

---

# **Regulation von Podosomen in Makrophagen durch Mikrotubuli und Motorproteine**

---

Dissertation  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Petra Kopp  
Oktober 2005

**Regulation von Podosomen in Makrophagen durch  
Mikrotubuli und Motorproteine**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Dipl. Biol. Petra Kopp  
aus München

Erstgutachter:	Prof. Dr. Heinrich Leonhardt
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Manfred Schliwa
Sondergutachter:	PD Dr. Stefan Linder

eingereicht am: 18.10.2005

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2006

### Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt

Petra Kopp

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2002 bis August 2005 am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von PD Dr. S. Linder erstellt. Die Arbeit wurde betreut und vor der biologischen Fakultät vertreten durch Prof. Dr. H. Leonhardt (Institut für Humangenetik, Department II für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München). Die Arbeit wurde teilweise durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

### Eigene Publikationen zum Thema:

1. Linder, S. und Kopp, P. (2005)

Podosomes at a glance. *J. Cell Sci.* 118, 2079-2082

2. Gimona, M., Grashoff, C. und Kopp, P. (2005)

Oktoberfest for adhesion structures, *EMBO reports* 6, 922-926

3. Kopp, P., Lammers, R., Aepfelbacher, M., Woehlke, G., Rudel, T., Machuy, N. und Linder, S. (2006) The kinesin KIF1C and microtubule plus-ends regulate podosome dynamics in macrophages, *Mol. Biol. Cell.*, in Revision

### Tagungsbeiträge:

Kopp, P., Lammers, R., Aepfelbacher, M., Woehlke, G., Rudel, T., Machuy, N., Steffen, W. und Linder S. (2005), The kinesin KIF1C and microtubule plus-ends regulate podosome dynamics in macrophages, 3<sup>rd</sup> Munich Symposium on Cell Dynamics (T29)

Desde aquí veo un camino que no sé adónde va.  
Por lo mismo que no lo sé, quisiera poderlo andar

Rosalía de Castro  
(spanische Dichterin, 1837-1885)

(Von hier aus sehe ich einen Weg, dessen Ziel ich nicht kenne.  
Genau deshalb, weil ich es nicht weiß, möchte ich ihn gehen.)

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>IV</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	
1.1.	Funktion von Makrophagen	1
1.2.	Das Zytoskelett	3
1.2.1.	Das Aktinzytoskelett	3
1.2.1.1.	Dynamik der Aktinpolymerisation	3
1.2.1.2.	Die Regulation der Aktinpolymerisation durch Aktin-bindende Proteine	4
1.2.2.	Podosomen	6
1.2.2.1.	Struktur und Aufbau von Podosomen	7
1.2.2.2.	Funktion von Podosomen	9
1.2.2.3.	Die Regulation von Podosomen	9
1.2.3.	Mikrotubuli	12
1.2.3.1.	Struktur und Funktion des Mikrotubuli-Zytoskeletts	12
1.2.3.2.	Mikrotubuli-assoziierte Proteine ( <i>microtubule-associated proteins</i> , MAPs)	13
1.2.4.	Interaktionen zwischen Aktin und Mikrotubuli	15
1.3.	Molekulare Motoren: Dyneine, Kinesine, Myosine	16
1.3.1.	Dynein	17
1.3.2.	Kinesin	18
1.3.3.	Myosin	21
1.4.	Aufgabenstellung	23
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1.	Arbeiten mit <i>E.coli</i>	24
2.1.1.	Kultivierung von <i>E.coli</i>	24
2.1.2.	Transformation mit Plasmiden	24
2.1.2.1.	Herstellung elektrokompenter Bakterien	24
2.1.2.2.	Elektroporation kompetenter Bakterien	24
2.1.2.3.	Herstellung hitzekompenter Bakterien	25
2.1.2.4.	Hitzeschocktransformation	25
2.2.	Arbeiten mit menschlichen Zellen	25
2.2.1.	Allgemeines	25
2.2.2.	Isolierung primärer humaner Makrophagen	26
2.2.3.	Isolierung primärer humaner Endothelzellen aus Nabelschnüren	27
2.2.4.	Ablösung adhärenter Zellen	27
2.2.5.	Mikroinjektion	27
2.2.6.	Nukleofektion	28
2.2.7.	Manipulation durch stimulierende und inhibierende Substanzen	28
2.3.	Mikroskopische Methoden	29
2.3.1.	Indirekte Immunfluoreszenz	29
2.3.1.1.	Fixierung und Lyse von humanen Zellen	29

2.3.1.1.1.	Formaldehyd/Aceton	29
2.3.1.1.2.	Methanol	29
2.3.1.2.	Färbung mittels spezifischer Antikörper	29
2.3.1.3.	Fluoreszenzmikroskopie	31
2.3.1.4.	<i>in vivo</i> -Mikroskopie	31
2.4.	Arbeiten mit Nukleinsäuren	31
2.4.1.	Arbeiten mit DNA	31
2.4.1.1.	Plasmide	32
2.4.1.2	Agarosegelelektrophorese von DNA	33
2.4.1.3.	Plasmidisolierung	33
2.4.1.4.	Gelelution	33
2.4.1.5.	DNA-Restriktionshydrolyse	33
2.4.1.6.	PCR-Reaktionen	34
2.4.1.6.1.	Oligonukleotide	34
2.4.1.5.2.	Standard-PCR	36
2.4.1.5.3.	Bakterien-PCR	36
2.4.1.5.4.	Mutagenese mittels QuikChange™ Mutagenesis Kit	37
2.4.1.5.5.	Aufreinigung von PCR-Produkten	37
2.4.1.6.	Ligation	37
2.4.2.	Arbeiten mit RNA	37
2.4.2.1.	Allgemeines	37
2.4.2.2.	Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA	37
2.4.2.3.	Reverse Transkriptase-Reaktion	37
2.4.2.4.	<i>Real-Time</i> PCR	38
2.4.2.5.	RNA-Interferenz	39
2.5.	Arbeiten mit Proteinen	40
2.5.1.	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	40
2.5.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli	40
2.5.3.	Molekulargewichtsbestimmung	40
2.5.4.	Coomassie-Färbung	40
2.5.5.	Silberfärbung	40
2.5.6.	Nachweis von Proteinen durch MALDI-TOF-Analyse	41
2.5.7.	Immunologischer Nachweis von Proteinen	41
2.5.8.	Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitäts- chromatographie	42
2.5.8.1.	GST-Fusionsproteine	42
2.5.8.1.1.	Elution mit Glutathion	42
2.5.8.1.2.	Thrombinspaltung	43
2.5.8.2.	MBP-Fusionsproteine	43
2.5.9	Interaktionsstudien	44
2.5.9.1.	Herstellung von Zelllysaten aus humanen Zellen	44
2.5.9.2.	Immun-Präzipitation	44
2.5.9.3.	GST-pull-down	45
2.5.10.	Isolierung von Motorproteinen aus primären humanen Makrophagen	45

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	46
3.1.	Mikrotubuli-Plusenden kontaktieren Podosomen	46
3.2.	Podosomenbildung ist ATP-abhängig	48
3.3.	Dynein-Inhibition hat keinen Effekt auf die Podosomen-Bildung	50
3.4.	Untersuchung der Beteiligung verschiedenen an der Podosomenbildung	53
3.4.1.	Inhibition von konventionellem Kinesin hat keinen Effekt auf die Podosomenbildung	53
3.4.2.	Transfektion von verschiedenen Kinesin-Konstrukten	55
3.4.3.	Auswirkungen eines RNAi-induzierten <i>knock-down</i> ausgewählter Kinesine auf die Podosomenbildung	56
3.4.4.	Auswirkung von KIF3 auf die Podosomenbildung	58
3.5.	KIF1C	59
3.5.1.	Nachweis der Expression von KIF1C in primären humanen Makrophagen	59
3.5.2.	KIF1C reguliert Podosomen	61
3.5.2.1.	Podosomenverhalten bei Einsatz des Wildtyp-Proteins	61
3.5.2.2.	Podosomenverhalten bei Fehlen des funktionellen Motors	63
3.5.2.2.1.	K103A-KIF1C	63
3.5.2.2.2.	<i>knock-down</i> von KIF1C	64
3.5.3.	Interaktionspartner Myosin IIA	68
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	77
4.1.	Regulation von Podosomen durch Mikrotubuli	77
4.2.	Regulation durch KIF1C	80
4.3.	KIF1C interagiert mit Myosin IIA	83
4.4.	Die Interaktion zwischen KIF1C und Myosin IIA hat einen funktionellen Einfluss auf Podosomen	84
4.4.	Modelle für die Podosomen-Regulation durch koordinierte Aktivität von KIF1C und Myosin IIA	85
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	92
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	95
<b>7.</b>	<b>Anhang:</b> Inhalt der Video-CD	115
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	117
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	118

**Abkürzungen:**

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP-PNP	Adenosin-5( $\beta$ , $\gamma$ -imido)-triphosphat
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLIP	Cytoplasmatisches Linker-Protein ( <i>cytoplasmic linker protein</i> )
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EHNA	Erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl) adenin
EtOH	Ethanol
F	Farad
F-	filamentöses (Aktin)
FAK	Fokale Adhäsionen-Kinase ( <i>focal adhesion kinase</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLF	formyl-Met-Leu-Phe
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec)
g	Gramm
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	doppelt destilliertes Wasser
HEPES	N-Hydroxy-Ethylpiperazin-N-Ethylsulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC	Humane vaskuläre Endothelzellen aus Nabelschnüren ( <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-® -D-Thiogalactopyranosid
K	Kilo
K103A	katalytisch inaktive P-loop-Punktmutante von KIF1C
KAP	Kinesin-assoziiertes Protein
KIF	Kinesin-like family
KLC	leichte Kette von Kinesin ( <i>kinesin light chain</i> )
l	Liter
LB	Luria Broth
M	Molar
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein



MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted Laser desorption ionization – time of flight</i>
max.	maximal
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
mRFP	monomeres rotes fluoreszierendes Protein
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum ( <i>microtubule-organizing center</i> )
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
NGS	Normales Ziegenserum ( <i>normal goat serum</i> )
nm	Nanometer
?	Ohm
OD	Optische Dichte
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBD	PTPD1-bindende Domäne von KIF1C
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
Pyk	Prolin-reiche Tyrosin Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
+TIP	<i>plus-end tracking protein</i>
PP2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-Butyl)pyrozolo[3-4-d]pyrimidin
PTPD	Protein Tyrosin-Phosphatase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA <i>interference</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodiumdodecylsulfat</i> )
sec	Sekunden
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SUK4	Seeigelkinesin-Antikörper ( <i>Sea Urchin kinesin</i> )
TEMED	N, N, N', N' –Tetramethylethyldiamin
TIRF	<i>Total internal reflection fluorescence microscopy</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	<i>unit(s)</i>
u. U.	unter Umständen
ÜNK	über Nacht-Kultur
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
Vol	Volumina
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrome-Protein
WAVE	WASP-Family Verprolin Homologous Protein
wt	Wildtyp

## **1. Einleitung**

### **1. 1. Funktion von Makrophagen**

Das Immunsystem schützt den Körper vor eindringenden Mikroorganismen und Parasiten. Eine erste Verteidigungslinie stellen hier die Leukozyten dar, zu denen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten zählen. Sie entstehen aus hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark aus Monozyten. Diese zirkulieren etwa 24 Stunden im Blutgefäßsystem und wandern anschließend in verschiedene Gewebe ein, wo sie zu Makrophagen ausdifferenzieren. Makrophagen werden je nach Gewebeständigkeit unterschiedlich bezeichnet und zusammen mit den im Blut kursierenden Monozyten zum sogenannten mononukleären Phagozytensystem zusammengefasst: z. B. Kupffer'sche Zellen der Leber, Histozyten des Bindegewebes, Mikroglia-Zellen des Gehirnes und Mesangiale Zellen der Niere.

Im Rahmen der angeborenen Immunität kommt den Makrophagen als professionellen Phagozyten eine wesentliche Rolle zu. Die Erkennung von Pathogenen geschieht mittels Oberflächenrezeptoren, die die Zellen befähigen, mikrobielle Komponenten, wie z.B. Kohlenhydrate, Glykolipide, Proteolipide und Proteine, zu erkennen (Greenberg und Grinstein, 2002; Underhill und Ozinsky, 2002) Zu diesen Rezeptoren zählen der Mannose-Rezeptor, *scavenger*-Rezeptoren, CD14 oder die *Toll like receptors* (TLRs; (Akira, 2003)).

Auch in der erworbenen Immunantwort leisten Makrophagen als Antigen-präsentierende Zellen einen wichtigen Beitrag: Makrophagen nehmen über Phagozytose Bakterien auf, im Phagolysosom werden die Mikroorganismen anschließend hydrolytisch verdaut. Die prozessierten Peptidfragmente der Pathogene werden an sogenannte *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse II-Moleküle gebunden und an der Makrophagenoberfläche den Lymphozyten präsentiert. Die Makrophagen stellen also ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Eine weitere Funktion kommt den Makrophagen bei der Eliminierung von Zelldebris oder apoptotischen Zellen zu. Die Phagozytose apoptotischer Zellen ist für den Zellumsatz im Gewebe von großer Bedeutung (Platt *et al.*, 1998). Auch bei der Bekämpfung von Tumoren spielen Makrophagen eine wichtige Rolle. Aktivierte Makrophagen sind in der Lage, selektiv Tumorzellen zu phagozytieren, während sie gesundes Gewebe nicht angreifen (Killian und Fidler, 1994).

Makrophagen besitzen wie alle Leukozyten die Fähigkeit, an aktivierte Endothelzellen zu adhären und durch die Gefäßwand auf einen Entzündungsherd zuzuwandern. Dieser Vorgang wird auch Diapedese genannt und setzt sich aus mehreren Schritten zusammen (Butcher, 1991; Springer, 1994). Endothelzellen, die mit bakteriellen Produkten oder primären Entzündungszytokinen wie Lipopolysaccharid (LPS), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) oder (Interleukin-1) IL-1 in Berührung gekommen sind, setzen sog. Monozyten-

Chemotaxis-Faktoren frei (Baggiolini und Dahinden, 1994; Ben-Baruch *et al.*, 1995; Mantovani *et al.*, 1998). Im Blut zirkulierende Leukozyten binden an Oberflächenrezeptoren des Endothels, wie z.B. E-Selektine, oder VCAM1, an die mononukleäre Integrine wie  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) binden (Berlin *et al.*, 1993; Alon *et al.*, 1995; Henderson *et al.*, 2001). Es kommt wiederholt zu Bindungen, die aber aufgrund des hohen Scherstress durch den Blutstrom wieder aufgebrochen werden, so dass die Leukozyten verlangsamt werden und am Endothel entlang „rollen“. Auf die Bindung von endothelialen Chemokinen an Chemokin-Rezeptoren folgt die Aktivierung nachgeschalteter G-Proteine, die wiederum in Aktivierung der Makrophagen resultiert, woraufhin besonders Integrine verstärkt exprimiert werden und die oben beschriebene feste Adhäsion der Makrophagen an das Endothel resultiert (Larson und Springer, 1990; Lobb und Hemler, 1994). Der letzte Schritt der Diapedese umfasst die Transmigration zwischen benachbarten Endothelzellen, wengleich alternativ zu diesem parazellulären Weg zumindest für Neutrophile auch transzelluläre Transmigration mittels Transzytose durch den Zellkörper der Endothelzellen beobachtet wurde (Marchesi und Gowans, 1964; Feng *et al.*, 1998)

Störungen dieser Prozesse führen zu einer inadäquaten Entzündungsreaktion, die Krankheitsbilder wie Atherosklerose, Psoriasis, Asthma und Arthritis nach sich ziehen kann (Übersicht bei Worthylake und Burridge, 2001).

Bei der Bildung eines Atheroms sind die Makrophagen maßgeblich an der Entstehung thrombotischer Komplikationen beteiligt: Das Endothel reagiert auf hyperlipidämische Diät mit einer vermehrten Expression von VCAM1 (Cybulsky und Gimbrone, 1991; Li *et al.*, 1993), woraufhin es zu einer erhöhten Adhäsion und Diapedese von Makrophagen kommt (Poole und Florey, 1958). In der Intima nehmen die Makrophagen über *Scavenger* Rezeptoren oxidierte Lipoproteine auf, wodurch aus ihnen die sog. Schaumzellen entstehen. Die aktivierten Makrophagen sezernieren verstärkt pro-inflammatorische Cytokine, reaktive Sauerstoffspezies und Matrix-Metalloproteinasen, die zu einer Ruptur des atherosklerotischen Plaques führen können (Rajavashisth *et al.*, 1999). Zudem wird der pro-thrombotische *Tissue factor* ins Blut freigesetzt, was zu einer zusätzlichen Verengung des Gefäßvolumens führt.

Die Zellmigration ist ein komplexer mechano-chemischer Prozess, der eine regulierte Veränderung der Zellgestalt in Form von Polarisation, Adhäsion und Retraktion beinhaltet. Diese wird u.a. durch Modulation des Aktinzytoskeletts durch RhoGTPasen erreicht. Rac1 und Cdc42 gelten hier als Schlüsselregulatoren, da sie für die Ausbildung von zwei unterschiedlichen Membranausstülpungen, Filopodien und Lamellipodien, verantwortlich sind. Filopodien stellen 0,2-10  $\mu\text{m}$  lange fadenförmige Zellausläufer dar und werden durch Cdc42 reguliert. Ihnen wird im Allgemeinen eine Funktion als Chemosensoren zugeschrieben. Sie bestehen aus unipolaren parallelen Aktinbündeln, die über die ganze Länge mit den Aktin-bindenden Proteinen Fascin und mit Ena/VASP an der Spitze quervernetzt werden (Svitkina *et al.*, 2003). Neuere Daten sprechen für einen zweiten Typ

von Filopodien, die sich in ihrer Länge und Dicke von den bisher beschriebenen unterscheiden und durch Rif (*Rho in filopodia*) reguliert werden (Ellis und Mellor, 2000) Lamellipodien sind flache aktin-reiche Membranausläufer am Vorderende von migrierenden Zellen, *ruffles* findet man vor allem an der apikalen Seite. Diese Strukturen werden durch Rac reguliert (Ridley *et al.*, 1992).

Eine Fortbewegung setzt eine Ablösung alter Adhäsionsstellen und eine Retraktion des hinteren Zellteiles voraus. Diese wird durch RhoA und ihren Effektor ROCK über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Myosinkontraktibilität kontrolliert (Alblas *et al.*, 2001; Worthylake und Burridge, 2001).

## 1.2. Das Zytoskelett

Eukaryontische Zellen besitzen ein Zytoskelett, das der Aufrechterhaltung und Umgestaltung der Zellform dient, sowie für Migration, Polarisierung und Organellenorganisation unerlässlich ist. Das Zytoskelett ist definiert als die Gesamtheit der im Zytoplasma verbleibenden, fädigen Zellstrukturen nach Extraktion mit einem nicht-ionischen Reagenz (Osborn und Weber, 1977). Das Zytoskelett ist keine starre, statische Struktur, sondern ein hochdynamisches und in ständigem Umbau begriffenes System. Es setzt sich aus drei unterschiedlichen Elementen zusammen: Aktin-Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Das Aktin-Zytoskelett übernimmt kontraktile und protrusive Funktionen in der Zelle, während Mikrotubuli ein polarisiertes Netzwerk ausbilden, das die Zellform bestimmt und als Transportweg für Proteine und Organellen benutzt wird. Intermediärfilamenten wird hauptsächlich eine stützende Funktion zugesprochen.

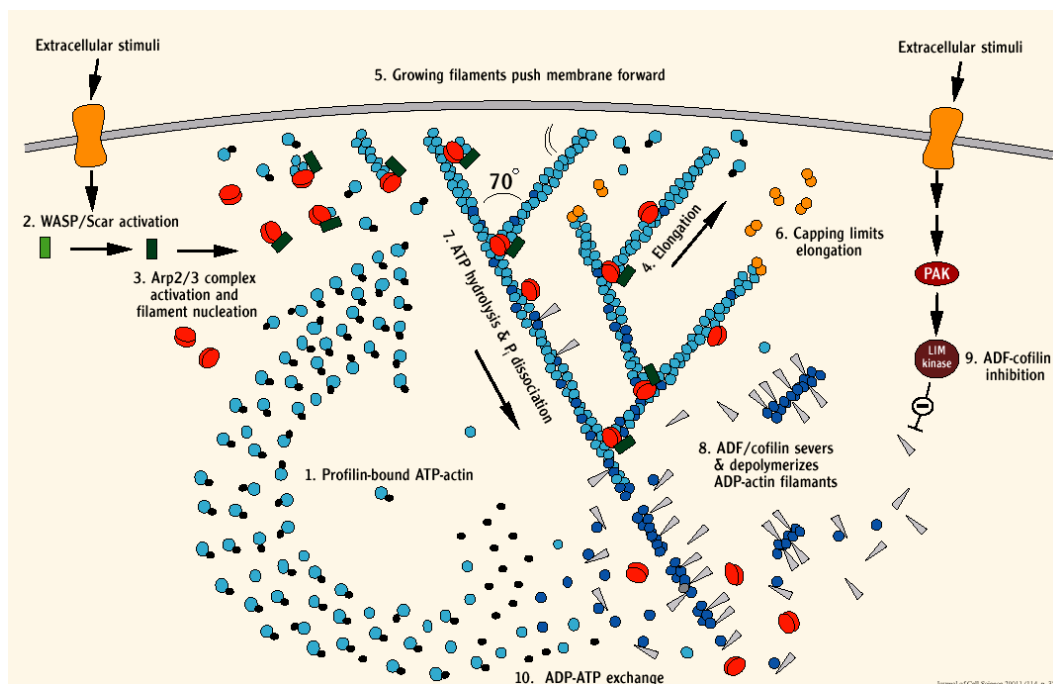
### 1.2.1 Das Aktinzytoskelett

#### 1.2.1.1. Dynamik der Aktinpolymerisation

Aktin stellt das häufigste Protein in Eukaryontenzellen dar (5% bzw. 20 % in Muskelzellen, Kabsch und Vandekerckhove, 1992) und ist eines der am besten untersuchten Proteine. Es spielt eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Polarisierung, Migration, Phagozytose, dem intrazellulären Transport durch das Zytoplasma bis hin zur Muskelkontraktion. Aktin ist ein globuläres Protein mit einer molekularen Masse von 43 kDa und wird in seiner monomeren Form als G-Aktin (für globulär) bezeichnet.

G-Aktin bindet ein Molekül ATP und ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion und kann unter ATP-Hydrolyse zu langen Filamenten, dem F-Aktin (filamentöses Aktin) polymerisieren. F-Aktin besteht aus zwei Strängen von Aktinpolymeren, die zu einer linksgängigen Helix mit einem Durchmesser von ca. 8 nm verdrillt sind (Kabsch und Vandekerckhove, 1992). Da alle Monomere die gleiche Orientierung aufweisen, ergibt sich für das Filament eine Polarität: Monomere binden schneller an das sog. stumpfe Ende (*barbed end*) als an das spitze Ende (*pointed end*) (Pollard, 1986; Kuhn und Pollard, 2005). Das an die Monomere gebundene ATP wird während der Addition an das wachsende Filament hydrolysiert, jedoch mit einer

zeitlichen Verzögerung, so dass eine Kappe (sog. ATP-cap) entsteht (Carlier *et al.*, 1984; Korn, 1985; Carlier und Pantaloni, 1988; Carlier, 1989). Das inorganische Phosphat dissoziiert anschließend, während das ADP-Produkt fest gebunden bleibt (Rickard und Sheterline, 1986). Die ATP-Hydrolyse scheint die Stabilität und Dynamik der Filamente zu regulieren, da terminales ADP-Aktin bei Bedarf schnell zu Monomeren depolymerisiert werden kann (Carlier, 1989). An den freigesetzten Monomeren wird das Nukleotid ausgetauscht, so dass wieder ATP-Aktin für einen neuen Polymerisationszyklus bereitsteht. Dieses gerichtete Filamentwachstum wird auch „Tretmühlenmechanismus“ (*treadmilling*) genannt.



**Abb.1-1. Modell der Aktin Nukleation (Dendritisches Nukleationsmodell) und Depolymerisierung *in vivo***

Profilin bindet freie Monomere und hält sie somit bereit für die Assemblierung (1). Durch aktivierte Proteine der WASP-Familie (2) wird der Arp2/3 Komplex aktiviert, der daraufhin mit konstanter Geschwindigkeit neue stumpfe Enden bereitstellt (3). Diese Filamente wachsen schnell (4) und führen zur Protrusion der Plasmamembran (5). Nach kurzer Zeit wird das Wachstum der stumpfen Enden durch „Capping“ beendet (6). Dieses System ist also von einer kontinuierlichen Aktivierung des Arp2/3 Komplexes abhängig. Nachfolgende Hydrolyse von ATP am Aktin-Filament (7) führt zum Abbau älterer Filamente durch ADF/Cofilin (8). Nukleotid-Austausch durch Profilin überführt die Aktin-Untereinheiten wieder in den ATP-Monomer Pool (10). Aus Pollard *et al.*, 2001.

**1.2.1.2. Die Regulation der Aktinpolymerisation durch Aktin-bindende Proteine**

1998 wurde erstmals das Dendritische Nukleationsmodell (*Dendritic nucleation model*) beschrieben, das die Entstehung von verzweigten Aktinnetzwerken am vorderen Ende migrierender Zellen erklärt (Mullins *et al.*, 1998).

Die initialen Schritte der Aktinpolymerisation, Dimerisierung und Trimerisierung von Aktinmonomeren sind energetisch ungünstig und laufen sehr langsam ab. Die Anlagerung

weiterer Monomere hingegen ist ein energetisch günstiger Prozess, der zu einer schnellen Elongation des Filaments führt. Die spontane Nukleation wird erst durch Aktinukleatoren wie dem Arp2/3-(*Actin-related protein*) Komplex ermöglicht. Der Arp2/3-Komplex ist der stärkste bekannte Aktinnukleator, liegt in der Zelle aber in inaktivem Zustand vor und muss daher erst aktiviert werden (Welch und Mitchison, 1998). Er bindet an ein bereits vorhandenes Aktinfilament. Die Untereinheiten Arp2 und 3 haben eine ähnliche Tertiärstruktur wie Aktin. Bei Anlagerung eines G-Aktin-Monomers entsteht ein stabiles Trimer und somit ein Nukleus für die Polymerisation. Das stumpfe Ende wächst durch die Anlagerung neuer Monomere, bis durch die Bindung von *capping*-Proteinen wie CapZ, Gelsolin und Tensin das Wachstum beendet wird.

Die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes erfolgt durch Komplexbildung mit Aktivatorproteinen. Die bekanntesten sind hier die WASP/Scar-Proteine (*Wiskott-Aldrich-Syndrome-Protein/Suppressor of cAMP-Rezeptor*), die Arp2/3 durch ihre C-terminale VCA (*Verprolin-Central-Acidic*)-Domäne binden (Miki und Takenawa, 2003). Die Proteinfamilie kann in zwei Unterfamilien unterteilt werden: N-WASP und die hämatopoietische Form WASP einerseits, WAVE/Scar-Proteine andererseits. N-WASP und WASP liegen in einer inaktiven Form vor, der eine intramolekulare Bindung des N-Terminus an die katalytische VCA-Domäne zugrunde liegt. Diese Autoinhibition wird durch die Bindung von PIP<sub>2</sub> und der Rho-GTPase Cdc42 aufgehoben (Kim *et al.*, 2000; Rohatgi *et al.*, 2000). Zudem liegt N-WASP in einem Komplex mit WIP/CR16 (*WASP-interacting protein*) vor, die zur Inhibition beitragen könnten. Neuere Daten konnten zeigen, dass unter physiologischen Bedingungen zusätzlich noch ein weiteres Protein namens Toca-1 (*transducer of Cdc42-dependent actin assembly*) nötig ist. Dieses Protein ist mit CIP4 verwandt und bindet sowohl an Cdc42 und N-WASP. Es könnte zusammen mit Cdc42 N-WASP kooperativ aktivieren, oder eventuell eine Inhibition durch WIP (*WASP-interacting protein*) aufheben (Ho *et al.*, 2004). WAVE/Scar-Proteine liegen in einem Komplex mit Nap1, dem Rac-1-bindenden Protein Sra-1/PIR121 und dem Abl-interagierenden Protein Abi1 vor (Innocenti *et al.*, 2004). Die Lokalisation dieses Komplexes wird von Rac-1 reguliert. Durch aktiviertes Rac1 wird der Komplex während der Entstehung von Lamellipodien an Membranprotrusionen rekrutiert (Steffen *et al.*, 2004).

Die Depolymerisation hingegen wird durch die ADF/Cofilin (Aktin-Depolymerisierungs-Faktor)-Familie-Proteine katalysiert. Neuere Daten sprechen für eine Beteiligung weiterer Proteine wie AIP-1 (Aktin-interagierendes Protein-1), die an ADF/Cofilin binden und deren depolymerisierende Aktivität erhöhen (Ono *et al.*, 2004; Paavilainen *et al.*, 2004). Gelsolin hat nicht nur eine *capping*-Funktion, sondern ist auch in der Lage, Teile der Filamente abzuspalten (Burtnick *et al.*, 2004). Abgelöste Monomere sind oft an Cofilin gebunden, durch Srv2/CAP wird eventuell Cofilin durch Profilin als Bindungspartner der Monomere ersetzt (Balcer *et al.*, 2003; Mattila *et al.*, 2004). Profilin beschleunigt den Austausch des Nukleotides, wodurch neues ATP-Aktin für einen weiteren Polymeri-

sationszyklus bereitsteht (Mockrin und Korn, 1980). Die Bindung freier Aktinmonomere an das Monomer-bindende Protein Profilin verhindert nicht nur die spontane Nukleation, sondern auch die Addition an spitzen Enden, so dass sich Monomere nur an stumpfen Enden anlagern können.

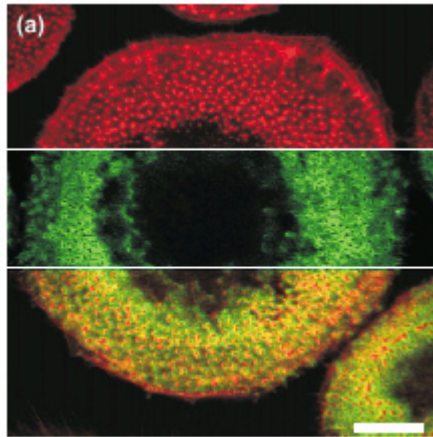
### 1.2.2 Podosomen

Zellen können an das Substrat über verschieden Arten von Adhäsionsstrukturen adhären: Fokale Komplexe, fokale Adhäsionen, fibrilläre Adhäsionen, Podosomen und Invadopodien (Zamir und Geiger, 2001). Fokale Adhäsionen sind als Zell-Substrat-Kontakte definiert, die die Enden von Stressfasern aus Aktin verankern und eine starke Anheftung an das Substrat ermöglichen (Buccione *et al.*, 2004). Sie entstehen aus fokalen Komplexen, die sich am Zellrand bald nach Substratanheftung ausbilden. Fibrilläre Adhäsionen binden Integrine an Fibronectin-Fibrillen. Sie bestehen aus länglichen Fibrillen im Zentrum der Zellen und sind reich an Tensin (Zamir *et al.*, 1999; Zaidel-Bar R *et al.*, 2003).

In einigen Zelltypen erfolgt die Anheftung an das Substrat über Podosomen. Diese sind aktin-reiche Adhäsionsstrukturen in hämatopoietischen Zellen wie Makrophagen (Lehto *et al.*, 1982; Linder *et al.*, 1999), dendritischen Zellen (Burns *et al.*, 2001), Osteoklasten (Marchisio *et al.*, 1984), wurden aber auch in anderen Zelltypen wie Endothelzellen (Moreau *et al.*, 2003; Zaidel-Bar R *et al.*, 2003; Osiak *et al.*, 2005) und glatten Muskelzellen (Fultz *et al.*, 2000; Hai *et al.*, 2002; Gimona *et al.*, 2003), sowie in Src-transformierten Fibroblasten gefunden (Tarone *et al.*, 1985; Marchisio *et al.*, 1987; Mizutani *et al.*, 2002). Sie unterscheiden sich von den anderen Adhäsionsstrukturen in einigen wichtigen Eigenschaften: erstens findet man in Podosomen Aktin-regulierende Proteine, wie Gelsolin, Arp2/3, N-WASP, Fimbrin (Marchisio *et al.*, 1984; Marchisio *et al.*, 1988). Zweitens weisen sie eine viel höhere Dynamik auf als z.B. fokale Adhäsionen und sind nicht auf *de novo*-Proteinsynthese angewiesen. Die Bildung von fokalen Adhäsionen dauert ca. 3h, während hingegen Podosomen bereits 1h nach Substratkontakt ausgebildet werden. Drittens kommt Podosomen im Gegensatz zu fokalen Adhäsionen im Matrixabbau eine Rolle zu.

Podosomenartige Strukturen in Src-transfizierten Zellen werden als Invadopodien bezeichnet. Diese Strukturen sind den Podosomen sehr ähnlich, wenngleich sie eine geringere Dynamik aufweisen und intensiv Matrixabbau betreiben, wobei sie die Matrix tief invadieren (Buccione *et al.*, 2004).

Osteoklasten sind auf die Resorption von mineralisiertem Knochen spezialisiert. Sie weisen zwei Arten von Aktinzytoskelettstrukturen auf: die sog. „*sealing zone*“, welche ein breites Aktinband darstellt mit einem inneren und äußeren Saum aus Vinculin und sich in der Nähe des Kerns ausbildet. Innerhalb der „*sealing zone*“ findet der enzymatische Abbau der Knochenmasse statt, die u.a. durch Mineralisierung durch Kalziumapatitkristalle ent-



**Abb. 1-2. Podosomen in primären humanen Makrophagen.**

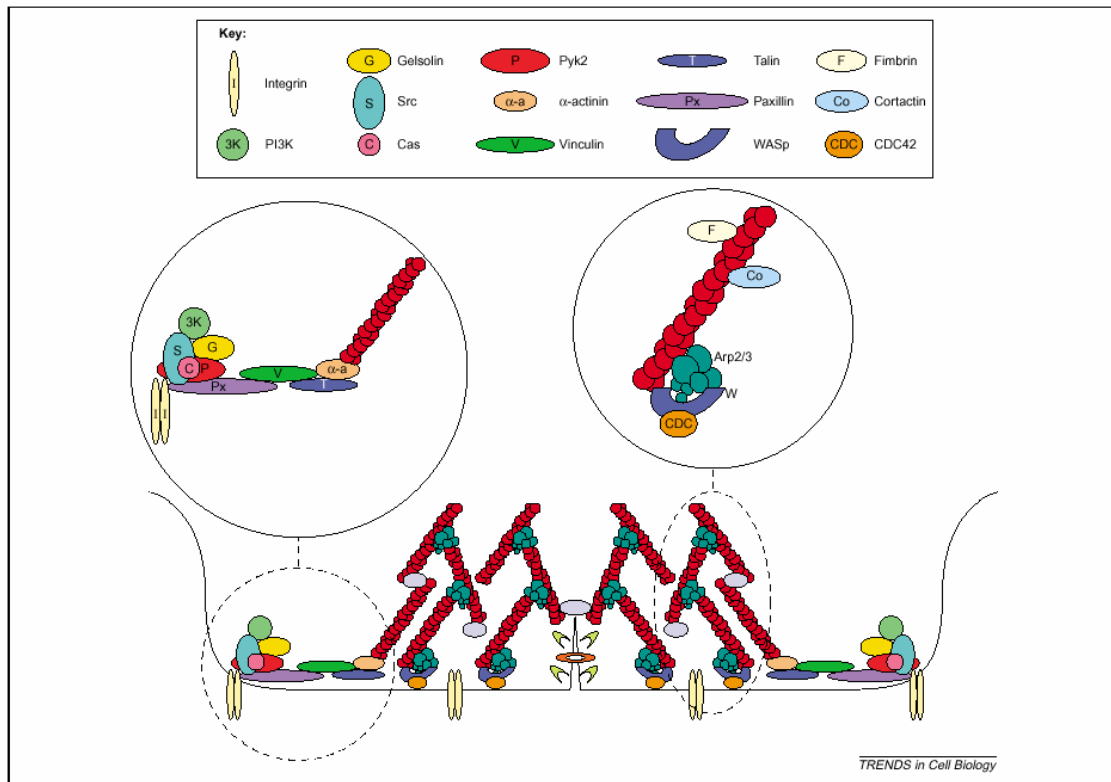
Konfokalmikroskopische Aufnahme eines ruhenden Makrophagen, oberes Drittel: F-Aktin (rot), mittleres Drittel: Talin (grün), unteres Drittel: in gelb ist die Überlagerung beider Signale zu erkennen. Jedes Podosom ist von einer Ringstruktur umgeben, die Talin enthält. Weißer Balken: 10  $\mu\text{m}$ . Aus Linder und Aepfelbacher, 2003

steht (Destaing *et al.*, 2003). An der Zellperipherie findet man einen Ring aus Podosomen, von dem man zunächst annahm, dass er ein Vorläufer der „*sealing zone*“ ist, die sich aus diesem Podosomenring durch Fusion bildet. Die „*sealing zone*“ entsteht jedoch nicht aus dem Podosomenring, sondern bildet sich vollständig neu aus, wobei Apatitkristalle das auslösende Signal darstellen. Der Aktinring der „*sealing zone*“ löst sich während der Ausbreitung und Migration der Osteoklasten auf und bildet sich in der stationären Phase während der Resorption wieder aus. Podosomen bilden sich nur in ausgebreiteten Osteoklasten, die auf nicht-apatithaltigem Substrat wie Glas oder Plastik adhäreren (Saltel *et al.*, 2004).

