Untersuchung der Rolle von Motorproteinen bei der MAP2c-induzierten Reorganisation von Mikrotubuli

Masterarbeit

Technische Universität Dortmund Fachbereich Chemie

Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie Dortmund Abteilung 2 - Systemische Zellbiologie

vorgelegt von

Olga Müller

Dortmund, den 2. März 2010

Die vorliegende Arbeit wurde vom 3. September 2009 bis zum 3. März 2010 an der Technischen Universität Dortmund am Lehrstuhl für Chemische Biologie und dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund (Abteilung II -Systemische Biologie) unter der Leitung von Dr. Leif Dehmelt angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Philippe Bastiaens Zweitgutachter: Prof. Dr. Frank Wehner

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Dortmund, den

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
a.u.	Arbitrary Unit
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Temperatur in Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
cm	Zentimeter
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DLIC	Dynein light intermediate chain (leichte Zwischenkette von Dynein)
Dync1h1	<i>Dynein heavy chain 1</i> (schwere Dynein Kette 1)
	(auch unter DNHC1 aufgeführt)
DNIC2	Dynein intermediate chain 2 (intermediäre Dynein Kette 2)
dNTPs	Desoxynukleotid-Triphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein (verstärkst grün-floureszierendes Protein)
et al.	und andere
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötales Rinderserum)
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein (grün-floureszierendes Protein)
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
HMW	high-molecular weight (hohes Molekulargewicht)
IM	Imaging Medium
INCENP	inner centromere protein
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase

kDa	Kilo-Dalton
KHC	Kinesin heavy chain (schwere Kinesin-Kette)
KIF	kinesin family member (Kinesin-Familienmitglied)
KIF11	kinesin family member 11 (Kinesin-Familienmitglied 11)
	auch unter Eg5 aufgeführt
KIF23	kinesin family member 23 (Kinesin-Familienmitglied 23)
KLC	Kinesin light chain (leichte Kinesin-Kette)
1	Liter
LB	Luria-Bertani
LFA	Lipofectamin 2000
LMW	low-molecular weight (niedriges Molekulargewicht)
М	Molar; Mol pro Liter
MAP	Microtubule associated protein (Mikrotubuli-assoziiertes Protein)
MDa	Mega-Dalton
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
min	Minute
ml	Milliliter
mМ	Millimolar
MKLP-1	<i>mitotic kinesin-like protein 1</i> (mitotische Kinesin-ähnliches Protein 1)
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MT	Mikrotubuli
MTBR	Microtubule-binding region (Mikrotubuli-bindende Domäne)
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
N2a	Neuro2a
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD600nm	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNase	Ribonuklease, RNA-abbauendes Enzym
RFP	Red fluorescent protein (rot-fluoreszierendes Protein)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)		
RT	Raumtemperatur		
S	Sekunde		
SD	Standardabweichung		
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)		
siRNA	Small interfering RNA		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TE	Tris-EDTA		
TIRF	Total internal reflection fluorescene (Interne Totalreflektions-Fluoreszenz)		
TIRF-M	Total internal reflection fluorescene microscopy		
	(Interne Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie)		
Tub	Tubulin		
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan		
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)		
UV	Ultraviolett		
üN	über Nacht		
V	Volt		
vgl.	Vergleiche		
(v/v)	Volumen pro Volumen		
(w/v)	Gewicht pro Volumen		
n			

Inhaltsverzeichnis

Ζι	ısamı	nenfass	ung	5
1	Einl	eitung		6
	1.1	Zytosl	kelett	6
	1.2	Mikro	tubuli	6
	1.3	Mikro	tubuli-assoziierte Proteine (MAPs) und die Rolle von MAP2c in	
		der En	Itwicklung von Neuronen	9
	1.4	Motor	proteine	12
2	Ziel	setzung	:	18
3	Mat	erial ur	nd Methoden	20
	3.1	Mater	ial	20
		3.1.1	Software	20
		3.1.2	Geräte	21
		3.1.3	Verbrauchsmaterialien	22
		3.1.4	Chemikalien und Reagenzien	22
		3.1.5	Kits	23
		3.1.6	Enzyme und Größenstandards	23
		3.1.7	Puffer und Lösungen	23
		3.1.8	Vektoren	24
		3.1.9	Bakterienstämme	25
		3.1.10	Nährmedien für Bakterien	25
		3.1.11	Antibiotika für <i>E.coli</i> Nährmedien	26
		3.1.12	Zelllinien	26
		3.1.13	Nährmedien für eukaryotische Zellen	26
		3.1.14	Antibiotika für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen	27
		3.1.15	Antikörper	28
	3.2	Molek	ularbiologische Methoden	29
		3.2.1	Konzentrationsbestimmung von DNA	29

		3.2.2	Analytische Agarosegelelektrophorese	29
		3.2.3	DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme	29
		3.2.4	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	30
		3.2.5	Hitzeschocktransformation chemisch-kompetenter E.coli Zellen .	31
		3.2.6	Herstellung von Gefrierkulturen	31
		3.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA	31
	3.3	Zellb	iologische Methoden	33
		3.3.1	Allgemeine Kultivierung und Passagierung von Zellkulturen	33
		3.3.2	Zellzählung	33
		3.3.3	Gefrierkulturen eukaryotischer Zellen	33
		3.3.4	Screen zur Identifizierung von Motorproteinen via RNAi in N2a	
			Zellen	34
		3.3.5	Fixierung und Antikörperfärbung von Neuro2a Zellen	35
		3.3.6	Transfektion von COS-7 Zellen mit FuGENE6 und <i>washout</i>	36
		3.3.7	Erstellung stabil-transfizierter P19-Zellen durch Selektion mit G418	36
	3.4	Mikro	oskopische Methoden	37
		3.4.1	Interne-Totalreflektions-Fluoreszenz Mikroskopie (TIRFM)	37
		3.4.2	Langzeit <i>live-cell Imaging</i> von N2a-Zellen	38
۷	Erg	ebnisse		41
	4.1	Entwi	cklung eines miniaturisierten Assays zur Untersuchung der Rol-	
		le vor	Motorproteinen während der MAP2c-induzierten Reorganisati-	
		on vo	n MT	41
	4.2	Analy	vse der Rolle von Motorproteinen während der MAP2c-induzierten	
		Reorg	anisation von MT	43
		4.2.1	Varalaich dar MAP2a CEP Intonsität in parinharan und provima	
			vergieich der MAI 2C-GIT-intensität in peripheren und proxima-	
			len Bereichen von Zellen	43
		4.2.2	len Bereichen von Zellen	43 49
		4.2.2 4.2.3	len Bereichen von Zellen	43 49
		4.2.2 4.2.3	Vergielen der MAT 2C-GFT-intensität in peripheren und proxima- len Bereichen von Zellen	43 49 54
	4.3	4.2.2 4.2.3 Langa	len Bereichen von Zellen Analyse der Zirkularität der Mikrotubulibündel Analyse des Bündelumfangs von MAP2c-induzierten Mikrotubulibündel bulibündeln zeit live-cell Imaging Experimente zur Untersuchung des Einflus-	43 49 54
	4.3	4.2.2 4.2.3 Langz ses vo	len Bereichen von Zellen	43 49 54 58
	4.3	4.2.2 4.2.3 Langz ses vo 4.3.1	Vergreicht der MAR 2C-GFF-intensität in peripheren und proxima- len Bereichen von Zellen	43 49 54 58
	4.3	4.2.2 4.2.3 Langz ses vo 4.3.1	Vergreicht der MAT 2C-GFF-Intensität int peripheren und proxima- len Bereichen von Zellen	43 49 54 58 58
	4.3	 4.2.2 4.2.3 Langz ses vo 4.3.1 4.3.2 	vergreicht der MAT 2C-GIT -Intensität int peripheren und proxima- len Bereichen von Zellen	 43 49 54 58 58
	4.3	 4.2.2 4.2.3 Langz ses vo 4.3.1 4.3.2 	Vergreicht der MAR 2C-GH -Intensität int peripheren und proxima- len Bereichen von Zellen	 43 49 54 58 58 61

		4.3.3	Langzeit <i>live-cell Imaging</i> Versuch zur Untersuchung des Einflus-	
			ses von KIF23 (MKLP-1) auf die MT-Reorganisation	66
		4.3.4	Langzeit live-cell Imaging zur Untersuchung des Einflusses von	
			KIF11 (Eg5) auf die MT-Reorganisation	67
	4.4	Direk	te Beobachtung der schweren Dynein-Kette (Dync1h1) im Trans-	
		port v	on MT-Bündeln	69
5	Dis	kussion		73
	5.1	Entwi	cklung des <i>high-content</i> Screens	73
	5.2	Die R	olle von Dynein in der MAP2c-induzierten MT-Reorganisation	74
		5.2.1	Knock-down von Dync1h1 führt zu einer Invertierung der MT-	
			Bündelpolarität	74
	5.3	Knock	<i>k-down</i> aller bekannten Dyneinuntereinheiten suggeriert multi-	
		ple Fı	inktionen von Dynein in Neuro2a-Zellen	76
	5.4	Die R	olle von KIFs in der MT-Reorganisation	77
		5.4.1	Knock-down von KIF23 (MKLP-1) induziert multiple Mikrotubuli-	
			abhängige Phänotypen	77
		5.4.2	Knock-down von KIF11 (Eg5) führt zu einer verlangsamten MT-	
			Motilität	77
		5.4.3	Beobachtungen nach <i>knock-down</i> anderer KIFs	78
Li	terati	urverze	ichnis	80
Aı	nhang	g		85

Zusammenfassung

Die Reorganisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts spielt eine wichtige Rolle bei der Neuriteninitiation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle einzelner Motorproteine bei diesem Prozess in einem Screen und mit Hilfe von langzeit live-cell Imaging Experimenten untersucht. Dazu wurde in Neuro2a-Zellen ein Screen durchgeführt, bei dem insgesamt die Rolle von 78 Motorproteinen bei der MAP2c induzierten Mikrotubuli Reorganisation analysiert wurde. Sowohl Mitglieder der Kinesin Familie, als auch Untereinheiten des zytoplasmatischen Dyneins wurden als Kandidaten identifiziert. Insbesondere wurden die Dyneinuntereinheiten Dync1h1, Dync1i2 und Dynlrb1als mögliche Effektoren der nach außen gerichteten MT-Verschiebung identifiziert. Entgegen unserer Erwartungen wurden jedoch auch nach knock-down der zentralen Dyneinkomponente Dync1h1 ausgeprägte Neuriten-artige Auswüchse gebildet. Allerdings zeigten live-cell Experimente dass diese Auswüchse durch einen alternativen Mechanismus gebildet werden. Im Gegensatz zu Kontrollzellen, welche durch einfache Verschiebungen von Mikrotubulibündeln Zellfortsätze induzieren, findet nach knock-down von Dync1h1 eine Invertierung eines Mikrotubuliasters statt. Dieser Aster wandert hierauf zur Zellperipherie und bildet eine Zellausstülpung. Dieser Bildungsmechanismus suggeriert eine invertierte Mikrotubulipolarität in dem resultierenden Neuriten-artigen Auswuchs. Weiter konnte nach Dynein knock-down eine Doppelanordnung von Mikrotubulibündeln beobachtet werden, welche Hinweise auf das Vorliegen von unterschiedlichen Mikrotubulipopulationen geben. Außerdem wurden Anzeichen für eine mögliche Rolle der Kinesine KIF11(Eg5) und KIF23(MKLP-1) in der MAP2c-induzierten MT-Bündelung erhalten. Die Untersuchungen dieser Arbeit offenbaren ein komplexes Zusammenspiel von Kinesinen und Untereinheiten des zytoplasmatischen Dynein in der MAP2c-induzierten Reorganisation von Mikrotubuli. Einige dieser Mechanismen sind möglicherweise in der Neuriteninitiation involviert.

1 Einleitung

1.1 Zytoskelett

Das Zytoskelett in eukaryotischen Zellen besteht aus einem Netzwerk von Protofilamenten, die zusammen eine komplexe dynamische Struktur bilden und der Zelle so Festigkeit und ihre Gestalt verleihen. Zusätzlich definiert das Zytoskelett die Polarität der Zelle und vermittelt intrazelluläre Transportvorgänge. Das Zytoskelett wird von den drei Filamenten F-Aktin, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli (MT) gebildet. Diese drei Filamente sind für verschiedene biologische Aufgaben zuständig. Aktinfilamente und Mikrotubuli weisen eine intrinsische Polarität auf, die zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität beiträgt und die Basis für den gerichteten Transport innerhalb der Zelle darstellt. Eine weitere Funktion der Mikrotubuli ist die Chromosomenverteilung durch die Bildung der Mitosespindel während der Zellteilung. Mikrotubuli spielen außerdem in Neuronen eine wichtige Rolle bei der Neuritenbildung [9]. Neuriten sind dynamische Auswüchse, die mindestens so lang wie der Zellkörper werden [14]. An ihrer Spitze bilden sie eine Aktin-reiche Struktur, den Wachstumskegel (growth cone) [14]. Die Bildung von Neuriten erfordert eine Reorganisation des MT- und Aktinzytoskeletts [14][46]. Zunächst fokussieren parallel gebündelte MT eine Kraft auf die Plasmamembran, wodurch der Aktin-reiche Zellkortex nachgibt und ein Wachstumskegel entsteht [9]. In diesem Prozess bilden MT den Neuritenschaft aus [46]. In der folgenden Entwicklung differenzieren sich Neuriten zu Axonen und Dendriten. In Axonen sind die MT mit ihrem Plus-Ende vom Zellkörper nach außen orientiert [13]. In Dendriten haben sie eine gemischte Orientierung [13].

1.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli (MT) sind in verschiedenen zellulären Prozessen, wie der Zellmorphogenese, der Zellteilung und dem intrazellulären Transport, involviert. In Zellen dienen sie als Gleise für den Transport von Organellen, der durch Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine vermittelt wird [34]. Mikrotubuli sind filamentöse Polymere aus TubulinHeterodimeren aus globulärem α - und β -Tubulin (53 kDa und 55 kDa) [47]. Die in Längsrichtung verlaufenden Filamente aus Tubulin-Untereinheiten werden Protofilamente genannt. Mikrotubuli bestehen aus 13 parallelen Protofilamenten, die zusammen einen Hohlzylinder bilden [47]. Diese Hohlzylinder besitzen einen Durchmesser von etwa 24 nm. Jedes Heterodimer bindet zwei GTP-Moleküle, wobei α -Tubulin ein GTP irreversibel und β -Tubulin ein GTP reversibel bindet. Das β -Tubulin gebundene GTP wird während der MT-Assemblierung zu GDP hydrolysiert. Während der Assemblierung bildet ein Heterodimer einen longitudinalen Kontakt zu einem weiteren Dimer durch sogenannte Kopf-Schwanz-Verbindung (head-to-tail) aus, wodurch die Filamente ihre intrinsische Polarität erlangen. Die Polymerisation von Tubulin-Dimeren findet bevorzugt am Plus-Ende statt, dessen Spitze aus β -Monomeren gebildet wird. Das Minus-Ende der MT schließt mit einer Kappe aus α -Monomeren ab. Bei der Polymerisation wechseln Mikrotubuli am Plus-Ende zwischen Phasen langsamen Wachstums und schneller Depolymerisation. Der Wechsel von einer Wachstumsphase zur Depolymerisierung wird als "Katastrophe" bezeichnet, der Wechsel in umgekehrter Richtung als "Rettung". Diese sogenannte dynamische Instabilität [48] verleiht Mikrotubuli eine hohe Flexibilität bzgl. ihrer Organisation und erleichtert die Remodellierung des MT-Zytoskeletts. Die dynamische Instabilität der Mikrotubuli wird durch die Hydrolyse von GTP an β -Tubulin reguliert. Wenn sich ein Tubulindimer an ein wachsendes Mikrotubuli anlagert, wird die GTP-Hydrolyse induziert. Das dabei entstehende GDP bleibt aber weiter an dem Polymer gebunden. Schnell wachsende Mikrotubuli haben an ihrem Plus-Ende eine GTP-Kappe, da die Polymerisation schneller als die GTP-Hydrolyse erfolgt. Die Kappe begünstigt die weitere Anlagerung von GTP-Tubulinmolekülen und somit das Wachstum des Mikrotubulus. Durch die kontinuierliche GTP-Hydrolyse entstehen jedoch GDP-Tubuline, die eine energetisch ungünstigere Konformation aufweisen. Dadurch entsteht eine mechanische Spannung, die den Mikrotubulus destabilisiert und zu einer schnelleren Depolymerisation führen kann. Wenn die Hydrolyse der Tubulindimere schneller als die Addition neuer Tubulindimere erfolgt, geht die GTP-Kappe verloren und der Mikrotubulus wird instabil und kann hierauf in eine schrumpfende Phase wechseln. Binden genügend GTP-gebundene Dimere an das schrumpfende Ende, bildet sich eine neue GTP-Kappe und der Mikrotubulus wächst wieder. Normalerweise sind Mikrotubuli jedoch mit ihrem Minus-Ende am Mikrotubuli-organizing center (MTOC) verankert. Durch diese Bindung werden MT vor einer Depolymerisierung geschützt. Freie MT, die nicht am MTOC verankert sind, können sich via treadmilling durch die Zelle bewegen [8]. Hierbei bewegen sich nicht die MT per se, sondern sie wandern durch die Zelle, indem sie an ihrem Minus-Ende depolymerisieren und an ihrem Plus-Ende polymerisieren (vgl. Abb. 1.1) [8].



Abbildung 1.1: Modelle der Dynamik von Mikrotubuli. A. Modell der dynamischen Instabilität. α -Tubuline sind in hellblau, β -Tubuline mit GTP in rot und β -Tubuline mit GDP in violett dargestellt. An das wachsende Plus-Ende der Mikrotubuli lagern sich GTP-Tubulin-Dimere an. GTP wird hydrolysiert, bis nur noch GDP-Tubulindimere vorhanden sind. Die GDP-Tubulindimere induzieren eine mechanische Spannung in dem Mirkotubulus, welche dazu führen kann, dass sich die Protofilamente am Ende des Tubulus nach außen biegen und der Mikrotubulus depolymerisieren könnte. Dieser Vorgang wird "Katastrophe" genannt. Wenn das Schrumpfen der Mikrotubuli gestoppt wird und wieder in eine Polymerisierung übergeht, wird dieser Zustand als "Rettung" bezeichnet. B. Mikrotubuli-Bewegung via treadmilling. Bei dem *treadmilling* lagern sich an das wachsende Plus-Ende der Mikrotubuli GTP-Tubulin-Dimere an. Am schrumpfenden Minus-Ende dissoziieren GDP-Tubulin-Dimere ab.

