

2. SCHRIFTTUM

Proteine erfüllen in der Zelle wichtige Funktionen wie Transportvorgänge, Signaltransduktion und die Regulation von Stoffwechsel- und Wachstumsprozessen. Bedeutsam für ihre Funktionalität sind neben der speziellen Faltung der Proteine verschiedene Modifikationen während und nach der Proteinbiosynthese [Wold, 1981], die die Lokalisation und Konformation und somit die Aktivität des modifizierten Proteins regulieren können. Die Primärstruktur eines Proteins lässt sich eindeutig aus der Nukleotidsequenz seines Gens ableiten, aber durch die Vielfalt der Proteinmodifikationen ist die Anzahl der unterschiedlichen Proteine in einer Zelle um ein Vielfaches höher als die bloße Anzahl ihrer Gene. Zu diesen Proteinmodifikationen zählen neben proteolytischer Spaltung, Glykosylierung, Phosphorylierung und Oligomerisierung auch die hydrophoben Modifikationen (Abb. 1).

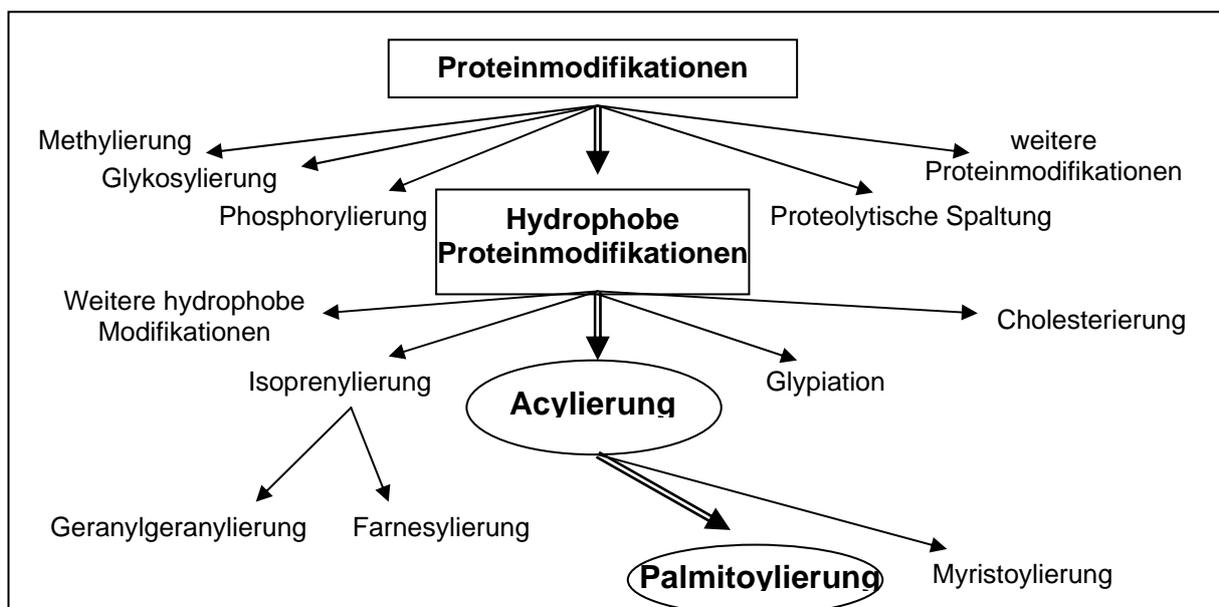


Abb. 1: Systematische Einordnung hydrophober Proteinmodifikationen.

Die Isoprenylierung stellt eine kovalente Proteinmodifikation mit Isoprenylgruppen am C-Terminus von Proteinen dar [Casey, 1992; Zhang und Casey, 1996; Gelb, 1998]. Durch Protein-Prenyltransferasen werden bestimmte verzweigte Kohlenwasserstoffreste, Farnesyl oder Geranylgeranyl, an Cystein-Reste des Proteins gebunden [Casey und Seabra, 1996]. Die Modifikation erfolgt C-terminal am Cystein der so genannten "CAAX-Box" (Konsensus-Sequenz Cystein – aliphatische Aminosäure – aliphatische Aminosäure – beliebige Aminosäure) über eine Thioetherbindung, nachdem die drei terminalen Aminosäuren (AAX) proteolytisch abgespalten wurden [Gelb et al., 1998]. Bei der Isoprenylierung handelt es sich

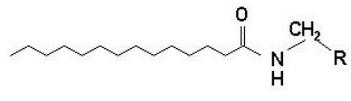
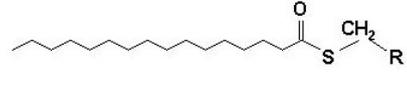
um eine irreversible Proteinmodifikation, die für bestimmte Aufgaben in der Signaltransduktion, Zellzyklus-Progression, Apoptose-Induktion, im Zytoskelett-Remodeling und Vesikeltransport erforderlich ist. Isoprenylierung kann sowohl einzeln auftreten, als auch kombiniert mit Palmitoylierung oder Myristoylierung vorkommen [Higgins und Casey, 1996; Maurer-Stroh et al., 2003].

Bei der Glypiation handelt es sich um eine kovalente Modifikation mit Glykophosphatidylinositolstrukturen [Cross, 1987; Ferguson und Williams, 1988; Udenfriend und Kodukula, 1995]. Bei dieser Membranverankerung mittels Glykophospholipiden wird die Fettsäure nicht direkt an das Protein gebunden, sondern ist Bestandteil einer komplexen Struktur aus Phosphatidylinositol, verschiedenen Zuckern und Ethanolamin. Die Modifikation erfolgt post-translational, indem nach der Translation am rauhen Endoplasmatischen Retikulum zunächst die N-terminale Signalsequenz und dann je nach Variante 17 bis 23 hydrophobe Aminosäuren vom C-Terminus abgespalten werden. Die Verknüpfung des Glykolipid-Ankers erfolgt wahrscheinlich als Ganzes mit dem Protein [Bangs et al., 1985; Ferguson et al., 1986; Kodukula et al., 1993]. Die Glypiation dient einer Membranverankerung von Proteinen, denen hydrophobe Folgen von Aminosäuren fehlen oder bei denen der ursprünglich vorhandene Membrananker aus hydrophoben Aminosäuren ersetzt wird [Chen et al., 1998; Ferguson, 1999; Chatterjee und Mayor, 2001; Coussen et al., 2001; Overbaugh et al., 2001; Eisenhaber et al., 2003].

Einige sekretierte Proteine der Familie der *Hedgehog Signaling Proteins* können durch die Modifikation der Cholesterierung nach einer autoproteolytischen Spaltung mit der dabei am C-Terminus freiwerdenden Carboxylgruppe mit Cholesterin verknüpft werden [Porter et al., 1996; Mann und Beachy, 2000].

Die Acylierung, also die kovalente Bindung von langkettigen Fettsäuren an Proteine, wurde erstmals vor ca. 50 Jahren beschrieben [Braun und Rehn, 1969; Stoffyn und Folch-Pi, 1971; Gagnon et al., 1971; Hantke und Braun, 1973]. Hierbei handelt es sich um eine häufig auftretende Proteinmodifikation, und die Zahl der neu entdeckten acylierten Proteine steigt noch immer an [Schlesinger et al., 1983; Towler et al., 1988; Resh, 1999]. Viele acylierte Proteine haben Schlüsselfunktionen in der Regulierung von Zellstruktur und Funktion, Targeting, Membranbindung und Enzymaktivität. Die beiden häufigsten Formen der Acylierung sind die bereits gut verstandene Myristoylierung und die in vielen Bereichen noch wenig entschlüsselte Palmitoylierung (*Tab. 1*), denen ihre dynamische Regulierbarkeit gemeinsam ist. Die Acylierung, und hier besonders die Palmitoylierung, steht im Mittelpunkt dieser Arbeit und wird daher im Folgenden ausführlich beschrieben.

Tab. 1: Vergleich von Myristoylierung und Palmitoylierung.

Acylierung	Modell	Bindung	Substrate
N-Myristoylierung		irreversible Amidbindung an Glycin	(C14:0) Myristoyl-CoA; co-translational
S-Palmitoylierung		reversible Thioester-Bindung an Cystein	(C16:0) Palmitoyl-CoA; post-translational

2.1 MYRISTOYLIERUNG

Unter dem Begriff der Myristoylierung wird die kovalente Anlagerung der gesättigten Fettsäure Myristinsäure (C14:0) an den N-terminalen Glycin-Rest eines Proteins über eine Amidbindung (N-Acylierung) verstanden. In den meisten Fällen erfolgt die Myristoylierung co-translational und ist eine stabile, bis auf einige Ausnahmen [da Silva und Klein, 1990] irreversible Modifikation.

2.1.1 FUNKTIONEN DER MYRISTOYLIERUNG

Röntgenstrukturanalysen einiger N-myristoylierter Proteine verdeutlichen die strukturelle Rolle der gebundenen Myristinsäure für die Stabilisierung einer dreidimensionalen Proteinkonformation. Die an virale Strukturproteine wie das VP4-Protein des Poliovirus oder das *gag*-Protein bei Retroviren gebundene Myristinsäure ist essentiell für die Virusvermehrung, da die Myristat-Untereinheit einen integralen Teil der Virion-Struktur bildet [Chow et al., 1987]. Eine durch Deletion oder Austausch des N-terminalen Glycins ausbleibende Myristoylierung verhindert die Zusammensetzung (Assembly) neugebildeter Viruspartikel sowie deren Freisetzung [Göttlinger et al., 1989; Marc et al., 1989]. Viele myristoylierte Proteine liegen membrangebunden vor und können in der Plasmamembran oder in intrazellulären Membranen in eukaryotischen Zellen gefunden werden. Allerdings dient die N-Acylierung nicht in jedem Fall einer Membranverankerung, da auch manche zytoplasmatische oder im Zellkern lokalisierte Proteine myristoyliert sind [Carr et al., 1982; Streuli and Griffin, 1987].

Durch Myristoylierung wird das Protein an der Membraninnenseite verankert [Kokame et al., 1992; Resh, 1994], wobei ein für Myristinsäure spezifischer Rezeptor eine Rolle spielen könnte [Buss et al., 1986]. Wird die Myristoylierung eines Proteins durch Mutation des Glycin-Rests inhibiert, resultiert daraus generell eine Reduzierung oder der komplette Verlust der Membranbindung. So haben Untersuchungen von pp60v-src, dem Transformierenden

Protein des Rous Sarkoma-Virus, ergeben, dass die Myristoylierung notwendig dafür ist, das *src*-Protein zur Membran zu dirigieren. Nicht-myristoylierte *src*-Mutanten binden nicht an Membranen und vermitteln keine zelluläre Transformation [Cross et al., 1984; Kamps et al., 1985]. Ebenso benötigen retro- und lentivirale *gag*-Proteine die Myristoylierung, um an die Plasmamembran zu binden und eine Viruspartikel-Formation zu ermöglichen. Eine verhinderte Myristoylierung hemmt die Membranbindung der *gag*-Proteine von murinem Leukämie-Virus, Milznekrose-Virus und HIV-1. Die Zusammenlagerung der Virionen ist bei diesen Mutanten blockiert [Gottlinger et al., 1989; Bryant and Ratner, 1990; Schultz and Rein, 1989; Weaver and Panganiban, 1990].

Obwohl eine Myristoylierung eindeutig nötig für die Membranbindung einiger Proteine ist, so ist sie dennoch nicht kräftig genug, eine stabile Bindung zu ermöglichen. Biophysikalische Untersuchungen zeigten, dass die durch das Myristat vermittelte Bindungsenergie relativ schwach ist und nicht ausreicht, das Protein vollkommen in der Membran zu verankern [Peitzsch and McLaughlin, 1993]. Um eine stabile Membranbindung zu erreichen, benötigen myristoylierte Proteine ein weiteres Membranbindungssignal, was auf verschiedene Weise erreicht werden kann (*Abb. 2*). Beispielsweise können Interaktionen mit anderen membrangebundenen Proteinen das myristoylierte Protein zusätzlich in der Membran festhalten. Ebenso kann eine Gruppe basischer Aminosäuren mit dem inneren Blatt der Bilayer-Membran interagieren, wofür die biophysikalische Basis bereits weitreichend untersucht wurde [Buser et al., 1994; Sigal und Resh, 1993; Zhou et al., 1994; Murray et al., 1998]. In der Plasmamembran sind die sauren Phospholipide überwiegend im inneren Blatt des Bilayers lokalisiert, wodurch ein Netz negativer Ladungen an der cytosolischen Seite der Membran entsteht. Nach Insertion des myristoylierten Proteins in die Lipid-Doppelschicht bilden die basischen Aminosäuren elektrostatische Interaktionen mit den sauren Phospholipid-Kopfgruppen aus [Murray et al., 1997]. Obwohl also weder hydrophobe noch elektrostatische Wechselwirkungen allein ausreichend für eine starke Membranbindung sind, summieren sie sich, wenn sowohl Myristoylierung als auch basische Motive in einem Protein auftreten. Die Anwesenheit von sechs basischen Aminosäuren in der N-terminalen Region des *src*-Proteins kann die Membranbindungsfähigkeit um annähernd das 3000-fache steigern, und so vermitteln Myristoylierung und basische Motive zusammen die Membranbindung des *src*-Proteins *in vitro* und *in vivo* und sind nötig für die zelluläre Transformation von *src* [Buser et al., 1994; Sigal et al., 1994]. Auch weitere Proteine zeigen das beschriebene Motiv aus Myristoylierung plus N-terminaler basischer Aminosäuren, wie die Proteine des HIV 1-Virus *nef* [Welker et al., 1998] und *gag* [Yuan et al., 1993; Zhou et al., 1994; Zhou and Resh, 1996]. Bei HIV-1 *gag* formt der Cluster basischer Aminosäuren ein amphipathisches β -Faltblatt, wobei fast alle positiven Ladungen zur Oberfläche des Moleküls

hin orientiert sind und mit den sauren Membran-Phospholipiden interagieren können [Zhou et al., 1994; Massiah, 1994; Matthews et al., 1994; Hill et al., 1996]. So verwundert es nicht, dass Chimären aus den Motiven von *src* und *gag* funktionell austauschbar sind und sowohl die *gag-src*-Chimäre Zelltransformation vermitteln [Zhou et al., 1994] als auch die *src-gag*-Chimäre Viruspartikel generieren kann [Verderame et al., 1996]. Alternativ kann die Membranbindung auch durch eine gleichzeitige Palmitoylierung verstärkt werden (*siehe auch Kapitel 1.2.3*). Ein ähnliches Doppelsignal-Modell existiert auch für die Membranbindung isoprenylierter Proteine, wie z.B. Ras [Hancock et al., 1990; Resh, 1994].

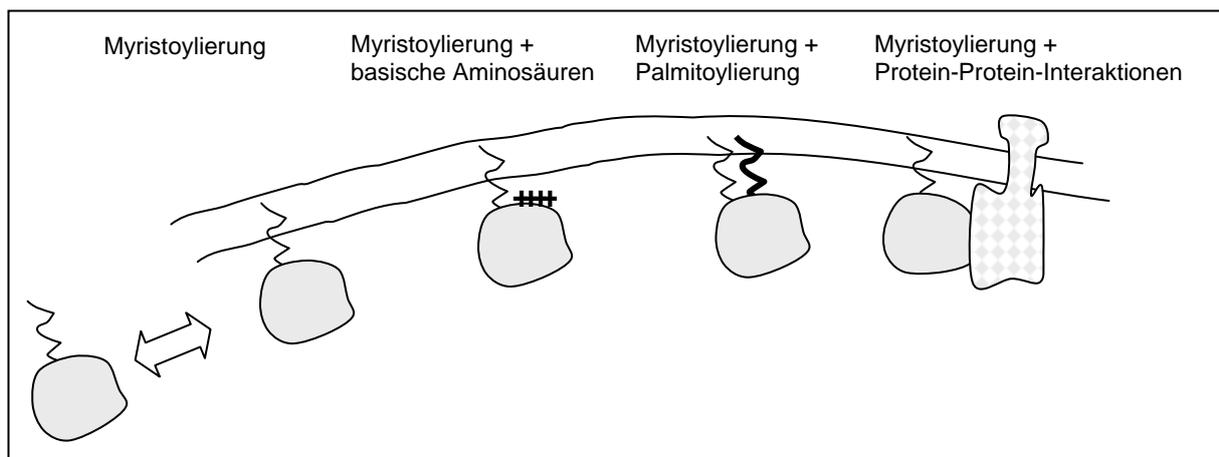


Abb. 2: Das Doppelsignal-Modell für die Membranbindung myristoylierter Proteine.

Bei einigen Proteinen dient die Myristoylierung nicht nur der Membranbindung, sondern auch dem Membran-Targeting. So zeigen Chimären löslicher Proteine eine spezifische Lokalisierung an der Plasmamembran, wenn die N-terminalen Sequenzen von *gag* oder *src* angehängt werden [Zhou and Resh, 1996; Murray et al., 1998]. Im Maso-Pfizer Monkey-Virus sammeln sich die Kapside im Cytoplasma an und bedürfen der Myristoylierung des *gag*-Proteins für den intrazellulären Transport zur Plasmamembran [Rhee and Hunter, 1987]. Die verhinderte Myristoylierung im Hefeprotein Gpa 1p oder HIV-1 *gag* dirigiert das Protein zurück zu intrazellulären Membranen, was eine Rolle der Myristoylierung im Plasmamembran-Targeting impliziert [Song et al., 1996; Hermida-Matsumoto and Resh, 1999].

Röntgenstrukturanalysen der Proteine Recoverin und *Arf-1* zeigen, dass hier die Bindungsstellen für Myristat in hydrophoben Taschen innerhalb der dreidimensionalen Struktur der Proteine liegen. In einer solchen Höhlung kann die Fettsäure verborgen vorliegen, aber nach Konformationsänderung dennoch an der Oberfläche des Proteins dargestellt werden. Diese Konformationsänderungen, die so genannten Myristoyl-Switches, bedingen die dynamische Regulierbarkeit myristoylierter Proteine, oft durch Bindung von

Calcium oder GTP [Farazi et al., 2001]. Auch in der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A ist das Myristat innerhalb einer hydrophoben Tasche positioniert und ist nötig für die Struktur- und Thermostabilität des Enzyms [Zheng et al., 1993].

2.1.2 MECHANISMEN DER MYRISTOYLIERUNG

Die Myristoylierung erfolgt co-translational, während die Proteinkette noch am Ribosom verlängert wird [Wilcox et al., 1987; Deichaite et al., 1988]. Das Enzym N-Myristoyl-Transferase (NMT) katalysiert den Transfer des Myristats vom spezifischen Fettsäure-Donor Myristoyl-CoA auf die betreffenden Proteinsubstrate [Gordon et al., 1991]. Untersuchungen an der NMT der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ergaben einen Bi-Bi-Reaktionsmechanismus, wobei zunächst Myristoyl-CoA und Peptid-Substrat an die NMT binden, dann das Myristat an das N-terminale Glycin des Peptides verlagert wird und nacheinander CoA und das Myristoyl-Peptid vom Enzym freigesetzt werden [Rudnick et al., 1990]. Die NMT konnte bereits aufgereinigt werden [Towler et al., 1987] und zeigt eine hohe Substratspezifität sowohl für die relativ selten vorkommende Myristinsäure als auch für N-terminales Glycin [Johnson et al., 1994]. Längere oder kürzere Fettsäure-CoA-Moleküle stellen nur schlechte Substrate dar. Ihre korrespondierenden Fettsäuren werden im Allgemeinen nicht von den NMTs auf die Proteine transferiert. Interessanterweise bindet Palmitoyl-CoA mit fast gleicher K_m wie Myristoyl-CoA an die NMT, allerdings wird das Palmitat von der NMT nicht auf das Protein transferiert. Da in den meisten Zellen die Konzentration von Palmitoyl-CoA bis zu 20-fach höher ist als die von Myristoyl-CoA, muss demnach ein Mechanismus existieren, der verhindert, dass Pal-CoA auf die NMT als kompetitiver Inhibitor wirken kann. Vermutet wird, dass durch die höhere Hydrophobizität Pal-CoA in Membranen angereichert wird und daher nicht erreichbar für die cytoplasmatisch lokalisierte NMT ist [Peitzsch und McLaughlin, 1993; Johnson et al., 1994].

Dennoch liegen einige N-myristoylierte Proteine wie Recoverin, Transducin und Proteinkinase A heterogen acyliert vor und beinhalten neben (C14:0) Myristinsäure auch (C12:0), (C14:1) und (C14:2) Fettsäuren [Dizhoor et al., 1992; Kokame et al., 1992]. Untersuchungen in verschiedenen Geweben ergaben jedoch, dass diese heterogene N-Acylierung vornehmlich auf die Retina beschränkt ist [Johnson et al., 1994; Demar and Anderson, 1997]. Die Gründe für diese spezifische heterogene Acylierung sind allerdings noch nicht geklärt, da der Fettsäure-CoA-Pool der Retina nahezu identisch mit dem in anderen Geweben ist [Demar and Anderson, 1997].

Proteine, die myristoyliert werden sollen, beinhalten eine Konsensus-Sequenz für die N-Myristoyl-Transferase: Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr (Met = Methionin, Gly = Glycin, Ser = Serin, Thr = Threonin, X = nicht definierte Aminosäure). Das Met₁ wird während der Translation enzymatisch durch die zelluläre Methionin-Amino-Peptidase entfernt, wobei Gly₂ die neue N-terminale Aminosäure wird. Die freie Aminogruppe des nun N-terminalen Glycins wird mit Myristinsäure durch eine Amidbindung verknüpft [Gordon et al., 1991; Johnson et al., 1994; McIlhinney, 1995; Bhatnagar et al., 1999; Fütterer et al., 2001]. Die Notwendigkeit von Glycin am N-Terminus für die Myristoylierung ist absolut, keine andere Aminosäure kann es ersetzen. Allerdings sind nicht alle Proteine mit einem N-terminalen Glycin auch myristoyliert, was zeigt, dass noch andere Aminosäuren wichtig sind, damit ein Substrat von der NMT erkannt wird. So werden meist Serin oder Threonin an Position 6 und Lysin oder Arginin an Position 7 und / oder 8 bevorzugt [Towler et al., 1988]. In den letzten Jahren wurden zwei fungale NMT-Strukturen mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht [Weston et al., 1998; Bhatnagar et al., 1998]. Beide Untersuchungen zeigen, dass die NMT ein kompaktes, globuläres Molekül ohne strukturelle Homologien zu anderen Proteinen darstellt. Bindungsanalyse der NMT der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigte, dass Myristoyl-CoA in fragezeichenähnlicher Konformation bindet und zusammen mit den C-terminalen Regionen der NMT einen Teil der Peptidbindungsstelle formt. Diese Struktur erlaubt die Identifikation spezifischer Reste innerhalb der NMT und damit die Beschränkung der Substratspezifität auf 14-Carbon-Fettsäuren, was die Bedeutung der Aminosäuren Gly₂ und Ser₆ und der basischen Aminosäuren an Position 7 und 8 des Peptid-Substrats unterstreicht [Bhatnagar et al., 1998].

In Säugetierzellen ist die Mehrheit der NMT im Cytoplasma lokalisiert [Giang and Cravatt, 1998], obwohl dennoch eine signifikante Menge nach Western Blot auch in der Membranfraktion vorhanden ist [McIlhinney, 1995; McIlhinney and McGlone, 1996]. Diese wird eventuell sogar noch unterschätzt, da in der Membran die Existenz von NMT-Inhibitoren beschrieben wurde [Raju et al., 1997]. Ein Teil dieser aufgereinigten Membranfraktionen könnte allerdings auch von an ribosomale Membranen gebundener NMT repräsentiert werden.

