

4. ERGEBNISSE

4.1 EINFLUSS DER TRANSMEMBRANREGION AUF DIE PALMITOYLIERUNG

4.1.1 ERSTELLUNG VERSCHIEDENER CHIMÄREN AUS PALMITOYLIIERTEN UND NICHT-PALMITOYLIERBAREN PROTEINEN

Um die Bedeutung der Transmembranregion für die Palmitoylierung membranspannender Proteine zu klären, wurden Chimären auf Grundlage eines nicht-palmitoylierbaren Proteins erstellt. Das Fusionsprotein des Sendai-Virus weist keine Palmitoylierungsstelle auf, aber auch das Einfügen eines acylierbaren Cystein-Rests in die übliche Palmitoylierungsregion durch gezielte Mutagenese führt nicht zur Fettsäurebindung [Ponimaskin und Schmidt, 1988], so dass es ein ideales Modellprotein für die Palmitoylierung darstellt. Von diesem mutierten Fusionsprotein (F_{Cys}) wurden jeweils zunächst die Transmembranregion und die cytoplasmatische Domäne zusammen, nachfolgend dann nur die Transmembranregion durch die entsprechenden Strukturen der acylierten Transmembranproteine CD4 und CD8 sowie des Influenza A-Virus Hämagglutinins ersetzt. Um eine Vergleichbarkeit der acylierten Proteine sicherzustellen, wurde durch gezielte Mutagenese der an vorletzter Position der Transmembranregion liegende Cystein-Rest des Hämagglutinins durch Isoleucin ersetzt, so dass das mutierte Hämagglutinin (HA') nur noch zwei Acylierungsstellen in der cytoplasmatischen Domäne aufwies [Ponimaskin und Schmidt, 1988] (Abb. 13).

	Extrazelluläre	Transmembranregion	Cytoplasmatische
F-F-F_{Cys}		VITIIIVMVVILVVIIVIIIVL	YRLRR <u>C</u> MLMGNPDDR.... - COOH
F-CD4-CD4		ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF	<u>C</u> VRCRHRRRQAERMSQI.... - COOH
F-CD4-F_{Cys}		ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFSV	YRLRR <u>C</u> MLMGNPDDR.... - COOH
F-CD8-CD8		LAGTCGVLLLSLVITLY <u>C</u> NH	RNRRRV <u>C</u> K <u>C</u> PRPVVKS.... - COOH
F-CD8-F_{Cys}		LAGTCGVLLLSLVITLY <u>C</u> NH	YRLRR <u>C</u> MLMGNPDDR.... - COOH
F-HA'-HA		...FGASCSTLLAIAMGLVFIIV	KNGNMR <u>C</u> T <u>C</u> I - COOH
F-HA'-F_{Cys}		...FGASCSTLLAIAMGLVFIIV	YRLRR <u>C</u> MLMGNPDDR.... - COOH

Abb. 13: Chimären aus acylierten Proteinen und dem nicht-acylierbaren Fusionsprotein des Sendai-Virus. Palmitoylierte Cystein-Reste sind unterstrichen dargestellt, der eingefügte Cystein-Rest in das Fusionsprotein ist kursiv gekennzeichnet.

Die für diese vier Proteine codierenden Gene lagen in den Expressions-Vektor pTM1 einkloniert vor (Abb. 14). Die Erstellung der Chimären erfolgte mittels der Technik der Overlap Extension-PCR, wobei die nach der ersten PCR erhaltenen Fragmente in der zweiten PCR zusammengefügt und amplifiziert wurden (Abb. 15).

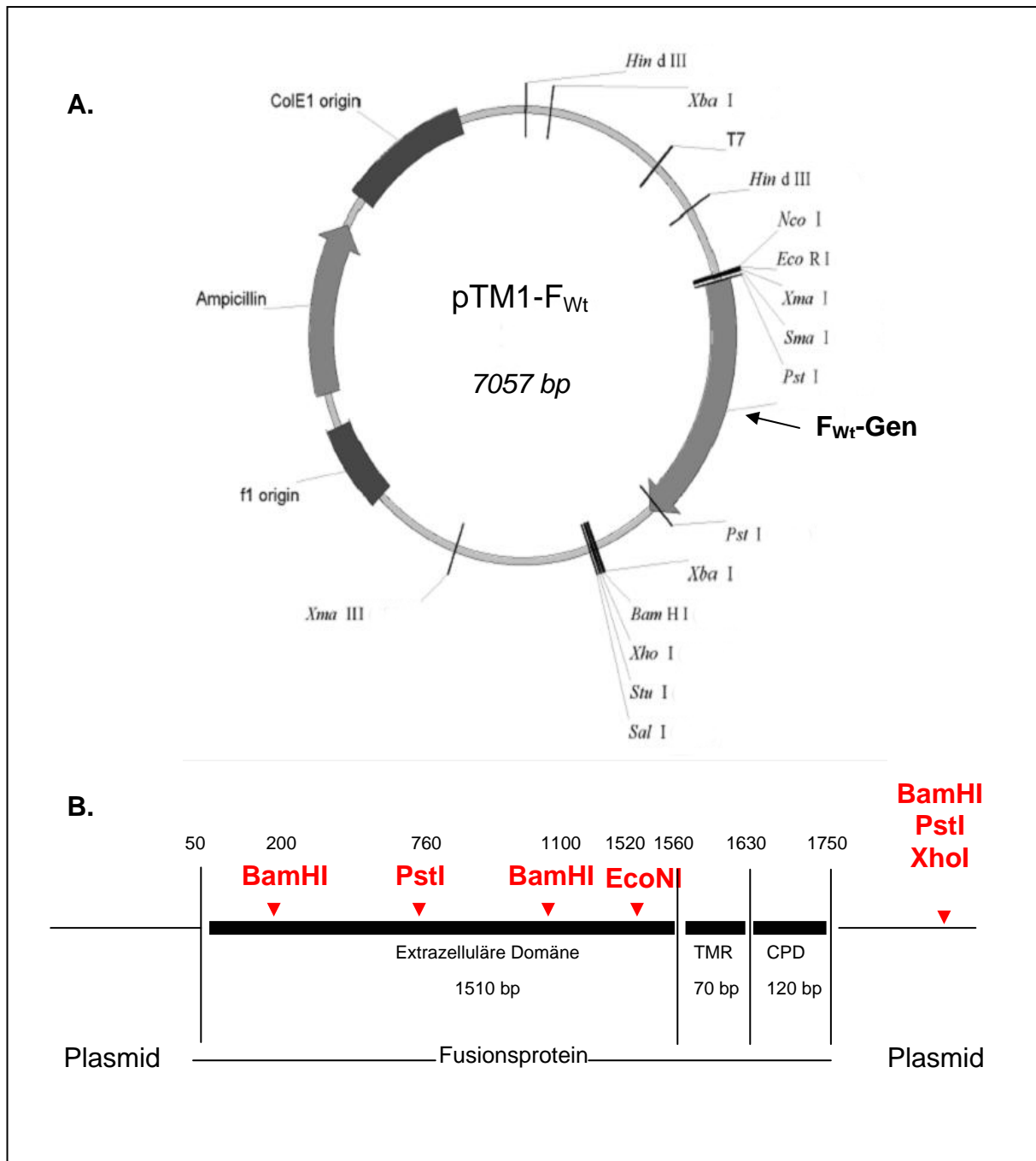


Abb. 14: A. Darstellung des F-Proteins, einkloniert in der *Multiple Cloning Site* des Plasmid pTM1.
B. Aufbau des F-Protein-Gens und seine Restriktions-Schnittstellen.

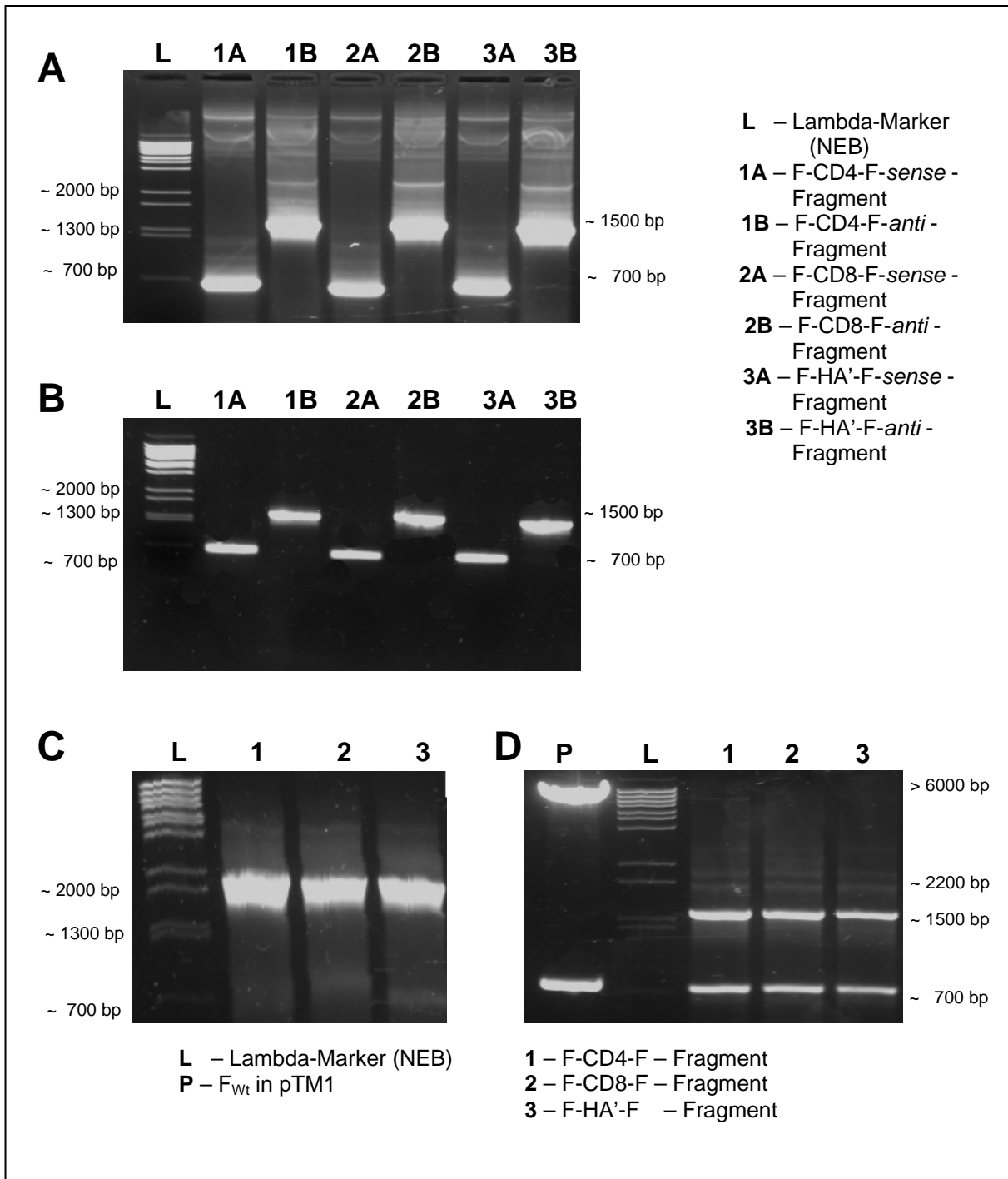


Abb. 15: Amplifikate nach der Overlap Extension-PCR und nach dem Restriktionsenzym-Verdau zur Klonierung; Darstellung durch Agarosegel-Elektrophorese.

