

# **Klonierung und erste Charakterisierung des humanen Mikrotubuli-assoziierten Proteins EML4**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von

**Marc Pollmann**

Kiel, 2002

Referentin: Frau Prof. Dr. K. Krupinska

Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Parwaresch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2002

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 17.07.2002

Der Dekan

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1 Zellteilung und Krebs .....	1
1.1.1 Zellzyklus-assoziierte Proteine fungieren als Marker für die Proliferationsaktivität einer Zelle .....	1
1.2 Der Zellzyklus .....	2
1.2.1 Die Mitose: Kernteilung somatischer Zellen.....	3
1.2.2 Der „Anaphase-promoting complex/cyclosome“ (APC/C) leitet das Ende der Mitose ein .....	4
1.3 Etablierung des monoklonalen Antikörpers „Ki-Mit“: ein neuer Marker für Mitosen	5
1.3.1 Immunaффinitätschromatographische Aufreinigung und Ansequenzierung des „Ki-Mit“-Antigens.....	7
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	8

## 2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Computerprogramme .....	9
2.2 Chemikalien.....	10
2.3 Bakterienstämme und deren Kultur .....	12
2.3.1 Bakterienstämme .....	12
2.3.2 Verwendete Medien und Zusätze für Bakterienkulturen.....	12
2.4 Plasmide, DNA-Größenmarker, Oligonukleotide .....	13
2.4.1 Plasmide.....	13
2.4.2 DNA-Größenmarker .....	15
2.4.3 Oligonukleotide .....	15
2.5 Peptide, Antikörper und Molekulargewichtsmarker .....	17
2.5.1 Peptide .....	17
2.5.2 Antikörper für Immunfärbungen, Immunpräzipitationen und Fluoreszenzmikroskopie.....	18
2.5.3 Protein-Größenmarker für SDS-PAGE .....	18
2.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	19
2.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	19
2.6.2 Alkalische Dephosphorylierung von Plasmid-DNA .....	20
2.6.3 Phenolisieren von DNA.....	21
2.6.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese.....	21
2.6.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	22
2.6.6 Ligation von DNA mit T4 DNA-Ligase.....	22
2.6.7 Transformation von Plasmid-DNA in <i>Escherichia coli</i> .....	23
2.6.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	23

2.6.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen .....	24
2.6.10	Sequenzierung von DNA .....	24
2.6.11	Isolierung von „Messenger RNA“ (mRNA) .....	25
2.6.12	Synthese von cDNA .....	26
2.6.13	Polymerase-Kettenreaktion .....	26
2.6.14	Identifikation der Enden einer mRNA durch „RACE“ .....	27
2.6.15	Bakterielle Genexpression .....	28
2.6.16	Gerichtete Mutagenese von DNA-Molekülen .....	29
2.6.17	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH) .....	30
2.7	Biochemische Arbeitsmethoden .....	30
2.7.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	30
2.7.2	Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Färbelösung .....	32
2.7.3	Western Blot .....	32
2.7.4	Immunfärbung von Western Blots .....	33
2.7.5	Herstellung monoklonaler Antikörper durch Immunisierung mit bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen .....	33
2.7.6	Immunpräzipitation von Proteinen .....	34
2.7.7	Proteinsequenzierung .....	34
2.7.8	Nachweis postrationaler Modifikationen von Proteinen .....	35
	2.7.8.1 Untersuchungen zur Phosphorylierung von Proteinen .....	35
	2.7.8.2 Untersuchungen zur Glykosylierung von Proteinen .....	35
2.7.9	„Spin-Down Assay“ für Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) .....	36
2.7.10	ELISA .....	36
2.8	Gewebekultur .....	37
2.8.1	Eukaryontische Zelllinien und deren Kultur .....	37
2.8.2	Präparation peripherer Blutlymphozyten und –monozyten .....	39
2.8.3	Herstellung von Zytospin-Präparaten .....	39
2.8.4	Zellsynchronisation und mitogene Stimulation .....	39
2.8.5	Herstellung von Zytoplasmalysat .....	40
2.8.6	Behandlung von L428-Zellen mit Lambda Protein-Phosphatase .....	40
2.9	Immunfärbung eukaryontischer Zellen .....	41
2.9.1	Immunzytochemie .....	41
2.9.2	Immunfluoreszenzmikroskopie .....	41
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Untersuchung der subzellulären Lokalisation des „Ki-Mit“-Antigens EML4 .....	43
3.1.1	Immunfluoreszenzmikroskopie mit „Ki-Mit“ .....	43
3.2	Ermittlung der mRNA-Sequenz von EML4 .....	44
3.2.1	Amplifikation und Sequenzierung der EML4-cDNA .....	44
3.2.2	Identifikation des 5'-Endes und des 3'-Endes der mRNA von EML4 .....	45
3.2.3	EML4 gehört zur Familie der EMAP-ähnlichen Proteine .....	50

3.3 Bakterielle Expression von EML4 .....	52
3.3.1 „Ki-Mit“ bindet an rekombinantes EML4-Protein .....	52
3.3.2 Etablierung des neuen monoklonalen Antikörpers „152“ .....	54
3.3.3 Die monoklonalen Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ detektieren EML4 während unterschiedlicher Zellzyklusphasen .....	56
3.3.4 Immunpräzipitation mit „Ki-Mit“ und „152“ .....	57
3.4 Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen von EML4 .....	58
3.4.1 „Ki-Mit“ und „152“ binden an glykosyliertes EML4 .....	59
3.4.2 „Ki-Mit“ erkennt eine Phosphoform von EML4 .....	60
3.5 Charakterisierung der Epitope von „Ki-Mit“ und „152“ .....	63
3.5.1 Bakterielle Genexpression verschiedener EML4-Fragmente .....	64
3.5.2 „Screening“ des EML4 C-Terminus .....	66
3.5.3 Gerichtete Mutagenese des „Ki-Mit“-Epitops .....	67
3.6 Genomische Organisation von EML4 .....	70
3.6.1 Chromosomale Lokalisation des EML4-Gens .....	70
3.6.2 Exon-Intron-Struktur des EML4-Gens .....	71
3.7 EML4 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) .....	73
3.7.1 <i>In vitro</i> -Interaktion von EML4 und Tubulin – „Spin-Down Assay“ für Mikrotubuli-assoziierte Proteine .....	74
<b>4. Diskussion</b>	
4.1 Die für EML4 spezifischen Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ im Vergleich .....	76
4.1.1 „Ki-Mit“ bindet an eine Phosphoform von EML4, die hauptsächlich in der Mitose vorkommt .....	77
4.1.2 Tyrosin 954 (Y <sub>954</sub> ) von EML4 ist eine Schlüsselaminosäure innerhalb des „Ki-Mit“-Epitops .....	80
4.1.3 Der Antikörper „152“ erkennt EML4 während der Interphase und der Mitose .....	81
4.2 Die subzelluläre Lokalisation des EML4-Proteins .....	82
4.2.1 Die Anfärbung von EML4 durch „152“ und „Ki-Mit“ in der Immun- fluoreszenzmikroskopie .....	82
4.2.2 Die Detektierbarkeit des phosphorylierten EML4 nimmt mit Beginn der Anaphase ab .....	84
4.3 EML4 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) .....	85
4.3.1 Die Mikrotubuli: Dynamische Strukturen mit variabler Funktion während des Zellzyklus .....	85
4.3.2 Die Aktivität von MAPs kann über Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden .....	86
4.3.3 Die Phosphorylierung von EML4 könnte dessen Aktivität beeinflussen .....	87
4.4 EML4 ist Teil einer konservierten Proteinfamilie .....	88

---

4.4.1	EML1, EML2 und EML4 sind EMAP-ähnliche Proteine des Menschen .....	88
4.4.2	Die Familie der EMAP-ähnlichen Proteine besitzt gemeinsame Merkmale ...	89
4.4.2.1	<i>EMAP-ähnliche Proteine enthalten konservierte „WD-repeats“ .....</i>	89
4.4.2.2	<i>„WD-repeats“ prägen die Stereochemie eines Proteins.....</i>	89
4.4.2.3	<i>Die HELP-Domäne ist der am stärksten konservierte Bereich der EMAP-ähnlichen Proteine .....</i>	90
4.5	Ausblick.....	90
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassungen .....</b>	<b>92</b>
5.1	Zusammenfassung .....	92
5.2	Summary.....	93
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>106</b>
7.1	Proteinsequenz-„Alignment“ der humanen EMAP-ähnlichen Proteine EML1, EML2 und EML4 .....	106
7.2	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....	108
7.3	Abkürzungen .....	109
	Lebenslauf .....	112
<b>8.</b>	<b>Danksagungen.....</b>	<b>113</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Zellteilung und Krebs

Wenn Steuerungsmechanismen versagen, die normalerweise das Wachstum und die Teilung von Zellen beschränken, kann dies die Entstehung von Krebs zur Folge haben. Krebszellen können sich unkontrolliert teilen und fremde Gewebe infiltrieren, in denen sie Ableger (Metastasen) bilden. Aus zahlreichen biomedizinischen Studien ist bekannt, daß aggressive Krebsarten eine hohe Zellzyklusaktivität besitzen (Parwaresch und Rudolph, 1996; Rudolph et al., 1998). Diese äußert sich in einer hohen Teilungsfrequenz der einzelnen Tumorzellen. Im Gegensatz dazu weisen weniger aggressive Varianten der Krankheit eine vergleichsweise niedrigere Zellteilungsaktivität auf. Aus einer Reihe von Publikationen geht hervor, daß die zelluläre Proliferation als Parameter für die Bestimmung der Aggressivität eines Tumors herangezogen werden kann (Frahm et al., 2001). Mittlerweile hat sie sich in der Medizin als wichtiges Hilfsmittel etabliert, wenn es darum geht, Prognosen für die Tumorprogression bei Krebspatienten zu erstellen (Rudolph et al., 1999 und 2001).

### 1.1.1 Zellzyklus-assoziierte Proteine fungieren als Marker für die Proliferationsaktivität einer Zelle

Im Lymphknotenregister des Instituts für Hämatopathologie in Kiel werden seit 1982 Proteine untersucht, deren zeitliches Auftreten in der Zelle zellzyklusabhängig reguliert wird. Solche Proteine sind bei Immunfärbungen mit geeigneten Antikörpern nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus nachzuweisen. Durch Kombination der Färbedaten verschiedener Antikörper, die spezifisch gegen phasenspezifische Antigene gerichtet sind, läßt sich die statistische Verteilung der Zellzyklusphasen innerhalb einer gegebenen Zellpopulation ermitteln.

Für die Medizin sind solche phasenspezifischen Proteine deshalb von Interesse, weil sie als Marker für die Proliferationsaktivität eines Tumors verwendet werden können (Heidebrecht et al., 1997). Durch sie kann festgestellt werden, wie weit sich das Teilungsverhalten eine Tumor-Zellpopulation vom nichtpathologischen Zustand entfernt hat. Je größer diese Abweichung im Teilungsverhalten ist, desto aggressiver ist der Tumor zu bewerten. Ist die Proliferationsaktivität eines Tumors mit Hilfe geeigneter Zellzyklusmarker bestimmt worden, so kann eine adäquate und tumoradaptierte Therapieform gewählt werden. Sofern sich ein bestimmtes Markerprotein als prognostisch relevant herausgestellt hat, treten im folgenden verstärkt auch zellbiologische Aspekte in den Vordergrund. Die molekulare und biologische Charakterisierung neuer Marker soll

Informationen über Funktionen des Proteins im zellulären Kontext liefern. Darüberhinaus dient sie dem Verständnis derjenigen Mechanismen, welche die zellzyklusabhängige Expression des Proteins steuern. Im Idealfall ist ein bestimmter Zellzyklusmarker direkt als Ziel von therapeutischen Maßnahmen geeignet.

Bereits 1983 beschrieben Gerdes et al. einen monoklonalen Antikörper („Ki-67“), der ein humanes nukleäres Protein erkennt, welches in zwei Isoformen mit Molekulargewichten von 320 bzw. 360 kDa vorkommt. Das Besondere an diesem Protein ist, daß es ausschließlich in teilungsaktiven Zellen exprimiert wird, und zwar in den Phasen G1, S, G2 und M. Dagegen werden Zellen in der G0-Phase bei Immunfärbungen mit „Ki-67“ nicht angefärbt. Das nukleäre „Ki-67“-Antigen wurde inzwischen als ein DNA-bindendes Protein identifiziert (MacCallum und Hall, 2000). Mit „Ki-S5“, einem Antikörper aus unserem Institut, der spezifisch für ein Formalin-resistentes Epitop des „Ki-67“-Antigens ist, wurden an archivierten Gewebeproben medizinische Studien von hoher statistischer Signifikanz durchgeführt (Kreipe et al., 1993; Rudolph et al., 1995). Diese zeigten, daß das „Ki-67“-Antigen als Marker für die Quantifizierung der Zellproliferation gut geeignet ist. Mittlerweile sind Antikörper gegen das „Ki-67“-Antigen weltweit als Werkzeug für Zellzyklusuntersuchungen etabliert.

Ein neuerer monoklonaler Antikörper („Ki-S2“), der ebenfalls nur teilungsaktive Zellen von dem Übergang der G1- in die S-Phase bis zum Ende der Zytokinese anfärbt, wurde 1997 beschrieben (Heidebrecht et al., 1997). Die molekulare Charakterisierung des „Ki-S2“-Antigens offenbarte, daß es sich um ein noch nicht beschriebenes humanes Protein handelte. Aufgrund der eingeschränkten Detektierbarkeit wurde es „restrictedly expressed proliferation-associated protein 86“ (repp86) genannt. Repp86 ist ein nukleäres Protein, welches in immunfluoreszenzmikroskopischen Versuchen während der Mitose mit dem Spindelapparat und dem Spindelpol assoziiert ist.

## 1.2 Der Zellzyklus

Eukaryontische Zellen entstehen nicht *de novo*, sondern gehen in einem zyklischen Prozeß, der aus Wachstum und Teilung besteht, aus ihresgleichen hervor. Man kann dabei zwei Hauptphasen des Zellzyklus unterscheiden, die Interphase und die Mitose.

Während der Interphase teilt sich die Zelle nicht. Sie nimmt hier an Masse zu, übt die ihr zugeordneten biologischen Funktionen im Kontext des Organismus aus und repliziert ihre DNA. Die Interphase wird ihrerseits in vier Subphasen gegliedert, die G0-, die G1-, die S- und die G2-Phase. Während der G1-Phase (präsynthetische Phase, bezogen auf die DNA) erfolgt verstärkt die Neusynthese von Molekülen, die wichtig für Struktur und Stoffwechsel der Zelle sind (z. B. Proteine und Lipide). Die Zelle nimmt an Größe zu. Auf die G1-Phase folgt die S-Phase (synthetische Phase), welche hauptsächlich der Replikation



der genomischen Information gewidmet ist. Während der G<sub>2</sub>-Phase (postsynthetische Phase) nimmt die Zelle weiter an Masse zu und synthetisiert die für die Teilung notwendigen Komponenten. Aus der G<sub>1</sub>-Phase kann eine Zelle auch reversibel in einen Zustand übergehen, in dem sie keine Teilungsaktivität zeigt (G<sub>0</sub>-Phase). Dies ist z. B. der Fall, wenn eine Zelle innerhalb eines Gewebetyps ausdifferenziert ist.

Den Phasen G<sub>1</sub> (G<sub>0</sub>), S und G<sub>2</sub>, die als Interphase zusammengefaßt werden, stellt man die Teilungsphase (M-Phase, von Mitose) gegenüber. Während der M-Phase finden die Kernteilung (Mitose) und die Teilung des Zytoplasmas (Zytokinese) statt. Zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen befinden sich immer wieder Kontrollpunkte, an denen der jeweilige Status der Zelle abgefragt wird. Erst wenn die für den Kontrollpunkt spezifischen Kriterien erfüllt sind, wird der nächste Zellzyklusabschnitt eingeläutet (Hartwell und Weinert, 1989; Hartwell et al., 1994; Barinaga, 1995; Sherr, 1996; Elledge, 1996).

### **1.2.1 Die Mitose: Kernteilung somatischer Zellen**

Die Anzahl der Chromosomen und die Menge der DNA sind konstante Merkmale einer Spezies. Bei der Mitose, dem Kernteilungsmechanismus somatischer Zellen, erhalten die Tochterzellen exakt gleiche DNA-Sätze mit der gleichen genetischen Information. Wenn eine Zelle in die Mitose eintritt, findet eine Reihe verschiedener Prozesse statt.

In der Prophase der Mitose kondensiert das Chromatin zu lichtmikroskopisch sichtbaren Chromosomen. Die Synthese von RNA-Transkripten und Proteinen sowie der Vesikeltransport erreichen ein Minimum. Ein aus Mikrotubuli bestehender Spindelapparat beginnt sich auszubilden, während die zytoplasmatischen Interphase-Mikrotubuli mehr und mehr depolymerisieren. Als Organisationszentrum der Spindel dienen bei höheren Metazoen die Zentrosomen, welche je zwei Zentriolen enthalten. In der folgenden Prometaphase beginnt sich die Kernmembran aufzulösen. An den Zentromeren, die jeweils zwei zueinander gehörende Schwesterchromatiden eines Chromosoms zusammenhalten, bilden sich die Kinetochoren aus. Dies sind Strukturen, an denen die Mikrotubuli der mitotischen Spindel ansetzen. Nach der Anheftung sorgen die Kinetochormikrotubuli dafür, daß die Chromosomen in der Metaphase senkrecht zur Spindel in einer Ebene, der sog. Äquatorialebene angeordnet werden. Durch Teilung der Kinetochore und Verkürzung der Kinetochorfasern in der Anaphase wandern die nun vollständig voneinander getrennten Chromatiden zu entgegengesetzten Polen der Zelle. Die Spindelpole entfernen sich nach der Trennung der Schwesterchromatiden durch Abstoßung der Polfasern weiter voneinander. In der Telophase erreichen die Chromatiden die Pole. Während sich die Kinetochorfasern zunehmend durch Depolymerisation verkürzen, weichen die Pole durch Verlängerung der Polfasern noch weiter auseinander. Es bildet sich jetzt eine neue Kernhülle um die Chromosomen, bevor diese wieder zu Chromatin decondensieren. Die

Teilung des Zytoplasmas (Zytokinese) beginnt bereits in der späten Ana- oder Telophase. Hierbei schnürt ein aus Aktinfilamenten bestehender kontraktiler Ring in Wechselwirkung mit Myosin die Zelle senkrecht zu den Spindelfasern durch.

### **1.2.2 Der „Anaphase-promoting complex/cyclosome“ (APC/C) leitet das Ende der Mitose ein**

Wir wissen heute, daß die mikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen einer Zelle während der Mitose durch eine komplizierte Reaktionskaskade gesteuert werden, von der längst nicht alle Komponenten bekannt sind. Die Schlüsselkomponente, welche den Eintritt einer Zelle von der G2-Phase in die Mitose kontrolliert, ist der „Mitosis-promoting factor“ (MPF; frühere Bezeichnung „Maturation-promoting factor“; Huchon et al., 1981). Dies ist ein Protein-Heterodimer mit Kinaseaktivität, welches mindestens aus einer Untereinheit von Cyclin B und der cyclinabhängigen Kinase cdc2 besteht (Labbe et al., 1989). Für die Aktivität des MPF ist der Phosphorylierungsgrad der katalytischen cdc2-Untereinheit von entscheidender Bedeutung (Sorger und Murray, 1992). So wirkt z. B. eine Phosphorylierung des Tyrosinrests 15 (Y15) durch die Proteinkinase Wee1 hemmend auf die Aktivität des MPF (McGowan und Russell, 1993). Dagegen bewirkt die Hydrolyse der genannten Phosphatgruppe durch die Phosphatase cdc25 eine Aktivierung des MPF (Millar et al., 1992). Darüberhinaus wird die Aktivierung des MPF durch verschiedene Rückkoppelungsmechanismen gesteuert, die u. a. abhängig sind von der Zellgröße und der Vollendung der vorangegangenen DNA-Replikation (Dasso et al., 1992). Die Ziele der direkten Phosphorylierung durch den MPF sind vielseitig. Als Beispiele seien hier nukleäre Lamine, das Histonprotein H1 sowie Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) genannt (Doree et al., 1989; Dessev et al., 1991; Shiina et al., 1992).

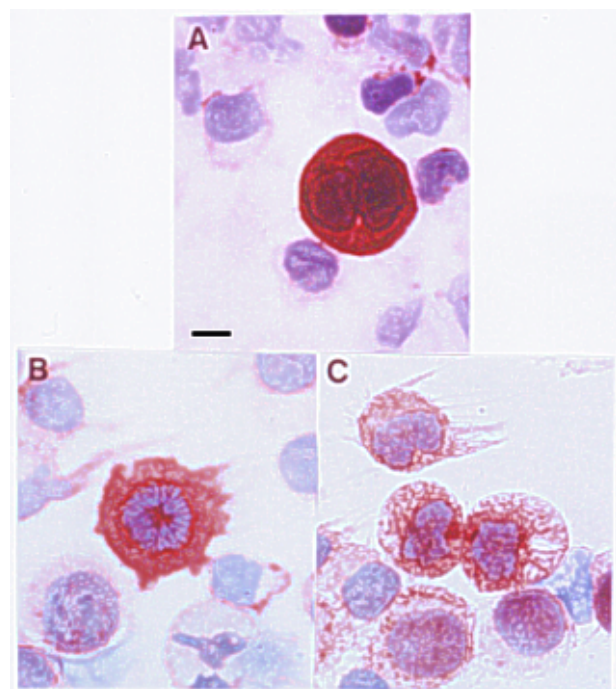
Auf der anderen Seite ist eine Inaktivierung von Mitose-induzierenden Faktoren notwendig, damit die Zelle die Mitose verlassen und zurück in die Interphase kehren kann. Als Werkzeug zur Inaktivierung dient hierbei u. a. der ubiquitinabhängige Abbau von Mitose-assoziierten Proteinen in 26S-Proteasomen, der während des Übergangs von der Metaphase zur Anaphase einsetzt. So führt beispielsweise die Degradation von Cyclin B zur vollständigen Inaktivierung des MPF (Hershko et al., 1994). Für die Anheftung der Polyubiquitin-Ketten, durch welche Proteine für die Proteolyse markiert werden, ist eine Ubiquitin-Proteinligase namens „Anaphase-promoting complex/cyclosome“ (APC/C) verantwortlich (Yu et al., 1996). Der APC/C ist ein Proteinkomplex, der beim Menschen aus mindestens elf Untereinheiten zusammengesetzt ist (Gieffers et al., 2001). Damit die Anaphase und der Austritt aus der Mitose nicht vorzeitig initiiert werden, bedarf es einer strikten Kontrolle der APC/C-Aktivierung. Diese erfolgt außer durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung u. a. durch Substrate, die der Cdc20/Fizzy-Familie angehören

(Fang et al., 1998; Kramer et al., 1998). Der APC/C bleibt vom Metaphase-Anaphase-Übergang bis zur S-Phase aktiv (Huang et al., 2001).

### 1.3 Etablierung des monoklonalen Antikörpers „Ki-Mit“: ein neuer Marker für Mitosen

Im Zuge der Suche nach neuen, für bestimmte Zellzyklusphasen spezifischen Markern wurde 1996 im *Institut für Hämatopathologie* ein neuer monoklonaler Antikörper (mAk) hergestellt. In der Immunzytochemie von mitogen stimulierten peripheren Blutzellen (Lympho- und Monozyten), färbte dieser Antikörper mitotische Zellen stark an (Abb. 1). Zellen, die sich in anderen Zellzyklusphasen befanden, wurden nur sehr schwach erkannt. Dieses Färbemuster konnte auch bei L428-Zellen, sowie bei nicht humanen Zellen oder Zelllinien, wie den Mauszelllinien Ag.8.653 und NiH-3T3, Ratten PBL- und AR42J-Zellen, wie auch bei der Hamsterzelllinie CHO beobachtet werden. Verglichen mit einer Färbung nach Pappenheim, welche alle Mitosephasen ausgenommen der Prophase erfaßt, ergab die Färbung von in der Mitose arretierten Zellen mit dem neuen Antikörper 10-25 % mehr positive Zellen. Dies deutet darauf hin, daß bereits in mitotischen Prophasezellen, die mit der weltweit angewendeten Färbung nach Pappenheim nicht erfaßt werden, eine Reaktion mit dem Antigen stattfindet.

**Abb. 1:** Immunfärbung von peripheren Blutzellen (Lympho- und Monozyten) mit dem monoklonalen IgM-Antikörper „Ki-Mit“ (APAAP-Methode). A: frisch präparierte Zellen; B und C: Zellen nach dreitägiger mitogener Stimulation. Mitotische Zellen werden stark angefärbt (A). In der Metaphase ist das Antigen stark im Zytoplasma der Zellen exprimiert (B). Ab dem Übergang von der Metaphase in die Anaphase nimmt die Reaktion von „Ki-Mit“ mit seinem Antigen signifikant ab (C). Zellen, die sich nicht in der Mitose befinden, werden von „Ki-Mit“ nur sehr schwach angefärbt (A, B, C). Der schwarze Strich in A entspricht 10 µm.

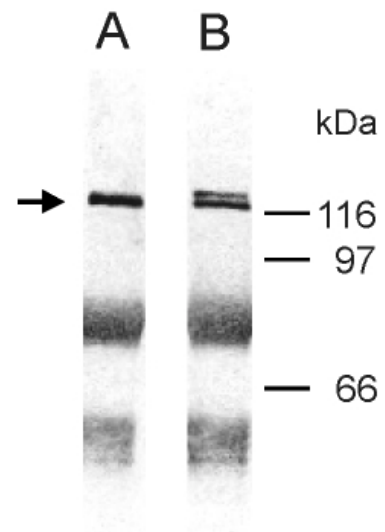


Aus den durchgeführten Immunfärbungen ließen sich auch erste Informationen zur zellulären Lokalisation des Antigens ableiten. Es zeigte sich, daß das Antigen in den Zellzyklusphasen G0, G1, S und G2 granulär im Zytoplasma der Zellen verteilt ist. Beim Eintritt in die Mitose nimmt die Antikörper-Antigen-Reaktion zu, wobei das Antigen jetzt diffus im gesamten Zytoplasma exprimiert wird.

Die Typisierung des Antikörpers ergab, daß es sich um ein Maus-Immunglobulin der Klasse IgM handelt. Wegen seiner mitotischen Reaktivität wurde der Antikörper „Ki-Mit“ genannt, was für „Kiel-Mitose“ steht.

„Ki-Mit“ erkennt in Immunpräzipitaten aus Zellen der humanen Hodgkin-Lymphom Zelllinie L428 ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa (Abb. 2). Werden die Zellen vor der Lysis mit dem Spindelgift Nocodazol in der Mitose arretiert, so erkennt „Ki-Mit“ ein zusätzliches Protein, das im SDS-Gel etwa 1-2 kDa über dem 120 kDa-Protein läuft.

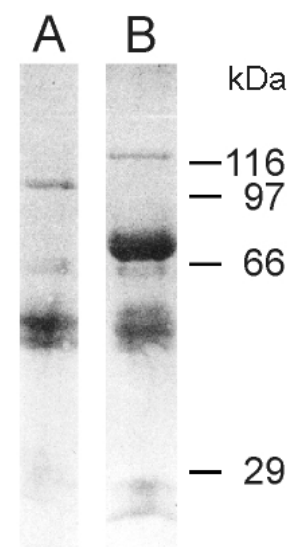
**Abb. 2:** Immunfärbung von „Ki-Mit“-Immunpräzipitaten aus unbehandelten L428-Zellen (A) und aus mit Nocodazol arretierten L428-Zellen (B) mit mAk „Ki-Mit“. Der Antikörper erkennt ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 120 kDa (markiert mit einem Pfeil). Als Folge der Arretierung der Zellen in der Mitose wird eine zweite Bande angefärbt, die etwa 1-2 kDa größer ist. Die restlichen Banden stellen die schwere und leichte Kette von „Ki-Mit“, sowie den für die Immunpräzipitation verwendeten anti-Maus Antikörper aus Kaninchen dar.



Auch in Zytoplasmalysat von L428-Zellen wurde nach Auftrennung im SDS-Gel und anschließendem Western Blot von „Ki-Mit“ ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa erkannt. Die Menge an angefärbtem 120 kDa-Protein nahm nach Behandlung der L428-Zellen mit Colcemid, welche einen Arrest in der Mitose bewirkt, signifikant zu. In L428-Kernlysate wurde darüber hinaus ein Protein von etwa 200 kDa Molekulargewicht detektiert. Dieses Protein konnte nach Ansequenzierung als „Non muscle myosin“ („Genbank“-Zugriffsnummer P35579) identifiziert werden. Da immunzytochemische Färbungen mit einem käuflich erhältlichen Antikörper (Biotrend, Köln, Deutschland), der spezifisch für „Non muscle myosin“ ist, aber ein vollkommen unterschiedliches Muster im Vergleich zu „Ki-Mit“ zeigten, handelt es sich hierbei lediglich um eine Koreaktivität von „Ki-Mit“ mit „Non muscle myosin“.

### 1.3.1 Immunaффinitätschromatographische Aufreinigung und Ansequenzierung des „Ki-Mit“-Antigens

Durch Aufreinigung und Ansequenzierung des „Ki-Mit“-Antigens sollte festgestellt werden, ob es sich bei dem Antigen um ein bisher unbekanntes oder ein bereits beschriebenes Protein handelt. Zu diesem Zweck wurde das Antigen aus Zytolysat der Zelllinie L428 mit „Ki-Mit“ immunpräzipitiert. Für die Proteinsequenzierung (s. 2.7.7) wurden ausschließlich Antigen-Präparationen verwendet, die in der Immunfärbung mit „Ki-Mit“ eine deutliche Bande bei 120 kDa zeigten (Abb. 3).



**Abb. 3:** Coomassie-Färbung einer Blotmembran mit Immunpräzipitat von „Ki-Mit“ (B) und dem monoklonalen Antikörper „Ki-S2“ (A; Negativkontrolle). Die Bande bei ca. 120 kDa (B) wurde ausgeschnitten und nach der Proteolyse mit Lys C ansequenziert. Die übrigen sichtbaren Banden sind Proteinfragmente (schwere und leichte Ketten) der für die Immunpräzipitation verwendeten Immunglobuline.

Da die Versuche einer N-terminalen Sequenzierung des 120 kDa „Ki-Mit“-Antigens fehlschlugen, wurde das Protein mit Lys C proteolytisch gespalten. Von insgesamt neun proteolytischen Fragmenten konnten durch Sequenzierung die Aminosäuresequenzen ermittelt werden (s. Tab. 1).

Peptid	Aminosäuresequenz	Peptid	Aminosäuresequenz
1	KAALADVLRRLAISEDHV	6	KVHLFQYP
2	KDVIINQEGEYI	7	KYSAHSSHVTNVSF
3	KIRIATGQIAGVD	8	KLSLPQNETVADT
4	KGVYQIS	9	KATLLEDQQDPS
5	KVIAVADDF		

**Tab. 1:** Aminosäuresequenzen der neun Peptide, die nach der proteolytischen Lys C-Spaltung des 120 kDa „Ki-Mit“-Antigens ansequenziert werden konnten.

Drei der ansequenzierten Peptide (3, 6, 7) zeigten nach Datenbank-Recherchen signifikante Homologien zu einem Mikrotubuli-assoziierten Protein der *Echinodermata*, dem „echinoderm microtubule-associated protein“ (EMAP) (Li and Suprenant, 1994) bzw. zu seinen humanen Homologen HuEMAP-1 und HuEMAP-2 (Eudy et al., 1997; Lepley et al., 1999). Die Analyse der übrigen Peptide ergab keine erkennbaren Sequenzverwandschaften zu anderen Proteinen.

## 1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Aufgrund der durch Proteinsequenzierung ermittelten Sequenzdaten des immunpräzipitierten 120 kDa „Ki-Mit“-Antigens war anzunehmen, daß es sich bei dem Antigen um ein neues, noch nicht beschriebenes Protein handelt. Für drei von neun sequenzierten Peptiden existierten zwar Homologien zu EMAP-ähnlichen Proteinen, für die übrigen sechs Peptide konnten in Proteindatenbanken aber weder identische noch homologe Sequenzen gefunden werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, das „Ki-Mit“-Antigen auf molekularer und zellbiologischer Ebene näher zu charakterisieren. Dazu sollte zunächst die vollständige mRNA-Sequenz des Antigens durch Klonierung und Sequenzierung der cDNA entschlüsselt werden. Vermutlich bedingt durch die IgM-Klasse von „Ki-Mit“ schlugen Versuche fehl, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte anzufärben. Deshalb war geplant, neue Immunglobuline der Klasse IgG gegen das „Ki-Mit“-Antigen herzustellen. Für diesen Zweck sollte rekombinantes Protein für die Immunisierung von Mäusen synthetisiert werden. Durch Einsatz der Technik der konfokalen „Laser scanning“-Mikroskopie sollten detaillierte Informationen über die subzelluläre Lokalisation des Proteins während der einzelnen Zellzyklusphasen gewonnen werden. Ferner sollten erste Charakterisierungen des „Ki-Mit“-Antigens auf Proteinebene vorgenommen werden. Dazu zählen zum Beispiel Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen und die Identifizierung möglicher Interaktionspartner.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Computerprogramme

Es werden Laborgeräte und Computersoftware der folgenden Hersteller verwendet:

Adobe Systems	Unterschleissheim, Deutschland
Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg, Deutschland
Appligene	Heidelberg, Deutschland
Bandelin	Berlin, Deutschland
Beckman Coulter	Unterschleissheim-Lohhof, Deutschland
Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Corel Corporation	Unterschleissheim, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
Kendro Laboratory Products	Hanau, Deutschland
Köttermann	Uetze/Hänigsen, Deutschland
Kontron Instruments	Eching, Deutschland
Leica	Bensheim, Deutschland
Microsoft	Unterschleissheim, Deutschland
MJ Research	Incline Village, U.S.A.
PE Applied Biosystems	Weiterstadt, Deutschland
Perkin Elmer	Wellesley, U.S.A.
Polaroid	Offenbach, Deutschland
Sartorius AG	Göttingen, Deutschland

verwendete Gerätetypen und Computerprogramme:

PCR-Thermocycler	Gene Amp <sup>®</sup> PCR System 9700, PE Applied Biosystems PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research
Sequenziergerät	ABI PRISM <sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems
Zentrifugen	Centrifuge 5402, Eppendorf Biofuge pico, Heraeus

	Varifuge K, Kendro Laboratory Products
	Centrifuge J2-21, Beckman Coulter
	TL100, Beckman Coulter
Photometer	Uvikon 860, Kontron Instruments
pH-Meter	Φ 72 pH Meter, Beckman Coulter
Fluoreszenzmikroskope	Leica TCS SP Spectral Confocal Microscope, Leica Zeiss LSM 510 Laser Scanning Microscope, Carl Zeiss
Ultraschallgerät	Sonopuls GM 70, Bandelin
Elektrophorese	Gene Power Supply GPS 200/400, Amersham Pharmacia Biotech
Blotkammer	Trans-Blot <sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories
Geldokumentation	Gel Doc, Bio-Rad Laboratories MP-3 Land, Polaroid
UV-Illuminator	TFL-20M, Appligene
Waagen	1264 MP, 1265 MP, 1801, Sartorius AG
Wasserbad	3041, Köttermann
Inkubatoren	Thermomixer comfort, Eppendorf GFL-3032, Gesellschaft für Labortechnik mbH
Computerprogramme	Quantity One, Bio-Rad Laboratories Sequencing Analysis, Perkin Elmer Corel DRAW 7, Corel Corporation Corel Photo-Paint 7, Corel Corporation Adobe Photoshop 5.0, Adobe Systems Zeiss LSM Image Browser, Carl Zeiss Word 97 und Excel 97, Microsoft

## 2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien, Kits und Medienbestandteile werden von folgenden Firmen bezogen:

Ambion	Huntingdon, Großbritannien
Amersham Biosciences	Freiburg, Deutschland
Applied Biosystems	Foster City, U.S.A.
BD Pharmingen	Erembodegem, Belgien
Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland



---

Clontech	Heidelberg, Deutschland
Cytoskeleton	Denver, U.S.A.
Dako Diagnostika GmbH	Hamburg, Deutschland
Dianova	Hamburg, Deutschland
Difco Laboratories GmbH	Augsburg, Deutschland
Eurogentec	Köln, Deutschland
Fluka	Buchs, Schweiz
Gibco BRL	Eggenstein, Deutschland
Hoechst AG	Deutschland
Invitrogen Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
MBI Fermentas GmbH	St.Leon-Rot, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Molecular Probes	Leiden, Niederlande
New England Biolabs	Frankfurt a. M., Deutschland
Novex	Frankfurt, Deutschland
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Perkin Elmer	Weiterstadt, Deutschland
Promega GmbH	Mannheim, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Riedel de Haën AG	Seelze, Deutschland
Roche	Ingelheim, Deutschland
Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Stratagene	Heidelberg, Deutschland
Upstate Biotechnology	Buckingham, Großbritannien

Alle Substanzen haben, sofern nicht anders angegeben, die Reinheitsgrade „p.a.“, „reinst.“ bzw. „für mikrobielle Medien“. Alle Lösungen werden in deionisiertem Wasser angesetzt und ggf. durch Autoklavieren oder Sterilfiltration sterilisiert.

## 2.3 Bakterienstämme und deren Kultur

### 2.3.1 Bakterienstämme

#### Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene):

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIq*  $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

#### Escherichia coli Top10F' (Invitrogen):

Genotyp: F' {*lacIq* Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ *lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1 deoR araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

#### Escherichia coli BL21-Gold (Stratagene; Stamm für die bakterielle Genexpression):

Genotyp: B F<sup>-</sup> *ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal endA Hte*

### 2.3.2 Verwendete Medien und Zusätze für Bakterienkulturen

#### Flüssigmedien

##### LB-Medium (Luria-Bertani broth):

Bacto-Trypton	10	g
Bacto-Hefeextrakt	5	g
NaCl	7	g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l; autoklavieren	

##### 2 x YT-Medium (pH=7,0):

Bacto-Trypton	16	g
Bacto-Hefeextrakt	10	g
NaCl	5	g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l; autoklavieren	

##### SOB-Medium:

Bacto-Trypton	20	g
Bacto-Hefeextrakt	5	g
NaCl	0,6	g
KCl	0,19	g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l; autoklavieren	

##### NZY-Medium (pH=7,0):

Bacto-Hefeextrakt	5	g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2	g
NZ Amin	10	g
NaCl	5	g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l; autoklavieren	

##### SOC-Medium:

SOB-Medium + 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 10 mM MgSO<sub>4</sub> + 20 mM Glukose (sterilfiltrierte Stammlösungen)

Antibiotikazusätze:

Folgende sterilfiltrierte Stammlösungen werden 1:1000 den Medien zugesetzt:

Ampicillin (Amp):	100 mg/ml
Kanamycin (Kan):	50 mg/ml

X-Gal Stammlösung (für „blue-white screening“):

40 mg/ml X-Gal gelöst in Dimethylformamid; Lagerung: dunkel, bei -20 °C

IPTG Stammlösung (für „blue-white screening“ und bakterielle Genexpression) :

100 mM Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalaktosid gelöst in H<sub>2</sub>O und sterilfiltriert; Lagerung bei -20 °C

Agarplatten

Zur Herstellung von Agarplatten werden 16 g Bacto-Agar in 1 l Medium eingewogen und autoklaviert.