1.3 Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) und die Rolle von MAP2c in der Entwicklung von Neuronen

Als Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) werden generell alle Proteine, die mit Mikrotubuli assoziieren, bezeichnet [14]. MAPs spielen in Säugerzellen beim zellulären Transport, der Gestaltung der Zellform und der Polarität der Zelle eine wichtige Rolle [14]. Sie können beispielsweise zur Stabilisierung oder Destabilisierung der MT beitragen [2] [7]. Dadurch können sie die dynamischen Eigenschaften von MT beeinflussen und regulieren [14]. Manche MAPs können auch Wechselwirkungen von Mikrotubuli mit dem Aktinzytoskelett und anderen Zellorganellen vermitteln. In Neuronen von Säugerzellen sind MAPs auch entscheidend in der neuronalen Morphogenese involviert [14]. Sie spielen insbesondere eine Rolle in der Regulation des Transports von Zellorganellen in die Neuriten. Klassische strukturelle MAPs, die in der Lage sind Mikrotubuli zu stabilisieren, sind MAP1a, MAP1b, MAP2, MAP4 und das Protein Tau. Bis auf MAP4 kommen diese MAPs hauptsächlich in Neuronen vor. Die neuronalen Vertreter der MAP2-Familie (MAP und Tau) spielen eine wichtige Rolle in der Axonund Dendritenentwicklung [10][18]. In der neuronalen Entwicklung wird MAP2 ungefähr einen Tag nach der ersten Differenzierung exprimiert [17]. Das humane MAP2 liegt in vier Isoformen vor [10]: Die high-molecular weight (HMW) Isoformen MAP2a und MAP2b (280 und 270 kDa) und die low-molecular weight (LMW) Isoformen MAP2c und MAP2d (70 und 75 kDa). Das Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen ist stark entwicklungsabhängig und wird durch alternatives Splicing eines einzigen mRNA-Transkripts hergestellt. Matus et al. (1985) zeigten, dass die Expressionsmuster von HMW und LMW MAP2-Isoformen sich gegenseitig ausschließen [18]. Dieses deutet darauf hin, dass jede Isoform für ihre Rolle während der Nervenzellreifung spezialisiert ist [3]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Suppression der MAP2-Expression in primären Neuronen zur Inhibition der Neuritenbildung führt [19]. Alle Isoformen haben eine N-terminale Domäne (projection domain), die von der MT-Oberfläche wegzeigt und eine C-terminale MT-Bindedomäne, welche die MT-Assemblierung fördert[10]. Die C-terminale Bindedomäne hat drei bis vier 18-Aminosäuren lange Wiederholungen (MTBRs, microtubuli binding repeats), die für die Bindung der MT verantwortlich sind [2]. Die MTBRs werden von 13-14 Aminosäure langen Zwischensequenzen (IRs, interrepeats) getrennt [2]. Die HMW Isoformen MAP2a und MAP2b werden überwiegend in Neuronen des adulten ZNS gefunden und nur in Dendriten exprimiert [10], wobei MAP2b in der neuronalen Differenzierung zeitlich vor MAP2a exprimiert wird [10]. Die LMW Isoformen sind überwiegend in frühen Entwicklungsstadien zu finden [10][18]. MAP2c und MAP2d unterscheiden sich dadurch, dass MAP2d vier MTBRs und MAP2c drei hat [10]. MAP2c ist 467 Aminosäuren lang und wird aufgrund seiner Expression in frühen Entwicklungsstadien als juvenile Form von MAP2 bezeichnet [10][18]. Es wird nur zu Beginn der neuronalen Entwicklung bei der Neuriteninitiation exprimiert und später herunterreguliert [10][18]. Die MTBRs von MAP2c können ebenfalls F-Aktin binden und bündeln [12]. Da die MTBRs von MAP2c beide Filamente binden können, bilden sie vermutlich abhängig vom Bindungspartner verschiedene Konformationen [12]. Jede MTBR von MAP2c kann entweder F-Aktin oder MT binden, aber nicht beide gleichzeitig [12]. Es könnte jedoch sein, dass ein an MT gebundes MAP2c mit einem an F-Aktin gebunden MAP2c dimerisiert und so beide Filamente miteinander verknüpft [12]. MAP2c stabilisiert MT indem es hauptsächlich die Frequenz und Dauer der Katastrophen reduziert [10]. Weisshaar et al. (1992) zeigten, dass eine Überexpression von MAP2c in nicht-neuronalen Zellen zur Ausbildung von Zellauswüchsen führt [20]. Es wurde dort angenommen, dass dieses durch Stabilisierung der Mikrotubuli bewerkstelligt wird. Dehmelt et al. (2003) konnten zeigen, dass MAP2c-transfizierte Neuro2a-Zellen gebündelte Mikrotubuli entwickeln, die Richtung Zellperipherie orientiert sind und Auslöser für eine Neuriteninititation sein könnten [46].



Abbildung 1.2: Schematische Ansicht der Rolle von MAPs in der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts während der Neuriteninitiation. Das Wechselspiel der Filamente Aktin und Mikrotubuli spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Zellen zu Neuronen. Während der Neuriteninitiation generieren parallel gebündelte Mikrotubuli eine Kraft auf die Plasmamembran, wodurch das Lamellipodium an einer Stelle nachgibt und ein Wachstumskegel entsteht. Die Mikrotubuli zeigen dabei mit ihrem Plus-Ende vom Zellkörper weg. Die Spitze des Wachstumkegels besteht aus einem Netzwerk aus F-Aktin. MAPs, wie z.B. MAP2c, können an Mikrotubuli binden und diese so stabilisieren und bündeln.

Es ist noch unklar, ob MAP2-Proteine und speziell MAP2c die MT-Stabilität erhöhen, indem sie entlang der Protofilamente binden (longitudinales Bindemodell) oder indem sie sich um die MT wickeln (laterales Bindemodell) [2]. Studien deuten darauf hin, dass die Stabilisierung dadurch gewährleistet wird, dass MAP2 entlang der MT binden und die Tubulinzwischenflächen verbrücken kann [2]. Die longitudinale MAP2-Bindung stabilisiert vermutlich eine spezifische Konformation der Tubulinzwischenflächen [2]. Die Aktivität von MAP2 wird hauptsächlich durch Phosphorylierung reguliert, wobei diese zu einer Abnahme der Bindungsaffinität für MT führt [21]. Die MT-Bindedomänen von MAP2 haben ein KXGS-Motif, das von vielen Kinasen (z.B. PKA) phosphoryliert werden kann [21].



Abbildung 1.3: Bindemodelle für MAP2c. A. Longitudinale und laterale Bindung von MAP2c entlang der Mikrotubuli-Protofilamente. MAP2c bindet entlang eines Protofilaments und nicht quer über mehrere Protofilamente. B. Dichtedifferenzmappen von MAP2c und Mikrotubuli-Protofilamente. Links: Blick von vorn auf longitudinal gebundenes MAP2c. Rechts: Blick von dem Minus-Ende des Mikrotubulus. Abbildung verändert nach Al-Bassam et al. (2002).

1.4 Motorproteine

Motorproteine bestehen aus einer Motor- und einer Schwanzdomäne und gehören ebenfalls zu den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) [14]. Sie sind an dem vesikulären Transport und der Zellteilung beteiligt. Die dafür erforderliche kinetische Energie wird aus der Hydrolyse von ATP zu ADP gewonnen, die dann in mechanische Energie umgewandelt wird. Die Motorproteine bewegen sich je nach Direktionalität entlang der Mikrotubuli entweder in Richtung des Minus- oder des Plus-Endes. Es werden zwei Arten von Motorproteinen unterschieden, welche der Dynein- und Kinesin-Familie zugeordnet werden. Insgesamt wurden 45 KIFs (Kinesin family members) im menschlichen Genom identifiziert, die in drei Gruppen eingeteilt werden können. Dazu gehören N-Kinesine, die eine N-terminale Motordomäne besitzen, M-Kinesine mit einer mittleren Motordomäne und C-Kinesine, mit einer C-terminalen Motordomäne. N- und M-Kinesine haben eine Plus-Ende gerichtete, anterograde Motoraktivität, C- Kinesine laufen in Richtung des Minus-Endes des MT. M-Kinesine besitzen zusätzlich noch eine MT-Depolymerisierungs Aktivität. Diese drei Gruppen können weiter in 14 Klassen unterteilt werden [23] (vgl. Abb. 1.4). Insgesamt neun KIFs gehören keiner der 14 Familien an und werden als Waisen bezeichnet [22]. KIFs haben eine große Bandbreite an Transportgütern, die sie transportieren können [13]. Diese Eigenschaft ist für die Funktion des Kinesins als Transportmotor insbesondere in sehr langgestreckten Zellen wie Nervenzellen essentiell. Die spezifische Bindung zwischen der Ladung und den KIFs wird dabei oft von Adapterproteinen vermittelt [23]. Konventionelles Kinesin besteht aus zwei schweren Ketten (KHC, *kinesin heavy chain*), welche die Motordomäne enthält und aus zwei leichten Ketten (KLC, *kinesin light chain*) [23]. Die Motordomänen von KIFs sind hochkonserviert [23] und enthalten sowohl die ATP-Bindestelle, als auch die MT-Bindestelle [13]. An der C-terminalen Schwanzdomäne erfolgt die Bindung des Transportguts. Eine kleine Region zwischen der Motor- und der Schwanzdomäne, heisst Nackendomäne und enthält Familien-spezifische Eigenschaften [22].



Abbildung 1.4: **Phylogenetische Verwandtschaft von KIFs.** Phylogenetische Analyse durch Abgleich der Aminosäuresequenzen aller in dieser Arbeit relevanten KIFs. Abbildung modifiziert nach Hirokawa et al. (2001).

Die zweite Klasse der Motorproteine sind Dyneine. Dyneine werden in zytosolisch und axonemal eingeteilt. Das axonemale Dynein ist an der Bewegung von Cilien und Flagellen beteiligt. Komplexe von zytoplasmatischem Dynein bestehen aus verschiedenen Untereinheiten und sind an einer Vielzahl von wichtigen zellulären Funktionen beteiligt. Dynein ist vor allem an dem Transport von intrazellulären Vesikeln, der Bildung der mitotischen Spindel und der Stabilisierung des Golgi-Apparates beteiligt. Die Bewegungsrichtung von Dynein verläuft dabei retrograd, d.h. in Richtung Minus-Ende der MT [13]. Dynein ist ein Proteinkomplex aus mehreren Proteinen, die alle zusammen eine geschätzte Molmasse von 1,2 MDa haben. Es besteht aus zwei schweren Ketten

(Dync1h1, dynein heavy chains), zwei intermediären Dynein-Ketten (DNICs, dynein intermediate chains), zwei leichten intermediären Ketten (DLICs, dynein light intermediate chains) und weiteren assoziierten Proteinen. Die Dyneinuntereinheiten können unterschiedlich zusammengesetzt sein, so dass unterschiedliche Komplexe entstehen. Jede schwere Kette beinhaltet C-terminal die Motordomäne, welche die MT-Bindedomäne enthält, in der die ATP-Hydrolyse erfolgt [13]. Diese Motordomäne besteht aus sieben globulären Domänen, die in einem Ring angeordnet sind. Sechs davon werden der AAA-Familie der ATPasen (ATPase associated with various cellular activities) zugeordnet. Durch die ATP-Hydrolyse wird eine Konformationsänderung induziert, die zur gerichteten Bewegung der Dyneine beiträgt. Zytoplasmatisches Dynein wird meist von dem Proteinkomplex Dynactin, das aus mindestens elf verschiedenen Polypeptiden besteht, begleitet. Dynactin selbst hat keine bekannte enzymatische Aktivität, aber agiert womöglich als extrinsischer Faktor für zytoplasmatisches Dynein, indem dessen Bindung die Prozessivität von Dynein verbessert. Womöglich stabilisiert Dynactin die Dynein-MT-Bindung [25]. Dynactin ist zudem auch an der Bindung mancher Transportgüter beteiligt. Wenn Dynein an der Plasmamembran verankert ist und an einen Mikrotubulus assoziiert, produziert Dynein aufgrund seiner Minus-Ende gerichteten Motor-Aktivität eine Kraft auf die MT, die entgegengesetzt zu der Laufrichtung der Motoren ist. Dadurch können MT mit ihrem Plus-Ende voran in Richtung Zellperipherie geschoben werden [9] (vgl. Abb. 1.5).



Abbildung 1.5: **Modell für die Dynein-vermittelte Mikrotubulibewegung entlang der Plasmamembran.** In der Plasmamembran verankerte Dynein-Komplexe, die mit Mikrotubuli assoziiert sind, erzeugen aufgrund ihrer Minus-Ende gerichteter Motor-Aktivität eine Kraft, die entgegengesetzt zu der Laufrichtung der Motoren ist. Die Mikrotubuli werden so in Richtung ihres Plus-Endes verschoben.

MAPs und Motorproteine, wie Dynein und Kinesine, interagieren auch miteinander, so dass MAPs den Motorprotein-vermittelten Transport von Vesikeln und Zellorganellen inhibieren können [7]. Seitz et al. (2002) zeigten, dass bestimmte MAPs die Anhaftung von Motoren, speziell Kinesinen, reduzieren können [7]. Weiter konnte gezeigt werden, dass Kinesine eine verkürzte Laufzeit bei einer Überexpression von MAPs haben [7].



Abbildung 1.6: Schematische Ansicht der Rolle von MAPs und Motorproteinen in der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts während der Neuriteninitiation. MAPs und Motorproteine können an Mikrotubuli binden und diese so stabilisieren, bündeln oder verschieben.

2 Zielsetzung

Die Dynamik und Regulation des Mikrotubuli-Zytoskeletts während der Neuriteninitiation wird mit Hilfe von Motorproteinen bewerkstelligt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Motorproteine und ihre Rolle bei der MAP2c-induzierten Reorganisation von Mikrotubuli untersucht werden. Hierbei sollte insbesondere die Rolle von Kinesinen und verschiedenen Untereinheiten des zytoplasmatischen Dyneins untersucht werden. Damit dieses im großen Maßstab automatisiert erfolgen konnte, sollte ein *high-content* Screen entwickelt werden. In diesem Screen sollten einzelne Motorproteine via RNAi herunterreguliert werden. Im Anschluss sollten die daraus resultierenden Phänotypen mithilfe eines Macros für die Bildbearbeitungssoftware ImageJ morphologisch analysiert und ausgewertet werden.

In Folgeversuchen sollte die Mikrotubuli-Dynamik von Zellen, bei denen die Herunterregulierung einzelner Motorproteine zu einem auffälligen Phänotyp führte, näher untersucht werden. Insbesondere wurden langzeit *live-cell Imaging* Experimente angestrebt, mit denen die MAP2c-induzierte Reorganisation der Mikrotubuli über einen Zeitraum von mehreren Tagen beobachtet werden kann.

Desweiteren sollte in dieser Arbeit die Dynamik des Dynein vermittelten Transports von Mikrotubuli untersucht werden. In der Plasmamembran verankerte Dyneine schieben Mikrotubuli mit ihrem Plus-Ende voran in Richtung der Zellperipherie [9]. Zur Verifizierung dieses Mechanismus sollte ein mit EGFP-markiertes Konstrukt der schweren Kette von Dynein (Dync1h1) (Masterarbeit, Biesemann 2009) für *live-cell* Versuche herangezogen werden. Dync1h1 ist die essentielle Komponente für die Motor-gerichtete Kraft des zytoplasmatischen Dyneins und sollte daher für eine direkte Beobachtung des Dynein-vermittelten Transports von Mikrotubuli in lebenden Zellen herangezogen werden. Zur Detektion der Dyneine in der Nähe der Plasmamembran, sollte die TIRF-Mikroskopie verwendet werden, wodurch ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis gewährleistet werden sollte.

bereits bekannte Funktionen der KIFs.					
Familie	Gen	Direktionalität	Funktion	Besonderheit	
Kinesin-1	KIF5A/ 5B/ 5C	+ Ende	Vesikeltransport	konventionell	
Kinesin-2	KIF3A/ 3B/ 3C	+ Ende	Vesikel-intraflagellarer	heterotrimer	
	KIF17		Transport		
Kinesin-3	KIF1A/ 1B/ 1C KIF13A/ 13B KIF14 KIF16B KIF28	+ Ende	Organelltransport	monomer	
Kinesin-4	KIF4 KIF7 KIF21A/ 21B KIF27	+ Ende	Organelltransport, Chromosomenbewegung		
Kinesin-5	KIF11 (Eg5)	+ Ende	Spindelbildung	homotetramer bipolar	
Kinesin-6	KIF20A/ 20B KIF23 (MKLP-1)	+ Ende	Zytokinese, Spindelpolarität		
Kinesin-7	KIF10	+ Ende	Kinetochor-MT-Bindung		
Kinesin-8	KIF18A KIF19A	+ Ende	Kernmigration, mitochondrialer Transport		
Kinesin-9	KIF9 KIF6	+ Ende	unklar		
Kinesin-10	KIF22	+ Ende	Chromosomenteilung	DNA-Bindemotiv	
Kinesin-11	KIF26A/ 26B	+ Ende	Signaltransduktion		
Kinesin-12	KIF15 KIF12	+ Ende	Organelltransport		
Kinesin-13	KIF2A/ 2B/ 2C KIF24	+ Ende	MT-Depolymerisierung	zentraler Motor	
Kinesin-14A	KIFC1	- Ende	Chromosomenteilung	C-terminaler Motor	
Kinesin-14B	KIFC2/C3 KIF25	- Ende	Organelltransport	C-terminaler Motor	
Waisen	KIFC5C KIFAP3	?			
Dynein 1	Dync1h1	- Ende	Vesikeltransport, Spindelbildung	Motordomäne	
Dynein 2	Dync2h1	- Ende	Transport in Cilia	Motordomäne	

Tabelle 2.1: Klassifizierung aller in diesem Screen herunterregulierten KIFs und Dynein. Aufgeführt ist die Familienzugehörigkeit, die Direktionalität und bereits bekannte Funktionen der KIFs.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die aufgeführten Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit bidest. Wasser angesetzt und autoklaviert, bzw. steril filtriert. Alle Zellkulturmedien wurden von Pan-Biotech (Aidenbach) bezogen. Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Herstellern Sigma Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Eggenstein), New England Biolabs (Beverly, USA), Serva (Heidelberg), PAN Biotech GmbH (Aidenbach) und BioRad Laboratories GmbH (München) bezogen und waren von höchstem erhältlichen Reinheitsgrad.