A. Resultierende Fragmente der Chimärenerstellung von F-CD4-F_{Cys}, F-CD8-F_{Cys} bzw. F-HA'-F_{Cys}, bezeichnet nach dem jeweils verwendeten Innenprimer, nach der 1. PCR. **B.** Darstellung der mit JetSorb aus dem Agarosegel aufgereinigten Fragmente nach der 1. PCR. **C.** Die aus der 2. PCR resultierenden Fragmente von F-CD4-F_{Cys}, F-CD8-F_{Cys} bzw. F-HA'-F_{Cys}. **D.** Restriktionsenzym-Verdau der Fragmente aus der Overlap Extension-PCR und des Gens F_{Wt} im Plasmid pTM1 mit dem Enzym Pst I.

Nach Isolierung der Amplifikate aus dem Agarosegel und Aufreinigung wurden sowohl die Fragmente als auch der Expressionsvektor pTM1 mit Restriktionsendonukleasen verdaut und dann ligiert. Nach Transfektion in *E. coli*-Bakterienzellen und Kultivierung wurden die Plasmide mit den einklonierten Chimären-Genen selektiert, aufgereinigt und sequenziert (Abb. 16).

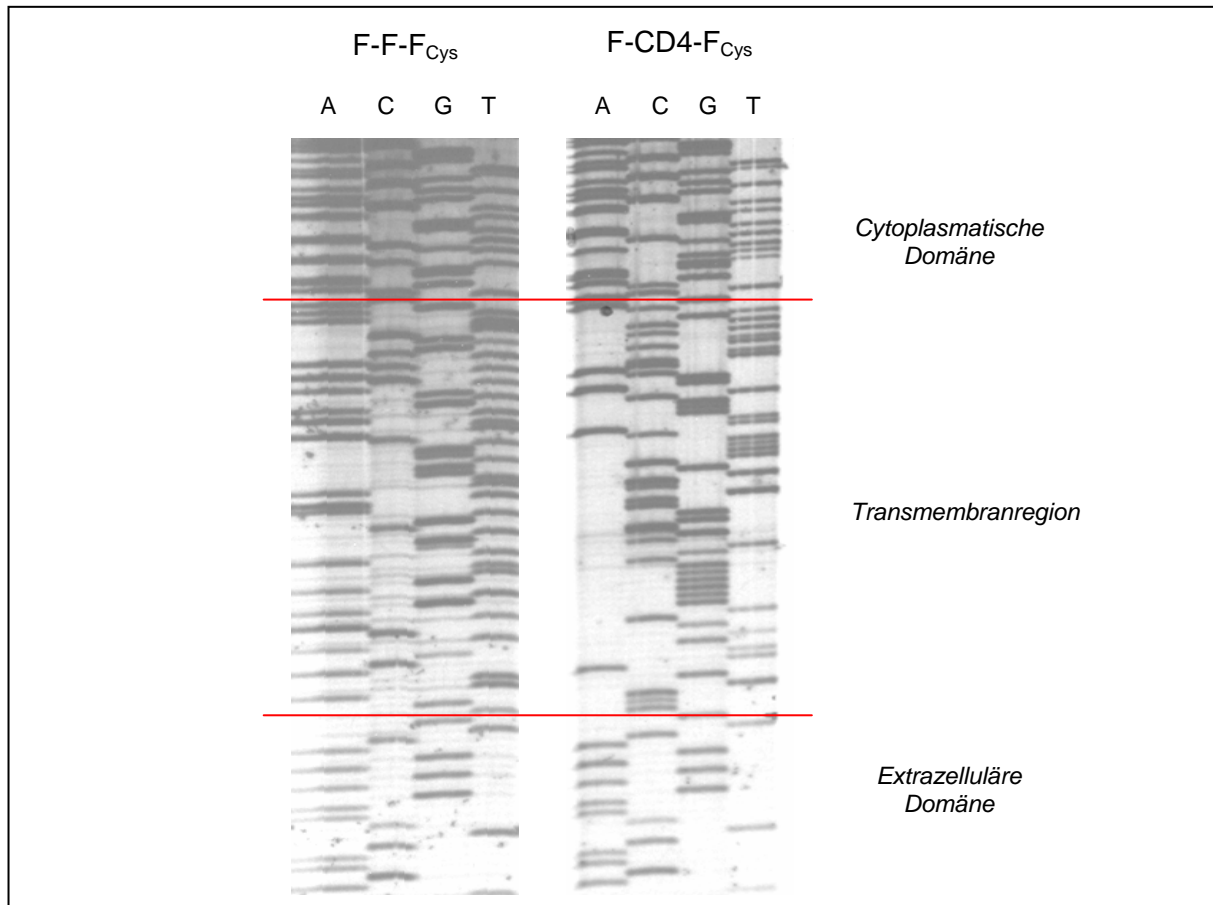


Abb. 16: Sequenz des mutierten Fusionsproteins F-F-F_{Cys} und der Chimäre F-CD4-F_{Cys} (Kettenabbruchmethode nach Sanger).

4.1.2 EXPRESSION DER CHIMÄRENPROTEINE UND MARKIERUNG MIT [³H]-PALMITINSÄURE

Die hergestellten Chimären wurden mittels des Vacciniavirus-Expressionssystems in CV1-Zellen exprimiert, mit [³⁵S]-Methionin und [³H]-Palmitinsäure metabolisch markiert und nach Immunpräzipitation elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Ermittlung der relativen Acylierung der einzelnen Chimären wurden die Fluorographie-Filme densitometrisch ausgewertet. Da die Anzahl der potentiell palmitoylierten Cystein-Reste zwischen dem mutierten Fusionsprotein F_{Cys} und seinen Chimären variiert (CD8 hat drei, das mutierte Hämagglutinin sowie CD4 zwei und das mutierte Fusionsprotein nur einen acylierbaren Cystein-Rest), wurden die Werte für den [³H]-Palmitinsäure-Einbau auf eine Bindungsstelle per Protein normalisiert, während die

Werte für die [^{35}S]-Methionin-Inkorporierung auf die Anzahl der Methionin-Reste im Protein bezogen wurde. Die Palmitoylierung eines Proteins wurde schließlich relativ zu der Expression der jeweiligen Proteine, ausgedrückt durch die [^{35}S]-Methionin-Markierung, dargestellt.

Das mutierte Fusionsprotein mit dem eingefügten Cystein-Rest in der Palmitoylierungsregion konnte, wie auch für den Fusionsprotein-Wildtyp beschrieben, nicht palmitoyliert werden. Der Austausch von Transmembranregion und cytoplasmatischer Domäne zusammen durch die korrespondierenden Domänen der acylierbaren Proteine führte – unabhängig von den verwendeten Proteinen - zu einem deutlichen Einbau von [^3H]-Palmitinsäure in die Chimärenproteine. Auch der alleinige Austausch der Transmembranregion des Fusionsproteins ermöglichte noch eine deutliche Acylierung. Das Palmitoylierungsniveau nach Substitution der Transmembranregion verglichen mit dem Austausch sowohl der Transmembranregion als auch der cytoplasmatischen Domäne war aber sowohl bei dem Chimären-Paar F-CD4-CD4 / F-CD4-F_{Cys} als auch bei dem Paar F-CD8-CD8 / F-CD8-F_{Cys} sowie dem Paar F-HA-HA / F-HA-F_{Cys} höchst signifikant erniedrigt und erreichte nur eine Acylierung von 10 – 20 % (Abb. 17, Tab. 9).

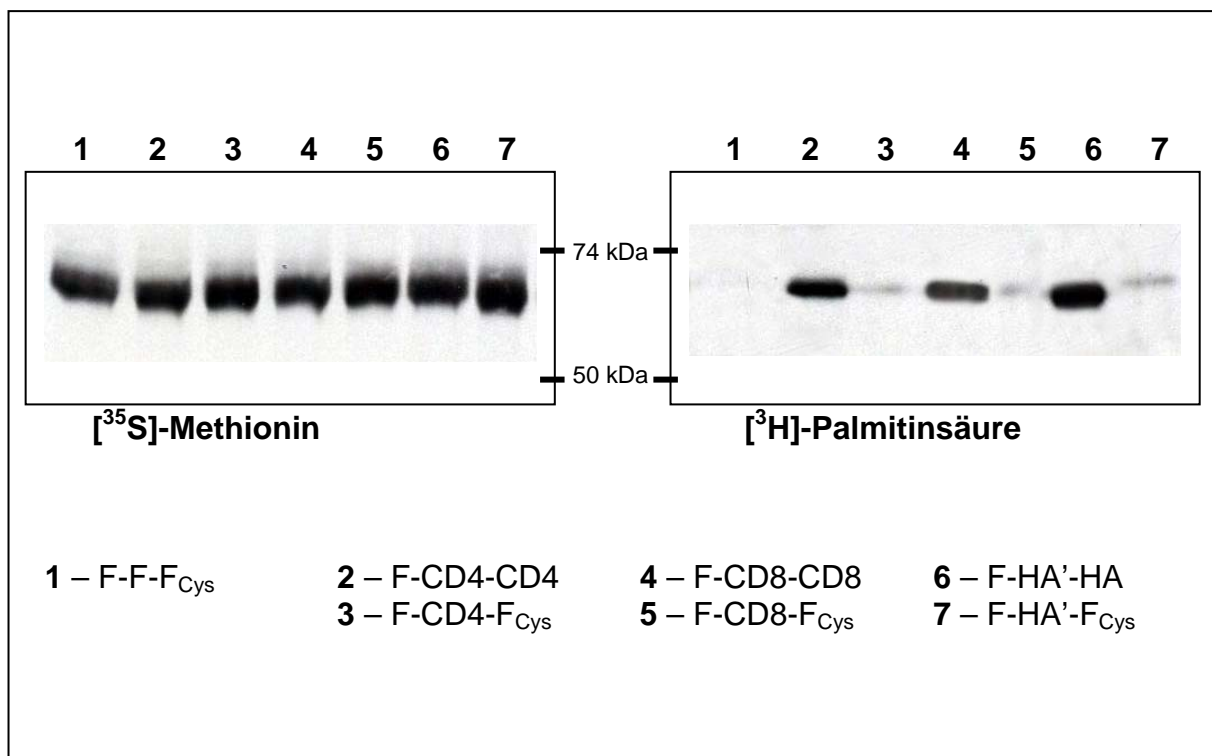


Abb. 17: Durch [^{35}S]-Methionin-markierte Protein-Expression und [^3H]-Palmitinsäure-Einbau in das mutierte Fusionsprotein und die Chimären mit CD4, CD8 und HA.

Tab. 9: Relativer [³H]-Palmitinsäure-Einbau, Standardabweichungen und Signifikanz in den Chimären aus F-, CD4-, CD8- und HA-Proteinen.

Das Palmitoylierungsniveau und die Signifikanz der Änderung in den TMR-Chimären wurden jeweils auf Grundlage der betreffenden TMR-CPD-Chimären berechnet.