## 2.4 Plasmide, DNA-Größenmarker, Oligonukleotide

### 2.4.1 Plasmide

pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen)

Dieser Vektor wird für die Routineklonierung von PCR-Produkten verwendet, die mit *Taq* DNA-Polymerase erzeugt werden. Amplifikate der *Taq*-Polymerase besitzen an den 3'-Enden von Plus- und Minusstrang unspezifische Adenin (A)-Überhänge, welche kompatibel zu Thymin (T)-Überhängen des Vektors pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> sind. Der Vektor enthält weiterhin einen *lac*-Promotor und das *lacZ $\alpha$* -Gen mit darin liegender TOPO-Cloning™ site. Ein in den Vektor kloniertes DNA-Fragment („Insert“) unterbricht folglich das *lacZ $\alpha$* -Gen. Nach der Transformation bilden deshalb Klone mit „Insert“ auf Agarplatten mit X-Gal und IPTG weiße Kolonien, Klone ohne „Insert“ hingegen blaue Kolonien. Dies ermöglicht eine Vorauswahl der potentiell positiven Bakterienklone („blue-white screening“).

pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen)

Dieser Vektor wird für die Produktklonierung von glatten („blunt end“) PCR-Produkten verwendet, die mit *Pfu* DNA-Polymerase erzeugt werden. Neben *lac*-Promotor und *lacZ $\alpha$* -

Gen enthält dieser Vektor ein für *Escherichia coli* (*E. coli*) lethales *ccdB* Gen (Bernard et al., 1994). Ein in den Vektor kloniertes DNA-Fragment unterbricht dieses Gen, so daß nach der Transformation in *E. coli* nur positive Klone in der Lage sind, Kolonien zu bilden.

#### pGEX-5X-1 (Amersham Pharmacia Biotech)

Der Vektor pGEX-5X-1 (Abb. 4) wird für die Expression von klonierten DNA-Fragmenten in *E. coli* eingesetzt. Der Vektor enthält einen *tac*-Promoter, der eine chemische Induktion der bakteriellen Genexpression durch IPTG ermöglicht, sowie eine für das Enzym Glutathion S-Transferase (GST) kodierende Sequenz, welche stromaufwärts der multiplen Klonierungsstelle liegt. Kloniert man die zu exprimierende DNA im passenden Leseraster in den Vektor, entsteht bei Expression in Bakterien ein Hybridprotein mit einer N-terminalen GST-Komponente, die eine Aufreinigung des Zielproteins aus Bakterienlysat ermöglicht.



**Abb. 4:** Vektorkarte und multiple Klonierungsstelle des Vektors pGEX-5X-1.

Sämtliche Klonierungen von DNA-Fragmenten in den Vektor pGEX-5X-1 erfolgen in dieser Arbeit über die *Bam* HI- und die *Sal* I-Schnittstellen unter Beachtung des vom Vektor vorgegebenen Leserasters.

## 2.4.2 DNA-Größenmarker

SmartLadder, SmartLadder Small Fragments (SF) (Eurogentec):

Neben der Größenbestimmung von DNA-Fragmenten ermöglichen die SmartLadder und SmartLadder SF eine Abschätzung von DNA-Mengen im Agarosegel. Werden 5 µl Marker pro Geltasche eingesetzt, so ergeben sich folgende DNA-Mengen pro Markerbande:

SmartLadder

bp	ng DNA / Bande	bp	ng DNA / Bande
10.000	100	2.000	20
8.000	80	1.500	15
6.000	60	1.000	100
5.000	50	800	80
4.000	40	600	60
3.000	30	400	40
2.500	25	200	20



SmartLadder SF

bp	ng DNA / Bande
1000	100
800	80
700	-
600	60
500	-
400	40
300	-
200	20
100	-



## 2.4.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide werden von der Firma Eurogentec synthetisiert und standardmäßig aufgereinigt.

Primer zur Amplifikation von EML4 bzw. EML4-Fragmenten für die Klonierung in den Vektor pGEX-5X-1 (s. 2.4.1)

Diese Primer enthalten für die spätere Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pGEX-5X-1 entweder eine *Bam* HI- oder eine *Sal* I-Erkennungssequenz.

Name	5'-3'-Sequenz
KiMitfulrGST	GCGCGGATCCGCAAGATGGACGGTTTCGCCG
KiMitBamHI	GCGCGGATCCCCGATGTTGACAACTATGATG
RoppCtermFor	GCGCGGATCCCAACTGGTGGAAAAGACATG
RoppNtermRev	GCGCGTTCGACGTCATCATAGTTGTCAACATCGG
KiMitSalI	GCGCGTTCGACTCATGTCTTTTCCACCAGTTG
KiMitfulrGST	GCGCGTTCGACGGAAAAGAGTTGCACTGAAGC

Primer für die gerichtete Mutagenese von EML4 (s. 2.6.16)

Name	5'-3'-Sequenz
R120MutY954F	GAGCCTCTTTTGAAGAGCCATG
R120MutY954R	CATGGCTCTTCAAAAAGAGGCTC
R120MutC958F	GAAGAGCCATCCAACGAGATAAG
R120MutC958R	CTTATCTCGTTGGATGGCTCTTC

Primer für die Identifizierung des 5'-Endes der mRNA (5'-RACE) von EML4 (s. 2.6.14)

Name	5'-3'-Sequenz
Universal Primer (Long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
Universal Primer (Short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC
Nested Universal Primer	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
KMNort5rev	CAATTGAGACAGCACTGGTATG
KMTest2rev	CAAGACGCCTCAAAACATCAGC
KMTest5rev	CTCGTTCTCTAGGTCGCCCG

Sonstige Primer

Name	5'-3'-Sequenz
KiMitTest0	GCCGCGGCTTACTACCCAG
KiMitTest1	GAACGGACGGACGACGGAGG
KiMitTest5	GGGCGACCTAGAGAACGAGC
KiMitTest4	CGATGATAGTATTTCTGCTGCAAG
KiMitTest2	GCTGATGTTTTGAGGCGTCTTG
KiMitTest3	ATCTGCTGCTAAAAGTGGTAC
KiMit2for	GATGTTGACAACTATGATGACATC
KiMit3for	AGGATTGCAACTGGACAGATAG
KiMit4for	GGACCTGGAGCGGCAATTCAC
KiMit5for	CTGAAACAGAAATAGAGGTTCTCTG
KiMit6for	TGGAATGGACCAGGCTGGTAG
KiMit7for	ATGTCTAACTCGGGAGACTATG
KiMit8for	GACAGTCACCTGATATCAACTG
KiMit9for	AGTGTCATCCAATCTAATACTC
KMNort3for	CAGCGGAGACCTTGGTGAG
KiMit10for	GGATGGGCAGTGATGGAGAATC
KiMit11for	CATCTACTGGCTCAGACTGTAC
KiMit12for	TGATGGATTCTCCAAGGAG
KiMit13for	AGTCTAATGTGGCTATCCTAC
KiMit14for	CTCCAGTGAACCTCCAAGGAC
KiMit15for	CTGACATGAACAGGCAGTTC

KMTest1rev	TCCGTCGTCCGTCCGTTCCG
KiMit3rev	CTATCTGTCCAGTTGCAATCCT
KiMit4rev	GTGAATTGCCGCTCCAGGTCC
KiMit5rev	CAGGAACCTCTATTTCTTTTCAG
KiMit6rev	CTACCAGCCTGGTCCATTCCA
KiMit7rev	CATAGTCTCCCGAGTTAGACAT
KiMit8rev	GATGCTCATGTCTTTTCCACCA
KiMit9revnew	GGAGTATTAGATTGGATGACAC
KMctermSeqRV	CTCACCAAGGTCTCCGCTG
KiMit10rev	GATTCTCCATCACTGCCATCC
KMNort3rev	CATCACACCACTTAGGTACAC
Ropp5500rev	GCCATGAGACAGGAATGCATG

## 2.5 Peptide, Antikörper und Molekulargewichtsmarker

### 2.5.1 Peptide

#### „Pepspot“-Membran mit dem C-Terminus von EML4 (AS 852-981)

Die „Pepspot“-Membran mit der carboxyterminalen EML4-Sequenz (Aminosäuren 852-981) für die Untersuchungen zur Lokalisation des „Ki-Mit“-Epitops (s. 3.5.2) wird von der Firma Jerini AG (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Membran enthält 25 immobilisierte und untereinander überlappende EML4-spezifische Peptide von jeweils 13 Aminosäuren Länge (s. Tab. 2). Die Überlappung der einzelnen Peptide beträgt jeweils acht Aminosäuren.

Peptid-Nr.	Aminosäuresequenz	Peptid-Nr.	Aminosäuresequenz
1	STGGKDMSIIQWK	14	ISSSPTLLENSLE
2	DMSIIQWKLVEKL	15	TLLENSLEQTVEP
3	QWKLVEKLSLPQN	16	SLEQTVEPSEDHS
4	EKLSLPQNETVAD	17	VEPSEDHSEEESE
5	PQNETVADTTLTK	18	DHSEEESEEGSGD
6	VADTTLTKAPVSS	19	ESEEGSGDLGEPL
7	LTKAPVSTESVI	20	SGDLGEPLYEPC
8	VSTESVIQSNTP	21	EPLYEPCNEISK
9	SVIQSNTPTPPPS	22	EPCNEISKEQAKA
10	NTPTPPPSQPLNE	23	ISKEQAKATLLED
11	PPSQPLNETAESEE	24	AKATLLEDQQDPS
12	LNETAESESRIS	25	TLLEDQQDPSPSS
13	EEESRISSTLL		

**Tab. 2:** Peptidnumerierung und zugehörige Aminosäuresequenzen der 25 verschiedenen EML4-spezifischen Peptide der „Pepspot“-Membran (Jerini AG, Berlin, Deutschland), welche den carboxyterminalen Proteinbereich von AS 852-981 abdecken.

## 2.5.2 Antikörper für Immunfärbungen, Immunpräzipitationen und Fluoreszenzmikroskopie

### Primärantikörper

- Ki-Mit; monoklonaler Maus-IgM-Antikörper (anti-EML4)
- 152; monoklonaler Maus-IgG<sub>1</sub>-Antikörper (anti-EML4)
- Ziege-anti-GST Antikörper, polyklonal (Amersham Pharmacia Biotech, #27-4577-01)
- PY99; monoklonaler Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosinreste (Santa Cruz Biotechnology)
- MPM-2; monoklonaler Antikörper gegen phosphorylierte Serin-Prolin- bzw. Threonin-Prolin-Motive (Upstate Biotechnology)

### Sekundärantikörper

- polyklonaler Ziege-anti-Maus IgM-Antikörper gekoppelt mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 (Molecular Probes, #A-21045); rote Fluoreszenz
- polyklonaler Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper (H+L) gekoppelt mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes, #A-11001 ); grüne Fluoreszenz
- polyklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper konjugiert mit FITC; grüne Fluoreszenz
- polyklonaler Kaninchen-anti-Maus IgM-Antikörper (Dianova)
- Peroxidase-konjugierter Kaninchen-anti-Ziege Antikörper, IgG (H+L) (Dianova, #305-035-003)

### Tertiärantikörper

- Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (polyklonal), konjugiert mit Peroxidase (Dianova)

## 2.5.3 Protein-Größenmarker für SDS-PAGE

### MultiMark<sup>®</sup> Multi-Colored Standard (Invitrogen)

Dieser vorgefärbte Marker enthält Proteinstandards der Größe 3-185 kDa (s. Tab. 3). Bei seiner elektrophoretischen Auftrennung ergeben sich unterschiedlich gefärbte Banden. Es werden 10-15 µl pro Geltasche aufgetragen. Die aufgeführten Molekulargewichte beziehen sich auf die Verwendung von NuPAGE<sup>®</sup> Bis-Tris (MES) Gelen (Invitrogen).



<b>Markerkomponente</b>	<b>Molekulargewicht in kDa</b>
Myosin	185
Phosphorylase B	98
Glutamin Dehydrogenase	52
Karbonische Anhydrase	31
Myoglobin	19
Myoglobin	17
Lysozym	11
Aprotinin	6
Insulin	3

**Tab. 3:** Molekulargewichte der einzelnen Komponenten des MultiMark® Multi-Colored Standard der Firma Invitrogen.

#### High M. W. Standard Mixture, 30-200 kDa (Sigma)

Dieser Proteinmarker deckt einen Molekulargewichtsbereich von etwa 30-200 kDa ab. Er enthält sechs unterschiedliche Proteine mit Molekulargewichten von 205, 116, 97, 66, 45 und 29 Kilodalton. Da der Marker nicht vorgefärbt ist, muß er im Anschluß an seine Auftrennung in der SDS-PAGE angefärbt werden (z. B. mit Coomassie-Färbelösung).

## **2.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **2.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die natürlicherweise in Bakterien vorkommen. Sie dienen dort dem Abbau von Fremd-DNA, welche sie an enzymespezifischen Sequenzabschnitten spalten. Diese Eigenschaft der Restriktionsenzyme macht man sich in der Gentechnik u. a. bei der Restriktionsanalyse und der Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide zunutze.

Es werden Restriktionsendonukleasen der Firmen New England Biolabs, Promega oder Roche mit den jeweils empfohlenen 10 x Puffern verwendet.

Es folgen Beispiele für typische Restriktionsansätze.

Kontrollrestriktion von Plasmid-Miniprep DNA (10 µl-Ansatz):

DNA (0,2 µg)	x	µl
10 x Restriktionspuffer	1	µl
Restriktionsenzym (20 units/µl)	0,4	µl
H <sub>2</sub> O	(8,6-x)	µl

Restriktion von Plasmid-DNA für Ligationen (100 µl-Ansatz):

DNA (5 µg)	x	µl
10 x Restriktionspuffer	10	µl
Restriktionsenzym (20 units/µl)	1,5	µl
H <sub>2</sub> O	(88,5-x)	µl

Die Inkubation erfolgt bei der für die jeweiligen Enzyme optimalen Reaktionstemperatur für mindestens 2 h. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch Phenolisieren, durch fünfminütiges Erhitzen auf 65 °C oder durch Gel- bzw. Säulenaufreinigung des Ansatzes.

**2.6.2 Alkalische Dephosphorylierung von Plasmid-DNA**

Durch die alkalische Dephosphorylierung von Plasmid-DNA, welche zuvor mit Restriktionsendonukleasen gespalten wurde, wird eine Religation verhindert. Das Enzym Alkalische Phosphatase spaltet die Phosphatgruppen an den 5'-Enden des linearisierten Plasmids ab. Ein erneuter Ringschluß kann erst dann erfolgen, wenn die fehlenden Phosphatgruppen beispielsweise durch ein DNA-„Insert“ zur Verfügung gestellt werden.

Verwendete Puffer und Lösungen:10 x Dephosphorylierungspuffer:

Tris-HCl; pH=8,5	500 mM
EDTA	1 mM

In einem Endvolumen von 60-120 µl werden folgende Komponenten eingesetzt:

DNA-Lösung	
10 x Dephosphorylierungspuffer	1/10 Volumen
Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)	1 Unit
H <sub>2</sub> O	

Der Ansatz wird zunächst für 30 min bei 37 °C inkubiert, dann wird eine weitere Unit Alkalische Phosphatase hinzugegeben und nochmals wie oben inkubiert.

### 2.6.3 Phenolisieren von DNA

Zur Entfernung von Proteinen (z. B. von alkalischer Phosphatase) wird die DNA enthaltende Lösung mit dem gleichen Volumen Roti<sup>®</sup>-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1) (Carl Roth) versetzt, gründlich durchmischt und für 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Es entsteht eine untere Phenolphase, welche die denaturierten Proteine enthält, und eine obere wäßrige Phase mit der gelösten DNA. Letztere Phase wird abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Azetat (pH=5,2) und 2 Volumen Ethanol gefällt. Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 13.000 x g wird die DNA pelletiert und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wird das DNA-Pellet in einem geeigneten Puffer gelöst (z. B. TE).

### 2.6.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Gemischen und die Größenbestimmung von DNA-Molekülen. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Moleküle relativ zu ihrer Größe von der Gelmatrix unterschiedlich stark abgebremst werden. Durch Verwendung von Ethidiumbromid, welches in die DNA-Doppelhelix interkaliert, wird die DNA unter Einstrahlung von UV-Licht sichtbar.

#### Verwendete Puffer und Lösungen:

Als Gel- und Laufpuffer werden entweder 1 x TAE oder 1 x TBE eingesetzt.

#### 10 x TAE-Puffer (pH=8,3):

Tris-Azetat	400	mM
EDTA	10	mM

#### 10 x TBE-Puffer (pH=8,0):

Tris-Base	1	M
Borsäure	0,9	M
EDTA	10	mM

5 x DNA-Probenpuffer:

30 % (w/v) Ficoll	20	ml
500 mM EDTA, pH=8	4	ml
20 % (w/v) SDS	1	ml
50 x Tris-Acetat, pH=7,5	0,8	ml
0,5 % (w/v) Xylenblau	2	ml
0,5 % (w/v) Bromphenolblau	2	ml
H <sub>2</sub> O	ad 40	ml

Durchführung:

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente variiert die Agarosekonzentration zwischen 0,7 und 1,5 %. Die Agarose wird in 1 x TAE oder 1 x TBE gelöst und im Mikrowellenherd aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wird Ethidiumbromid zugegeben (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) und die Agaroselösung in einen Elektrophoreseschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen. Das erkaltete Gel wird in eine mit Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gelegt. Nach Entfernen des Kamms werden die Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Kleine Gele (6,5 cm x 10 cm) laufen bei maximal 100 V, große (11 cm x 14 cm) bei maximal 130 V.

**2.6.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die gewünschte Bande wird nach der Elektrophorese unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraktion Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dazu wird das Gelstück zunächst mit 3 Volumen eines chaotropen Puffers (QG) unter Schütteln im Thermoinkubator bei 50 °C aufgelöst. Die DNA wird anschliessend an eine Silicalgel-Matrix gebunden. Nach dem Waschen mit einem ethanolhaltigen Puffer wird die DNA mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH=8,5 eluiert.

**2.6.6 Ligation von DNA mit T4 DNA-Ligase**

Sowohl Vektor als auch DNA-„Insert“ werden mit Restriktionsendonukleasen so gespalten, daß kompatible kohäsive Enden entstehen („sticky ends“). Mit Hilfe eines Agarosegels kann eine Abschätzung der für die Ligation einzusetzenden Mengen an Vektor-DNA und „Insert“ vorgenommen werden. Das „Insert“ wird dem dephosphorylierten Vektor in etwa sechsfachem molaren Überschuß zugegeben und in einem Volumen von 15 µl mit 1,5 µl 10 x Ligationpuffer und 1 „Unit“ T4 DNA-Ligase

vermischt. Der Ligationsansatz wird bei 4 °C über Nacht inkubiert und direkt für die Transformation in *E. coli* verwendet.

### **2.6.7 Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli***

#### Transformation von *E. coli* Top10F'

Die chemisch kompetenten *E. coli* werden auf Eis aufgetaut und in ein für die Transformation geeignetes Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe der Plasmid-DNA erfolgt die Inkubation auf Eis für etwa 30 min. Danach wird der Transformationsansatz für 30 s im Wasserbad auf 42 °C erwärmt („Hitzeschock“) und anschließend 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl raumtemperiertem SOC-Medium werden die transformierten Bakterien 1 h bei 37 °C im Thermomixer geschüttelt und anschließend auf LB-Agarplatten mit Antibiotikumzusatz ausgestrichen.

#### Transformation von *E. coli* XL1-Blue und BL21-Gold

Die Transformation erfolgt wie oben beschrieben mit folgenden Ausnahmen:

- die Transformation von XL1-Blue Zellen erfordert die Zugabe von 25 mM β-Mercaptoethanol
- die Dauer des Hitzeschocks beträgt 45 s (XL1-Blue) bzw. 20 s (BL21-Gold)
- die Zellen werden nach der Transformation in 900 µl SOC-Medium aufgenommen (bei BL21-Gold auf 42 °C vorgewärmt).

### **2.6.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli***

#### Plasmid-Minipräparation

Die Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgt mit Hilfe des *E.Z.N.A.*<sup>®</sup> *Plasmid Miniprep Kit II* (Pierce & Warriner) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim et al., 1979). Die Bakterien werden in 2-15 ml Flüssigmedium über Nacht angezogen, kurz pelletiert und durch Zugabe von Lysispuffer aufgeschlossen. Nach der Neutralisierung des alkalischen Lysats wird der Ansatz durch Pelletieren des bakteriellen Debris geklärt und das klare Lysat auf eine Silikamatrix-Säule geladen. Die Plasmid-DNA bindet an die Matrix und wird nach dem Waschen mit einem ethanolhaltigen Puffer mit Wasser oder TE-Puffer eluiert.

## Plasmid-Maxipräparation

Auch dieses Verfahren der Plasmid-Isolierung aus Bakterien beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, jedoch erzielt man hier wesentlich größere Ausbeuten und einen größeren Reinheitsgrad der DNA, verglichen mit der Minipräparation. Für Plasmid-Maxipräparationen wird das *QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers.

### **2.6.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen**

Die Bestimmung der Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen erfolgt photometrisch (Uvikon 860, Kontron). Für die Messung werden 5 µl DNA-Lsg. bzw. 4 µl RNA-Lsg. mit H<sub>2</sub>O auf 500 µl Endvolumen verdünnt. Die Extinktion der Proben wird bei 260, 280 und 340 nm Wellenlänge gegen reines Wasser gemessen. Über eine interne Software wird die Konzentration der Ausgangslösung unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe in ng/µl berechnet.

### **2.6.10 Sequenzierung von DNA**

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wird eine modifizierte Methode nach Sanger et al. (1977) angewendet. Dabei handelt es sich um eine sog. „Cycle-Sequencing“-Reaktion (Carothers et al., 1989) unter Verwendung des *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (PE Applied Biosystems). Das Kit enthält einen Reaktionspuffer („Premix“), in welchem sich *Taq* DNA-Polymerase, dNTP-Mix und ddNTP-Mix befinden. Die Sequenzierreaktion läuft ähnlich einer PCR ab, es wird allerdings jeweils nur ein Primer verwendet. Zusätzlich zu den in einem gewöhnlichen PCR-Ansatz vorhandenen Deoxynukleotiden (dNTPs) werden bei einer Sequenzierung in geringerer Menge zusätzlich Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt. Diesen Nukleotiden fehlt die 3'-OH-Gruppe, weshalb sie bei ihrem zufälligen Einbau durch die DNA-Polymerase in die neusynthetisierte DNA als Terminatoren fungieren und einen Kettenabbruch verursachen. Jedes der vier Didesoxynukleotide ist mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Alle Fragmente, die durch das gleiche ddNTP gestoppt werden, tragen demnach den gleichen Farbstoff am 3'-Ende. Durch Kapillarelektrophorese im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) werden die markierten DNA-Fragmente anschliessend aufgetrennt, wobei sich aufeinanderfolgende DNA-Fragmente in ihrer Länge jeweils nur um ein Nukleotid unterscheiden. Ein Laser regt die Farbstoffe der ddNTPs am Ende der Trennkapillare zur Fluoreszenz an, welche von einer CCD-Kamera registriert

wird und an einen angeschlossenen Computer zur Auswertung weitergeleitet wird. Durch Kombination von Größen- und Farbinformation der DNA-Fragmente läßt sich die Templatesequenz eindeutig bestimmen.

Je Sequenzierreaktion werden 0,6-1,2 µg Plasmid-DNA bzw. 20-500 ng PCR-Produkt eingesetzt. Ein Ansatz à 20 µl hat die folgende Zusammensetzung:

Premix	4	µl
Primer (5 pmol/µl)	1,5	µl
DNA	x	µl
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 20	µl

Zur Erzeugung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Fragmente wird folgender Zyklus 25-30 durchlaufen:

Denaturierung:	96 °C	10	s
Annealing:	50 °C	5	s
Elongation	60 °C	4	min

Die Sequenzieransätze werden zwecks Entfernung überschüssiger Primer, nicht eingebauter dNTPs und ddNTPs mit dem *DyeEx Spin Kit* der Firma Qiagen laut Herstellerangaben aufgereinigt.

### 2.6.11 Isolierung von „Messenger RNA“ (mRNA)

Die Isolierung von mRNA aus eukaryontischen Zelllinien erfolgt mit Hilfe des *Poly(A)Pure™ Kit* der Firma Ambion nach den Richtlinien des Herstellers. Das Prinzip der Isolierung basiert darauf, daß mRNA-Moleküle an ihrem 3'-Ende eine Abfolge mehrerer Adenin-Reste (Poly(A)-Ende) besitzen. Über diese Adenin-Reste kann die Bindung an synthetische Oligo(dt)-Ketten erfolgen, die wiederum an eine Zellulose-Matrix gekoppelt sind. Nach der Bindung werden vorhandene DNA-, Total-RNA- und Proteinverunreinigungen durch mehrmaliges Waschen mit verschiedenen Waschpuffern entfernt, bevor die Elution der mRNA-Moleküle erfolgt. Es folgt eine Ethanol-fällung der mRNA bei -20 °C über Nacht. Danach wird die mRNA durch Zentrifugation pelletiert, gewaschen und getrocknet und danach in nukleasefreiem H<sub>2</sub>O/0,1 mM EDTA oder RNA Storage Solution (Ambion) gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgt bei -80 °C.

### 2.6.12 Synthese von cDNA

Die Synthese von einzelsträngiger cDNA aus mRNA erfolgt gemäß Okayama und Berg (1982) mit Hilfe eines Kits der Firma Amersham Pharmacia Biotech (*First Strand cDNA Synthesis Kit*). Neben dem Reaktionspuffer, welcher das Enzym Reverse Transkriptase enthält, beinhaltet das Kit zwei verschiedene Primer. Der Primer pd(N)<sub>6</sub> ist nicht von definierter Sequenz, sondern besteht aus einer zufälligen Abfolge von sechs Nukleotiden. Die Anlagerung an die RNA erfolgt statistisch. Der Primer *Not* I-d(T)<sub>18</sub> hingegen bindet mit seinem Oligo(dT)-Ende an die Poly(A)-Enden der mRNA Moleküle. Pro Ansatz wird jeweils nur einer der beiden Primer verwendet. Für die Synthesereaktion werden 20-150 ng mRNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl gebracht, für 10 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Folgender Ansatz (33 µl) wird dann 1 h bei 37 °C inkubiert:

Bulk First Strand Reaktionsmix	11 µl
Primer pd(N) <sub>6</sub> bzw. <i>Not</i> I-d(T) <sub>18</sub> (je 0,2 µg)	1 µl
DTT-Lösung	1 µl
denaturierte RNA	20 µl

Die Ansätze können nach fünfminütiger Inkubation bei 90 °C, während der RNA-cDNA Duplexe denaturieren und die Reverse Transkriptase inaktiviert wird, direkt als Template für PCR-Experimente eingesetzt werden. Alternativ erfolgt die Lagerung bei -20 °C. Die Integrität der cDNA wird durch PCR-Amplifikation eines konservierten Haushaltsgens (G3PDH) überprüft.

### 2.6.13 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, nach dem englischen „polymerase chain reaction“) (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986) besteht aus einem mehrfach wiederholten Zyklus aus DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung („Annealing“) und Elongation zweier Oligonukleotide, von denen eines am 5'-Ende, das andere am 3'-Ende eines ausgesuchten DNA-Abschnitts hybridisiert. Der von den Primern eingerahmte DNA-Abschnitt der Template-DNA wird während der PCR logarithmisch amplifiziert. Als Template-DNA können u. a. Plasmide, genomische DNA und cDNA eingesetzt werden.

Die Automatisierung der PCR wurde erst durch die Entdeckung hitzestabiler DNA-Polymerasen wie z. B. der *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* möglich. Kommt es bei einer PCR auf eine fehlerfreie Vervielfältigung der Template-DNA an, so ist die *Pfu* DNA-Polymerase der *Taq*-Polymerase vorzuziehen, da



diese aufgrund ihrer 3'-Exonukleaseaktivität („proofreading“-Aktivität) eine deutlich höhere Lesegenauigkeit hat.

#### Durchführung:

Nach einer initialen Denaturierung der Template-DNA bei 94 °C für 2 min werden 25-35 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung:	30-60 s	94 °C
Annealing:	30-45 s	50-62 °C
Elongation:	≈ 1 min/1000 bp	72 °C ( <i>Taq</i> -Polymerase)
	bzw. ≈ 2 min/1000 bp	72 °C ( <i>Pfu</i> -Polymerase)

Die Dauer des Elongationsschrittes richtet sich sowohl nach der Länge des zu erwartenden Amplikons als auch nach der verwendeten DNA-Polymerase.

Ist ein hoher Reinheitsgrad der PCR-Produkte erforderlich, werden diese mit Hilfe des *StrataPrep PCR Purification Kit* (Stratagene) laut Herstellerangaben oder durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion (s. 2.6.5) aufgereinigt. Zwecks besserer Handhabung und der Möglichkeit der Vermehrung in Bakterien, können PCR-Fragmente direkt nach ihrer Amplifikation auch in TOPO<sup>®</sup>-Vektoren (pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup>, pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>; Invitrogen) produktkloniert werden (s. 2.4.1).

#### **2.6.14 Identifikation der Enden einer mRNA durch „RACE“**

Die „rapid amplification of cDNA ends“ (RACE) ist eine Methode zur Bestimmung des 5'- bzw. 3'-Endes einer mRNA. In der vorliegenden Arbeit wird ein 5'-RACE Experiment durchgeführt, für welches das *SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit* der Firma Clontech verwendet wird. Das Prinzip des Kits beruht darauf, daß bestimmte Reverse Transkriptasen bei der cDNA-Synthese in einem Template-unabhängigen Vorgang 3-5 Nukleotide (überwiegend dC) an das 3'-Ende des cDNA-Erststrangs anhängen. Ein im Kit enthaltener Primer, das sog. SMART II Oligo, besitzt an seinem 3'-Ende eine dG-Sequenz, die mit dem dC-reichen Ende des cDNA-Erststrangs hybridisieren kann. Nach der Hybridisierung entsteht ein erweitertes Template, das am 5'-Ende die Sequenz des SMART II Oligos besitzt. Diese bekannte Sequenz ermöglicht im weiteren Verlauf die Anheftung sog. Universal Primer (Universal Primer, Nested Universal Primer), welche ebenfalls im Kit enthalten sind. Durch Kombination der Universal Primer mit Primern, die spezifisch für die zu amplifizierende cDNA sind, kann das 5'-Ende durch PCR amplifiziert und anschließend kloniert und sequenziert werden. Die Durchführung des Experiments erfolgt nach den Vorgaben des Herstellers.

### 2.6.15 Bakterielle Genexpression

Für verschiedene Versuche ist in dieser Arbeit die Herstellung rekombinanter Proteine erforderlich. Hierfür wird ein bakterielles Expressionssystem der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet (*GST Gene Fusion System*). Das zu exprimierende DNA-Fragment wird in einen speziellen Expressionsvektor (pGEX-5X-1; s. 2.4.1) kloniert, der stromaufwärts der multiplen Klonierungsstelle eine für das Enzym Glutathion S-Transferase (GST) kodierende Sequenz besitzt. GST ist ein 26 kDa-Protein, das zwar natürlicherweise im Eukaryonten *Schistosoma japonicum* vorkommt, welches jedoch auch bei Expression in *E. coli* seine volle enzymatische Aktivität behält. Nach der Klonierung der zu exprimierenden DNA in den Vektor und Transformation des Konstrukts in *E. coli* wird in den Bakterien ein Fusionsprotein exprimiert, welches sich aus dem Zielprotein und einer N-terminalen GST-Komponente zusammensetzt. Der enzymatische GST-Anteil ermöglicht aufgrund seiner starken Affinität für das Substrat Glutathion eine affinitätschromatische Aufreinigung des Zielproteins aus Bakterienlysat. Hierzu werden die Fusionsproteine an Glutathion Sepharose 4B Säulen gebunden und nach mehreren Waschschritten mit freiem Glutathion eluiert. Für die bakterielle Genexpression wird ein Derivat des *E. coli* Stamms BL21 (BL21-Gold; s. 2.3.1) verwendet. Dieser Stamm ist defizient für die bakteriellen Proteasen Lon und OmpT, welche rekombinantes Protein degradieren könnten.

#### Durchführung:

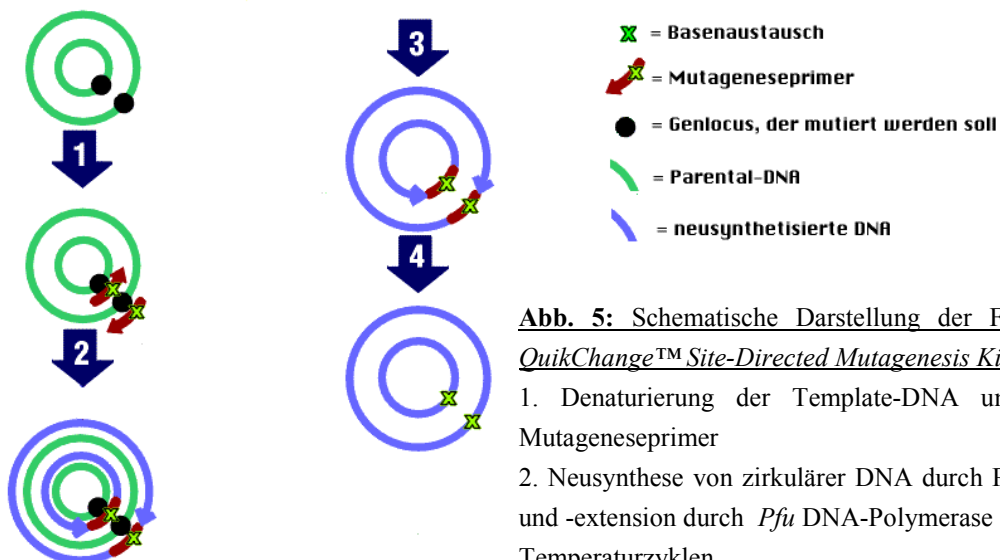
Zur Herstellung einer Starterkultur werden 2,5 ml LBamp Flüssigmedium mit einer transformierten Einzelkolonie von *E. coli* BL21-Gold inokuliert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Übernachtskultur wird in 250 ml vorgewärmtes (37 °C) 2 x YT Medium mit Ampicillin gegeben und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 herangezogen. Durch Zugabe von 1 mM IPTG erfolgt die Induktion der Genexpression für 4 h bis über Nacht bei 30-37 °C im Schüttelinkubator. Anschließend werden die Bakterien durch fünfzehnminütige Zentrifugation bei 7.500 x g pelletiert und in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Der Baktiensuspension wird nun ein Proteaseinhibitor (Complete™ Protease-Inhibitoren-Cocktail; Roche) und ggf. 1 % SDS und/oder Lysozym zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgt durch Behandlung mit Ultraschall (Sonopuls GM 70, Bandelin) auf Eis. Das Bakteriendebris wird durch Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 x g für mind. 30 min sedimentiert, bevor der klare Überstand auf eine equilibrierte Glutathion Sepharose 4B Säule gegeben wird. Nach mehrmaligem Waschen mit kaltem PBS erfolgt die Ablösung der gebundenen Fusionsproteine mit Elutionspuffer, welcher reduziertes

Glutathion enthält. Die Kontrolle der bakteriellen Genexpression erfolgt in der SDS-PAGE und im Western Blot.

### 2.6.16 Gerichtete Mutagenese von DNA-Molekülen

Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese lassen sich definierte Punktmutationen in Proteine einführen. Die eigentliche Mutagenesereaktion erfolgt dabei aber auf Ebene der cDNA des entsprechenden Proteins. Es werden Oligonukleotide eingesetzt, die in Bezug auf die für den Wildtyp spezifische cDNA ein oder mehrere Basenaustausche aufweisen. Dadurch werden ausgesuchte Kodons gezielt so verändert, daß sie bei ihrer Translation für definierte, nicht wildtypische Aminosäuren kodieren. Die Synthese von mutiertem Protein erfolgt durch den Einsatz der mutierten cDNA in einem geeigneten Expressionssystem.

Für die gerichtete Mutagenese wird in dieser Arbeit das *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene verwendet (Abb. 5). Als Template für die Mutagenese wird hierbei zirkuläre Plasmid-DNA (isoliert aus Bakterien) eingesetzt. Nach Hybridisierung der Mutageneseprimer und Extension durch *Pfu* DNA-Polymerase wird die nichtmutierte Parental-DNA durch Spaltung mit dem Enzym *Dpn* I entfernt. *Dpn* I schneidet spezifisch nur methylierte und hemimethylierte DNA, die durch *Dam*-Methylierung in nahezu allen *E. coli* Stämmen entsteht. Die neusynthetisierte DNA, welche die Nukleotidaustausche trägt, ist dagegen unmethyliert und somit vor *Dpn* I-Spaltung geschützt.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Funktionsweise des *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits*:

1. Denaturierung der Template-DNA und Annealing der Mutageneseprimer
2. Neusynthese von zirkulärer DNA durch Primerinkorporation und -extension durch *Pfu* DNA-Polymerase während definierter Temperaturzyklen
3. spezifischer Verdau der parentalen DNA durch das Enzym *Dpn* I und Hybridisierung der neusynthetisierten, mutierten DNA-Stränge
4. Transformation in *E. coli*

Die Durchführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers. Nach der Transformation der Mutageneseansätze in *E. coli* XL1-Blue werden mehrere Einzelkolonien vermehrt und die Plasmide via Plasmid-Minipräparation isoliert. Zur Verifizierung der Mutagenesereaktion wird eine DNA-Sequenzierung durchgeführt. Positive Plasmide, welche die gewünschten Nukleotidaustausche aufweisen, werden für die bakterielle Expression in *E. coli* BL21-Gold transformiert.

### 2.6.17 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) humaner Metaphasechromosomen erfolgt in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. R. Siebert vom *Institut für Humangenetik* der Universitätsklinik Kiel. Das Experiment wird nach Schlegelberger et al. (1999) durchgeführt.

## 2.7 Biochemische Arbeitsmethoden

### 2.7.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE (nach Laemmli et al., 1970) werden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. SDS ist ein stark negativ geladenes Detergenz, welches an Proteine adsorbiert. Diese werden dadurch so stark negativ geladen, daß ihre ursprüngliche Ladung bei der Auftrennung im Gel nicht mehr ins Gewicht fällt. Die Proteine bewegen sich durch die negative Ladung im elektrischen Feld zur Anode, wobei kleinere Proteine schneller durch die Poren der Polyacrylamid-Matrix wandern als große.

