

Reinigung und Charakterisierung von Tubulin Polyglutamylase
aus *Crithidia fasciculata*

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Stefan Westermann

geboren am 7. Oktober 1971 in Heesen

2001

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Biochemie und Zellbiologie von Herrn Prof. Dr. Klaus Weber am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. Dr. B. Tümmler
Medizinische Hochschule Hannover

Koreferent: Prof. Dr. Klaus Weber
MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen

Tag der Promotion: 26.11.2001

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- 1) Westermann, S., Schneider, A., Horn, E.K. und Weber, K. (1999). Isolation of *Crithidia* tubulin polyglutamylase; binding to microtubules and tubulin, and glutamylation of mammalian brain α - and β -tubulins. *J.Cell Sci.* **112**, 2185-2193.
- 2) Westermann, S., Plessmann, U. und Weber, K. (1999). Synthetic peptides identify the minimal sequence requirements of tubulin polyglutamylase in side chain elongation. *FEBS Lett.* **459**, 90-94.
- 3) Westermann, S. und Weber, K. (2000). Cloning and recombinant expression of the La RNA-binding protein from *Trypanosoma brucei*. *Biochem.Biophys.Acta* **1492**, 483-487.

1	ZUSAMMENFASSUNG	8
2	EINLEITUNG	12
3	MATERIALIEN UND METHODEN	20
3.1	Materialien	20
3.1.1	Geräte	20
3.1.2	Chemikalien	21
3.1.3	Radiochemikalien	21
3.1.4	Antikörper	22
3.1.5	Bakterienstämme	22
3.1.6	Plasmide	22
3.1.7	Zelllinien	22
3.1.8	Puffersysteme	22
3.2	Proteinbiochemische Methoden	23
3.2.1	Proteinbestimmung	23
3.2.2	Proteinfällung	23
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
3.2.4	SDS-PAGE zur Trennung von α - und β -Tubulin	25
3.2.5	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	25
3.2.6	Proteinreinigungen	25
3.2.6.1	Reinigung von Tubulin aus Schweinehirn	25
3.2.6.2	Herstellung von MAP-freiem Hirntubulin	26
3.2.6.3	Cytoskelett-Präparation und Solubilisierung von Tubulin Polyglutamylase aus <i>Crithidia</i>	26
3.2.6.4	Reinigung und Charakterisierung carboxyterminaler Peptide von Tubulin aus <i>Crithidia</i>	27
3.2.6.5	Reinigung von Tubulin Polyglutamylase aus dem 0,25 M NaCl-Überstand	27
3.2.6.6	Präparation der ATP-Affinitätssäule	29
3.2.6.7	Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E.coli</i>	29
3.2.7	Enzymtest für Tubulin Polyglutamylase	30
3.2.8	Enzymtest für Monoglutamylierungs-(„Verzweigungs“-)Aktivität	30
3.2.9	In situ Verdau von Proteinen mit Endoproteinase LysC	31
3.2.10	Chemische Spaltung von Proteinen mit Bromcyan	31
3.2.11	Vorbereitung von Proben für die Massenspektroskopie	31
3.2.12	Aufnahme der Massenspektren	32
3.2.13	In-vitro-Glutamylierung von synthetischen Peptiden	32
3.2.14	In-vitro Phosphorylierungs-Test	33

3.2.15	RNA-Bindungstest	33
3.2.16	Hochauflösende isoelektrische Fokussierung	33
3.2.17	Autoradiographie von Polyacrylamidgelen	34
3.3	Immunologische Methoden	35
3.3.1	Western-Transfer	35
3.3.2	Immunblotting	35
3.3.3	Herstellung polyklonaler Antikörper	36
3.3.4	Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern	36
3.3.4.1	Herstellung der Affinitätsmatrix	36
3.3.4.2	Affinitätsreinigung der Antikörper	36
3.4	Molekularbiologische Methoden	38
3.4.1	Nährmedien	38
3.4.2	Anzuchtbedingungen	38
3.4.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.4.4	Agarosegelelektrophorese	39
3.4.5	Fällung von DNA	39
3.4.6	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
3.4.7	Enzymatische Behandlung von DNA	40
3.4.7.1	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
3.4.7.2	Behandlung von DNA mit Alkalischer Phosphatase	40
3.4.7.3	Ligationen	40
3.4.8	Präparation transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen und Transformation	41
3.4.9	TOPO-TA-Klonierung	41
3.4.10	Polymerase-Kettenreaktion	42
3.4.11	Kolonie-PCR	42
3.4.12	Analytische Plasmidisolierung	43
3.4.13	Präparative Plasmidisolierung	43
3.4.14	RNA-Isolierung aus <i>Crithidia</i>	44
3.4.15	Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)	44
3.4.16	RACE-PCR	44
3.4.17	Gekoppelte in-vitro Transkription/Translation	45
3.4.18	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E.coli</i>	46
3.4.19	Sequenzierung von Doppelstrang-DNA	46
3.5	Zellbiologische Methoden	47
3.5.1	Kultivierung von <i>Crithidia fasciculata</i>	47
3.5.2	Einfrieren und Auftauen von <i>Crithidia fasciculata</i>	47
3.5.3	Kultivierung von Hela-Zellen	48
3.5.4	Immunfluoreszenz bei <i>Crithidia</i> und Hela-Zellen	48

4	ERGEBNISSE	49
4.1	Kultivierung von <i>Crithidia fasciculata</i>	49
4.2	Isolierung und Charakterisierung der carboxyterminalen Fragmente von Tubulin aus <i>Crithidia</i>	50
4.3	Immunfluoreszenz an <i>Crithidia</i> - und HeLa-Zellen mit dem glutamylierungs-spezifischen Antikörper GT335	52
4.4	Glutamylierungsaktivität von isolierten Cytoskeletten und Solubilisierung der Tubulin Polyglutamylase	54
4.5	Einbau von radioaktiv markierter Glutaminsäure in die carboxyterminalen Peptide von $\alpha\beta$ Tubulin	56
4.6	Etablierung eines Filtertests für die in-vitro Glutamylierung	56
4.7	Allgemeine Enzymeigenschaften der Tubulin Polyglutamylase	58
4.8	Analyse der Glutamylierungsprodukte durch 2D-Gelelektrophorese	60
4.9	Glutamylierung von Tubulin aus Säugerhirn durch eine Enzymfraktion aus Trypanosomen	60
4.10	Reinigung von Tubulin Polyglutamylase aus dem 0,25 M NaCl-Überstand von <i>Crithidia fasciculata</i>	64
4.10.1	Präparation des Rohenzym und Identifizierung der Hauptbanden	64
4.10.2	ATP-Affinitätschromatographie	65
4.10.3	Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation	66
4.10.4	Anionenaustauschchromatographie	68
4.10.5	„Scale up“ und Verwendung von Hydroxyapatitchromatographie	69
4.11	Substratspezifität der Tubulin Polyglutamylase	72
4.12	Glutamylierung von synthetischen Peptiden	74
4.12.1	Hemmung der beobachteten Glutamylierungsaktivität durch synthetische Peptide	74
4.12.2	Synthetische Peptide sind Substrate der Tubulin Polyglutamylase	75
4.12.3	Minimale Sequenzanforderungen zur Glutamylierung von synthetischen Peptiden	77
4.12.4	Anionenaustauschchromatographie zur Detektion der Glutamylierung von synthetischen Peptiden	80
4.13	Immunologischer Nachweis der Monoglutamylierungs-(„Verzweigungs“)-Aktivität	81

4.14	Hyperglutamylierung von Hirntubulin durch <i>Crithidia</i> Tubulin polyglutamylase	83
4.14.1	Inhibierung der Bindung von Antikörpern an glutamyliertes Tubulin	85
4.15	Identifizierung von p40 als trypanosomales La-Protein	87
4.15.1	Datenbanksuche und cDNA-Klonierung	87
4.15.2	Sequenzanalyse	89
4.15.3	Rekombinante Expression und RNA-Bindungstest	92
4.16	Klonierung und Charakterisierung von p54	94
4.16.1	Klonierung der p54-cDNA	94
4.16.2	Sequenzanalyse	95
4.16.3	Rekombinante Expression und Gewinnung polyklonaler Antikörper	99
5	DISKUSSION	103
5.1	Glutamylierung von Tubulin in <i>Crithidia fasciculata</i>	104
5.2	Solubilisierung und Reinigung von Tubulin Polyglutamylase aus <i>Crithidia</i>	106
5.3	Vergleich der Tubulin-Polyglutamylase-Präparationen aus <i>Crithidia</i> und Säugerhirn	109
5.4	Substratspezifität der <i>Crithidia</i> Tubulin Polyglutamylase in einem Enzym-Peptid-System	111
5.5	Klonierung eines trypanosomalen La-Proteins	112
5.6	Klonierung von p54, eines Verwandten des Zellzyklus-Regulators NIMA	113
6	LITERATURVERZEICHNIS	117
7	ANHANG	121

1 Zusammenfassung

Die carboxyterminale Region von $\alpha\beta$ Tubulin ist an der äußeren Oberfläche der Mikrotubuli lokalisiert und Gegenstand einer Vielzahl posttranslationaler Modifikationen. Unter Polyglutamylierung und -glycinylierung versteht man dabei das Anfügen einer Glutamat- bzw. Glycin-Seitenkette variabler Länge durch die Bildung einer Isopeptidbindung mit der γ -Carboxylatgruppe bestimmter Glutaminsäurereste in der carboxyterminalen Domäne. Obwohl diese Modifikationen die Mikrotubuli-Funktion durch Regulation der Interaktion mit assoziierten Proteinen wesentlich beeinflussen können, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nichts über beteiligte Enzymsysteme bekannt.

Trypanosomen wie *Crithidia fasciculata* besitzen ein stabiles Cytoskelett, dessen Mikrotubuli ausgiebig durch Polyglutamylierung modifiziert sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch einen in-vitro Glutamylierungs-Test gezeigt werden, daß isolierte Cytoskelette aus Trypanosomen eine enzymatische Aktivität enthalten, die ATP-abhängig Glutamat in $\alpha\beta$ Tubulin inkorporiert. Die Glutamylierungsaktivität wird durch Behandlung der Cytoskelette mit 0,25 M NaCl solubilisiert und kann durch ein Reinigungsschema bestehend aus ATP-Affinitätschromatographie, Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation und Hydroxyapatitchromatographie fast 1000 fach angereichert werden. Gereinigte Fraktionen konnten stabil aufbewahrt und für in-vitro Glutamylierungstests eingesetzt werden. Nach Extraktion vom Cytoskelett sedimentiert ein Teil des Enzyms als 7 S-Komplex mit $\alpha\beta$ Tubulin, nach Entfernung des Tubulins verhält sich die Glutamylierung jedoch als globuläres Protein von etwa 3 S. Weitere grundlegende enzymatische Eigenschaften sind eine ausgeprägte Salzempfindlichkeit, sowie ein hohes pH-Optimum. Die *Crithidia* Tubulin Polyglutamylierung akzeptiert Tubulin aus Säugerhirn als Substrat und inkorporiert Glutamat vorzugsweise in die sauersten Isoformen von α - und β -Hirntubulin.

Synthetische Peptide, die die carboxyterminalen 15 bzw. 19 Reste von α und β Tubulin aus Säugerhirn repräsentieren, sind ebenfalls Substrate der Tubulin Polyglutamylierung. Die Glutamylierung von synthetischen Peptiden kann durch MALDI-TOF-Massenspektroskopie oder Anionenaustauschchromatographie verfolgt werden. Um als Substrat akzeptiert zu werden, müssen die Peptide minimal einen Glutamatrest mit einer freien α -Carboxylatgruppe zur Verfügung stellen, an die die weiteren Glutamatreste dann schrittweise addiert werden. Da das Produkt eines jeden Glutamylierungsschritts wiederum die Voraussetzung für den nächsten Zyklus erfüllt, können mit Hirntubulin als Substrat sehr lange Seitenketten gebildet werden und bis zu 70 Mole Glutamat pro $\alpha\beta$ Heterodimer wurden durch das Enzym inkorporiert.

Die Bildung einer Isopeptidbindung zur Initiation einer neuen Seitenkette wurde im Enzym-Peptid-System nicht beobachtet und scheint das intakte Tubulin-Molekül zu benötigen. Diese „Verzweigungsaktivität“ kann jedoch durch einen immunologischen Assay, der nicht-glutamyliertes Hefetubulin und den glutamylierungsspezifischen

Antikörper GT335 verwendet, in den gereinigten Fraktionen der *Crithidia* Tubulin Polyglutamylyase nachgewiesen werden.

Basierend auf Peptidsequenz-Informationen aus einem 40 kD-Polypeptid, das in der Anionenaustauschchromatographie mit der Glutamylyierungsaktivität koeluierte, wurde die cDNA eines *T.brucei*-Homologs des La RNA-Bindungsproteins kloniert. Die cDNA wurde als GST-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und das rekombinante Protein hatte RNA-Bindungsaktivität.

Hochangereicherte Präparationen der Polyglutamylyase zeigten ein einzelnes Polypeptid von 54 kD, das in der Hydroxyapatitchromatographie mit der Glutamylyierungsaktivität koeluierte. Nach direkter Sequenzierung von p54-Peptiden, konnte die korrespondierende cDNA durch RT-PCR mit degenerierten Primern kloniert werden. Das *Crithidia*-Protein wurde als Mitglied der NIMA-Familie von putativen Zellzyklus-Regulatoren identifiziert. Diese Proteine leiten sich vom Mitose-Regulator NIMA aus *Aspergillus nidulans* ab und besitzen eine katalytische Domäne, die sie in die Superfamilie eukaryontischer Serin/Threonin-Kinasen einordnet. Die Identifizierung von p54 als *Crithidia*-NIMA-verwandte Kinase-1 (CNK-1) eröffnet die Möglichkeit, daß NIMA-verwandte Proteine, direkt oder indirekt, über die posttranslationale Glutamylyierung von Mikrotubuli wirken.

Schlagwörter: Tubulin, Polyglutamylyierung, posttranslationale Modifikationen

Summary

The carboxyterminal region of $\alpha\beta$ tubulin is located at the outer surface of the microtubule and subject to a number of posttranslational modifications. Polyglutamylation and γ -glycylation consist of the addition of a glutamic acid- or glycine-side chain of variable length via the formation of an isopeptide bond with the γ -carboxylate of a particular glutamic acid residue located in the carboxyterminal domain. While these modifications can influence microtubule function by the regulation of interactions with associated proteins, nothing was known about the enzymes involved in this process when this study was started in 1998.

Trypanosomatids like *Crithidia fasciculata* have a stable microtubular cytoskeleton which is extensively modified by polyglutamylation. In this work an in-vitro glutamylation assay is used to demonstrate that isolated trypanosomal cytoskeletons contain an enzymatic activity that incorporates glutamic acid into $\alpha\beta$ tubulin in an ATP-dependent manner. The glutamylation activity is solubilised by treating the cytoskeletons with 0,25 M NaCl and can be enriched nearly 1000 fold by a purification scheme consisting of ATP-affinity chromatography, glycerol gradient centrifugation and hydroxyapatite chromatography. Purified enzyme fractions could be stored at -70°C and used for in-vitro glutamylation assays. After extraction from the microtubular cytoskeleton part of the enzyme forms a 7 S complex with $\alpha\beta$ tubulin. After removal of tubulin the enzyme behaves as a globular protein of about 3 S. Basic enzyme characteristics include a pronounced sensitivity to salt and a high pH-optimum. The *Crithidia* tubulin polyglutamylase recognises mammalian brain tubulin where it incorporates glutamic acid preferentially into the more acidic isoforms of both α and β tubulins.

Synthetic peptides representing the carboxyterminal 15 and 19 residues of mammalian brain α - and β -tubulins, respectively, are substrates of *Crithidia* tubulin polyglutamylase. Glutamylation of synthetic peptides can be followed by MALDI-TOF mass spectrometry or anion exchange chromatography. To act as substrates the peptides must minimally provide a glutamic acid residue with a free α -carboxylate group to which the additional glutamates are added in a stepwise manner. Since the product of each glutamylation step fulfills the sequence requirement necessary for the next cycle, very long side chains are generated with brain tubulin as a substrate. Up to 70 moles of glutamic acid were incorporated per $\alpha\beta$ heterodimer.

The generation of an isopeptide bond necessary for the initiation of a novel side chain was not detected in the enzyme-peptide system and thus seems to require the intact tubulin molecule. This „branching activity“ was detected in *Crithidia* tubulin polyglutamylase fractions using an immunological assay which employs unglutamylated yeast tubulin and the glutamylation-specific antibody GT335.

Based on peptide sequence information obtained from a 40 kD polypeptide copurifying with the glutamylation activity in an anion exchange chromatography, the cDNA of a *T.brucei* homolog of the La RNA-binding protein was cloned. The cDNA

was expressed as a GST-fusion protein in *E.coli* and the recombinant protein had RNA-binding activity.

Highly enriched preparations of tubulin polyglutamylase showed a single 54 kD polypeptide coeluting with the glutamylation activity during hydroxyapatite chromatography. Following direct sequencing of p54 peptides, the corresponding cDNA was cloned using RT-PCR with degenerate primers. The *Crithidia* protein was identified as a member of the NIMA-family of putative cell cycle regulators. These proteins are related to the mitotic regulator NIMA of *Aspergillus nidulans* and contain a catalytic domain common to the superfamily of eukaryotic serine/threonine kinases. The identification of p54 as *Crithidia* NIMA-related kinase-1 (CNK-1) raises the possibility that NIMA-related proteins may, directly or indirectly, function via the posttranslational glutamylation of microtubules.

Keywords: Tubulin, polyglutamylase, posttranslational modifications

2 Einleitung

Als ein Hauptbestandteil des Cytoskeletts eukaryontischer Zellen sind Mikrotubuli an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt: Während der Zellteilung bilden sie die Mitosespindel aus, sie sind als Komponenten des Axonems von Cilien und Flagellen für die Beweglichkeit von Zellen verantwortlich und sie dienen als Transportbahnen entlang derer Vesikel und Organellen innerhalb der Zelle mit Hilfe von Motorproteinen bewegt werden können (Hyams und Loyd, 1993). Während ihre filamentartige Struktur bereits im 19. Jahrhundert durch lichtmikroskopische Untersuchungen beschrieben wurde, ist die Bezeichnung „Mikrotubuli“ erst seit 1963 gebräuchlich. Durch Bindung von Tritium-markiertem Colchicin konnte schliesslich das Protein „Tubulin“, das für den Aufbau der Mitosespindel verantwortlich ist, isoliert werden (Dustin, 1984). Tubulin ist ein $\alpha\beta$ Heterodimer von 110 kD, die Kopf-Schwanz-Assoziation der Dimere führt zur Ausbildung von linearen Protofilamenten. Die laterale Assoziation von in der Regel 13 Protofilamenten ergibt die Wände der zylinderartigen Mikrotubuli, die einen äusseren Durchmesser von 25 nm haben.

Mikrotubuli sind polare Strukturen mit einem schnell wachsenden (+) Ende und einem (-) Ende, das eher Untereinheiten verliert. Dabei wird das (-) Ende eines Mikrotubulus oft durch Einbettung in ein MTOC (Mikrotubuli-organisierende Zentren), das ein Centrosom, ein Basalkörper oder Spindelpolkkörper sein kann, stabilisiert. Das Verhalten individueller Mikrotubuli wird durch das Phänomen der dynamischen Instabilität beschrieben. Dabei gehen Mikrotubuli von einer Phase langsamen Wachstums in eine plötzliche Verkürzung über („Katastrophe“) oder die rapide Verkürzung wird plötzlich gestoppt und es beginnt eine neue Wachstumsphase („Rettung“). Neuere Untersuchungen zeigen, daß assoziierte Proteine die Dynamik von Mikrotubuli in vivo durch die Änderung der Frequenz von Katastrophen und Rettungen beeinflussen können (Desai und Mitchison, 1997). Chemische Grundlage für die dynamische Instabilität ist die verzögerte Hydrolyse von GTP an der β -Untereinheit, durch die der Mikrotubulus am (+) Ende eine GTP-Kappe erhält, die das weitere Wachstum begünstigt. Plötzlicher Verlust der Kappe zieht dann ein rasches Schrumpfen des Mikrotubulus nach sich (Mitchison und Kirschner, 1984).

Durch die elektronenkristallographischen Arbeiten von Nogales et al. ist seit kurzem eine atomare Struktur des Tubulin-Heterodimers in einer Auflösung von 3,7 Angström zugänglich (Nogales et al., 1998). Die Strukturen beider Untereinheiten sind dabei im wesentlichen identisch und können in drei funktionelle Domänen eingeteilt werden: Die N-terminale Domäne zeigt einen „Rossmann-Fold“, der typisch für Nucleotid-bindende Proteine ist. Die mittlere Domäne bildet beim β -Tubulin die Bindungsstelle für Taxol und die C-terminale Domäne wird von den Helices H11 und H12 gebildet, die an der Aussenseite des Protofilaments liegen (Abb. 1). Die letzten 10 Reste des α -Tubulins und die letzten 18 Reste des β -Tubulins sind zwar in der Kristallstruktur nicht aufgelöst, sie müssen jedoch ebenfalls an der Aussenseite des

Mikrotubulus liegen und dürften damit an Interaktionen zwischen Mikrotubuli und Motorproteinen oder anderen assoziierten Proteine beteiligt sein. Es ist bemerkenswert, daß die atomare Struktur von $\alpha\beta$ Tubulin sehr ähnlich mit der des bakteriellen Zellteilungsproteins FtsZ ist (Lowe und Amos, 1998). FtsZ kann, genau wie Tubulin, Protofilamente ausbilden, die durch GTP-Hydrolyse von einer gestreckten in eine gekrümmte Konformation übergehen können (Erickson, 2001). Es scheint sich also bei diesem für die bakterielle Zellteilung wichtigen Protein um einen prokaryontischen Vorläufer der Tubuline zu handeln.

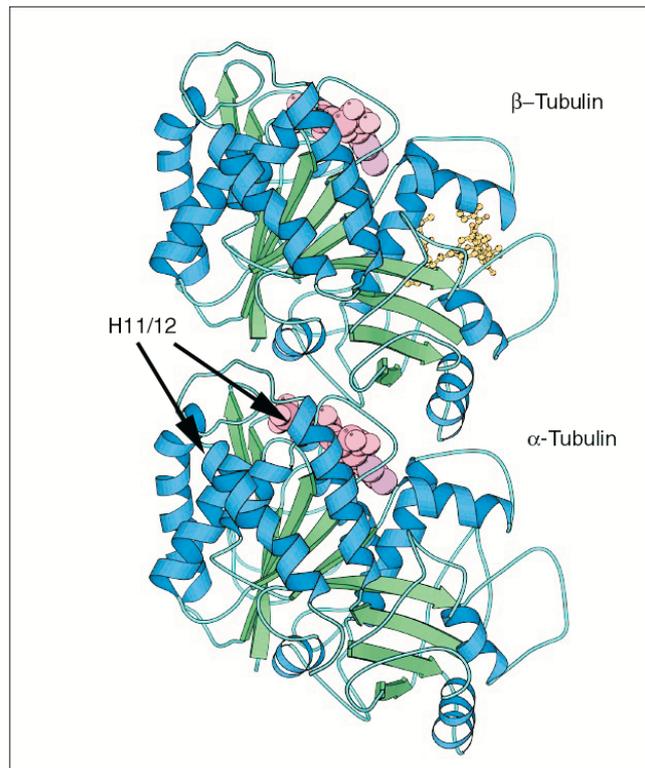


Abb.1: 3-D-Struktur eines $\alpha\beta$ -Tubulin Heterodimers (Nogales et al., 1998). Die Strukturen der beiden Untereinheiten sind praktisch identisch. An der β -Untereinheit ist ein Molekül GDP, an der α -Untereinheit ein Molekül GTP gebunden (rot). Ausserdem sieht man die Bindung von Taxol (gelb) an der β -Untereinheit. Legt man die Orientierung des Heterodimers im Mikrotubuli zugrunde, so blickt man in dieser Abbildung auf die Aussenseite eines Protofilaments. Man sieht, daß die äussere Oberfläche von zwei fast parallelen Helices (H11 und H12, siehe Pfeile) gebildet wird.

Während zunächst nur die Grundbausteine der Mikrotubuli α und β -Tubulin bekannt waren, umfasst die eukaryontische Tubulin-Superfamilie heute 5 weitere Mitglieder: γ -Tubulin wurde 1989 in einem genetischen Screen in *Aspergillus nidulans* als Supressor bestimmter temperatursensitiver Mutationen von β -Tubulin identifiziert (Oakley und Oakley, 1989). γ -Tubulin ist am Centrosom und anderen MTOCs lokalisiert und seine Rolle bei der Nukleation von Mikrotubuli ist inzwischen gut beschrieben. γ -Tubulins ist ein Hauptbestandteil eines 25S-Proteinkomplexes (γ TuRC), der als Matrize für die Bildung neuer Mikrotubuli wirkt (Zheng et al., 1996). δ -Tubulin wurde als Produkt des UNI3-Gens in der Grünalge *Chlamydomonas* beschrieben (Dutcher et al., 1998). Mutationen in UNI3 führten dabei zu Defekten beim Aufbau der Flagellen. η -Tubulin wurde durch eine Mutation in *Paramecium* entdeckt, die zu Defekten bei der Verdopplung der Basalkörper führte (Ruiz et al., 2000). ϵ - und ξ -Tubulin schliesslich, wurden durch Datenbanksuche identifiziert (Chang und Stearns, 2000) und vorläufige Untersuchungen legen nahe, daß diese

beiden Tubuline ebenfalls an Centriolen, bzw. Basalkörper lokalisieren (Mc Kean et al., 2001). Während α , β und γ Tubulin ubiquitär sind und den minimalen Satz an Tubulinen darstellen, den eine Zelle benötigt, fehlen die „neuen“ Tubuline in den vollständig sequenzierten Genomen von *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *Drosophila melanogaster*.

Die Tatsache, daß Mikrotubuli an vielen unterschiedlichen Prozessen in der Zelle beteiligt sind, führte früh zur Formulierung der Multi-Tubulin-Hypothese (Fulton und Simpson, 1976), nach der funktionell unterschiedliche Mikrotubuli aus unterschiedlichen Tubulin-Typen aufgebaut sein sollten. Tatsächlich exprimieren viele eukaryontische Zellen verschiedene Tubulin-Isotypen, in Vertebraten bilden jeweils 6 verschiedene α - und β -Tubulingene eine Multigenfamilie (Cleveland und Sullivan, 1985, Lewis et al., 1985, Little und Seehaus, 1988). Innerhalb einer Spezies findet man dabei die grösste Sequenzvariabilität zwischen den einzelnen Isotypen in den C-terminalen 15 Aminosäuren. Nach ihrer isotypdefinierenden C-terminalen Sequenz liessen sich die β -Tubulinsequenzen in 6 Klassen einteilen (Sullivan und Cleveland, 1986). Zwischen verschiedenen Spezies sind die einzelnen Klassen hochkonserviert, was andeutet, daß die Unterschiede einzelner Isotypen von funktioneller Signifikanz sein könnten.

Obwohl in einer ganzen Reihe von Experimenten eine funktionelle Austauschbarkeit verschiedener Isotypen gezeigt werden konnte (Luduena, 1993), so gibt es doch einige deutliche Beispiele dafür, daß ganz bestimmte Isotypen für die Organisation besonderer Mikrotubuli-Strukturen verantwortlich sind. So werden in *C.elegans* der β -Tubulin Isotyp *mec7* und der α -Tubulin Isotyp *mec12* für den Aufbau von speziellen 15-Protofilament-Mikrotubuli in den Axonen von berührungssensitiven Neuronen benötigt (Savage et al., 1994, Fukushige et al., 1999). Genetische Experimente in *Drosophila* haben gezeigt, daß der $\beta 2$ -Isotyp des Flagellen-Axonems nicht durch den $\beta 1$ -Isotyp, der normalerweise in den Basalkörpern exprimiert wird, ersetzt werden kann (Raff et al., 2000). Flagellen, die nur $\beta 1$ besaßen, bildeten in diesen Experimenten 9+0 Axoneme aus, erhöhte man die Menge an $\beta 1$ weiter, so entstanden 10+0 Axoneme. Da die Sequenzen der beiden Isotypen zu mehr als 90% identisch sind, zeigen diese Experimente, daß selbst subtile Unterschiede zwischen einzelnen Isotypen einen dramatischen Effekt auf die Mikrotubuli-Organisation haben können.

Neben der Expression verschiedener Isotypen wird zusätzliche Vielfalt durch eine grosse Bandbreite verschiedener posttranslationaler Modifikationen erzeugt (Abb. 2). So wird Hirntubulin in der hochauflösenden isoelektrischen Fokussierung in über 20 Banden aufgelöst, weit mehr als durch die exprimierten Isotypen zu erwarten wäre (Wolff et al., 1982). Mit Ausnahme der Acetylierung von Lys40 (L'Hernaut und Rosenbaum, 1985, LeDizet und Piperno, 1987) betreffen diese Modifikationen die C-terminale Domäne und sind damit potentiell dazu in der Lage, die Bindung von assoziierten Proteinen an Mikrotubuli zu beeinflussen.

Acetylierung von α -Tubulin findet nach dem Zusammenbau des Mikrotubulus statt und gilt als Marker für stabile Mikrotubuli (Sasse und Gull, 1988). Obwohl die

Mikrotubuli in *Tetrahymena* normalerweise ausgiebig acetyliert sind, zeigten mutierte *Tetrahymena*-Zellen, bei denen das α -Tubulin durch eine nicht-acetylierbare Variante ersetzt worden war, keinen erkennbaren Phänotyp (Gaertig et al., 1995). Entweder ist die Tubulin-Acetylierung also nicht essentiell, oder die Zellen kompensieren den Verlust an Acetylierung auf unbekannte Weise. Über die verantwortliche Tubulin-Acetyltransferase ist wenig bekannt: Maruta et al. (1986) beschreiben eine 110fache Anreicherung der Aktivität aus *Chlamydomonas*, jedoch sind keine Sequenzen von verantwortlichen Polypeptiden bekannt.

Die bis heute am besten untersuchte posttranslationale Tubulin-Modifikation ist der Zyklus des C-terminalen Tyrosins beim α -Tubulin. Der t-RNA unabhängige Einbau von Tyrosin in Tubulin wurde zunächst in Gehirnhomogenaten nachgewiesen (Barra et al., 1973, Acre et al., 1975). Murofushi gelang 1980 die Reinigung des für den Einbau verantwortlichen Enzyms Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL). Mit Hilfe einer Immunaффintätsreinigung konnten Schröder et al. (1985) ausreichende Mengen des Enzyms aus Hirngewebe reinigen, so daß mit Hilfe von Proteinsequenzierungsdaten schliesslich die cDNA der TTL kloniert werden konnte (Ersfeld et al., 1993). Sequenzvergleiche zeigen, daß die TTL in die Gruppe der „Glutathion-Synthetase ADP-bildenden Enzyme“ gehört (Dideberg und Bertrand, 1998). Überraschenderweise finden sich in den vollständig sequenzierten Genomen von *Drosophila* und *C.elegans* keine offensichtlichen funktionellen Homologe der Säuger-TTL, obwohl der Tyrosinierungszyklus in diesen Organismen beschrieben ist. Über die für die primäre Reaktion, also die Abspaltung des C-terminalen Tyrosins, verantwortliche Tubulin-Tyrosin-Carboxypeptidase (TTCP) ist wenig bekannt. Zwar wird eine 250fache Anreicherung beschrieben (Argarana, 1988), es ist jedoch bis heute nicht gelungen, das Enzym in reiner Form zu isolieren. Seit längerem ist bekannt, daß ein signifikanter Anteil des Hirn- α Tubulins dem Tyrosinierungszyklus entgeht (Barra et al., 1980, Raybin und Flavin, 1977). Der Grund hierfür liegt in der Abspaltung des vorletzten Glutamatrestes, wodurch das sogenannte $\Delta 2$ -Tubulin gebildet wird (Paturle et al., 1989, Paturle-Lefanechere et al., 1991). Dieses ist kein Substrat mehr für die TTL, da diese minimal die Sequenz GEE zum Anfügen des Tyrosins benötigt (Rüdiger et al., 1994). Ebenso wie die Acetylierung vollzieht sich die Detyrosinierung nach dem Zusammenbau des Mikrotubulus, da die Carboxypeptidase Mikrotubuli, die TTL jedoch lösliche $\alpha\beta$ -Heterodimere als Substrat bevorzugt (Wehland und Weber, 1987, Webster et al., 1987).

Die genaue biologische Funktion des Tyrosinierungszyklus ist bis heute unklar, es gibt jedoch einige interessante Experimente, die Einblicke in die mögliche Bedeutung erlauben: Gurland und Gundersen (1991) konnten zeigen, daß Vimentin-Intermediärfilamente in kultivierten Säugerzellen bevorzugt mit detyrosinierten Mikrotubuli kolokalisieren. Die Interaktion scheint durch Kinesin vermittelt zu werden, denn sowohl die Mikroinjektion eines Antikörpers gegen detyrosiniertes α -Tubulin (Gurland und Gundersen, 1995), als auch die eines anti-Kinesin Antikörpers führte zum Zusammenbruch des Vimentin-Netzwerks (Gyoeva und Gelfland, 1991).

Im Einklang mit diesen Ergebnissen inhibierte auch chemisch verändertes, nicht-polymerisierbares detyrosiniertes α -Tubulin die Bindung von Kinesin an Mikrotubuli

α Tubulin	Modifikation	Bemerkung
	Acetylierung	nur α Tubulin, gilt als Marker für stabile MTs
	Detyrosinierung/Tyrosinierung	reversibel, Enzym Tubulin-Tyrosin-Ligase kloniert
	Bildung $\Delta 2$ Tubulin	nicht mehr tyrosinierbar
	Polyglutamylierung	α und β ; Varianten mit über 20 Resten in der Seitenkette bekannt; mehr als eine Glutamylierungsstelle möglich
	Polyglycinylierung	α und β ; ebenfalls mehrere Glycinylierungsstellen möglich.
	Palmitoylierung	vielleicht für Membranbindung von Tubulin verantwortlich (Caron, 1997)
	Phosphorylierung	besser belegt für β Tubulin an Ser 441/444

COOH-terminale Domäne

Abb. 2: Zusammenfassung der verschiedenen posttranslationalen Modifikationen am Beispiel des α Tubulins.

in vitro (Kreitzer et al., 1999). Den bislang direktesten Hinweis auf die Wichtigkeit des Tyrosinierungszyklus liefert der „Knock-out“ des TTL-Gens in der Maus. Die betroffenen Mäuse sterben direkt nach der Geburt, die genaue Natur des zugrundeliegenden Defekts ist jedoch nicht bekannt (J. Wehland, persönliche Mitteilung).

Die beiden Polymodifikationen des Tubulins, die Polyglutamylierung und -glycinylierung wurden durch massenspektroskopische Analyse der C-terminalen Peptide von α und β Tubulin entdeckt. Die Polyglutamylierung wurde erstmals für α -Tubulin aus dem Hirn beschrieben (Eddé et al., 1990). Hierbei ist eine Oligoglutamatsseitenkette variabler Länge über eine Isopeptidbindung mit der γ -Carboxylatgruppe eines Glutamatrestes der Hauptkette verbunden. Die Polyglutamylierung, sowie die exakte Position der modifizierten Reste wurde in der Folgezeit für alle im Säugerhirn exprimierten Isotypen von α - und β -Tubulin beschrieben (Alexander et al., 1991, Rüdiger et al., 1992, Mary et al., 1994). Der Nachweis der Polyglutamylierung in primitiven Protisten wie *Giardia lamblia*, (Weber et al., 1997), *Tritrichomonas mobilensis* (Schneider et al., 1998) und *Trypanosoma brucei* (Schneider et al., 1997) zeigt, daß die Modifikation bereits früh im Verlauf der eukaryontischen Evolution entstanden ist. Untersuchungen am Tubulin aus *Tritrichomonas mobilensis* (Schneider et al., 1998), sowie am $\alpha 4$ -Isotyp aus Säugerhirn (Redeker et al., 1998) zeigten, daß die Glutamylierung multiple, eng

benachbarte Reste in der C-terminalen Domäne betreffen kann. Mit Hilfe des glutamylierungsspezifischen monoklonalen Antikörpers GT335 konnte die Modifikation auch für axonemales Tubulin aus Säugetierspermien (Fouquet et al., 1994) und *Drosophila*-Spermien (Bré et al., 1996) nachgewiesen werden. In kultivierten HeLa-Zellen zeigt der GT333-Antikörper eine starke Färbung der Centriolen, sowie der Spindel-Mikrotubuli (Bobinnec et al., 1998) an. Bis vor kurzem war man der Ansicht, daß die Polyglutamylierung eine tubulinspezifische posttranslationale Modifikation ist. Regnard et al. (2000) entdeckten durch eine Kreuzreaktivität des GT335-Antikörpers jedoch, daß wenigstens zwei weitere Proteine polyglutamyliert werden. Es handelt sich hierbei um die Nukleosomen-Assembly Proteine NAP-1 und -2. Massenspektroskopische Analyse zeigt, daß sich die modifizierten Glutamatreste, genau wie beim Tubulin, innerhalb einer sehr sauren C-terminalen Domäne der beiden Proteine befinden. Ob und wie Glutamylierung von Tubulin und NAP-1/2 zusammenhängen und ob unterschiedliche Enzymsysteme für die Modifikationen der verschiedenen Proteine verantwortlich sind, ist bis jetzt nicht bekannt.

Die Bedeutung der Polyglutamylierung als potentieller Regulator der Interaktion von Mikrotubuli mit assoziierten Proteinen wurde zunächst durch in-vitro Versuchen verdeutlicht: In Overlay-Assays zeigten MAPs wie Kinesin und tau die höchste Affinität für $\alpha\beta$ Tubulin bei Seitenkettenlängen von 3 Glutamat-Resten, während die Bindung bei längeren Seitenketten schwächer wurde (Boucher et al., 1994, Larcher et al., 1996). Im Gegensatz dazu wurde die Bindung von MAP1A auch durch längere Seitenketten nicht signifikant inhibiert (Bonnet et al., 2001). Gagnon et al., (1996) konnten zeigen, daß Antikörper gegen glutamyliertes Tubulin (GT335 und B3) spezifisch die Beweglichkeit der Flagellen von Seeigel-Spermien inhibieren, möglicherweise durch Behinderung der Bindung von Dynein an die B-Tubuli des äusseren Mikrotubuli-Doublets. Im Zusammenhang mit diesen Experimenten ist es interessant, daß sowohl konventionelle, wie auch monomere Kinesine konservierte basische Reste besitzen, die spezifisch mit dem negativ geladenen C-Terminus von Tubulin interagieren. Durch Austausch dieser basischen Reste mittels ortsgerichteter Mutagenese lässt sich die Prozessivität der Kinesine verändern (Thorn et al., 2000, Okada und Hirokawa, 2000). Das bislang spektakulärste Experiment war die Mikroinjektion des GT335-Antikörpers in HeLa-Zellen (Bobinnec et al., 1998). Diese führte zu einem Verschwinden der Centriolen und einer nachfolgenden Verstreuung des pericentriolären Materials ins Cytoplasma. Die Polyglutamylierung des Tubulins scheint damit entscheidend für die Stabilität der Centriolen zu sein.

Die Polyglycinylierung von Tubulin wurde erstmals durch massenspektroskopische Analyse von Peptiden aus den Cilien von *Paramecium* entdeckt (Redecker et al., 1994). Hier wurden C-terminale Peptide gefunden, die durch das Anfügen einer bis zu 34 zusätzlichen Glycin-Resten modifiziert waren. Ebenso wie bei der Polyglutamylierung wurde die Untersuchung dieser Modifikation durch monoklonale Antikörper, die gegen glycinylierte synthetische Peptide erzeugt wurden, wesentlich erleichtert (Bré et al., 1996). Eine genauere Analyse der Polyglycinylierung in *Paramecium* zeigte an, daß die Modifikationen differentiell verteilt sind: Während die

stabilen axonemalen Mikrotubuli ausgiebig mit bis zu 34 Resten glycyliert waren, zeigte das cytoplasmatische Tubulin nur ein geringes Glycylierungs-Level (Bré et al., 1998). Ebenso wie die Polyglutamylierung wird die Glycylierung bereits im evolutionär sehr alten Diplomonaden *Giardia lamblia* detektiert (Weber et al., 1996, Weber et al., 1997), sie fehlt jedoch in *T.brucei* (Schneider et al., 1997) und *Trichomonas mobilensis* (Schneider et al., 1998). Massenspektroskopische Untersuchungen an Spermientubulin aus Bullensamen (Plessmann und Weber, 1997) und Spermientubulin aus dem Seeigel *Paracentrotus lividus* (Mary et al., 1997) zeigten, daß α - und β -Tubulin gleichzeitig durch Polyglutamylierung und -glycylierung modifiziert sein können. Die Modifikationen erfolgen dabei an eng benachbarten, oder sogar am selben Glutamatrest, so daß auch die Existenz von gemischten Glutamat-Glycin-Seitenketten nicht ausgeschlossen werden kann. Bisher wurde die Polyglycylierung nur für Tubulin beschrieben, nach der Entdeckung der Polyglutamylierung von NAP-1/2 scheint es jedoch nicht ausgeschlossen, daß auch andere Proteine auf diese Art und Weise modifiziert sein könnten.

Analog zu den Experimenten mit GT335, bewirkte auch die Mikroinjektion von Antikörpern gegen die Glycin-Seitenkette (AXO 47 und TAP 952) eine spezifische Inhibierung der Beweglichkeit der Flagellen von Seeigelspermien (Bré et al., 1996). Die deutlichsten Hinweise auf die Funktion der Polyglycylierung wurden durch Genaustausch-Experimente in *Tetrahymena* erhalten (Xia et al., 2000). Dieser Organismus eignet sich besonders gut zur Analyse, da alle Mikrotubuli nur aus einem einzigen $\alpha\beta$ -Tubulin-Isotyp aufgebaut werden und so die Tubulin-Diversität allein auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen zurückgeht. Durch ortgerichtete Mutagenese der multiplen Glycylierungsstellen und anschließende Expression des mutierten Tubulins in vivo wurden folgende Ergebnisse erhalten: Komplettes Ausschalten der Polyglycylierung von α -Tubulin durch Ersatz aller modifizierten Glutamat-Reste durch Aspartat, brachte keinen detektierbaren Phänotyp. Das gleiche Experiment für β -Tubulin zeigte jedoch, daß die Polyglycylierung hier essentiell für das Überleben der Zellen war. Modifizierte man nur eine Teil der Glycylierungsstellen des β -Tubulins, so war das Ergebnis ein verlangsamtes Wachstum der Zellen, reduzierte Beweglichkeit und Defekte bei der Zellteilung. Überraschenderweise wurde ein nicht-glycylierbares β -Tubulin akzeptiert, wenn gleichzeitig der Carboxyterminus des α -Tubulins durch den des β -Tubulins mit dem normalen Satz an Glycylierungsstellen ersetzt wurde. Dieses Ergebnis scheint anzudeuten, daß nicht die Modifikation an einer ganz bestimmten Stelle, sondern eher das Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes der Glycylierung für das Überleben von *Tetrahymena* essentiell ist (Xia et al., 2000). Diese Ergebnisse sind überraschend angesichts der Tatsache, daß, wie durch peptidchemische Analyse und in-vivo-Markierungsexperimente gezeigt, die Polyglycylierung in Trypanosomen und Trichomonaden fehlt (Schneider et al., 1997, Schneider et al., 1998). Es ist daher wichtig festzustellen, daß die Tubuline von *Tetrahymena* auch glutamyliert sind und durch die Mutagenese auch die Glutamylierungsstellen ausgeschaltet werden.

Über die für die Polyglutamylierung oder –glycinylierung verantwortlichen Enzymsysteme war bis 1998 noch nichts bekannt. Erst die Arbeiten von Regnard et al., (1998, 1999), sowie die vorliegende Arbeit brachten erste Ergebnisse zur Enzymologie der posttranslationalen Glutamylierung von Tubulin.

Ziel der Arbeit:

Da die Eigenschaften der Glutamylierungsaktivität zu Beginn der Arbeit noch in keinem Organismus untersucht worden waren, konnte einzig ein biochemischer Ansatz zur Reinigung und Charakterisierung der beteiligten Enzyme verwendet werden. Trypanosomen sollten sich als Ausgangsmaterial für eine Reinigung aus folgenden Gründen gut eignen: Für *T. brucei* wurde eine ausgiebige Glutamylierung der stabilen subpelliculären und axonemalen Mikrotubuli beschrieben (Schneider et al., 1997). Andere Trypanosomen wie *Leishmania tarentolae* oder *Crithidia fasciculata* können in einfachen Medien in grossen Mengen kultiviert werden, so daß genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung stehen sollte, auch wenn die beteiligten Enzyme möglicherweise nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden sind. Weiterhin ist in Protozoen eine geringere Protein-Komplexität zu erwarten als etwa im Säugerhirn. Schliesslich eröffnen Trypanosomen wie *Leishmania tarentolae* zu einem späteren Zeitpunkt die Möglichkeit einer molekularbiologischen Analyse durch Genaustausch-Experimente (Cruz et al., 1991, ten Asbroek et al., 1990).

Neben der Reinigung sollten zur Charakterisierung der Glutamylierungsaktivität unter anderem folgende Fragen beantwortet werden. Akzeptiert die Glutamylierungsaktivität aus Trypanosomen auch Tubulin aus Säugerhirn als Substrat? Lässt sich ein Peptid-Substrat entwerfen? Werden Tubulin-Dimere oder Mikrotubuli als Substrat bevorzugt? Nach Identifizierung der beteiligten Polypeptide sollte versucht werden, die korrespondierenden cDNAs zu klonieren. Hierzu müssen entweder genügend Sequenzinformationen oder spezifische Antikörper gewonnen werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Massenspektrometer:	Kratos MALDI 4 Flugzeit-Massenspektrometer (Shimadzu, Duisburg)
SMART-System:	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
SMART-Säulen:	monoQ PC 1.6/5 (Anionenaustauscher, 100 µl Volumen) monoS PC 1.6/5 (Kationenaustauscher, 100 µl Volumen) TSKgel DEAE-NPR (Anionenaustauscher, 4,6 x 35 mm, Tosohaas, Stuttgart) Fast desalting column PC 3.2/10 (Gelfiltration) Superdex 200 (Größenausschlusschromatographie)
FPLC-System:	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
FPLC-Säulen:	mono Q 5/5 (Anionenaustauscher, 1 ml Säulenvolumen) mono S 5/5 (Kationenaustauscher, 1 ml Säulenvolumen) CHT-2 (Hydroxyapatit, 1ml Säulenvolumen, Bio-Rad, München) TSK 3000SW _{XL} (Größenausschlusschromatographie, 23,4 ml Säulenvolumen, Tosohaas, Stuttgart)
Durchflussphotometer:	Pharmacia Uvicord SII (Pharmacia, Freiburg)
Photometer:	Pharmacia Ultrospec 2000 (Pharmacia, Freiburg)
PCR-Gerät:	Perkin-Elmer GeneAmp 2400
Flüssigszintillationszähler:	Beckman, LS-230 (Beckman Instruments, Palo Alto, USA)
HPLC	Applied Biosystems Microgradient System Perkin Elmer 785A UV/VIS Detector Knauer microfraction collector verwendet wurden folgende stationäre Phasen: Vydac 218 TP 51 (250 x 1 mm)

	POROS II R/H (100 x 0,8 mm)
Peptidsequenzierung	Procise Protein Sequencer, Perkin-Elmer
Zentrifugen:	Sorvall RC 5-Superspeed Kühlzentrifuge (Dupont de Nemour, New Town, Connecticut, USA)
	Biofuge A (Heraeus Christ, Osterode)
	Eppendorf 5415 C Tischzentrifuge
	Speed Vac Vakuum-Konzentrationszentrifuge (Savant-Instruments, Farmingdale, New York, USA)
	Beckman L8-55 Ultrazentrifuge
	Beckman TL-100 Ultrazentrifuge

3.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten *per analysi* Qualität, soweit nicht anders angegeben, wurden sie von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen).