Protein	Anzahl der Versuche	Mittelwert relativer [³ H]-Einbau [%]	Standard-Abweichung	Signifikanz
F-F-F _{Cys}	7	0,00	-----	-----
F-CD4-CD4	7	100,00	-----	-----
F-CD4-F _{Cys}	7	9,69	± 3,50	< 0,0001
F-CD8-CD8	3	100,00	-----	-----
F-CD8-F _{Cys}	3	24,10	± 12,30	0,0086
F-HA'-HA	8	100,00	-----	-----
F-HA'-F _{Cys}	8	11,14	± 3,75	< 0,0001

4.1.3 KONTROLLE DER UNTERSCHIEDE IN TRANSPORT UND PROZESSIERUNG

Die beschriebenen Unterschiede im [³H]-Palmitinsäure-Einbau gaben allerdings noch keinen Anhaltspunkt dafür, ob diese tatsächlich auf den Einfluss der Aminosäuresequenzen in den substituierten Domänen zurückzuführen sind, oder ob die Fettsäure-Modifikation der Proteine durch Störungen im Transport oder der Prozessierung gebremst wurde. Daher wurden drei Kontroll-Experimente ausgeführt, die sicherstellen sollten, dass die Chimärenproteine in gleicher Weise wie das Fusionsprotein exprimiert wurden.

4.1.3.1 Kontrolle der Glykosylierung

Um auszuschließen, dass die Unterschiede im Palmitoylierungsniveau der Proteine aus einem Verbleiben der Proteine beispielsweise im Endoplasmatischen Retikulum resultieren, diese also nicht korrekt prozessiert wurden, wurde die Glykosylierung des Fusionsproteins und der Chimären mittels Endoglykosidase-Verdau kontrolliert. Hierzu wurden transfizierte Zellen fünf Stunden inkubiert, lysiert und aufgeteilt. Eine Probe wurde dem Verdau mit dem Enzym Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) ausgesetzt, um alle N-glykosidisch gebundenen Seitenketten abzuspalten, also zu kontrollieren, ob überhaupt post-translational glykosyliert wurde. Die zweite Probe wurde mit Endoglykosidase H (Endo H) verdaut, mit der spezifisch nur die High Mannose-Seitenketten der Proteine abgespalten werden. Die Prozessierung mit High Mannose-Strukturen erfolgt erst nach der Palmitoylierung [Schmidt und Schlesinger, 1980], so dass sich eine gute Aussage über den Verlauf der Prozessierungen treffen lässt. Die dritte Probe wurde als Kontrolle verwendet. In allen Chimärenproteinen wie auch im Fusionsprotein erfolgte der komplette Verdau der Zuckerseitenketten; es gab demnach keine

Hinweise auf Unterschiede in der Prozessierung und somit auch im Transport der Proteine (Abb. 18).

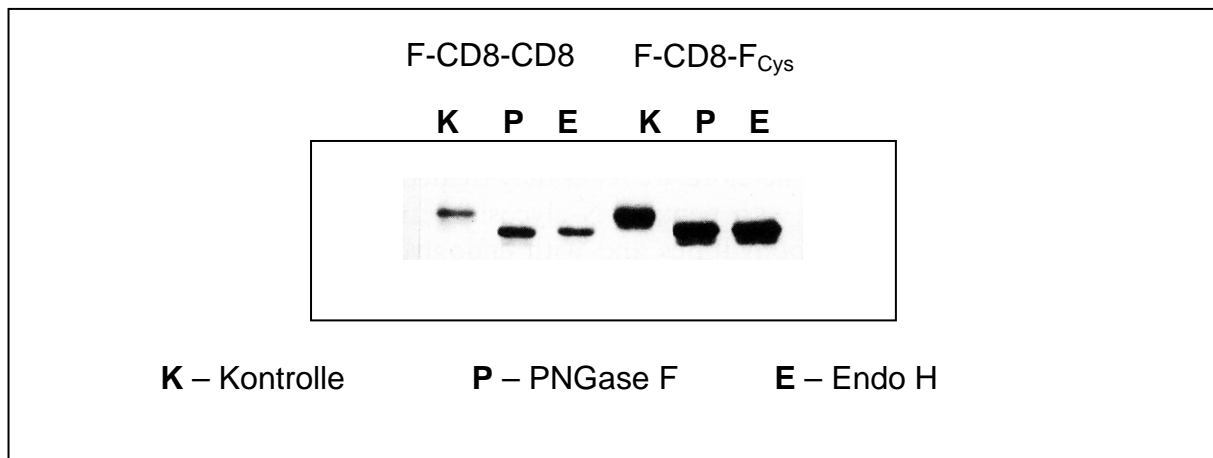


Abb. 18: Endoglykosidase-Verdau am Beispiel der Chimären F-CD8-CD8 und F-CD8-F_{Cys}.

In beiden Proteinen wurden die betreffenden Zuckerseitenketten vollständig abgespalten, auch wenn sich deutliche Unterschiede im Expressionsniveau zwischen F-CD8-CD8 und F-CD8-F_{Cys} zeigten.

4.1.3.2 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde verwendet, um den ungestörten Transport der Chimärenproteine im Vergleich zum Fusionsprotein zu kontrollieren. Durch die veränderte Proteinstruktur in den Chimären musste damit gerechnet werden, dass der Transport der integralen Membranproteine zur Zellmembran und deren Einbau dort verlangsamt oder komplett verhindert wurde, weshalb jeweils 5×10^5 CV1-Zellen, die mit den betreffenden Genen transfiziert waren, in der Durchflusszytometrie eingesetzt wurden. Diese Zellen wurden nach fünfstündiger Protein-Expression mit einem Antikörper gegen Sendavirus markiert, der nur an die Ektodomäne derjenigen Proteine binden konnte, die tatsächlich an die Zelloberfläche gelangt sind, da die Zellmembran selbst nicht durchlässig für Antikörper ist. Nach Färbung mit einem zweiten Antikörper, der mit dem Fluorophor FITC gelabelt war, wurde die relative Fluoreszenz der Proteine im Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 19). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenexpression der Chimärenproteine untereinander und zum mutierten Fusionsprotein F_{Cys} als Expressionsvergleich (Tab. 10).

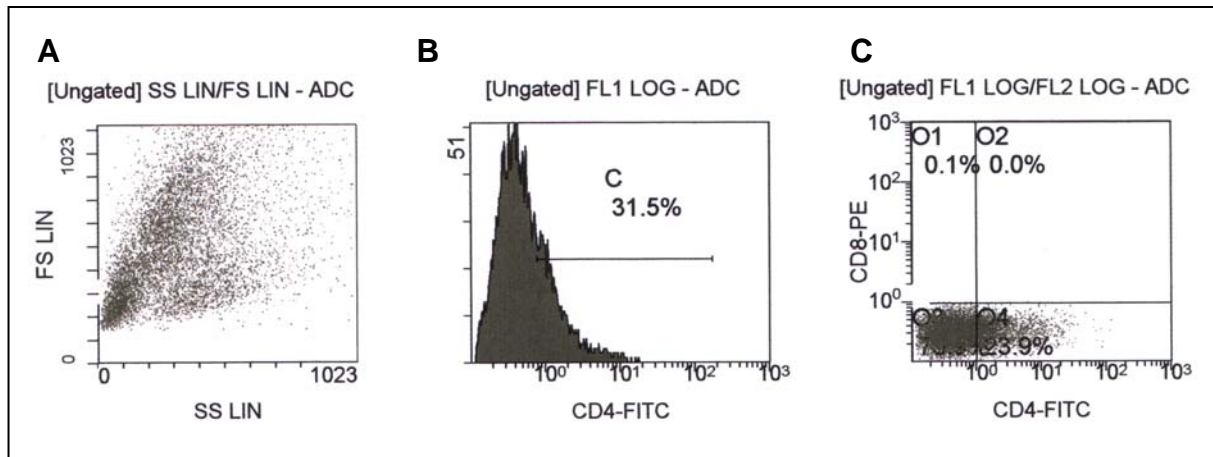


Abb. 19: Beispiel für die Bestimmung der Oberflächenexpression eines Proteins im Durchflusszytometer.

A. Darstellung der relativen Größe (SS) und der relativen Granularität (FS) der Zellen;
 B. und C. Darstellung der relativen Fluoreszenz der gebundenen FITC-markierten Antikörper.

Tab. 10: Oberflächenexpression des mutierten Fusionsproteins und der Chimären-Proteine (ermittelt durch Durchflusszytometrie).

Protein	Effizienz der Oberflächenexpression [%]	Relativer Fluoreszenzindex [%]
F-F-F _{Cys}	27,2	100,0
F-CD4-CD4	24,5	90,1
F-CD4-F _{Cys}	26,5	97,4
F-CD8-CD8	27,3	100,4
F-CD8-F _{Cys}	25,3	93,0
F-HA'-HA	26,4	97,1
F-HA'-F _{Cys}	25,1	92,3

4.1.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Wie auch bei der Durchflusszytometrie (siehe 4.1.3.2) wurde mit der indirekten Immunfluoreszenz kontrolliert, ob die Chimärenproteine tatsächlich zur Zellmembran gelangen. Auch hier wurden die transfizierten Zellen nach fünfstündiger Protein-Expression mit einem Antikörper gegen Sendaivirus und anschließend mit dem FITC-gelabelten Nachweisantikörper markiert. Die Fluoreszenz wurde nun im Fluoreszenzmikroskop kontrolliert, wobei eine nicht-transfizierte Kontrolle mitgeführt wurde, um die Hintergrundfluoreszenz anzuzeigen. Die Präparate wurden durchgemustert und typische Zellbilder photographiert (Abb. 20). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenexpression der exprimierten Chimärenproteine untereinander und zum mutierten Fusionsprotein F_{Cys} als Expressionsvergleich.