In Pilzen wird die NMT von nur einem Gen (Single-Copy-Gene) kodiert, bei Säugetieren von zwei Genen [Giang and Cravatt, 1998]. Beide Isoformen, NMT-1 und NMT-2, sind zu 77 % identisch, ubiquitär exprimiert, und zeigen ähnliche Substratspezifität, wobei NMT-2 als einzelne 65 kDa-Bande auf Polyacrylamidgelen wandert, während NMT-1 multiple Isoformen zwischen 49 und 68 kDa zeigt [Glover and Felsted, 1995; Giang and Cravatt, 1998]. Einige dieser Isoformen könnten das Resultat von alternativem Splicing sein [McIlhinney et al.,

1998]. Die Deletion des Gens, das für NMT kodiert, führt in Pilzen zu rezessiver Letalität [Duronio et al., 1989], womit die NMT ein attraktives Ziel für antimykotische Therapien sein könnte. Pilz- und Säugetier-NMTs haben zwar überlappende, aber dennoch unterschiedliche Substrat-Spezifitäten, weshalb es möglich sein sollte, Bereiche auszusuchen, die nur die fungale, nicht aber die humane NMT hemmen. Entwickelte de-peptidisierte fungale NMT-Hemmer versprechen gute Erfolge als Fungizide bei *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans*, zwei Organismen mit großer Bedeutung bei systemischen Pilzinfektionen immunsuprimierter Individuen [McWherter et al., 1997; Sikorski et al., 1997; Lodge et al., 1998].

2.2 PALMITOYLIERUNG

Unter dem Begriff der Palmitoylierung wird die kovalente Verknüpfung langkettiger Fettsäuren mit Proteinen verstanden, die bei den verschiedensten viralen und zellulären Proteinen gefunden werden kann und weit verbreitet ist. In der Literatur wird der Begriff Palmitoylierung synonym mit S-Acylierung verwendet [Casey, 1994; Dunphy und Linder, 1998]. Größere Aufmerksamkeit erhielt das Thema Palmitoylierung erst Ende der siebziger Jahre, als beobachtet wurde, dass sich einige Proteine behüllter Viren mit radioaktiven Fettsäuren markieren ließen [Schmidt und Schlesinger, 1979; Schmidt et al., 1979]. Die Bedeutung dieser Modifikation stellte sich allerdings erst später nach genaueren Untersuchungen dar. So führte der Nachweis des Einbaus radioaktiv gebundener Fettsäuren in das G-Protein des Vesicular Stomatitis-Virus [Schmidt und Schlesinger, 1979] zu genaueren Untersuchungen an viralen Glykoproteinen [Schmidt, 1982] und dadurch zu intensivierter Forschung. Später gelang auch der Nachweis der Palmitoylierung für zelluläre Proteine unterschiedlichster systematischer Herkunft und intrazellulärer Lokalisation [Schlesinger et al., 1980; Omary und Trowbridge, 1981; Schlesinger et al., 1983]. Im Gegensatz zu anderen Proteinmodifikationen wie der Myristoylierung oder Isoprenylierung ist die Palmitoylierung bis auf einige Ausnahmen [Parat und Fox, 2001] reversibel [Casey, 1994]. Während Biologie und Enzymologie der Protein-N-Myristoylierung bereits ausführlich charakterisiert werden konnten, sind weder der Mechanismus noch die Funktion der Palmitoylierung bisher vollständig charakterisiert, und lediglich aus der Primärstruktur eines Proteins lässt sich keine Voraussage über dessen Palmitoylierung treffen.

2.2.1 PALMITOYLIERTE PROTEINE

Noch immer gibt es ständig Neuentdeckungen palmitoylierter Proteine. In allen untersuchten eukaryotischen Zellen (Hefe-, Trypanosomen-, Insekten-, Vertebratenzellen) können

palmitoylierte Proteine gefunden werden. In diesen Zellen gezüchtete Viren können palmitoylierte Proteine exprimieren [Veit und Schmidt, 1998]. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl palmitoylierter Proteine entdeckt, darunter viele Komponenten des Nervensystems wie Ionenkanäle, Neurotransmitter-Rezeptoren, Komponenten der Signaltransduktion und Zelladhäsionsmoleküle. Obwohl es auch einige sekretierte Proteine gibt, die palmitoyliert werden, ist die überwiegende Anzahl membrangebunden, wobei sowohl integrale als auch periphere Membranproteine palmitoyliert sein können [Schmidt, 1989; Dunphy und Linder, 1998; Resh, 1999].

Die Gruppe der peripheren Membranproteine enthält Ras- und Ras-verwandte Proteine, manche α -Untereinheiten der G-Proteine und N-terminal acylierte Proteine [Hancock et al., 1990; Degtyarev et al., 1993]. Integrale Glykoproteine entstammen sowohl viraler als auch zellulärer Herkunft, wobei die Acylierung in der Nähe des membranspannenden Segments stattfindet [Schmidt et al., 1989]. Es wurde eine Einteilung palmitoylierter Proteine in vier Gruppen vorgeschlagen [Resh, 1999], wobei die erste Gruppe Transmembranproteine beinhaltet, welche an juxtamembranär liegenden Cysteinen acyliert sind. Gruppe zwei enthält hiernach Proteine der Ras-Familie, die in der C-terminalen Region palmitoyliert werden, nachdem sie zuvor an Cystein-Resten in der „CAAX“-Box prenyliert worden sind [Berthiaume, 2002]. Proteine der Gruppe drei haben ihre Palmitoylierungsstelle in der Nähe des N-Terminus, wobei ein oder mehrere Cystein-Reste innerhalb der ersten 10-20 N-terminalen Aminosäuren liegen. Auch bei Proteinen der Gruppe vier liegt die Palmitoylierungsstelle nahe dem N-Terminus des Proteins. Hier handelt es sich ebenfalls um eine doppelte hydrophobe Modifikation. Die Proteine beinhalten jeweils eine Konsensus-Sequenz bestehend aus den Aminosäuren Methionin, Glycin und Cystein (MGC), wobei am Glycin-Rest myristoyliert und am Cystein in Position 3 palmitoyliert wird. Die Myristoylierung scheint eine Voraussetzung für die Palmitoylierung zu sein [Alland et al., 1994; Mumby et al., 1994].

Eine besser strukturierte Darstellung palmitoylierter Proteine sieht die Einteilung in integrale und periphere Membranproteine vor, wobei letztere wiederum aufgrund der N-terminalen, C-terminalen oder internen Lage ihrer acylierten Cystein-Reste unterschieden werden können. Bei der N-terminalen Palmitoylierung gibt es sowohl eine unabhängige Palmitoylierung als auch eine Palmitoylierung nach zuvor erfolgter Myristoylierung, die mit und ohne MGC-Motiv als Konsensus-Sequenz auftreten kann (*Tab. 2 - 5*) [Veit, 2002a].

Tab. 2: Palmitoylierungsstellen in zellulären und viralen integralen Membranproteinen.

Die palmitoylierten Cysteine sind fett gedruckt und unterstrichen dargestellt (modifiziert nach Resh, 1999 und Veit, 2002a).

Zelluläre Proteine	
TGF- α	...EKPSALLKGRTA <u>CC</u> HSETVV...-COOH
P-Selectin	...KDDGK <u>C</u> PLNPHS...-COOH
Transferrin-Rezeptor	...TG <u>Y</u> <u>C</u> ISGS <u>C</u> RKPKTVNAKTNNDANEEEDVAL...-NH ₂
HLA-B7	...GAVVAAVM <u>C</u> RKRKSSGGKGGSYSQAACSD...-COOH
CD4	...GIFF <u>C</u> VR <u>C</u> RHRRRQAERMSSQIKRLLSEKKT...-COOH
Synaptotagmin 1	...VT <u>CC</u> <u>F</u> <u>C</u> V <u>C</u> CKK <u>C</u> LFKKNKKNKKGKEKGGKNA...-NH ₂
snc 1 (aus Hefen)	...IIVLAL <u>C</u> MKMKLDKYWMAKRV...-COOH
p63	...LALYFLFNLARGRR <u>S</u> <u>C</u> SASSSAAAA...-NH ₂
Surfactant-Protein C	...VILVVVVVILLRKLHVP <u>CC</u> PIGF...-NH ₂
Virale Proteine:	
Vesicular Stomatitis-Virus G-Protein	...LIIGLFLVLRVGIHL <u>C</u> IKLKRATKKRQIYTDIE...-COOH
Influenzavirus A-Hämagglutinin (H1)	...M <u>S</u> NSGLQ <u>C</u> R <u>I</u> <u>C</u> I-COOH
Influenzavirus A-Hämagglutinin (H7)	...AMGLVFI <u>C</u> VKNGNM <u>R</u> <u>C</u> T <u>I</u> <u>C</u> I-COOH
Newcastle Disease-Virus Fusionsprotein	...LSLVLA <u>C</u> YLMYKKAQQKTLWLGNNTLDQ...-COOH
Semliki Forest Virus E2-Protein	...AS <u>C</u> YMLAAARSK <u>C</u> LTPYALTPGAAVPWTLGIL <u>CC</u> A...-COOH
Adenovirus "death protein"	...FVCLIIIMWLI <u>CC</u> LKRK...-COOH
Sindbisvirus E2-Protein	...PTSLALL <u>CC</u> VRSANA-COOH
Sindbisvirus 6K-Protein	...R <u>CC</u> <u>SC</u> CLPF-COOH
HIV-1 gp160	...DDLRS <u>L</u> <u>C</u> LFSYHRLRD...-COOH
Rift Valley Fever-Virus G2-Protein	...FSSIAI <u>C</u> LAVL...-COOH
7-TMR-Rezeptorproteine:	
Rhodopsin	...NPVIYIMMKNQFRNCMVTTL <u>CC</u> GKNPLGD... -COOH
β 2-Adrenalin	...NPLIYCRSPDFRIAFQELL <u>C</u> LRRSSLKAYG...-COOH
Dopamin D1	...NPIIYAFNADFRKAFSTLLG <u>C</u> YRL <u>C</u> PAT... -COOH
Serotonin 5HT _{1b}	...PVIIYTM SNEDFQAFHKLIRFK <u>C</u> TS... -COOH
α 2A Adrenalin-Rezeptor	...RRAFKKIL <u>C</u> RGDRKRIV-COOH
LH/hCG-Rezeptor	...LLSRFG <u>CC</u> KRRAELYRRK...-COOH
Endothelin A-Rezeptor	...FQS <u>C</u> <u>L</u> <u>CC</u> <u>CC</u> YQSKS...-COOH
Endothelin B-Rezeptor	...KRFKNCFKSCL <u>CC</u> <u>W</u> <u>C</u> QSFE...-COOH
Vasopressin-Rezeptor	...SVSSELRSLL <u>CC</u> ARGRTPPS...-COOH
Neurokinin B-Rezeptor	...RAGFKRAFRW <u>C</u> PFIQVSSYD...-COOH

Tab. 3: N-terminal palmitoylierte Proteine.

Das MGC-Motiv bzw. myristoylierte Glycin-Reste sind fett gedruckt, palmitoylierte Cysteine sind fett gedruckt und unterstrichen dargestellt (modifiziert nach Resh, 1999 und Veit, 2002a).

Myristoylierte und palmitoylierte Proteine mit MGC-Motiv	
src-Familie der Tyrosin-Proteinkinasen	
<i>yes</i>	MGC <u>IKSKEDKGPAMKY</u>
<i>fyn</i>	MGC <u>VQCKDK</u> EATKLTE
<i>lyn</i>	MGC <u>IKSKRKDNLNDDE</u>
<i>lck</i>	MGC <u>VCSSNPEDDWMEN</u>
<i>hck</i>	MGC <u>MKSKFLQVGGNTG</u>
<i>fgr</i>	MGC <u>VFCKKLEPVATAK</u>
<i>yrc</i>	MGC <u>VHCKEKISGKGQG</u>
G α Untereinheiten	
α_{i1}	MGC <u>TL</u> SAEDKAAVERS
α_o	MGC <u>TL</u> SAEERAALERS
α_z	MGC <u>RQSSEEKEAARRS</u>
Myristoylierte und palmitoylierte Proteine ohne MGC-Motiv	
eNOS	MGNLKS $\underline{VQEPGPPCGLGLGLGLGLC}$ GK
AKAP18	MGQL <u>CC</u> FPFSRDEGK
Vac8p	MG <u>SCC</u> SCLKD
N-terminal palmitoylierte, aber nicht myristoylierte Proteine	
G α Untereinheiten	
α_s	M <u>GL</u> GNSKTEDQRNE (Glycin nicht myristoyliert)
α_q	MTLESIM <u>ACL</u> SEEAKEA
α_{12}	MSGVVRTLSR <u>CLL</u> PAEAG
α_{13}	MADFLPSRSVLSV <u>CFPQC</u> VLTNGEAEQQRKSKEIDK <u>CLS</u>
α_{16}	MARSLRWR <u>CCP</u> WCLTEDEKAA
GAP-43	ML <u>CC</u> MRRTKQVEKNDDQKIEQDGI
PSD-95	MD <u>CLC</u> IVTTKKYRYQDEDTP
Ca ²⁺ Kanal β 2a-Untereinheit	M <u>QC</u> GLVHRRRV
GRK6	...FSRQD <u>CCGN</u> SDSEEELPTL
RGS4	M <u>CK</u> GLAGLPASCLRSKDMK

Tab. 4: C-terminal palmitoylierte und isoprenylierte Proteine.

Die "CAAX-Box" ist durch Fettdruck markiert. Palmitoylierte Cysteine sind fett gedruckt und unterstrichen (modifiziert nach Resh, 1999 und Veit, 2002a).

H-Ras	...SGPG <u>C</u> MS <u>CK</u> CVLS-COOH
N-Ras	...GTQG <u>C</u> MGLP <u>CV</u> VM-COOH
K-Ras-A	...TPG <u>C</u> VKIKK <u>CV</u> IM-COOH
K-Ras-B	...KKKSKTK <u>CV</u> IM-COOH
Paralemmin	...DMKKHR <u>CK</u> CSIM-COOH

Tab. 5: Zentral palmitoylierte Proteine.

Cysteine sind fett gedruckt und unterstrichen. Nicht für jedes Cystein ist eine Acylierung nachgewiesen (modifiziert nach Veit, 2002a).

SNAP-25B	NH ₂ -...EKNLTDLGKFC <u>G</u> L <u>C</u> V <u>C</u> P <u>C</u> NKLNKSSDA...-COOH
SNAP-25A	NH ₂ -...EKNLKDGLGK <u>CC</u> GLF <u>C</u> P <u>C</u> NKLNKSSDA...-COOH
SNAP-23	NH ₂ -...ELNK <u>CC</u> GL <u>C</u> V <u>C</u> P <u>C</u> NRTKNFESGKNYK...-COOH
SNAP-29	NH ₂ -...EKMVDKMDQDLKMSQKHINSIKSVFG...-COOH
CHIC	NH ₂ -...LL <u>C</u> G <u>C</u> L <u>CCCC</u> TLG <u>C</u> SMWPV <u>C</u> L...-COOH
Cysteine String-Protein	NH ₂ -...VVCGLLT <u>CC</u> <u>Y</u> <u>CCCC</u> L <u>CCC</u> F <u>CCC</u> GK <u>C</u> KPKA...-COOH

Der Nachweis der Fettsäurebindung beruht meist auf einer metabolischen Markierung mit radioaktiven Fettsäuren und einer anschließenden Untersuchung der Acylierung mittels eindimensionaler Gelelektrophorese und Fluorographie der Proteingele. Mit Hilfe dieser Methode konnte eine S-Acylierung für viele zelluläre Proteine aus unterschiedlichen Spezies und Kulturen verschiedenster Zellen nachgewiesen werden. Eine bedeutende Gruppe bilden dabei acylierte Rezeptoren [Kawate und Menon, 1994; Ng et al., 1993, 1994; Bouvier et al., 1995; Zhu et al., 1995; Alaluf et al., 1995] und an der intrazellulären Signalübertragung beteiligte Proteine [Milligan et al., 1995; Wedegaertner et al., 1995; Casey, 1994], aber auch verschiedene andere Proteine weisen gebundene Fettsäuren auf. Unter den Viren mit palmitoylierten Proteinen befinden sich sowohl RNA- als auch DNA-Viren, jedoch ausschließlich behüllt. Häufig sind die palmitoylierten Proteine an der Bildung von Spikes auf der viralen Lipidhülle beteiligt. Die meisten dieser palmitoylierten Spikeproteine bestehen aus einem kurzen intraviralen Abschnitt, einer Sequenz von 15 bis 25 hydrophoben Aminosäuren, die die Virusmembran überbrücken, und einem großen extraviralen Teil, der häufig der Bindung der Viren an die Wirtszellmembran und / oder der Fusion mit dieser dient. Eine hiervon abweichende Struktur zeigt beispielsweise das M2-Protein der Influenza A-Viren [Sugrue et al., 1990; Veit et al., 1991; Holsinger et al., 1995].

2.2.2 FUNKTIONEN DER PALMITOYLIERUNG

Die Frage nach der Bedeutung der Palmitoylierung für die biologische Aktivität oder ihre Auswirkung auf die strukturelle Funktion der Proteine ist von großem Interesse. Durch Acylierung ändert sich der Charakter eines Polypeptids in vielerlei Hinsicht, wodurch neue Reaktionseigenschaften wie Membran-Interaktionen und Konformationsänderungen möglich werden. So kann eine Änderung der Hydrophobizität bei cytosolischen Proteinen eine Membranbindung durch Verankerung der Proteine mittels der Fettsäuren bewirken [Molenaar et al., 1988; Skene und Virag, 1989; Bhatnagar et al., 1997]. Eine Deletion der Palmitoylierungsregion des Proteins SNAP-25 führt beispielsweise dazu, dass dieses nur

noch ausschließlich im Cytosol vorliegt [Lane und Liu, 1997; Veit, 2000; Gonelle-Gispert et al., 2000; Washbourne et al., 2001]. Besonders zuvor myristoylierte Proteine, die sich mit ihrem Myristinsäurerest lose in Membrannähe anlagern, werden durch die Palmitoylierung fest im inneren Blatt der Lipid-Doppelschicht verankert [Alland et al., 1994; Bhatnagar et al., 1997; McCabe und Berthiaume, 1999], während die Hydrophobizität der kurzkettigen Myristinsäure allein nicht ausreicht, um das Peptid dauerhaft in der Membran zu befestigen [Peitzsch und McLaughlin, 1993; Shahinian und Silvius, 1995]. Allerdings wird in einigen Proteinen für den Prozess der Palmitoylierung selbst auch eine vorläufige Membranbindung benötigt. Dies dient vermutlich dazu, einen Kontakt mit dem Palmitoyl-CoA-transferierenden Enzym zu ermöglichen. So ist für eine Palmitoylierung von α -Untereinheiten der hydrophilen G-Proteine eine schwache Membran-Assoziation des Proteins durch Myristoylierung oder aber durch andere Mechanismen entscheidend. Wird eine α -Untereinheit ohne Myristoylierungssignal exprimiert, so unterbleibt die Membranbindung des Proteins und damit auch dessen Palmitoylierung. Erst bei gleichzeitiger Expression des $\beta\gamma$ -Komplexes kann eine Palmitoylierung der α -Untereinheit auch ohne vorherige Myristoylierung des Proteins ablaufen, weil die Membranbindung des heterotrimeren Komplexes in diesem Fall über die isoprenylierte γ -Untereinheit ermöglicht wird [Ponimaskin et al., 1998].

Da die Anlagerung von Fettsäuren an Polypeptide die Hydrophobizität des Proteins erhöht, kann sie somit eine Membranverankerung ermöglichen oder verstärken, wie für die meisten palmitoylierten peripheren Proteine nachgewiesen werden konnte [Skene und Virag, 1989; Veit et al., 1996]. Da aber viele palmitoylierte Proteine fest mit der Membran verbunden sind, werden die Fettsäuren demnach nicht für die stabile Membran-Verankerung des betreffenden Acylproteins benötigt [Veit et al., 1991], weshalb es für integrale Membranproteine andere Funktionen der Palmitoylierung geben muss. Beispielsweise ist ein Einfluss der S-Acylierung auf den intrazellulären Transport von Proteinen denkbar. Diese werden vom Ort der Proteinbiosynthese, dem rauhen Endoplasmatischen Retikulum (rER), über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran geleitet, indem sich Vesikel von den intrazellulären Membranen abschnüren und mit peripheren Membranen wieder verschmelzen. Schon seit langem wird vermutet, dass die Protein-Palmitoylierung beim vesikulären Transport von Proteinen eine Rolle spielt. Diese Theorie stützt sich auf die gesteigerte Transportaktivität in Anwesenheit aktivierter Fettsäuren, wobei Palmitoyl-CoA sowohl das Budding als auch die Fusion der Transportvesikel fördert. Die Palmitinsäure muss allerdings vom CoA auf das Protein übertragen werden, da ein nicht übertragbares De-Thio-Palmitoyl-CoA-Analogon den Transport hemmt. Hieraus wurde abgeleitet, dass für die Transport-Prozesse funktionell relevante, allerdings noch nicht identifizierte Proteine acyliert und damit aktiviert werden können [Pfanter et al., 1989, 1990].

Für virale Transmembranproteine wird eine Rolle der Acylierung beim Eindringen in die Wirtszellen [Lambrecht und Schmidt, 1986; Naeve und Williams, 1990] sowie bei der Morphogenese und Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel postuliert [Schlesinger und Malfer, 1982; Gaedigk-Nitschko et al., 1990; Gaedigk-Nitschko und Schlesinger, 1991; Ivanova und Schlesinger, 1993]. So ist sowohl das gp 41-Protein des HIV [Rousso et al., 2000] als auch das Fusionsprotein des Masernvirus [Caballero et al., 1998] palmitoyliert, was jeweils für die Fusionsfähigkeit des betreffenden Virus essentiell ist. Inhibierung der Acylierung im E2-Protein des Sindbis Virus erschwert das Budding der Viruspartikel [Ivanova und Schlesinger, 1993]. Allerdings gibt es auch Fälle, in denen bei viralen Proteinen keine Unterschiede zwischen acylierten und nicht-acylierten Proteinen beobachtet werden konnten [Whitt und Rose, 1991].

Besonders intensive Untersuchungen zur Funktion der Palmitoylierung viraler Proteine wurden mit dem Hämagglutinin (HA) der Influenza A-Viren durchgeführt. Sowohl der intrazelluläre Transport des HA vom Endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran als auch die Fähigkeit des HA, an Rezeptoren auf Erythrozyten zu binden, waren ohne Fettsäuren erhalten. Eine Kontrolle der Fusionsaktivität des Hämagglutinins wurde durch die Verschmelzung der HA-exprimierenden Zellen zu Synzytien bestimmt, wobei bis auf eine Ausnahme [Naeve und Williams, 1990] keine Unterschiede zwischen acyliertem und fettsäurefreiem HA festzustellen waren [Steinhauer et al., 1991; Veit et al., 1991; Naim et al., 1992; Philipp et al., 1995]. Genauere Untersuchungen der Fusionsfähigkeit zeigten weder einen Einfluss der Palmitoylierung des HA auf die Kinetik des Lipidaustausches zwischen Zielzelle und HA-exprimierender Zelle noch auf die Öffnung der Fusionspore [Philipp et al., 1995]. Gleiches gilt für die Kinetik der Membranfusion bei niedrigem pH [Schroth et al., 1996]. Die Acylierung ist aber notwendig für das wiederholte Öffnen und Schließen der Fusionspore, das so genannte Flickering [Melikyan et al., 1997]. Auch die Erweiterung der Fusionspore ist bei Zellen, die nicht acyliertes HA exprimierten, blockiert oder zeitlich stark verzögert [Fischer et al., 1998]. Während beim Influenza A-Virus Hämagglutinin des Subtyps H3 keine Unterschiede im Budding der Partikel, der Fusionsauslösung und der Infektiosität zwischen palmitoyliertem und unpalmitoyliertem HA feststellbar waren, erfolgte beim Subtyp H1 bei fehlender Palmitoylierung keine Freisetzung neugebildeter Viruspartikel [Zurcher et al., 1994; Jin et al., 1996].