Nährmedien für die Bakterienkultivierung waren von Difco (USA), Zellkulturmedien von Gibco-BRL (Eggenstein).

3.1.3 Radiochemikalien

[3,4-³H]-Glutaminsäure, spezifische Aktivität 60 Ci/mmol, Volumenaktivität 1 mCi/ml (Hartmann Analytik, Braunschweig)

γ-[³²P]-ATP, spezifische Aktivität 400 Ci /mmol, Volumenaktivität 10 mCi /ml (Hartmann Analytik, Braunschweig)

Redivue™ L-[³⁵S]Methionin (10 mCi/ml, Amersham, Braunschweig)

3.1.4 Antikörper

primäre Antikörper:	DM1A (Maus-anti α -Tubulin, Sigma, Deisenhofen) Tub 2.1 (Maus-anti β -Tubulin, Sigma, Deisenhofen) GT 335 (Maus-anti polyglutamyliertes Tubulin, Wolff et al., 1992) ID 5 (Maus-anti detyrosiniertes α -Tubulin, Wehland und Weber, 1987) KMX-1 (Maus-anti β -Tubulin, Birkett et al., 1985)
sekundäre Antikörper:	Kaninchen-anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt Ziege-anti-Maus Rhodamin-gekoppelt (Dianova, Hamburg) Schwein-anti-Kaninchen IgG, Peroxidase gekoppelt (DAKO, Dänemark)

3.1.5 Bakterienstämme

Es wurden folgende *E.coli* Stämme verwendet: *E. coli* TOP 10 F^c One Shot (Invitrogen, Groningen, Niederlande). *E.coli* BL 21 (DE3) pLysS (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

3.1.6 Plasmide

pCR 2.1 TOPO	TA-Klonierung, Invitrogen (Leek, Niederlande)
pCR-Blunt II-TOPO	TOPO-blunt Klonierung (Invitrogen, Leek, Niederlande)
pGEX-4T-1	Expression in <i>E.coli</i> als GST-Fusionsprotein, (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
pCITE-4a	In-vitro Transkription/Translation, Novagen (Madison, USA)

3.1.7 Zelllinien

Hela SS6 Humanes Cervix-Adenokarzinom (Gey et al., 1952)

3.1.8 Puffersysteme

PBS: 20 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ pH 7,3
 150 mM NaCl

TBS: 20 mM Tris-HCl pH 7,4

	150 mM NaCl
TBST:	20 mM Tris- HCl pH 7,4 150 mM NaCl 0,2 % (v/v) Tween 20
TE:	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA
TBE:	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 7,5

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Farbstoffbindungsmethode nach Bradford (1976) angewandt. Als Eichprotein wurde BSA (Bio-Rad, München, 1,43 mg/ml) verwendet. Dem Protokoll der Hersteller folgend wurden die Proben mit H₂O auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach 5 minütiger Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm gegen den entsprechenden Puffer gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve bestimmt.

3.2.2 Proteinfällung

Für geringe Proteinmengen oder für Proteine, die in Lösungen hoher Salzkonzentration vorliegen, eignet sich die Präzipitation mittels eines Chloroform/Methanol-Gemischs (Wessel und Flügge, 1984). Hierzu wurde ein Volumenteil der Proteinlösung zunächst mit 4 Volumenteil Methanol versetzt und gemischt. Nach Zugabe von 1 Volumenteil Chloroform sowie 3 Volumenteil Wasser und jeweils erneuter Mischung, wurde 3 min lang bei 15000 g zentrifugiert. Hierbei trennen sich wässrige Phase und Chloroform, und das präzipitierte Protein ist in der Interphase zu finden. Nun wurde die wässrige Phase bis zum Protein abgenommen und 3 Volumenteil Methanol zugegeben. Nach erneutem Mischen wurde das Protein durch Zentrifugation bei 15000 g für drei Minuten präzipitiert. Nach Abnahme des Überstandes und Trocknen wurde das Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Zur Präzipitation von Proteinen aus stark verdünnten Lösungen fand ausserdem das DOC-TCA-Verfahren Anwendung. Hierzu wurde die Probe mit 0,1 Volumenteil Natriumdeoxycholat versetzt und gemischt. Dann erfolgte die Zugabe von 1

Volumenteil 100 % (w/v) Trichloressigsäure. Nach erneutem Mischen wurde die Probe zur vollständigen Fällung für mindestens eine Stunde auf Trockeneis belassen und anschliessend bei 15000 g für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS- PAGE wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt, die Minigele hatten die Abmessungen 100 x 80 x 0,5 mm, grössere Gele 160 x 150 x 0,75 mm. Die Proben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung 5 min lang gekocht.

Lösungen:

A) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (30 g Acrylamid, 0,8 g Bis-(N,N'-Methylen-diacrylamid) auf 100 ml, 0,2 µm filtriert.

B) Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS

C) Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,6, 0,4 % (w/v) SDS

D) 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Die Trenngele wurden nach folgendem Schema angefertigt (Angaben in ml):

Lösungen	5%	7,5%	8%	10%	11%	12,5%	15%	18%
A	5,0	7,5	8,0	10,0	11,0	12,5	15,0	18,0
B	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
H ₂ O	17,9	14,8	14,4	12,4	11,3	9,9	7,4	4,3
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
D	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Sammelgele enthielten immer 3,9% Acrylamid:

A	1,3 ml
C	2,5 ml
H ₂ O	6,2 ml
TEMED	0,01 ml
D	0,2 ml

Elektrophoresepuffer: 3,0 g Tris, 14,4 g Glycin, 1 g SDS auf 1 Liter (pH 8,8)

Färbelösung:	5 g Coomassie-Blau (Sigma R 250); 164 ml Essigsäure; 900 ml Methanol auf 2 l (filtrieren)
Entfärbelösung:	1,5 l Essigsäure, 1 l Methanol auf 20 l
2x SDS-Probenpuffer:	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β - Mercaptoethanol, 0,001% (w/v) Bromphenolblau

3.2.4 SDS-PAGE zur Trennung von α - und β -Tubulin

Zwei Veränderungen des Standardprotokolls führen zu einer verbesserten Auftrennung von α - und β - Tubulin (Rüdiger et al., 1992):

- 1.) Das Trenngel enthält 6 M Harnstoff.
- 2.) Es wird ein spezielles SDS von Sigma verwendet (Sigma L- 5750), dieses enthält Anteile an Cetyl- und Myristylsulfat.

3.2.5 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung von Proteinen im Polyacrylamidgel hat eine Nachweisgrenze von etwa 1-10 ng und ist damit 50-100 fach sensitiver als eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. Es wurde das Silberfärbungskit Roti-Black P (Roth, Karlsruhe) nach dem Protokoll des Herstellers angewendet. Dieses beinhaltet nach der Fixierung der Proteine im Gel einen Sensitivierungsschritt mit Natriumthiosulfat und eine Reduktion zu kolloidalem Silber im schwach basischen Milieu (Natriumcarbonat). Entscheidend für eine möglichst hintergrundfreie Färbung war die absolute Sauberkeit der Färbegefäße, diese wurden dazu mit konzentrierter Salpetersäure geschwenkt und anschliessend mit reichlich destilliertem Wasser gespült.

3.2.6 Proteinreinigungen

3.2.6.1 Reinigung von Tubulin aus Schweinehirn

Die Reinigung erfolgte nach Shelanski (1977) über Zyklen von temperaturabhängiger Polymerisation und Depolymerisation des Tubulins. Zunächst wurden 700 g frisches Schweinehirn von Hirnhäuten und Blutgefässen befreit und mit 0,9% Kochsalzlösung blutfrei gewaschen. Die Homogenisation erfolgte in 700 ml PIPES-Assembly-Puffer (100 mM PIPES/KOH pH 6,8, 0,5 mM DTT und je 1 mM EGTA und $MgCl_2$) mit 2,5 mM ATP, 0,1 mM GTP im Waring-Blendor. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde zentrifugiert (20000 g, 30 min, 4°C). Nach erneuter Zentrifugation des Überstandes

(100000 g, 30 min, 4°C) wurde 55% (v/v) 11,5 M Glycerol in PIPES-Assembly-Puffer mit 2,5 mM ATP, 0,1 mM GTP zugesetzt und für 40 min bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Mikrotubuli wurden herunterzentrifugiert (100000 g, 30 min, 37°C) und in 50 ml kaltem PIPES-Assembly-Puffer mit 1 mM GTP unter Zuhilfenahme eines Glas-Glas-Homogenisators auf Eis resuspendiert. Die Mikrotubuli wurden durch 40 minütige Inkubation auf Eis depolymerisiert und durch anschliessende Zentrifugation (100000g, 30 min, 4°C) von Aggregaten befreit. Mit dem Überstand dieser Zentrifugation wurde der Zyklus aus Polymerisation und Depolymerisation wiederholt. Das letzte 37°C-Pellet wurde dann in einem möglichst geringem Volumen MES-Assembly-Puffer (100 mM MES/KOH pH 6,8, 0,5 mM DTT und je 1 mM EGTA, MgCl₂ und GTP) resuspendiert, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

3.2.6.2 Herstellung von MAP-freiem Hirntubulin

Durch Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose konnte Mikrotubulinprotein von assoziierten Proteinen (MAPs) befreit werden (Sloboda und Rosenbaum, 1982). 1 ml gequollene Phosphocellulose (Whatman PC 12) pro 3 mg Mikrotubulinprotein wurden in MES-Assembly-Puffer äquilibriert. Das Mikrotubulinprotein wird auf die Phosphocellulosesäule gegeben und sauberes Tubulin (pcTubulin) eluiert aufgrund seines anionischen Charakters im Durchfluss.

3.2.6.3 Cytoskelett-Präparation und Solubilisierung von Tubulin

Polyglutamylase aus *Crithidia*

Crithidia Zellen wurden aus 6–9 Litern Kulturansatz während der späten logarithmischen Wachstumsphase bei Zelldichten von etwa $3-4 \times 10^7$ Zellen/ml geerntet. Nach Zentrifugation im GS3-Rotor (6000 rpm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 600 ml eiskaltem PBS gewaschen. Zur Cytoskelett-Extraktion wurden die Zellen in 300 ml Extraktionspuffer resuspendiert und 1 Stunde lang mit einem Magnetrührer bei 4°C gerührt. Um den Zellaufschluss zu unterstützen wurde die Suspension in einem grossen Glas-Glas Dounce Homogenisator bearbeitet, dann wurde zentrifugiert (SS34, 12000rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand (cytosolische Fraktion) sollte an dieser Stelle gelblich gefärbt sein, das Cytoskelett-Pellet dagegen weiss. Anschliessend wurde das Pellet in PEM-Puffer (100 mM PIPES/KOH pH 6,9, je 1 mM MgCl₂, EGTA und DTT) mit Protease-Inhibitoren gewaschen und wie oben zentrifugiert. Zur Solubilisierung der Glutamylierungsaktivität wurde das Pellet in 40 ml des PEM-Puffers + 250 mM NaCl resuspendiert und im Glas-Glas Dounce-Homogenisator bearbeitet. Nach der folgenden Zentrifugation (UZ Ti 50, 40000 rpm, 4°C, 20 min) enthielt der Überstand nun die solubilisierete Tubulin Polyglutamylase. Die rohe Enzymfraktion wurde durch eine weitere Zentrifugation geklärt (Ti 50, 43500 rpm, 20 min, 4°C), in einem 50 ml Falcon-Röhrchen auf flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Isoliertes Cytoskelett und Rohenzym-Fraktion aus *Leishmania tarentolae* wurde in analoger Weise erhalten und von Dr. André Schneider (Institut für Zoologie, Universität Fribourg, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Extraktionspuffer: 1 mM PIPES/KOH pH 6,9
1% NP-40
5 mM EDTA
1 mM DTT

Protease-Inhibitoren: Pefabloc SC 0,1 mg/ml
Sojabohnen Trypsin-Inhibitor (SBTI) 0,1 mg/ml
Leupeptin 0,01 mg/ml
Benzamidin 0,5 mM

3.2.6.4 Reinigung und Charakterisierung carboxyterminaler Peptide von Tubulin aus *Crithidia*

Crithidia Cytoskelette wurden wie unter 3.2.6.3. beschrieben isoliert, in SDS-Probenpuffer gekocht, über ein präparatives 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die prominente Tubulin-Bande bei 55 kD ausgeschnitten. Nach in-situ-Verdau mit Endoproteinase LysC (3.2.9.) bzw. mit Bromcyan (3.2.10.) wurden die carboxyterminalen Peptide von α - und β -Tubulin wie in Schneider et al. (1997) für *Trypanosoma brucei* beschrieben durch Anionenaustauschchromatographie an monoQ und Umkehrphasen-HPLC gereinigt und Peaks von der HPLC durch automatische Sequenzierung und MALDI-Massenspektroskopie charakterisiert.

3.2.6.5 Reinigung von Tubulin Polyglutamylase aus dem 0,25 M NaCl-Überstand

ATP-Affinitätschromatographie: Periodat-oxidiertes ATP wurde wie beschrieben (3.2.6.6.) über einen Spacer von Sebacinsäuredihydrazid an Bromcyan-aktivierte Sepharose gekoppelt. Das Affinitätsgel wurde vor jeder Präparation frisch hergestellt und in einer Glassäule mit 20 mM PIPES/KOH pH 6,9, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT (Puffer A) äquilibriert. Das Säulenvolumen betrug etwa 8 ml. Der 0,25 M NaCl-Überstand (Rohenzym) wurde 1:1 mit PEM-Puffer verdünnt und mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Affinitätssäule gegeben. Typischerweise wurde für jede Reinigung das Material aus 3 Rohenzym-Präparationen (entsprechend einem Ausgangsmaterial von 27 Litern *Crithidia*-Kultur) in diesem Schritt eingesetzt. Die Säule wurde anschliessend mit 10 Säulenvolumen Puffer A + 0,25 M KCl gewaschen. Die Elution der Glutamylierungsaktivität erfolgte durch Puffer A mit 20 mM ATP, 20 mM $MgCl_2$ und 0,5 M KCl. Fraktionen von 2 ml wurden aufgefangen und während

der Elution wurde die Flussrate auf 0,5 ml/min reduziert. 2 µl Aliquots der Fraktionen wurden im Enzymtest untersucht. Diejenigen Fraktionen, die Glutamylierungsaktivität enthielten, wurden mittels Ultrafiltration in Centricon-10 Konzentratoren (Amicon, Witten) von 2 ml auf etwa 400 µl konzentriert. Um die Ausbeute an Enzym zu erhöhen, wurden die Ultrafiltrationseinheiten nach den Angaben des Herstellers mit 5% (v/v) Tween 20 vorbehandelt.

Glycerin-Dichtegradienten Zentrifugation: Fraktion II Enzym konnte durch Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation weiter gereinigt werden. Hierzu wurden jeweils 400 µl der konzentrierten ATP-Fraktion vorsichtig auf lineare 10% - 20% (v/v) Glycerin-Gradienten in 20 mM PIPES/KOH pH 6,9, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM DTT (Puffer B) aufgetragen. Die Proben wurden bei 4°C und 286000 g (41 000 rpm) für 20 h in einem SW 41-Rotor (Beckmann) zentrifugiert. Die Röhrchen wurden am Boden punktiert und 30 Fraktionen von je 400 µl von jedem Gradienten gesammelt. Glutamylierungsaktive Fraktionen wurden vereinigt (Fraktion III Enzym). Zur Abschätzung der Sedimentationskonstanten wurden Markerproteine (Ribonuklease A, Ovalbumin, BSA, Aldolase) in Parallelröhrchen mitzentrifugiert.

Anionenaustauschchromatographie: Eine weitere Anreicherung der Glutamylierungsaktivität erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie. Hierzu wurden 2 ml der Dichtegradientenfraktion (Fraktion III Enzym) auf eine monoQ PC 1.6/5 Säule (SMART System, Pharmacia) aufgetragen. Die Säule wurde mit einem 4 ml linearen Gradienten entwickelt, der durch Mischen von Puffer B mit Puffer C (Puffer B + 1 M NaCl) hergestellt wurde. Folgendes Programm kam zum Einsatz: 0-2,3 ml, 0% C; 2,3-3,3 ml, 0-50% C; 3,3-3,5 ml, 50-90% C; 3,5-4,0 ml, 90% C. Die Flussrate betrug 100 µl/min, es wurden Fraktionen von 100 µl gesammelt. Alternativ zum beschriebenen linearen Gradienten wurde die Säule in weiteren Experimenten in zwei Stufen von 0,4 und 0,9 M NaCl entwickelt.

Grössenausschlusschromatographie: Maximal 400 µl der Glutamylierungsaktivität nach der monoQ-Säule (Fraktion IV Enzym) wurden auf eine TSK 3000 SW_{XL}-Säule, angeschlossen ans FPLC-System (Pharmacia), aufgetragen. Die Säule wurde zuvor in 50 mM PIPES/KOH pH 6,9, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 M NaCl äquilibriert. Die Flussrate betrug 0,6 ml/min und Fraktionen von 400 µl wurden gesammelt. Die Säule wurde mit Markerproteinen (Thyroglobulin, Aldolase, BSA, Ovalbumin, Ribonuklease) unter identischen Bedingungen kalibriert.

Hydroxyapatitchromatographie: Nach der Dichtegradientenzentrifugation konnte anstelle der monoQ-Säule eine CHT-2 Hydroxyapatit-Säule (Bio-Rad, München) zur Reinigung der Glutamylierungsaktivität eingesetzt werden. Hierzu wurde die Dichtegradientenfraktion zunächst in einer Dialyse-Kassette (Pierce) für 1 h gegen 10 mM Natriumphosphat pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT dialysiert und dann bei einer Flussrate von 0,6 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen linearen 16 ml Gradienten von 10 bis 400 mM Natriumphosphat, es wurden Fraktionen von 500 µl gesammelt. Die Glutamylierungsaktivität eluierte unter diesen Bedingungen bei 160 mM Natriumphosphat.

3.2.6.6 Präparation der ATP-Affinitätssäule

Periodat-oxidiertes ATP wurde über einen Spacer von Sebacinsäuredihydrazid an Bromcyan-aktivierte Sepharose gekoppelt. Zur Synthese des Spacers wurden 100 ml Diethylsebacat, 200 ml Hydrazinhydrat und 200 ml Ethanol in einen Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler gegeben. Die Mischung wurde 3 Stunden lang vorsichtig unter Rückfluss gekocht und der entstehende farblose Niederschlag von Sebacinsäuredihydrazid auf einem Büchner-Trichter gesammelt, mit kaltem Ethanol und Ether gewaschen und getrocknet.

2,4 g Bromcyan-aktivierte Sepharose (Pharmacia) wurden mit 200 ml 1 mM HCl und 200 ml Wasser gewaschen und anschliessend mit Sebacinsäuredihydrazid-Lösung (0,8 g in 16 ml Eisessig) versetzt. Die Mischung wurde über Nacht langsam bei Raumtemperatur gerührt. Das Gel wurde anschliessend nacheinander mit 200 ml 50 % (v/v) Essigsäure, 400 ml Wasser und 200 ml 1 M Natriumacetat pH 5 gewaschen und in 8 ml des Natriumacetat-Puffers resuspendiert. 2,4 ml 20 mM ATP wurden mit 2,4 ml 18 mM Natriummetaperiodat (frisch in Wasser gelöst) versetzt und eine Stunde lang bei 4°C im Dunkeln gerührt. Die entstehende oxidierte ATP-Lösung wurde zur Sebacinsäuredihydrazid-Sepharose gegeben und für 2,5 h bei 4°C gerührt. Zuletzt wurde das Gel mit jeweils 100 ml kalter 1 M NaCl-Lösung, 1 mM EDTA und Wasser gewaschen, in Wasser suspendiert und bei 4°C bis zur Benutzung aufbewahrt.

3.2.6.7 Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus E.coli

Die Zellen wurden zunächst durch Zentrifugation geerntet (GSA-Rotor, 7000 rpm, 10 min, 4°C) und dann in 20 ml PBS mit Complete-Protease Inhibitoren (Boehringer, Mannheim) resuspendiert. Die Suspension wurde anschliessend 4-5 mal für je 30 sec auf Eis sonifiziert, wobei darauf geachtet wurde, dass keine zu starke Schaumentwicklung auftrat. Nach Zugabe von Triton-X-100 auf 1% (v/v) final, wurde 30 min lang bei 4°C zur vollständigen Solubilisierung des Fusionsproteins gerührt. Nun wurde wiederum zentrifugiert (Rotor SS34, 11000 rpm, 4°C, 10 min) und der Überstand auf eine Affinitätssäule aus Glutathion-Sepharose 4B (AmerhamPharmacia, Freiburg) gegeben, die zuvor in PBS äquilibriert worden war. Das Säulenvolumen betrug bei einem Ausgangsvolumen der Bakterienkultur von 500 ml etwa 1,2 ml. Die Säule wurde verschlossen und mit dem Überstand für 30 min bei RT rotiert. Anschliessend wurde die Säule ausgiebig mit PBS gewaschen. Die Abspaltung des GST-Anteils des Fusionsproteins erfolgte durch Thrombin-Spaltung auf der Säule. Hierzu wurden pro 200 µl Gelvolumen 10 µl Thrombin-Lösung (1000 U/ml, Sigma, Deisenhofen) mit 190 µl PBS versetzt, in das Säulenbett vollständig einlaufen gelassen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschliessend wurde das abgespaltene Protein dreimal mit dem einfachen Säulenvolumen an PBS eluiert und Aliquots der Elutionsfraktionen in der SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden bei -20°C gelagert.

3.2.7 Enzymtest für Tubulin Polyglutamylase

Die Enzymaktivität der Tubulin Polyglutamylase wurde durch die Inkorporation von Tritium-markierter Glutaminsäure in Tubulin gemessen. Der 50 µl Standard-Reaktionsansatz enthielt 50 mM Tris-HCl pH 9, 15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,5 % NP-40, 1 mM ATP (mit NaOH auf pH 7 eingestellt), 5 mM DTT, 20% Glycerol und L-[³H]Glutaminsäure (2,3 µM, 7 µCi).

Zur Demonstration der Glutamylierungsaktivität wurden 20-40 µg der extrahierten Cytoskelette in der Reaktionsmischung resuspendiert und bei 27°C für 90 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer und anschliessendem Kochen abgestoppt. Der Reaktionsansatz wurde auf einem 7,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Nach Färbung mit Ponceau S wurde die prominente Tubulinbande ausgeschnitten, in Wasser entfärbt, getrocknet und in 5 ml Szintillator-Flüssigkeit (Filter-Count, Packard) gelöst. Die Messung der radioaktiven Inkorporation erfolgte im Flüssigszintillationszähler.

Zur einfachen und schnellen Messung der Enzymaktivität während der Proteinreinigung wurde ein Filter-Test etabliert. Da die Tubulin Polyglutamylase freies Glutamat in den C-Terminus von Tubulin einbaut, ist das inkorporierte Glutamat mit Trichloressigsäure fällbar und kann auf Whatman 3 MM Filtern gesammelt werden. Als Substrat wurde Mikrotubuliprotein aus Schweinehirn in einer finalen Konzentration von 0,4 mg/ml im Reaktionsansatz verwendet. Nach Inkubation mit der Enzymfraktion wurden die gesamten 50 µl Reaktionsansatz auf ein Whatmann 3 MM Filter (Durchmesser 2,3 cm) pipettiert und das Filterpapier in eiskalte 10 % (w/v) Trichloressigsäure (4 ml pro Filter) gegeben. Das Waschen der Filter zur Entfernung nicht gebundener Radioaktivität wurde wie beschrieben (Flavin und Murofushi, 1984) durchgeführt: Die Filter wurden zunächst noch zweimal mit 10 % TCA, dann mit 5 % (v/v) Essigsäure gewaschen. Anschliessend folgten noch zwei kurze Waschgänge in 50% (v/v) Ethanol 50 % (v/v) Ether und in schliesslich in Diethylether, um den restlichen Alkohol und Wasser zu entfernen. Die Filter wurden unter einer Wärmelampe getrocknet und im Zählgefäß mit je 5 ml Filter-Count (Packard, Groningen, Niederlande) versetzt. Die Zähleffizienz wurde durch Aufbringen einer definierten Menge ³H-Glutaminsäure auf den Filter und sofortiges Zählen ohne Waschprozedur ermittelt. Sie betrug für Tritium auf Whatman 3 MM Filtern etwa 4,5 %.

3.2.8 Enzymtest für Monoglutamylierungs- („Verzweigungs“-)Aktivität

Die Glutamylierungsreaktion besteht grundsätzlich aus zwei Schritten: Seitenketteninitiation durch Bildung einer Isoeptidbindung und anschliessende Kettenelongation. Durch eine Abwandlung des Standard-Assays konnte spezifisch die Bildung der Isoeptidbindung verfolgt werden: Das Reaktionsvolumen des Assays wurde auf 20 µl reduziert und als Substrat wurde Hefetubulin (Cytoskeleton, Denver, USA) in einer Konzentration von 0,1 mg/ml mit 4 mM Glutaminsäure eingesetzt. Je 1

μ l der Reaktionslösung wurde direkt auf Nitrozellulose aufgebracht und der Dot-Blot mit dem glutamylierungs-spezifischen Antikörper GT335 (1:10000) angefärbt. Da unbehandeltes Hefetubulin nicht mit GT335 reagiert und die Isoeptidbindung Teil des GT335-Epitops ist (Wolff et al., 1992), zeigt eine GT335-positive Reaktion in diesem Assay die Initiation einer neuen Seitenkette beim Hefetubulin an.

3.2.9 In situ Verdau von Proteinen mit Endoproteinase LysC

Coomassie-gefärbte Proteinbanden wurden ausgeschnitten, die Gelstückchen mit destilliertem Wasser gewaschen und bis zu ihrer Verwendung bei -70°C eingefroren. Zur Vorbereitung auf den *in-situ*-Verdau wurden die Gelstückchen 3x für je 15 min in 50% Acetonitril 50% 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,0 äquilibriert und anschließend an der Luft für 15 min getrocknet. Endoproteinase LysC wurde in einer Konzentration von 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat eingesetzt, das Gesamtvolumen der Enzymlösung betrug in der Regel 100 μl , dies reichte aus, um die Gelstückchen vollständig zu bedecken. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C . Zur Extraktion der Peptide wurde zunächst der Überstand abgenommen und die Gelstückchen mit 50% Acetonitril 50% Trifluoressigsäure versetzt und bei 57°C für 45 min inkubiert, anschließend wurden die Gelstückchen unter den gleichen Bedingungen noch 2x mit 50% Acetonitril inkubiert, die Überstände wurden vereinigt und in der Speed-Vac-Konzentrationszentrifuge getrocknet. Der Rückstand wurde in 200 μl 20 mM Natriumphosphat pH 7,0 aufgenommen.

3.2.10 Chemische Spaltung von Proteinen mit Bromcyan

BrCN spaltet Polypeptidketten carboxyterminal von Methionin- Resten. Zur Vorbereitung auf den Verdau wurden die Gelstückchen wie oben in 50 % Acetonitril äquilibriert. Bromcyan wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml in 70% Ameisensäure eingesetzt, dabei wurde soviel Lösung zugegeben, daß die Gelstückchen vollständig bedeckt waren. Die Inkubation erfolgte über Nacht lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

Zur Extraktion der Peptide aus dem Gel wurde zunächst der Überstand abgenommen, die Gelstückchen mit 70% Ameisensäure versetzt und 45 min bei 57°C inkubiert. Anschließend wurde analog zum LysC-Verdau verfahren.

3.2.11 Vorbereitung von Proben für die Massenspektroskopie

Zur massenspektrometrischen Charakterisierung von HPLC-Fractionen oder Fractionen aus der Anionenaustauschchromatographie wurden Aliquots der entsprechenden Proben in der Speed-Vac-Zentrifuge zur Trockne gebracht. Als Matrix wurde 10 mg/ml α -cyano-4-hydroxizimtsäure (α -CN) in 30% (v/v)

Acetonitril, 0,1% (v/v) TFA verwandt. 1 μ l dieser Matrix-Lösung wurde zum Rückstand gegeben, und das gesamte Matrix-Proben-Gemisch auf ein Probenfeld eines MALDI-Probenträgers transferiert, der zuvor mit einem dünnen Film 10 mg/ml α -CN in 95% Aceton beschichtet worden war. Zur Kristallisation des Matrix-Proben-Gemischs wurde der Träger 10 min bei Raumtemperatur belassen. Um Verunreinigungen (z.B. anorganische Salze, SDS) zu entfernen, wurden die Proben vor der Messung gewaschen, indem 1 μ l mit 1% TFA angesäuertes Wasser auf die Proben gegeben wurde. Der Tropfen wurde nach etwa 10 sec mit einem Strom von CO₂-Gas weggeblasen, und der Träger zum Trocknen kurz bei Raumtemperatur belassen.

3.2.12 Aufnahme der Massenspektren

Das Kompact MALDI 4-Flugzeit-Massenspektrometer (Shimadzu, Duisburg) ist mit einem Stickstoff- Laser ($\lambda = 337$ nm) ausgerüstet. Es wurden Spektren der negativen Ionen im linearen Modus aufgenommen, die Kalibrierung des Instruments erfolgte mit den externen Standards Insulin und α -Melanocyten-stimulierendes Hormon (α -MSH). Die Verwendung des negativen Modus sorgt für ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis der aufgenommenen Spektren gegenüber einer Messung im positiven Modus, da die stark sauren C-terminalen Peptide von Tubulin leicht ein Proton abgeben (Rüdiger et al., 1995).

Für jede Probe wurden zwischen 30 und 100 Einzelspektren akkumuliert und gemittelt.

3.2.13 In-vitro-Glutamylierung von synthetischen Peptiden

Tubulin-verwandte Peptide wurden nach Standardmethoden synthetisiert und gereinigt. Sie wurden weiterhin durch Sequenzierung und Massenspektroskopie charakterisiert. Durch quantitative Aminosäureanalyse konnten genaue Peptid-Konzentrationen ermittelt werden. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 0,1 mM im Standardreaktionspuffer mit 4 mM nicht-radioaktiver Glutaminsäure und partiell gereinigter Polyglutamylase (Fraktion II) inkubiert.

Ein Aliquot des Reaktionsansatzes wurde über eine Umkehrphasen-HPLC gereinigt und Peptid-Peaks wurden durch Massenspektroskopie und automatische Sequenzierung genauer untersucht.

Alternativ zu dieser Methode konnten die Reaktionsprodukte auch durch Anionenaustauschchromatographie charakterisiert werden. Hierzu wurde ein 10 μ l Aliquot des Reaktionsansatzes mit 20 mM Tris-HCl pH 8 (Puffer A) auf 400 μ l verdünnt und auf eine TSKgel DEAE-NPR Säule (Tosohaas, 4,6 x 35 mm) gegeben. Die Peptide wurden durch einen 2,7 ml linearen Gradienten von 0 – 0,5 M NaCl in Puffer A gefolgt von einem 0,9 M NaCl Waschschrift eluiert. Die Flussrate betrug

dabei 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 100 μl Fraktionen wurden gesammelt. Peptide aus den DEAE-Fraktionen konnten mit Hilfe von C18 Zip-Tips (Millipore, Bedford, USA) nach Anweisung des Herstellers für die Massenspektroskopie vorbereitet werden.

3.2.14 In-vitro Phosphorylierungs-Test

Der Standard-Kinase-Puffer war 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl_2 in einem Gesamtvolumen von 20 μl . Die Reaktion wurde mit 5 μCi [γ - ^{32}P]-ATP versetzt und mit den entsprechenden Enzymfraktionen bei 27°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer und anschliessendem 3 minütigem Kochen abgestoppt und Aliquots des Ansatzes in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer des Gels auf Whatman 3 MM-Papier und Trocknen unter Vakuum, konnte der Einbau von markiertem Phosphat in der Autoradiographie nachgewiesen werden.

3.2.15 RNA-Bindungstest

Die Fähigkeit zur RNA-Bindung wurde in einem EMSA („electrophoretic mobility shift assay“) –Test überprüft. Verschiedene Mengen des rekombinanten *T.brucei* La Proteins wurden in einem Gesamtvolumen von 10 μl mit 1 μl MNV 11 RNA (67 nt, 0,9 mg/ml) bei 27°C für 20 min inkubiert. Die Proben wurden anschliessend auf einem nicht-denaturierenden 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid analysiert.

La-Puffer: 25 mM Tris-HCl pH 8,0
 20 % Glycerol
 0,1 mM EDTA
 0,5 mM DTT

3.2.16 Hochauflösende isoelektrische Fokussierung

Zur Charakterisierung der Reaktionsprodukte von Tubulin Polyglutamylase wurde die hochauflösende isoelektrische Fokussierung nach O’Farell (1975) mit den Modifikationen von Wolff et al. (1982) verwandt.

Verwendete Lösungen:

Lysepuffer: 9,8 M Harnstoff, 2%(w/v) NP-40, 2% Ampholyte pH 5-6, 100 mM DTT

Überschichtungspuffer: 8 M Harnstoff, 1% Ampholyte pH 5-6, 5% (w/v) NP-40, 100 mM DTT

Äquilibriumspuffer: 0,06 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 100 mM DTT, 10% Glycerol

Acrylamidlösung: 28,38%(w/v) Acrylamid und 1,62 %(w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Elektrophoresepuffer:Kathodenpuffer: 10 mM Histidin
Anodenpuffer: 10 mM Glutaminsäure

Gellösung: 4,12 g Harnstoff, 0,975 ml Acrylamid-Lösung, 1,5 ml 10 % NP-40, 1,5 ml H₂O, 0,4 ml Ampholyte pH 5-6; Start der Polymerisation durch Zugabe von 7,5 µl APS und 5 µl TEMED.

Die verwendeten Gelröhrchen hatten die Dimensionen 3 x 200 mm, sie wurden mit Hilfe einer Spritze mit Gellösung beschickt, mit 50 µl Überschichtungspuffer bedeckt und zur Polymerisation über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Anschliessend wurden die Röhrchen mit Wasser gespült und in die Apparatur (Bio-Rad Tube Cell 175) eingesetzt. Zur Vorfokussierung wurden die Gele mit 100 µl Lysis-Puffer, 50 µl Überschichtungspuffer und Kathodenpuffer beladen. Das Protokoll zur Vorfokussierung folgte der Methode von (Wolff et al., 1982): Zunächst wurde eine konstante Spannung von 1000 V eingestellt und die Stromstärke notiert. Dann wurde die Stromstärke soweit reduziert, daß die Spannung nur noch 750 V betrug. Nachdem die Spannung nach einiger Zeit wieder 1000 V erreicht hatte, wurde die Stromstärke wiederum bis zu einer zugehörigen Spannung von 750 V reduziert. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis die Stromstärke die Hälfte ihres Ausgangswertes erreicht hatte.

Nach dem Vorlauf wurden die Röhrchen aus der Apparatur genommen und mit Kathodenpuffer gespült. Die Proben für die IEF wurden mit Chloroform-Methanol gefällt und in 50 µl Lysis-Puffer aufgenommen. Wiederum wurde der Ansatz mit 50 µl Überschichtungspuffer bedeckt und mit Kathodenpuffer bis zur Spitze des Röhrchengels aufgefüllt. Nun wurde für 16 h bei 750 V, anschliessend für 2 h bei 1000 V fokussiert. Danach wurden die Gele mit Hilfe einer wassergefüllten Spritze vorsichtig aus den Röhrchen gepresst und für 30 min in einer Petrischale mit Äquilibriumspuffer unter leichtem Schütteln inkubiert.

Für die zweite Dimension wurden 8% Polyacrylamid-Gele verwendet. Das IEF-Gel aus der ersten Dimension wurde dazu mit einer Lösung von 1% (w/v) Agarose in SDS-Laufpuffer vorsichtig auf dem SDS-Gel fixiert.

3.2.17 Autoradiographie von Polyacrylamidgelen

Zur Autoradiographie von Gelen, die ³H-markierte Proteine enthielten wurden diese nach der Elektrophorese für 15 min in Amplify-Lösung (Amersham Pharmcia)

inkubiert. Um ein Reißen des Gels beim Trocknen zu verhindern, wurde es für 10 min in 7% Essigsäure, 7% Methanol, 1% Glycerol inkubiert. Anschliessend wurde das Gel auf Whatman 3 MM Filterpapier unter Vakuum getrocknet und bei -70°C für wenigstens 16 h exponiert.

Alternativ wurden die ^3H -markierten Proben nach der SDS-PAGE auf Nitrozellulose transferiert, diese wurde auf Filterpapier getrocknet und mit einem Verstärkerfoliensystem (BioMax TranScreen LE, Kodak) gegen einen Röntgenfilm (BioMax MS, Kodak) bei -70°C exponiert.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Western-Transfer

In der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine konnten elektrophoretisch auf Nitrozellulose oder PVDF-Membran übertragen werden. Hierzu fand das Verfahren des Naßtransfers (Towbin et al., 1979) in einer Bio-Rad transblot Zelle (Bio-Rad, München) Anwendung. Transferpuffer war 25 mM Tris, 190 mM Glycin in 20 % Methanol, 0,02 % SDS für die immunologische Detektion oder 50 mM Tris, 50 mM Borat wenn das Protein zur Sequenzierung auf PVDF geblottet wurde. Die PVDF-Membran musste vor dem Transfer in Methanol getränkt werden. Der Transfer erfolgte zwischen je 3 Lagen Whatman 3MM Filterpapier bei einer konstanten Stromstärke von 335 mA für 30 min. Proteine auf den Blotfolien konnten reversibel mit Ponceau S (0,25% Ponceau S, 40% Methanol, 15% Essigsäure in Wasser) angefärbt werden, die Entfärbung erfolgte durch mehrmaliges Waschen in Wasser.

3.3.2 Immunblotting

Zur Blockierung freier Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran wurde diese mit 3% BSA (oder 5% Magermilchpulver) in TBST abgesättigt (1 Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, der in TBST mit 3% BSA verdünnt wurde (1 Stunde bei 37°C unter Schütteln, oder über Nacht bei 4°C). Die Membran wurde mindestens 3 x für je 10 Minuten mit TBST gewaschen, dann wurde sie mit dem zweiten Antikörper (1: 20000 in TBST mit 3% BSA), der gegen den ersten gerichtet und mit Peroxidase gekoppelt war, inkubiert (1 Stunde bei 37°C). Nach Entfernung des zweiten Antikörpers wurde die Membran für mindestens jeweils 10 Minuten mit TBST, TBST mit 0,5 M NaCl und TBST mit 0,5 % Triton X-100 gewaschen.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Chemolumineszenz mit dem ECL-System (Amersham, Braunschweig). Das bei der Peroxidase-katalysierten Oxidation von Luminol ausgesandte Licht wird mit einem Röntgenfilm nachgewiesen. Es wurde das Protokoll des Herstellers befolgt.

Nach dem Ablösen des ersten und des zweiten Antikörpers konnte die Membran erneut genutzt werden. Hierzu wurde die Membran 30 min bei 70°C unter gelegentlichem Schütteln in 62.5 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS inkubiert und anschließend 2x 10 min mit TBST gewaschen.

3.3.3 Herstellung polyklonaler Antikörper

Polyklonale Antikörper wurden gegen ein synthetisches 16-Aminosäure-Peptid korrespondierend zu den Resten 453-468 von *Crithidia* NIMA-verwandter Kinase-1 hergestellt. Zur Kopplung an KLH (keyhole limpet haemocyanin) wurde das Peptid N-terminal mit einem Cystein versehen. Kaninchen wurden nach Standardmethoden immunisiert (Bioscience, Göttingen) und die gewonnenen Antiseren bis zur Affinitätsreinigung nach Zugabe von Natriumazid auf 2 mM bei -70°C gelagert.

3.3.4 Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern

3.3.4.1 Herstellung der Affinitätsmatrix

Zur Affinitätsreinigung des Peptid-Antikörpers wurde das Peptid zunächst über Sulfo-MBS an BSA gekoppelt. Hierzu wurden 5 mg des synthetischen Peptids in PBS gelöst, 500 μ l Sulfo-MBS/BSA, sowie 300 μ l 0,5 M Natriumphosphat pH 7,5 zugegeben und die Lösung 3 h lang bei Raumtemperatur rotiert. Zur Entfernung nicht-gebundener Peptide wurde die Reaktion anschliessend gegen 0,1 M Natriumhydrogencarbonat pH 8,3, 0,5 M NaCl über Nacht bei 4°C dialysiert.

Anschliessend wurde 1 g BrCN-aktivierte Sepharose mit 250 ml 1 mM HCl aktiviert und auf einer Glasfritte mit 250 ml Natriumhydrogencarbonat-Dialysepuffer gewaschen. Die Gelmatrix wurde in ein 14 ml Röhrchen (Sarstedt) gegeben, pelletiert (Heraeus-Zentrifuge, 600 rpm) und mit dem dialysierten BSA/Sulfo-MBS/Peptid-Konjugat versetzt. Die Kopplung an die Sepharose erfolgte durch Rotation bei 4°C über Nacht. Die Gelmatrix wurde pelletiert, zur Absättigung freier Bindungsstellen mit 10 ml 1M Tris pH 8,0 versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur rotiert. Die Gelmatrix wurde danach 5x mit PBS gewaschen und in PBS mit 2 mM Natriumazid bei 4°C bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

Zur Kopplung von rekombinanter CNK-1 an CNBr-aktivierte Sepharose, wurden 5 mg des Proteins zunächst gegen den Natriumhydrogencarbonat-Puffer dialysiert. Die weitere Kopplung an die Gelmatrix erfolgte wie oben beschrieben.

3.3.4.2 Affinitätsreinigung der Antikörper

Die Gelmatrix wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und pelletiert. 20 ml Antiserum wurden zugegeben und über Nacht bei 4°C rotiert. Anschliessend wurde

die Gelmatrix pelletiert, 3x mit PBS gewaschen und in eine Plastiksäule (Pierce) überführt. Nun wurde zunächst mit 10 ml Elutionspuffer I (0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl pH 4,8), dann mit 10 ml PBS gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden schliesslich mit 10 ml Elutionspuffer II (0,2 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl pH 2,6) eluiert und durch Vorlage von 1 M Tris-HCl pH 8,8 sofort neutralisiert. Protein-haltige Fraktionen wurden durch Messung der OD₂₈₀ bestimmt, vereinigt, mit BSA auf 0,1 mg/ml eingestellt und über Nacht gegen PBS mit 2mM NaN₃ dialysiert. Die Antikörperlösung wurde dann in Aliquots bei -70°C gelagert. Die Gelmatrix konnte nach mehrmaligem Waschen mit PBS und Lagerung in PBS mit 2mM NaN₃ für weitere Antikörperreinigungen verwendet werden.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden bei 120°C autoklaviert. Aufgrund ihrer Hitzeempfindlichkeit wurden die Antibiotika zunächst sterilfiltriert (0,2 µm) und dem Medium nach dem Autoklavieren zugesetzt. Bacto-Trypton, Hefeextrakt und Agar wurden von Difco (USA) bezogen.

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l H₂O

SOB-Medium: 20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,59 g NaCl, 0,19 g KCl, ad 1 l H₂O

SOC-Medium: 20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,59 g NaCl, 0,19 g KCl, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, ad 1 l H₂O

2xTY-Medium: 16 g Bacto-Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l H₂O

Antibiotikazusätze: 50 µg/ml Ampicillin (Biomol, Hamburg)
50 µg/ml Kanamycin (Sigma, Deisenhofen)

Zur Herstellung der Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Bactoagar zugesetzt. Nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf etwa 50°C konnten die Antibiotika zugegeben werden. Für das Blau/Weiß-Screening wurde auf den Agarplatten vor dem Ausplattieren je 40 µl einer 0,1 M IPTG und einer 2 % (w/v) X-Gal-Stammlösung in Dimethylformamid ausgestrichen.

3.4.2 Anzuchtbedingungen

Flüssigkulturen wurden in einem Schüttelinkubator über Nacht bei 37°C angezogen. Zur Kultivierung auf festem Medium wurden Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert und anschliessend bei 4°C gelagert.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei Wellenlängen von 260 und 280 nm in Quartzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht dabei 20 µg/ml Oligonukleotid, 40 µg/ml RNA oder

50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ kann zur Überprüfung der Reinheit der vorliegenden Nukleinsäurelösung herangezogen werden, es beträgt bei reiner DNA etwa 1,8, bei reiner RNA-Lösung etwa 2,0.

3.4.4 Agarosegelelektrophorese

Zur präparativen und analytischen Elektrophorese von DNA wurden, je nach Grösse der aufzutrennenden Fragmente, Gele mit 1 – 2 % (w/v) Agarose in 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf ca. 50°C mit 2 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro 50 ml Gelvolumen versetzt. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer, die Gelkammer war ein Werkstatt eigenbau. Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit 6 x Probenpuffer versetzt. Zur Größenabschätzung der DNA-Fragmente wurden Grössenstandards parallel aufgetragen (KB-Ladder, oder *Hae*IV verdaute ΦX174 RF-DNA, MBI Fermentas). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt, nach dem Lauf wurden die Banden auf einem UV-Leuchttisch bei λ = 302 nm sichtbar gemacht.

6 x Probenpuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
 0,25 % (w/v) Xylencyanol
 30 % (v/v) Glycerin
 50 mM EDTA pH 8,0

3.4.5 Fällung von DNA

Zur Fällung von Nukleinsäuren wurde die Lösung mit 0,1 VT 3 M Natriumacetat pH 5,2 und entweder 2,5 VT eiskaltem Ethanol oder 1 VT Isopropanol versetzt, gemischt und für wenigstens 30 min bei –20°C inkubiert. Das entstehende Präzipitat wurde abzentrifugiert (SS34, 14000 rpm, 4°C, 30 min), mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das gewaschene DNA-Pellet wurde in der Vakuum-Konzentrationszentrifuge getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen. RNA-Pellets wurden dagegen im Heizblock bei 42°C und geöffnetem Deckel der Eppendorfgefäße für 5 min getrocknet und in einem geeigneten Volumen DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

3.4.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Qiaex II Extraktionskits (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben gereinigt. Prinzip

der Aufreinigung ist dabei die quantitative Adsorption von Nukleinsäuren an Silicagelpartikel unter Hochsalzbedingungen. Nach Waschschrritten wurde die DNA mit TE-Puffer eluiert und bei -20°C gelagert.