**1.2.2.1. Struktur und Aufbau von Podosomen**

Podosomen sind füßchenartige Protrusionen der Plasmamembran, die extrazellulär mit Integrin- und Komplementrezeptoren und intrazellulär mit Aktin und Aktin-regulierenden Proteinen assoziiert sind (Tarone *et al.*, 1985; Zambonin-Zallone *et al.*, 1989). Sie befinden sich im ventralen Teil der Zelle in der Substratanheftungsebene und weisen eine zweigeteilte Architektur auf: ein F-Aktinbündel-haltiger Kern mit einem Durchmesser von ca. 0,3  $\mu\text{m}$  und einer Höhe von 0,5  $\mu\text{m}$  (Gavazzi *et al.*, 1989; Destaing *et al.*, 2003), der von einer Ringstruktur aus Plaqueproteinen wie Vinkulin oder Talin umgeben ist. Diese Bündelung kommt wahrscheinlich durch verschiedene aktinbindende und quervernetzende Proteine mit Fimbrin zustande (Marchisio *et al.*, 1984; Babb *et al.*, 1997; Volkmann *et al.*, 2001). Die polare Orientierung der Aktinbündel ist bislang unbekannt, jedoch liegt die Vermutung nahe, dass das stumpfe Ende in Richtung der Plasmamembran zeigt, da Podosomen in ventraler Richtung auf weichen Substraten protrudieren können (Yamaguchi *et al.*, 2005). Zudem findet man im Kern die Aktinregulatoren WASP/N-WASP (Linder *et al.*, 1999; Mizutani *et al.*, 2002) und Arp2/3-Komplex (Linder *et al.*, 2000a; Burns *et al.*, 2001) was für eine dynamische Aktinpolymerisation spricht.





### Abb. 1-3. Podosomenmodell

schematische Darstellung eines Podosoms, Querschnitt senkrecht zum Substrat. **Oben links:** Ausschnitt aus der podosomalen Ringstruktur (vereinfachte Darstellung). Integrine binden an die extrazelluläre Matrix, während Paxillin als Gerüst für einen intrazellulären Komplex aus Src, Pyk2/FAK, Gelsolin und Phosphoinositokinase (PI3K) und p130cas dient. Dieser Komplex ist über Vinculin, Talin und  $\alpha$ -Aktinin an F-Aktin des Kerns verbunden. **Oben rechts:** Ausschnitt aus dem Podosomenkern. Die Aktivierung von WASP/N-WASP durch Cdc42 führt zu einem aktivierten Arp2/3-Komplex, an dem Aktinfilamente an der Membran polymerisieren. Die Aktinfilamente sind über Cortactin und Fimbrin miteinander verbunden. **Unten:** Die Plasmamembran (schwarze Linie) enthält säulenförmige Membraneinstülpungen, die wahrscheinlich durch Dynamin (roter Kreis) vermittelt werden und an denen vermutlich Metallomatrixproteasen sekretiert werden (gelbe „Schwalbenschwänze“). (Aus Linder und Aepfelbacher, 2003)

Der F-Aktin-reiche Kern der Podosomen ist von einer Wolke aus monomerem G-Aktin umgeben (Akisaka *et al.*, 2001; Destaing *et al.*, 2003). Vom Kern gehen sternförmig F-Aktinfilamente aus, die einzelne Podosomen miteinander verbinden (Trotter, 1981; Evans *et al.*, 2003). Im Ring findet man hauptsächlich Proteine, die auch in fokalen Adhäsionen und anderen Zell-Matrix-Kontakten vorhanden sind wie z. B. Talin (Marchisio *et al.*, 1987; Zamboni-Zallone *et al.*, 1989; Duong und Rodan, 2000), Vinculin (Tarone *et al.*, 1985; Zamboni-Zallone *et al.*, 1989), Paxillin (Duong und Rodan, 2000; Pfaff und Jurdic, 2001) sowie PI3K (Lakkakorpi, 1997; Chellaiah *et al.*, 2001) und Src (Gavazzi *et al.*, 1989). Ring und Kern scheinen durch Proteine wie  $\alpha$ -Aktinin miteinander verbunden zu sein, die Verankerung am Substrat erfolgt durch Integrine, wobei im Ring hauptsächlich Integrine vom Isotyp  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 und im Kern  $\beta$ 1 zu finden sind.

### 1.2.2.2. Funktion von Podosomen

Die Funktion der Podosomen ist noch nicht vollständig geklärt, wenngleich eine Rolle in der Adhäsion und Migration sehr wahrscheinlich ist, da Podosomen nicht nur reich an Integrinen sind (Linder und Aepfelbacher, 2003), sondern auch in engem Kontakt zum Substrat stehen, wie durch TIRF-Mikroskopie gezeigt wurde (Linder und Kopp, 2005). Zudem werden sie ausschließlich auf der ventralen Seite der Zellen gebildet und sind in migrierenden Makrophagen auf das Vorderende beschränkt. Humane Makrophagen ohne funktionelle Version des Podosomenregulator WASP (Badolato *et al.*, 1998; Zicha *et al.*, 1998; Linder *et al.*, 1999) und Maus-Osteoklasten ohne funktionelles Gelsolin (Marchisio *et al.*, 1987; Chellaiah *et al.*, 2000; Chellaiah *et al.*, 2001) wiesen Polarisierungs- bzw. Chemotaxis- und Motilitätsdefekte auf. Dies, sowie die Beobachtung, dass nur unreife, d.h. migratorische, aber nicht reife ruhende dendritische Zellen Podosomen enthalten (Burns *et al.*, 2001), spricht für eine Beteiligung an der Migration.

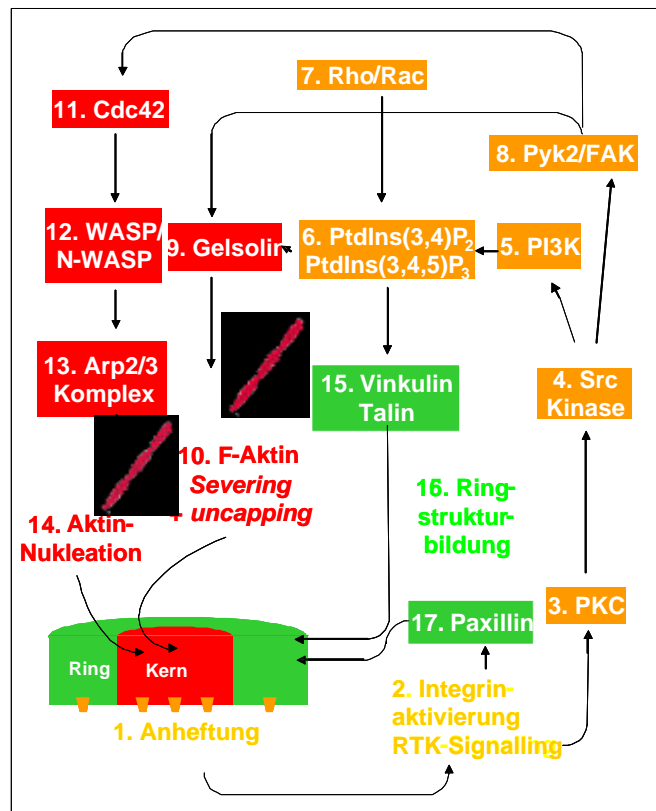
Da Podosomen typischerweise in Zellen zu finden sind, die Gewebescheiden überwinden müssen, wird ihnen auch eine Funktion in der Zellinvasion zugeschrieben. Dafür spricht vor allem das Vorhandensein von Matrix-Metalloproteinasen wie MT-1-MMP und MMP-9 in den Podosomen (Sato *et al.*, 1997; Delaissé *et al.*, 2000) und die Tatsache, dass Podosomen den Abbau extrazellulärer Matrix vermitteln können. Unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Matrixproteine konnte gezeigt werden, dass Podosomen mit den Bereichen des Abbaus kolokalisieren und im Substrat Löcher hinterlassen, die in Form und Größe den Podosomen entsprechen (Mizutani *et al.*, 2002; Burgstaller und Gimona, 2005; Osiak *et al.*, 2005). Expression des dominant-negativen Podosomenregulators N-WASP führt in src-transfizierten Fibroblasten nicht nur dazu, dass keine Invadopodien mehr gebildet werden, sondern auch, dass in diesen Zellen auch kein Matrixabbau mehr stattfindet.

### 1.2.2.3. Die Regulation von Podosomen

Podosomen sind hochdynamische Strukturen mit einer Halbwertszeit von 2-12 min (Chen, 1989; Destaing *et al.*, 2003). Sie sind zueinander in gleichmäßigen Abständen in Gruppen lokalisiert. Einzelne Podosomen bewegen sich relativ zum Substrat kaum, jedoch vollzieht sich die Bewegung einer Gruppe durch Auflösung der Podosomen am hinteren Rand der Gruppe und Neubildung an der Front. Innerhalb eines Podosoms findet ein permanenter Aktinumsatz statt, der 2-3 mal schneller ist als die Halbwertszeit eines Podosoms, was auf eine hohe interne Dynamik hinweist (Destaing *et al.*, 2003).

Der Kern scheint für die Podosomenstabilität eine zentrale Rolle zu spielen, da Depolymerisierung von F-Aktin durch Agentien wie Latrunculin oder Cytochalasine die Podosomen vollständig zerstört werden (Lehto *et al.*, 1982; Linder *et al.*, 2000a; Destaing *et al.*, 2003). Wie bereits beschrieben, findet man alle nötigen Proteine für Aktinpolymerisation wie Cdc42, Arp2/3-Komplex und WASP im Podosomenkern. Entfernung einer dieser Faktoren, wie WASP in WAS-Patienten oder Arp2/3-Komplex durch Injektion eines Arp2/3-bindenden Peptides führt zur Auflösung der Podosomen (Linder *et al.*,

2000a; Jones *et al.*, 2002). Ein neues Modell für Podosomenbildung postuliert eine Aktinpolymerisierung an der Basis der Podosomen und Depolymerisierung im gesamten Kern (Destaing *et al.*, 2003), auch durch die Aktivität eines Aktinfilament-schneidenden Proteins wie Gelsolin. Gelsolin-defiziente Mäuse entwickeln keine Podosomen, was auf eine Rolle dieses Proteins im Aktinumsatz der Podosomen schließen lässt (Chellaiah *et al.*, 2000).



**Abb. 1-4. Vereinfachtes Modell für die Podosomenregulation**

Das Schlüsselsignal für die Bildung von Podosomen ist die Anheftung der Zelle an das Substrat (1). Diese führt zur Gruppierung und Aktivierung von Integrinen und Signalweiterleitung durch Rezeptor Tyrosin-Kinasen (RTK, 2) zu PKC (Protein Kinase C, 3) und weiter zu Src Kinasen (4). Diese führt zur Aktivierung von PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase, 5), die zur Bildung von Phosphatidylinositolen PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (6) führt. Diese wird zudem von den RhoGTPasen Rho und Rac (7) beeinflusst. Außerdem wird die Fokale Adhäsions-Kinase (FAK, 8) bzw. deren hämatopoietisches Homolog Pyk2 aktiviert, die wiederum das Aktin-schneidende Protein Gelsolin (9) aktivieren und somit den Aktinumsatz (10) beeinflussen. Cdc42 (11) ist nötig für die Nukleation der Aktinfilamentbildung, indem es die Autoinhibition von WASP/N-WASP (12) aufhebt. WASP/N-WASP kann so den Arp2/3-Komplex (13) aktivieren. Es ist bislang unbekannt, wie Kern- und Ringstrukturbildung koordiniert werden. Zentrale Komponenten der Ringstruktur (16) wie Vinkulin und Talin (15) werden auch durch Phosphoinositide (6) reguliert. Paxillin (17) kann durch Integrin-Signaling (2) aktiviert werden. (Linder und Kopp, 2005)

In diesem Zusammenhang ist auch die Beteiligung der kleinen GTPasen der Rho-Familie zu sehen. Sowohl RhoA, Rac1 als auch Cdc42 sind in verschiedenen Zelltypen für den Podosomenumsatz nötig. Mikroinjektion konstitutiv aktiver und inaktiver Mutanten von Cdc42 führt zu einer verminderten Podosomenbildung in humanen Makrophagen (Linder

*et al.*, 1999) und dendritischen Zellen (Burns *et al.*, 2001). Transfektion von konstitutiv aktivem Cdc42 hat in HeLa, Rattenleukämiezellen und Aorta-Endothelzellen die Bildung von Podosomen zur Folge (Dutartre, 1996; Castellano *et al.*, 2001a; Castellano *et al.*, 2001b; Moreau *et al.*, 2003b). Konstitutiv aktives Rac1 zerstört in Huhn-Osteoklasten Podosomen (Ory *et al.*, 2002), in menschlichen Dendritischen Zellen jedoch nicht (Burns *et al.*, 2001), während Transfektion von dominant-negativem Rac1 in beiden Zelltypen zur Auflösung der Podosomen führt. (West *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2001; Ory *et al.*, 2002). Eine Hemmung von RhoA in menschlichen und murinen dendritischen Zellen (West *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2001) und in Maus-Osteoklasten-ähnlichen Zellen (Zhang *et al.*, 1995) hat eine Zerstörung der Podosomen zur Folge, während konstitutiv aktives RhoA eine vermehrte Podosomenbildung in Osteoklasten verursacht (Symons und Settleman, 2000), aber in Osteoklasten-ähnlichen Zellen zur Auflösung der Podosomen führt (Ory *et al.*, 2002). Zudem konnte aktives RhoA in Invadopodien nachgewiesen werden (Berdeaux *et al.*, 2004). Diese Daten sprechen dafür, dass Podosomen durch ein fein abgestimmtes Zusammenspiel der Aktivität und des GDP-GTP-Zyklus mehrerer Rho-GTPasen reguliert werden. Widersprüchliche Ergebnisse in verschiedenen Zelltypen könnten einerseits auf unterschiedliche Überexpressionslevel oder auch auf generelle Unterschiede in den Zelltypen zurückzuführen sein (Linder und Aepfelbacher, 2003).

Podosomen wurden erstmals in Fibroblasten entdeckt, die mit der onkogenen Protein-tyrosinkinase v-src transfiziert wurden (Tarone *et al.*, 1985; Marchisio *et al.*, 1987), was auf eine zentrale Rolle dieses Moleküls hinweist. Die Phosphotyrosinkinasen c-Src und Csk konnten in Podosomen nachgewiesen werden, zudem enthalten Podosomen einen hohen Anteil an phosphorylierten Tyrosinresten (Tarone *et al.*, 1985; Gavazzi *et al.*, 1989; Howell und Cooper, 1994; Burns *et al.*, 2001; Gimona *et al.*, 2003). Umgekehrt führt die Hemmung von Tyrosinkinasen in Makrophagen und Osteoklasten zu einer Zerstörung der Podosomen (Tanaka *et al.*, 1995; Linder *et al.*, 2000a), während eine Inhibition von Tyrosinphosphatasen eine verstärkte Podosomenbildung nach sich zieht (Marchisio *et al.*, 1988; Cory *et al.*, 2002). Auch spielen die Substrate von Src eine zentrale Rolle in der Podosomenbildung. (Lakkakorpi *et al.*, 1999). Eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung der Src-Substrate Pyk2 (Prolin-reiche Tyrosin Kinase 2) und p130Cas und eines Teils von Paxilin konnte nach Aktivierung des Integrins  $\alpha V\beta 3$  in Osteoklasten-ähnlichen Zellen beobachtet werden (Chellaiah und Hruska, 1996; Chellaiah *et al.*, 1998). Alle diese Proteine sind im Podosomenring zu finden (Gavazzi *et al.*, 1989; Lakkakorpi *et al.*, 1999; Duong und Rodan, 2000; Chellaiah *et al.*, 2001; Pfaff und Jurdic, 2001) und interagieren teilweise auch miteinander (Chellaiah *et al.*, 2001; Pfaff und Jurdic, 2001) und außerdem mit Gelsolin (Chellaiah und Hruska, 1996; Chellaiah *et al.*, 1998). Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich nach Integrinaktivierung ein Komplex aus c-Src, PI3K, p130Cas, Gelsolin, Pyk2 und Paxillin ausbildet. Eine Verbindung des Aktinzytoskeletts an den Integrinkomplex könnte wahrscheinlich über Paxillin gebildet werden, (Schaller, 2001) da dieses Protein sowohl an Integrin, Bestandteile des c-Src-Komplexes und Vinkulin binden kann (Turner, 2000). Vinkulin hingegen kann wiederum an die aktinbindenden Proteine Talin und  $\alpha$ -Aktinin?binden (Zamir und Geiger, 2001). Im

Podosomenkern scheint WASP ein zentrales Molekül für die Weiterleitung von Phosphotyrosinsignalen zu sein, da an seine Polyprolinomäne mehrere Src-Tyrosinkinase binden können (Banin *et al.*, 1996). Für den Podosomenturnover sind zudem auch Tyrosinphosphatasen wie Shp-2 oder PTP-PEST nötig (Chellaiah *et al.*, 2001). Ein weiterer Regulationsmechanismus stellt die Interaktion mit Mikrotubuli dar: in Osteoklasten wird der Podosomenring durch Mikrotubuli stabilisiert (Babb *et al.*, 1997). Die Bildung von Podosomen (Linder *et al.*, 2000a) sowie die Teilungs- und Fusionsrate von Podosomen sind abhängig von Mikrotubuli (Evans *et al.*, 2003).

### 1.2.3. Mikrotubuli

#### 1.2.3.1 Struktur und Funktion des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Mikrotubuli sind langgestreckte Polymere, die innerhalb der Zelle ein Filamentsystem bilden, welches für die Anordnung der Zellorganellen und als Transportwege für die Beförderung von Fracht wie Vesikel, mRNA und Chromosomen durch molekulare Motoren nötig ist.

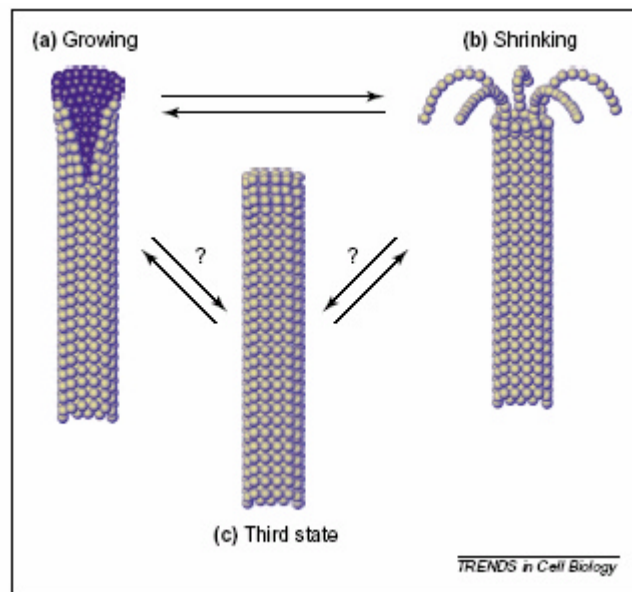
Mikrotubuli sind aus Tubulin aufgebaut, einem stabilen Dimer aus  $\alpha$  und  $\beta$ -Untereinheiten. Die einzelnen Tubulinmoleküle liegen in Ketten, den sog. Protofilamenten vor, von denen jeweils 13 eine Röhre mit einem Durchmesser von ca. 18 bis 25 nm ausbilden. Mikrotubuli besitzen eine Polarität: das schnell wachsende Plusende wächst ca. dreimal schneller als das Minusende (Hyams und Lloyd, 1993). In den meisten Zelltypen zeigt das Plusende in Richtung der Zellperipherie, während das Minusende durch das Mikrotubuliorganisierende Zentrum MTOC am Zentrosom (*Microtubule-organizing-center*) im Zellzentrum stabilisiert wird (Bergen und Borisy, 1980.)

Mikrotubuli sind jedoch keineswegs statische permanente Strukturen, sondern einem ständigem Wechsel aus Wachstum und Schrumpfung unterworfen, der als Dynamische Instabilität bezeichnet wird (Mitchison und Kirschner, 1984). Diese Prozesse sind von zentraler Bedeutung für die räumliche Verteilung der Mikrotubuli und ihre Funktion als Transportwege, da sie dadurch ständig in andere Zellbereiche vordringen können (Holy und Leibler, 1994). Beide Untereinheiten können Guaninosin-Nukleotide binden. Guanosin-triphosphat (GTP) bindet jedoch nur an die  $\beta$ -Untereinheiten und wird während der Tubulinpolymerisierung zu Guanosindiphosphat (GDP) hydrolysiert. Dem jeweils gebundenen Guanosinnukleotid kommt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Stabilität der Mikrotubuli zu. Nur mit gebundenem GTP ist eine Assemblierung möglich. *In vitro* wachsen einzelne Mikrotubuli in Gegenwart von Tubulin und GTP einige Mikrometer und schrumpfen plötzlich. Dieser spontane Übergang wird „Katastrophe“ genannt und wird *in vivo* von weiteren Proteinen reguliert.

Tubulindimere mit GTP weisen eine hohe Affinität für Mikrotubuli-Enden auf und dissoziieren nur langsam, während hingegen Tubulindimere mit gebundenem GDP eine niedrige Affinität zeigen und sich schnell ablösen (Mitchison und Kirschner, 1984). Durch eine zeitliche Verzögerung zwischen Polymerisierung und GTP-Hydrolyse könnte eine

Kappe aus GTP-Tubulin entstehen, die das Ende der Mikrotubuli stabilisiert, jedoch fehlen für eine solche GTP-Kappe noch eindeutige Hinweise.

Cryo-Elektronenmikroskopische Aufnahmen wachsender und schrumpfender Mikrotubuli lieferten Daten zu strukturellen Veränderungen innerhalb der Mikrotubuli (Chretien *et al.*, 1996). Bei Depolymerisierung biegen sich diese Protofilamente nach außen. Es konnten in Gegenwart von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen oder bestimmten divalenten Kationen sogar stabile GDP-Tubulin-Ringe beobachtet werden (Kirschner *et al.*, 1974)



#### Abb. 1-5 Die dynamische Instabilität der Mikrotubuli

Schematische Abbildung der strukturellen Änderungen an Mikrotubuli-Enden während der dynamischen Instabilität. (a) Die Plusenden wachsender Mikrotubuli werden durch ein offenes Blatt aus Protofilamenten stabilisiert, zudem enthalten die Tubulindimere GTP an den  $\beta$ -Untereinheiten. (b) Schrumpfende Mikrotubuli haben keine GTP-Kappe mehr, woraufhin sich die Protofilamente nach außen abblättern. (c) Als dritter Zustand wird eine geschlossene Röhre postuliert, die einen Übergangszustand zwischen wachsenden und schrumpfenden Mikrotubuli darstellt. (Carvalho *et al.*, 2003)

Neuere Daten konnten einen Zusammenhang zwischen einer destabilisierenden GTP-Hydrolyse und dem Biegen der Protofilamente herstellen (Wang und Nogales, 2005). Das GDP-Protofilament ist sowohl an den Inter- und als auch den Intradimer-Kontakten gebogen, was zu einer nach außen gebogenen Konformation führen würde, wenn diesem innerhalb des Polymers nicht der Kontakt mit benachbarten Protofilamenten gegenüber stünde. Die Energie der GTP-Hydrolyse ist somit im Protofilament gespeichert und macht die Depolymerisierung auch unter hohen Konzentrationen von GTP-Tubulin zu einer energetisch günstigen Reaktion

#### 1.2.3.2. Mikrotubuli-assoziierte Proteine (*microtubule-associated proteins*, MAPs)

Spezielle akzessorische Proteine beeinflussen die Stabilität und Dynamik der Mikrotubuli, indem sie Tubulindimere binden, Polymere stabilisieren oder destabilisieren oder an Mikrotubuli-Enden binden. Die meisten stabilisierenden MAPs binden entlang der ge-

samten Länge, wie z.B. die Proteine der tau-Familie (= *tubulin-associated protein*). Sie sind stäbchenförmige Moleküle, die schnurrhaarartig von Mikrotubuli abstehen und das Wachstum von Mikrotubuli um den Faktor 3 erhöhen. Sie werden über Phosphorylierung durch MARKs (*MAP affinity-regulating kinases*) und durch das Protein Mapmodulin reguliert. Letzteres konkurriert mit den MAPs um die Bindungsstellen, wodurch der Weg für molekulare Motoren wie Dyneine oder Kinesine (siehe 1.3) freigemacht werden könnte (Ulitzur *et al.*, 1997).

Zu den destabilisierenden MAPs zählt Op18/Stathmin, welches Tubulindimere bindet und die dynamische Instabilität erhöht (Melhem *et al.*, 1991; Belmont und Mitchison, 1996). Weitere destabilisierende MAPs sind Katanin und Spastin aus der Familie der AAA-ATPasen (*ATPasen Associated with various cellular Activities*, (Neuwald *et al.*, 1999)), welche aktiv unter ATP-Verbrauch Mikrotubuli schneiden und somit zusätzliche Enden schaffen, die depolymerisieren können (McNally und Vale, 1993; Karabay *et al.*, 2004). Neuere Studien zu diesen beiden Enzymen zeigten einen weiteren Mechanismus namens *cut-and-run* für die Dynamik der Mikrotubuliorganisation: Katanin und Spastin schneiden die Mikrotubuli in kurze Stücke, die durch Dynein oder einen Tretmühlenmechanismus durch die Zelle transportiert werden und dort elongieren (Baas *et al.*, 2005).

Eine weitere Gruppe MT-assoziiierter Proteine bilden die sog. +TIPS (*Plus-end tracking proteins*), die die Fähigkeit haben, an wachsende Mikrotubuli-Enden zu binden. Welche Funktion sie in der Zelle ausüben, wird jedoch noch kontrovers diskutiert. Denkbar wären eine Beeinflussung der Mikrotubuli-Dynamik, eine Rolle im Proteintransport oder *search-capture* (Vaughan, 2004). Das +TIP APC (*Adenomatous polyposis coli*) (Grodin *et al.*, 1991) zum Beispiel spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von  $\beta$ -Catenin (Polakis, 1997). APC scheint entlang der Mikrotubuli von Kinesinen zu den Plusenden transportiert zu werden (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000; Jimbo *et al.*, 2002) Allerdings interagiert APC auch mit Mikrotubuli zusammen mit EB1 (*End-binding*) (Askham *et al.*, 2000), einem weiteren +TIP, das ursprünglich als APC-interagierendes Protein identifiziert wurde (Su *et al.*, 1995). Von EB1 ist bekannt, dass es das Mikrotubuli-Wachstum in Hefe und *Xenopus* fördert, durch RNAi-*knock-down* von EB1 konnte eine Beteiligung an der Ausbildung der Mitosespindel gezeigt werden (Tirnauer *et al.*, 1999; Ligon *et al.*, 2003). Für das +TIP CLIP-170 (*Cytoplasmic linker protein*) hingegen konnte eine Rolle in der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik nachgewiesen werden, da dominant negatives CLIP-170 zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli führt (Komarova *et al.*, 2002).

Ungeklärt ist bisher die Frage, warum +TIPS spezifisch nur an Plusenden akkumulieren. Strukturelle Besonderheiten der Plusenden wie z. B. die GTP-Kappe oder andere Eigenschaften der Protofilamente wurden vorgeschlagen, jedoch sind +TIPS bei Überexpression in der Lage, überall entlang der Mikrotubuli zu binden und diese zu bündeln (Perez *et al.*, 1999). Eventuell spielt eine Regulation über Phosphorylierung durch eine bislang unbekannt Kinase bei der spezifischen Bindung der Plusenden eine Rolle (Morrison *et al.*, 1997; Askham *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2002).

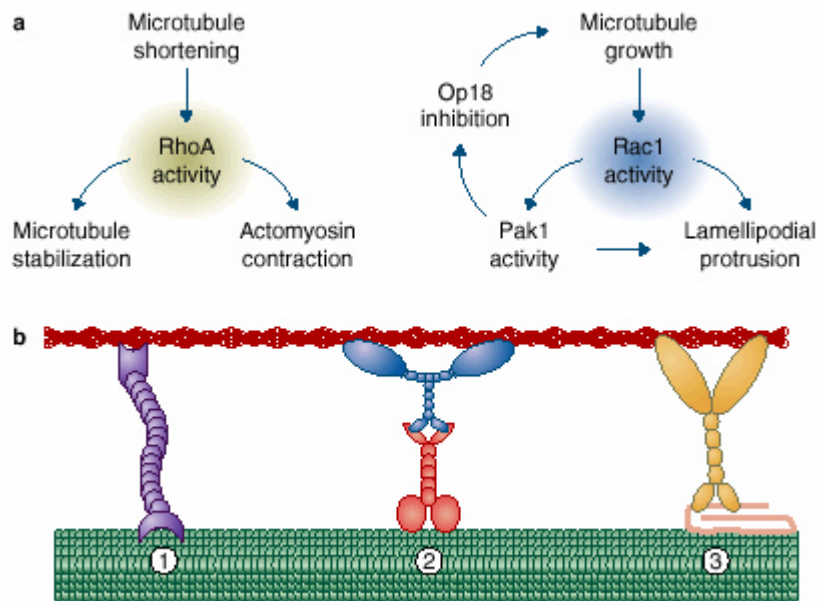
#### 1.2.4. Interaktionen zwischen Aktin und Mikrotubuli

Bei Untersuchungen des Zytoskeletts wurde in den letzten Jahren immer wieder deutlich, dass bei Manipulation eines Aktinnetzwerkes oft auch das Mikrotubuli-Zytoskelett verändert wurde. Zudem werden immer mehr Proteine entdeckt, die beide miteinander in Struktur und Funktion verbinden (Fuchs und Yang, 1999). In niederen und höheren Eukaryoten gibt es einige Vorgänge, die sowohl von Aktinfilamenten als auch von Mikrotubuli abhängig sind. Hierzu zählen die Positionierung des Kerns, Ausrichtung der Mitosespindel und der Übergang des Vesikeltransportes zwischen Aktin und Mikrotubuli-Transportwegen.

Es können zwei Arten von Interaktionen unterschieden werden: regulatorische und strukturelle Wechselwirkungen. Strukturelle Interaktionen sind diejenigen Wechselwirkungen, bei denen Aktin und Mikrotubuli miteinander verbunden sind. Hierbei können wiederum zwei Arten unterschieden werden: erstens statische Interaktionen, bei denen beiden Polymere durch einzelne oder Komplexe aus Mikrotubuli- und Aktinbindenden Proteinen verbunden sind und zweitens dynamische Interaktionen, bei denen eine Bewegung zwischen den beiden Zytoskelettsystemen möglich ist. Letztere könnte durch Mikrotubuli- oder Aktinbasierte Motoren bewerkstelligt werden (Rodriguez *et al.*, 2003).

Bei den regulatorischen beeinflussen sich beide Systeme indirekt über die jeweiligen Effekte auf Signalwege. Am besten untersucht ist hier die Rho-Familie der kleinen GTPasen, die sowohl Mikrotubuli als auch Aktin kontrollieren. RhoA-Aktivierung führt nicht nur zur Bildung von Stressfasern (Etienne-Manneville und Hall, 2002), sondern auch zur Stabilisierung von Mikrotubuli (Cook *et al.*, 1998). Dies geschieht über die RhoA-Effektoren Rho-Kinase, die die Kontraktilität durch Phosphorylierung der regulatorischen Leichten Myosinkette (Ridley, 2001) erhöht und dem Formin mDia, welches nicht nur zur Bündelung von Aktinfasern (Pruyne, 2002; Sagot *et al.*, 2002), sondern auch zur Stabilisierung von Mikrotubuli beiträgt (Palazzo *et al.*, 2002). Eine mögliche Erklärung bietet das sog. „Tensegrity Model“, in dem durch das Aktomyosinsystem eine Zugbelastung generiert wird, die gegen steife Mikrotubuli-„Seile“ wirkt (Ingber, 2003a; Ingber, 2003b). Auch Rac1 reguliert bei der Lamellipodienentstehung sowohl Aktin als auch Mikrotubuli: über Scar/WAVE-Proteine wird die Aktinpolymerisation über den Arp2/3-Komplex gesteuert, Rac1-Effektoren wie Pak-Kinasen beeinflussen die Mikrotubuli-Stabilität eventuell durch Regulation des Mikrotubuli-destabilisierenden Proteins Op18/Stathmin (Daub *et al.*, 2001; Wittmann *et al.*, 2003). Die Aktivität der Rho-GTPasen wird andersherum auch durch Aktin und Mikrotubuli reguliert: Depolymerisierung der beiden Zytoskelettsysteme führen zu einer Aktivierung von RhoA, im Falle der Mikrotubuli eventuell durch die Freisetzung des an die Mikrotubuli gebundenen Rho-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide-exchange factor*, GEF) GEF-H1 (Krendel *et al.*, 2002).



