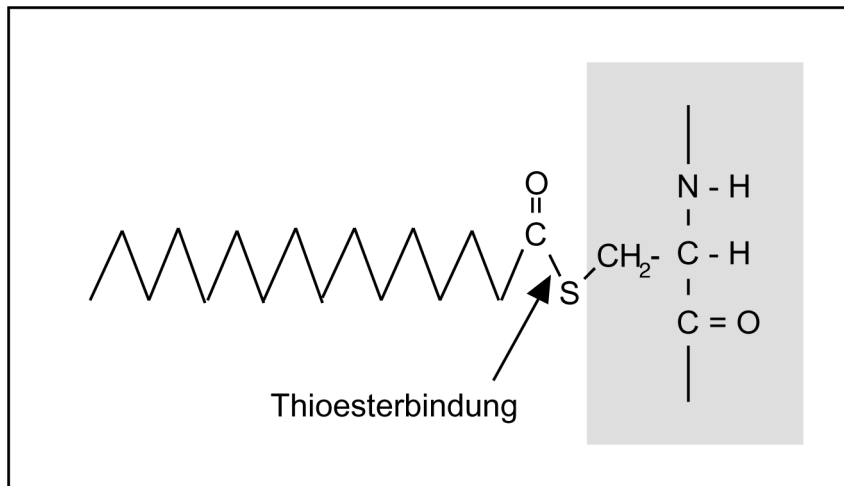


Abbildung 3: Schema der S-Acylierung

Fällen wurden die Acylierungsstellen mit molekularbiologischen Techniken identifiziert, indem die Kodons der vermutlich palmitoylierten Cysteine mittels gerichteter Mutagenese verändert wurden, so daß statt Cysteinen Serine in die Polypeptidkette eingebaut wurden. Nach Expression des veränderten Gens und Markierung mit radioaktiven Fettsäuren konnte eine Veränderung im Einbau der Fettsäuren bestimmt werden. In der überwiegenden Zahl der Fälle war nach Substitution der betreffenden Serine kein Einbau von Palmitinsäure mehr zu beobachten.

In den letzten Jahren wurde eine große Zahl von Proteinen als palmitoyliert beschrieben, darunter viele Komponenten des Nervensystems, wie Ionenkanäle, Neurotransmitter-Rezeptoren, Komponenten der Signaltransduktion und Zelladhäsionsmoleküle (Tabelle 1). Sowohl periphere als auch integrale Membranproteine können durch kovalent gebundene Fettsäuren modifiziert sein. Bisher lagen alle bei Transmembranproteinen als Acylierungsstellen identifizierte Cysteine im Bereich der Transmembranregion oder im daran angrenzenden Bereich der cytoplasmatischen Domäne. Dieser Bereich an der Grenze zwischen innerer Transmembranregion und cytoplasmatischer Domäne wird deshalb oft als Acylierungsbereich bezeichnet.

Die Anwesenheit eines Cysteinrestes in dieser Region ist allerdings nicht die einzige Voraussetzung für eine zu erfolgende Palmitoylierung, da sich der Sequenzkontext in dieser Region ebenfalls als bedeutsam erwiesen hat. Untersuchungen am nicht acy-