#### Herstellung des Polyacrylamidgels

Das Polyacrylamidgel wird zwischen zwei 8,5 x 7 cm große Glasplatten gegossen, hat eine Stärke von 1 mm und besteht aus Sammel- und Trenngel. Im Sammelgel findet zunächst eine Vorfokussierung der Proteine statt, wodurch der Probeneinlauf in das Trenngel synchronisiert wird. Die eigentliche Proteinauftrennung nach Größe erfolgt erst im Trenngel.

Trenngel (10 %):

H <sub>2</sub> O	2,4	ml
1,5 M Tris-HCl, pH=8,8	1,5	ml
Acrylamid/Bis-Stammlösung	2	ml

10 % (w/v) SDS-Lösung	60	ml
TEMED	8	µl
25 % (w/v) APS	8	µl

Das Trenngel wird sofort nach Zugabe der APS-Lösung gegossen, mit ca. 1 ml Wasser überschichtet, wodurch eine gleichmäßige Polymerisation an der Grenzfläche gewährleistet wird, und härtet bei RT in etwa 30 min aus. Dann wird das Wasser wieder entfernt und die Sammelgellösung ebenfalls unmittelbar nach Zugabe von APS auf das Trenngel gegossen und für mindestens 2 h polymerisieren gelassen.

Sammelgel:

H <sub>2</sub> O	1	ml
0,5 M Tris-HCl, pH=6,8	0,4	ml
Acrylamid/Bis-Stammlösung	0,3	ml
10 % (w/v) SDS-Lösung	16,7	ml
TEMED	3,3	µl
25 % (w/v) APS	5	µl

#### Verwendete Puffer und Lösungen:

SDS-Laufpuffer:

Tris-Base	3	g
Glycin	14,4	g
SDS	1	g
H <sub>2</sub> O	ad 1	l

6 x SDS-Probenpuffer:

Tris-HCl (pH=6,8)	0,35	M
SDS	10,28	% (w/v)
Glycerin	36	% (v/v)
β-Mercaptoethanol	5	%
Bromphenolblau	0,012	% (w/v)

Alternativ werden kommerziell erhältliche NuPAGE<sup>®</sup> Bis-Tris (MES) 4-12 % Gradientengele (1 mm, 10 „well“) der Firma Invitrogen verwendet.

#### Durchführung der Gelelektrophorese:

Alle Proben werden kurz vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und in die Geltaschen geladen. Das Gel läuft zunächst bei einer konstanten

Spannung von maximal 120 V (Sammelgel), dann bei einer konstanten Spannung von maximal 160 V (Trenngel).

### 2.7.2 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Färbelösung

Coomassie-Färbelösung:

Coomassie-Blau R250	1,8 g
Ethanol	150 ml
Essigsäure	60 ml
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

Nicht gelöstes Coomassie-Blau wird durch Filtration entfernt.

Coomassie-Entfärber:

Ethanol	300 ml
Essigsäure	120 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

Das Proteingel wird für etwa 30 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt, dann in Coomassie-Entfärber solange wieder entfärbt (ggf. Lösung wechseln), bis die blauen Proteinbanden sich deutlich kontrastiert vom Hintergrund abheben. Zur Dokumentation werden die Gele mit der *Gel Doc*-Anlage (Bio-Rad) fotografiert.

### 2.7.3 Western Blot

Für Immunfärbungen mit spezifischen Antikörpern werden Proteine nach der Auftrennung in der SDS-PAGE durch „Western blotting“ auf eine Nitrozellulose-Membran (*Protran Nitrocellulose Transfermembran*; Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) übertragen.

Equilibrierungs- und Transferpuffer:

Glycin	14,4 g
Tris-Base	3 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

Die Blotkassette mit der Nitrozellulose-Membran und dem SDS-Gel wird nach Herstellerprotokoll luftblasenfrei zusammengesetzt. Der Proteintransfer erfolgt im

elektrischen Feld in einer *Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) bei 250 mA und 6 W bei 4 °C über Nacht.

#### 2.7.4 Immunfärbung von Western Blots

##### Verwendete Puffer und Lösungen:

TBS (Tris-gepufferte Saline):

Tris-HCl, pH=7,6	20 mM
NaCl	137 mM

TBS-T: TBS + 0,1 % (v/v) Tween-20

Absättigungspuffer: 3-5 % BSA in TBS-T

Herstellung der Entwicklerlösung (diese Lösung muß stets frisch angesetzt werden):

60 mg 4-Chloro-1-Naphtol werden in 20 ml eiskaltem Methanol gelöst. Es werden 100 ml TBS und 60 µl Perhydrol mit 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) zugegeben.

##### Durchführung:

Nach einmaligem Waschen der Membran mit TBS-T wird sie zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen auf der Trägeroberfläche für mind. 2 h in Absättigungspuffer geschwenkt. Danach erfolgt die einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher spezifisch für das Zielprotein ist. Überschüssiger Antikörper wird durch dreimaliges Waschen à 10 min mit TBS-T entfernt. Es folgt eine Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem, Spezies-spezifischem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität können auch drei Antikörper verwendet werden. In diesem Fall ist erst der Tertiärantikörper mit dem Reporterenzym Peroxidase gekoppelt. Nach dreimaligem Waschen erfolgt die Detektion der Immunkomplexe durch Umsetzung des Peroxidasesubstrats 4-Chloro-1-naphtol in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 2.7.5 Herstellung monoklonaler Antikörper durch Immunisierung mit bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen bakteriell exprimierte und aufgereinigte GST-Fusionsproteine wird das Eluat, welches die Fusionsproteine enthält (s. 2.6.15), direkt

für die Immunisierung von BALB/C-Mäusen verwendet. Dies geschieht durch viermalige intraperitoneale Injektion im Abstand von jeweils 10 Tagen gefolgt von sog. „Booster“-Injektionen. Nach Präparation der Milz werden die Splenozyten mit P<sub>3</sub>x63-Ag.8653 Maus-Myelomzellen fusioniert. Hybridomaklone werden in RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS kultiviert und subkloniert. Das Testen der Kulturüberstände auf Reaktivität mit dem Antigen erfolgt im ELISA und im Western Blot.

### 2.7.6 Immunpräzipitation von Proteinen

In dieser Arbeit werden Immunpräzipitationen mit den monoklonalen Antikörpern „Ki-Mit“ und „152“ durchgeführt (s. 2.5.2). Für die Immunpräzipitation wird zunächst ein zytoplasmatisches Lysat von  $5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen hergestellt (s. 2.8.3). Alle weiteren Schritte werden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Nach intensivem Waschen mit eiskaltem PBS werden die Zellen mit 2 % Triton X-100, 1 mM EDTA und Complete™ Protease-Inhibitoren-Cocktail (Roche) in PBS (pH=7,4) für fünf Minuten lysiert. Das Lysat wird für 10 min bei  $15.000 \times g$  zentrifugiert bevor der Überstand für die Immunpräzipitation eingesetzt wird. Die Bindung der Antikörper erfolgt an Protein A-Sepharose CL-4B Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) an die im Fall von „Ki-Mit“ zusätzlich ein Kaninchen-anti-Maus IgM-Antikörper gekoppelt ist. Für Immunpräzipitationen mit mAk „152“ ist die Säulenmatrix mit einem Kaninchen-anti-Maus IgG-Antikörper konjugiert. Nach einstündiger Inkubation werden die Immunpräzipitate mehrere Male mit geringkonzentrierter Salzlösung (PBS, 0,4 % Triton X-100) und später mit höher konzentrierter Salzlösung (PBS, 0,5 M NaCl, 0,4 % Triton X-100) gewaschen. Danach werden die Immunpräzipitate in Auftragspuffer für 5 min aufgekocht, bevor sie in der SDS-PAGE aufgetrennt werden.

### 2.7.7 Proteinsequenzierung

Proteinsequenzierungen erfolgen in Zusammenarbeit mit Dr. F. Buck vom *Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie* am Universitätskrankenhaus Eppendorf (UKE) in Hamburg.

Es wird zunächst eine Immunpräzipitation des zu sequenzierenden Proteins aus zytoplasmatischem Lysat von  $1 \times 10^9$  L428-Zellen durchgeführt (s. 2.7.6). Nach der Auftrennung im SDS-Gel werden die Immunpräzipitate durch „Western blotting“ auf eine PVDF-Membran (*Immobilion P*; Millipore, Eschborn, Deutschland) transferiert, wo sie mit Coomassie Brilliantblau R250 angefärbt werden. Nach der Entfärbung mit 50 % Methanol werden die zu sequenzierenden Banden ausgeschnitten und für die Sequenzierung



aufbereitet. Hierzu werden die Proteine zunächst mit Lys C gespalten und die proteolytischen Fragmente anschließend durch HPLC (130 A, Applied Biosystems) mit einer Vydac C4-Säule (300 A Porengröße, 5 mm Partikelgröße, 2,1 x 250 mm) aufgetrennt. Die Peptide werden bei einer Flußrate von 200 ml/min mit einem linearen Gradienten eluiert. Die Peptid enthaltenden Fraktionen werden bei 210 nm Wellenlänge detektiert, in silikonisierten Eppendorfgläsern gesammelt und sofort eingefroren. Die Peptidsequenzen werden durch Edmann-Abbau mit Hilfe eines 473 A-Sequencers (Applied Biosystems) bestimmt.

## **2.7.8 Nachweis postrationaler Modifikationen von Proteinen**

### 2.7.8.1 Untersuchungen zur Phosphorylierung von Proteinen

Immunpräzipitate der zu testenden Proteine werden, wie unter Punkt 2.7.6 beschrieben, aus unbehandelten bzw. aus mit Nocodazol arretierten L428-Zellen hergestellt. Die Immunpräzipitate werden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Zum Nachweis der Phosphorylierung werden die Blotmembranen mit zwei verschiedenen Primärantikörpern immungefärbt, die spezifisch für bestimmte Phosphoepitope sind. Der Antikörper „MPM-2“ (Upstate Biotechnology) erkennt phosphorylierte Serin-Prolin- und Threonin-Prolin-Motive (Westendorf et al., 1994). Dagegen ist der Antikörper „PY99“ (Santa Cruz Biotechnology) spezifisch gegen phosphorylierte Tyrosinreste gerichtet. Der Nachweis von gebundenen Primärantikörpern erfolgt wie unter Punkt 2.7.4 beschrieben.

### 2.7.8.2 Untersuchungen zur Glykosylierung von Proteinen

Immunpräzipitate der zu testenden Proteine werden wie unter Punkt 2.7.6 beschrieben aus unbehandelten bzw. aus mit Nocodazol arretierten L428-Zellen hergestellt. Die Präzipitate werden in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch „Western blotting“ auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Glykosylierung (sowohl N- als auch O-gekoppelt) von Proteinen wird anschließend durch Färbung der Blotmembran mit dem *Pro-Q Emerald 300 Glycoprotein Blot Stain Kit* (Molecular Probes) entsprechend der Vorschrift des Herstellers nachgewiesen. Die Auswertung erfolgt unter UV-Licht mit Hilfe der *Gel Doc*-Anlage der Firma Bio-Rad.

### 2.7.9 „Spin-Down Assay“ für Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs)

Das *Microtubule Associated protein (MAP) Spin-Down Assay Kit* (Cytoskeleton, Denver, U.S.A.) bietet eine Methode, mit der *in vitro* überprüft werden kann, ob ein gegebenes Protein in der Lage ist, an Mikrotubuli zu binden. Die Funktionsweise des Kits basiert darauf, daß zunächst, ausgehend von hochreinem Tubulinprotein, Mikrotubuli in einem speziellen Puffer *in vitro* polymerisiert und anschließend durch Zugabe von Taxol stabilisiert werden. Im folgenden wird das zu testende Protein zugegeben und für kurze Zeit mit den Mikrotubuli inkubiert. Etwaige Komplexe aus Mikrotubuli und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen werden durch Ultrazentrifugation durch eine Pufferschicht bei 100.000 x g sedimentiert. Das Pellet wird anschließend unter denaturierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt und durch „Western blotting“ auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Nachweis von kosedimentiertem Testprotein erfolgt durch Immunfärbung der Blotmembran mit einem geeigneten Antikörper. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben.

### 2.7.10 ELISA

In einem ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) können Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper untersucht werden. Zu diesem Zweck wird das Antigen auf einem Träger (ELISA-Platte) immobilisiert. Bindet ein Antikörper an das immobilisierte Antigen, kann dies mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten, Spezies-spezifischen Zweitantikörpers nachgewiesen werden. Das Enzym Peroxidase dehydriert dabei ein Farbreagenz unter Reduktion von  $H_2O_2$  zu einem kolorimetrisch nachweisbaren Farbstoff (farblos => gelb).

#### verwendete Puffer und Lösungen:

10 x PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Saline) (pH=7,4):

$KH_2PO_4$	0,01 M
$Na_2HPO_4$	0,1 M
NaCl	1,37 M
KCl	0,027 M

Entwicklerlösung:

0,1 M Zitronensäure	6,25 ml
0,2 M $Na_2HPO_4$	6,25 ml

H <sub>2</sub> O	12,5	ml
30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	µl
O-Phenylendiamin	10	mg

Durchführung:

Es werden Maxisorp™ Immunoplaten der Firma Nunc (Wiesbaden, Deutschland) verwendet. Das zu koppelnde Antigen wird in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. (pH=9,6) verdünnt. Von dieser Lösung werden je Loch 50 µl eingesetzt und die Platte über Nacht bei 4 °C inkubiert („coaten“). Danach wird die Platte dreimal mit PBS (200 µl/Loch) gewaschen. Abgesättigt wird mit je 200 µl PBS + FCS (PBS + 10% (v/v) fötales Kälberserum) für 1 h bei RT. Anschließend werden je 50 µl des ersten Antikörpers (wenn erforderlich verdünnt in PBS + FCS; immer Doppelbestimmungen) aufgegeben. Die Platte wird erneut für 1 h bei RT inkubiert. Es wird dreimal mit PBS gewaschen, 50 µl des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers (1:1000 in PBS + FCS) werden eingefüllt und erneut für 1 h bei RT inkubiert. Abschließend wird die Platte fünfmal mit PBS gewaschen, bevor die Entwicklung erfolgt.

Entwicklung:

Es werden 200 µl frische Entwicklerlösung pro Loch eingesetzt. Bei positiver Reaktion wird die zunächst farblose Lösung allmählich gelb. Die Reaktion wird nach maximal 10 min durch Zugabe von 50 µl einer 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lsg. pro Loch abgestoppt. Die Quantifizierung der Färbungsintensität erfolgt durch Messung bei 492 nm Wellenlänge.

**2.8 Gewebekultur****2.8.1 Eukaryontische Zelllinien und deren Kultur**

Es werden folgende eukaryontische Zelllinien verwendet:

**L428**

DSM Nummer:	ACC 197
Herkunft:	<i>Homo sapiens</i>
Gewebe:	Hodgkin-Lymphom
Medium:	RPMI-1640 mit 10 % FCS

## HeLa

DSM Nummer:	ACC 57
Herkunft:	<i>Homo sapiens</i>
Gewebe:	Cervix-Karzinom
Medium:	RPMI-1640 mit 10 % FCS

### Verwendete Medien und Puffer:

- RPMI-1640 Medium (Gibco BRL) mit Zusatz von 10 % FCS, sterilfiltriert
- Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco BRL), steril
- PBS (s. 2.7.10), sterilfiltriert

### Standardkultur

Die Zellen werden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> in Gewebekulturflaschen (Nunc) in entsprechendem Medium kultiviert. Alle 2-4 Tage müssen die Zellen passagiert werden. Hierzu werden adhärente Zellen (z. B. HeLa) mit PBS gewaschen, einmal mit steriler Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL) gespült und anschließend mit ca. 5 ml der Lösung für 1-2 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit Medium werden die Zellen durch Spülen mit einer Pipette abgelöst, verdünnt in neue Gewebekulturflaschen umgesetzt und mit frischem Medium aufgefüllt. Zellen in Suspensionskulturen (z. B. L428) werden durch Zentrifugation (5 min bei 2.500 x g) pelletiert und mit PBS gewaschen. Nach der Resuspension in frischem Medium werden die Zellen verdünnt in neue Gewebekulturflaschen umgesetzt und mit frischem Medium versorgt.

### Kultur auf Deckgläsern

Neben oben erwähnter Standardkulturmethode können adhärente Zellen zwecks späterer mikroskopischer Betrachtung auch direkt auf Deckgläsern kultiviert werden. Dazu wird eine „24-well“-Platte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit sterilen Deckgläsern bestückt und die Zellen werden in geeigneter Verdünnung in je 1 ml Medium pro Vertiefung ausgesät.

### 2.8.2 Präparation peripherer Blutlymphozyten und -monozyten

Neben Experimenten mit etablierten Zelllinien werden in dieser Arbeit auch Versuche mit frisch isolierten Blutzellen durchgeführt. Hierzu werden Lymphozyten und Monozyten aus der peripheren Blutbahn des Menschen präpariert. Die Blutpräparate stammen aus der Blutspendenzentrale des Universitätsklinikums Kiel.

#### Durchführung (nach Boyum, 1968):

In ein 50 ml Falcon-Röhrchen werden 25 ml Ficoll (Dichte: 1,077 g/ml) gegeben und mit Blut (1:2 mit PBS verdünnt) auf 50 ml aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation für 35 min bei 850 x g (ohne Bremse) bildet sich eine dünne weiße Trennschicht, welche die Lympho- und Monozyten enthält. Diese wird nun vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und anschließend mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min bei 400 x g) wird der Überstand verworfen und das Pellet für die Bestimmung der Zellzahl in ca. 20 ml PBS aufgenommen. Die Zellen werden erneut mit PBS gewaschen und danach mit RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Anschließend erfolgt eine dreitägige mitogene Stimulation durch Zugabe von 10 µl Phythämagglutinin (PHA) pro Milliliter Zellkulturvolumen.

### 2.8.3 Herstellung von Zytospin-Präparaten

Für immunologische Färbungen nicht adhärenter Zellen und für die Immunfluoreszenzmikroskopie ist die Herstellung sogenannter Zytospin-Präparate erforderlich. Hierzu werden etwa  $1 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 1 ml durch Zentrifugation geerntet und nach Verwerfen des Überstandes in 1 ml einer zehnpromzentigen BSA-Lsg. (in PBS) aufgenommen. Bei 110 x g werden die Zellen anschliessend für 5 min auf einen Objektträger zentifugiert. Die Präparate werden für mind. 2 h bei Raumtemperatur getrocknet bevor sie mit Azeton bzw. mit 2 % Paraformaldehyd-Lsg. und Azeton fixiert werden.

### 2.8.4 Zellsynchronisation und mitogene Stimulation

Für verschiedene Versuche dieser Arbeit werden Zellen benötigt, die sich in der Mitose befinden. Da dies normalerweise nur auf einen geringen Prozentsatz von Zellen einer Zellpopulation zutrifft, ist eine Anreicherung mitotischer Zellen durch Zugabe bestimmter Chemikalien erforderlich. Eine Möglichkeit der Anreicherung ist der Arrest von Zellen in

der Mitose durch Zugabe von Nocodazol oder Colcemid zum Zellkulturmedium. Beides sind Spindelgifte, welche die Ausbildung des mitotischen Spindelapparats unterdrücken und auf diese Weise die Trennung der Metaphasechromosomen verhindern. Dies führt zum Arrest der Zellen in der Metaphase der Mitose.

Es werden folgende Konzentrationen eingesetzt:

Nocodazol:	1 µg/ml
Colcemid:	0,15 µg/ml

Die Einwirkzeit von Nocodazol bzw. Colcemid beträgt 16-18 h.

Neben dem mitotischen Arrest besteht die Möglichkeit, den Anteil an mitotischen Zellen durch Zugabe mitogener Stimulanzen wie z. B. Phythämagglutinin (PHA) zu erhöhen. Die Stimulation mit PHA erfolgt bei einer Konzentration von 10 µl PHA pro ml Kultur für drei Tage.

### 2.8.5 Herstellung von Zytoplasmalysat

Lysispuffer (in PBS):

Triton X-100	2 %
EDTA	1 mM
Complete Protease	
Inhibitor Cocktail (Roche)	1- fach

Für die Herstellung von zytoplasmatischem Lysat aus eukaryontischen Zellen werden mind. 1 bis  $2 \times 10^7$  Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und danach durch Zentrifugation pelletiert. Der Zellaufschluss erfolgt durch Zugabe von 100 µl Lysispuffer und anschließende fünfminütige Inkubation auf Eis. Nach Entfernung des Zelldebris durch Zentrifugation (1 min bei 13.000 x g) wird der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wird sofort für die entsprechenden Experimente weiterverwendet.

### 2.8.6 Behandlung von L428-Zellen mit Lambda Protein-Phosphatase

Es werden Zytospin-Präparate der L428-Zellen hergestellt (s. 2.8.3), welche wie für die Immunfluoreszenzmikroskopie beschrieben fixiert werden (s. 2.9.2). Es folgt eine 30-

minütige Inkubation mit 400 „units“ pro ml Lambda Protein-Phosphatase ( $\lambda$ -PPase; New England Biolabs) bei 37 °C. Nach dem Waschen der Präparate mit PBS erfolgt die Inkubation mit spezifischen Antikörpern sowie die Färbung der DNA wie unter Punkt 2.9.2 beschrieben.

## 2.9 Immunfärbung eukaryontischer Zellen

### 2.9.1 Immunzytochemie

Für die intrazelluläre Anfärbung von Proteinen werden in dieser Arbeit immunzytochemische und immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die immunzytochemischen Färbungen werden entweder an L428-Zellen oder an mitogen stimulierten peripheren Blutzellen (Lymphozyten und Monozyten; s. 2.8.2) durchgeführt. Hierzu werden Zytospin-Präparate (s. 2.8.3) der Zellen hergestellt, welche für 10 min bei Raumtemperatur mit Azeton fixiert werden. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper und anschließendem Waschen werden vorhandene Immunkomplexe mit Hilfe der APAAP-Methode (APAAP = alkalische Phosphatase/anti-alkalische Phosphatase; Cordell et al., 1984) nachgewiesen. Die Gegenfärbung der Präparate erfolgt durch kurze Behandlung mit „Mayers Hämatoxylin“ (alle Reagenzien von Dianova).

### 2.9.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die konfokale „Laser scanning“-Mikroskopie, welche mit L428- oder HeLa-Zellen durchgeführt wird, erfolgt die Fixierung des Zytoskeletts anders als bei der Immunzytochemie in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Zunächst werden die Zellen für 10 min mit einer 2 % Paraformaldehyd/PBS-Lsg. behandelt, anschließend für die gleiche Dauer mit Azeton. Nach der Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Primärantikörpern und anschließendem Waschen mit PBS, werden die Objektträger mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörpern (s. 2.5.2) inkubiert und danach erneut mit PBS gewaschen. Zwecks Markierung von DNA erfolgt nun ein Inkubationsschritt mit 2  $\mu$ M TOTO-3 (Molecular Probes, Eugene, USA), einem Fluoreszenzfarbstoff, welcher in die Doppelhelix der DNA interkaliert. Nachdem überschüssiges TOTO-3 durch Waschen mit PBS entfernt wurde, erfolgt das Einbetten der Zellen mit DABCO-Einbettmedium (Sigma). Die mikroskopische Betrachtung der Präparate wird an einem *Zeiss LSM 510 laser scanning microscope* (Carl Zeiss)

vorgenommen. Fotos in dieser Arbeit, welche Doppel-Immunfluoreszenzen zeigen, stellen eine Ebene von 0,5  $\mu\text{m}$  Dicke durch das Zentrum der abgebildeten Zellen dar.



### 3. Ergebnisse

Im Zuge der Suche nach neuen, für bestimmte Zellzyklusphasen spezifischen Markern wurde im *Institut für Hämatopathologie* der monoklonale IgM-Antikörper „Ki-Mit“ hergestellt. Hervorgegangen aus Immunisierungen einer Maus mit Kernlysat der humanen Hodgkin-Lymphom Zelllinie L428, färbte der Antikörper in immunologischen Färbungen mitotische Zellen stark an (Abb. 1). Im Gegensatz dazu wurden Zellen in den Zellzyklusphasen G0, G1, S und G2 nur sehr schwach angefärbt. Anhand von Daten aus Immunfärbungen wurde das Molekulargewicht des „Ki-Mit“-Antigens bestimmt. Es beträgt ca. 120 kDa (Abb. 2). Das Antigen wurde im folgenden mit „Ki-Mit“ immunpräzipitiert, proteolytisch gespalten und ansequenziert. Dabei offenbarte sich, daß nur ein geringer Teil der ermittelten Sequenzdaten Homologien zu bereits beschriebenen Proteinen aus der EMAP-Familie aufwies. Die Sequenzen der übrigen sequenzierten Peptide waren dagegen noch nicht in Proteindatenbanken hinterlegt. Demnach handelte es sich bei dem 120 kDa „Ki-Mit“-Antigen mit großer Wahrscheinlichkeit um ein noch nicht charakterisiertes humanes Protein. Mittlerweile wurde das „Ki-Mit“-Antigen vom „Human Genome Nomenclature Committee“ offiziell als EML4 deklariert. Obwohl diese Benennung erst gegen Ende dieser Arbeit im Jahr 2002 erfolgte, wird aus Gründen der Übersichtlichkeit der Name EML4 für das „Ki-Mit“-Antigen in dieser Arbeit von Anfang an übernommen. Nähere Erläuterungen zur Nomenklatur des „Ki-Mit“-Antigens sind unter Punkt 3.2.3 zu finden.

#### 3.1 Untersuchung der subzellulären Lokalisation des „Ki-Mit“-Antigens EML4

##### 3.1.1 Immunfluoreszenzmikroskopie mit „Ki-Mit“

Die immunzytochemischen Färbungen verschiedener Zellen und Zelllinien mit „Ki-Mit“ hatten erste Anhaltspunkte bezüglich der Lokalisation des Antigens EML4 geliefert. Sie hatten gezeigt, daß EML4 in Interphasezellen punktförmig im Zytoplasma verteilt ist. Beim Eintritt der Zellen in die Mitose war zu beobachten, daß die Anfärbung durch „Ki-Mit“ signifikant zunahm, wobei EML4 stark im gesamten Zytoplasma der Zellen dargestellt wurde. Mit dem Beginn des Übergangs von der Metaphase zur Anaphase kam es zu einer raschen Abnahme der „Ki-Mit“-EML4-Reaktion.

Um detailliertere Informationen über die subzelluläre Verteilung des Antigens in der Zelle im Hinblick auf die verschiedenen Zellzyklus- bzw. Mitosephasen zu gewinnen, wurde in

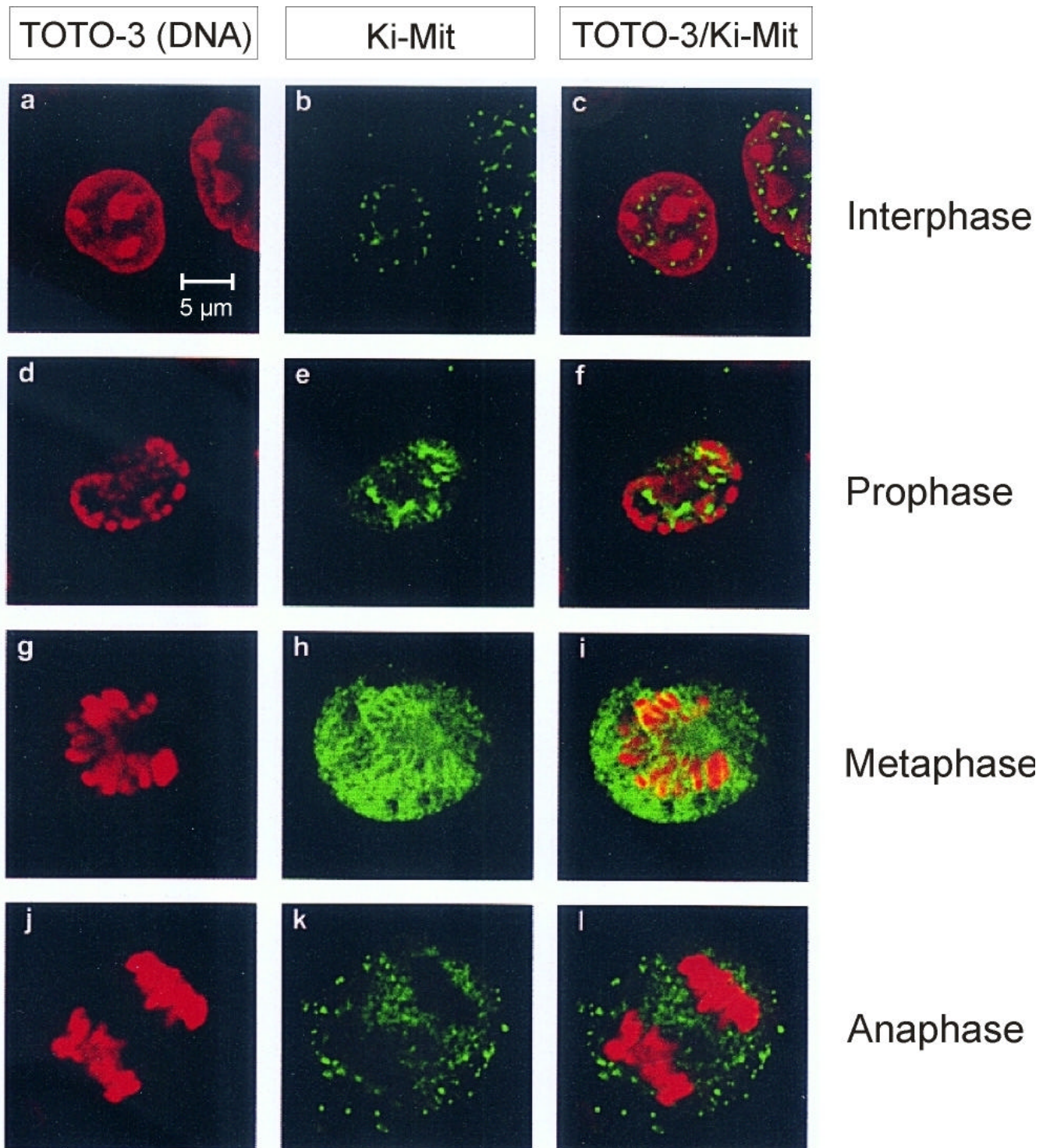
der vorliegenden Arbeit die Technik der konfokalen „Laser scanning“-Mikroskopie eingesetzt. Abbildung 6 zeigt eine Doppelfärbung von HeLa Zellen, die sich in verschiedenen Zellzyklusphasen befinden, mit „Ki-Mit“ und dem die DNA anfärbenden Fluoreszenzfarbstoff TOTO-3. Es wird bestätigt, daß in Interphasezellen EML4 in einem punktförmigen Muster im gesamten Zytoplasma der Zelle verteilt ist (Abb. 6 a/b/c). Beim Eintritt der Zellen in die Mitose nimmt die zytoplasmatische Detektion von EML4 zu. Ferner ist zu erkennen, daß das Protein mit den kondensierenden Chromosomen kolokalisiert (Abb. 6 d/e/f). In der Metaphase erreicht die Anfärbung von EML4 ihr Maximum. EML4 ist jetzt in der gesamten Zelle verteilt sowie zusätzlich signifikant mit den Chromosomen assoziiert (Abb. 6 g/h/i). Während der Anaphase kommt es rasch zu einer signifikanten Abnahme der Immunreaktion (Abb. 6 j-l). EML4 tritt jetzt in granulären, relativ scharf begrenzten Strukturen auf. Bei sämtlichen durchgeführten Färbungen mit „Ki-Mit“ war zu keinem Zeitpunkt eine Assoziation von EML4 mit der mitotischen Spindel zu erkennen. Bei Doppelfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper „Ki-S2“, welcher ein spindel- und zentrosomassoziiertes Protein (repp86) erkennt, waren z. T. leichte Kolokalisationen mit „Ki-Mit“ am Zentrosom zu beobachten.

## 3.2 Ermittlung der mRNA-Sequenz von EML4

Um die mRNA-Sequenz von EML4 vollständig zu entschlüsseln, sollte die EML4-cDNA („copy-DNA“) durch PCR amplifiziert und anschließend kloniert und sequenziert werden. Die experimentelle Strategie bestand darin, mit Hilfe der Aminosäuresequenzdaten aus der Peptidsequenzierung degenerierte Primer zu konstruieren, die dann in PCR-Experimenten mit einer cDNA-Bibliothek der Zelllinie L428 eingesetzt werden sollten. Sequenzdaten von zwei der sequenzierten Peptide (KDVIINQEGEYI, KLSLPQNETVADT) wurden für die Konstruktion der degenerierten Oligonukleotide zugrundegelegt. Diese wurden in Zusammenarbeit mit Dr. F. Buck am *Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie* des Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE) in Hamburg synthetisiert. Die Primersequenzen wurden dabei vom Syntheseautomaten so berechnet, daß sie alle möglichen Kodons für beide relativen Orientierungen der Peptide zueinander abdeckten.

### 3.2.1 Amplifikation und Sequenzierung der EML4-cDNA

Für jede PCR wurde als Negativkontrolle ein Ansatz mit jeweils nur einem degenerierten Primer verwendet. Eine der Primerkombinationen führte zur Amplifikation eines DNA-Fragments von etwa 2 Kilobasen Länge, welches zur weiteren Untersuchung in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) kloniert wurde. Die DNA-Sequenzierung des Fragments



**Abb. 6:** Subzelluläre Lokalisation von EML4 in HeLa- Zellen im Verlauf des Zellzyklus, dargestellt durch konfokale "Laser scanning"-Mikroskopie. Die Immunfärbung erfolgte mit "Ki-Mit" und einem FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus Antikörper (grüne Fluoreszenz; b/e/h/k). Die DNA-Färbung erfolgte mit TOTO-3 (rote Fluoreszenz; a/d/g/j). Doppelfluoreszenzen sind in c/f/i/l dargestellt.

ergab, daß die exakte Länge des Amplikons 1982 Basenpaare (bp) betrug. In der Sequenz enthalten war ein offener Leserahmen („open reading frame“; orf), in welchem drei zusätzliche Peptidsequenzen aus der Ansequenzierung von EML4 identifiziert werden konnten.

Eine Datenbanksuche mit der DNA-Sequenz des klonierten Fragments bestätigte, daß die Sequenz zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt oder hinterlegt war. Sowohl für das 5'-Ende der Sequenz als auch für ihr 3'-Ende konnten jedoch überlappende EST (expressed sequence tag) cDNA-Sequenzen (AA968911, H78649) gefunden werden. Die eigene Sequenzierung der beiden überlappenden EST-Klone lieferte eine Gesamtsequenz von 3419 bp für EML4, darin enthalten der komplette offene Leserahmen des 120 kDa-Proteins. Dieser kodiert für ein Polypeptid mit einer Länge von insgesamt 981 Aminosäuren (AS). Sämtliche Peptide (s. Tab. 1) aus der Ansequenzierung des EML4-Proteins konnten darin wiedergefunden werden. Die ermittelte Sequenz konnte anhand von PCR-Experimenten mit cDNA-Template der Zelllinie L428 und anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt werden. Die 3419 bp cDNA-Sequenz und die 981 AS Proteinsequenz von EML4 wurden in der Zeitschrift „Genomics“ publiziert (Heidebrecht et al., 2000) und in der „Genbank“-Sequenzdatenbank unter der Zugriffsnummer AF177377 hinterlegt.

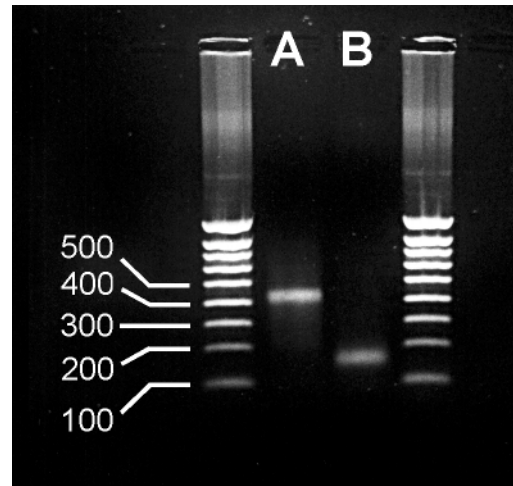
### 3.2.2 Identifikation des 5'-Endes und des 3'-Endes der mRNA von EML4

Mit der Vorgehensweise, die cDNA von EML4 mit Hilfe von degenerierten Primern zu amplifizieren und zu klonieren, konnte eine spezifische DNA-Sequenz von 1982 bp Länge ermittelt werden. Durch Sequenzierung von zwei überlappenden EST-Klonen konnte die Sequenz anschließend sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung verlängert werden. Die resultierende cDNA (3419 bp) enthielt zwar die komplette kodierende Region für das 120 kDa-Protein sowie zusätzliche untranslatierte Sequenz, jedoch war anzunehmen, daß die Enden der Sequenz nicht den tatsächlichen Enden der mRNA entsprachen. Um den exakten Startpunkt des Transkripts zu bestimmen, wurde nachfolgend ein 5'-RACE Experiment (s. 2.6.14) mit mRNA der Hodgkin-Lymphom Zelllinie L428 durchgeführt.

Ausgehend von L428-mRNA erfolgte die Synthese von cDNA unter Koppelung des für den Versuch essentiellen SMART II Oligos (s. 2.6.14). Danach wurde die erste PCR mit den Primern UPM (Universal Primer Mix, „Short“ und „Long“) und KMNort5rev durchgeführt. Diese führte nicht zur Amplifikation eines im Gel nachweisbaren DNA-Fragments. Erst die Durchführung von „nested“ PCRs mit den Primerpaaren NUP (Nested Universal Primer)/KMTTest2rev bzw. NUP/KMTTest5rev ließ im Agarosegel in beiden Fällen Amplikons erkennen (Abb. 7). Beide PCR-Produkte wurden in den Vektor

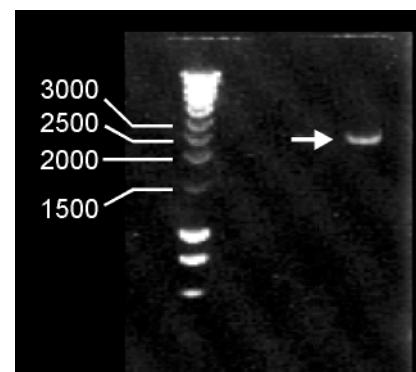
pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) kloniert und anschließend sequenziert. Anhand der Sequenzdaten konnte der exakte Startpunkt der mRNA von EML4 bestimmt werden. Dieser liegt 62 Nukleotide stromaufwärts der 3419 bp-Sequenz.

**Abb. 7:** 5'-RACE zur Identifikation des 5'-Endes der mRNA von EML4. Das Bild zeigt die elektrophoretische Auftrennung von Aliquots der beiden „nested“ PCRs. Die Primerkombination NUP/KMTest2rev (A) führt zur Amplifikation eines Fragments mit einer Größe von etwa 420 bp. Die Kombination NUP/KMTest5rev (B) resultiert in einem kleineren Fragment, welches im Gel bei etwa 170 bp läuft.