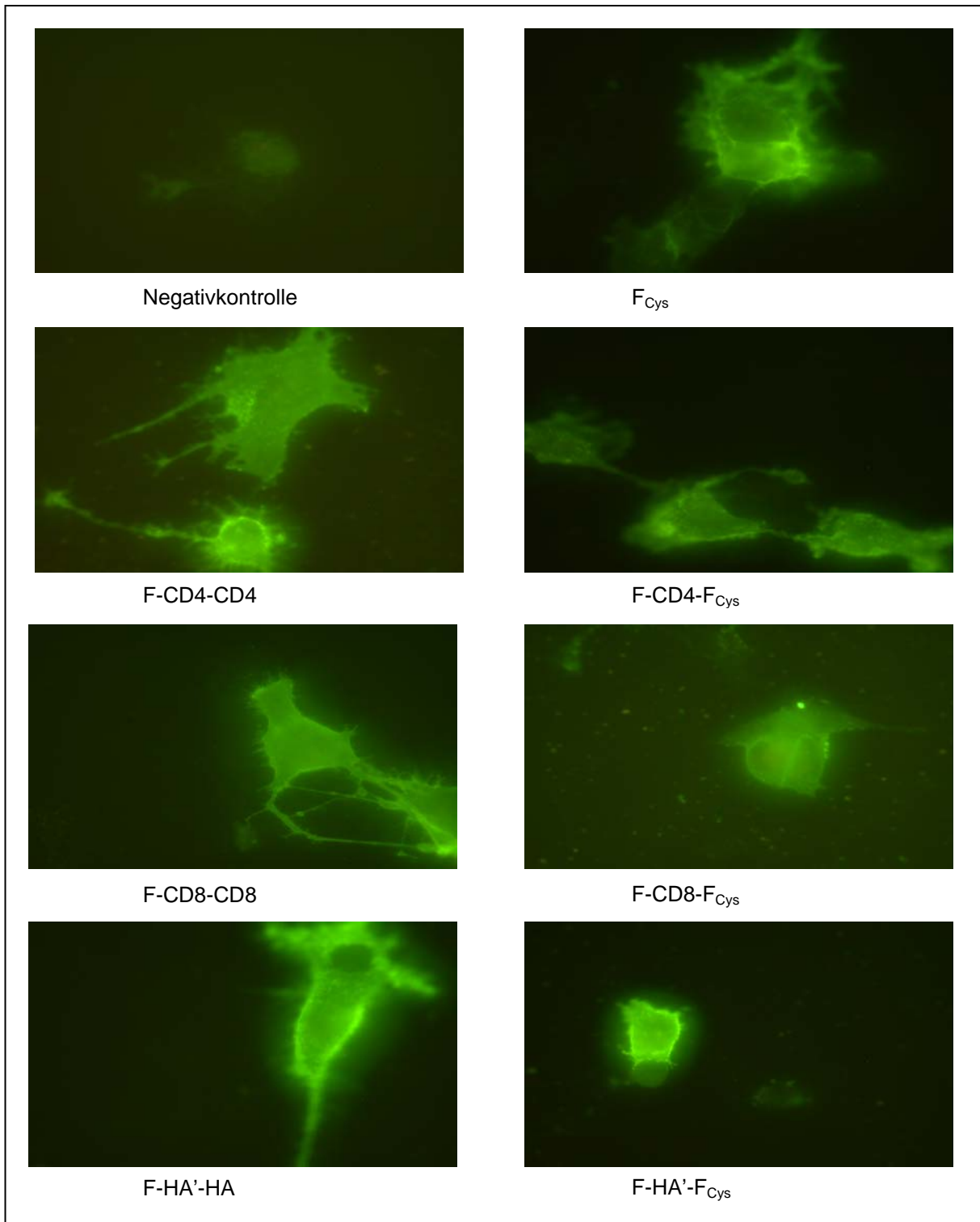


Abb. 20: Oberflächen-Expression des mutierten Fusionsproteins und der Chimärenproteine (Immunfluoreszenz, 630-fache Vergrößerung).

4.1.4 VERGLEICH DER HELIKALEN ANORDNUNG UND DER HYDROPHOBIZITÄT DER TRANSMEMBRANSEGMENTE

Die Expressionsanalysen mit den Chimären haben gezeigt, dass es einen Einfluss der Transmembranregion auf die Palmitoylierung integraler Membranproteine gibt. Um die molekularen Grundlagen dieser Entdeckung verstehen zu können, wurden die Transmembranregionen von Fusionsprotein, Hämagglutinin, CD4 und CD8 einer Analyse ihrer Hydrophobizität und ihrer Anordnung in der Membran- α -Helix unterworfen. Bei einer α -Helix handelt es sich um eine rechtshändig gedrehte Spirale mit durchschnittlich 3,6 Aminosäureseitenketten pro Umdrehung, wobei pro Windung die Helix auf diese Weise um jeweils 5,4 Å wächst. Die Anordnung der Aminosäuren in der α -Helix wurde mit Hilfe von *Helix Wheel-Plots* dargestellt, in denen die Aminosäuren zueinander versetzt dargestellt sind, so dass die Aufsicht auf diese Helix von einem Ende aus simuliert wird. In dieser Studie wurden die Transmembranregionen von Fusionsprotein, Hämagglutinin, CD4 und CD8 vom cytoplasmatischen Ende aus dargestellt, wobei jeweils die letzten 18 Aminosäuren dargestellt sind.

Die Hydrophobizität wurde mit dem Programm PROTSCALE gemäß der Hydrophobizitätstabelle von Abraham bestimmt, wonach jede Aminosäure einen bestimmten Wert zugewiesen bekommt. Die Hydrophobizität ist umso größer, je positiver dieser Wert ist; die Aminosäure Glycin hat den Wert Null [Abraham und Leo, 1987] (Tab. 11).

Tab. 11: Hydrophobizitäts-Werte für Aminosäuren nach Abraham und Leo, 1987.

Ala	0.440	Arg	-2.420	Asn	-1.320	Asp	-0.310
Cys	0.580	Gln	-0.710	Glu	-0.340	Gly	0.000
His	-0.010	Ile	2.460	Leu	2.460	Lys	-2.450
Met	1.100	Phe	2.540	Pro	1.290	Ser	-0.840
Thr	-0.410	Trp	2.560	Tyr	1.630	Val	1.730

Für die vier Proteine sind nachfolgend jeweils die betreffenden *Helix Wheel-Plots* und die Hydrophobizitäts-Diagramme zusammen mit der Aminosäure-Sequenz der Transmembranregion gezeigt (Abb. 21-24).

Die Aufsicht auf die letzten 18 Aminosäuren der Transmembranregion vom Cytoplasma aus zeigte für das Fusionsprotein des Sendai-Virus eine ausschließliche Zusammensetzung aus hydrophoben Aminosäuren, wie auch das Hydrophobizitäts-Diagramm außer für die Position 3 nur stark hydrophobe Aminosäuren nachweist (Abb. 21). Auch für das Influenza A-Hämagglutinin zeigt sich im *Helix Wheel-Plot* eine hydrophobe Zusammensetzung, wobei

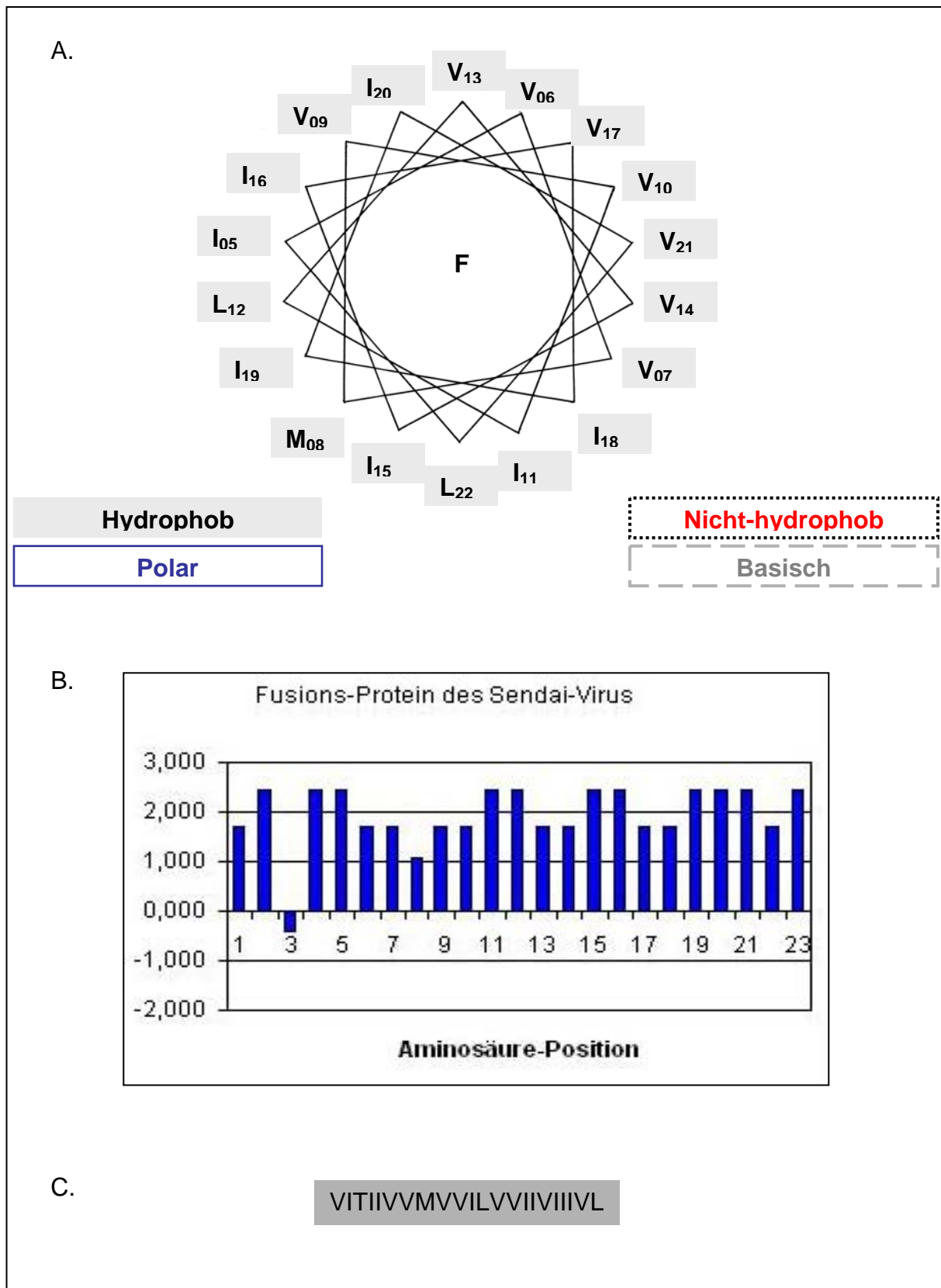


Abb. 21: Struktur-Analyse der Transmembranregion des Fusionsproteins des Sendai-Virus.

A. Helix Wheel-Plot: Dargestellt ist die Aufsicht auf die letzten 18 Aminosäuren der α -Helix aus der Richtung der cytoplasmatischen Domäne. **B. Hydrophobizitäts-Analyse** der Aminosäuren in der α -Helix. **C. Aminosäure-Sequenz** des Transmembran-Abschnitts.