3.1.1 Software

EMBL ImageJ (http://rsbweb.nih.gov/ij/)

3.1.2 Geräte

Tabelle 3.1: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Bezugsquelle
384-well-Platten		Greiner (Frickenhausen)
Agarosegelkammer		Biostep (Jahnsdorf)
Bakterienschüttler	TC-7, I 26	New Brunswick Scientific
		(Edison,USA)
Deckel für 384-well-Platten		Thermo Scientific (Karlsruhe)
Mikroskope	Nikon Eclipse TE200	Nikon
-	Zeiss Axiovert 200	Zeiss
	Olympus IX81	Olympus (Hamburg)
	Scan Mikroskop	
Neubauer-Zählkammer	1	Brandt (Wertheim)
Pippetten		Eppendorf (Hamburg)
Reinstwasseranlage	Milli-Q	Millipore (Billerica, USA)
Thermoblock	QBD4	Grant (Cambridge)
	DB-3D	Techne (Jahnsdorf)
Tischmixer	G-560	Vortex
Tischzentrifugen	Eppendorf 5424	Eppendorf
0	11	(Wesseling-Berzdorf)
	Eppendorf 5809 R	Eppendorf
	11	(Wesseling-Berzdorf)
UV/Vis-Spektrometer	Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
1		(Uppsala, Schweden)
Waage	440-35N	Kern (Balingen-Frommern)
Wärmeschrank	Modell 100-800	Memmert
Wasserbad	D-3162	Köttermann
		(Uetze/Hänigsen)
Zellinkubator	HERA cell 150	Heraeus Thermo
		Electron Corporation
Zentrifugen	Sorvall Evolution RC	Thermo Scientific
0		(Waltham,USA)
Zentrifugenrotor	Sorvall SS-34	Thermo Scientific
5		(Waltham,USA)

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Anzuchtröhrchen für E.coli (13 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilgefäß mit Filteraufsatz für Medien	Millipore (Billerica, USA)
Zellkulturschalen mit Glasboden (35 mm)	MatTek-Corporation (Ashland, USA)
Zellkulturschalen (10 cm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatten (6-well-Platten)	Greiner (Nürtingen)

Tabelle 3.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle
Agarose Broad Range	Roth (Karlsruhe)
DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)	Hoechst
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
DMSO	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Roth (Karlsruhe)
FBS	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
FuGENE6 Transfektionsreagenz	Sigma Aldrich (Steinheim)
Glycerin (wasserfrei)	AppliChem (Darmstadt)
LipofectaminTM 2000	Invitrogen (Eggenstein)
MEM (synthetisches Kulturmedium)	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
Nocodazol	Sigma Aldrich (Steinheim)
Non-Essential Amino Acid Lösung	Sigma Aldrich (Steinheim)
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich (Steinheim)
Pyruvat	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Trypsin-EDTA	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)

Tabelle 3.3: Verwendete Reagenzien	

3.1.5 Kits

Tabelle 3.4: Verwendete	e Kits
	Rezugenuelle

Kit	Bezugsquelle
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

3.1.6 Enzyme und Größenstandards

Tabelle 3.5: Verwendete Enzyme und Größenstandards	
Enzyme und Größenstandards	Bezugsquelle
GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder	Fermentas
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB)

3.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 5.0.	. Verwendete i unei
Pufferlösungen	Zusammensetzung
6x DNA-Probenpuffer	50% Glycerol
	0,25% (w/v) Bromphenolblau
1x TAE Puffer	40 mM Tris-Acetat
	1 mM EDTA
	рН 8,3
1x PBS	8 g/l NaCl
	0,2 g/1 KCl
	1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O
	0,2 g/l KH ₂ PO ₄ (1,8 mM)
Triton X-100 Puffer	0,25% Triton X-100 in PBS

Tabollo 3.6: Vorwondoto Puffor

3.1.8 Vektoren

Vektor	Bezugsquelle
N1-pEGFP-MAP2c	4,7 kb Vektor zur Expression von MAP2c in eukaryotischen Zellen und <i>E. coli</i> ; produziert ein C-terminales Fusions- protein mit dem verstärkt grün fluoreszierenden Protein (GFP); KanR, NeoR; SV40-Promoter; CMV-Promoter; von Clontech (Mountain View, USA)
N1-pmCherry	4,7 kb Vektor zur Expression in eukaryotischen Zellen und <i>E. coli</i> ; produziert ein C-terminales Fusionsprotein mit dem roten Fluorophor mCherry; KanR, NeoR; SV40-Promoter; CMV-Promoter; von Clontech (Mountain View, USA)
N1-pmCherry-CMV-MAP2c	5,9 kb Vektor zur Expression von MAP2c in eukaryotischen Zellen; abgeleitet von N1-pmCherry von Clontech (Moun- tain View, USA) und N1-pEGFP-MAP2c (Ozer und Hal- pain, 2000); MAP2c über BamHI/HindIII einkloniert.
N1-pEGFP-delCMV-DNHC1	18,2 kb Vektor zur Expression von DNHC1 in eukaryo- tischen Zellen; abgeleitet von N1-EGFP-delCMV (Verena Hannak, 2009)

Tabelle 3.7: Verwendete Vektoren

3.1.9 Bakterienstämme

Tabelle 3.8:	Verwendete	Bakterienstämm	ne

E.coli Stamm	Genotyp	Herkunft
Top10	Bakterienstamm von Invitrogen (Eggenstein) der	Invitrogen
	für die Amplifizierung von Plasmiden eingesetzt wurde, F^- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG Λ -	(Karlsruhe)
XL10Gold	Bakterienstamm von Stratagene (La Jolla, USA) der für die Amplifikation von großen Plasmiden (>9000 kb) eingesetzt wurde, TetR Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB- hsdSMR mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10(TetR) Amy CamR]	Stratagene (Mannheim)

3.1.10 Nährmedien für Bakterien

Nährmedium	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium	10 g/l Bacto-Tryptor
	10 g/l NaCl
	5 g/l Hefe-Extrakt
	pH 7,4 mit NaOH
Luria-Bertani (LB)-Festagarplatten	10 g/l Bacto-Tryptor
	10 g/l NaCl
	5 g/l Hefe-Extrakt
	16 g/l Bacto-Agar
	pH 7,2 mit NaOH

3.1.11 Antibiotika für E.coli Nährmedien

Tabelle 3.10: Verwendete Antibiotika für Nährmedien		
	Antibiotikum	Konzentration
	Ampicillin	$100 \mu \text{g/ml}$
	Kanamycin	$50 \mu g/ml$

3.1.12 Zelllinien

Tabelle 3.11: Verwendete Zelllinien				
Zelllinie	Organismus	Gewebe	Morphologie	DSMZ Nr.
COS-7	Affe	Niere	Fibroblast	ACC 60
Neuro2a	Maus	Tumor	Neuroblast	ACC 148
NIH3T3	Maus	Embryo	Fibroblast	ATCC CRL-1658
P19	Maus	Embryo	Teratoma	ACC 316

3.1.13 Nährmedien für eukaryotische Zellen

Die Nährmedien für eukaryotische Zellen wurden mit Filteraufsätzen von Millipore (Billerica, USA) steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 3.12: Verwendete Zellmedien		
Nährmedium	Zusammensetzung	
COS-7 Zellkulturmedium	1% (v/v) L-Glutamin	
	10% (v/v) FBS	
	100 μ g/ml Penicillin	
	$100 \mu g/ml$ Streptomycin	
	mit DMEM auf 500 ml auffüllen	

NIH3T3 Zellkulturmedium	1% (v/v) L-Glutamin
	1% (v/v) Pyruvat
	10% (v/v) FBS
	100 μ g/ml Penicillin
	100 μ g/ml Streptomycin
	1% (v/v) Non-Essential Amino Acid
	mit DMEM auf 500 ml auffüllen
P-19 und N2a Zellkulturmedium	1% (v/v) L-Glutamin
	1% (v/v) Pyruvat
	10% (v/v) FBS
	100 μ g/ml Penicillin
	100 μ g/ml Streptomycin
	mit MEM auf 500 ml auffüllen
N2a <i>live-cell</i> Medium	1% (v/v) L-Glutamin
	1% (v/v) Pyruvat
	10% (v/v) FBS
	100 μ g/ml Penicillin
	100 μ g/ml Streptomycin
	10 mM HEPES (pH 7)
	mit clear MEM auffüllen
Imaging-Medium	DMEM
	10% (v/v) FBS

3.1.14 Antibiotika für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Tabelle 3.13: Verwendete Antibiotika für Zellmedien		
	Antibiotikum	Zusammensetzung
	Geneticin G418	Sigma Aldrich
	Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH

3.1.15 Antikörper

Antikörper	Wirt	Spezifität	Bezugsquelle	Verdünnung
primär				
Anti-α-tubulin	Maus	α-tubulin	Sigma	1:1000
Anti-GAPDH	Maus	GAPDH	Pierce	1:1000
Eg5 (KiF11)	Kaninchen	Eg5 (KiF11)	abcam	1:1000
MKLP-1 (KIF23)	Kaninchen	MKLP-1 (KiF23)	Santa Cruz Biotechnology Inc	1:500
Dynein HC	Kaninchen	DNHC-1	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:500
sekundär				
Alexa Fluor® 750 goat anti-mouse	Ziege	Maus	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse	Ziege	Maus	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit	Ziege	Kaninchen	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse	Ziege	Maus	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit	Ziege	Kaninchen	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor® 750 goat anti-rabbit	Ziege	Kaninchen	Invitrogen	1:1000

Tabelle 3.14: Verwendete Antikörper

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch. Nukleinsäuren zeigen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, wofür hauptsächlich die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich sind. Aus der Absorption lässt sich die Konzentration an doppelsträngiger DNA bestimmen. Eine Lösung doppelsträngiger DNA mit der Konzentration 50 μ g/ml besitzt bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm, einen Absorptionswert von eins. Ausgehend hiervon kann die DNA-Konzentration bestimmt werden. Da Proteine aufgrund der aromatischen Aminosäuren UV-Strahlung hauptsächlich bei 280 nm absorbieren, kann aus dem Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ der Reinheitsgrad der Probe ermittelt werden. Bei einer reinen DNA-Lösung liegt das Verhältnis bei 1,8 - 2,0. Ein niedrigerer Wert deutet auf eine Kontamination mit Proteinen, ein höherer Wert auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern hin.

3.2.2 Analytische Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der verwendeten DNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese herangezogen. Die einzelnen DNA-Fragmente werden dabei durch ein angelegtes elektrisches Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Kleinere DNA-Stücke wandern dabei schneller durch das Agarose-Gel als größere. Für die Gele wurde 1% Agarose in 1x TAE-Puffer verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden 1:6 mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Als Größenstandard wurde die 1 kb *Gene Ruler* der Firma Fermentas herangezogen. Zur vereinfachten Detektion der DNA wurden dem Gel zusätzlich 4 Tropfen Ethidiumbromid je 100 ml zugesetzt, das in die DNA interkaliert und die DNA-Banden so bei Anregung mit UV-Licht sichtbar macht.

3.2.3 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Zur Überprüfung der Richtigkeit des verwendeten DNA-Konstrukts, wurde eine hydrolytische Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Restriktionsendonukleasen spalten die DNA sequenzspezifisch, indem Phosphodiesterbindungen des doppelsträngigen DNA-Fragments hydrolytisch gespalten werden. Die Reaktion erfolgte in den vom Hersteller mitgelieferten Restriktionspuffern und angegebenen Reaktionsbedingungen. Die Menge des einzusetzenden Restriktionsenzyms ist von der Reaktionsmenge abhängig und sollte max. 10% des Reaktionsansatzes betragen. Die Restriktion erfolgte für 1-3 h bei 37°C. In Tabelle 3.15 ist ein analytischer Restriktionsansatz für Plasmid-DNA dargestellt. Die anschließende Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte nach Anlegen einer Spannung von 100 V. Die aufgetrennten Banden wurden anschließend auf einem UV-Schirm mit einer Anregungswelle von 256 nm detektiert.

Tabelle 3.15: Analytischer Reaktionsansatz			
Menge			
ca. 100 - 400 ng			
1 <i>µ</i> l			
1 µl			
2 µl			
0,2 µl			
add to 20 μ l			

3.2.4 Herstellung chemisch-kompetenter E.coli-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt, wobei 5 ml LB-Medium mit einer Gefrierkultur von XL10-Gold angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert wurde. Von dieser Vorkultur wurden 4 ml zu 200 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte OD_{600} von 0,6 erreicht wurde. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 5 min. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 0,4-fachem Volumen eiskaltem Tbf I-Puffer resuspendiert und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut bei 4000 rpm und 4°C für 5 min pelletiert. Die Zellen wurden in 0,04-fachem Volumen eiskaltem Tbf II-Puffer resuspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde zu 50 μ l aliquotiert. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert

Tabelle 3.16: Puffer zur Herstellung	chemisch-kompetenter Zellen
--------------------------------------	-----------------------------

Komponente	Menge	
Tbf-I-Puffer	30 mM Kaliumacetat	
	100 mM Rubidiumchlorid	
	10 mM Calciumchlorid 50 mM Manganchlorid 15% Glycerin	
	pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen	
Tbf-II-Puffer	10 mM MOPS	
	10 mM Rubidiumchlorid	
	75 mM Calciumchlorid	
	15% Glycerin	
	pH 6,5 mit 0,2 M Essigsäure einstellen	

3.2.5 Hitzeschocktransformation chemisch-kompetenter E.coli Zellen

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der Hitzeschocktransformation in die Zellen eingeführt. Dabei wurde zu 50 μ l kompetenten Zellen 100 ng - 600 ng Plasmid-DNA zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde für 2 min bei 42°C durchgeführt, um die Zellmembran für die Aufnahme der DNA zu permeabilisieren. Daraufhin wurde 950 μ l LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen kurz herunterzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und die Suspension auf vorgewärmten LB-Platten mit dem entsprechenden Anitbiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C.

3.2.6 Herstellung von Gefrierkulturen

Zur langfristigen Konservierung von Bakterienstämmen wurden 500 μ l einer frischen Bakterienkultur mit 500 μ l 100%-igem sterilem wasserfreien Glycerin versetzt. Die Bakterienzellen wurden in einem Isopropanolbad auf -80°C heruntergekühlt und bei -80°C gelagert.

3.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurden 4 ml LB-Medium mit einem geeigneten Selektionsantibiotikum mit transformierten *E.coli* Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension für 1 min bei 13000 rpm sedimentiert und der Überstand entfernt. Die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAquick Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben (QIAprep Miniprep Manual using a microcentrifuge 12/2006). Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C. Die Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab erfolgte mit dem QIAquick Spin Maxiprep Kit, bzw. QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit von Qiagen. Dazu wurden jeweils 4 ml LB-Medium mit einem geeigneten Selektionsantibiotikum mit *E.coli* Zellen mit dem zu isolierenden Plasmid ca. 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Mit 1 ml davon wurden 200 ml LB-Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 220 rpm und 37°C. Die Bakteriensuspension wurde danach für 20 min bei 4000 rpm sedimentiert und der Überstand entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben (QIAprep Maxiprep Manual 11/2005, bzw. QIAGEN Plus Maxi Manual 01/2009).
3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Allgemeine Kultivierung und Passagierung von Zellkulturen

Die Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Dazu wurden alle Arbeiten stets unter der Sterilbank der Firma NuAire durchgeführt und nur sterile Medien und Materialien verwendet. Die Zellen wurden in sterilen Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) in 15 ml des jeweiligen Mediums kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und einer 5% -igen (v/v) CO_2 -Atmosphäre. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 2-3 Tage nach Erreichen einer 80% -igen Konfluenz. Die Zellen wurden dabei enzymatisch durch Lösen von Zell-Matrix-Verbindungen vom Boden der Kulturschale abgelöst. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 2 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung durch kurzes Schwenken gewaschen und anschließend in 1 ml Trypsin-EDTA (siehe Tabelle 3.17) bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann in 5 ml Medium aufgenommen. Geeignete Verdünnungen der Zellen wurden anschließend in eine neue Kulturschale mit 15 ml zelltypischem Medium übertragen.

Tabelle 3.17: Dauer der Trypsinisierung für verschiedene Zelllinien

Zelllinie	Dauer der Trypsinisierung
P19	10 min
N2a	5 min
NIH3T3	3 min
COS-7	5 min

3.3.2 Zellzählung

In den Versuchen wurden definierte Zellzahlen eingesetzt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Zählung erfolgte mit einem 10x-Objektiv. Es wurden die Zellen in den zwei mittleren Großquadraten der Zählkammer gezählt. Der Mittelwert beider Quadrate wurde mit dem Kammerfaktor 10⁴ multipliziert, wodurch sich die Anzahl der Zellen pro Milliliter ergab. Der Faktor 10⁴ berücksichtigt die Fläche, das Volumen und die Tiefe der Zählkammer.

3.3.3 Gefrierkulturen eukaryotischer Zellen

Die Lagerung von eukaryotische Zellen über mehrere Jahre wurde wie folgt gewährleistet. Die entsprechenden Zellen wurden bei ausreichender Konfluenz in einer Zellkulturschale trypsinisiert und anschließend mit 5 ml frischem zelltypischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden im weiteren Verlauf für 5 min bei 1000 rpm sedimentiert und das Pellet in 5 ml zelltypischem Medium mit 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden zu 500 μ l aliquotiert und in einem Isopropanol-Bad über Nacht auf -80°C heruntergekühlt. Die langfristige Lagerung erfolgt bei -150°C. Bei Wiederverwendung von eingefrorenen Zellen wurd ein Aliquot im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in eine Zellkulturschale mit 15 ml vorgewärmten und mit CO₂ angereichertem, zellspezifischem Medium überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte im Inkubator bei konstant 37°C und 5% CO₂.