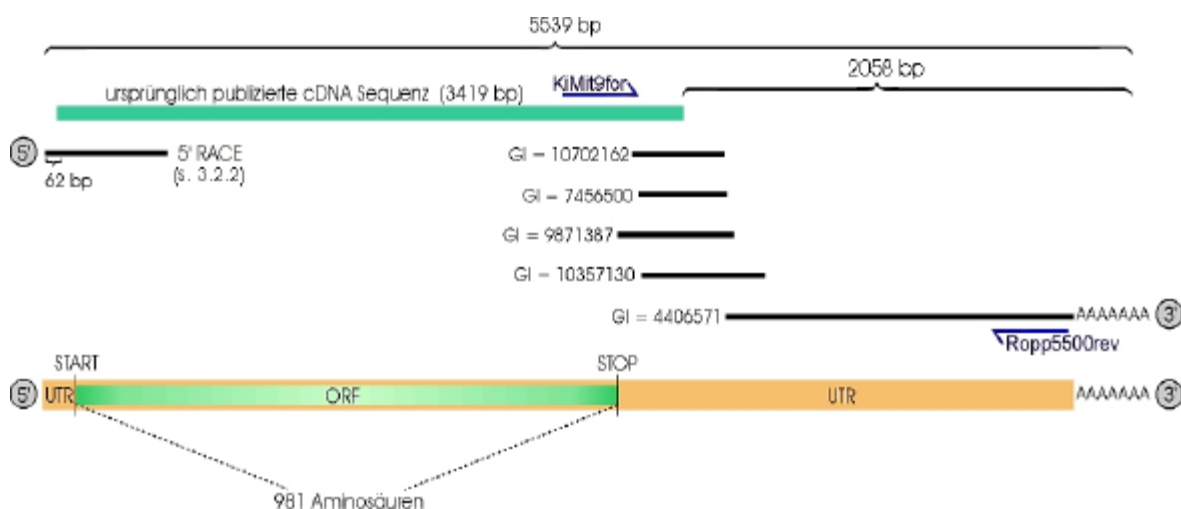
Im weiteren Verlauf der Versuche, die für diese Arbeit durchgeführt wurden, erfolgten nach und nach weitere Hinterlegungen von neuen EST cDNA-Sequenzen in den weltweiten Datenbanken. So war es möglich, durch Kombination mehrerer EST-Sequenzen, die untereinander bzw. mit dem 3'-Ende der bisher bekannten cDNA-Sequenz von EML4 überlappten, die cDNA bis zur Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende zu vervollständigen. Da dieses Vorgehen jedoch theoretischer Natur war und fehlerhafte EST-Sequenzen generell nicht ausgeschlossen werden können, wurde zur Validierung der Sequenz eine PCR durchgeführt. Hierzu wurde ein 5'-Primer (KiMit9for) gewählt, der innerhalb der 3419 bp-Sequenz hybridisiert, sowie ein 3'-Primer (Ropp5500rev), der unmittelbar stromaufwärts der hypothetischen Poly(A)-Sequenz bindet (Abb. 9). Die PCR mit cDNA-Template der Zelllinie L428 führte zur Amplifikation eines DNA-Fragments der erwarteten Länge (ca. 2,5 Kilobasen; Abb. 8), welches anschließend kloniert und komplett sequenziert wurde.

**Abb. 8:** Amplifikation des cDNA-Bereiches von EML4, der stromabwärts der 3419 bp-Sequenz liegt (3'-Fragment). Als Template für die PCR mit den Primern KiMit9for/Ropp5500rev fungierte cDNA der Zelllinie L428. Nach Auftrennung im Gel ist eine Bande bei ca. 2500 bp zu erkennen (markiert durch einen Pfeil). Das Amplikon wurde in den Vektor pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) kloniert und anschließend sequenziert.





Die vollständige cDNA-Sequenz von EML4 hat nach der genauen Kenntnis des 5'-Endes und des 3'-Endes eine Gesamtlänge von 5539 bp (inklusive 18 (A)-Nukleotiden der Poly(A)-Sequenz). Die Sequenz wurde unter der Zugriffsnummer AF177377 in der „Genbank“-Datenbank hinterlegt und ersetzte die ursprünglich hinterlegte 3419 bp-Sequenz. Eine schematische Darstellung der cDNA von EML4 ist in Abb. 9 zu sehen.



**Abb. 9:** Schema der cDNA von EML4. Die ursprünglich publizierte 3419 bp-Sequenz konnte durch den 5'-RACE Versuch (s. 3.2.2) in 5'-Richtung bzw. durch überlappende EST-Sequenzen und PCR-Experimente in 3'-Richtung verlängert werden (s. 3.2.2). Bei den zusätzlichen Nukleotiden handelt es sich um nicht translatierte Sequenz („untranslated region“; UTR). Die Gesamtlänge der Sequenz beträgt 5539 bp inklusive 18 Adenin-Nukleotiden der Poly(A)-Sequenz. Das Transkript kodiert für ein Protein mit einer Länge von 981 Aminosäuren (ORF). Die dargestellte Sequenz wurde unter der Zugriffsnummer AF177377 in der „Genbank“-Datenbank hinterlegt.

#### Sequenz der EML4-cDNA (5539 bp) und des EML4-Proteins (981 AS):

```

1  GGAGGGAGGC  CGGGCAGGCG  GCTGAGCGGC  GCGGCTCTCA  ACGTGACGGG  GAAGTGGTTC
61  GGGCGGCCGC  GGCTTACTAC  CCCAGGGCGA  ACGGACGGAC  GACGGAGGCG  GGAGCCGGTA
121  GCCGAGCCGG  GCGACCTAGA  GAACGAGCGG  GTCAGGCTCA  GCGTCGGCCA  CTCTGTCGGT
181  CCGCTGAATG  AAGTGCCCGC  CCCTCTAAGC  CCGGAGCCCG  GCGCTTTCCC  CGCAAGATGG
                                     M
241  ACGGTTTCGC  CGGCAGTCTC  GATGATAGTA  TTTCTGCTGC  AAGTACTTCT  GATGTTCAAG
      D G F A G S L D D S I S A A S T S D V Q
301  ATCGCCTGTC  AGCTCTTGAG  TCACGAGTTC  AGCAACAAGA  AGATGAAATC  ACTGTGCTAA
      D R L S A L E S R V Q Q Q E D E I T V L
361  AGGCGGCTTT  GGCTGATGTT  TTGAGGCGTC  TTGCAATCTC  TGAAGATCAT  GTGGCCTCAG
      K A A L A D V L R R L A I S E D H V A S
421  TGAAAAAATC  AGTCTCAAGT  AAAGGCCAAC  CAAGCCCTCG  AGCAGTTATT  CCCATGTCCT
      V K K S V S S K G Q P S P R A V I P M S
481  GTATAACCAA  TGGAAGTGGT  GCAAACAGAA  AACCAAGTCA  TACCAGTGCT  GTCTCAATTG
      C I T N G S G A N R K P S H T S A V S I
541  CAGGAAAAGA  AACTCTTTCA  TCTGCTGCTA  AAAGTGGTAC  AGAAAAAAG  AAAGAAAAAC
      A G K E T L S S A A K S G T E K K K E K
601  CACAAGGACA  GAGAGAAAAA  AAAGAGGAAT  CTCATTCTAA  TGATCAAAGT  CCACAAATTG

```

P Q G Q R E K K E E S H S N D Q S P Q I  
 661 GAGCATCACC TTCTCCCCAG CCCTCTTCAC AACCTCTCCA AATACACAGA CAAACTCCAG  
 R A S P Q P S S Q P L Q I H R Q T P  
 721 AAAGCAAGAA TGCTACTCCC ACCAAAAGCA TAAAACGACC ATCACCAGCT GAAAAGTCAC  
 E S K N A T P T K S I K R P S P A E K S  
 781 ATAATTCTTG GGAAAATTCA GATGATAGCC GTAATAAATT GTCGAAAATA CCTTCAACAC  
 H N S W E N S D D S R N K L S K I P S T  
 841 CCAAATTAAT ACCAAAAGTT ACCAAAAGTT CAGACAAGCA TAAAGATGTC ATCATCAACC  
 P K L I P K V T K T A D K H K D V I I N  
 901 AAGAAGGAGA ATATATTAAT ATGTTTATG GCGGTCGGCC AATTACCATG TTCATTCTTT  
 Q E G E Y I K M F M R G R P I T M F I P  
 961 CCGATGTTGA CAACTATGAT GACATCAGAA CGGAAGTCC TCCTGAGAAG CTCAAAGTGG  
 S D V D N Y D D I R T E L P P E K L K L  
 1021 AGTGGGCATA TGGTTATCGA GGAAAGGACT GTAGAGCTAA TGTTTACCTT CTTCCGACCG  
 E W A Y G Y R G K D C R A N V Y L L P T  
 1081 GGGAAATAGT TTATTTTCAAT GCATCAGTAG TAGTACTATT TAATTATGAG GAGAGAATC  
 G E I V Y F I A S V V V L F N Y E E R T  
 1141 AGCGACACTA CCTGGGCCAT ACAGACTGTG TGAAATGCCT TGCTATACAT CCTGACAAAA  
 Q R H Y L G H T D C V K C L A I H P D K  
 1201 TTAGGATTGC AACTGGACAG ATAGCTGGCG TGGATAAAGA TGGAAAGGCCT CTACAACCCC  
 I R I A T G Q I A G V D K D G R P L Q P  
 1261 ACGTCAGAGT GTGGGATTCT GTTACTCTAT CCACACTGCA GATTATTGGA CTTGGCACTT  
 H V R V W D S V T L S T L Q I I G L G T  
 1321 TTGAGCGTGG AGTAGGATGC CTGGATTTTT CAAAAGCAGA TTCAGGTGTT CATTATATGTG  
 F E R G V G C L D F S K A D S G V H L C  
 1381 TTATTGATGA CTCCAATGAG CATATGCTTA CTGTATGGGA CTGGCAGAAG AAAGCAAAAG  
 V I D D S N E H M L T V W D W Q K K A K  
 1441 GAGCAGAAAT AAAGACAACA AATGAAGTTG TTTTGGCTGT GGAGTTTAC CCAACAGATG  
 G A E I K T T N E V V L A V E F H P T D  
 1501 CAAATACCAT AATTACATGC GGTAAATCTC ATATTTTCTT CTGGACCTGG AGCGTCAATT  
 A N T I I T C G K S H I F F W T W S G N  
 1561 CACTAACAAG AAAACAGGGA ATTTTTGGGA AATATGAAAA GCCAAAATTT GTGCAGTGT  
 S L T R K Q G I F G K Y E K P K F V Q C  
 1621 TAGCATTCTT GGGGAATGGA GATGTTCTTA CTGGAGACTC AGGTGGAGTC ATGCTTATAT  
 L A F L G N G D V L T G D S G G V M L I  
 1681 GGAGCAAAAC TACTGTAGAG CCCACACTG GGAAGGACC TAAAGGTGTA TATCAAATCA  
 W S K T T V E P T P G K G P K G V Y Q I  
 1741 GCAAACAAAT CAAAGCTCAT GATGGCAGTG TGTTACACT TTGTCAGATG AGAAATGGGA  
 S K Q I K A H D G S V F T L C Q M R N G  
 1801 TGTTATTAAC TGGAGGAGGG AAAGACAGAA AAATAATTCT GTGGGATCAT GATCTGAATC  
 M L L T G G G K D R K I I L W D H D L N  
 1861 CTGAAAGAGA AATAGAGGTT CCTGATCAGT ATGGCACAAT CAGAGCTGTA GCAGAAGGAA  
 P A E R E I E V P D Q Y G T I R A V A E G  
 1921 AGGCAGATCA ATTTTTAGTA GGCACATCAC GAAACTTTAT TTTACGAGGA ACATTTAATG  
 K A D Q F L V G T S R N F I L R G T F N  
 1981 ATGGCTTCCA AATAGAAGTA CAGGGTCATA CAGATGAGCT TTGGGGTCTT GCCACACATC  
 D G F Q I E V Q G H T D E L W G L A T H  
 2041 CCTTCAAAGA TTTGCTCTTG ACATGTGCTC AGGACAGGCA GGTGTGCCTG TGGAACTCAA  
 P F K D L L L T C A Q D R Q V C L W N S  
 2101 TGGAACACAG GCTGGAATGG ACCAGCTGG TAGATGAACC AGGACACTGT GCAGATTTTC  
 M E H R L E W T R L V D E P G H C A D F  
 2161 ATCCAAGTGG CACAGTGGTG GCCATAGGAA CGCACTCAGG CAGGTGGTTT GTTCTGGATG  
 H P S G T V V A I G T H S G R W F V L D  
 2221 CAGAAACCAG AGATCTAGTT TCTATCCACA CAGACGGGAA TGAACAGCTC TCTGTGATGC  
 A E T R D L V S I H T D G N E Q L S V M  
 2281 GCTACTCAAT AGATGGTACC TTCCTGGCTG TAGGATCTCA TGACAACTTT ATTTACCTCT  
 R Y S I D G T F L A V G S H D N F I Y L  
 2341 ATGTAGTCTC TGAAAATGGA AGAAAATATA GCAGATATGG AAGGTGCACT GGACATTCCA  
 Y V V S E N G R K Y S R Y G R C T G H S  
 2401 GCTACATCAC ACACCTTGAC TGGTCCCCAG ACAACAAGTA TATAATGTCT AACTCGGGAG  
 S Y I T H L D W S P D N K Y I M S N S G  
 2461 ACTATGAAAT ATTGTACTGG GACATTCCAA ATGGCTGCAA ACTAATCAGG AATCGATCGG  
 D Y E I L Y W D I P N G C K L I R N R S  
 2521 ATTGTAAGGA CATTGATTGG ACGACATATA CCTGTGTGCT AGGATTTCAA GTATTTGGTG  
 D C K D I D W T T Y T C V L G F Q V F G  
 2581 TCTGGCCAGA AGGATCTGAT GGGACAGATA TCAATGCACT GGTGCGATCC CACAATAGAA  
 V W P E G S D G T D I N A L V R S H N R  
 2641 AGGTGATAGC TGTTGCCGAT GACTTTTGTA AAGTCCATCT GTTTCAGTAT CCCTGCTCCA

K V I A V A D D F C K V H L F Q Y P C S  
 2701 AAGCAAAGGC TCCCAGTCAC AAGTACAGTG CCCACAGCAG CCATGTCACC AATGTCAGTT  
 K A K A P S H K Y S A H S S H V T N V S  
 2761 TTA~~CT~~CACAA TGACAGTCAC CTGATATCAA CTGGTGGAAA AGACATGAGC ATCATTCA~~GT~~  
 F T H N D S H L I S T G G K D M S I I Q  
 2821 GGAAACTTGT GGAAAAGTTA TCTTTGCC~~TC~~ AGAATGAGAC TG~~TAG~~CGGAT ACTACTCTAA  
 W K L V E K L S L P Q N E T V A D T T L  
 2881 CCAAAGCCCC CGTCTCTTCC ACTGAAAGTG TCATCCAATC TAATACTCCC ACACCGCCTC  
 T K A P V S S T E S V I Q S N T P T P P  
 2941 TTCTCAGCC CTTAAATGAG ACAGCTGAAG AGGAAAGTAG AATAAGCAGT TCTCCCACAC  
 P S Q P L N E T A E E E S R I S S S P T  
 3001 TTCTGGAGAA CAGCCTGGAA CAAACTGTGG AGCCAAGTGA AGACCACAGC GAGGAGGAGA  
 L L E N S L E Q T V E P S E D H S E E E  
 3061 GTGAAGAGGG CAGCGGAGAC CTTGGT~~GAGC~~ CTCTTTATGA AGAGCCATGC AACGAGATAA  
 S E E G S G D L G E P L Y E E P C N E I  
 3121 GCAAAGGCC GGCCAAAGCC ACCCTTCTGG AGGACCAGCA AGACCCTCG CCCTCGTCC~~T~~  
 S K E Q A K A T L L E D Q Q D P S P S S  
 3181 AACACCCTGG CTTCAGTGCA ACTCTTTTCC TTCAGCTGCA TGTGATTTTG TGATAAAGTT  
 3241 CAGGTAACAG GATGGGCAGT GATGGAGAAT CACTGTTGAT TGAGATTTTG GTTTCATGT  
 3301 GATTTGTTTT CTTCAATAGT CTTATTTTCA GTCTCTCAA TACAGCCAAC TTAAAGTTTT  
 3361 AGTTTGGTGT TTATTGAAA TTAACCAAAC TTAATACTAG GAGAAGACTG AATCATTAAT  
 3421 GATGTCTCAC AAATTACTGT GTACCTAAGT GGTGTGATGT AAATACTGGA AACAAAACA  
 3481 GCAGTTGCAT TGATTTTGAA AACAAACCCC CTTGTTATCT GAACATGTTT TCTT~~CAGGAA~~  
 3541 CAACCAGAGG TATCACAAAC ACTGTTACTC ATCTACTGGC TCAGACTGTA CTACTTTTTT  
 3601 TTTTTTTTTT CCTGAAAAG AAACCAGAAA AAAATGTACT CTTACTGAGA TACCCTCTCA  
 3661 CCCC~~AAATGT~~ GTAATGGAAA ATTTTAAATT AAGAAAACT TCAGTTTTGC CAAGTGCAAT  
 3721 GGTGTTGCCT TCTTTAAAAA ATGCCGTTTT CTTACACTAC CAGTGGATGT CCAGACATGC  
 3781 TCTTAGTCTA CTAGAGAGGT GCTGCCTTTT CTAAGTCATA ATGAGGAACA GTCCCTTAAT  
 3841 TTCTTGTGTG CAACTCTGTT TTATCCTAGA ACTAAGAGAG CATTGGTTTG TTAAGAGCCT  
 3901 TTCAATGTAT ATTAAAACCT TCAATACTCA GAAATGATGG ATTCCTCCAA GGAGTCCTTT  
 3961 ACTAGCCTAA ACATTCTCAA ATGTTTGAGA TTCAAGTGAA TGGAAGGAAA ACCACATGCC  
 4021 TTTAAA~~ACTA~~ AACTGTAATA ATTACCTGGC TAATTT~~CAGC~~ TAAGCCTTCA TCATAATTTG  
 4081 TTCCTCAGT AATAGGAGAA ATATAAATAC AGTAAGTTTA GATTATTGAA TTGGTGCCTG  
 4141 AAATTTATTG GTTTTGTGTG AATTTTATAC AGATTATATG AGGGATAAGA TACTCATCAA  
 4201 ATTGCAAATT CTTTTTTTTA CAGAAGTGTG GGTAACAGTC ACAGCAGTTT TTTTTACCAA  
 4261 CAGCATACT AACAGACTTG CTGTGTAGCA GTTTTTTCT GGTGGAGTTG CTGTAAGCT  
 4321 TGTAAGTCTA ATGTGGCTAT CCTACTCTTT TGGGCAATGC ATGTATTATG CATTGGAAAAG  
 4381 GTATTTTTTT TAAGTCTGTG TGGCTAGCTA TGGTTTTCAG TACATTTCCCT ACTTTAAGAG  
 4441 TAATTACTGA CAAATATGTA TTTCTTATAT GTTTATACTT TGATTATAAA AAAGTATTTT  
 4501 GTTTTGATTT TTTAACTTGC TGCATTGTTT TGATACTTTC TATTTTTTTG GTCAAATCAT  
 4561 GTTTAGAAAC TTTGGATGAG TTAAGAAGTC TTAAGTATGC AGGCGTTTAC GTGATTGTGC  
 4621 CATTCCAAAG TGCATCAGAA CTGTCATTCC CTTCTAATAT CTTCTCAGGA GTAATACAAA  
 4681 TCAGGTATTT CATCATCATT TGGTAATATG AAAACTCCAG TGA~~ACT~~CCCA AGGACATTTA  
 4741 CAACATTTAT ATTACACGC TGTATGGAAG GGTGTGGGTG TGTGTGAAGG GCGAGTGGA  
 4801 GACACTGTGT GTATCTCTAG ATAAGAAGAT ATGCACCACG TTGAAAATAC TCAGTGTAGA  
 4861 TCTCTATGTG TATAGGTATC TGTATATCTT TCCTTTTGT TACA~~ACT~~GTT AAAAAACCTC  
 4921 AAAATAGTTC TCTTCAAAG AAGAGAGATT CCAAGCAACC CATCTTTCTT CAGTATGTAT  
 4981 GTTCTGTACA TACTTATCGG AGCGCGCCAG TAAGTATCAG GCATATATAT CTGTCTGTTA  
 5041 GCAATGATTA TTACATCATC AGATCAGCAT GTGCTATACT CCCTGCAAGA AATATACTGA  
 5101 CATGAACAGG CAGTTCTTGG AGAAGAAAAG GCATTTCTTT AAGTACCTGG GGAATACAGC  
 5161 TCTCAGTGAT CAGCAGGGAG TTTATTTGAG GACATCAGTC ACCTTTGGGG TTGCCATGTA  
 5221 CAATGAGATT TATAATCATG ATACTCTTCG GTGGTAGTTT CAAAAGACAC TACTAATACG  
 5281 CAGGAAGCGT TCCAGCTATT TAATGCTGGC AACTACTGTT TAATGGTCAG TTAAATCTGT  
 5341 GATAATGGTT GGAAGTGGGT GGGGTTATGA AATTGTAGAT GTTTTTAGAA AA~~ACT~~TGTGA  
 5401 ATGAAAATGA ATCCAAGTGT TTCATGTGAA GATGTTGAGC CATTGCTATC ATGCATTCC~~T~~  
 5461 GTCTCATGGC AGAAAATTTT GAAGATTA~~AAA~~ AAATAAAATA ATCAAATGT TTCCTCTT~~C~~  
 5521 TAAAA~~AAAA~~ AAAAA~~AAAA~~



### 3.2.3 EML4 gehört zur Familie der EMAP-ähnlichen Proteine

Aufgrund der auf die Mitose beschränkten Detektierbarkeit von EML4 bei Immunfärbungen mit „Ki-Mit“ und aufgrund des Molekulargewichts von 120 kDa wurde das Protein zunächst „restrictedly overexpressed proliferation associated protein 120“ (ropp120) genannt. Unter diesem Namen erfolgte im Jahr 2000 auch die erste Hinterlegung der cDNA- und Proteinsequenz (cDNA: 3419 bp; Protein: 981 AS) in der „Genbank“-Datenbank. Inzwischen ist die offiziell vom „Human Gene Nomenclature Committee“ vergebene Bezeichnung für das „Ki-Mit“-Antigen EML4. Diese nimmt Bezug auf Sequenzhomologien zu anderen humanen Proteinen, welche nachfolgend veranschaulicht werden.

Bereits drei Peptide aus der Ansequenzierung von EML4 hatten signifikante Homologien zu schon bekannten und teilweise charakterisierten Proteinen gezeigt (s. 1.3.1). In allen Fällen handelt es sich dabei um Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs), die aufgrund bestehender Sequenzübereinstimmungen einer Proteinfamilie zugeordnet werden können. Hierbei handelt es sich um die Familie der EMAP-ähnlichen Proteine. Der erste bekannte Vertreter dieser Familie, das „echinoderm microtubule-assoziiertes protein“ (EMAP) (Li and Suprenant, 1994), wurde ursprünglich in Stachelhäutern (Stamm *Echinodermata*) entdeckt. EMAP, ein 77 kDa-Protein, gehört dort zu den mengenmässig am häufigsten vorkommenden MAPs. In Anlehnung an das EMAP und bedingt durch ihre signifikanten Sequenzübereinstimmungen wurden die beiden später identifizierten humanen Homologe von EMAP von den Autoren zunächst HuEMAP-1 und HuEMAP-2 (Eudy et al., 1997; Lepley et al., 1999) genannt. Vom „Human Genome Nomenclature Committee“ erhielten HuEMAP-1 und HuEMAP-2 später die offiziellen Bezeichnungen EML1 und EML2, wobei die Abkürzung EML für „echinoderm microtubule-assoziiertes protein like“ steht.

Da das „Ki-Mit“-Antigen auf Proteinsequenzebene sowohl zu EML1 als auch zu EML2 eine ausgeprägte Homologie besitzt, ist es sinnvoll das 120 kDa-Protein ebenfalls als humanes EML-Protein zu betrachten. Da der Name EML3 bereits für ein noch nicht veröffentlichtes Protein reserviert wurde, wurde dem „Ki-Mit“-Antigen der Name EML4 zugeteilt.

Eine Arbeitsgruppe der Universität Kansas (U.S.A.) um Mrs. Kathy A. Suprenant (Department of Molecular Biosciences) nahm kürzlich in einer Publikation (Eichenmüller et al., 2002) eine taxonomische Einteilung vor, in der die humanen EMLs und EMAP-ähnliche Proteine anderer Organismen in der Proteingruppe der „EMAP-like proteins“ (ELP) zusammengefasst werden. Die genannte Proteingruppe beinhaltet außer den drei humanen Proteinen (EML1, EML2, EML4) fünf nicht humane Proteine.

Die folgende Tabelle (Tab. 4) gibt eine Übersicht über die Synonyme der bislang bekannten humanen EML-Proteine:

offizielle Bezeichnung	Molekulargewicht; Anzahl der Aminosäuren	synonyme Bezeichnungen
EML1	79 kDa; 717 AS	HuEMAP-1; EMAPL; ELP79
EML2	70 kDa; 649 AS	HuEMAP-2; ELP70
EML4	120 kDa; 981 AS	ropp120; C2orf2; ELP120

**Tab. 4:** Übersicht über die Molekulargewichte und synonymen Bezeichnungen der bislang bekannten humanen EMAP-ähnlichen Proteine EML1, EML2 und EML4. Das Protein EML4 entspricht dem 120 kDa „Ki-Mit“-Antigen.

EML4 ist mit einem Molekulargewicht von 120 kDa und einer Länge von 981 Aminosäuren der größte Vertreter der humanen EMAP-ähnlichen Proteine. Die Homologiegrade zwischen EML4 und den beiden anderen EML-Proteinen betragen 56 % (EML4  $\leftrightarrow$  EML1) bzw. 57 % (EML4  $\leftrightarrow$  EML2) wenn man identische Sequenzbereiche berücksichtigt. Werden auch ähnliche Sequenzbereiche für die Berechnung verwendet, so betragen die Homologien sogar 74 % (EML4  $\leftrightarrow$  EML1) bzw. 75 % (EML4  $\leftrightarrow$  EML2). Außer in *Homo sapiens* gibt es EMAP-ähnliche Proteine in dem Ciliaten *Euplotes octocarinatus* (AJ251505), den Seesternen *Strongylocentrotus purpuratus* (U15551) und *Lytechinus variegatus* (AF136234), der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (CT32830) sowie dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Z92833).

Abgesehen von der signifikanten Sequenzhomologie besitzen die EMAP-ähnlichen Proteine weitere Gemeinsamkeiten. Alle Proteine besitzen z. B. charakteristische „WD-repeats“. Dies sind hochkonservierte Module, die für gewöhnlich die Aminosäurefolge „Tryptophan-Asparaginsäure“ („WD“ im Einbuchstaben-Code) beeinhalt. „WD-repeats“ kommen bei allen Eukaryonten in Proteinen verschiedenster Funktion (z. B. RNA-Prozessierung, Transkriptionsregulation, Zellteilung, Signaltransduktion und Aufbau des Zytoskeletts) vor (Neer et al., 1994; Smith et al., 1999). Die genaue Funktion der „WD-repeats“ ist noch nicht bekannt, vermutlich sind sie aber Module, welche Protein-Protein-Interaktionen erleichtern. Das EML4-Protein besitzt insgesamt neun „WD-repeats“, deren jeweilige Länge und Lokalisation in Tabelle 5 aufgeführt sind (Quelle: <http://us.expasy.org/sprot/>).

WD-repeat	von-bis (AS)	Länge (in AS)	Sequenz
1	307-356	50	GHTDCVKCLAIHPDKIRIATGQIAGVDKDGRLQPHVRV WDSVTLSTLQI
2	361-404	44	TFERGVGCLDFSKADSGVHLCVIDDSNEHMLTVWDWQ KKAKGAE
3	407-448	42	TTNEVVLAVEFHPTDANTIITCGKSHIFFWTWSGNSLTRK QG
4	454-492	39	EKPKFVQCLAFLGNGDVLGTGDSGGVMLIWSKTTVEPTP G
5	507-546	40	AHDGSVFTLCQMRNGMLLTGGGKDRKIILWDHDLNPER EI
6	590-629	40	GHTDELWGLATHPFKDLLLTCAQDRQVCLWNSMEHRL EWT
7	673-712	40	DGNEQLSVMRYSIDGTFLAVGSHDNFIYLYVVENGRK YS
8	719-758	40	GHSSYITHLDWSPDNKYIMSNSGDYEILYWDIPNGCKLIR
9	832-872	41	AHSSHVTNVSFTHNSHLISTGGKDMSIIQWKLVEKLSLP Q

**Tab. 5:** Vorkommen von konservierten „WD-repeats“ im EML4-Protein. Es existieren insgesamt neun „WD-repeats“ mit einer Länge von 39-50 Aminosäuren, die im Proteinbereich von AS 307-872 lokalisiert sind.

Abgesehen von den „WD-repeats“ besitzen alle acht EMAP-ähnlichen Proteine eine gemeinsame, stark homologe Proteindomäne einer Länge von 43 AS, die bisher nicht in anderen Proteinen gefunden wurde (Eichenmüller et al., 2002). Aufgrund der vorausgesagten Hydrophobizität der Domäne wurde sie „hydrophobe ELP“ (HELP)-Domäne genannt. Bislang konnte der HELP-Domäne aber noch keine konkrete Funktion zugeordnet werden. Innerhalb des EML4-Proteins reicht die HELP-Domäne von AS 255 bis 297.

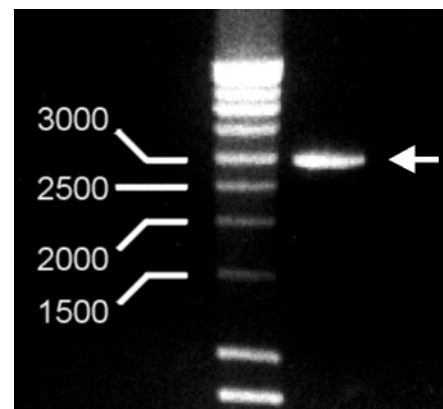
### 3.3 Bakterielle Expression von EML4

#### 3.3.1 „Ki-Mit“ bindet an rekombinantes EML4-Protein

Nach der Entschlüsselung der vollständigen cDNA-Sequenz von EML4 war anhand des identifizierten „open reading frames“ ersichtlich, daß das Transkript für ein Protein von 981 Aminosäuren Länge kodiert. Das berechnete theoretische Molekulargewicht von EML4 beträgt 108,932 kDa, was in etwa dem im SDS-Gel bzw. Western Blot beobachteten Molekulargewicht von ca. 120 kDa entspricht. Dennoch fehlte zu diesem Zeitpunkt noch der eindeutige Beweis, daß es sich bei dem EML4-Protein auch tatsächlich um das „Ki-Mit“-Antigen handelt. Aus diesem Grund sollte im folgenden, ausgehend von der cDNA-Sequenz, rekombinantes EML4-Protein hergestellt und im Western Blot mit

„Ki-Mit“ getestet werden. Für die Synthese des rekombinanten EML4 wurde ein bakterielles Expressionssystem gewählt, da dieses die Möglichkeit bietet, größere Mengen an Protein herzustellen. Dabei handelt es sich um das *GST Gene Fusion System* der Firma Amersham Pharmacia Biotech (s. 2.6.15). Das Zielprotein wird bei diesem System als Fusionsprotein mit dem Enzym Glutathion S-Transferase (GST) exprimiert. Die starke Affinität des GST für das Substrat Glutathion ermöglicht nach dem Aufschluss der Wirtsbakterien eine gezielte Aufreinigung der GST-Fusionsproteine aus dem Bakterienlysat.

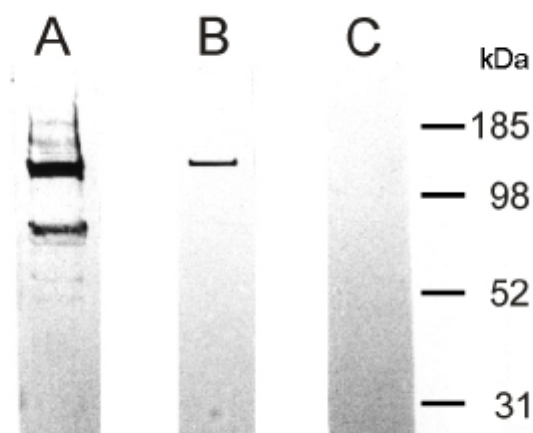
Die Amplifikation des cDNA-Abschnitts, der den vollständigen EML4-„open reading frame“ (EML4<sub>orf</sub>) enthält, erfolgte ausgehend von L428 cDNA-Template durch PCR mit den Primern KiMitfulfGST und KiMitfulrGST (Abb. 10). Beide verwendeten Primer enthalten für die Klonierung in den Vektor pGEX-5X-1 (s. 2.4.1) geeignete Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Bam* HI bzw. *Sal* I. Die Einhaltung des vom Vektor vorgegebenen Leserasters sowie die Korrektheit der klonierten DNA-Sequenz wurden nach der Ligation durch Sequenzierung überprüft.



**Abb. 10:** Amplifikation des kompletten „open reading frame“ von EML4 (EML4<sub>orf</sub>) mit den Primern KiMitfulfGST und KiMitfulrGST für die Klonierung in den Vektor pGEX-5X-1. Durch die PCR wird ein DNA-Fragment mit einer Länge von 2980 bp amplifiziert (siehe Pfeil).

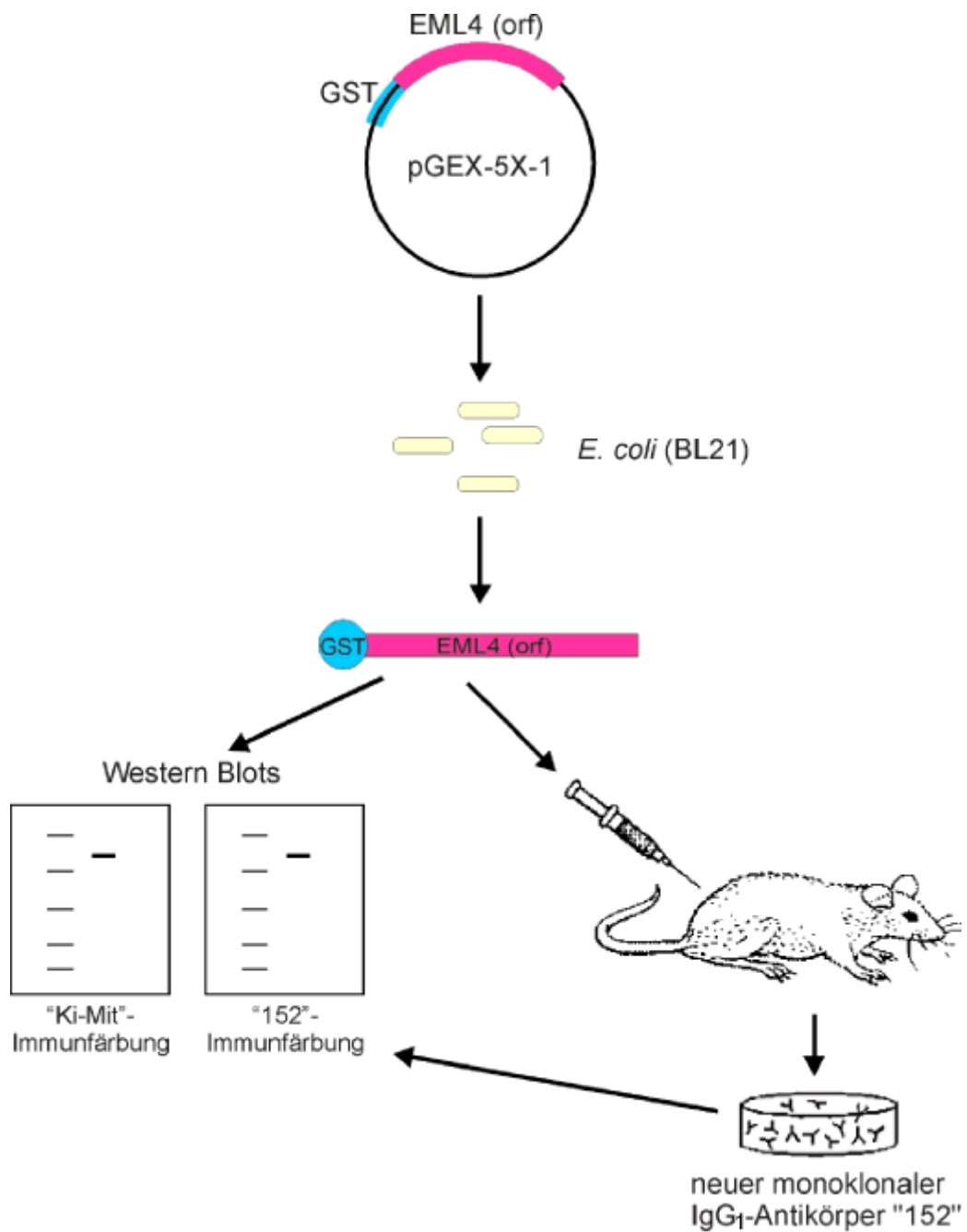
Nach der bakteriellen Expression von GST-EML4<sub>orf</sub> wurde geprüft, ob der Antikörper „Ki-Mit“ in der Lage ist, an das rekombinante Protein zu binden. Dazu wurde Bakterienlysat bzw. schon aufgereinigtes Fusionsprotein im SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit mAk „Ki-Mit“ immungefärbt. Dabei zeigte sich, daß „Ki-Mit“ das rekombinante GST-EML4<sub>orf</sub> Fusionsprotein detektiert (Abb. 11). Bei dem 120 kDa-Protein, welches im L428-Zytolysat bzw. nach der Immunpräzipitation von „Ki-Mit“ erkannt wird, handelt es sich demnach tatsächlich um EML4.

**Abb. 11:** Western Blot, immungefärbt mit mAk „Ki-Mit“. A: bakterielles Lysat von *E. coli* BL21-Gold, die zuvor mit dem Konstrukt EML4<sub>orf</sub>/pGEX-5X-1 transformiert wurden. B: mit Glutathion Sepharose 4B aufgereinigtes GST-Fusionsprotein nach der Elution. „Ki-Mit“ erkennt ein Protein bei ungefähr 150 kDa (GST-EML4<sub>orf</sub>; A und B). Im Lysat von untransformierten Bakterien (C) wird kein Protein angefärbt (Negativkontrolle).