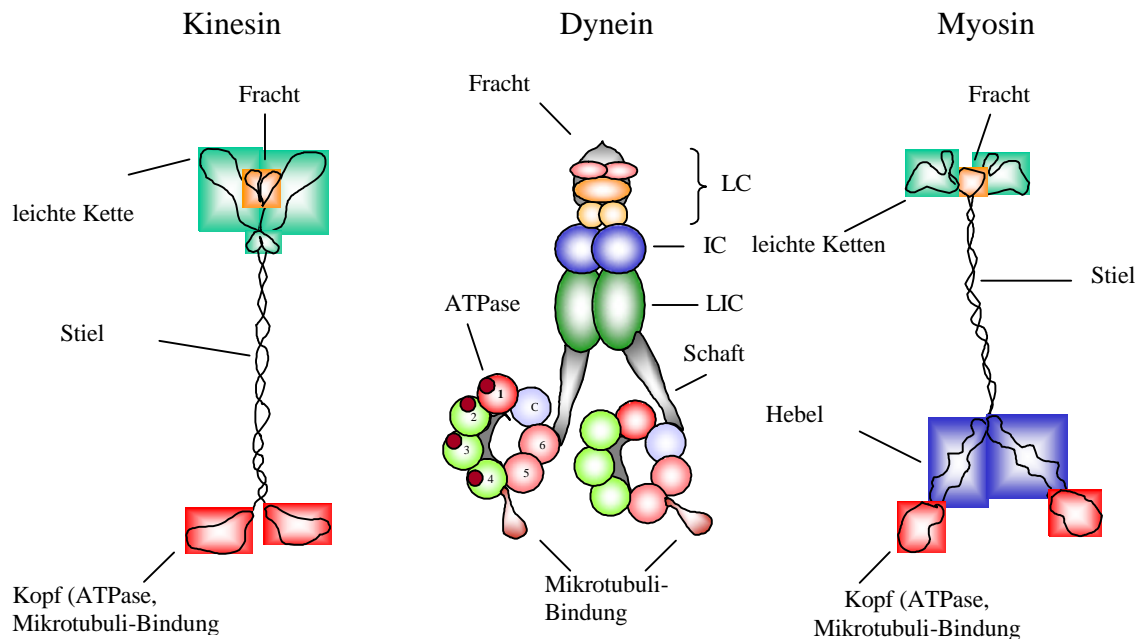


**Abb. 1-6: Regulatorische und strukturelle Interaktionen zwischen Mikrotubuli und Aktin.**

(a) RhoGTPasen und Zytoskelett-Filamente können sich gegenseitig regulieren. Mikrotubuli-Disassemblierung stimuliert RhoA-Aktivität (**links**). Rho stabilisiert Mikrotubuli durch das Formin mDia und führt zu Aktomyosin-Kontraktion durch Stimulation der Rho-Kinase, die die leichte Kette von Myosin phosphoryliert. Mikrotubuli-Wachstum stimuliert Rac1-Aktivität (**rechts**), was zu Aktinpolymerisierung und Lamellipodienprotrusion führt. Aktivierung des Pak1-Op18-Signalweges in einer positiven Rückkopplung hat weiteres Mikrotubuli-Wachstum zur Folge. (b) Aktin (rot) und Mikrotubuli (grün) können statische oder dynamische Interaktionen ausbilden. **1** zeigt ein Protein, das sowohl Aktin- als auch Mikrotubuli-Bindestellen aufweist und als statische Quervernetzung fungieren könnte. **2** zeigt einen Komplex zwischen einem Aktin-basierten Motor (blau) und einem Mikrotubuli-basierten Motor (hellrosa), während **3** einen Komplex zwischen einem Motor (gelb) und einem Bindeprotein (rosa) zeigt. Die beiden letztgenannten Typen von Interaktionen könnten Aktin und Mikrotubuli relativ gegen einander bewegen. (Rodriguez *et al.*, 2003)

### 1.3. Molekulare Motoren: Dyneine, Kinesine, Myosine

Molekulare Motoren sind Enzyme, die chemische Energie in Form von ATP in mechanische Arbeit umsetzen. Hierzu zählen rotatorische Motoren wie die  $F_1/V_1/A_1$ -ATPasen oder der bakterielle Flagellenmotor als auch lineare Motoren, die sich entlang von Zytoskelett-Polymeren bewegen. Es gibt drei Arten von linearen Motoren: Myosin bewegt sich entlang von Aktin-Filamenten, während Dynein und Kinesin sich entlang von Mikrotubuli bewegen, wobei Dyneine ihre Fracht in Richtung der Minusenden und die meisten Kinesine in Richtung der Plusenden der Mikrotubuli transportieren (Vale und Milligan, 2000). In allen drei Klassen führt die Hydrolyse von ATP zu einer Konformationsänderung der globulären Kopfdomäne, die mit Hilfe von zusätzlichen Domänen verstärkt und in Bewegung umgesetzt wird (Schliwa und Woehlke, 2003). Kinesine und Myosine zeigen zwar kaum Sequenzidentität, auf struktureller Ebene jedoch sind beide Motorklassen überraschend ähnlich (Kull *et al.*, 1996). Dies wird besonders an der Nukleotidbindestelle deutlich, die aus drei *loops* besteht, die *P-loop*, *switch I* und *switch II* genannt werden. *P-loop* bindet das Nukleotid, während *switch I* und *II* das  $\gamma$ -Phosphat flankieren und je nach gebundenem Nukleotid eine Konformationsänderung erfahren (Woehlke, 2001).



**Abb 1-7 Repräsentative Darstellung der Zytoskelettmotoren Kinesin und Dynein**

Überblick über die molekularen Motoren **Kinesin-1/KIF5** (links), zytoplasmatisches **Dynein** (Mitte) und **Myosin V** (rechts). **KIF5** ist aus einer schweren Kette mit einer globulären Kopfdomäne (rot) mit Mikrotubuli-Bindungsstelle und ATPase-Aktivität und einem *coiled-coil*-Stiel (schwarze Linien) aufgebaut. Über die leichten Ketten (grün) erfolgt die Bindung der Fracht (orange). **Dynein** (rechts) besteht aus einem Motorkopf, der aus einem Ring aus 6 AAA-Domänen (Kreise 1-6) besteht, C ist keine AAA-Domäne. ATP (dunkelroter Kreis) bindet an AAA1 und möglicherweise auch an AAA2-4. Der Schaft (grau) verbindet die mittelleichten Ketten (LIC, grün) und die Domänen AAA1-4. Die Mikrotubuli-Bindung erfolgt über Stiele (violett) zwischen den Domänen AAA4 und 5, die Bindung der Fracht (hellgrau) über verschiedene mittelschwere (IC, blau) und leichte Ketten (gelb, orange, rosa). Bei **Myosin V** erfolgen die Mikrotubuli-Bindung sowie die ATP-Hydrolyse am globulären Kopf (rot), die Konformationsänderung wird über einen Hebel (blau) verstärkt. Die leichten Ketten (grün) sind über einen *coiled-coil*-Stiel gebunden. Die Bindung der Fracht (orange) erfolgt über die leichten Ketten. Aus (Mallik und Gross, 2004).

### 1.3.1. Dyneine

Dyneine sind sehr große Moleküle aus der AAA-Familie der ATPasen mit einer molekularen Masse von 1000-2000 kDa. Es werden zwei Gruppen unterschieden: zytoplasmatisches und axonemales Dynein. Zytoplasmatisches Dynein transportiert Organellen in Richtung der Minusenden der Mikrotubuli (Vallee und Sheetz, 1996), wurde aber auch in Mitosevorgängen nachgewiesen (Pfarr *et al.*, 1990; Steuer *et al.*, 1990; Echeverri *et al.*, 1996; Busson *et al.*, 1998; Gönczy *et al.*, 1999) und ist für die Lokalisation des Golgi-Apparates verantwortlich (Harada *et al.*, 1998)

Axonemales Dynein ist für die ATP-getriebene Bewegung von Flagellen und Zilien verantwortlich (Gibbons und Rowe, 1965). Zytoplasmatisches und axonemales Dynein sind strukturell und biochemisch sehr ähnlich, sie unterscheiden sich jedoch hauptsächlich in ihrer Zusammensetzung aus vier Arten von Untereinheiten: (schwere, mittelschwere, mittelleichte und leichte Ketten (Paschal und Vallee, 1987; Lye *et al.*, 1997): Ein bis drei schwere Ketten (*heavy chains*, HC) mit ca 550 kD bilden die funktionelle Motoreinheit mit

ATPase-Aktivität (Mikami *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Vallee und Sheetz, 1996) und enthalten die Mikrotubuli-Bindestelle (Gee *et al.*, 1997; Steffen *et al.*, 1997) Den drei bis vier mittelschweren Ketten (ca 74 kD, *intermediate chains* IC) kommt bei zytoplasmatischen Dyneinen eine Funktion in der Interaktion mit einem zweiten Komplex namens Dynactin zu. Dieser verbindet Dynein mit verschiedenen Organellen und könnte als „Dyneinrezeptor“ fungieren (Vaughan und Vallee, 1995; Echeverri *et al.*, 1996; Steffen *et al.*, 1997). Dynein-Dynactin-Wechselwirkung wird durch Interaktion der mittelschweren Dynein-Kette mit der p150<sup>Glued</sup>-Untereinheit des Dynactinkomplexes gewährleistet (Karki und Holzbaur, 1995; Vaughan und Vallee, 1995; Echeverri *et al.*, 1996). Vier mittelleichte Ketten (ca. 55 kD, *light intermediate chains*, LIC) sind auf zytoplasmatisches Dynein beschränkt. Sie enthalten ein ATP-bindendes Motiv mit unbekannter Funktion (Hughes *et al.*, 1995). Weiterhin umfasst Dynein mehrere kleine leichte Ketten (8-22 kD, *light chains*, LC), die eventuell eine Rolle im subzellulären Targeting spielen könnten (Tai *et al.*, 1999). Axonemales Dynein weist im Bereich der mittelschweren und leichten Ketten eine sehr hohe Komplexität auf mit Untereinheiten mit molekularen Massen von 60-120 kDa (mittelschwere) und 10-20 kDa (leichte Ketten, (Piperno und Luck, 1979; Pfister *et al.*, 1982; Tang *et al.*, 1982). Der 70 kDa-Untereinheit wird eine Funktion in der Bindung des äußeren Dyneins am axonemalen A-Subfaser-Mikrotubulus zugeschrieben (King und Witman, 1990).

Die Aufklärung des Bewegungsmechanismus hinkt weit hinter der von Kinesin oder Myosin hinterher (Cross, 2004a). Es wird vermutet, dass die Freisetzung von ADP an den Ruderschlag gekoppelt ist (Johnson, 1985). Kürzlich konnte mit elektronenmikroskopischen Studien des flagellaren Dynein C gezeigt werden, dass während des Überganges zwischen dem ADP/P<sub>i</sub>-Dynein-Zustand und der Freisetzung der Hydrolyse-Produkte eine Konformationsänderung erfolgt, die zu einer Verdichtung des AAA-Domänenringes führt und möglicherweise so den Ruderschlag des Mikrotubuli-bindenden Stieles verursacht (Burgess *et al.*, 2003).

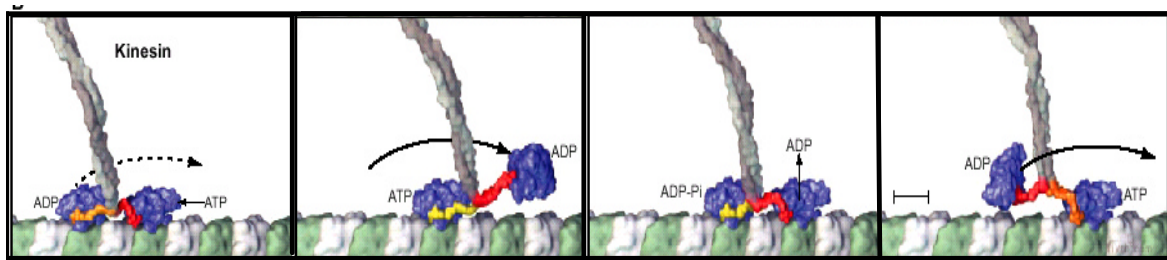
### 1.3.2. Kinesine

Die meisten **Kinesine** bilden Homodimere aus und binden über ihre Stiel- und Schwanzregion akzessorische leichte Ketten, denen eine Funktion in der Regulation und/oder Cargobindung zugeschrieben wurde (Pfister *et al.*, 1989). Die Kinesinfamilie (KIF für *kinesin-like-family*) stellt bislang die erste Proteinfamilie in Säugetieren dar, die gänzlich identifiziert und sowohl *in silico* als auch *in vivo* bestätigt wurden. Sie umfasst 14 Familien mit 45 Mitgliedern in Maus, Mensch und Ratte (Miki *et al.*, 2005).

Kinesine besitzen einen globulären Kopf mit ca. 360 Aminosäuren, der nicht nur die katalytische Tasche für die ATP-Hydrolyse enthält, sondern auch die Mikrotubuli-Bindestelle (Hirokawa *et al.*, 1989; Aizawa *et al.*, 1992; Kikkawa *et al.*, 2001; Nitta *et al.*, 2004). Dahinter folgt eine stäbchenförmige Stiel- und Schwanzregion, die für Dimerisierung und Interaktion mit anderen Untereinheiten sowie die Cargobindung nötig sind (Kanai *et al.*, 2004). Zwischen Kopf und Stiel liegt der sogenannte Hals, der oftmals

für eine der 14 Kinesinfamilien spezifische Besonderheiten enthält und für die Direktionalität und Aktivitätsregulation verantwortlich ist, hier liegt auch die 12 Aminosäuren lange Halsverbindung (*neck-linker*), die beim katalytischen Zyklus eine Konformationsänderung erfährt (Endow und Waligora, 1998). Die Motordomäne ist zwischen allen Familien stark konserviert, wohingegen die Stiel- und Schwanzregionen hochdivergent sind (Miki *et al.*, 2001). Diese Variabilität spiegelt die unterschiedlichen zellulären Funktionen der Kinesine wider, die von Transport von Organellen, Proteinkomplexen, synaptischen Vesikeln und mRNAs bis zur Chromosomensegregation während der Mitose und Meiose reichen (Hirokawa, 1998; Vale, 1999; Sharp *et al.*, 2000; Friedl *et al.*, 2001). Die meisten Kinesine tragen die Motordomäne am N-Terminus, einige jedoch am C-Terminus. Diese Kinesine bewegen sich in Richtung der Mikrotubuli-Minusenden. Bei einigen Kinesinen sitzt die Motordomäne sogar in der Mitte des Moleküls. Diesen Kinesinen wird eine Mikrotubuli-destabilisierende Funktion zugeschrieben, für einige wurde allerdings auch eine Beteiligung am Vesikeltransport nachgewiesen (Noda *et al.*, 1995; Desai, 1999; Moores *et al.*, 2002; Ogawa *et al.*, 2004). Diese Mikrotubuli-destabilisierende Wirkung spielt eine wichtige Rolle in der Assemblierung der Mitosespindel und Chromosomen-Segregation. Ursprünglich als M-Typ-Kinesine bezeichnet wegen ihrer in der Mitte des Moleküls gelegenen Motordomäne, werden die Vertreter dieser Kinesine jetzt den Kinesin-Familien 13 und 8 zugerechnet. Sie binden Mikrotubuli mit einer sehr hohen Affinität für deren Enden, (Desai, 1999; Hunter *et al.*, 2003) jedoch bevorzugt an gebogene Protofilamente und beschleunigen so die Depolymerisierung der Mikrotubuli (Moores *et al.*, 2002).

Die meisten Kinesine liegen als Dimere vor und verfügen deshalb über zwei Köpfe, die abwechselnd an die Mikrotubuli binden. So kann ein Kinesinmolekül lange Wegstrecken zurücklegen, ohne sich vom Mikrotubulus abzulösen. Pro Schritt eines Kopfes wird ein Molekül ATP verbraucht und eine ca. 8 nm lange Wegstrecke zurückgelegt, was der Entfernung zwischen zwei benachbarten  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten entspricht. Im Modell von R. Vale und R. Milligan erfolgt die Konformationsänderung der Halsverbindung nach Bindung von ATP, wodurch sie aus einem ungeordneten Zustand in einen geordneten (*zippered*) übergeht und mit dem katalytischen Zentrum interagiert. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Motordomäne an den Mikrotubulus gebunden ist. Im Unterschied zu Myosin erfolgt demnach der Ruderschlag (*power stroke*) nicht nach Phosphatfreisetzung, sondern wie bei  $F_1$ -ATPasen nach Bindung des ATP. Durch die Wechselwirkung der Halsverbindung mit der Motordomäne wird der zweite Kopf in Richtung der Plusenden der Mikrotubuli gezogen, dort bindet er an das nächste  $\beta$ -Tubulin und setzt ADP frei. Der hintere Kopf hydrolysiert ATP, hat dadurch nun eine niedrige Affinität für Tubulin und löst sich vom Polymer ab. Der vordere Kopf kann jetzt ATP binden, wodurch eine hohe Affinität für Mikrotubuli resultiert und die Konformationsänderung der Halsverbindung erfolgt und somit ein neuer Zyklus beginnen kann (Vale und Milligan, 2000).



**Abb. 1-8. Modell für den mechanischen Mechanismus von konventionellem Kinesin.** Die Motordomäne ist blau dargestellt, die Halsverbindung rot bzw. orange/gelb, die *coiled-coil*-Domänen grau, die Tubulin-Untereinheiten grün ( $\beta$ -Untereinheit) und weiß ( $\alpha$ -Untereinheit). **Bild 1:** jede Motordomäne ist an das Mikrotubulus-Protofilament gebunden. ATP bindet an den vorderen Kopf. **Bild 2:** durch die ATP-Bindung wird die Halsverbindung des vorderen Kopfes an die Motordomäne angelagert und dadurch der hintere Kopf ca. 16 nm an die übernächste  $\beta$ -Untereinheit des Mikrotubulus nach vorne geschleudert. **Bild 3:** der nun vordere Kopf bindet an den Mikrotubulus, wodurch ein 8 nm-Schritt der gebundenen Fracht resultiert. Durch die Bindung an das Tubulin wird auch die Freisetzung des ADP erleichtert, währenddessen hydrolysiert der hintere Kopf ATP. **Bild 4:** Nach Dissoziation des ADP bindet ein neues Molekül ATP an den vorderen Kopf. Vom hinteren Kopf wird Phosphat freigesetzt, die Anlagerung der Halsverbindung aufgehoben und durch Bindung der Halsverbindung des vorderen Kopfes nach vorn geschleudert. (Vale und Milligan, 2000)

Dieser Mechanismus setzt eine Koordination zweier alternierender Köpfe voraus. Wie kann jedoch die Prozessivität, d.h. der Transport entlang der Mikrotubuli ohne Ablösung bei monomeren Motoren erklärt werden? Beispiele hierfür stellt die KIF1/Unc-104-Familie dar, deren Mitglieder KIF1A und KIF1B höchstwahrscheinlich als Monomere vorliegen. Der Name Unc104 leitet sich vom *C. elegans*-Kinesin Unc-104 her, da eine Mutation in diesem Gen in einer unkoordinierten und langsamen Bewegung des Wurmes resultiert. Unc-104 ist für den axonalen Transport synaptischer Vesikel nötig (Yonekawa *et al.*, 1998). Allen Mitgliedern dieser Kinesinfamilie ist die U104-Motor-Domäne gemeinsam (Ponting, 1995), die mit einer *Forkhead-associated*-Domäne überlappt. Die dahinter liegende Halsregion weist eine Sequenz auf, die nur eine geringe Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer *coiled-coil*-Struktur aufweist, so dass lange Zeit angenommen wurde, dass die Motoren dieser Familie als Monomere vorliegen und über eine positiv geladene Sequenz der Motordomäne, dem sogenannten *K-loop*, am negativ geladenen C-Terminus von Tubulin über elektrostatische Wechselwirkungen binden (Kikkawa *et al.*, 2000). So wurde eine diffusionsgesteuerte Bewegung der Kinesine mit Tendenz in Richtung der Plusenden vorgeschlagen: nach Hydrolyse von ATP löst sich der Motor mit dem gebundenen ADP vom Mikrotubulus ab, diffundiert entlang des Mikrotubulus und bindet erneut, wobei ADP freigesetzt wird (Okada *et al.*, 2003). Dabei rotiert der *K-loop* in der Motordomäne um  $20^\circ$  in Richtung des Mikrotubuli-Plusendes, so dass durch diesen Mechanismus eine Prozessivität erreicht wird (Kikkawa *et al.*, 2001). Für Unc-104 konnte jedoch nur eine Rotation von  $5^\circ$  beobachtet werden (Al-Bassam *et al.*, 2003). Zudem

wurde eine Anhäufung mehrerer Kinesine an einem transportierten Frachtvesikel vorgeschlagen, durch welche die hohe Geschwindigkeit von KIF1A erreicht werden könnte. Diese ist mit einem Wert von 1,3  $\mu\text{m/s}$  um den Faktor drei bis vier höher als die von konventionellem Kinesin (Tomishige *et al.*, 2002).

Für KIF1A wurde jedoch gezeigt, dass der Motor *in vivo* dimerisieren kann, wenngleich die Interaktion nur schwach ist. Der Anteil der dimerisierten Motoren erhöht sich bei einer Aufkonzentrierung der Motoren an Liposomen (Tomishige *et al.*, 2002). Die Dimerisierung scheint reguliert zu sein: Al-Bassam *et al* schlagen zwei Konformationen für Unc-104, dem *C.elegans*-Homolog von KIF1A vor: bei niedriger Motorkonzentration liegt Unc-104 als Monomer vor, dessen Halsregion über intramolekulare Bindungen in sich selbst zurückgefaltet ist. Bei höherer Konzentration geht die Halsregion in eine intermolekulare *coiled-coil*-Konformation über, die eine Dimerisierung zur Folge hat (Al-Bassam *et al.*, 2003).

Dynein und Kinesin konkurrieren um eine überlappende Bindestelle an den Mikrotubuli (Mizuno *et al.*, 2004), diese Bindestelle liegt im Zwischenraum innerhalb eines Dimers (Krebs *et al.*, 2004) auf der gleichen Seite der  $\beta$ -Tubulin-Untereinheit (Mizuno *et al.*, 2004). Im zellulären Kontext wird dieses Problem durch das „Kinesin-hat-Vorfahrt“-Modell erklärt: Kinesin bindet stärker an Tubulin als Dynein, bei einem Zusammentreffen weicht Dynein auf das benachbarte Protofilament aus. Kinesine bewegen sich hauptsächlich entlang eines oder zweier Protofilamente (Ray *et al.*, 1993; Cross, 2004b), während hingegen für Dyneine öfter größere seitliche Bewegungen beobachtet wurden (Vale und Toyoshima, 1988; Wang *et al.*, 1995)

### 1.3.3. Myosin

Die Myosine bilden eine große Familie von Motorproteinen, die durch die Hydrolyse von ATP in Gegenwart von filamentösem Aktin gerichtete Bewegung erzeugen können. Sie spielen eine Rolle in der Muskelkontraktion, Phagozytose, intrazellulärem Transport und Zytokinese (Mermall *et al.*, 1998). Die ATPase-Aktivität der Myosine wird erst durch die Interaktion mit filamentösem Aktin bis zum 100fachen erhöht.

Myosin ist in Vertebraten meist aus einem Paar schwerer Ketten mit einem Molekulargewicht von 300 kDa und zwei Paaren leichter Ketten (15-28 kDa) aufgebaut. Die allen Myosinen gemeinsame globuläre Motordomäne am N-Terminus der schweren Kette ist hochkonserviert und enthält sowohl die aktinbindende Region als auch die ATP-Bindungsstelle. Darauf folgt eine  $\alpha$ -helikale Halsregion, die auch als regulatorische Domäne bezeichnet wird. Sie besteht aus einer bis sechs 24-Aminosäuren-langen Isoleucin-Glutamin (IQ)-Motiven mit der Konsensussequenz IQXXRGXXR (Cheney und Mooseker, 1992), die als Bindestelle für die leichten Ketten fungieren (Heintzelman und Schwartzman, 1997). Die größten sequentiellen und funktionellen Unterschiede zwischen den Myosinen findet man in der Schaftregion: sie können *coiled-coil*-Domänen enthalten, über die die Moleküle dimerisieren können, woraus Myosine mit zwei Köpfen

resultieren (Sellers, 2000). Bei niedrigen Ionenstärken lagern sich die Dimere zudem zu dicken Filamenten zusammen.

Es wurden früher zwei Gruppen unterschieden: konventionelles Myosin/Muskelmyosin und unkonventionelles Myosin/Nichtmuskelmyosin. Diese unkonventionellen Myosine lokalisieren an Aktin in der Zelle und sind als Motorproteine an Transportprozessen und der Dynamik des Zytoskeletts beteiligt (Adams und Pollard, 1986; Kuznetsov *et al.*, 1992b; Conrad *et al.*, 1993). Sie liegen in den Zellen als Hexamer vor aus jeweils zwei schweren Ketten und zwei Paar leichten Ketten (Katsuragawa *et al.*, 1989; Kawamoto und Adelstein, 1991). Mittlerweile werden 18 Myosinklassen unterschieden, wobei 40 Myosingene aus 12 Klassen im Menschen exprimiert werden (Berg *et al.*, 2001). Die Regulation der Myosinaktivität erfolgt über die Phosphorylierung der leichten Kette. Diese kann durch 2 unterschiedliche Enzyme erfolgen: MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*) wird durch Calcium-/Calmodulin aktiviert, ROCK (*Rho-dependent coiled-coil Kinase*) ist ein Effektor der kleinen GTPase Rho (Smith *et al.*, 2003).

Der katalytische Mechanismus ist offensichtlich für alle Myosin-Isoformen konserviert. Myosin kann in zwei Zuständen in Bezug auf ihre Affinität für Aktin vorliegen: mit gebundenem ATP und ADP/P<sub>i</sub> ist Myosin nur schwach an Aktin gebunden und kann sich deshalb vom Filament ablösen. Durch ATP-Hydrolyse kommt es zu einer weiteren Konformationsänderung, der Kopf klappt zurück, die Produkte ADP und inorganisches Phosphat bleiben weiterhin an Myosin gebunden. Dissoziation des inorganischen Phosphats führt zum „Ruderschlag“ (*power stroke*) des Myosinkopfes, durch den die Bewegung des Moleküls zustande kommt, denn hierbei ist das Myosin fest an Aktin gebunden. Erst durch Dissoziation des ADP und erneute Bindung eines neuen Moleküls ATP kann der Zyklus von neuem beginnen (De La Cruz und Ostap, 2004) Die Halsregion dient als Hebel zur Verlängerung der Motordomäne und verstärkt die Konformationsänderung, die durch die ATP-Hydrolyse hervorgerufen wird (Heintzelman und Schwartzman, 1997).

#### 1.4. Aufgabenstellung

In der Regulation von Podosomen kommt Mikrotubuli eine beträchtliche Rolle zu: in Osteoklasten wird der charakteristische periphere Podosomenring im Gegensatz zu fokalen Adhäsionen durch Mikrotubuli stabilisiert (Babb *et al.*, 1997; Destaing *et al.*, 2003). Experimente mit lebenden Mausmakrophagen konnten außerdem eine Regulation der Podosomen durch Mikrotubuli aufzeigen: Podosomen können entweder *de novo* am Vorderende der Zellen oder durch Abspaltung aus sogenannten Podosomen-Vorläufer-Komplexen entstehen. Der letztere Vorgang ist reversibel, d.h. einzelne Tochterpodosomen können auch wieder fusionieren. Für die *de novo*-Assemblierung der Podosomen ist keine intaktes Mikrotubuli-Zytoskelett nötig, während hingegen die Teilungs- und Fusionsraten der Podosomen-Vorläufer-Komplexe von Mikrotubuli abhängig sind (Evans *et al.*, 2003)

Mikrotubuli und Podosomen weisen nicht nur eine große räumliche Nähe auf, sondern es scheint auch ein funktioneller Zusammenhang zu bestehen: ohne funktionelles Mikrotubuli-Zytoskelett werden keine Podosomen mehr gebildet, fehlende Podosomen haben allerdings keinen Effekt auf die Mikrotubuli-Dynamik. Der genaue Mechanismus dieser Beziehung zwischen Mikrotubuli und Podosomen war jedoch nicht bekannt. (Linder *et al.*, 2000a). Es ergaben sich folgende Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden sollten:

1. Werden Podosomen von Mikrotubuli in lebenden Zellen kontaktiert? Welche Folgen haben diese Kontakte?
2. Existiert ein oder mehrere molekulare Motor/en, der/die in der Regulation der Podosomen eine Rolle spielt/spielen?
3. Interagiert dieser Motor mit den Podosomen?
4. Wie verhalten sich die Podosomen nach Kontakt mit diesem Motor? Ändert sich das Verhalten der Podosomen bei Fehlen des funktionellen Motors?
5. Kann ein Interaktionspartner dieses Motors identifiziert werden?



## **2.1. Arbeiten mit *E.coli***

### **2.1.1. Kultivierung von *E. coli***

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : F $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rK<sup>+</sup>,mK<sup>+</sup>) *phoA supE44  $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1* (Fa. GibcoBRL, Paisley, Großbritannien) wurden bei 37°C in LB Medium kultiviert, das zuvor für 20 min bei 121°C im Autoklav (Bioclav, Fa. Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen) sterilisiert wurde. Mit einem Resistenz-verleihenden Plasmid transformierte Bakterien wurden selektiv auf LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) oder 30  $\mu$ g/ml Kanamycin (Fa. Sigma-Aldrich Steinheim) gezogen. Die Langzeitlagerung erfolgte nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C in LB-Medium mit 20% Glycerol.

LB-Agarplatten mit dem jeweiligen selektiven Antibiotikum wurden mit Hilfe einer Impföse mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 37°C über Nacht bebrütet. Kleine Volumina Flüssigkultur (5-10 ml LB-Medium) wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Für größere Volumina (100 ml-1000 ml) wurde zunächst eine Starterkultur angelegt und nach 8h in einer Verdünnung von 1:500-1:1000 zu LB- Medium gegeben und 37°C schüttelnd inkubiert.

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde in Plastikkuvetten gegen unbeimpftes Medium bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektrophotometer (Fa. Kontron Instruments, Watford, Großbritannien) bestimmt. Eine OD<sub>600</sub>-Einheit entspricht hierbei ungefähr einer Konzentration von 10<sup>8</sup> Zellen/ml bei OD<sub>600</sub> < 1

### **2.1.2. Transformation von Plasmiden**

#### **2.1.2.1. Herstellung elektrokompenter *E.coli* DH5a**

1 ml einer Übernachtskultur von *E.coli* DH5a wurde in 1 l LB-Medium gegeben und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend durch zehnmünütige Zentrifugation bei 4300 x g (Zentrifuge Centricon H-401, Kontron Instruments, Watford, Großbritannien; Rotor A8.24) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 1 l eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 0,5 l kaltem Wasser aufgenommen, die Zentrifugation wiederholt, das verbleibende Sediment in ca. 20 ml 10% Glycerol resuspendiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die so behandelten Zellen wurden schließlich in 2 ml 10% Glycerol aufgenommen, in Aliquots zu 50  $\mu$ l in 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### **2.1.2.2. Elektroporation von kompetenten Bakterien**

Plasmide wurden mittels Elektroporation in *E. coli*-Bakterien transformiert. Vor der Transformation wurden 2 mm-Elektroporationsküvetten (Fa. equibio, Ashford, Großbritannien) bei -20°C vorgekühlt. Währenddessen wurden die elektrokompenteren Bakterien langsam

auf Eis aufgetaut. 2-5  $\mu$ l der zu transformierenden DNA-Lösung wurden mit den aufgetauten Bakterien vermischt und die Suspension in die gekühlten Küvetten pipettiert. Die Transformation erfolgte bei 200  $\mu$ s, 25  $\mu$ F und 2,5 kV im Gene-Pulser II (Fa. Biorad, München). Danach wurden die Zellen in 1 ml kaltem LB-Medium mit 1% Glucose aufgenommen, für 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden selektivem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.1.2.3. Herstellung hitzekompetenter Bakterien**

100 ml LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5a beimpft und bei 37°C schüttelnd bis zu einer OD600 von 0,4 inkubiert. Die Bakterien wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 1900 x g bei 4°C geerntet. Das Sediment wurde in 50 ml eiskaltem 100 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert und in 50 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden in 2 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> gelöst und für 24 h bei 4°C inkubiert, mit 0,5 ml Glycerin und 2,5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> supplementiert und in 100  $\mu$ l Aliquots bei -70°C gelagert.

### **2.1.2.4. Hitzeschocktransformation**

Bei Verwendung des Alligator-DNA-Ligations-Kits (Fa. Genaxxon, Stafflangen) wurden die hitzekompetenten Bakterien nach Herstellerangaben transformiert.

## **2.2. Arbeiten mit humanen Zellen**

### **2.2.1. Allgemeines**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (Fa. BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen) mit Einmal-Kunststoffkulturflaschen (Fa. Corning, Corning, USA) durchgeführt.

Sofern nicht bereits als sterile Lösungen erworben, wurden alle Medien, Lösungen und Supplemente für die Zellkultur mit einem an eine Vakuumpumpe angeschlossenes 0,2- $\mu$ m Filtermembranfiltrationssystem (Stericup; Fa. Millipore, Bedford, USA) oder mit 0,2- $\mu$ m Spritzenfilter sterilisiert.

Für adhäsives Wachstum von HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) wurden alle Zellkulturflaschen, Petrischalen und Deckgläschen mit 75  $\mu$ g/ml steriler Kollagenlösung G (Fa. Biochrom KG, Berlin) gelöst in PBS (Dulbecco's PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, Fa. PAA, Linz, Österreich) für 15 min bei RT beschichtet.

### 2.2.2. Isolierung primärer humaner Makrophagen aus menschlichem Blut

Primäre humane Monozyten/Makrophagen wurden wöchentlich frisch aus peripherem humanem Blut isoliert. Die Blutabnahme wurde mit 50 ml-Spritzen vorgenommen, in die zuvor je 1000  $\mu$ l (= 5000 I.E U) Heparin (Fa. Braun, Melsungen) vorgelegt wurden, um die Blutgerinnung zu verhindern. Zur Isolation wurden 15 ml Ficoll-Lösung (Fa.PromoCell, Heidelberg) vorsichtig mit 12,5 ml Blut überschichtet und das Blut durch 30minütige Zentrifugation bei RT und 460 x g (Zentrifuge Biofuge pico; Heraeus (Fa. Osterode) aufgetrennt. Die Leukozyten wurden abpipettiert, jeweils 2 Proben vereinigt und auf 50 ml mit kaltem RPMI 1640 (Fa.PromoCell, Heidelberg) aufgefüllt. Danach folgte erneut ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 460 x g und 4°C. Nach dieser Zentrifugation wurden die Zellen in kaltem RPMI 1640 gewaschen, erneut zwei Proben vereinigt, mit kaltem RPMI 1640 auf 50 ml aufgefüllt und wie beschrieben zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt, allerdings wurde RPMI\* (RPMI 1640 mit 100  $\mu$ g/ $\mu$ l Penicillin/Streptavidin) verwendet.