3.4.7 Enzymatische Behandlung von DNA

3.4.7.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde zu analytischen Zwecken im $10\ \mu\text{l}$ Volumen, zur Vorbereitung von DNA für Ligationen im $100\ \mu\text{l}$ Volumen durchgeführt. Für die Reaktionen kamen die Enzyme und Puffersysteme von NEB (,USA) zum Einsatz. Für einen analytischen Verdau wurden $0,5 - 1\ \mu\text{g}$ DNA, $1\ \mu\text{l}$ $10\times$ Reaktionspuffer und 2-5 U Enzym gemischt, mit Wasser auf $10\ \mu\text{l}$ aufgefüllt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Bei einem präparativen Verdau wurden etwa $10\ \mu\text{g}$ DNA und 5-10 U Enzym verwendet. Die Inkubationszeit wurde hier auf mindestens 3 h verlängert. Die meisten Restriktionsenzyme konnten nach Herstellerangaben durch 15 minütige Inkubation bei $65\ ^{\circ}\text{C}$ inaktiviert werden. Nach dem Verdau wurde die DNA über ein präparatives Agarosegel gereinigt.

3.4.7.2 Behandlung von DNA mit Alkalischer Phosphatase

Zur Vorbereitung der Ligation wurden durch Restriktionsverdau linearisierte Vektoren am 5'Ende mit Alkalischer Phosphatase (calf intestine phosphatase, CIP, Boehringer , Mannheim) dephosphoryliert, um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. So verringerte sich bei der Transformation die Anzahl der Klone, die Vektoren ohne Insert trugen.

Reaktionsansatz: $10\ \mu\text{g}$ DNA
 $10\ \mu\text{l}$ $10\times$ Reaktionspuffer
 2-3 U CIP
 ad $100\ \mu\text{l}$ H_2O

Es wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden $2\ \mu\text{l}$ $0,5\ \text{M}$ EDTA zugegeben und bei 68°C für 20 min inkubiert.

3.4.7.3 Ligationen

DNA-Stücke mit kohäsiven Enden wurden mittels T4-DNA Ligase kovalent verknüpft. Hierzu wurden etwa 100 ng entsprechend geschnittene Vektor-DNA und die 1-5 fache Menge Insert-DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von $10\ \mu\text{l}$ mit $1\ \mu\text{l}$ $10\times$ Reaktionspuffer und 2 U Ligase (Boehringer,

Mannheim) durchgeführt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. 5 µl des Ansatzes wurden zur Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien verwendet.

3.4.8 Präparation transformationskompetenter *E.coli*-Zellen und Transformation

E.coli Zellen wurden mit der CaCl₂-Methode (Sambrook et al., 1989) kompetent, d.h. aufnahmefähig für Plasmid-DNA gemacht. Dazu wurden 200 ml LB-Medium mit 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 herangezogen. Nun wurde 10 min auf Eis inkubiert, die Zellen abzentrifugiert (2000 rpm, Heraeus-Zentrifuge, 4°C, 5 min), das Pellet in 3 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert, in 3 ml 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nach Zugabe von Glycerol auf 10% (v/v) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70°C gelagert.

Zur Transformation wurde 5 µl Ligationsansatz zu 100 µl der kompetenten Zellen gegeben. Der Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 100 sec lang im Wasserbad bei 42°C erwärmt. Dann wurde wiederum 2 min lang auf Eis inkubiert, 1 ml SOC-Medium zugegeben und eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zwischen 50 und 200 µl der Bakterienkultur wurden auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen. So konnten nur diejenigen Zellen wachsen, die das Plasmid mit dem Resistenzgen gegen Ampicillin aufgenommen hatten.

3.4.9 TOPO-TA-Klonierung

Zur Klonierung von PCR-Produkten, die mit Taq-DNA-Polymerase amplifiziert worden waren, wurde das TOPO-TA-Klonierungs Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande) eingesetzt. Da die Taq-Polymerase durch ihre matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität PCR-Produkte mit Adenylatüberhängen synthetisiert, können diese direkt in den Vektor pCR2.1, der mit überhängenden 3' Thymidilatresten ausgestattet ist, ligiert werden. Es wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Mit dem Ligationsansatz wurden anschließend kompetente *E.coli* TOP10F'-Zellen transformiert und positive Klone über Blau/Weiss-Selektion ausgewählt.

3.4.10 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) können durch zwei flankierende Oligonukleotidprimer definierte DNA-Abschnitte exponentiell amplifiziert werden (Saiki et al., 1988). Als Enzyme wurden entweder Taq-Polymerase (Dynazyme, Biometra, Göttingen) oder Pfu-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Letztere besitzt eine Korrekturaktivität (proofreading) und wurde dann verwandt, wenn das PCR-Produkt in einen Expressionsvektor kloniert werden sollte. Bei der PCR werden in einem Heizblock Zyklen mit unterschiedlichen Temperaturen durchlaufen: Zunächst wird die Matrizen-DNA aufgeschmolzen, dann binden die Primer an ihre Zielsequenzen („annealing“), schliesslich werden die Primer durch die DNA-Polymerase in 5‘- 3‘ Richtung verlängert („primer extension“). Für eine 50 µl Reaktion wurde folgender Ansatz pipettiert:

50-200 ng DNA-Template
 5 µl Primer 1 (sense, 5 pmol/µl)
 5 µl Primer 2 (antisense, 5 pmol/µl)
 5 µl 10 x Reaktionspuffer
 0,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
 0,5 µl DNA-Polymerase (2 U)
 ad 50 µl H₂O

Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert und erst dann in den Thermocycler überführt, wenn dessen Heizblock 95°C erreicht hatte („cold start“). Das PCR-Programm sah folgendermassen aus: Nach einem einmaligen Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C schlossen sich 40 Zyklen bestehend aus 30 sek 95°C (Denaturierung), 1 min 45-60°C (annealing) und 1 min 72°C (extension) an, schliesslich folgte ein 10 minütiger 72°C-Schritt (Auffüllreaktion). Standardmässig wurde ein 10 µl Aliquot der Reaktion in der Agarosegelelektrophorese analysiert.

1x PCR-Reaktionspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl,
 0,1 % Triton-X 100

3.4.11 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde anstelle der analytischen Plasmid-Isolierung mit anschliessendem Restriktionsverdau zur Überprüfung von Klonierungen durchgeführt. Hierzu wurden die zu analysierenden Bakterienkolonien von der Agarplatte mit einem Zahnstocher in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und 3 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 100 µl der Bakteriensuspension wurden abzentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, 5 min, volle Drehzahl), mit 100 µl H₂O dest. gewaschen und in 100 µl H₂O aufgenommen. 1 µl aus dieser Koloniesuspension wurde für die nachfolgende PCR eingesetzt. Die weiteren Reaktionskomponenten wurden in einem 90 µl Mastermix angesetzt: 10 µl M13 (-20) Primer (5 pmol/µl), 10

μl M13 (rev) Primer (5 pmol/ μl), 10 μl 10 x Reaktionspuffer, 1 μl dNTP-Mix (je 10 mM), 58 μl H₂O, 1 μl Taq-DNA-Polymerase. 9 μl vom Master-Mix wurden zu 1 μl Koloniesuspension gegeben. Zur Amplifikation wurde folgendes PCR-Programm angewendet: 95°C, 5 min, dann 40 Zyklen mit 15 sek 95°C, 15 sek 52°C, 1 min 72°C und abschliessend einmalig 10 min 72°C. Nach der PCR wurden die Ansätze mit 2 μl Probenpuffer versetzt und auf dem einem Agarosegel analysiert.

3.4.12 Analytische Plasmidisolierung

Zur Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA wurde die Methode nach He et al. (1990) angewendet. Hierbei wird Plasmid-DNA durch Behandlung mit Triton-X 100 und LiCl enthaltendem Puffer solubilisiert, während chromosomale DNA und zelluläre Debris präzipitiert wird. Die so erhaltene DNA kann zur Subklonierung, zum Restriktionsverdau oder zur Sequenzierung eingesetzt werden.

Zum Heranziehen der Bakterien wurde jeweils eine Kolonie gepickt und in 2 ml LB-amp Medium gegeben. Nach mindestens 6 h Schütteln bei 37°C wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen abzentrifugiert (Eppendorfszentrifuge, 5 min, volle Drehzahl). Das Pellet wurde in 150 μl TELT-Puffer resuspendiert und 5 ml Lysozym (50 mg/ml) zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz 2 min lang gekocht und dann 5 min auf Eis belassen. Anschliessend wurde 10 min bei voller Drehzahl zentrifugiert und das viskose Pellet mit einem Zahnstocher entfernt. Die DNA wurde dann aus dem Überstand durch Zugabe von 100 μl Isopropanol gefällt, pelletiert und mit 200 μl kaltem 75% (v/v) Ethanol gewaschen. Anschliessend wurde das Pellet getrocknet, in 20 μl TE-Puffer mit 0,1 mg/ml RNase A resuspendiert, 10 min bei RT inkubiert und anschliessend 5 min auf 65°C erhitzt. Für einen anschliessenden analytischen Verdau wurden in der Regel 4 μl der mini-präp DNA eingesetzt.

TELT-Puffer: 250 μl 1 M Tris-HCl pH 7,5
 625 μl 0,5 M EDTA pH 8,0
 200 μl 10 % (v/v) Triton-X 100
 3,93 μl 3.2 M LiCl

3.4.13 Präparative Plasmidisolierung

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (etwa 100 μg) wurde das Plasmid Midi Purification Kit der Firma Qiagen (Hilden) eingesetzt. Das Prinzip besteht hierbei in einer Lyse der Bakterien im Alkalischen und der Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Säule unter Niedrigsalzbedingungen. Die DNA wird anschliessend mit einem Hochsalzpuffer eluiert und mit Isopropanol gefällt. Es wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Für die tip-100 Säulen wurden 50 ml einer Übernachtskultur eingesetzt.

3.4.14 RNA-Isolierung aus *Crithidia*

Gesamt-RNA aus *Crithidia* wurde mit dem TRIzol-Reagenz der Firma Gibco-BRL (Eggenstein) isoliert. Hierzu wurden 10 ml *Crithidia*-Zellkultur (2×10^7 Zellen/ml) abzentrifugiert (500 rpm, Heraeus-Zentrifuge, 5 min) und das Zellpellet mit 6 ml Trizol-Reagenz unter mehrfachem auf- und abpipettieren versetzt. Die Lösung wurde gleichmässig auf 6 Eppendorfgefässe verteilt, mit jeweils 200 μ l Chloroform versetzt und 30 Sekunden lang kräftig geschüttelt. Nach 3 minütiger Inkubation bei RT wurde zentrifugiert (SS 34, 9000 rpm, 4°C, 20 min), der RNA-enhaltende Überstand bis zur Interphase vorsichtig abgenommen und in neue Eppendorfgefässe überführt. Nun wurde die RNA durch Zugabe von einem VT Isopropanol über Nacht bei -20°C gefällt. Das abzentrifugierte Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen und vorsichtig bei 42°C im Heizblock getrocknet. Die Gesamt-RNA aus 10 ml Zellkultur wurde in insgesamt 100 μ l DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und bei -70°C gelagert.

3.4.15 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Bei der RT-PCR werden cDNA-Abschnitte amplifiziert, die zuvor durch das Umschreiben von RNA in cDNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase synthetisiert worden sind. Für die cDNA-Synthese kam die Superscript-Reverse Transkriptase (GIBCO-BRL, Eggenstein) zum Einsatz, diese leitet sich aus der MMLV (Moloney murine leukemia virus) Reverse Transkriptase durch Deletion der für die RNaseH-Aktivität codierenden Sequenz ab.

Bis zu 5 μ g Gesamt-RNA wurden mit 1 μ l Oligo-dT-Primer (10 μ M) versetzt und mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 μ l aufgefüllt. Die Lösung wurde 10 min lang auf 70°C erhitzt und anschliessend wenigstens 1 min auf Eis belassen. Dann wurden die folgenden Komponenten zugegeben: 2 μ l 10x PCR-Puffer, 2 μ l 25 mM MgCl₂, 1 μ l 10 mM dNTP-Mix, 2 μ l 0,1 M DTT. Nach 5 min bei 42°C wurden 1 μ l Superscript II RT zugegeben und die Reaktion für weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschliessend durch 15 minütiges Erhitzen auf 70°C abgestoppt. Zum Verdau des RNA-Templates wurde nun 1 μ l RNaseH zugesetzt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die so synthetisierte cDNA konnte bei -20°C gelagert werden.

Für die folgenden PCR-Ansätze wurden 2 μ l dieses Erstrangansatzes als Template in einer 50 μ l PCR verwendet.

3.4.16 RACE-PCR

Die RACE (rapid amplification of cDNA ends)-PCR ist eine Variante der RT-PCR bei der, ausgehend von einer bekannten internen Sequenz, die cDNA-Sequenz bis

zum 5' oder 3' Ende der korrespondierenden mRNA verlängert wird. Die Methode dient so zum Vervollständigen von cDNA-Klonen.

Bei der 5'RACE macht man sich im Falle von *Crithidia f.* und *Trypanosoma b.* den Umstand zunutze, daß alle mRNAs in Trypanosomatid-Spezies eine gemeinsame 39 Nukleotid-Sequenz am 5'Terminus besitzen. Diese „spliced leader“ Sequenz wird durch trans-Splicing vom 5' Ende einer kleinen SL-RNA auf die entsprechende Stelle der prä-mRNA übertragen. Nach dem Umschreiben von RNA in cDNA (3.4.15.) wurde in der folgenden PCR daher ein genspezifischer Antisense-Primer und ein Primer mit einer Sequenz, die identisch zur entsprechenden spliced-leader-Sequenz aus *Crithidia* oder *Trypanosoma* war, eingesetzt.

Crithidia spliced leader:

5'-CGCTATAAAGTATCAGTTTCTGTACTTTATTG-3'

Trypanosoma spliced leader:

5'-GCGGCCGCCGCTATTATTAGAACAGTTTCTGTACTATATTG-3'

Bei der 3'RACE wurde RNA in cDNA durch die Verwendung von reverser Transkriptase und eines speziellen oligo-dT Adapter-Primers umgeschrieben. In der nachfolgenden PCR wurde dann ein genspezifischer sense-Primer verwendet während als antisense-Primer ein Universeller Amplifizierungs-Primer zum Einsatz kam, der einen Bereich der poly-A-Region erkannte. Es wurde hier das 3'RACE-System von GIBCO-BRL (Eggenstein) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Adapter-Primer (AP):

5'-GCGCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Universal Amplification Primer (UAP):

5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'

3.4.17 Gekoppelte in-vitro Transkription/Translation

Das T7-Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Madison, USA) wurde für die in-vitro Synthese von Proteinen in einem Retikulozytenlysat ausgehend von einem DNA-Plasmid eingesetzt. Das zu translatierende PCR-Produkt wurde zunächst in den pCITE4a-Vektor (Novagen, Madison, USA) kloniert, dieser enthält einen T7-Promotor, sowie eine „CITE“ (Cap-independent Translation Enhancer)-Sequenz zur Erhöhung der Effizienz der in-vitro Translation von synthetischer RNA. Für eine Standard-Transkription/Translation wurde folgender Ansatz pipettiert: 40 µl TNT-Quick Master-Mix wurden mit einem 1 µg DNA-Plasmid und 2 µl ³⁵S-Methionin zur radioaktiven Detektion des Translationsproduktes versetzt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei 30°C für 90 min inkubiert, ein 5 µl Aliquot abgenommen mit 15 µl H₂O und 20 µl 2x SDS-

Probenpuffer versetzt, gekocht und in der SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie analysiert.

3.4.18 Expression von rekombinanten Proteinen in E.coli

Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden 0,5 ml LB-amp-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie BL21 (DE3) pLysS, die das gewünschte Expressionsplasmid enthielt, angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Nun wurden 4 ml frisches Medium hinzugegeben und die Zellen in einen 30°C-Inkubator überführt. Nach 30 min wurden die Reaktionsansätze aufgeteilt und in jeweils einem die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG auf eine finale Konzentration von 1 mM induziert. Nach 4 h wurden 200 µl Bakteriensuspension aus den Ansätzen entnommen und die Zellen herunterzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, volle Drehzahl, 5 min). Das Pellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert und in 3 Zyklen auf Trockeneis eingefroren und bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut und gemischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Zum Pellet wurden 50 µl 2x SDS-Probenpuffer gegeben, 20 µl des Überstandes wurden mit 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt. Nach 4 minütigem Erhitzen auf 94°C wurden vom Überstand 20 µl, vom Pellet 10 µl zur Analyse auf ein 10 % Polyacrylamidgel geladen.

Zur präparativen Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurde als Vorkultur 20 ml 2xYT+amp mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit 5 ml der Vorkultur wurden am nächsten Morgen 500 ml 2xYT+amp angeimpft, auf 2 Erlenmeyerkolben verteilt und bei 27°C geschüttelt. Nachdem eine OD₆₀₀ von etwa 0,8 erreicht worden war, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG auf 0,8 mM induziert. Nach weiteren 4 h Schütteln bei 27°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und das Fusionsprotein wie beschrieben (1.2.6.7) durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose gereinigt.

Bei Löslichkeitsproblemen wurde das Protokoll in der Weise abgeändert, daß die Expressionskulturen nach Erreichen von OD₆₀₀ = 0,7 im Eisbad abgekühlt und dann in ein 18°C Schüttelwasserbad überführt wurden. Nun wurde durch Zugabe von IPTG auf 0,8 mM induziert und das Protein bei 18°C für 16 Stunden exprimiert.

3.4.19 Sequenzierung von Doppelstrang-DNA

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) mit dem „Sequenase 2.0“-Kit (Pharmacia, Freiburg). Die Sequenzreaktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei pro Reakton 2-3 µg Plasmid-DNA und 12 µmol Primer (M13 -20 und M13 reverse-Primer) eingesetzt wurden. Die neusynthetisierte DNA wurde mit α-[³⁵S]-dATP markiert und auf einem Harnstoff Polyacrylamidgel mit 8% Acrylamid und 7,5 M Harnstoff (Sequenzierungsmix von GIBCO-BRL, 100 ml

Sequenzierungsmix wurden durch Zugabe von 350 μ l 10 % APS und 40 μ l TEMED polymerisiert) aufgetrennt. Nach einer Vorelektrophorese von 30 min bei 60 W, wurde das Gel beladen und die Elektrophorese bei 60 W für 2 h durchgeführt (Kurzlauf). Das Gel wurde nach dem Lauf in 10% Essigsäure 10% Methanol fixiert, auf Whatmann 3 MM Papier transferiert, im Vakuumgeltrockner bei 60°C getrocknet und über Nacht gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Alternativ wurden gereinigte Plasmide zur Auftragssequenzierung bei MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) eingeschickt.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Kultivierung von *Crithidia fasciculata*

Crithidia fasciculata wurde bei 27°C in Brain Heart Infusion Medium (BHI, Difco, USA) mit 4 μ g/ml Hämin kultiviert. Zur Herstellung einer 2 mg/ml Hämin-Stammlösung wurden 200 mg Hämin (Sigma, Deisenhofen) in 50 ml Ethanol und 50 ml 0,02 N NaOH gelöst und sterilfiltriert (0,2 μ m). Die Stammlösung wurde lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Zur Verhinderung von Kontaminationen durch Bakterien wurde dem Medium ausserdem Streptomycinsulfat in einer finalen Konzentration von 200 μ g/ml zugesetzt. 10 ml Stammkulturen wurden in Zellkulturfläschchen mit 0,2 μ m Filterkappe gehalten und zweimal pro Woche im Verhältnis 1:50 in frisches Medium umgesetzt. Für Proteinpräparationen wurden zunächst 100 ml Vorkulturen in 500 ml Erlenmeyerkolben angesetzt, mit diesen wurden dann die grossvolumigen Kulturen (je 3 l in 5 l-Erlenmeyerkolben) angeimpft.

3.5.2 Einfrieren und Auftauen von *Crithidia fasciculata*

Zum Einfrieren von *Crithidia*-Zellen wurden diese aus 10 ml Zellkultur in logarithmischer Wachstumsphase zunächst pelletiert (Heräus-Zentrifuge, 1000 rpm, 4°C, 5 min) und dann in 6 ml BHI-Medium mit Hämin, Streptomycinsulfat und 10% (v/v) DMSO resuspendiert. 1 ml Aliquots wurden in Kryo-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt und über Nacht auf Trockeneis belassen, bevor sie am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten.

Zum Auftauen wurde ein 1 ml Aliquot im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut, sofort in 10 ml frisches Medium überführt und bei 26°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen dann wie üblich 1:50 in frisches Medium umgesetzt.

3.5.3 Kultivierung von Hela-Zellen

Hela-Zellen (SS6) wurden bei 37°C in DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium, GIBCO-BRL) plus 10% FCS (fötales Kälberserum, Sigma) in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden 2 x pro Woche umgesetzt, hierzu wurden sie mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (GIBCO-BRL) von der Schale gelöst (2 min bei 37°C) und verdünnt (1:6 bis 1:10) wieder ausplattiert.

3.5.4 Immunfluoreszenz bei Crithidia und Hela-Zellen

Zur Untersuchung mittels Immunfluoreszenz wurde ein 1ml-Aliquot einer *Crithidia*-Kultur zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, 5min, volle Drehzahl), gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Ein 25 µl Aliquot dieser Zellsuspension wurde auf ein mit poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen gegeben und zur Anheftung der Zellen 10 min bei Raumtemperatur belassen. Das Deckgläschen wurde kurz in PBS gewaschen und die Anheftung der Zellen im Phasenkontrastmikroskop überprüft. Die Fixierung erfolgte dann in Methanol bei -20°C über Nacht.

Hela-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert. Diese wurden 2 x kurz mit PBS zur Entfernung von Resten des Zellkulturmediums gewaschen. Standardmässig erfolgte die Fixierung für 6 min in Methanol bei -10°C. Zur besseren Darstellung von Mikrotubuli wurden die Zellen zunächst mit einem stabilisierenden Puffer für 5 min extrahiert (100 mM PIPES pH 6,9, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 4 M Glycerin, 0,5% (v/v) Triton X-100) und dann in Methanol fixiert.

Die Inkubationen mit Antikörpern (20 µl Verdünnung in PBS mit 1% (w/v) BSA) wurden in einer feuchten Kammer (Petrischale mit H₂O getränktem Filterpapier) bei 37°C für 1 h durchgeführt. Nach jeder Inkubation wurden die Deckgläschen dreimal in PBS für 5 min bei RT gewaschen. Zur Darstellung von Zellkernen und Chromosomen wurden die Deckgläser dann in für 4 min in Höchst-Lösung (1 mM Höchst 33342 in PBS) inkubiert, kurz in PBS gewaschen, die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt und in Mowiol-Lösung auf einem Objektträger eingebettet. Die Präparate wurden mit einem Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskop analysiert und durch eine angeschlossene digitale CCD-Kamera (Visitron Systems, Puchheim) dokumentiert.

Mowiol-Lösung: 2,4 g Mowiol 4-88 (Hoechst, Frankfurt), 6 g Glycerin, 12 ml
0,2 M Tris-HCl pH 8,5, 6 ml H₂O

4 Ergebnisse

4.1 Kultivierung von *Crithidia fasciculata*

Als Ausgangsmaterial für die biochemische Reinigung der Glutamylierungsaktivität wurde *Crithidia fasciculata* in Brain Heart Infusion Medium mit 4 µg/ml Häm in kultiviert. Da *Crithidia* nicht humanpathogen sind (sie benutzen Insekten als Wirt) konnten sie unter Laborbedingungen der Sicherheitsstufe 1 gehalten werden. Abbildung 1 zeigt eine Phasenkontrastaufnahme von *Crithidia* in einer Neubauer-Zählkammer. Während der logarithmischen Wachstumsphase war die Morphologie der Zellen durch einen länglichen Zellkörper und ein einzelnes Flagellum gekennzeichnet. Die Parasiten hatten eine Länge von etwa 10-15 µm und einen Durchmesser von 2-3 µm. Es wurden Zelldichten von bis zu 5×10^7 Zellen pro ml erreicht, die Generationszeit betrug etwa 6 Stunden. Ungefähr 48 Stunden nach Inokulation erreichten die Zellen eine stationäre Phase, bei 4-5 Tage alten Kulturen zeigte sich eine deutliche Änderung der Zellmorphologie: die Zellen rundeten sich ab, verloren ihr Flagellum und zeigten dementsprechend keine Beweglichkeit mehr. Angesichts dieser deutlichen Veränderung des Aussehens wurde darauf geachtet, für biochemische Präparationen ausschliesslich logarithmisch wachsende Parasiten zu verwenden.



Abb.1: Phasenkontrastaufnahme von *Crithidia fasciculata* in einer Neubauer-Zählkammer. Die Seitenlängen der kleinen Quadrate betragen 25 µm. Der Pfeil deutet auf zwei Parasiten, die sich gerade in der Zellteilung befinden.

4.2 Isolierung und Charakterisierung der carboxyterminalen Fragmente von Tubulin aus *Crithidia*

Vor einer enzymologischen Untersuchung der Glutamylierungsaktivität in *Crithidia* sollten zunächst die posttranslationalen Modifikationen der carboxyterminalen Tubulin-Peptide charakterisiert und mit den aus *Trypanosoma brucei* und *Leishmania tarentolae* bekannten Ergebnissen verglichen werden. Abbildung 2A zeigt die Vorgehensweise im Fließschema: Wie für *Trypanosoma brucei* beschrieben (Schneider et al., 1997) wurden zunächst Cytoskelette durch Triton-Extraktion von *Crithidia*-Zellen erhalten, die Cytoskelett-Fraktion wurde dann im präparativen SDS-Gel aufgetrennt, die Tubulin-Banden ausgeschnitten und zur Freisetzung der carboxyterminalen Peptide entweder mit Endoproteinase LysC (α -Tubulin), oder mit Bromcyan (β -Tubulin) in-situ verdaut. Da sich die C-terminalen Peptide durch ihre Acidität auszeichnen, konnten sie über Anionenaustauschchromatographie an einer kleinen monoQ-Säule angereichert werden. Spät von der Säule eluierende Fraktionen wurden vereinigt und die Peptide über Umkehrphasen-HPLC weiter gereinigt. Peaks von der HPLC wurden dann durch Massenspektroskopie und automatische Protein-Sequenzierung charakterisiert. Entscheidendes Merkmal für das Vorhandensein von Polyglutamylierung ist dabei Auftreten von Masseninkrementen von 129 Da in der Massenspektroskopie, dies entspricht gerade dem Inkrement eines Glutamat-Restes. Die Position des modifizierten Glutaminsäurerestes ergibt sich aus einer „Lücke“ in der zugehörigen Peptidsequenzierung, an der kein PTH-Derivat identifizierbar ist, während die Sequenzierung in der nächsten Runde dann normal weiterläuft. Aus der Differenz der Masse des unmodifizierten Peptids und den tatsächlich gefundenen Massen berechnet sich schliesslich die Zahl der angefügten Glutaminsäurereste.

Abb. 2B zeigt eine Analyse der Cytoskelett-Präparationen der drei Trypanosomen-Spezies im 10% SDS-Polyacrylamidgel. Man erkennt, daß in allen drei Fällen $\alpha\beta$ Tubulin bei 55 kDa die dominierende Bande der Präparation ist und jeweils über 50% des Gesamtproteins der Cytoskelett-Präparationen ausmacht.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der posttranslationalen Modifikationen sind in Abb. 2C zusammengefasst: Erwartungsgemäss ist das *Crithidia*-Tubulin ausgiebig durch Polyglutamylierung modifiziert. Die erhaltene C-terminale Sequenz des α -Tubulins ist identisch mit der *Leishmania*-Sequenz und die Position des modifizierten Glutamat-Restes der Hauptkette stimmt mit dem modifizierten Glutamat-445 aus *Trypanosoma brucei* (Schneider et al., 1997) überein. Die Länge der Glutamat-Seitenkette bei *Crithidia* entspricht mit 1-15 Glutamat-Resten ebenfalls den Werten, die bei den anderen Trypanosomen-Spezies gefunden wurden. In allen drei Spezies wurden Varianten der carboxyterminalen Peptide mit und ohne das C-terminale Tyrosin gefunden, dies zeigt das Vorhandensein eines Tyrosinierungs-/Detyrosinierungszyklus an.

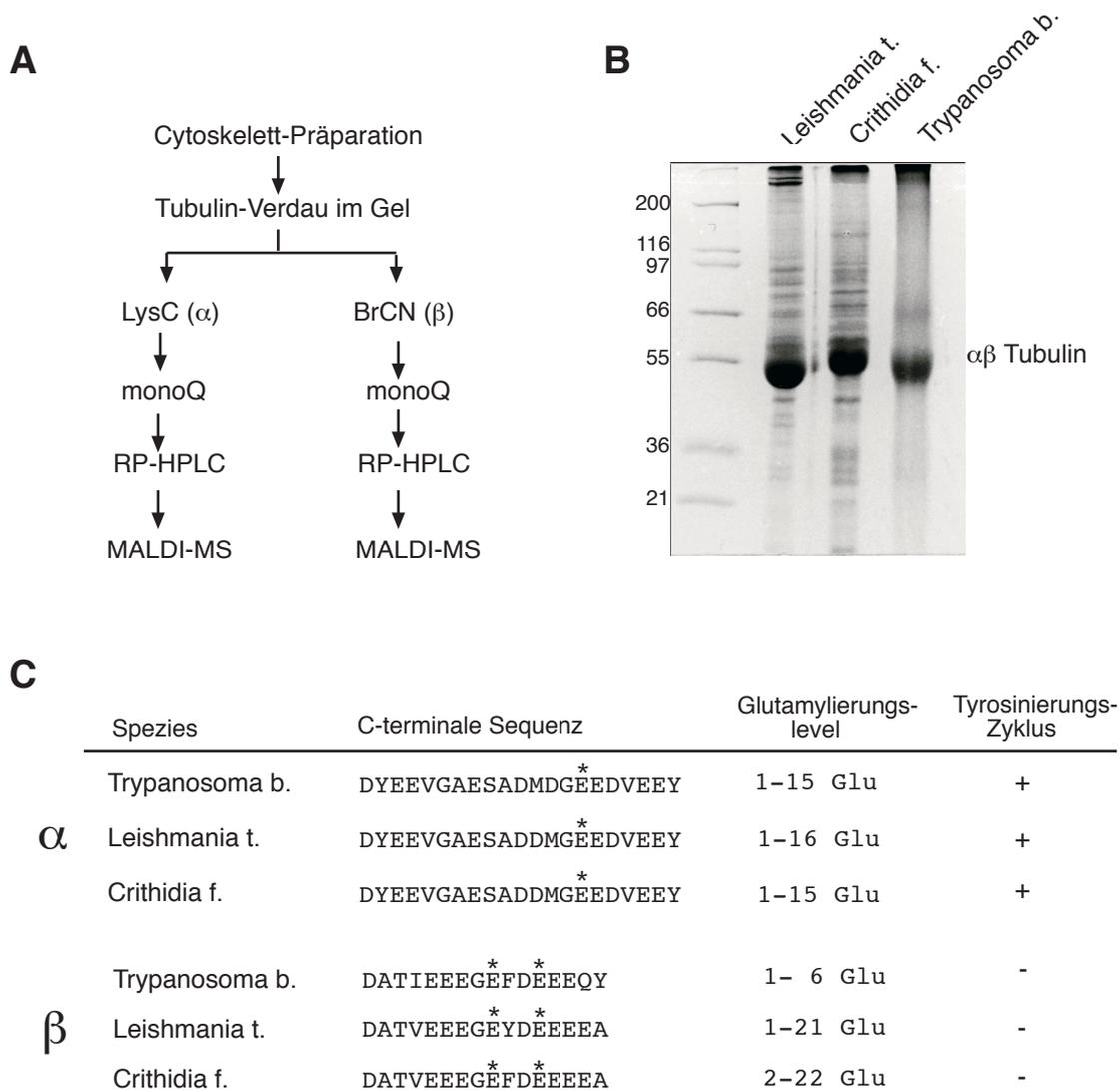


Abb2: **A)** Fließschema zur Reinigung und Charakterisierung carboxyterminaler Peptide aus *Crithidia*. **B)** 10% SDS-PAGE von Cytoskelett-Präparationen aus allen drei Trypanosomen-Spezies. **C)** Zusammenfassung der posttranslationalen Modifikationen der carboxyterminalen Tubulin-Peptide aus drei Trypanosomen-Spezies. Die Position des modifizierten Glutamat-Restes ist durch einen Stern oberhalb der Sequenz gekennzeichnet, das Vorhandensein eines Tyrosinierungs-/Detyrosinierungszyklus ist mit +/- angezeigt.

Die C-terminale β -Tubulin Sequenz von *Crithidia* und *Leishmania* ist bis auf einen konservativen Tyrosin-Phenylalanin Austausch identisch. Die Glutamat-Seitenketten sind hier an zwei Positionen über Isopeptidbindungen mit Glutamatresten der Hauptkette verbunden. Die beiden Positionen entsprechen Glu-435 und Glu-438 der *T.brucei* Sequenz (Kimmel et al., 1985). Die maximale Zahl der gefundenen Seitenkettenreste ist sowohl bei *Crithidia* als auch bei *Leishmania* mit mehr als 20 bedeutend grösser als der Wert von 6 zusätzlichen Glutamat-Resten bei *T.brucei*. Das carboxyterminale β -Tubulin-Peptid von *T.brucei* wird zwar mit und ohne terminales Tyrosin gefunden (Schneider et al., 1997), es gibt jedoch keinen Hinweis auf eine

Tyrosinierungsreaktion beim β -Tubulin. Es ist wichtig darauf hinzuweisen, daß bei *Crithidia*, wie auch bei den anderen untersuchten Trypanosomen-Spezies keine Masseninkremente von 57 Dalton beobachtet wurden, die auf eine Modifikation durch Polyglycinylierung hinweisen würden. Das heisst, bei allen drei untersuchten Trypanosomen-Spezies, wie auch bei *Tritrichomonas mobilensis* (Schneider et al., 1998), fehlt trotz des Vorhandenseins von funktionellen Axonemen die Modifikation des Tubulins durch Polyglycinylierung

Zusammenfassend kann man sagen, daß die carboxyterminalen Peptide der stabilen Mikrotubuli aus *Crithidia* wie erwartet ausgiebig durch Polyglutamylierung modifiziert sind. Die Positionen der modifizierten Reste sind identisch mit denjenigen in *Leishmania t.* oder *Trypanosoma b.* und die Seitenketten von *Crithidia* und *Leishmania* zeigen die höchste Zahl an Glutamat-Resten, die bisher beobachtet wurden.

4.3 Immunfluoreszenz an Crithidia- und Hela-Zellen mit dem glutamylierungs-spezifischen Antikörper GT335

Der monoklonale Antikörper GT335 wurde gegen ein synthetisches Octapeptid dargestellt, das die Struktur des C-Terminus von α 1/2-Tubulin, modifiziert durch zwei Glutamat-Reste, nachahmt (Wolff et al., 1992). Der Antikörper erkennt spezifisch glutamyliertes Tubulin in einer grossen Bandbreite verschiedener Spezies (Bre et al., 1994). Zur Immunfluoreszenz wurden *Crithidia*-Zellen auf poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen immobilisiert, mit Methanol fixiert, permeabilisiert und anschliessend mit GT335 angefärbt. Der erste Antikörper wurde durch einen Rhodamin-konjugierten sekundären Antikörper sichtbar gemacht, ausserdem wurde die DNA durch Färbung mit Hoechst dargestellt. Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse der Immunfluoreszenz: *Crithidia*-Zellen werden intensiv durch GT335 gefärbt. Die deutlichste Färbung ergibt sich im Bereich des Zellcortex, wo die subpelliculären, käfigartig angeordneten Mikrotubuli des Zellkörpers zu finden sind. Ausserdem ist das Flagellum eindeutig gefärbt. Während bei der massenspektroskopischen Untersuchung alle stabilen Mikrotubuli gemeinsam betrachtet wurden, zeigt die Immunfluoreszenz, daß, wie auch bei *Trypanosoma brucei* (Schneider et al., 1997), sowohl die subpelliculären, als auch die axonemalen Mikrotubuli des Flagellums, ausgiebig glutamyliert sind.

Die Hoechst-Färbung zeigt die besondere Organisation der DNA in *Crithidia*, einem Vertreter der Kinetoplastiden: Pro Zelle werden zwei Punkte angefärbt. Bei dem helleren Punkt, der sich in der Nähe der Anheftungsstelle des Flagellums an den Zellkörper befindet, handelt es sich um die Kinetoplastiden-DNA. Hier ist die mitochondriale DNA der Trypanosomen in Form einer scheibenartigen Struktur aus topologisch miteinander verbundenen Mini- und Maxi-Ringen organisiert (Shapiro und Englund, 1995). Der schwächer gefärbte Punkt dagegen, ist die DNA des Zellkerns.

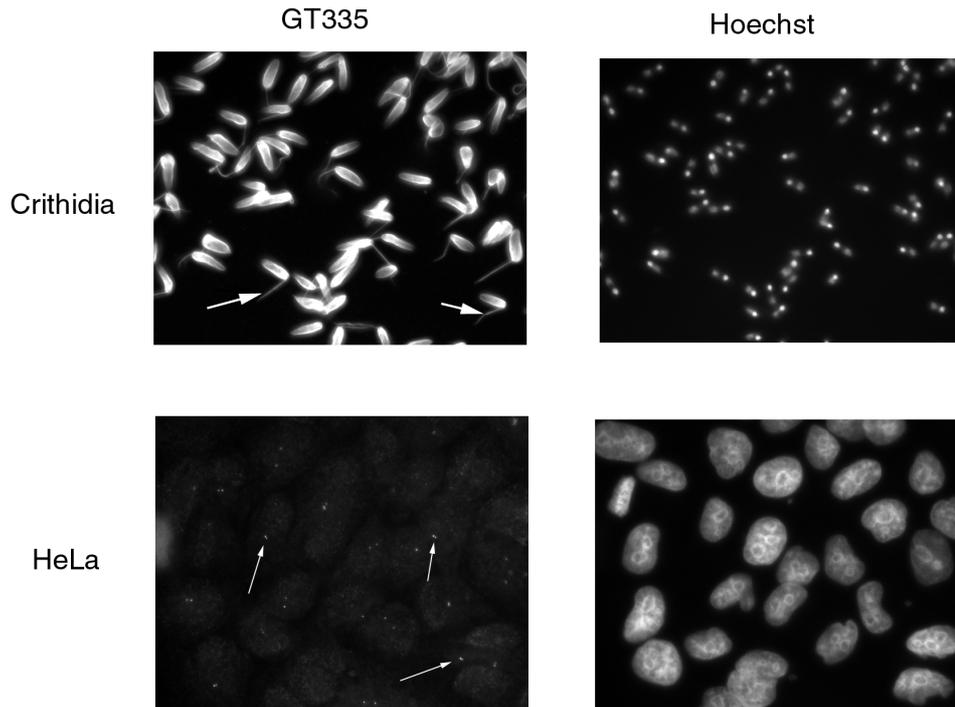


Abb.3: Indirekte Immunfluoreszenz an *Crithidia*- und HeLa-Zellen mit dem glutamylierungs-spezifischen Antikörper GT335. Die Zellen wurden jeweils mit Methanol fixiert und GT335 in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Während in *Crithidia* der gesamte Zellkörper und das Flagellum (siehe Pfeile) gefärbt werden, ist bei HeLa lediglich eine punktförmige Färbung der Centriolen zu erkennen (siehe Pfeile). Zur Darstellung von DNA wurden die Zellen ausserdem mit Hoechst 33342 gefärbt, bemerkenswert ist dabei die Detektion von Kinetoplastiden- und Kern-DNA in den *Crithidia*-Zellen.

Das hohe Ausmass an Tubulin-Glutamylierung in *Crithidia* wird insbesondere im Vergleich mit einer entsprechenden GT335-Färbung von humanen HeLa SS6-Zellen deutlich (Abbildung 3, untere Reihe). Wie bereits beschrieben (Bobinnec et al., 1998) färbt der GT335-Antikörper hier zwei eng benachbarte, in Kernnähe befindliche Punkte, bei denen es sich um die Centriolen handelt. In Abbildung 3 nicht erfasst, wird ausserdem eine Färbung der Spindel-Mikrotubuli während der Mitose beobachtet, während der grösste Teil des cytoplasmatischen Mikrotubuli-Netzwerks nicht, oder nur minimal durch Glutamylierung modifiziert ist (Bobinnec et. al, 1998). Die Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung weist also *Crithidia*-Zellen im Vergleich zu HeLa als reichhaltige Quelle von glutamiliertem Tubulin aus und lässt vermuten, daß die für die Modifikation verantwortlichen Enzyme hier in höherer Konzentration vorliegen sollten.

4.4 Glutamylierungsaktivität von isolierten Cytoskeletten und Solubilisierung der Tubulin Polyglutamylase

Frühere in-vivo Markierungsexperimente an *Trypanosoma brucei* haben die Tubulin-spezifische Inkorporation von Glutaminsäure in Gegenwart von Inhibitoren der Proteinbiosynthese demonstriert (Schneider et al., 1997). Zur Charakterisierung des verantwortlichen Enzymsystems wurden Cytoskelette von *Leishmania tarentolae* und *Crithidia fasciculata* wie beschrieben durch Triton-Extraktion präpariert, in einem Puffer mit 1 mM ATP, Mg^{2+} und 3H -Glutamat resuspendiert und bei 27°C für 90 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und anschließendem Kochen gestoppt, der Ansatz in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose gebロットet und nach Färbung mit Ponceau S die prominente Tubulin-Bande ausgeschnitten. Nach Zugabe von Filter-Count wurden die Tubulin-Banden dann im Flüssigszintillationszähler auf die Inkorporation von radioaktiv markierter Glutaminsäure hin untersucht. Abbildung 4 a zeigt das Ergebnis dieses Experiments für isolierte *Leishmania*-Cytoskelette: In Gegenwart von 1 mM ATP im Reaktionspuffer ist eine deutliche Inkorporation von markierter Glutaminsäure in Tubulin festzustellen, während in einem Parallelansatz ohne ATP nur ein marginaler Einbau beobachtet wird. Analoge Experimente mit *Crithidia fasciculata* und *Trypanosoma brucei* zeigten ein identisches Ergebnis. Durch Extraktion mit Detergentien isolierte Cytoskelette aus Trypanosomatiden enthalten also eine enzymatische Aktivität, die ATP-abhängig Glutaminsäure in Tubulin einbaut.

Um Ausgangsmaterial für weitere Experimente zu gewinnen, war es wichtig, diese enzymatische Aktivität vom unlöslichen Cytoskelett-Bestandteilen zu trennen und zu solubilisieren. Eine gängige Methode zur Solubilisation besteht in der Erhöhung der Ionenstärke. Es wurde daher versucht, in parallelen Ansätzen gleiche Mengen von *Leishmania*-Cytoskeletten in Extraktionspuffer mit steigender NaCl-Konzentration zu waschen. Die so behandelten Cytoskelette wurden im Standard-Reaktionspuffer resuspendiert und die verbliebene Tubulin-Glutamylierungsaktivität wie oben beschrieben, gemessen. Abbildung 4 B zeigt, daß nach Waschen des Cytoskeletts in Extraktionspuffer mit 250 mM NaCl nur noch etwa 20% der ursprünglichen Glutamylierungsaktivität im Pellet verbleiben. Durch Waschen mit noch höherer Ionenstärke, konnte auch die restliche Glutamylierungsaktivität der Cytoskelette völlig entfernt werden.

Als nächstes wurde in einem Rekonstitutionsexperiment versucht, die Glutamylierungsaktivität der isolierten Cytoskelette wiederherzustellen. Hierzu wurden 20 µg der salzgewaschenen *Leishmania*-Cytoskelette mit 10 µg des 0,25 M NaCl-Überstandes im 50 µl Standardreaktionspuffer für 90 min bei 27°C inkubiert. Der Reaktionsansatz, sowie ein Parallelansatz ohne Zusatz des NaCl-Überstandes, wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels 3H -Fluorographie auf die Inkorporation von radioaktiv markiertem Glutamat hin untersucht. Abbildung 4 C zeigt das Ergebnis dieses Experiments: Nur im Ansatz, der mit dem 0,25 M NaCl-

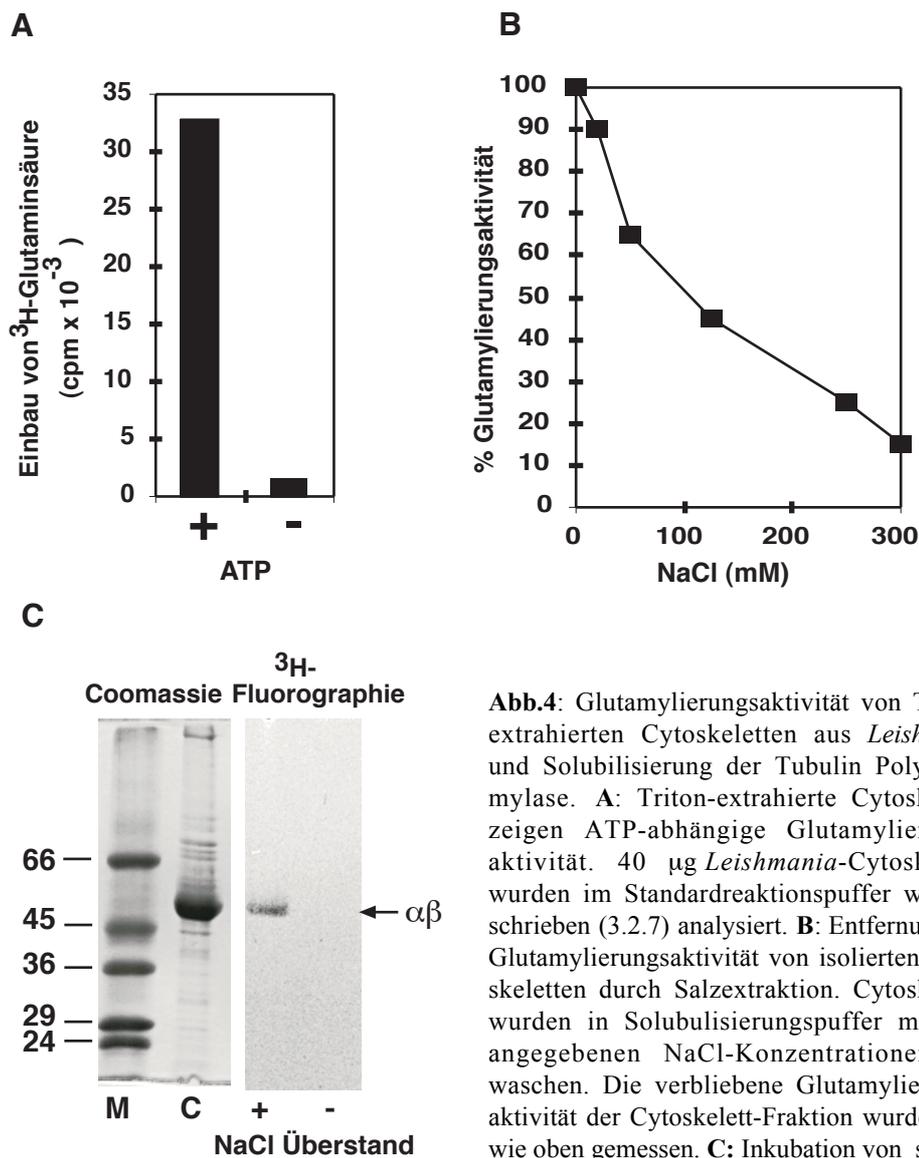


Abb.4: Glutamylierungsaktivität von Triton-extrahierten Cytoskeletten aus *Leishmania* und Solubilisierung der Tubulin Polyglutamylyase. **A:** Triton-extrahierte Cytoskelette zeigen ATP-abhängige Glutamylierungsaktivität. 40 μ g *Leishmania*-Cytoskelette wurden im Standardreaktionspuffer wie beschrieben (3.2.7) analysiert. **B:** Entfernung der Glutamylierungsaktivität von isolierten Cytoskeletten durch Salzextraktion. Cytoskelette wurden in Solubilisierungspuffer mit den angegebenen NaCl-Konzentrationen gewaschen. Die verbliebene Glutamylierungsaktivität der Cytoskelett-Fraktion wurde dann wie oben gemessen. **C:** Inkubation von salz-

gewaschenen Cytoskeletten mit dem verdünnten 0,25 M NaCl-Überstand (+ NaCl-Überstand) stellt die Glutamylierungsaktivität wieder her. 20 μ g salz-gewaschener Cytoskelette (Spur C) wurden mit 10 μ g 0,25 M NaCl-Überstand inkubiert; die Proben wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch ³H-Fluorographie analysiert. Bemerkenswert ist, dass die radioaktive Markierung ausschliesslich in Tubulin inkorporiert wurde. Molekulargewichte von Standardproteinen sind in Spur M gezeigt.