### 3.3.2 Etablierung des neuen monoklonalen Antikörpers „152“

Da der IgM-Antikörper „Ki-Mit“ wahrscheinlich aufgrund seiner Pentamerstruktur nicht geeignet ist, sein zytoplasmatisches Antigen EML4 in immunhistochemischen Färbungen von Gewebeschnitten zu erkennen, sollte das bakteriell exprimierte GST-EML4<sub>orf</sub> auch dafür verwendet werden, neue monoklonale IgG-Antikörper herzustellen. Hierzu wurden BALB/C Mäuse mit aufgereinigtem GST-EML4<sub>orf</sub> immunisiert. Nach der Fusion der Splenozyten mit P<sub>3</sub>x63-Ag.8653 Maus-Myelomzellen wurden die Kulturüberstände der Hybridomaklone im ELISA auf Reaktivität mit dem rekombinanten GST-EML4<sub>orf</sub> getestet. Einer der positiv getesteten Überstände (Klonnummer 152) enthielt einen IgG Antikörper der Subklasse 1. Dieser monoklonale IgG<sub>1</sub>-Antikörper wird nachfolgend „152“ genannt. Wie auch „Ki-Mit“ erkennt mAk „152“ das bakteriell exprimierte EML4 voller Länge im Western Blot.



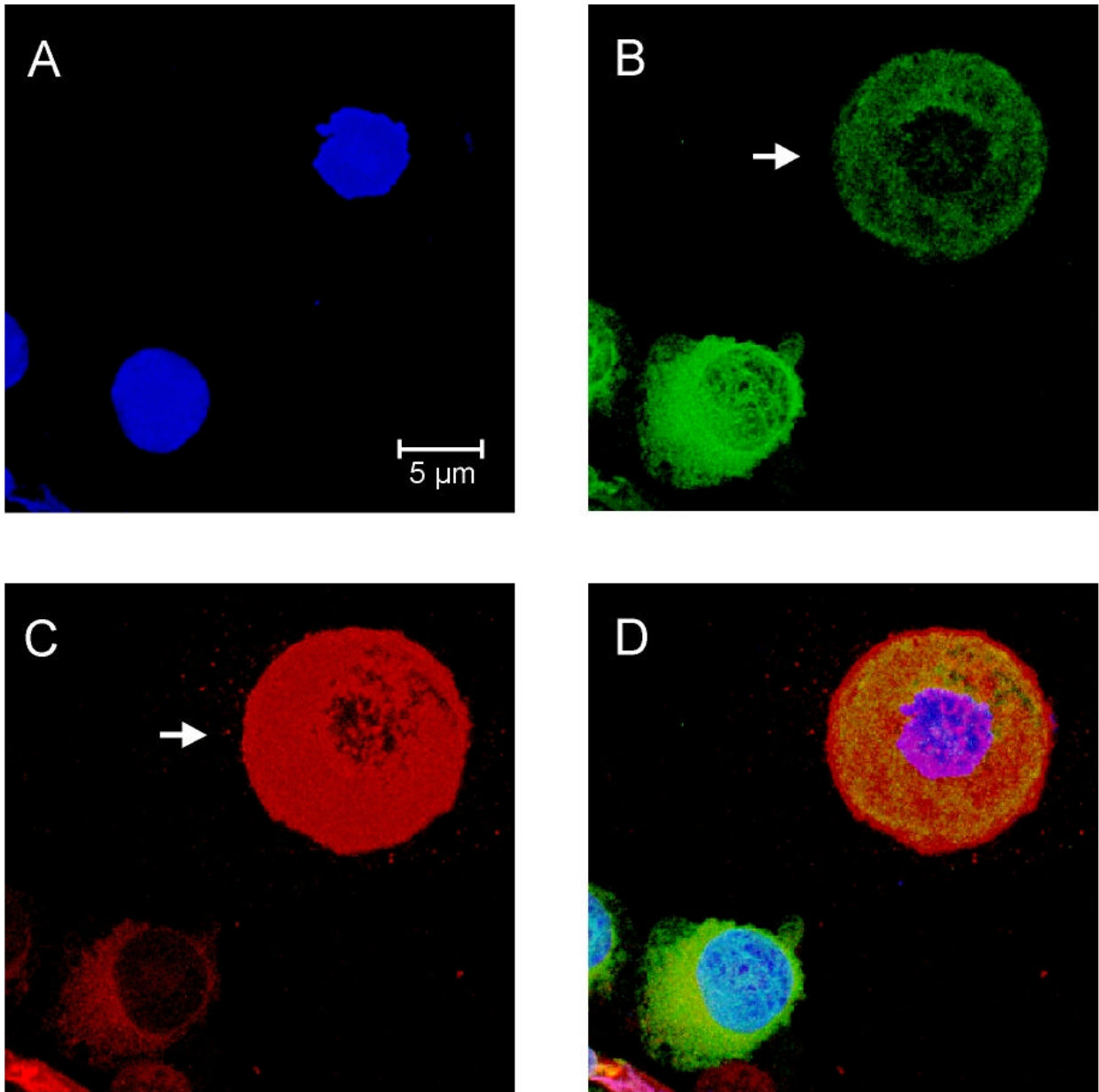
**Abb. 12:** Fließschema zur bakteriellen Genexpression von EML4 und Herstellung des monoklonalen IgG<sub>1</sub>-Antikörpers „152“. Nach der bakteriellen Expression wurde das GST-EML4-Fusionsprotein aufgereinigt und zur Immunisierung einer BALB/C-Maus verwendet. Der neue anti-EML4 Antikörper „152“ und „Ki-Mit“ erkennen das rekombinante GST-EML4-Fusionsprotein im Western Blot.

### 3.3.3 Die monoklonalen Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ detektieren EML4 während unterschiedlicher Zellzyklusphasen

Die vorangegangenen immunzytochemischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Versuche mit mAk „Ki-Mit“ erweckten den Eindruck, daß das Antigen EML4 ein Protein ist, dessen Expression streng zellzyklusabhängig reguliert wird. EML4 ist mit „Ki-Mit“ überwiegend in mitotischen Zellen zu detektieren, während Interphasezellen, also Zellen, die sich in den Phasen G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S oder G<sub>2</sub> befinden, nur eine schwache Antigenität aufweisen.

Intrazelluläre Immunfärbungen mit dem neuen monoklonalen Antikörper „152“, der mit bakteriell exprimiertem EML4 hergestellt wurde, zeigen jedoch, daß das Bild des zellzyklusabhängig überexprimierten Proteins korrigiert werden muss. Im Gegensatz zu „Ki-Mit“ erkennt der Antikörper „152“ das EML4-Protein in allen Zellzyklusphasen, wobei die Detektion von mitotischem EML4 vergleichsweise schwächer ausfällt als die Detektion von EML4 in nicht mitotischen Zellen (Abb. 13). Demnach ist die Expression von EML4 nicht wie anfänglich angenommen auf die Mitose beschränkt, sondern sie scheint konstitutiv während des gesamten Zellzyklus stattzufinden. RNA *In situ*-Hybridisierungen mit EML4-Sonden an proliferativem und nicht proliferativem Gewebe bestätigen dies (Daten nicht gezeigt).

Die phasenspezifische Darstellung des EML4-Proteins in der Mitose ist demnach antikörperspezifisch und muß aus diesem Grund mit der Beschaffenheit des Epitops von mAk „Ki-Mit“ zusammenhängen. Da die Proteinmenge an EML4 im Verlauf des Zellzyklus nicht signifikant zu variieren scheint, was aus Immunfärbungen mit dem Antikörper „152“ hervorgeht, ist anscheinend lediglich die Ausbildung bzw. Exposition des „Ki-Mit“-Epitops zellzyklusabhängig und findet hauptsächlich in der Mitose statt. Dies würde bedeuten, daß „Ki-Mit“ spezifisch gegen eine bestimmte Form des EML4-Proteins gerichtet ist, welche hauptsächlich in der Mitose existiert. Konsequenterweise müßte der Antikörper „152“, der auch während der Interphase an EML4 binden kann, ein anderes Epitop auf dem EML4-Protein erkennen als „Ki-Mit“.



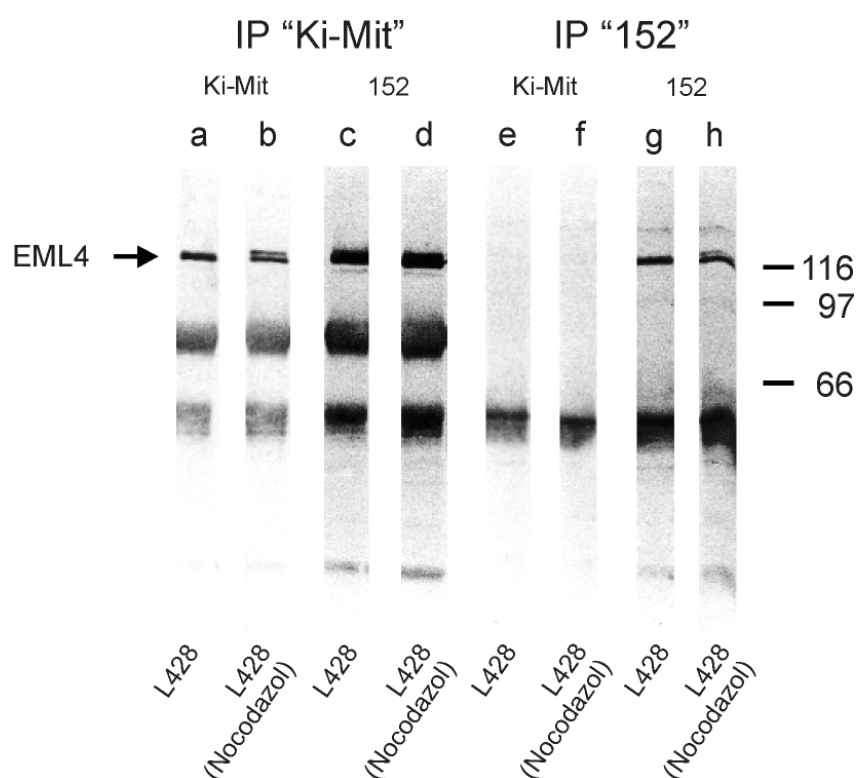
**Abb. 13:** Immunfluoreszenzfärbungen von mit PHA stimulierten L428-Zellen mit den monoklonalen Antikörpern "152" (B; grüne Fluoreszenz) und "Ki-Mit" (C; rote Fluoreszenz). Im Bildausschnitt sind eine mitotische Zelle (in B und C durch einen weißen Pfeil markiert) und eine Interphasezelle zu erkennen. "Ki-Mit" detektiert EML4 stark in der mitotischen Zelle, jedoch nur sehr schwach in der Interphasezelle. Der Antikörper "152" erkennt EML4 stärker in der Interphasezelle als in der Mitosezelle. Die DNA-Gegenfärbung erfolgte mit TOTO-3 (A; blaues Signal). Bild D zeigt die simultane Darstellung der verschiedenen Fluoreszenzen (TOTO-3, "152", "Ki-Mit").



### 3.3.4 Immunpräzipitation mit „Ki-Mit“ und „152“

Der direkte Vergleich der Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ in der Immunfluoreszenzmikroskopie offenbarte, daß *in vivo* anscheinend unterschiedliche Formen von EML4 existieren, deren Auftreten zellzyklusabhängig reguliert wird. Nun sollte untersucht werden, ob diese Formen auch nach Immunpräzipitation mit den Antikörpern „Ki-Mit“ und „152“ unterschieden werden können.

Hierzu wurden jeweils Immunpräzipitationen mit L428-Lysat und mit Lysat von mit Nocodazol behandelten L428-Zellen durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden anschließend sowohl mit „Ki-Mit“ als auch mit „152“ immungefärbt (Abb. 14). Der Versuch zeigte, daß der Antikörper „152“ an das von „Ki-Mit“ immunpräzipitierte EML4 bindet. Im Gegensatz dazu wird das von „152“ immunpräzipitierte EML4 nur extrem schwach von „Ki-Mit“ erkannt.



**Abb. 14:** Immunpräzipitationen (IP) mit den Antikörpern „Ki-Mit“ (a-d) und „152“ (e-f). Die Immunpräzipitationen wurden jeweils mit Lysat von unbehandelten und von mit Nocodazol arretierten L428-Zellen durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden anschließend mit „Ki-Mit“ (a, b, e, f) bzw. mit „152“ (c, d, g, h) immungefärbt. Beide Antikörper erkennen ihr eigenes Immunpräzipitat („Ki-Mit“: a, b / „152“: g, h). Darüberhinaus bindet „152“ an das von „Ki-Mit“ immunpräzipitierte EML4 (c, d). „Ki-Mit“ erkennt jedoch nur extrem schwach das EML4-Protein, welches von „152“ immunpräzipitiert wird (e, f).

### 3.4 Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen von EML4

Die unter Punkt 3.2.4 durchgeführten Immunpräzipitationen mit „Ki-Mit“ und „152“ untermauerten die These von der Existenz unterschiedlicher Formen bzw. Strukturen des EML4-Proteins. Während die von mAk „152“ detektierte Form während aller Zellzyklusphasen mit Übergewicht in der Interphase zu existieren scheint, beschränkt sich das Vorkommen der für „Ki-Mit“ spezifischen Form fast ausschließlich auf die Mitose. Die zu beobachtende Dynamik der Epitopausbildung spricht hierbei für eine spezifische, transiente Modifikation des EML4-Proteins, die in einer zellzyklusabhängigen Art und Weise reguliert wird. Da die bisherigen Versuche keine Hinweise auf das Vorkommen von alternativ gespleißten EML4-Transkripten geliefert hatten, schien es wahrscheinlich zu sein, daß es sich bei dieser Modifikation um eine posttranslationale Modifikation des Proteins handelt.

Solche sekundären Proteinmodifikationen, die erst nach der Biosynthese des Proteins, also posttranslational erfolgen, sind bei Eukaryonten weit verbreitet. Sie kommen in geringerem Maße aber auch bei Prokaryonten vor. Posttranslationale Modifikationen gewährleisten der Zelle eine dynamische und hochdifferenzielle Feinabstimmung bei der Regulation verschiedenster Prozesse wie z. B. bei der Signaltransduktion oder bei enzymatischen Reaktionen. Zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen zählen bei Eukaryonten die Proteinglykosylierung und -phosphorylierung.

Bei der Proteinglykosylierung wird das Zielmolekül über Asparagin-, Serin- oder Threoninreste mit Zuckerseitenketten versehen, die hauptsächlich aus N-Acetylglucosamin, Mannose und Glucose gebildet werden. Komplexere Seitenketten können zusätzlich Galactose, Sialinsäure oder Fucose enthalten. Die Proteinglykosylierung findet in der Zelle entweder im endoplasmatischen Reticulum (ER) (N-gekoppelte Glykosylierung) oder im Golgi-Apparat (O-gekoppelte Glykosylierung) statt. Eine computergestützte Analyse der EML4 Aminosäuresequenz (<http://www.expasy.ch>) sagt für das Protein 6 N-Glykosylierungsstellen voraus.

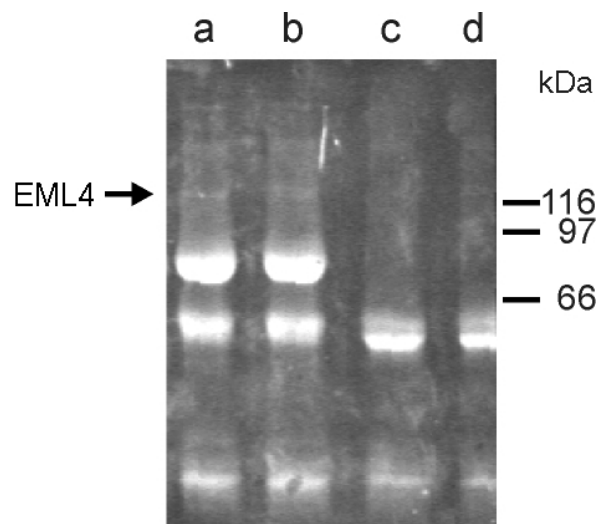
Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein reversibler Prozess, bei dem durch spezielle Enzyme, sogenannte Proteinkinasen, Phosphatgruppen vorwiegend auf Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste der Proteine übertragen werden. Bei Säugetieren liegen schätzungsweise mindestens 30 % aller Proteine zumindest zeitweise in einer ein- oder mehrfach phosphorylierten Form vor (Barford, 1999). Den mengenmäßig größten Anteil an Phosphorylierungen (> 99 %) nehmen dabei Phosphorylierungen von Serin- und Threoninresten ein, während der Anteil an tyrosinphosphorylierten Proteinen mit ca. 0,1 % verschwindend gering erscheint (Hunter und Sefton, 1980; Barford, 1999). Trotzdem kommt auch dieser Form der Phosphorylierung und den sie katalysierenden

Tyrosinkinase eine essentielle Rolle im Zellstoffwechsel zu. Der reversible Charakter von Proteinphosphorylierungen wird durch die antagonistisch wirkenden Phosphatase-Enzyme gewährleistet, die in der Lage sind, durch Hydrolyse Phosphatgruppen von phosphorylierten Aminosäureresten abzuspalten.

Um herauszufinden, ob die Diskrepanz der EML4-Detektion mit „Ki-Mit“ bzw. „152“ möglicherweise auf unterschiedliche Proteinglykosylierung oder -phosphorylierung zurückzuführen ist, war im folgenden geplant, Immunpräzipitate beider Antikörper bezüglich ihres Glykosylierungs- und Phosphorylierungsgrades zu vergleichen.

### 3.4.1 „Ki-Mit“ und „152“ binden an glykosyliertes EML4

Die Untersuchungen zur Glykosylierung des EML4-Proteins erfolgten mit Hilfe des *Pro-Q Emerald 300 Glycoprotein Blot Stain Kit* der Firma Molecular Probes (s. 2.7.8.2), mit dem sowohl N- als auch O-gekoppelte Glykosylketten von Proteinen erfasst werden. Es wurden Immunpräzipitate mit den Antikörpern „Ki-Mit“ bzw. „152“ aus Zellysat von unbehandelten und von mit Nocodazol arretierten L428-Zellen hergestellt und im SDS-Gel aufgetrennt. Nach Proteintransfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurden Glykoproteine durch Färbung nach dem Herstellerprotokoll nachgewiesen. Die Versuche zeigten, daß sowohl „Ki-Mit“ als auch „152“ glykosyliertes EML4-Protein immunpräzipitieren. Abbildung 15 zeigt repräsentativ die Färbung eines Immunpräzipitats von mAk „Ki-Mit“.



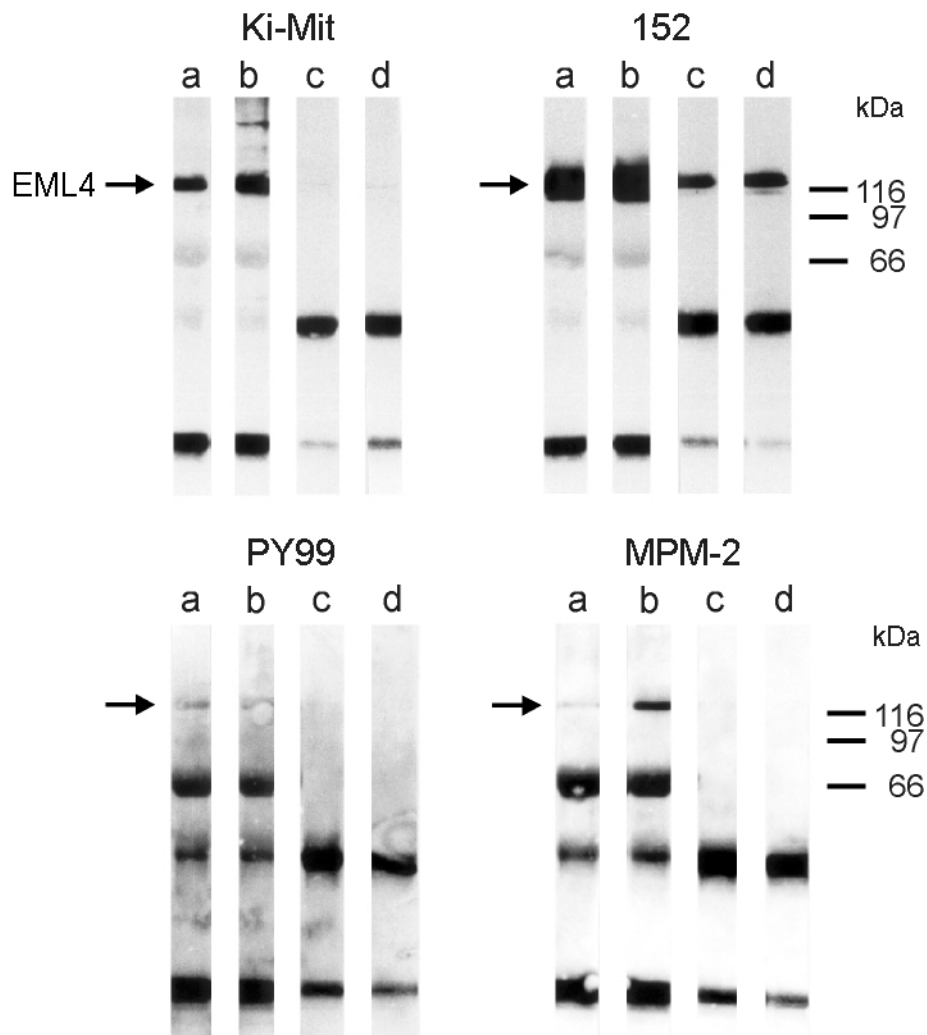
**Abb. 15:** Nachweis der Glykosylierung von EML4; Immunpräzipitate des Antikörper „Ki-Mit“ aus L428-Zellysat (a) bzw. aus Lysat von mit Nocodazol arretierten L428-Zellen (b) enthalten ein glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa (EML4). Bei Durchführung der Immunpräzipitationen ohne „Ki-Mit“ (c, d) ist dieses Protein nicht zu erkennen. Die übrigen sichtbaren Banden stellen schwere und leichte Immunglobulin-Ketten der für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper dar.

### 3.4.2 „Ki-Mit“ erkennt eine Phosphoform von EML4

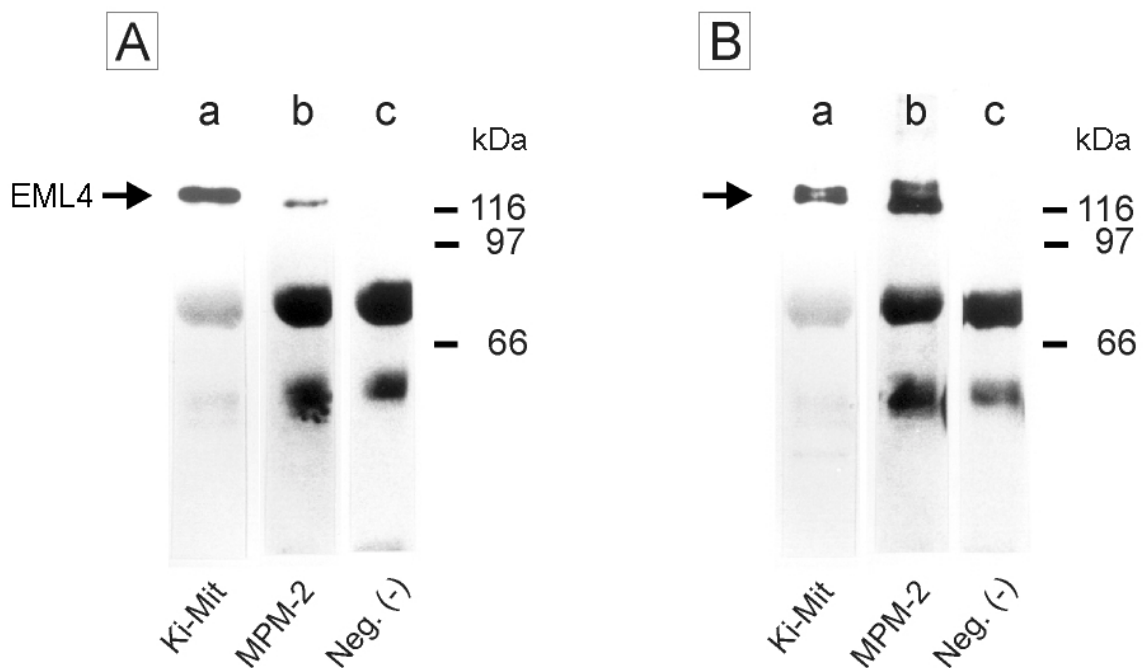
Für die Untersuchungen zur Phosphorylierung von EML4 wurden zwei verschiedene monoklonale Antikörper eingesetzt, die spezifisch für bestimmte Phosphoepitope sind. Der Antikörper „PY99“ (Santa Cruz Biotechnology) erkennt spezifisch phosphorylierte Tyrosinreste, während das minimale Epitop des Antikörpers „MPM-2“ (Upstate Biotechnology) aus phosphorylierten Serin- oder Threoninresten gefolgt von einem Prolinrest besteht (Ⓟ-Serin-Prolin/Ⓟ-Threonin-Prolin).

Zum Nachweis von Proteinphosphorylierungen wurden Immunpräzipitate der Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ mit den beiden genannten phosphorylierungsspezifischen Antikörpern immungefärbt (s. Abb. 16 a). Dabei zeigte sich, daß das von „Ki-Mit“ immunpräzipitierte EML4 sowohl phosphorylierte Serin-Prolin- bzw. Threonin-Prolin-Motive (detektiert durch „MPM-2“) als auch phosphorylierte Tyrosinreste (detektiert durch „PY99“) besitzt (Abb. 16 a). Darüberhinaus wird die Immunfärbung mit „MPM-2“ durch Nocodazolbehandlung, d. h. Anreicherung von mitotischen Zellen, intensiviert (Abb. 16 a und 16 b).

Im Gegensatz dazu verlaufen die Immunfärbungen des von mAk „152“ immunpräzipitierten EML4 mit „PY99“ und „MPM-2“ negativ (Abb. 16 a). Die Ergebnisse zeigen, daß offenbar unterschiedlich phosphorylierte Formen des EML4-Proteins existieren. Das von „Ki-Mit“ detektierte und immunpräzipitierte EML4 ist sowohl an Tyrosinresten als auch an Serin- und/oder Threoninresten phosphoryliert, während das von mAk „152“ präzipitierte EML4-Protein keine mit den verwendeten Antikörpern nachweisbare Phosphorylierung erkennen läßt. Nicht nachweisbar und deshalb von der Interpretation ausgenommen sind allerdings phosphorylierte Serin- und Threoninreste, auf die in der Proteinsequenz eine andere Aminosäure als Prolin folgt.



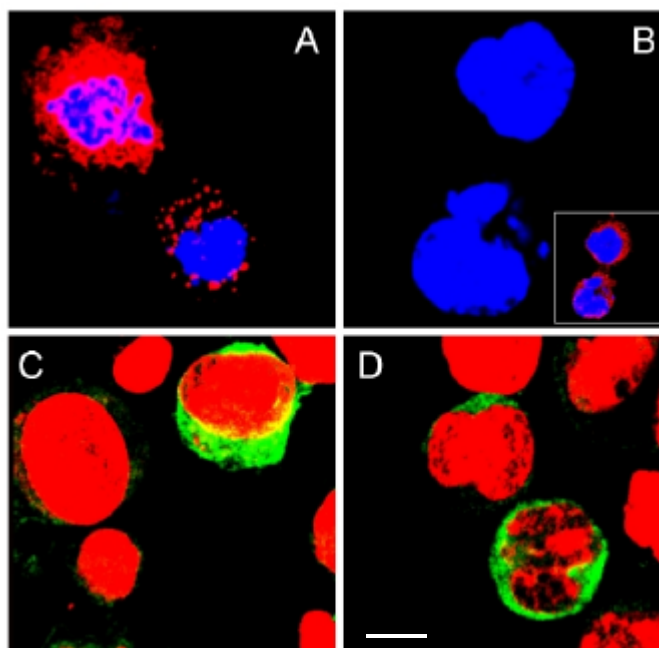
**Abb. 16 a:** Immunpräzipitation mit „Ki-Mit“ (a, b) und „152“ (c, d) aus Zytolysat von L428-Zellen (a, c) bzw. mit Nocodazol behandelten L428-Zellen (b, d). Die Immunpräzipitate wurden mit den Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern „PY99“ und „MPM-2“ sowie mit „Ki-Mit“ und „152“ immungefärbt. „PY99“ erkennt phosphorylierte Tyrosinreste, während „MPM-2“ spezifisch für phosphorylierte Serin-Prolin- und Threonin-Prolin-Motive ist. Das von „Ki-Mit“ immunpräzipitierte EML4 ist sowohl an Tyrosinresten als auch an Serin-Prolin/Threonin-Prolin-Motiven phosphoryliert. Beim Immunpräzipitat von „152“ lassen sich mit den verwendeten Antikörpern keine Phosphorylierungen nachweisen.



**Abb. 16 b:** „Ki-Mit“ Immunpräzipitate aus Lysat von L428-Zellen (A) bzw. Lysat von mit Nocodazol behandelten L428-Zellen (B) immungefärbt mit „Ki-Mit“ (a) und „MPM-2“ (b). Der Antikörper „MPM-2“ erkennt spezifisch Phosphoepitope bestehend aus einem phosphorylierten Serin-Prolin- oder Threonin-Prolin-Motiv. Als Negativkontrollen wurden Immunpräzipitationsansätze ohne „Ki-Mit“ verwendet (c). Obwohl die Bahnen A,b und B,b vergleichbare Mengen an EML4-Protein enthalten, was durch Immunfärbung mit „Ki-Mit“ gezeigt wird (A, a und B, a), wird EML4 aus mit Nocodazol behandelten L428-Zellen deutlich stärker durch „MPM-2“ angefärbt (B, b).

Die durch *in vitro*-Untersuchungen mit den phosphorylierungsspezifischen Antikörpern „PY99“ und „MPM-2“ gewonnenen Informationen sollten nachfolgend *in vivo* verifiziert werden. Es war geplant, durch Immunfluoreszenzmikroskopie von L428-Zellen zu testen, ob sich die Dephosphorylierung von endogenem EML4 auf die Bindung der Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ auswirkt.

Dazu wurden L428-Zellen vor der Inkubation mit „Ki-Mit“ bzw. „152“ mit Lambda Protein-Phosphatase ( $\lambda$ -PPase) behandelt (s. 2.8.6), einem Enzym, das Phosphatgruppen von Proteinen abspaltet. Die Protein-Dephosphorylierung hat zur Folge, daß mitotische Zellen von „Ki-Mit“ nur noch sehr schwach angefärbt werden. Nur im Falle einer starken Erhöhung der Empfindlichkeit des „Ki-Mit“-Farbkanals waren im Versuch noch Farbsignale detektierbar (Abb. 17). Im Gegensatz dazu wird die Bindung von mAk „152“ durch die Phosphatasebehandlung nicht beeinflusst. Als Kontrolle für die erfolgreiche Dephosphorylierung intrazellulärer Proteine wurden Immunfärbungen mit dem phosphorylierungsspezifischen Antikörper „MPM-2“ durchgeführt.



**Abb. 17:** Immunfärbung von L428-Zellen mit „Ki-Mit“ (A, B) bzw. „152“ (C, D). In B und D wurden die Zellen nach der Fixierung und vor der Inkubation mit den Antikörpern mit Lambda Protein-Phosphatase ( $\lambda$ -PPase; New England Biolabs) behandelt. „Ki-Mit“ bindet nach der Phosphatasebehandlung nur noch sehr schwach (B). Ein Signal ist nur bei starker Erhöhung der Empfindlichkeit zu detektieren (Ausschnitt in B). Dagegen wirkt sich die Phosphatasebehandlung nicht hemmend auf die Bindung von mAk „152“ an EML4 aus (D). Der weiße Strich entspricht 10  $\mu$ m (D).

### 3.5 Charakterisierung der Epitope von „Ki-Mit“ und „152“

Wie bereits gezeigt wurde, sind die monoklonalen Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ gegen das gleiche Antigen (EML4) gerichtet. Dennoch zeigten sie in den bisherigen Versuchen deutliche Unterschiede im direkten Vergleich.

Der zuerst etablierte Antikörper „Ki-Mit“ bindet hauptsächlich an mitotisches EML4, was anfänglich den Eindruck vermittelte, als sei das Protein in der Mitose signifikant überexprimiert. Versuche mit dem monoklonalen Antikörper „152“ relativierten diesen Eindruck jedoch. Es konnte gezeigt werden, daß auch Interphasezellen vergleichbare Mengen an EML4-Protein enthalten. Dieses wird aber offenbar nur schwach von „Ki-Mit“ erkannt. Zu diesem Befund paßt die Tatsache, daß „Ki-Mit“ nur bedingt in der Lage ist, an EML4 zu binden, sofern dieses mit mAk „152“ immunpräzipitiert wird. Ferner ist zu beobachten, daß das von „152“ immunpräzipitierte EML4 nicht phosphoryliert ist (weder an Tyrosinresten noch an Serin/Threonin-Prolin-Motiven). Dagegen sind beide genannten Phosphorylierungen bei EML4 aus „Ki-Mit“-Immunpräzipitationen nachweisbar.

Alle genannten Aspekte sprechen dafür, daß in Abhängigkeit von der Wahl des Antikörpers offenbar unterschiedliche EML4-Formen nachgewiesen werden. Daraus folgt

die Konsequenz, daß beide Antikörper voneinander abweichende Epitope auf dem EML4-Protein erkennen müssen. Außerdem muß das „Ki-Mit“-Epitop so beschaffen sein, daß es beim Eintritt in die Mitose transient verändert werden kann. Zur Charakterisierung der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung von „Ki-Mit“ bzw. „152“ mit EML4, sollten die spezifischen Antikörperepitope auf dem EML4-Protein im folgenden identifiziert und lokalisiert werden.

### 3.5.1 Bakterielle Genexpression verschiedener EML4-Fragmente

Um erste Informationen über die Lage der Antikörperepitope innerhalb der EML4-Sequenz zu erhalten, war geplant, drei verschiedene Fragmente vom N-Terminus, dem mittleren Bereich bzw. vom C-Terminus des EML4-Proteins bakteriell zu exprimieren und auf Antigenität in Bezug auf „Ki-Mit“ und „152“ zu prüfen. Hierzu wurden zunächst die entsprechenden EML4 cDNA-Fragmente durch PCR amplifiziert. Die PCR-Primer wurden dabei so entworfen, daß sie für die spätere Klonierung in den Vektor pGEX-5X-1 geeignete Restriktionsschnittstellen enthielten (5'-Primer: *Bam* HI; 3'-Primer: *Sal* I). Die genauen Primerkombinationen sind Tabelle 6 zu entnehmen. Weiterhin wurden die einzelnen Fragmente so ausgewählt, daß sie untereinander um jeweils sieben Aminosäuren überlappen. Hierdurch wurde sichergestellt, daß die komplette Proteinsequenz von EML4 von den exprimierten Fragmenten lückenlos abgedeckt wird.

EML4-Protein-fragment	Aminosäuren	Name des 5'-Primers	Name des 3'-Primers
N-Terminus	1-249	KiMitfulrGST	RoppNtermRev
mittl. Fragment	243-858	KiMitBamHI	KiMitSalI
C-Terminus	852-981	RoppCtermFor	KiMitfulrGST

**Tab. 6:** Auflistung der als GST-Fusionsproteine bakteriell exprimierten EML4-Fragmente und der zugehörigen Primer, die zur Amplifikation der korrespondierenden cDNA-Fragmente verwendet wurden. Die 5'-Primer enthalten jeweils eine *Bam* HI-Schnittstelle, die 3'-Primer jeweils eine *Sal* I-Erkennungssequenz. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind Punkt 2.4.3 zu entnehmen. Die Primer wurden so gewählt, daß die bakteriell exprimierten Fragmente um jeweils sieben Aminosäuren überlappen.

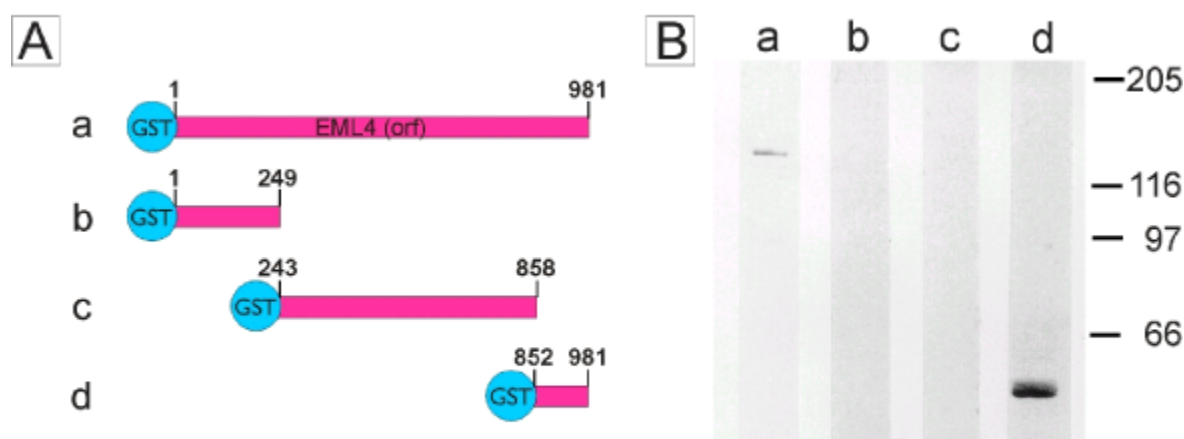
Nach der Restriktion der PCR-Produkte mit *Bam* HI und *Sal* I erfolgte die Ligation in den Vektor für die bakterielle Genexpression von GST-Fusionsproteinen pGEX-5X-1, jeweils unter Beachtung des vorgegebenen offenen Leserasters. Die klonierten DNA-„Inserts“ und



die „Insert“-Vektor-Übergänge am 5'- und am 3'-Ende der „Inserts“ wurden vor der Durchführung der bakteriellen Expression durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Nach der Transformation der verschiedenen Konstrukte in *E. coli* erfolgte die bakterielle Genexpression wie unter 2.6.15 beschrieben. Die GST-Fusionsproteine wurden aufgereinigt und nach SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Mit Hilfe eines anti-GST Antikörpers wurde zunächst die Größe der exprimierten Fusionsproteine verifiziert, bevor Immunfärbungen mit „Ki-Mit“ bzw. „152“ durchgeführt wurden (Abb. 18).

Es zeigte sich, daß sowohl „Ki-Mit“ als auch „152“ neben dem kompletten GST-EML4 (GST-EML4<sub>orf</sub>) nur das carboxyterminale GST-Fusionsprotein erkennen. Dieses enthält eine EML4-spezifische Sequenz der Aminosäuren 852-981. Die Epitope der Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ befinden sich folglich beide am Carboxyterminus des EML4-Proteins im genannten Bereich.