	Acylierungsstelle
Virus-Proteine	
Influenza A HA	...SFWM <u>C</u> SNGSLQCR <u>C</u> I...
HIV-1 gp160	...DDLRS <u>L</u> CLESYHRLRD...
Vesicular stomatitis virus G	...VLRVGIH <u>L</u> CIKLKHTKK...
Semliki Forest virus E	...VVVT <u>C</u> IGLRR...
Sindbis virus E2-Protein	...PTSLALL <u>C</u> CVRSANA...
Zelluläre Proteine	
Transferrin Rezeptor	...KANVTKPKR <u>C</u> SGSIC <u>Y</u> GTIAV...
GAP-43	ML <u>C</u> CMRRTKQVEK...
CD4	...GIFF <u>C</u> VRCRHRRRQ...
TGF	...ALLKGRTA <u>C</u> CHSETV
<i>SNARE-Proteine</i>	
Synaptotagmin I	...LVVT <u>C</u> CFV <u>C</u> KK <u>C</u> LF...
SNAP-25	...GKF <u>C</u> GL <u>C</u> V <u>C</u> P <u>C</u> NK...
<i>Rezeptoren mit sieben TMR</i>	
Rhodopsin	...MVTTL <u>C</u> CGKNPLGD...
2-Andrenerger Rezeptor	...QELL <u>C</u> LRSSL...
Dopamin D1-Rezeptor	...LLG <u>C</u> YRL <u>C</u> PAT...
Endothelin A-Rezeptor	...FQSCL <u>C</u> CC <u>C</u> YQSKS...
Endothelin B-Rezeptor	...KSCL <u>C</u> W <u>C</u> QSFEE...
Vasopressin-Rezeptor	...RSL <u>C</u> CCARGR...
Serotonin-Rezeptor	...HKLIRFK <u>C</u> TS
Somatostatin-Rezeptor 5	...FQKVL <u>C</u> LRKGS...
<i>Prenylierte und palmit. Proteine</i>	
H-Ras	...SGPG <u>C</u> MS <u>C</u> K <u>C</u> VLS
K-Ras (A)	...TPG <u>C</u> VKIKK <u>C</u> VIM
N-Ras	...GTQG <u>C</u> MGLP <u>C</u> VVM
<i>Myristoylierte und palmit. Proteine</i>	
Src Tyrosin-Kinase	Yes
	Fyn
	Lyn
	MGC <u>I</u> KSKEDKGPAMKY...
	MGC <u>V</u> Q <u>C</u> KDKEATKLTE...
	MGC <u>I</u> KSK...

Tabelle 1: **Auswahl viraler und zellulärer palmitoylierter Proteine**
Cysteine in der Palmitoylierungsregion unterstrichen

lierten F-Protein des Sendai-Virus zeigten, daß ein Cystein im Acylierungsbereich zwar für die Acylierung notwendig ist, aber nicht immer dafür ausreicht (Ponimaskin, 1994; Ponimaskin und Schmidt, 1995). Es konnte auch mittels Sequenzvergleich palmitoylierter Proteine noch keine eindeutige Konsensussequenz gezeigt werden, wengleich Phenylalanine und Glycine in der Region relativ häufig auftreten.

Die Enzymologie der Palmitoylierung ist noch weitgehend unklar. Ein Enzym, das für die Palmitoylierung zellulärer und viraler Proteine verantwortlich ist, konnte bisher noch nicht gereinigt werden. Im Gegensatz dazu wurden die Struktur und die Wirkungsweise der N-Myristoyl-Transferase (NMT) bereits ausführlich beschrieben (Übersicht bei Resh, 1999). Die Probleme bei der Reinigung einer Palmitoyl-Acyl-Transferase (PAT) liegen zum großen Teil in der Labilität, da die Palmitoylierungsaktivität meist schon nach wenigen Reinigungsschritten verloren geht (Schmidt und Burns, 1989, 1991). Außerdem wurden bereits mehrere Mechanismen zur nichtenzymatischen Palmitoylierung von Proteinen beschrieben, wie z.B. bei G_s-Untereinheiten (Duncan und Gilman, 1996) und dem c-Yes-Peptid (Bano et al., 1998). Da es sich aber bei den meisten Autopalmitoylierungsexperimenten um *in vitro*-Versuche handelte und diese keine physiologischen Konzentrationen an Akzeptorproteinen und Fettsäure-CoA aufwiesen und die Reaktionskinetik der nichtenzymatischen Acylierung für Palmitoylierungsvorgänge von Signaltransduktions-Proteinen relativ langsam ist, erscheint eine enzymatische Reaktion wahrscheinlicher. Auch wenn eine endgültigen Identifizierung der PAT gelingt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß nicht-enzymatische Mechanismen an der Palmitoylierung *in vivo* beteiligt sind.

Es gab bereits mehrere Ansätze, die enzymatische Aktivität zur Palmitoylierung partiell aufzureinigen (Berger und Schmidt, 1984; Berthiaume und Resh, 1995; Liu et al., 1996). Die aufgereinigten PATs sind membrangebunden (das G_s-palmitoylierende Enzym ist in der Plasmamembran angereichert) und sie bevorzugen Palmitoyl-CoA gegenüber anderen Fettsäure-Acyl-CoA-Substraten. In zellfreien Assays wurden diese gewonnenen PAT-Aktivitäten erfolgreich zur Acylierung verschiedener chemisch deacylierter oder unacyliert synthetisierter Substrate eingesetzt (Mack et al., 1987; Schmidt und Burns, 1989; Berthiaume und Resh, 1995, Veit et al., 1998).