Ein weiterer Effekt kovalent gebundener Fettsäuren in integralen Membranproteinen wird durch Protein-Protein-Wechselwirkungen hervorgerufen, so dass die Acylkette an der Signaltransduktion durch die Lipidmembran ins Innere der Zelle beteiligt ist [Karnik et al., 1993; Degtyarev et al., 1993; Resh, 1996; Dunphy und Linder, 1998; Nakamura, 1998]. Auch

die Einbeziehung palmitoylierter Proteine in Interaktionen zwischen integralen und peripheren Membranproteinen wird vermutet, die wiederum für die Signaltransduktion von Rezeptoren zu G-Proteinen in eukaryoten Zellen wie auch für Virus-Assembly und Freisetzung der Viruspartikel erforderlich sind [O'Dowd et al., 1989; Casey, 1994].

Eine ausführliche *in vivo*-Studie zeigt, dass die S-Acylierung der non-Rezeptor-Protein-Tyrosinkinase p56 *lck* essentiell für die Signalübertragungsfunktion des Proteins in T-Lymphozyten ist [Kabouridis et al., 1997]. Das Protein p56 *lck* ist, ähnlich wie p59 *fyn*, N-terminal an der Aminosäuresequenz MGCVC dual acyliert. Hemmung der Palmitoylierung hat sowohl Auswirkung auf die Lokalisation des Proteins in der Zelle als auch auf seine biologische Aktivität. Bei Austausch beider Palmitoylierungsstellen wird das Protein nach Expression in Zellen nicht mehr in die Nähe der inneren Plasmamembran gesteuert, wodurch keine Interaktion mit dem T-Zell-Antigenrezeptor zustande kommt und somit funktionell die essentielle Signalübertragung über diesen Rezeptor gestört wird. Die Palmitoylierung bewirkt regulatorisch eine Zielsteuerung der Proteine an die entsprechenden Wirkungsorte, meist die innere Plasmamembran, was somit zur Übertragung von Zellkommunikationssignalen führt. Innerhalb der Plasmamembran können die Proteine auch zu verschiedenen Regionen, wie beispielsweise zu Lipid Rafts oder Caveolae, dirigiert werden [Resh, 2004].

Diese erwähnten Lipid Rafts stellen, wie auch die so genannten Caveolae, uneinheitliche Bereiche in der Lipidmembran eukaryoter Zellen dar, die sich in ihrer Lipidzusammensetzung von der restlichen Plasmamembran unterscheiden. In den Lipid Rafts herrschen Cholesterin, Glykosphingolipide und Phospholipide mit ausschließlich gesättigten Fettsäuren vor, was ihre Unlöslichkeit in Detergenz bedingt und ihnen eine geordnetere Struktur verleiht [Magee und Parmryd, 2003]. In diesen Membranbereichen werden bestimmte Proteine mit deutlich hydrophoben Strukturen wie GPI-Anker oder mehrfacher Acylierung angereichert, um ihnen eine Interaktion miteinander zu ermöglichen. Durch reversible Palmitoylierung z.B. von Proteinen der Signaltransduktionskaskade kann so Einfluss auf die Stärke eines Signals über Anreicherung der betreffenden Proteine in diesen Gebieten genommen werden. Auch Neuroproteine wie VAMP und SNAP-25 liegen in den Rafts vor [Lang et al., 2001; El-Husseini und Bredt, 2002; Patterson, 2002].

Am Modell von p59 *fyn* konnte in *in vivo*-Studien gezeigt werden, wie Proteine an die Plasmamembran dirigiert werden [van't Hof und Resh, 1997]. Ohne die genauen molekularen Mechanismen aufzudecken, wurde gezeigt, dass p59 *fyn* als cytosolisches Protein synthetisiert wird, dann aber schnell mit der inneren Plasmamembran assoziiert,

worauhin eine langsame Ansiedlung in den Detergenz-resistenten Regionen, den Lipid Rafts, innerhalb der Plasmamembran erfolgt. Diese Lokalisationsvorgänge sind geprägt von schneller Kinetik. So ist die Acylierung nicht nur bedeutend für eine Membranverankerung, sondern auch für die Steuerung neusynthetisierter Proteine an bestimmte Lokalisationen oder Untereinheiten im Zellsystem. Genetisch veränderte p59 *fyn*-Mutanten mit fehlender Myristoylierungs- oder Palmitoylierungsstelle sind in der Lokalisation gestört [Kabouridis et al., 1997]. Auch für andere dual acylierte Proteine ist eine Anreicherung in Rafts bereits beschrieben, wie für die α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine und Mitglieder der Familie der *src*-Kinasen.

Auch Markerproteine wie GFP werden nach Chimärenbildung mit dem N-terminalen Ende von G α zu Lipid Rafts dirigiert [Simons und Toomre, 2000], was die Potenz der Acylierung für das Targeting von Proteinen ausdrückt. Allerdings bedingt eine Palmitoylierung nicht immer auch eine Anreicherung in Lipid Rafts, wie ein Vergleich zweier Glykoproteine der Influenza-Viren zeigt. Während eine Palmitoylierung das Hämagglutinin der Influenza A-Viren in Lipid Rafts anreichert, liegt das HEF-Protein der Influenza C-Viren ebenfalls acyliert außerhalb der Rafts in der Membran vor [Zhang et al., 2000].

Der Vorgang der Palmitoylierung stellt im Gegensatz zur Myristoylierung eine reversible Proteinmodifikation dar. Untersuchungen an verschiedenen peripheren Membranproteinen zeigen, dass diese Modifikation durch dynamische De- und Repalmitoylierung die Potenz hat, die intrazelluläre Lokalisation und damit auch die biologische Aktivität dieser Proteine zu modulieren. Damit hat die Palmitoylierung entscheidende Bedeutung für die Funktion der Proteine [Paige et al., 1993; Casey, 1994; Wedegaertner und Bourne, 1994; Veit et al., 1994; Milligan et al., 1995; Wedegaertner et al., 1995; Dunphy und Linder, 1998]. Die Theorie über eine dynamische Rolle der Palmitoylierung wurde aus der Tatsache gewonnen, dass bei vielen palmitoylierten Proteinen ein relativ hoher Turn-Over der Fettsäuren beschrieben wurde.

Bei der zellulären Signaltransduktion liegen die drei Untereinheiten der G-Proteine als Komplex an der Membran vor. Bindet ein Signalstoff an den betreffenden Rezeptor, bewirkt dies eine Konformationsänderung im cytoplasmatischen Teil des Rezeptors, wodurch die G-Proteine an diese Domäne binden können. Dadurch kommt es zu einem Austausch von GDP gegen GTP in der α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine, woraufhin G α vom $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert. Nach Bindung an ein Effektor-Protein wie z.B. die Adenylat-Cyclase wird dieses dadurch ebenfalls aktiviert. Schließlich hydrolysiert die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit das GTP, wodurch die Inaktivierung erfolgt und die α -Untereinheit

wieder mit der β - und γ -Untereinheit reassoziert, was den Ausgangszustand wieder herstellt [Gilman, 1995]. Unpalmitoylierte Formen der α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine können allerdings nicht mit nachfolgenden Komponenten der Signaltransduktion, wie der Adenylatcyclase oder der Phospholipase C, interagieren [Wedegaertner et al., 1995; Jones, 2004].

Auch das Cytokin TGF- α weist zwei palmitoylierte Cystein-Reste auf, die eine entscheidende Rolle in der Interaktion von TGF- α mit assoziierten Proteinen spielen und so für die Integrität und Funktion dieses Protein-Komplexes entscheidend sind [Shum et al., 1996]. Für verschiedene neuronale Proteine konnte ebenfalls eine Funktion der Palmitoylierung postuliert werden, indem die Oligomerisierung von Protein-Untereinheiten in funktionelle Rezeptoren oder Kanäle durch fehlende S-Acylierung verhindert wird. So kann keine Zusammenlagerung der fünf Untereinheiten des nikotinergen Acetylcholin-Rezeptors zu einem funktionellen Rezeptor erfolgen, wenn diese in der nicht-acylierten Form synthetisiert wurden [Olson et al., 1984]. In gleicher Weise lässt sich nach Entfernung der Palmitinsäure-Reste auch für das Myelin-Proteolipidprotein (PLP) eine Konformationsänderung beobachten, die mit der fehlenden Ausbildung eines funktionell aktiven Komplexes erklärt wird [Bizzozero und Lees, 1986]. Auch die Regulation enzymatischer Prozesse durch Palmitoylierung aktiver Regionen wird postuliert, wie beispielsweise in den Enzymproteinen Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase (MMSDH) und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) [Berthiaume et al., 1994]. Für einige virale Acylproteine, wie das E2-Protein vom Semliki Forest-Virus und das Hämagglutinin der Influenzaviren, wurde ebenfalls eine schnelle, annähernd vollständige Abspaltung der Fettsäuren *in vitro* nachgewiesen. Eine Depalmitoylierung dieser Proteine *in vivo* wurde allerdings nicht beobachtet [Veit und Schmidt, 2001].

Die meisten Untersuchungen zur Funktion der Palmitoylierung basieren zumeist auf Mutanten der Proteine, bei denen die Cysteine durch Serine oder Alanine ersetzt wurden. Werden diese Konstrukte in geeigneten Systemen exprimiert, können eventuelle Veränderungen in Lokalisation und / oder Funktion des entsprechenden Proteins ermittelt werden. 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. Weitere Untersuchungen insbesondere in definierten *in vitro*-Systemen sind daher nötig, um Aufschluss über die Funktionen der Palmitoylierung zu geben. Auch die Identifizierung eines Fettsäure-übertragenden Enzyms kann hilfreich zur Klärung der Funktion der Palmitoylierung sein, da bei bekannter Gensequenz des Enzyms

dieses Gen eliminiert werden kann, was eine Evaluierung der Effekte der Nicht-Palmitoylierung *in vivo* ermöglichen würde.

2.2.3 MECHANISMEN DER PALMITOYLIERUNG

2.2.3.1 Fettsäure-Substrat

Das bevorzugte Substrat einer vermuteten Protein-Acyl-Transferase (PAT) scheint Palmitoyl-CoA zu sein [Berthiaume und Resh, 1995; Dunphy et al., 1996]. Die Substratspezifität der PAT ist allerdings nicht so ausgeprägt wie die der N-Myristoyl-Transferase (NMT), da die PAT auch CoA-Derivate der Myristin- und Stearinsäure als Lipid-Donor akzeptiert [Veit et al., 1990]. Sie besitzt aber eine deutliche Tendenz zur Palmitinsäure [Berger und Schmidt, 1984; Schmidt, 1989]. Entsprechende Resultate ergaben auch metabolische Markierungen mit verschiedenen Tritium-gelabelten Fettsäuren [Schmidt, 1984; Olson et al., 1985; Veit et al., 1989].

Ein von diesem Muster abweichendes Bild ergab die Analyse der bei der Acylierung des Hämagglutinin-Esterase-Fusionsproteins (HEF) der Influenza C-Viren gebundenen Fettsäuren. Hierbei überwiegt die (C18:0) Stearinsäure unabhängig von der für die Markierung verwendeten Fettsäurespezies. Als mögliche Erklärung für die Selektion bestimmter Fettsäurespezies wurde postuliert, dass die Acylierung je nach Protein an unterschiedlichen Orten mit unterschiedlichen Fettsäurepools stattfindet, das Acylierungsmuster also vom Acylierungsort abhängig ist. Bei dem vergleichend untersuchten Hämagglutinin der Influenza A-Viren überwog allerdings immer die (C16:0) Palmitinsäure, was einen zellulären Einfluss auf die Fettsäurespezifität unwahrscheinlich macht [Veit et al., 1990]. Gleichermassen war das E1-Protein des Semliki Forest-Virus stearoyliert, während das E2-Protein palmitoyliert vorlag [Schmidt, 1985; Veit et al., 1989]. Demnach werden strukturelle Unterschiede zwischen palmitoylierten und stearoylierten Proteinen als Ursache für die differierenden Acylierungsmuster diskutiert. So konnte beobachtet werden, dass alle Proteine, bei denen eine Acylierung hauptsächlich mit Stearinsäure nachgewiesen worden ist, einen extrem kurzen cytoplasmatischen Abschnitt aus zwei bis drei stark basischen Aminosäuren besitzen, während palmitoylierte Proteine einen längeren cytoplasmatischen Bereich aufweisen (Tab. 6). Wird die cytoplasmatische Domäne des stearoylierten HEF-Proteins durch die des palmitoylierten Hämagglutinins des Influenza A-Virus ersetzt, so zeigt sich eine deutliche Verschiebung des Fettsäuremusters zu kürzerkettigen Fettsäuren wie Palmitinsäure. Vermutlich hat also die Länge der cytoplasmatischen Domäne einen Einfluss darauf, welche Fettsäuren zur Acylierung verwendet werden [Veit et al., 1996; Reverey et al.,

1996]. Die funktionelle Bedeutung einer präferentiellen Acylierung mit Stearinsäure ist allerdings noch nicht geklärt, auch wenn die längere Stearinsäure dem Protein eine größere Hydrophobizität überträgt und so Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen könnte.

Tab. 6: Virale Transmembranproteine mit Stearinsäure.

Acylierte Cysteine sind fett gedruckt und unterstrichen, positiv geladene Aminosäuren sind kursiv gedruckt dargestellt (modifiziert nach Veit, 2002a).

Protein	Transmembranregion	Cytoplasmatische Domäne
Influenzavirus C HEF-Protein	...LVISGIA <u>C</u>	RTK-COOH
Semliki Forest Virus E1-Protein	...LVVV <u>T</u> <u>C</u> IGL	RR-COOH

Auch bei anderen vermeintlich palmitoylierten Proteinen konnten weitere langkettige Fettsäuren nachgewiesen werden, weshalb der Terminus „S-Acylierung“ eine genauere Beschreibung dieser Fettsäure-Modifikation darstellt [Casey, 1994]. Eine basische Hydrolyse der totalen Leber- und Herzproteine wies neben dem Vorkommen von (C16:0) Palmitinsäure auch nachweisbare Mengen Thioester-gebundener (C14:0) Myristinsäure, (C18:0) Stearinsäure, (C16:1) Palmitoleinsäure, (C18:1) Ölsäure, (C18:2) Linolsäure und anderer nicht-gesättigter Fettsäuren auf [Demar und Anderson, 1997]. Für die G α -Untereinheiten [Hallak et al., 1994], Myelin [Bizzozero et al., 1987], p-Selectin [Fujimoto et al., 1993], den Asialoglycoprotein-Rezeptor [Zeng et al., 1995] und verschiedene Thrombozyten-Proteine [Muszbek und Laposata, 1993; Laposata und Muszbek, 1996] wurde sogar eine heterogene S-Acylierung mit Palmitinsäure und Stearinsäure beziehungsweise mit (C20:4) Arachidonsäure beschrieben.

2.2.3.2 Art und Zeitpunkt der Bindung

Die Palmitoylierung von Polypeptiden in der Zelle erfolgt post-translational, also nach vollendeter Synthese der Proteine, aber vor der Prozessierung durch Anlagerung von High-Mannose-Resten [Schmidt und Schlesinger, 1980].

In den meisten Fällen liegt eine Thioesterbindung mit der Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein vor. Schon bei den ersten Untersuchungen an acylierten Proteinen wurde deutlich, dass die Fettsäuren bei vielen dieser Acylproteine durch eine Bindung vom Ester-Typ mit den Proteinen verbunden waren [Schmidt et al., 1979; Schmidt und Schlesinger, 1979; Schmidt, 1982; Magee und Schlesinger, 1982]. Zunächst war jedoch nicht klar, ob es sich um Thioester- oder um Oxyester-Bindungen handelte. Durch Behandlung mit Hydroxylamin bei neutralem pH-Wert ließen sich die Fettsäuren jedoch in den meisten Fällen abspalten, was auf eine Thioesterbindung an Cysteinen hindeutete, da sich die meisten Oxyester-

Bindungen unter diesen Bedingungen nicht spalten lassen [Magee et al., 1984; Rose et al., 1984; Schmidt und Lambrecht, 1985; Schmidt et al., 1989]. Die Bestätigung dieser Vermutungen gelang schließlich mit Hilfe proteinbiochemischer [Mack und Kruppa, 1988; Schmidt et al., 1989] und gentechnologischer Experimente [Gaedigk-Nitschko et al., 1990; Gaedigk-Nitschko und Schlesinger, 1991; Veit et al., 1991; Kawate und Menon, 1994].

Heutzutage werden häufig molekularbiologische Techniken zum Nachweis von Acylierungsstellen angewendet. Hierbei werden die Cystein-codierenden Basentriplets der entsprechenden cDNA zunächst mittels gezielter Mutagenese durch Basentriplets ersetzt, die für die Aminosäure Serin oder andere Aminosäuren codieren, wonach das mutierte Gen in einem geeigneten System exprimiert wird. Eine metabolische Markierung mit radioaktiven Fettsäuren und Fluorographie gibt dann Auskunft über die Acylierung des Proteins [Gaedigk-Nitschko et al., 1990; Gaedigk-Nitschko und Schlesinger, 1991; Veit et al., 1991; Kawate und Menon, 1994]. In der Regel kann nach Austausch der Cysteine kein Einbau radioaktiv markierter Fettsäuren in das mutierte Protein nachgewiesen werden, doch gibt es auch einige Berichte, die auf eine mögliche Acylierung an Serin-Resten hinweisen [Jing und Trowbridge, 1990].

Im Lipophilin aus der Myelinmembran des Rinderhirnes liegt Threonin als acylierte Aminosäure am extra-cytosolischen Teil des mehrfach membrandurchspannenden Moleküls vor [Stoffel et al., 1983], wohingegen die Adenylat-Cyclase des Bakteriums *Bordetella pertussis* mit einer Amid-gebundenen Palmitinsäure an einem internen Lysin-Rest modifiziert sein soll [Hackett et al., 1994]. Das Phänomen der N-Palmitoylierung, also die Anknüpfung der Fettsäure über eine Amidbindung an das Protein, wurde ebenfalls für Sonic Hedgehog, ein sekretiertes Signalprotein, beschrieben [Pepinsky et al., 1998], wie auch für das G-Protein G_{sa} . Während bei Sonic Hedgehog die Fettsäurebindung über den N-terminalen Cystein-Rest stattfindet, so dient bei G_{sa} das N-terminale Glycin als Acylierungsort.

Im Gegensatz zu myristoylierten Proteinen, die oft auch cytosolisch vorliegen, sind palmitoylierte Proteine meist membrangebunden. Untersuchungen der thermodynamischen Wechselwirkungen acylierter Proteine an Membranen zeigen, dass die durch Palmitoylierung übertragene Membranaffinität etwa 15-fach stärker ist als die bei Myristoylierung [Peitzsch und McLaughlin, 1993]. Über den genauen Zeitpunkt der Acylierung gibt es jedoch unterschiedliche Angaben. Bei vielen zellulären und den meisten viralen Proteinen, deren Acylierung gezeigt werden konnte, lässt sich eine Bindung von Fettsäuren verhindern, wenn vor der metabolischen Markierung Cycloheximid, ein Inhibitor der *de novo*-Proteinsynthese, zugegeben wird. Dies spricht dafür, dass eine Acylierung nur an neu synthetisierten

Proteinen auftreten kann. Für andere zelluläre Proteine konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass die Acylierung zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet und Fettsäuren vom Protein abgespalten und wieder angehängt werden können [Omary und Trowbridge, 1981; Magee et al., 1987; Staufenbiel, 1988; Paige et al., 1993; Berthiaume et al., 1994; Kennedy und Limbird, 1994; Robinson et al., 1995].

Als Ort der Acylierung sind das Endoplasmatische Retikulum [Schmidt, 1980; Berger und Schmidt, 1985; Rizzolo und Kornfeld, 1988] und der cis-Golgiapparat [Dunphy et al., 1981], aber auch Transportvesikel zwischen diesen beiden Kompartimenten [Bonatti et al., 1989] identifiziert worden. Hemmung des intrazellulären Transportes zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat durch Brefeldin A oder durch eine Temperaturabsenkung auf 15°C beeinflusste die Palmitoylierung jedoch nicht [Bonatti et al., 1989; Veit et al., 1991]. Eine Protein-Palmitoylierung ist auch für Erythrozyten und Thrombozyten beschrieben, die keine intrazellulären Membranen besitzen [Staufenbiel, 1988; Muszbek und Laposata, 1989]. Auch die Plasmamembran ist als Ort einer S-Acylierung beschrieben worden [Olson und Spizz, 1986; Walser und Deppert, 1989], und aus diesen Lipid-Doppelschichten konnte eine enzymatische Aktivität aufgereinigt werden, die α -Untereinheiten der G-Proteine *in vitro* palmitoylieren kann [Dunphy et al., 1996]. Vermutlich werden auch diejenigen Proteine der Plasmamembran, für die ein schneller Turn-Over der Fettsäuren nachgewiesen wurde, dort palmitoyliert, da ein Rücktransport zum ER oder Golgi-Apparat für die Re-Palmitoylierung wenig wahrscheinlich ist [Milligan et al., 1995]. Vor kurzem konnte ebenso gezeigt werden, dass gereinigte synaptische Vesikel und Hefevakuolen die Potenz besitzen, Proteine *in vitro* mit Fettsäuren zu verknüpfen [Veit et al., 2000, 2003].

2.2.3.3 Die Enzymologie der Palmitoylierung

Im Gegensatz zur N-Myristoylierung ist der Mechanismus der Palmitoylierung komplexer und bisher nur wenig verstanden. Die molekularen Mechanismen, die eine Protein-Palmitoylierung bedingen, sind noch immer nicht vollständig bekannt und stellen eine entscheidende Lücke im Verständnis des Phänomens dar. Der Beweis einer enzymatischen Palmitoylierung scheiterte bis vor kurzem daran, dass für eine Identifizierung der vermuteten Fettsäure-übertragenden Enzyme nicht ausreichend große Mengen der Enzym-Aktivität aufgereinigt werden konnten. Dennoch konnte aus den Beobachtungen geschlossen werden, dass die Enzym-Aktivität immer membrangebunden ist und nur durch Detergenz aus der Membran extrahiert werden kann, was für ein Transmembranprotein oder hydrophob modifiziertes Protein spricht. Die Lokalisation der Fettsäurebindungsstellen in Proteinen an der Membran-Cytoplasma-Grenze deutet darauf hin, dass das Enzym mit seinem aktiven

Zentrum zum Cytoplasma weist und so auch cytosolische Proteine erreichen kann, die über Isoprenylierung oder N-terminale Myristoylierung kurzzeitig an die Membran gebunden werden. Erst relativ neue Berichte über Protein-Palmitoylierung in *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila* erlauben einen ersten Ausblick auf die Enzyme, die eine Palmitoylierung ausführen. Zudem wurden von einigen Forschern auch nicht-enzymatische Modelle der Palmitoylierung postuliert.