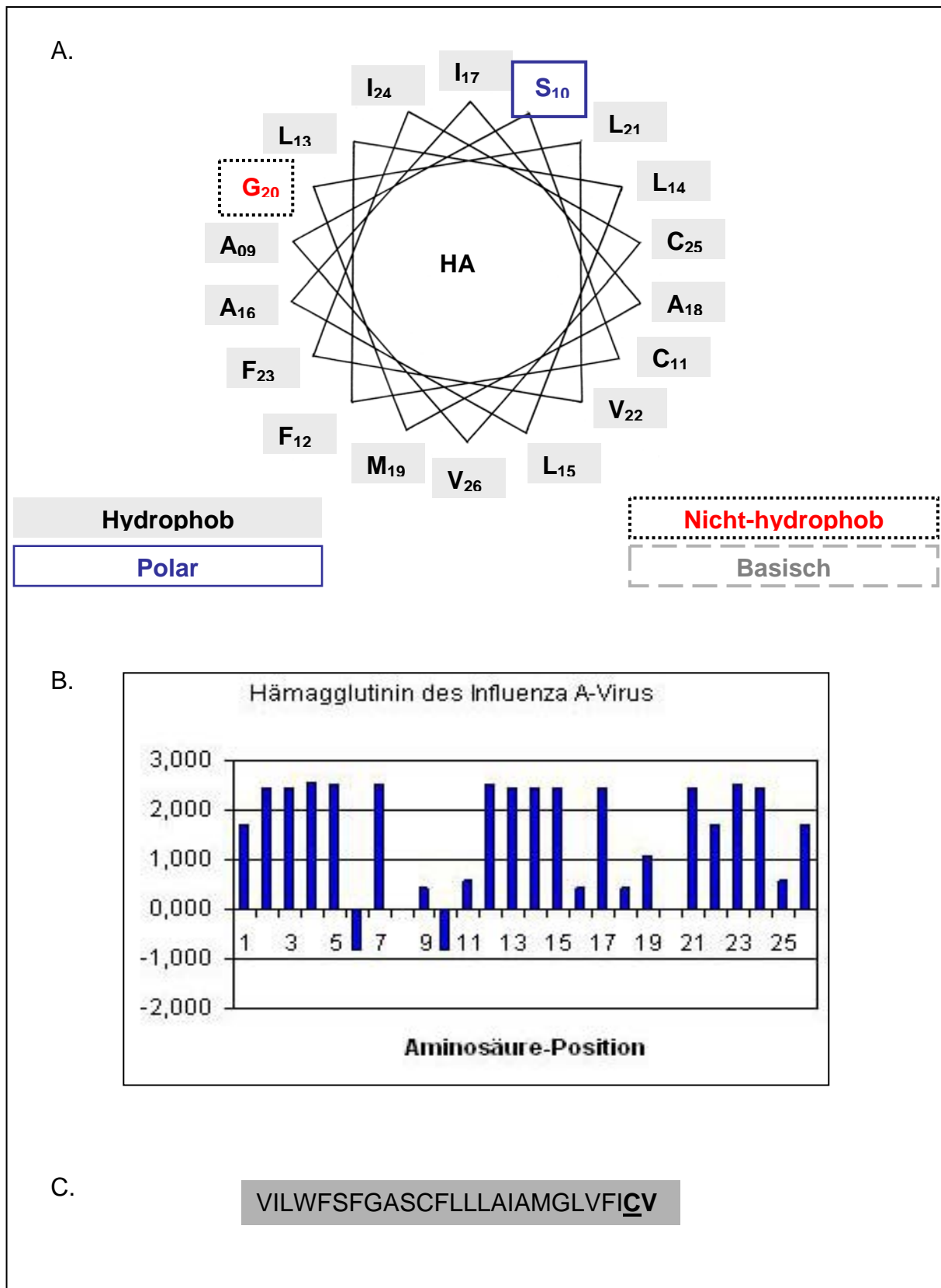


Abb. 22: Struktur-Analyse der Transmembranregion des Hämagglutinins des Influenza A-Virus.

A. Helix Wheel-Plot: Dargestellt ist die Aufsicht auf die letzten 18 Aminosäuren der α -Helix aus der Richtung der cytoplasmatischen Domäne. **B. Hydrophobizitäts-Analyse** der Aminosäuren in der α -Helix. **C. Aminosäure-Sequenz** des Transmembran-Abschnitts.

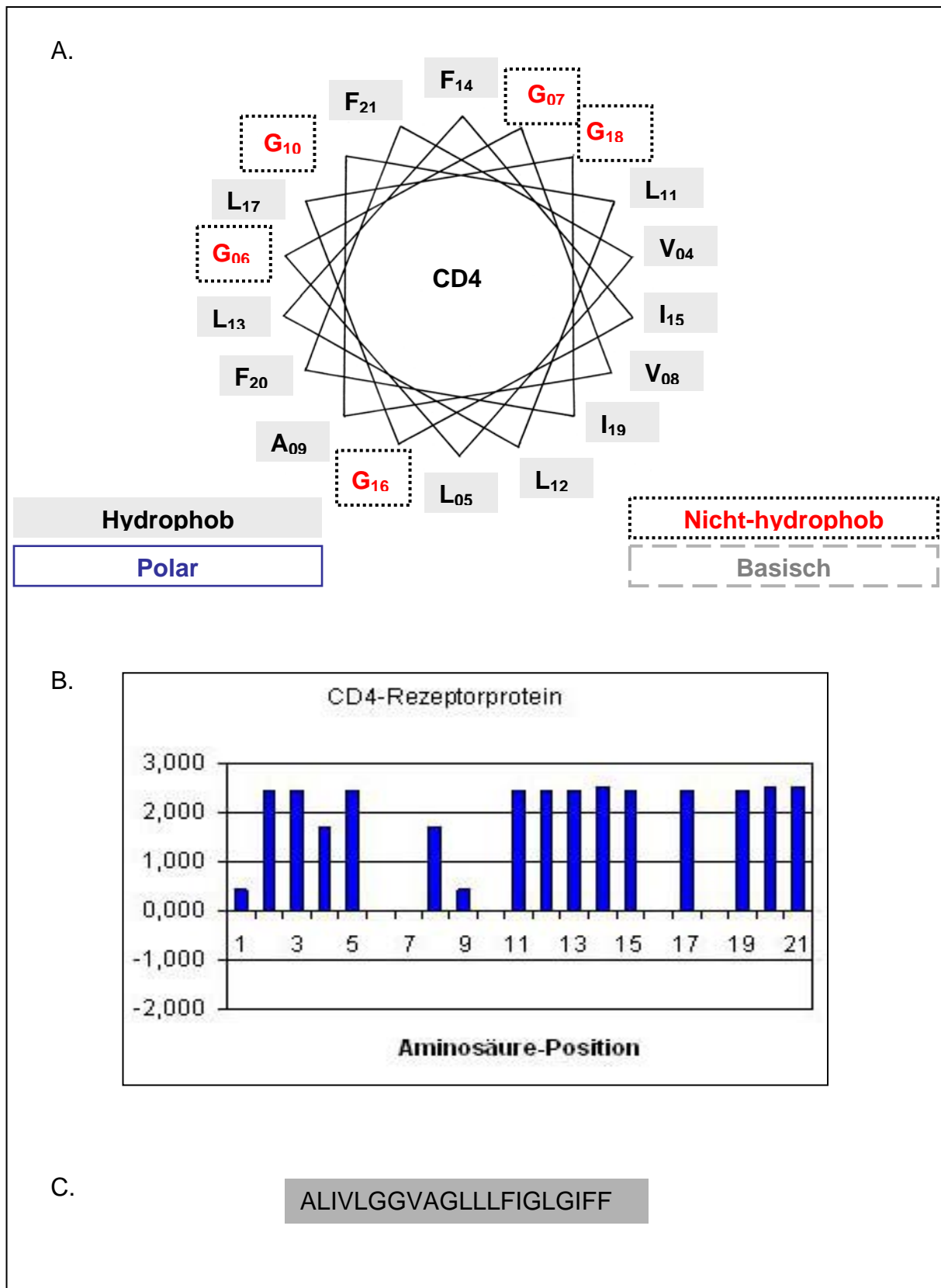


Abb. 23: Struktur-Analyse der Transmembranregion des CD4-Rezeptorproteins.

A. Helix Wheel-Plot: Dargestellt ist die Aufsicht auf die letzten 18 Aminosäuren der α -Helix aus der Richtung der cytoplasmatischen Domäne. **B. Hydrophobizitäts-Analyse** der Aminosäuren in der α -Helix. **C. Aminosäure-Sequenz** des Transmembran-Abschnitts.

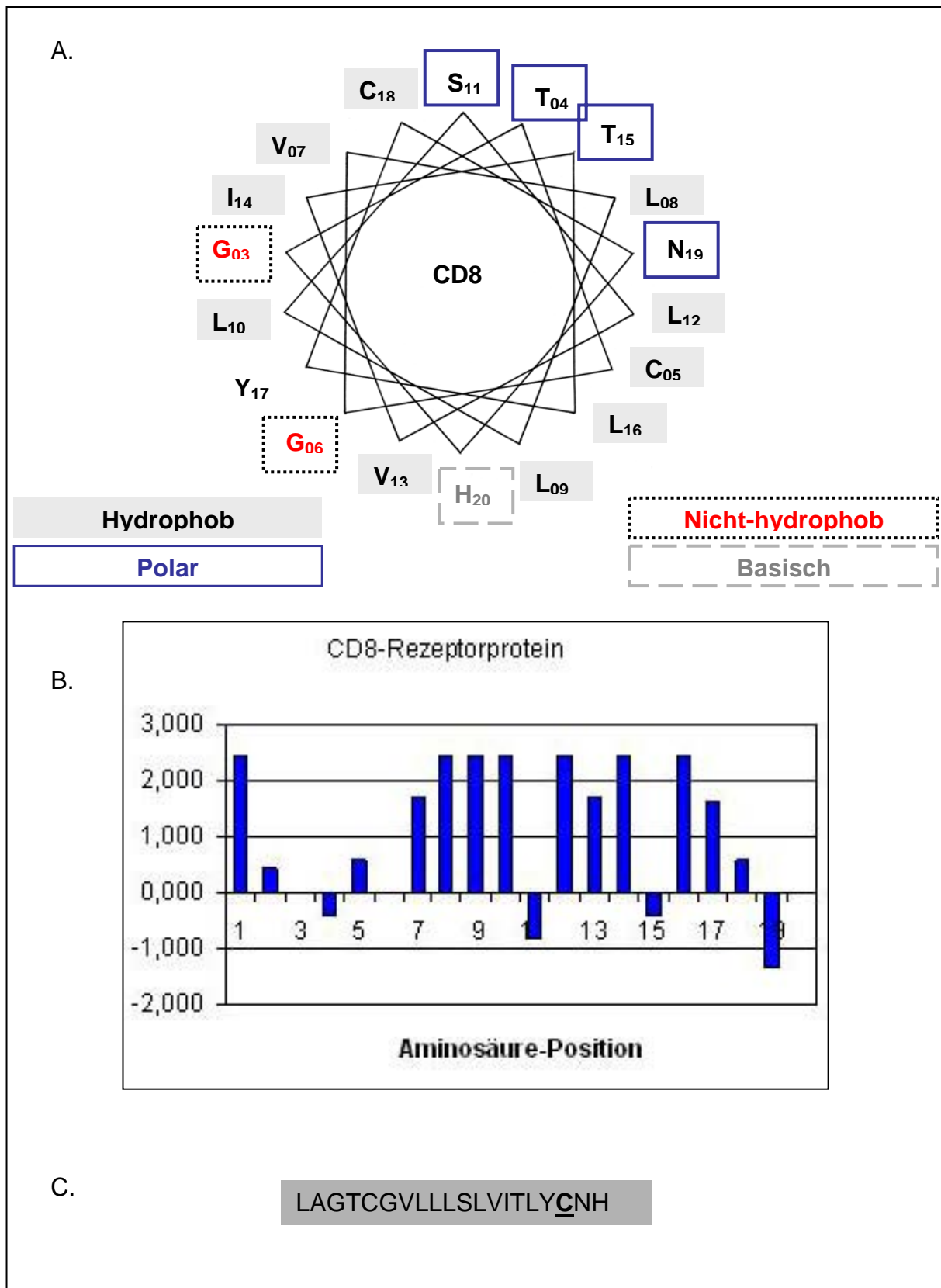


Abb. 24: Struktur-Analyse der Transmembranregion des CD8-Rezeptorproteins.