3.3.4 Screen zur Identifizierung von Motorproteinen via RNAi in N2a Zellen

In dem Screen zur Identifizierung von der Rolle von Motorproteinen in N2a-Zellen wurde das Prinzip der RNA Interferenz (RNAi) genutzt. Die siRNAs entstammen einer siRNA Motorprotein-Bibliothek (Dharmacon-RNA Technologies (Thermo Scientific)). Insgesamt wurden 78 Motorproteine und das Protein Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), als zusätzliche Überprüfung eines korrekten Screenverlaufs, herunterreguliert. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit siRNA, die an keine Ziel-mRNA in der Zelle bindet, verwendet. Die siRNA wurde mit dem Hamilton Microlab STAR Pipettierroboter in 384-well-Platten (Greiner) vorgelegt. Es wurden 5 µl siRNA-Lösung pro well pipettiert und zentrifugiert (1 min, 1000 rpm). Die Platten wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert. Die siRNA lag in einer Titration von 0,5 pmol bis 4 pmol vor. Für eine transiente Transfektion von cDNA und siRNA in N2a Zellen, wurde das Transfektionsreagenz LipofectaminTM 2000 (Invitrogen) verwendet. LipofectaminTM 2000 besteht aus Lipiden, die zusammen mit anderen Komponenten des Reagenz, einen Komplex mit der negativ geladenen DNA eingehen. Diese Komplexe können von der Zielzelle aufgenommen werden. Die DNA-Konzentration der reversen Transfektion betrug 30 ng und wurde in clear MEM eingestellt und davon 5 μ l pro well pipettiert. Die Platte wurde für 1 min bei 1000 rpm herunterzentrifugiert. Die LipofectaminTM 2000-Konzentration betrug 60 nl wurde ebenfalls in clear MEM gelöst und für 5 min bei RT inkubiert. Davon wurden 5 µl pro well pipettiert und die Platte erneut zentrifugiert (1 min, 1000 rpm). Es folgte eine Inkubation von 20 min bei RT. Währenddessen wurden die Zellen vorbereitet. Die erforderliche Zellzahl lag bei 300 Zellen pro *well* und wurde in 80 μ l zellspezifischem Medium pro *well* zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und einer CO₂-Atmosphäre von 5%. Am dritten Tag der reversen Transfektion erfolgte die zweite Transfektion in Form einer *forward* Transfektion. Hierbei betrug die DNA-Konzentration und die LFA 2000-Konzentration pro *well* 120 ng. Hierbei erfolgte die Inkubation des Transfektionsreagenz mit der DNA-Lösung außerhalb der Platten. Nach 20 min wurden 5 μ l der Lösung pro *well* gegeben und die Platten wurden weiter, ohne vorheriges Zentrifugieren, bei 37°C inkubiert. Am zweiten Tag nach der *forward* Transfektion wurden die Zellen fixiert und angefärbt. Der Ablauf ist Abschnitt 3.3.5 zu entnehmen. Der primäre Antikörper war anti-*alpha*-Tubulin und färbte so Mikrotubulibündel an. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Der sekundäre Antikörper war Alexa-750-GAM und wurde für 4 h bei RT inkubiert. Die Verdünnungen betrugen dabei jeweils 1:1000. Zusätzlich wurde je 0,1% Triton-X zugegeben. Die Reaktionsansätze für beide Transfektionsschritte sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 3.18: Reaktionsansatz für die reverse Transfektion pro well

Reagenz	Menge/ well	Volumen/ <i>well</i>
siRNA	0,5 - 4 pmol	in 5 μ l clear MEM
Lipofectamin 2000	60 nl	in 5 μ l clear MEM
Plasmid-DNA	30 ng	in 5 μ l clear MEM

Tabelle 3.19: Reaktionsansatz für forward Transfektion pro well

Reagenz	Menge/ well	Volumen/ well
Lipofectamin 2000	120 nl	in 5 μ l clear MEM
Plasmid-DNA	120 ng	in 5 μ l clear MEM

3.3.5 Fixierung und Antikörperfärbung von Neuro2a Zellen

Neuro2a Zellen wurden durch Zugabe von 4%-iges Formaldehyd (80 μ l/well) in PBS für 20 min bei 37°C fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 85 μ l PBS gewaschen. Das Anfärben von Zellen erfolgte mithilfe von indirekter Immunfluoreszenz. Bei dieser Methode erfolgt die Visualisierung von Proteinen durch die Bindung spezifischer primärer Antikörper, die von einem mit Fluoreszenzfarbstoff markierten sekundären Antikörper gebunden und so sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die fixierten Zellen zunächst für 7 min bei Raumtemperatur mit 80 μ l 0,25% Triton X-100 permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit 85 μ l PBS gewaschen. Vor der Inkubation der Zellen mit Antikörpern, wurden durch Zugabe von 10%-iger BSA unspezifische Bindungsstellen blockiert, um so die Antikörperspezifität zu verbessern. Die Inkubati-

on erfolgte dabei 30 min bei 37°C. Im Anschluss daran wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 2% BSA hinzuzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Hiernach wurden die Zellen mit 85 μ l PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper zugegeben. Dieser war ebenfalls 1:1000 in 2% BSA verdünnt. Zusätzlich wurde noch der Zellkernfarbstoff DAPI 1:1000 in 2% BSA verdünnt und zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei RT. Die Zellen wurden danach dreimal mit PBS gewaschen und bis zum Mikroskopieren bei 4°C gelagert.

3.3.6 Transfektion von COS-7 Zellen mit FuGENE6 und washout

Die Transfektion von COS-7 Zellen für Nocodazole-washout Experimente erfolgte mit dem Transfektionsreagenz FuGENE6. Das Transfektionsreagenz basiert auf dem Prinzip der Lipofektion, bei dem das Transfektionsreagenz mit der negativ geladenen Plasmid-DNA einen Komplex eingeht, der dann von Zelle aufgenommen wird. Ein Teil der transfizierten Plasmid-DNA gelangt dabei in den Zellkern und wird dort transient exprimiert. Dazu wurden am Tag vor der Transfektion 5x10⁵ Zellen in Zellkulturplatten mit Glasboden (Mat-Tek Corporation, Ashland) in 2 ml zellspezifischem Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde FuGENE6 in 100 μ l clear MEM gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Es wurde jeweils 3 μ l FuGENE6 pro µg DNA verwendet. Anschließend wurde die DNA dazu gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Die Menge der eingesetzten DNA überstieg dabei nicht 3 μ g pro 5x10⁵ Zellen. Diese Lösung wurde dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 2 µM Nocodazol zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für einen Tag bei 37°C. Am ersten Tag nach der Transfektion erfolgte das washout-Experiment. Hierzu wurde das Medium gegen 2 ml Imaging Medium (IM) mit 2 μ M Nocodazol ausgetauscht. Dann wurden am Mikroskop geeignete Zellen gesucht und fokussiert. Für den washout wurde das Medium gegen 12 ml reines IM + FBS ausgetauscht. Die Bildaufnahme während des washouts erfolgte mit dem TIRF-M System.

3.3.7 Erstellung stabil-transfizierter P19-Zellen durch Selektion mit G418

Zur Erstellung stabil-transfizierter P19-Zellen, wurde die einzubauende Plasmid-DNA, mit einem Restriktionsenzym linerarisiert und anschließend mit dem PCR Purifikation Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Es wurden 3×10^5 Zellen mit 2 μ g linearisierter DNA mittels FuGENE6 in 6-*well*-Platten transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte einen Tag nach der Transfektion. Hierfür wurde die Neomycin Variante G418 verwendet, die in einer Konzentration von 1 mg/ml zum Wachstumsmedium gegeben wurde. Das Medium wurde täglich gewechselt. Die Selektion erfolgte über zwei Wochen, wobei je nach vorliegender Konfluenz gesplittet wurde. Die Selektions- und Transfektionseffizienz wurden mikroskopisch bestimmt. Die selektierten Zellen wurden anschließend eingefroren oder in eine 10 cm Zellkulturschale überführt, wobei die Antibiotikakonzentration im Medium auf 100 μ g/ml reduziert wurde.

3.4 Mikroskopische Methoden

Die mikroskopischen Untersuchungen zur Vorbereitung des Screens und alle TIRF-Messungen wurden mit dem Olympus TIRF-M System unter Einsatz des Olympus IX81 Mikroskops durchgeführt. Die verwendete Software war CellR. Die Aufnahmen erfolgten mit der Hamamatsu Image EM Kamera (Electronmultiplication CCD-Camera). Als Lichtquelle diente eine MT20 Einheit. Langzeit *live-cell* Messungen wurden bei 35°C durchgeführt.

Der Screen wurde bei RT mit dem Olympus IX81 Mikroskop unter Verwendung der Software ScanR durchgeführt. Als Lichtquelle diente ebenfalls eine MT20-Einheit. Die Aufnahmen erfolgten mit der Hamamatsu ORCA-AG Kamera.

3.4.1 Interne-Totalreflektions-Fluoreszenz Mikroskopie (TIRFM)

Die Untersuchung der Dynamik des Zytoskeletts in N2a und COS-7 Zellen erfolgte durch TIRFM. Die TIRF Analysen wurden am Olympus IX-81 TIRF-Mikroskop unter Verwendung des PlanAPO 60xOil TIRFM (NA = 1.45) Objektivs durchgeführt. Als Filter wurde der Olympus U-M3TIR405/488/561 Filtercube mit dem Emmisionsfilter Semrock Brightline HC 520/35 (GFP) bzw. Semrock Brightline HC 629/53 (RFP) von AHF Anylsentechnik (Tübingen) kombiniert. Die Bilder wurden mit der Hamamatsu Image EM CCD Kamera (eletron multiplication charge coupled device camera) C9100-12 und dem Programm CellR mit maximalem EM-CCD gain (255) aufgenommen. Als Lichtquellen wurden eine MT20-Einheit und die CellR Dioden Laser 488 nm (20 mW) und 561(25 mW) verwendet. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von konstanten 35°C, die mit einer Inkubationskammer erreicht wurden.

Bei der Detektion von schwach exprimierenden Konstrukten, wie pEGFP-delCMV-Dync1h1-N1 in lebenden Zellen, kann die hohe Autofluoreszenz verschiedenster Strukturen in der Zelle zu einer Überdeckung des eigentlichen Fluoreszenzsignals führen. Diesem Problem kann durch eine Verringerung des Anregungsvolumens entgegengewirkt werden. Dieses kann u.a. durch TIRF-M bewerkstelligt werden.

Die Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF-M) ist eine Weitfeldtechnik, die auf dem Prinzip der Totalreflektion basiert. Hierbei ist der Einfallswinkel des Lichtstrahl, der aus dem optisch dichteren Medium (hier Glas) in das optisch dünnere Medium (hier Zellenim Medium) übertritt, so groß, dass er vollständig gebrochen wird und parallel zur Phasengrenze verläuft. Dieser Winkel wird als kritischer Winkel der Totalreflektion bezeichnet. Der einfallende Lichtstrahl kann nicht mehr in das optisch dünnere Material eintreten, sondern wird vollständig an der Grenzfläche reflektiert. Es wird daher von Totalreflektion gesprochen. Hierbei verläuft das elektromagnetische Feld an der Grenzfläche stetig weiter, wobei es zur Ausbildung einer evaneszenten Welle kommt. Die Anregung der Probe erfolgt durch die evaneszente Welle des totalreflektierten Strahls. Die Intensität des Feldes nimmt exponentiell mit steigender Entfernung zur Grenzfläche ab. Durch die dadurch bedingte geringe Eindringtiefe (50-200 nm) in die Zelle und das dadurch resultierende geringe Anregungsvolumen, resultiert eine im Vergleich zur Confocal Laser Scanning (CLS-) Mikroskopie bis zu zehnfach bessere Diskriminierung in z-Richtung. Im Vergleich zu Standardfluoreszenztechniken wird so ein besseres Signal-Rauschverhältnis sowie eine Minimierung sowohl der lichtinduzierten Zellschäden als auch des Ausbleichens der Probe erreicht [15].

3.4.2 Langzeit live-cell Imaging von N2a-Zellen

Für eine detailliertere Analyse der Dynamik der Neuriten-ähnlichen Auswüchse in N2a-Zellen nach dem gezielten Herunterregulieren von Motorproteinen mittels RNAi, wurden langzeit *live-cell Imaging* Versuche durchgeführt. Es wurden pro Versuch zwei verschiedene siRNAs und als Kontrolle eine siRNA, die an keine Ziel-mRNA in der Zelle bindet, verwendet. Es wurden in eine 384-*well*-Platte (Greiner) 5 μ ll siRNA-Lösung pro *well* pipettiert und die Platte zentrifugiert (1 min, 1000 rpm). Die siRNA lag in einer Konzentration von 4 pmol vor. Die reverse Transfektion erfolgte wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben. Zur Bündelung der Mikrotubuli wurde das Konstrukt EGFP-MAP2c-N1 verwendet. Die DNA-Konzentration der Transfektion betrug dabei 120 ng pro *well* und die LFA 2000 Konzentration 120 ng pro *well*. Die Zellzahl der N2a Zellen wurde auf 1000 Zellen pro *well* in zellspezifischem Medium eingestellt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und einer CO₂-Atmosphäre von 5%. Die Aufnahmen erfolgten am Olympus IX81 mit dem Objektiv Uplans APO 10x/ 0,4 über einen Zeitraum von 5 Tagen. Es wurde dabei immer zuerst die linke untere Ecke eines *wells* angesteuert und fokussiert.

In der stagelist wurde diese Position gespeichert und der Wert der z-Achse notiert. Das gleiche erfolgte für den Autofokus. Für den Autofokus wurde ein fluoreszierender Farbstoff in einem seperaten *well* benutzt. Der Höhenunterschied zwischen den einzelnen *wells* wurde mithilfe des Autofokus im Experimentmanager berechnet und eingetragen. Dabei muss der Höhenunterschied in der z-Achse nach einem Durchgang der *wells* Null ergeben, um ein präzises Fokussieren des Autofokus zu gewährleisten. Die Mikroskopeinstellungen für einen Aufnahmedurchgang sind der Tabelle 3.21 zu entnehmen. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Zellen fixiert und angefärbt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der ImageJ Software.

Tabelle 3.20: Reaktionsansatz pro well für langzeit live-cell Imaging Versuche

Reagenz	Menge/ well	Volumen/ well
siRNA	4 pmol	in 5 μ l clear MEM
Lipofectamin 2000	120 nl	in 5 μ l clear MEM
Plasmid-DNA	120 ng	in 5 μ l clear MEM

Tabelle 3.21: Mikroskopeinstellungen eines langzeit live-cell Imaging Versuchs

Parameter	Wert
Filter	GFP
Exposure time	10 ms (GFP)
Light intensity	100%
Objektiv	UPlans APO 10x/ 0,4
Binning	1
Repeat	1000
Cycle	5 min
Videolänge	5 Tage
EMCCD-gain	100
stage	Höhenunterschied des Fokus
	zwischen 2 <i>wells</i>
stagelist	list1 (Position der linken unteren Ecke eines
-	jeden <i>wells</i>)

Parameter	Wert
Filter	GFP
Exposure time	1 ms
Light intensity	7,25%
Objektiv	UPlans APO 10x/ 0,4
Binning	1
EMCCD-gain	100
Range	3,00 µm
Big Step	1,00 μm
Fine Step	1,00 µm
stage	Höhenunterschied des Fokus zwischen Auto-
	fokus und den einzelnen wells
stagelist	listhome (Position des Autofokus)

Tabelle 3.22: Mikroskopeinstellungen des Autofokus

$$shift 1 = (z - Achse des Autofokus) - (z - Achse well 1)$$

$$shift 2 = \frac{(z - Achse des letzten well) - (z - Achse well 3)}{Anzahl der wells}$$

$$shift 3 = -(shift 1) + ((Anzahl der wells) \cdot (shift 2)$$

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung eines miniaturisierten Assays zur Untersuchung der Rolle von Motorproteinen während der MAP2c-induzierten Reorganisation von MT

Zur Identifizierung von regulatorisch wichtigen Motorproteinen bei der Ausbildung von Neuriten-artigen Auswüchsen in Neuro2a-Zellen, wurde das Prinzip der RNA Interferenz (RNAi) genutzt. Mithilfe dieser Technik wurden gezielt einzelne Motorproteine herunterreguliert. Insgesamt wurden 78 Motorproteine und das Kontrollprotein Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) herunterreguliert. Als negative Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit siRNA, welche an keine Ziel-mRNA in der Zelle bindet, verwendet. Es wurden je 0,5 bis 4 pmol jeder siRNA mit dem Hamilton Microlab STAR Pipettierroboter in 384-well-Platten (Greiner) vorgelegt. Insgesamt wurden zwei Repetitionen des Screens durchgeführt. Um den Einfluss von Motorproteinen auf die Mikrotubuliorganisation in der Bildung von Neuriten zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich mit MAP2c-GFP transfiziert. MAP2c induziert in der verwendeten Zelllinie Neuro-2a eine Bündelung der Mikrotubuli, welche wiederum Neuriten-artige Auswüchse bilden [46]. Die einzelnen Zellmanipulationen mussten zeitlich genau abgestimmt werden, damit sowohl ein effizienter knock-down, als auch eine effiziente Transfektion und Expression von MAP2c-GFP und hieraus folgende MT-Bündelung, garantiert werden konnte. Zur Optimierung der zeitlichen Abfolge der beiden Transfektionsschritte und zur Bestimmung der optimalen Transfektionsreagenzund DNA-Konzentrationen, wurde zunächst das Kontrollprotein GAPDH herangezogen. GAPDH ist ein metabolisches Enzym, das für einen katalytischen Schritt im Glykolytischen Signalweg zuständig ist. Da GAPDH in den meisten Zelltypen exprimiert wird, jedoch üblicherweise nicht essentiell ist, wird es als Standard für die RNAi Optimierung herangezogen. Zu der vorgelegten siRNA wurde zusätzlich ein Konstrukt gemischt, welches für das rot-fluoreszierende Protein mCherry kodiert. Das Einbringen dieses Konstrukts diente als Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion der siRNA. Da in diesem Experiment das Transfektionsreagenz Lipofektamine 2000 verwendet wur-

de, welches sowohl zur Transfektion von Plasmiden, als auch siRNA geeignet ist, und da die siRNA im Vergleich zu dem mCherry-Plasmid zu einem wesentlich höheren molaren Anteil (etwa 300:1) in dem Ansatz vorlag, konnte bei einer positiven roten Fluoreszenz der Zelle davon ausgegangen werden, dass ebenfalls die siRNA erfolgreich von der Zelle aufgenommen wurde. Es wurde weiter der beste Zeitpunkt für die vorwärts gerichtete Transfektion von EGFP-MAP2c-N1 bestimmt. Zunächst musste jedoch sichergestellt werden, dass zu diesem Zeitpunkt die jeweiligen Motorproteine durch RNAi inhibiert wurden und gleichzeitig die Zelldichte nicht zu hoch war, um die vorwärts gerichtete Transfektion von EGFP-MAP2c-N1 zu ermöglichen. Für optimierte Bedingungen (300 Zellen pro well, 60 nl Lipofektamine 2000, 30 ng mCherry Plasmid) war die Inhibition der GAPDH Expression nach 4 bis 5 Tagen maximal (Abb. siehe Anhang .6). Die Induktion von Mikrotubulibündeln durch EGFP-MAP2c-N1 war zwei Tage nach der vorwärts Transfektion optimal. Insgesammt wurde die beste Balance zwischen Zelldichte, RNAi knock-down und MT-Bündelinduktion erreicht, wenn die vorwärts gerichtete Transfektion am dritten Tag nach der reversen Transfektion erfolgte und am fünften Tag die Zellen zur nachfolgenden Analyse fixiert wurden. Um die MT-Bündel besser zu visualisieren, wurde eine immunhistochemische Färbung von alpha-Tubulin durchgeführt. Zur Erleichterung der Analyse wurden zusätzlich die Kerne mit dem Farbstoff DAPI angefärbt. Die fertigen Platten wurden mit einem Olympus-ScanR Mikroskop-System aufgenommen. Mit diesen aufgenommenen Bildern erfolgte eine morphologische Analyse, welche auf der freien Software ImageJ basiert. Die Details der Bildanalyse sind in den dazugehörigen Abbildungen aufgeführt.