Eine Fettsäure-übertragende Aktivität wurde erstmals von Berger und Schmidt beschrieben. Sie charakterisierten eine Protein-S-Acyl-Transferase-Aktivität in mikrosomalen Membranen aus BHK-Zellen und Ratten-Hepatozyten, die virale Hüllproteine des Semliki Forest-Virus acylieren konnte [Berger und Schmidt, 1984]. Diese Fettsäure-Übertragung *in vitro* war zudem abhängig von Temperatur und Mikrosomen-Konzentration, was den Eigenschaften einer enzymgesteuerten Reaktion entspricht [Mack et al., 1987]. Ohne Mikrosomenzugabe bzw. bei Zugabe hitzeinaktivierter Mikrosomen kam es zu keiner oder äußerst geringer Fettsäureübertragung auf die Akzeptorproteine [Berger und Schmidt, 1984].

Diese Fettsäure-übertragende Aktivität wurde erstmals mittels Chromatographie aus humaner Plazenta gewonnen. Die Aktivität konnte mittels nicht-ionischer Detergenzien herausgelöst werden und reagierte auf Protease- und Hitze-Behandlung, zeigte sich aber resistent gegenüber Extraktionen mit hohen Salzkonzentrationen oder hohen pH-Werten, was für eine Membranlokalisierung dieses Enzyms spricht. Eine weitere Aufreinigung der Aktivität scheiterte allerdings an der Labilität des Enzyms [Schmidt und Burns, 1989]. Dennoch wurde diese grob aufgereinigte Enzym-Aktivität in zellfreien Tests zur Acylierung von Proteinen eingesetzt, wobei meist Fettsäure-Coenzym A als Substrat mit chemisch deacylierten oder in der unacylierten Form synthetisierten Akzeptorproteinen verwendet wurde [Mack et al., 1987; Schmidt und Burns, 1989, 1991; Berthiaume und Resh, 1995].

Auch an Erythrozytenmembranen wurde eine solche Aktivität gefunden [Staufenbiel, 1987; Schmidt et al., 1995; Das et al., 1997]. Ein Vergleich der acylierenden Aktivitäten in Mikrosomen humaner Plazenta und in Oberflächenmembranen humaner Erythrozyten („erythrocyte ghosts“) zeigt Ähnlichkeit bezüglich der Palmitoylierung endogener und exogener (viraler) Acylproteine [Schmidt et al., 1995]. In der gleichen Untersuchung ließ sich eine Acylierung durch die Proteine gegenseitig hemmen. Diese kompetitive Hemmung spricht dafür, dass die gleiche Enzym-Aktivität für die Palmitoylierung verschiedener Proteine verantwortlich ist [Schmidt et al., 1995].

Berthiaume und Resh reicherten eine in mikrosomalen Membranen aus Gehirn-Lysaten lokalisierte Enzym-Aktivität an, welche myristoylierte Proteine der Familie der *src*-Kinasen palmitoylieren konnte. Diese Aktivität wies ähnliche Eigenschaften wie die zuvor von Schmidt et al. beschriebene Enzym-Aktivität auf und war ebenfalls gegenüber Lagerung und biochemischen Prozeduren äußerst labil, weshalb eine weitere Aufreinigung des Enzyms nicht gelang [Berthiaume und Resh, 1995].

Auch eine partielle Aufreinigung einer einige $G\alpha$ -Untereinheiten acylierenden Enzym-Aktivität in Plasmamembranen aus Rattenlebern bevorzugte myristoylierte Proteine als Substrat und Palmitoyl-CoA vor anderen Fettsäure-CoA's als Fettsäurespender. Durch Probleme mit Klonierung und molekularer Charakterisierung war die beschriebene Enzym-Aktivität aber schwer zu beurteilen [Dunphy et al., 2001].

Eine weitere Enzym-Aktivität konnte aus Rattenleber-Mikrosomen gewonnen werden, die Palmitat von Palmitoyl-CoA auf C-terminale Cysteine von H-Ras transferieren konnte [Liu et al., 1996]. Auch dieses Enzym lag membrangebunden vor, konnte aber im Gegensatz zu den bis dahin charakterisierten Übertragungsaktivitäten, die nur mit Hilfe von Detergenz von den Membranen zu lösen waren [Schmidt und Burns, 1989; Berthiaume und Resh, 1995], mit Salzkonzentrationen von 150 mM KCl aus den Membranen eluiert werden. Über vier chromatographische Reinigungsschritte gelang auf diese Weise die Isolierung von zwei Proteinfractionen mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa und ca. 33 kDa, die beide Protein-Acyl-Transferase-Aktivität aufwiesen. Eine weitere Aufreinigung und Untersuchung der Aminosäuresequenz ergab, dass es sich bei dem gereinigten Enzym um das peroxisomale Enzym Thiolase A (3-oxoacyl-CoA-Thiolase) handelt, welches Funktionen in der β -Oxidation von Fettsäuren hat. Da die Thiolase A vornehmlich in Mitochondrien und Peroxisomen lokalisiert ist und eher Hydrolysierungen katalysiert anstatt Fettsäuren zu übertragen, kann sie kaum als Kandidat für eine Palmitoylierung des Membran-gebundenen Ras-Proteins *in vivo* angesehen werden [Dunphy und Linder, 1998; Liu et al., 1999].

Ähnlich unbefriedigende Ergebnisse zeigten sich auch nach der Aufreinigung einer PAT-Aktivität aus Erythrozyten. Das Auslösen der Aktivität aus der Membran durch erhöhte Salzkonzentrationen und eine anschließende chromatographische Aufreinigung ergab ein 70 kDa großes Protein, welches Spectrin palmitoylieren konnte [Das et al., 1997]. Unbekannt ist, ob auch andere Proteine mit Hilfe dieser Aktivität palmitoyliert werden können. Bis heute sind Wesen, Aminosäure- und cDNA-Sequenz des Enzyms noch nicht aufgeklärt, daher ist die Beurteilung der Bedeutung dieses Enzyms schwierig.

Eine für die *in vitro*-Palmitoylierung der C-terminalen Regionen von *Drosophila* Ras1 und Ras2 verantwortliche Enzymaktivität wurde ebenfalls aufgereinigt und ihre cDNA aus der Seidenraupe *Bombyx mori* geklont [Ueno und Suzuki, 1997]. Allerdings stellte sich dieses Enzym als eine von einer vorherigen Isoprenylierung des Substrat-Proteins unabhängige Transferase heraus, wogegen eine Palmitoylierung *in vivo* nur nach vorheriger Isoprenylierung stattfinden kann. Diese Acyltransferase besteht aus zwei 260 und 270 kDa großen Polypeptiden, die beide ähnliche strukturelle Eigenschaften wie die Fettsäure-Synthase besitzen, einem Enzym, das die Synthese von Palmitinsäure katalysiert. Zudem wird dieser Proteinkomplex *in vivo* nur während der Embryogenese exprimiert, so dass eine natürliche Beteiligung an der Ras-Palmitoylierung vermutlich ausgeschlossen ist.

Bei Versuchen mit *Drosophila* wurde ein Protein gefunden, dass für die Palmitoylierung des Proteins Sonic Hedgehog (Shh) erforderlich ist, welches am äußeren Blatt der Plasmamembran gebundenen ist [Taipale und Beachy, 2001]. Im Gegensatz zum bekannten Mechanismus ist die Palmitoylgruppe hier an den N-Terminus von Hedgehog mittels Amidbindung über die α -Aminogruppe des Cys₂₄ gebunden [Pepinsky et al., 1998; Chen et al., 2006], wobei durch autoproteolytische Spaltung das bioaktive Produkt C-terminal ein Cholesterin-Molekül erhält [Porter et al., 1996]. Denkbar ist allerdings, dass zunächst eine Thioesterbindung zur Verknüpfung des Palmitat-Rests mit dem Protein Shh besteht, die dann durch die Amidbindung ersetzt wird [Pepinsky et al., 1998]. Fehlt die relativ neu entdeckte Acyltransferase *Skinny Hedgehog* (*ski*), auch bekannt unter den Namen *Sightless* [Lee und Treisman, 2001] und *rasp* [Micchelli et al., 2002], ergibt sich eine Funktionseinbuße von Sonic Hedgehog, die der des unpalmitoylierten Proteins entspricht [Chamoun et al., 2001; Lee und Treisman, 2001]. Es ist allerdings fraglich, ob *Skinny Hedgehog*, das zu einer Familie von Acyltransferasen mit acht bis zehn Transmembranregionen gehört, die oben angeführten Reaktionen katalysieren könnte. Zum einen erfolgt die Acylierung von Shh zwar an einem Cystein, aber nicht in einer Thioesterbindung, sondern in einer Amidbindung. Zum anderen hat Sonic Hedgehog keine membranspannende Domäne, wird sekretiert und dazu im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates transportiert [Bijlsma et al., 2004], woraus abgeleitet werden kann, dass das aktive Zentrum von *Skinny Hedgehog* zum Lumen dieser Kompartimente hin orientiert ist. Es bleibt also abzuwarten, ob Säugetieranaloga dieser Acyltransferase in der Lage sein werden, den Einbau von Palmitinsäure auch in anderen Zellkompartimenten zu katalysieren.

Ein signifikanter Durchbruch in der Enzymologie der Palmitoylierung wurde erst vor kurzem mit der Identifizierung zweier Enzym-Aktivitäten in Hefe erzielt, die eine C-terminale

Palmitoylierung katalysieren können: dem Erf2p-Erf4p-Komplex [Lobo et al., 2002] und dem Protein Akr1p [Roth et al., 2002].

Bei bestimmten Mutationen in den Hefe-Genen ERF2 und ERF4 (bekannt auch als SHR5) wurde bereits zuvor eine verminderte Palmitoylierung des Proteins Ras2p beobachtet. Für den aufgereinigten Komplex aus Erf2p und Erf4p konnte nun die Fähigkeit zur Palmitoylierung von Ras2p *in vitro* beobachtet werden. Hierbei wird das am C-Terminus farnesylierte Ras2p dem in gleicher Weise modifizierten Ras-Protein der Säugetiere sowie der myristoylierten G α_{i1} -Untereinheit vorgezogen. Erf2p ist ein im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes integrales Membranprotein, das eine konservierte Asp-His-His-Cys-Cysteinreiche Domäne (DHHC-CRD) enthält [Lobo et al., 2002; Zhao et al., 2002].

Auch Akr1p enthält eine DHHC-CRD [Givan und Sprague, 1997], weist ansonsten aber keine Homologien zu Erf2p auf. Aufgereinigtes Akr1p kann die Casein-Kinase Yck2p *in vitro* palmitoylieren [Feng und Davis, 2000; Roth et al., 2002]. Dieses Protein weist *in vivo* vermutlich sechs Transmembran-Domänen auf und ist wahrscheinlich im Golgi-Apparat zu finden [Pryciak und Hartwell, 1996; Roth et al., 2002]. Da die Substratspezifität nicht allzu hoch ist, also erwiesenermaßen Mutanten von Akr1p ebenso in der Lage sind, Ras2p zu palmitoylieren, wie andererseits auch Erf2p-Mutanten Yck2p palmitoylieren können, ist davon auszugehen, dass es auch noch andere PAT-Aktivitäten geben kann [Roth et al., 2002].

Mit der Identifikation der PAT-Aktivitäten von *skinny Hedgehog* und der DHHC-CRD-Proteine Erf2p und Akr1p in Modellorganismen wurde eine neue Grundlage für die Erforschung der PAT in Säugetieren geschaffen [Linder und Deschenes, 2004]. Ein Säugetier-Ortholog zu Akr1p wurde mit dem Huntington-Interagierenden Protein (HIP14) gefunden, was in der Lage ist, neuronale Proteine, wie SNAP-25, PSD-95, GAD65 und Synaptotagmin I, zu palmitoylieren und gleichzeitig einen Palmitoylierungs-abhängigen Vesikeltransfer zu modulieren [Huang et al., 2004].

Auch weitere DHHC-CRD-Proteine wurden aus Säugetierzellen aufgereinigt, die spezifisch das Protein PSD-95 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* palmitoylieren können. Diese so genannten PSD-95-Palmitoyl-Transferasen (P-PAT) zeigen deutliche Substratspezifität und können andere Proteine wie SNAP-25, H-Ras oder G α_s nicht in gleichem Maße acylieren [Fukata et al., 2004]. Ein weiteres gereinigtes DHHC-CRD-Enzym ist in der Lage, spezifisch humanes H-Ras und N-Ras zu modifizieren [Swarthout et al., 2005].

2.2.3.4 Nicht-enzymatische Mechanismen

Obwohl die meisten Untersuchungen auf eine enzymatische S-Acylierung hindeuten, gibt es einige Berichte, die eine nicht-enzymatische Verbindung von Fettsäuren und Protein beschreiben [Townsend et al., 1982; Bizzozero et al., 1987; O'Brien et al., 1987; Quesnel und Silvius, 1994; Bharadwaj und Bizzozero, 1995]. Die Sulfhydrylgruppe des Cysteins ist ein gutes Nukleophil, das die Thioesterbindung zwischen Palmitat und CoA angreifen kann. So ist es nicht erstaunlich, dass unter angemessenen Bedingungen auch eine nicht-enzymatische, autokatalytische Palmitoylierung von Proteinen *in vitro* beobachtet werden konnte [Duncan und Gilman, 1996; Banó et al., 1998]. Dieses Phänomen wurde sowohl für einige Proteine, wie z.B. die $G\alpha$ -Untereinheiten [Duncan und Gilman, 1996], SNAP-25 [Veit, 2000], das Myelin-Proteolipid und Rhodopsin [O'Brien et al., 1987; Veit et al., 1998], als auch für bestimmte Peptide, unter anderem für die myristoylierte *src*-Kinase *yes* und die C-terminale Domäne des β_2 -Adrenergen Rezeptors, berichtet. Diese nicht-enzymatische Palmitoylierung zeigt große Ähnlichkeiten mit einer enzymatischen Reaktion, charakterisiert beispielsweise durch Abhängigkeit von Zeit, Substratkonzentration und einer zuvor erfolgten Myristoylierung des Substrates.

Für die in *E. coli* exprimierte G-Protein-Untereinheit $G\alpha_{i1}$ als Akzeptorprotein konnte eine Palmitoylierung ohne Zugabe einer putativen Enzymquelle beobachtet werden, wenn $G\alpha_{i1}$ myristoyliert vorlag [Duncan und Gilman, 1996]. Die gut beschriebene Abhängigkeit der Palmitoylierung von einer vorangegangenen Myristoylierung [Parenti et al., 1993; Alland et al., 1994; Mumby et al., 1994; Galbiati et al., 1994], welche auch als Konsensus-Signal für die Protein-Acyl-Thioesterase (PAT) postuliert wurde [Berthiaume und Resh, 1995], konnte in diesen enzymfreien Tests *in vitro* reproduziert werden. Die Autoacylierung der $G\alpha$ -Untereinheit erfolgte bei physiologischem pH-Wert ausschließlich am Cys₃, der zentralen Palmitoylierungsstelle *in vivo* [Mollner et al., 1998]. Nach Austausch der Myristoylierungsstelle Gly₂ durch Ala erfolgte weder Myristoylierung noch Palmitoylierung. Wurde zu dem Polypeptid $G\alpha_{i1}$ der G-Protein-Untereinheitenkomplex $\beta_1\gamma_2$ hinzugegeben, so dass sich der Komplex $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ bildete, konnte eine erhöhte Kinetik der Reaktion beobachtet werden, allerdings nur, wenn die γ -Untereinheit selbst isoprenyliert vorlag. In diesem Fall war die Myristoylierung der α -Untereinheit auch keine Voraussetzung für die Palmitoylierung mehr. Aus den Ergebnissen dieser *in vitro*-Studien wurde extrapoliert, dass $G\alpha_{i1}$ unter physiologischen Bedingungen chemisch autoacyliert wird, da eine Zelle eine Autoacylierung nicht verhindern könnte, wenn einer enzymatischen Acylierung tatsächlich eine regulatorische Funktion zukäme [Duncan und Gilman, 1996].

Andere Ergebnisse für die Hypothese der Autoacylierung wurden mittels *in vitro*-Tests mit synthetischen Peptiden erzielt, welche die Aminosäuresequenzen der N-terminalen Acylierungsregionen des *src*-Proteins *c-yes* repräsentieren [Banó et al., 1998]. Systematische Versuche zeigten keine Unterschiede in der Acylierung des Peptids mit oder ohne Zugabe der potentiellen Enzymquellen, verschiedener Zellfraktionen aus Zellkulturen und tierischen Geweben. Auch hier konnte die Abhängigkeit der Palmitoylierung von der Myristoylierung *in vitro* enzymfrei reproduziert werden. Die Autoren schlagen als Funktion der Myristoylierung eine Proteinausrichtung oder Aggregation vor, welche die Interaktion des Proteins mit Palmitoyl-CoA *in vitro* beeinflusst oder überhaupt erst möglich macht. Insgesamt beschreiben sie den Mechanismus der *in vitro*-Palmitoylierung als pseudoenzymatisch, da die Reagibilität von verschiedenen Faktoren, wie z.B. der Myristoylierung, abhängig ist, die an enzymatisch katalysierte Reaktionen denken lassen. Für die Reaktion *in vivo* postulieren sie eine durch Myristoylierung erleichterte Interaktion mit den Acyl-CoA-Derivaten [Banó et al., 1998].

Ob eine autokatalytische Palmitoylierung auch bei Proteinen *in vivo* vorkommt, ist bislang ungeklärt, wobei die diversen Unterschiede zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktionen eher dagegensprechen. So werden *in vitro* bestimmte G α -Untereinheiten effizienter als andere G α -Untereinheiten palmitoyliert, wohingegen das *in vivo* nicht der Fall ist [Mollner et al., 1998]. Unter Bedingungen, bei denen G α -Untereinheiten *in vitro* vollständig palmitoyliert werden können, kommt es nicht zu einer Palmitoylierung des myristoylierten *fyn*-Proteins [Duncan und Gilman, 1996], obwohl dieses *in vivo* mit vergleichbarer Kinetik palmitoyliert wird. Proteine wie Actin, die normalerweise unpalmitoyliert vorliegen, können *in vitro* auto-palmitoyliert werden.

Zudem gibt es Sequenz-Spezifitäten für die Protein-S-Acylierung, die nur schwer mit einer nicht-enzymatischen Acylierung in Einklang zu bringen sind. So sind zum Beispiel sowohl das Hämagglutinin (HA) als auch das Hämagglutinin-Esterase-Fusions-Protein (HEF) der Influenza-Viren plasmamembrangebundene Glykoproteine. In Säugetierzellen ist HA palmitoyliert, während HEF mit Stearat acyliert vorliegt. Wird der cytoplasmatische Teil des HEF gegen den des HA ausgetauscht, liegt die resultierende Chimäre in Säugerzellen palmitoyliert vor. Zudem liegt in Insektenzellen exprimiertes HEF palmitoyliert vor, auch wenn Stearoyl-CoA in den Zellen vorliegt [Reverey et al., 1996]. Auch die E1- und E2-Glykoproteine des Semliki Forest-Virus werden mit unterschiedlichen Fettsäuren modifiziert. Beide Proteine werden zunächst als Hetero-Oligomer gemeinsam durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert, so dass Zeitpunkt und Ort der Acylierung gleich sein sollten. Allerdings bindet E1 hauptsächlich Stearinsäure und E2 vornehmlich Palmitinsäure

[Veit et al., 1996]. Diese Fettsäure-Selektivität ist bei einem unkatalysierten Mechanismus ungewöhnlich und nicht erklärbar.

Untersuchungen an der Tyrosinkinase *fyn* zeigen ebenso deutliche Unterschiede zwischen nicht-enzymatischer Palmitoylierung *in vitro* und der in Zellen *in vivo* ablaufenden Palmitoylierungsreaktion. So kann eine *fyn*-Mutante, in der die Cysteine an Position 3 und 6 gegen Serin-Reste ausgetauscht worden sind, *in vitro* nicht-enzymatisch palmitoyliert werden, *in vivo* jedoch kann nur eine geringe oder gar keine Palmitoylierung dieser Mutante beobachtet werden [Rhee und Hunter, 1987; Alland et al., 1994]. Werden die Cysteine durch Alanin-Reste ersetzt, wird die Palmitoylierung dieser Mutante *in vitro* und *in vivo* blockiert. Diese Untersuchungen deuten an, dass eine nicht-enzymatische Palmitoylierung in signifikantem Ausmaß *in vivo* nicht stattfindet.

Die Existenz einer enzymatischen Reaktion wird auch durch das Auftreten konformitätsabhängiger Palmitoylierung gestützt. So kommt es bei bovinem Rhodopsin bei Inkubation in der Dunkelheit ohne Zugabe einer Enzymquelle zu einer Autoacylierung mit langsamer, linear verlaufender Kinetik. Die Zugabe partiell angereicherter Protein-Acyl-Transferase (PAT) aus humaner Plazenta verstärkt den Palmitinsäure-Einbau in der Initial-Kinetik um das Zehnfache, während Denaturierung dieser Enzym-Aktivität durch Erhitzen wieder zur langsamen Autoacylierung führt. Nach einer Belichtung und damit Aktivierung von Rhodopsin findet *in vivo* und *in vitro* keine Fettsäureübertragung durch die Enzympräparation mehr statt, während die nicht-enzymatische Acylierung davon nur unwesentlich beeinflusst wird, was ein Erkennen der unbelichteten, nicht-aktivierten Konformation von Rhodopsin durch das Enzym nahe legt [Veit et al., 1998].

Auch das neuronale SNARE-Protein SNAP-25 lässt sich *in vitro* allein durch Zugabe von Palmitoyl-CoA acylieren, wenn auch mit sehr geringer Effizienz. Wird SNAP-25 aber vorher an die anderen SNARE-Proteine (Syntaxin und VAMP-1) gebunden, ist der Einbau von Palmitinsäure um das 100-fache erhöht [Veit, 2000]. In der CD-Spektroskopie zeigt SNAP-25 als Einzelmolekül keine Struktur. Die Bindung an Syntaxin induziert eine α -helikale Struktur, wie sie auch im kristallisierten SNARE-Komplex vorliegt [Fasshauer et al., 1997], was auf eine konformationsabhängige, durch die α -helikale Struktur begünstigte Palmitoylierung von SNAP-25 schließen lässt.

Bei den meisten Auto-Palmitoylierungsexperimenten handelte es sich um *in vitro*-Experimente, die keine physiologischen Konzentrationen an Akzeptorproteinen und Fettsäure-CoA aufwiesen. Bei Palmitoyl-CoA-Konzentrationen, die den physiologischen

Verhältnissen in Zellen entsprechen, konnte eine nicht-enzymatische Acylierung kaum nachgewiesen werden. Außerdem scheint die beobachtete Reaktionskinetik für die nicht-enzymatische Palmitoylierung wesentlich zu langsam zu sein, so dass eine biologisch wichtige Rolle der nicht-enzymatischen Palmitoylierung bei Proteinen mit hoher Turn-Over-Rate der Acylierung *in vivo* eher unwahrscheinlich ist [Dunphy et al., 2000]. Während nämlich eine autokatalytische Fettsäureübertragung auf G α -Untereinheiten *in vitro* zwar innerhalb einiger Sekunden erfolgen kann, wird für eine spontane Acylierung von G α -Untereinheiten *in vivo* ein Zeitrahmen von mehreren Minuten bis hin zu einigen Stunden vorausgesagt [Resh, 1999], basierend auf dem Vorliegen von Acyl-CoA-bindenden Proteinen (ACBP) in Zellen [Rasmussen et al., 1990; Rosendal et al., 1993]. Diese ACBP's liegen reichlich im Cytoplasma vor und binden mit hoher Affinität langkettige Fettsäuren, was die intrazelluläre Konzentration freier Fettsäure-CoA's auf ca. nur 5 % reduziert und damit auch den nicht-enzymatischen Palmitoyl-CoA-Transfer auf Proteine behindert und weitgehend unterdrückt [Leventis et al., 1997]. Im Gegensatz dazu zeigt sich durch ACBP nur eine sehr geringe Hemmung der enzymatischen Acylierung mit teilgereinigter PAT von G α -Protein-Untereinheiten *in vitro* [Dunphy et al., 2000].