Überstand inkubiert wurde, ist eine Inkorporation von radioaktiv markiertem Glutamat festzustellen. Selbst nach längerer Exposition wurde ausschliesslich ein Einbau in Tubulin festgestellt, dies machte die hohe Spezifität der Reaktion deutlich. Das Experiment zeigte, daß der 0,25 M NaCl-Überstand tatsächlich die solubilisierete, funktionale Glutamylierungsaktivität enthielt und als Ausgangsmaterial für die weiteren Experimente, sowie zur weiteren Reinigung der Aktivität verwendet werden konnte. Das salzgewaschene Cytoskelett dagegen konnte als Substrat für in-vitro

Glutamylierungstests verwendet werden. Die Ergebnisse zur Solubilisierung der Enzymaktivität waren für *Leishmania t.* und *Crithidia f.* identisch. So konnte NaCl-Überstand, der von *Leishmania*-Cytoskeletten gewonnen wurde, auch zur Glutamylierung von gewaschenen *Crithidia*-Cytoskeletten eingesetzt werden und umgekehrt.

4.5 Einbau von radioaktiv markierter Glutaminsäure in die carboxyterminalen Peptide von $\alpha\beta$ Tubulin

Zur Überprüfung, ob der beobachtete ATP-abhängige Einbau von Glutamat in Tubulin tatsächlich auf die posttranslationale Modifikation der carboxyterminalen Peptide zurückzuführen war, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Etwa 200 μg salzgewaschener *Leishmania*-Cytoskelette wurden mit 0,25 M *Leishmania*-NaCl Überstand in-vitro glutamyliert. Um eine ausreichende Markierung mit radioaktiver Glutaminsäure zu erreichen, wurde der Ansatz für 4 h bei 27°C inkubiert. Anschliessend wurde die Reaktion auf einem präparativen SDS-Gel aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und die prominenten Tubulin-Banden ausgeschnitten. Die carboxyterminalen Tubulin-Peptide wurden nun wie beschrieben (3.2.6.4) durch Verdau mit LysC bzw. Bromcyan freigesetzt und über eine Anionenaustauschchromatographie an monoQ angereichert. Zur Detektion der inkorporierten Radioaktivität wurden in den Fraktionen der monoQ-Säule Poros R2-HPLC-beads in 0,1 % TFA vorgelegt, an die die eluierten Peptide binden sollten. Die beads wurden anschliessend abzentrifugiert, direkt in Szintillatorflüssigkeit aufgenommen und in der Flüssigszintillationszählung analysiert. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs: Sowohl beim LysC-Verdau (5A) als auch beim Bromcyan-Verdau (5B) eluiert die inkorporierte Radioaktivität im letzten Drittel des Gradienten exakt in demjenigen Bereich, wo auch die carboxyterminalen Peptide von α - und β -Tubulin eluieren (Schneider et al., 1997). In beiden Fällen lag die Ausbeute bei etwa 20% der eingesetzten Radioaktivität. Der Versuch legte somit nahe, daß im in-vitro-Glutamylierungs-Test sowohl α - als auch β -Tubulin modifiziert werden, und daß die Inkorporation der Glutaminsäure im carboxyterminalen Bereich von $\alpha\beta$ -Tubulin stattfindet.

4.6 Etablierung eines Filtertests für die in-vitro Glutamylierung

Der bisher verwandte Glutamylierungstest, der eine Auftrennung des Reaktionsansatzes über SDS-PAGE und anschliessenden Western-Blot verlangte, war aufwendig und eignete sich nicht für die gleichzeitige Prozessierung von vielen Reaktionsansätzen. Es wurde daher ein Filtertest in Anlehnung an den Enzymtest der Tubulin-Tyrosin-Ligase etabliert (Murofushi und Flavin, 1984). Hierzu wurde der gesamte 50 μl Reaktionsansatz auf ein Whatman 3MM Filterpapier gegeben und das

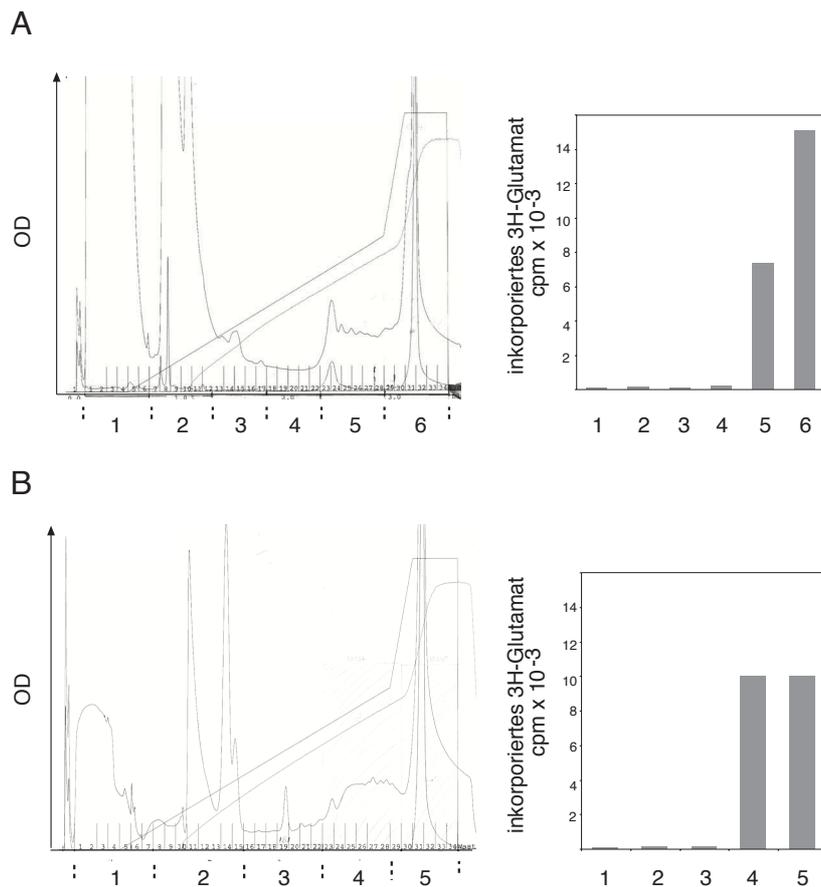


Abb. 5: *Leishmania*-Tubulin wurde in vitro mit 0,25 M NaCl-Überstand radioaktiv glutamylert, mit Endoproteinase LysC (Reihe A) bzw. mit Bromcyan (Reihe B) verdaut und die carboxyterminalen Peptide über eine monoQ-Säule angereichert. Die eluierten Peptide wurden an HPLC-beads angelagert und die Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszählung detektiert. In beiden Fällen eluiert die Radioaktivität im letzten Drittel des Gradienten, dies ist typisch für die C-terminalen Tubulin-Peptide.

Filter zur Fällung der Proteine in 10% eiskalte Trichloressigsäure gegeben. Die Filter wurden dann wie beschrieben (3.2.7) zur Abtrennung nicht-gebundener Radioaktivität gewaschen und die TCA-fällbare Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler gemessen. Zwar war die Zähleffizienz für Tritium auf Whatman 3MM mit 4,5% recht niedrig, andere Filterarten wie Nitrocellulose- oder Glasfaser-Filter waren jedoch mit den Waschbedingungen in TCA und Ether nicht kompatibel. Da in der Autoradiographie zuvor gezeigt worden war, daß die Radioaktivität ausschliesslich in Tubulin inkorporiert wurde, war gewährleistet, daß durch den Filtertest auch tatsächlich ausschliesslich Tubulin-Glutamylierung verfolgt wurde. Mit diesem Filtertest war es möglich, die Glutamylierungsaktivität einzelner Proben innerhalb von ca. 2 Stunden zu analysieren.

4.7 Allgemeine Enzymeigenschaften der Tubulin Polyglutamylase

Mit dem oben beschriebenen Filtertest wurden einige grundlegende enzymatische Eigenschaften der 0,25 M NaCl-Fraktion untersucht. Unter den Standardreaktionsbedingungen mit 2,3 μM Glutamat war die Inkorporation über die ersten 4 Stunden linear und (bei gleicher Endkonzentration an NaCl im Assay) proportional zur Menge an eingesetzter 0,25 M NaCl-Fraktion. Es zeigte sich ausserdem, daß auch in Abwesenheit von salzgewaschenen *Leishmania*-Cytoskeletten als Substrat eine Inkorporation von radioaktiv markierter Glutaminsäure festzustellen war. Diese „Autoglutamylierungs“-Aktivität war auf das Vorhandensein einer Restmenge an Tubulin in der Enzymfraktion zurückzuführen, das bei der Extraktion mit 0,25 M NaCl solubilisiert wurde. ATP war für die Glutamylierungsreaktion absolut notwendig und konnte nicht durch ADP, GTP oder ATP γ S, ein nur langsam hydrolysierbares ATP-Derivat, ersetzt werden (Abb.6 E). Die optimale Konzentration für ATP betrug 1-4 mM bei konstanten 2 mM Mg $^{2+}$ im Assay, in Konzentrationen über 5 mM zeigte ATP einen deutlichen inhibitorischen Effekt (Abb. 6 C). Bei konstanten 1 mM ATP im Assay lag die optimale MgCl $_2$ -Konzentration bei 2-4 mM, auch hier bewirkten höhere MgCl $_2$ -Konzentrationen eine drastische Hemmung der Glutamylierungsaktivität (Abb. 6D).

Die Inkorporationsrate war bei pH 9 deutlich höher als bei pH 7. So wurde im Glutamylierungstest nach 4 Stunden bei pH 9 beinahe doppelt so viel Glutaminsäure inkorporiert als bei pH 7 (Abb.6 F). Bei pH-Werten über 9 fiel die Einbaurate dann jedoch deutlich ab. Zur Temperaturabhängigkeit der Reaktion ist anzumerken, daß die Einbaurate bei 37°C drastisch reduziert war und nur noch etwa 10% des Wertes betrug, der bei 27°C, der Standardtemperatur des Glutamylierungstests, erreicht wurde.

Bereits bei den ersten Experimenten mit der Rohenzym-Fraktion zeichnete sich eine deutliche Hemmung der Enzymaktivität durch Salze ab. So musste stets darauf geachtet werden, die 0,25 M NaCl-Fraktion in einer finalen Konzentration von nicht mehr als 25 mM NaCl im Assay einzusetzen, um noch eine optimale Einbaurate zu erhalten. Abbildung 6A zeigt die Hemmung der Glutamylierungsaktivität durch NaCl: Eine NaCl-Konzentration von 100 mM im Assay inhibiert die Aktivität um mehr als 90%. Dies macht klar, daß Proben hoher Ionenstärke vor dem Assay durch Dialyse oder Gelfiltration entsalzt werden sollten. Das Phänomen der Salzhemmung ist ausserdem von Bedeutung bei der Beurteilung der Enzymaktivität von Fraktionen aus der Chromatographie, die durch Elution mit Salzgradienten erhalten wurden. Im allgemeinen musste darauf geachtet werden, die finale NaCl-Konzentration im Glutamylierungstest im Bereich von 15 – 20 mM NaCl zu halten, um die Inhibierung zu umgehen. Auch andere Salze zeigten einen ausgeprägt inhibitorischen Einfluss, so hemmte KCl in einer Konzentration von 100 mM im Assay die Glutamylierungsaktivität um etwa 70% (Abb. 6 B).

Die 0,25 M-NaCl Rohenzymfraktion erwies sich weiterhin als recht instabil. So wurde nach 16 h Aufbewahrung der Probe im Eisbad nur noch etwa 20% der Aktivität

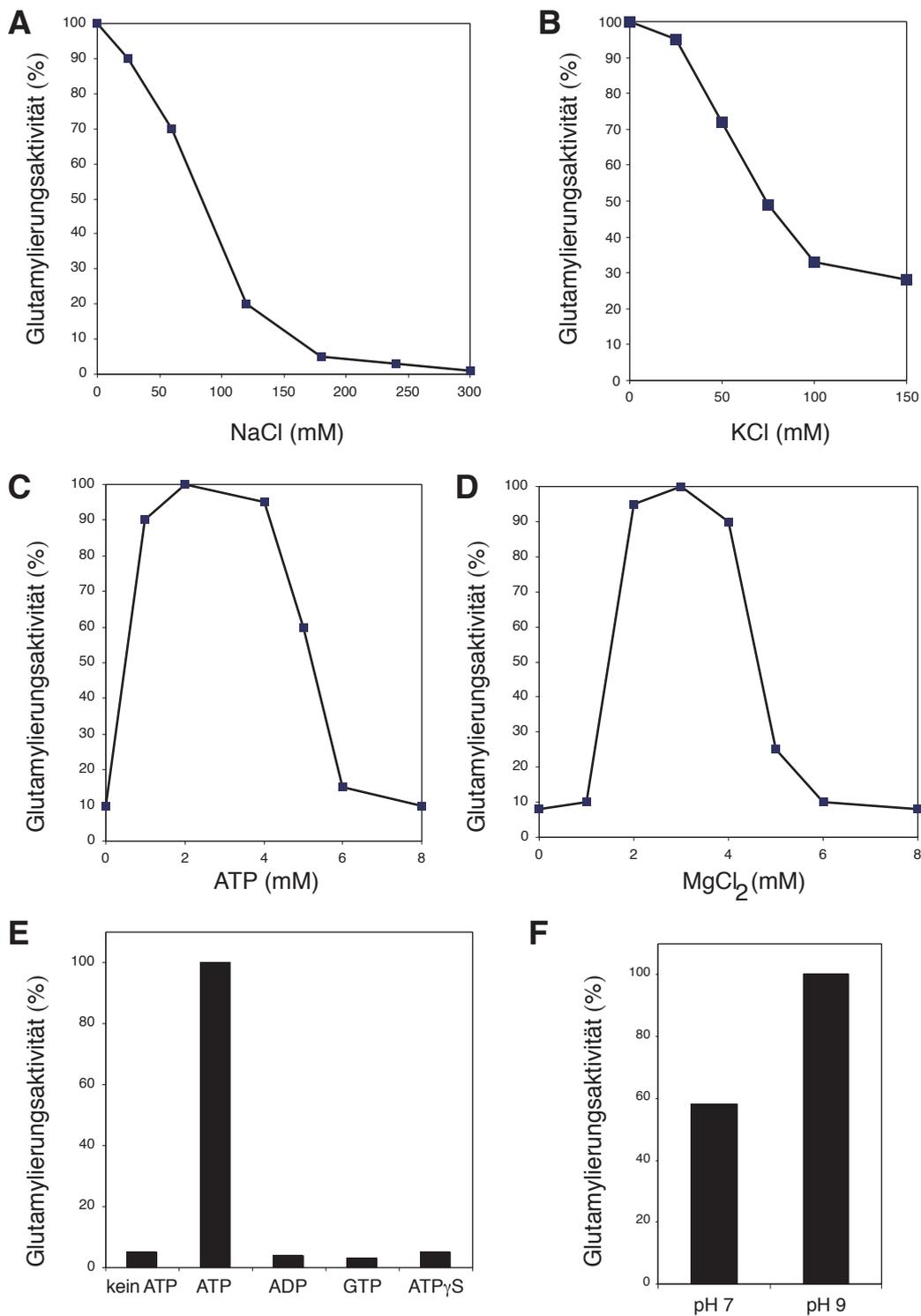


Abb.6: Allgemeine Enzymeigenschaften der Tubulin Polyglutamylase. **A/B:** Hemmung der Glutamylierungsaktivität durch NaCl und KCl. **C/D** Optimale Konzentrationen für ATP und Mg²⁺, starke Hemmung bei höheren Konzentrationen. **E:** Absolute Notwendigkeit für ATP, kein Ersatz durch GTP oder nicht-hydrolysierbares ATP möglich. **F:** Gesteigerte Enzymaktivität bei pH 9 im Vergleich zum neutralen pH-Wert.

des „frischen“ Enzyms gemessen. Die Rohfraktion wurde deshalb schnell auf flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen reduzierte die Aktivität deutlich, das Problem war in späteren Fraktionen, mit geringeren Proteinkonzentrationen, allerdings noch ausgeprägter. Zusatz von Glycerol zum Standardassay erhöhte die Aktivität und verbesserte auch die Lagerungseigenschaften des Enzyms.

4.8 Analyse der Glutamylierungsprodukte durch 2D-Gelelektrophorese

Salzgewaschene *Leishmania*-Cytoskelette wurden mit 0,25 M NaCl im präparativen Ansatz radioaktiv glutamyliert und jeweils 50 μg der markierten Cytoskelette für eine hochauflösende isoelektrische Fokussierung eingesetzt. Als zweite Dimension schloss sich eine 8% SDS-PAGE an, danach wurden die Gele entweder geblottet und mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen Tubulin gefärbt, oder in der ^3H -Fluorographie auf den Einbau von markiertem Glutamat hin untersucht. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis des Experiments: α - und β -Tubulin aus *Leishmania* werden durch die allgemeinen Tubulin-Antikörper DM1A, bzw. Tub 2.1 angefärbt. Man erkennt, daß β -Tubulin deutlich saurer ist, beide Tubuline werden in der zweiten Dimension nicht gut voneinander getrennt und laufen praktisch auf gleicher Höhe. Man erkennt auch, daß weniger α -Tubulin angefärbt wird, dieses schien im IEF-Lysepuffer immer schlechter solubulisiert zu werden als β -Tubulin. Der glutamylierungsspezifische Antikörper GT335 erkennt beide Tubuline auf der ganzen Länge ihrer isoelektrischen Varianten. In der Fluorographie ist der Einbau von markiertem Glutamat sowohl in α - als auch in β -Tubulin festzustellen. Bei längerer Expositionszeit erkennt man, daß im wesentlichen sämtliche isoelektrischen Varianten auch radioaktiv markiert werden. Der insgesamt scheinbar geringere Einbau ins α -Tubulin, war eher darauf zurückzuführen, dass wie oben beschrieben, immer weniger α -Tubulin für die IEF solubulisiert werden konnte. Eine vergleichende isoelektrische Fokussierung von *Leishmania*- und Hirntubulin zeigte, daß das trypanosomale Tubulin deutlich saurer ist. Das α -Tubulin der Trypanosomen läuft dabei etwa auf Höhe des β -Tubulins aus dem Hirn. Diese insgesamt höhere Acidität dürfte auf die grössere Zahl an Seitenketten-Glutamatresten zurückzuführen sein.

4.9 Glutamylierung von Tubulin aus Säugerhirn durch eine Enzymfraktion aus Trypanosomen

Eine wichtige Frage ist, ob Tubulin Polyglutamylase aus Trypanosomen in der Lage ist, heterologes Tubulin aus Säugerhirn als Substrat zu verwenden. Mikrotubuli-Protein aus Schweinehirn wurde wie beschrieben (3.2.6.1) durch Zyklen von

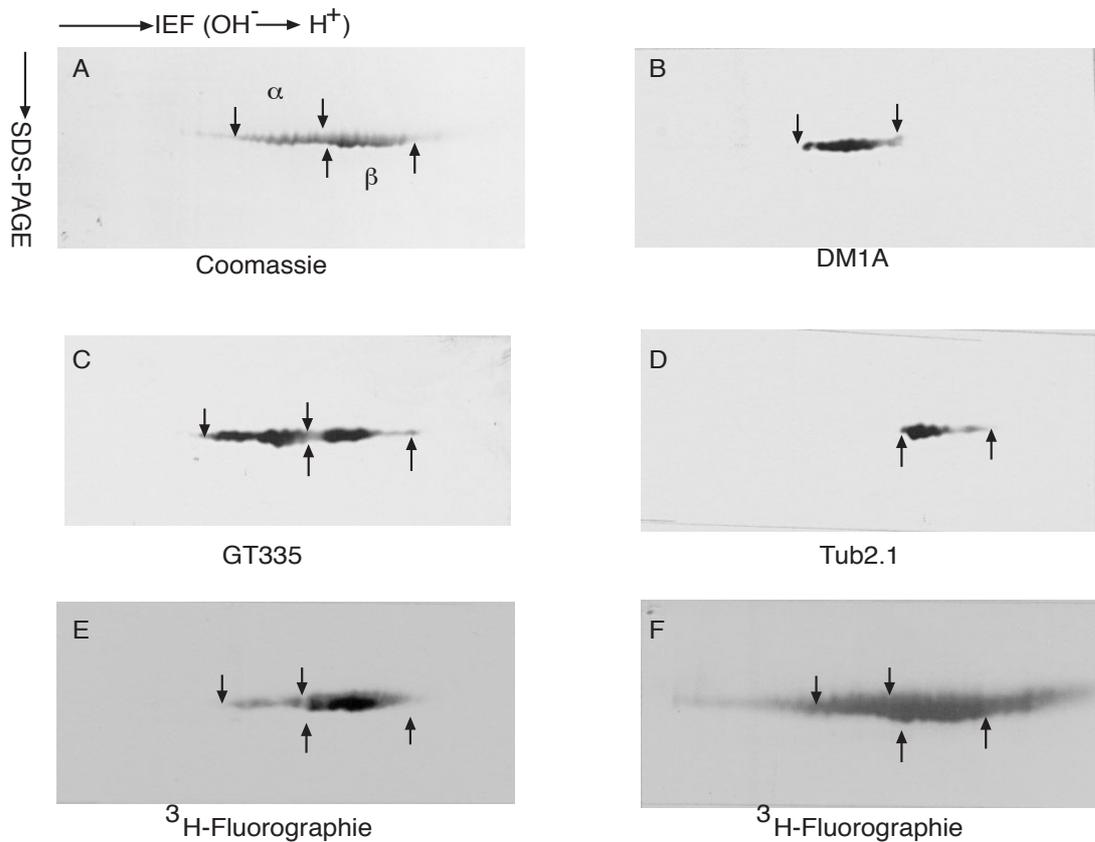


Abb 7: Analyse der Glutamylierungsprodukte von *Leishmania*-Tubulin mittels 2D-Gelelektrophorese: Salzgewaschene Cytoskelette wurden mit 0,25 M NaCl-Überstand radioaktiv glutamylert und die Reaktionsprodukte in der 2D-Gelelektrophorese analysiert. **A)** Coomassie-Färbung, **B)** ein paralleles Gel wurde geblottet und α -Tubulin mit dem monoklonalen Antikörper DM1A angefärbt. **C)** GT335-Färbung gegen glutamylertes Tubulin, **D)** Tub2.1-Färbung gegen β -Tubulin. **E)** ³H-Fluorographie von Gel A, Expositionszeit 3 Tage, **F)** wie E mit einer Expositionszeit von 7 Tagen. Die Pfeile markieren die α - bzw. β -Tubulin-Isoformen und erlauben eine einfachere Orientierung zwischen den Gelen.

Polymerisation und Depolymerisation isoliert und einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml im Glutamylierungsassay mit dem 0,25 M-NaCl Überstand als Enzymfraktion eingesetzt. Abbildung 8/1 zeigt den ATP-abhängigen Einbau von TCA-fällbarem Glutamat bei Zusatz von Mikrotubuli-Protein aus Säugerhirn als Substrat. Die geringe

radioaktive Inkorporation in Abwesenheit von exogenem Substrat ist wie oben erwähnt auf das Vorhandensein von Trypanosomen-Tubulin in der Enzymfraktion zurückzuführen. Ohne Zusatz der 0,25 M NaCl-Fraktion ist kein Einbau festzustellen, Mikrotubuli aus Säugerhirn, isoliert durch temperaturabhängige Polymerisation-/Depolymerisation, zeigen also allein keine Glutamylierungsaktivität. In einem weiteren Ansatz wurde anstelle von Mikrotubuliprotein reines pcTubulin als Substrat verwendet. Auch dieses wurde durch die Enzymfraktion aus Trypanosomen glutamyliert. Der Einbau von Glutamat in Säugerhirn-Tubulin im Assay hing also nicht von der Anwesenheit Mikrotubuli-assoziiierter Proteine des Substrats ab. Insgesamt war Hirntubulin ein ähnlich gutes Substrat wie die gewaschenen Cytoskelette aus *Crithidia* oder *Leishmania*.

Zur näheren Analyse der Glutamylierungsprodukte von Hirntubulin, wurde dieses wie unter 3.2.7 beschrieben in einem präparativen Ansatz mit 0,25 M NaCl-Fraktion glutamyliert und die Reaktionsprodukte durch 2D-Gelelektrophorese und anschliessendem Immunblot, bzw. ³H-Fluorographie analysiert. Abbildung 8/2 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. α - und β -Tubulin werden im zweidimensionalen Gel sauber voneinander getrennt. Die monoklonalen Antikörper DM1A und Tub 2.1 identifizieren β -Tubulin als die Variante mit der höheren Acidität. GT335 färbte unter den gewählten Bedingungen α - und β -Tubulin praktisch vollständig, korrespondierend zum hohen Glutamylierungsgrad von Tubulin aus Säugerhirn. In der Fluorographie erkennt man bei kurzer Expositionszeit (3 Tage) das Signal vornehmlich in den sauersten Varianten sowohl des α - als auch des β -Tubulins. Längere Expositionszeiten identifizieren auch eine Markierung von weniger sauren Isoformen. Quantitativ wurden α - und β -Tubulin etwa gleich stark markiert. Dieses Ergebnis zeigte sich auch in Experimenten, bei denen radioaktiv markiertes Hirntubulin geblottet und die α - und β -Bande getrennt ausgeschnitten und gezählt wurden.

Insgesamt akzeptiert die Tubulin Polyglutamylase aus Trypanosomen also Tubulin aus Säugerhirn als Substrat und baut Glutamat präferentiell in die sauersten Isoformen sowohl von α - , als auch von β -Tubulin ein.

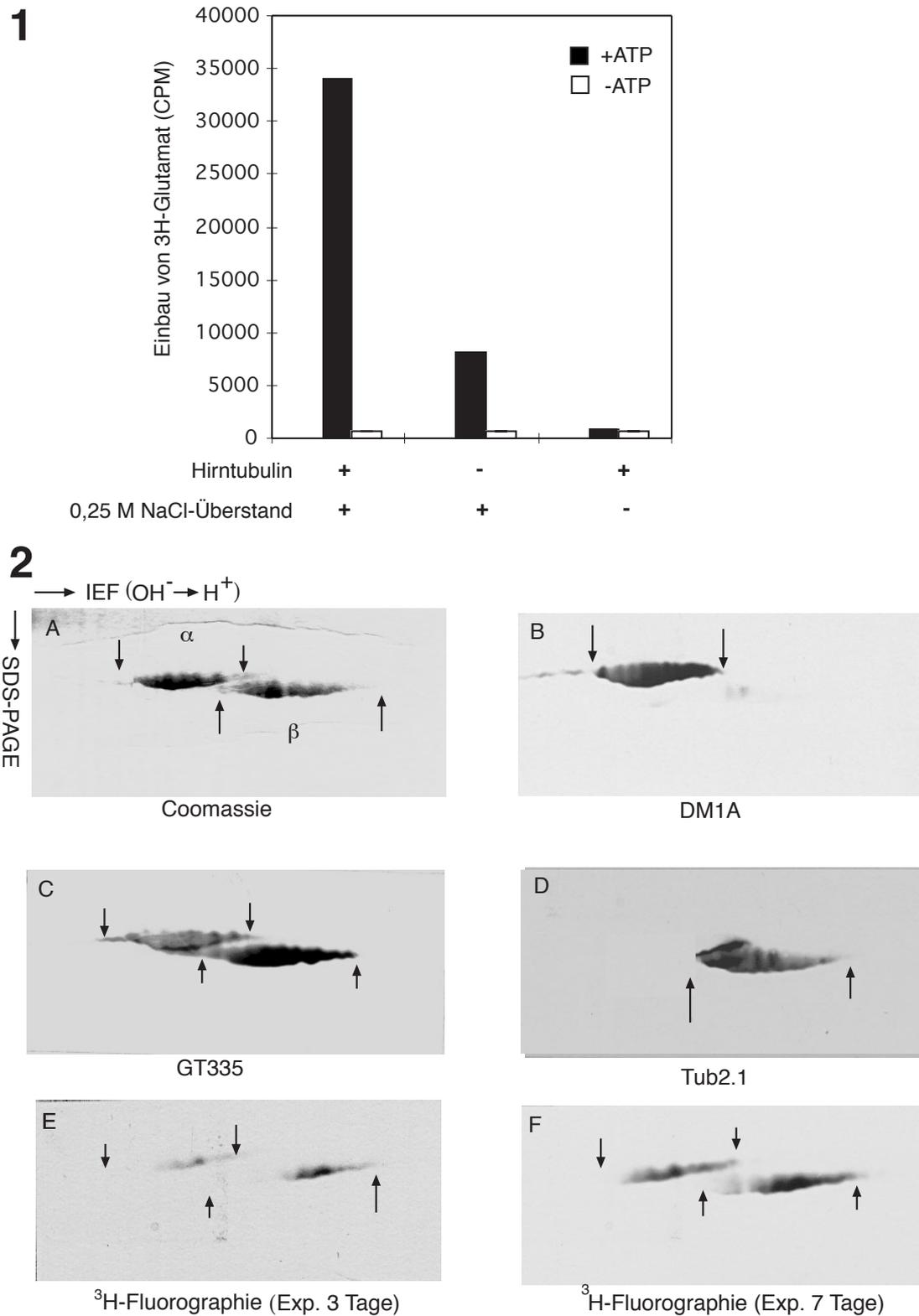


Abb.8: Tubulin aus Säugerhirn ist Substrat der Tubulin Polyglutamylase aus Trypanosomen. **1)** Einbau von ^3H -Glutamat in Hirntubulin gemessen mit dem Filterassay. Bemerkenswert ist der geringfügige Einbau in Abwesenheit von Hirntubulin, der auf das Vorhandensein von Tubulin im 0,25 M NaCl-Überstand zurückzuführen ist. **2)** 2D-Gel-Analyse von Hirntubulin nach Behandlung mit der Enzymfraktion. A: Coomassie-Färbung, parallele Gele wurden geblottet und mit Antikörper gegen α -Tubulin (B), glutamiliertes Tubulin (C) und β -Tubulin (D) gefärbt. E: Fluorographie von Gel A, Expositionszeit 3 Tage, F: identisches Gel wie in E, Expositionszeit 7 Tage.

4.10 Reinigung von Tubulin Polyglutamylase aus dem 0,25 M NaCl-Überstand von *Crithidia fasciculata*

4.10.1 Präparation des Rohenzym und Identifizierung der Hauptbanden

Isolierte *Crithidia* Cytoskelette wurden wie unter 1.2.6.3 beschrieben zur Gewinnung des 0,25 M NaCl-Überstandes genutzt. Während der Reinigung wurde der Filterassay (3.2.7) zur Verfolgung der Glutamylierungsaktivität genutzt, als Substrat wurde dabei Hirntubulin verwendet, das, wie oben gezeigt, selbst keine Enzymaktivität aufwies. Abbildung 9 zeigt die Reinigungsstufen bis zur Gewinnung des Rohextraktes und die zugehörigen spezifischen Aktivitäten der einzelnen Fraktionen. Es ist dabei wichtig festzustellen, daß der Triton-Überstand, also die cytosolische Fraktion der Präparation, praktisch keine Glutamylierungsaktivität enthielt. Durch das Waschen mit 0,25 M NaCl wurde die Aktivität fast vollständig vom Cytoskelett entfernt und solubilisiert.

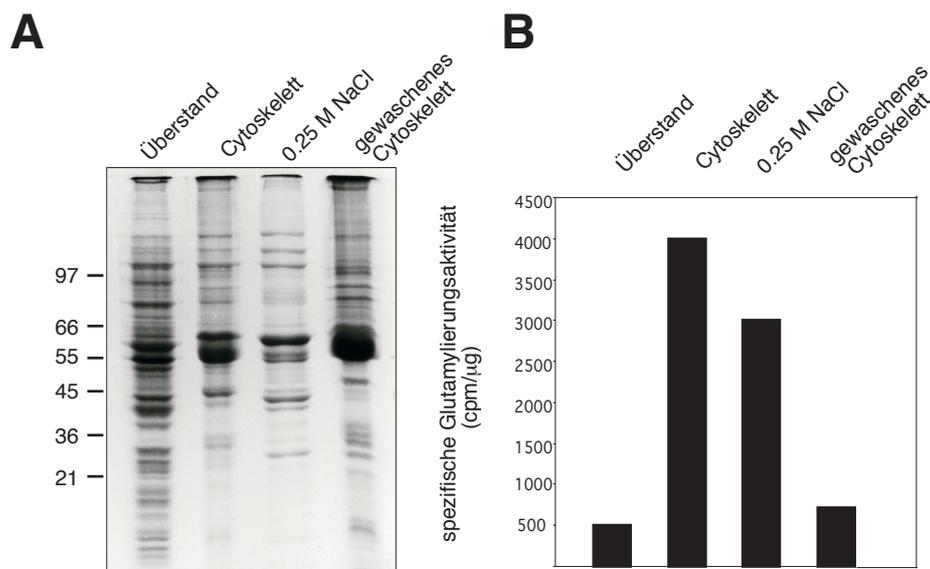


Abb. 9: Präparation des 0,25 M-NaCl Rohenzym aus *Crithidia*. A: Stufen der Reinigung, analysiert im 10% SDS-Polyacrylamidgel. B: Spezifische Aktivitäten der einzelnen Fraktionen. Nur die Cytoskelett-Fraktion und die anschließende 0,25 M-NaCl Waschfraktion zeigen signifikante Glutamylierungsaktivität.

Das Polypeptidprofil der 0,25 M NaCl-Fraktion entspricht demjenigen, das in früheren Arbeiten zur Isolierung von sogenannten „Korsett“-Proteinen erhalten wurde (Bramblett et al., 1987) Hierbei handelt es sich um Proteine, die mit dem Korsett-artigen Mikrotubuli-Cytoskelett der Trypanosomen assoziiert sind. Die Hauptbanden der Fraktion wurden aus Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten, mit LysC verdaut und die erhaltenen Peptide sequenziert. Mit Hilfe dieser Peptidsequenzen konnten durch Datenbanksuche folgende Proteine identifiziert werden:

Bande	Identifiziert als
p97	Pyruvat-Kinase
p61	PEP-Carboxykinase
p55	Tubulin
p43	Aldolase
p41	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
p33	Malat-Dehydrogenase

Bei den prominenten Banden handelt es sich mit Ausnahme des Tubulins sämtlich um Enzyme der Glykolyse. Dabei wurde p41 bereits zuvor durch Bindung von polyklonalen Antikörpern an Glykosomen und Enzymtests als GAPDH identifiziert (Bramblett et al., 1989). p33 und p61 binden auch *in vitro* an Mikrotubuli und p33 kann ausserdem Mikrotubuli zu Bündeln quervernetzen (Kambadur et al., 1990). Offensichtlich sind die glykolytischen Enzyme keine regulären Cytoskelett-Bestandteile. Sie liegen in den Trypanosomen in hoher Konzentration vor und sind zum großen Teil in spezialisierten Organellen, den Glykosomen, lokalisiert. Während des Homogenisierungsprozesses mit Detergentien, werden auch die Membranen der Glykosomen geöffnet und die freigesetzten Glykolyse-Enzyme, die vorwiegend basisch sind, binden an die stabilen Mikrotubuli des Cytoskeletts.

Der 0,25 M NaCl-Überstand (Fraktion I) war diejenige Reinigungsstufe, die sich am besten zur Lagerung eignete, So konnten vielfache Präparationen von Fraktion I bei -70°C aufbewahrt und dann weiter bearbeitet werden.

4.10.2 ATP-Affinitätschromatographie

Die am besten charakterisierte Eigenschaft der Glutamylierungsaktivität ist ihre strikte ATP-Abhängigkeit (siehe Abb. 6 E). Es sollte daher versucht werden, die Glutamylierungsaktivität aus dem 0,25 M NaCl-Überstand über eine Affinitätschromatographie an immobilisiertem ATP anzureichern. In Vorversuchen zeigte sich, daß kommerziell erhältliche ATP-Agarose oder Adipinsäure-ATP nur eine geringe Affinität für die Tubulin Polyglutamylase hatten. Es war daher essentiell, ATP über einen Spacer von Sebacinsäuredihydrazid an Sepharose zu koppeln (3.2.6.6.). Die Benutzung dieser Art von ATP-Säule war auch bei der Tubulin-Tyrosin-Ligase erfolgreich (Murofushi, 1984). Abbildung 10 zeigt Fraktionen der ATP-Säule in der SDS-PAGE. Es war wichtig, den 0,25 M NaCl-Überstand (Fraktion I) vor dem Auftragen 1:1 zu verdünnen, unter diesen Bedingungen wurde die Aktivität fast quantitativ an die Säule gebunden, während der Grossteil der Proteine im Durchfluss zu finden war. Das Enzym blieb auch beim folgenden Waschschrift mit 0,25 M KCl auf der Säule, während insbesondere der Grossteil der glykolytischen Enzyme und Tubulin unter diesen Bedingungen eluiert wurden. Die Glutamylierungsaktivität wurde dann als scharfer Peak mit 20 mM MgATP und 0,5 M KCl eluiert. Eine

Affinitätselution allein mit freiem Liganden (20 mM MgATP) führte zu einem wesentlich breiteren Elutionsprofil der Aktivität und sehr geringen Proteinkonzentrationen in den aktiven Fraktionen. Die Addition von 0,5 M KCl zum Elutionspuffer half, dieses Problem zu überwinden. Die dominierenden Banden der ATP-Fraktion waren die beiden ATP-bindenden Enzyme Pyruvat-Kinase (p97) und PEP-Carboxykinase (p61), ein Polypeptid, das dem Aktivitätsprofil im Glutamylierungsassay folgte, war an dieser Stelle nicht klar auszumachen.

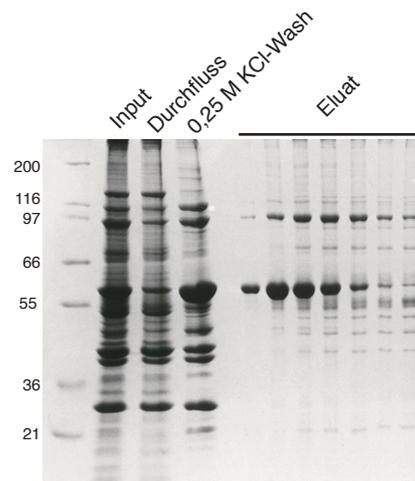


Abb. 10: 10% SDS-PAGE von Fraktionen aus der ATP-Affinitätschromatographie. Aufgetragen wurde der 0,25 M NaCl-Überstand. Der Grossteil der aufgetragenen Proteine ist im Durchfluss oder im 0,25 M KCl Waschschrift zu finden. Bemerkenswert ist die Anreicherung von p97 und p61, zwei ATP-bindenden Enzymen, im Eluat.

Die glutamylierungsaktiven Fraktionen wurden gesammelt (Fraktion II) und vor der folgenden Dichtegradientenzentrifugation durch Ultrafiltration in Centricon-10-Einheiten konzentriert. Diese Behandlung hatte typischerweise große Verluste an Gesamtprotein und Glutamylierungsaktivität zur Folge, auch wenn die Ultrafiltrationsmembran zur Verhinderung unspezifischer Bindung zuvor nach Herstellerangaben passiviert worden war. Eine Ionenaustauschchromatographie zur Konzentrierung der Fraktion war an dieser Stelle wegen der hohen Salz- und ATP-Konzentration nicht möglich. Ebenso führte eine ausgiebige Dialyse, wie sie zur Entfernung des ATP notwendig gewesen wäre, zu großen Verlusten an Enzymaktivität. Die konzentrierten ATP-Fraktionen konnten nach Zusatz von Glycerin auf 20% (v/v) über mehrere Monate bei -70°C gelagert werden.

4.10.3 Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation

Die Verwendung einer Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation als weiteren Schritt im Aufreinigungsschema hatte verschiedene Vorteile: Erstens stabilisierte Glycerin die Tubulin Polyglutamylase. Die Ausbeute bezogen auf diesen Schritt war typischerweise grösser als 70% während das einfache Aufbewahren von Fraktion II bei 4°C für 24 h zu mindestens 50% Verlust an Enzymaktivität führte. Zweitens führte die Dichtegradientenzentrifugation zu einer weiteren Erhöhung der

spezifischen Aktivität, da die Hauptmenge an Protein, insbesondere p97 und p61, gegenüber der Glutamylierungsaktivität zu höheren S-Werten verschoben waren. Drittens wurden die KCl- und ATP-Konzentrationen als Vorbereitung auf die folgende Ionenaustauschchromatographie reduziert.

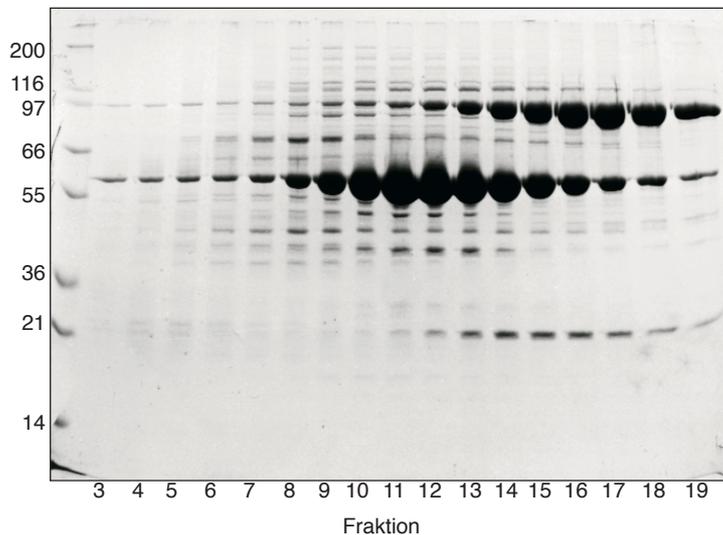


Abb.11: Zentrifugation der ATP-Fraktion in einem 10-20% Glycerin-Dichtegradienten. 30 Fraktionen von je 400 μ l wurden abgenommen, von diesen sind hier nur die Fraktionen 3-19 dargestellt. Die beiden prominenten Polypeptide p97 (Pyruvat-Kinase) und p61 (PEP-Carboxykinase) sedimentieren jeweils als Dimer. Der Hauptteil der Glutamylierungsaktivität war in diesem Experiment in den Fraktionen 7-10 zu finden.

Bei der Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation zeigte sich ausserdem ein deutlich unterschiedliches Sedimentationsverhalten von Rohenzym und Glutamylase nach der ATP-Affinitätschromatographie.

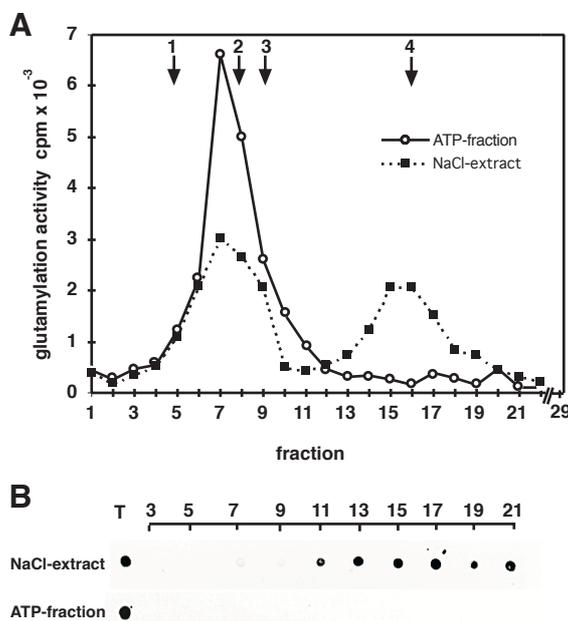


Abb. 12: Unterschiedliches Sedimentationsverhalten von roher (NaCl-Extrakt) und teilweise gereinigter (ATP-Fraktion) Tubulin-Polyglutamylase. **A:** 300 μ l Proben von roher und teilweise gereinigter Tubulin polyglutamylase wurden auf lineare 10-20% Glycerringradienten aufgetragen und wie beschrieben zentrifugiert. 2 μ l Proben jeder Fraktion wurden auf Glutamylierungsaktivität untersucht. Die Position von Standardproteinen ist oben angegeben, siehe Legende zu Figur 13. **B:** 1 μ l Proben der angegebenen Fraktionen wurde auf Nitro-cellulose gespottet und zur Detektion von Tubulin mit dem monoklonalen Antikörper DM1A gefärbt. 1 μ g pcTubulin aus Schweinehirn diente als Kontrolle (T). Bemerkenswert sind die beiden Aktivitäts-peaks in der Rohfraktion (2,9 S und 7S), während das ATP-gereinigte Enzym ausschliesslich bei 2,9 S sedimentiert. Der größere Peak in der Rohfraktion enthält Tubulin, das dann durch die ATP-Säule entfernt wird.

Der größere Peak in der Rohfraktion enthält Tubulin, das dann durch die ATP-Säule entfernt wird.

Abbildung 12 zeigt, daß die Glutamylierungsaktivität der Rohfraktion durch die Dichtegradientenzentrifugation in zwei Peaks aufgelöst wurde. Während der eine zu einem S-Wert von etwa 2,9 korrespondierte, lag der zweite bei etwa 7

(korrespondierend zu einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa für ein globuläres Protein). Ein Dot-Blot detektierte Tubulin in den Fraktionen des zweiten Peaks (Abb. 12 B). Nach der ATP-Affinitätschromatographie war das Enzym frei von Tubulin und sedimentierte ausschliesslich als 2,9 S-Spezies. Der Wert von 7 S ist am besten mit der Existenz eines 1:1 Komplexes zwischen Enzym und Tubulin-Heterodimer (110 kDa) zu erklären. Der Komplex wird durch die ATP-Affinitätschromatographie getrennt, bei der Tubulin größtenteils im 0,25 M KCl-Waschschritt eluiert wird.