A. Helix Wheel-Plot: Dargestellt ist die Aufsicht auf die letzten 18 Aminosäuren der α -Helix aus der Richtung der cytoplasmatischen Domäne. **B. Hydrophobizitäts-Analyse** der Aminosäuren in der α -Helix. **C. Aminosäure-Sequenz** des Transmembran-Abschnitts.

sich an der Position 20 ein nicht-hydrophober Glycin-Rest findet. Das leicht-polare Serin an Position 10 hat durch die Entfernung von der Palmitoylierungsstelle vermutlich keinen Einfluss auf die Acylierung. Allerdings finden sich unter den letzten zehn Aminosäuren im Hydrophobizitäts-Diagramm auch zwei Alanin-Reste, die eine geringere Hydrophobizität aufweisen als die hydrophoben Aminosäuren im F-Protein (*Abb. 22*). In die hydrophobe Helix des CD4 sind insgesamt fünf Glycin-Reste eingelagert: Gly₆, Gly₇ und Gly₁₀, die allerdings zu weit von der Cytoplasma-Grenze entfernt sein dürften, um einen Einfluss auf die Palmitoylierung ausüben zu können, und Gly₁₆ und Gly₁₈, die nur jeweils vier bzw. sechs Aminosäuren entfernt vom Cytoplasma liegen. Der Aufblick auf die Helix zeigt, dass sich diese Glycin-Reste annähernd gegenüberliegen (*Abb. 23*). Eine von den anderen Proteinen abweichende Struktur stellt sich mit CD8 dar. In der hydrophoben Helix finden sich zwei gegenüberliegende Gruppen nicht-hydrophober Aminosäuren, die einerseits von den polaren Aminosäuren Thr₄, Ser₁₁, Thr₁₅ und Asn₁₉ und auf der anderen Seite von Gly₃, Gly₆ und der Base His₂₀ gebildet werden. Im Hydrophobizitäts-Diagramm zeigt CD8 von allen Proteinen die größten Abweichungen in der Hydrophobizität und den Einbau der am stärksten nicht-hydrophoben Proteine (*Abb. 24*).

Die Struktur-Analysen der vier in dieser Studie verwendeten Proteine CD4, CD8, HA und F-Protein zeigten deutliche Unterschiede in der Aminosäure-Ausrichtung in der α -Helix und in der Verteilung der Hydrophobizität. Während das nicht-palmitoylierbare Fusionsprotein eine einheitlich hydrophobe Transmembran-Helix aufwies, konnten bei den drei palmitoylierten Proteinen CD4, CD8 und HA nicht-hydrophobe Motive erkannt werden, die zu den Seiten hin ausgerichtet waren; bei CD4 und HA konnten Glycin-Reste Cytoplasma-nahe in der α -Helix gefunden werden.

4.2 EINFLUSS SPEZIFISCHER AMINOSÄUREN

4.2.1 SEQUENZVERGLEICH PALMITOYLIERTER POLYPEPTIDE

In der Hoffnung, durch einen Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der Transmembranregionen verschiedener bekannter palmitoylierter Single-TMR-Proteine ein allen Proteinen eigenes Sequenz-Motiv für die Palmitoylierung zu finden, wurden zwei verschiedene Sequenz-Alignments durchgeführt. Mittels NCBI-Protein-Datenbank-Recherche konnten die gesamten Aminosäure-Sequenzen der interessierenden Proteine ermittelt werden, woraufhin die Aminosäuren, die die Transmembran-Helix bilden, durch das Programm PREDICTPROTEIN ermittelt wurden [Rost et al., 1996].

NOMAD RESULT

Informations:

Objective function:	shared entropy (proteins specific)
Occurrence repartition:	OOPS
Number of occurrences:	19
Width:	12
Number of sequences:	19
Maximum length:	32
Minimum length:	19
Average length:	23.789

Alignment:

>CD4	7	GVAGLLLFILGLG	5.390
>CD8	4	TCGVLLLSLVIT	6.368
>Surfactant Protein C	9	VVVVLIVVVIVG	4.092
>Synaptotagmin	3	AIILVFLVVFG	5.582
>HLA-B7	5	ARPAVLAVVVIG	6.853
>Bacteriorhodopsin	14	SCLNPLVYVIVG	10.170
>CCR5	10	CCINPIIYAFVG	9.715
>p63	2	CWGSPAAAVALA	6.710
>p75	5	VYCSILAAVVVG	7.159
>Influenza A-HA	9	ASCFLLLAIAMG	8.102
>Influenza A-M2	6	ASIIIGILHLILW	5.448
>Influenza C-HEF	13	TAANLMAALVIS	6.213
>Murines Leuk	11	PLIILLLILLFG	4.435
>Newc. Disease-F	3	STSALITYIVLT	5.791
>Semliki Forest-E1	9	AIGAILVLVVVT	5.062
>Semliki Forest-E2	6	AVVGMSLLALIS	3.378
>Sindbis-Virus 6k	16	CSCCLPFLVVAG	7.734
>Sindbis-Virus E2	3	AVASATVAMMIG	5.734
>Vesic. Stomatits-G	1	ASFFFIIGLIIG	5.983

Objective score: 6.312

Abb. 25: Sequenz-Alignment der Transmembranregion von 20 palmitoylierten Proteinen mittels NOMAD. In der ersten Spalte finden sich die Protein-Bezeichnungen, in der zweiten Spalte die Nummer der Aminosäure, an der der Zwölf-AS-Abschnitt startet; die dritte Spalte zeigt die verglichenen Sequenzen an, und in der vierten Spalte stehen die objektiven Werte für das Zutreffen der vorhergesagten Sequenz. Je höher dieser Wert ist, desto besser passt das Protein in das Alignment-Schema.

Zunächst wurden Transmembranregion-Sequenzen bekannter S-acylierter Proteine über die Software NOMAD verglichen, um Sequenzübereinstimmungen in einem willkürlich gewählten Segment von zwölf Aminosäuren zu finden, wobei NOMAD (*Neighborhood Optimization for Multiple Alignment Discovery*) Entropie-basierende objektive Funktionen verwendet, die die Natur der Aminosäuren berücksichtigt, und so verlässlicher als die oft verwendete Distanz-Gruppierung sein soll [Hernandez et al., 2004] (Abb. 25).

Als wahrscheinliches Muster für palmitoylierte Transmembranproteine zeigten sich mit genügender Sicherheit im NOMAD-Schema lediglich Glycin-Reste am Ende des Rahmens; allerdings kamen die Aminosäure Alanin häufig am Anfang des Rahmens, die Aminosäure Leucin an den Positionen 5-8 sowie die Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin häufig an den Positionen 8-11 vor.

Ein weiteres Alignment wurde für die selben zwanzig Proteine mit dem Programm MULTALIN durchgeführt, wobei die vollständigen eingereichten Sequenzen verwendet und sinnvoll zueinander ausgerichtet werden [Corpet, 1988]. Auch hier bestätigt sich, dass es keine Konsensus-Sequenz gibt, dafür aber ein häufiges Auftreten von Glycin-Resten nahe der Grenze zum Cytoplasma (Abb. 26).

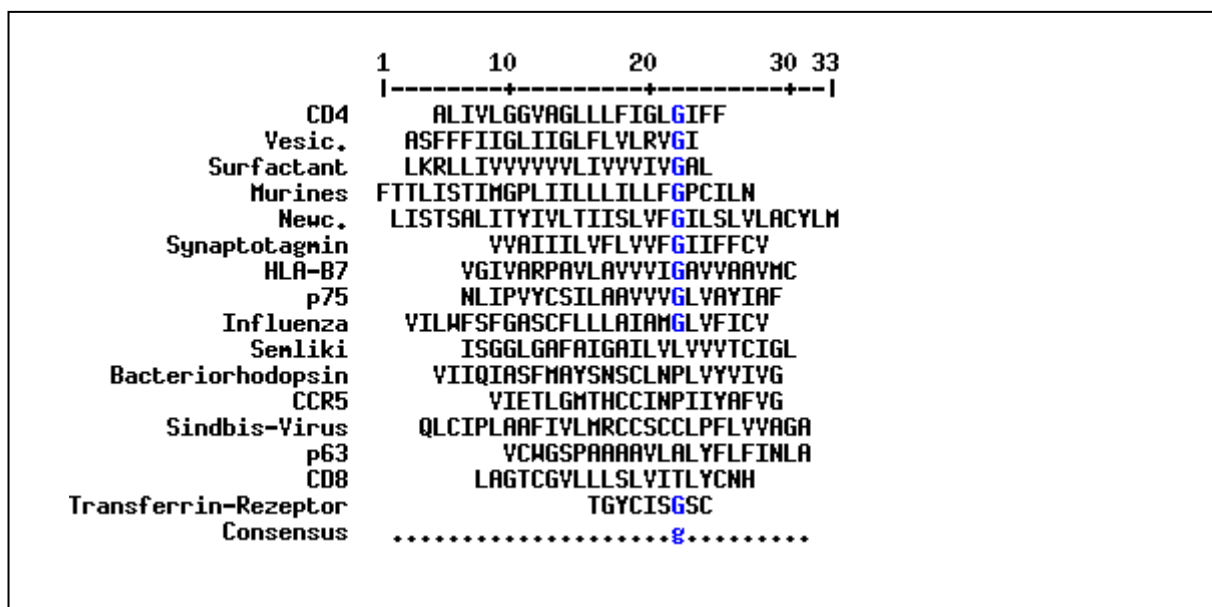


Abb. 26: Sequenz-Alignment der Transmembranregion von 20 palmitoylierten Proteinen mittels MULTALIN. In der ersten Spalte finden sich die Protein-Bezeichnungen, in der zweiten Spalte die verglichenen Sequenzen. Als Konsensus-Merkmal tritt lediglich die Aminosäure Glycin auf.

4.2.2 EINFLUSS DER AMINOSÄUREN GLYCIN UND PHENYLALANIN

Anhand der Strukturanalysen der acylierten Proteine und aufgrund der Alignment-Ergebnisse kristallisierte sich das Glycin als entscheidende Aminosäure für die Palmitoylierung integraler Proteine heraus. Frühere Sequenzvergleiche unserer Arbeitsgruppe [Ponimaskin und Schmidt, 1998] fanden zusätzlich auch oft Phenylalanin in der unmittelbaren Nachbarschaft der Cytoplasma-Grenze. Der Einfluss speziell dieser beiden Aminosäuren, Glycin und Phenylalanin, auf die Palmitoylierung wurde durch Erstellung von Mutanten aus den oben beschriebenen Chimärenproteinen F-CD4-F_{Cys} und F-HA'-F_{Cys} untersucht.

4.2.2.1 Chimäre F-CD4-F_{Cys}

Mittels Overlap Extension-PCR wurden Mutanten der Chimäre F-CD4-F_{Cys} hergestellt, bei denen selektiv die unpolare, hydrophobe Aminosäure Glycin in der CD4-Transmembranregion nahe der Grenze zur cytoplasmatischen Domäne gegen die ebenfalls unpolare Aminosäure Isoleucin substituiert wurde. In der Mutante F-CD4-F_{G18I} wurde lediglich der Glycin-Rest an der Position 18 (gezählt vom Anfang der TMR), in der Mutante F-CD4-F_{G16/18I} beide Glycin-Reste an den Positionen 16 und 18 gegen Isoleucin ausgetauscht (Abb. 27).