Die Übertragbarkeit der *in vitro* gefundenen Beweise für eine nicht-enzymatische Autoacylierung auf *in vivo*-Verhältnisse erscheint alles in allem fraglich. Die angeführten Untersuchungen sprechen für die Existenz einer Palmitoyltransferase, auch wenn es möglich ist, dass nicht-enzymatische Mechanismen bei der Palmitoylierung bestimmter Proteine vorkommen.

2.2.3.5 Enzymatische Depalmitoylierung

In gleichem Maße wichtig wie die Palmitoylierung ist der Mechanismus der Depalmitoylierung. Auch die Palmitoylierung kann, genau wie die Myristoylierung durch den Gebrauch von Myristoyl-Switches, dynamisch durch Zyklen von De- und Re-Palmitoylierung reguliert werden [McIlhinney, 1985; Magee et al., 1987]. Eine dynamische Palmitoylierung wurde bereits für einige an der Signaltransduktion beteiligte Proteine wie heptahelikale Rezeptoren und Tyrosinkinasen gezeigt. Bei diesen Proteinen steigt die Frequenz des Turn-Overs der Fettsäuren an, wenn die Signaltransduktions-Kaskade aktiviert wird, was darauf hinweist, dass die Palmitoylierung durch intrazelluläre Lokalisierung und Aktivitätsbeeinflussung regulierend in die Signaltransduktion eingreift [Milligan et al., 1995]. Auch die Palmitoylierung des α 2A-adrenergen Rezeptors soll ein dynamischer Prozess sein [Kennedy und Limbird, 1994]. In Hirn-Homogenat konnte ein Pool an nichtacylierten Proteinen gefunden werden, die durch Inkubation mit Palmitoyl-CoA acyliert werden können

[Bizzozero und Lees, 1986]. Die Entdeckung, dass in vielen palmitoylierten Substraten die Palmitinsäure-Turnover-Ratio bei weitem die des Proteins selbst übertrifft, spricht für ein Vorhandensein von spezifischen Thioesterasen in eukaryoten Zellen. Ein Enzym, das Palmitinsäure abspalten kann, eine S-Thioesterase, wurde bereits 1986 postuliert [Berger und Schmidt, 1986]. Auch in Myelin aus Rattenhirn wurde eine Fettsäure-Acylesterase-Aktivität gefunden, die bovines Proteolipid-Protein deacylieren konnte [Bizzozero et al., 1992].

Zwei Enzyme, die bestimmte Proteine *in vitro* depalmitoylieren können, wurden bislang identifiziert und gründlich charakterisiert: eine lysosomale Hydrolase, genannt Protein-Palmitoyl-Thioesterase, sowie das cytoplasmatische Enzym Acylprotein-Thioesterase 1 (APT1).

Aus einem Rinderhirn-Extrakt wurde das Enzym Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 (PPT1) aufgereinigt und durch *in vitro*-Depalmitoylierung des radiomarkierten H-Ras und der G α -Untereinheiten überprüft [Camp und Hofmann, 1993]. Klonierung der cDNA und weitere Analyse des Proteins führten zur der unerwarteten Erkenntnis, dass PPT1 mit abspaltbarer Signalsequenz synthetisiert wird und mit N-gebundenen Oligosacchariden modifiziert ist, was vermuten lässt, dass PPT1 im Lumen intrazellulärer Organellen vorliegt und die zu deacylierenden Proteine ebenfalls dort vorkommen müssen [Camp et al., 1994]. Weitere Analysen enthüllten, dass PPT1 eine klassische lysosomale Hydrolase ist, die durch Oligosaccharid-Modifikationen mit Mannose-6-Phosphat spezifisch in die Lysosomen geleitet wird [Hellsten et al., 1996; Verkruyse und Hofmann, 1996; Verkruyse et al., 1997; Sleat et al., 1996]. Die PPT1-Aktivität kann durch Didemnin B nicht-kompetitiv gehemmt werden [Meng et al., 1998]. Die lysosomale PPT1 kann zwar zur Degradation palmitoylierter Proteine durch Deacylierung der Cystein-Thioester beitragen, eine Rolle der PPT1 als Vermittler einer Depalmitoylierung von Plasmamembran-gebundenen Proteinen *in vivo* erscheint dagegen aber wegen der Lokalisation unwahrscheinlich [Camp und Hofmann, 1993; Camp et al., 1994]. Vielmehr legt das alleinige Vorkommen in den Lysosomen eine Rolle der PPT1 nur für den Abbau palmitoylierter Proteine nahe, nicht für deren dynamische Regulierung, was am Beispiel der Palmitoylierung der endothelialen Stickstoff-Synthase (eNOS) gezeigt wurde [Michel und Michel, 1997].

Das Interesse an PPT1 stieg mit der Entdeckung, dass PPT1-Defekte verantwortlich für eine schwere neurodegenerative Störung, der Infantilen Neuronalen Ceroidlipofuscinose (INCL) sind [Vesa et al., 1995], die mit selektivem Verlust kortikaler Neurone einhergeht, wobei Hirnstamm und Rückenmark aber intakt bleiben [Hofmann et al., 1997; Lehtovirta et al.,

2001; Zhang et al., 2006]. Diese lysosomale Speicherkrankheit hat verheerende klinische Konsequenzen, wobei die Patienten fünf bis acht Jahre in einem vegetativen Stadium persistieren können und der Tod im Alter von acht bis elf Jahren eintritt. Individuen mit diesen PPT1-Mutationen akkumulieren Lipid-Thioester, die vermutlich die eigentlichen Substrate für PPT1 sind [Vesa et al., 1995]. Die Entdeckung von PPT1 als lysosomales Enzym führte erst zur Klassifizierung der NCL als lysosomale Speicherkrankheit [Hellsten et al., 1996; Verkruyse und Hofmann, 1996].

Die Bedeutung von PPT1 für den Abbau palmitoylierter Proteine wird durch ein Zellkulturmodell mit Fibroblasten und Lymphoblasten von Patienten mit INCL verdeutlicht [Lu et al., 1996]. Lipid-Thioester aus acylierten Proteinen akkumulieren in Zellen von Patienten mit INCL, aber nicht in normalen Kontrollzellen. Die Akkumulation dieser Thioester ist abhängig von der Proteinsynthese, was vermuten lässt, dass die Lipid-Thioester aus thioacylierten Proteinen stammen. Wird rekombinantes PPT1 über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor in die INCL-Zellen gebracht, so wird die Akkumulation von Lipid-Thioestern in den Lymphoblasten verhindert. Während also die PPT1 vor Apoptose schützt, führt kompetitive Inhibition von PPT1 durch Antisense-PPT1-Behandlung zu einer gesteigerten Apoptoserate in den betroffenen Zellen [Cho et al., 2000; Cho und Dawson, 2000].

Vor kurzem wurde ein Mausmodell für INCL mit Ablation des PPT1-Genes erstellt [Gupta et al., 2001]. Bei der Geburt waren alle Mäuse gesund und fertil. Innerhalb von acht Monaten entwickelten ausnahmslos alle Mäuse neurologische Abnormitäten und zeigten sinkende Überlebensraten. Die neurologischen Erscheinungsbilder umfassten hierbei u.a. abnormales Greifverhalten und Anfälle und korrelierten zweifellos mit dem Verlust von Neuronen durch Apoptose. Ebenso wie bei den Patienten mit PPT1-Mangel zeigten die Gehirne der Mäuse Akkumulation von autofluoreszierendem Material. Durch das breite Spektrum der Erscheinungsbilder bei den PPT1-defizienten Mäusen ist das Mausmodell sehr geeignet, um Therapien für die INCL des Menschen zu testen.

Die Kristallstruktur von bovinem PPT1 wurde für drei verschiedenen Formen des Enzymes ermittelt: sowohl mit und ohne gebundene Palmitinsäure [Bellizzi et al., 2000] und nach Inaktivierung mit dem Inhibitor Hexadecylsulfonylfluorid (HDSF) [Das et al., 2000]. PPT1 nimmt eine α/β -Hydrolase-Faltung mit katalytischer Triade geformt aus Ser₁₁₅, His₂₈₉ und Asp₂₃₃ an [Bellizzi et al., 2000], was auch für diverse andere Hydrolasen gezeigt worden konnte [Heikinheimo et al., 1999]. Die kanonische α/β -Faltung beinhaltet acht β -Faltblätter und sechs α -Helices und kann sich so extrem vielseitig an ein Single-Domain-Protein

anpassen. Ein bestimmendes Merkmal der α/β -Hydrolasen ist der nukleophile Ellbogen, ein enger Bogen hinter β_5 , der die katalytischen Serin-Reste in PPT1 beherbergt. Die Struktur des Acyl-Enzym-Komplexes wurde bestimmt, indem PPT1 zusammen mit Palmitoyl-CoA kristallisiert wurde [Bellizzi et al., 2000]. Diese Struktur enthüllt die hydrophobe Tasche, die die Fettsäurekette begleitet, und bestätigt die nukleophile Rolle des Ser₁₁₅. Im Gegensatz zu anderen Serin-Lipasen ist PPT1 resistent gegenüber dem Serin-modifizierenden Reagenzien Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) und Diisopropylfluorophosphat (DFP) [Camp und Hofmann, 1993], obwohl ein Substratanalog zu PMSF, Hexadecylsulfonidfluorid (HDSF), dennoch als Inhibitor wirkt [Das et al., 2000]. Die 2,4 Å Struktur der inaktiven PPT1-Form enthüllt, dass HDSF Ser₁₁₅ modifiziert und die Palmitat-Bindungstasche blockiert. HDSF ist in der Lage, eine enge hydrophobe Tasche zu besetzen, die für den umfangreicheren aromatischen Ring von PMSF nicht passen würde, was die Resistenz der PPT1 gegenüber den meisten Serin-modifizierenden Agenzien erklärt [Das et al., 2000]. Mehr als 36 Mutationen im PPT1-Gen wurden bislang beschrieben [Das et al., 1998, 2001], wobei die R122W-Mutation allerdings verantwortlich für den Grossteil der Fälle ist [Vesa et al., 1995]. Die R122W-Mutation verformt vermutlich entweder das aktive Zentrum oder die Palmitat-Bindungstasche der PPT1, wohingegen die mit einer weniger ernsthaften juvenilen NCL assoziierten Mutationen T75P und D79G vom Enzymzentrum entfernt liegen. Folgerichtig unterscheiden sich die kinetischen Parameter rekombinanter Enzyme mit den Mutationen T75P oder D79G nicht dramatisch von denen der Wildtyp-Enzyme [Das et al., 2001]. Lymphoblasten von Patienten mit T75P- bzw. D79G-Mutationen zeigen eine zwar geringe, aber messbare Enzymaktivität im Bereich von ungefähr 2 % des Wildtyp-Enzyms, im Gegensatz zu anderen Mutationen, die katalytisch inaktiv sind. Alle PPT1-Mutanten akkumulieren früh, was kennzeichnend für fehlgefaltete Proteine ist, die degradiert werden sollen.

Bei einer Datenbanksuche nach Homologen zu PPT1 wurde eine verwandte Thioesterase, die Palmitoyl-Protein-Thioesterase 2 (PPT2), mit einer 28 %-igen Identität der Aminosäuresequenzen aufgefunden [Soyombo und Hofmann, 1997]. PPT2 ist ebenfalls ein lysosomales Enzym, dessen Substratprofil sich mit dem von PPT1 überlappt, da beide Enzyme Acyl-CoA mit deutlicher Präferenz für Fettsäuren mit 14-18 Kohlenstoffatomen hydrolysieren. Während PPT1 aber eine Vielzahl von Cystein-Thioestern depalmitoylieren kann, ist PPT2 im Gegensatz dazu bei diesen inaktiv und kann Palmitat nur von Palmitoyl-CoA entfernen, nicht von palmitoylierten Proteinen, was eine Rolle von PPT2 vornehmlich in der Degradation anderer Lipid-Thioester vermuten lässt.

Im Gegensatz zu den PPT's konnte eine im Cytosol lokalisierte Acylprotein-Thioesterase (APT) gereinigt werden, die $G\alpha$ -Untereinheiten und Ras *in vitro* und $G\alpha_s$ auch *in vivo* depalmitoylieren kann [Duncan und Gilman, 1998]. Auch eine De-Acylierung der endothelialen Stickstoff-Synthase (eNOS) wurde beschrieben [Yeh et al., 1999]. Interessanterweise wurde APT zunächst als eine Lysophospholipase identifiziert, auch wenn das Enzym palmitoylierte Protein-Substrate eindeutig Lipid-Substraten vorzieht. APT1 depalmitoyliert bevorzugt Membran-assoziierte Proteine. Die Lokalisierung der APT1 im Cytoplasma der Zellen lässt vermuten, dass ihre Aufgabe vornehmlich in der Vermittlung des Palmitat-Turn-Overs von im Cytoplasma exponierten palmitoylierten Substraten liegt.

Es ist allerdings bislang ungeklärt, ob APT1 die einzige Acylprotein-Thioesterase für palmitoylierte, Membran-assoziierte Proteine darstellt. Zwei Beobachtungen legen nahe, dass es andere Palmitoyl-Thiotransferasen gibt. Zum einen wurde die so genannte Lysophospholipase II aufgereinigt, kloniert und charakterisiert, die Aktivität bei verschiedenen Lipidsubstraten zeigt und auf Aminosäure-Ebene zu 64 % identisch zu APT1 ist [Sunaga et al., 1995; Toyoda et al., 1999]. Es ist offensichtlich von großem Interesse, ob dieses Enzym ebenfalls Acylprotein-Thioesterase-Aktivität aufweist. Des Weiteren gibt es zwar niedrige, dennoch messbare Thioester-Aktivität in Hefe-Extrakten für H-Ras, das nicht verringert in Extrakten von *apt1* Null-Zellen ist [Duncan und Gilman, 2002]. Wahrscheinlich existieren aber noch weitere Thioesterasen mit unterschiedlichen Substrat-Spezifitäten.

Für einen bestimmten Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*, dem das Gen für APT1 fehlt, wurde gezeigt, dass es bei scheinbar normalem Wachstum und Sporulation dennoch zu signifikant verminderter biochemischer Thioesterase-Aktivität bei palmitoylierter $G\alpha_{i1}$ kommt [Duncan und Gilman, 2002]. Basierend auf dieser Prämisse wurden bereits mehrere APT1-Inhibitoren entwickelt [Biel et al., 2006].

2.2.3.6 Strukturelle Voraussetzungen für die Palmitoylierung

Die strukturellen Voraussetzungen für die Palmitoylierung von Proteinen sind bisher nur wenig verstanden. Im Unterschied zur Myristoylierung gibt es für die Palmitoylierung weder eine Konsensus-Sequenz am Protein noch eine allen palmitoylierten Proteinen gemeinsame Palmitoylierungsstelle, denn die S-Acylierung kann sowohl Amino- oder Carboxyterminal als auch innerhalb eines Polypeptides auftreten. Cystein-Reste in der Nähe von Transmembran-Domänen (TMD) beziehungsweise an Membran-assoziierten Domänen bei nicht-integralen Proteinen sind scheinbar bevorzugte Palmitoylierungsstellen, was möglicherweise in der Erreichbarkeit für eine Membran-assoziierte Protein-Acyl-Transferase (PAT) begründet liegt.

Allerdings müssen weitere Faktoren für die Palmitoylierung eine Rolle spielen, da nicht alle entsprechenden Cystein-Reste palmitoyliert vorliegen, andererseits aber dennoch eine S-Acylierung an Cystein-Resten, die auf den ersten Blick nicht nahe an Membran-interagierenden Domänen liegen, auftreten kann.

2.2.3.6.1 *Periphere Membranproteine*

Bei den peripher liegenden Membranproteinen kann die Palmitoylierung an Cystein-Resten an drei verschiedenen Lokalisationen innerhalb des Proteins auftreten (*siehe Kapitel 1.2.1 und Tab. 3-5*). Bei vielen dieser Proteine, die keine membranspannende Region besitzen, scheint durch hydrophobe Modifikationen anderer Art oder eine Reihe hydrophober Aminosäuren eine Assoziation mit dem inneren Blatt der Membran Voraussetzung für die S-Acylierung zu sein. Hierbei liegen die palmitoylierten Cysteine oft in der Nähe von Prenylierungs- oder Myristoylierungsstellen, wobei hydrophobe Modifikationen aber nicht in jedem Fall Voraussetzung für eine S-Acylierung nicht-integraler Proteine sind.

N-terminal palmitoylierte Proteine

Proteine der Familie der *src*-Tyrosinkinasen und viele G α -Untereinheiten werden co-translational myristoyliert, wobei eine stabile Membranassoziation aber erst nach erfolgter Palmitoylierung erfolgen kann [Shenoy-Scaria et al., 1993; Alland et al., 1994; Kwong und Lublin, 1995; Yurchak und Sefton, 1995]. Diese Proteine beginnen am N-Terminus mit den Aminosäuren Met-Gly-Cys (MGC). Nach der Abspaltung des Starter-Methionins erfolgt eine co-translational Myristoylierung am Glycin und danach eine post-translational Palmitoylierung am Cystein. Auch die Palmitoylierung weiterer Cystein-Reste nach der Minikonsensus-Sequenz, wie z.B. bei *fyn* konnte beobachtet werden, wie ebenso eine Palmitoylierung von zuvor myristoylierten Proteine, denen das MGC-Motiv fehlt, beispielsweise des Hefeproteins Vac8p [Veit et al., 2001]. Die S-Acylierung dieser Proteine kann nicht ohne vorangehende Myristoylierung erfolgen [Galbiati et al., 1994; Hallak et al., 1994; Koegl et al., 1994; Robbins et al., 1995]. Eine bei der alleinigen Expression wegen fehlender Myristoylierung nicht acylierte Mutante der G-Protein-Untereinheit α_{i1} konnte allerdings bei Co-Expression mit den β - und γ -Untereinheiten und einer dadurch erzielten Membranlokalisation mit radioaktiven Fettsäuren markiert werden [Degtyarev et al., 1994].

Für dual acylierte Proteine wie p59 *fyn* oder p56 *lck*, die zunächst myristoyliert und dann palmitoyliert werden, wurde von verschiedenen Autoren das *kinetic membrane trapping model* („kinetisches Membranfallenmodell“) postuliert [Hancock et al., 1990; Shahinian und Silvius, 1995; van't Hof und Resh, 1997; Dunphy und Linder, 1998]. Hierbei kommt der

zuerst stattfindenden Myristoylierung die Aufgabe zu, das Protein durch erhöhte Hydrophobizität in die Nähe der Membran zu steuern. Hier kommt es vermutlich zu einer Interaktion mit dem postulierten membrangebundenen Enzym Protein-Acyl-Transferase (PAT), wodurch Palmitoyl-CoA kovalent an einen oder mehrere Cystein-Reste des Proteins gebunden wird. Erst dies führt zur stabilen Membranbindung des Proteins [Shahinian und Silvius, 1995].

Doppelt-acylierte Proteine weisen oftmals positiv geladene Aminosäuren in der Nähe der Palmitoylierungsstelle auf, die die Membran-Assoziation dieser Proteine verstärken und somit die Zugänglichkeit für eine Protein-Acyl-Transferase (PAT) erhöhen [Resh, 1999]. Übereinstimmend mit dieser Aussage weist beispielsweise die *src*-Kinase *fyn*, die Lysin-Reste an den Positionen 7, 9 und 13 hat, eine wesentlich höhere Membranassoziierungs-Kinetik auf als die verwandte Kinase *lck*, die N-terminal keinerlei basische Aminosäuren hat [van't Hof und Resh, 1997; Bijlmakers und Marsh, 1999]. Auch eine *fyn*-Mutante, bei der die Palmitoylierungsstelle entfernt wurde, zeigt eine Membranassoziierung in höherem Ausmaße als nicht-palmitoyliertes *lck* [Shenoy-Scaria et al., 1993; Kwong und Lublin, 1995; Yurchak und Sefton, 1995]. Ebenso können hydrophobe Aminosäuren im Umfeld von Cysteinen die Palmitoylierung in einigen cytosolischen Proteinen beeinflussen. So ist die endotheliale Form der Stickstoffsynthase (eNOS) durch Myristoylierung des Gly₂ und durch Palmitoylierung der Cystein-Reste an den Positionen 15 und 26 modifiziert [Liu et al., 1995]. Die Sequenz zwischen diesen beiden Cystein-Resten enthält fünf Wiederholungen der Abfolge Glycin – Leucin, die unbedingt notwendig für die Palmitoylierung und dadurch die Lokalisation des Proteins sind [Liu et al., 1996], nicht aber für die N-Myristoylierung, Membran-Assoziation und Aktivität der Stickstoffsynthase [Liu et al., 1997].

In einer Studie mit artifiziell hergestellten Peptiden wurden Konstrukte erstellt, die jeweils aus der Konsensus-Sequenz Met-Gly-Cys-Thr-Leu-Ser, gefolgt von einigen Wiederholungen des Aminosäure-Triplets Ala-Gly-Ser bestanden. In diese Konstrukte wurden dann Spacer-Sequenzen eingefügt, so dass das zu palmitoylierende Cys₃ schließlich drei, neun, 15 oder 21 Aminosäure-Reste entfernt von der Myristoylierungsstelle vorlag. Mit zunehmender Entfernung sank das Palmitierungs-Niveau, wie auch in anderen Veröffentlichungen beschrieben. Eine Plasmamembran-Assoziierung erfolgte nur, wenn das Peptid neben der Myristoylierung gleichzeitig auch palmitoyliert war. Nur die beiden Acylierungen kombiniert konnten das Peptid in Cholesterol-angereicherte Bereiche leiten [Navarro-Lerida et al., 2002]. Es gibt allerdings auch N-terminal palmitoylierte Proteine, die nicht gleichzeitig auch myristoyliert sind. Hierzu zählen bestimmte α -Unterheiten der G-Proteine, wie $G_{\alpha_{12}}$ und $G_{\alpha_{13}}$ [Ponimaskin et al., 1998; Ponimaskin et al., 2000]. Auch hier kommt den hydrophoben

Aminosäuren in der Nachbarschaft der palmitoylierten Cysteine eine große Bedeutung zu, selbst wenn die wiederholten Glycin-Leucin-Motive wie bei eNOS in anderen Proteinen nicht gefunden werden können. Das Gerüstprotein PSD95 aus der MAGUK-Familie, das wichtig für die Zusammenlagerung neuronaler Rezeptoren an postsynaptischen Membranen ist, liegt ebenso physiologisch an Cys₃ und Cys₅ palmitoyliert vor [Topinka und Bredt, 1998]. Werden die Aminosäuren Leu₄, Ile₆ oder Val₇ durch andere hydrophobe Aminosäuren ersetzt, so hat dies keinen Einfluss auf die Palmitoylierung, wohingegen Austausch gegen Alanin, Serin oder saure Aminosäuren die Palmitoylierung signifikant vermindert [El Husseini et al., 2000]. Ebenso gilt auch für das an Cys₃ und Cys₄ palmitoylierte GAP43-Protein [Skene und Virag, 1989], dass Serin-Reste anstelle der normalerweise vorliegenden Aminosäuren Leu₂ und Met₅ die Palmitoylierung verhindern. Wird der Methionin-Rest dagegen durch die hydrophobe Aminosäure Isoleucin ersetzt, wird die Palmitoylierung nur teilweise gehemmt [El Husseini et al., 2000]. Für die Palmitoylierung des in neuronalen Wachstumszapfen gefundenen nicht-myristoylierten Proteins GAP43 sind dagegen die basischen Aminosäuren im Umfeld immens wichtig [Liang et al., 2002].