4.10.4 Anionenaustauschchromatographie

Glutamylierungsaktive Fraktionen aus dem Dichtegradienten (Fraktion III) wurden durch Anionenaustauschchromatographie an einer kleinen monoQ-Säule weiter gereinigt. Abbildung 13 fasst die Reinigungsschritte beginnend mit der ATP-Affinitätschromatographie noch einmal zusammen. Während der größte Teil der Proteine durch etwa 0,25 M NaCl von der monoQ-Säule eluiert wurden, zeigte sich ein scharfer Peak von Glutamylierungsaktivität erst beim finalen Waschen der Säule mit 0,9 M NaCl. SDS-PAGE (Abb. 13 D) zeigte, daß die monoQ-Fraktion (Fraktion IV) vom einem einzelnen Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa dominiert wurde. Längere Silberfärbung zeigte das Vorhandensein noch weiterer Banden, diese konnten dem Aktivitätsprofil an dieser Stelle jedoch nicht zugeordnet werden. Aufgrund der hohen Salzkonzentration war die Glutamylierungsaktivität in dieser Fraktion stark inhibiert und das Salz konnte weder durch Dialyse noch Gelfiltration effizient entfernt werden, ohne die Enzymaktivität fast völlig zu verlieren. Zur Lagerung von Fraktion IV musste wegen der geringen Proteinkonzentration BSA und Glycerin zugesetzt werden.

Da das Polypeptid p40 als interessanter Kandidat für die Tubulin Polyglutamylase verblieb, wurden verschiedene Präparationen gesammelt, die finale MonoQ-Fraktion in der SDS-PAGE aufgetrennt und die p40-Bande ausgeschnitten. Nach LysC-Verdau wurden die Sequenzen interner Peptide erhalten und zur Klonierung der p40-cDNA verwendet (siehe 4.15).

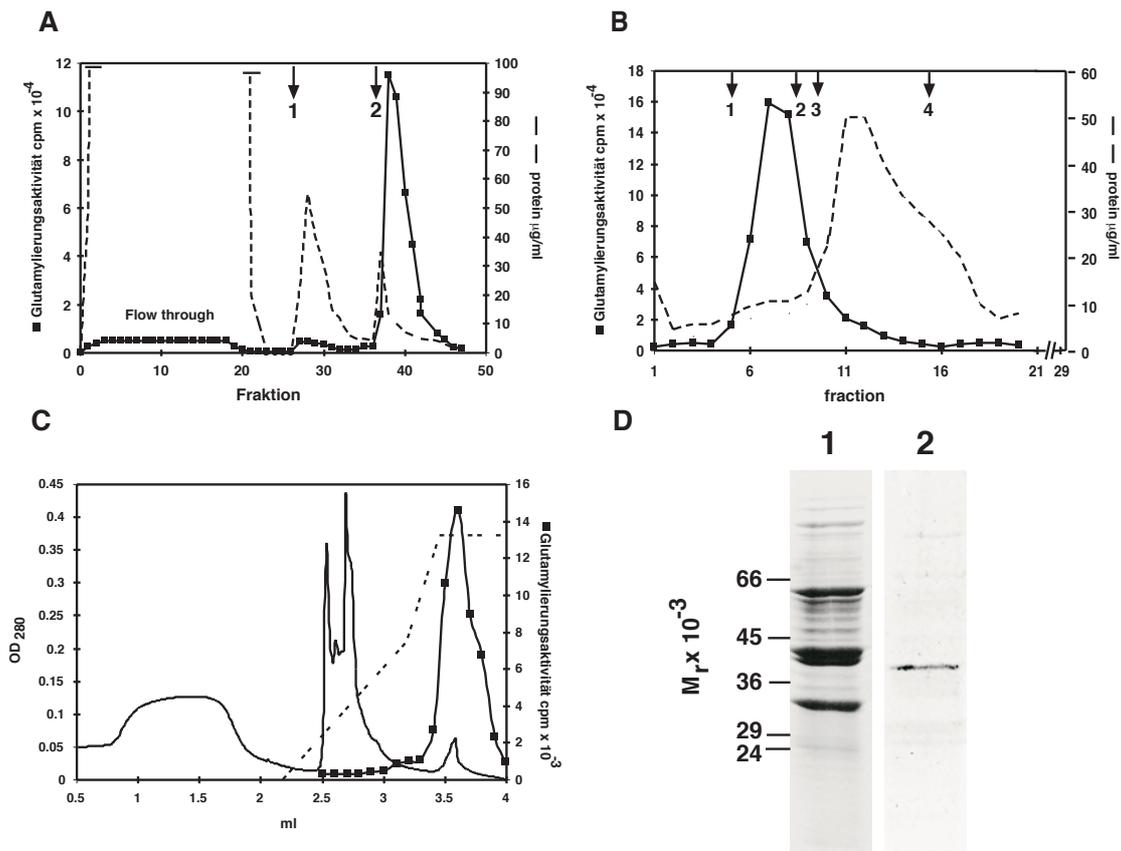


Abb. 13: Reinigung von Tubulin Polyglutamylase aus *Crithidia*. **A:** Affinitätschromatographie des 0,25 M NaCl-Überstands von isolierten Cytoskeletten (Fraktion I) an Sepharose-Sebacinsäure-ATP. Am Punkt 1 wurde die Säule mit 0,25 M KCl gewaschen; am Punkt 2 erfolgte die Elution mit 20 mM MgATP und 0,5 M KCl. 1 ml Fraktionen wurden gesammelt und 2 µl jeder Fraktion im Glutamylierungstest untersucht (Fraktion II). **B:** Weitere Reinigung des Enzyms durch Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation. 30 Fraktionen wurden gesammelt und 10 µl jeder Fraktion im Aktivitätstest untersucht (Fraktion III). Die Richtung der Sedimentation ist von links nach rechts. Die Positionen der Markerproteine sind 1: Ribonuklease 2S, 2: Ovalbumin 3,6 S, 3: BSA, 4,2 S, 4 Aldolase 7,2 S. **C:** Anionenaustauschchromatographie des Enzyms an einer MonoQ-Säule. 2 ml Proben wurden auf Glutamylierungsaktivität untersucht (Fraktion IV). Keine Aktivität wurde in den Fraktionen des Durchflusses detektiert. Der NaCl-Gradient von 0-0.9 M ist als gestrichelte Linie gekennzeichnet. **D:** 10% SDS-PAGE von *Crithidia* Tubulin Polyglutamylase: Bahn 1: 15 µg Rohenzym (Fraktion I) gefärbt mit Coomassie; Bahn 2: ungefähr 0,1 µg Enzym nach Anionenaustauschchromatographie (Fraktion IV), Silberfärbung. Molekulargewichte von Standard-Proteinen sind angegeben.

4.10.5 „Scale up“ und Verwendung von Hydroxyapatitchromatographie

Mit der Klonierung der p40-cDNA aus *T. brucei* (4.15) wurde deutlich, daß es sich bei der Hauptkomponente der monoQ-Fraktion um ein RNA-bindendes Protein handelte, das für die Glutamylierungsaktivität nicht verantwortlich sein konnte. Da andere Polypeptide in der monoQ-Fraktion nur als sehr schwache Banden zu erkennen waren, mußte die Menge an Ausgangsmaterial für die Reinigung drastisch gesteigert werden, um die tatsächliche Glutamylierungsaktivität im Gel visualisieren zu können. Ausserdem war sowohl die Ausbeute der Anionenaustauschchromatographie

unbefriedigend, als auch die Tatsache, daß die finalen Fraktionen in extrem hoher Salzkonzentration vorlagen und damit für Enzymtests fast unbrauchbar waren. Es wurde deshalb nach einer Alternative für die MonoQ-Säule im letzten Schritt der Präparation gesucht.

Während die ersten Präparationsversuche mit Rohenzym starteten, das aus 2-3 Liter *Crithidia*-Kulturansatz gewonnen worden war, wurde nun standardmäßig Rohenzym aus 9 Litern gewonnen und für den anschliessenden ersten Reinigungsschritt über die ATP-Säule das Material aus 3 Rohenzym-Präparationen (entsprechend 27 Litern Ausgangsmaterial) gesammelt.

Anstelle der Anionenaustauschchromatographie wurde im letzten Schritt der Präparation eine Hydroxyapatitchromatographie an einer CHT-2 Säule (Säulenvolumen 1 ml) eingesetzt. Hierzu mussten die gesammelten Fraktionen des Dichtegradienten zunächst gegen Phosphatpuffer dialysiert werden. Um den Verlust an Enzymaktivität zu beschränken, wurde die Dialysezeit auf maximal eine Stunde bei 4°C begrenzt. Abbildung 14 gibt ein Fließschema der Präparation an und zeigt ein 10% SDS-Polyacrylamidgel mit glutamylierungsaktiven Fraktionen der finalen Hydroxyapatitsäule.

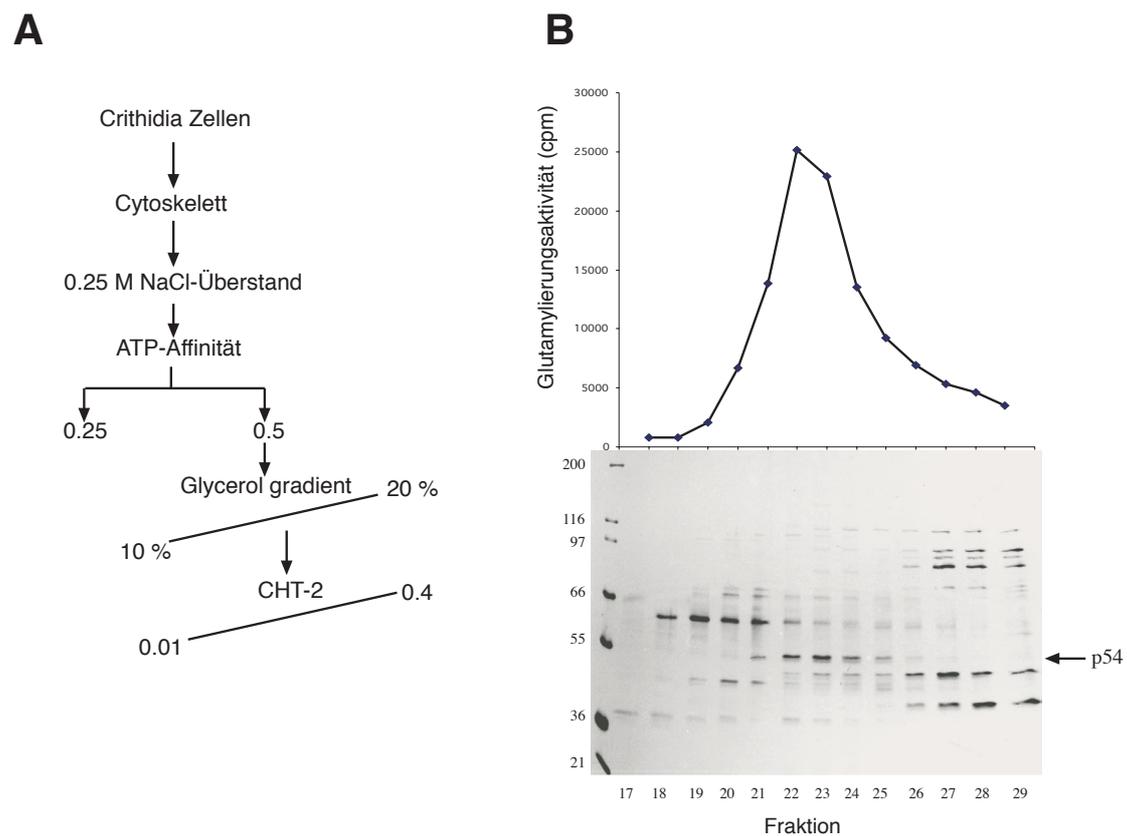


Abb. 14: A: Fließschema zur Reinigung von Tubulin Polyglutamylase. B: 10% SDS-PAGE von Fraktionen der finalen Hydroxyapatitchromatographie und Glutamylierungsaktivität der einzelnen Fraktionen. Jeweils 10 µl der einzelnen 0,5 ml-Fraktionen wurde im Assay getestet. Das Gel wurde mit Silber gefärbt. Zu beachten ist ein Polypeptid von etwa 54 kDa, das mit der Glutamylierungsaktivität koeluiert.

Die Glutamylierungsaktivität wurde nach der Dialyse quantitativ an die Hydroxyapatitsäule gebunden, während insbesondere p61 (PEP-Carboxykinase) im Durchfluß zu finden war. Die Aktivität eluierte konsistent als scharfer Peak bei 160 mM Natriumphosphat. 20 µl-Aliquots der 0,5 ml Fraktionen wurden in der SDS-PAGE mit Silberfärbung analysiert. Abbildung 14 B zeigt, daß ein Polypeptid von 54 kDa die einzige Bande war, die mit der Glutamylierungsaktivität koeluierte. Die Reinigung nach dem veränderten Schema ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Es ergab sich eine mehr als 800fache Anreicherung der Glutamylierungsaktivität bezogen auf den NaCl-Überstand, die Ausbeute an Aktivität lag dabei bei etwa 7 %.

Fraktion	Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (cpm)	Aktivitäts-Ausbeute	Reinigungs-Faktor
I	NaCl-Überstand	240	720×10^6	100 %	x 1
II	ATP-Säule	6	280×10^6	40 % ^a	x 16
III	Dichtegradient	0,5	196×10^6	28 %	x 130
IV	Hydroxyapatit-Säule	0,02	50×10^6	7 % ^b	x 833

Tabelle 1: Reinigung von Tubulin Polyglutamyrase aus dem 0,25 M-NaCl Überstand von *Crithidia*. Aktivitätsausbeute und Reinigungsfaktor beziehen sich immer auf den NaCl-Überstand. **a:** Die geringe Ausbeute ist im Wesentlichen auf die nach der ATP-Säule folgende Ultrafiltration zurückzuführen. **b:** Nur ein Teil der Dichtegradienten-Fraktion wurde auf die nachfolgende Hydroxyapatit-Säule aufgetragen.

Fraktion IV Enzym konnte nach Zusatz von Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (SBTI) auf 0,1 mg/ml und Glycerin auf 20 % (v/v) auf flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert werden. Die Klonierung der p54-cDNA ist unter 4.16 beschrieben.

Die Hydroxyapatit-Fraktion konnte durch chromatographische Verfahren nicht weiter angereichert werden. So wurde versucht, die Fraktion zu konzentrieren und über eine Grössenausschlusschromatographie an einer TSK3000SW_{XL}-Säule weiter zu reinigen. Dies hatte, vermutlich aufgrund der geringen Proteinkonzentration, einen mehr als 90%igen Verlust an Enzymaktivität zur Folge. Weitere chromatographische Verfahren, die getestet wurden, waren zum einen eine Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose. Hierbei wurde die Glutamylierungsaktivität fast quantitativ gebunden und durch 0,4 M KCl eluiert, allerdings gemeinsam mit den Hauptkomponenten der Rohenzymfraktion, so daß der Anreicherungsfaktor nur recht gering war. Desweiteren wurde die Enzymaktivität quantitativ an eine HiTrapBlue-Säule (Pharmacia) gebunden, konnte aber selbst durch 1 M NaCl nicht eluiert werden.

4.11 Substratspezifität der Tubulin Polyglutamylase

Die Aminosäure-Spezifität der Tubulin Polyglutamylase wurde in einem Konkurrenzexperiment untersucht. Dabei wurden Glutamat-Analoga oder andere Aminosäuren auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Standard-Glutamylierungsreaktion zu inhibieren oder anstelle von L-Glutamat in Tubulin inkorporiert zu werden. Es wurden Standardassays mit partiell gereinigter Tubulin Polyglutamylase durchgeführt, bei der die Konzentration des potentiellen Kompetitors 100 bzw 1000fach größer als die des radioaktiv markierten L-Glutamats ($2,3 \mu\text{M}$) war. Die inkorporierte Radioaktivität wurde wie üblich mit dem Filter-Assay gemessen. Abbildung 15 fasst die Ergebnisse zusammen.

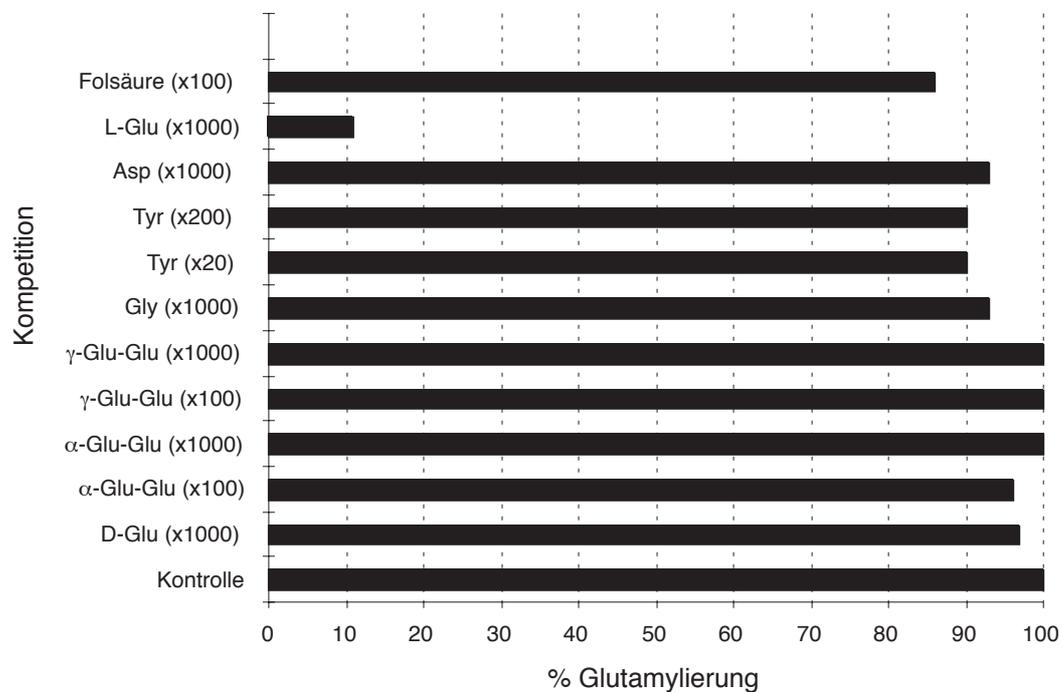


Abb. 15: Aminosäure-Spezifität der Tubulin Polyglutamylase, getestet in einem Konkurrenzexperiment. Mit Ausnahme der unmarkierten L-Glutaminsäure konnte keine der getesteten Komponenten die Inkorporation von radioaktiv markierter L-Glutaminsäure signifikant reduzieren.

Keine der getesteten Komponenten inhibierte die gemessene Glutamylierungsaktivität um mehr als 15%. Die Stereospezifität der Reaktion wurde durch die Tatsache verdeutlicht, daß auch die Anwesenheit eines 1000fachen Überschusses D-Glutamat die Inkorporation des Stereoisomers nicht reduzierte. Die beiden Dipeptide α -Glu-Glu und γ -Glu-Glu konnten ebenfalls nicht umgesetzt werden, genauso wie die Aminosäuren Glycin und Tyrosin. Dies zeigt an, daß Glutamylierung, Tyrosinierung und

Glycinylierung von unterschiedlichen Enzymsystemen katalysiert werden. Folsäure wurde in diesem Experiment getestet, da das Enzym Folylpolyglutamat-Synthetase die Umsetzung von Folsäure in ihre Polyglutamat-Derivate katalysiert (Cichowicz und Shane, 1987). Jedoch bewirkte auch ein Überschuss an Folsäure keine signifikante Reduktion der Tubulin-Glutamylierungsaktivität.

Eine weitere wichtige Frage war, ob die Tubulin Polyglutamylase Tubulin-Dimere oder Mikrotubuli als Protein-Substrate bevorzugt. Zur Untersuchung dieser Frage wurde Mikrotubuli-Protein aus Schweinehirn in einer Konzentration von 5 mg/ml (also unterhalb der kritischen Konzentration der Polymerisation) mit 20 μ M Taxol bei 37°C für 30 min vorinkubiert. Ein Parallelansatz wurde auf Eis belassen und Tubulin aus beiden Ansätzen anschliessend im Standardglutamylierungstest eingesetzt. Es zeigte sich, daß in den Ansätzen mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli regelmässig höhere Glutamylierungsaktivitäten gemessen wurden, die Steigerung der Enzymaktivität gegenüber den Kontrollansätzen lag allerdings nur bei rund 10%. Sowohl Tubulin-Dimere als auch Mikrotubuli sind also Substrate für die Tubulin Polyglutamylase aus *Crithidia*.

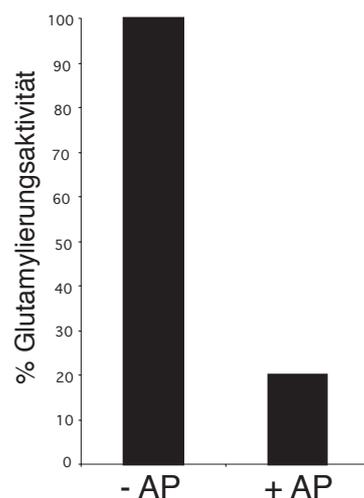


Abb. 16: Reduktion der Glutamylierungsaktivität durch Vorbehandlung der Enzymfraktion mit Alkalischer Phosphatase. *Crithidia* Tubulin Polyglutamylase (Fraktion I) wurde mit 10 U Alkalischer Phosphatase (+ AP) für 30 min bei 27°C vorinkubiert und ein Aliquot des Ansatzes im Standard-Glutamylierungstest eingesetzt. Ein Parallelansatz ohne Enzym (-AP) wurde entsprechend behandelt.

Eine Vorbehandlung von *Crithidia* Tubulin polyglutamylase mit Alkalischer Phosphatase führte zu einer drastischen Reduktion der Enzymaktivität, die anschliessend nur noch etwa 20% des Kontrollwertes betrug. Dies galt sowohl für die Rohenzym-Fraktion, als auch für hoch angereicherte (Fraktion IV) Polyglutamylase.

K_M -Werte wurden bei pH 9,0 ermittelt, sie betragen ungefähr 0,3 μ M für Tubulin und 0,8 mM für Glutamat und entsprechen damit in etwa denjenigen, die für Tubulin Polyglutamylase aus dem Hirn angegeben wurden (Regnard et al., 1998).

4.12 Glutamylierung von synthetischen Peptiden

4.12.1 Hemmung der beobachteten Glutamylierungsaktivität durch synthetische Peptide

Verschiedene Enzyme haben die Fähigkeit, nicht nur ihr natives Substrat umzusetzen, sondern auch substrat-verwandte Peptide zu verwerten. Beispiele hierfür sind Proteinkinasen, Protein-Farnesyltransferasen (Reiss et al., 1990) oder auch die Tubulin-Tyrosin-Ligase (Rüdiger et al., 1994). Zunächst wurde untersucht, welchen Effekt der Zusatz Tubulin-verwandter Peptide auf den Standard-Glutamylierungstest hat. Hierzu wurde ein Peptid verwandt, das den 15 carboxyterminalen Aminosäuren von tyrosiniertem α 1/2 Tubulin aus Säugerhirn entspricht. Das Peptid wurde zum einen in unmodifizierter Version synthetisiert, zum anderen in einer Variante mit einer Oligoglutamat-Seitenkette von vier Resten an der zuvor etablierten Position, also Glutamat-445 (Edde et al., 1990). Die letzten drei Aminosäuren der Seitenkette waren dabei über normale α -Peptidbindungen miteinander verknüpft. Die beiden Peptide wurde in unterschiedlichen Konzentrationen im Standard-Glutamylierungstest mit Hirntubulin als Substrat eingesetzt. Es ist dabei wichtig anzumerken, daß die Peptide zu klein sind, als das sie mit TCA gefällt werden könnten. Das heisst, diejenige Radioaktivität, die eventuell in die Peptide und nicht ins Protein eingebaut wird, würde nicht auf dem Filter zurückgehalten.

Abbildung 17 zeigt das Ergebnis des Experiments: Das unmodifizierte α -Peptid bewirkte nur eine geringe Reduktion der beobachteten Glutamylierungsaktivität, bei einer Konzentration von 200 μ M im Assay, was einen etwa hunderfachen Überschuss gegen Tubulin bedeutete, betrug die Aktivität noch immer 80% des Kontrollwertes. Dagegen zeigte das verzweigte Peptid eine signifikant größere Fähigkeit, die beobachtete Glutamylierungsaktivität zu reduzieren: Eine etwa 50% Reduktion wurde bei einer Peptid-Konzentration von 50 mM im Assay erreicht, dies ist ein etwa 25 facher molarer Überschuss gegenüber Tubulin in der Reaktion. Bei 200 μ M betrug die beobachtete Tubulin-Glutamylierungsaktivität nur noch ca. 30% des Kontrollwertes ohne zugesetztes Peptid.

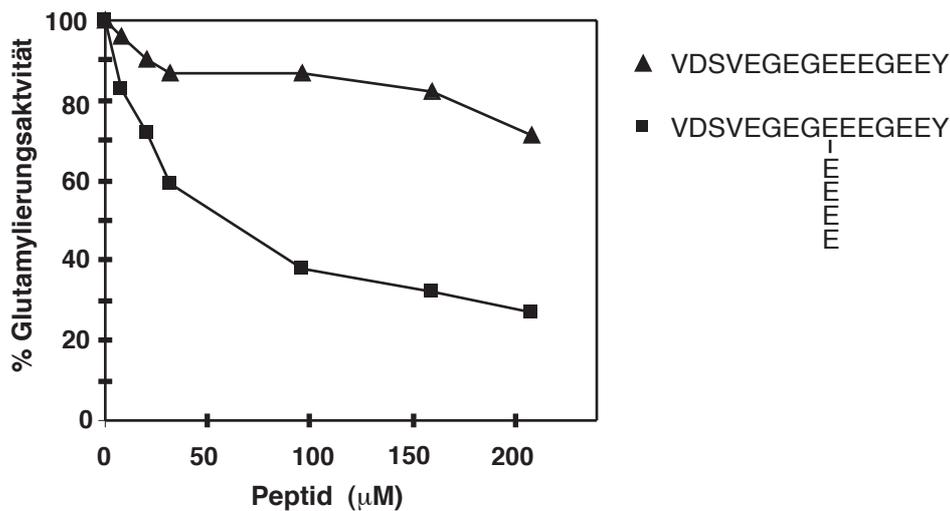


Abb 17: Inhibierung der beobachteten Tubulin Polyglutamylierung durch synthetische α -Peptide. Glutamylierung von Hirntubulin mit Rohenzymfraktion (10 μg) wurde durch synthetische Peptide kompetiert, die die letzten 15 Reste von tyrosiniertem Hirntubulin (Dreiecke), bzw. einer Variante mit einer 4 Reste langen Glutamat-Seitenkette (Quadrate), repräsentieren. Standard-Glutamylierungstests wurden bei den angegebenen Peptid-Konzentrationen durchgeführt und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt. Bemerkenswert ist die deutliche stärkere Inhibierung durch das verzweigte Peptid.

4.12.2 Synthetische Peptide sind Substrate der Tubulin Polyglutamylyase

Die Beobachtung, daß synthetische Peptide den Einbau von ^3H -Glutamat in TCA-fällbare Radioaktivität reduzieren, legte die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um eine kompetitive Hemmung handelte, daß die Peptide also von der Tubulin Polyglutamylyase als Substrate verwendet werden konnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Peptide im Standard-Glutamylierungstest mit 2 mM nicht markiertem Glutamat und 1 μg partiell gereinigter Tubulin Polyglutamylyase inkubiert. Um auch eine möglicherweise sehr geringe Einbaurrate zu detektieren, wurde die Inkubationszeit auf 16 h verlängert. Ein Aliquot der Reaktionsmischung wurde über eine Umkehrphasen-HPLC gereinigt und Peptid-Peaks durch Massenspektroskopie und automatische Sequenzierung charakterisiert. Neben dem α -Peptid wurde auch ein β -Peptid eingesetzt, das die carboxyterminalen 19 Reste von $\beta 2$ -Tubulin aus Säugerhirn repräsentiert. Auch dieses Peptid wurde sowohl in unmodifizierter Form, als auch in einer Variante mit einer Oligoglutamat-Seitenkette von vier Resten an Position Glu-435 verwendet. Die Ergebnisse zur Glutamylierung von synthetischen Peptiden lassen sich wie folgt zusammenfassen: Bei beiden unverzweigten Peptiden waren keine Unterschiede in den Massenspektren vor und nach der Reaktion zu erkennen, die auf einen Einbau von Glutaminsäure hingedeutet hätten.

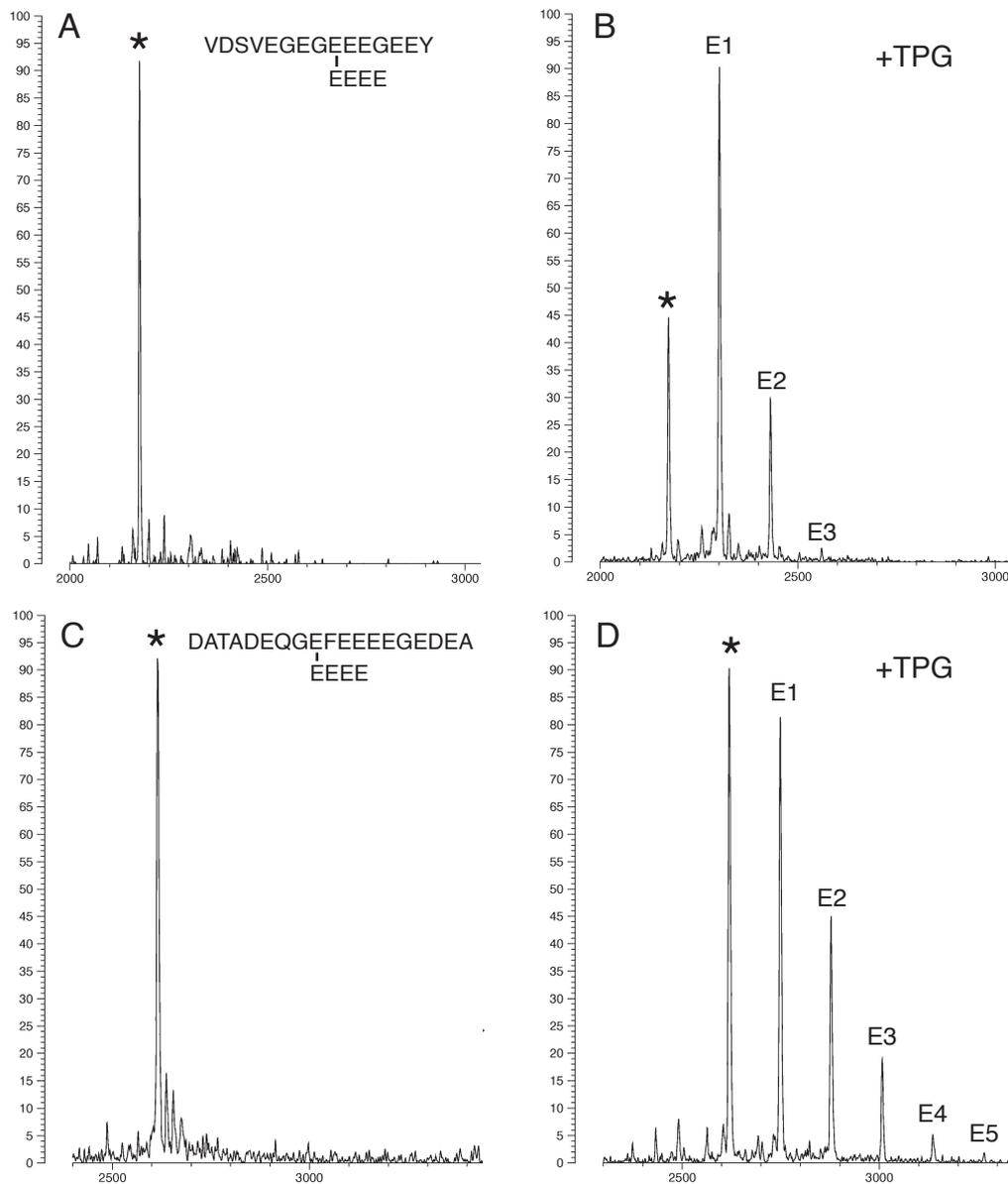


Abb 18: Verzweigte synthetische Peptide, die den Carboxyterminus von α - und β -Tubulin aus Säugerhirn repräsentieren, sind Substrate der *Crithidia* Tubulin Polyglutamylase (TPG). Massenspektren des α -Peptids (15 Reste mit einer Oligoglutamat-Seitenkette von 4 Resten an Position 9) und des β -Peptids (19 Reste mit einer Seitenkette von 4 Resten an Position 9) sind in **A** und **C** gegeben. Massenspektren der Reaktionsprodukte (+ TPG) sind in **B** (α) und **D** (β) gezeigt. Die Ausgangspeptide sind mit einem Stern gekennzeichnet, die Anzahl der zusätzlich eingefügten Seitenketten-Glutamatreste ist mit E1 bis E5 angegeben. Die Reaktionen wurden mit 1 μ g Fraktion II bei pH 9,0 für 16 h durchgeführt, um maximalen Einbau zu gewährleisten.

Wie Abbildung 18 zeigt, wurden dagegen beide verzweigten Peptide als Substrate akzeptiert. Die Tubulin Polyglutamylase fügte bis zu 3 zusätzliche Glutamatreste ins α -Peptid, bis zu 5 zusätzliche Reste ins β -Peptid ein. Die Sequenzierung der Produktpeptide durch automatischen Edman-Abbau zeigte in beiden Fällen nur eine Seitenkette an der bekannten Position an, der Anbau einer weiteren Seitenkette konnte dagegen nicht detektiert werden. Behandlung des enzymatisch verlängerten α -Peptids mit Carboxypeptidase A entfernte das C-terminale Tyrosin vollständig, während die Glutamat-Inkrementen im Produkt dieser Reaktion erhalten blieben. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse von Massenspektroskopie, Sequenzierung und Carboxypeptidase A-Behandlung, daß die zusätzlichen Glutamatreste nicht an den C-Terminus, sondern als Verlängerung der bestehenden Glutamat-Seitenkette eingefügt wurden.

Bei den Reaktionsprodukten des α -Peptids wurden in der Massenspektroskopie ausserdem Varianten gefunden, die sich um ein Masseninkrement von 79 vom Ausgangspeptid unterschieden. Dies zeigte eine Phosphorylierung des α -Peptids an. Zur Überprüfung wurde das entsprechende Peptid der sauren Hydrolyse unterworfen und in der Dünnschichtchromatographie mit Phosphoaminosäure-Standards verglichen. So konnte Serin-Phosphat identifiziert werden. Die verwendete Enzymfraktion nach der ATP-Affinitätsäule enthält also eine Proteinkinase, die den einzigen Serinrest des α -Peptids, der Serin-439 entspricht, phosphoryliert.

Die im Konkurrenzexperiment beobachtete Inhibierung der Glutamylierung ist also auf eine kompetitive Hemmung zurückzuführen, bei der die verzweigten Peptide als alternative Substrate genutzt werden. Aus der Beobachtung, daß ein 25facher Überschuss an Peptid gegenüber Tubulin zur 50%igen Reduktion der beobachteten Aktivität nötig sind, wie auch aus der insgesamt recht geringen Zahl der in die Peptide eingebauten Glutamatreste, ist abzulesen, daß die Glutamylierung der Peptide deutlich ineffizienter als die des nativen Tubulins verläuft.

4.12.3 Minimale Sequenzanforderungen zur Glutamylierung von synthetischen Peptiden

Das Enzym-Peptid-System erlaubte eine direkte Untersuchung der Sequenzanforderungen zur Glutamylierung von Peptiden. Hierzu wurde die Sammlung der Tubulin-verwandten Peptide erweitert. Alle Peptide wurden in einer Konzentration von 0,1 mM mit partiell gereinigter Tubulin Polyglutamylase (1 μ g Fraktion II), 4 mM Glutamat und 2 mM ATP eingesetzt und die Produkte der Reaktion wie beschrieben (3.2.13) charakterisiert.

Die Ergebnisse der Peptid-Glutamylierungen sind in Abbildung 19 zusammengefasst: Eine Reduktion der Seitenkettenlänge bis zur monoglutamylierten Variante des α - und β -Peptids hatte keinen Einfluss auf die Effizienz der Glutamylierungsreaktion. Bis zu 5 und 6 zusätzliche Glutamatreste wurden in das verzweigte α 1E (Abbildung 19 C) und β 1E –Peptid (Abbildung 19 B) eingebaut. Automatischer Edman-Abbau

und Carboxypeptidase A-Behandlung bestätigten, daß die zusätzlichen Glutamat-Reste an die bestehenden Seitenketten angebaut wurden. Als nächstes wurde eine Reihe von Peptiden getestet, bei denen die Monoglutamat-Seitenkette mit unterschiedlichen Glutamatresten der Hauptkette verbunden war. Beim α -Peptid wurde die Seitenkette um +2 und -2 Reste gegenüber der ursprünglichen Position verschoben, während beim β -Peptid Verschiebungen von -3 und +9 versucht wurden. Alle Varianten mit einer verschobenen Seitenkette wurden als Substrate akzeptiert (Abb. 19 A,D), wobei allerdings insbesondere das β -Peptid mit einer weit an den C-Terminus verschobenen Seitenkette (β 1E (+9)) schlechter umgesetzt wurde, als die Variante mit der Seitenkette an der korrekten Position.

Allen bislang akzeptierten Substratpeptiden war ein Glutamatrest mit einer freien α -Carboxylatgruppe gemeinsam, der von der Seitenkette geliefert wurde, da der carboxyterminale Rest entweder ein Tyrosin (α) oder ein Alanin (β) war. Als nächstes wurde daher eine Reihe carboxyterminal verkürzter Peptide ohne Seitenkette getestet. Alle Peptide, die mit einem Glutamat-Rest endeten wurden als Substrate akzeptiert und automatische Sequenzierung bestätigte, daß die zusätzlichen Glutamatreste an den C-Terminus angefügt worden waren. So wurden beispielsweise die Peptide, die dem detyrosinierten α -Tubulin (α 0E (-Y)) oder dem Δ 2-Tubulin (α 0E (Δ 2)) entsprachen, um bis zu 3 weitere Glutamat-Reste verlängert. Beurteilte man die Glutamylierungseffizienz nach der maximalen Zahl der eingebauten Glutamat-Reste und nach der relativen Höhe der Peaks in der Massenspektroskopie, so war die Elongation der Peptide am Carboxyterminus weniger effizient als die Elongation der Seitenketten der verwandten Peptide. Im Gegensatz zu Peptiden mit einem C-terminalen Glutamat-Rest wurden Peptide, die mit einem Glycin (α 0E (Δ 3)) oder einem Aspartat (β 0E (-EA)) endeten, genauso wie die unmodifizierten vollständigen Peptide, vom Enzym nicht als Substrate akzeptiert (Abbildung 19 A).

Zusammenfassend kann man daher sagen, daß das Vorhandensein eines Glutamatrestes mit einer freien α -Carboxylatgruppe notwendig und hinreichend für die Akzeptanz eines Peptids durch die Tubulin Polyglutamylase war. Diese Sequenzanforderung wurde durch alle Peptide mit einer Glutamat-Seitenkette erfüllt, sowie durch diejenigen, die mit einem C-terminalen Glutamat endeten. In keinem Fall wurde ein internes Glutamat, das nur eine γ -Carboxylat-Gruppe zur Verfügung stellen konnte, als Substrat akzeptiert. Im untersuchten Enzym-Peptid-System wurde somit keine Initiation einer neuen Glutamat-Seitenkette durch die Bildung einer Isopeptidbindung („Verzweigungsaktivität“) beobachtet.

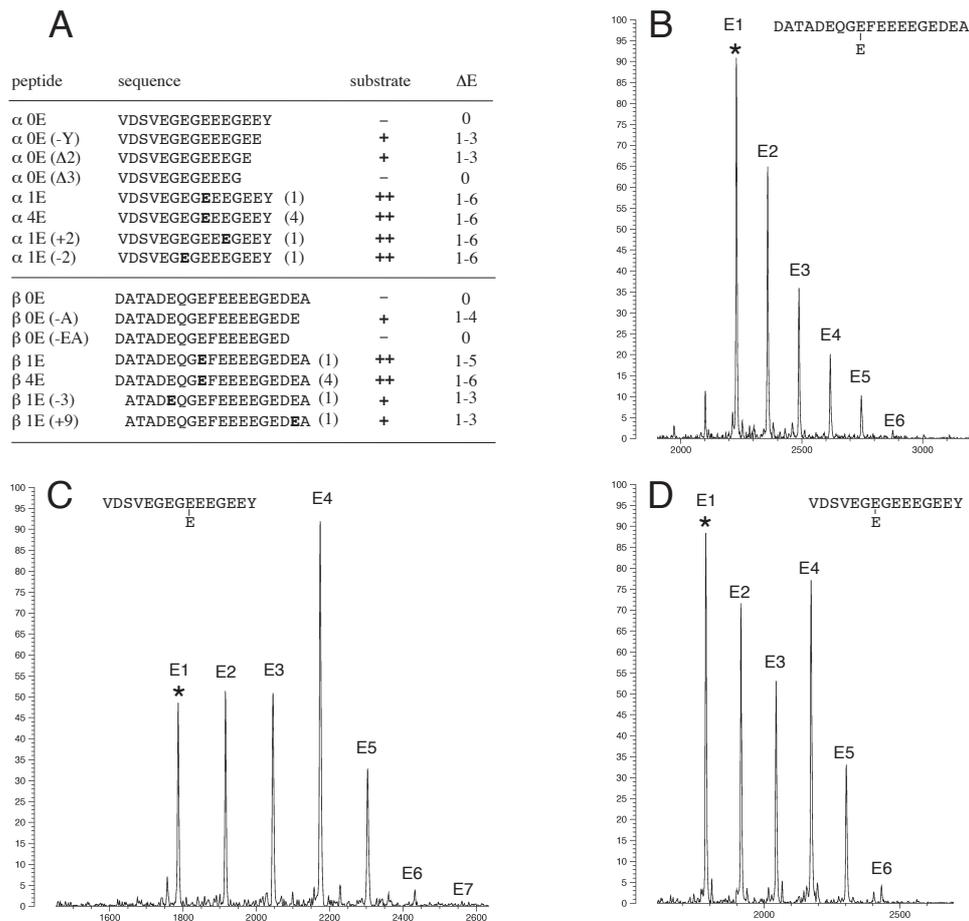


Abb. 19: Substratspezifität von *Crithidia* Tubulin Polyglutamylase in einem Peptid-System. **A:** Zusammenfassung der Resultate der Peptid-Assays. Fettgedruckte Buchstaben in der Sequenz kennzeichnen die Position der Oligoglutamat-Seitenketten. Die Zahl in Klammern hinter der Sequenz gibt die Länge der Seitenkette des Substrats an. Die Eignung als Substrat wird in der vorletzten Spalte bewertet, die letzte Spalte (ΔE) gibt die Zahl der angefügten Glutamat-Reste an. **B:** Massenspektrum des Reaktionsprodukts, das mit dem monoglutamylierten normalen β -Peptid erhalten wurde. Die Sequenz des Substrats ist oben angegeben, ein Stern markiert den entsprechenden Peak im Massenspektrum. Die zusätzlichen Peaks sind der Länge der Seitenkette entsprechend numeriert. Bis zu 5 zusätzliche Glutamatreste wurden inkorporiert. **C:** Massenspektrum des Reaktionsproduktes, das mit dem monoglutamylierten, normalen α -Peptid erhalten wurde. Bis zu 6 zusätzliche Glutamatreste wurden in diesem Fall inkorporiert. **D:** Elongation eines monoglutamylierten α -Peptids mit einer um zwei Positionen verschobenen Seitenkette (siehe Sequenz am oberen Bildrand). Bis zu 6 zusätzliche Glutamatreste wurden angefügt.

4.12.4 Anionenaustauschchromatographie zur Detektion der Glutamylierung von synthetischen Peptiden

Die Detektion der Glutamylierung von synthetischen Peptiden durch MALDI-TOF-MS beruht auf der Massenzunahme der enzymatisch verlängerten Peptide. Durch den Einbau weiterer Glutamatreste erhöht sich jedoch auch die Acidität der Peptide, so daß es möglich sein sollte, die Reaktionsprodukte durch eine hochauflösende Anionenaustauschchromatographie nachzuweisen. Um dies zu überprüfen, wurde das monoglutamylierte α - und β -Peptid (α 1E, β 1E) mit partiell gereinigter Tubulin Polyglutamylase inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquots des Reaktionsansatzes wie beschrieben (3.2.13) durch Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE-Säule analysiert.

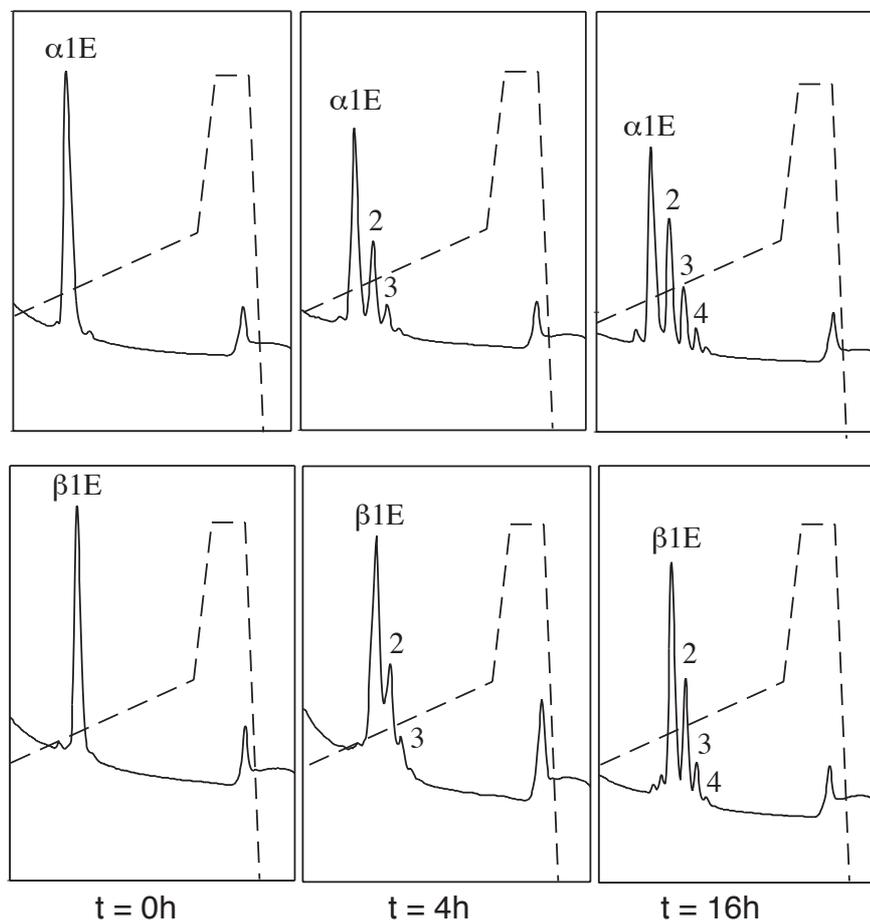


Abb. 20: Glutamylierung von synthetischen Peptiden durch *Crithidia* Tubulin Polyglutamylase, verfolgt durch Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE-Säule. Aliquots des Reaktionsansatzes mit dem monoglutamylierten α -Peptid (α 1E, obere Reihe) und dem monoglutamylierten β -Peptid (β 1E, untere Reihe) wurden zu den angegebenen Zeiten analysiert. Die Reaktion wurde durch Absorption bei 214 nm verfolgt. Peaks sind nach der Länge der Oligoglutamat-Seitenkette numeriert. Die Sequenzen der Peptide sind in Abbildung 18 angegeben.