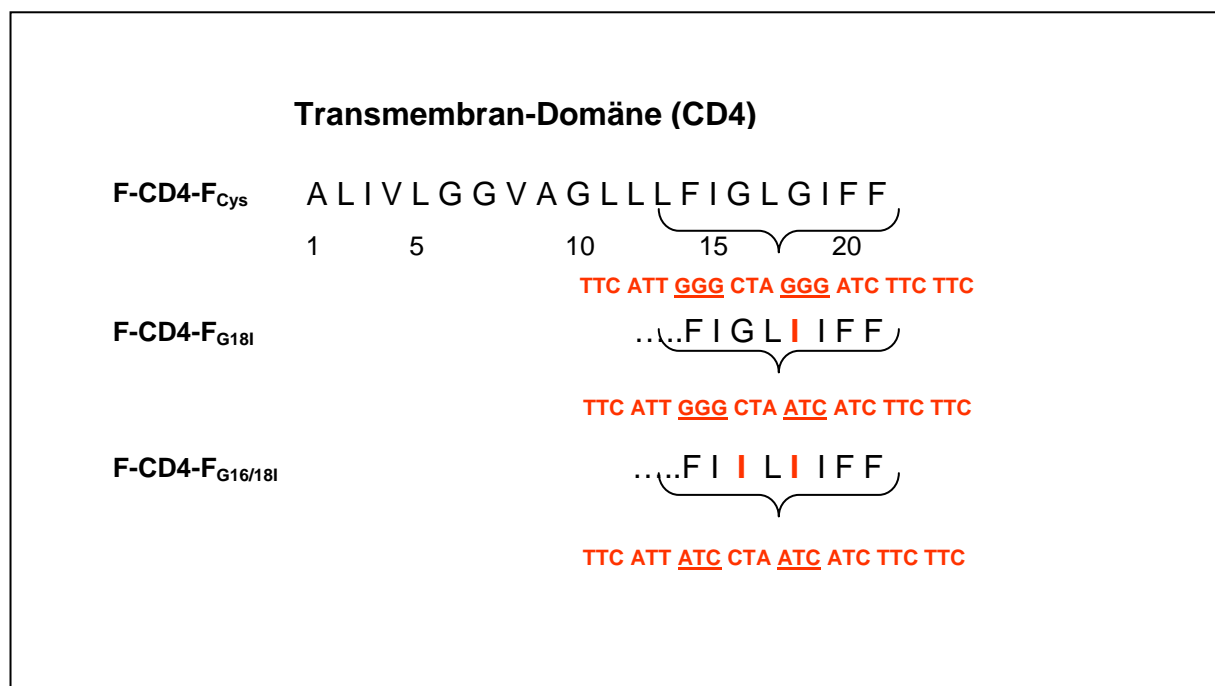


Abb. 27: Die Chimäre F-CD4-F_{Cys} und die daraus erstellten Mutanten. Die Änderungen im Protein wurden fett markiert. Die Gen-Sequenz ist aufgehellt dargestellt, Änderungen der Basentriplets sind unterstrichen.

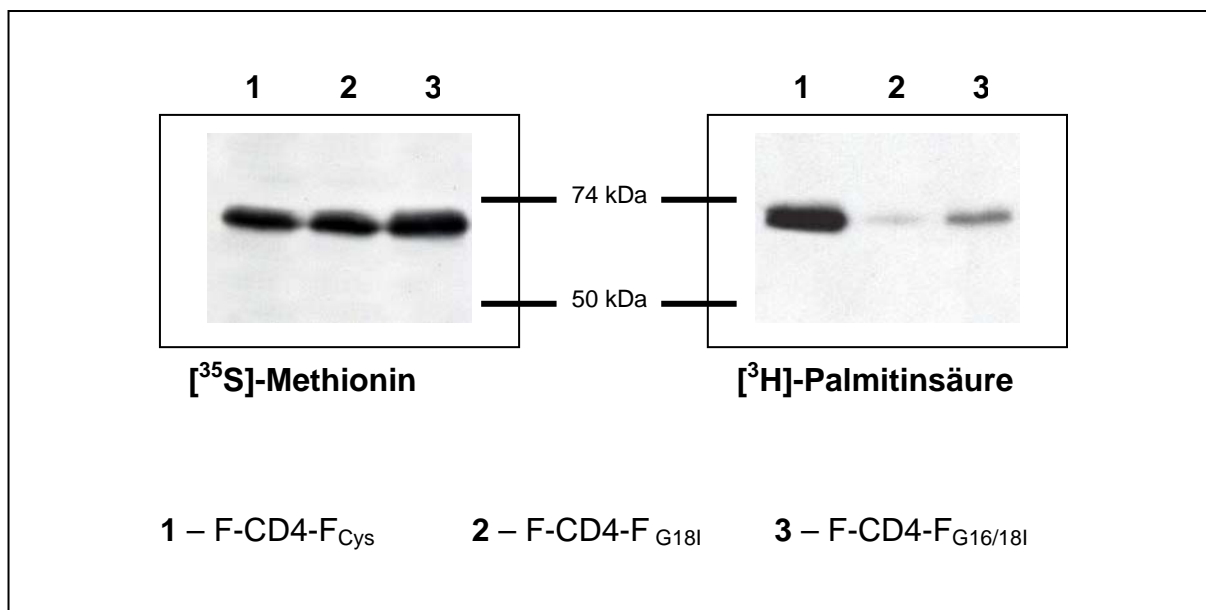


Abb. 28: Durch $[^{35}\text{S}]$ -Methionin-markierte Protein-Expression und $[^3\text{H}]$ -Palmitinsäure-Einbau in das F-CD4-F_{Cys}-Chimärenprotein und die daraus erstellten Mutanten.

Die Palmitoylierung eines Proteins wurde schließlich relativ zu der Expression der jeweiligen Proteine, ausgedrückt durch die $[^{35}\text{S}]$ -Methionin-Markierung, dargestellt. Austausch der Aminosäure Glycin an Position 18 durch Isoleucin führte zu einem höchst signifikanten Abfall der Palmitoylierung im Vergleich zu der ursprünglichen F-CD4-F_{Cys}-Chimäre. Auch die Substitution beider Glycin-Reste an Position 16 und 18 zusammen zeigte einen höchst signifikanten Einbruch der Palmitoylierung, aber dennoch ein geringfügig höheres Palmitoylierungsniveau als nach Austausch des Glycinrests an Position 18 allein (Abb. 28, Tab. 12).

Tab. 12: Relativer $[^3\text{H}]$ -Palmitinsäure-Einbau, Standardabweichungen und Signifikanz im Chimärenprotein F-CD4-F_{Cys} und dessen Mutanten.

Das Palmitoylierungsniveau und die Signifikanz der Änderung wurden jeweils auf Grundlage der Chimäre F-CD4-F_{Cys} berechnet.

Protein	Anzahl der Versuche	Mittelwert relativer $[^3\text{H}]$ -Einbau [%]	Standard- Abweichung	Signifikanz
F-CD4-F _{Cys}	7	100,00	-----	-----
F-CD4-F _{G18I}	7	11,41	± 3,61	< 0,0001
F-CD4-F _{G16/18I}	7	18,49	± 5,97	< 0,0001

4.2.2.2 Chimäre F-HA'-F_{Cys}

Mittels Overlap Extension-PCR wurden auch von der Chimäre F-HA'-F_{Cys} Mutanten hergestellt, bei denen selektiv Aminosäuren in der Transmembranregion ausgetauscht wurden. In der Mutante F-HA'-F_{C11I} wurde der Cysteinrest an der Position 11 (gezählt vom Anfang der TMR) gegen Isoleucin ausgetauscht, um eine Palmitoylierung an dieser Stelle auszuschließen. Außerdem wurden mehrere Mutanten erstellt, an denen die Glycinreste an den Positionen 8 und 20 durch Valin beziehungsweise der Phenylalaninrest an Position 23 durch Isoleucin substituiert wurden (Abb. 29 und 30).

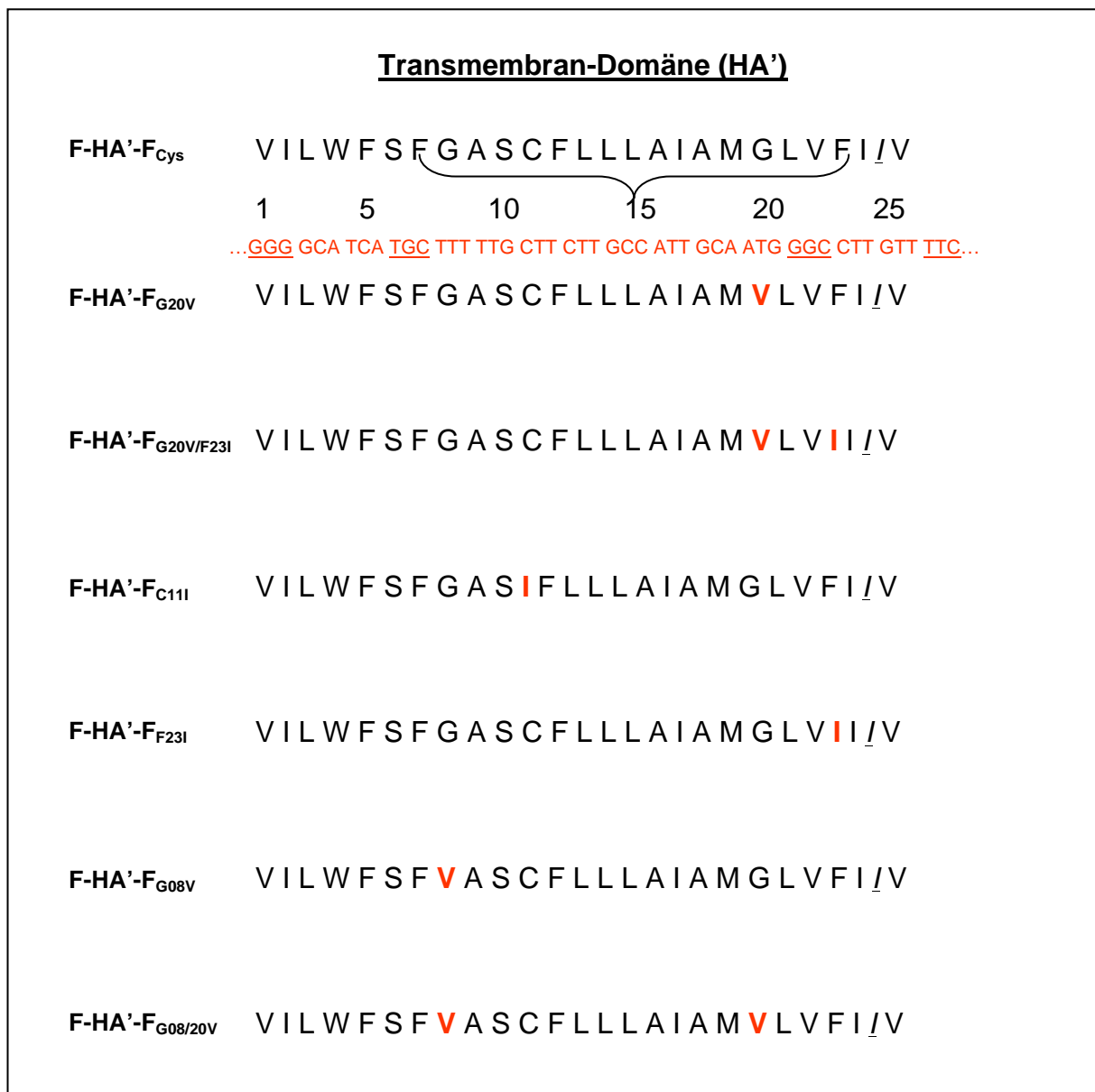


Abb. 29: Die Chimäre F-HA'-F_{Cys} und die daraus erstellten Mutanten. Die Änderungen im Protein wurden fett markiert. Die Gen-Sequenz ist aufgehellt dargestellt, die Basentriplets sind unterstrichen.