Wie auch für integrale Membranproteine ist es bei peripheren Proteinen im Moment noch schwer, Vorhersagen über die Palmitoylierung spezifischer Proteine zu treffen. Das Glutamaterezeptor-interagierende Protein 1 (GRIP1) wird in zwei Splice-Varianten, GRIP1a und GRIP1b, synthetisiert, die sich nur in ihren N-terminalen Regionen unterscheiden. Beide Proteine weisen N-terminale Cystein-Reste und Zusammenlagerungen von basischen und hydrophoben Aminosäuren auf, aber nur GRIP1b ist auch palmitoyliert [Yamazaki et al., 2001]. Eine ähnliche Situation trifft für die zwei Formen der Glutaminsäure-Decarboxylase, GAD65 und GAD67, zu: obwohl beide Proteine Cystein-Reste innerhalb einer zentralen Region aufweisen, liegt nur GAD65 palmitoyliert vor [Solimena et al., 1994].

C-terminal palmitoylierte Proteine

Zu den C-terminal palmitoylierten peripheren Proteinen zählen die Ras-Proteine, GTP-bindende Proteine aus verschiedenen Signaltransduktions-Kaskaden, die in mutierter Form das Wachstum von Tumoren auslösen können. Als Konsensus-Sequenz für die Isoprenylierung beinhalten diese Proteine C-terminal die so genannten "CAAX-Box" (Konsensus-Sequenz Cystein – aliphatische Aminosäure – aliphatische Aminosäure – beliebige Aminosäure), wobei der betreffende Cystein-Rest über eine Thioetherbindung isoprenyliert wird, nachdem die drei terminalen Aminosäuren (AAX) proteolytisch abgespalten wurden [Casey, 1994; Gelb et al., 1998]. An weiteren Cystein-Resten kann dann die Palmitoylierung erfolgen. Ähnlich wie bei N-terminal palmitoylierten Proteinen die Myristoylierung, ist die Isoprenylierung eine Voraussetzung für die nachfolgende C-terminale

Palmitoylierung [Jung et al., 1995]. Einzig das Protein K-Ras-B wird nicht palmitoyliert, da sich eine polybasische Region an Stelle der zu palmitoylierenden Cysteine befindet, die durch Bindung an negativ geladene Phospholipide die Membrananker-Funktion der Fettsäuren ersetzen kann [Resh, 1999].

Intern palmitoylierte Proteine

Eine weitere Lokalisierung palmitoylierter Cystein-Reste in peripheren Membranproteinen konnte erst vor kurzem gefunden werden, wobei die Palmitoylierung hier an einer Ansammlung von Cysteinen in der Mitte des Proteins erfolgt. Beispiele hierfür sind das neuronale SNAP-25 mit vier Cysteinen [Veit, 2000], das ebenfalls neuronale Torpedo Cystein String-Protein mit 14 Cysteinen [Gundersen et al., 1994] und die Familie der CHIC-Proteine mit acht Cysteinen [Cools et al., 2001]. Über die Palmitoylierung hinausgehende hydrophobe Modifikationen sind für diese Proteine nicht beschrieben. Eine Palmitoylierung der intern gelegenen Cysteine bewirkt, dass das modifizierte Protein sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Domäne dem Cytoplasma zuwenden kann. Die Aminosäuren in der Umgebung der Cysteine sind wiederum nicht streng konserviert. So gibt es von SNAP-25 zwei Formen, die durch unterschiedliches Splicen entstehen und sich ausschließlich in den Aminosäuren in der Umgebung der palmitoylierten Cysteine unterscheiden. Beide Formen sind an den vier Cysteinen acyliert [Bark et al., 1995]. Daneben gibt es Homologe von SNAP-25, z.B. SNAP-23, die ebenfalls an zentralen Cysteinen palmitoyliert sind [Vogel und Roche, 1999], aber auch Isoformen, z.B. SNAP-29, die in dieser Region kein Cystein besitzen und die offensichtlich auch nicht palmitoyliert sind [Steggmaier et al., 1998].

Bei peripheren Membranproteinen gibt es außer des N-terminalen MGC-Motivs und der C-terminalen „CAAX-Box“ keine übereinstimmenden Sequenzen für die Palmitoylierung. Vermutlich dient die der Palmitoylierung vorausgehende hydrophobe Modifikation, also Isoprenylierung oder Myristoylierung, dazu, das Protein kurzzeitig an zelluläre Membranen zu binden, was der Protein-Acyl-Transferase (PAT) ermöglicht, das Protein zu palmitoylieren. Sowohl die Myristoylierung als auch die Isoprenylierung sind beide für die Palmitoylierung entbehrlich, wenn eine Membranbindung des Substrates durch andere Mechanismen, z.B. durch basische oder hydrophobe Aminosäuren, erreicht wird. Das Signal für die Palmitoylierung peripherer Membranproteine ist aber offenbar weniger komplex als bei integralen Membranproteinen und in wenigen Aminosäuren codiert. Werden die ersten 10 bis 15 Aminosäuren von GAP-43 oder G α an andere periphere, normalerweise nicht acylierte Proteine fusioniert, so kann damit eine Palmitoylierung des Chimärenproteins erzielt werden [Galbiati et al., 1999].

2.2.3.6.2 *Integrale Membranproteine*

Viele virale und zelluläre integrale Membranproteine sind an Cystein-Resten palmitoyliert, die entweder in der Transmembranregion (TMR) oder in der Cytoplasma-Domäne (CPD) lokalisiert sind. Obgleich nur bestimmte Cystein-Reste palmitoyliert werden, schwankt ihre Position beträchtlich in unterschiedlichen Acylproteinen. Die Aminosäure-Sequenzen in der Umgebung der acylierten Cysteine sind nicht konserviert, und die einzigen Übereinstimmungen in der Aminosäure-Sequenz von palmitoylierten integralen Membranproteinen, sowohl vom Typ I als auch vom Typ II, ist die Lage der betreffenden Cysteine in der cytoplasmatischen Domäne nahe der Transmembranregion oder in der Transmembran-Domäne selbst [Sefton und Buss, 1987; Schlesinger et al., 1983]. Hierbei liegen palmitoylierte Cystein-Reste meist innerhalb von vierzehn Aminosäuren juxtamembranär [Schmidt et al., 1988; Ponimaskin und Schmidt, 1995; Reverey, 1996], auch wenn anscheinend noch weiter entfernte Cystein-Reste befriedigend acyliert werden können [Kawate und Menon, 1994]. Eine Palmitoylierung von Cysteinen, die mitten in der TMR oder in der CPD weit vom membranspannenden Segment entfernt sind, findet nicht statt. Diese Topologie weist auf die Protein-Acyl-Transferase (PAT) als membrangebundenes zelluläres Enzym mit einer Orientierung des aktiven Zentrums zum Zytoplasma hin, weshalb ein Cystein-Rest, der zu tief in der Transmembranregion oder zu weit entfernt in der cytoplasmatischen Domäne liegt, von der PAT nicht erreicht werden kann. Die Position der acylierten Cysteine schwankt aber beträchtlich in unterschiedlichen Acylproteinen, und eine Kontrolle der Aminosäuren in der Nähe der Verbindungsstelle zwischen TMR und CPD deckt kein offensichtliches Konsensussignal für die Palmitoylierung auf, wie es sie beispielsweise für die N-Myristoylierung gibt [Towler et al., 1988].

Der Abstand vom cytosolisch palmitoylierten Cystein zur Transmembranregion in integralen Membranproteinen ist nicht für jedes Protein gleich. So beträgt dieser Abstand vier Aminosäure bei CD4 [Crise und Rose, 1992], sechs Aminosäuren für p63 [Schweizer et al., 1995], einige Hämagglutinin-Subtypen des Influenzavirus [Veit et al., 1991], das G-Protein des Vesicular Stomatitis-Virus [Rose et al., 1984] und das Surfactant Protein-C, zehn Aminosäuren für das Endothelin-Converting-Enzym 1 [Schweizer et al., 1999], sowie zwölf Aminosäuren im Fall des α 2A-Adrenergen Rezeptors [Kennedy und Limbird, 1994] und des β 2-Adrenergen Rezeptors [O'Dowd et al., 1989]. Allerdings läuft in einigen Proteinen auch die S-Acylierung von Membran-ferneren Cysteinen ab, wie bei dem Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR), bei dem das palmitoylierte Cystein 34 Aminosäuren von der TMR entfernt ist [Schweizer et al., 1996; Breuer und Braulke, 1998], und bei Hüllproteinen (*Env*) der Immundefizienz-Viren von Primaten [Yang et al., 1995]. So ist das

Env-Protein des HIV-1 HXB2-Virus an Cysteinen palmitoyliert, die 59 und 132 Aminosäuren von der Membrangrenze entfernt liegen. Von diesen beiden Cystein-Resten ist das Membran-nähere Cystein in den meisten HIV-Arten konserviert und nahe einer amphipatischen Helix lokalisiert, die mit der Membran interagieren könnte [Yang et al., 1995]. In einigen Fällen, wie bei dem Transferrin-Rezeptor [Jing und Trowbridge, 1987], können auch Palmitoylierungsstellen innerhalb der Transmembranregion gefunden werden.

Obwohl die palmitoylierten Cysteine über einen großen Bereich in der Grenzregion zwischen der Transmembranregion und der cytoplasmatischen Domäne verteilt sind, ist bei manchen Proteinen offenbar die genaue Lokalisation wichtig. Beispielsweise wurde für das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Typ II-Membranprotein p63 gezeigt, dass das Palmitoylierungs-Niveau strikt von seinem Abstand von exakt sechs Aminosäuren von der TMR abhängt, da Änderung der Spacer-Länge mehr oder weniger den kompletten Verlust der Palmitoylierung bedeutete [Schweizer et al., 1995].

Auch im Surfactant-Protein C, einem der vier Proteine im Lipid-Protein-Gemisch ("surfactant") auf der Oberfläche der Lungenalveolen, beeinflusste die Änderung des Abstands zwischen Cystein-Resten und der Transmembranregion die S-Acylierung, es zeigte sich eine reziproke Wechselbeziehung zwischen der Länge des Spacers und dem Palmitoylierungsniveau [Ten Brinke et al., 2002], wenn auch weniger absolut als bei p63 [Schweizer et al., 1995].

Ähnliche Resultate ergaben sich auch für intensive Untersuchungen an der H1-Untereinheit des humanen Asialoglycoprotein-Rezeptors. Durch umfangreiche Mutagenese wurde gezeigt, dass weder die native Aminosäure-Sequenz in der Nachbarschaft des palmitoylierten Cystein-Rests noch die Sequenz der cytoplasmatischen Domäne an sich einen Einfluss auf die S-Acylierung ausüben. Im Gegensatz dazu war die Palmitoylierung komplett unterbunden, wenn die Acylierungsstelle weitere 30 Aminosäuren von der TMR entfernt versetzt wurde. Die Länge des Segments zwischen Acylierungsstelle und Transmembranregion entscheidet demnach über die Palmitoylierung [Yik und Weigel, 2002].

Es hat bislang nur wenige Veröffentlichungen über die strukturellen Anforderungen für die Palmitoylierung integraler Membranproteine gegeben. Eine generelle, wenn auch sehr ungenaue Konsensus-Sequenz für die Lokalisation der Cysteine in palmitoylierten Proteinen wurde nach Computer-assistiertem Sequenz-Alignment bekannter palmitoylierter integraler Membranproteine als TMDX₁₋₁₂AA(C)A beschrieben, wobei TMD für die Transmembran-Domäne, X für beliebige und A für aliphatische Aminosäuren steht; C bedeutet

palmitoyliertes Cystein [Grosenbach et al., 1997]. Dieselbe Arbeitsgruppe publizierte wenig später eine konservierte Aminosäuresequenz einiger Acylproteine, die als Signal-Sequenz für die Palmitoylierung aller Proteine, sowohl integral als auch peripher, gelten soll: *Hydro*^{*}AAC(C)A. *Hydro*^{*} steht für einen hydrophoben Anteil eines Proteins, repräsentiert entweder durch eine hydrophobe Abfolge von Aminosäuren, eine zuvor erfolgte hydrophobe Modifizierung oder eine ein bis zwölf Aminosäuren weit entfernte Transmembranregion, wie zuvor beschrieben [Hansen et al., 1999].

Hieraus könnte gefolgert werden, dass ein Transmembranprotein acyliert wird, wenn Cystein-Reste grenznah zwischen Transmembranregion und cytoplasmatischer Domäne vorliegen. Die Anwesenheit eines Cystein-Rests in dieser so genannten Acylierungsregion ist allerdings nicht die einzige Voraussetzung für eine Palmitoylierung, da sich der Sequenzkontext in dieser Region als ebenfalls bedeutsam herausgestellt hat. So gibt es integrale Membranproteine, wie das kleine hydrophobe Protein des humanen Respiratorischen Synzytialvirus mit einem Cystein-Rest in verhältnismäßig kurzem Abstand von der TMR, die nicht palmitoyliert werden können [Collins und Mottet, 1993].

Allein mutagene Einfügung von Cystein-Resten in diese empirische Acylierungsregion des nicht-palmitoylierten Fusionsproteins des Sendaivirus reicht nicht zur Palmitoylierung aus [Ponimaskin und Schmidt, 1995], weshalb zusätzliche strukturelle Eigenschaften für die S-Acylierung der Transmembranproteine vorliegen müssen. In einer Studie mit dem palmitoylierten Hämagglutinin des Influenzavirus A (Subtyp H7) und dem nicht-acylierten Fusionsprotein des Sendaivirus (Strain Z) mit eingefügten Cystein-Resten in der Acylierungsregion wurde eine Reihe neuer Chimären-Proteine mit gegeneinander ausgetauschter Transmembranregion oder cytoplasmatischer Domäne erstellt. Einfügen von TMR oder CPD des Hämagglutinins in das nicht-acylierte Fusionsprotein führte zu dessen Palmitoylierung. Diese Experimente zeigen, dass sowohl die Transmembranregion als auch die cytoplasmatische Domäne des Hämagglutinins entscheidende strukturelle Informationen für die Palmitoylierung beinhalten, wohingegen für die extrazelluläre Domäne keine Bedeutung für den Transfer von Fettsäuren auf seine Acylierungsstellen beobachtet werden konnte [Ponimaskin und Schmidt, 1998].

Während also das Einfügen von Cystein-Resten in die Cytoplasma-Domäne des normalerweise nicht-palmitoyliert vorliegenden Fusionsproteins des Sendai-Virus nicht zu dessen Palmitoylierung führt, findet aber bei einer Chimäre dieses mutierten Fusionsproteins, bei der die Transmembran-Domäne gegen die des Influenza Hämagglutinins getauscht ist, Palmitoylierung statt. Sogar der Austausch einzelner

Aminosäuren im cytoplasmatischen Teil der Transmembranregion gegen die entsprechenden Aminosäuren des Influenza A-Hämagglutinins kann die Palmitoylierung des Fusionsproteins bewirken. So führte das Einfügen der letzten sieben Aminosäuren (Gly-Leu-Val-Phe-Ile-Ile-Val) zu einer relativen Palmitoylierung von ungefähr 20 % im Vergleich zum Wildtyp-Hämagglutinin, die letzten sechs Aminosäuren zeigten eine Acylierungsrate von 10 %, und die Mutante mit ausgetauschten vier Aminosäuren zeigte immerhin noch eine Palmitoylierung von 4,5 %. Strukturmodelle der Transmembran-Domäne des Influenza A-Virus Hämagglutinins, so genannte Helix Wheel-Plots, zeigen eine Helix, bei der nicht-hydrophobe Aminosäuren zu einer Seite hin ausgerichtet sind. Änderungen der Aminosäuresequenz, bei denen hydrophobe Aminosäuren in diese Seite hineingebracht werden, führen zu einer reduzierten Palmitoylierung des Hämagglutinins, woraus abgeleitet werden kann, dass nicht-hydrophobe Aminosäuren in der Transmembran-Domäne eine S-Acylierung von Proteinen ermöglichen können [Ponimaskin und Schmidt, 1998].

Folglich besteht die Möglichkeit, dass es Aminosäuren gibt, die einen negativen Effekt auf die Palmitoylierung haben, wie in einer *in vitro*-Studie an aus β_2 -Adrenergen Rezeptorproteinen entwickelten kurzen Peptiden weiter untersucht wurde. In diesen Proteinen sind oftmals jeweils vor und nach den Palmitoylierungsstellen Zusammenlagerungen von hydrophoben und basischen Proteinen zu beobachten. Bei der nicht-enzymatischen *in vitro*-Palmitoylierung von Peptiden, die der C-terminalen Domäne des β_2 -adrenergen Rezeptors entsprechen, wurde angemerkt, dass diese Anordnung der Aminosäuren optimal für die S-Acylierung sei, auch wenn dieses Sequenzmuster nicht in allen palmitoylierten integralen Membranproteinen konserviert und die Relevanz für die Palmitoylierung *in vivo* noch immer unklar ist. Als Schlussfolgerung dieser Studie wurde postuliert, dass basische Aminosäuren essentiell und hydrophobe Aminosäuren begünstigend für eine Palmitoylierung seien, wohingegen saure Aminosäuren die Palmitoylierung vollständig hemmen würden [Belanger et al., 2001].

Im Gegensatz dazu hatte aber die Deletion der sieben positiv-geladenen Aminosäuren aus der cytoplasmatischen Domäne distal des Cystein-Rests keine Auswirkungen für die Palmitoylierung des α_2 -adrenergen Rezeptors [Kennedy und Limbird, 1994]. Im Falle des Cocksackie- und Adenovirus-Rezeptors (CAR), der die Membran einmal durchspannt, scheint es keine Notwendigkeit für cytoplasmatischen Strukturen gleich welcher Art zu geben, wobei in dieser Untersuchung allerdings die potentielle Rolle der Transmembran-Domäne dieses Proteins völlig außer Acht gelassen wurde [van't Hof und Crystal, 2002].

In einer weiteren Studie wurden 26 synthetische Peptide hergestellt, die die Palmitoylierungsstellen gut bekannter Proteine wie SNAP-25, CD4, dem β 2-adrenergen Protein, dem Proteolipid-Protein und dem Transferrin-Rezeptor repräsentierten. Zusammenfassend zeigten hier die Peptide mit basischen und aromatischen Aminosäure-Resten nahe den Cystein-Resten die höchste S-Acylierungsrate. Da generell die Palmitoylierungsregionen vieler Proteine von basischen Aminosäuren umgeben sind, könnte das ein Ansatz sein, die vermeintliche Spezifität der Akzeptor-Sequenz bei nicht-enzymatischen Palmitoylierungsprozessen zu erklären [Bizzozero et al., 2001].

Analysen am 37 kDa-Hüllproteins des Vaccinia-Virus entsprechend der postulierten Konsensus-Sequenz *Hydro⁺AA(C)A* ergaben, dass die beiden aliphatischen Aminosäuren vor dem palmitoylierten Cystein erforderlich für die Palmitoylierung sind, im Gegensatz dazu aber der Austausch der nachfolgenden aliphatischen Aminosäure, im vorliegenden Fall Leucin gegen Glycin, die Palmitoylierung verstärkt. Generell erwiesen sich die Aminosäuren stromaufwärts der Palmitoylierungsstelle in Richtung TMR als unbedingt notwendig für die Palmitoylierung, wohingegen die zehn Aminosäuren stromabwärts unbedeutend waren [Hansen et al., 1999].

Studien an dem relativ einfach strukturierten Vorläufer des Surfactant-Proteins C (proSP-C) zeigten, dass proSP-C leistungsfähig und unabhängig von der Art der Aminosäuren zwischen den Cystein-Resten und der Transmembranregion palmitoyliert wird. Die zwei juxtamembranär-liegenden positiv-geladenen Aminosäuren Lys₃₄ und Arg₃₅ zeigten keinen direkten Effekt auf die Palmitoylierung von proSP-C, beeinflussten aber die zelluläre Lokalisation des Proteins [Ten Brinke et al., 2001]. Die Aminosäuren, die zwischen den palmitoylierten Cystein-Resten und der Transmembranregion liegen, enthalten kein Signal für die Palmitoylierung von proSP-C [Ten Brinke et al., 2002]. ProSP-C konnte ebenso in Anwesenheit einer Transmembranregion mit einer künstlichen Aminosäure-Sequenz in einer Länge, die der Stärke der Membran entspricht, palmitoyliert werden. Zu diesem Zweck wurden chimärische Konstrukte gebildet, in denen die Transmembranregion von proSP-C, die Aminosäuren 36-58, durch artifizielle TMR-Sequenzen ersetzt wurde. Diese künstlichen TMR's bestanden aus bis zu vierfacher Wiederholung der Sequenz Leu-Ala-Ala-Leu oder Leu-Leu-Ala-Leu-Leu. Die Palmitoylierungsniveaus der Chimären waren mit dem Wildtyp vergleichbar. Nur eine für die Membranverankerung zu kurze Aminosäure-Folge oder zu viele Aminosäuren verringerte die Palmitoylierung. Die Transmembranregion von proSP-C scheint folglich keine Informationen zu enthalten, die für die Palmitoylierung erforderlich sind [Ten Brinke et al., 2002]. Allerdings induzierten diese proSP-C-Chimären mit den artifiziellen Transmembranregionen Membran-Kompartimente mit abweichender

Morphologie, so dass die reguläre Sequenz Einfluss auf Membran-Formation und Morphologie zu haben scheint, was *in vivo* unter physiologischen Bedingungen relevant sein könnte [Ten Brinke et al., 2003]. Der Ersatz der vier N-terminal der palmitoylierten Cysteine von proSP-C liegenden Aminosäuren Phe-Gly-Iso-Pro durch Alanin-Reste hatte einen drastischen Einfluss auf das Palmitoylierungsniveau von proSP-C. Diese Verringerung der Palmitoylierung wurde hauptsächlich durch den Ersatz von Ile-26 verursacht. Überraschenderweise hatte die komplette Deletion der vier Aminosäuren keinen Effekt auf die Palmitoylierung, da die jetzt N-terminal der Cystein-Reste liegende Aminosäuresequenz Pro-Arg-Gly-Arg, ursprünglich die letzten vier Aminosäuren des N-terminalen Propeptids, nun das positiv geladene Arginin anstelle der hydrophoben Phenylalanin- und Isoleucin-Reste enthielt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass in diesem Bereich Aminosäuren anwesend sein müssen, die mit der Membran interagieren können, wie das positiv geladene Arginin oder die hydrophoben Aminosäuren, Dies war nicht der Fall bei Austausch dieser Aminosäuren durch Alanin, was selbst eine nur schwache Hydrophobizität zeigt. In einigen Spezies wurde in Position 24 ein Leucin-Rest anstelle des Phenylalanins und in Position 25 ein Arginin-Rest anstelle eines Glycins gefunden, was die Vermutung stützt, dass N-terminale hydrophobe und / oder basische Reste neben dem Cystein für eine Palmitoylierung vorteilhaft sind, indem sie möglicherweise Interaktion mit der Membran vermitteln [Ten Brinke et al., 2002].