Die Zellen wurden in je 1 ml kaltem RPMI\* aufgenommen, die Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert und 2 min bei 4°C und 400 x g (Biofuge *fresco*, Fa. Heraeus Sepatech, Osterode) zentrifugiert. Die Sedimente wurden in je 400  $\mu$ l Monopuffer (PBS mit 5 mM EDTA pH 7,4, 0,5% humanes Serumalbumin) resuspendiert, 100  $\mu$ l mit anti-CD14-Antikörper-gekoppelte Magnetkugeln (Fa. Miltenyi, Bergisch-Gladbach) zugegeben, vorsichtig gemischt, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden und 15 min auf Eis inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Säulen mit 500  $\mu$ l kaltem Monopuffer äquilibriert und ein 50 ml-Röhrchen mit 15-20 ml kaltem RPMI\* vorbereitet. Die oben genannte Suspension wurde auf die Säule gegeben, diese mit 500  $\mu$ l Monopuffer gewaschen, die isolierten Monozyten anschließend mit 1 ml Monopuffer zügig in das vorbereitete 50 ml-Röhrchen eluiert und 10 min bei 460 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Pellets in 0,5-2 ml RPMI\* (je nach Zelldichte) aufgenommen und in einer Neuenbauer Zählkammer (Fa. Marienfeld, Lauda-Königsfeld) unter Verwendung eines Mikroskops (Modell IX50; Fa.Olympus Optical GmbH, Hamburg) gezählt. Anschließend wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät (auf runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$ /Deckgläschen; auf eckige Deckgläschen (13,8 x 13,8 mm) die doppelte Menge. Nach 1,5 bis 2 h wurde 1,5 ml Kulturmedium (RPMI\* mit 20% autologem Serum) hinzugefügt und die Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Fa. WTB Binder, Tuttlingen) kultiviert. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

### 2.2.3. Isolierung von primären HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) aus Nabelschnüren

Humane ECs wurden aus Venen von humanen Nabelschnüren nach Jaffe *et al.*, 1973 isoliert. Von jedem Ende der frisch entnommenen Nabelschnüre wurde 1 cm abgeschnitten und die Nabelschnur vertikal aufgehängt. Am oberen Ende wurde in die Vene eine Kanüle eingeführt und mit Arterienklammern abgeschlossen. Blut wurde mit sterilem PBS ausgewaschen und das untere Ende mit Arterienklammern verschlossen. Zur Ablösung der HUVEC von der inneren Venenwand wurden ca. 5 ml 0,1 % [w/v] a-Chymotrypsin in PBS injiziert. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C und einer kurzen Massage der Nabelschnur wurde die Lösung mit den Zellen mit 10 ml PBS in 2 ml FCS zum Abstoppen der Chymotrypsinaktivität eluiert. Die Zellen wurden durch 8-minütige Zentrifugation mit 130 x g bei 25°C sedimentiert, in 24 ml EGM Medium (Fa. PromoCell, Heidelberg) resuspendiert, in zwei Kollagen-beschichtete 75-cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 3 h wurde das Medium erneuert und Blutreste von den adhären Zellen mit PBS gewaschen. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

### 2.2.4. Ablösung adhärenter Zellen

Die Zellen wurden nach Entfernung des Wachstumsmediums einmal mit PBS gewaschen. HUVEC wurden mit 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin aus Schwein und 0,2 g/l EDTA-Na<sub>4</sub> in HBSS, Fa. PAA Laboratories, Linz, Österreich) pro 75 cm<sup>2</sup>-Kolben abgelöst, für primäre humane Makrophagen wurde Accutase II (Fa. PAA Laboratories, Linz, Österreich) verwendet. Hierzu wurden pro 10 cm<sup>2</sup>-Wachstumsfläche 500 µl Accutase II eingesetzt und die Zellen für 15-25 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsin-bzw Accutase II-Aktivität wurde jeweils mit der doppelten Menge an Medium abgestoppt und die Zellen mittels Zentrifugation für 5 min bei 450 x g und 24°C (Zentrifuge Biofuge pico; Fa. Heraeus, Osterode) sedimentiert und subkultiviert, auf Deckgläschen ausgesät oder für Nukleofektion eingesetzt.

### 2.2.5. Mikroinjektion

Die zu injizierende Lösung wurde mit Mikroinjektionspuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) verdünnt, bei Injektion von Proteinen wurde eine Maximalkonzentration von 10 µg/µl nicht überschritten, um zu verhindern, dass die Lösung zu viskos wurde.

Es wurde Ratten-IgG (Endkonzentration 200 ng/ml, Fa. dianova, Hamburg) als Markersubstanz koinjiziert, die das Auffinden der injizierten Zellen ermöglichte. Die Injektionslösung wurde zur Entfernung von Aggregaten, die die Injektionskanüle verstopfen könnten, bei 4°C, 16000 x g (Biofuge *fresco*, Fa. Heraeus Sepatech, Osterode) 30 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert.

Zur Injektion wurden 3  $\mu$ l Injektionslösung in ein Femtotip (Fa. Eppendorf, Hamburg) gefüllt und ins Gewinde des Mikroinjektionsarms eingeschraubt. Die Injektion selbst erfolgte in der Mikroinjektionsanlage Transjector 5246 und Mikromanipulator 5171 (Fa. Eppendorf, Hamburg.). Eine Kulturschale mit ca. 2 ml Kulturmedium wurde in den Heizring des Mikroskops eingesetzt, das Deckgläschen mit den Zellen im Strahlengang positioniert und leicht angedrückt. Zum Injizieren der Zellen wurde die Spitze der Injektionskanüle am Bildschirm auf die Zellebene eingestellt, die Zellen mit dem Cursor angesteuert und ca. 90-150 Zellen injiziert. Die Deckgläschen wurden entweder sofort mit 3,7% [v/v] Formaldehyd in PBS fixiert oder für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Markersubstanz Ratten-IgG wurde mit einem FITC-gekoppeltem anti-Ratten-Antikörper gefärbt.

### 2.2.6. Nukleofektion von Zellen

Die transiente Transfektion erfolgte mittels Nukleofektion in einem Nukleofector-Gerät (Modell I, Fa. amaxa, Köln) nach Herstellerangaben. Für HUVEC wurde das HUVEC Nukleofektionskit, für Makrophagen die *coded solution* Nr. 6857 (Fa. amaxa, Köln) eingesetzt. Für die Transfektion von 1 Mio. Zellen wurden durchschnittlich 2  $\mu$ g DNA verwendet, die optimalen DNA-Mengen mussten jedoch für jedes Konstrukt individuell ermittelt werden.

### 2.2.7. Manipulation durch stimulierende und inhibierende Substanzen

Name der Substanz	Effekt	Endkonzentration	Inkubationszeit	Hersteller
AMP-PNP	nicht-hydrolysierbares ATP-Analogon	Mikroinjektion 50 mM Kinesinbindung 4 mM	1h	Sigma
TRITC-Dextran	<i>fluid phase</i> -Marker	2 mg/ml	30 min – 1h	Molecular Probes
PP2	Src-Kinase-Inhibition	25 $\mu$ M	1 h	Calbiochem
EHNA	Dynein-Inhibition	Mikroinjektion 1 mM, zusätzlich 200 $\mu$ M im Medium	1 h	Calbiochem
Taxol	Tubulinstabilisierung	20 $\mu$ M	30 min	Calbiochem
Blebbistatin	Myosin II Inhibition	25-50 $\mu$ M	30 min	Calbiochem

Tabelle 2.1. modulierende und inhibierende Substanzen

## 2.3. Mikroskopische Methoden

### 2.3.1. Indirekte Immunfluoreszenz

#### 2.3.1.1. Fixierung und Lyse von Zellen

##### 2.3.1.1.1. Formaldehyd/Aceton

Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden in 3,7 % [v/v] Formaldehyd in PBS für 10 min bei RT fixiert. Die Permeabilisierung erfolgte anschließend in eiskaltem Aceton bei -20°C für 5 min. Danach wurden die Deckgläschen in PBS mit 1 % [w/v] BSA gewaschen, um das restliche Aceton zu entfernen.

##### 2.3.1.1.2. Methanol

Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden in eiskaltem Methanol bei -20°C für 60 sec fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Anschließend wurden die Deckgläschen sofort in PBS mit 1 % BSA gewaschen, um das restliche Methanol zu entfernen.

##### 2.3.1.2. Färbung mittels spezifischer Antikörper

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung erfolgte in einer feuchten Kammer. Auf ein feuchtes Tuch wurde Parafilm (Fa. American National Can, Menasha, USA) gelegt, auf den 30 µl der Färbelösung pipettiert wurden. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten, d.h. auf die vorpipettierte Lösung gelegt.

Die Färbung *per se* erfolgte in drei durch Waschschriffe voneinander getrennten Stufen. Zunächst wurden unspezifische Bindungen mittels PBS mit 1% [w/v] BSA, 5% [v/v] NGS und 5% [w/v] HS abgesättigt. Nach einem Waschschriff in PBS mit 1% BSA wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper für 45 min bei RT inkubiert. Wurden mehrere Zielproteine durch Färbung detektiert, mußten die primären Antikörper sukzessive auf die Zellen gegeben werden. Zur Entfernung der nichtgebundenen primären Antikörpermoleküle wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS mit 1% BSA gewaschen und anschließend für 30 min mit dem (den) gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper(n) bei RT gefärbt. Darauf folgten drei Waschschriffe in PBS, bevor die Deckgläschen auf einem Objektträger in Mowiol eingebettet wurden. 4 µl Mowiol (enthält *p*-Phenylendiamin als Antibleichmittel) wurde bei 37°C vorgewärmt und auf einen Objektträger pipettiert. Die Deckgläschen wurden auch hier mit der Zellseite nach unten auf den Mowioltropfen gelegt und mit Nagellack versiegelt.

Bezeichnung des Antikörpers	Antikörper gerichtet gegen	aus (Spezies)	Hersteller/Kooperationspartner
	HA	Ratte	Roche
	KIF1C	Kaninchen	Cytoskeleton
	KIF1C	Kaninchen	R. Lammers, Tübingen
	KIF3B	Maus	Tansduction Laboratories
SUK4	KIF5	Maus	Covance
m74.2	Dynein	Maus	W. Steffen, London
OxPhosIV	Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette	Maus	Cytoskeleton
	GST	Ziege	Pharmacia
	Tubulin	Schaf	Cytoskeleton
	gamma-Tubulin	Maus	Sigma
MAB1501	Aktin	Maus	Chemicon
	Myosin IIA	Kaninchen	Biomedical Technologies
	Myosin IIA	Kaninchen	Sigma

Tabelle 2.2: verwendete primäre Antikörper

gekoppelter Farbstoff/Enzym	Isotyp	aus (Spezies)	gerichtet gegen (Spezies)	Hersteller
Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Ziege	Kaninchen	Molecular Probes
Alexa Fluor® 586	IgG (H+L)	Ziege	Kaninchen	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Ziege	Maus	Molecular Probes
Alexa Fluor® 568	IgG (H+L)	Ziege	Maus	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Ziege	Ratte	Molecular Probes
Alexa Fluor® 586	IgG (H+L)	Ziege	Ratte	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Ziege	Schaf	Dianova
Alexa Fluor® 586	IgG (H+L)	Ziege	Schaf	Dianova
Meerretich-Peroxidase	IgG F(ab) <sub>2</sub>	Esel	Kaninchen	Amersham-Biosciences
Meerretich-Peroxidase	IgG	Schaf	Kaninchen	Amersham-Biosciences
Meerretich-Peroxidase	IgG	Schaf	Maus	Amersham-Biosciences

Tabelle 2. 3. verwendete sekundäre Antikörper

### 2.3.1.3. Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse fluoreszenzmarkierter Präparate erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops Modell (Fa. Leica, Wetzlar), welches mit einer digitalen „Spot“-Kamera (Leica) verbunden war, oder mittels eines konfokalen *laser scanning* Mikroskops (Leica DM IRB).

Die Bildverarbeitung erfolgte mit den Programmen „Imaging“ (Fa. Microsoft, Seattle, USA) „imageJ“ (National Institutes of Health, Washington, USA) „Photoshop“ (Fa. Adobe, San Jose, USA) und „Corel Draw“ (Fa. Corel, Ottawa, Kanada).

### 2.3.1.4. *in vivo*-Mikroskopie

*In vivo*-Aufnahmen wurden mit Hilfe des UltraView Confocal Live Cell Imaging-Systems (Fa. Perkin Elmer, Wellesley, USA) durchgeführt. Die Zellen wurden während der Beobachtung in einer Inkubationskammer, Modell Incubator Controller (EMBL, Heidelberg) bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Mikroskop diente das Umkehrmikroskop Eclipse TE 300 spinning disc Invers (Fa. Nikon, Düsseldorf) mit einem Nikon PlanApo 100x/1,4 Objektiv, das mit einer Quecksilber-Kurzbogen-Lampe HBO, (Fa. Osram, München) verbunden war. Die Lasereinstellungen der Laser der Ion laser serie 43; 568/647: Krypton, 488/514: Argon (Fa. Melles-Griot, Carlsbad, USA) waren wie folgt: 488: 525/50 nm Bandpass; 568: 607/45 nm. Es wurde ein optischer *shutter-driver* Modell Lambda 10-2 (FA. Sutter Instruments, Navato, USA) verwendet. Filme wurden mit einer Scan interline digital CCD Kamera Modell Orca ER (Fa. Hamamatsu, Herrsching) in einer Auflösung von 1344x1024, als 12-bit aufgenommen. Als Software wurde die UltraView Software Version 5.5.0.2. (Fa. Perkin Elmer) eingesetzt. Die zu untersuchenden Zellen wurden auf *Glass Bottom Dishes* (Fa. MatTek, Ashland, USA) mit einer Dichte von 4-8 x 10<sup>5</sup> pro Schälchen ausgesät und mit dem gewünschten GFP-, DsRed-, mRFP- oder YFP-Konstrukt wie unter Punkt 2.2.6. beschrieben transformiert. Die *in vivo*-Aufnahmen wurden je nach Experiment in einem Zeitrahmen von 10 bis 30 min durchgeführt.

## 2.4. Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 2.4.1. Arbeiten mit DNA

#### 2.4.1.1. Plasmide

Es wurden die bakteriellen Expressionvektoren pGEX-2T/pGEX-4T-2: Expressionsvektoren für GST-Fusionsproteine (Amersham Biosciences Europe, Little Chalfont, Großbritannien), die eukaryontischen Expressionsplasmide pEGFP-N1: Expressionsvektor für GFP-Fusionsproteine (Clontech, vertrieben über BD Biosciences, Palo Alto, USA) und das psiSTRIKE U6 hairpin Cloning System (Human)-hMGFP Expressionsvektor für RNAi-Knock-down Versuche (Fa Promega, Madison, USA) verwendet.



2. Material und Methoden

Name des Konstrukts	Beschreibung Insert/Art der Mutante	Vektor	Tag	Spezies	Herkunft des Konstrukts
pRKRS-KIF1C $\Delta$ NT	KIF1C $\Delta$ NT:AS 1-571 fehlen: ohne Motordomäne	pRKRS	HA	Mensch	R. Lammers
pRKRS-KIF1C-K103A	KIF1CRigor	pRKRS	-	Mensch	R. Lammers
pRKRS-HA-KIF1C	KIF1C Wildtyp	pRKRS	HA	Mensch	R. Lammers
pRKRS-HA-KIF1C $\Delta$ CT	KIF1C $\Delta$ CT: AS 1-802	pRKRS	HA	Mensch	R. Lammers
pRKRS-VSV-KIF1C-S1092A	KIF1C Punktmutation; Casein Kinase II Phosphorylierungsstelle	pRKRS	VSV	Mensch	R. Lammers
pRKRS-KIF1C	KIF1C Wildtyp	pRKRS	-	Mensch	R. Lammers
pCT101	KIF3B ohne Motordomäne	pEGFP-C1	GFP	Xenopus	S. Deacon
pGEX-HA-KIF3B [aa593-747]	KIF3B ohne Motordomäne	pGEX 3	HA + GST	Maus	Y.Takai
pMAL-C2-SMAP	KAP3	pMAL	MBP	Maus	Y.Takai
KAP3-GFP	KAP3 Wildtyp	pEGFP N	GFP	Mensch	T. Akiyama
KAP3- $\Delta$ Arm5-GFP	KAP3 ohne Armadillo-Repeat5	pEGFP	GFP	Mensch	T. Akiyama
pCMV-Myc KIF4 ( $\Delta$ 1-7)	KIF4 KIF4 ( $\Delta$ 1-7)	pCMV-Myc	myc		Y. Lee
HisKHC771-963	KIF5B ohne Motor	pET28a	His	Mensch	R. Diefenbach
HisKHC771-876	KIF5B ohne Motor	pET28a	His	Mensch	R. Diefenbach
HisKHC814-963	KIF5B ohne Motor	pET28a	His	Mensch	R. Diefenbach
pcDNA-myc-KHC	KHC Wildtyp	pcDNA-myc	myc	Mensch	B. Schnapp
H682	KHC ohne Cargo binding	pcDNA-myc	myc	Mensch	B. Schnapp
pcDNA-HA-KLC	KLC1 Vollänge	pcDNA3-HA	HA	Mensch	B. Schnapp
HA-KLC-TPR6	KLC1 ohne heptad repeats	pcDNA3-HA	HA	Mensch	B. Schnapp
HA-KLC-L176	KLC1 ohne TRP6-Domäne	pcDNA3-HA	HA	Mensch	B. Schnapp
pMKN	KLC2 354-599	pCMVTag2C	FLAG	Maus	T. Ichimura
pWK	KLC2 Wildtyp	pCMVTag2C	FLAG	Maus	T. Ichimura
pEGFP-CLIP170	Wildtyp	pEGFP	GFP	Mensch	N. Galjart
pmRFP-EB1	Wildtyp	pmRFP	mRFP	Mensch	N. Galjart
pEGFP-EB1	Wildtyp	pEGFP-C2	GFP	Mensch	Y. Mimori-Kiyosue

Tabelle 2 4: Konstrukte von Kooperationspartnern

#### 2.4.1.2 Agarosegelelektrophorese von DNA

Agarosegelelektrophorese wurde für analytische und präparative Zwecke durchgeführt. 1 % [w/v] Agarose (SeaKem GTG, Fa. Cambrex, Rockland, USA) wurde in 0,5 x TBE Elektrophoresepuffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA) erhitzt, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einem Elektrophoresetank (Sub-Cell GT Agarosegelelektrophoresesystem; Fa. Bio-Rad, München) gegeben. Nach Erkalten wurde das Gel mit 0,5 X TBE-Puffer übergossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 5x DNA-Ladepuffer (0,25% [w/v] Bromphenolblau, 0,25% [w/v] Xylencyanol, 30% [v/v] Glycerol, 50 mM EDTA) gemischt und in die Taschen des Gel gefüllt. Als Größenmarker und zur ungefähren Mengenabschätzung dienten 5 µl Smart-Ladder (Fa. Peqlab Biotechnologies, Erlangen). Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 120 V. Das Gel wurde zur Dokumentation unter UV-Licht (UV Illuminator Model N90M; Fa. UniEquip, Martinsried) mit einer MP-4 Land Camera (Model 44-31; Fa. Polaroid, Offenbach) auf Polapan-Film (Fa. Polaroid, Offenbach) fotografiert.

#### 2.4.1.3. Plasmidisolierung

Plasmidisolierungen im kleinen Maßstab wurden mit dem „QIA® Spin Miniprep Kit“ (Fa. Qiagen, Hilden), und im mittleren Maßstab mit dem „Nucleobond AX100 Midiprep Kit“ (Fa. Macherey-Nagel, Düren) jeweils nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Endotoxin-freie DNA-Präparationen wurden für alle zur Transfektion verwendeten Plasmide benutzt. Diese Präparation führt zu einer Entfernung der aus der Bakterienmembran stammenden Endotoxine aus der präparierten DNA und erfolgte mit dem „Endofree® Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers.

#### 2.4.1.4. Gelelution

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des „QIAquick™ Gel-Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers isoliert.

#### 2.4.1.5. DNA-Restriktionshydrolyse

Eine analytische Restriktionshydrolyse mit 0,5-1 U der Typ II Restriktionsendonukleasen wurde zur Kontrolle von Vektoren oder zur Kontrolle der Klonierung eines DNA-Fragments in einen bestimmten Vektor eingesetzt. Die verwendete DNA-Menge betrug ca. 100-200 ng bei einem Gesamtvolumen des Ansatzes von 20 µl. Das notwendige Ionen- und pH-Milieu für das (die) verwendete(n) Enzym(e) wurde durch einen für das (die) Enzym(e) optimierten Restriktionspuffer gewährleistet. Um das Endvolumen von 20 µl zu erreichen, wurde der entsprechende Ansatz mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgefüllt.

Für eine präparative Restriktionshydrolyse für Klonierungen wurden 1-10 µg DNA-Mengen mit 1-20 U Restriktionsenzym eingesetzt. Dementsprechend erhöhte sich das Gesamtvolumen im Vergleich zum analytischen Verdau auf 40-100 µl.

## 2.4.1.6.PCR-Reaktionen

## 2.4.1.6.1. Oligonukleotide

Name	Bindungsort	Accession Nr.	Sequenz (5' 3')
1C-Xho	MCS von EGFP-N1		CCCGGGCGACTCGAGACCATGTA CC
1C-Bam	MCS von EGFP-N1		AGGATGTGGATCCCACACAGCTG C
Eco-for	1847-1869 in KIF1C	U91329	CTGGTGCTGAATTCAGGGAATAG
Eco-rev	1847-1869 in KIF1C	U91329	CTATCCCTGAATTCAGCACCAG
QCS1092A-f	3374-3405 in KIF1C	U91329	GAGACGGCAGCGTGCTGCCCTG ACCTCAAGG
QCS1092A-r	3374-3405 in KIF1C	U91329	CCTTGAGGTCAGGGGCAGCACGC TGCCGTCT
QCK103A-f	404-440 in KIF1C	U91329	CAGACCGGGGCTGGGGCATCCTA TACC TGATGGGG
QCK103A-r	404-440 KIF1C	U91329	CCCCATCATGGTATAGGATGCC CAGCCCCGGTCTG
QEco-f	1843-1875 in KIF1C	U91329	GCCGCTGGTGCTGAAGTCAGGGA ATAGGATTG
QEco-r	1843-1875 in KIF1C	U91329	CAATCCTATCCCTGACTTCAGC ACCAGCGGC

Tabelle 2 5. zur Mutagenese verwendete Oligonukleotide

Name	Bindungsort	Accession Nr.	Sequenz (5' 3')
EGFP-N1-f	vor MCS in EGFP-N1		GCAGAGCTGGTTTAGTGAACGG
EGFP-N1-r2	hinter MCS in EGFP-N1		CGTCGCCCCGCGTCCAGCTCGACC AG
KIF1C-S1	184-201 in KIF1C	U91329	ATGCTGACCACACACTTGG
KIF1C-S2	3287-3306 in KIF1C	U91329	AACTTCTTATCCCCAGCCAC
KIF1CXEm	765-783 in KIF1C	U91329	ATGCCGTCTTTACCATCG
1CBE2	1698-1717 in KIF1C	U91329	ATATGGACATCAAGCTGAC
1CBE3	2369-2377 in KIF1C	U91329	AAGGAGATCTGCTACGAG

Tabelle 2.6: zur Sequenzierung und für Bakterien-PCR verwendete Oligonukleotide

Name	Bindungsort	Accession Nr.	Sequenz (5' 3')
3- $\beta$ -Aktin	1161-1142 in $\beta$ -Aktin	X00351	ATTTGCGGTGGACGATGGAG
5- $\beta$ -Aktin	716- 735 in $\beta$ -Aktin	X00351	AGAGATGGCCACGGCTGCTT
KIF1C-f	3030-3069 in KIF1C	U91329	AACGACTGCAACGTACGCTTCCCCTT CAAG
KIF1C-r	3369-3397 in KIF1C	U91329	TCAGGGGCAGAACGCTGCCGTCTCAA TC

Tabelle 2.7. zur Reversen Transkriptase-PCR verwendete Oligonukleotide

**2.4.1.5.2. Standard-PCR**

Ein Standard-PCR-Lauf erfolgte im Thermocycler Mastercycler gradient (Fa.Eppendorf, Hamburg) je nach Oligonukleotid-Paar und Länge der zu amplifizierenden DNA konnten die Annealing-Temperaturen von 50°C bis 65°C und die Extensions-Zeit von 30 sec bis 1,5 min variieren. Die Reaktion wurde mit dem Deep Vent PCR-Kit (Fa. New England Biolabs, Beverly, USA) durchgeführt.

**Reaktionsansatz**

10x Puffer	5 µl
Nukleotid-Mix	1 µl
<i>Forward</i> -Primer	0,5 µl
<i>Reverser</i> Primer	0,5 µl
DNA	100 ng
Taq-Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 50 µl

**2.4.1.5.3. Bakterien-PCR (Kolonie-PCR)**

Diese Methode erlaubt es, positive Klone direkt mittels PCR zu identifizieren, ohne die Plasmid-DNA isolieren zu müssen.

Dazu wurden pro Platte von ca. 10 Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in 15 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> resuspendiert. 5 µl dieser Suspension wurden in 5 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum bei 37°C schüttelnd inkubiert, der Rest zum Aufschluß der Bakterien für 5 min bei 95°C gekocht. Dadurch wurde die Plasmid-DNA freigesetzt und konnte direkt für die PCR eingesetzt werden.

**Allgemeiner Ansatz für die Bakterien-PCR**

10 x Puffer	5 µl
Nukleotid-Mix	1 µl
<i>Forward</i> -Primer	0,5 µl
<i>Reverser</i> Primer	0,5 µl
DNA	5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 50 µl

Die für die Bakterien-PCR eingesetzten Oligonukleotide mussten je nach Konstrukt individuell gewählt werden. Dabei unterschieden sich die *Annealing*-Temperaturen je nach *Primer*-Paar von 55°C bis 63°C. Die Bakterien-PCR wurde mit dem *Taq* PCR Core Kit (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt.

#### **2.4.1.5.4. Mutagenese mittels QuikChange™ Mutagenesis Kit**

Punktmutationen in eukaryotische Expressionvektoren wurden mit Hilfe des QuikChange™ Mutagenesis Kits (Fa. Stratagene, La Jolla, USA) nach Herstellerangaben eingeführt.

#### **2.4.1.5.5. Aufreinigung von PCR-Produkten**

PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick™ PCR-Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

#### **2.4.1.6. Ligation**

Die Ligationsansätze wurden mit Hilfe des Alligator™-Kits (Fa. Genaxxon GmbH, Stafflangen) nach Angaben des Herstellers behandelt, in hitzekompetente *E.coli*-Bakterien transformiert, in 300 µl LB-Medium mit 1% Glucose 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert und auf LB-Agarplatten mit dem selektivem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

### **2.4.2. Arbeiten mit RNA**

#### **2.4.2.1. Allgemeines**

Für alle Arbeiten mit RNA wurden Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet, die durch fünfstündige Hitzebehandlung bei 140 °C von RNase-Kontaminationen befreit worden waren. Sämtliche Arbeitsflächen und Geräte mit wurden mit RNase-Away (Fa. Molecular BioProducts, San Diego, USA) behandelt

#### **2.4.2.2. Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA**

Gesamt-RNA wurde mittels TRIzol (Invitrogen, Santa Clara, USA) nach Angaben des Herstellers isoliert. Für die Isolierung von mRNA wurde das QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit (Fa. Amersham Biosciences, Little Chalfont, Großbritannien) eingesetzt.

#### **2.4.2.3. Reverse Transkriptase-Reaktion**

Zur Entfernung von DNA wurde zunächst eine halbstündige DNase-Behandlung (Fa. Novagen, Madison, USA) bei 37°C nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden zunächst 1 µg *Random Primer* (Fa. Promega, Madison, USA) pro 2 µg RNA an die isolierte mRNA oder Gesamt-RNA (siehe 2.1.2.1) für 5 min bei 70°C angelagert und anschließend mit M-MLV Reverser Transkriptase (Fa. Promega, Madison, USA) in einer einstündigen Reaktion bei 37° C der erste Strang der cDNA synthetisiert.

Reaktionsansatz:

mRNA	2 µg
<i>Random Primer</i>	1 µg
Nukleotid-Mix	5 µl
Reverse Transkriptase	1 µl/200U
M-MLV-Puffer (5x)	5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Der erste Strang der cDNA wurde zunächst einer Kontroll-PCR mit  $\beta$ -Aktin-Primern unterzogen, um zu überprüfen, ob noch genomische DNA im Ansatz enthalten war. In diesem Falle würde durch das spezifische Primerpaar eine Bande bei 652 bp generiert, da hier noch ein enthaltenes Intron transkribiert wird. Ohne Verunreinigung durch genomische DNA ergibt sich eine Bande mit 446 bp, d.h. hier wird nur gespleißte mRNA transkribiert.

Reaktionsansatz

cDNA	500ng
<i>Primer 1</i> 3'- $\beta$ -Aktin	2 µl
<i>Primer 2</i> 5'- $\beta$ -Aktin	2 µl
10x Puffer	5 µl
Nukleotid-Mix	3µl
Deep Vent DNA-Polymerase	1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Der Reaktionsansatz wurde mit DNA-Probenpuffer versetzt und in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt.

**2.4.2.4. Real-Time PCR**

Die siRNAs wurden freundlicherweise durch das EURIT-Projekt des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie (Berlin) durch quantitative Real-Time PCR validiert. Dazu wurden  $10 \times 10^4$  HeLa-Zellen in 96-well-Platten mit 0,1 bis 0,25 µg der entsprechenden siRNAs transfiziert, Gesamt-RNA mit Hilfe des Rneasy 96 BioRobot 8000 System (Fa. Qiagen, Hilden) isoliert. Die relative Menge der ZielmRNA wurde durch quantitative Real-Time mit Quantitect SYBR Green RT-PCR-Kit (Fa. Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben bestimmt.

#### 2.4.2.5. RNA-Interferenz (RNAi)

siRNAs wurden freundlicherweise von Peter Marschall (RPDZ, Berlin) zur Verfügung gestellt. 650 ng wurden mit Hilfe des Nucleofectors in primäre humane Makrophagen transient transfiziert. Wegen der geringen Transfektionseffizienz mussten 1,2 µg GFP-N1-Leervektor als Transfektionskontrolle kotransfiziert werden. Bei diesen Mengen ergibt sich ein Verhältnis RNA:DNA von ca 60:1, woraus sich eine hohe Wahrscheinlichkeit der Ko-Transfektion ableitet und die mit siRNA transfizierten Zellen durch die grüne Fluoreszenz identifiziert werden können.

Vektor-kodierte siRNA wurde mit Hilfe des psiSTRIKE U6 hairpin Cloning System (Human)-hMGFP (Fa Promega, Madison, USA) durchgeführt. Dazu wurden nach Angaben des Herstellers geeignete Oligonukleotide entworfen und in den psi-STRIKE-Vektor eingefügt. Dieser kodiert zudem für hMGFP, wodurch eine Lokalisation transfizierter Zellen ermöglicht wird.

Name	Targetsequenz	Accession Nr.	Sequenz (5' 3')
Lamin A/C1	610-622	M13451	AACTGGACTTCCAGAAGAACA
KIF1C	870-882	U91329	AAGAAGCGAAAGTCGGATTTT
KIF3A	518-539	BC045542	AAGACCTGATGTGGGAGTTTA
KIF3B	323-335	NM_004798	AATCCGTGGTGACCCTGAAAA
KIF5B	476-488	NM_004521	AAACCGAGTTCCTATGTAAA
KAP3	928-940	NM_014970	AAGCCCTTGATCGGGACAATT
strike-1C-3f	426-446	U91329	ACCGGTGAGCTATATGGAGATCTTCAAG AGAGATCTCCATATAGCTCACCTTTT
strike1C-3r	426-446	U91329	<u>CACTCGATATACCTCTAGAAGTTCTCTCT</u> AGAGGTATATCGAGTGGAAAAAGACGT

Tab. 2.8 für *knock-down*-Versuche eingesetzte Oligonukleotide und Sequenzen



## **2.5. Arbeiten mit Proteinen**

### **2.5.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

Die Proteinbestimmung wurde mit BIO-RAD Protein Assay nach Bradford durchgeführt (1976). Als Proteinstandard für den Protein-Microassay (1-20 µg Protein; = 25 µg/ml) wurde BSA in den Konzentrationen 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml verwendet. Die Bestimmung der Proteinmenge wurde für alle Proben wie folgt durchgeführt: Zu 800 µl Probe (Proteinstandard in der oben angegebenen Konzentration bzw. verdünnte Proteinlösung) wurden 200 µl *Dye Reagent Concentrate* gegeben. Als „Nullwert“ wurde 800 µl Puffer als Probe eingesetzt. Diese Lösungen wurden durch kurzes Vortexen gemischt. Nach 5 min bis 1 h Inkubationszeit wurde für alle Proben die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Standardwerte der BSA-Proben wurden gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen und dienten als Eichkurve. Aus der Eichkurve wurden die Proteinkonzentrationen der Proben abgelesen.

### **2.5.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli (Laemmli, 1970)**

Die Proben wurden mit Probenpuffer nach Lämmli (0,5 M Tris-HCL, 20 % Glycerin, 8 % [w/v] SDS, 10% [v/v] Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und bei konstant 150 V bei kleinen Gelen bzw. 45 mA bei großen Gelen unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt.

### **2.5.3. Molekulargewichtsbestimmung**

Als Marker für die Größenbestimmung von Proteinen wurde der *prestained high range* Proteinmarker (Fa. peqlab, Erlangen) verwendet. Zur Abschätzung der molekularen Massen wurden die Laufstrecken der Markerproteinen vom oberen Trenngelrand aus gemessen und gegen den Logarithmus der molekularen Massen aufgetragen. Die apparenten molekularen Massen der zu bestimmenden Proben wurden aus dieser Eichgeraden abgelesen.

### **2.5.4. Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969)**

Die Polyacrylamidgele wurden für 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung (0,25% [w/v] Serva-Blau-R250, 22,7% [v/v] Methanol) inkubiert und anschließend bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in Entfärber (33% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Eisessig) gewaschen.

### **2.5.5. Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987), modifiziert)**

Die Polyacrylamidgele wurden für 1 h in Fixierlösung (50% [v/v] Methanol, 0,8% [v/v] Eisessig, 0,002% [v/v] Formaldehyd) fixiert. Anschließend wurden die Gele 3 x 10 min mit 50 % [v/v] Ethanol gewaschen und für 1 min in Thiosulfatlösung (0,02% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O) geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für je 20 s in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> wurden die Gele 20

min imprägniert (Imprägnierlösung: 0,2% [w/v]  $\text{AgNO}_3$ , 0,075% [v/v] Formaldehyd). An erneutes Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  schloß sich die Entwicklung mit 9% [w/v]  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ , 1% [v/v] Thiosulfatlösung, 0,1% [v/v] Formaldehyd an. Waren die Proteine deutlich zu sehen, wurde die Entwicklung mit 0,186% [w/v] EDTA gestoppt.

### 2.5.6. Nachweis von Proteinen durch MALDI-TOF-Analyse

Bestimmte durch Silberfärbung sichtbare Proteinbanden wurden aus den Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und freundlicherweise durch MALDI im Zentrum für Proteinanalytik der Universität München identifiziert. Dazu wurden die durch Silberfärbung sichtbar gemachten Gelbanden zweimal mit Wasser gewaschen, anschließend mit einer 1:1-Mischung aus 30 mM Kaliumferricyanid und 100 mM Natriumthiosulfat inkubiert und zweimal mit Wasser gewaschen. Die Gelbanden wurden zweimal für 5 min mit 50% Acetonitril behandelt. Trypsin (Fa. Promega, Mannheim) wurde zugegeben und die Proteine über Nacht in 40 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer pH 8,0 bei 37°C und 650 rpm geschüttelt. 10  $\mu\text{l}$  jeder Bande wurden zunächst gereinigt und aufkonzentriert unter Verwendung einer C18 Reverse-Phase Pipettenspitze (ZipTip, Fa. Millipore, Schwalbach). Die Peptide wurden mit 1  $\mu\text{l}$   $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (HCCA, Fa. Sigma, Taufkirchen) eluiert und direkt auf eine MALDI-Probenplatte (Fa. Applied Biosystems, Lincoln, USA) gegeben. Die MALDI-TOF-Messungen wurden mit einem Voyager-DE STR Time-of-flight Massenspektrometer (Fa. Applied Biosystems, Lincoln, USA) durchgeführt. Die Spektren wurden mit Hilfe der Mascot Software (Fa. Matrix Science, London, Großbritannien) unter Verwendung der NCBI-Inr-Protein Datenbank analysiert.

### 2.5.7. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine einem „Western Blotting“ unterzogen (Khyse-Andersen, 1984), modifiziert). Der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran ( Fa. Pall, Portsmouth, Großbritannien) erfolgte in einer Mini-Protean Kammer (Fa. Biorad, München) nach dem Tankblot-Verfahren. Die Membran, das Gel und das Filterpapier (Fa Whatman, Maldstone, USA) wurden in „Blotting-Puffer (25 mM Tris-Base, 96 mM Glycin) getränkt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 80 V. Anschließend wurde die Membran entnommen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in TBST-Puffer (20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 0,3 % Triton X-100, pH 7,4) mit 2,5% BSA (Fa. Serva, Heidelberg) und 5% Magermilchpulver (Fa. Biorad, München) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde die Membran für 1 h in TBST geschwenkt, dem der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:750 bis 1:2000 zugesetzt worden war. Nicht gebundene und nicht-spezifisch gebundene primäre Antikörper wurden durch dreimaliges 10minütiges Waschen mit TBST entfernt. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit HRP-gekoppelten Antikörpern (Fa Amersham Biosciences, Little Chalfont, Großbritannien) in TBST inkubiert. Nach weiterem dreimaligem 10minütigen Waschen wurde die Membran 10 min

in *Super Signal® West Pico Luminol Enhancer* und *Super Signal® Stable Peroxide Solution* Detektionslösung (Fa. Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert. Die Lichtemission bei der Umsetzung der Detektionslösung durch die Meerrettichperoxidase wurde durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Fa. Kodak AG, Stuttgart) dokumentiert. Zur Überprüfung des Transfererfolges wurde das Gel mit Coomassie angefärbt (siehe Punkt 2.5.4).