Die Palmitoylierung von Polypeptiden in der Zelle erfolgt posttranslational, also nach vollendeter Synthese, aber vor der Prozessierung durch Anlagerung von High-Mannose-Resten (Schmidt und Schlesinger, 1980). Über den genauen Zeitpunkt der Acylierung gibt es unterschiedliche Erkenntnisse. Für viele Proteine konnte gezeigt werden, daß bei einer Blockade der de-novo-Proteinsynthese mit Zykloheximid eine Fettsäureanlagerung unterbunden werden konnte. Auf der anderen Seite ist es ebenfalls möglich, daß die Palmitoylierung ein dynamischer Prozeß ist, wobei Proteine auch lange nach der Synthese noch de- und wieder repalmitoyliert werden können. So wurde gezeigt, daß Hirn-Homogenat einen Pool an nichtacylierten Proteinen aufweist, die durch Inkubation mit Palmitoyl-CoA acyliert werden können (Bizzozero und Lees, 1986a). Dies spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Membranbereichen wieder, für die eine Palmitoylierungsaktivität gezeigt werden konnte. Sowohl das Endoplasmatische Retikulum (Berger und Schmidt, 1985) als auch cis-Golgi-Membranen (Dunphy et al., 1981) werden als Träger einer vermuteten Palmitoyl-Acyl-Transferase genannt, aber auch in der Plasmamembran (Olson und Spitz, 1986; Dunphy et al., 1996) sowie an Erythrozytenmembranen konnte eine solche Aktivität identifiziert werden (Staufenbiel, 1987; Schmidt et al., 1995; Das et al., 1997).

Untersuchungen zur Funktion dieser hydrophoben Modifikation basieren zumeist auf Mutanten der Proteine, bei denen die Cysteine durch Serine oder Alanine ersetzt wurden. Exprimiert man diese Konstrukte in geeigneten Systemen, kann man eventuelle Veränderungen in Lokalisation und/oder Funktion des entsprechenden Proteins ermitteln. Schwer abschätzbar bei dieser Methode ist allerdings, ob die geänderten Eigenschaften auf den Ersatz des Cysteins durch eine andere Aminosäure oder den Verlust der Palmitinsäure zurückzuführen sind.

Da die Anlagerung von Fettsäuren an Polypeptide die Hydrophobizität des Proteins erhöht, kann sie somit eine Membranverankerung ermöglichen oder verstärken, wie es für die meisten palmitoylierten peripheren Proteine nachgewiesen werden konnte (Skene und Virag, 1989; Veit et al., 1996). Da aber viele palmitoylierte Proteine transmembranen Charakters und somit fest mit der Membran verbunden sind, ist in diesem Falle die Wirkung der Fettsäure auf die Membranverankerung verhältnismäßig gering. Dies und die Tatsache, daß bei vielen palmitoylierten Proteinen ein relativ hoher Turnover der Fettsäuren beschrieben wurde, läßt vermuten, daß die Anlagerung

bzw. Abspaltung der Palmitinsäurereste auch dazu dient, die Aktivität der Proteine zu regulieren. Bei β -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine konnte beobachtet werden, daß nichtpalmitoylierte Formen nicht in der Lage sind, mit nachfolgenden Komponenten der Signaltransduktion, wie Adenylatcyclase oder Phospholipase C, zu interagieren (Wedegaertner et al., 1995).

Für verschiedene neuronale Proteine konnte eine Funktion der Palmitoylierung postuliert werden wie z.B. die Oligomerisierung von Protein-Untereinheiten in funktionelle Rezeptoren oder Kanäle. Die fünf Untereinheiten des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors können sich, wenn sie in der nichtacylierten Form synthetisiert wurden, nicht zu einem funktionellen Rezeptor zusammenlagern (Olson et al., 1984). Auch für das Myelin-Proteolipid-Protein (PLP) wurde nach Entfernen der Fettsäuren eine Konformationsänderung beschrieben, die mit der fehlenden Ausbildung eines funktionell-aktiven Komplexes (Pentamere oder Hexamere) erklärt wurde (Bizzozero und Lees, 1986b).