Abbildung 20 zeigt, daß die Peptide auf der DEAE-Säule nach der Länge ihrer Seitenkette getrennt werden und daß das Absorptionsprofil direkt den Glutamylierungsprozess widerspiegelt. Die Identität der einzelnen Peaks wurde durch massenspektroskopische Untersuchung der einzelnen DEAE-Fractionen bestätigt. Man erkennt außerdem, daß die in den geringsten Konzentrationen vorliegenden Spezies, die durch die Massenspektroskopie noch detektiert wurden (Abb 19) im Absorptionsprofil nicht sichtbar sind. Weiterhin fällt auf, daß selbst nach 20 h Reaktionszeit das monoglutamylierte Substratpeptid noch immer die Hauptkomponente der Reaktionsmischung ist. Dies bestätigt die bereits zuvor beobachtete eher geringe Effizienz der Peptid-Glutamylierung.

Insgesamt stellt die Anionenaustauschchromatographie einen einfachen Assay zur Verfolgung der Peptid-Glutamylierung da, der jedoch weniger sensitiv als die Analyse durch Massenspektroskopie ist.

4.13 Immunologischer Nachweis der Monoglutamylierungs- („Verzweigungsaktivität“)

Bei den Versuchen zur Glutamylierung von synthetischen Peptiden wurde in keinem Fall die Initiation einer neuen Glutamat-Seitenkette durch Bildung einer Isopeptidbindung beobachtet. Dies konnte zum einen daran liegen, daß die verantwortliche Monoglutamylierungsaktivität in der verwendeten Enzympräparation nicht vorhanden war, oder aber die Peptide waren als Substrat ungeeignet und die Aktivität benötigte das intakte Tubulin-Molekül. Aus diesem Grund wurde nach einem anderen Verfahren zur Verfolgung der „Verzweigungsaktivität“ gesucht. Die Verwendung von Trypanosomen- oder Hirntubulin war hierbei ausgeschlossen, da das Tubulin hier bereits fast vollständig glutamyliert ist und der Einbau von Glutamat somit als Elongation bereits vorhandener Seitenketten vollzogen wird. Es wurde deshalb versucht, Tubulin isoliert aus *Saccharomyces cerevisiae* als Substrat im Glutamylierungstest zu verwenden. Das Hefetubulin wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml im 50 µl Standardassay eingesetzt und mit 1 µg partiell gereinigter Tubulin Polyglutamylase (Fraktion II) inkubiert. Abbildung 21 A zeigt das Ergebnis dieses Experiments: In Gegenwart von Hefetubulin war eine deutliche Inkorporation von Glutamat in TCA-fällbare Radioaktivität zu verzeichnen, während in Abwesenheit dieses Substrats nur ein marginaler Einbau gemessen wurde.

Um diese Reaktion näher zu charakterisieren wurde der Reaktionsansatz in der SDS-PAGE mit 6 M Harnstoff im Trenngel aufgetrennt und nach Western-Blot mit verschiedenen Tubulin-Antikörpern untersucht. Abbildung 21 B zeigt das Ergebnis dieses Experiments: α - und β -Tubulin der Hefe wurden unter den gewählten Bedingungen knapp voneinander getrennt und von den monoklonalen Antikörpern YL 1/2 und KMX-1, die spezifisch für α -, bzw. β -Tubulin sind, detektiert.

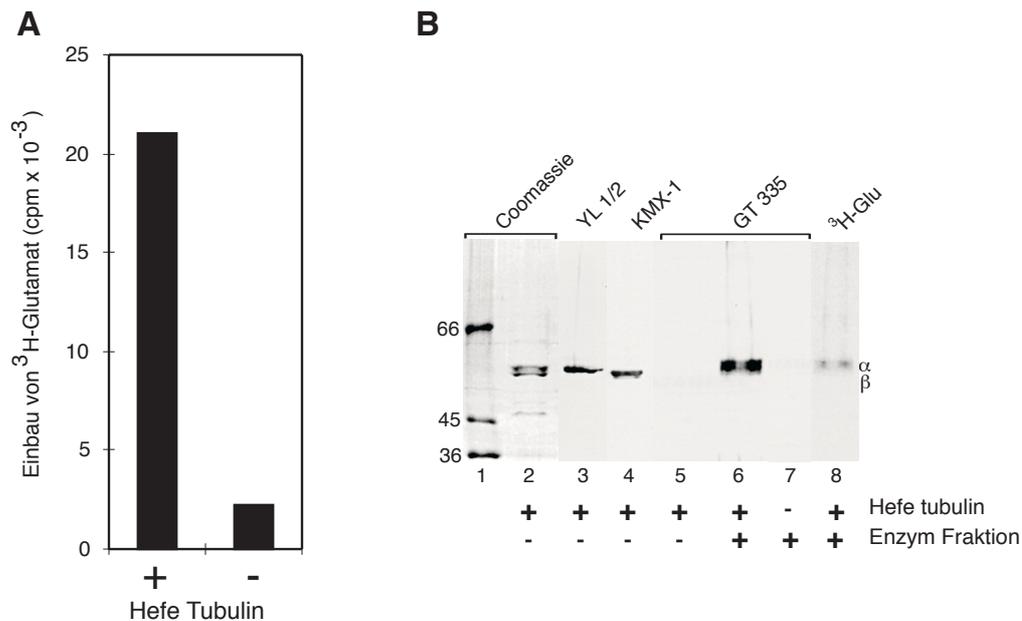


Abb 21: Immunologischer Nachweis einer Monoglutamylierungs- („Verzweigungs“-)Aktivität. **A:** Einbau von radioaktiv markiertem Glutamat in Hefetubulin gemessen mit dem Filterassay. **B:** Hefetubulin wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt (Bahn 2, Markerproteine in Bahn 1, die Molekulargewichte sind in kDa angegeben) und α - und β -Bande wurden in Immunblots (Bahn 3 und 4) mit den monoklonalen Antikörpern YL 1/2 (α) und KMX-1 (β) angefärbt. Der glutamylierungsspezifische Antikörper GT335 erkennt unbehandeltes Hefetubulin nicht (Bahn 5), sondern erst nach Inkubation mit einer partiell gereinigten Glutamylase-Fraktion aus *Crithidia* (Bahn 6). Kontroll-Blot der Enzym-Fraktion, die ohne Hefetubulin im Standardassay inkubiert wurde auf Bahn 7. Bahn 8 zeigt eine parallele ^3H -Glu-Autoradiographie, die den Einbau von Glutaminsäure in Hefe- α -Tubulin demonstriert.

Im Gegensatz dazu wurde keine Reaktion mit dem glutamylierungsspezifischen Antikörper GT335 beobachtet, dieser erkennt ein Sequenzmotiv, das bereits durch monoglutamyliertes α -Tubulin geliefert wird (Wolff et al., 1992). Diese Situation änderte sich jedoch, als das Hefetubulin zuvor mit partiell gereinigter Polyglutamylase behandelt wurde: GT335 detektierte nun die α -Tubulin-Bande (Bahn 6), während ein Kontrollblot mit der Enzymfraktion alleine keine Reaktion mit GT335 ergab (Bahn 8). Dies zeigte, daß die Enzymfraktion kein endogenes Trypanosomen-Tubulin mehr enthielt, das mit GT335 reagieren würde. Eine parallele Autoradiographie von Hefetubulin, das mit ^3H -Glutamat und Enzym behandelt wurde, zeigte, daß der Gewinn der GT335-Reaktivität auf den Einbau von Glutaminsäure in das Hefe- α -Tubulin zurückzuführen war (Bahn 8). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, daß gereinigtes Hefetubulin nicht glutamyliert ist und daß eine Aktivität in der Enzymfraktion aus *Crithidia* vorhanden ist, die den ersten Glutamatrest einer neuen Seitenkette durch die Bildung einer Isopeptidbindung einführen kann.

4.14 Hyperglutamylierung von Hirntubulin durch *Crithidia* Tubulin polyglutamylase

Die bisherigen Versuche zur Glutamylierung von Hirntubulin mit *Crithidia* Tubulin Polyglutamylase waren bei einer limitierenden Glutamat-Konzentration ($2,3 \mu\text{M} \ll K_m(\text{Glu})$) zur Maximierung des radioaktiven Signals für die Autoradiographie durchgeführt worden. Zur Bestimmung der maximalen Einbaurrate und zur peptidchemischen Analyse der Glutamylierungsprodukte wurde das Tritium-markierte Glutamat mit unmarkierter Glutaminsäure versetzt und in einer Endkonzentration von 4 mM im Standardassay eingesetzt. Parallele Ansätze wurden zu den angegebenen Zeitpunkten abgestoppt und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt. Unter Berücksichtigung der Zähleffizienz konnte die Stoffmenge an inkorporiertem Glutamat errechnet und als Verhältnis Stoffmenge inkorporiertes Glutamat zu Stoffmenge Tubulin-Dimer im Reaktionsansatz angegeben werden. Abbildung 22 A zeigt, daß die Einbaukurve hyperbolisch verläuft. Während die Einbaurrate über die ersten 4 Stunden in etwa linear mit der Zeit verläuft, flacht die Kurve danach ab und zeigt eine maximale Inkorporation von etwa 70 mol Glutamat pro mol Tubulin-Dimer nach 20 h Reaktionszeit.

Aliquots der Reaktionsmischung, die zum Zeitpunkt $t = 0$ und nach 16 h abgenommen und in der SDS-PAGE analysiert wurden, zeigten eine auffällige Reduktion der elektrophoretischen Mobilität des Tubulins durch Polyglutamylierung (Abb 22 B). Coomassie-gefärbte Banden wurden aus dem Gel elektroeluiert, mit Endoproteinase LysC (α -Tubulin) bzw. BrCN (β -Tubulin) verdaut und die sauren carboxyterminalen Peptide durch Anionenaustauschchromatographie und Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Massenspektroskopische Analyse der verschiedenen HPLC-Fractionen zeigte eine ausgiebige Modifikation der Peptide durch Polyglutamylierung. Bis zu 31 zusätzliche Glutamatreste wurden für die α -Peptide gefunden. Abbildung 22 C zeigt das Massenspektrum einer Fraktion, die detyrosinierte α -Peptide mit 8-27 zusätzlichen Glutamatresten enthält. Automatische Sequenzierung dieser Fraktion detektierte nur eine einzelne Glutamat-Seitenkette, die an der erwarteten Position Glu-445 lokalisiert war. Die hochglutamylierten α -Peptide wurden sowohl in tyrosinierter, wie auch in detyrosinierter Form gefunden. Ein Teil der α -Peptide war außerdem durch Phosphorylierung an Serin-439 modifiziert, wie bereits unter 4.12.2 für das synthetische α -Peptid beschrieben. Während die häufigsten Varianten 15-17 zusätzliche Glutamatreste trugen, wurde auch ein geringer Anteil des unmodifizierten Peptids, sowie Varianten mit kürzeren Seitenketten gefunden. Im Gegensatz hierzu enthält Tubulin aus Säugerhirn bis zu 4 oder 6 zusätzliche Glutamatreste pro α - oder β -Tubulin-Molekül (Edde et al., 1990, Rüdiger et al., 1995, Redecker et al, 1998).

In einem weiteren Experiment wurden die carboxyterminalen Peptide durch Verdau direkt aus der Glutamylierungsreaktion erhalten und die präparative SDS-PAGE weggelassen. Unter diesen Versuchsbedingungen wurden durch Massenspektroskopie noch höhere Glutamylierungsraten gefunden: Sowohl α -, als auch β -Peptide wurden

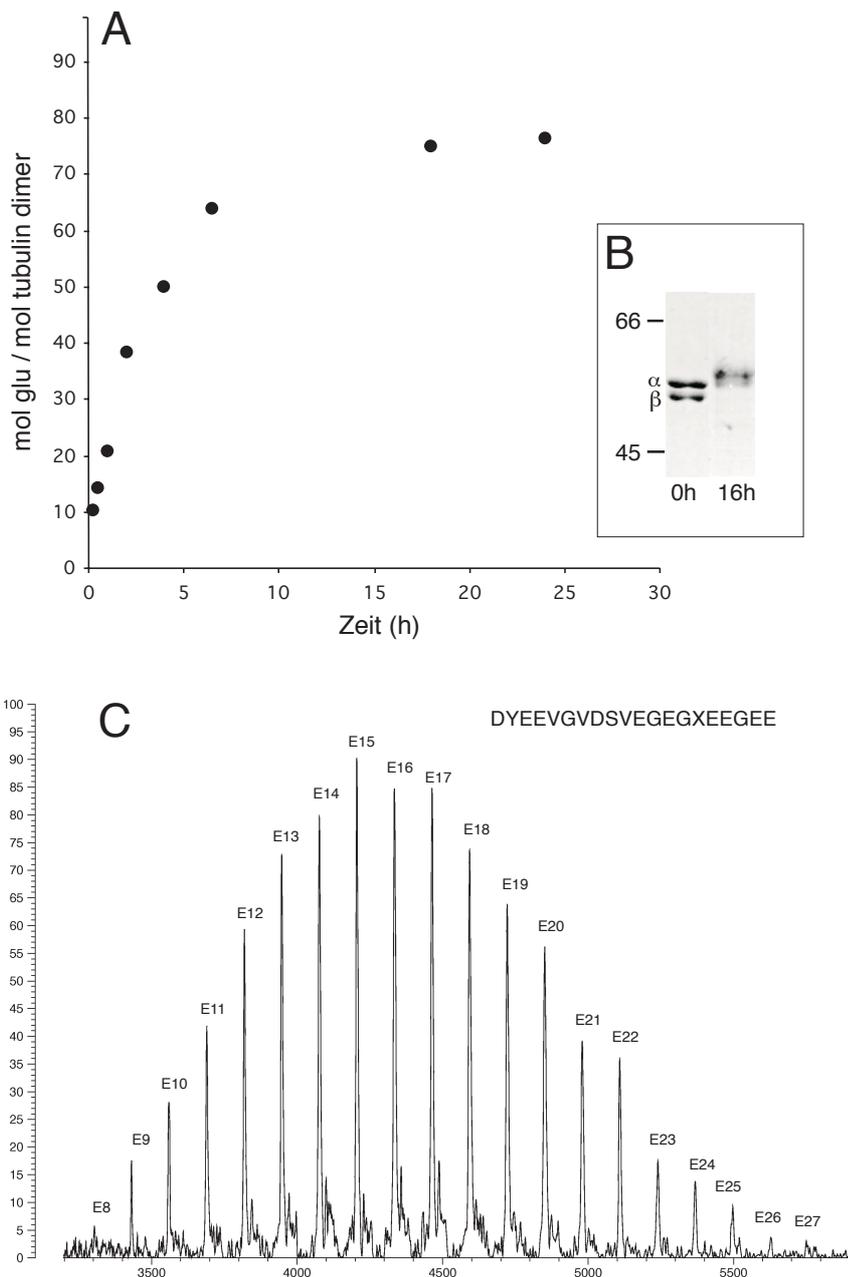


Abb.22: Hyperglutamylierung von Säugerhirn-Tubulin katalysiert durch *Crithidia* Tubulin Polyglutamylyase. **A:** Zeitverlauf der Tubulin Glutamylierung verfolgt durch den Einbau von radioaktiv markierter Glutaminsäure und ausgedrückt als Zahl der Glutamatreste, die pro Tubulin-Molekül angefügt wurden. **B:** SDS-PAGE von normalem und hoch glutamyliertem Hirntubulin, das durch eine 16 h Behandlung mit dem *Crithidia* Enzym erhalten wurde. Bemerkenswert ist die geringere Mobilität der α - und β -Tubulin-Banden nach Glutamylierung. **C:** Massenspektrum der C-terminalen Peptide von glutamyliertem α -Tubulin, erhalten durch Verdau mit Endoproteinase LysC. Das Ergebnis der automatischen Sequenzierung ist oben angegeben. Die Varianten haben Seitenkettenlängen zwischen 8 und 27 Glutamatresten. Sie leiten sich vom detyrosinierten α -Tubulin ab und zeigen ausserdem vollständige Phosphorylierung des einzelnen Serinrestes. Das X in der Sequenz kennzeichnet die Position der Glutamat-Seitenkette, sie entspricht Glutamat-445.

und die Lokalisation der Epitope der beiden verwendeten Antikörper. Hierbei umfasst das Tub2.1-Epitop die Reste 436 – 442 und liegt damit in unmittelbarer Nähe der Position des modifizierten Glutamat-Restes Glu-435. Im Immunblot ist beim glutamylierten Tubulin wie bereits beschrieben ein Shift zum höheren Molekulargewicht in der SDS-PAGE zu bemerken (Abbildung 23 B). Ausserdem wird das ausgiebig glutamylierte Tubulin von beiden Antikörpern deutlich schlechter erkannt als im unbehandelten Parallelansatz. Insbesondere die Bindung des Antikörpers Tub 2.1 ist durch das Anfügen der voluminösen, bis zu 50 Reste umfassenden, Seitenkette soweit inhibiert, daß das Tubulin im Immunblot kaum noch erkannt wird.

4.15 Identifizierung von p40 als trypanosomales La-Protein

4.15.1 Datenbanksuche und cDNA-Klonierung

Aufeinigung der Tubulin Polyglutamylase über eine Anionenaustauschchromatographie im dritten Schritt der Präparation führte zu einer starken Anreicherung eines Polypeptids von etwa 40 kDa. Zur Überprüfung der Identität dieses Proteins sollte versucht werden, die korrespondierende cDNA mit Hilfe von Sequenzinformation aus einem Verdau der entsprechenden Proteinbande zu isolieren. Mehrere Präparationen wurden gesammelt, in der SDS-PAGE aufgetrennt und die entsprechende 40 kDa-Bande ausgeschnitten. Nach in-situ-Verdau mit Endoproteinase LysC wurden die Peptide über eine HPLC gereinigt und sequenziert. Neben einem Peptid, das von einer Kontamination durch humanes Keratin herrührte, wurden von vier Peptiden (Lys12, Lys18, Lys26, Lys4) brauchbare Sequenzen erhalten:

Lys12	KFAAAPPEYDGVQLTAQM
<i>T.b</i> 39C13	FQKAPPMYDDVQLTAEM
Lys18	KDAPAESTRKPSVVFVFGNSEEAA
<i>T.b</i> 39C13	KDAPPESRTTDPVVFVFNSSSEEAA
Lys26	KEEALIIGQDAEXAF
<i>T.b</i> 39C13	KESALLIFQDTQ
Lys4	KMVESVQTRAATLQGTQP
<i>T.b</i> 39C13	KMVADLKSRRGTTLNGKQP

Tab.2: Aufstellung der sequenzierten Peptide von *Crithidia* p40 und der entsprechenden vorhergesagten Aminosäuresequenz des *T.brucei* EST-Klons 39C13.

Mit den *Crithidia*-Peptiden wurde die Datenbank des Genomprojektes (The Institute of Genomic Research, TIGR) der verwandten Spezies *Trypanosoma brucei* durchsucht. Es zeigte sich dabei eine grosse Ähnlichkeit der Peptidsequenzen mit der vorhergesagten Aminosäuresequenz eines EST-Klons mit der Bezeichnung 39C13 (TIGR Klon Nr. GATPW13TF). Die Aminosäuresequenzen dieses Klons sind in Tabelle 2 unterhalb der zugehörigen *Crithidia*-Sequenzen angegeben. Alle vier Peptide sind Bestandteil eines offenen Leserahmens des Klons 39C13, die Ähnlichkeit mit den *Crithidia*-Sequenzen bewegt sich zwischen 82% Sequenzidentität für das Peptid Lys18 und 50% Sequenzidentität für Peptid Lys4. Der überlappende EST-Klon 49M15 (GATRE75TR) enthielt die Peptide Lys12, 26 und 4. Er erweiterte den offenen Leserahmen bis zu einem Stopcodon. Da in 5'-Richtung kein überlappendes EST-Klon gefunden wurde, musste der offene Leserahmen mit folgendem experimentellem Ansatz vervollständigt werden:

1 µg Gesamt-RNA aus *T. brucei* wurden unter Verwendung eines oligo-dT-Primers revers transkribiert und die so erhaltene cDNA als Matrize in der folgenden PCR

eingesetzt. Das gesuchte 5' Ende wurde dann mit Hilfe eines sequenzspezifischen antisense-Primers (SW 24: 5'-GCATTGCACGATCCACAATTTCTTCTCC-3') und eines „spliced leader“-Primers amplifiziert, der identisch mit einer gemeinsamen Sequenz am 5'-Ende aller *T.brucei* mRNAs ist (SL: 5'-GCGGCCGCGC-TATTATTAGAACAGTTTCTGTACTATATTG-3', eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen). Das Haupt-PCR-Produkt von 1kb wurde über ein Agarosegel gereinigt und in den Vektor pCR2.1 kloniert. Die Sequenzierung bestätigte, daß dieser cDNA-Klon den offenen Leserahmen bis zu einem potentiellen Startcodon erweiterte. Ein weiterer EST-Klon aus der TIGR-Datenbank mit der Bezeichnung 1H4 (GATAA88TPB) überlappte mit dem 5'-Ende der isolierten cDNA und bestätigte das Startcodon. Dieser Klon überlappte jedoch nicht mit dem ursprünglichen Klon 39C13 und wurde daher bei der Datenbank-Suche zunächst nicht gefunden. Mit Hilfe der neu etablierten Sequenz konnten die genspezifischen Primer SW 33 (5'-CCCGGGATGCCACTTTCCTCCGAGAACAAGCAG-3', unterstrichen ist eine *SmaI*-Restriktionsschnittstelle) und SW 34 (5'-GCGGCCGCTTATTCACGTGACCGCTTGTGTCCTCG-3', unterstrichen ist eine *NotI*-Schnittstelle) synthetisiert werden, die zur Amplifikation des kompletten offenen Leserasters verwendet wurden. Abbildung 24 fasst die Vorgehensweise bei der Isolierung der p40-cDNA schematisch zusammen.

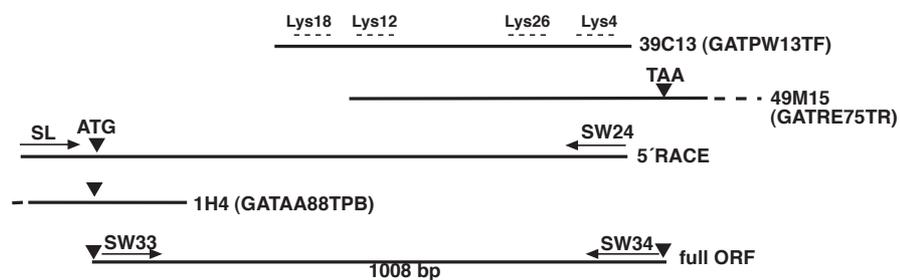


Abb.24: Schematische Darstellung der Klonierung des *T.brucei* La proteins. EST-Klon 39C13 (GATPW13TF) enthält die sequenzierten Peptide Lys18, 12, 26 und 4 als Teil eines offenen Leserahmens. Der überlappende Klon 49M15 (GATRE75TR) erweitert das ORF zu einem Stopcodon. Eine 5'RACE-PCR mit einem spliced leader Primer und dem genspezifischen Primer SW24 ergab das 5'-Ende der Sequenz, ein weiterer überlappende EST-Klon (1H4, GATAA88TBP) bestätigte das Vorhandensein des Startcodons. Der vollständige Klon, der 1008 bp umfasste, konnte mit den genspezifischen Primern SW33 und SW34 amplifiziert werden.

4.15.2 Sequenzanalyse

Der komplette offene Leserahmen des *T. brucei*-Klons umfasst 1008 bp und kodiert für ein Protein von 335 Aminosäuren. Aus der Aminosäuresequenz ergibt sich ein Protein von 37,7 kDa mit einem errechneten isoelektrischen Punkt von pI = 9,4.

```

1      CGGCGCGCCGCTATTATTAGAACAGTTTCTGTACTATATTGGGAAAGGAAAAAAAAACAA
61     GAAGAATAAACAACTATGCCACTTTCCTCCGAGAACAAGCAGAAGTTGCAAAAGCAAGTG
1      M P L S S E N K Q K L Q K Q V
121    GAGTTCCTACTTCAGCGATGTGAATGTGCAGAGAGATATTTTCCTGAAGGGGAAGATGGCA
16     E F Y F S D V N V Q R D I F L K G K M A
181    GAAAACTGCTGAGGGTTTCGTCTCCCTGGAGACCCCTCTAACATTCAAGCGCGTGAATCTT
36     E N A E G F V S L E T L L T F K R V N S
241    GTTACGACGGATGTGAAGGAAGTCGTAGAAAGCAATTCGTCCAGCGAAAAGCTTGTCTTG
56     V T T D V K E V V E A I R P S E K L V L
301    TCTGAGGATGGCCTTATGGTGCGCCGAGGATCCGCTTCCGGAATCCATCCAAACCGAT
76     S E D G L M V R R R D P L P E S I Q T D
361    CACCAAAACCGTGTATGTGAAACCTGTACCACCCACAGCAACACTCGAGCAACTTACCGAA
96     H Q T V Y V K P V P P T A T L E Q L T E
421    TTCTTCAGCAAAACACGGTACGGTGCAGGCGGTATGGCGCCGTACTTTGCTGGGAAAAAG
116    F F S K H G T V Q A V W R R Y F A G K K _
481    GACGCACCTCCAGAGAGCCGCACAAAGCCCTCTGTATTTGTTGTGTTCAACAGTAGTGAA
136    D A P P E S R T K P S V F V V F N S S E
541    GAGGCGGAGGCGTTCCAAAAGGCCCTCCCATGTACGACGATGTGCAACTTACAGCAGAG
156    E A E A F Q K A P P M Y D D V Q L T A E
601    ATGAAAAACAAGTACTTGGAGCGTAAGCGGGAAGAAATAGCAGCAAAAGAAGTCAAGTAAA
176    M K T T Y L E R K A E E I A A K K S S K
661    ACAAGAACGGCGGTGCAACTGACAGGGCGGAGAAGAAAACCCACCCATGCCGCTTGGA
196    T K N G G A T D R A E K K T P P M P L G
721    AGTAGCTATCGTGTAAGCGGTTGTGGGGAGATGGAGAGTTTCGCCACGGTGAAGAATCTA
216    S S Y R V S G C G E M E S F A T V K N L
781    TGGCCTGTGGAGGAGCAGAAGGGGATTCGTTACGTATTTATGCCGATAAGGAAAGCGCA
236    W P V E E Q K G I R Y V F M P D K E S A
841    CTGCTCATATTTTCAGGATACTCAGACAGGAGAAAAGATGGTGGCGGACTTAAAGAGCCGT
256    L L I F Q D T Q T G E K M V A D L K S R
901    GGTACAACCTTAACGGTAAACAACCGGATATAAAGAAGTTGGAGGGTGACGATGAACAA
276    G T T L N G K Q P D I K K L E G D D E Q
961    AAGCTATTGGAAAATGTGGAGAAGGAAATTTGTGGATCGTGCAATGCAGAGTGCGAATAAT
296    K L L E N V E K E I V D R A M Q S A N N
1021  CGTTCGGGGCGAGGAGGACGAGGTGGGCGAGGGGGCCGAGGACACAAGCGGTCACGTGAA
316    R S G R G G R G G R G G R G G R G H K R S R E
1081  TAA
336   *
```

Abb.25: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der *T. brucei* La cDNA. Die Nukleotid-sequenz ist vom 5'Ende der cDNA, die durch RACE-PCR erhalten wurde, an nummeriert. Die spliced leader-Sequenz ist unterstrichen (durchgezogene Linie) und die Aminosäuresequenz ist vom Start-ATG an nummeriert. Die mögliche ATP-Bindungsstelle (P-Loop) ist eingerahmt und die Aminosäuren, die den sequenzierten Peptiden entsprechen, sind unterstrichen (gestrichelte Linie). Die dargestellten Sequenzdaten sind in der GenBank unter der Nummer AJ252010 abzurufen.

Die Sequenz zeigt ausserdem einen hohen Anteil der geladenen Aminosäuren Lysin und Glutamat, die jeweils einen Anteil von 10% am Gesamtprotein haben.

Eine Datenbanksuche mit der kompletten *T.brucei* Sequenz zeigte eine deutliche Homologie zu La-Protein Sequenzen aus *Drosophila melanogaster* und anderen Spezies, unter anderem Hefe, *Xenopus* und Mensch. Das La („Lupus Antigen“-) Protein wurde ursprünglich als Autoantigen in Patienten entdeckt, die an den Autoimmunkrankheiten systemischer Lupus erythematosus und Sjögren's Krankheit leiden (van Venrooij und Pruin, 1995). Bei La-Proteinen scheint es sich um multifunktionale RNA-Bindungsproteine zu handeln, die in einer Vielzahl von Prozessen an der Bindung und Stabilisierung von RNAs beteiligt sind. Während die Proteine aus *Trypanosoma* und *Drosophila* insgesamt nur zu 26% identisch sind, ist die Homologie in der aminoterminalen Domäne (Reste 15-85 in der *T.brucei* Sequenz) besonders hoch, hier sind beide Proteine zu 52% identisch. Abbildung 25 zeigt ein Alignment des trypanosomalen Proteins mit La-Protein Sequenzen aus Mensch, *Xenopus*, *Drosophila* und *Saccharomyces cerevisiae* (Lhp1p). Das *T.brucei* Protein zeigt die allgemeine Domänenstruktur der La-Proteine: Die aminoterminalen La-Domäne, die auch in einigen Proteinen zu finden ist, die ansonsten nicht mit La-Proteinen verwandt sind (Sobel und Wolin, 1999), ist die am besten konservierte Region innerhalb dieser Proteine. Die zentrale RNA-Erkennungsdomäne ist durch das Vorhandensein der RNA-Erkennungsmotive RNP-1 (Reste 143-151 von *T.brucei* La) und RNP-2 (Reste 97-105) charakterisiert. Sie ist schlechter konserviert als die La-Domäne. Die carboxyterminale Region schliesslich ist normalerweise hoch geladen und zeigt einen extrem basischen Bereich (Reste 316-335) im *T.brucei* Protein. Sie enthält ausserdem eine mögliche ATP-Bindungsstelle, die von den Aminosäuren 276-283 gebildet wird. Diese Sequenz unterscheidet sich vom klassischen P-Loop A/GXXXXGKT/S nur durch den Austausch von Serin/Threonin gegen Glutamin in der letzten Position der Konsensussequenz. Das Vorhandensein einer ATP-Bindungsstelle wurde ebenfalls für das humane La-Protein berichtet (Reste 333-340, Topfer et al., 1993) und ist auch im *Xenopus*-Protein zu verzeichnen (Reste 334-341). Sie fehlt jedoch sowohl im *Drosophila*-, als auch im Hefe-Homolog. Die Tatsache, daß das trypanosomale La-Protein durch ein Reinigungsschema mit einer ATP-Affinitätssäule angereichert wurde, zeigt, daß es sich vermutlich um eine funktionale ATP-Bindungsstelle handelt.

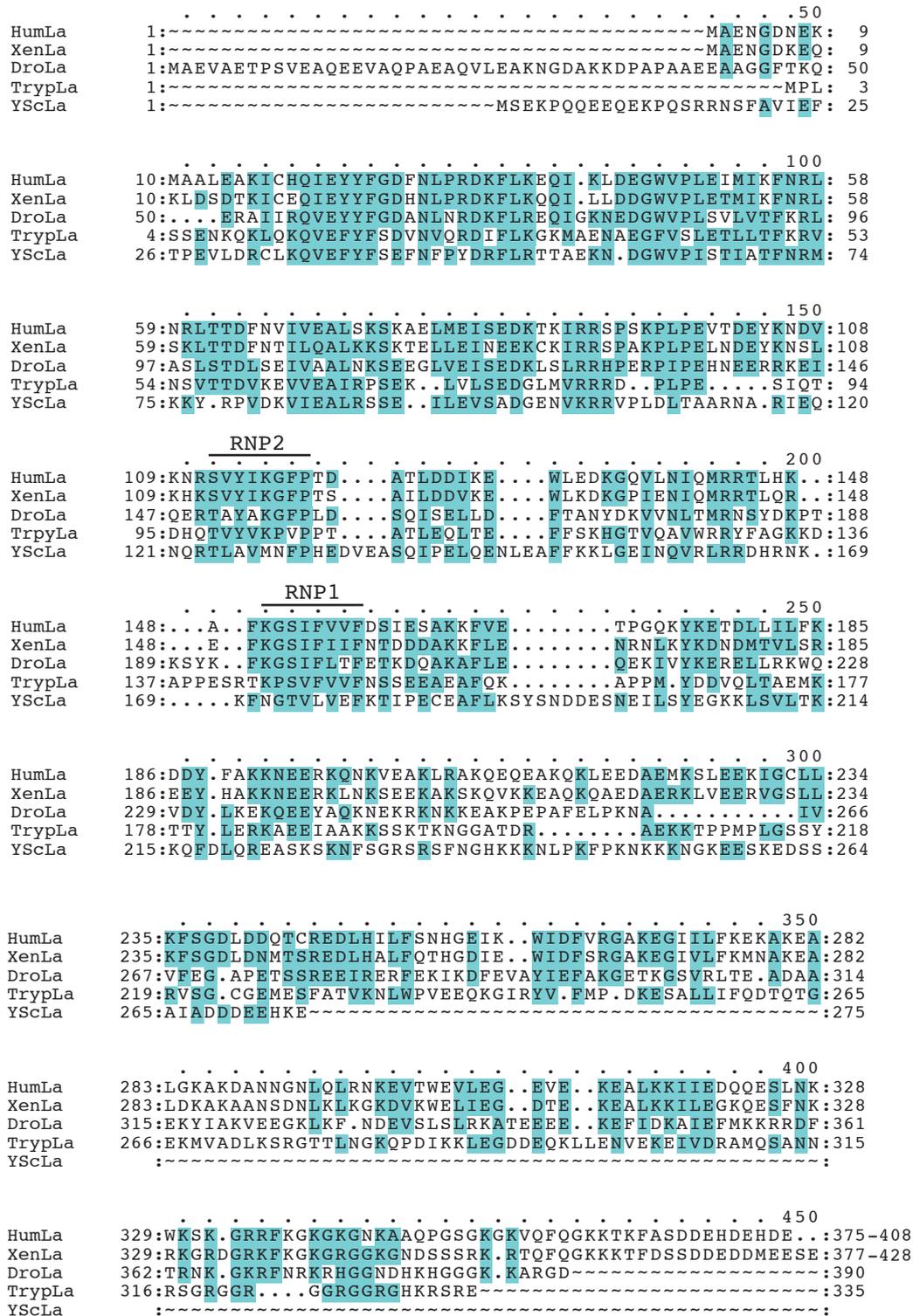


Abb.26: Alignment von La-Proteinen. La-Protein Sequenzen aus Mensch (HumLa, P05455), *Xenopus laevis* (XenLa, P28048), *Drosophila melanogaster* (DroLa, P40796), *Trypanosoma brucei* (TrypLa, diese Arbeit) und *Saccharomyces cerevisiae* (YScLa, Lhp1p, P33399) wurden mit dem Pileup-Programm verglichen (GCG-Paket, Madison, USA). Ähnliche oder identische Reste, die in wenigstens 3 der 5 Proteine konserviert sind, wurden eingefärbt. Die RNP1 und -2 RNA-Erkennungsmotive sind oberhalb der Sequenz gekennzeichnet.

4.15.3 Rekombinante Expression und RNA-Bindungstest

Der komplette offene Leserahmen des *T.brucei* La Proteins wurde in die SmaI/NotI-Schnittstelle des pGEX-4T-1 Vektors zur Expression als GST-Fusionsprotein kloniert. *E. coli* BL21-Zellen wurden mit dem rekombinanten pGEX-Plasmid transformiert und das Fusionsprotein durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose gereinigt. Durch Thrombin-Verdau wurde das La-Protein vom GST-Anteil getrennt. Abbildung 27 A zeigt die Expression und Aufreinigung in der 10% SDS-PAGE. Ein 65 kDa-Fusionsprotein wurde im induzierten Ansatz stark exprimiert. Das Eluat nach dem Thrombin-Verdau wurde durch ein Polypeptid von 40 kDa dominiert, N-terminale Sequenzierung bestätigte, daß es sich hierbei um das *T.brucei* La Protein handelte. Im rekombinanten Protein geht dem Start-Methionin dabei die Sequenz GSPEFPG voraus, die durch den Expressions-Vektor kodiert wird. Die Präparation des rekombinanten La-Proteins ist zu etwa 80% homogen und das Protein läuft bei einem etwas grösseren Molekulargewicht als den vorhergesagten 37,7 kD. Dieses aberrante Laufverhalten im SDS-Gel wurde auch schon beim Hefe- und *Drosophila* La-Protein beobachtet (Yoo und Wolin, 1994) und ist wahrscheinlich auf die hochgeladene C-terminale Domäne zurückzuführen

Um die Fähigkeit zur RNA-Bindung zu testen, wurden unterschiedliche Mengen des rekombinanten La-Proteins mit MNV 11 RNA (T7-Transkript, 86 Nukleotide, Biebricher, 1987) in La-Puffer bei 27°C für 20 min inkubiert und die Proben auf einem nicht-denaturierenden 10% Polyacrylamidgel analysiert, das anschliessend mit

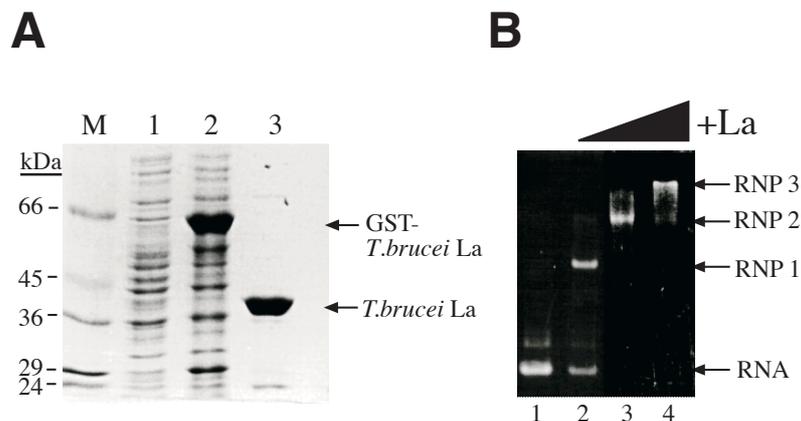


Abb. 27: A: Rekombinante Expression des *T.brucei* La-Proteins analysiert durch SDS-PAGE. Bahn M: Markerproteine; Bahn 1: Total Zellysat von *E.coli* BL21-Zellen; Bahn 2: Zellysat nach Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG; Bahn 3: Eluat nach Thrombin-Verdau von GST-La auf der Glutathion-Affinitätssäule. B: RNA-Bindung von rekombinanten La-Protein in einem Shift-Assay. Ein 86 Nukleotide umfassendes T7-Transkript wurde mit steigenden Mengen (Bahn 2: 1mg; Bahn 3: 5 mg; Bahn 4: 9 mg) La-Protein inkubiert und auf einem nicht-denaturierenden 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid erkennt man die Bildung langsam wandernder RNA-Proteinkomplexe (RNP 1-3).

Ethidiumbromid gefärbt wurde. Abbildung 27 B zeigt die Abnahme der elektrophoretischen Beweglichkeit nach Addition des rekombinanten La-Proteins aufgrund der Bildung von RNA-Protein-Komplexen. Mit steigendem Zusatz an La-Protein werden immer langsamer wandernde Spezies beobachtet und es scheint eine genau definierte Stöchiometrie der RNA-Bindung vorzuliegen. Ausserdem zeigte das rekombinante *T.brucei*-Protein eine weitere typische Eigenschaft von La-Proteinen, nämlich die Bindung an poly(U)-Sephrose, die die Bindung an die polyU-Schwänze von RNA-Polymerase III-Transkripten imitiert.

4.16 Klonierung und Charakterisierung von p54

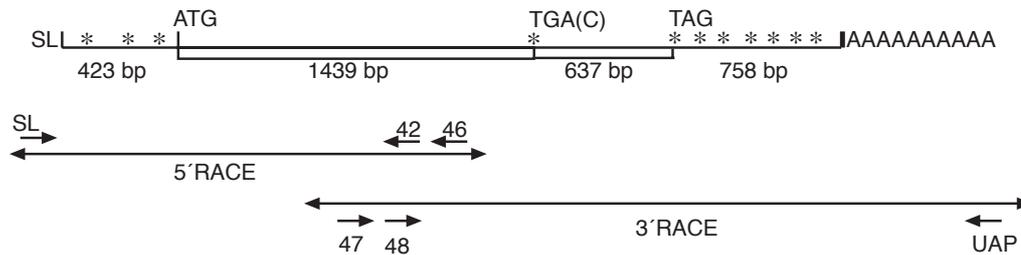
4.16.1 Klonierung der p54-cDNA

Zur Gewinnung von Sequenzinformationen wurden vier Enzym-Präparationen (entsprechend einem Ausgangsmaterial von 108 l *Crithidia*-Kultur) mit der Hydroxapapptitochromatographie als finalem Schritt verwendet. Die p54-Bande wurde ausgeschnitten und mit LysC verdaut. Mit der erhaltenen Sequenzinformation wurden degenerierte Antisense-Primer synthetisiert, die in verschiedenen Kombinationen in PCRs gegen den *Crithidia*-Spliced Leader Primer (SL 5'-CGCTATAATAA-GTATCAGTTTCTGTACTTTATTG-3') eingesetzt wurden. Dabei zeigte sich, daß folgende Kombination zur Amplifikation des korrekten PCR-Produkts führte: In der ersten PCR-Runde wurde der auf dem Peptid DVFPVPEV basierende Primer SW46 (5'-ACYTCIGGIACIGGRAANACRTC-3') gegen SL eingesetzt und das Produkt in einer zweiten PCR mit dem Primer SW42 (Peptid SETIPPKD, 5'-TCYTTIGGIGGIATNGTYTCNGA-3') gegen SL reamplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt von 1,5 kb wurde in den Vektor pCR2.1 kloniert und sequenziert. Basierend auf der so gewonnenen partiellen cDNA-Sequenz wurden zwei genspezifische Primer, SW47 (5'-AGCATGAAGGCGCTGCTGGACCCGC-3') und SW48 (5'-CGACG-CAGCAGCTGCTCCAGACAGAG-3') entworfen, die anschliessend in der 3'RACE-PCR zur Vervollständigung des cDNA-Klons eingesetzt wurden (3.4.16). Das erhaltene 3'RACE-Produkt von 1,7 kb wurde ebenfalls kloniert und vollständig sequenziert.

Abbildung 28 fasst die Klonierungsstrategie und die ermittelte cDNA-Struktur zusammen. Die spliced-Leader-Sequenz wird von einem 423 bp umfassenden 5'UTR gefolgt, dieses enthält drei Stopcodons im gleichen Leserahmen wie das Start-Methionin. Es folgt ein 1439 bp umfassender offener Leserahmen, der durch ein TGA-Stopcodon begrenzt wird. Interessanterweise folgen nun 637 bp im gleichen Leserahmen, die durch kein weiteres Stopcodon unterbrochen werden, bevor dieser Teil des 3'UTR durch ein TAG-Stopcodon abgeschlossen wird. Bis zum poly-A-Schwanz folgen nun noch 758 bp, die weitere 6 Stopcodons in diesem Leserahmen enthalten.

Der offene Leserahmen kodiert für ein Protein von 479 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 54,9 kDa und einem berechneten isoelektrischen Punkt von pI = 6,94. UGA-Stopcodons sind in verschiedenen Untersuchungen als Ziele alternativer Kodierungsereignisse aufgefallen (Low und Berry, 1996). Hierzu zählen die Inkorporation von Selenocystein, eine Verschiebung des Leserahmens oder ein Durchleseereignis („translational readthrough“). Im Säugersystem konnte dabei gezeigt werden, daß die Termination der Translation dann besonders ineffizient ist, wenn UGA von einem Cytosin gefolgt wird, wie dies in der p54-mRNA auch der Fall ist. Nimmt man im vorliegenden Fall eine Inkorporation von Tryptophan

A



B

```

1  MPTNKDDKQS NPSLELLNQY AKYFPHVLFT SQESLEKYAS KMDPDAYRNC
51  VDLQEGEPEP ESTNPRDHMY VLTTLVGRNP TTAAFVATRG SDPSEKVVAK
101 FVMLNDDKQA TYARSELHCL AACTHFGIVK HYDDFKSEDK LLLIMEYGSG
151 GDLNKQIKQR LKEHLPFOEY EVGLLFYQIV LALDEVHTRR MMHRDLKSAN
201 IFLMPTGIIK LGDFGFSKQY NDSVSLDVGS SFCGTPPYLA PELWERKRYS
251 KKADMWSLGV ILYELLTLHR PFKGPSQREI MQQVLYGKYD PFPCPVSASM
301 KALLDPLLSK DPEDRPTTQO LLQTEFMKYV TNLFQDIVRH SETIPPKDRE
351 EILKQLQESN ERAPLPSSIR YGVVSSQVTQ GGYLYKYGSD YRWKKRYFFI
401 GNGQLRISLS DNPESDGVAP KSVNLATVSD VFPVPEVYSO KHPNQLVIWF
451 NNGQKIAYA SSVEDRDMWI SKFHRACGM

```

Abb. 28: Klonierung von p54. **A:** Organisation der cDNA und Strategie zur Klonierung mittels 5' und 3'RACE-PCR. Für Details siehe zugehörigen Text. **B:** Abgeleitete Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens. Aminosäuren, die sequenzierten p54-Peptiden entsprechen, sind unterstrichen. Die vollständige cDNA-Sequenz ist dem Anhang zu entnehmen.

anstelle der Termination an, so wäre das Resultat dieses Durchlesens bis zum zweiten („starken“) UAG-Stop ein Protein von 79 kDa mit einem berechneten isoelektrischen Punkt von $pI = 9,4$.