Eine gerichtete Mutagenese der Aminosäure-Reste ₉₉₋₁₀₅ im p63-Protein zeigte allerdings, dass die Aminosäuren um das palmitoylierte Cystein nicht bedeutsam für die Palmitoylierung sind, diese also ohne ein primäres Sequenzmotiv aufzutreten scheint [Schweizer et al., 1995]. Auch eine Chimäre des Proteins p63, in der die Transmembranregion von p63 durch die Transmembranregion des Plasmamembranproteins Dipeptidylpeptidase IV (CD26) ersetzt worden war, wurde nicht in Bezug auf die Palmitoylierung beeinflusst [Schweizer et al., 1995]. Demgegenüber erfolgte eine drastische Abnahme der Palmitoylierung nach Austausch der Transmembranregion des Hämagglutinins durch die entsprechende Domäne des Sendaviruses F-Proteins, woraus gefolgert wurde, dass die TMR Informationen für eine Palmitoylierung enthält [Ponimaskin und Schmidt, 1998].

Die generellen Probleme, Palmitoylierungssignale zu erkennen, werden am Beispiel des CD8-Rezeptorproteins verdeutlicht. CD8 ist ein Co-Rezeptor des T-Zell-Antigenrezeptors (TCR) auf cytotoxischen T-Zellen. Das CD8-Heterodimer lagert sich vor dem Austritt aus dem Endoplasmatischen Retikulum zusammen. Sowohl CD8 α als auch CD8 β beinhalten Cysteine nahe der Grenze zwischen TMR und Cytoplasma, aber nur CD8 β wird palmitoyliert.

Die Hydrophobizität beider Proteine ist vergleichbar, und in beiden Proteinen finden sich positiv geladene Aminosäuren nahe der Cysteine [Arcaro et al., 2000].

Die angeführten Veröffentlichungen mit z.T. sehr unterschiedlichen Ergebnissen legen deshalb nahe, dass die Palmitoylierung integraler Membranproteine mehr von der Wahrscheinlichkeit der Cystein-Interaktion mit der Membran-gebundenen Palmitoyltransferase als von spezifischen Sequenzmotiven abhängt. Auch ein Sequenzvergleich bekannter palmitoylierter Proteine führte nicht zu einer eindeutigen Konsensus-Sequenz für die Palmitoylierung, auch wenn bestimmte Aminosäure-Gruppen relativ häufig vertreten waren. Der tatsächliche Einfluss dieser Aminosäuren auf die Acylierung muss jedoch in weiteren Experimenten untersucht werden.

2.3 KURZE DARSTELLUNG DER IM RAHMEN DIESER ARBEIT UNTERSUCHTEN PROTEINE

2.3.1 FUSIONSPROTEIN DES SENDAI-VIRUS

Das Sendaivirus (auch Hemagglutinating Virus of Japan oder Murines Parainfluenzavirus, Serotyp 1) gehört zur Familie der Paramyxo-Viren und verursacht bei Mäusen eine interstitielle Pneumonie [Ishida und Homma, 1978]. Es besitzt eine pleomorphe Struktur mit einem Durchmesser von ungefähr 150 nm [Kuroya et al., 1953]. Das Nukleokapsid ist helikal, unsegmentiert und wird durch eine Lipiddoppelschicht umgeben, in die zwei Glykoproteine eingebettet sind [Klenk et al., 1977; Lyles, 1979; Caldwell und Lyles 1981; Morrison, 1988]. Die Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) vermittelt die Bindung an die zellulären Rezeptoren Sialoglykoproteine oder -lipide [Nagai und Klenk, 1977; Markwell et al., 1981] und liegt hauptsächlich in Oligomeren vor, wobei Dimere durch Disulfidbrücken, Tetramere durch nicht-kovalente Bindungen zusammengefügt sind [Markwell und Fox, 1980; Sechoy et al., 1987].

Das zweite Oberflächenglykoprotein des Sendaivirus ist das Fusionsprotein (F-Protein), was für den Eintritt des Nukleokapsids in das Zytoplasma der Wirtszelle notwendig ist [Choppin et al., 1981]. In infizierten Vertebraten-Wirtszellen wird das Fusionsprotein als inaktiver Vorläufer synthetisiert, dessen Fusions-Fähigkeiten durch proteolytische Spaltung in zwei mit Disulfidbrücken verbundene Untereinheiten durch eine Trypsin-ähnlichen Endoprotease aktiviert werden [Scheid und Choppin, 1974; Mottet et al., 1986]. Durch Konformationsänderung kommt es zur Exposition eines hydrophoben, aminoterminalen Segments der F1-Untereinheit, des Fusionspeptids [Scheid und Choppin, 1977; Hsu et al., 1981; Barnes, 1989; Rapaport und Shai, 1994], was mit der Wirtszellmembran interagieren

und so den Fusionsvorgang einleiten kann [Gething et al., 1978a, 1978b; Hsu et al., 1981; Sarkar und Blumenthal, 1988], wobei allerdings die Anwesenheit der HN-Proteine gleichfalls nötig ist [Henis et al., 1989; Horvath et al., 1992; Bagai et al., 1993; Miura, 1993; Bousse et al., 1994; Tomasi et al., 2003]. Der Infektionszyklus beginnt mit der Anlagerung viraler Partikel an N-Acetyl-Neuraminsäure-haltige Rezeptoren der Zelle. Nach dieser Adsorption folgt das Eindringen in die Zelle und die Freisetzung des genetischen Materials durch Fusion der viralen Hülle mit der zellulären Plasmamembran [Choppin et al., 1975; Choppin und Scheid, 1980; Novick und Hoekstra, 1988].

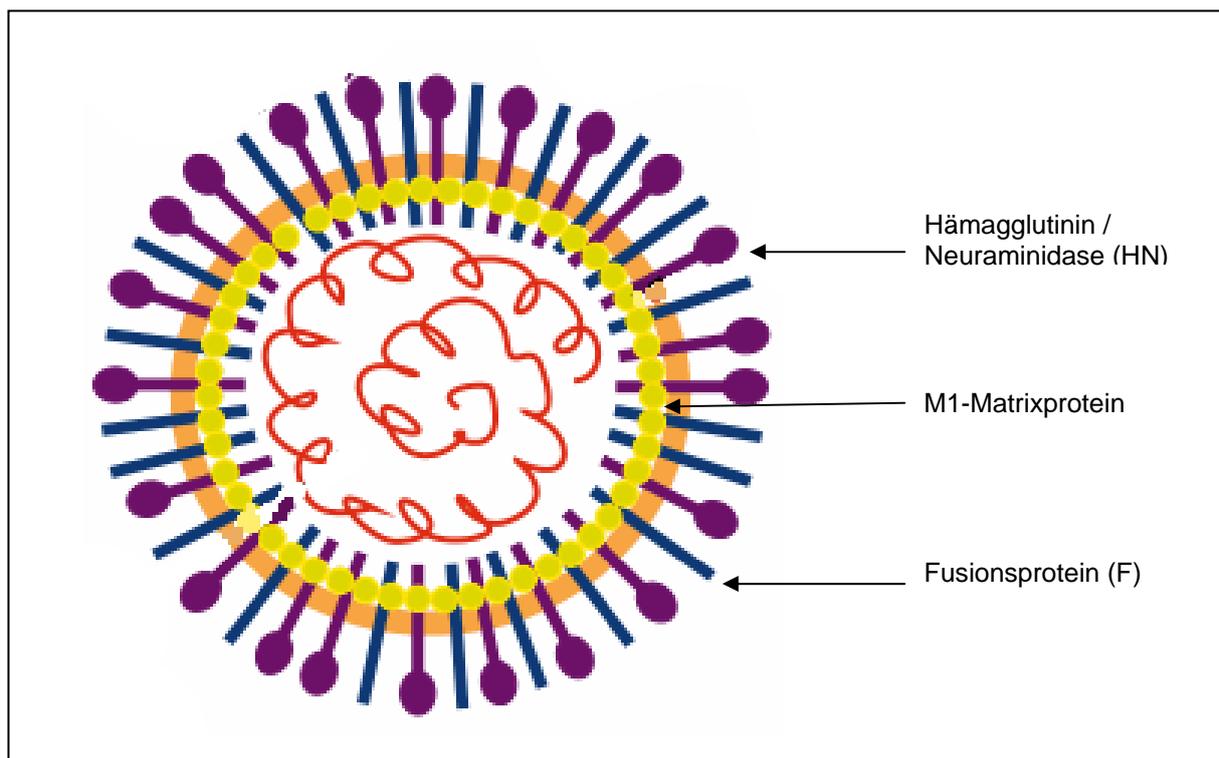


Abb. 3: Schematischer Aufbau des Sendai-Virus.

Das Fusionsprotein ist durch eine hydrophobe Folge von Aminosäuren mit dem C-Terminus in der Membran verankert [Scheid und Choppin, 1974; Paterson et al., 1985; Peisajovich et al., 2002], wobei ein kleiner hydrophiler Teil im Cytoplasma liegt [Lyles, 1979]. Der größte Teil des Proteins liegt extrazellulär und ist Träger der biologischen Aktivität. Die Synthese des Fusions-Proteins erfolgt an membrangebundenen Ribosomen, wonach die wachsende Polypeptidkette in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums überführt wird. Die Proteine enthalten eine N-terminale Signalsequenz, die aus einer hydrophoben Folge von Aminosäuren besteht [Gorman et al., 1988]. Während die internale Signalsequenz des HN nicht abgespalten wird und das Protein in der Membran des ER verankert [Blobel, 1980; Wickner und Lodish, 1985], wird im Gegensatz dazu die Signalsequenz des F-Proteins abgespalten und das Protein durch eine andere C-terminale hydrophobe Aminosäure-

Sequenz in der ER-Membran befestigt [Bowen und Lyles, 1981; Moscufo et al., 1987; Paterson und Lamb, 1987]. Während des Transports vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran wird das Protein modifiziert [Blobel, 1980; Simons und Garoff, 1980; Wickner und Lodish, 1985]. Die umfangreichste Modifikation stellt die Glykosylierung dar, wobei co-translational Oligosaccharide mit bestimmten Asparagin-Resten in N-glykosidischer Bindung verknüpft werden [Morrison und Simpson, 1980; Yoshima et al., 1981; Rose und Doms, 1988; Vidal et al., 1989; Ponimaskin et al., 1994]. Neuere Untersuchungen des Fusionsproteins mittels Cryo-Elektronenmikroskopie zeigen, dass Fusionsproteine hauptsächlich zu Trimeren zusammengelagert auftreten [Lamb et al., 1999; Ludwig et al., 2003]. Hydrophobe Modifikationen, wie sie für andere F-Proteine von Paramyxo-Viren beschrieben wurden, konnten beim F-Protein des Sendaivirus nicht beobachtet werden [Veit et al., 1989], wie auch keine Cystein-Reste in der potentiellen Acylierungsregion dieses Proteins vorkommen.

2.3.2 HÄMAGGLUTININ DES INFLUENZA A-VIRUS

Influenza-Viren gehören zu der Familie der Orthomyxo-Viren, bei denen es sich um behüllte Viren mit einem einzelsträngigen, segmentierten RNA-Genom in Negativstrangorientierung handelt [Moorman, 2003]. Das Nukleokapsid der Influenza A-Viren besteht aus acht Gensegmenten einzelsträngiger RNA, die auf ihrer ganzen Länge mit Nukleoproteinen komplexiert sind [Lamb und Choppin, 1983]. Es ist von einer Hüllmembran umgeben, in die Glykoproteine (Spikes) eingelagert sind: die drei integralen Proteine Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und das Matrixprotein M2 sowie das Membran-assoziierte Protein M1 (*Abb. 4*). Bei Influenza A-Viren wurden bis heute 16 verschiedene HA-Subtypen und neun Subtypen der NA identifiziert.

Das Hämagglutinin ist ein Typ I-Membranglykoprotein mit langer Ektodomäne, Transmembranregion und einem kurzen cytoplasmatischen Endstück [Webster und Rott, 1987; Garten und Klenk, 1999; Schroth-Diez et al., 2000; Skehel und Wiley, 2000; Cross et al.; 2001]. Influenza-Hämagglutinin stellt 20-30% des gesamten viralen Proteins [Carr und Kim, 1993; Bullough et al., 1994; Qiao et al., 1998; Chen et al., 1995; Chen et al., 1999], besitzt Rezeptorbindungsfähigkeit und Fusionsaktivität und ist das Hauptantigen des Virus [Nestorowicz et al., 1985]. Neben der wichtigen Rolle des Hämagglutinins für die Virusinfektiosität [Klenk und Rott, 1988] ist es ein vorbildliches System für Glycoproteine im Allgemeinen, weil seine Struktur, Biosynthese und post-translationale Modifikationen ausführlich untersucht worden sind [Wiley und Skehel, 1987; Bullough et al., 1994].

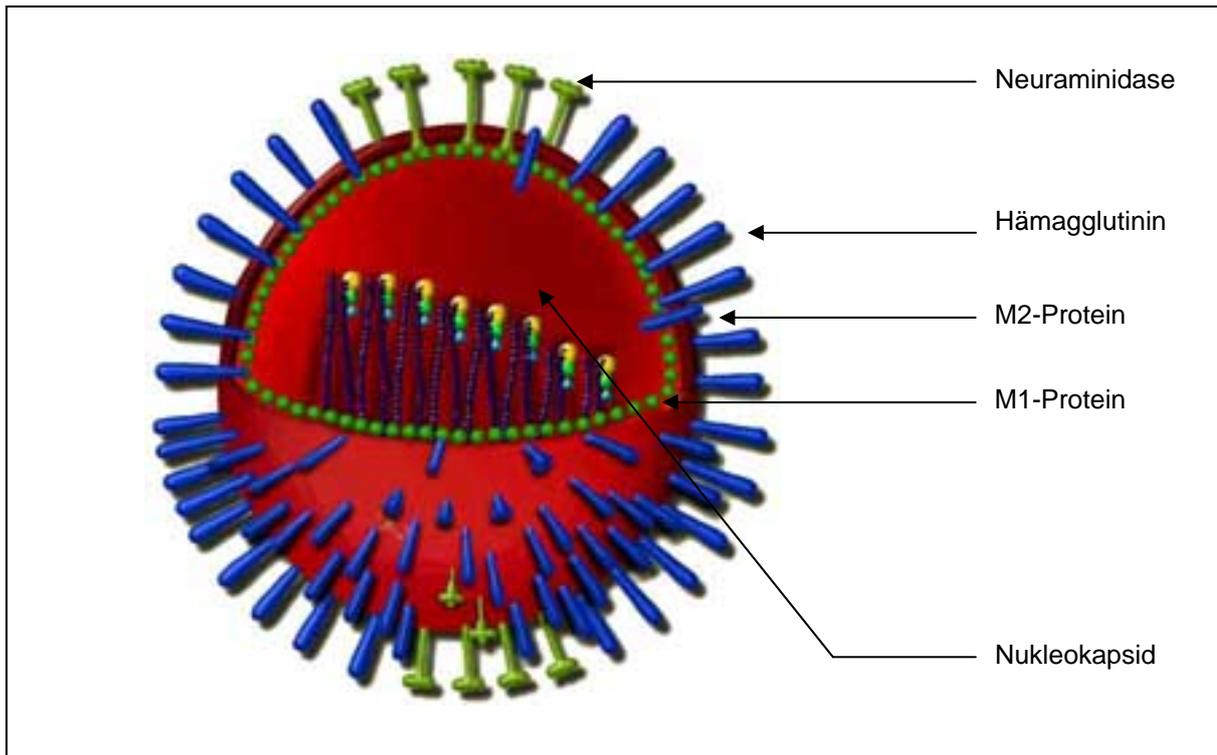


Abb. 4: Schematischer Aufbau des Influenza A-Virus.

Hämagglutinin wird an membrangebundenen Ribosomen synthetisiert und in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums abgegeben, wo Signalpeptid-Abspaltung, Glykosylierung, Faltung, Bildung von Disulfidbindungen und Zusammenfügung in Trimere erfolgen [Gething et al., 1986; Doms et al., 1993; Klenk und Garten, 1994; Garten und Klenk, 1999; Banks und Plowright, 2003]. HA trägt sieben an Asparagin gebundene Zuckerseitenketten und drei palmitoylierte Cystein-Reste in der zytoplasmatischen Domäne [Melkonian et al., 1999; Zhang et al., 2000; Molinari und Helenius, 2002]. Im Golgi-Apparat wird HA weiteren Glykosylierungen unterzogen und assoziiert mit Sphingolipid-Cholesterol enthaltenden Mikrodomänen, die als „Detergent-insoluble glycolipid-enriched domains“ (DIGS) oder Lipid Rafts bezeichnet werden [Scheiffele et al., 1997; Keller und Simons, 1998; Zhang et al., 2000].

HA bildet auf der Virusoberfläche Trimere (220 kDa) aus identischen 70 kDa Untereinheiten [Wiley et al., 1977; Cross et al., 2001]. Die Monomere werden als Vorläuferpolypeptid (HA_0) gebildet, die durch eine exogene Protease in die beiden Untereinheiten HA_1 (36 kDa, mit Modifikationen etwa 50 kDa) und HA_2 (26 kDa) gespalten werden, die aber durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys₁₄ von HA_1 und Cys₁₃₇ von HA_2 verbunden sind [Cross et al., 2001; Ada und Jones, 1986] (Abb. 5). Erst durch die Spaltung in die zwei Untereinheiten erlangt HA die Fähigkeit, die Fusion einzuleiten [Wiley und Skehel, 1987]. Die Bindungsstelle für Neuraminsäure-haltige Rezeptoren und die antigenen Epitope sind auf der N-terminal

gelegenen globulären Domäne lokalisiert, wie auch das Signalpeptid, was nach Insertion des Hämagglutinins in das Endoplasmatische Retikulum abgespalten wird. Die kleinere HA₂-Untereinheit beinhaltet eine N-terminal liegende hydrophobe Sequenz, das sogenannte Fusionspeptid, sowie C-terminal eine weitere hydrophobe Aminosäuresequenz zur Verankerung des Proteins in der Membran [Ada und Jones, 1986].

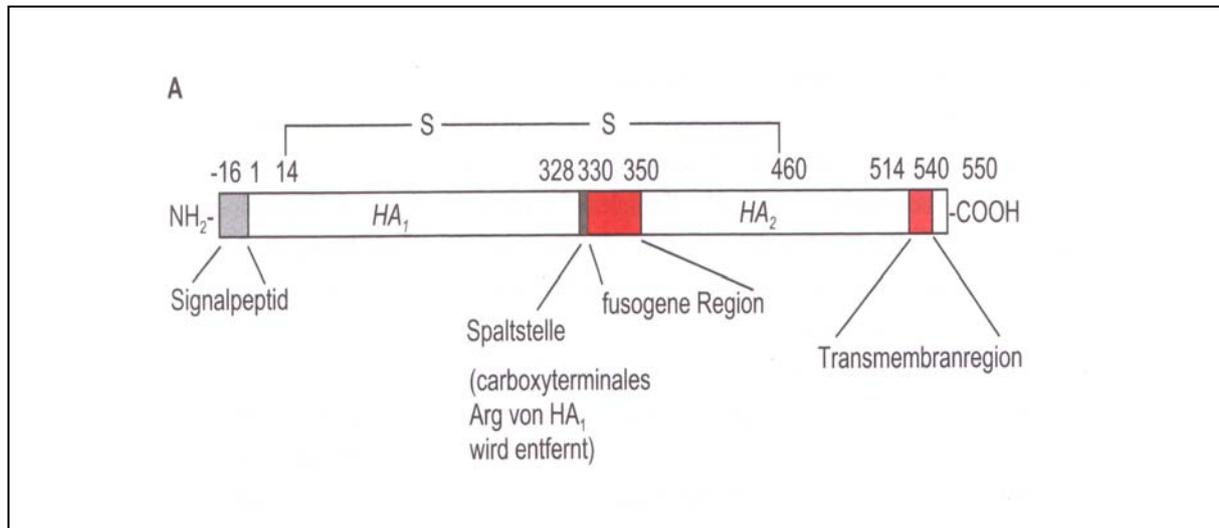


Abb. 5: Primärstruktur des Hämagglutinins der Influenza A-Viren.

HA₁ und HA₂ sind die Untereinheiten, die nach der proteolytischen Spaltung durch eine Disulfidbrücke (S-S) verbunden bleiben [Garten und Klenk, 1999].

Bei der Infektion von Wirtszellen bindet das Hämagglutinin an die Zielzelle und vermittelt die Fusion von viraler und zellulärer Membran [Hughes, 1995; Cross et al., 2001; Armstrong et al., 2004]. Das Influenza-Virus dringt in Zellen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose ein [Gaudin et al., 1995], indem es über eine Tasche aus 27 Aminosäureresten am distalen Ende des HA-Moleküls an Oligosaccharide bindet, die 5-N-Acetyl-Neuraminsäure enthalten [Ada und Jones, 1986]. Es erfolgt die Aufnahme in ein behülltes Vesikel, das mit einem Endosom fusioniert [Simons et al., 1982]. Durch Änderung des pH-Wertes wird eine Konformationsänderung des HA induziert, es wird fusionsaktiv und vermittelt die Annäherung der viralen Hülle an die endosomale Membran [Hoeckstra und Lima, 1992; Gaudin et al., 1995; Dutch et al., 2000]. Die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran ermöglicht es dem Nukleokapsid, ins Zytoplasma einzudringen [Simons et al., 1982].

Auf molekularer Ebene umfasst die HA-vermittelte Membranfusion mehrere Schritte. Zunächst kommt es bei niedrigem pH-Wert zur Dissoziation der globulären Domänen durch Protonierung, wodurch sich die monomeren HA-Untereinheiten voneinander entfernen [White und Wilson, 1987; Huang et al., 2002] (Abb. 6A). Dadurch kann das HA₂ seine

Konformation ändern, was zur Exposition des im Kontaktbereich des Monomers verborgenen „Fusionspeptids“ führt, wobei es sich um eine kurze, hydrophobe Sequenz von ca. 20 Aminosäure-Resten handelt [Huang et al., 2004]. In kristallographischen Untersuchungen an Bromelain-fragmentiertem HA konnte gezeigt werden, dass jedes HA zwei Hauptregionen enthält: eine trimere coiled-coil und eine globuläre Region mit antiparallelen β -Faltblättern [Oxford et al., 1981; Wiley et al., 1981; Wilson et al., 1981; Lamb und Choppin, 1983; Ada und Jones, 1986; Stegmann, 1990; Chernomordik et al., 1999]. Dieser so genannte „spring loaded“-Mechanismus [Carr und Kim, 1993] befördert das Fusionspeptid an die Spitze des HA und damit in Richtung Zielmembran (*Abb. 6B*) [Lai et al., 2006]. Die Bindung des C-Terminus von HA₂ an den N-Terminus der vollständig verlängerten coiled-coil-Struktur scheint essentiell für die Annäherung der Membranen zu sein [Gething et al., 1986; Huang et al., 2003]. Nachdem das Fusionspeptid wie ein Anker in die Wirtsmembran eingetaucht ist, klappt das HA₂ um, zieht das Virus an die Membran heran (*Abb. 6C*) und löst die Fusion beider Membranen aus (*Abb. 6D*) [Blumenthal und Morris, 1999]. Die HA-Konformationsänderung wird unter sauren Bedingungen sehr schnell mit einer Halbwertszeit für die Exposition des Fusionspeptides bei pH 5.0 und 37°C von 15 sec vermittelt [Huang et al., 2003]. Diese Konformationsänderung ist irreversibel [Hoekstra und Lima, 1992; Ramalho-Santos et al., 1993].