Abbildung 4.1: Arbeitsschritte des Assays für den *high-content* Screens. Die siRNA wurde in 384-*well*-Platten in einer Titrationsreihe von 0,5 - 4 pmol vorgelegt. Die Reverse Transfektion der siRNA erfolgte zusammen mit dem rot-fluoreszierenden Protein mCherry. Am dritten Tag erfolgte die vorwärts gerichtete Transfektion mit MAP2c-GFP. Nach zwei weiteren Tagen wurden die Platten fixiert und die MT mit dem Antikörper anti*alpha*-Tubulin angefärbt. Die Detektion der Phänotypen erfolgte mit einem automatisierten Olympus-ScanR-Mikroskop-System.

4.2 Analyse der Rolle von Motorproteinen während der MAP2c-induzierten Reorganisation von MT

4.2.1 Vergleich der MAP2c-GFP-Intensität in peripheren und proximalen Bereichen von Zellen

Zunächst wurde die Lokalisierung von Mikrotubuli relativ zum Zellkern untersucht. Hierzu wurden die morphometrischen Analyseschritte nach Abbildung 4.2 durchgeführt, um Messwerte für die periphere bzw. proximale (in der Nähe des Zellkerns) MAP2c-Bündellänge zu erhalten.



Abbildung 4.2: **Abfolge der Bildbearbeitungsschritte der morphologischen Analyse des Screens.** Anhand der GFP-Intensitäten wurden die MT-Bündel detektiert. Die Zellkerne, welche sowohl GFP-positiv und RFP-positiv sind, wurden durch *Thresholding* und die logische AND-Verknüpfung identifiziert, so dass für die weitere Analyse nur Zellen, die sowohl GFP als auch mCherry und somit MAP2c und die siRNA enthielten, berücksichtigt wurden. Die Zellkerne wurden Ring-artig erweitert, so dass ein proximaler Bereich festgelegt wurde. Zusätzlich wurden die Zellkerne zweimal erweitert und einmal der proximale Bereich von dieser Fläche abgezogen, sodass ein Ring-artiger peripherer Bereich um den Zellkern festgelegt wurde. Diese beiden Ringstrukturen wurden mit den detektierten MT-Bündeln verrechnet, so dass einmal proximale Bündel und einmal periphere Bündel bestimmt werden konnten.

Diese Daten wurden gegeneinander aufgetragen (vgl. Abb. 4.3). Da beide Messwerte linear von der Gesammtintensität abhängen, wurde eine lineare Regression durchgeführt, um Abweichungen in dem Verhältnis dieser Meßgrößen zu detektieren. Es wurde erwartet, dass dieses Verhältnis eine Aussage über die Bildung von peripher ausgerichteten MT-Bündeln im Gegensatz zu Zellkern-nahen Bündeln ermöglicht. Die grau gestrichelten Linien markieren die dreifache Standardabweichung der Werte zur Regressionsgeraden. Bei einer Gaußschen-Verteilung befinden sich etwa 99% von zufällig verteilten Messdaten innerhalb dieser Grenzen. Somit beträgt die Wahrscheinlichkeit, einen zufällig verteilten, falsch-positiven Kandidaten ausserhalb dieser Grenzen zu finden etwa 1%. 18 Kandidaten zeigen bei der höchsten verwendeten siRNA-Konzentration, im Vergleich zu dem proximalen Bereich der Zelle, eine höhere MAP2c-Intensität im peripheren Bereich.



Abbildung 4.3: Analyse der MAP2c-GFP-Intensität im peripheren und proximalen Bereich der Zelle. Der dargestellte Graph wurde aus den gemittelten Daten beider Screen-Repetitionen dargestellt. Es ist die periphere MAP2c-Bündellänge gegen die proximale MAP2c-Bündellänge aufgetragen. Die grau gestrichelten Linien zeigen den Bereich für eine dreifache Standardabweichung des Wertes zur Regressionsgeraden. Es sind für jeden Kandidaten die vier siRNA-Konzentrationen (0,5 pmol, 1 pmol, 2 pmol, 4 pmol) als Titrationsverlauf dargestellt. Die Pfeile zeigen jeweils zur nächst höheren Konzentration.

Von diesen Kandidaten, welche nach unserer Erwartung ausgeprägtere periphere Auswüchse haben sollten, verhält sich jedoch keiner analog zu einem Screen in P19-Zellen. So wird z.B. bei *knock-down* von KIF2A, Dynlt3, Dync1li2, KIF27, LOC668303 und KIF19a eine erhöhte MAP2c-GFP-Intensität im peripheren Zellbereich gemessen, in dem P19-Screen weist jedoch keiner dieser Kandidaten einen veränderten Phänotypen auf, wie z.B. erhöhtes Neuritenwachstum (vgl. Tab. 4.1). *Knock-down* von KIF3C zeigt sogar in diesem Screen eine höhere periphere MAP2c-GFP-Intensität und somit anscheinend längere Auswüchse, in dem P19-Screen jedoch kürzere Neuriten. Bei manueller Betrachtung der aufgenommenen Bilder nach *knock-down* von KIF2A konnte jedoch beobachtet werden, dass eine Erhöhung von peripheren MAP2c-Bündeln oft auf eine allgemeine Vergrößerung der Zellen zurückgeführt werden kann (vgl. Abb. 4.4 oben). Andere Kandidaten, wie Dync1li2 zeigen jedoch eindeutig verlängerte Auswüchse (vgl. Abb. 4.4 unten).



Abbildung 4.4: Zellen nach *knock-down* der Motorproteine KIF2A und Dync1li2. Die oberen Bilder zeigen Aufnahmen aus dem Screen von Zellen, bei denen das Motorprotein KIF2A mit siRNA herunterreguliert wurde. Der KIF2A-Phänotyp bei hoher siRNA-Konzentration (4 pmol) dient als Beispiel für eine erhöhte periphere MAP2c-GFP-Intensität durch eine Zunahme der Zellgröße. Die unteren Bilder zeigen Aufnahmen aus dem Screen von Zellen, bei denen die Motorproteinuntereinheit Dync1li2 mit siRNA herunterreguliert wurde. Der Dync1li2-Phänotyp (4 pmol) dient als Beispiel für eine erhöhte periphere MAP2c-GFP-Intensität durch eine tatsächliche Verlängerung der Neuriten-artigen Auswüchse. Bei geringer siRNA-Konzentration (0,5 pmol) können keine Unterschiede zu Kontrollzellen detektiert werden. Es lagen keine Kandidaten unter einer dreifachen Standardabweichung, welche als Kandidaten für verringerte Bildung von Auswüchsen in Betracht kommen würden. Womöglich ist die Sensitivität der verwendeten Analyse hierfür nicht ausreichend, so dass Veränderungen in der Abnahme der proximalen MAP2c-GFP-Intensität nicht detektiert werden konnten.

siRNA Konz. (4pmol)	Gen	Abstand zur Regressions- geraden/ SD	Phänotyp N2a-Screen	Phänotyp P19-Screen
4	KIF2A	5,82	größere Zellen	kein
4	Dynlt3	5,48	längere Vorsprünge	kein
4	Dync1li2	5,26	längere Vorsprünge	kein
4	KIF27	4,43	längere Vorsprünge	kein
4	DCTN4	4,32	unklar	kürzere Neuriten
4	Dync2h1	4,20	unklar	kein
4	Dync2li1	4,14	unklar	kein
4	KIF21A	4,12	größere Zellen	kürzere Neuriten
4	KIF3C	3,99	längere Vorsprünge	kürzere Neuriten
4	KIF12	3,98	unklar	kein
4	LOC668303	3,88	längere Vorsprünge	kein
4	KIF2C	3,85	unklar	kein
4	KIF19a	3,53	längere Vorsprünge	kein
2	KIF2A	3,50	größere Zellen	kein
2	Dync1li1	3,33	unklar	kein
4	Dynll1	3,25	unklar	kein
2	KIF7	3,20	unklar	kein
2	Dynlt1	3,17	doppelt zirkuläre Bündel (selten)	kürzere Neuriten
4	KLC3	3,14	unklar	kein

Tabelle 4.1: Messwerte der Analyse zur Bestimmung der MAP2c-GFP-Intensität im peripheren und proximalen Bereich der Zelle.

4.2.2 Analyse der Zirkularität der Mikrotubulibündel

Um mögliche Effekte von Motorproteinen auf die MAP2c-induzierte Bildung von MT-Bündeln zu analysieren, wurde die Morphologie der MT-Bündel charakterisiert. Es wurde z.B. erwartet, dass MT-Bündel bei unzureichender nach außen gerichteter Kraft eher zirkuläre Bündel bilden (Abb. 4.5, A). Mit Hilfe einer alternativen Bildanalyse konnte das Auftreten solcher zirkulärer Bündel bestimmt werden (vgl. Abb. 4.5, B).



Abbildung 4.5: **Abfolge der Bildbearbeitungsschritte der morphologischen Analyse zur Bestimmung zirkulärer Bündel.** Anhand der MAP2c GFP-Intensität wurden zunächst die Mikrotubuli-Bündel detektiert. Es erfolgte ein Schritt, bei dem alle geschlossenen Bereiche ausgefüllt wurden. Dieses erstellte Bild wurde dann von dem vorherigen subtrahiert, so dass nur die eingeschlossene Fläche vorlag. Diese wurde dann gemessen und durch die Fläche der detektierten Bündeln dividiert, so dass ein Maß für zirkuläre Bündel erhalten wurden. Ein Maß für das Auftreten zirkulärer Bündel (eingeschlossene Fläche/Bündelfläche) wurde gegen die gesamte MAP2c-GFP-Intensität in den Zellen aufgetragen (Abb. 4.6). In diesem Fall ist die Messung der zirkulären Bündel nicht unbedingt linear von der Gesamtintensität abhängig. Eine solche Auftragung kann jedoch hilfreich sein Artefakte, welche auf der Transfektionseffizienz beruhen, zu identifizieren. So konnte indirekt eine Aussage über eine eventuell nach außen gerichtete Kraft auf die MT gemacht werden. Die grau gestrichelten Linien markieren wieder die dreifache Standardabweichung der Werte von der Regressionsgeraden. Durch diese Analyse wurden insgesamt 9 Kandidaten identifiziert, die vermehrt zirkuläre Bündel bilden.



Abbildung 4.6: Analyse der zirkulären Bereiche durch eine MAP2c-induzierte Mikrotubulibündelung. Der dargestellte Graph wurde aus den gemittelten Daten beider Screen-Repetitionen dargestellt. Ein Maß für das Auftreten zirkulärer Bündel ist gegen die MAP2c-GFP-Gesamtintensität aufgetragen. Die grau gestrichelten Linien zeigen eine dreifache Standardabweichung des Wertes zur Regressionsgeraden an. Kandidaten, die über einer dreifachen Standardabweichung der Regressionsgeraden liegen, bilden vergleichsweise mehr zirkuläre als lineare Mikrotubulibündel. Alle in dieser Analyse detektierten Kandidaten, die eine Zunahme an zirkulären Bündeln aufweisen, zeigen erwartungsgemäß im P19-Screen kürzere Neuriten (vgl. Tab. 4.2).

siRNA	Gen	Abstand zur	Phänotyp	Phänotyp
Konz. (4pmol)		Regressions- geraden/ SD	N2a-Screen	P19-Screen
2	KIF11	10,48	einige größere zirkuläre Bündel	dickere und kürzere Neuriten
4	Dync1i2	7,66	größere oder mehr zirkuläre Bündel	kürzere Neuriten
4	Dynlrb1	4,66	größere oder mehr zirkuläre Bündel	kürzere Neuriten
4	KIF23	4,31	einige größere zirkuläre Bündel	dickere und kürzere Neuriten
4	DCTN3	3,64	größere oder mehr zirkuläre Bündel	kürzere Neuriten
4	Dync1h1	3,33	größere oder mehr zirkuläre Bündel	kürzere Neuriten
4	DCTN6	3,04	unklar	kürzere Neuriten
2	Dync1h1	3,03	unklar	kürzere Neuriten

Tabelle 4.2: Messwerte der Analyse zur Ermittlung von zirkulären Bündeln.

Bei den beiden Kandidaten KIF11 und KIF23 führt die höchste verwendete siRNA-Konzentration (4 pmol) jedoch zu einer drastischen Inhibition des Zellwachstums, weshalb diese Werte nicht mehr klar auswertbar sind. Hiervon abgesehen sind bei den aufgeführten Kandidaten oft klare Dosis-abhängige Auswirkungen auf die Bildung von zirkulären Bündeln zu sehen (vgl. Abb. 4.7). Für manche Kandidaten sind diese Unterschiede jedoch oft nur schwer erkennbar.



Abbildung 4.7: *Knock-down* des Kandidaten Dync1i2 führt zum Anstieg von zirkulären Bündeln. Die Bilder zeigen Aufnahmen aus dem Screen von Zellen, bei denen das Motorprotein Dync1li2 mit siRNA herunterreguliert wurde. Der Dync1i2-Phänotyp dient als Beispiel für einen Dosisabhängigen Anstieg zirkulärer Bündel.

Zusätzlich konnte durch manuelle Betrachtung nach *knock-down* der Kandidaten Dync1i2 und Dynlt1, welche beide Untereinheiten des zytoplasmatischen Motorproteins Dynein sind, Doppelbündel beobachtet werden (siehe Abb. 4.8), welche ebenfalls auf eine verringerte nach außen gerichtete Kraft hinweisen könnten. Solche Doppelbündel-artigen Strukturen wurden ebenso nach Inhibition der schweren Kette des Dyneins (Dync1h1) detektiert (Daten nicht aufgeführt).



Abbildung 4.8: *Knock-down* der Kandidaten Dync1i2 und Dynlt1 zeigt Zellen mit Doppelbündeln. Die Bilder zeigen Aufnahmen aus dem Screen, bei denen die Untereinheiten Dync1li2 und Dynlt1 des Motorproteins Dynein mit siRNA herunterreguliert wurden. Es ist jeweils die MAP2c-GFP-Aufnahme, die anti-*alpha*-Tubulin-Aufnahme und eine Kombination beider aufgeführt. In den Aufnahmen wurde eine siRNA-Konzentration von 4 pmol eingesetzt.

4.2.3 Analyse des Bündelumfangs von MAP2c-induzierten Mikrotubulibündeln

Es wurde weiter eine quantitative Analyse des Bündelumfangs von MAP2c-induzierten Mikrotubulibündeln durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die Fläche der Mikrotubulibündel anhand der Pixelzahl berechnet. Die Bündelfläche wurde dann auf die Größe von einem Pixel reduziert. Es wurde anschließend das Verhältnis aus beiden Flächen berechnet, wodurch eine Aussage über den Bündelumfang ermöglicht wird (vgl. Abb. 4.9).



Abbildung 4.9: **Abfolge der Bildbearbeitungsschritte der morphologischen Analyse zur Bestimmung des Bündelumfangs.** Anhand der MAP2c-GFP-Intensität wurden die MT-Bündel detektiert. Die Bündel wurden dann skeletonisiert, sodass sie nur noch eine Dicke von 1 Px hatten. Das Verhältnis der Gesamtfläche vor und nach der Skeletonisierung entspricht der durchschnittlichen Bündeldicke in Pixeln.

Der Umfang von MAP2c-induzierten Bündeln wurde gegen die Gesamtintensität von MAP2c-GFP aufgetragen (Abb. 4.10). Die grau gestrichelten Linien zeigen wieder die dreifache Standardabweichung des Wertes zur Regressionsgeraden. Kandidaten, welche über der Regressionsgeraden liegen, bilden vergleichsweise dickere MAP2cinduzierte Mikrotubulibündel. Kandidaten, die in dieser Analyse unterhalb der Regressionsgeraden liegen, bilden vergleichsweise dünnere MAP2c-induzierte Mikrotubulibündel.



Abbildung 4.10: **Analyse des Bündelumfangs von MAP2c-induzierten Mikrotubulibündeln.** Der dargestellt Graph wurde aus den gemittelten Daten beider Screen-Repetitionen dargestellt. Es ist der Umfang von MAP2cinduzierten Bündeln gegen die Gesamtintensität von MAP2c-GFP in den Zellen aufgetragen. Die grau gestrichelten Linien zeigen eine dreifache Standardabweichung des Wertes zur Regressionsgeraden an.