## **2.5.8. Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie**

### **2.5.8.1. GST-Fusionsproteine**

Zur Expression eines Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteins wurde eine 37°C Übernachtskultur von Bakterien, die das zu exprimierende Plasmid enthielten, in 100 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum angeimpft. 1 ml der Übernachtskultur wurde am nächsten Tag zu 1l LB-Medium mit selektivem Antibiotikum gegeben und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,4 wurde die Expression des GST-Fusionsproteins mit 1 mM IPTG induziert und weitere 2,5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (5 min, 4400 x g) sedimentiert, die Sedimente in vorgekühltem PBS gelöst und in einem 50 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Die Suspension wurde mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut für 20 min mit 3020 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 10-20 ml Lysepuffer (50 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 475 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pefabloc) resuspendiert.

Die Bakteriensuspension wurde mit 65 W insgesamt sechsmal für 10 sec mit Ultraschall aufgeschlossen und die Zellreste für 30 min bei 50000 g (Ultrazentrifuge Optima™, Rotor TLA-100, Fa. Beckman Coulter, Fullerton, USA) abzentrifugiert. Währenddessen wurden 1-2 ml GST-Sepharose-Kugeln 3 min bei 4°C in Lysepuffer äquilibriert und danach bei 121 x g für 2 min bei 4°C zentrifugiert (Zentrifuge Centricon H-401, Kontron Instruments, Watford, Großbritannien; Rotor A8.24). Der Proteinüberstand der Ultrazentrifugation wurde auf die Kugeln gegeben und 1h bei 4°C inkubiert. Die Kugeln wurden anschließend fünfmal mit Lysepuffer ohne DTT und einmal mit Resuspensionspuffer (50 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 2,5 mM  $NaCl_2$ , 1 mM DTT) gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das Protein von den Kugeln eluiert.

#### **2.5.8.1.1. Elution mit Glutathion**

Zur Elution des Fusionsproteins wurden die Sepharose-Kugeln sechs- bis achtmal mit je 1 ml Resuspensionspuffer plus 10 mM Glutathion behandelt. Dabei wurden die Kugeln bei jedem Schritt vier- bis sechsmal mit der Puffer/Glutathion-Lösung gevortext und anschließend 5 min bei 3020 x g (Zentrifuge Centricon H-401, Kontron Instruments, Watford, Großbritannien; Rotor A8.24) abzentrifugiert. Die aus den Elutions-

/Zentrifugationsschritten resultierenden Überstände wurden vereinigt und gegen Dialysepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM DTT) dialysiert. Die Dialyse war notwendig, da die Proteine für Mikroinjektionsexperimente verwendet werden sollten und dafür der für die Injektion passende Puffer benötigt wurde (vgl. Punkt III.3.4.2.). Nach der Dialyse wurde die Proteinmenge wie unter Punkt 2.5.1 beschrieben bestimmt.

#### **2.5.8.1.2. Thrombinspaltung**

Um den GST-Anteil des Fusionsproteins abzuspalten, wurden pro ml GST-Beads 2 U Thrombin gegeben und entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Kugeln bei 3020 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand erneut dreimal mit 2 ml Resuspensionspuffer gewaschen. Zur Entfernung des Thrombins, wurden zu dem gewaschenen Überstand 100 µl p-Aminobenzamidin-Kugeln pipettiert und für 1h bei 4°C schüttelnd inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die p-Aminobenzamidin-Kugeln (mit dem anhaftenden Thrombin) abzentrifugiert und der Überstand gegen Dialysepuffer dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Proteinmenge wie unter Punkt 2.5.1. beschrieben bestimmt.

#### **2.5.8.2. MBP-Fusionsproteine**

Zur Expression eines MBP (*maltose-binding protein*)-Fusionsproteins wurde eine 37°C Übernachtkultur von Bakterien, die das zu exprimierende Plasmid enthielten, in 100 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum angeimpft. 1 ml der Übernachtkultur wurde am nächsten Tag zu 1 l LB-Medium mit selektivem Antibiotikum gegeben, mit 2 g Glucose versetzt und für 2,5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Expression des Fusionsproteins mit 0,5 M IPTG induziert und erneut bei 37°C 2,5 h schüttelnd inkubiert.

Anschließend wurden die Bakterien durch fünfminütige Zentrifugation bei 4350 x g, 4°C (Zentrifuge Centricon H-401, Kontron Instruments, Watford, Großbritannien; Rotor A8.24) geerntet und danach mittels Sonifikation aufgeschlossen. Die Zellreste wurden in der Ultrazentrifuge (Optima™, Rotor TLA-.100, Fa. Beckman Coulter, Fullerton, USA) für 10 min bei 100000 x g abzentrifugiert.

Währenddessen wurden 2 ml Säulenmaterial in Säulenpuffer (20 mM Tris pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) für 1h bei 4°C äquilibriert und anschließend bei 121 x g, 4°C (Centricon H-401, Kontron Instruments, Watford, Großbritannien; Rotor A8.24) zentrifugiert. Das Sediment nach der Ultrazentrifugation wurde verworfen, der Überstand zum äquilibrierten Säulenmaterial gegeben und für 1h bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch sechsmaliges Waschen mit Säulenpuffer entfernt und das MBP-Fusionsprotein anschließend fünfmal mit 1 ml Maltose -Lösung (3,6 g/ml in Säulenpuffer) eluiert.

Das Eluat wurde über Nacht bei 4°C gegen Dialysepuffer (20 mM Tris pH 8, 25 mM NaCl) dialysiert, anschließend aufkonzentriert und erneut über Nacht bei 4°C dialysiert, diesmal gegen Mikroinjektionspuffer (vgl. Punkt III.3.4.2.). Anschließend wurde die Proteinmenge wie unter Punkt 2.2.3.2. beschrieben bestimmt.

## 2.5.9 Interaktionsstudien

### 2.5.9.1. Herstellung von Zelllysaten aus humanen Zellen

Die Zellen wurden mit PBS (Dulbecco's PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , Fa. PAA; Linz, Österreich) gewaschen und mit Hilfe eines Zell-Lifters (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) in 600  $\mu\text{l}$  entsprechendem Lysepuffer vom Kulturgefäß entfernt. Die Zusammensetzung des Lysepuffers variierte je nach präzipitierten Protein. Der Zellaufschluss erfolgte durch 30-minütige Inkubation in detergens-haltigen Lysepuffern bei 4°C. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 3500 xg bei 4°C wurden Zelltrümmer entfernt und der Überstand in Immun-Präzipitationsversuchen und zur Isolierung von Motorproteinen eingesetzt.

### 2.5.9.2. Immun-Präzipitation

Zur Immun-Präzipitation wurde das  $\mu\text{MACS}$ -Kit (Fa. Miltenyi, Bergisch-Gladbach) verwendet. 2  $\mu\text{g}$  des jeweiligen Antikörpers wurden mit 50  $\mu\text{l}$  Protein A oder Protein G-gekoppelten Magnetkugeln zu Zelllysate gegeben und für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert.  $\mu\text{MACS}$ -Säulen wurden im  $\mu\text{MACS}$ -Multi-Ständer mit 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer äquilibriert und das Zelllysate-Antikörper-Protein A/G-Kugel-Gemisch daraufgegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen, die Säulen wurden 4 mal mit je 200  $\mu\text{l}$  Lysepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50  $\mu\text{l}$  95°C heißem SDS-Puffer nach Lämmli.

Für eine MALDI-TOF-Analyse war es notwendig, den Anteil von eluiertem Antikörper möglichst gering zu halten, da diese Verunreinigungen eine eindeutige Identifizierung der einzelnen Proteinbanden verhinderten. Hierzu wurden die Antikörper mit Hilfe des *Cross-Linking-Reagens* DMP (Dimethylpimelindiaimidatdihydrochlorid, Fa. Fluka, Steinheim) an die Protein A bzw. G-gekoppelten Magnetkugeln kovalent gebunden: Antikörper und Protein A/G-Kugeln wurden in 0,2 M Triethanolamin pH 8 bei RT für 10-15 min inkubiert. 200 mM DMP wurden jeweils frisch in 0,2 M Triethanolamin gelöst und zu den Antikörpern und den Magnetkugeln gegeben und 30 min bei RT inkubiert. Die Cross-linking Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  50 mM Tris pH 8-9 für 10 min abgestoppt. Ungebundene Antikörper wurden mit Hilfe einer  $\mu\text{MACS}$ -Säule durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zur Elution wurden 150  $\mu\text{l}$  65°C warmem RIPA-Puffer (50 mM Tris pH 7,4, 1% [v/v] Triton X-100, 75 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  pH 7,4) verwendet, wobei die Säule aus dem Magnetständer entnommen wurde. Nach Zugabe des Zelllysates wurde wie oben beschrieben verfahren.

**2.5.9.3. GST- bzw. MBP-pull-down**

200 µl einer Glutathion-Sepharose 48-Lösung (Fa. Amersham Biosciences, Little Chalfont, Großbritannien) bzw. einer Amylose-Lösung (Fa. New England Biolabs, Beverly, USA) wurden dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und dabei jeweils durch Zentrifugation bei 4°C und 500 x g für 1 min sedimentiert. Nach Äquilibrieren mit 1 ml RIPA-Puffer (50 mM Tris pH 7,4; 1% [v/v] Triton X-100, 75 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) wurde nach Sedimentieren der Sepharose, bzw. Amylose das GST- bzw MBP-Fusionsprotein in 1 ml RIPA zugegeben und für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler gemischt. Anschließend wurde die Sepharose bzw. Amylose durch erneutes Zentrifugieren sedimentiert. Das Zelllysat wurde wie unter Punkt 2.5.9.1. beschrieben mit RIPA-Puffer hergestellt und zu der Glutathion-Sepharose, bzw. Amylose gegeben und für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 1 ml RIPA wurde das Sediment in 100 µl SDS-Probenpuffer nach Lämmli aufgenommen.

**2.5.10. Isolierung von Motorproteinen aus primären humanen Makrophagen**

Zelllysat aus primären humanen Makrophagen wurde mit Lysepuffer (50 mM HEPES, 5 mM EGTA, 75 mM NaCl, 1% Triton X-100) wie unter Punkt 2.2.3.3. gewonnen und mit 400 µg polymerisiertem Tubulin versetzt. Hierzu wurde das Tubulin (Fa. Cytoskeleton, Denver, USA) nach Herstellerangaben mit 1 mM GTP in G-PEM-Puffer (80 mM PIPES, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 3 mM GTP pH 6,9) mit 2% Glycerol 20 min bei 37°C polymerisiert und mit 20 µM Taxol (Fa Sigma, Steinheim.) stabilisiert.

Durch Zugabe von 4 mM AMP-PNP (Fa. Sigma, Steinheim) erfolgte unter leichtem Schütteln bei 37°C das Anheften der Motorproteine an die Mikrotubuli. Diese wurden mit den daran anhaftenden Proteinen durch halbstündige Zentrifugation bei 220000 x g (Optima<sup>TM</sup>, Rotor TLA-100, Fa. Beckman Coulter Fullerton, USA) bei 25°C sedimentiert. Das Sediment wurde in 200 µl Elutionspuffer (10 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>xH<sub>2</sub>O, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µM Taxol) resuspendiert und die Motormoleküle durch 15minütige Inkubation bei Raumtemperatur abgelöst. Die Trennung der Motormoleküle von den Mikrotubuli erfolgte durch Ultrazentrifugation bei 140000 xg für 30 min, 25°C. Das Sediment wurde erneut in Elutionspuffer resuspendiert und der Vorgang wiederholt.

### **3. Ergebnisse**

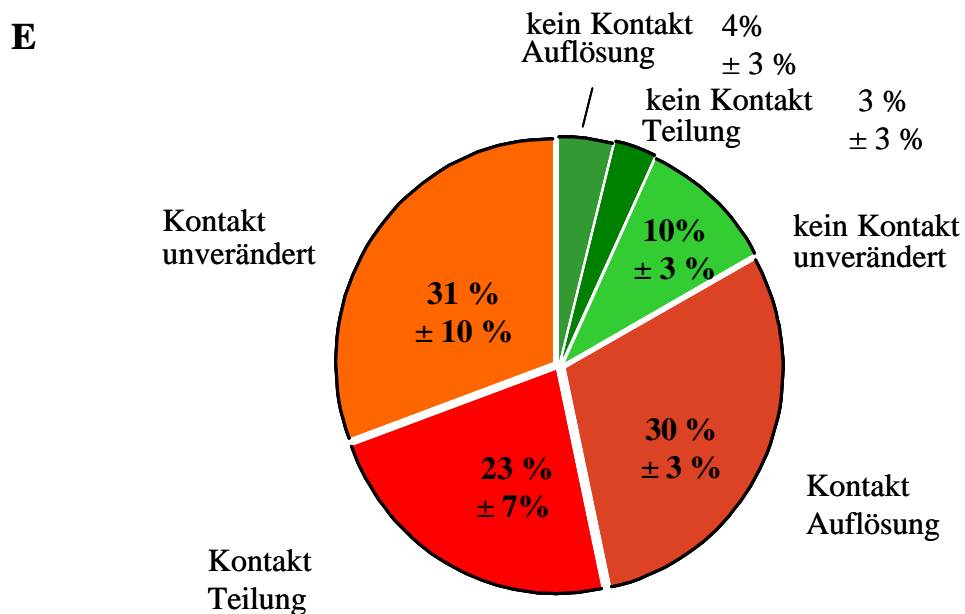
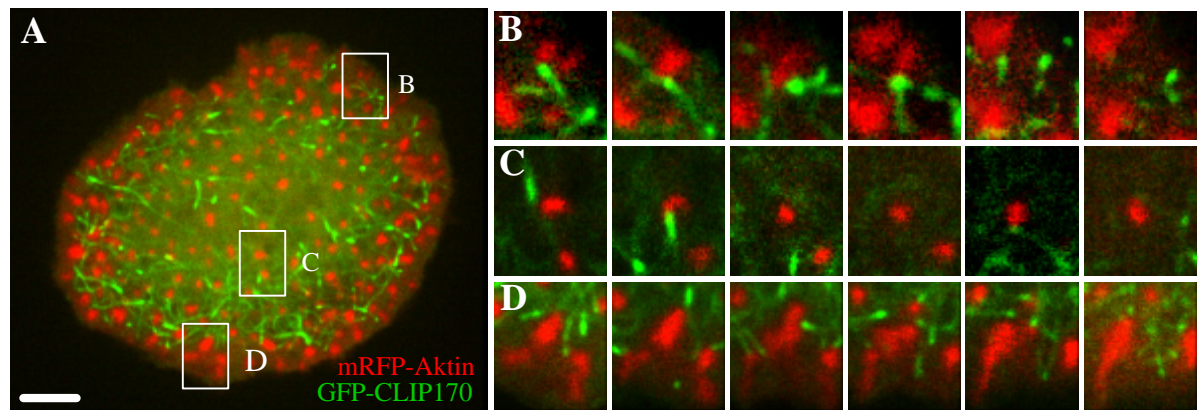
#### **3.1. Mikrotubuliplusenden kontaktieren Podosomen**

Arbeiten aus dem Labor von J.V. Small zeigten Ende der 90er Jahre in Fischfibroblasten erstmals Kontakte zwischen Mikrotubuli und fokalen Adhäsionen, die auf die Mikrotubuli einen stabilisierenden Effekt haben (Kaverina *et al.*, 1998). Diese Kontakte führen allerdings zur Auflösung der fokalen Adhäsionen und nicht zu deren Wachstum (Kaverina *et al.*, 1999). Unterschiedliche Mikrotubuli scheinen zudem stets die gleichen Bahnen zu benutzen, was auf die Existenz eines zusätzlichen strukturellen Elements schließen lässt, das eine gerichtete Mikrotubulipolymerisierung fördert (Krylyshkina *et al.*, 2002).

Desweiteren zeigten Arbeiten aus dem eigenen Labor, dass auch podosomale Adhäsionsstrukturen durch Mikrotubuli in zahlreicher Weise beeinflusst werden. Mikrotubuli sind nicht nur in großer räumlicher Nähe zueinander, sondern es besteht zudem eine Abhängigkeit zwischen Podosomen und Mikrotubuli (Linder *et al.*, 2000a): ohne funktionelles Mikrotubuli-Zytoskelett werden keine Podosomen mehr gebildet, fehlende Podosomen haben allerdings keinen Effekt auf die Mikrotubuli. Der genaue Mechanismus dieser Beziehung zwischen Mikrotubuli und Podosomen war jedoch nicht bekannt.

Bislang konnte nur in fixierten Präparaten eine räumliche Nähe gezeigt werden. Zur Untersuchung dieser möglichen Interaktionen zwischen Podosomen und Mikrotubuli in lebenden primären humanen Makrophagen wurde ein sogenanntes +TIP-Protein (*Plusend-tracking protein*) zur Visualisierung der Mikrotubuli-Plusenden verwendet. GFP-CLIP170 (Perez *et al.*, 1999) zählt zu dieser Proteinfamilie und bindet an die wachsenden Plusenden von Mikrotubuli und ermöglicht so eine Beobachtung von möglichen dynamischen Interaktionen zwischen Podosomen und Mikrotubuli-Plusenden. Podosomen wurden durch Transfektion mit mRFP-Aktin visualisiert (siehe Abb. 3-1 und Film 1).

*Live cell imaging*-Experimente zeigten, dass 84% aller beobachteten Podosomen von GFP-CLIP170-positiven Plusenden kontaktiert wurden, wobei einzelne Podosomen oftmals hintereinander von verschiedenen Plusenden berührt wurden. Die Kontakte hatten drei unterschiedliche Konsequenzen: während des Beobachtungszeitraumes von 20 min teilten sich  $23\% \pm 7\%$  der kontaktierten Podosomen-*Precursor-Cluster* in 2 oder 3 Tochterpodosomen (siehe Abb. 3-1D; Film 1C),  $30\% \pm 3\%$  lösten sich auf (siehe Abb. 3-1B, Film 1B),  $31\% \pm 10\%$  blieben unverändert (siehe Abb. 3-1C, Film 1A). Auch die Podosomen, die während des Beobachtungszeitraums nicht kontaktiert wurden, zeigten diese drei Arten der Reaktion:  $3\% \pm 3\%$  teilten sich,  $4\% \pm 3\%$  lösten sich auf und  $10\% \pm 3\%$  zeigten keine Veränderung. Jeweils ca. ein Drittel der kontaktierten Podosomen zeigen dieses Verhalten, im Gegensatz zu den nicht kontaktierten: hier beträgt dieser Anteil jeweils nur ein Fünftel. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Auflösung bzw. Teilung der Podosomen wohl auf die Kontakte durch die Mikrotubuli-Plusenden zurückzuführen sind.



**Abb. 3-1. CLIP170-markierte Mikrotubuli-Plusenden kontaktieren Podosomen.**

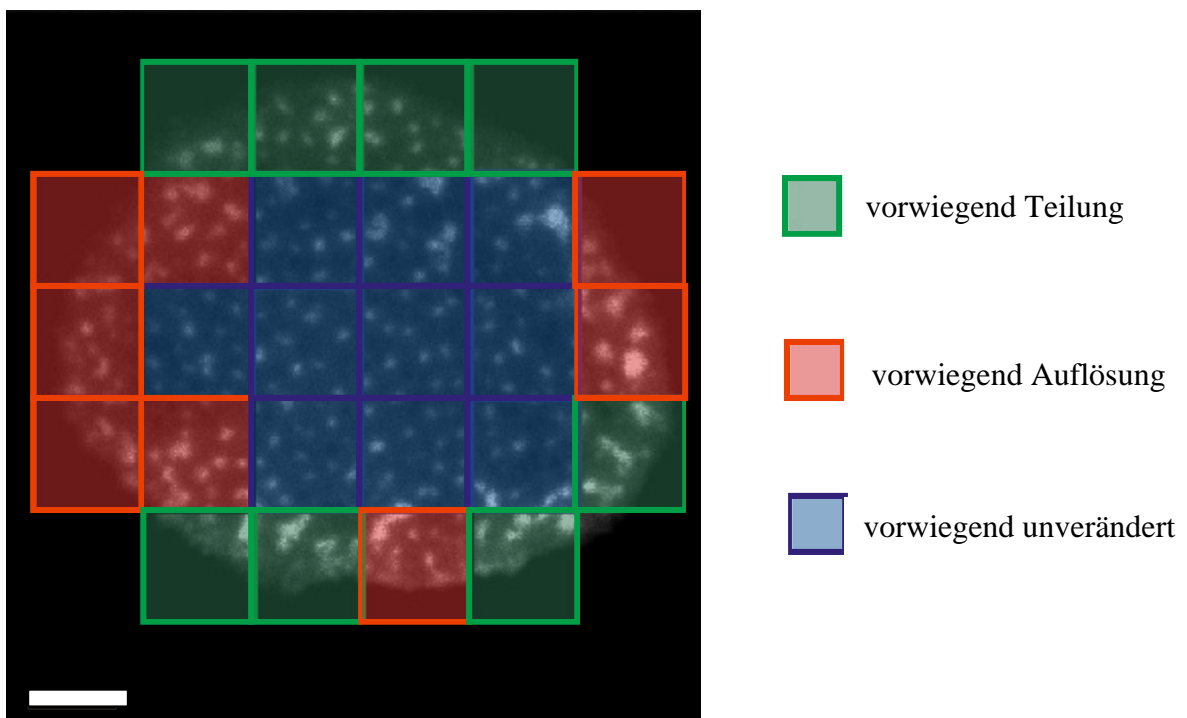
Konfokalmikroskopische Momentaufnahme eines 9 Tage alten lebenden primären humanen Makrophagen, der mit pmRFP-Aktin und pEGFP-CLIP170 transient transfiziert wurde nach 20 h (A-D). A zeigt die Lokalisation von CLIP170 (grün) an MT-Plusenden und Podosomen (rot), die durch Aktin gekennzeichnet sind, B, C und D zeigen je eine Sequenz einer Ausschnittsvergrößerung eines bestimmten Zellbereichs aus dem Filmmaterial A. In B ist der kurze Kontakt von CLIP170 mit einem Podosom zu sehen, welches sich daraufhin in 3 Tochterpodosomen teilt. Im Gegensatz dazu bleibt in C das Podosom nach MT-Kontakt unverändert. Weißer Balken: 10  $\mu$ m.

E: Quantifizierung des Podosomenverhaltens: sämtliche Podosomen ausgewählter und wie oben beschrieben transfizierter Makrophagen aus 4 Filmen mit jeweils ca. 15 Minuten Länge wurden gezählt und in oben angegebene Kategorien eingeteilt. Die Prozentsätze für die einzelnen Kategorien sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.



Dieses Ergebnis bestätigt die Daten von J. Evans, der zeigen konnte, dass Podosomen entweder *de novo* oder durch eine mikrotubuliabhängige Teilung aus sogenannten Podosomen-*Precursor-Cluster* entstehen. Auch die Auflösung einzelner Podosomen ist abhängig von Mikrotubuli (Evans *et al.*, 2003).

Im Rahmen der Beobachtung der einzelnen Podosomen fiel zudem auf, dass es regionale Unterschiede der Häufigkeit der unterschiedlichen Reaktionen zu geben scheint: an der Zellperipherie ruhender Makrophagen fanden hauptsächlich Teilung oder Auflösung der Podosomen statt, während hingegen im Zentrum der Zelle die Podosomen vorwiegend unverändert erschienen. Abb. 3-2 zeigt dieses unterschiedliche Verhalten am Beispiel einer ausgewählten Zelle.



**Abb.3-2. Podosomenverhalten in Abhängigkeit vom Zellbereich**

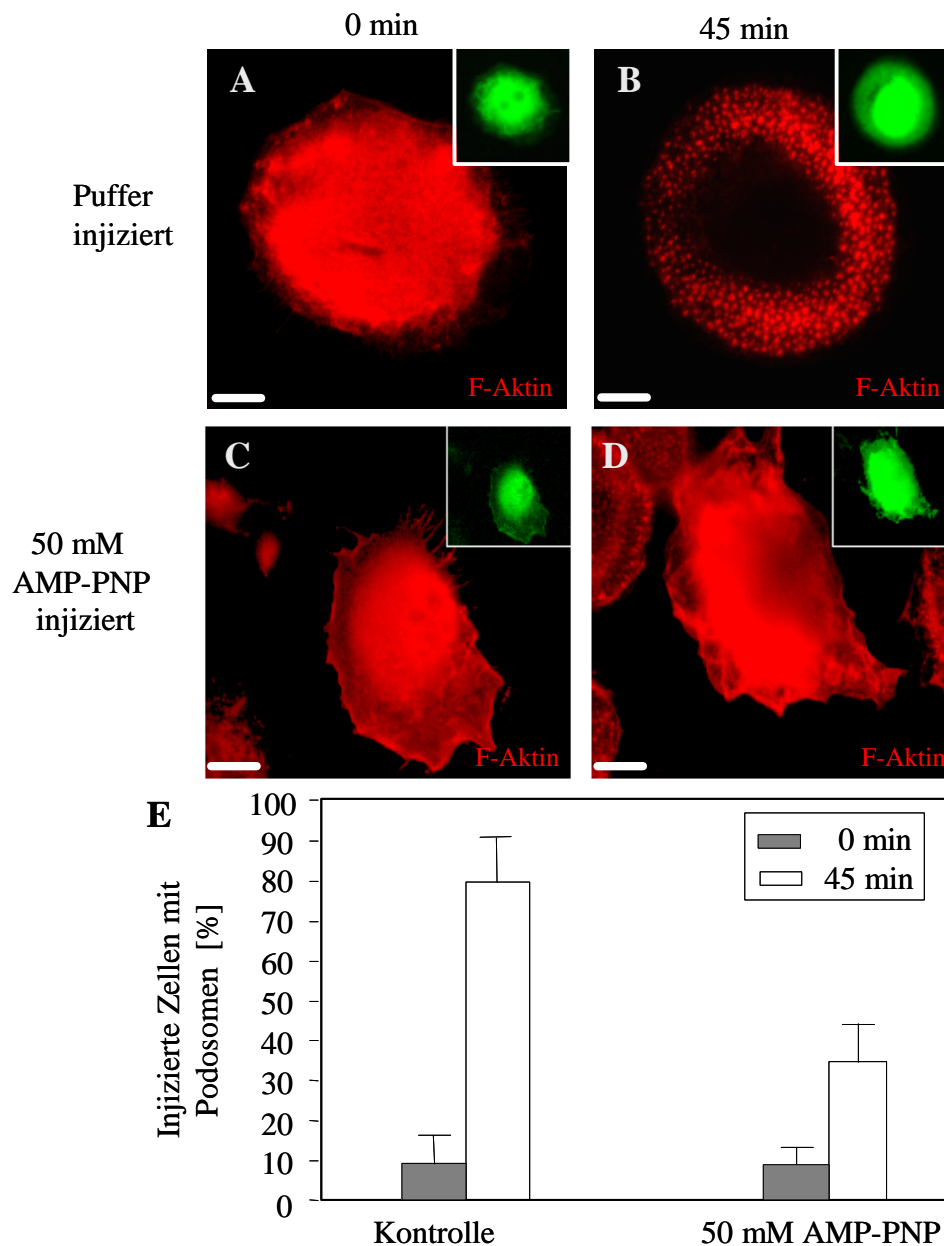
Sämtliche Podosomen eines 9 Tage alten und mit pmRFP-Aktin transfizierten Makrophagen wurden mit Hilfe eines auf das Bild gelegten Rasters gezählt, je nach Verhalten in die Kategorien statische, sich auflösende und sich teilende Podosomen eingeteilt und die Region je nach vorherrschender Kategorie eingefärbt: Regionen mit vorherrschend statischen Podosomen (blau), Regionen mit vorherrschend sich auflösenden Podosomen (rot), Regionen mit vorherrschend sich teilenden Podosomen (grün). Weißer Balken: 10 µm

### 3.2. Podosomenbildung ist ATP-abhängig

Die Arbeiten von K. Hüfner (Linder *et al.*, 2000a) und die unter Punkt 3.1. aufgeführten Resultate zeigen, dass Podosomen eventuell von Mikrotubuli kontaktiert und reguliert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass durch die Mikrotubuli regulierende Faktoren wie z.B. WASp, Cdc42 etc. oder auch möglicherweise strukturelle Bestandteile an die Podosomen geführt werden. Da die bekannten Regulatoren selbst keine Motoraktivität aufweisen, müssen sie durch molekulare Motoren transportiert werden.

Es gibt in eukaryontischen Zellen zwei Klassen von Motorproteinen, die sich entlang Mikrotubuli mittels ATP-Hydrolyse fortbewegen. Dyneine transportieren Fracht in

Richtung der Minusenden, also in Richtung des Zellinneren, während hingegen die meisten Kinesine in Richtung der Plusenden, d. h. in den meisten Zelltypen in Richtung der Zellperipherie wandern.



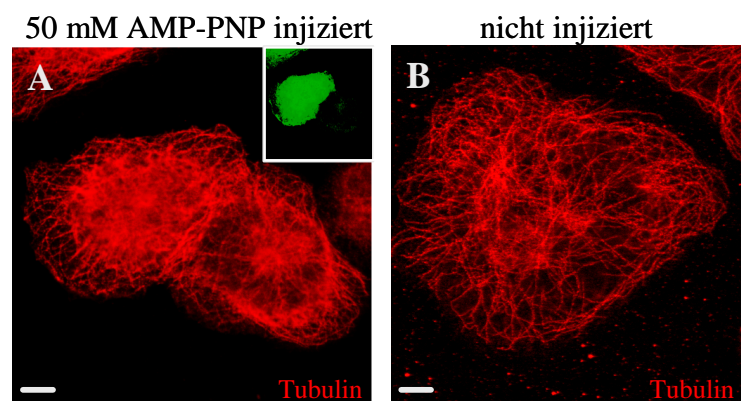
**Abb. 3-3. Podosomenbildung ist abhängig von ATP-Hydrolyse.**

**A- D:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 7 Tage alter primärer humaner Makrophagen, die mit Puffer (**A, B**) oder 50 mM AMP-PNP (**C, D**) mit Ratten-IgG (grün, Inset) als Injektionsmarker injiziert und nach 0 (**A, C**) bzw 45 min (**B, D**) fixiert wurden. Zur Sichtbarmachung der Podosomen wurde F-Aktin (rot) mit Alexa-568-Phalloidin angefärbt. Weißer Balken: 10  $\mu$ m.

**E:** Quantifizierung der Podosomenbildung. Hierfür wurden in 3 unabhängigen Experimenten je 30 injizierte Zellen gezählt. Als Kontrolle dienen Zellen, die nur mit Mikroinjektionspuffer injiziert wurden. Die Prozentsätze für injizierte Zellen sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Um einen ersten Hinweis auf die Beteiligung eines solchen ATP-verbrauchenden Vorgangs zu erhalten, wurden primäre humane Makrophagen mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogon AMP-PNP (Adenosin-5( $\beta$ , $\gamma$ -imido)-triphosphat) injiziert. Für die Untersuchung der Podosomenbildung kann man sich hierbei ein Artefakt der Mikroinjektionsprozedur zunutze machen: Durch hohen Injektionsdruck wurden die Podosomen reversibel zerstört (Linder *et al.*, 2000a), bildeten sich aber innerhalb von 30 min wieder aus (siehe Abb. 3-3A, B). Direkt nach Injektion wiesen nur noch  $8,9\% \pm 7,2\%$  der injizierten Zellen Podosomen auf, nach 45 min Inkubation zeigten  $79,2\% \pm 11,0\%$  der Zellen Podosomen. Injizierte man hingegen 50 mM AMP-PNP, so ging die Bildung der Podosomen 45 min nach der Zerstörung auf  $36,7\% \pm 9,0\%$  zurück (siehe Abb. 3-3C, D, E).

Um auszuschließen, dass die Injektion von AMP-PNP die Mikrotubulistabilität beeinflusst, (Infante *et al.*, 2000) wurden primäre humane Makrophagen mit 50 mM AMP-PNP injiziert und das Mikrotubuli-Zytoskelett angefärbt. Im Vergleich mit Mikrotubuli nicht-injizierter Zellen ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen (siehe Abb. 3-4)

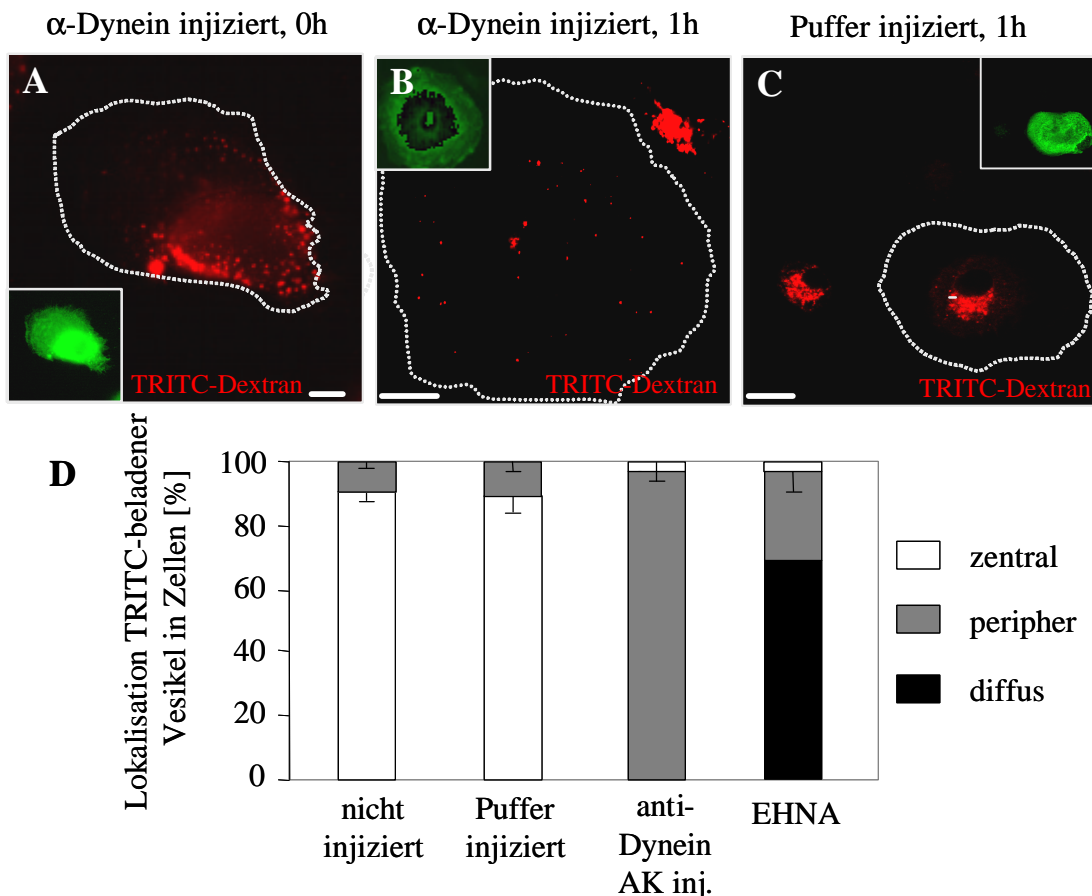


**Abb. 3-4. AMP-PNP hat keinen schädigenden Einfluss auf das Mikrotubuli-Zytoskelett**

**A, B:** Konfokalmikroskopische Aufnahme 7 Tage alter primärer humaner Makrophagen, die **A** mit 50 mM AMP-PNP und Ratten-IgG als Injektionsmarker (grün) injiziert, 1 h inkubiert und das Mikrotubuli-Zytoskelett mit anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörper rot angefärbt wurden. Der Vergleich mit **B**, einer nicht injizierten Zelle, zeigt, dass die Injektion mit 50 mM AMP-PNP keinen Einfluss auf die Mikrotubuli hat. Weißer Balken: 10  $\mu$ m.