4.16.2 Sequenzanalyse

Eine Datenbanksuche mit der erhaltenen p54-Aminosäuresequenz zeigte eine 90%ige Identität des Proteins mit einer Proteinsequenz, die im Rahmen des Genomprojektes der verwandten Spezies *Leishmania major* erhalten wurde und die als LNK-1 (für *Leishmania*-NIMA-verwandte Kinase-1) bezeichnet war. Abbildung 29 zeigt ein Alignment der *Crithidia*-Sequenz mit dem homologen *Leishmania*-Protein.

```

Crithidia p54 1 MPTNKDDKQSNPSLELLNQYAKYFPHVLFTSQESLEKYASKMDPPDAYRNC 50
                |||  | : . . | ||||| ||||| ||||| ||||| . || : | . : || : | : |
LNK-1 1 MPA.KEVEHGSASTELLNQYAKYFPHVLFTSQEAFEKHAATLDPEVYKTC 49
                .
51 VDLQEGEPPPESTNPRDHMYVLTTLVGRNPTTAAAFVATRGSDPSEKVVAK 100
                |||  | ||||| ||||| ||||| : ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
50 VDLPEGEESPEP.NPREHMYVLTTLVGRNPTTAAAFVATRGSDPSEKVVAK 98
                .
101 FVMLNDDKQATYARSELHCLAACHTFGIVKHYDDFKSEDKLLLIMEYGS 150
                ||||| : ||||| ||||| ||||| : ||||| : ||||| ||||| |||||
99 FVMLNDDRQATYARSELHCLAACKHFGIVKHFDDFKSDDKLLLIMEYGS 148
                .
151 GDLNKQIKQRLKEHLPFQEYEVGLLFYQIVLALDEVHTRRMMHRDLKSAN 200
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
149 GDLNKQIKQRLKEHLPFQEYEVGLLFYQIVLALDEVHSRRMMHRDLKSAN 198
                .
201 IFLMPTGIIKLGDFGFSKQYNDVSLDVGSSFCGTPYYLAPELWERKRY 250
                ||||| ||||| ||||| ||||| . ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
199 IFLMPTGIIKLGDFGFSKQYSDVSLDVASSFCGTPYYLAPELWERKRY 248
                .
251 KKADMWSLGVILYELLTLHRPFKGPSQREIMQOVLYGKYDPFPCPVASAM 300
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
249 KKADMWSLGVILYELLTLHRPFKGPSQREIMQOVLYGKYDPCPCPVSSSM 298
                .
301 KALLDPLLSKDPEDRPTTQQLLQTEFMKYVTNLFQDIVRHSETIPPKDRE 350
                . ||||| ||||| . : ||||| ||||| ||||| ||||| : ||||| ||||| |||||
299 QALLDPLLSKNPTEPPTTQQLLQTEFLKYVANLQDLVRHSETISPNDRA 348
                .
351 EILKQLOESNERAPLPSSIRYGVSSQVTQGGYLYKYGSDYRWKKRYFFI 400
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| . . ||||| ||||| ||||| ||||| : |
349 EILKQLOESGERAPLPSSIRYGVMTSQVTHGGYLYKYGSDCRWKKRYFYI 398
                .
401 GNGQLRISLSDNPESDGVAPKSVNLATVSDVFPVPEVYSQKHPNQLVIWF 450
                | . ||||| ||||| : ||||| . ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| : ||
399 GDGQLRISLSENPENDGVAPKSVNLETVGDVFPVPEVYSQKHPNQLVLF 448
                .
451 NNGQKIIAYASSVEDRDMWISKFHRACGM 479
                ||||| ||||| ||||| . . . ||||| ||||| ||||| |||||
449 NNGQKIIAYANTMEDRDMWISKFHRACGM 477

```

Abb. 29: Alignment von *Crithidia* p54 mit der *Leishmania* NIMA-verwandten Kinase-1 (LNK-1). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm BESTFIT (GCG-Paket) unter Verwendung der Standardparameter vorgenommen.

Die beiden Proteine zeigen eine Identität von 88,6% bei 92% Ähnlichkeit über die gesamte Sequenz. Unterschiede zeigen sich fast nur am N-Terminus innerhalb der ersten 50 Aminosäuren. Der namensgebende Begründer der Proteinfamilie, zu der beide Proteine zu zählen sind, ist der Zell-Zyklus-Regulator NIMA (für „never-in-mitosis-protein A“) aus dem filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans*. NIMA wurde in *Aspergillus* als Faktor identifiziert, der essentiell für den G2-M Übergang ist (Osamani et al., 1987). Aufgrund der Sequenz wurde NIMA als Ser/Thr-spezifische Proteinkinase identifiziert, die sich jedoch biochemisch von bisher bekannten Proteinkinasen deutlich unterschied (Lu et al., 1993). In der Folgezeit wurden zahlreiche weitere NIMA-verwandte Kinasen identifiziert, allein in Säugern gibt es mindestens 7 verschiedene.

Nach LNK-1 zeigen zwei NIMA-verwandte Kinasen aus *T. brucei*, NrkA und B, die größte Ähnlichkeit mit dem *Crithidia*-Protein. Dabei beträgt die Sequenzidentität allerdings nur 38,9 % in einem Intervall von 419 Aminosäuren, und ist in der katalytischen Domäne am größten. Abbildung 30 zeigt ein Alignment der katalytischen Domänen verschiedener NIMA-verwandter Kinasen, bei dem einige Besonderheiten der *Leishmania* (und damit auch der *Crithidia*)-Sequenz auffallen: Der deutlichste Unterschied ist in der glycinreichen Sequenz der Kinasesubdomäne I zu finden. Das innerhalb der Superfamilie eukaryontischer Proteinkinasen eigentlich invariante Glycin (entspricht Glycin-20 in NIMA, Hanks und Hunter, 1995) ist durch ein Asparagin ersetzt und auch das folgende, beinahe invariante, Glycin fehlt und wird durch ein Threonin ersetzt. Das Fehlen des Konsensusmotivs GXGXXG im *Leishmania* und *Crithidia*-Protein ist sehr ungewöhnlich. Diese Sequenz der Subdomäne I ist an der ATP-Bindung und Orientierung beteiligt (Hanks und Hunter, 1995). Im Gegensatz hierzu ist das invariante Lysin der Subdomäne II (K40 in NIMA) vorhanden. Mutation des Lysins zu einem Methionin führt bei NIMA zu einem Verlust der katalytischen Aktivität (Lu et al., 1993).

Die katalytische Domäne liegt bei den *Crithidia*- und *Leishmania*-Proteinen nicht wie bei den anderen NIMA-verwandten Kinasen unmittelbar am N-Terminus. Die N-terminale Sequenz beinhaltet stattdessen einen Abschnitt, der besonders reich an den Aminosäuren Prolin, Glutamat, Serin und Threonin ist (AS 55-65 bei *Crithidia*). Diese sogenannten PEST-Sequenzen sind in Proteinen zu finden, die einem rapiden Abbau unterliegen und gelten als Zielsequenzen für die Zerstörung des Proteins durch das 26S Proteasom (Rechsteiner et al., 1996). Mit Hilfe des Computerprogramms PEST-Find wurden die relativ hohen „PEST“-Werte von 9 bzw 12 für das *Crithidia* und das *Leishmania*-Protein gefunden, wobei Werte über 5 als signifikant gelten.

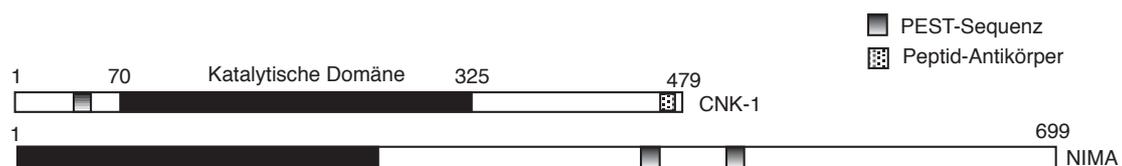


Abb.31: Schematische Darstellung der Domänenorganisation von *Crithidia* NIMA-verwandter Kinase-1 (CNK-1) und *Aspergillus* NIMA.

Auch das original NIMA-Protein aus *Aspergillus* hat zwei PEST-Sequenzen, die allerdings in der C-terminalen Domäne lokalisiert sind (Abb. 31). Ausschalten dieser PEST-Sequenzen führt zu einer hyperstabilen NIMA-Variante, die nicht, wie für einen korrekten Durchgang durch die Mitose notwendig, proteolytisch degradiert werden kann (Pu und Osmani, 1995).

4.16.3 Rekombinante Expression und Gewinnung polyklonaler Antikörper

Der komplette offene Leserahmen der *Crithida* NIMA-verwandten Kinase 1 (CNK-1) wurde mit Hilfe der Primer SW49 (5'-ACGGGGAATTCATGCCGACCAACAAGGATGACAAGCAG-3', *EcoRI*-Schnittstelle unterstrichen) und SW50 (5'-TTCCCGCGGCCGCTCACATGCCACAGGCGCGGTGAAAC-3', *NotI*-Schnittstelle) aus cDNA amplifiziert und in die *EcoRI/NotI*-Schnittstelle des Vektors pGEX-4T-1 zur Expression als GST-Fusionsprotein kloniert. Nach Abspaltung des GST-Fusionsanteils mittels Thrombin (Abbildung 32 A) wurde die rekombinante CNK-1 über eine Hydroxapatitchromatographie an einer CHT-2-Säule weiter gereinigt (Abbildung 32 B). Hierbei wurden dieselben Bedingungen wie im entsprechenden Schritt der Präparation der nativen Tubulin Polyglutamylase gewählt. Die rekombinante CNK-1 eluierte, genau wie das native Protein, bei 160 mM Natriumphosphat und die erhaltene Präparation war zu mindestens 90% homogen.

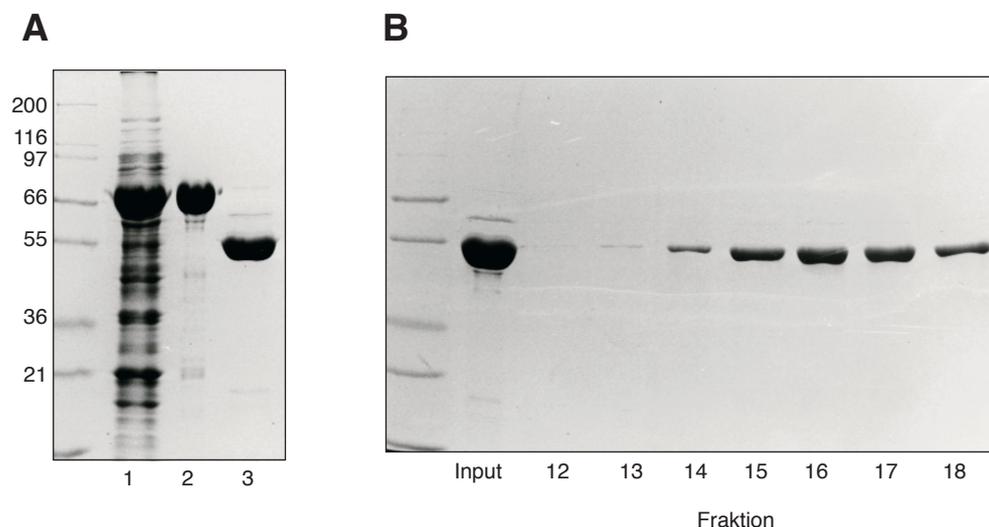


Abb.32: **A:** Rekombinante Expression von CNK-1 in *E.coli*. Bahn 1 Total-Zellysate nach Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG; Bahn 2: GST-CNK-1 nach Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose; Bahn 3: CNK-1 nach Thrombin-Spaltung. **B:** Reinigung von rek. CNK-1 durch Hydroxapatitchromatographie. Dargestellt ist das Ausgangsmaterial (Input) und Fraktionen, die bei etwa 160 mM Natriumphosphat aufgefangen wurden.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des rekombinanten Proteins wurden in-vitro-Phosphorylierungstests durchgeführt. Als exogenes Substrat wurde dabei Casein verwendet, da die Kinase-Aktivität gegenüber β -Casein ein typisches Merkmal NIMA-verwandter Kinasen ist (Osmani et al., 1991, Letwin et al., 1992). Abbildung 32 zeigt das Ergebnis des Experiments: Während die als Positiv-Kontrolle eingesetzte kommerzielle Casein-Kinase II starke Kinase-Aktivität gegenüber Casein zeigte, war beim Einsatz von rekombinanter CNK-1 weder ein Phosphattransfer auf Casein, noch

eine Autophosphorylierungs-Aktivität festzustellen. Auch verschiedene Variationen der Versuchsbedingungen und die Gegenwart von Mn^{2+} anstelle von Mg^{2+} führten nicht zu einer Aktivierung des Enzyms.

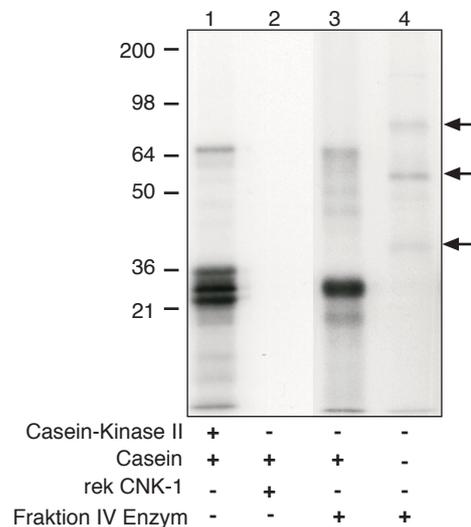


Abb.33: Überprüfung der Kinase-Aktivität von CNK-1 mittels Autoradiographie. Bahn 1: Positiv-Kontrolle mit kommerzieller Casein-Kinase II. Rek. CNK-1 zeigt keine Kinase-Aktivität (Bahn 2). Native Enzymfraktion aus der Hydroxyapatitchromatographie zeigt Kinase-Aktivität gegen Casein (Bahn 3) und Autophosphorylierungsaktivität (Bahn 4).

Im Gegensatz dazu zeigte native *Crithidia* Tubulin Polyglutamylase (Fraktion IV) deutliche Kinase-Aktivität gegen Casein als Substrat (Abb.33, Bahn 3). Bei einer Inkubation ohne exogenes Substrat zeigte sich außerdem ein Einbau von Phosphat in Proteine der Hydroxyapatit-Fraktion (Bahn 4). Die mittlere der drei markierten Banden (siehe Pfeile in Abb. 33) läuft bei etwa 55 kDa, so daß es sich um das Autophosphorylierungsprodukt von nativer CNK-1 handeln könnte.

Rekombinante CNK-1 wurde weiterhin unter verschiedenen Bedingungen in Glutamylierungs-Assays eingesetzt. Bei keinem dieser Experimente konnte dabei eine Glutamylierungsaktivität von rekombinanter CNK-1 festgestellt werden. Es wurde ausserdem keine Aktivierung nativer glutamylierungsaktiver Fraktionen durch Zusatz rekombinanter CNK-1 beobachtet. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, daß in *E.coli* exprimierte, rekombinante CNK-1, weder Kinase- noch Glutamylierungs-Aktivität hatte.

Das Peptid GQKIIAYASSVEDRDM (entspricht AS 453-468 von CNK-1) wurde zur Gewinnung polyklonaler Antikörper in Kaninchen verwendet. Zur Kopplung an KLH wurde es mit einem N-terminalen Cystein versehen. Spezifische Antikörper wurden aus den Immunsereen wie beschrieben (3.3.4.2) durch Affinitätschromatographie an einer Peptid-Säule gereinigt. Die so gereinigten Antikörper erkannten im Blot sowohl das an BSA gekoppelte Peptid als auch rekombinante CNK-1.

Abbildung 34 zeigt einen Western-Blot mit dem affinitätsgereinigten Peptid-Antikörper auf der Rohenzym-Fraktion (0,25 M NaCl-Überstand).

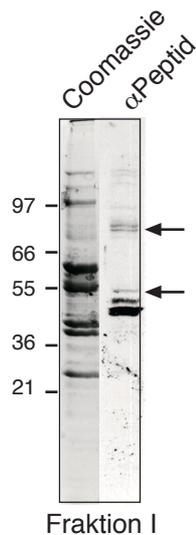


Abb.34: Analyse der *Crithidia* Tubulin Polyglutamylase (Rohenzymfraktion) im Immunblot mit einem affinitätsgereinigten Peptid-Antikörper gegen CNK-1. Man erkennt die Färbung eines Bandentriplets zwischen 50 und 54 kDa, sowie einer Doppelbande bei etwa 80 kDa, bei der es sich um das Durchleseprodukt der p54-mRNA handeln könnte.

Man erkennt, daß ein Bandentriplett bei etwa 54 kDa angefärbt wird. Hierbei könnte es sich um Degradationsprodukte der nativen CNK-1 handeln, die sich ja durch das Vorhandensein einer PEST-Sequenz auszeichnet. Es könnten aber auch elektrophoretische Varianten sein, die durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, entstanden sind. Neben diesen Hauptbanden erkennt man ausserdem die schwächere Färbung einer Doppelbande bei etwa 80 kDa. Dies ist gerade die Größe eines möglichen Durchleseproduktes der p54-mRNA.

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von CNK-1 wurde der Peptid-Antikörper in der Immunfluoreszenz an *Crithidia* eingesetzt. Abbildung 35 zeigt, daß der affinitätsgereinigte Antikörper sowohl den Zellkörper, als auch das Flagellum anfärbt. Der Zellkern bleibt bei der Färbung jedoch ausgespart. Eine Inkubation mit sekundärem Antikörper alleine zeigte keine Reaktion. Eine genauere Analyse der Lokalisation war mit den zur Verfügung stehenden Vergrößerungen und Auflösungen nicht zu erzielen.

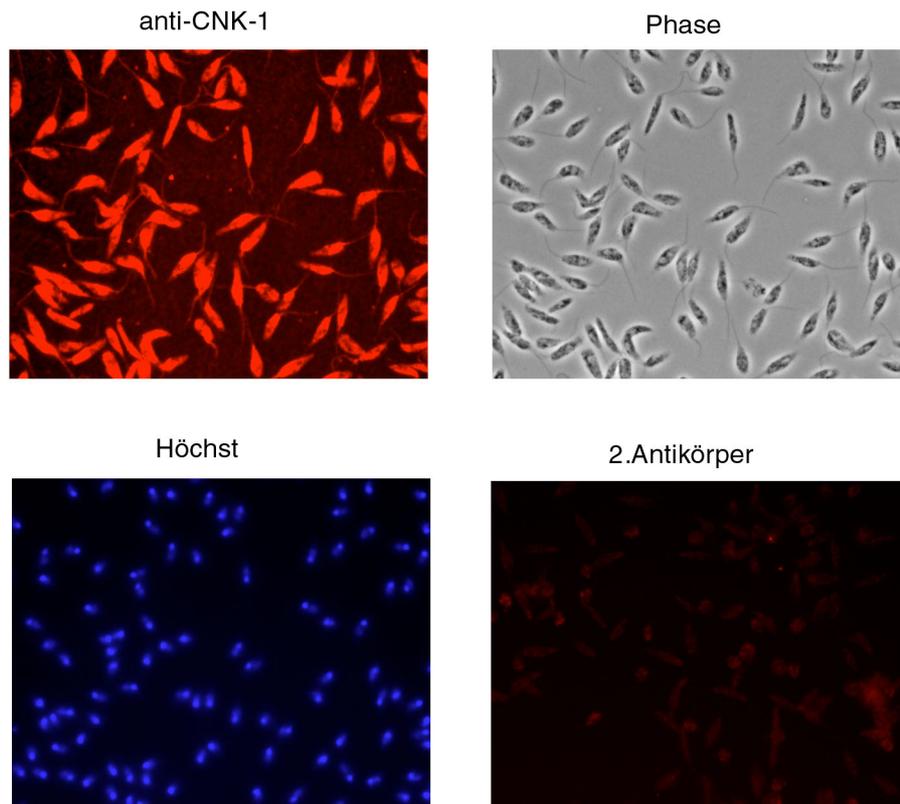


Abb.35: Indirekte Immunfluoreszenz an *Crithidia* mit einem affinitätsgereinigten Peptid-Antikörper gegen die NIMA-verwandte Kinase CNK-1. Die Zellen wurden ausserdem im Phasenkontrast aufgenommen und mit Hoechst zur Darstellung der DNA gefärbt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen allein mit sekundärem Antikörper gefärbt. Der CNK-1 Peptidantikörper färbt Zellkörper und Flagellum, spart jedoch den Zellkern aus.

5 Diskussion

Die carboxyterminale, saure Region ist entscheidend für die Diversität der $\alpha\beta$ Tubuline in einer Zelle, denn hier liegen sowohl die grössten Unterschiede zwischen den einzelnen exprimierten Isotypen, als auch, mit Ausnahme der Acetylierung, die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen. Obwohl die C-terminalen Reste in der elektronenkristallographischen Struktur des $\alpha\beta$ -Heterodimers nicht aufgelöst sind, lässt sich dennoch sagen, daß sie sich an der Aussenseite des Mikrotubulus befinden müssen und vermutlich ungeordnet in Lösung vorliegen (Nogales et al., 1998, 1999). In Übereinstimmung damit ist ihre Protease-Sensitivität und Zugänglichkeit für verschiedene Antikörper.

In einigen unterschiedlichen experimentellen Ansätzen ist deutlich geworden, daß Modifikationen in der carboxyterminalen Region entscheidenden Einfluss auf die Mikrotubuli-Funktion haben können, z.B. durch die Regulation der Interaktion mit Motorproteinen (Rosenbaum, 2000). Auffällig sind die strukturellen Parallelen zwischen den komplexen posttranslationalen Modifikationen der Tubuline und den Histon-modifikationen (Strahl und Allis, 2000). Auch Histone sind Bestandteil eines biologischen Polymers, denn sie bilden zusammen mit eukaryontischer DNA die Nukleosomen und damit die grundlegende Organisationsform des Chromatins. Die N-terminalen Schwanzdomänen der Histone liegen an der Aussenseite der Nukleosomen und sind das Ziel einer ganzen Reihe kovalenter Modifikationen. Die Rolle dieser Modifikationen bei der Regulation der Transkription wird zumindest ansatzweise bereits recht gut verstanden (Jenuwein und Allis, 2001), was nicht zuletzt daran liegt, daß viele der modifizierenden Enzyme wie Histon-Acetyltransferasen und Deacetylasen bereits identifiziert sind und in rekombinanter Form vorliegen.

Im Gegensatz dazu wurde von den Tubulin-modifizierenden Enzymen bisher lediglich die Tubulin-Tyrosin-Ligase aus Säugerhirn isoliert und ihre cDNA kloniert (Ersfeld et al., 1993). Weiterhin sind nur partielle Reinigungen von Tubulin-Acetyltransferase (Maruta et al., 1986) sowie Tubulin-Tyrosin-Carboxypeptidase (Argarana et al., 1989) beschrieben. Eine bessere Charakterisierung der beteiligten Enzymsysteme ist daher für ein Verständnis der posttranslationalen Tubulin-Modifikationen unabdingbar, wobei es aus folgenden Gründen sinnvoll ist, sich auf die Glutamylierung zu konzentrieren: Bei der Polyglutamylierung scheint es sich, mit Ausnahme der Hefe, um eine ubiquitäre Tubulinmodifikation zu handeln, während die Polyglycinylierung in bestimmten Spezies wie Trypanosomen fehlt. Die Addition multipler negativ geladener Reste an den ohnehin bereits anionischen C-Terminus bringt von allen Modifikationen die grösste Änderung des chemischen Charakters mit sich. Während die Tubulin-Acetylierung an Lys40 des α Tubulins, zumindest in *Tetrahymena*, nicht essentiell ist (Gaertig et al., 1995), zeigen verschiedene in-vitro Experimente eine wichtige Rolle für die Glutamylierung bei der Regulation Mikrotubuli-abhängiger Prozesse an.

Da die Glutamylierungsaktivität zuvor noch in keinem Organismus untersucht worden war, bot sich nur die biochemische Reinigung der Aktivität als Vorgehensweise an. Die Aminosäuresequenz des einzig bisher bekannten Tubulin-modifizierenden Enzyms, der TTL, bot dabei keinen Hinweis auf die Natur der zu erwartenden Glutamylierungsenzyme. So gehört die TTL strukturell lediglich in eine sehr allgemeine Gruppe von Enzymen mit ATP-abhängiger Carboxyl-Ligase Aktivität (Dideberg und Bertrand, 1998). Ausserdem finden sich keine klaren funktionellen Homologe der Säuger-TTL in den vollständig sequenzierten Genomen von *C.elegans* und *Drosophila melanogaster*. Entweder ist die TTL nur schwach sequenzkonserviert, oder ein in der Primärstruktur völlig anders aussehendes Enzym kann in diesen Organismen die Tyrosinierungsreaktion katalysieren.

Für die biochemische Reinigung einer Enzymaktivität mit unbekanntem Eigenschaften sind zwei Punkte entscheidend: Die Wahl des Ausgangsmaterials, sowie ein sensitiver und schneller Test für die Enzymaktivität. Im Prinzip bietet sich im vorliegenden Fall auch Hirn aus sehr jungen Mäusen als reichhaltige Quelle von glutamiliertem Tubulin an, denn Messungen in rohen Hirnextrakten zeigten eine Abnahme der Glutamylierungsaktivität im Verlauf der Entwicklung an (Regnard et al., 1998). So betrug die spezifische Aktivität an Tag 16 nach der Geburt nur noch 20% des Maximalwertes, der an Tag 3 gemessen wurde. Im Vergleich zu Hirntubulin zeigt Trypanosomen-Tubulin einen noch höheren Grad an Glutamylierung (Schneider et al., 1997), und Spezies wie *Leishmania tarentolae* oder *Crithidia fasciculata* können in einfachen Medien in grossen Mengen kultiviert werden.

5.1 Glutamylierung von Tubulin in *Crithidia fasciculata*

Posttranslationale Modifikationen von $\alpha\beta$ Tubulin in *Crithidia* wurden durch Isolierung und Charakterisierung der C-terminalen Fragmente mittels Massenspektroskopie und automatischer Sequenzierung untersucht. Dabei zeigte sich, daß sowohl das Ausmaß der Glutamylierung als auch die Position der modifizierten Reste in *Crithidia* und *Leishmania tarentolae* identisch waren. Ein Unterschied zu den bei *Trypanosoma brucei* erhaltenen Ergebnissen (Schneider et al., 1997) ergab sich lediglich in dem deutlich höheren Ausmaß an β -Tubulin Glutamylierung in *Crithidia* und *Leishmania*. Wie sich die bis zu 22 zusätzlichen Glutamatreste über die beiden modifizierten Positionen im C-terminus des β -Tubulins verteilen, kann durch das vorliegende experimentelle System nicht geklärt werden, hierzu müssten die Peptide einer Analyse durch Tandem-Massenspektroskopie unterworfen werden, wie dies zum Beispiel für die an multiplen Stellen glycylierten Peptide von *Paramecium* beschrieben ist (Vinh et al., 1999). In allen untersuchten Trypanosomen-Spezies findet sich der Tyrosinierungs-/Detyrosinierungszyklus, während diese Modifikation in den beiden älteren Eukaryonten *Giardia lamblia* (Weber et al., 1997) und *Tritrichomonas mobilensis* (Schneider et al., 1998) fehlt. Die Polyglycylierung wird als dominierende Modifikation der stabilen Mikrotubuli bereits in *Giardia* detektiert

(Weber et al., 1996, 1997), sie scheint jedoch in den Zweigen, die zu den Trichomonaden und den Trypanosomen führen, verlorengegangen zu sein. Dies ist umso erstaunlicher angesichts der Tatsache, daß kürzlich gezeigt werden konnte, daß die Polyglycylierung von β -Tubulin in *Tetrahymena* essentiell ist und Prozesse wie Beweglichkeit und Zellteilung wesentlich beeinflusst (Xia et al., 2000). Es ist zum einen denkbar, daß in diesen Experimenten nicht das Ausschalten der Polyglycylierung, sondern die gleichzeitige Verhinderung der Polyglutamylierung an eng benachbarten oder sogar identischen Resten für den beobachteten Phänotyp verantwortlich war. Dabei scheint die Glutamylierung allerdings in *Tetrahymena* gegenüber der Glycylierung nur eine relativ seltene Nebenreaktion zu sein. Alternativ könnte man vermuten, daß Glycylierung und Glutamylierung, wenigstens teilweise, funktionell redundant sind und die Trypanosomen den Verlust an Glycylierung durch das hohe Ausmaß an Polyglutamylierung kompensieren können. Dafür spricht auch die Beobachtung von Xia et al. (2000), daß nicht so sehr ein bestimmter modifizierter Rest für die korrekte Mikrotubuli-Funktion in *Tetrahymena* entscheidend ist, sondern eher das Erreichen eines ausreichenden Glycylierungs-Niveaus.

Mit der Entdeckung der posttranslationalen Modifikation der beiden Nukleosomen-Assembly-Proteine NAP-1 und -2 durch Polyglutamylierung (Regnard et al., 2000) können erstmals Glutamylierungsstellen (fettgedruckt) in unterschiedlichen Proteinen miteinander verglichen werden.

NAP-1(348-373): EDDDDDYDEEGEEADEE~~EE~~GEEEGDEEN
 NAP-2(341-367): EDDDNFEE~~EE~~GEEGEEEELEGDEEGEDED

Dabei ist die auffälligste Parallele zwischen Tubulin und NAP-1/2, daß sich bei beiden Proteinen die Glutamylierungsstellen innerhalb sehr saurer Sequenzen befinden, die reich an Glutamat- und Aspartatresten sind. Abgesehen von der allgemeinen Acidität fällt es schwer spezifischere Eigenschaften der Primärsequenz in Nachbarschaft der Glutamylierungsstelle anzugeben. Es ist bemerkenswert, daß der Einbau einer negativ geladenen Glutamatgruppe in dieser sauren Umgebung elektrostatisch nicht sehr vorteilhaft ist und es ist zu vermuten, daß die beteiligten Enzyme die vielfachen negativen Ladungen durch bestimmte basische Reste abschirmen müssen. Regnard et al. (2000) berichten ausserdem von einem N-terminalen NAP-1-Peptid, das in der Massenspektroskopie Glutamat-Inkrement zeigt. Dies würde andeuten, daß Glutamylierungspositionen nicht auf C-terminale Domänen beschränkt sein müssen. Interessanterweise wurden durch GT335-Affinitätschromatographie noch weitere Proteine angereichert, in die radioaktiv markiertes Glutamat ATP-abhängig eingebaut wurde (Regnard et al., 2000). Die Identität dieser ebenfalls glutamylierbaren Proteine ist bis jetzt unbekannt und es wird

interessant sein festzustellen, ob sich die modifizierten Reste hier in ähnlich sauren Domänen befinden. Allgemein scheint der monoklonale GT335-Antikörper, der gegen ein synthetisches Octapeptid korrespondierend zu glutamylierten $\alpha/2$ Tubulin hergestellt wurde (Wolff et al., 1922), auch glutamylierte Motive in anderen Proteinen zu erkennen, wobei aber die Stärke der Antikörperbindung auch von der Sequenz der Hauptkette beeinflusst wird.

5.2 Solubilisierung und Reinigung von Tubulin Polyglutamylase aus *Crithidia*

Frühere *in vivo*-Markierungsexperimente haben die Tubulin-spezifische Inkorporation von Glutamat bei strikter Inhibierung der Proteinbiosynthese demonstriert (Schneider et al., 1997). Um einen Ausgangspunkt für die Reinigung der zugrundeliegenden Glutamylierungsaktivität zu gewinnen, wurden Trypanosomen-Cytoskelette durch Triton-Extraktion gewonnen und in einem *in vitro*-Glutamylierungsassay mit Tritium-markiertem Glutamat und MgATP eingesetzt. Das wichtige Ergebnis dieser Experimente war, daß isolierte Cytoskelette aus allen untersuchten Trypanosomen-Spezies eine enzymatische Aktivität enthalten, die streng ATP-abhängig Glutamat in Tubulin einbaut. Das Vorhandensein dieser Aktivität liefert direkt eine Erklärung für das hohe Ausmaß an Tubulin-Glutamylierung, die bei der peptidchemischen Analyse der posttranslationalen Modifikationen detektiert wurde. Die für die weitere Reinigung der Aktivität notwendige Solubilisierung gelang durch Behandlung der Cytoskelett-Fraktion mit salzhaltigem Puffer, dabei erwies sich die Verwendung von 250 mM NaCl als optimal, da diese Fraktion die höchste spezifische Glutamylierungsaktivität aufwies. Bei Verwendung höherer Ionenstärken, konnte zwar auch eine noch vorhandene Restaktivität von den Cytoskeletten entfernt werden, jedoch wurden unter diesen Bedingungen auch relativ grosse Mengen an Tubulin solubilisiert und die Enzymaktivität war stark inhibiert. Während die Ergebnisse zur Solubilisierung der Enzymaktivität bei *Crithidia* und *Leishmania* identisch waren, genügten die dort verwendeten Versuchsbedingungen nicht zur Solubilisierung der Aktivität in *Trypanosoma*. Hier mussten die Cytoskelette mehrmals mit Puffern höherer Ionenstärke behandelt werden, um die Aktivität vollständig vom Cytoskelett zu entfernen. Ob diese stärkere Assoziation mit dem Cytoskelett eine grundsätzlich unterschiedliche Organisation der Glutamylierungsaktivität in *T. brucei* gegenüber den beiden anderen Trypanosomen-Spezies widerspiegelt, ist bis jetzt unbekannt. Es ist weiterhin wichtig anzumerken, daß im Cytosol gegenüber der Cytoskelett-Fraktion nur eine äusserst geringe Glutamylierungsaktivität messbar war (vgl. Abb. 11), es ist daher davon auszugehen, daß durch das gewählte Verfahren der weitaus grösste Teil der in *Crithidia* vorhandenen Glutamylierungsaktivität solubilisiert wurde.

Die weitere Reinigung der Aktivität erforderte die Etablierung eines schelleren Enzymtests. In Anlehnung an den Assay für die Tubulin-Tyrosin-Ligase (Murofushi

und Flavin, 1984) wurde daher der Einbau TCA-fällbarer Radioaktivität auf Whatman 3MM Filtern gemessen. Dabei ist es wichtig festzuhalten, daß durch die Charakterisierung der Glutamylierungsprodukte mittels Autoradiographie zuvor gezeigt worden war, daß die Tritium-markierte Glutaminsäure ausschliesslich in Tubulin inkorporiert wurde, so daß auch durch den Filter-Assay nur Tubulin-Glutamylierung verfolgt wurde. Dabei eignet sich der Test vermutlich nicht zur Messung sehr geringer Glutamylierungsaktivitäten in anderen Geweben, da die Zähleffizienz für Tritium auf den Whatman-Filter recht gering ist. Die Reproduzierbarkeit des Assays war sehr hoch, bei Doppelbestimmungen ergab sich in keinem Fall eine Abweichung von mehr als 10%.

Trotz der bereits angereicherten Enzym-Rohfraktion als Ausgangsmaterial und dem einfacheren Filtertest zur Messung der Aktivität erwies sich die weitere Reinigung der Glutamylierungsaktivität als schwierig. Dies lag zum einen an einer ausgesprochenen Instabilität des Enzyms, die auch durch Zusatz von Protease-Inhibitoren nur teilweise unterdrückt werden konnte. So konnten partiell gereinigte Fraktionen nur kurzzeitig bei 4°C aufbewahrt werden, Einfrieren und Auftauen war typischerweise ebenfalls mit Verlusten verbunden, die jedoch durch Zusatz von Glycerol und BSA oder SBTI in Grenzen gehalten werden konnten.

Von den verschiedenen chromatographischen Verfahren die getestet wurden, erwiesen sich nur wenige zur Anreicherung der Glutamylierungsaktivität als brauchbar. So waren die Ausbeuten in Gelfiltrationsexperimenten immer sehr niedrig, besonders wenn Superdex-Säulen, die aus einer Matrix von Agarose und Dextran bestehen, verwendet wurden. Auf Silica-Partikeln basierende Gelfiltrationssäulen von Tosohaas waren hier besser geeignet, doch auch sie zeigten typischerweise Ausbeuten von weniger als 30%. Die Ausbeuten bei der Ionenaustauschchromatographie waren dagegen im allgemeinen grösser, allerdings ergab sich hier das Problem, daß die Enzymaktivität in der Regel mit dem Großteil kontaminierender Proteine von der Säule eluiert wurde, was geringe Anreicherungsfaktoren zur Folge hatte. Durch die Salzempfindlichkeit der Glutamylierungsaktivität konnten andere Verfahren, wie hydrophobe Interaktionschromatographie, nicht erfolgreich angewendet werden. Die Bindung an die Säule erfolgt hier in Puffern hoher Ionenstärke (typischerweise 4M KCl) und die Elution durch einen absteigenden Salzgradienten, was eine Analyse der Enzymaktivität einzelner Fraktionen im vorliegenden Fall sehr schwierig macht. Bei der Reinigung der Tubulin Polyglutamylase aus dem Hirn (Regnard et al., 1998) erwiesen sich selbst ATP-Affinitätschromatographie und Ionenaustauschchromatographie als ungeeignet. Der Grund hierfür könnte das Vorliegen eines Komplexes sein, dessen Untereinheiten durch die chromatographischen Verfahren getrennt werden.

Mit der Identifizierung der Hauptbanden der 0,25 M NaCl-Waschfraktion von isolierten Cytoskeletten wurde deutlich, daß die für die Glutamylierungsaktivität verantwortlichen Polypeptide auch in dieser angereicherten Fraktion nur in geringer Menge vorliegen. Die ATP-Affinitäts-chromatographie war daher als erster Reinigungsschritt unbedingt notwendig, da sie das einzige Verfahren war, mit der

man die Aktivität aus einem grossen Volumen an Ausgangsmaterial sammeln und in konzentrierter und angereicherter Form eluieren konnte. Die anschliessende Ultrafiltration war problematisch und mit grossen Verlusten an Aktivität verbunden. Ähnliche Probleme traten jedoch auch bei anderen Reinigungen von Enzymen aus Trypanosomen auf (Yokoyama et al., 1998) und sind typisch für das Vorliegen sehr geringer Mengen an aufzureinigendem Material. Durch die hohen Konzentrationen an ATP und KCl in der Fraktion nach der ATP-Affinitäts-chromatographie und die hohen Verluste, die immer mit Gelfiltration oder Dialyse verbunden waren, konnte eine Ionenaustauschchromatographie an dieser Stelle nicht eingesetzt werden.

Trotz der geschilderten Schwierigkeiten gelang eine fast 1000fache Anreicherung der Glutamylierungsaktivität aus dem *Crithidia* 0,25 M NaCl-Überstand. Bedenkt man, daß der NaCl-Überstand gegenüber einem Gesamt-Zellysat bereits eine angereicherte Fraktion darstellt, so dürfte der Reinigungsfaktor insgesamt bei über 10000 liegen. Die Fraktionen der finalen Hydroxyapatitsäule zeigen, daß eine Bande von 54 kD das einzige Polypeptid darstellt, das mit der Glutamylierungsaktivität kogereinig wird. Die Hydroxyapatit-Fraktionen sind dabei nicht ganz homogen, jedoch folgen die anderen Polypeptide nicht den Variationen der Enzymaktivität (vgl. Abb.14). Aufgrund der geringen Proteinkonzentration konnte die Hydroxyapatit-Fraktion nicht weiter gereinigt werden. Sie kann jedoch nach Zusatz von Glycerol über mehrere Monate bei -70°C gelagert werden und eignet sich damit ausgezeichnet als Enzymfraktion für in-vitro Glutamylierungstests. So könnten in Zukunft Mikrotubuli mit dieser Fraktion glutamyliert und in in-vitro-Motilitätstests mit verschiedenen Motorproteinen eingesetzt werden. Diese Versuche könnten wichtige Aufschlüsse darüber geben, wie die Glutamylierung die Bindung und Prozessivität von Motorproteinen beeinflusst. Interessant wäre es ausserdem in Polymerisations- und Depolymerisations-experimenten zu untersuchen, ob glutamylierte Mikrotubuli eine höhere intrinsische Stabilität haben, oder ob die in-vivo beobachtete Assoziation mit besonders stabilen Mikrotubuli-Strukturen von der Bindung spezieller MAPs herrührt.

Bei den Versuchen zur Klonierung von p54 wurde eine weitere grundsätzliche Schwierigkeit des gewählten Ansatzes deutlich: Die Sequenzierung von p54 mittels Edman-Abbau von isolierten Peptiden benötigte recht große Mengen an gereinigtem Material, die gerade bei in geringer Konzentration vorliegenden Enzymen nur schwer zu gewinnen sind. So mussten im vorliegenden Fall zur Gewinnung von genügend Sequenzinformationen zur Klonierung des Proteins über 100 l Trypanosomen-Kultur aufgearbeitet werden. Es empfiehlt sich daher in zukünftigen Versuchen zur Reinigung seltener Enzyme auf Organismen zurückzugreifen, deren Genome entweder bereits vollständig sequenziert sind, oder aber kurz vor der Fertigstellung stehen und öffentlich zugängliche Rohsequenzdaten haben. In diesem Fall könnten bereits geringste Proteinmengen durch Massenspektroskopische Techniken sequenziert (Shevchenko et al., 1997) und das vollständige Protein durch Datenbanksuche identifiziert werden. Die Genomprojekte von *T.brucei* in *Leishmania major* waren im vorliegenden Fall noch nicht so weit fortgeschritten, als daß dies für alle sequenzierten Polypeptide möglich gewesen wäre. Eine Fertigstellung der

Genomprojekte für diese beiden Spezies wird etwa für das Jahr 2003 erwartet. Da auch für einige weitere Polypeptide der Hydroxyapaptit-Fraktion noch partielle Sequenzinformationen gewonnen wurden, sollte es mit voranschreitender Fertigstellung insbesondere des *Leishmania*-Genomprojektes in Zukunft möglich sein, auch diese Polypeptide zu identifizieren und zu klonieren.

5.3 Vergleich der Tubulin-Polyglutamylase-Präparationen aus *Crithidia* und Säugerhirn

Neben der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Präparation von Tubulin Polyglutamylase aus *Crithidia*, liegt eine weitere, partiell gereinigte Glutamylase-Fraktion aus dem Hirn von 3 Tage alten Mäusen vor (Regnard et al., 1998). Die beiden Präparationen ähneln sich in einer ganzen Reihe von Eigenschaften, es gibt jedoch auch einige deutliche Unterschiede: Beide Präparationen katalysieren den ATP-abhängigen Einbau von Glutamat sowohl in α - als auch in β -Tubulin aus dem Hirn. Die Notwendigkeit für ATP ist absolut, die optimalen ATP-Konzentrationen sind für beide Enzym-Präparationen vergleichbar. Die optimale $MgCl_2$ -Konzentration liegt mit 6-8 mM für das Hirn-Enzym etwas höher als für die *Crithidia* Tubulin Polyglutamylase. Kompetitionsexperimente zeigten für beide Präparationen eine sehr hohe Spezifität für Glutamat an. Insbesondere Glycin kompetierte nicht mit Glutamat um den Einbau in Tubulin, was klar anzeigt, daß Glutamylierung und Glycinylierung von unterschiedlichen Enzymen katalysiert werden. Eine weitere interessante Übereinstimmung ist das hohe pH-Optimum vom 9-9,5 für beide Präparationen. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für die Folylpolyglutamat-Synthetase erhalten (Cichowicz und Shane, 1987) und könnte bedeuten, daß das Glutamat mit der deprotonierten Aminogruppe die Form ist, die vom Enzym umgesetzt wird. Jedoch kann auch die Titration einer an der Katalyse beteiligten funktionellen Gruppe nicht ausgeschlossen werden. Eine besonders charakteristische Eigenschaft der Glutamylierungsaktivität, die beiden Präparationen gemein ist, stellt die ausgeprägte Hemmung durch Salze wie NaCl oder KCl dar. Der Grund hierfür könnte sein, daß das Enzym mit den beteiligten Substraten (Tubulin, MgATP, Glutamat) im wesentlichen über schwache ionische Kräfte wechselwirkt. Diese Interaktionen könnten dann sehr empfindlich gegenüber einer Erhöhung der Ionenstärke sein. Eine alternative Erklärung wäre, daß ein Enzymkomplex vorliegt, dessen Untereinheiten nur schwach miteinander wechselwirken und dessen Integrität daher sehr empfindlich gegenüber einer Erhöhung der Ionenstärke ist.

Wesentliche Unterschiede zwischen beiden Präparationen liegen zunächst im ermittelten Molekulargewicht der Glutamylase. Dichtegradientenzentrifugation gibt für das Hirnenzym einen Wert von 10 S an, mittels Gelfiltration wurde ein Stokes-Radius von 70 Å, korrespondierend zu einem Molekulargewicht von 360 kD erhalten. Das *Crithidia*-Enzym dagegen sedimentiert bei etwa 3 S, im Komplex mit $\alpha\beta$ Tubulin wird ein Wert von 7 S erhalten. Während die Hydroapaptit-Fraktion der *Crithidia*-

Präparation ein dominierendes Polypeptid von 54 kD anzeigt, das mit der Glutamylierungsaktivität koeluiert, besteht Fraktion V der Präparation aus dem Hirn aus mindestens 20 Proteinen, von denen die für die Glutamaylierungsaktivität verantwortlichen Proteine noch nicht identifiziert werden konnten.

Die spezifischen Aktivitäten der beiden Enzymfraktionen sind schwierig miteinander zu vergleichen, da die Assaymethoden voneinander abweichen. Betrachtet man allerdings die erreichten Inkorporationsraten, so ergibt sich, bei vergleichbaren Tubulin-Konzentrationen im Assay, ein Einbau von etwa 0,5 mol Glutamat pro mol Tubulin für das Hirnenzym, während mit der *Crithidia* Tubulin Polyglutamylase bis zu 70 mol Glutamat pro mol Tubulin eingebaut wurden (vgl. Abb.21). Die spezifische Aktivität der *Crithidia*-Präparation dürfte damit um ein Vielfaches höher liegen.

Interessanterweise sind Mikrotubuli für die Tubulin Polyglutamylase aus dem Hirn ein deutlich besseres Substrat als dimeres $\alpha\beta$ Tubulin, wobei die maximale Inkorporation je nach pH-Wert 4-10 mal höher liegt. Diese deutliche Präferenz für Mikrotubuli wurde beim *Crithidia*-Enzym nicht beobachtet, hier war die Einbaurate gegenüber $\alpha\beta$ Tubulin nur leicht erhöht. Aufgrund der unterschiedlichen Erscheinung der Glutamylierungsprodukte in der Autoradiographie diskutieren Regnard et al. (2000) einen prozessiven Mechanismus für die Addition von vielen Glutamat-Resten an ein einzelnes $\alpha\beta$ -Dimer, sowie einen distributiven Mechanismus für die gleichmäßige Glutamylierung von Mikrotubuli. Man könnte auch vermuten, daß der Enzymkomplex aus Hirn möglicherweise ein Motorprotein beinhaltet, das die Glutamylierungsaktivität am Mikrotubulus entlang bewegen kann, so daß eine gleichmäßige Addition von Glutamatresten an viele Untereinheiten stattfinden kann. In Tabelle 3 sind Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Enzympräparationen aus Hirn und *Crithidia* noch einmal zusammengefasst.

	Hirn Tubulin Polyglutamylase	<i>Crithidia</i> Tubulin Polyglutamylase
Ausgangsmaterial	3 Tage altes Mäusehirn	0,25 M NaCl-Überstand von isolierten <i>Crithidia</i> -Cytoskeletten
S-Wert	10 S	3S / 7S (Tubulin-Komplex)
Polypeptid-Zusammensetzung	≥ 20 Polypeptide	p54 einzige Bande, die der Aktivität folgt
Identifizierte Polypeptide	keine	<i>Crithidia</i> NIMA-verwandte Kinase 1
Bevorzugtes Substrat	MT \gg Dimer	MT \approx Dimer \gg Peptid
Max. Einbaurate	0,5 mol Glu/mol Tubulin	70 mol Glu/mol Tubulin
Inhibierung	NaCl, KCl	NaCl, KCl
pH-Optimum	~ 9	~ 9
Initiationsaktivität	gezeigt für α und β Hirntubulin	gezeigt für Hefe α -Tubulin

Tabelle 3 : Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Tubulin Polyglutamylase-Präparationen aus Hirn (Regnard et al., 1998) und *Crithidia fasciculata*.