**Abb. 18:** Bakterielle Expression verschiedener EML4-Fragmente als GST-Fusionsproteine.

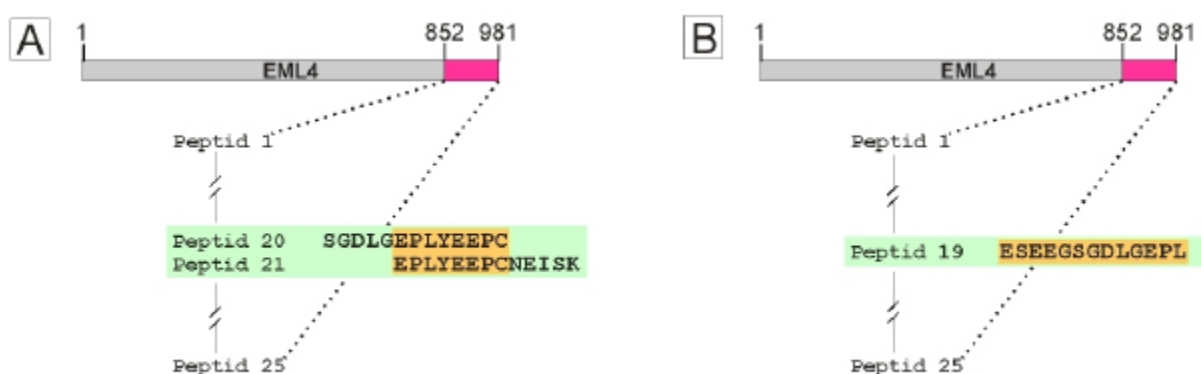
A: schematische Darstellung der exprimierten Fragmente mit Angabe der entsprechenden Aminosäuren (a: EML4<sub>orf</sub>; AS 1-981 / b: EML4 N-Terminus; AS 1-249 / c: EML4 Mittelfragment; AS 243-858 / d: EML4 C-Terminus; AS 852-981)

B: Western Blot der bakteriell exprimierten Proteine immungefärbt mit mAk „Ki-Mit“; der Antikörper erkennt neben dem vollständigen EML4 (EML4<sub>orf</sub>; a) nur das C-terminale Fragment von Aminosäure 852-981 (d). Die Immunfärbung mit „152“ liefert identische Ergebnisse (ohne Abbildung).

### 3.5.2 „Screening“ des EML4 C-Terminus

Die C-terminale Region des EML4-Proteins (AS 852-981), die sich nach der bakteriellen Expression als reaktiv mit „Ki-Mit“ und „152“ erwies, sollte nachfolgend detaillierter analysiert werden. Die experimentelle Strategie bestand darin, den entsprechenden Bereich des EML4-Proteins in sequenzüberlappende Peptide aufzuschlüsseln, welche anschließend immobilisiert auf einer Membran mit den Antikörpern „Ki-Mit“ und „152“ auf Antigenität getestet werden sollten („screening“). Eine derart konstruierte Membran („Pepspot“-Membran) wurde von der Firma Jerini AG bezogen. Die Membran enthält insgesamt 25 untereinander überlappende EML4-spezifische Peptide von jeweils 13 Aminosäuren Länge. Die Überlappung der einzelnen Peptide beträgt jeweils 8 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptide sind unter Punkt 2.5.1 aufgeführt.

Zunächst wurde die „Pepspot“-Membran mit mAk „Ki-Mit“ inkubiert, wobei sich herausstellte, daß „Ki-Mit“ nur an zwei der insgesamt 25 Peptide bindet. Dies sind die Peptide 20 und 21 (Abb. 19). Die von beiden Peptiden geteilte überlappende Region bestehend aus der Konsensussequenz „EPLYEEPC“ kann folglich als maximales „Ki-Mit“-Epitop betrachtet werden. Der Antikörper „152“ detektiert hingegen ausschließlich das in N-terminaler Richtung unmittelbar angrenzende Peptid 19 mit der Aminosäuresequenz „ESEEGSGDLGEPL“ (Abb. 19). Interessanterweise sind die letzten drei Aminosäuren dieses Motivs („EPL“) schon Bestandteil des „Ki-Mit“-Epitops.



**Abb. 19:** Schema des „Screenings“ der „Pepspot“-Membran, die den EML4 C-Terminus (AS 852-981) enthält, mit den Antikörpern „Ki-Mit“ (A) und „152“ (B). „Ki-Mit“ detektiert die untereinander überlappenden Peptide 20 und 21, welche die Konsensussequenz „EPLYEEPC“ besitzen. Dagegen bindet „152“ ausschließlich an das Peptid 19 mit der Sequenz „ESEEGSGDLGEPL“.

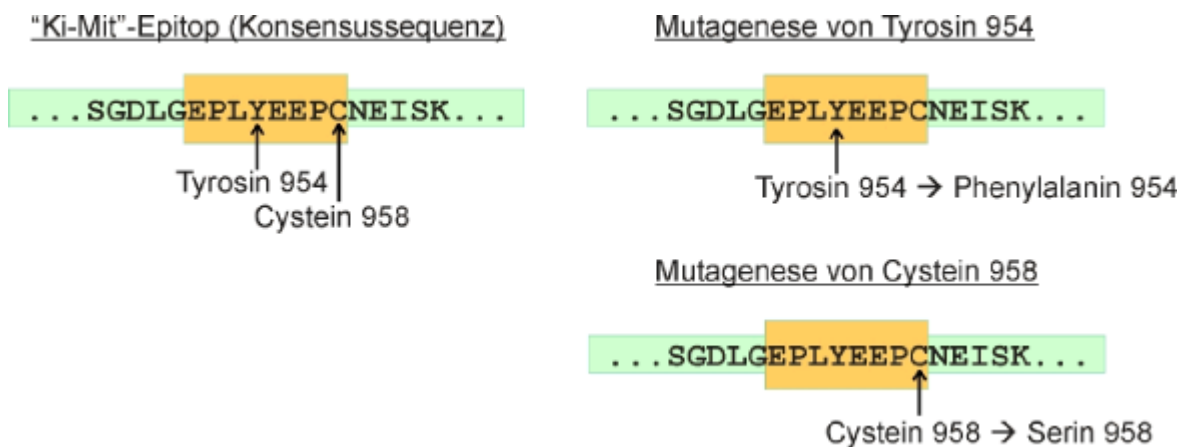
### 3.5.3 Gerichtete Mutagenese des „Ki-Mit“-Epitops

Durch das „Screening“ der „Pepspot“-Membran (s. 3.5.2) konnten die maximalen Epitope der Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ innerhalb des EML4 C-Terminus ermittelt werden. Das „Ki-Mit“-Epitop besteht demnach aus einem acht Aminosäuren umfassenden Proteinabschnitt, mit der Sequenz „EPLYEEPC“ (EML4-Aminosäuren 951-958). Das Epitop des Antikörpers „152“ konnte durch das „Screening“ auf eine Sequenz von 13 Aminosäuren eingegrenzt werden („ESEEGSGDLGEPL“; EML4-Aminosäuren 941-953). Diese Sequenz schließt unmittelbar an das „Ki-Mit“-Epitop in N-terminaler Richtung an und hat mit dem „Ki-Mit“-Epitop sogar drei Aminosäuren („EPL“) gemeinsam.

Bei Betrachtung des „Ki-Mit“-Epitops „EPLYEEPC“ fällt auf, daß es zwei potentielle Angriffspunkte für posttranslationale Modifikationen enthält. Zum einen besteht die Möglichkeit der Tyrosinphosphorylierung von Aminosäurerest 954 (Y<sub>954</sub>), zum anderen könnte das EML4-Protein über das im Epitop enthaltene Cystein (C<sub>958</sub>) über Disulfidbrückenbildung posttranslational modifiziert werden. Eine computergestützte Analyse (<http://scansite.mit.edu>) des „Ki-Mit“-Epitops sagte für das in der Sequenz enthaltene Tyrosin (Y<sub>954</sub>) mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Phosphorylierung voraus.

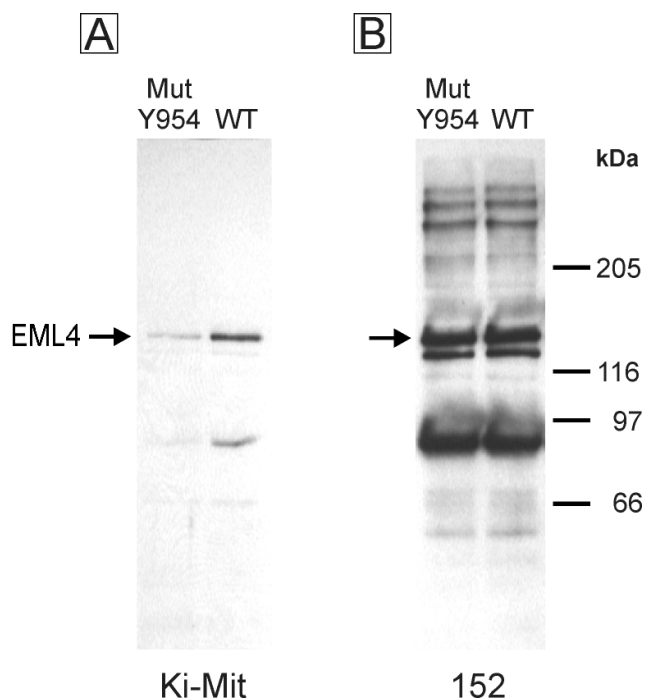
Die Vorhersage einer posttranslationalen Modifikation des Tyrosinrests Y<sub>954</sub> sowie die Existenz eines modifizierbaren Cysteinrests (C<sub>958</sub>) im „Ki-Mit“-Epitop, ließen es wahrscheinlich erscheinen, daß einer oder sogar beide der genannten Aminosäurereste eine Schlüsselrolle in der Ausbildung des „Ki-Mit“-Epitops spielen.

Beide Aminosäurereste sollten daher im folgenden durch gerichtete Mutagenese gegen andere Reste ausgetauscht werden, die zwar strukturell verwandt sind, jedoch nicht mehr durch Phosphorylierung bzw. Disulfidbrückenbildung modifizierbar sind. Unter Berücksichtigung der strukturellen Ähnlichkeit war geplant, den Tyrosinrest (Y<sub>954</sub>) durch einen Phenylalaninrest (F<sub>954</sub>), sowie in einer zweiten Mutagenesereaktion den Cysteinrest (C<sub>958</sub>) durch einen Serinrest (S<sub>958</sub>) zu substituieren (Abb. 20). Da beide EML4-Mutanten für die nachfolgenden Bindungsstudien bakteriell exprimiert werden sollten, wurde als Template für die Mutagenese das Konstrukt für die bakterielle Genexpression EML4<sub>orf</sub>/pGEX-5X-1 mit der für den Wildtyp spezifischen EML4-cDNA verwendet. Die Mutageneseprimer (s. 2.4.3; R120MutY954f und R120MutY954r für den Austausch von Y<sub>954</sub> bzw. R120MutC958f und R120MutC958r für den Austausch von C<sub>958</sub>) wurden so entworfen, daß sie gezielt diejenigen Kodons verändern, die für die auszutauschenden Aminosäuren kodieren.



**Abb. 20:** Schematische Darstellung der gerichteten Mutagenese von EML4. Die möglichen Ziele posttranslationaler Modifikationen (Tyrosin 954, Cystein 958) innerhalb des „Ki-Mit“-Epitops wurden separat gegen strukturell ähnliche Aminosäurereste (Phenylalanin, Serin) ausgetauscht.

Nach der Durchführung der Mutagenesereaktionen mit dem *QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft, ob die beabsichtigten Nukleotidaustausche tatsächlich stattgefunden hatten. Sofern dies der Fall war, erfolgte anschließend die Transformation der mutierten EML4<sub>orf</sub>/pGEX-5X-1 Konstrukte in *Escherichia coli* zur bakteriellen Expression von mutiertem EML4-Protein. Die mutierten GST-EML4<sub>orf</sub> Fusionsproteine wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch „Western blotting“ auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die folgende Immunfärbung mit „Ki-Mit“ zeigte, daß der Austausch von Tyrosin 954 eine drastische Abschwächung der Antikörper-Antigen-Reaktion zur Folge hat (Abb. 21). Eine densitometrische Auswertung der Signale mit Hilfe der *Gel Doc*-Anlage (Bio-Rad) ergab, daß die prozentuale Bindungsstärke von „Ki-Mit“ an die Y<sub>954</sub>-Mutante nur etwa 10-15 % im Vergleich zum EML4-Wildtyp beträgt. Daß der beobachtete Effekt als spezifisch einzustufen ist, zeigte die Immunfärbung der C<sub>958</sub>-Mutante von EML4. Diese führte zu keinerlei Beeinträchtigung der Bindungsfähigkeit von „Ki-Mit“ an sein Antigen EML4.



**Abb. 21:** Western Blot der bakteriell exprimierten EML4-Tyrosinmutante (MutY954) und des EML4-Wildtyps (WT) immungefärbt mit „Ki-Mit“ (A) bzw. „152“ (B). Die Substitution des Tyrosinrests 954 durch einen Phenylalaninrest führt zu einer Abschwächung der „Ki-Mit“-Bindung um 85-90 % im Vergleich zum EML4-Wildtyp. Die Immunfärbung mit mAk „152“ (B) zeigt, daß vergleichbare Proteinmengen der Tyrosinmutante und des Wildtyps aufgetragen wurden.

Neuere Versuche weisen darauf hin, daß der Phosphorylierungszustand des Tyrosins 954 von entscheidender Bedeutung für die „Ki-Mit“-Bindung ist. Wenn „Ki-Mit“ vor einer immunfluoreszenzmikroskopischen Färbung mit einem synthetischen Peptid (Jerini AG) mit der Aminosäurefolge „LGEPLYEPCNEI“ (das „Ki-Mit“-Epitop ist fett gedruckt) präinkubiert wird, so wird die Anfärbung mitotischer Zellen signifikant abgeschwächt. Dies geschieht aber nur dann, wenn der im Peptid enthaltene Tyrosinrest nicht phosphoryliert ist. Im Gegensatz dazu beeinflußt die Präinkubation mit einer am Tyrosinrest phosphorylierten Form des Peptids die Detektion des intrazellulären EML4 nicht.

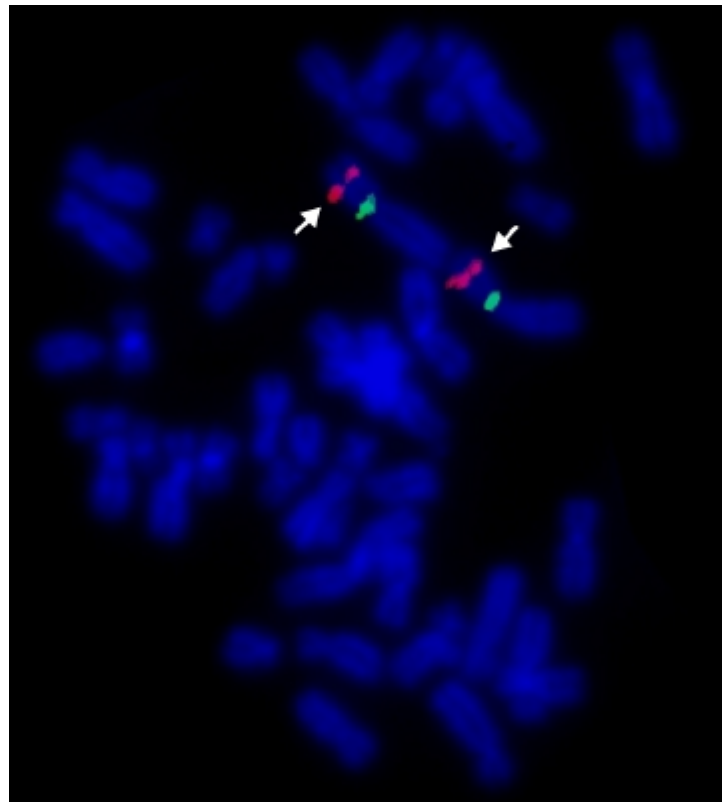
## 3.6 Genomische Organisation von EML4

### 3.6.1 Chromosomale Lokalisation des EML4-Gens

Für die Bestimmung der chromosomalen Lokalisation des EML4-Gens war die Durchführung einer Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) humaner Metaphasechromosomen geplant. Durch „Screening“ der isolierten Chromosomen mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten, für EML4 spezifischen DNA-Fragment (Sonde) sollte derjenige Chromosomenabschnitt identifiziert werden, welcher das Gen von EML4 enthält. Die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. R. Siebert vom *Institut für Humangenetik* der Universitätsklinik Kiel durchgeführt.

Als Hybridisierungssonde wurde ein biotinylierter PAC-Vektor (LLNLP708B052Q3; Ressourcen Zentrum/Primäre Datenbank, Berlin, Deutschland) eingesetzt, welcher ein Insert mit genomischer DNA von EML4 enthält. Dieser PAC-Vektor wurde durch Datenbanksuche mit der cDNA-Sequenz von EML4 identifiziert. Das Vorhandensein von für EML4 spezifischen Sequenzabschnitten wurde vor der Durchführung der *in situ*-Hybridisierung durch eigene Sequenzierungen des PAC-Klons bestätigt. Weil durch bereits in Datenbanken hinterlegte genomische Sequenzen ersichtlich war, daß sich das EML4-Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf dem humanen Chromosom 2 befindet, wurde als interne Kontrolle für das FISH-Experiment eine für das Chromosom 2 spezifische Zentromersonde (Oncor, Gaithersburg, MD, USA) verwendet.

Die Auswertung der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung ergab, daß die PAC-Sonde mit der chromosomalen Region 2p22-p21 auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 hybridisiert (Abb. 22). Laut Genkartierungen, welche inzwischen im Rahmen der Sequenzierung und Kartierung des humanen Genoms durchgeführt wurden, befindet sich das Gen für EML4 zwischen den genetischen Markern D2S177-D2S337 („National Center for Biotechnology Information“; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; GM99-GB4 Map). Die physikalische Distanz des Gens von der Spitze von Chromosom 2 wird mit 62,8 bis 84,1 cM angegeben. Die offizielle vom „Human Gene Nomenclature Committee“ vergebene Bezeichnung für das EML4-Gen lautet C2orf2 („Chromosome 2 open reading frame 2“).



**Abb. 22:** Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) humaner Metaphasechromosomen zur Lokalisation des EML4-Gens. Die rote Fluoreszenz stellt die biotinmarkierte, genomische EML4-Sonde (LLNLP708B052Q3), detektiert mit Streptavidin-Cy3 dar. Das grüne Signal entspricht der Digoxigeninmarkierten Zentromersonde für Chromosom 2 (Oncor), detektiert mit anti-DIG-FITC. Die Gegenfärbung der DNA erfolgte mit DAPI (blaues Signal). Das EML4-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p22-p21; markiert durch weiße Pfeile). Das abgebildete Foto wurde in der Zeitschrift „Genomics“ publiziert (Heidebrecht et al., 2000).

### 3.6.2 Exon-Intron-Struktur des EML4-Gens

Im Zuge der Sequenzierung des humanen Genoms wurde auch diejenige chromosomale Region analysiert, welche das EML4-Gen einschließt. Die Sequenz wurde u. a. in der öffentlich zugänglichen Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Zugriffsnummer NT\_031753.1) hinterlegt.

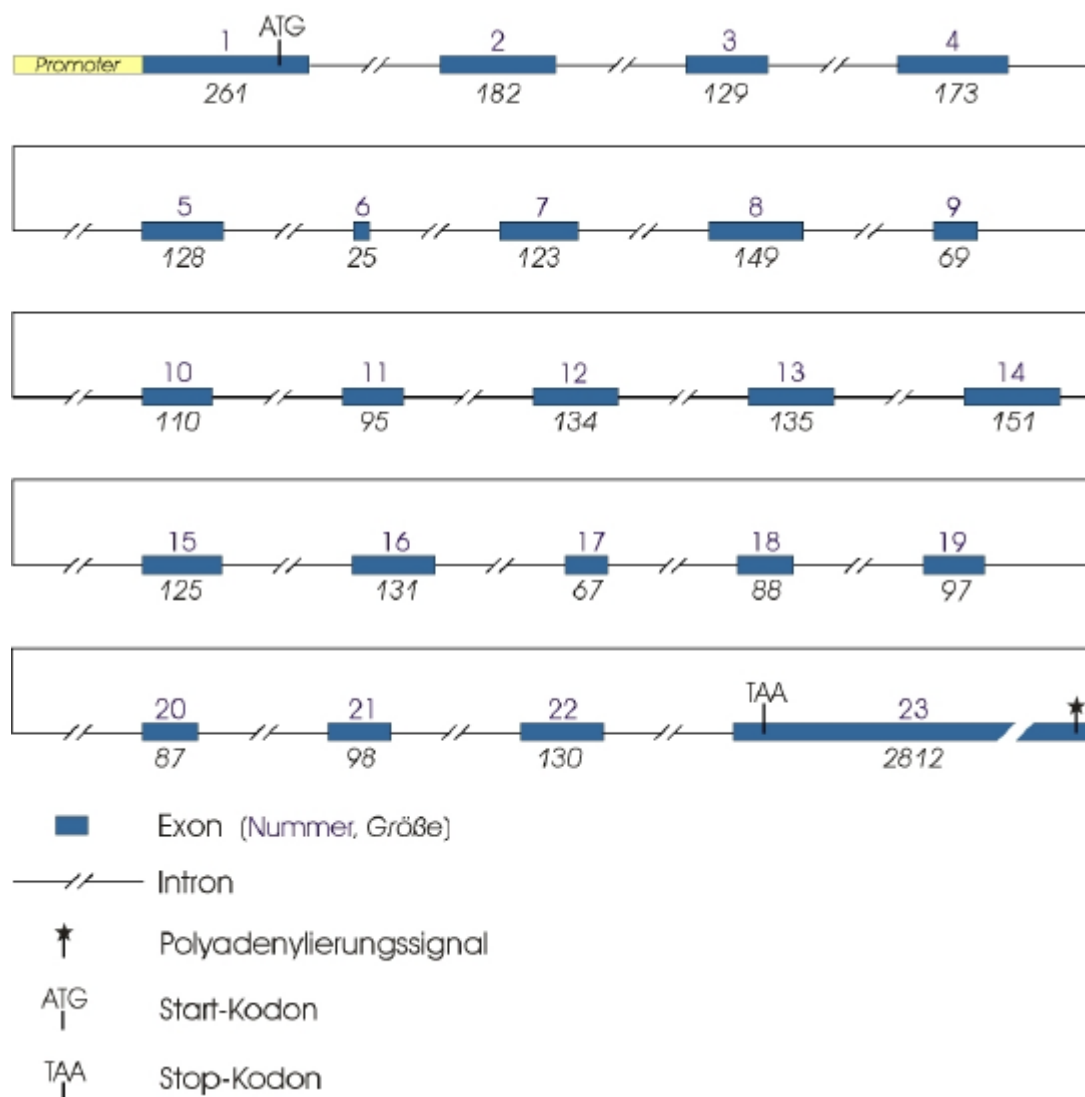
Führt man gegen diese genomische EML4-Sequenz ein „Alignment“ mit der 5539 bp mRNA-Sequenz von EML4 durch, so erschließt sich die Exon-Intron-Struktur des Gens. Demnach sind alle Sequenzabschnitte, die sowohl innerhalb der genomischen Sequenz als auch auf der mRNA auftreten, exonisch. Dagegen sind Sequenzen, die nur in genomischer Form existieren, als intronisch anzusehen.

Laut „Alignment“ ist das EML4-Gen in 23 Exons und 22 Introns organisiert (Abb. 23). Die Längen der Exons variieren zwischen 25-2812 Nukleotiden, die Gesamtlänge des Gens

---

beträgt 163.176 bp vom Transkriptionsstart der RNA bis zum Beginn der Poly(A)-Sequenz. Verschiedene computerbasierte Analyseprogramme (z. B. <http://anthea.gsf.de/>; [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) sagen für die genomische Sequenz, die sich stromaufwärts des kartierten Transkriptionsstarts befindet, eine Promotoraktivität voraus. Die vermeintliche Promotorsequenz hätte demnach einen hohen GC-Anteil, was häufig bei Genen vorkommt, die konstitutiv exprimiert werden. Man bezeichnet solche Gene als Haushaltsgene. Dagegen fehlen in der vorhergesagten Promotorsequenz von EML4 Elemente wie eine TATA-Box oder eine CAAT-Box, die charakteristisch sind für transkriptionsregulierte Gene. Da sowohl die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunfärbungen, als auch die Sequenzanalyse des potentiellen Promotors für eine konstitutive Expression von EML4 während des gesamten Zellzyklus sprechen, wurde auf eine detaillierte Analyse des Promotors verzichtet. Diese wäre dann von Interesse, wenn die Transkription des Gens in einer zellzyklusabhängigen Art und Weise gesteuert werden würde. In diesem Fall würde die Identifizierung von aktiven Promotorelementen (cis-Regulation) und von an den Promotor bindenden Transkriptionsfaktoren (trans-Regulation) Hinweise auf den Mechanismus der Regulation liefern.





**Abb. 23:** Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur des EML4-Gens anhand der vom humanen Genomprojekt veröffentlichten Sequenzdaten von Chromosom 2. Das Gen von EML4 ist in 23 Exons organisiert, die in ihrer Länge zwischen 25 und 2812 Nukleotiden variieren. Die Gesamtlänge des Gens beträgt etwa 163 Kilobasen. Das Start-Kodon für die Translation des EML4-Proteins befindet sich am 3'-Ende von Exon 1. Das Stop-Kodon, welches die Translation terminiert, ist innerhalb von Exon 23 lokalisiert. Eine computergestützte Sequenzanalyse sagt die Existenz eines GC-reichen Promotors stromaufwärts des Transkriptionsstarts voraus.

### 3.7 EML4 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP)

Die Einordnung des „Ki-Mit“-Antigens EML4 in die Gruppe der EMAP-ähnlichen Proteine erfolgte unter Punkt 3.2.3 bislang ausschließlich aufgrund gemeinsamer Sequenzmerkmale und Proteinmotive, die das Protein mit anderen, bereits bekannten Proteinen teilt. Diese Proteine sind zum Großteil bereits *in vivo* oder *in vitro* als an Tubulin

bindend charakterisiert worden und fallen deshalb in die große Gruppe der MAPs (Mikrotubuli-assoziierte Proteine). Alle Proteine, die in der Lage sind an Mikrotubuli zu binden, werden per Definition als MAPs bezeichnet. Die Dauer der Interaktion ist dabei für die Einordnung in diese Proteingruppe nicht relevant. Von vielen der bisher bekannten MAPs weiß man, daß sie nur transient mit den Mikrotubuli assoziiert sind. Man unterscheidet generell drei verschiedene Klassen von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen:

- Die *strukturellen MAPs* unterstützen den Zusammenbau und Abbau von Mikrotubuli (MT) und regulieren dadurch die MT-Dynamik. Sie können aber auch Verbindungen zu den anderen Komponenten des Zytoskeletts (Aktin- und Intermediärfilamente) herstellen.
- Die sog. *Motorproteine* sind MAPs, welche durch gerichtete Bewegung entlang der MT Moleküle und Vesikel zu bestimmten Zellorkompartimenten transportieren können. Zu den Motorproteinen gehören die Dyneine und die Kinesine.
- Schließlich gibt es noch *Enzyme und Signaltransduktions-assoziierte Proteine* (z. B. Proteinkinasen), welche an MT binden können.

Die Sequenzhomologie des EML4-Proteins zu den z. T. als Tubulin-bindend beschriebenen EMAP-ähnlichen Proteinen, legte die Vermutung nahe, daß auch EML4 direkt mit Mikrotubuli assoziiert sein könnte. Um dies zu überprüfen, sollte im folgenden ein *in vitro*-Test auf Interaktion von EML4 mit Tubulin durchgeführt werden.

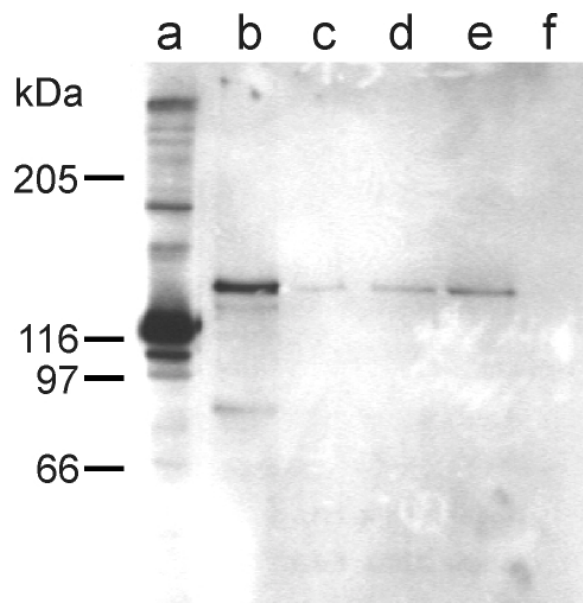
### **3.7.1 *In vitro*-Interaktion von EML4 und Tubulin – „Spin-Down Assay“ für Mikrotubuli-assoziierte Proteine**

Für die Durchführung des Interaktionstests wurde das *Microtubule Associated protein (MAP) Spin-Down Assay Kit* der Firma Cytoskeleton (Denver, USA) verwendet (s. 2.7.9). Das Prinzip des Kits beruht auf einer *in vitro*-Polymerisation von Mikrotubuli, die anschließend mit dem zu testenden Protein inkubiert werden. Findet eine Interaktion des Testproteins mit den Mikrotubuli statt, so kommt es während eines Ultrazentrifugationsschrittes zu einer Kosedimentation von Tubulin und dem Testprotein. Dagegen ist der Test als negativ zu beurteilen, wenn das Testprotein nach der Zentrifugation nicht im Pellet nachweisbar ist.

Für den Test auf Tubulinbindung von EML4 wurde bakteriell exprimiertes EML4-Protein voller Länge (GST-EML4<sub>orf</sub>) in verschiedenen relativen Konzentrationen (10, 20 und 30 µl) eingesetzt. Nach Zentrifugation der potentiellen EML4-Tubulin-Komplexe erfolgte die Auftrennung der Pellets unter denaturierenden Bedingungen im SDS-Gel.

Kosedimentiertes EML4-Protein wurde nach Western Blot-Proteintransfer durch Immunfärbung mit mAk „152“ nachgewiesen.

Der Versuch zeigte, daß rekombinantes EML4-Protein *in vitro* an polymerisierte und mit Taxol stabilisierte Mikrotubuli binden kann. Relativ zur eingesetzten Menge an bakteriell exprimiertem EML4 läßt sich kosedimentiertes EML4 im Pellet nachweisen (Abb. 24). Daß es sich hierbei um eine Mikrotubuli-abhängige Pelletierung des EML4-Proteins handelt, zeigt die Negativkontrolle, bei welcher der Zentrifugationsschritt in Abwesenheit von Mikrotubuli erfolgt. Hierbei läßt sich hinterher kein EML4 im Pellet nachweisen.



**Abb. 24:** „Spin-Down Assay“ für Mikrotubuli-assoziierte Proteine. Bakteriell exprimiertes GST-EML4<sub>orf</sub> (c: 10 µl, d: 20 µl, e: 30 µl) kosedimentiert bei Ultrazentrifugation mit *in vitro* polymerisierten Mikrotubuli. Dagegen liefert eine Zentrifugation von 30 µl rekombinantem EML4 in Abwesenheit von Tubulin ein negatives Versuchsergebnis (f, Negativkontrolle). Die Immunfärbung erfolgte mit mAk „152“. Weitere Kontrollen: a: L428-Zytolysat / b: GST-EML4<sub>orf</sub>

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem humanen 120 kDa-Protein EML4, welches mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers „Ki-Mit“ entdeckt wurde. „Ki-Mit“ erkennt EML4 stark in mitotischen Zellen und nur schwach in Interphasezellen. Aus Lysat der humanen Zelllinie L428 wurde EML4 immunaffinitätschromatographisch aufgereinigt und ansequenziert. Datenbankrecherchen mit den ermittelten Sequenzdaten ergaben, daß es sich um ein bislang unbekanntes Protein handelt. Nach Klonierung und Sequenzierung der cDNA von EML4 konnte das Protein aufgrund signifikanter Sequenzhomologien der Familie der EMAP-ähnlichen Proteine zugeordnet werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gaben Aufschluß über die subzelluläre Verteilung von EML4 während des Zellzyklus. Durch Immunisierung mit bakteriell exprimiertem EML4 konnte ein weiterer monoklonaler Antikörper („152“; IgG<sub>1</sub>) spezifisch für EML4 hergestellt werden. Darüberhinaus konnten die spezifischen Epitope beider anti-EML4 Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ innerhalb der EML4-Proteinsequenz durch Expression von EML4-Fragmenten und Peptid-„Screening“-Experimente ermittelt werden. Die Untersuchungen von posttranslationalen Modifikationen des EML4-Proteins ergaben, daß das Protein *in vivo* in der Mitose sowohl an Tyrosin-, als auch Serin- bzw. Threoninresten phosphoryliert wird. Ferner konnte gezeigt werden, daß EML4 in allen Zellzyklusphasen glykosyliert ist. Schließlich konnten mit Hilfe eines *in vitro*-Bindungstests polymerisierte Mikrotubuli als ein Interaktionspartner von EML4 identifiziert werden.

### 4.1 Die für EML4 spezifischen Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ im Vergleich

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei spezifisch gegen EML4 gerichteten monoklonalen Antikörpern gearbeitet. Der Antikörper „Ki-Mit“ (IgM) ging aus Immunisierungen einer Maus mit Lysat der humanen Hodgkin-Lymphom Zelllinie L428 hervor. Anders als „Ki-Mit“ entstand der Antikörper „152“ (IgG<sub>1</sub>) durch Immunisierungen mit bakteriell exprimiertem GST-EML4.

Obwohl „Ki-Mit“ und „152“ spezifisch für das gleiche Antigen sind, zeigen sie im immunzytochemischen Vergleich deutliche Unterschiede. So reagiert der Antikörper „Ki-Mit“ überwiegend mit mitotischen Zellen und nur schwach mit Interphasezellen. Im Gegensatz dazu erkennt der Antikörper „152“ EML4 *in vivo* hauptsächlich während der Interphase und vergleichsweise schwächer in mitotischen Zellen.

Alternativ gespleißte Proteinvarianten kommen für die Erklärung der Diskrepanzen aus zwei Gründen nicht in Betracht. Zum einen zeigen das von „152“ und das von „Ki-Mit“ detektierte EML4 im Western Blot ein Molekulargewicht von 120 kDa, zum anderen sind

das „152“- und das „Ki-Mit“-Epitop innerhalb eines Exons in unmittelbarer Nachbarschaft lokalisiert. Die Unterschiede, die bei Immunfärbungen mit beiden Antikörpern zu beobachten sind, müssen folglich auf anderen, wahrscheinlich posttranslationalen Modifikationen des EML4-Proteins beruhen. Das beobachtete Bindungsverhalten beider Antikörper und die Schlußfolgerungen, die sich daraus ableiten lassen, werden nachfolgend diskutiert.

#### **4.1.1 „Ki-Mit“ bindet an eine Phosphoform von EML4, die hauptsächlich in der Mitose vorkommt**

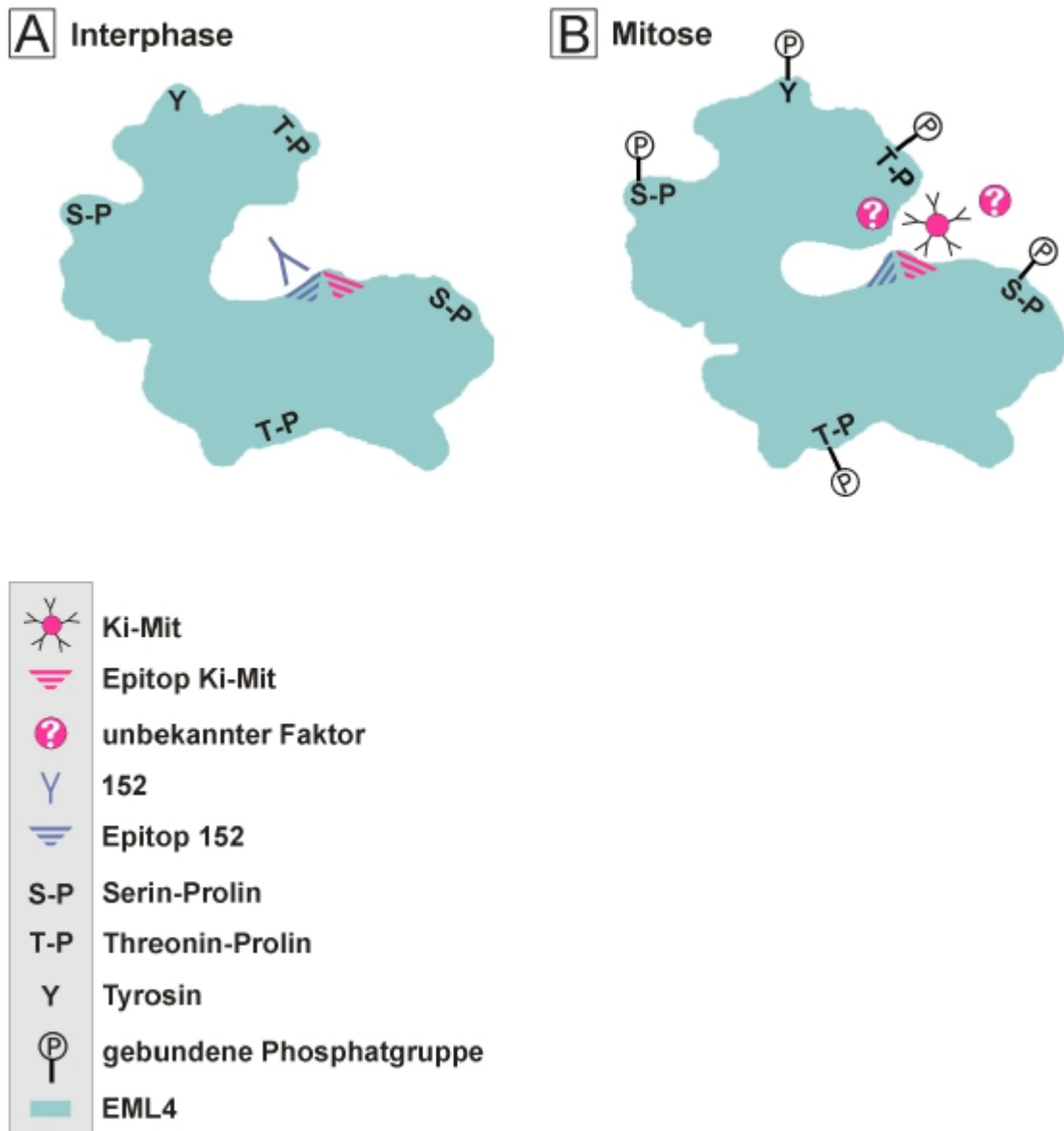
Die Immunpräzipitation von EML4 mit mAk „Ki-Mit“ aus L428-Zellen zeigte, daß der Antikörper an phosphoryliertes EML4 bindet. Da „Ki-Mit“ das EML4-Protein auch in mit Nocodazol arretierten Zellen erkennt, welche keine Spindel ausbilden, kann davon ausgegangen werden, daß die Phosphorylierung von EML4 in der Mitose nicht spindelabhängig ist. Mit Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern („PY99“, „MPM-2“) konnte die Art der Proteinphosphorylierung von EML4 in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden. EML4, das von „Ki-Mit“ immunpräzipitiert wird, ist demnach sowohl an Tyrosinresten als auch Serin-Prolin- (SP)- bzw. Threonin-Prolin- (TP)-Motiven phosphoryliert. Der Phosphorylierungsgrad von mit „Ki-Mit“ immunpräzipitiertem EML4 an (S/T)P-Motiven nimmt nach Nocodazol-Arretierung der Zellen in der Mitose, signifikant zu, was ebenfalls aus Versuchen mit dem Phosphoepitop-spezifischen Antikörper „MPM-2“ hervorging.