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass Influenza-Viren ihre fusogenen Eigenschaften auch bei niedrigem pH über eine lange Zeit behalten und in der Lage sind, die Mischung der Membranen zu induzieren [Ramalho-Santos et al., 1996]. Möglich ist, dass zumindest einige Aspekte der Konformationsänderung, namentlich die Positionierung des HA im Verhältnis zu seiner möglichen Zielmembran bei neutralem oder saurem pH, reversibel sind [Tatlian und Tamm, 1996]. Eine andere Vermutung ist, dass nicht alle HA-Trimere auf der Virushülle an der Fusion beteiligt sind und tatsächlich die physiologisch wichtige pH-abhängige Strukturänderung vollziehen [Tsurudome et al., 1992]. Eine beobachtete Hemmung der Fusion von Influenza A-Viren mit Erythrozyten durch Lysolipide verläuft unabhängig von der Bindung des Hämagglutinins zur Zielzelle [Baljinnyam et al., 2002].

Das cytoplasmatische Endstück des Hämagglutinins enthält 11 Aminosäuren und ist unter den 14 HA-Subtypen hoch konserviert [Nobusawa et al., 1991; Skehel und Wiley, 2001]. Zwei dieser konservierten Aminosäure-Reste sind Cysteine, und ein weiterer hochkonservierter Cystein-Rest findet sich in der Transmembranregion. Diese konservierten Cystein-Reste werden durch kovalente Thioesterbindung von Palmitinsäure modifiziert [Naeve und Williams, 1990; Veit et al., 1991; Naim et al., 1992; Jin et al., 1996].

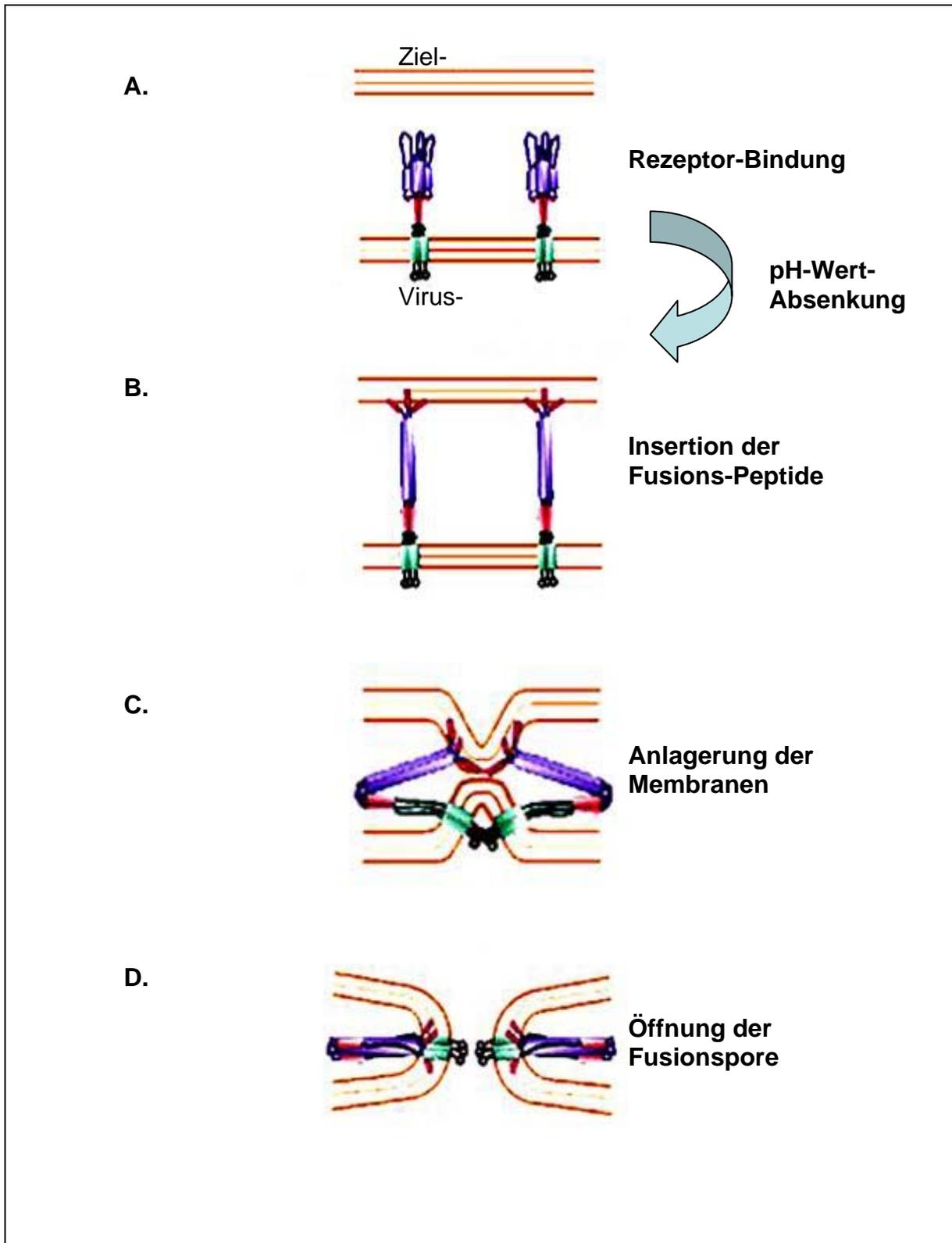


Abb. 6: Mechanismus der Hämagglutinin-vermittelten Fusion viraler und zellulärer Membranen.
Erläuterungen siehe Text [modifiziert nach Cohen und Melikyan, 2001].

Eine Acylierung des Hämagglutinins hat vermutlich aber keinen Einfluss auf die Prozessierung, den Transport vom ER zur Zellmembran, die Rezeptor-bindenden

Eigenschaften und die Fusion von Zellen zu Synzytien [Steinhauer et al., 1991; Naim et al., 1992; Zurcher et al., 1994; Jin et al., 1994; Philipp et al., 1995; Jin et al., 1997; Melikyan et al., 1997; Schroth-Diez et al., 1998]. In einer Arbeit wurde allerdings berichtet, dass die nicht acylierte Mutante keine Synzytienbildung bewirken kann [Naeve und Williams, 1990]. Genauere Untersuchungen der Fusionseigenschaften des Hämagglutinins mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Erythrozyten folgten. Bei der Fusion der das Hämagglutinin tragenden Zellen mit den markierten Erythrozyten kommt es sowohl zum Lipidaustausch beider Membranen als auch zur Öffnung einer Fusionspore, durch die es zum Cytoplasma-Austausch kommt [Philipp et al., 1995]. Die Palmitoylierung des Hämagglutinins beeinflusst weder den Lipidaustausch noch das Öffnen der Fusionspore [Schroth et al., 1996].

Andererseits soll die kovalent mit den cytoplasmatischen Cystein-Resten des HA (H3) verbundene Palmitinsäure für das wiederholte Öffnen und Schliessen der Fusionspore, das so genannte *Flickering*, nötig sein [Melikyan et al., 1997]. Ein Unterschied zwischen acyliertem und fettsäurefreiem HA wurde auch bei der Erweiterung der Fusionspore festgestellt. Sie war bei Zellen, die nicht acyliertes HA exprimieren, blockiert oder zeitlich stark verzögert [Fischer et al., 1998]. Beim Vergleich acylierter und nicht acylierter Influenzaviren zeigte sich bei einem Influenzasubtyp (H1) eine vollständige Hemmung der Freisetzung neugebildeter Viruspartikel bei der nicht acylierten HA-Mutante, und ebenso war das *Budding* und die Virenformation in H7-Viren behindert [Portincasa et al., 1992]. Beim H3-Subtyp waren dagegen keine Effekte auf das *Budding* der Viruspartikel sowie auf deren Infektiosität, insbesondere die Fähigkeit zur Fusionsauslösung mit Zellen, messbar [Zurcher et al., 1994; Jin et al., 1996].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Palmitoylierung des HA nicht essentiell für die Einleitung der Membranfusion ist, aber einen subtilen Einfluss auf die Ausbildung und Erweiterung der Fusionspore ausübt, der nicht in jedem experimentellen System messbar ist.

2.3.3 CD4- UND CD8-REZEPTORPROTEINE

Die Rezeptor-Proteine CD4 und CD8 fungieren neben dem T-Zell-Rezeptor als Co-Rezeptoren für MHC-Moleküle. Die intrazellulären Anteile von CD4 und CD8 sind nicht-kovalent mit der Phospho-Tyrosinkinase p56 *lck* assoziiert. Sehr wahrscheinlich ist diese Kinase an der intrazellulären Signalübertragung bei der T-Zell-Aktivierung beteiligt. T-Zellen vom CD4-Typ und vom CD8-Typ haben eine doppelte Spezifität sowohl für das Peptid-Antigen als auch für eines der beiden MHC-Moleküle, welche das betreffende Peptid

präsentieren. CD4- und CD8-T-Zellen sind grundsätzlich MHC-restringent [Bierer et al., 1988; Parnes, 1989; Rudd, 1990; Micelli und Parnes, 1991].

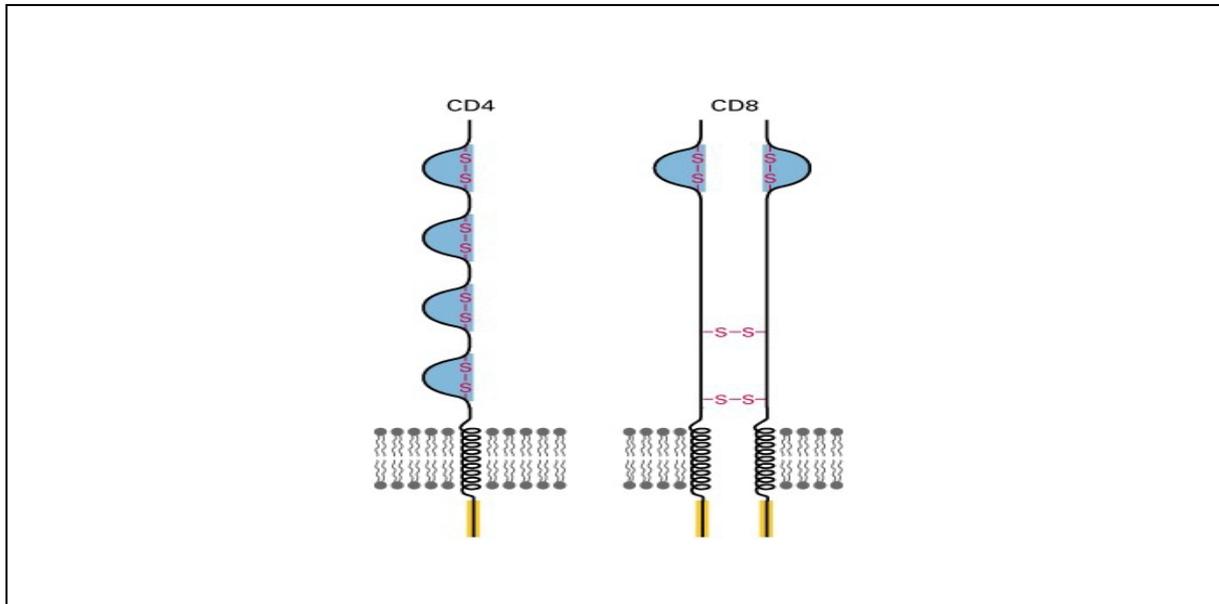


Abb. 7: Vergleich der Struktur der CD4- und CD8-Rezeptor-Proteine [modifiziert nach Stryer, 1995].

2.3.3.1 CD4

Das CD4-Protein, alternativ auch als L3/4 oder W3/25 bekannt, findet sich vornehmlich auf T-Lymphozyten, aber auch auf Monozyten und Makrophagen. Es dient als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors und bindet *lck* mit seiner cytoplasmatischen Domäne. CD4 gehört zur Immunglobulin-Supergenfamilie und ist ein monomeres Transmembranprotein. Der Rezeptor besteht aus vier hintereinander angeordneten Immunglobulin-Domänen, welche aus der Oberfläche der T-Zelle herausragen, einer Transmembranregion sowie einem kleinen cytoplasmatischen Abschnitt [Tendian et al., 1995; Willbold und Rösch, 1996; Wray et al., 1998]. Seine beiden N-terminalen Immunglobulin-ähnlichen Domänen binden das MHC-Klasse II-Molekül in dessen nicht-variablen Anteil (β_2 -Domäne) [Doyle et al., 1989]. Der CD4-Rezeptor dient auch als Eintrittspforte für das humane Immundefizienz-Virus (HIV-1 und HIV-2), indem das HIV-Glykoprotein gp120 mit hoher Affinität mit dem aminoterminalen Ende des CD-Proteins interagiert [Poulin et al., 1991; Willey et al., 1994; Yao et al., 1995; Wu et al., 1996]. Das Gen für CD4 umfasst 33 kBp und liegt beim Menschen auf dem Chromosom 12p12-ter [Littman, 1987]. Humanes CD4 besteht aus einer Polypeptidkette aus 459 Aminosäuren mit einer N-terminalen Signalsequenz aus 23 Aminosäuren, dem extrazellulären Bereich von 375 Resten, einer 21 Aminosäuren umfassenden Transmembranregion sowie einer aus 40 Resten zusammengesetzten cytoplasmatischen Domäne [Shin et al., 1991; Horejsi, 2004]. Der extrazelluläre Bereich weist eine um die 30 %

identische Aminosäure-Sequenz mit den variablen Regionen der leichten Ketten von Immunglobulinen auf und ist zweifach glykosyliert [Brady und Barclay, 1996].

1992 wurde beschrieben, dass das in HeLa-Zellen exprimierte Oberflächen-Glykoprotein CD4 metabolisch mit [³H]-Palmitinsäure gelabelt werden kann. Die Fettsäuren konnten leicht mit einer schwachen Base abgespalten werden, wonach eine Thioesterbindung postuliert wurde. Einzelmutationen der Cystein-Reste Cys₃₉₄ und Cys₃₉₇ im Bereich zwischen Transmembranregion und cytoplasmatischer Domäne verminderten die S-Acylierung, wohingegen eine Deletion beider Cystein-Reste die Palmitoylierung vollständig verhinderte. Die Palmitoylierung hatte aber keinen Einfluss auf die CD4-Expression an der Zelloberfläche oder auf die Bindung von p56 *lck* an seine Cytoplasmatische Domäne [Crisse und Rose, 1992].

Basierend auf Triton X-100 Solubilisierung und Konfokalmikroskopie konnte gezeigt werden, dass CD4 sich zum Teil in Lipid Rafts verteilt. Durch Verhinderung der CD4-Palmitoylierung und seiner Interaktion mit p56 *lck* durch Mutagenese wurde CD4 zu non-raft Domänen der Zellmembran geleitet, wobei diese signifikante Beschränkung der CD4-Assoziierung in Rafts allerdings keinen Einfluss auf die HIV-1 Rezeptorfunktion des CD4 hatte. Wenn auch eine Anreicherung in Lipid Rafts nicht nötig für die Virusinfektion zu sein scheint, so wird aber der HIV-1-Eintritt durch die Depletion des Plasmamembran-Cholesterins verhindert, so dass vermutet wird, dass Cholesterin den HIV-1-Eintritt unabhängig von seiner Fähigkeit, eine Raft-Formation zu fördern, moduliert [Percherancier et al., 2003].

Durch gezielte Mutagenese wurde gezeigt, dass eine Palmitoylierung der Membran-nahen Cystein-Reste sowie die Assoziation des CD4 an *lck* zur Anreicherung des CD4 in mit Sphingolipiden angereicherten, Detergenz-resistenten Lipid Rafts beitragen. Cross-Linking des CD4 induziert extensives Membran-Patching an der T-Zell-Oberfläche, was in einer Lipid Raft-Aggregation resultiert. Die Lokalisierung von CD4 in Lipid Rafts ist hierbei bestimmend für seine Aggregationsfähigkeit, weshalb die CD4-induzierte Raft-Aggregation demnach eine zusätzliche Rolle für das CD4-Signaling neben seiner Adhäsion an MHC-Moleküle und Assoziation mit *lck* spielen könnte [Fragoso et al., 2003].

Trotz der bevorzugten Lokalisation von CD4 zu den Lipid Rafts [Balamuth et al., 2004] ist die Bedeutung dieser Mikrodomänen für den HIV-1-Eintritt noch umstritten. Die Möglichkeit, dass in non-Raft-Bereichen lokalisiertes CD4 in der Lage sein könnte, den Viruseintritt zu unterstützen, kann nicht ausgeschlossen werden [Popik und Alce, 2004]. Da die zuvor beschriebene Disintegration der Rafts durch Cholesterin-Extraktion mit Methyl-β-Cyclodextrin

auch die physiologischen Prozesse beeinflusst [Percherancier et al., 2003], wurden die molekularen bestimmenden Faktoren erforscht, die die Raft-Lokalisation des CD4 Rezeptors steuern. Umfangreiche Mutagenese des Rezeptors zeigte, dass ein Raft-lokalisierender Marker, bestehend aus einer kurzen Folge der positiv-geladenen Aminosäure-Reste RHRRR, im Membran-proximalen cytoplasmatischen Bereich von CD4 anwesend war. Ersatz der RHRRR-Sequenz mit Alanin-Resten (RA5) hob die Raft-Lokalisierung auf, wie durch Solubilisierung in nichtionischen Detergenzien und durch Konfokalmikroskopie gezeigt werden konnte. Der mögliche hemmende Effekt der Veränderungen auf die angrenzenden Palmitoylierungsstellen wurde ausgeschlossen, da sowohl der CD4-Wildtyp als auch die beschriebene RA5-Mutante, nicht aber eine Palmitoylierungsstellen-defiziente Mutante, effizient palmitoyliert wurden. Nichtsdestoweniger förderte die durch Mutation entstandene Variation RA5 produktiven Viruseintritt zu gleichen Niveaus wie der CD4-Wildtyp. Sucrosegradientenanalyse der Triton X-100 Virus-Lysate zeigte, dass sich sowohl das *gag*-Protein als auch das Hüllprotein gp120 in den Fraktionen mit hoher Dichte ansammelten. Dieses Muster wurde nach Virusinkubation mit Zellen geändert. Während die *gag*-Proteine in den Lipid Rafts in den Zellen lokalisiert waren, die CD4 und RA5 exprimierten, akkumulierte gp120 in Rafts in den Zellen, die zwar CD4, nicht aber RA5 exprimierten. Raft-Lokalisation des CD4 scheint nicht erforderlich für den eigentlichen Viruseintritt zu sein, aber die Membran-Fusion könnte ein Lipid Raft-Assembly erfordern [Popik und Alce, 2004]. Die Entdeckung, dass eine HIV-Infektion durch ein Targeting der CD4-Zellen zu Lipid Rafts blockiert werden könnte, ist bedeutsam für die Entwicklung neuer Medikamente zur Prävention von HIV-Infektionen [del Real et al., 2002].

Auch für das *nef*-Protein von HIV-1 wurde gezeigt, dass 10% des in Zellen exprimierten Proteins in den Lipid Rafts vorliegt und praktisch das gesamte Membran-gebundene *nef* darstellt [Liu et al., 1997]. Um festzustellen, ob Raft-Targeting funktionelle Signifikanz hat, wurde eine *nef*-Chimäre mit einem ausschließlich in den Lipid Rafts vorliegendem Protein (LAT-*nef*) sowie eine mutierte Form ohne Palmitoylierungsstellen erstellt. LAT-*nef* zeigte eine Raft-Lokalisation von > 90%, die nicht-palmitoylierte Mutante war bei gleicher Membranbindungsrate zu weniger als 5 % dort vertreten. LAT-*nef* war der non-Raft-Mutante signifikant überlegen in der Modulation von CD4 und MHC-I-Molekülen und zeigte eine vermehrte Erstrunden-Infektiosität und Inkorporation in Viruspartikel, was die mechanistische Rolle des Raft-Targetings für diese Funktionen verdeutlicht. Im Vergleich zum *nef*-Wildtyp betrug die Down-Modulation von MHC-I nahezu 100 %, wohingegen die Modulation des CD4 nur 60 % der Effektivität des Wildtyps aufwies; die Infektiosität betrug nur 30 % [Anderson et al., 1994]. Aus der fast ausschließlichen Raft-Lokalisation von LAT-*nef* im Gegensatz zum Wildtyp, der nur zu 10 % in den Rafts und zu 90% in der löslichen Fraktion verteilt war,

wurde geschlossen, dass die Down-Modulation der MHC I-Moleküle ausschließlich durch Rafts-assoziiertes *nef* durchgeführt werden kann, wohingegen die CD4-Modulation und die Infektiosität sowohl lösliche als auch Membran-gebundene *nef*-Komponenten erfordern [Alexander et al., 2004; Sol-Foulon et al., 2004].

2.3.3.2 CD8

Das CD8-Protein findet sich auf T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK). Es dient als Co-Rezeptor des T-Zell-Antigenrezeptors (TCR) auf cytotoxischen T-Zellen und bindet MHC-I-Moleküle in deren nicht-variablen Molekülanteil (α_3 -Domäne) [Moody et al., 2001; Copeland, 2002; Moody et al., 2003]. Wie CD4 gehört auch CD8 zur Immunglobulin-Supergenfamilie und liegt in der Regel als durch Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer vor, das aus einer CD8 α -Untereinheit, auch bekannt als Leu2 oder T8, und einer CD8 β -Einheit, die auch als Lyt3 bezeichnet wurde, besteht [Eichmann et al., 1991]. Dieses Heterodimer lagert sich vor dem Austritt aus dem ER zusammen [Hennecke und Cosson, 1993]. Beide Ketten werden von benachbart gelegenen Genen kodiert, die auch nahe den Gen-Regionen für die Immunglobulin-Kette κ liegen [Littman, 1987]. Auch ein CD8-Homodimer aus zwei CD8 α -Ketten wurde beschrieben. Sowohl die CD8 α -, als auch die CD8 β -Kette bestehen jeweils aus einer N-terminalen, der variablen Region ähnelnden Domäne von ca. 110 Aminosäuren, einer hydrophoben Transmembranregion und einem cytoplasmatischen Anteil mit einer Länge von ungefähr 25 Aminosäuren [Kaufmann, 1988; Sprent und Schaefer, 1990; Soares et al., 2000; Wong und Pamer, 2003; Horejsi, 2004].

Heterodimeres CD8 ist ein effizienterer Co-Rezeptor als das CD8 α -Homodimer. Untersuchungen der CD8-Ketten zeigten, dass lediglich CD8 β in der cytoplasmatischen Domäne palmitoyliert ist [Reschner et al., 2003], auch wenn die Hydrophobizität beider Proteine vergleichbar ist und sie jeweils basische Aminosäuren nahe der Palmitoylierungsstelle aufweisen. Durch die Acylierung wird offensichtlich das α/β -Dimer, nicht aber das α/α -Homodimer, zu Lipid Rafts dirigiert. Die Lokalisierung des CD8-Rezeptors ist aber entscheidend für seine Co-Rezeptor-Funktion, da eine Assoziation mit p56 *lck* fast ausschließlich in Rafts vorkommt. Eine Deletion der cytoplasmatischen Domäne des CD8 β führt zu verminderter Steuerung zu Lipid Rafts und somit zu verminderter Assoziation mit p56 *lck*. Die Palmitoylierung von CD8 β ist also entscheidend für die effiziente Co-Rezeptor-Funktion des CD8-Rezeptors [Arcaro et al., 2000]. Zusätzlich vermittelt das palmitoylierte CD8 β -Protein auch die Assoziation mit dem T-Zell-Rezeptor, so dass dieser einerseits eine hohe Affinität zum MHC-Komplex übertragen bekommt und zusätzlich auch in Lipid Rafts gelenkt wird [Arcaro et al., 2001].