Bei den zwei Kandidaten KIF11 und KIF23 führte die Erhöhung der siRNA-Konzentration auf 4 pmol wie oben beschrieben zur Inhibition des Zellwachstums. Diese Werte waren daher nicht auswertbar. Der starken Ausreisser von KIF11 (4 pmol), der außerhalb des Graphens liegt, erhöhte ferner die Standardabweichung. KIF11 und ein weiterer plausibler Kandidat, KIF21B, liegen knapp unterhalb der dreifachen Standardabweichung, was möglicherweise auf diese erhöhte Standardabweichung zurückzuführen ist. Es scheint jedoch, dass *knock-down* von KIF23 (2 pmol) und KIF11 (2 pmol, 4 pmol) in diesem Screen zu dickeren Neuriten-artigen Auswüchsen führt. Ein *knock-down* in dem P19-Screen zeigte einen analogen Phänotyp mit vergrössertem Neuritenumfang (vgl. Tab. 4.3). Der Kandidat KIF21B zeigt in diesem Screen ebenfalls etwas dickere Auswüchse (2 pmol, 4 pmol), in dem P19-Screen jedoch nur kürzere Neuriten.

siRNA	Gen	Abstand zur	Phänotyp	Phänotyp
Konz.		Regressions-	N2a-Screen	P19-Screen
(4pmol)		geraden/ SD		
4	KIF11	15,43	dicker	dickere und
				kürzere Neuriten
2	KIF23	4,18	dicker	dickere und
				kürzere Neuriten
2	KIF21B	2,83	dicker	kürzere Neuriten
2	KIF11	2,80	dicker	dickere und
				kürzere Neuriten
4	E230025N22	2,49	dünner (unklar)	kürzere Neuriten
4	KIF21B	2,41	dicker	kürzere Neuriten
4	TCP1	2,36	dünner (unklar)	kürzere Neuriten

Tabelle 4.3: Messwerte der Analyse zur Ermittlung des Bündelumfangs.



Abbildung 4.11: *Knock-down* von KIF11, KIF23 und KIF21B führt zu dickeren Bündeln. Die Bilder zeigen Aufnahmen aus dem Screen von Zellen, bei denen die Motorproteine KIF11, KIF23 und KIF21B mit siRNA herunterreguliert wurden.

4.3 Langzeit *live-cell Imaging* Experimente zur Untersuchung des Einflusses von Motorproteinen auf die Reorganisation von MT

Um Informationen über die Mechanismen, welche zu den auffälligsten Phänotypen führten, zu bekommen, wurden langzeit life-cell Imaging Versuche von ausgewählten Kandidaten durchgeführt. Die Analyse der Dynamik von Mikrotubuli während ihrer Reorganisation erforderte die Beobachtung über einen längeren Zeitraum. Hierfür wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, welcher dies bei optimalen Wachstumsbedingungen ermöglicht. Die Aufnahmen der Zellen mussten bei einer konstante Temperatur von 35°C und einer pH-Stabilisierung des Mediums durch Zugabe von 10 mM HEPES (pH 7,0) als Puffer erfolgen. Die einzelnen Aufnahmen erfolgten alle 5 Minuten, wodurch ein unnötiger Stress durch Phototoxizität vermieden wurde. Die Aufnahmen wurden in 384-well-Platten durchgeführt, so dass mehrere Konditionen parallel untersucht werden konnten. Die zu untersuchenden Platten wurden über den gesamten Versuchsverlauf mit einer Glasplatte und Silicagel abgedichtet, um einen Flüssigkeitsverlust, der die Salzkonzentrationen im Medium verändern würde, zu verhindern. Um die Dauer der mikroskopischen Beobachtung der Mikrotubulibündelung und Motorinhibition zu maximieren, wurden die Zellen daher von Anfang an mit MAP2c-GFP und 4 pmol siRNA transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion begann die Aufnahme am Mikroskop. Am siebten Tag wurde die Messung beendet und die Zellen wurden fixiert. Basierend auf den Screen-Phänotypen, wurden KIF11, KIF23 und stellvertretend für das zytoplasmatische Dynein, die schwere Kette Dync1h1, in diesen langzeit livecell Imaging Versuchen näher untersucht.

4.3.1 Die Dynamik der MAP2c-induzierten MT-Reorganisation in Kontrollzellen

Unter Kontrollbedingung mit siRNA, die an keine mRNA in der Zelle bindet, haben die Zellen wärend der Zeitaufnahmen ein breites Spektrum an verschiedenen Verhaltensmustern gezeigt. Der größte Teil der Zellen war schwach transfiziert und behielt eine vergleichbare Zellgröße wärend der Aufnahme [vgl. Abb. 4.12]. Die Mehrzahl dieser Zellen konnte sich während der Messung mehrmals erfolgreich teilen. Einzelne Zellen, welche oftmals höhere Mengen von MAP2c exprimiert haben, zeigten eine relativ starke Zunahme der Zellgröße.



Abbildung 4.12: Langzeit-Aufnahmen von Kontrollzellen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von ca. 5 Tagen aufgenommen. Um optimale Bedingungen für die Zellen zu gewährleisten, wurden die Aufnahmen mit einer Wärmekammer gemacht. Die Zellen wurden mit 4 pmol siRNA transfiziert, die an keine mRNA in der Zelle bindet. Es sind Aufnahmen von ungefähr allen 830 min der Messung aufgeführt (Zeitverlauf von links oben nach rechts unten).

Bei diesen Zellen war zudem besonders bei den größeren Zellen zu beobachten, dass die Mitose nicht erfolgreich durchlaufen wird. Die Zellen runden sich zunächst ab und zeigen dabei einen transienten Verlust von klar erkennbaren Mikrotubuli-Bündeln - vermutlich aufgund von massiver Reorganisation der Mikrotubulianordnung, oder durch Verlust der Assoziation von GFP-MAP2c an Mikrotubuli (vgl. Abb. 4.13).



 Abbildung 4.13: Vergrößerte Darstellung einer Kontrollzelle bei dem Versuch die Mitose zu vollführen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von ca. 5 Tagen aufgenommen. Die Zellen wurden mit 4 pmol Kontroll-siRNA transfiziert. Der Zeitverlauf ist wie folgt: von links nach rechts, dann von oben nach unten. (Gesamtzeit: 83 h; Aufnahmen alle 500 min).

Die Zellen versuchen sich offensichtlich zu teilen, wobei die Mitose aber nicht bis zum Ende vollzogen wird. Es ist zu sehen, dass die Zellen eine Zytokinese einleiten und zeitgleich sind wieder klare Mikrotubuli erkennbar. Die Zytokinese wird jedoch nicht vollendet (vgl. Abb. 4.14).



Abbildung 4.14: **Eine Kontrollzelle bei dem Versuch die Mitose zu durchlaufen.** Detailiertere Zeitreihe der Zelle aus Abb. 4.13.Der Zeitverlauf ist wie folgt: von links nach rechts, dann von oben nach unten. (Gesamtzeit: 4,4 h; Aufnahmen alle 5 min).

4.3.2 Langzeit *live-cell Imaging* Experiment zur Untersuchung des Einflusses von Dync1h1 auf die MT-Reorganisation

Nach dem *knock-down* von Dync1h1 konnte beobachtet werden, dass ein großer Teil der Zellen am Ende der Messung einen von MT-Astern aufwiesen. Im Gegensatz hierzu zeigen Aufnahmen von Kontrollzellen zum gleichen Zeitpunkt der Messung solche Astern in den meisten Zellen (vgl. Abb. 4.15).



 Abbildung 4.15: Aufnahmen von Kontrollzellen und Zellen mit Dync1h1-siRNA am Ende der Messung. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von ca.
5 Tagen aufgenommen. Die Aufnahmen sind 31 h nach Beginn der Messung entstanden. Eindeutig zu erkennende Asterzentren sind mit roten Pfeilen indiziert. Beide Aufnahmen wurden zum gleichen Zeitpunkt der Messung gemacht.

Im Gegensatz zu allen anderen Konditionen wurde nach Inhibition von Dync1h1 oft ein weiteres interessantes Verhalten der Zellen beobachtet (sechs mal in einem Dync1h1 inhibierten *well*, niemals in den acht anderen *wells* dieser Studie), welches auf eine Invertierung der MT-Bündelorientierung hindeutet. Hierbei war zu beobachten, dass die Zellen zunächst gewöhnliche periphere, zirkuläre Mikrotubulibündel aufwiesen. Im Zellzentrum entwickelte sich zusätzlich eine helle Struktur, womöglich ein Mikrotubuliaster um ein Zentrosom. Diese Struktur fluktuiert zunächst in ihrer Position. Dann bewegt sich diese Struktur kontinuierlich zur Zellperipherie. Es ist zu erkennen, dass sich diese Strukur von der ursprünglichen Astergeometrie in eine Kometen-artige Geometrie umorganisiert. Im weiteren Verlauf stülpt diese Struktur die Plasmamembran nach außen und bildet einen langen und breiten Vorsprung der Zelle. In diesem Beispiel zieht sich hierauf innerhalb von 20 min dieser Vorsprung sehr schnell in die Zelle zurück (vgl. Abb. 4.16).



Abbildung 4.16: **Invertierung der Mikrotubulibündel bei** *knock-down* **von Dync1h1.** Die Zellen wurden mit 4 pmol siRNA gegen Dync1h1 transfiziert. Der Zeitverlauf ist wie folgt: von links nach rechts, dann von oben nach unten. (Gesamtzeit: 250 h; Aufnahmen alle 500 min).

Zur besseren Veranschaulichung dieser Invertierung wurden ebenfalls Aufnahmen mit höherer Zeitfrequenz (alle 20 min) von dieser Messung abgebildet (vgl. Abb. 4.17). Hierbei ist deutlich zu erkennen, wie die innere Struktur zusammen mit den gebundenen MT die Plasmamembran ausstülpt und immer weiter nach außen schiebt. Es bildet sich dabei ein langer Vorsprung der Zelle, der ungefähr zwei bis dreimal so lang wie die Zelle vor der Bilung der Struktur ist. Weiter ist zu erkennen, dass diese Struktur sich plötzlich zurückbildet.



Abbildung 4.17: **Invertierung der Mikrotubulibündel bei** *knock-down* **von Dync1h1.** Die Zellen wurden mit 4 pmol siRNA gegen Dync1h1 transfiziert. Dargestellt ist ein Ausschnitt der *live-cell* Messung, wobei die Aufnahmen aus einem Zeitfenster ab der Mitte bis zum Ende der Messung dargestellt sind. Der Zeitverlauf ist wie folgt: von links nach rechts, dann von oben nach unten. (Gesamtzeit: 13 h; Aufnahmen alle 20 min). Weiter konnte häufig die Bildung von Doppelbündeln beobachtet werden (vgl. Abb. 4.18). Hierbei bildeten sich zuerst Mikrotubulibündel wie in den Kontrollzellen aus. Diese zirkuläre MT-Struktur schien dann im Zellinneren zu verweilen. Hierauf bildete sich an der Zellperipherie ein neues zirkuläres Mikrotubulibündel aus, welches von dem inneren Bündel separiert blieb. Die Zelle verharrte ca. 15 h in diesem Zustand. Danach schien die Zelle an Größe zu verlieren, wobei sich die beiden Ringstrukturen näher kamen und schließlich fusionierten.



Abbildung 4.18: **Doppelbündelbildung bei** *knock-down* **von Dync1h1.** Die Zellen wurden über einen Zeitraum von ca. 5 Tagen aufgenommen. Die Zellen wurden mit 4 pmol siRNA gegen Dync1h1 transfiziert. Dargestellt ist ein Ausschnitt der *live-cell* Messung, wobei die Aufnahmen aus einem Zeitfenster ab der Mitte bis zum Ende der Messung dargestellt sind. Der Zeitverlauf ist wie folgt: von links nach rechts, dann von oben nach unten. (Gesamtzeit: 30 h; Aufnahmen alle 50 min).

4.3.3 Langzeit *live-cell Imaging* Versuch zur Untersuchung des Einflusses von KIF23 (MKLP-1) auf die MT-Reorganisation

Der *knock-down* von KIF23 (MKLP-1) führte zu einem weiteren interessanten Verhalten der Mikrotubuliorganisation innerhalb der Zellen. Es konnte hier beobachtet werden, dass KIF23-*knock-down* eine Rotation von Mikrotubuliastern bewirkt. Diese Bewegung wurde mit Hilfe des ImageJ PlugIns ParticleTracker (by Guy Levy, Computational Biophysics Lab, ETH Zurich) verfolgt (vgl. Abb. 4.19). Es ist klar zu erkennen, dass helle MT-Strukturen, welche wahrscheinlich Asterzentren entsprechen, eine rotierende Bewegung durchführen. Die Rotationsfrequenz betrug etwa 2/ h. Kontrollzellen zeigen dieses Verhalten normalerweise nicht. Es waren jedoch vereinzelt Bewegungen von Astern in den Zellen zu beobachten, diese waren jedoch nur sehr selten regelmäßig und zirkulär.



Abbildung 4.19: Analyse der Rotation von Zentrosomen in Kontrollzellen und Zellen nach KIF23-RNAi. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von ca. 5 Tagen aufgenommen. Die Zellen wurden mit 4 pmol der jeweiligen siRNA transfiziert. Die Positionen von hellen Strukturen wurden mit einem Makro verfolgt. Dargestellt sind Kontrollzellen (links) und Zellen nach *knock-down* von KIF23 (rechts) zu Beginn der Messung. Die zeitlich aufgelösten Bewegungen der Zentrosomen sind farbig dargestellt. (Gesamtdauer der Analyse: 17 h; Aufnahmen alle 5 min) Durch eine höhere zeitliche Auflösung (alle 5 min) kann diese Rotationsbewegung klar dargestellt werden (vgl. Abb. 4.20).



Abbildung 4.20: **Kymographische Analyse der Rotation von Zentrosomen in Kontrollzellen und Zellen mit KIF23-siRNA.** Die Zellen wurden mit 4 pmol der jeweiligen siRNA transfiziert und über einen Zeitraum von ca. 5 Tagen aufgenommen. A) zeigt die Verläufe der Asterbewegung in Abständen von 5 min. B) zeigt die Trajektorien der Rotationsbewegung über einen Zeitraum von 50 min. Es sind Aufnahmen aller 5 min dargestellt.

4.3.4 Langzeit *live-cell Imaging* zur Untersuchung des Einflusses von KIF11 (Eg5) auf die MT-Reorganisation

Nach dem *knock-down* von KIF11(Eg5) konnte beobachtet werden, dass die Proliferation der Zellen stark reduziert war. Es konnten keine Zelle beobachtet werden, die eine erfolgreiche Zellteilung vollzogen haben. Auch haben diese Zellen im Gegensatz zu Kontrollzellen keine eindeutigen Ansätze von Zytokinese gezeigt. Wie die Kontrollzellen runden sich jedoch auch KIF11 *knock-down* Zellen zeitweise ab und zeigen zeitgleich einen transienten Verlust von klar erkennbaren Mikrotubuli-Bündeln. Jedoch verläuft der Bündelwechsel in Zellen mit KIF11-siRNA wesentlich langsamer, als in Kontrollzellen (vgl. Abb. 4.21). Die Bündelbildung nimmt mehr Zeit in Anspruch und die anschließende MT-Bündeldynamik ist ebenfalls langsamer. Die Zellen wiesen hierüber hinaus allgemein sehr wenige Neuriten-artige Auswüchse auf. Wenn es zur Ausbildung eines Auswuchses kam, war dieser recht kurz und auffällig dick.



Abbildung 4.21: Langsame Mikrotubulibündelbildung bei *knock-down* von KIF11. Die Zellen wurden mit 4 pmol siRNA transfiziert. Links sind Kontrollzellen dargestellt. Rechts sind Zellen nach Behandlung mit KIF11siRNA dargestellt. Der Zeitverlauf ist wie folgt: von links nach rechts, dann von oben nach unten. (Gesamtzeit: 83 h; Aufnahmen alle 125 min).

Bei allen *live-cell Imaging* Versuchen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen das jeweilige Motorprotein angefärbt. Diese Antikörper konnten jedoch aus Zeitgründen nicht ausreichend getestet werden, so dass keine klare Aussage anhand der Antikörper-fluoreszenz hinsichtlich der *knock-down* Effizienz getroffen werden konnte (siehe Bilder im Anhang). Insbesondere erschwert die hohe Zelldichte und das erhöhte Zellsterben gegen Ende des 5 Tage andauernden Experiments, die Detektion dieser schwach exprimierten Motoren.
4.4 Direkte Beobachtung der schweren Dynein-Kette (Dync1h1) im Transport von MT-Bündeln

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein MAP2c führt zur vermehrten Nukleierung neuer Mikrotubuli sowie Stabilisierung und Bündelung bestehender Mikrotubuli. Dieser Mechanismus ist vermutlich an der Bildung von Neuriten in Neuronen beteiligt (Dehmelt et al. 2006). Für eine detaillierte Untersuchung der Rolle des Dynein vermittelten Transports von Mikrotubuli wurde ein Nocodazol-washout-Experiment durchgeführt. Nocodazol führt zu einer vollständigen Depolymerisation bestehender Mikrotubuli. Dieser Prozess ist reversibel und kann durch Auswaschen rückgängig gemacht werden. Es wurde für die Untersuchung das fluoreszenzmarkierte Konstrukt EGFP-Dync1h1 herangezogen. Dieses Konstrukt enthält einen delCMV-Promotor, eine verkürzte Variante des CMV Promotors, der ein geringes Expressionslevel gewährleistet und somit eine sensitivere Detektion des Proteins im Bereich der Plasmamembran mithilfe von TIRF-M ermöglicht. Die Zellen wurden zusätzlich mit mCherry-MAP2c transfiziert und mit Nocodazol inkubiert. In den Zellen ist nach dem Auswaschen des Nocodazols durch die Transfektion mit MAP2c eine rasche Nukleierung und Bündelung neu gebildeter Mikrotubuli zu sehen. Diese bewegen sich unidirektional durch die Zelle. In den Aufnahmen bewegt sich die Mehrzahl der Mikrotubuli im TIRF-Feld und somit in der Nähe der Plasmamembran. In Abbildung 4.22 ist eine typische Bewegung der freien Mikrotubulibündel in einer TIRF-M Aufnahme dargestellt.