Die Phosphorylierung von Proteinen an (S/T)P-Motiven ist ein essentieller Mechanismus, welcher der Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse dient. Dazu zählen auch Vorgänge, die das Voranschreiten des Zellzyklus steuern (Zhou et al., 1999). Immunfärbungen mit „MPM-2“ zeigen, daß eine Vielzahl von Proteinen in der frühen Mitose Ziel einer SP- und TP-Phosphorylierung sind (Davis et al., 1983; Zhao et al., 1989). Die Enzyme, welche die Phosphorylierung an den genannten Motiven durchführen, sind Prolin-gesteuerte Proteinkinasen. Die Proteinphosphorylierung an den genannten Motiven kann aktivierend auf weitere Enzyme wirken. Das Enzym Pin1 z. B. ist eine Prolyl-Isomerase, die den Eintritt von Zellen in die Mitose steuert, indem sie spezifisch Bindungen von phosphorylierten (S/T)P-Motiven in Proteinen isomerisiert (Stukenberg und Kirschner, 2001). Prolinreste sind für die Struktur eines Proteins generell von großer Bedeutung, da diese in einer cis- oder trans-Konformation vorliegen können. Durch Prolin-Isomerisierungen, z. B. induziert durch Phosphorylierung, kann die Konformation eines Proteins drastisch verändert werden. Für die Prolyl-Isomerase Pin1 wurde dies am Beispiel von Cdc25 gezeigt (Stukenberg und Kirschner, 2001). Ferner konnte für Pin1 eine direkte Interaktion mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau (s. auch 4.2.1) nachgewiesen

werden (Lu et al., 1999). Die Phosphorylierung von Tau bewirkt eine Konformationsänderung, die u. a. in einer Abnahme der Beweglichkeit in der SDS-Gelelektrophorese resultiert (Hagestedt et al., 1989; Steiner et al., 1990; Scott et al., 1993). Abnormale Phosphorylierungen von Tau werden als Ursache für neurodegenerative Krankheiten wie z. B. Alzheimer angesehen (Mandelkow und Mandelkow, 1993; Kosik, 1986).

Die Zunahme von nachweisbaren (S/T)P-Phosphorylierungen bei EML4 während der Mitose könnte folglich in einer Konformationsänderung des Proteins resultieren. Die Hyperphosphorylierung von EML4 während der Mitose könnte darüberhinaus auch das Auftreten einer zweiten, geringfügig größeren Bande im Western Blot bei Immunfärbungen mit „Ki-Mit“ erklären. Diese könnte auf einer veränderten Beweglichkeit des phosphorylierten EML4-Polypeptids im SDS-Gel beruhen.

„Ki-Mit“ wäre demnach spezifisch für eine durch Phosphorylierung induzierte Konformation von EML4. Unterstützt wird diese These durch das Ergebnis, daß durch die Behandlung von Zellen mit Lambda Protein-Phosphatase die Bindung von „Ki-Mit“ in immunfluoreszenzmikroskopischen Experimenten drastisch reduziert wird (s. 3.4.2). Vorstellbar wäre der phosphorylierungsabhängige Wechsel von einer eher offenen Konformation der Interphase hin zu einer geschlosseneren Konformation in der Mitose (Abb. 25). Die Tatsache, daß „Ki-Mit“ nur extrem schwach an Interphase-EML4 bindet, könnte in diesem Fall als ein Hinweis darauf gewertet werden, daß „Ki-Mit“ *in vivo* außer dem in dieser Arbeit ermittelten Epitop (EPLYEEPC) einen weiteren, noch unbekanntem Faktor erkennt. Dies könnte z. B. ein anderes Protein sein, welches die oben genannte Epitopsequenz vollständig oder teilweise enthält. Datenbankabfragen mit der Sequenz „EPLYEEPC“ zeigen, daß eine Vielzahl von z. T. noch nicht charakterisierten Proteinen homologe Sequenzabschnitte aufweist. Interessanterweise enthält auch das EML4-Protein außer im ermittelten Epitop ein weiteres „YEE“-Motiv (AS 297-299). Es wäre möglich, daß der multivalente IgM-Antikörper „Ki-Mit“ zusätzlich auch an dieses Motiv bindet (Abb. 25). Dagegen scheint bei bakteriell exprimiertem GST-EML4 bzw. bei EML4-spezifischen synthetischen Peptiden die erwähnte Epitopsequenz hinreichend für eine Bindung von „Ki-Mit“ zu sein.



**Abb. 25:** Hypothetisches Modell zur Bindung der Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ an EML4. EML4 wird beim Eintritt in die Mitose sowohl Tyrosin-phosphoryliert als auch Serin/Threonin-Prolin-phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Serin/Threonin-Prolin-Motiven könnte zu einer Konformationsänderung des Proteins führen. Vorstellbar ist, daß das EML4-Protein in der Interphase in einer eher „offenen“ Konformation vorliegt (A). Die Phosphorylierung könnte eine „Schließung“ der Proteinkonformation bewirken, durch die das „152“-Epitop maskiert wird (B). Die Tatsache, daß „Ki-Mit“ nur extrem schwach an die offene Konformation bindet, könnte ein Hinweis darauf sein, daß für eine effiziente Bindung von „Ki-Mit“ neben dem in dieser Arbeit ermittelten Epitop ein weiterer Faktor notwendig ist.

#### 4.1.2 Tyrosin 954 (Y<sub>954</sub>) von EML4 ist eine Schlüsselaminosäure innerhalb des „Ki-Mit“-Epitops

Das maximale „Ki-Mit“-Epitop innerhalb der EML4-Proteinsequenz besteht aus einem Abschnitt von acht Aminosäuren mit der Sequenz „EPLYEEPC“ (EML4-Aminosäuren 951-958). Dies ist das Ergebnis des „Screenings“ der „Pepspot“-Membran. (s. 3.5.2). Die gerichtete Mutagenese des in der Sequenz enthaltenen Tyrosins (Y<sub>954</sub>) zeigte, daß der genannte Tyrosinrest von essentieller Bedeutung für die Bindung von „Ki-Mit“ ist (s. 3.5.3). Der Austausch des Tyrosinrests gegen einen strukturell ähnlichen Phenylalaninrest hatte zur Folge, daß die Intensität der Bindung von „Ki-Mit“ an bakteriell exprimiertes GST-EML4 um 85-90 % abgeschwächt wurde.

Nachfolgend konnte gezeigt werden, daß der Phosphorylierungsgrad des Tyrosins 954 einen direkten Einfluß auf die Bindung von „Ki-Mit“ hat. Dies trifft zumindest auf synthetische Peptide zu, die das aus dem Proteinkontext isolierte Epitop enthalten. Wenn „Ki-Mit“ vor einer immunfluoreszenzmikroskopischen Färbung mit einem synthetischen Peptid mit der Sequenz „LGEPLYEEPCNEI“ (das „Ki-Mit“-Epitop ist fett gedruckt) präinkubiert wird, so wird die nachfolgende Anfärbung mitotischer Zellen signifikant abgeschwächt. Dieser Effekt ist jedoch nur dann zu beobachten, wenn der im Peptid enthaltene Tyrosinrest (Y<sub>954</sub>) nicht phosphoryliert ist. Im Gegensatz dazu beeinflußt die Präinkubation mit einer tyrosinphosphorylierten Variante des Peptids die spätere Detektion von endogenem EML4 nicht. Auch die Versuche mit bakteriell exprimiertem GST-EML4 sprechen dafür, daß das Tyrosin 954 für eine Bindung von „Ki-Mit“ in dephosphoryliertem Zustand vorliegen muß. „Ki-Mit“ bindet bei Immunfärbungen von Western Blots an bakteriell exprimiertes GST-EML4, welches mit großer Wahrscheinlichkeit nicht tyrosinphosphoryliert ist. Es gibt jedoch Veröffentlichungen, in denen die Phosphorylierung von Tyrosinresten auch in Bakterien beschrieben wird (Shi et al., 1998; Vincent et al., 1999; Grangeasse et al., 2002). Vorausgesetzt „Ki-Mit“ bindet nur dann an sein Epitop, wenn Y<sub>954</sub> in dephosphoryliertem Zustand vorliegt, müsste EML4 folglich in der Mitose an anderen Tyrosinresten phosphoryliert sein, denn Versuche mit mAk „PY99“, belegen, daß das von „Ki-Mit“ immunpräzipitierte mitotische EML4 tyrosinphosphoryliert ist.

Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, daß eine Phosphorylierung von Y<sub>954</sub> hemmend auf die Bindung von „Ki-Mit“ wirkt. Dadurch wurde die Bedeutung dieses Aminosäurerests für die Ausbildung des „Ki-Mit“-Epitops belegt. Es ist jedoch nicht bekannt, ob Y<sub>954</sub> in der Zelle überhaupt Ziel einer Phosphorylierung durch Tyrosinkinase ist. So könnten die beobachteten Hemmungseffekte rein struktureller Natur sein, die auf sterischer Inhibition der „Ki-Mit“-Bindung bzw. Maskierung des „Ki-Mit“-Epitops durch die Phosphatgruppe beruhen.



Daß der Phosphorylierungsgrad von Y<sub>954</sub> nicht allein dafür ausschlaggebend sein kann, ob eine „Ki-Mit“-Bindung erfolgt oder nicht, zeigen Versuche mit mAk „152“. Das von „152“ immunpräzipitierte EML4 ist nicht tyrosinphosphoryliert (s. 3.4.2). Dennoch kann „Ki-Mit“ nur schwach daran binden. Dies unterstützt das in Abbildung 25 vorgestellte Modell, in dem für eine effiziente „Ki-Mit“-Bindung ein weiterer Faktor notwendig ist.

#### **4.1.3 Der Antikörper „152“ erkennt EML4 während der Interphase und der Mitose**

Der monoklonale IgG<sub>1</sub>-Antikörper „152“ reagiert mit EML4 sowohl in der Interphase als auch während der Mitose, wobei die Interphase-Anfärbung von EML4 deutlich stärker ausfällt. Durch die Immunfärbungen mit „152“ konnte gezeigt werden, daß die Expression des EML4-Proteins nicht wie anfänglich angenommen zellzyklusabhängig gesteuert wird. Das EML4-Protein ist konstitutiv während des gesamten Zellzyklus vorhanden. Dies wird durch RNA *in situ*-Hybridisierungen bestätigt. EML4 scheint deshalb über zwei unterschiedlich posttranslational modifizierte Proteinformen, die in der Interphase bzw. der Mitose überwiegen, reguliert zu werden. Zu betonen ist, daß beide Formen nur wenig kolokalisieren, was aus immunfluoreszenzmikroskopischen Versuchen hervorgeht. Die für mAk „152“ spezifische Form wird folglich *in vivo* nur schwach von „Ki-Mit“ erkannt und umgekehrt.

Das Auftreten beider Formen von EML4 während des Zellzyklus kann als dynamische Koexistenz betrachtet werden. In der Interphase überwiegt die für „152“ spezifische Form von EML4 deutlich. Beim Übergang von der G<sub>2</sub>- zur M-Phase verändert sich die Verteilung der beiden Formen drastisch. In der Mitose treten die für „152“ spezifische und die für „Ki-Mit“ spezifische Form von EML4 nebeneinander auf, wobei letztgenannte Form überwiegt. Nach der Mitose verschiebt sich das Gleichgewicht wieder in Richtung der für „152“ spezifischen Form von EML4.

Wie bereits erwähnt, befindet sich das Epitop von mAk „152“ in unmittelbarer Nachbarschaft des „Ki-Mit“-Epitops in aminoterminaler Richtung. Sollte eine Konformationsänderung die Ursache für das beobachtete Bindungsverhalten der Antikörper „152“ und „Ki-Mit“ sein, so müßte diese folglich genau diejenige EML4-Region strukturell verändern, welche die Epitope von „152“ und „Ki-Mit“ enthält. Eine computergestützte Motivsuche (ISREC; <http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>) offenbart, daß die genannte Region, welche die Epitope von „152“ und „Ki-Mit“ enthält, auffallend glutaminsäurereich ist. Die sauren Carboxylgruppen von Glutaminsäureresten tragen, wenn sie in deprotonierter Form vorliegen, negative Ladungen. Es wäre folglich möglich, daß die Phosphorylierung des EML4-Proteins während der Mitose außer der Isomerisierung von (S/T)P-Bindungen auch zu Abstoßungseffekten durch Einführung von negativen

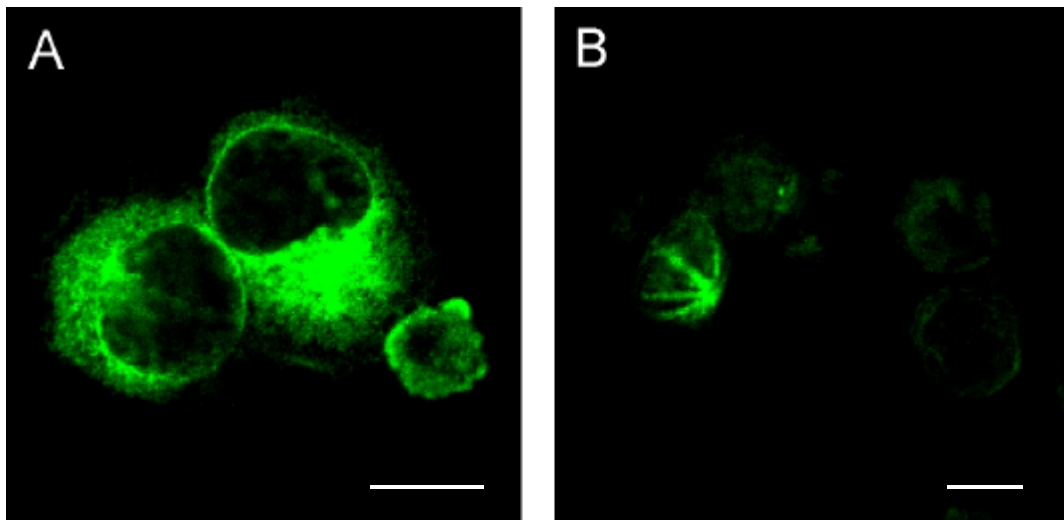
Ladungen führt. Dadurch könnte die Struktur der glutaminsäurereichen Region auch durch elektrostatische Kräfte beeinflusst werden.

## **4.2 Die subzelluläre Lokalisation des EML4-Proteins**

### **4.2.1 Die Anfärbung von EML4 durch „152“ und „Ki-Mit“ in der Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die Antikörper „Ki-Mit“ und „152“ lieferten in der Immunfluoreszenzmikroskopie wichtige Informationen über die subzelluläre Verteilung der verschiedenen EML4-Formen im Verlauf des Zellzyklus. Da in den durchgeführten Versuchen nur eine geringe Kolo-kalisation beider Antikörper zu beobachten war, muß von einer räumlichen bzw. zeitlichen Trennung der von den Antikörpern detektierten EML4-Formen ausgegangen werden.

Wie beschrieben bindet mAk „152“ an die dephosphorylierte Form von EML4. Bei Immunfärbungen mit „152“, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigte sich, daß diese Form in der Interphase im gesamten Zytoplasma der Zelle verteilt ist. Dabei war die beobachtete Anfärbung des Zytoplasmas häufig von diffussem Charakter. Zum Teil wurden aber auch fädige Strukturen sichtbar, die man als Mikrotubuli interpretieren könnte (Abb. 26). Sternförmige Strukturen in der Nähe des Zellkerns könnten hingegen Mikrotubuli-organisierende Zentren (MTOCs) darstellen. Doppelfärbungen mit mAk „152“ und spezifischen anti-Tubulin Antikörpern könnten hier Aufschluß geben. In der Mitose ist die von „152“ detektierte EML4-Form quantitativ schwächer im Zytoplasma nachweisbar. Bei keiner Immunfärbung war eine Assoziation der für „152“ spezifischen Form von EML4 mit der mitotischen Spindel erkennbar.



**Abb. 26:** Immunfärbung von EML4 in L428-Zellen mit mAk „152“. In Interphasezellen wurden z. T. fädige Strukturen angefärbt, welche Mikrotubuli sein könnten (A). Dagegen könnten sternförmig erscheinende Strukturen MTOCs (Mikrotubuli-organisierende Zentren) darstellen (B). Die weißen Striche entsprechen 10  $\mu\text{m}$  (A) bzw. 15  $\mu\text{m}$  (B).

Die für „Ki-Mit“ spezifische, phosphorylierte Form von EML4 tritt hauptsächlich während der Mitose in Erscheinung. Sie ist, wie auch die von „152“ detektierte Form, diffus im gesamten Zytoplasma der Zelle verteilt. Darüberhinaus war auch bei Immunfärbungen mit „Ki-Mit“ keine Assoziation von EML4 mit der mitotischen Spindel detektierbar. Bei Doppelfärbungen mit „Ki-S2“, einem Antikörper, der ein spindel- und zentrosomassoziiertes Antigen (repp86) erkennt, waren leichte Kollokalisierungen mit „Ki-Mit“ am Zentrosom zu beobachten. Zusätzlich war eine deutliche Assoziation mit der Hülle der Metaphasechromosomen bzw. dem Chromosomengerüst zu erkennen.

Das Chromosomengerüst (engl. „chromosomal scaffold“) besteht aus Proteinen (81 %), RNA (12 %) und DNA (7 %) (Donev und Djondjurov, 1999). Für verschiedene Proteine ist eine Assoziation mit dem Chromosomengerüst während der Mitose beschrieben worden. Dazu gehören auch die Mikrotubuli-assoziierten Proteine Tau (Cross et al., 2000) und Stathmin/Op18 (Andersen et al., 1997). Der Name Tau steht für eine Familie von engverwandten Phosphoproteinen, die mit Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Intermediärfilamenten assoziiert sind. Als MAPs mit MT-stabilisierender Funktion kommen sie überwiegend in den Axonen von Neuronen vor und spielen dort eine Rolle bei der Entwicklung der axonalen Morphologie (Léger et al., 1997). Inzwischen konnte Tau auch in nicht neuronalen Zellen nachgewiesen werden (Cross et al., 2000). Es kommt dort sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma vor. Stathmin/Op18 ist ebenfalls ein MAP, welches aber im Gegensatz zu Tau zu den MT-Destabilisatoren gezählt wird. Über die Assoziation von Stathmin/Op18 mit mitotischem Chromatin erfolgt die Regulation der

Phosphorylierung des Proteins während der Mitose (Andersen et al., 1997). Diese hat einen Einfluß auf das Bindungsverhalten des Proteins an die Mikrotubuli (s. 4.3.2).

Vor dem Hintergrund, daß auch EML4 ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) ist, könnte die Assoziation mit den Chromosomen ein Hinweis darauf sein, daß EML4 in der Mitose an der Vermittlung der Bindung der Mikrotubuli-Plusenden an die DNA beteiligt ist. Die Assoziation mit dem mitotischen Chromatin könnte darüberhinaus auch Auswirkungen auf die Phosphorylierung des EML4-Proteins haben. Dies träfe jedoch nur auf einen Teil der phosphorylierten Form von EML4 zu, denn der Großteil der EML4-Phosphoform ist diffus im gesamten Zytoplasma verteilt.

#### **4.2.2 Die Detektierbarkeit des phosphorylierten EML4 nimmt mit Beginn der Anaphase ab**

Ab dem Beginn der Anaphase nimmt die Nachweisbarkeit der von „Ki-Mit“ detektierten, phosphorylierten EML4-Form rapide ab. Das phosphorylierte EML4 wird in granulären Strukturen konzentriert, bevor es verschwindet. Dies könnte ein Hinweis auf eine gesteuerte Degradation des Proteins sein, die z. B. in 26S-Proteasomen stattfinden könnte. 26S-Proteasomen sind Proteasekomplexe, in denen der Abbau von ubiquitinmarkierten Proteinen stattfindet. 26S-Proteasomen spielen eine wichtige Rolle bei der nicht-lysosomalen Proteolyse in eukaryontischen Zellen (Coux et al., 1996; Hilt und Wolf, 1996). Sie sind in Säugetierzellen im Nukleus oder im Zytoplasma lokalisiert oder assoziiert mit der dem Zytoplasma zugewandten Oberfläche des ER (Rivett et al., 1992; Palmer et al., 1996; Brooks et al., 2000).

Beim Metaphase-Anaphase-Übergang der Mitose wird eine Ubiquitin-Proteinligase aktiviert, die eine Reihe mitotischer Proteine ubiquitinyliert und so deren Degradation durch 26S-Proteasomen einleitet. Dies ist genau der Zeitpunkt, an dem die Proteinmenge der phosphorylierten, von „Ki-Mit“ detektierten Form von EML4 signifikant abzunehmen beginnt. Bei der erwähnten Ubiquitin-Proteinligase handelt es sich um den „Anaphase-promoting complex/cyclosome“ (APC/C). Der APC/C ist ein großer Proteinkomplex, welcher beim Menschen aus mindestens elf Untereinheiten zusammengesetzt ist (Gieffers et al., 2001). Ziel der selektiven Degradation durch den APC/C sind beispielsweise mitotische Cycline (Sudakin et al., 1995; King et al., 1995), die für den Eintritt von Zellen in die Mitose von Bedeutung sind, und Anaphase-Inhibitoren. Die Aktivierung des APC/C wird u. a. durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung einzelner APC/C-Untereinheiten und durch Proteine aus der Mad- und Bubfamilie reguliert (He et al., 1997; Fang et al., 1998; Alexandru et al., 1999; Fesquet et al., 1999). Letztere sind Komponenten des sogenannten „spindle assembly checkpoint“. Der „spindle assembly checkpoint“ wird in der Prometaphase aktiviert und zeigt an, ob alle Chromosomen über das Kinetochor

korrekt an die mitotische Spindel angeheftet sind. Dadurch wird eine vorzeitige Initiierung der Anaphase unterdrückt.

Um einen APC/C-abhängigen Abbau von EML4 am Ende der Metaphase nachzuweisen, wäre die Durchführung von Interaktionsstudien mit Untereinheiten des APC/C z. B. im Hefe Zwei-Hybrid-System sinnvoll. Alternativ könnten Kopräzipitationsexperimente durchgeführt werden. Bei einer Interaktion von EML4 mit dem APC/C müssten eine oder mehrere Untereinheiten des APC/C mit EML4 aus Zellysat kopräzipitiert werden können. Der Nachweis könnte dann über für den APC/C spezifische Antikörper erfolgen. Eine Interaktion von EML4 mit dem APC/C könnte beispielsweise über die „WD-repeat“-Region von EML4 erfolgen (s. 4.4.2.1).

Prinzipiell besteht auch die Möglichkeit, daß die Phosphoform von EML4 nicht durch Proteolyse degradiert wird, sondern lediglich die Hyperphosphorylierung während der Mitose durch Phosphatase-Enzyme wieder rückgängig gemacht wird. Aufgrund der beobachteten Konzentrierung der EML4-Phosphoform in granulären Strukturen erscheint jedoch die proteolytische Degradation wahrscheinlicher zu sein.

### **4.3 EML4 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP)**

#### **4.3.1 Die Mikrotubuli: Dynamische Strukturen mit variabler Funktion während des Zellzyklus**

Alle eukaryontischen Zellen besitzen ein Zytoskelett, dessen wesentliche Bestandteile die Intermediär- und Aktinfilamente sowie die Mikrotubuli sind. Die Mikrotubuli (MT) sind röhrenförmige Strukturen von 24 nm Durchmesser, die sich aus je 13 Protofilamenten zusammensetzen. Die Protofilamente ihrerseits bestehen aus Tubulin-Heterodimeren mit jeweils einem  $\alpha$ - und einem  $\beta$ -Tubulin-Molekül. Dabei sind MT polar aufgebaut, d. h. sie haben ein Plusende, an dem sich ein Ring von  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten befindet, und ein Minusende, welches aus einem Ring von  $\alpha$ -Tubulin-Molekülen besteht. Für MT existiert das Modell der „dynamischen Instabilität“ (Desai und Mitchison, 1997), welches besagt, daß MT Strukturen sind, an denen ein permanenter Einbau und eine permanente Dissoziation von Tubulindimeren stattfindet. Lediglich das Verhältnis bestimmt, ob dies in einem Nettowachstum („Rettung“) oder einem Nettoabbau („Katastrophe“) der MT resultiert. Einbau und Dissoziation von Tubulin finden bevorzugt am Plusende statt (Yvon und Wadsworth, 1997; Rodionov und Borisy, 1997), während das Minusende eine wichtige Rolle bei der Verankerung der MT im Zentrosom bzw. MTOC spielt.

Die Funktion der MT variiert im Verlauf des Zellzyklus. Bezogen auf Interphasezellen von höheren Mehrzellern besteht sie hauptsächlich im intrazellulären Transport von Vesikeln

und Organellen. Dieser Transport erfolgt entlang der MT mit Hilfe von Motorproteinen wie z. B. Kinesin (in Richtung Plusende) und Dynein (in Richtung Minusende) (Hirokawa, 1998). Während der Mitose formen die MT den vom Zentrosom ausgehenden Spindelapparat, der für die Anordnung und Trennung der Chromosomen verantwortlich ist. Die organisierende Funktion des Zentrosoms übernimmt in Interphasezellen das „Mikrotubuli-organisierende Zentrum“ (MTOC). Im perizentriolaren Material von Zentrosom und MTOC findet man eine dritte, ringförmig angeordnete Variante des Tubulins, die „ $\gamma$ -Tubulin Ringkomplexe“ ( $\gamma$ -TURC). Generell sind mitotische MT dynamischer als Interphase-MT (Rusan et al., 2001).

Neben den beschriebenen transienten Mikrotubulistrukturen existieren beispielsweise in den Axonen von Neuronen oder auch in Cilien und Flagellen permanente Formen von MT. In Verbindung mit den Mikrotubuli kennt man zahlreiche assoziierte Proteine, die man als MAPs bezeichnet (Mikrotubuli-assoziierte Proteine). Man differenziert zwischen den hochmolekularen MAPs (200-300 kDa) und den niedermolekularen Tau-Proteinen (20-60 kDa). Die MAPs sind wesentlich an den verschiedenen Funktionen der MT beteiligt und können deren Dynamik *in vitro* und *in vivo* entscheidend beeinflussen (Drechsel et al., 1992; Pryer et al., 1992; Hirokawa, 1994; Dhamodharan und Wadsworth, 1995).

#### **4.3.2 Die Aktivität von MAPs kann über Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden**

Für verschiedene Mikrotubuli-assoziierte Proteine ist beschrieben worden, daß ihre Aktivität durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung definierter Aminosäurereste zellzyklusabhängig reguliert werden kann (Cassimeris, 1999). Dabei beeinflussen neben den bereits erwähnten phosphorylierungsabhängigen Konformationsänderungen wahrscheinlich auch elektrostatische Wechselwirkungen durch die Einführung negativer Ladungen die Bindung an die Mikrotubuli (Maccioni und Cambiazo, 1995). Vom ubiquitären MAP4 (Ookata et al., 1997; Tombes et al., 1991), den *Xenopus*-Proteinen XMAP (Gard und Kirschner, 1987) und p220/p230 MAP (Shiina et al., 1992; Andersen et al., 1994) und dem Säugerprotein E-MAP-115 (Masson und Kreis, 1995) weiß man, daß sie in einer zyklischen Art und Weise phosphoryliert und dephosphoryliert werden, wenn die Zellen in die Mitose eintreten bzw. diese wieder verlassen. Die zeitlich und räumlich gesteuerte Aktivität von MAPs ist von entscheidender Bedeutung für die Reorganisation der MT am Ende der G2-Phase von den Interphase-MT hin zum Spindelapparat der Mitose. Generell korreliert die Phosphorylierung von MAPs während der Mitose mit einer drastischen Abnahme der Menge an polymerisierten Mikrotubuli (Zhai und Borisy, 1994). Aber auch während der Interphase spielen MAPs und deren Regulation eine wichtige Rolle. Vom zytoplasmatischen MAP Stathmin/Op18 ist bekannt, daß es die MT-Dynamik

in Interphasezellen beeinflusst (Gradin et al., 1998; Marklund et al., 1996). Stathmin/Op18 wurde ursprünglich als ein in verschiedenen malignen Krebsarten hochexprimiertes Protein mit komplexem Phosphorylierungsmuster entdeckt, welches zellzyklusabhängig variiert. Das Protein hat die Funktion eines MT-Destabilisators, welcher die Depolymerisation an MT-Plusenden katalysiert (Belmont und Mitchison, 1996; Walczak, 2000). Beim Übergang von der G2-Phase in die Mitose wird das Protein an vier Serinresten phosphoryliert (Larsson et al., 1997). Durch die Phosphorylierungen geht das Protein von einer aktiven in eine inaktive Form über. Dieser Zustand wird für die Dauer der Mitose aufrechterhalten. Da Stathmin/Op18 im aktiven Zustand ein MT-Destabilisator ist, vermutet man, daß durch die Hyperphosphorylierung in der Mitose eine Destabilisierung der mitotischen Spindel verhindert wird (Marklund et al., 1996). Experimente mit nicht phosphorylierbaren Mutanten bestätigen, daß die Inaktivierung essentiell ist, um den MT die Trennung der kondensierten Chromosomen zu ermöglichen (Marklund et al., 1994, 1996; Larsson et al., 1995). Darüberhinaus konnte von Andersen et al. (1997) gezeigt werden, daß die Hyperphosphorylierung von Stathmin/Op18 in der Mitose chromatinabhängig ist.

#### **4.3.3 Die Phosphorylierung von EML4 könnte dessen Aktivität beeinflussen**

In Bezug auf EML4 könnte die Verschiebung des Gleichgewichts von der dephosphorylierten Form hin zur phosphorylierten Form beim Eintritt in die Mitose ähnliche Gründe haben, wie für Stathmin/Op18 beschrieben.

Durch ein *in vitro*-Experiment konnte für EML4 gezeigt werden, daß es an polymerisierte Mikrotubuli bindet (s. 3.7.1). In der Immunfluoreszenzmikroskopie mit „152“ waren in Interphasezellen z. T. mikrotubuliartige Strukturen, bzw. Strukturen, die MTOCs darstellen könnten, erkennbar. Dagegen war bei Immunfärbungen eine Assoziation von EML4 mit Mikrotubuli der mitotischen Spindel weder mit „152“ noch mit „Ki-Mit“ erkennbar. Für das Protein EML2 (ELP70; HuEMAP-2), welches zur gleichen Proteinfamilie gehört wie EML4, wurde von Eichenmüller et al. (2002) beschrieben, daß es Eigenschaften eines MT-Destabilisators besitzt. Die Sequenzhomologie von EML4 zu EML2 könnte auf eine Homologie der Funktionen beider Proteine hinweisen. Sollte EML4 ebenfalls ein MT-Destabilisator sein, so könnte die Phosphorylierung des Proteins in der Mitose, wie bei Stathmin/Op18, eine Inaktivierung des Proteins bewirken. Ausgehend von der Annahme, daß das phosphorylierte EML4 in der Mitose die Interaktion von DNA mit den Mikrotubuli vermittelt, wäre die Aufhebung der MT-destabilisierenden Wirkung ein sinnvoller Vorgang. Darüberhinaus könnte das Fehlen der destabilisierenden Aktivität von EML4 generell einen stabilisierenden Einfluß auf den mitotischen Spindelapparat haben.

Dazu paßt, daß die phosphorylierte Form von EML4 mit Beginn der Anaphase, in der eine Verkürzung der Kinetochormikrotubuli stattfindet, degradiert wird.

## 4.4 EML4 ist Teil einer konservierten Proteinfamilie

### 4.4.1 EML1, EML2 und EML4 sind EMAP-ähnliche Proteine des Menschen

Wie bereits unter Punkt 3.2.3 beschrieben, konnte EML4 aufgrund von Sequenzhomologien der Familie der EMAP-ähnlichen Proteine zugeordnet werden. Der Name der Gruppe bezieht sich auf das Protein EMAP („echinoderm microtubule-associated protein“) (Li and Suprenant, 1994), welches das erste bekannte Protein aus der Familie war. EMAP ist ein 77 kDa-Protein, das in Seeigeln (Stamm *Echinodermata*, Klasse *Echinoidea*) zu den mengenmäßig am häufigsten vorkommenden MAPs gehört. Der Homologiegrad auf Proteinebene zwischen EML4 und EMAP beträgt 52 %, wenn man identische Sequenzabschnitte berücksichtigt und ca. 70 %, wenn auch konservierte Aminosäureaustausche in die Homologieberechnung miteinbezogen werden. EMAP ist sowohl in Assoziation mit der mitotischen Spindel als auch lokalisiert entlang der Interphase-MT nachweisbar (Suprenant et al., 1993). EMAP teilt nicht die MT-Bindungsdomäne anderer MAPs wie MAP2, MAP4 und Tau. Anders als die genannten MAPs bindet EMAP auch nicht an den sauren Carboxyterminus von Tubulin. Polyklonale Seren gegen EMAP zeigen jedoch starke Kreuzreaktivität mit MAP2 und Tau in Western Blots (Li et al., 1998). Dies ist ein Indiz dafür, daß es in allen genannten Proteinen konservierte strukturelle und funktionelle Domänen gibt. Es wurde beschrieben, daß EMAP, wie auch EML4, in einer zellzyklusabhängigen Art und Weise phosphoryliert wird. Demnach liegt EMAP während der Mitose als Phosphoprotein vor, das an mindestens 10 Serinresten phosphoryliert ist (Brisch et al., 1996).

Bisher sind in *Homo sapiens* drei dem EMAP der *Echinodermata* homologe Proteine bekannt. Dies sind die Proteine EML1, EML2 und EML4. Die Sequenz eines vierten humanen Proteins (EML3) ist bereits hinterlegt aber momentan noch gesperrt (Mitteilung des „Human Gene Nomenclature Committee“ im Februar 2002). EML1 wird aufgrund seines Genlocus als Kandidat für die Krankheit „Usher Syndrom“ diskutiert (Eudy et al., 1997). Dies ist eine erblich bedingte Kombination von Netzhautdegeneration und Innenohrschwerhörigkeit, für die Zytoskelett-Dysfunktionen verantwortlich gemacht werden (Barrong et al., 1992; Weil et al., 1995). EML2 ist mit Microtubuli (MT) in HeLa Zellextrakten assoziiert und kolokalisiert mit ihnen im mitotischen Spindelapparat. Eichenmüller et al. (2002) beschreiben die Funktion von EML2 als MT-destabilisierend, da es die Nukleation von Tubulin hemmt und gleichzeitig konzentrationsabhängig den



Abbau von MT fördert. Sequenzen von EMAP-ähnlichen Proteinen sind auch für die Säugetiere *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* hinterlegt („Swissprot“-Zugriffsnummern Q9DAS8 und AAL33537). Das EMAP-ähnliche Protein der Ratte wurde jüngst als ein an den Delta-Glutamat Rezeptor bindendes Protein identifiziert (Ly et al., 2002).

#### **4.4.2 Die Familie der EMAP-ähnlichen Proteine besitzt gemeinsame Merkmale**

##### 4.4.2.1 EMAP-ähnliche Proteine enthalten konservierte „WD-repeats“

Charakteristisch für die Familie der EMAP-ähnlichen Proteine ist das Vorkommen von konservierten „WD-repeats“ (auch „WD-40 repeats“ genannt). „WD-repeats“ sind Motive mit einer Länge von 23 bis 41 Aminosäuren, die meist mit einer Abfolge von Glycin-Histidin (G-H) beginnen und mit den Aminosäuren Tryptophan-Asparaginsäure (WD) enden (Neer et al., 1994). Den „WD-repeats“ kann keine einheitliche Funktion zugeordnet werden. Man vermutet aber, daß sie Module sind, welche Protein-Protein-Interaktionen erleichtern (Clapham und Neer, 1993). Es wird angenommen, daß „WD-repeat“-Proteine auch mit Proteinen aus der „Tetratricopeptid-repeat“ (TPR)-Familie interagieren können (Van der Voorn und Ploegh, 1992). Zu letztgenannter Familie gehören auch die APC/C-Untereinheiten CDC16, CDC23 und CDC27 (Sikorski et al., 1990; Lamb et al., 1994). Wie bereits unter Punkt 4.2.2 angedeutet, könnte eine Interaktion von EML4 mit dem APC/C über die „WD-repeat“-Region von EML4 erfolgen. Die genannten APC/C-Untereinheiten kämen aufgrund der TPRs als direkte Interaktionspartner von EML4 in Frage. „WD-repeats“ kommen ferner in Zellzyklus-assoziierten Proteinen wie Cdc20 oder Cdh1 vor, welche als Aktivatoren des APC/C fungieren (Visintin et al., 1997).

##### 4.4.2.2 „WD-repeats“ prägen die Stereochemie eines Proteins

Jedes „WD-repeat“ faltet sich in eine Struktur von  $\beta$ -Faltblättern, die durch Drehung die Erscheinung eines Propellerblattes annehmen (Wall et al., 1995; Saxena et al., 1996). Das Protein G-Beta, eine Untereinheit des heteromeren G-Proteins Transducin, ist bislang das einzige „WD-repeat“-Protein, von dem die Stereochemie durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurde (Wall et al., 1995; Sondek et al., 1996). G-Beta faltet sich zu einem siebenblättrigen  $\beta$ -Propeller. Es wird als wahrscheinlich angesehen, daß alle „WD-repeat“-Proteine eine ähnliche Struktur besitzen wie G-Beta (Garcia-Higuera et al., 1996). Laut computergestützter Analyse der EML4-Proteinsequenz besitzt das Protein neun „WD-repeats“ (s. 3.2.3). Demzufolge würde sich die „WD-repeat“-Region von EML4 zu einer neunblättrigen  $\beta$ -Propellerstruktur falten.

#### 4.4.2.3 Die HELP-Domäne ist der am stärksten konservierte Bereich der EMAP-ähnlichen Proteine

Neben den „WD-repeats“ enthalten alle EMAP-ähnlichen Proteine einen stark konservierten hydrophoben Bereich (hellblau markiert im Proteinsequenz-„Alignment“ von EML1, 2 und 4; siehe Anhang), der nach bisherigem Wissen nicht in anderen Proteinen vorkommt. Von Eichenmüller et al. (2002) wurde dieser Sequenzabschnitt als hydrophobe ELP (HELP)-Domäne deklariert. Ob die HELP-Domäne eine spezielle Funktion hat, ist bislang noch nicht bekannt. Die starke Homologie deutet aber darauf hin, daß die HELP-Domäne von Bedeutung für die EMAP-ähnlichen Proteine ist. Innerhalb des EML4-Proteins reicht die HELP-Domäne von Aminosäure 255 bis 296.