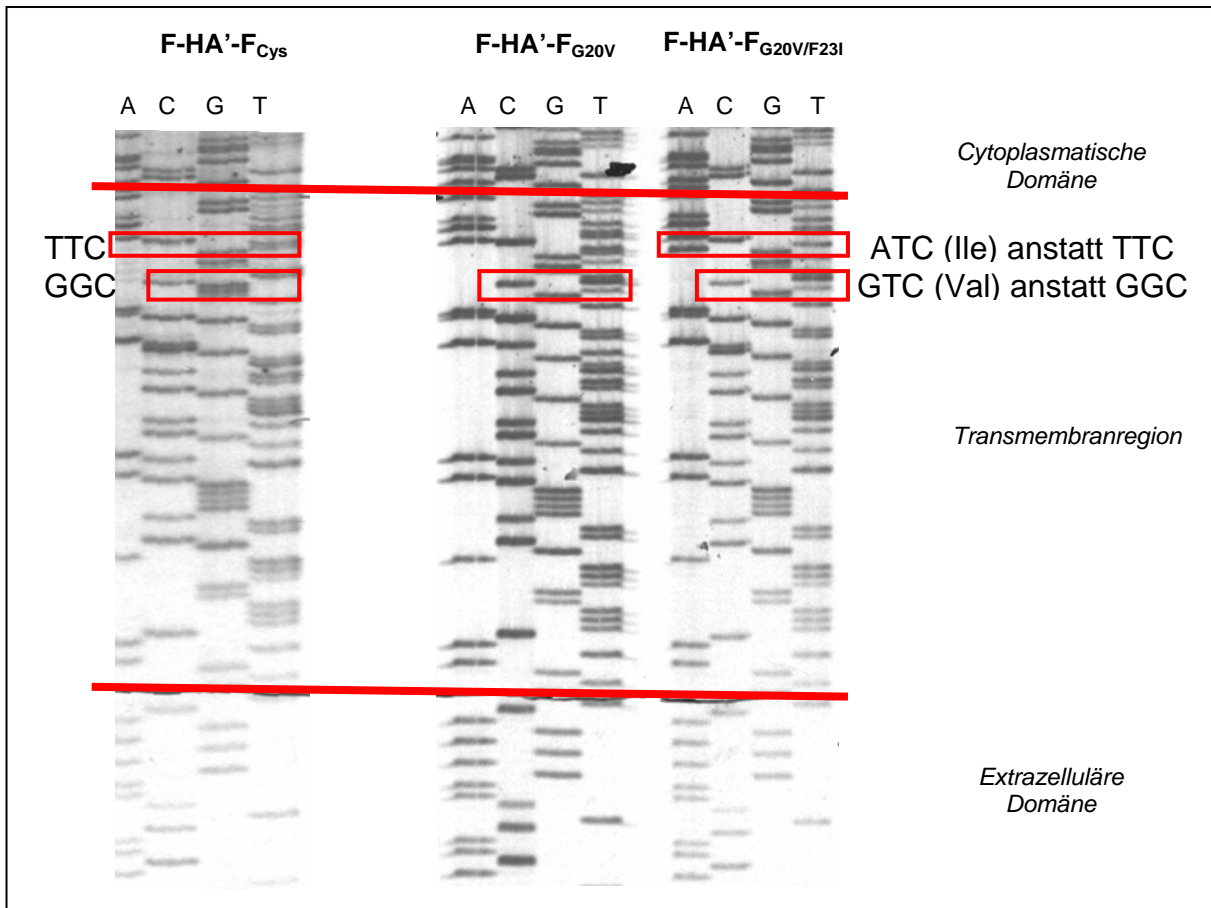


Abb. 30: Sequenz des Chimärenproteins F-HA'-F_{Cys} und zweier Mutanten (Kettenabbruchmethode nach Sanger).

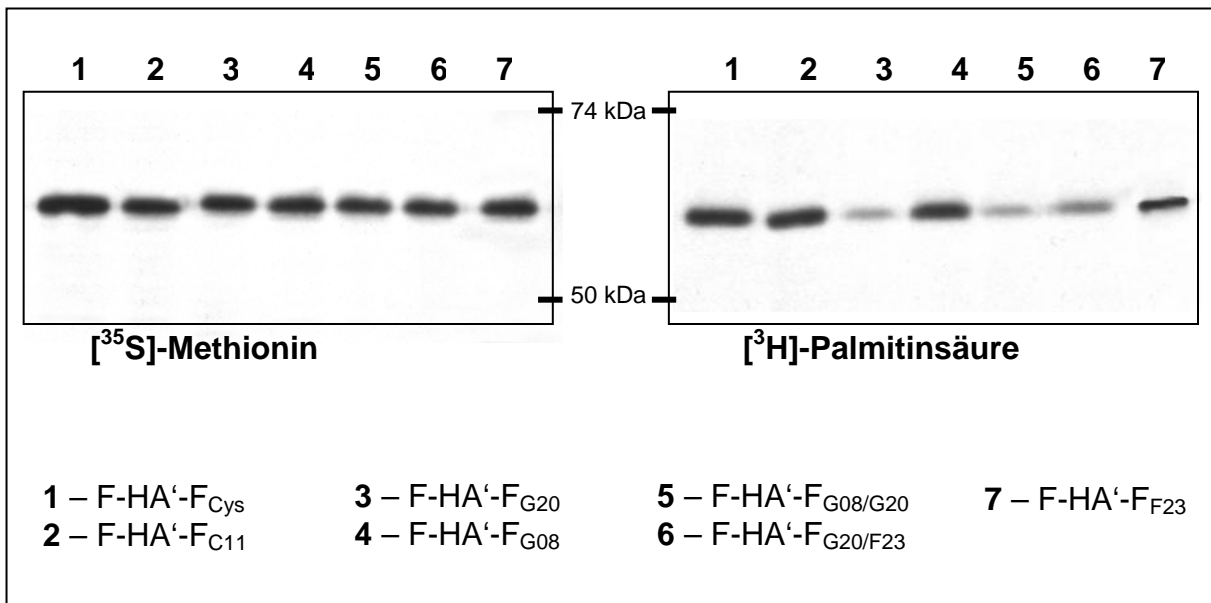


Abb. 31: Durch [³⁵S]-Methionin-markierte Protein-Expression und [³H]-Palmitinsäure-Einbau in das F-HA'-F_{Cys}-Chimärenprotein und die daraus erstellten Mutanten.

Der Austausch der Aminosäure Cystein an Position 11 der Transmembrandomäne des Chimärenproteins F-HA'-F_{Cys} zeigte keinen Unterschied zur [³H]-Palmitinsäure-Inkorporation des unmutierten F-HA'-F_{Cys}-Proteins, dieses Cystein liegt also nicht-acyliert vor. Auch bei Substitution der sehr weit von der Membran-Grenze entfernt lokalisierten Aminosäure Glycin an Position 8 trat kein signifikanter Unterschied zur Expression der ursprünglichen F-HA'-F_{Cys}-Chimäre auf. Wurde allerdings zusammen mit Gly₈ auch Gly₂₀ ausgetauscht, kam es zu einem höchst signifikanten Abfall des Palmitinsäure-Levels der Mutante auf gerade noch knapp 8 % der Palmitoylierung der Chimäre F-HA'-F_{Cys}, ebenso wie bei alleinigem Austausch des Gly₂₀. Auch ein Ersatz des Phenylalanins an Position 23 führt zu einer signifikanten Verminderung der Acylierung, wenn auch mit gut 50 % nicht in vergleichbarem Ausmaß wie der Austausch der Aminosäure Glycin. Interessanterweise kommt es bei gemeinsamer Substituierung von Gly₂₀ und Phe₂₃ zwar zu höchst-signifikantem Einbruch in der Palmitoylierung, der relative Wert liegt mit 14 % aber fast doppelt so hoch wie für den Austausch des Glycin-Rests allein (*Abb. 31, Tab. 13*).

Tab. 13: Relativer [³H]-Palmitinsäure-Einbau, Standardabweichungen und Signifikanz im Chimärenprotein F-HA'-F_{Cys} und dessen Mutanten.

Das Palmitoylierungsniveau und die Signifikanz der Änderung wurde jeweils auf Grundlage der Chimäre F-HA'-F_{Cys} berechnet.

Protein	Anzahl der Versuche	Mittelwert relativer [³ H]-Einbau [%]	Standard- Abweichung	Signifikanz
F-HA'-F _{Cys}	4	100,00	-----	-----
F-HA'-F _{G20V}	4	7,58	± 2,11	< 0,0001
F-HA'-F _{G20V/F23I}	4	13,98	± 1,91	< 0,0001
F-HA'-F _{C11}	4	100,05	± 1,89	0,9612
F-HA'-F _{F23I}	4	52,08	± 5,89	< 0,0001
F-HA'-F _{G08V}	4	98,10	± 2,11	0,1786
F-HA'-F _{G08V/G20V}	4	7,38	± 1,76	< 0,0001

4.2.2.3 Kontrolle der Unterschiede in Transport und Prozessierung

Wie unter Punkt 4.1.3.2 beschrieben, wurden alle mutierten Chimärenproteine von F-CD4-F_{Cys} und F-HA'-F_{Cys} mittels Durchflusszytometrie auf Unterschiede in Transport und post-translationaler Prozessierung untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen mutierten und nicht-mutierten Proteinen festgestellt werden (*Tab. 14 und 15*).

Tab. 14: Oberflächenexpression der F-CD4-F_{Cys}-Chimäre und ihrer Mutanten
(ermittelt durch Durchflusszytometrie).

Protein	Effizienz der Oberflächenexpression [%]	Relativer Fluoreszenzindex [%]
F-CD4-F _{Cys}	31,2	100,0
F-CD4-F _{G18I}	29,3	93,9
F-CD4-F _{G16/18I}	30,0	96,2

Tab. 15: Oberflächenexpression der F-HA'-F_{Cys}-Chimäre und ihrer Mutanten
(ermittelt durch Durchflusszytometrie).

Protein	Effizienz der Oberflächenexpression [%]	Relativer Fluoreszenzindex [%]
F-HA'-F _{Cys}	26,1	100,0
F-HA'-F _{G20V}	24,9	95,4
F-HA'-F _{G20V/F23I}	25,5	97,7
F-HA'-F _{C11}	25,4	97,3
F-HA'-F _{F23I}	23,8	91,2
F-HA'-F _{G08V}	26,7	102,3
F-HA'-F _{G08V/G20V}	26,9	103,1