Abbildung 4.22: Motilität von MAP2c-induzierten Mikrotubulibündeln in COS-7 Zellen. COS-7 Zellen wurden mit EGFP-Dync1h1 und mCherry-MAP2c transfiziert. Es folgte eine Inkubation mit 10 μ M Nocodazol. Am folgenden Tag wurde das Nocodazol durch mehrfachen Mediumwechsel ausgewaschen. Es bildeten sich vermehrt Mikrotubulibündel, die sich unidirektional durch die Zelle bewegten und in der Peripherie der Zelle akkumulierten. Dargestellt ist eine Aufnahme einer Zelle nach dem Nocodazol-Auswasch im TIRF-Feld. Zur Verdeutlichung der Bewegung der Mikrotubuli wurde ein Ausschnitt der Zelle vergrößert dargestellt. Die Bewegung einzelner MT ist durch Pfeile gekennzeichnet. A) zeigt die Zelle kurz nach dem Auswasch von Nocodazol. B) zeigt die Zelle ca. 15 min später.

Mikrotubuli-Filamente interagieren in der Nähe der Zytoplasmamembran mit zytosolischem Dynein. Je stärker diese Interaktion zwischen dem Dynein und MT ist, umso heller erscheinen einige Mikrotubuli in den Aufnahmen. Dieses hängt damit zusammen, dass Objekte nah der Oberfläche eine bessere Auflösung und somit höhere Fluoreszenzintensität in TIRF-mikroskopischen Aufnahmen zeigen. Frühere Untersuchungen (Krejczy, Bachelorarbeit 2008; Biesemann, Masterarbeit 2009) unterstützen einen Mechanismus, nach welchem Dynein Komplexe Mikrotubuli Fragmente gegen die Plasmamembran verschieben können. Diese Arbeiten haben sich jedoch auf Dynactin 1 und die intermediäre Dyneinkette DNIC2 beschränkt. Ein Konstrukt zur direkten Beobachtung der schweren Dyneinkette (Dync1h1) wurde in einer früheren Arbeit fertiggestellt (Biesemann, Masterarbeit 2009), jedoch noch nicht in Zellen untersucht. In dieser Arbeit konnten die vorherigen Beobachtungen von Dynactin 1 und DNIC2 auch für die schwere Kette bestätigt werden. Abb. 4.23 zeigt zum Beispiel, wie ein Mikrotubulus sich in der Zelle entlang vieler stationärer Dyneine bewegt.



Abbildung 4.23: Dynamisches Verhalten der MT bei Kolokalisation mit Dynein. A) zeigt eine COS-7 Zelle, die mit mCherry-MAP2c und mit der schweren Kette von Dynein (EGFP-Dync1h1) transfiziert wurde. Die Zelle ist nach dem Auswaschen des Nocodazols dargestellt. Die Mikrotubuli bewegen sich rasch durch die gesamte Zelle, wobei sie mit Dyneinen kolokaliseren. B) zeigt einen Ausschnitt aus der Zelle, in dem die direktionale Bewegung eines Mikrotubulus durch die Zelle vergrößert dargestellt ist. Der Mikrotubulus kolokalisiert dabei mit Dynein-Ansammlungen, welche stationär an der Plasmamembran lokalisiert sind. In C) ist diese Bewegung zeitlich aufgelöst in einem Kymographen dargestellt. Der Mikrotubulus läuft dabei innerhalb von 150 sec entlang mehrerer stationärer Dynein-Komplexe.

Es konnten weitere interessante Beobachtungen von der Bewegung der MT gemacht werden, wenn diese entlang stationärer Dyneine verschoben wurden. So war zum Beispiel zu sehen, dass ein Mikrotubulus seine Bewegungsrichtung stark verändert und verbogen werden kann, wenn es mit mehreren Dynein-Komplexen kolokalisiert ist (vgl. Abb. 4.24). In diesem Beispiel relaxiert die Verbiegung schlagartig, nachdem ein Dynein-Komplex, welcher vermutlich für diese Verbiegung verantwortlich war, nicht mehr detektiert werden kann.



Abbildung 4.24: Änderung der Bewegungsrichtung des Mikrotubulus bei Kolokalisation mit Dynein. Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt einer COS-7 Zelle, die mit mCherry-MAP2c und mit der schweren Kette von Dynein (EGFP-Dync1h1) transfiziert wurde. Die Bewegung des MT von links nach rechts ist über einen Zeitraum von 21 sec dargestellt. Hierbei assoziiert zwischen 9 und 12 sec das Mikrotubuli mit drei Dynein-Ansammlungen (schwarze Pfeile), welche das Mikrotubuli anscheinend verbiegen können. Zwischen 18 und 21 sec verschwindet die mittlere Dynein-Ansammlung und zeitgleich relaxiert die MT-Verbiegung.

5 Diskussion

5.1 Entwicklung des high-content Screens

Für die Identifizierung von regulatorisch wichtigen Motorproteinen bei der MAP2c induzierten Reorganisation von Mikrotubulibündeln wurde ein Assay für ein highcontent Screen entwickelt. Da Untersuchungen in primären Neuronen technisch herausfordernd sind, wurden in dieser Arbeit Neuroblastoma-Zellen herangezogen, welche als einfacheres Modelsystem zur Untersuchung der neuronalen Entwicklung betrachtet werden können. In dem durchgeführten Screen wurden unterschiedliche Phänotypen nach knock-down einzelner Motorproteine beobachtet. Drei verschiedene morphologische Analysen von MAP2c-induzierten Mikrotubulibündeln wurden durchgeführt: 1) Die Verteilung im peripheren und proximalen Bereich der Zelle, 2) Die Bildung von zirkulären Bündeln und 3) die Bestimmung des Bündelumfangs. In einem vorherigen Screen, welcher auf P19-Zellen basierte, wurden ebenfalls MAPs via RNAi inhibiert, darunter auch die hier betrachteten Motorproteine. Je nach Analyse konnten bei einzelnen Kandidaten Analogien zu diesem vorherigen Screen festgestellt werden. Jedoch wurden für andere Kandidaten auch erhebliche Unterschiede detektiert. Die Diskrepanz zwischen diesen Analysen kann zunächst durch die großen Unterschiede in den verwendeten biologischen Systemen erklärt werden: Bei dem vorherigen Screen handelte es sich um ein komplexeres biologisches System, in welchem Stammzellenähnliche P19-Zellen mit Hilfe eines neurogenen Transkriptionsfaktors zu Neuronen differenziert wurden (J. Arens, in Präperation). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung von Neuriten-artigen Auswüchsen in einem wesentlich einfacheren System untersucht. Im Gegensatz zur vollständigen de novo Differenzierung von P19-Zellen zu Neuronen, wurde hier speziell die Reorganisation von Mikrotubuli und Induktion von artifiziellen Neuriten-artigen Auswüchsen durch das neuronale Mikrotubuliassoziierte Protein MAP2c untersucht. Einige zentrale Untereinheiten des zytoplasmatischen Dynein-Dynaktin Komplexes (Dync1h1, Dync1i2, Dynlrb1, DCTN3, DCTN6) und die Kinesine KIF23 und KIF11 zählen zu den Kandidaten, welche in dieser Arbeit einen analogen Phänotypen zu dem vorherigen Screen in P19-Zellen zeigen. Auf diese Kandidaten soll zunächst näher eingegangen werden.

5.2 Die Rolle von Dynein in der MAP2c-induzierten MT-Reorganisation

5.2.1 *Knock-down* von Dync1h1 führt zu einer Invertierung der MT-Bündelpolarität

Der knock-down der schweren Kette von Dynein (Dync1h1) kann gleichzeitig viele Prozesse in der Zelle beeinflussen, wie z.B. den intrazellulären Transport oder die Verschiebung von Mikrotubuli entlang der Plasmamembran [9]. Dynch1h ist die aktive Motor-Komponente des zytoplasmatischen Dyneins vom Typ 1. In den langzeit live-cell Imaging Versuchen weisen Zellen, die mit siRNA gegen diese schwere Kette von Dynein transfiziert wurden, drei interessante Beobachtungen auf. Zum einen konnte eine Invertierung der Mikrotubuli-Bewegung in den Zellen beobachtet werden (vgl. Abb. 4.17). Hierbei waren die MT zunächst an einer zentralen Struktur, womöglich einem Zentrosom, gebunden. Die MT bildeten hierauf eine Kometen-artige Struktur, welche sich durch die Zelle bewegte. Koonce et al. (1999) und Brito et al. (2005) konnten eine ähnliche Kometen-artige Struktur in Dictyostelium beobachten, wenn dominant negative Dynein-Fragmenten überexprimiert wurden. Da MT prinzipiell sowohl Dynein-, als auch Kinesin-vermittelten Kräften ausgesetz sind, vermuteten diese Autoren, dass beide Kräfte eine Rolle in der Organisation von MT in der Interphase spielen. Eine Störung des Gleichgewichts dieser Kräfte, würde eine dieser Motoraktivitäten dominanter werden lassen und hierdurch eine Veränderung der MT Organisation verursachen. Brito et al. schlussfolgerten, dass nach ihrer Inhibition, die Dynein-vermittelte Kraft auf die MT einer Kinesin-vermittelten schiebenden Kraft, nicht mehr entgegen wirkt, und hierdurch die Kometen-artige Mikrotubuli-Organisation und Motilität entstehen könnte. Welches Kinesin für die schiebende Kraft verantwortlich ist, blieb unklar. Die Beobachtungen in dieser Arbeit suggerieren ebenfalls, dass Dynein zusammen mit einer entgegen gerichteten Kraft, eventuell von einem Kinesin, in der Organisation von Interphasen-MT involviert ist. Nach knock-down der Dynein-vermittelten Kraft wird eine Reorganisation der MT induziert, da die Kinesin-vermittelte Kraft auf die MT dominant wird. Diese Beobachtung suggeriert auch, dass sich die MT-Bündel in ihrer Polarität umorientieren. Nach Dynein-Inhibition wird die ursprüngliche MT-Verschiebung in Richtung ihrer Plus-Enden (durch Kortex-assoziierte Minus-End gerichtete Dynein-Motoren) möglicherweise in eine Verschiebung in Richtung ihrer Minus-Enden (durch Kortex-assoziierte Plus-End gerichtete Kinesin-Motoren) umgekehrt. Interessanterweise kann diese umgekehrte Kraft ebenfalls Neuriten-artige Auswüchse induzieren. Allerdings unterscheiden sich diese in Ihrer morphologischen Erscheinung: die Kinesininduzierten Auswüchse haben ein wesentlich abgerundeteres Ende. Weiter konnte bereits 88 h nach Beginn des *knock-downs* von Dync1h1 in den meisten Zellen ein Verschwinden der Mikrotubuliaster beobachtet werden. Dieses könnte in Zusammenhang mit dem Verlust der Mikrotubuli zentrierenden Dynein-vermittelten Kraft stehen.

Weiter wurden doppelte Ring-artige Bündelstrukturen in Zellen nach Dynein-*knockdown* detektiert. Zum einen befand sich ein gebündelter MT-Ring innerhalb der Zelle, relativ nah am Nukleus. Zum anderen wurde zusätzlich eine MT-Ringstruktur an der Zellperipherie beobachtet (vgl. Abb. 4.18). Dieser Zustand konnte bis zu 17 h andauern. Da Dynein eine anterograde Verschiebung von Mikrotubuli entlang der Plasmamembran bewirkt, könnte die Herunterregulierung ein Ausbleiben dieser Kraft bewirken. Die durch MAP2c gebündelten MT könnten so nicht mehr nach außen verschoben werden. Unklar bleibt, warum es zur Ausbildung einer zweiten peripheren MT-Bündelung gekommen ist. Es könnte sich bei diesen zwei Bündelstrukturen um zwei unterschiedliche MT-Populationen handeln, die von Dynein, bzw. Kinesinen unterschiedlich beeinflusst werden und dadurch in unterschiedliche zelluläre Bereiche verschoben werden. Es wurde z.B. gezeigt, dass posttranslationale Modifikationen von Mikrotubuli die Effizienz von Motorproteinen beeinflussen [44]. Diese Hypothese könnte in zukünftigen Experimenten durch den Einsatz von Modifikations-selektiven Antikörpern getestet werden.

In *live-cell* Analysen sollte der Einfluss von Dync1h1 auf die MT-Dynamik genauer beobachtet werden. Hierzu wurde ein Nocodazol-*washout* Experiment in nicht-neuronalen COS-7 Zellen durchgeführt. Nach dem Auswaschen von Nocodazol konnten kleine gebündelte Mikrotubuli beobachtet werden, die sich im Zytoplasma gebildet haben. Diese bewegten sich unidirektional durch die Zelle in Richtung Zellperipherie. Die Beobachtungen in dieser Arbeit bekräftigen die Idee, dass Dync1h1 in der Lokalisation und Dynamik der MT-Reorganisation involviert ist. Die Zunahme an zirkulären Bündeln bei *knock-down* von Dync1h1 könnte so z.B. auf eine fehlende Richtungs-weisende Kraft zurückgeführt werden. Anhand der TIRF-M gestürtzen Aufnahmen kann vermutet werden, dass diese Kräfte insbesondere im Bereich der Plasmamembran eine entscheidende Rolle haben. Ein nächster Schritt wäre die Untersuchung der Dynein-Dynamik während der Neuriteninitiation. Hierfür wurde in dieser Arbeit eine stabile P19-Zelllinie hergestellt, welche in Neuronen differenziert werden kann (siehe Anhang).

5.3 *Knock-down* aller bekannten Dyneinuntereinheiten suggeriert multiple Funktionen von Dynein in Neuro2a-Zellen

Der *knock-down* der Dynein Untereinheiten Dync1i2, Dynlrb1und Dync1h1 führt zu einer Veränderung von MAP2c-transfizierten N2a-Zellen, di in einem Anstieg zirkulärer Bündel resultiert. Diese Beobachtung suggeriert das Fehlen einer nach außen gerichteten Kraft auf Mikrotubulibündel. Der *knock-down* dieser Kandidaten zeigt im P19-Screen analog zu diesem Phänotyp verkürzte Neuriten. Anhand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass diese drei Untereinheiten eine zentrale Rolle in der MT-Reorganisation spielen. Es handelt sich hierbei um die stark neuronal exprimierten Untereinheiten Dync1h1 (schwere Kette des zytoplasmatischen Dyneins, Typ 1), Dync1i2 (intermediäre Kette 2, Typ 1) und Dynlrb1 (leichte Kette vom roadblock-Typ). Alle diese Untereinheiten gehören zum ubiquitären zytoplasmatischen Dynein Komplex vom Typ 1.

Der *knock-down* von anderen Dynein Untereinheiten zeigte jedoch auch Veränderungen des Phänotyps, welche nicht analog zu dem vorherigen Screen in P19 Zellen waren. Insbesondere zeigte *knock-down* von Dynlt3 (leichte Kette vom Tctex-Typ) oder Dync1li2 (leichte intermediäre Kette 2, Typ 1) einen entgegengesetzten Effekt und somit eine Verstärkung der Neuriten-artigen Auswüchse. Die genaue Rolle dieser Dyneinuntereinheiten in der MT-Reorganisation während der Neuriteninitiation muss jedoch in weiteren Versuchen genauer untersucht werden. Möglicherweise spielen diese Dynein Untereinheiten, die keine vergleichbaren Phänotypen in dem P19-Screen hervorrufen, keine oder eine andere Rolle in dem vorgeschlagenen Mechanismus der Dynein vermittelten Mikrotubuliverschiebung.

5.4 Die Rolle von KIFs in der MT-Reorganisation

5.4.1 *Knock-down* von KIF23 (MKLP-1) induziert multiple Mikrotubuli-abhängige Phänotypen

KIF23 (MKLP-1) hat zusammen im Komplex mit INCENP (inner centromere protein) eine wichtige regulatorische Rolle während der Zytokinese. In diesem Screen konnte beobachtet werden, dass die Herunterregulierung von KIF23(MKLP-1) zur Ausbildung von Zellen mit mehreren Nuklei führte (siehe Anhang). Dieses lässt sich dadurch erklären, dass die Depletion von MKLP-1 nicht die Mitose inhibiert, sondern erst in der Zytokinese eine essentielle Rolle spielt [40]. Dadurch könnte eine Zelle mehrere Kerne ausbilden, ohne sich dabei zu teilen. Liu et al. (2004) konnten ebenfalls zeigen, dass die Depletion von MKLP-1 in HeLa Zellen zur Ausbildung von Multi-Kern Zellen führte [40]. KIF23 ist ein Plus-Ende gerichteter Motor, der u.a. antiparallele MT gegeneinander veschieben kann [13], und zusammen mit dem Rho-GTPasen Regulator RACGAP1 Mikrotubuli bündelt. Interessanterweise wurden in einem live-cell Experiment nach Herunterregulierung von KIF23 dickere MT-Bündel detektiert (Daten nicht aufgeführt). Dieser Effekt könnte dadurch zustande kommen, dass durch geringere Bündelung breitere Mikrotubulistrukturen resultieren. Alternativ könnten ähnlich zur Ausbildung des kontraktilen Rings in der Mitose auch kontraktile Kräfte, welche durch den KIF23-INCENP-Komplex reguliert werden, eine Verengung des Auswuchses während der Neuriteninitiation im Neuritenschaft verursachen. Durch Inhibition von KIF23 könnte ein Verlust dieser Kräfte ebenfalls in breiteren Mikrotubulistrukturen resultieren. Weiter wurde zudem eine starke Rotation von MR-Astern nach KIF23 knock-down beobachtet. Der genaue molekulare Mechanismus, welcher zu dieser Rotation führt, muss in zukünftigen Analysen aufgeklärt werden.