5.4 Substratspezifität der *Crithidia* Tubulin Polyglutamylase in einem Enzym-Peptid-System

Eine Reihe von synthetischen Peptiden, die auf den carboxyterminalen Resten von α - und β -Tubulin aus dem Säugerhirn basieren wurde zur Charakterisierung der Substratspezifität einer partiell gereinigten Präparation von Tubulin Polyglutamylase aus *Crithidia* verwendet. Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse (vgl. Abb.18), daß die Peptide dann glutamyliert werden konnten, wenn sie einen Glutamatrest mit einer freien α -Carboxylatgruppe zur Verfügung stellen konnten. Diese Minimalanforderung wurde bereits durch monoglutamylierte Peptide erfüllt, bei denen ein einzelner Glutamatrest über eine Isopeptidbindung mit einem Glutamatrest der Hauptkette verbunden war, sowie durch diejenigen unverzweigten Peptide, die mit einem carboxyterminalen Glutamatrest endeten. Dabei wurde im Peptid-System die Verlängerung einer bestehenden Seitenkette gegenüber einer C-terminalen Verlängerung bevorzugt. Die Spezifität für einen Glutamatrest mit einer freien α -Carboxylatgruppe war absolut, interne Glutamatreste wurden nicht modifiziert und andere C-terminale Reste als Glutamat wurden nicht verlängert. Innerhalb des Peptid-Systems wurde keine Bildung einer neuen Seitenkette („Verzweigungsaktivität“) beobachtet. Die Länge und relative Position einer bestehenden Seitenkette hatte keinen grossen Einfluss auf die Effizienz der Elongation. Die Polyglutamylase zeigte in diesem Peptid-System also nur geringe Sequenzanforderungen und sie wurde immer dann aktiv sobald ein monoglutamyliertes α - oder β -Peptid vorlag. Diese niedrige Sequenzanforderung erklärt die Bildung von sehr langen Seitenketten, wenn Hirntubulin als Substrat verwendet wird (vgl. Abb.21). Das Produkt jedes Glutamylierungsschritts erfüllt wiederum die Bedingungen für den nächsten Zyklus, so daß eine progressive Elongation der Oligoglutamat-Seitenkette stattfinden kann.

Hirntubulin ist ein weitaus besseres Substrat als die verschiedenen synthetischen Peptide. Wie schon für die Tubulin-Tyrosin-Ligase diskutiert (Rüdiger et al., 1994) kann es sein, daß die Peptide nicht optimal mit dem Enzym in Kontakt treten können oder nicht die korrekte Konformation für eine maximale Elongation annehmen können. Die niedrigen Sequenzanforderungen der Polyglutamylase, die im Peptid-System beobachtet wurden, stehen in deutlichem Kontrast zur hohen Ortsspezifität der Glutamylierung *in vivo*. In den meisten Fällen tragen nur ganz bestimmte Glutamatreste innerhalb von kurzen Sequenzen, die besonders reich an Glutaminsäure sind, die Seitenketten. Die Untersuchungen im Peptid-System legen nahe, daß die Ortsspezifität allein durch die Bildung der Isopeptidbindung gegeben wird. Da im Peptid-System keine Verzweigungsaktivität beobachtet wird, scheint die Komplexbildung mit dem gesamten Tubulin-Molekül für die korrekte Initiation einer neuen Seitenkette benötigt zu werden.

Zur Detektion der Verzweigungsaktivität kann, wie hier erstmals gezeigt, Hefetubulin eingesetzt werden. Dieses wird durch den Antikörper GT335 zunächst nicht erkannt, durch die Behandlung mit *Crithidia*-Enzymfraktionen wird jedoch eine Reaktivität des Hefe α -Tubulins mit dem GT335-Antikörper generiert, die die Initiation einer neuen

Seitenkette anzeigt (vgl. Abb. 20). Das Fehlen einer Reaktivität mit Hefe β -Tubulin könnte zum einen daran liegen, daß aufgrund der divergenten carboxyterminalen Sequenz hier vom *Crithidia*-Enzym keine neue Seitenkette angefügt werden kann, zum anderen wäre es möglich, daß zwar eine neue Seitenkette gebildet wird, diese vom GT335-Antikörper aber nicht erkannt wird. In jedem Fall wird es in Zukunft notwendig sein, die Glutamylierungsstellen beim Hefetubulin durch peptidchemische Analyse der carboxyterminalen Peptide mittels Massenspektroskopie und Sequenzierung näher zu bestimmen.

Die Frage ob ein- und dasselbe Enzym für Initiation und Elongation der Seitenketten verantwortlich ist, kann bis zum Vorliegen einer funktionalen rekombinanten Glutamylase nicht abschliessend beantwortet werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, daß bei gleichzeitiger Untersuchung der Fraktionen mit dem normalen Assay und dem Hefeassay, Elongations- und Initiationsaktivität sowohl durch die ATP-Säule, als auch durch Dichtegradient und Hydroxyapatitsäule kogereinigt wurden, so daß sich hier keine Hinweise auf dinstinkte Enzymaktivitäten fanden.

5.5 Klonierung eines trypanosomalen La-Proteins

Im Rahmen der Reinigung der Tubulin Polyglutamylase wurde ein 40 kD-Polypeptid identifiziert, das in der Anionenaustauschchromatographie mit der Glutamylierungsaktivität kogereinigt wurde. Nach Erhalt von Sequenzinformationen für Peptide der 40 kD Bande konnte das *T. brucei*-Homolog des *Crithidia*-Proteins kloniert und als trypanosomales La-Protein identifiziert werden.

Das La-Protein, das zunächst als Autoantigen in Patienten, die an Autoimmunkrankheiten wie systemischer Lupus erythematosus litten, identifiziert wurde (van Venrooij et al., 1995) ist ein multifunktionelles RNA-Bindungsprotein. Durch seine Affinität für den 3' oligo(U)-Schwanz bindet La an RNA Polymerase III Transkripte und erleichtert so Initiation und Termination der Transkription (Gottlieb und Steitz, 1989). Das La-Homolog aus *Saccharomyces cerevisiae* Lhp1p ist an der Reifung von tRNA-Vorläufern in vivo beteiligt (Yoo und Wolin, 1997). Das La-Protein scheint jedoch auch potentielle cytoplasmatische Funktionen zu haben: So scheint es essentiell für die Cap-unabhängige Translation bestimmter viraler mRNAs zu sein (Meerovitch et al., 1993, Ali und Siddiqui, 1997), es kann Histon-mRNAs vor der Zellzyklus-abhängigen Degradation schützen (Mc Laren et al., 1997) und es kann als ATP- abhängige RNA/DNA und RNA/RNA-Helicase fungieren (Bachmann et al., 1990, Hühn et al., 1997). Diese Vielfalt scheinbar unterschiedlicher Funktionen führte zu dem Vorschlag, daß La als generelles RNA-Chaperone wirkt, das verschiedene RNAs binden und stabilisieren kann (Meerovitch und Sonenberg, 1993). Im Einklang damit zeigte das rekombinante *T. brucei* La-Protein RNA-Bindungsaktivität in vitro (vgl. Abb. 26). Da die Funktion des La-Proteins noch immer Gegenstand von Diskussionen ist und die meisten Charakterisierungsexperimente in vitro durchgeführt wurden, bietet die Klonierung eines La-Proteins aus einem Organismus der

molekular-biologisch leicht durch Genaustausch (Cruz et al., 1991, ten Asbroek et al., 1990) oder RNA-Interferenz (Ngo et al., 1998) manipuliert werden kann, einen neuen Ansatz zur Erforschung der Rolle des La-Proteins *in vivo*.

5.6 Klonierung von p54, eines Verwandten des Zellzyklus-Regulators NIMA

Durch eine Erhöhung der Menge des Ausgangsmaterials und Verwendung einer Hydroxyapatitchromatographie im letzten Schritt der Präparation wurde eine fast 1000 fache Anreicherung der Glutamylierungsaktivität bezogen auf den 0,25 M NaCl-Überstand erreicht. Die finale Präparation ist durch ein dominierendes 54 kD-Polypeptid gekennzeichnet, das als einzige Bande der Variation der Glutamylierungsaktivität in den Fraktionen der Hydroxyapatitsäule folgt (vgl. Abb.14). Nach Gewinnung von Peptidsequenz-Informationen konnte die p54-cDNA durch RT-PCR mit degenerierten Primern kloniert werden. Ein Datenbank-Vergleich der erhaltenen vollständigen Aminosäuresequenz zeigte eine Ähnlichkeit des *Crithidia*-Proteins mit verschiedenen NIMA-verwandten Proteinen an.

Temperatursensitive Mutationen im original *nimA*-Gen („never-in-mitosis-Gen A“) von *Aspergillus nidulans* führten bei der restriktiven Temperatur zu einer Blockierung der Zellen in der späten G2-Phase (Osmani et al., 1988). Die NIMA-Aminosäuresequenz enthält eine katalytische Domäne mit Motiven, die typisch für eukaryontische Serin/Threonin-Kinasen sind. In Immunpräzipitaten mit NIMA-spezifischen Antikörper konnte Kinase-Aktivität gegen das exogene Substrat Casein nachgewiesen werden (Osmani et al., 1991). Die Kinase-Aktivität fluktuierte dabei Zellzyklus-abhängig und war während der M-Phase maximal. Diese Ergebnisse erweckten großes Interesse, da neben der Cdc2-Proteinkinase mit NIMA eine weitere Kinase in *Aspergillus* für die Einleitung der Mitose entscheidend war. Im Einklang hiermit hatte die Überexpression von NIMA das vorzeitige Einleiten von mitotischen Ereignissen, wie der Kondensation der Chromosomen, zur Folge, dies galt auch für humane Zellen, was andeutete, daß ein NIMA-ähnlicher Signalweg auch in höheren Eukaryonten existieren könnte (Lu und Hunter, 1995). Osmani et al. (1991) konnten ausserdem zeigen, daß durch gleichzeitige Mutation des Checkpoint-Gens *bimE7* in *Aspergillus* die Mitose auch ohne Aktivierung der NIMA-Kinase eingeleitet werden konnte. In diesem Fall zeigten sich jedoch schwere Defekte unter anderem in der Organisation der Mitosespindel, die die normale Rolle der aktivierten NIMA-Kinase widerspiegeln (Osmani et al., 1991). Es hat sich als schwierig erwiesen, *in vivo*-Substrate des NIMA-Proteins zu identifizieren. Histon H3 wurde als NIMA-Substrat in *Aspergillus* vorgeschlagen (Colin et al., 2000), die Studie ist jedoch korrelativ und es ist unwahrscheinlich, daß NIMA-verwandte Kinasen eine allgemeine Rolle als Histon H3-Kinasen haben, da diese Rolle von mehreren Studien den Aurora-ähnlichen Kinasen zugeschrieben wurde (Hsu et al., 2000).

NIMA-verwandte Kinasen wurden in verschiedenen Organismen beschrieben, das Säuger genom allein enthält wenigstens 7 verschiedene (Nigg, 2001). Von diesen stellt Nek2 den strukturell ähnlichsten NIMA-Vertreter dar, wobei auch die Nek2-Aktivität Zellzyklus-abhängig reguliert wird (Fry et al., 1995). Ob die NIMA-verwandten Kinasen echte funktionelle Orthologe des NIMA-Proteins darstellen, ist bis heute unbekannt. Das einzige Protein, das die nimA-Mutation funktionell komplementieren konnte, war die Nim-1 Kinase aus *Neurospora crassa*, einem weiteren Pilz (Pu et al., 1995).

Das Ergebnis, daß ein NIMA-verwandtes Protein mit der Glutamylierungsaktivität in Trypanosomen kogereinigt wird, ist überraschend und nicht auf den ersten Blick verständlich. Es ergeben sich drei Erklärungsmöglichkeiten für den Zusammenhang zwischen Tubulin-Glutamylierungsaktivität und der *Crithidia*-NIMA-verwandten Kinase-1 (CNK-1):

Erstens, CNK-1 ist lediglich eine Kontamination der Enzymfraktion und hat nichts mit der Glutamylierungsaktivität zu tun. Diese Erklärung erscheint unwahrscheinlich, da p54 das einzige sichtbare Polypeptid ist, das mit der Glutamylierungsaktivität von der finalen Hydroxyapatitsäule koeluiert, andere prominente Polypeptide sind gegenüber dem Aktivitätspeak deutlich verschoben. Die gemessenen Einbauraten sprechen dafür, daß diese finale Präparation eine deutlich höhere spezifische Aktivität als die Präparation aus dem Hirn hat. Es ist daher unwahrscheinlich, wenn auch nicht völlig auszuschließen, daß die tatsächliche Polyglutamylase noch immer unterhalb der Detektionsgrenze liegt. Mehr noch sind NIMA-verwandte Kinasen an einer Reihe von Prozessen beteiligt, bei denen auch die Polyglutamylierung eine Rolle zu spielen scheint: So sind beispielsweise Nek2B in *Xenopus laevis* und die humane Nek2 am Zusammenbau und der Aufrechterhaltung der Integrität von Centrosomen beteiligt (Uto und Sagata, 2000, Fry et al., 1998). Inhibierung der Nek2B-Funktion in *Xenopus* durch Injektion neutralisierender Antikörper führt zu einer Fragmentierung und Zerstreung des Centrosoms, ein Phänotyp, der stark an denjenigen erinnert, der bei der Injektion des anti-Glutamylierungs-Antikörpers GT335 in humane Zellen erhalten wird (Bobinnec et al., 1998). Das Original NIMA-Protein lokalisiert während der Mitose an Spindel-Mikrotubuli (Colin et al., 2000) und Mutationen in NIMA führen zu Defekten in der mitotischen Mikrotubuli-Organisation (Osmani et al., 1991). Dies ist besonders interessant angesichts der Tatsache, daß in humanen Zellen spezifisch Spindel-Mikrotubuli mit GT335 gefärbt werden und daß sich während der Mitose speziell die Glutamylierung von β -Tubulin erhöht (Bobinnec et al., 1998). In *Drosophila* reguliert das NIMA-verwandte Protein „Fused“ die Mikrotubuli-Interaktion eines Multiproteinkomplexes, der ein Kinesin-verwandtes Protein und einen Transkriptionsfaktor enthält (Robbins et al., 1997). Dabei konnte nicht festgestellt werden, daß Fused durch direkte Phosphorylierung der beteiligten Proteine wirkt.

Die zweite Erklärung für die Koreinigung von CNK-1 und Glutamylierungsaktivität ist, daß das NIMA-verwandte Protein die Glutamylierungsreaktion direkt katalysiert. Dagegen scheint die Tatsache zu sprechen, daß das Protein eine katalytische Domäne

besitzt, die in die Superfamilie eukaryontischer Serin/Threonin-Kinasen fällt (Hanks und Hunter 1995). Man kann allerdings vermuten, daß Phosphorylierung und Glutamylierung möglicherweise derart mechanistisch miteinander verwandt sind, daß die Herstellung einer neuen Peptidbindung über die Generierung eines intermediären Acylphosphats verläuft, das dann in einem nukleophilen Angriff durch die Aminogruppe der zu addierenden Glutaminsäure abgefangen wird. Tatsächlich gehören die NIMA-verwandten Kinasen biochemisch zur Gruppe der Casein-Kinasen, die saure Substrate wie Casein gegenüber basischen wie den Histonen bevorzugen. Sie wären damit in der Lage, einen Phosphattransfer auch innerhalb einer sehr sauren Umgebung, wie sie beispielsweise der C-Terminus von Tubulin darstellt, zu katalysieren. Interessanterweise wurde bei den Peptid-Versuchen sowohl eine Glutamylierung des α -Peptids, als auch eine Phosphorylierung am Serin-Rest festgestellt. Dabei ist allerdings nicht auszuschließen, daß diese Phosphorylierung durch eine weitere kontaminierende Proteinkinase erfolgt.

Die Aminosäuresequenz von CNK-1 zeigt innerhalb der katalytischen Domäne einige interessante Abweichungen von klassischen Proteinkinasen (vgl. Abb.29). Am auffälligsten ist dabei das Fehlen eines eigentlich invarianten Glycins innerhalb der glycinreichen Subdomäne I. Ob diese Veränderungen innerhalb von Sequenzen, die an der Bindung und Orientierung von ATP beteiligt sind, funktionell signifikant sind, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Während die native Glutamylase deutliche Casein-Phosphorylierungsaktivität zeigte, war rekombinante, in *E.coli* exprimierte CNK-1 leider katalytisch inaktiv. Es sollte daher in Zukunft versucht werden, katalytisch aktives Enzym mit Hilfe des Baculovirus-Systems aus Insektenzellen zu gewinnen. Erst dann könnte die Frage, ob die NIMA-verwandte Kinase CNK-1 Phosphorylierungs und/oder Glutamylierungsaktivität besitzt, definitiv beantwortet werden.

Eine dritte Möglichkeit für den Zusammenhang zwischen CNK-1 und Glutamylierungsaktivität besteht im Vorliegen eines Glutamylierungskomplexes, in dem die NIMA-verwandte Kinase aktivierend auf eine katalytische Untereinheit wirken könnte. Ein solcher Proteinkomplex wird für die Glutamylase aus dem Hirn diskutiert (Regnard et al., 1998, 1999), man sieht jedoch im vorliegenden Fall in den Fraktionen der Hydroxyapatit-Säule keine Polypeptide, die offensichtlich und stöchiometrisch mit der NIMA-verwandten Kinase zusammen gereinigt würden. Dabei ist allerdings zu beachten, daß ein wesentliches Merkmal der Glutamylierungsaktivität ihre große Salzeempfindlichkeit ist, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß mögliche Untereinheiten eines Komplexes während der Reinigung wenigstens teilweise voneinander getrennt werden und nicht mehr gemeinsam von der Säule eluieren. Unter solchen Bedingungen ist die Isolierung eines intakten Komplexes nur mit spezifischen Antikörpern gegen einzelne Untereinheiten möglich. Leider erwiesen sich die hergestellten polyklonalen CNK-1 Antikörper als ungeeignet, um signifikante Mengen des nativen Proteins aus Rohextrakten zu präzipitieren. In Zukunft könnten durch die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen CNK-1 größere Mengen an nativem Protein und eventuell interagierender Polypeptide isoliert werden.

In jedem Fall verdient die Idee, daß Mitglieder einer Familie möglicher Zellzyklus-Regulatoren ihre Wirkung, sei es direkt oder indirekt, über die Modifikation von Tubulin und damit die Beeinflussung der Eigenschaften von Mikrotubuli entfalten könnten, eine genauere Untersuchung. Hierzu wären in Zukunft folgende Experimente denkbar: Herstellung einer rekombinanten, funktionsfähigen CNK-1 durch Expression in Insektenzellen. Darstellung von monoklonalen CNK-1-Antikörpern für Immunpräzipitations-Experimente. Schliesslich „Knock-out“ der homologen *Leishmania*-NIMA verwandten Kinase-1 aus *Leishmania tarentolae* und eine Analyse der manipulierten Parasiten unter besonderer Beachtung der posttranslationalen Tubulin-Modifikationen.

6 Literaturverzeichnis

Acre, C.A., Rodriguez, J.A, Barra, H.S. and Caputto, R. (1975): Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-Dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin, *Eur.J.Biochem.* **59**, 145-149.

Agarana, C.E., Barra, H.S. and Caputto, R. (1975): Release of ¹⁴C-Tyrosin from tubulinyl-¹⁴C-tyrosine by brain extracts. Separation of a carboxypeptidase from tubulin tyrosine ligase. *Mol. Cell Biochem.* **19**, 17-21.

Agarana, C.E., Barra, H.S. and Caputto, R. (1980): Tubulinyl-tyrosine-carboxypeptidase from chicken brain: properties and partial purification. *J. Neurochem.***34**, 114-118.

Alexander, J.E., Hunt, D.F., Lee, M.K., Shabanowitz, J., Michel, H., Berlin, S. C., Mac Donald, T.L., Sundberg, R.J., Rebhuhn, L. and Frankfurter, A. (1991): Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III β Tubulin by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4685-4689.

Ali, N. and Siddiqui, A.(1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2249-2254.

Audebert, S., Desbruyères, E., Gruszinski, C., Koulakoff, A., Gros, F., Denoulet, P. and Eddé, B. (1993): Reversible polyglutamylation of α - and β -Tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. *Mol. Biol. Cell* **4**, 615-626.

Bachmann, M., Pfeifer, K., Schroder, H.C. and Müller, W.E. (1990). Characterization of the autoantigen La as nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties. *Cell* **60**, 85-93.

Barra, H.S., Rodriguez, J.A., Arce, C.A. and Caputto, R. (1973): A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins ¹⁴C-Arginine, by a ribonuklease-sensitive system and ¹⁴C-tyrosine by a ribonuklease insensitive system. *J. Neurochem.* **20**, 97-108.

Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**, 241-250.

Biebricher, C.K.. (1987). Replication and evolution of short RNA-species replicated by Q β replicase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**, 299-306.

Birkett, C.R., Foster, K.E., Johnson, L., and Gull, K. (1985) Use of monoclonal antibodies to analyse the expression of a multi-tubulin family. *FEBS Lett.* **187**, 211-218

Bobinac, Y., Moudjou, M., Fouquet, J.-P., Desbruyères, E., Eddé, B. and Bornens, M. (1998). Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil. Cytoskel.* **39**, 223-233.

- Bobinsec, Y., Khodjakov, A., Mir, L.M., Rieder, C.L., Eddé, B. and Bornens, M. (1998). Centriole Dissassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J.Cell Biol* **143**, 1575-1589
- Boucher, D., Larcher, J.-C., Gros, F. and Denoulet, P. (1994): Polyglutamylation of Tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein tau and Tubulin. *Biochemistry* **33**, 12471-12477.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bramblett, G.T., Chang, S. and Flavin, M. (1987). Periodic crosslinking of microtubules by cytoplasmic microtubule-associated and microtubule-corset proteins from a trypanosomatid. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* **84**, 3259-3363
- Bramblett, G.T., Kambadur, R. and Flavin, M. (1989). Immunocytochemical studies with antibodies to three proteins prominent in the isolated microtubule cytoskeleton of a trypanosomatid. *Cell Motil.Cytoskeleton* **13**, 145-157.
- Bré, M.-H., Redecker, V., Quibell, M., Darmanaden-Delorme, J., Bressac, C., Cosson, J., Huitorel, P., Schmitter, J.-M., Rossier, J., Johnson, T., Adouette, A. and Levilliers, N. (1996): Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility. *J.Cell Sci.* **109**, 727-738.
- Bré, M.-H., de Nechaud, B., Wolff, A. and Fleury, A. (1994): Glutamylated tubulin probed in ciliates with the monoclonal antibody GT335. *Cell Mot.Cytoskeleton* **27**, 337-349.
- Bré, M.H., Redeker, V., Vinh, J., Rossier, J. and Levillier, N. (1998). Tubulin polyglycylation: differential posttranslational modification of dynamic cytoplasmic and stable axonemal microtubules in Paramecium. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2655-2665
- Bressac, C., Bré, M.-H., Darmanaden-Delorme, J., Laurent, M., Levilliers, N. and Fleury, A. (1995). A massive new posttranslational modification occurs on axonemal tubulin at the final step of spermatogenesis in *Drosophila*. *Eur. J.Cell. Biol.* **67**, 346-355.
- Chang, P., and Stearns., T. (2000). Delta and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nature Cell Biol.* **2**, 30-35
- Cleveland, D.W. and Sullivan, K.F. (1985): Molecular biology and genetics of tubulin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 331-365.
- Colin, P.C., Osmani, A.H., Wu, L.P., Spotts, J.L. and Osmani, S.A. (2000). Mitotic Histone H3 Phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **102**, 293-302
- Cruz, A., Coburn, C. M. and Beverly, S. M. (1991). Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7170- 7174.
- Dideberg, O. and Bertrand, J. (1998). Tubulin tyrosine ligase: a shared fold with the glutathione synthetase ADP-forming family. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 57-58.
- Dustin, P. (1984) Microtubules. New York: Springer-Verlag

Dutcher, S.K. and Trabuco, E. (1998). The UNI3 gene is required for the assembly of basal body in *Chlamydomonas* and encodes delta tubulin, a new member of the tubulin superfamily. *Mol.Biol.Cell* **9**, 1293-1308

Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J.-P., Desbrières, E., Gros, F. and Denoulet, P. (1990): Posttranslational modification of α -tubulin. *Science* **247**, 83-84.

Erickson, H.P.(1997): FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trends in Cell Biology* **7**, 362-367.

Erickson, H.P. (2001). The FtsZ protofilament and attachment of ZipA – structural constraints on the FtsZ power stroke. *Curr.Opin.Cell Biol.* **13**, 55-60

Ersfeld, K., Wehland, J., Plessmann, U., Dodemont, H., Gerke, V. and Weber, K. (1993): Characterization of the tubulin-tyrosin ligase. *J.Cell Biol.* **120**, 725-732.

Flavin, M. and Murofushi, H. (1984). Tyrosine incorporation in tubulin. *Methods Enzymol.* **106**, 223-237.

Fouquet, J.-P., Edde, B., Kann, M.-L., Wolff, A., Desbrières, E., Gros, F. and Denoulet, P. (1994): Differential distribution of glutamylated tubulin during spermatogenesis in mammalian tissues. *Cell Motil.Cytoskeleton* **27**, 49-58.

Fry, A.M, Schultz, S.J., Bartek, J. and Nigg, E.A. (1995). Substrate specificity and cell cycle regulation of the Nek2 protein kinase, a potential human homolog of the mitotic regulator NIMA of *Aspergillus nidulans*. *J.Biol.Chem.* **270**, 12899-12905

Fukushige, T., Siddiqui, Z.K., Chou, M., Culotti, J.G., Gogonea, C.B., Siddiqui, Z.K. and Hamelin, M. (1999). Mec-12, an alpha-tubulin required for touch sensitivity in *C.elegans*. *J.Cell.Sci.* **112**, 395-403.

Fulton, C. and Simpson, P.A. (1976): Selective synthesis and utilization of flagellar tubulin: the multi-tubulin hypothesis. In *Cell Motility*, R.Goldmann; T.Pollard and J. Rossenbaum, eds. (Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory).

Gaertig, J., Cruz, M.A., Bowen, J., Gu, L., Pennock, D.G. and Gorovsky, M.A. (1995). Acetylation of lysine-40 in α -tubulin is not essential in *Tetrahymena termophila*. *J.Cell Biol* **129**, 1301-1310

Gagnon, C., White, D., Cosson, J., Huitorel, P., Edde, B., Desbrières, E., Paturle-Lefanchère, L., Multigner, L., Job, D. and Cibert, C. (1996): The polyglutamylated lateral chain of alpha-tubulin plays a key role in flagellar motility. *J.Cell Sci.* **109**, 1545-1553.

Gard, D.L. and Kirschner, M.W. (1985): A polymer dependent increase in phosphorylation of β -tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J. Cell. Biol.* **100**, 764-774

Geimer, S., Teltenkötter, A., Plessmann, U., Weber, K. and Lechtreck, K.-F. (1997). Purification and characterization of basal apparatuses from a flagellate green alga. *Cell Motil. Cytoskel.* **37**, 72-85.

Gevaert, K., Demol, H., Paype, M., Brockaert, D., De Boeck, S., Houthaeve, T., and Vandekerckhove, J. (1997). Peptides adsorbed on reverse-phase chromatographic

beads as target for femtomole sequencing by post source decay matrix assisted laser desorption ionization reflection time of flight mass spectrometry (MALDI-RETTOF-MS). *Electrophoresis* **18**, 2950-2960

Gottlieb, E. and Steitz., J.A. (1989a). Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J.* **8**, 851-861.

Gottlieb, E. and Steitz., J.A. (1989b). The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *EMBO J.* **8**, 841-850.

Greer, K. and Rosenbaum, J.L. (1989): Posttranslational modifications of tubulin, in: *Cell movement*, Volume 2: Kinesin, Dynein and Microtubule dynamics, 47-66, Alan R.Liss, Inc.

Gundersen, G.G. and Bulinski, J.C. (1984): Distinct populations of microtubules: tyrosinated and detyrosinated α -tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* **38**, 779-789.

Gurland, G. and Gundersen, G.G. (1995). Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *J Cell Biol* **131**, 1275-1290

Gyoeva, F.K., and Gelfland, V.I. (1991). Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature* **353**, 445-448

Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576-596

Hallack, M.E., Rodriguez, J.A., Barra, H.S. and Caputto, R. (1977): Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Letters* **73**, 147-150.

Hsu, J.Y. Sun, Z.W., Li, X. Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M. and Allis, C.D. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**, 279-291

Hühn, P, Pruijn, G.J.M, van Venrooij, W.J. and Bachman, M. (1997). Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme. *Nucleic Acids Res.* **25**, 410-416

Hyams, J.S. and Lloyd, C.W. (1993). *Microtubules*. New York: Wiley-Liss.

Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001). Translating the Histon Code. *Science* **293**, 1074-1080.

Joshi, H.C., Palacios, M.J., McNamara, L. and Cleveland, D.W. (1992): γ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell-cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature* **356**, 80-82.

Kambadur, R., Lewis, M., Chang, S. and Flavin, M. (1990). Characterization of putative cytoskeletal proteins from a Trypanosomatid and their comparative binding to microtubules and soluble tubulin. *J.Biol.Chem.* **265**, 20959-20965

- Khawaja, S., Gundersen, G.G. and Bulinski, C.J.(1988): Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J. Cell Biol.* **106**, 141-149.
- Krauhs, E., Little, M., Kempf, T., Hofer-Warbinek, R., Ade, W. and Postingl, H. (1981): Complete amino acid sequence of β -tubulin from porcine brain. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* **78**, 4156- 4170.
- Kreitzer, G., Liao, G., and Gundersen, G.G. (1999). Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* **10**, 1105-1118
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larcher, J. C., Boucher, D., Lazareg, S., Gros, F. and Denoulet, P. (1996). Interaction of kinesin motor domains with α - and β -tubulin subunits at a Tau-independent binding site. *J. Biol. Chem.* **271**, 22117-22124.
- LeDizet, M. and Piperno, G. (1987): Identification of an acetylation site of Chlamydomonas α -tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5720- 5724.
- Lewis, S.A., Lee, M.G.-S. and Gowan, N.J: (1985): Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J.Cell Biol.* **101**, 852-861.
- Low, S.C. and Berry, M.J. (1996). Knowing when not to stop: selenocystein incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **21**, 203-207
- Löwe, J.Y. and Amos, L.A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell division protein FtsZ complexed with GDP. *Nature* **391**, 203-206
- Lu, K.P. and Hunter, T. (1995). Evidence for a NIMA-like mitotic pathway in vertebrate cells. *Cell* **81**, 413-424
- Ludueno, R.F. (1993): Are Tubulin isotypes functionally significant?. *Mol. Biol. Cell*, **4**, 445-457.
- Ludueno, R. F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* **178**, 207-275.
- Mary, J., Redecker, V., Le Caer, J.-P., Rossier, J. and Schmitter, J.-M. (1997): Posttranslational modifications on axonemal tubulin. *J. Prot. Chem.* **16**, No.5, 403-407.
- Mary, J., Redecker, V., Le Caer, J.-P., Rossier, J. and Schmitter, J.-M. (1996): Posttranslational modifications in the C-terminal tail of axonemal tubulin from sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* **271**, 9928-9933.
- Mary, J., Redecker, V., Le Caer, J.-P., Prome, J.-C. and Rossier, J. (1994): Class I and class IV β -tubulin isotypes expressed in adult mouse brain are glutamylated. *FEBS Lett.***353**, 89-94.
- MacRae, T. H. (1997). Tubulin post-translational modifications. Enzymes and their mechanisms of action. *Eur. J. Biochem.* **244**, 265-278.

- Mattioli, M and Reichlin, M. (1974). Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic non ribosomal antigen. *Arthritis Rheum.* **17**, 421-429.
- McKean, P.G., Vaughan, S and Gull, K. (2001). The extended tubulin superfamily. *J.Cell Sci.* **114**, 2723-2733
- Mc Laren, R.S. Caruccio, N. and Ross, J. (1997). Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. *Mol.Cell.Biol* **17**, 3028-3036
- Meerovitch, K., Sivitskin, Y.V., Lee, H.S., Lejbkowitz, D.J., Kenan, D.J., Chan, E.K., Agol, V.I., Keene, J.D. and Sonenberg, N. (1993). La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J.Virol.* **67**, 3798-3807
- Meerovitch, K. and Sonenberg, N. (1993). Internal initiation of picornavirus RNA translation. *Semin. Virol.* **4**, 217-227.
- Mitchison, T.J. and Kirschner, M.W. (1984): Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**: 237-242.
- Mitchison, T.J. (1993): Localization of an exchangeable GTP-binding site at the plus end of microtubules. *Science* **261**, 1044-1047.
- Multigner, L., Pignot-Paintrand, I., Saoudi, Y., Job, D., Plessmann, U., Rüdiger, M. and Weber, K. (1996): The A and B Tubules of the outer doublets of sea urchin sperm axonemes are composed of different tubulin variants. *Biochemistry* **33**, 10862-10871.
- Ngo, C. Tschudi, K. Gull and E. Ullu. (1998). Double stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14687-14692.
- Nigg, E.A. (2001). Mitotic Kinases as Regulators of Cell Division and its Checkpoints. *Nature Reviews* **2**, 21-32
- Nogales, E., Wolf, S. G. and Downing, K. H. (1998). Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199-202.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A. and Downing, K.H. (1999). High-Resolution Model of the Microtubule. *Cell* **96**, 79-88
- Oakley, C.E. and Oakley, B.R. (1989). Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by the *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* **338**, 662-664
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- Okada, Y. and Hirokawa, N. (2000). Mechanism of single-headed processivity: Diffusional anchoring between the K-loop of kinesin and the C-terminus of tubulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **97**, 640-645
- Osmani, A.H., O'Donnell, K., Pu, R.T. and Osamani, S.J. (1991). Activation of the *nimA* protein kinase plays a unique role during mitosis that cannot be bypassed by absence of the *bimE* checkpoint. *EMBO.J.* **10**, 2669-2679

- Ozols, J. and Caron, J.M. (1997). Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation. *Mol Biol Cell* **4**, 637-645
- Paturle, L., Wehland, J., Margolis, R.L. and Job, D. (1989): Complete separation of tyrosinated, detyrosinated and nontyrosinable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. *Biochemistry* **28**, 2698-2704.
- Paturle-Lefanechère, L., Eddé, B., Denoulet, P., Van Dorsselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J.-P., Wehland, J., and Job, D. (1991): Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* **30**, 10523-10528.
- Plessmann, U. and Weber, K. (1997): Mammalian sperm tubulin: An exceptionally large number of variants based on several posttranslational modifications. *J. Prot. Chem.* **16**, No.5, 385-390.
- Postingl, H., Krauhs, E., Little, M. and Kempf, T. (1981): Complete amino acid sequence of α -tubulin from porcine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2757-2761.
- Raff, E.C., Hutchens, J.A., Hoyle, H.D., Nielsen, M.G. and Turner, F.R. (2000). Conserved axoneme symmetry altered by a component β -tubulin. *Curr Biol.* **10**, 1391-1394
- Rechsteiner, M. and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**, 267-271-
- Redeker, V., Levelliers, N., Schmitter, J.-M., LeCaer, J.-P., Rossier, J., Adouette, A. and Bré, M.-H. (1994): Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* **266**. 1688-1691.
- Redeker, V., Le Caer, J.-P., Rossier, J. and Promé, J.-C. (1991). Structure of the polyglutamyl side chain post-translationally added to α -tubulin. *J. Biol. Chem.* **266**, 23461-23466.
- Redeker, V., Rusconi, F., Mary, J., Promé, D. and Rossier, J. (1996). Structure of the C-terminal tail of α -tubulin: increase of heterogeneity from newborn to adult *J. Neurochem.* **67**, 2104-2114.
- Regnard, C., Audebert, S., Desbruyères, E., Denoulet, P. and Eddé, B. (1998). Tubulin polyglutamylase: partial purification and enzymatic properties. *Biochemistry* **37**, 8395-8404.
- Regnard, C., Desbruyères, E., Denoulet, P. and Eddé, B. (1999). Tubulin polyglutamylase: isozymic variants and regulation during the cell cycle in HeLa cells. *J. Cell Sci* **112**, 4281-4289
- Regnard C., Desbruyères, E., Huet, J.-C., Beauvallet, C., Pernollet, J.-C. and Eddé, B. (2000). Polyglutamylase of Nucleosome Assembly Proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 15696-15976.
- Robbins, D.J., Nybakken, K.E., Kobayashi, R., Sisson, J.C., Bishop, J.M. and Therond, P.P. (1997). Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal-2. *Cell* **90**, 225-234
- Rosenbaum, J. (2000). Functions for tubulin modifications at last. *Curr. Biol.* **10**, R801-R803

- Ruiz, F., Krzywicka, A., Klotz, C., Keller, A.M., Cohen, J., Koll, F., Balavione, G., and Baisson, J. (2000). The sm19 gene, required for basal body duplication in *Paramecium*, encodes eta-tubulin, a new member of the tubulin superfamily. *Curr. Biol.* **10**, 1451-1454
- Rüdiger, M., Plessmann, U., Klöppel, K.-D., Wehland, J. and Weber, K. (1992): Class II tubulin, the major brain β tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435. *FEBS Lett.* **308**, 101- 105
- Rüdiger, M. and Weber, K. (1993): Characterization of the posttranslational modifications in tubulin from the marginal band of avian erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **218**, 107-116.
- Rüdiger, M., Wehland, J., and Weber, K. (1994): The carboxyterminal peptide of detyrosinated α tubulin provides a minimal system to study the substrate specificity of tubulin-tyrosine ligase. *Eur.J.Biochem.* **220**, 309-320.
- Rüdiger, M., Plessmann, U., Rüdiger, A.-H. and Weber, K. (1995a): β tubulin of bull sperm is polyglycylated. *FEBS Lett.* **364**, 147-151.
- Rüdiger, A., Rüdiger, M., Weber, K. and Schomburg, D. (1995b): Characterization of posttranslational modifications of brain tubulin by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy: direct one-step-analysis of a limited subtilisin digest. *Anal.Biochem.* **224**, 532-537.
- Rüdiger, A.-H., Rüdiger, M., Wehland, J. and Weber, K. (1999). Monoclonal antibody ID5: epitope characterization and minimal requirements for the recognition of polyglutamylated α - and β -tubulin. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 15-20.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. (Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Sammak, P.J. and Borisy, G.G. (1988): Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature* **332**: 724-726.
- Savage, C., Xue, Y., Mitani, S., Hall, D., Zakhary, R. and Chalfie, M. (1994). Mutations in the *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin gene *mec-7*: effects on microtubule assembly and stability and on autoregulation. *J.Cell. Sci* **107**, 2165-2175
- Sasse, R., and Gull, K.(1988). Tubulin posttranslational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei*. *J.Cell.Sci* **90**, 577-589
- Schnapp, B.J., Vale, R.D., Sheetz, M.P., and Reese, T.S. (1985): Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. *Cell* **40**, 455-462.
- Schneider, A., Sherwin, T., Sasse, R., Russell, D. G., Gull, K. and Seebeck, T. (1987). Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei brucei* contain the same α -tubulin isoforms. *J. Cell Biol.* **104**, 431-438.
- Schneider, A., Plessmann, U. and Weber, K. (1997). Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei* are extensively glutamylated. *J. Cell Sci.* **110**, 431-437.

Schneider, A., Plessmann, U., Felleisen, R. and Weber, K. (1998). Post-translational modifications of trichomonad tubulins; identification of multiple glutamylation sites. *FEBS Lett.* **429**, 399-402.

Schröder, H. C., Wehland, J. and Weber, K. (1985). Purification of brain tubulin-tyrosine ligase by biochemical and immunological methods. *J. Cell Biol.* **100**, 276-281.

Seebeck, T., Schneider, A., Kueng, V., Schlaeppli, K. and Hemphill, A. (1988). The cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* – the beauty of simplicity. *Protoplasma* **145**, 188-194.

Seebeck, T., Hemphill, A. and Lawson, D. (1990). The cytoskeleton of trypanosomes. *Parasitol. Today* **6**, 49-52.

Seiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Ehrlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Sherwin, T., Schneider, A., Sasse, R., Seebeck, T. and Gull, K. (1987). Distinct localization and cell cycle dependence of COOH terminally tyrosinolated α -tubulin in the microtubules of *Trypanosoma brucei brucei*. *J. Cell Biol.* **104**, 439-446.

Shim, H. and Fairlamb, A. H. (1988). Levels of polyamines, glutathion and glutathion-spermidine conjugates during growth of the insect trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 807-817.

Shelanski, M.L., Gaskin, F. and Cantor, C.R. (1973): Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 765-768.

Shevchenko, A., Wilm, M. Vorm, O. and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained Polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858

Sloboda, R.D. and Rosenbaum, J.L. (1982): Purification and assay of Microtubule-Associated Proteins (MAPs). *Methods Enzymol.* **85**, 409-416.

Sobel, S.G. and Wolin, S.L. (1999). Two yeast La-motif containing proteins are RNA-binding proteins that associate with polyribosomes. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3849-3862.

Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45

Sullivan, K.F. (1988). Structure and Utilization of tubulin isotypes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 687-716.

Sullivan, K.F. and Cleveland, D.W. (1986): Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate β -tubulin polypeptide classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4327-4331.

ten Asbroek, A. L. M. A., Oulette, M. and Borst, P. (1990). Targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene into the tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei*. *Nature* **348**, 174-175.

Thorn, K.S., Ubersax, J.A. and Vale, R.D. (2000). Engineering the processive run length of the kinesin motor. *J. Cell Biol.* **151**, 1093-1100

Topfer, F., Gordon, T. and McCluskey. (1993). Characterization of the mouse autoantigen La (SS-B). Identification of a conserved ATP-binding site and reactivity of the recombinant protein with poly(U) and human autoantibodies. *J. Immunol.* **150**, 3091-3100.

Uto, K and Sagata, N. (2000). Nek2B, a novel maternal form of Nek2 kinase, is essential for the assembly or maintenance of centrosomes in early *Xenopus* embryos. *EMBO J.* **19**, 1816-1826

Vale, R.D., Schnapp, B.J., Reese, T.S. and Sheetz, M.P. (1985): Organelle, Bead and microtubule translocations promoted by soluble factors from squid giant axon. *Cell* **40**, 559-569.

van Venrooij, W.J. and Pruijn, G.J.M. (1995). Ribonucleoprotein complexes as autoantigens. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 819-824.

Vallee, R.B. (1990): Molecular characterization of high molecular weight microtubule-associated proteins: some answers, many questions. *Cell Motil. Cytoskeleton* **15**, 204-209.

Vallee, R.B. and Sheptner, A. (1990): Motor proteins of cytoplasmic microtubules. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 909-932.

Vinh, J., Landridge, J.I., Bré, M.H., Levilliers, N., Redeker, V., Loyaux, D. and Rossier, J. (1999). Structural Characterization by Tandem Mass Spectrometry of the posttranslational polyglycylation of Tubulin. *Biochemistry* **38**, 3133-3139

Weber, K., Schneider, A., Westermann, S., Müller, N. and Plessmann, U. (1997). Post-translational modifications of α - and β -tubulin in *Giardia lamblia*, an ancient eukaryote. *FEBS Lett.* **419**, 87-91.

Wolff, A., de Néchaud, B., Chillet, D., Mazarguil, H., Desbruyères, E., Audebert, S., Eddé, B., Gros, F. and Denoulet, P. (1992). Distribution of glutamylated α and β -tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur. J. Cell Biol.* **59**, 425-432.

Wolff, A., Houdayer, M., Chillet, D., de Néchaud, B. and Denoulet, P. (1994). Structure of the polyglutamyl chain of tubulin: Occurrence of alpha and gamma linkages between glutamyl units revealed by monoreactive polyclonal antibodies. *Biol. Cell* **81**, 11-16.

Webster, D.R., Wehland, J., Weber, K. and Borisy, G.G. (1990): Detyrosination of α -tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J. Cell Biol.* **111**, 113-122.

Wehland, J. and Weber, K. (1987): Tubulin-Tyrosine-Ligase has a binding site on β -tubulin: a two-domain structure of the enzyme. *J. Cell Biol.* **104**, 1059-1067.

Wessel, D. and Flügge, U.J. (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-143.

Yoo, C.J. and Wolin, S.L. (1997). The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell* **89**, 393-402.

Yoo, C.J. and Wolin, S.L. (1994). La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5412-5424

Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B. and Mitchison, T. (1995): Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature* **378**, 578-583.

Zhu, N.Z., Hunt, D.F., Shabanowitz, J., Bodnar, W.M. and Frankfurter, A. (1992): Posttranslational modification of class III β -Tubulin: characterization by tandem mass spectrometry. *Mol. Biol. Cell* **3**, 50-55.

Xia, L., Hai, B., Gao, Y., Burnette, D., Thazath, R., Duan, J., Bré, M.H., Levilliers, N., Gorovsky, M.A. and Gaertig, J. (2000). Polyglycylation of tubulin is essential and effects cell motility and division in *Tetrahymena*. *J. Cell Biol* **148**, 1097-1106

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
Cpm	counts per minute
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl. enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FCS	Fötales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HPLC	engl. high performance liquid chromatography
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MALDI	engl. matrix assisted laser desorption ionization
MAPs	Mikrotubuli-assoziierte-Proteine
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	Phosphocellulose
PCR	engl. polymerase chain reaction

pc Tubulin	über Phosphocellulose gereinigtes, MAP-freies Tubulin
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PTH	Phenylthiohydantoin
PTM	posttranslationale Modifikation
RP	engl. reversed phase
UAP	engl. universal amplification primer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	engl. sodium dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	engl. time of flight
TPG	Tubulin Polyglutamylase
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
TTL	Tubulin-Tyrosin Ligase
U	internationale Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
VT	Volumenteil
(w/v)	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Alle weiteren Abkürzungen, wie auch der Ein- und Dreibuchstabencode für die Aminosäuren, erfolgten nach den international anerkannten Empfehlungen der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) und der IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology).

Lebenslauf

Name, Vorname	Westermann, Stefan
Anschrift	Stauffenberggring 1 37075 Göttingen
Geburtstag/-ort	7.10.1971 in Heessen
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1978-1982	Grundschule Welper
1982-1991	Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Hamm
Juni 1991	Abitur
1991-1992	Grundwehrdienst

Wissenschaftliche Ausbildung

Oktober 1992	Beginn des Studiums der Biochemie, Universität Hannover
Oktober 1994	Diplomvorprüfung
Mai 1997	Diplomprüfung Hauptfächer: Biochemie, biophysikalische Chemie Nebenfach: Immunologie
Mai-November 1997	Anfertigung der experimentellen Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Weber in der Abteilung Biochemie und Zellbiologie am MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen
Seit Dezember 1997	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am MPI für biophysikalische Chemie, Abteilung Biochemie und Zellbiologie