### 3.3. Dynein-Inhibition hat keinen Effekt auf die Podosomenbildung

Podosomen werden von Mikrotubuli kontaktiert und reguliert (Linder *et al.* 2000 und Punkt 3.1.), wobei womöglich ein Transportvorgang eine Schlüsselrolle spielt. Um einen möglichen Einfluss eines Dyneins zu untersuchen, wurde ein inhibitorischer Antikörper gegen zytoplasmatisches Dynein (Steffen *et al.*, 1997) in primäre humane Makrophagen injiziert. Zunächst wurde die hemmende Wirkung des Antikörpers überprüft: bei einer Hemmung des Transportes durch Dynein werden lysosomale Vesikel nicht mehr ins Zellinnere transportiert (Burkhardt *et al.*, 1997; Steffen *et al.*, 1997), (Schliwa *et al.*, 1984; Harada *et al.*, 1998).



**Abb. 3-5. Nachweis der hemmenden Wirkung eines inhibitorischen Dynein-Antikörpers: Blockierung des Transportes von TRITC-Dextran zu den Lysosomen**

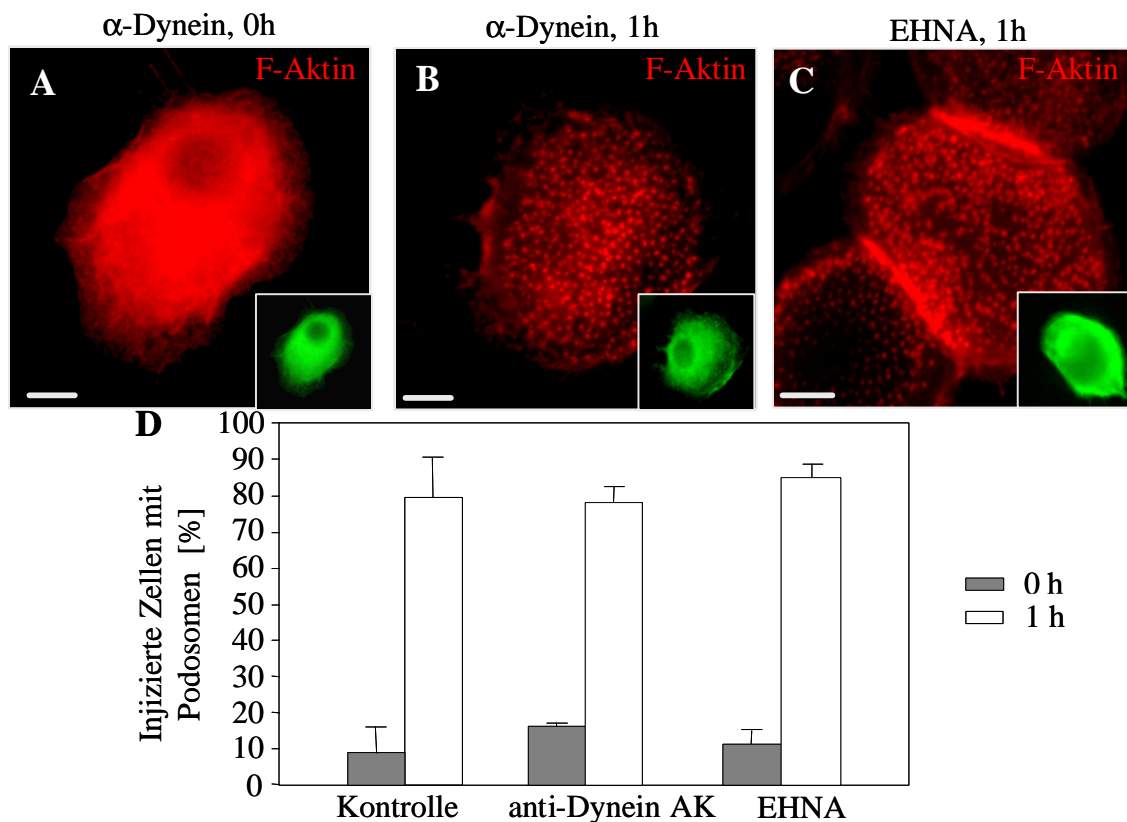
**A, B, C:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme 8 Tage alter primärer humaner Makrophagen, die 5 min mit TRITC-Dextran inkubiert, (**A, B**) mit m74.2 (4  $\mu$ g/ $\mu$ l), einem inhibitorischen Antikörper gegen Dynein injiziert oder (**C**) mit Puffer injiziert wurden und sofort (**A**) oder nach 45 min (**B, C**) fixiert wurden. Zur besseren Darstellung der Zellen wurden diese weiß umrandet. Weißer Balken: 10  $\mu$ m.

**D:** Quantifizierung der Lokalisierung von TRITC-Dextran-beladenen Vesikeln nach 1 h. Hierfür wurden in 3 unabhängigen Experimenten je 30 injizierte Zellen gezählt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Mikroinjektionspuffer injiziert wurden. Zusätzlich wurde in einem weiteren Ansatz 1mM des chemischen Dynein-Inhibitors EHNA injiziert. Die Prozentsätze für injizierte Zellen sind als Mittelwerte + Standardabweichung dargestellt

Zur Visualisierung wurde der *fluid-phase*-Marker Dextran benutzt, an den ein TRITC-Farbstoff gekoppelt ist. Inkubiert man Zellen in einem *pulse-chase*-Experiment zunächst für 5 min in TRITC-Dextran-haltigem Medium und anschließend für 45 min in TRITC-Dextran-freiem Medium, wird der *fluid-phase*-Marker von den Zellen in Vesikeln aufgenommen und innerhalb von 45 min in das Zellinnere zu den Lysosomen transportiert (siehe Abb. 3-5A und C), in 90%  $\pm$  2,6% der Zellen sind die Vesikel nach 45 min zentral angeordnet. Injiziert man Puffer vor Zugabe von TRITC-Dextran, so akkumulieren die Vesikel ebenso im Zellinneren (siehe Abb. 3-5C), jedoch nicht, wenn man den inhibitorischen Antikörper gegen Dynein m74.2 injiziert. Das TRITC-Dextran wird zwar noch in Vesikel aufgenommen, diese bleiben aber im gesamten Zytoplasma verteilt (Abb 3-5B). Das gleiche Bild ergibt sich bei Hemmung des Dyneins durch den chemischen

Inhibitor Erythro-9-(2-Hydroxy-3-Nonyl)Adenin EHNA (Schliwa *et al.*, 1984). Nur  $3,3\% \pm 0,0\%$  EHNA-injizierte Zellen weisen zentrale TRITC-Dextran-beladene Vesikel auf. Hier jedoch erscheint das aufgenommene TRITC-Dextran häufig nicht als distinkte Vesikel, sondern diffus in der Zelle verteilt ( $68,9\% \pm 5,3\%$  der injizierten Zellen).

Eine Inhibition von Dynein durch den inhibitorischen Antikörper konnte in Fischfibroblasten bereits gezeigt werden (Krylyshkina *et al.*, 2002). Dynein kann auch in primären humanen Makrophagen durch die Injektion des inhibitorischen Antikörpers bzw. EHNA gehemmt werden



**Abb. 3-6. Mikroinjektion eines inhibitorischen Dynein-Antikörpers bzw. eines Dynein-Inhibitors hat keinen Effekt auf die Podosomen-Bildung**

**A, B, C:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme 7 Tage alter primärer humaner Makrophagen, die mit m74.2 ( $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), einem inhibitorischen Antikörper gegen Dynein (**A, B**) bzw. mit EHNA ( $1 \text{ mM}$ ) (**C**), einem Dynein-Inhibitor und Ratten-IgG als Injektionsmarker injiziert und sofort (**A**) oder nach 45 Min (**B, C**) fixiert wurden. F-Aktin wurde mit Alexa-568-Phalloidin (rot) angefärbt. Weißer Balken:  $10 \mu\text{m}$

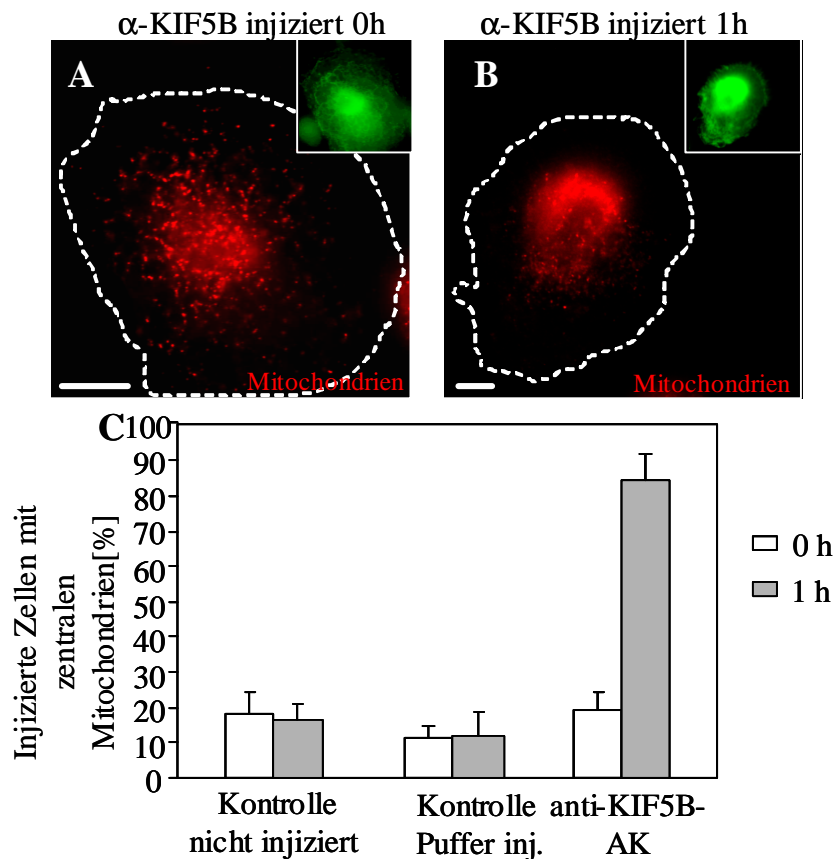
**D:** Quantifizierung der Podosomenbildung: Primäre humane Makrophagen wurden wie oben beschrieben injiziert und in 3 unabhängigen Experimenten je 30 Zellen gezählt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Mikroinjektionspuffer injiziert wurden. Die Prozentsätze für injizierte Zellen sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Um eine mögliche Beteiligung von Dynein an der Podosomenbildung zu untersuchen, wurden primäre humane Makrophagen wie beschrieben injiziert und der Anteil podosomenhaltiger Zellen ermittelt. Podosomen wurden wie bereits erwähnt durch den hohen Injektionsdruck zerstört (siehe Abb. 3-6A, D: mit Puffer injizierte Zellen mit Podosomen:  $8,9\% \pm 7,2\%$ ; mit Antikörper gegen Dynein injizierte Zellen mit Podosomen  $15,6\% \pm 1,5\%$ , mit EHNA injizierte Zellen mit Podosomen:  $11,0\% \pm 3,9\%$ ). Nach einstündiger Inkubation werden sowohl in pufferinjizierten als auch in Zellen, die mit dem inhibitorischen Antikörper gegen Dynein bzw. EHNA injiziert wurden (Abb. 3-6B, C), die Podosomen in  $79,2\% \pm 11,0\%$  (Kontrolle),  $80,0\% \pm 6,8\%$  (Dynein-Antikörper) bzw.  $81,1\% \pm 3,9\%$  (EHNA) der Zellen wieder gebildet. Dynein spielt bei der Podosomenbildung also keine Rolle.

### **3.4. Untersuchung der Beteiligung verschiedener Kinesine an der Podosomenbildung**

#### **3.4.1. Inhibition von konventionellem Kinesin hat keinen Effekt auf die Podosomenbildung**

Die Hemmung von Dynein hatte keinen Einfluss auf die Podosomenbildung (siehe Punkt 3.3.) Kinesine stellen die zweite große Gruppe der Motoren dar, die sich am Mikrotubuli-Zytoskelett entlang bewegen. Arbeiten aus dem Labor von J.V. Small zeigten, dass fokale Adhäsionen durch konventionelles Kinesin, KIF5B, reguliert werden. (Krylyshkina *et al.*, 2002). Da fokale Adhäsionen in ihrer Zusammensetzung eine große Ähnlichkeit zu Podosomen aufweisen, wurde im Folgenden untersucht, ob auch bei der Regulation von Podosomen KIF5B eine Rolle spielt. Zu diesem Zweck wurde zunächst in Analogie zu Punkt 3.3. (Hemmung von Dynein) ein inhibitorischer Antikörper gegen KIF5B, SUK4 (Ingold *et al.*, 1988) in primäre humane Makrophagen injiziert. Auch hier wurde zunächst die hemmende Wirkung des Antikörpers überprüft, wobei in diesem Fall die Lokalisation von Mitochondrien als phänotypische Auswirkung herangezogen wurde. Mitochondrien werden von KIF5B in Richtung Zellperipherie transportiert, so dass sie in der Zelle gleichmäßig verteilt sind (Krylyshkina *et al.*, 2002). Eine Hemmung von KIF5B hat zur Folge, dass dieser Transport ausbleibt, und die Mitochondrien im Zellzentrum akkumulieren. Um auszuschließen, dass durch die Injektion *per se* die Verteilung der Mitochondrien gestört werden könnte, wurde die Lokalisation der Mitochondrien in injizierten und nicht-injizierten Zellen untersucht: Der größte Teil der Mitochondrien ist über die ganze Zelle verteilt (siehe Abb. 3-7C), nur  $17,7\% \pm 6,5\%$  bzw.  $15,5\% \pm 5,4\%$  der Zellen weisen nach einstündiger Inkubation zentrale Mitochondrien auf. Ebenso verhalten sich mit Puffer injizierte Zellen:  $11,1\% \pm 3,9\%$  bzw.  $12,2\% \pm 6,5\%$  zeigen nach einstündiger Inkubation eine Akkumulation der Mitochondrien im Zellzentrum. Wurde hingegen der inhibitorische Antikörper SUK4 gegen KIF5B injiziert, so steigt der Anteil der zentral angeordneten Mitochondrien von  $18,9\% \pm 5,3\%$  (siehe Abb. 7A, C) auf  $83,3\% \pm 7,7\%$  nach einstündiger Inkubation (siehe Abb. 3-7B, C) an. Der inhibitorische Antikörper blockiert demnach den Transport der Mitochondrien auch in primären humanen Makrophagen, d.h. der Antikörper wirkt hemmend auf KIF5B.

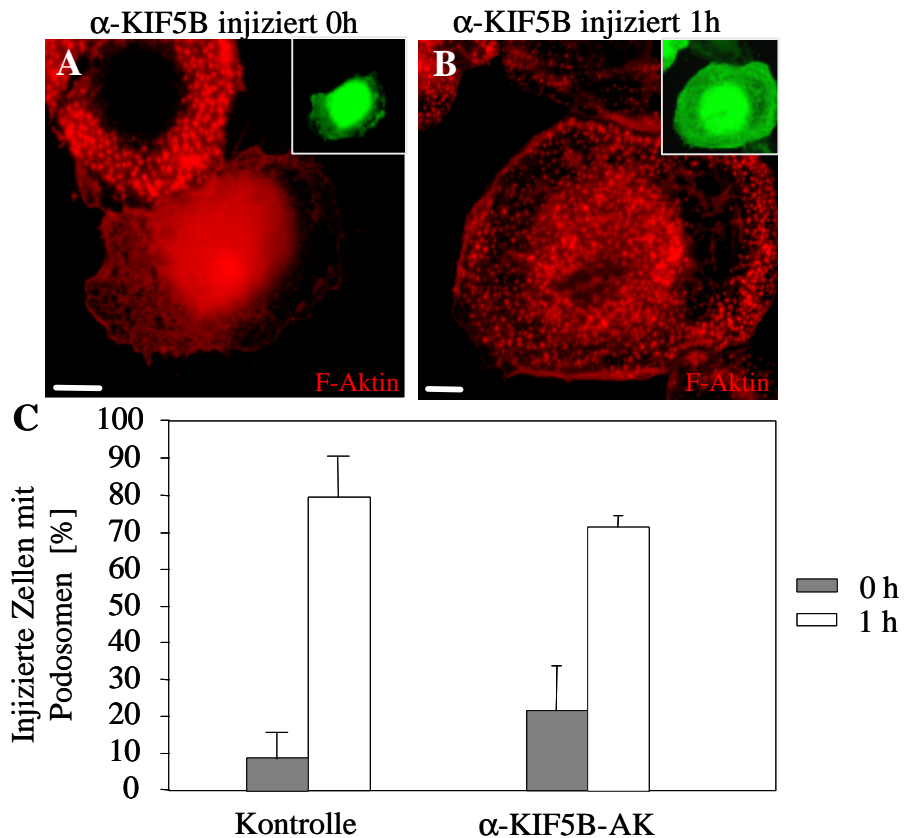


**Abb.3-7: Nachweis der hemmenden Wirkung eines inhibitorischen KIF5B-Antikörpers**

**A, B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 8 Tage alter primärer humaner Makrophagen, die mit SUK4 (4  $\mu$ g/ $\mu$ l), einem inhibitorischen Antikörper gegen KIF5B mit Ratten-IgG (grün) als Injektionsmarker injiziert und direkt (**A**) oder nach 1 h (**B**) fixiert wurden. Mitochondrien wurden mit einem Antikörper gegen Cytochrom-c-Oxidase Komplex IV angefärbt (rot). Zur besseren Darstellung der Zellen wurden diese weiß umrandet. Weißer Balken: 10  $\mu$ m

**C:** Quantifizierung der Mitochondrienlokalisierung: Primäre Makrophagen wurden wie oben beschrieben injiziert und in 3 unabhängigen Experimenten je 30 Zellen gezählt. Als Kontrolle dienen Zellen, die nur mit Mikroinjektionspuffer injiziert wurden. Die Prozentsätze für injizierte Zellen sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Im Folgenden konnte deshalb eine Beteiligung von KIF5B an der Podosomen-Regulation untersucht werden. Hierzu wurden primäre humane Makrophagen mit SUK4 injiziert und die Podosomen untersucht. Wie bereits erwähnt, wurden durch den hohen Injektionsdruck die Podosomen reversibel zerstört, so dass zum Zeitpunkt 0 h nur noch 8,9%  $\pm$  7,2% der mit Puffer injizierten Zellen und 22,2%  $\pm$  12,1% der mit dem inhibitorischen Antikörper injizierten Zellen Podosomen aufwiesen (Abb. 3-8A, C). Nach einstündiger Inkubation werden in 79,2%  $\pm$  11,0% der mit Puffer injizierten Zellen wieder Podosomen gebildet, allerdings auch in den mit SUK4 injizierten Zellen: 72,2%  $\pm$  3,0% der Zellen weisen Podosomen auf (Abb. 3-8B, C). Konventionelles Kinesin KIF5B spielt also anders als bei fokalen Adhäsionen keine Rolle bei der Podosomenbildung



**Abb. 3-8. Mikroinjektion eines inhibitorischen KIF5B-Antikörpers hat keinen Effekt auf die Podosomen-Bildung**

**A, B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme 7 Tage alter primärer humaner Makrophagen, die mit SUK4 (4  $\mu$ g/ $\mu$ l), einem inhibitorischen Antikörper gegen KIF5B (**A, B**) und Ratten-IgG als Injektionsmarker injiziert und sofort (**A**) oder nach 1 h (**B**) fixiert wurden. F-Aktin wurde mit Alexa-568-Phalloidin (rot) angefärbt. Weißer Balken: 10  $\mu$ m.

**C:** Quantifizierung der Podosomenbildung. Primäre Makrophagen wurden wie oben beschrieben injiziert und in 3 unabhängigen Experimenten je 30 Zellen gezählt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Mikroinjektionspuffer injiziert wurden. Die Prozentsätze für injizierte Zellen sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

#### 3.4.2. Transfektion mit verschiedenen Kinesin-Konstrukten

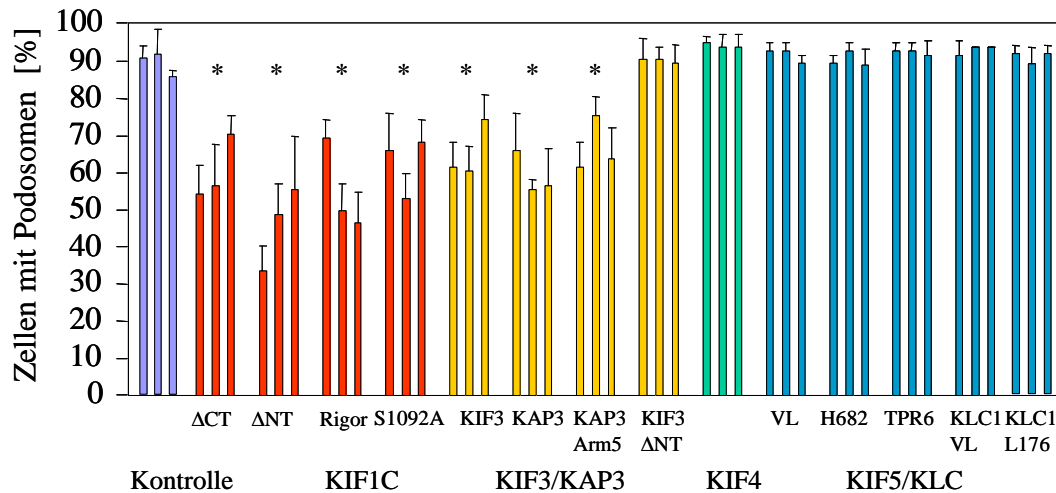
Die bisherigen Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu: Podosomen werden von Mikrotubuli-Plusenden kontaktiert, die Podosomenbildung ist von einer ATP-Hydrolyse abhängig, jedoch spielt Dynein keine Rolle. Das konventionelle Kinesin KIF5B hat keinen Einfluss auf Podosomen.

Um ein oder mehrere andere Kinesine zu identifizieren, die bei der Regulation von Podosomen beteiligt sein könnten, wurden primäre humane Makrophagen mit verschiedenen Kinesin-Konstrukten transfiziert. Es wurden Kinesine ausgeschlossen, die gewebespezifisch exprimiert werden oder eine Rolle in der Mitose spielen.

Src-Kinase ist ein zentraler Regulator der Podosomen (Tarone *et al.*, 1985b; Marchisio *et al.*, 1987). Hemmt man die Src-Kinase mit dem spezifischen Inhibitor PP2, werden Podosomen reversibel zerstört. Nach einstündiger Inkubation in PP2-freiem Medium werden wieder Podosomen gebildet.



Nach Transfektion der verschiedenen Kinesin-Trunktionskonstrukte, Konstrukte mit Punktmutationen oder Volllängenkonstrukte wurden die Podosomen mit PP2 reversibel zerstört und eine Stunde ohne PP2 inkubiert und die Makrophagen auf Podosomen untersucht. Von den eingesetzten Kinesinkonstrukten zeigten KIF1C und KIF3A/B/KAP3 einen Einfluss auf die Podosomenbildung (siehe Abb. 3-9). KIF5B-Konstrukte zeigten keine Wirkung, was die Ergebnisse aus 3.4.1. bestätigt.



**Abb. 3-9. Einfluss der transienten Transfektion mit Kinesin-Konstrukten in primären humanen Makrophagen**

7 bis 8 Tage alte primäre humane Makrophagen wurden mit jeweils 2 µg DNA des jeweiligen Kinesin- oder KLC-Konstrukts transfiziert, 4, 6 und 8 h inkubiert. Durch 25 µM PP2 wurden die Podosomen reversibel zerstört und die Zellen 1 h in PP2-freiem Medium inkubiert. F-Aktin wurde mit Alexa586-Phalloidin angefärbt. In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit pEGFP-N1 transfiziert wurden. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. \*: p < 0,05

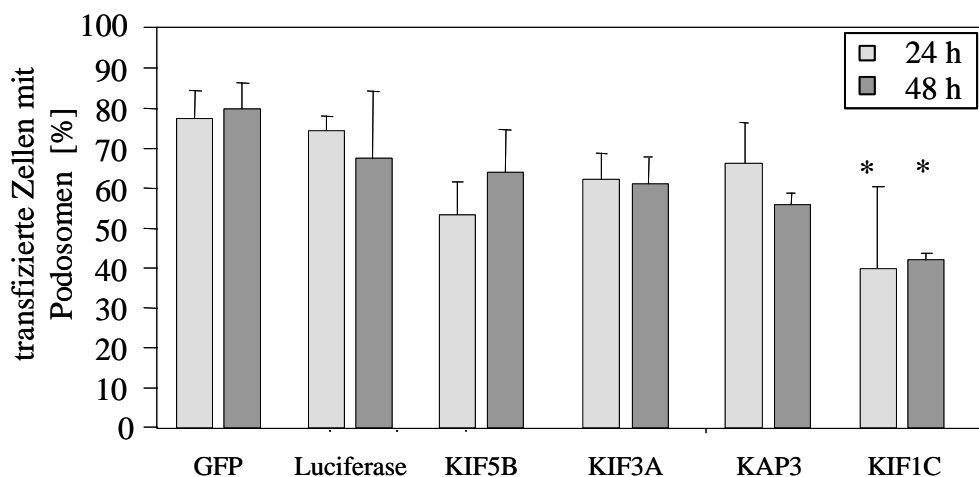
### 3.4.3. Auswirkungen eines RNAi-induzierten *knock-down* ausgewählter Kinesine auf die Podosomenbildung

Zur Überprüfung der Ergebnisse der transienten Transfektion von verschiedenen Kinesinen (Punkt 3.4.2.) wurde die RNAi-Technologie angewandt (Übersicht bei Tuschl, 2001; Hannon, 2002; Tijsterman *et al.*, 2002). RNAi steht für *RNA interference* und dient dem *knock-down* von Genen auf RNA-Ebene. RNAi ist ein posttranskriptioneller *Silencing*-Mechanismus, der bei vielen Organismen von Pflanzen über Pilze bis hin zu Säugern zu finden ist. Der Abbau der mRNA eines Zielproteins und die damit verbundene Reduktion der Proteinmenge wird durch sogenannte „*small interfering RNAs*“, kurz siRNAs, von 21 nt Länge vermittelt.

Für diejenigen Kinesine, die in 3.4.3. einen Effekt auf die Podosomenbildung zeigten, wurden RNAi-Experimente durchgeführt. Als nochmalige Überprüfung wurde KIF5B verwendet, da in Punkt 3.4.1. gezeigt wurde, dass es keinen Einfluss auf die Podosomenbildung hat. Für KIF3A, KAP3A und KIF1C wurden in Kooperation mit dem EURIT-

Projekt des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie (Berlin) siRNA-Duplex-Moleküle entworfen und mittels RT-PCR validiert. Die Validierung per RT-PCR ergab hierbei einen *knock-down* von 84,0% für KIF5B, 90,2% für KIF3A, 85,2% für KAP3A und 97,8% für KIF1C. Anschließend wurden primäre humane Makrophagen mit diesen siRNA-Duplex-Molekülen transfiziert und die Auswirkungen der unterschiedlichen siRNAs auf die Podosomenbildung untersucht (siehe Abb. 3-10). Als Kontrollen wurde einerseits pEGFP-N1 als Kontrolle für einen möglichen Einfluss der Transfektion *per se* auf die Podosomenbildung, andererseits siRNA gegen Luciferase als unspezifische siRNA eingesetzt.

Nur der *knock-down* von KIF1C zeigte eine deutliche Verringerung des Anteils der transfizierten Makrophagen: 40,0%  $\pm$  18,0% (24h) bzw. 42,0%  $\pm$  2,0% (48h) der Zellen zeigten Podosomen. Die siRNA-induzierte verminderte Expression von KIF5B, KIF3A, KAP3A verringerte den Anteil der Zellen mit Podosomen nur auf 54,4%  $\pm$  8,4 (24h, KIF5B), 65,6%  $\pm$  10,7 (48h); 63,3%  $\pm$  6,7% (24h KIF3A), 62,2%  $\pm$  6,9% (48h); 67,8%  $\pm$  10,2% (24h, KAP3A), 56,7%  $\pm$  3,3 % (48h), was im Vergleich zu den Kontrollen mit 78,0%  $\pm$  7,9 (24h, GFP), 80,0  $\pm$  7,0 (48h) und 74,0%  $\pm$  4,0 (24h, Luciferase), 68,0  $\pm$  17,0% (48h) keinen signifikanten Unterschied darstellt.



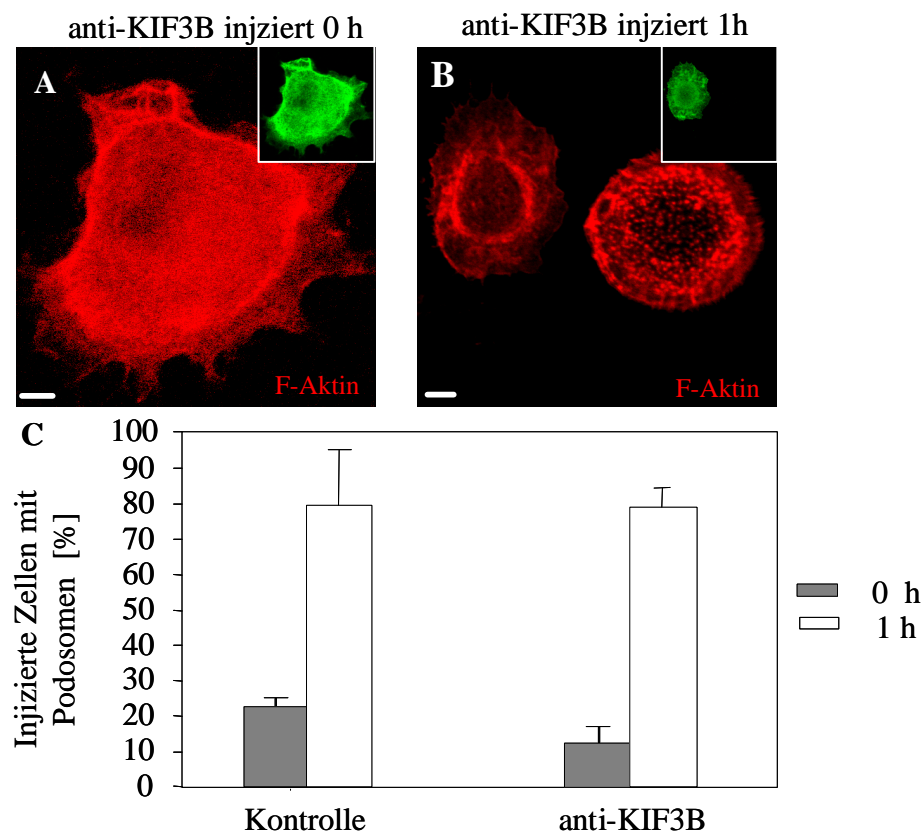
**Abb 3-10. Auswirkungen des siRNA-induzierten *knockdowns* von ausgewählten Kinesinen auf die Podosomenbildung**

7 Tage alte primäre humane Makrophagen wurden mit siRNA transfiziert und 24 und 48 h inkubiert, als Transfektionsmarker wurde pEGFP-N1 verwendet. F-Aktin wurde mit Alexa586-Phalloidin gefärbt und in 3 unabhängigen Experimenten je 30 Zellen gezählt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit pEGFP-N1 bzw. mit siRNA gegen Luciferase transfiziert wurden. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. \*:  $p < 0,05$

### 3.4.4. Auswirkung von KIF3 auf die Podosomenbildung.

Transfektionen mit Konstrukten, die für KIF3A/B/KAP3 kodierten, zeigten einen schwachen Effekt auf die Podosomenbildung (Punkt 3.4.2.), wohingegen siRNA-induzierte verminderte Expression dieser Gene keinen Einfluss auf die Podosomen hatte (Punkt 3.4.3). Wegen dieser widersprüchlichen Ergebnisse wurde ein eventuell inhibitorisch wirkender Antikörper gegen KIF3B, K2.4. (Morris und Scholey, 1997) in primäre humane Makrophagen injiziert (siehe Abb. 3-11). Nach Zerstörung der Podosomen durch den Injektionsdruck (mit Puffer injizierte Zellen:  $22,2\% \pm 1,5\%$ , anti-KIF3B:  $11,8\% \pm 4,6\%$  zum Zeitpunkt 0 h), wiesen nach einstündiger Inkubation  $80,0\% \pm 2,6\%$  der mit Puffer injizierten Zellen Podosomen auf, der Anteil der mit inhibitorischem Antikörper gegen KIF3B injizierten Zellen mit Podosomen war jedoch mit  $78,9\% \pm 5,1\%$  fast genauso hoch wie in den Kontrollzellen.

KIF3B scheint demnach keinen Einfluss auf die Podosomenbildung zu haben.



#### Abb 3-11. Mikroinjektion eines Antikörpers gegen KIF3B

**A, B:** 7 Tage alte Primäre humane Makrophagen wurden mit  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  anti-KIF3B-Antikörper mit Ratten-IgG als Injektionsmarker injiziert und sofort (**A**) oder nach 1 h (**B**) fixiert. Weißer Balken:  $10 \mu\text{m}$ . F-Aktin wurde mit Alexa586-Phalloidin sichtbar gemacht und in 3 unabhängigen Experimenten wurde das Vorhandensein von Podosomen in je 30 Zellen untersucht (**C**). Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Puffer injiziert wurden. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

### 3.5. KIF1C

#### 3.5.1. Nachweis der Expression von KIF1C in primären humanen Makrophagen

Da der *knock-down* von KIF1C im Gegensatz zu dem von heterotrimerem Kinesin KIF3A/B und auch in den Transfektionsversuchen (siehe Punkte 3.4.2. und 3.4.3.) zu einer Verringerung des Anteils von Zellen mit Podosomen geführt hat, wurde der Einfluss dieses Kinesins auf die Podosomen im Folgenden genauer charakterisiert.