Außer der HELP-Domäne besitzen alle humanen EMAP-ähnlichen Proteine (EML1, EML2, EML4) eine „EF-Hand“-Kalziumbindungsdomäne. EML1 und EML4 besitzen zusätzlich ein „saure Phosphatase“-Motiv. Spezifisch für EML4 ist hingegen das Vorhandensein einer „Serin-Protease“-Konsensussequenz. Die erwähnten Motive innerhalb der EML4-Proteinsequenz könnten ein Hinweis auf die Funktion von EML4 sein. Es wäre denkbar, daß EML4 eine kalziumabhängige Phosphatase oder Protease ist.

## **4.5 Ausblick**

In Zukunft werden Untersuchungen von vordergründigem Interesse sein, welche eindeutige Hinweise zur Funktion von EML4 in der Zelle liefern. Im speziellen könnte dies z. B. die Identifizierung von EML4-Interaktionspartnern sein. Solche mit EML4 interagierenden Proteine könnten beispielsweise durch Kopräzipitationsexperimente oder durch ein „screening“ im Hefe Zwei-Hybrid System gefunden werden. In letztgenanntem Versuchssystem könnten darüberhinaus auch gezielte Bindungsstudien mit Untereinheiten des APC/C erfolgen. Da EML4 in der vorliegenden Arbeit als Mikrotubuli-assoziiertes Protein identifiziert wurde, ist zu klären, ob es eine Rolle bei der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik im Verlauf des Zellzyklus spielt. Insbesondere sind eventuelle Unterschiede der Funktion in der Interphase und während der Mitose von Interesse. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern eindeutige Hinweise auf eine zellzyklusabhängige Modulation der EML4-Funktion. Für das dem EML4-Protein homologe EML2-Protein wurde publiziert, daß es eine MT-destabilisierende Aktivität besitzt. Durch *in vitro*-Studien mit polymerisierten Mikrotubuli könnte überprüft werden, ob EML4 eine ähnliche Aufgabe zukommt wie EML2. Die Analyse der Aminosäuresequenz von EML4 indiziert, daß EML4 eine kalziumabhängige Phosphatase oder Protease sein könnte, da das Protein entsprechende Sequenzmotive besitzt. Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese wäre es möglich, die Funktionalität der genannten Motive aufzuheben und EML4 danach in

eukaryontischen Zelllinien überzuexprimieren. Die Effekte auf die mikroskopisch sichtbare Morphologie der transfizierten Zellen könnten wertvolle Hinweise auf die Funktion von EML4 liefern. Neben der Überexpression von nativem und mutiertem EML4 bieten sich Experimente zur Hemmung der Proteinsynthese von endogenem EML4 z. B. durch RNA-Interferenz oder „Antisense“-Versuche an. Die funktionelle Charakterisierung von EML4 könnte darüberhinaus die Bedeutung der konservierten Familie der EMAP-ähnlichen Proteine für Metazoa unterstreichen.

## 5. Zusammenfassungen

### 5.1 Zusammenfassung

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers „Ki-Mit“ wurde im *Institut für Hämatopathologie* in Kiel das humane 120 kDa-Protein EML4 entdeckt. „Ki-Mit“ detektiert EML4 stark in mitotischen Zellen und nur sehr schwach in Interphasezellen. Bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurde EML4 mit „Ki-Mit“ immunpräzipitiert, proteolytisch gespalten und ansequenziert. Dabei stellte sich heraus, daß nur ein geringer Teil der ermittelten Sequenzdaten Homologien zu bereits beschriebenen Proteinen aus der mit Mikrotubuli assoziierten Familie der EMAP-ähnlichen Proteine zeigte, während der Großteil der Sequenzen noch nicht in Proteindatenbanken hinterlegt war. Dies gab Anlaß zu der Vermutung, daß EML4 ein bislang noch nicht charakterisiertes Protein ist, das darüberhinaus ein neues Mitglied der oben genannten Proteinfamilie sein könnte. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte EML4 kloniert und teilweise charakterisiert werden. Die erzielten Resultate lieferten erste wichtige Informationen über das bislang unbekanntes humane Mikrotubuli-assoziierte Protein EML4.

Durch PCR-Experimente und 5'-RACE konnte die EML4-cDNA amplifiziert, kloniert und anschließend vollständig sequenziert werden. Das mRNA-Transkript von EML4 hat eine Länge von 5539 bp. Die Sequenz wurde in der „Genbank“-Datenbank unter der Zugriffsnummer AF177377 hinterlegt. Es wurde bestätigt, daß es sich bei EML4 um ein bislang noch nicht bekanntes oder beschriebenes humanes Protein handelt.

Die vergleichende Sequenzanalyse offenbarte, daß EML4 zur Familie der „Echinoderm microtubule-associated protein“-ähnlichen (EMAP-ähnlichen) Proteine gehört. EMAP-ähnliche Proteine sind konservierte „WD-repeat“-Proteine, die in vielen bislang untersuchten Metazoa, u. a. auch im Menschen vorkommen. EMAP-ähnliche Proteine spielen nach bisherigem Wissen eine Rolle bei der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik. Für EML4 konnte im Rahmen dieser Arbeit eine direkte Interaktion mit polymerisierten Mikrotubuli durch einen *in vitro*-Test nachgewiesen werden. EML4 ist laut Definition also ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP).

Durch Immunisierungen mit bakteriell exprimiertem, rekombinantem GST-EML4 konnte ein neuer, für EML4 spezifischer monoklonaler Antikörper („152“) hergestellt werden. Für beide anti-EML4 Antikörper („Ki-Mit“ und „152“) konnten darüberhinaus ihre spezifischen Epitope innerhalb der Proteinsequenz von EML4 ermittelt werden.

Die Untersuchungen von posttranslationalen Modifikationen des EML4-Proteins ergaben, daß EML4 ein Phosphoprotein ist, welches *in vivo* in der Mitose sowohl an Tyrosinresten, als auch Serin- bzw. Threoninresten phosphoryliert wird. Dagegen liegt EML4 während

der Interphase überwiegend in dephosphorylierter Form vor. EML4 ist darüberhinaus ein Glykoprotein. Im Gegensatz zur Phosphorylierung ist die Glykosylierung von EML4 aber nicht zellzyklusabhängig.

Die subzelluläre Verteilung von EML4 im Verlauf des Zellzyklusses konnte mit Hilfe der konfokalen „Laser scanning“-Mikroskopie detailliert dargestellt werden. EML4 ist während des gesamten Zellzyklusses im Zytoplasma lokalisiert. Während der Mitose ist EML4 zusätzlich mit den Metaphasechromosomen assoziiert, jedoch nicht mit der Spindel. Ferner konnte anhand der Daten aus der Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, daß die phosphorylierte Form von EML4 mit Beginn des Übergangs von der Metaphase zur Anaphase in granulären Strukturen konzentriert wird und schließlich verschwindet. Schließlich konnte das Gen von EML4 durch Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung chromosomal lokalisiert werden. Es befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p22-p21), ist in 23 Exons organisiert und hat eine Gesamtlänge von etwa 163 kb.

## 5.2 Summary

With help of a monoclonal antibody (Ki-Mit) the human 120 kDa protein EML4 was discovered in the *Institute for Hematopathology* in Kiel. Ki-Mit detects EML4 strongly in mitotic cells whereas interphase cells turn out to be only weakly positive. Yet before starting this work, EML4 was purified via immunoprecipitation with Ki-Mit before it was proteolytically digested and partly sequenced. Analysis of the obtained sequence data revealed that only a small part of the sequences showed significant homologies to already characterized proteins belonging to the microtubule associated family of EMAP-like proteins. These findings led to the presumption that EML4 is a previously unknown human protein that might be a new member of the above mentioned family. During the course of this work EML4 could be cloned and partly characterized. The results of the presented work yielded important informations concerning the newly discovered human microtubule associated protein EML4.

Using PCR experiments and 5'-RACE the EML4 cDNA was amplified, cloned and entirely sequenced. The mRNA transcript of EML4 has a length of 5539 bp. The sequence was submitted to the public genbank database (accession number AF177377). The results confirmed that EML4 is a yet uncharacterized protein. Sequence homology searches revealed that EML4 belongs to the conserved family of „echinoderm microtubule associated protein“ (EMAP)-like proteins. EMAP-like proteins are WD-repeat proteins that exist in many of the hitherto investigated metazoans, for instance in humans. EMAP-like proteins are supposed to play an important role in regulating the dynamic of microtubules. Concerning the EML4 polypeptide it could be demonstrated that it directly interacts with

*in vitro* polymerized and stabilized microtubules. Immunization with recombinant bacterially expressed GST-EML4 fusion proteins yielded a new monoclonal antibody (152) specific for EML4. Moreover the specific epitopes of both anti-EML4 antibodies (Ki-Mit and 152) within the protein sequence of EML4 could be identified. Investigation of posttranslational modifications of the EML4 polypeptide showed that EML4 is a phosphoprotein that is phosphorylated during mitosis on both, tyrosine residues and serine/threonine residues. In contrast to mitotic cells, interphase cells contain predominantly a dephosphorylated form of EML4. Additionally it could be demonstrated that EML4 is a glycoprotein. In contrast to the phosphorylation, the glycosylation turned out to be independent from cell cycle progression. The subcellular distribution of EML4 during the different cell cycle phases was visualized in detail using confocal laser scanning microscopy technique. EML4 is diffusely distributed throughout the cytoplasm during the cell cycle. In addition, during mitosis EML4 is significantly associated with the chromosomal scaffold of metaphase chromosomes. The immunofluorescence microscopy data further showed that the phosphorylated form of EML4 is concentrated within granular structures during the transition from metaphase to anaphase before it finally vanishes. The EML4 gene was assigned to the short arm of chromosome 2 (2p22-p21) via fluorescence *in situ* hybridization (FISH). It is organized into 23 exons and has an overall size of about 163 kb.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Alexandru, G., Zachariae, W., Schleiffer, A. und Nasmyth, K. (1999). Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *EMBO J.* **18** (10): 2707-2721.
2. Andersen, S. S., Buendia, B., Dominguez, J. E., Sawyer, A. und Karsenti, E. (1994). Effect on microtubule dynamics of XMAP230, a microtubule-associated protein present in *Xenopus laevis* eggs and dividing cells. *J. Cell Biol.* **127** (5): 1289-1299.
3. Andersen, S. S., Ashford, A. J., Tournebize, R., Gavet, O., Sobel, A., Hyman, A. A. und Karsenti, E. (1997). Mitotic chromatin regulates phosphorylation of Stathmin/Op18. *Nature* **389** (6651): 640-643.
4. Barford, D. (1999). Colworth Medal Lecture. Structural studies of reversible protein phosphorylation and protein phosphatases. *Biochem. Soc. Trans.* **27** (6): 751-766.
5. Barinaga, M. (1995). A new twist to the cell cycle. *Science* **269** (5224): 631-632.
6. Barrong, S. D., Chaitin, M. H., Fliesler, S. J., Possin, D. E., Jacobson, S. G. und Milam, A. H. (1992). Ultrastructure of connecting cilia in different forms of retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* **110** (5): 706-710.
7. Belmont, L. D. und Mitchison, T. J. (1996). Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* **84** (4): 623-631.
8. Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1513-1523.
9. Boyum, A. (1968). Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand. J. Clin. Lab Invest Suppl* **97** 31-50.
10. Brisch, E., Daggett, M. A. und Suprenant, K. A. (1996). Cell cycle-dependent phosphorylation of the 77 kDa echinoderm microtubule-associated protein (EMAP) in vivo and association with the p34cdc2 kinase. *J. Cell Sci.* **109** ( Pt 12) 2885-2893.

11. Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R. Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M. C., Hendil, K. B., Tanaka, K., Dyson, J. und Rivett, J. (2000). Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem. J.* **346 Pt 1** 155-161.
12. Carothers, A. M., Urlaub, G., Mucha, J., Grunberger, D. und Chasin, L. A. (1989). Point mutation analysis in a mammalian gene: rapid preparation of total RNA, PCR amplification of cDNA, and Taq sequencing by a novel method. *Biotechniques* **7** (5): 494-499.
13. Cassimeris, L. (1999). Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11** (1): 134-141.
14. Clapham, D. E. und Neer, E. J. (1993). New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365** (6445): 403-406.
15. Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K. A., Stein, H. und Mason, D. Y. (1984). Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J. Histochem. Cytochem.* **32** (2): 219-229.
16. Coux, O., Tanaka, K. und Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65** 801-847.
17. Cross, D. C., Munoz, J. P., Hernandez, P. und Maccioni, R. B. (2000). Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau. *J. Cell Biochem.* **78** (2): 305-317.
18. Dasso, M., Smythe, C., Milarski, K., Kornbluth, S. und Newport, J. W. (1992). DNA replication and progression through the cell cycle. *Ciba Found. Symp.* **170** 161-180.
19. Davis, F. M., Tsao, T. Y., Fowler, S. K. und Rao, P. N. (1983). Monoclonal antibodies to mitotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80** (10): 2926-2930.
20. Desai, A. und Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13** 83-117.
21. Dessev, G., Iovcheva-Dessev, C., Bischoff, J. R., Beach, D. und Goldman, R. (1991). A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear



- lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J. Cell Biol.* **112** (4): 523-533.
22. Dhamodharan, R. und Wadsworth, P. (1995). Modulation of microtubule dynamic instability in vivo by brain microtubule associated proteins. *J. Cell Sci.* **108** ( Pt 4) 1679-1689.
23. Donev, R. M. und Djondjurov, L. P. (1999). Macromolecular and ultrastructural organization of the mitotic chromosome scaffold. *DNA Cell Biol.* **18** (2): 97-105.
24. Doree, M., Labbe, J. C. und Picard, A. (1989). M phase-promoting factor: its identification as the M phase-specific H1 histone kinase and its activation by dephosphorylation. *J. Cell Sci. Suppl* **12** 39-51.
25. Drechsel, D. N., Hyman, A. A., Cobb, M. H. und Kirschner, M. W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell* **3** (10): 1141-1154.
26. Eichenmuller, B., Everley, P., Palange, J., Lepley, D. und Suprenant, K. A. (2002). The human EMAP-like protein-70 (ELP70) is a microtubule destabilizer that localizes to the mitotic apparatus. *J. Biol. Chem.* **277** (2): 1301-1309.
27. Eudy, J. D., Ma-Edmonds, M., Yao, S. F., Talmadge, C. B., Kelley, P. M., Weston, M. D., Kimberling, W. J. und Sumegi, J. (1997). Isolation of a novel human homologue of the gene coding for echinoderm microtubule-associated protein (EMAP) from the Usher syndrome type 1a locus at 14q32. *Genomics* **43** (1): 104-106.
28. Fang, G., Yu, H. und Kirschner, M. W. (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev.* **12** (12): 1871-1883.
29. Fesquet, D., Fitzpatrick, P. J., Johnson, A. L., Kramer, K. M., Toyn, J. H. und Johnston, L. H. (1999). A Bub2p-dependent spindle checkpoint pathway regulates the Dbf2p kinase in budding yeast. *EMBO J.* **18** (9): 2424-2434.
30. Frahm, S. O., Schubert, C., Parwaresch, R. und Rudolph, P. (2001). High proliferative activity may predict early metastasis of thin melanomas. *Hum. Pathol.* **32** (12): 1376-1381.

31. Garcia-Higuera, I., Gaitatzes, C., Smith, T. F. und Neer, E. J. (1998). Folding a WD repeat propeller. Role of highly conserved aspartic acid residues in the G protein beta subunit and Sec13. *J. Biol. Chem.* **273** (15): 9041-9049.
32. Gard, D. L. und Kirschner, M. W. (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J. Cell Biol.* **105** (5): 2203-2215.
33. Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. und Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* **31** (1): 13-20.
34. Gieffers, C., Dube, P., Harris, J. R., Stark, H. und Peters, J. M. (2001). Three-dimensional structure of the anaphase-promoting complex. *Mol. Cell* **7** (4): 907-913.
35. Gradin, H. M., Larsson, N., Marklund, U. und Gullberg, M. (1998). Regulation of microtubule dynamics by extracellular signals: cAMP- dependent protein kinase switches off the activity of oncoprotein 18 in intact cells. *J. Cell Biol.* **140** (1): 131-141.
36. Grangeasse, C., Doublet, P. und Cozzone, A. J. (2002). Tyrosine phosphorylation of protein kinase Wzc from *Escherichia coli* K12 occurs through a two-step process. *J. Biol. Chem.* **277** (9): 7127-7135.
37. Hagestedt, T., Lichtenberg, B., Wille, H., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E. (1989). Tau protein becomes long and stiff upon phosphorylation: correlation between paracrystalline structure and degree of phosphorylation. *J. Cell Biol.* **109** (4 Pt 1): 1643-1651.
38. Hartwell, L., Weinert, T., Kadyk, L. und Garvik, B. (1994). Cell cycle checkpoints, genomic integrity, and cancer. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **59** 259-263.
39. Hartwell, L. H. und Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246** (4930): 629-634.
40. He, X., Patterson, T. E. und Sazer, S. (1997). The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint protein mad2p blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94** (15): 7965-7970.

41. Heidebrecht, H. J., Buck, F., Steinmann, J., Sprenger, R., Wacker, H. H. und Parwaresch, R. (1997). p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. *Blood* **90** (1): 226-233.
42. Hershko, A., Ganoth, D., Sudakin, V., Dahan, A., Cohen, L. H., Luca, F. C., Ruderman, J. V. und Eytan, E. (1994). Components of a system that ligates cyclin to ubiquitin and their regulation by the protein kinase cdc2. *J. Biol. Chem.* **269** (7): 4940-4946.
43. Hilt, W. und Wolf, D. H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* **21** (3): 96-102.
44. Hirokawa, N. (1994). Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6** (1): 74-81.
45. Hirokawa, N., Noda, Y. und Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10** (1): 60-73.
46. Huang, J. N., Park, I., Ellingson, E., Littlepage, L. E. und Pellman, D. (2001). Activity of the APC(Cdh1) form of the anaphase-promoting complex persists until S phase and prevents the premature expression of Cdc20p. *J. Cell Biol.* **154** (1): 85-94.
47. Huchon, D., Ozon, R., Fischer, E. H. und Demaille, J. G. (1981). [Meiotic maturation of the ovocyte of *Xenopus laevis* : a 4-step mechanism]. *C. R. Seances Acad. Sci. III* **292** (1): 65-67.
48. Hunter, T. und Sefton, B. M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77** (3): 1311-1315.
49. King, R. W., Peters, J. M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P. und Kirschner, M. W. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81** (2): 279-288.
50. Kosik, K. S., Joachim, C. L. und Selkoe, D. J. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83** (11): 4044-4048.
51. Kramer, E. R., Gieffers, C., Holzl, G., Hengstschlager, M. und Peters, J. M. (1998). Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr. Biol.* **8** (22): 1207-1210.

52. Kreipe, H., Wacker, H. H., Heidebrecht, H. J., Haas, K., Hauberg, M., Tiemann, M. und Parwaresch, R. (1993). Determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphomas by monoclonal antibody Ki-S5 directed against a formalin-resistant epitope of the Ki-67 antigen. *Am. J. Pathol.* **142** (6): 1689-1694.
53. Labbe, J. C., Capony, J. P., Caput, D., Cavadore, J. C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J. M., Picard, A. und Doree, M. (1989). MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* **8** (10): 3053-3058.
54. Laemmli, U. K., Beguin, F. und Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J. Mol. Biol.* **47** (1): 69-85.
55. Lahav-Baratz, S., Sudakin, V., Ruderman, J. V. und Hershko, A. (1995). Reversible phosphorylation controls the activity of cyclosome-associated cyclin-ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92** (20): 9303-9307.
56. Lamb, J. R., Michaud, W. A., Sikorski, R. S. und Hieter, P. A. (1994). Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *EMBO J.* **13** (18): 4321-4328.
57. Larsson, N., Melander, H., Marklund, U., Osterman, O. und Gullberg, M. (1995). G2/M transition requires multisite phosphorylation of oncoprotein 18 by two distinct protein kinase systems. *J. Biol. Chem.* **270** (23): 14175-14183.
58. Larsson, N., Marklund, U., Gradin, H. M., Brattsand, G. und Gullberg, M. (1997). Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol. Cell Biol.* **17** (9): 5530-5539.
59. Leger, J., Kempf, M., Lee, G. und Brandt, R. (1997). Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau. *J. Biol. Chem.* **272** (13): 8441-8446.
60. Lepley, D. M., Palange, J. M. und Suprenant, K. A. (1999). Sequence and expression patterns of a human EMAP-related protein-2 (HuEMAP-2). *Gene* **237** (2): 343-349.
61. Li, Q. und Suprenant, K. A. (1994). Molecular characterization of the 77-kDa echinoderm microtubule-associated protein. Homology to the beta-transducin family. *J. Biol. Chem.* **269** (50): 31777-31784.

62. Li, Q., Callaghan, M. und Suprenant, K. A. (1998). The 77-kDa echinoderm microtubule-associated protein (EMAP) shares epitopes with the mammalian brain MAPs, MAP-2 and tau. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250** (2): 502-505.
63. Lu, P. J., Wulf, G., Zhou, X. Z., Davies, P. und Lu, K. P. (1999). The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* **399** (6738): 784-788.
64. Ly, C. D., Roche, K. W., Lee, H. K. und Wenthold, R. J. (2002). Identification of rat EMAP, a delta-glutamate receptor binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291** (1): 85-90.
65. MacCallum, D. E. und Hall, P. A. (2000). The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J. Pathol.* **191** (3): 286-298.
66. Maccioni, R. B., Tapia, L. und Cambiazo, V. (1995). Functional organization of tau proteins during neuronal differentiation and development. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28** (8): 827-841.
67. Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E. (1993). Tau as a marker for Alzheimer's disease. *Trends Biochem. Sci.* **18** (12): 480-483.
68. Marklund, U., Osterman, O., Melander, H., Bergh, A. und Gullberg, M. (1994). The phenotype of a "Cdc2 kinase target site-deficient" mutant of oncoprotein 18 reveals a role of this protein in cell cycle control. *J. Biol. Chem.* **269** (48): 30626-30635.
69. Marklund, U., Larsson, N., Gradin, H. M., Brattsand, G. und Gullberg, M. (1996). Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *EMBO J.* **15** (19): 5290-5298.
70. Masson, D. und Kreis, T. E. (1995). Binding of E-MAP-115 to microtubules is regulated by cell cycle- dependent phosphorylation. *J. Cell Biol.* **131** (4): 1015-1024.
71. McGowan, C. H. und Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J.* **12** (1): 75-85.
72. Millar, J. B., Lenaers, G., McGowan, C. und Russell, P. (1992). Activation of MPF in fission yeast. *Ciba Found. Symp.* **170** 50-58.

73. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1** 263-273.
74. Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R. und Smith, T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371** (6495): 297-300.
75. Okayama, H. und Berg, P. (1982). High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell Biol.* **2** (2): 161-170.
76. Ookata, K., Hisanaga, S., Sugita, M., Okuyama, A., Murofushi, H., Kitazawa, H., Chari, S., Bulinski, J. C. und Kishimoto, T. (1997). MAP4 is the in vivo substrate for CDC2 kinase in HeLa cells: identification of an M-phase specific and a cell cycle-independent phosphorylation site in MAP4. *Biochemistry* **36** (50): 15873-15883.
77. Palmer, A., Rivett, A. J., Thomson, S., Hendil, K. B., Butcher, G. W., Fuertes, G. und Knecht, E. (1996). Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J.* **316 ( Pt 2)** 401-407.
78. Parwaresch, R. und Rudolph, P. (1996). The Cell Cycle - Theory and Application to Cancer. *Onkologie* **19** 464-472.
79. Pryer, N. K., Walker, R. A., Skeen, V. P., Bourns, B. D., Soboeiro, M. F. und Salmon, E. D. (1992). Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamic instability in vitro. Real-time observations using video microscopy. *J. Cell Sci.* **103 ( Pt 4)** 965-976.
80. Rivett, A. J., Palmer, A. und Knecht, E. (1992). Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* **40** (8): 1165-1172.
81. Rodionov, V. I. und Borisy, G. G. (1997). Microtubule treadmilling in vivo. *Science* **275** (5297): 215-218.
82. Rudolph, P., Lappe, T., Schubert, C., Schmidt, D., Parwaresch, R. M. und Christophers, E. (1995). Diagnostic assessment of two novel proliferation-specific antigens in benign and malignant melanocytic lesions. *Am. J. Pathol.* **147** (6): 1615-1625.
83. Rudolph, P., Knuchel, R., Endl, E., Heidebrecht, H. J., Hofstader, F. und Parwaresch, R. (1998). The immunohistochemical marker Ki-S2: cell cycle

- kinetics and tissue distribution of a novel proliferation-specific antigen. *Mod. Pathol.* **11** (5): 450-456.
84. Rudolph, P., Alm, P., Heidebrecht, H. J., Bolte, H., Ratjen, V., Baldetorp, B., Ferno, M., Olsson, H. und Parwaresch, R. (1999). Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91** (3): 271-278.
85. Rudolph, P., Alm, P., Olsson, H., Heidebrecht, H. J., Ferno, M., Baldetorp, B. und Parwaresch, R. (2001). Concurrent overexpression of p53 and c-erbB-2 correlates with accelerated cycling and concomitant poor prognosis in node-negative breast cancer. *Hum. Pathol.* **32** (3): 311-319.
86. Rusan, N. M., Fagerstrom, C. J., Yvon, A. M. und Wadsworth, P. (2001). Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol. Biol. Cell* **12** (4): 971-980.
87. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230** (4732): 1350-1354.
88. Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74** (12): 5463-5467.
89. Saxena, K., Gaitatzes, C., Walsh, M. T., Eck, M., Neer, E. J. und Smith, T. F. (1996). Analysis of the physical properties and molecular modeling of Sec13: A WD repeat protein involved in vesicular traffic. *Biochemistry* **35** (48): 15215-15221.
90. Schlegelberger, B., Metzke, S., Harder, S., Zühlke-Jenisch, R., Zhang, Y. und Siebert, R. (1999). Classical and molecular cytogenetics of tumor cells. 151-185.
91. Scott, C. W., Spreen, R. C., Herman, J. L., Chow, F. P., Davison, M. D., Young, J. und Caputo, C. B. (1993). Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* **268** (2): 1166-1173.
92. Shi, L., Potts, M. und Kennelly, P. J. (1998). The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol. Rev.* **22** (4): 229-253.

93. Shiina, N., Moriguchi, T., Ohta, K., Gotoh, Y. und Nishida, E. (1992). Regulation of a major microtubule-associated protein by MPF and MAP kinase. *EMBO J.* **11** (11): 3977-3984.
94. Sikorski, R. S., Boguski, M. S., Goebel, M. und Hieter, P. (1990). A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* **60** (2): 307-317.
95. Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K. und Neer, E. J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **24** (5): 181-185.
96. Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E. und Sigler, P. B. (1996). Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature* **379** (6563): 369-374.
97. Sorger, P. K. und Murray, A. W. (1992). S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34cdc28. *Nature* **355** (6358): 365-368.
98. Stukenberg, P. T. und Kirschner, M. W. (2001). Pin1 acts catalytically to promote a conformational change in Cdc25. *Mol. Cell* **7** (5): 1071-1083.
99. Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F. C., Ruderman, J. V. und Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* **6** (2): 185-197.
100. Suprenant, K. A., Dean, K., McKee, J. und Hake, S. (1993). EMAP, an echinoderm microtubule-associated protein found in microtubule- ribosome complexes. *J. Cell Sci.* **104** (2): 445-450.
101. Tombes, R. M., Peloquin, J. G. und Borisy, G. G. (1991). Specific association of an M-phase kinase with isolated mitotic spindles and identification of two of its substrates as MAP4 and MAP1B. *Cell Regul.* **2** (11): 861-874.
102. van der Voorn, L. und Ploegh, H. L. (1992). The WD-40 repeat. *FEBS Lett.* **307** (2): 131-134.
103. Vincent, C., Doublet, P., Grangeasse, C., Vaganay, E., Cozzone, A. J. und Duclos, B. (1999). Cells of Escherichia coli contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J. Bacteriol.* **181** (11): 3472-3477.



104. Visintin, R., Prinz, S. und Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC- dependent proteolysis. *Science* **278** (5337): 460-463.
105. Walczak, C. E. (2000). Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12** (1): 52-56.
106. Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J. A., Posner, B. A., Gilman, A. G. und Sprang, S. R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* **83** (6): 1047-1058.
107. Weil, D., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Levilliers, J., Weston, M. D. und . (1995). Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* **374** (6517): 60-61.
108. Yu, H., King, R. W., Peters, J. M. und Kirschner, M. W. (1996). Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. *Curr. Biol.* **6** (4): 455-466.
109. Yvon, A. M. und Wadsworth, P. (1997). Non-centrosomal microtubule formation and measurement of minus end microtubule dynamics in A498 cells. *J. Cell Sci.* **110** ( Pt 19) 2391-2401.
110. Zhai, Y. und Borisy, G. G. (1994). Quantitative determination of the proportion of microtubule polymer present during the mitosis-interphase transition. *J. Cell Sci.* **107** ( Pt 4) 881-890.
111. Zhao, J. Y., Kuang, J., Adlakha, R. C. und Rao, P. N. (1989). Threonine phosphorylation is associated with mitosis in HeLa cells. *FEBS Lett.* **249** (2): 389-395.
112. Zhou, X. Z., Lu, P. J., Wulf, G. und Lu, K. P. (1999). Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* **56** (9-10): 788-806.



```

EML4      VLDAETRDLSIHTDGNQLSVMRYSIDGTF LAVGSHDNFIYLYV VSENGRKYSRYGRCT 718
          :*:**:*::*****:***: * ** :**:* ** *:* * * .:.* ** :* *:::

EML1      GHSSFITHLDWSVNSQFLVNSGDYEILYWVP-SACKQVVS VETTRDIEWATYTCTLGFH 630
EML2      GHSSFITHLDWAQDSSCFVTNSGDYEILYWDP-ATCKQITSADAVRNM EWATATCVLGFQ 562
EML4      GHSSYITHLDWSPDNKYIMNSGDYEILYWDIPNGCKLIRNRSDCKDIDWTTTYTCV LGFQ 778
          ****:*****: :. . :::***** ** : . . :::**:* ** .***

EML1      VFGVWPEGSDGTDINAVCRAHEKLLSTGDDFGKVHLFSYPCSQFRAPSHIYGGHSSHVT 690
EML2      VFGIWSEGADGTDINAVARSHDGKLLASADDFGKVHLFSYPCCQPRALSHKYGGHSSHVT 622
EML4      VFGVWPEGSDGTDINALVRSHNRKVI AVADDFCKVHLFQYPCSKAKAPSHKYSAHSSHVT 838
          ***:*.**:******: *::: *::: .*** ***** .***.: :* ** *..*****

EML1      NVDFLCEDSHLISTGGKDTSIMQWRVI----- 717
EML2      NVAF LWDDSMALTTGGKDTSVLQWRVV----- 649
EML4      NVSEFTHNDSHLISTGGKDM SIIQWKLVEKLSLPQNETVADTTLT KAPVSSSTESVIQSNTP 898
          ** * :** ::* ** *::**:::

EML1      -----
EML2      -----
EML4      TPPSQPLNETAEESRISSSPTLLENSLEQTVEPSEDHSEEESEEGSGDLGEPLYEPC 958

EML1      -----
EML2      -----
EML4      NEISKEQAKATLLEDQDPS PSS 981

```

Legende:

- \* = identische oder konservierte Aminosäuren in allen drei Sequenzen (grau unterlegt)
- : = konservierte Aminosäureaustausche
- . = semikonservierte Aminosäureaustausche

In dem dargestellten „Alignment“ (Quelle: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ist die für die EMAP-ähnlichen Proteine charakteristische HELP-Domäne hellblau unterlegt (nach Eichenmüller et al., 2002). Als Basis für das „Alignment“ dienten die unter folgenden Zugriffsnummern in der „Swissprot“-Proteindatenbank (<http://www.expasy.org/sprot/>) hinterlegten Sequenzen: EML1=O00432, EML2=O95834, EML4=Q9HC35.

## 7.2 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

### Veröffentlichungen:

Heidebrecht, H. J., Buck, F., Pollmann, M., Siebert, R. und Parwaresch, R. (2000). Cloning and localization of C2orf2(ropp120), a previously unknown WD repeat protein. *Genomics* **68** (3): 348-350.

### Kongressbeiträge (Abstracts und Poster):

*Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) 2000 (Karlsruhe, Deutschland)*

Pollmann, M., Heidebrecht, H. J., Buck, F. und Parwaresch, R. (2000). Cloning and expression of ropp120: A cytoplasmic protein strongly overexpressed in mitotic cells. *European Journal of Cell Biology*

*12. Europäische Zellzykluskonferenz (2001, Mayrhofen, Österreich)*

Pollmann, M., Buck, F., Szczepanowski, M., Parwaresch, R. und Heidebrecht, H. J. (2001). Genomic organization of ropp120: a WD-repeat protein overexpressed during mitosis. *Cell Biology International* **25** (2): A24

*Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) 2001 (Strasbourg, Frankreich)*

Pollmann, M., Szczepanowski, M., Dettmann, B., Parwaresch, R. und Heidebrecht, H. J. (2001). The Ki-Mit epitope is predominantly detectable during mitosis. *Biology of the Cell* **93** (3/4): 208

## 7.3 Abkürzungen

<b>A</b>	Ampere
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>aqua bidest.</b>	doppelt destilliertes Wasser
<b>aqua dest.</b>	destilliertes Wasser
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>AP</b>	alkalische Phosphatase
<b>APAAP</b>	alkalische Phosphatase/anti-alkalische Phosphatase
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>cDNA</b>	„copy DNA“; der RNA komplementäre DNA
<b>DABCO</b>	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]oktan
<b>DAPI</b>	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
<b>ddNTP</b>	2', 3'-Didesoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat (auch Mischung der vier DidesoxynukleotideddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure („Desoxyribonucleic acid“)
<b>dNTP</b>	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat (auch Mischung der vier Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ELISA</b>	„Enzyme-linked immunosorbent assay“
<b>FCS</b>	Fötale Kälberserum („fetal calf serum“)
<b>FISH</b>	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyant
<b>G3PDH</b>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>h</b>	Stunde
<b>HPLC</b>	High Pressure Liquid Chromatography
<b>HEPES</b>	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>kDa</b>	Kilodalton

---

<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>Lsg.</b>	Lösung
<b>μ</b>	Mikro-
<b>m</b>	Milli-
<b>M</b>	Molar
<b>mAk</b>	monoklonaler Antikörper
<b>min</b>	Minute
<b>mRNA</b>	Boten-RNA („messenger RNA“)
<b>MW</b>	Molekulargewicht
<b>orf</b>	offener Leserahmen („open reading frame“)
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>P</b>	Prolin
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Saline
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
<b>PHA</b>	Phythämagglutinin
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluorid
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
<b>RPMI</b>	Rockwell Park Memorial Institute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde
<b>s.</b>	siehe
<b>S</b>	Svedberg
<b>S</b>	Serin
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>T</b>	Threonin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TAE</b>	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<b>TBS</b>	Tris-gepufferte Saline
<b>TBS-T</b>	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
<b>Tris</b>	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TRITC</b>	Tetramethylrhodaminisothiocyanat

---

<b>TSR</b>	Template Suppression Reagent
<b>U</b>	Einheit („Unit“)
<b>ü. N.</b>	über Nacht
<b>UV</b>	ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>W</b>	Watt
<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
<b>Y</b>	Tyrosin

---

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Marc Pollmann
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	11.10.1972
Geburtsort	Salzgitter
Wohnort	Calvinstraße 8 24114 Kiel
Eltern	Marion und Wilfried Pollmann

### **Schulbildung**

1978-1982	Grundschule am Ostertal, Salzgitter
1982-1984	Orientierungsstufe an der Schölke, Salzgitter
1984-1991	Gymnasium am Fredenberg, Salzgitter
1991	Abitur

### **Zivildienst**

12/1991-2/1993	Zivildienst im Jugendamt der Stadt Salzgitter
----------------	---

### **Hochschulausbildung**

10/1993-3/1999	Biologie-Studium an der Technischen Universität Braunschweig mit Fachrichtung Mikrobiologie/Zellbiologie/Zoologie
5/1998-3/1999	Diplomarbeit in der Abteilung Zellbiologie und Immunologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig; Thema: Aromatische und basische Aminosäuren innerhalb der EVH1-Domäne von VASP definieren die Bindung an ihre prolinreichen Liganden
seit 4/1999	Doktorarbeit im Institut für Hämatopathologie des Klinikums der CAU Kiel



## 8. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im *Institut für Hämatopathologie* des Klinikums der CAU zu Kiel durchgeführt.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reza Parwaresch für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Arbeit, für die zahlreichen motivierenden Diskussionen und für die weitreichende Unterstützung sowie die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Bei Frau Prof. Dr. Karin Krupinska von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Übernahme des Referats und für das Interesse an der vorliegenden Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Hans-Jürgen Heidebrecht (Hansi) danke ich sehr für die nette und kompetente Betreuung meiner Doktorarbeit und für die konstruktiven, anregenden Gespräche.

Für die Kooperation und Hilfe bei verschiedenen Experimenten gilt mein großer Dank PD Dr. Sabine Adam, Dr. Friedrich Buck, Dr. Elmar Endl, Frau Marie-Luise Kruse und PD Dr. Reiner Siebert.

Den Mitgliedern und Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe Heidebrecht gebührt ein ganz großes Dankeschön für ihre Hilfsbereitschaft und technische Assistenz sowie für das nette Arbeitsklima und den Kaffee: Kristine Andersen, Bianca Dettmann, Eskild Nö, Reinhard Steffen und Monika Szczepanowski.

Weiterhin danke ich den (z. T. ehemaligen) Arbeitskollegen des Isotopenlabors: Meike Friedrichsen, Dr. Klaus Heidorn, Björn Iwers, Dr. Wolfram Klapper, Karen Kühne, Steven Reinhard, Dr. Joachim Schalk, Anna Sotnikova und Lihong Weng.

Dank geht auch an folgende Mitarbeiter und Doktoranden des Instituts: Olivera Batic, Frau Dege, Dr. Andreas Hanne, Monika Hauberg, Dr. Matthias Krams, Frau Mäder, Mossi, Lars Rölver, Jan Scheele, Edda Sevecke-Wessels und Karen Wimmer.

Desweiteren danke ich ganz besonders meiner Freundin Gesche Brauer, der ich viel zu selten erzählt habe was ich eigentlich den ganzen Tag im Labor mache und natürlich meinen Eltern, die zum Gelingen dieser Arbeit in großem Maße beigetragen haben.