5.4.2 *Knock-down* von KIF11 (Eg5) führt zu einer verlangsamten MT-Motilität

KIF11 (Eg5) gehört zu der Kinesin-5 Familie, deren Mitglieder sich durch eine tetramere Struktur auszeichen. Aufgrund der tetrameren Struktur, wird angenommen, dass Kinesin-5 Proteine zu der bipolaren Organisation der mitotischen Spindel beitragen, in dem sie mehrere MT verknüpfen. KIF11 ist ein Plus-Ende gerichtetes Motorprotein und besitzt insgesamt vier Motordomänen, die sich paarweise gegenüberliegen. Dadurch kann KIF11 mit zwei Motordomänen an ein Mikrotubulus binden und mit den beiden gegenüberliegenden Motordomänen ein weiteres Mikrotubuli verknüpfen. Mikrotubuli können so bei paralleler Anordnung mit gleich ausgerichteten Plus-Enden gebündelt werden, oder bei antiparaleller Anordnung, gegeneinander verschoben werden. In dieser Arbeit zeigen Zellen, in denen KIF11 mit Hilfe von siRNA herunterreguliert wurde, im Vergleich zu Kontrollzellen, dickere und kürzere Neuriten-artige Auswüchse (vgl. Tabelle 4.1). In einem Screen in P19-Zellen, in welchem ebenfalls KIF11 herunterreguliert wurde, konnten analog hierzu dickere Neuriten detektiert werden (J. Arens, in Arbeit). Da KIF11 in Richtung des Plus-Endes der MT läuft und so diese bei gleicher Ausrichtung ihre Plus-Enden zusammenziehen könnte, würde eine Inhibition dieses Mechanismus eine Zunahme des Neuritenumfangs mit sich führen. Ein ähnlicher Mechanismus könnte die Erhöhung des Mikrotubulibündelumfangs in dieser Arbeit erklären. Eine mögliche Rolle von KIF11 während der MT-Bündelung wird durch live-cell Experimenten unterstützt. So wurde eine verlangsamte MT-Bündelbildung und MT-Reorganisation nach KIF11 knock-down beobachtet. In dem Screen konnte zusätzlich eine massive Reduktion der Zellzahl beobachtet werden, was ebenfalls durch die essentielle Rolle von KIF11 in der Mitose erklärt werden kann [32]. Interessanterweise benötigt der Transport von KIF11(Eg5) zum Spindelpol die Dynein-Aktivität [45]. Hierzu müssten beide Motoren zumindest zeitweise in einem gemeinsamen Komplex vorliegen. Daher wäre KIF11 ein möglicher Kandidat für die dem Dynein-vermittelte entgegengesetzte Kraft (siehe Abschnitt 5.2.1). Es wäre daher in Zukunft interessant die MT-Dynamik in live-cell Experimenten bei geichzeitigem knock-down beider Motorproteine zu analysieren.

5.4.3 Beobachtungen nach knock-down anderer KIFs

In dieser Arbeit wurden weitere Kinesine identifiziert, welche eine Rolle in der MAP2cinduzierten Mikrotubuli Organisation spielen. In manchen Fällen handelt es sich hier jedoch eher um einen indirekten Einfluss auf die Mikrotubuli Bündelung. Dieses ist möglicherweise bei KIF2A der Fall. KIF2A gehört zur Kinesin-13 Familie und hat eine MT-Depolymerisierungsaktivität. Beim Fehlen dieser Aktivität würden MT stärker polymerisieren und eventuell in der Zelle akkumulieren. Diese Akkumulation könnte eine Vergrösserung der Mikrotubulibündel und hierdurch auch eine Vergrößerung des Zellumfangs hervorrufen. Dieses wurde tatsächlich bei manueller Betrachtung der KIF2A inhibierten Zellen beobachtet.

Auffällig ist weiterhin, dass in dieser Arbeit Mitglieder der Kinesin-4 Familie, so z.B. KIF19a, KIF27 und KIF21A, gehäuft eine erhöhte periphere MAP2c-GFP-Intensität aufweisen. Mitglieder der Kinesin-4 Familie sind u.a. involviert in dem Transport von Or-

ganellen. In dem P19-Screen weist jedoch keiner dieser Kandidaten einen veränderten Phänotypen auf (vgl. Tab 4.1). Die Bedeutung dieser Kinesinfamilie für die MAP2cinduzierte MT-Reorganisation bleibt somit vorläufig unklar.

Literaturverzeichnis

- Liu SY, Chen YT, Tseng MY, Hung CC, Chiang WF, Chen HR, Shieh TY, Chen CH, Jou YS, and Chen JY (2008). *Involvement of microtubule-associated protein* 2 (MAP2) in oral cancer cell motility: a novel biological function of MAP2 in non-neuronal cells. Biochem Biophys Res Commun, 366, 520-525.
- [2] Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA (2002). MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. J Cell Biol ,157:1187-1196.
- [3] Jalava NS, Lopez-Picon FR, Kukko-Lukjanov TK, Holopainen IE (2007). Changes in microtubule-associated protein-2 (MAP2) expression during development and after status epilepticus in the immature rat hippocamus. Int. J. Devl Neuroscience 25:121-131.
- [4] Lieven CJ, Millet LE, Hoegger MJ, Levin LA (2007). Induction of axon and dendrite formation during early RGC-5 cell differentiation. Exp Eye Res. 2007 Nov;85(5):678-83. Epub 2007 Aug 8.
- [5] B?langer D, Farah CA, Nguyen MD, Lauzon M, Cornibert S, Leclerc N (2002). The projection domain of MAP2b regulates microtubule protrusion and process formation in Sf9 cells. J Cell Sci. 2002 Apr 1;115(Pt 7):1523-39.
- [6] Fifre A, Sponne I, Koziel V, Kriem B, Yen Potin FT, Bihain BE, Olivier JL, Oster T, Pillot T (2006). *Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2* proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. J Biol Chem. 2006 Jan 6;281(1):229-40. Epub 2005 Oct 18.
- [7] Seitz A, Kojima H, Oiwa K, Mandelkow EM, Song YH, Mandelkow E (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. EMBO J. 2002 Sep 16;21(18):4896-905.

- [8] Rodionov VI, Borisy GG (1997). Microtubule treadmilling in vivo. Science. 1997 Jan 10;275(5297):215-8.
- [9] Dehmelt L, Nalbant P, Steffen W, Halpain S (2006). A microtubule-based, dynein-dependent force induces local cell protrusions: Implications for neurite initiation. Brain Cell Biol. 2006 Feb;35(1):39-56. Epub 2007 Mar 13.
- [10] Dehmelt L, Halpain S (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. Genome Biol. 2005;6(1):204. Epub 2004 Dec 23.
- [11] Baas PW, Joshi HC (1992). Gamma-tubulin distribution in the neuron: implications for the origins of neuritic microtubules. J Cell Biol. 1992 Oct;119(1):171-8.
- [12] Roger B, Al-Bassam J, Dehmelt L, Milligan RA, Halpain S (2004). MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. Curr Biol. 2004 Mar 9;14(5):363-71.
- [13] Sheetz MP, Pfister KK, Bulinski JC, Cotman CW (1998). Mechanisms of trafficking in axons and dendrites: implications for development and neurodegeneration. Prog Neurobiol. 1998 Aug;55(6):577-94.
- [14] Dehmelt L, Halpain S (2004). Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? J Neurobiol. 2004 Jan;58(1):18-33.
- [15] Fish KN (2009). Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy.Curr Protoc Cytom. 2009 Oct;Chapter 12:Unit12.18.
- [16] Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA (2002). MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. J Cell Biol. 2002 Jun 24;157(7):1187-96.
- [17] Menezes JR, Luskin MB (1994). Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. J Neurosci. 1994 Sep;14(9):5399-416.
- [18] B Riederer and A Matus (1985). Differential expression of distinct microtubuleassociated proteins during brain development.Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 September; 82(17): 6006-6009.
- [19] Caceres A, Mautino J, Kosik KS (1992). Suppression of MAP2 in cultured cerebeller macroneurons inhibits minor neurite formation. Neuron. 1992 Oct;9(4):607-18.

- [20] Weisshaar B, Doll T, Matus A (1992). Reorganisation of the microtubular cytoskeleton by embryonic microtubule-associated protein 2 (MAP2c).Development. 1992 Dec;116(4):1151-61.
- [21] Ozer RS, Halpain S (2000). Phosphorylation-dependent Localization of Microtubule-associated Protein MAP2c to the Actin Cytoskeleton. Molecular Biology of the Cell Vol. 11, 3573-3587, October 2000.
- [22] Miki H, Okada Y, Hirokawa N (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. Trends Cell Biol. 2005 Sep;15(9):467-76.
- [23] Hirokawa N, Takemura R (2004). *Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics*. Exp Cell Res. 2004 Nov 15;301(1):50-9.
- [24] Vale RD (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. Cell. 2003 Feb 21;112(4):467-80.
- [25] King SJ, Schroer TA (2000). Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. Nat Cell Biol. 2000 Jan;2(1):20-4.
- [26] Ma N, Tulu US, Ferenz NP, Fagerstrom C, Wilde A, Wadsworth P (2010). Poleward Transport of TPX2 in the Mammalian Mitotic Spindle requires Dynein, Eg5 and Microtubule Flux. Mol Biol Cell. 2010 Jan 28.
- [27] Brito DA, Strauss J, Magidson V, Tikhonenko I, Khodjakov A, Koonce MP (2005). Pushing forces drive the comet-like motility of microtubule arrays in Dictyostelium. Mol Biol Cell. 2005 Jul;16(7):3334-40. Epub 2005 Apr 27.
- [28] Valentine MT, Gilbert ST (2007). To step or not to step? How biochemistry and mechanics influence processivity in Kinesin and Eg5. Curr Opin Cell Biol. 2007 Feb;19(1):75-81. Epub 2006 Dec 26.
- [29] Kapitein LC, Peterman EJ, Kwok BH, Kim JH, Kapoor TM, Schmidt CF (2005). The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. Nature 2005;435:114-118.
- [30] Hayashi N, Koller E, Fazli L, Gleave ME (2008). Effects of Eg5 knockdown on human prostate cancer xenograft growth and chemosensitivity. Prostate. 2008 Sep 1;68(12):1283-95.

- [31] Zhu C, Bossy-Wetzel E, Jiang W (2005). Recruitment of MKLP1 to the spindle midzone/midbody by INCENP is essential for midbody formation and completion of cytokinesis in human cells. Biochem J. 2005 Jul 15;389(Pt 2):373-81.
- [32] Whitehead M, Rattner JB (1998). *Expanding the role of HsEg5 within the mitotic and post-mitotic phases of the cell cycle*. Journal of Cell Science 111, 2551-2561.
- [33] Miki H, Setou M, Kaneshiro K, Hirokawa N (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jun 19;98(13):7004-11.
- [34] Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Oct;10(10):682-96.
- [35] Boman AL, Kuai J, Zhu X, Chen J, Kuriyama R, Kahn RA (1999). Arf proteins bind to mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1) in a GTP-dependent fashion. Cell Motil Cytoskeleton. 1999 Oct;44(2):119-32.
- [36] Powers J, Bossinger O, Rose D, Strome S, Saxton W (1998). A nematode kinesin required for cleavage furrow advancement. Curr Biol. 1998 Oct 8;8(20):1133-6.
- [37] Nislow C, Sellitto C, Kuriyama R, McIntosh JR (1990). A monoclonal antibody to a mitotic microtubule-associated protein blocks mitotic progression. J Cell Biol. 1990 Aug;111(2):511-22.
- [38] Kobayashi N, Reiser J, Kriz W, Kuriyama R, Mundel P (1998). Nonuniform microtubular polarity established by CHO1/MKLP1 motor protein is necessary for process formation of podocytes. J Cell Biol. 1998 Dec 28;143(7):1961-70.
- [39] Liu X, Erikson RL (2007). The nuclear localization signal of mitotic kinesin-like protein Mklp-1: effect on Mklp-1 function during cytokinesis. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Feb 23;353(4):960-4. Epub 2006 Dec 28.
- [40] Liu X, Zhou T, Kuriyama R, Erikson RL (2004). Molecular interactions of Pololike-kinase 1 with the mitotic kinesin-like protein CHO1/MKLP-1. J Cell Sci. 2004 Jul 1;117(Pt 15):3233-46. Epub 2004 Jun 15.
- [41] Matuliene J, Kuriyama R (2002). Kinesin-like protein CHO1 is required for the formation of midbody matrix and the completion of cytokinesis in mammalian cells. Mol Biol Cell. 2002 Jun;13(6):1832-45.

- [42] King Sm (2000). AAA domains and organization of the dynein motor unit. J Cell Sci. 2000 Jul;113 (Pt 14):2521-6.
- [43] Mishima M, Kaitna S, Glotzer M. Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. Dev Cell. 2002 Jan;2(1):41-54.
- [44] Rosenbaum J. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. Curr Biol. 2000 Nov 2;10(21):R801-3.
- [45] Ma N, Tulu US, Ferenz NP, Fagerstrom C, Wilde A, Wadsworth P. Poleward Transport of TPX2 in the Mammalian Mitotic Spindle Requires Dynein, Eg5 and Microtubule Flux. Mol Biol Cell. 2010 Jan 28.
- [46] Dehmelt L, Smart FM, Ozer RS, Halpain S. The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. J Neurosci. 2003 Oct 22;23(29):9479-90.
- [47] Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. *High-resolution model of the microtubule*. Cell. 1999 Jan 8;96(1):79-88.
- [48] Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. Nature. 1984 Nov 15-21;312(5991):237-42.

Anhang

1. Erstellung der stabilen Zelllinie P19-pEGFP-delCMV-Dync1h1-N1

Für eine detaillierte Analyse der Dynamik der schweren Dyneinkette Dync1h1 bei der neuronalen Differenzierung, wurde im Rahmen dieser Arbeit die stabile Zelllinie P19-EGFP-Dync1h1 erstellt. P19-Zellen sind embryonale Karzinomzellen, die aus Teratokarzinomen der Maus gewonnen wurden. Sie sind pluripotente Stammzellen, die lange in Kultur gehalten werden können ohne zu differenzieren. Daher eignen sie sich besonders gut als alternatives Modell zu Stammzellen, für Studien der neuronalen Differenzierung. Zur Generierung dieser Zelllinie wurden P19-Zellen mit dem linearisierten Konstrukt pEGFP-delCMV-Dync1h1-N1 transfiziert und mit dem Antibiotikum G418 über einen Zeitraum von zwei Wochen selektiert. Anschließend wurde die Expression des Proteins durch TIRF-M begutachtet. Das grün-fluoreszierende Konstrukt pEGFPdelCMV-Dync1h1-N1 konnte erfolgreich in P19-Zellen eingebracht werden. Diese Zelllinie exprimiert dauerhaft eine EGFP-markierte schwere Dynein-Kette. Die Expression des Proteins konnte mit Hilfe von TIRF-M detektiert werden. Im TIRF Mikroskop wurde das erwartete gepunktete Muster detektiert. Aus Zeitgründen konnte im Rahmen dieser Arbeit die Erhöhung der Fluoreszenz im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nicht näher charakterisiert und quantifiziert werden. Es konnte eine gelegentlich auftretende Motilität der Dynein-Komplexe detektiert werden. Die Zelllinien wurde aus einem Pool von stabil transfizierten Zellen erstellt, so dass der Expressionslevel von P19-EGFP-Dync1h1 innerhalb der Zelllen variiert, da das Gen an verschiedenen Stellen in das Genom eingebaut worden ist. Durch weitere Selektion könnte der Expressionslevel weiter optimiert werden. Eine Sortierung der Zellen gemäß ihrer Fluoreszenzintensität mithilfe von Durchflusszytometrie (FACS), könnte sich aufgrund des geringen Expressionslevels durch den delCMV-Promotor als schwierig erweisen. Mit dieser Zelllinie könnte in Zukunft mit Hilfe von TIRF-M die Interaktion von Dyneinen mit MT in der Nähe der Plasmamembran näher charakterisiert werden. Weiter könnte in differenzierenden P19-Zellen die Rolle von Dynein bei dem MT-Transport während der Differenzierung zu Neuronen untersucht werden. Des Weiteren könnte mit dieser Zelllinie in Zukunft eine weitere Charakterisierung von siRNA knock-down Phänotypen in langzeit life-cell Imaging Experimenten erfolgen.



Abbildung .1: **P19-Zellen mit der stabil eingebrachten schweren Kette von Dynein** (Dync1h1). A) zeigt P19-Zellen, die stabil mit EGFP-Dync1h1 transfiziert wurden in der widefield-Aufnahme. B) zeigt die stabile Zelllinie in der TIRF-M Aufnahme. Es ist zu sehen, dass die Zellen EGFP-Dync1h1 exprimieren. Die P19-Zellen befinden sich dabei in einem undifferenzierten Stadium.

2. Antikörperfärbung von KIF11, KIF23 und Dync1h1 nach langzeit *live-cell Imaging* Experimenten.



Abbildung .2: **Antikörperfärbung von Dync1h1.** Dargestellt sind Aufnahmen von Zellen, bei denen Dync1h1 herunterreguliert wurde. Die Zellen wurden fixiert und anschließend wie in Abschnitt 3.3.5. beschrieben angefärbt.



Abbildung .3: **Antikörperfärbung von KIF11.** Dargestellt sind Aufnahmen von Zellen, bei denen KIF11 herunterreguliert wurde. Die Zellen wurden fixiert und anschließend wie in Abschnitt 3.3.5. beschrieben angefärbt.



Abbildung .4: **Antikörperfärbung von KIF23.** Dargestellt sind Aufnahmen von Zellen, bei denen KIF23 herunterreguliert wurde. Die Zellen wurden fixiert und anschließend wie in Abschnitt 3.3.5. beschrieben angefärbt.



3. Aufnahmen aus dem Screen nach knock-down von KIF23

Abbildung .5: **Aufnahmen aus dem Screen von Zellen nach** *knock-down* **von KIF23(MKLP-1).**(Links) Aufnahmen von Zellen, die mit nicht-bindender siRNA behandelt wurden. (Rechts) Zellen nach Transfektion mit KIF23-siRNA

3. Nachweis einer erfolgreichen Herunterregulierung von GAPDH



Abbildung .6: **Antikörperfärbung von GAPDH.** Dargestellt sind Aufnahmen von Zellen, bei denen GAPDH herunterreguliert wurde. (Links) Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. (Rechts) Zellen, die mit GAPDHsiRNA transfiziert wurden. In beiden Aufnahmen wurden die Zellen mit anti-GAPDH-Antikörper angefärbt. 4. Dauer der MT-Bündelbildung in Kontrollzellen

Abbildung .7: **Dauer der MT-Bündelbildung in Kontrollzellen.** Dargestellt sind Aufnahmen von Kontrollzellen. Dargestellt sind 33h der Messung. Aufnahmen alle 5 min.