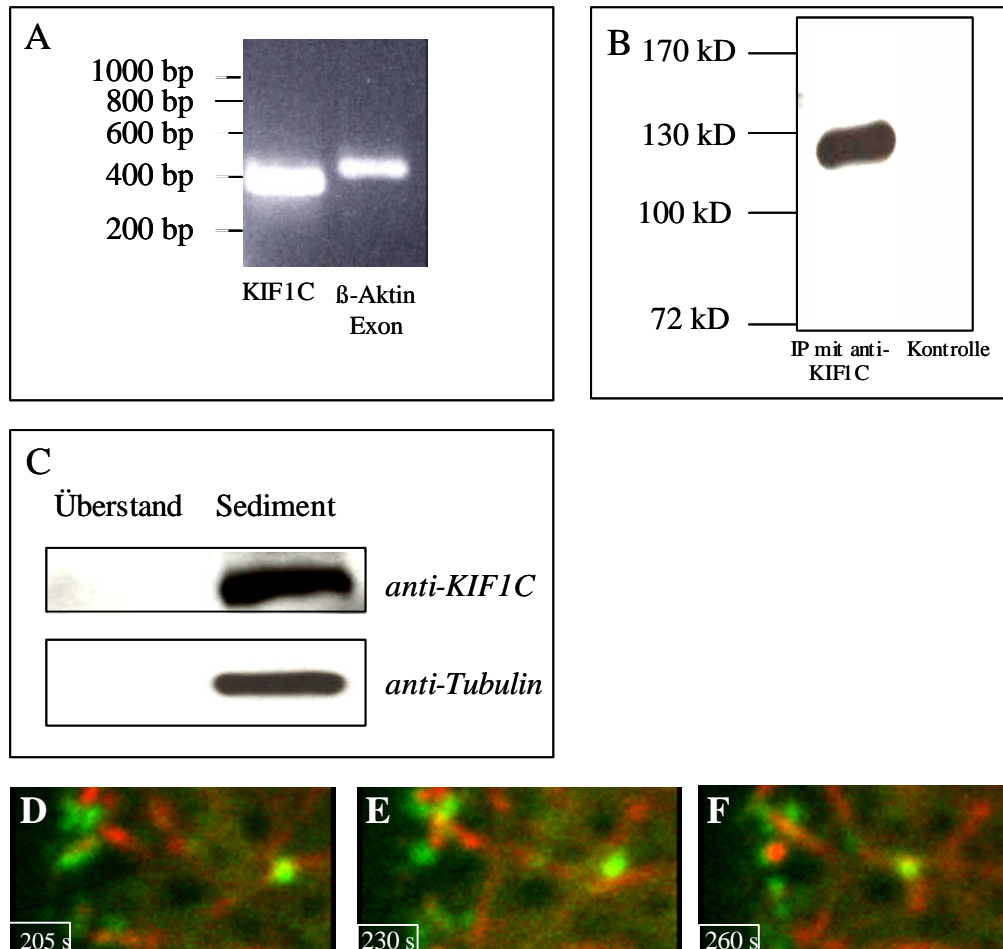
Zunächst wurde überprüft, ob KIF1C in primären humanen Makrophagen exprimiert wird. Hierzu wurden zwei Ansätze verfolgt: über Reverse Transkriptase-PCR wurde mit spezifischen Oligonukleotiden für KIF1C (Dorner *et al.*, 1998) mRNA aus Makrophagen in cDNA überführt (siehe Abb. 3-12A), als Kontrolle der vollständigen Entfernung von genomischer DNA wurden Oligonukleotide spezifisch für ein Exon im Gen für  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Bei vollständigem Verdau der genomischen DNA ergibt sich nur eine Bande von 446 bp, da hier ausschließlich gespleißte mRNA in cDNA überführt wurde. Sollte noch genomische DNA vorhanden sein, so ergäbe sich eine zusätzliche größere Bande von 652 bp, da hier noch Introns enthalten sind.

Das Signal bei 400 bp zeigt, dass KIF1C in primären humanen Makrophagen auf mRNA-Ebene vorhanden ist.

Als Nachweis und zur Anreicherung des Proteins wurde eine Immunpräzipitation aus Makrophagen-Lysat mit einem Antikörper gegen KIF1C durchgeführt. Abb. 3-12B zeigt das Signal für KIF1C im *Western Blot*, KIF1C kann also auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von KIF1C wurden die Mikrotubuli in einem Makrophagen-Lysat mit Taxol stabilisiert und Kinesine mit dem nicht-hydrolyisierbaren ATP-Analogon AMP-PNP irreversibel an die Mikrotubuli gebunden. Abb. 3-12C zeigt die Signale für KIF1C und Tubulin in der Sedimentfraktion eines Mikrotubuli-Kosediment-Versuches im *Western Blot*. Wie für einen Mikrotubuli-basierten Motor zu erwarten, bindet KIF1C an Mikrotubuli und kann mit diesem ko-präzipitiert werden.

Für Live Cell Imaging-Versuche wurde der Vektor pEGFP-KIF1C hergestellt, d.h. an das Wildtyp-KIF1C-Gen wurde das Gen für EGFP angefügt. Abb. 3-12D, E, F zeigt einen Ausschnitt aus der Zellperipherie einer konfokalmikroskopischen Aufnahme eines lebenden primären humanen Makrophagen, der mit pEGFP-KIF1C und dem für das +TIP-Protein EB1 kodierende Plasmid pmRFP-EB1 transfiziert wurde. GFP-KIF1C lokalisiert deutlich an den Spitzen der mit mRFP-EB1 markierten Mikrotubuli-Plusenden. Diese vesikelähnlichen Strukturen bewegen sich aktiv entlang der Mikrotubuli. Immunfluoreszenzaufnahmen der ventralen Seite von primären humanen Makrophagen, die mit pEGFP-KIF1C transfiziert wurden und in denen Tubulin mit anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörper sichtbar gemacht wurde, zeigen eine vesikelartige Lokalisation von KIF1C an der Zellperipherie, das sich teilweise mit Tubulin überlagert.



**Abb. 3-12. KIF1C wird in primären humanen Makrophagen exprimiert und bindet an Mikrotubuli**

**A:** Reverse Transkriptase-PCR-Produkt eines KIF1C-Primerpaars (links), Kontrollreaktion mit Primerpaar spezifisch für ein  $\beta$ -Aktin-Exon.

**B:** Immunologischer Nachweis von KIF1C in einer Immunpräzipitation primärer humaner Makrophagen mit einem KIF1C-Antikörper, als Kontrolle zur Überprüfung von unspezifischen Bindungen an die Protein A-Sepharose-Kugeln wurde Kaninchen-IgG eingesetzt

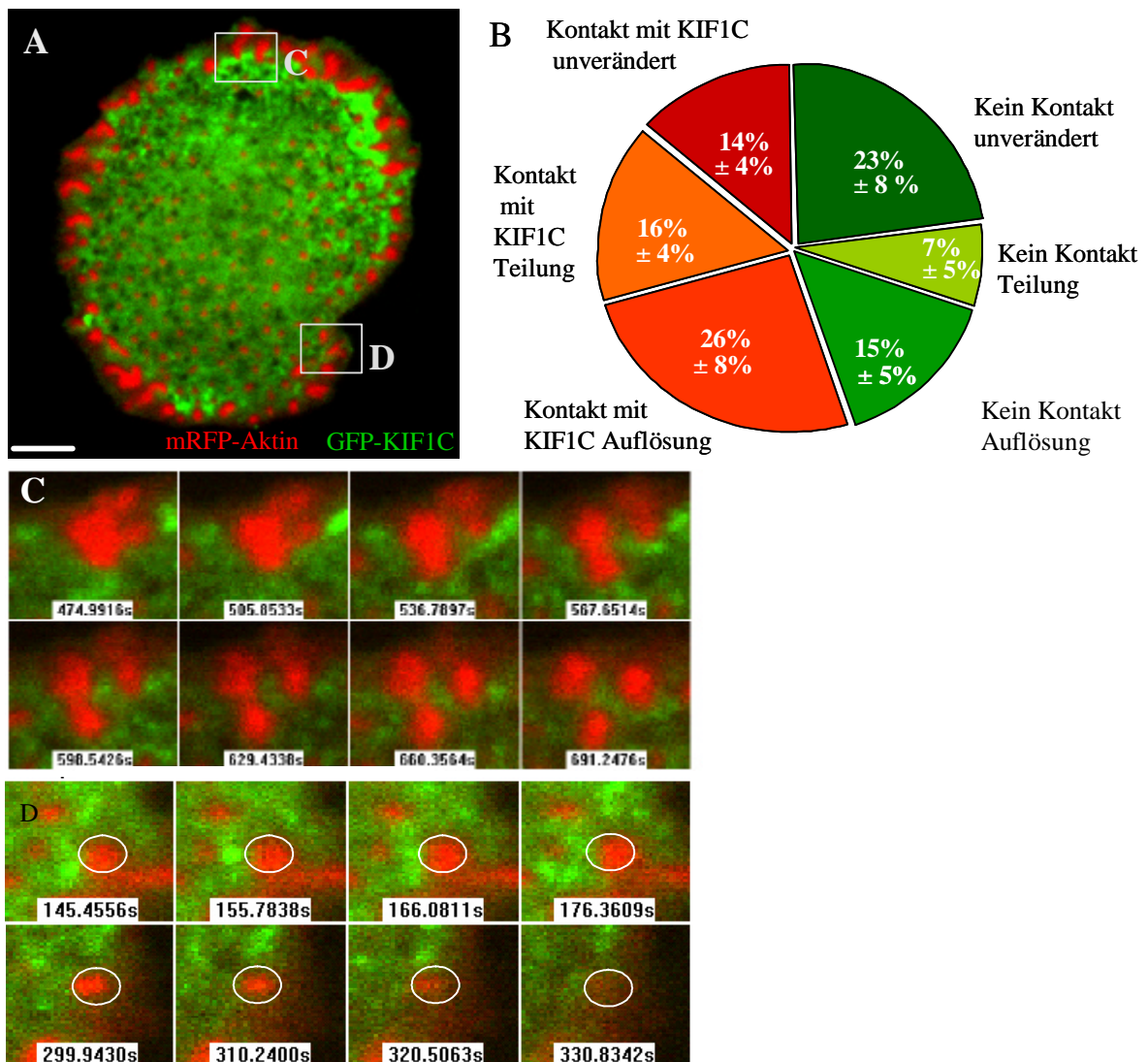
**C:** KIF1C kosedimentiert mit polymerisierten und mit Taxol stabilisierten Mikrotubuli. Durch Zugabe von AMP-PNP (4 mM) bindet KIF1C reversibel an Mikrotubuli und kann mit ihnen sedimentiert werden. Immunologischer Nachweis von KIF1C bzw.  $\beta$ -Tubulin in der Überstands- bzw. Sedimentfraktion

**D, E, F:** Konfokalmikroskopische Momentaufnahmen zur Lokalisation von GFP-KIF1C (grün) und mRFP-EB1 (rot) in einem lebenden Makrophagen, gelbe Färbung zeigt die Kolo-kalisation an: Die Insets geben die Sekunden seit Beginn des Filmes an. Man erkennt, wie sich ein GFP-KIF1C-Vesikel entlang der mRFP-EB1-markierten Mikrotubuli fortbewegt.

### 3.5.2. KIF1C reguliert Podosomen

#### 3.5.2.1. Podosomenverhalten bei Einsatz des Wildtyp-Proteins

Wie die Ergebnisse der Transfektionen mit verschiedenen Kinesin-Konstrukten und die RNAi-Versuche zeigten, hat KIF1C einen deutlichen Einfluss auf die Podosomenbildung (siehe Punkte 3.4.2. und 3.4.3. Beobachtet man das Verhalten der Podosomen und GFP-KIF1C in lebenden primären humanen Makrophagen (siehe Abb. 3-13, Film 2), so zeigt sich, dass GFP-KIF1C-Vesikel Podosomen kontaktieren und diese Kontakte in Analogie zu den Ergebnissen aus 3.1 zu deren Teilung oder Auflösung führen.

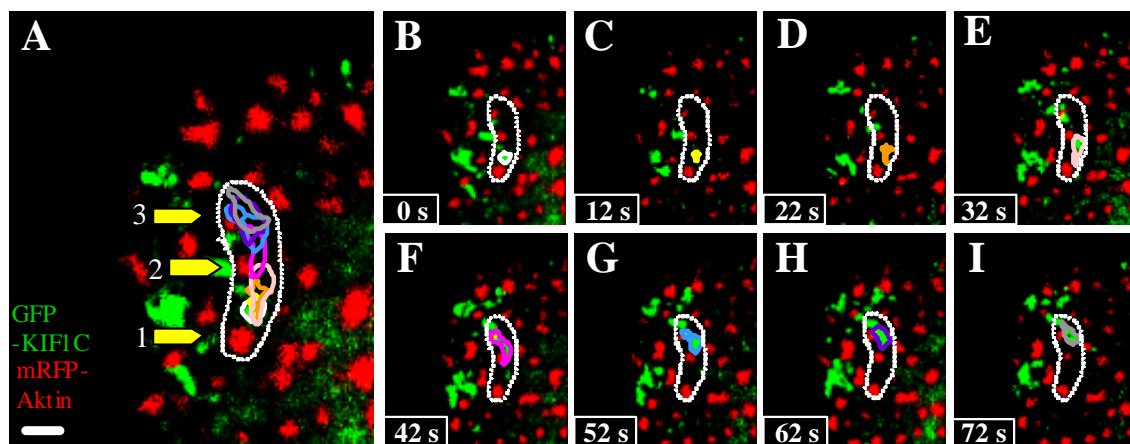


**Abb 3-13. KIF1C kontaktiert Podosomen und führt teilweise zu deren Auflösung oder Teilung**

**A:** Konfokalmikroskopische Aufnahme eines 8 Tage alten lebenden primären humanen Makrophagen, der transient mit pEGFP-KIF1C (grün) und pmRFP-Aktin (rot) transfiziert wurde. Weißer Balken: 10  $\mu$ m **B,** Quantifizierung des Podosomenverhaltens. Sämtliche Podosomen aus 4 Filmen mit 10 min Länge wurden gezählt und in im Text angegebene Kategorien eingeteilt. Die Prozentsätze für die einzelnen Kategorien sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. **C** und **D** zeigen je eine Sequenz einer Ausschnittsvergrößerung eines bestimmten Zellbereichs aus dem Filmmaterial **A.** In **C** ist der kurze Kontakt von GFP-KIF1C (grün) mit einem Podosomen Precursor Cluster (rot) zu sehen, welcher sich daraufhin in 3 Tochterpodosomen teilt. In **D** führt der Kontakt zur Auflösung des Podosoms.

Die quantitative Auswertung dieser Beobachtung ergab, dass 56% der gesamten Podosomen von GFP-KIF1C kontaktiert werden. Hiervon lösen sich  $26\% \pm 8\%$  auf (siehe Abb. 3-13B, D, Film 2B),  $16\% \pm 4\%$  der Podosomen teilen sich in 2 oder mehr Tochterpodosomen (siehe Abb. 3-13B, C, Film 2A) und  $14\% \pm 4\%$  der kontaktierten Podosomen bleiben unverändert. 45% der Podosomen wurden während des Beobachtungszeitraumes nicht von GFP-KIF1C kontaktiert, davon teilten sich  $7\% \pm 5\%$ ,  $15\% \pm 5\%$  lösten sich auf und  $23\% \pm 8\%$  zeigten keine Veränderung. Im Vergleich der kontaktierten mit nicht-kontaktierten ist zu erkennen, dass die Hälfte der nicht-kontaktierten Podosomen unverändert blieb, wohingegen dies nur bei einem Viertel der von GFP-KIF1C kontaktierten Podosomen der Fall war. Fast die Hälfte aller kontaktierten Podosomen löst sich auf, ein Drittel teilt sich in Tochterpodosomen.

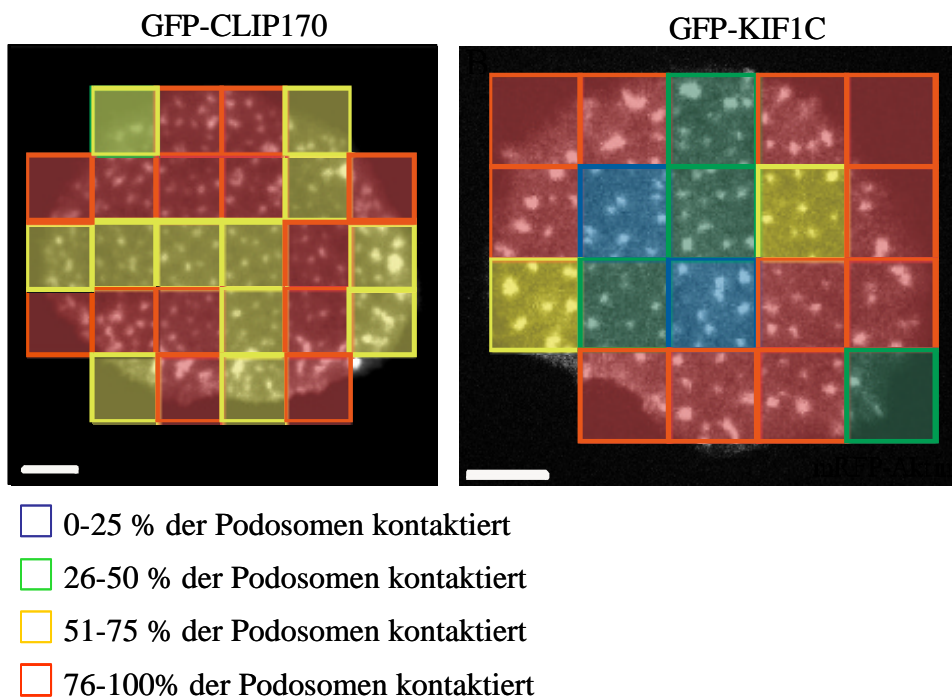
Verfolgt man den Weg eines GFP-KIF1C-Vesikels innerhalb einer lebenden Zelle (siehe Abb. 3-14), so zeigt sich, dass GFP-KIF1C erst ein Podosom (siehe Abb. 3-14, gelber Pfeil: Nr.1) kontaktierte und in den nächsten 42 Sekunden zu einem benachbarten Podosom weiterwanderte (siehe Abb. 3-14, gelber Pfeil Nr.2). In den nächsten 30 Sekunden wanderte das GFP-KIF1C-Vesikel weiter zu einem weiteren Podosom (siehe Abb. 3-14, gelber Pfeil Nr. 3). GFP-KIF1C scheint zwischen Podosomen zu wandern und nacheinander mehrere Podosomen zu kontaktieren.



**Abb. 3-14. GFP-KIF1C kontaktiert mehrere Podosomen nacheinander**

**A-I:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen eines lebenden primären humanen Makrophagen, der transient mit pEGFP-KIF1C (grün) und mRFP-Aktin (rot) transfiziert wurde. **B-I** Zur Visualisierung wurde eine GFP-KIF1C-Akkumulation verschiedenfarbig umrandet. Die nacheinander kontaktierten drei Podosomen wurden mit gestrichelter Linie umrandet, um die relative Position des GFP-KIF1C-Vesikels besser erkennen zu können. Die Insets geben die Sekunden seit Beginn des Filmes an. **A:** Die Umrandungen aus **B-I** wurden in **A** kopiert, um den Weg des GFP-KIF1C-Vesikels verfolgen zu können. Die gelben Pfeile zeigen die nacheinander kontaktierten Podosomen. Weißer Balken: 1  $\mu$ m.

Vergleicht man die Wechselwirkungen zwischen GFP-CLIP170-markierten Plusenden und Podosomen mit denen zwischen GFP-KIF1C und Podosomen, so fällt auf, dass es Bereiche unterschiedlichen Verhaltens gibt (siehe Abb. 3-15): GFP-CLIP170 kontaktiert Podosomen unabhängig von der Zellregion; GFP-KIF1C lokalisiert vorrangig in der Zellperipherie und kontaktiert hauptsächlich nur dort Podosomen. Es besteht anscheinend ein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Podosomendynamik in Abhängigkeit von der Zellregion und dem Verhalten von GFP-KIF1C.



**Abb. 3-15. Podosomen in der Zellperipherie werden von GFP-KIF1C bevorzugt kontaktiert.**  
**A, B:** Konfokalmikroskopische Aufnahme 9 Tage alter lebender primärer humaner Makrophagen, die transient mit pmRFP-Aktin und pEGFP-CLIP170 (**A**) bzw. pEGFP-KIF1C (**B**) transfiziert wurden. Sämtliche Podosomenkontakte während des Beobachtungszeitraumes von 15 min wurden mit Hilfe eines auf das Bild gelegten Zählrasters gezählt und die Region je nach Kategorie eingefärbt. Weißer Balken: 10  $\mu$ m

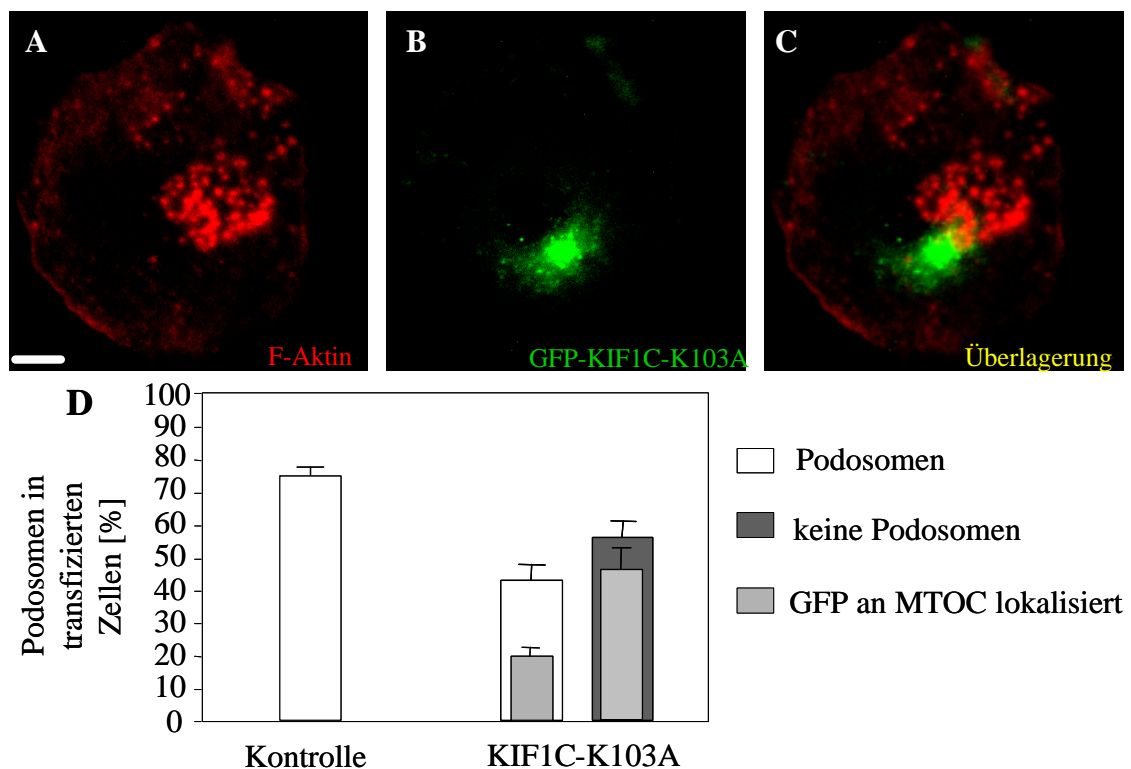
### 3.5.2.2. Podosomenverhalten bei Fehlen des funktionellen Motors

#### 3.5.2.2.1 K103A-KIF1C

Molekulare Motoren können durch Punktmutation des ATP-Bindemotivs GXXXXGKS/T, auch Walker-Motiv A genannt, in einen sogenannten Rigor-Zustand versetzt werden, d.h. sie binden ATP, können aber das gebundene ATP nicht hydrolysieren, so dass sie fest an Mikrotubuli binden (Nakata und Hirokawa, 1995). Es wird noch kontrovers diskutiert, welche Konsequenzen sich daraus für den mikrotubulibasierten Transport ergibt: bei einer ausreichenden Menge an mutiertem Protein könnten sämtliche Wege für Kinesine blockiert werden, diese Situation wird auch *roadblock* genannt.



Um die Rolle von KIF1C bei der Podosomen-Regulation genauer charakterisieren zu können, wurde eine Punktmutation an Position 103 in KIF1C in das Walker-Motiv A eingeführt, welche in einer Rigor-Mutante resultieren sollte, d.h. in diesem Fall kann KIF1C-K103A ATP zwar binden, aber nicht hydrolysieren, da Lysin 103 durch Alanin ersetzt wurde. Primäre humane Makrophagen wurden mit der möglichen Rigor-Mutante pEGFP-KIF1C-K103A transfiziert und die Podosomenbildung untersucht. Zur Zerstörung der Podosomen wurde PP2 eingesetzt, nur ein geringer Anteil,  $2,2\% \pm 1,5\%$  der Zellen wies direkt nach Ende der Inkubation mit PP2 (Zeitpunkt 0 h) Podosomen auf, nach einstündiger Inkubation hatten  $74,4\% \pm 1,5\%$  der Zellen wieder Podosomen (siehe Abb. 3-16D, Kontrolle). Über die Hälfte ( $55,6\% \pm 7,8\%$ ) der mit der KIF1C Rigor-Mutante transfizierten Zellen zeigten abnorm große oder verklumpte Podosomen, eine stark verringerte Anzahl pro Zelle (unter 20) oder gar keine Podosomen.  $44,4\% \pm 7,8\%$  der transfizierten Zellen wiesen normale Podosomen in üblicher Anzahl auf.

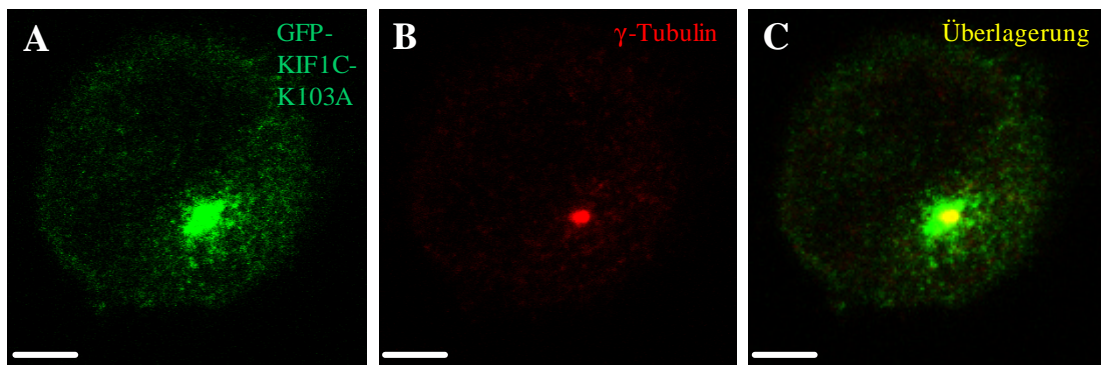


**Abb 3-16. Einfluss einer KIF1C-„Rigor“-Mutante auf Podosomen**

**A, B, C:** Konfokalmikroskopische Aufnahme eines 8 Tage alten primären humanen Makrophagen, der transient mit der Rigor-Mutante pEGFP-KIF1C-K103A (**A**, grün) transfiziert wurde, F-Aktin wurde mit TRITC-Phalloidin angefärbt (**B**, rot), **C** zeigt eine Überlagerung von **A** und **B**. Weißer Balken: 10  $\mu\text{m}$  **D:** Transfektion mit GFP-KIF1C-K103A führt zu einer Reduktion der Podosomenzahl. Primäre humane Makrophagen wurden mit pEGFP-KIF1C-K103A transfiziert, für 8 h inkubiert, anschließend für 1 h mit 25  $\mu\text{M}$  PP2 behandelt und nach 1 h Inkubation in PP2-freiem Medium fixiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit pEGFP-N1 transfiziert wurden. In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. \*:  $p < 0,01$

Auffällig war eine Akkumulation des GFP-Signals am MTOC. Diese Lokalisation des GFP-KIF1C am MTOC war in  $45,6\% \pm 14,1\%$  der Zellen mit abnormen/weniger/keinen Podosomen zu finden, hingegen nur in  $16,7\% \pm 2,6\%$  der Zellen mit normalen Podosomen. Es scheint also eine Korrelation zwischen Lokalisation am MTOC und abnormen Podosomen zu bestehen.

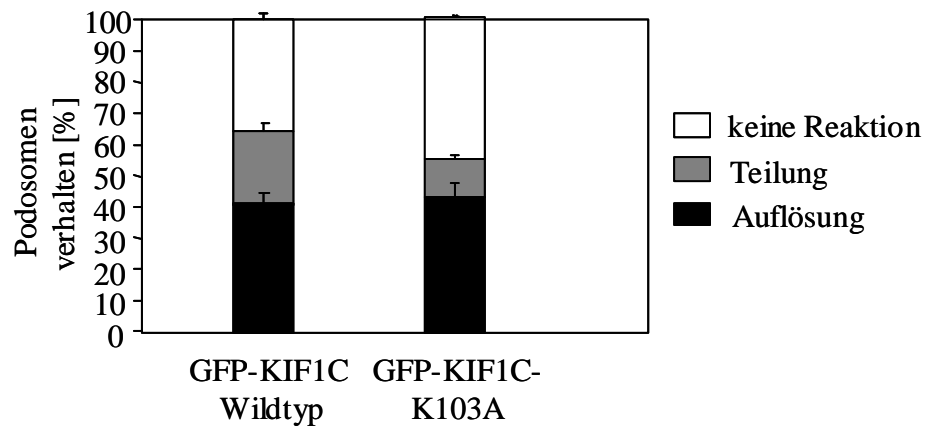
Zur Überprüfung, dass sich es hierbei um das MTOC (*Microtubule-organizing center*) handelt, wurde in fixierten Makrophagen  $\gamma$ -Tubulin angefärbt, die mit pEGFP-KIF1C-K103A transfiziert wurden. Abb.3-17 zeigt die Lokalisierung von KIF1C-K103A und  $\gamma$ -Tubulin. In der Überlagerung ist eine Anhäufung von KIF1C-K103A am MTOC zu sehen. In Zellen, die GFP stärker exprimierten, war das Signal auch entlang von Mikrotubuli zu erkennen. Für ein Rigor-Kinesin wäre eine solche Lokalisation entlang der Mikrotubuli und im Zentrum der Zellen denkbar.



**Abb. 3-17: GFP-KIF1C-K130A akkumuliert am MTOC.**

Konfokalmikroskopische Aufnahme eines 8 Tage alten primären humanen Makrophagen, der transient mit der Rigor-Mutante pEGFP-KIF1C-K103A (A, grün) transfiziert wurde, das MTOC wurde mit einem Antikörper gegen  $\gamma$ -Tubulin angefärbt (B, rot), C zeigt eine Überlagerung von A und B. Weißer Balken: 10  $\mu$ m

Das Verhalten von Podosomen in mit „Rigor“-Kinesin transfizierten Zellen wurde auch in lebenden Makrophagen untersucht. Hier wurden sämtliche Podosomen beobachtet, eine Einteilung in kontaktierte und nicht-kontaktierte war nicht möglich, da GFP-Rigor-KIF1C nicht an der ventralen Seite der Makrophagen zu finden war, sondern, wie bereits beschrieben, in der Nähe des Kerns, bzw. am MTOC. Die Zellen wiesen deutlich generell weniger Podosomen auf (siehe Abb 3-16). Im Vergleich mit Zellen, die mit dem GFP-Wildtyp-KIF1C transfiziert wurden, (siehe Abb. 3-18), war der Anteil der Podosomen, die sich auflösen, fast unverändert:  $41,3\% \pm 3,1\%$  gegen  $42,2\% \pm 6,2\%$ , jedoch war der Anteil der sich teilenden Podosomen verringert:  $23,3\% \pm 3,2\%$  im Vergleich zu  $11,7\% \pm 2,4\%$ . Der Prozentsatz der unveränderten Podosomen war mit  $36,3\% \pm 1,9\%$  leicht niedriger in Wildtyp- als in Rigor-transfizierten Zellen ( $46,2\% \pm 8,0\%$ ).



### Abb 3-18. Einfluss einer KIF1C-Rigor-Mutante auf Podosomen

Quantifizierung des Podosomenverhaltens in 9 Tage alten lebenden primären humanen Makrophagen. Die Makrophagen wurden mit pEGFP-KIF1C-K103A und mRFP-Aktin transfiziert und für 18 h inkubiert. Sämtliche Podosomen aus 3 Filmen mit 10 min Länge wurden untersucht und in die im Text angegebenen Kategorien eingeteilt. Die Prozentsätze für die einzelnen Kategorien sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

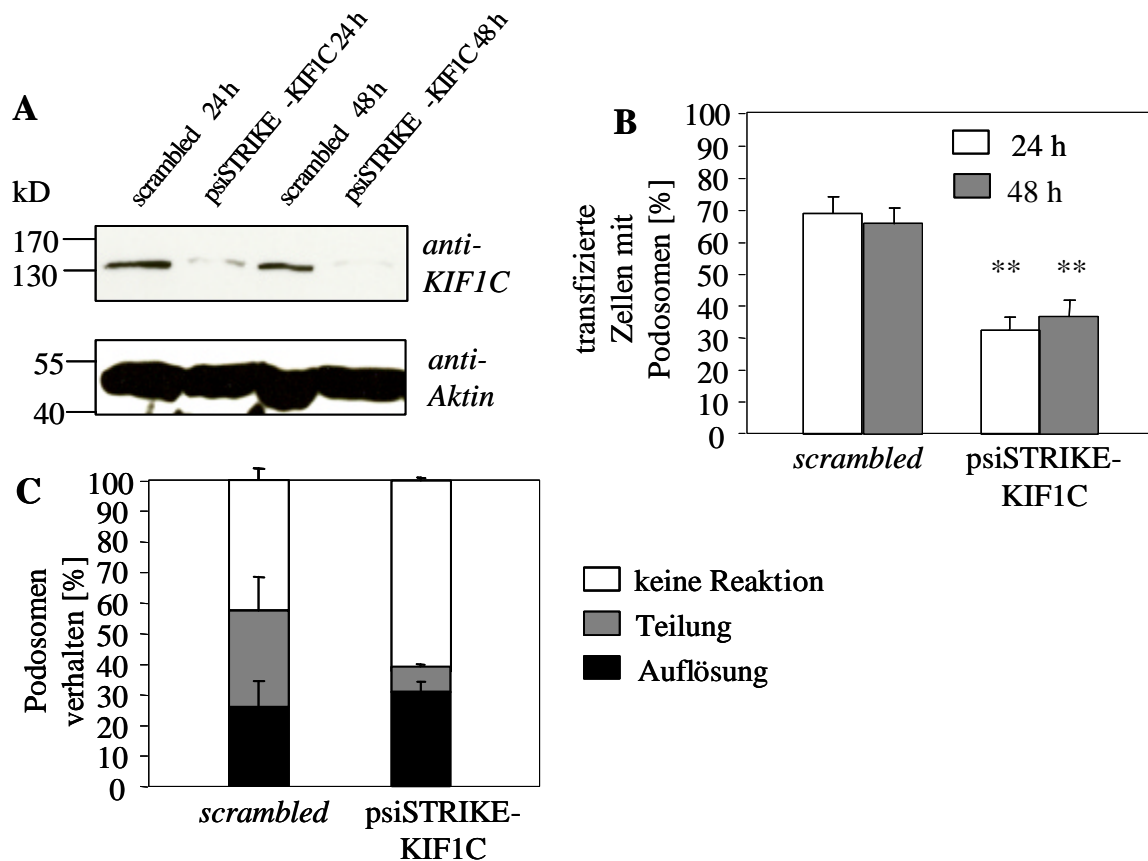
Um einen möglichen Einfluss der K103A-Mutante auf die Mikrotubuli zu untersuchen, wurden *Live Cell Imaging* Experimente mit Makrophagen durchgeführt, die transient mit pEGFP-KIF1C-K103A und pDsRed-EB1 transfiziert wurden. KIF1C-K103A lokalisierte wie bereits beschrieben im Zentrum der Zellen, das Verhalten der mit DsRed-EB1-markierten Mikrotubuli-Plusenden unterschied sich nicht von Zellen, die mit pEGFP-KIF1C, also dem Wildtyp transfiziert wurden.

#### 3.5.2.2.2. *knock-down* von KIF1C

Sowohl der *knock-down* von KIF1C als auch die Überexpression und die Transfektion mit pEGFP-KIF1C-Rigor zeigt einen Einfluss auf die Podosomenbildung. Im Folgenden wurde nun das Verhalten von Podosomen in lebenden und fixierten humanen primären Makrophagen in *knock-down*-Versuchen beobachtet. Hierzu wurde das Vektor-basierte siRNA-System psiSTRIKE eingesetzt. Eine gegen KIF1C gerichtete Zielsequenz wurde in den bicistronischen Vektor ligiert, transfizierte Zellen exprimieren außer der Zielsequenz zusätzlich GFP. Dies hat gegenüber der Transfektion mit siRNA-Duplex-Molekülen den Vorteil, transfizierte Zellen mit Sicherheit identifizieren zu können. Zum Nachweis des *knock-downs* wurden HUVEC eingesetzt, da primäre humane Makrophagen eine zu geringe Transfektionseffizienz für eine biochemische Untersuchung aufweisen, um die Verringerung des KIF1C-Proteins in transfizierten gegenüber den nicht-transfizierten Zellen in der Gesamtproteinfraktion erkennen zu können. Abb. 3-19A zeigt, dass im Vergleich zu einer *scrambled* siRNA-Sequenz das Signal für KIF1C geringer ist. Durch den *knock-down* ist also die Proteinmenge von KIF1C reduziert.

Auf Einzelzellebene ist eine deutlich geringere Anzahl der Zellen mit Podosomen zu beobachten (siehe Abb. 3-19B): nach 24 h Expression weisen nur 32,2%  $\pm$  3,9% der Zellen Podosomen auf, nach 48 h 36,7%  $\pm$  5,1%. In Makrophagen, die als Negativkontrolle mit der Zielsequenz mit einer randomisierten Basenabfolge transfiziert (sogenannte *scrambled*

Sequenzen) wurden, haben nach 24 h  $68,9\% \pm 5,9\%$  und nach 48 h  $65,6\% \pm 5,3\%$  der transfizierten Zellen Podosomen. Dies bestätigt den Einfluss von KIF1C auf die Podosomenbildung.



**Abb. 3-19: knock-down von endogenem KIF1C verringert die Podosomenzahl**

**A:** Reduktion von endogenem KIF1C in HUVEC mittels RNAi-Technik. HUVEC wurden mit psiSTRIKE mit Targetsequenz gegen KIF1C (Spuren 2, 4) oder mit der *scrambled* Sequenz (Spuren 1, 3) transfiziert und nach 24 bzw. 48 h lysiert. In allen vier Spuren wurden gleiche Proteinmengen auf ein 12,5 % SDS-Gel geladen. Die Expression von KIF1C wurde mit anti-KIF1C-Antikörper nachgewiesen. Der obere Teil der Abbildung zeigt die durch die Targetsequenz hervorgerufene Reduktion der Expression. Der untere Teil der Abbildung zeigt anhand der Detektion von Aktin mittels anti-Aktin-Antikörper den Einsatz ungefähr gleicher Proteinmengen.

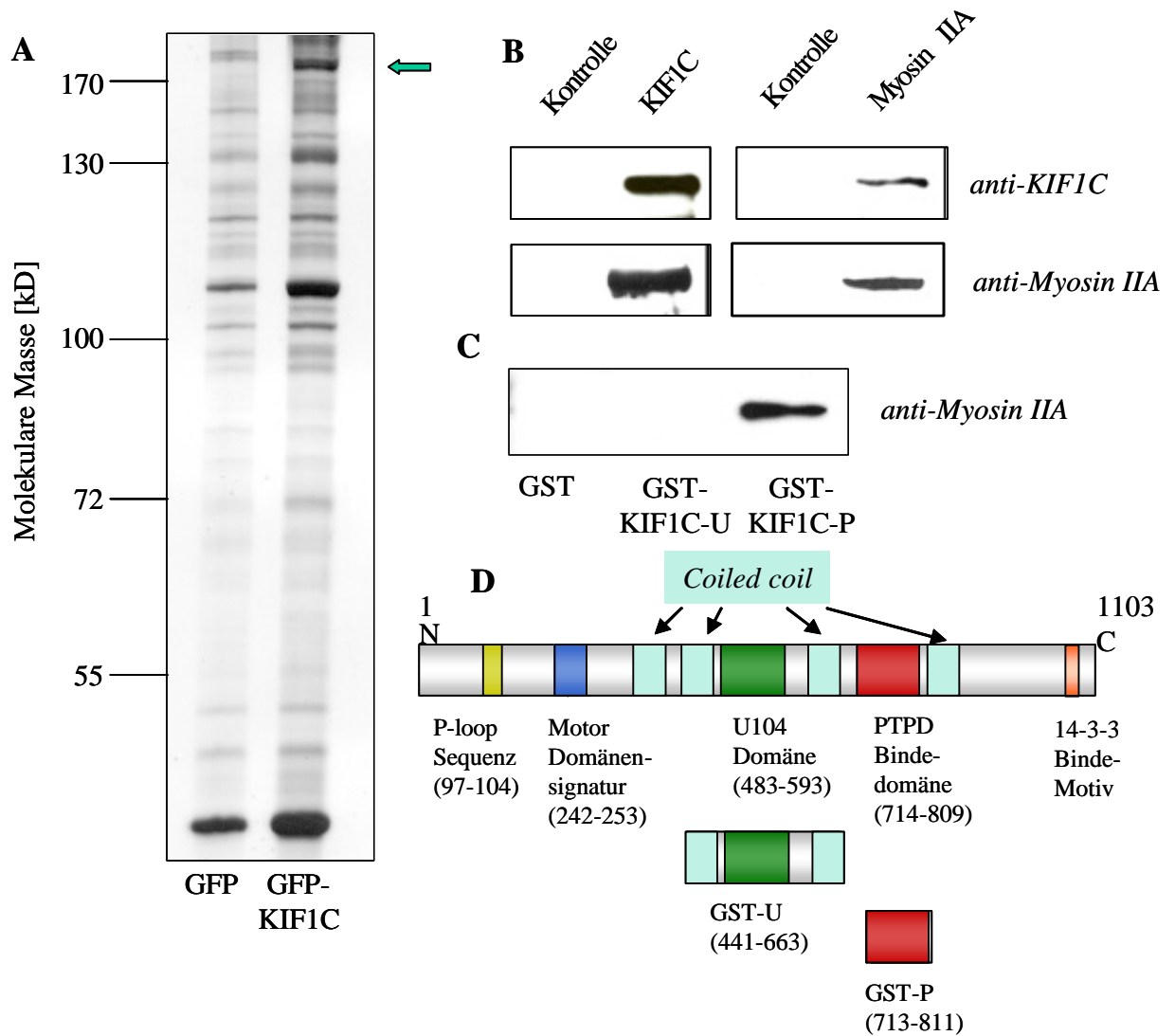
**B:** Primäre humane Makrophagen wurden mit psi-STRIKE transfiziert, der eine gegen KIF1C gerichtete Zielsequenz enthielt, für 24 h und 48 h inkubiert und F-Aktin mit Alexa568-Phalloidin angefärbt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einer *scrambled* Zielsequenz transfiziert wurden. In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. \*\*:  $p < 0.01$

**C:** Quantifizierung des Podosomenverhaltens in lebenden Makrophagen. Primäre humane Makrophagen wurden mit psiSTRIKE mit einer Zielsequenz gegen KIF1C und mRFP-Aktin bzw. mit einer *scrambled* Sequenz transfiziert und für 24 h inkubiert. Sämtliche Podosomen aus 3 Filmen mit 10 min Länge wurden untersucht ( $n = 501$  für KIF1C und  $n = 473$  für *scrambled*) und in oben angegebene Kategorien eingeteilt. Die Prozentsätze für die einzelnen Kategorien sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt \* $p < 0,09$

In lebenden Makrophagen ist der Anteil der sich auflösenden Podosomen im Vergleich zu mit *scrambled*-transfizierten Zellen fast gleich:  $29,6\% \pm 9,0\%$  gegenüber  $23,1\% \pm 5,0\%$ , (siehe Abb. 3-18C), der Anteil sich teilender Podosomen jedoch ist mit  $13,8\% \pm 7,4\%$  gegenüber  $30,6\% \pm 10,7\%$  stark verringert, der Anteil der unveränderten Podosomen stieg mit  $63,0\% \pm 10,2\%$  im Vergleich zu  $42,5\% \pm 3,9\%$  stark an. Durch den *knock-down* ist demnach der Anteil der Podosomenteilungen verringert. Die Vermutung liegt nahe, dass KIF1C für die Regulation der Teilung beteiligt ist.

### 3.5.3. Interaktionspartner Myosin IIA

Kontakte zwischen KIF1C und Podosomen in lebenden Makrophagen führen in der Hälfte der Fälle zu deren Teilung oder Auflösung. Transfektionen einer möglichen Rigor-Mutante von KIF1C und *knock-down* von KIF1C haben eine verminderte oder gestörte Bildung von Podosomen in fixierten Zellen zur Folge. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass KIF1C eine Rolle in der Regulation der Podosomen hat, womöglich durch den gezielten Transport eines regulatorischen Proteins, der u. U. zur Teilung der Podosomen führt. Es sollten deshalb Interaktionspartner für KIF1C gesucht werden. Abb. 3-20A zeigt ein mit Silbernitrat gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel einer Immunpräzipitation mit pEGFP-KIF1C-transfizierten HUVEC unter Verwendung eines Antikörpers gegen GFP. Wegen der geringen Transfektionseffizienz in Makrophagen musste hier auf HUVEC ausgewichen werden, die auch Podosomen bilden (Osiak *et al.*, 2005). Als Kontrolle für unspezifische Bindungen an GFP bzw. den GFP-Antikörper wurden Zellen verwendet, die mit dem Leervektor pEGFP-N1 transfiziert wurden. Es wurden Proteinsignale ausgewählt, die nicht in der GFP-Kontrolle der Immunpräzipitation auf dem Gel zu sehen waren und mittels Massenspektrometrie charakterisiert. Ein Proteinsignal mit einer molekularen Masse von ca. 230 kD wurde als Myosin IIA identifiziert. Diese Interaktion konnte in Immunpräzipitationen primärer humaner Makrophagen mit endogenem KIF1C bzw. Myosin IIA mit Antikörper gegen KIF1C bzw. Myosin IIA bestätigt werden. (siehe Abb. 3-20B). Sowohl in Immunpräzipitationen mit einem Antikörper gegen KIF1C konnte Myosin kopräzipitiert werden als auch KIF1C in Immunpräzipitationen mit Antikörper gegen Myosin IIA detektiert werden.

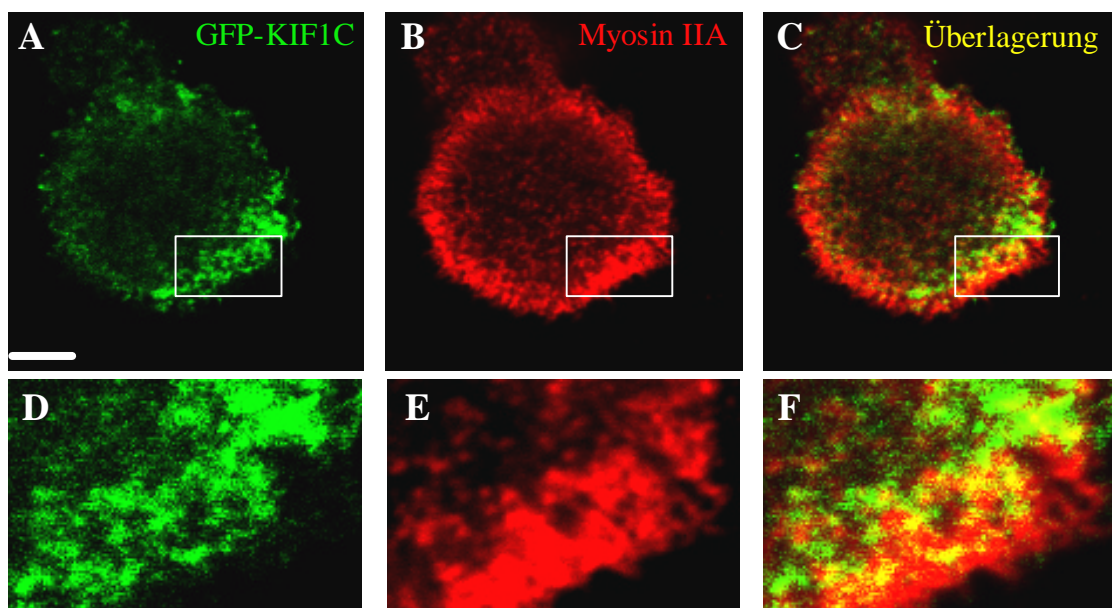


**Abb. 3-20. KIF1C bindet Myosin II**

**A:** Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels, auf das ein Aliquot der GFP-Immunpräzipitation aufgetragen wurde. HUVEC wurden transient mit pEGFP-KIF1C transfiziert, 24 h inkubiert und eine Immunpräzipitation gegen GFP durchgeführt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit pEGFP-N1 transfiziert wurden. Ausgewählte Banden wurden mit Hilfe von MALDI-TOF identifiziert. Der Pfeil weist auf eine Proteinbande, die als Nicht-Muskel-Myosin IIa identifiziert wurde. **B:** Immunologischer Nachweis von KIF1C und Myosin IIa in Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen KIF1C und Myosin IIa, als Kontrolle wurden Lysate ohne Antikörperzugabe verwendet. **C:** Immunologischer Nachweis von Myosin IIa in GST-pull-down-Versuchen mit GST-Domänen von KIF1C. Als Kontrolle wurde GST eingesetzt, GST-U umfasst die Unc104-Domäne von KIF1C, GST-P die PTPD1-Domäne. **D:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von KIF1C. 1 bezeichnet den N-Terminus, 1103 den C-Terminus, P: P-loop, UD: Unc-104-Domäne, PTPD: PTPD1-bindende Domäne, 14-3-3: 14-3-3-Protein-bindende Domäne.

Weiterhin wurden *GST-pull-downs* mit primären humane Makrophagen mit drei unterschiedlichen Domänen von KIF1C durchgeführt (Abb. 3-20C): bei Einsatz der Unc-104-Domäne (Aminosäuren 441-623) und der 14-3-3-Bindenden Domäne (Aminosäuren 970-1103) ergaben keine Signale im Western Blot für Myosin IIA, jedoch bei Verwendung der PTPD1-bindenden Domäne (Aminosäuren 713-811) von KIF1C. KIF1C enthält also eine Bindestelle für MyosinIIA, diese konnte auf diese Domäne eingeschränkt werden.

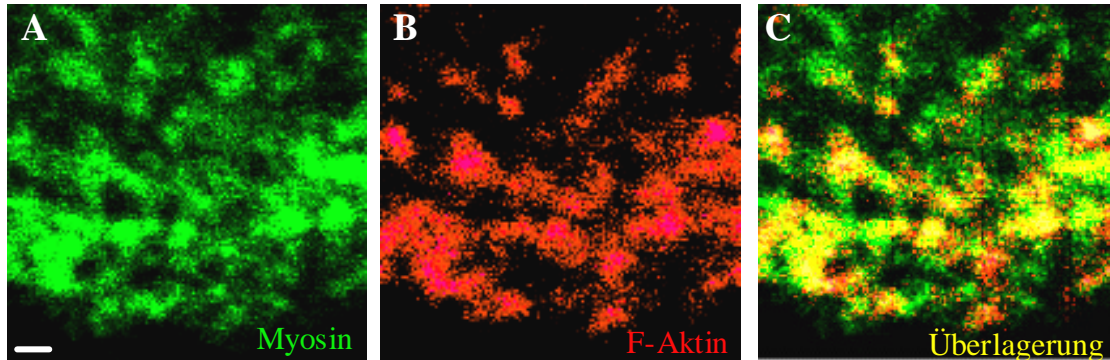
Da Myosin und KIF1C miteinander interagieren, wurde untersucht, ob beide Proteine in Makrophagen kolokalisieren. Dazu wurden primäre humane Makrophagen mit pEGFP-KIF1C transfiziert und Myosin mit anti-Myosin IIA-Antikörper sichtbar gemacht. Eine Färbung des endogenen KIF1C war leider nicht möglich, da sowohl der Antikörper gegen KIF1C als auch gegen Myosin aus der gleichen Tierspezies stammte und somit eine unterschiedliche Färbung unmöglich war. GFP-KIF1C ist vorrangig, wie bereits zuvor berichtet, an der Zellperipherie angereichert. Myosin IIA zeigt generell eine bevorzugte Lokalisierung an der Zellperipherie in perlschnurartigen Fasern, die senkrecht zum Zellrand verlaufen. An Bereichen hoher GFP-KIF1C- und Myosin IIA-Dichte liegt zudem eine Kolokalisierung vor (siehe Ausschnittsvergrößerung).



**Abb. 3-21. GFP-KIF1C und Myosin sind an der Zellperipherie an der Substratanheftungsebene angereichert**

**A-F:** Konfokalmikroskopische Aufnahme eines 8 Tage alten primären humanen Makrophagen, der mit pEGFP-KIF1C transient transfiziert wurde (**A, C, D, F**, grün), Myosin IIA wurde mit Myosin IIA-Antikörper sichtbar gemacht (**B, C, E, F**, rot); **C:** Überlagerung aus **A** und **B**, in gelb ist die Kolokalisierung zu sehen; **D, E, F:** Ausschnittsvergrößerungen aus **A, B, C:** Weißer Balken: 10 µm

Abb. 3-22 zeigt die Lokalisierung von Myosin IIA und Aktin an der Substratanheftungsebene. Myosin IIA ist an und zwischen den Podosomen verteilt. Myosin IIA scheint Verbindungsstege zwischen einzelnen Podosomen zu bilden.

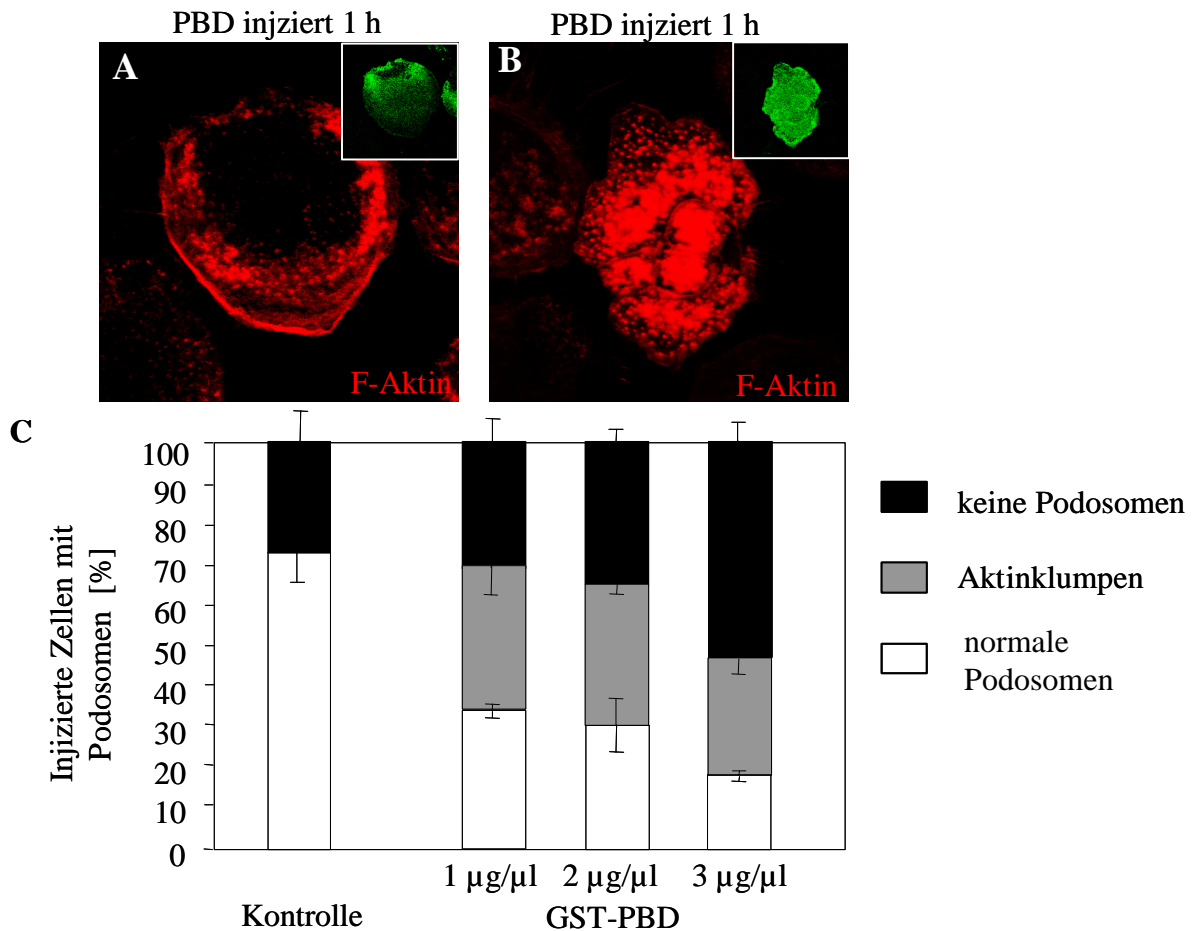


**Abb. 3-22. Myosin verbindet Podosomen, GFP-KIF1C kolokalisiert partiell mit Myosin und Aktin**

**A-C:** Konfokalmikroskopische Aufnahme eines 8 Tage alten primären humanen Makrophagen, Myosin IIA wurde mit anti-Myosin IIA-Antikörper sichtbar gemacht (**A, C**, rot) und F-Aktin mit Alexa-568-Phalloidin (**B, C** rot) angefärbt. **C:** Überlagerung von **A** und **B**, Weißer Balken: 1µm

Es wurde im Folgenden untersucht, ob die Interaktion zwischen KIF1C und Myosin IIA eine funktionelle Rolle in der Regulation der Podosomen spielt. Hierzu wurde die gereinigte GST-PTPD1-Bindende Domäne von KIF1C als potentiell inhibitorisches Peptid der MyosinIIA-KIF1C-Interaktion in primäre humane Makrophagen injiziert, als Kontrolle diente die Injektion von gereinigtem GST. Mit GST-PTPD1-Bindedomäne injizierte Zellen zeigten oftmals gestörte Podosomenbildung: große unförmige Aktinklumpen (siehe Abb. 3-23B) oder eine verringerte Anzahl an Podosomen pro Zelle (unter 30) im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 3-23A). Diese gestörte Podosomenbildung zeigte eine Dosisabhängigkeit: in  $28,9\% \pm 5,97\%$  der mit  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Protein transfizierten Zellen (siehe Abb. 3-23C), in  $36,7\% \pm 3,0\%$  der mit  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  und in  $53,3\% \pm 5,1\%$  der mit  $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  injizierten Makrophagen wies keine Podosomen mehr auf. Der Anteil normaler Podosomen war ebenso umso stärker verringert, je mehr Protein injiziert wurde:  $34,4\% \pm 1,5\%$  bei  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $30,0\% \pm 7,3\%$  bei  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  und  $17,8\% \pm 1,5\%$  bei  $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Die Injektion der PTPD1-bindenden Domäne von KIF1C, an die Myosin IIA bindet, führt also zu einer Störung der normalen Podosomenbildung.





**Abb 3-23. Hemmung von Myosin IIA durch Injektion der PTPD1-Bindedomäne (PBD) von KIF1C verringert die Anzahl der Podosomen**

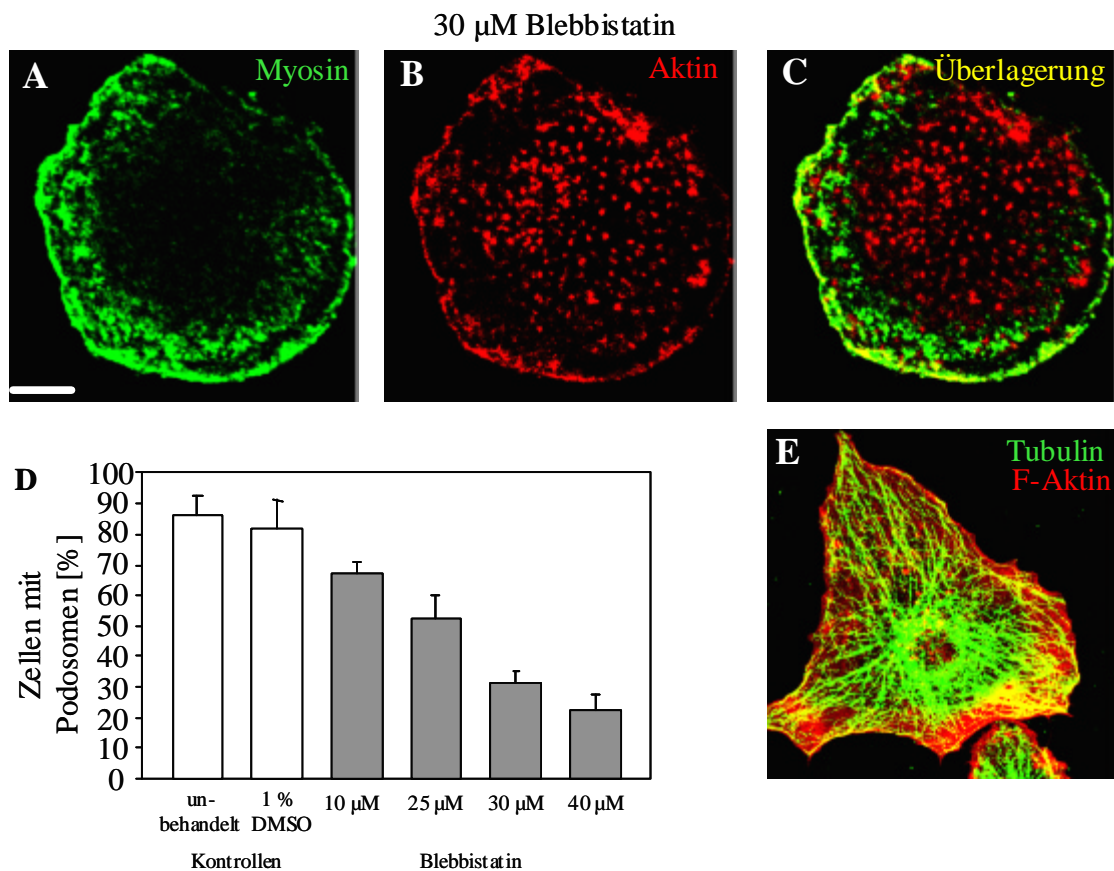
**A, B, C:** Mikroinjektion von GST-PTPD1-Bindedomäne.

**A und B:** Konfokalmikroskopische Aufnahme 8 Tage alter primärer humaner Makrophagen, die mit 1, 2 bzw. 3 µg/µl gereinigter GST-PTPD1-Bindedomäne von KIF1C mit Ratten-IgG als Injektionsmarker (grün) injiziert und 1h nach Injektion fixiert wurden. F-Aktin wurde mit Alexa568-Phalloidin sichtbar gemacht. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit 0,5 µg/µl GST injiziert wurden

**C:** Quantifizierung der Podosomenbildung. In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Um die Beteiligung von Myosin an der Podosomenregulation zu untersuchen, wurde im Folgenden ein Myosin-Inhibitor eingesetzt. Das zellgängige (S)-Blebbistatin oder (-)-1-Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydro-4-Hydroxypyrrollo-[2,3-b]-7-Methylquinolin-4-on inhibiert spezifisch Nicht-Muskel-Myosin II (Straight *et al.*, 2003; Kovacs *et al.*, 2004; Ramamurthy *et al.*, 2004). Primäre humane Makrophagen wurden jeweils 30 min in blebbistatinhaltigem Medium in der angegebenen Konzentration inkubiert und anschließend direkt fixiert, das F-Aktinzytoskelett mit Alexa568-Phalloidin angefärbt und die Zellen auf Podosomen untersucht. Als Kontrolle wurden sowohl unbehandelte Zellen als auch Makrophagen verwendet, denen 1% DMSO zum Medium gegeben wurde, da Blebbistatin als stark hydrophobe Substanz in DMSO gelöst werden musste. Die

Podosomenanzahl ist in der unbehandelten Kontrolle mit  $84,4\% \pm 6,5\%$  kaum höher als in der Kontrolle mit 1% DMSO ( $80,0\% \pm 9,2\%$ ), DMSO hat in der eingesetzten Konzentration keinen Einfluss auf die Podosomenbildung. Bei Einsatz des Myosininhibitors konnte eine dosisabhängige Verringerung der Podosomenanzahl beobachtet werden. (siehe Abb. 3-24D). Beträgt bei  $10 \mu\text{M}$  Blebbistatin der Anteil podosomenhaltiger Zellen noch  $65,5\% \pm 3,9\%$ , so liegt er bei  $25 \mu\text{M}$  Blebbistatin nur noch  $51,1\% \pm 7,8\%$ . Bei Verwendung von  $30 \mu\text{M}$  Blebbistatin weisen noch  $31,1\% \pm 3,9\%$  der Makrophagen Podosomen auf, bei  $40 \mu\text{M}$  Blebbistatin sinkt der Anteil der Zellen mit Podosomen auf  $22,2\% \pm 5,3\%$ .



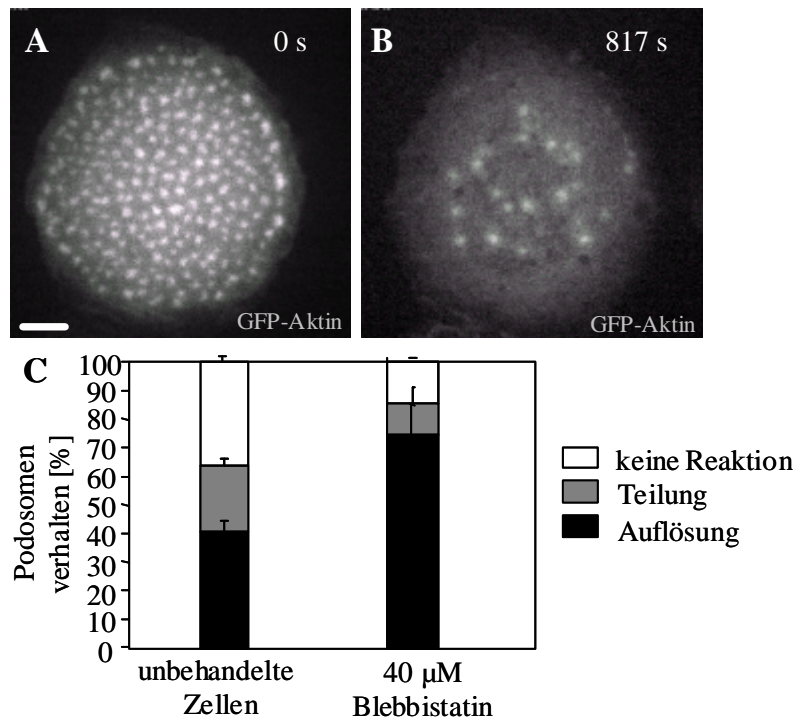
**Abb. 3-24. Hemmung von Myosin IIA durch Blebbistatin in fixierten Zellen verringert die Anzahl der Podosomen**

**A-C:** Konfokalmikroskopische Aufnahme eines 7 Tage alten primären humanen Makrophagen, der für 30 min in  $30 \mu\text{M}$  Blebbistatin inkubiert wurde. Myosin IIA wurde mit anti-Myosin IIA-Antikörper sichtbar gemacht (A, grün), F-Aktin wurde mit Alexa568-Phalloidin angefärbt (B, rot), **C:** Überlagerung von A und B. Weißer Balken:  $10 \mu\text{m}$ . **D:** Quantifizierung der Podosomenbildung. Primäre humane Makrophagen wurden für jeweils 30 min mit Blebbistatin in der angegebenen Konzentration inkubiert, fixiert und das F-Aktinzytoskelett angefärbt. In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für Zellen mit Podosomen sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

**E:** Konfokalmikroskopische Aufnahme eines 8 Tage alten primären humanen Makrophagen, der mit  $40 \mu\text{M}$  Blebbistatin behandelt wurde und dessen Mikrotubuli-Skelett mit anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörper (grün) und F-Aktin mit Alexa568-Phalloidin (rot) angefärbt wurden.

Ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  liegen die Podosomen in den Zellen, die noch Podosomen aufweisen, fast ausschließlich in der Mitte der Zellen (siehe Abb. 3-24B). Podosomen in der Zellperipherie sind kaum vorhanden oder sind deutlich kleiner. Betrachtet man hierzu die Lokalisation von Myosin IIA (Abb. 3-24A, C), so fällt auf, dass das Myosin IIA hauptsächlich an der Zellperipherie zu finden ist, wo die Podosomendichte stark verringert ist. Auffällig ist zudem eine starke Akkumulation des Myosin IIA am Zellrand.

In Analogie zu den Experimenten mit RNAi und mit der Rigor-Mutante GFP-KIF1C-K103A wurden *Live Cell Imaging* Experimente durchgeführt: primäre humane Makrophagen wurden mit pmRFP-Aktin transfiziert und jeweils zu Beginn der Aufnahmen 40  $\mu\text{M}$  Blebbistatin gegeben. Innerhalb von 5 min trat der Effekt ein: die Podosomen teilten sich kaum noch, die Mehrzahl der Podosomen löste sich auf, bis nur noch eine geringe Anzahl vorhanden war. (siehe Abb. 3-25A-B, Film 3).



**Abb. 3-25: Hemmung von Myosin IIA durch Blebbistatin in lebenden Zellen führt zur Auflösung von Podosomen**

9 Tage alte primäre humane Makrophagen wurden transient mit pmRFP-Aktin transfiziert, für 24 h inkubiert und zu Beginn der konfokalmikroskopischen Aufnahmen jeweils 40  $\mu\text{M}$  Blebbistatin zugegeben. **A:** Makrophage zum Zeitpunkt der Blebbistatinzugabe, **B:** Makrophage 817 Sekunden nach Blebbistatinzugabe. Fast alle Podosomen haben sich aufgelöst. Weißer Balken: 10  $\mu\text{m}$  **C:** Quantifizierung des Podosomenverhaltens. Sämtliche Podosomen aus 3 Filmen mit 10 min Länge wurden untersucht und in oben angegebene Kategorien eingeteilt. Die Prozentsätze für die einzelnen Kategorien sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Eine quantitative Auswertung ergab, dass der Anteil sich auflösender Podosomen deutlich erhöht war: von den 903 beobachteten Podosomen aus 3 Zellen lösten sich  $74,5\% \pm 10,1\%$  auf, im Vergleich zu  $41,3\% \pm 3,1\%$  zu unbehandelten Zellen. Der Anteil der sich teilenden Podosomen liegt mit  $10,4\% \pm 6,0\%$  weit unter dem Wert der unbehandelten Zellen:  $23,3\% \pm 2,2\%$ . Auch der Anteil sich nicht verändernder Podosomen beträgt nur noch  $14,9\% \pm 9,0\%$ , in unbehandelten Zellen bleiben  $36,3\% \pm 1,9\%$  unverändert. Eine Hemmung von Myosin IIA hat demnach ähnliche Auswirkungen wie eine Depletion von KIF1C oder der Einsatz der Rigor-Mutante KIF1C-K103A. Auch dies ist ein Hinweis auf eine funktionelle Wechselwirkung zwischen Myosin IIA und KIF1C.

Der Einfluss der Myosinhemmung auf die Wechselwirkungen zwischen GFP-KIF1C bzw. GFP-CLIP170 und Podosomen konnte nicht untersucht werden. Experimente mit lebenden Zellen, die transient mit pEGFP-KIF1C bzw. GFP-CLIP170 und pmRFP-Aktin transfiziert wurden, zeigten, dass nach Zugabe des Myosin-Inhibitors Blebbistatin weder GFP-CLIP170-markierte Mikrotubuli-Plusenden noch GFP-KIF1C in der Ebene der Substratanheftung lokalisierten. Es besteht die Möglichkeit, dass der Inhibitor einen Einfluss auf die Mikrotubuli hat, wengleich in der Literatur solche Effekte nicht beschrieben wurden (Pielak *et al.*, 2003). Hierzu wurde das Tubulinzytoskelett und das F-Aktinzytoskelett fixierter Makrophagen, die mit  $40\ \mu\text{M}$  Blebbistatin behandelt wurden, angefärbt und untersucht. Die Mikrotubuli unterschieden sich nicht von den unbehandelten Kontrollzellen. Abb. 3-24E zeigt ein Beispiel eines primären humanen Makrophagen, der keine Podosomen mehr aufweist, dessen Mikrotubuli jedoch eine normale Morphologie zeigen, Blebbistatin schädigt das Tubulinzytoskelett demnach nicht.

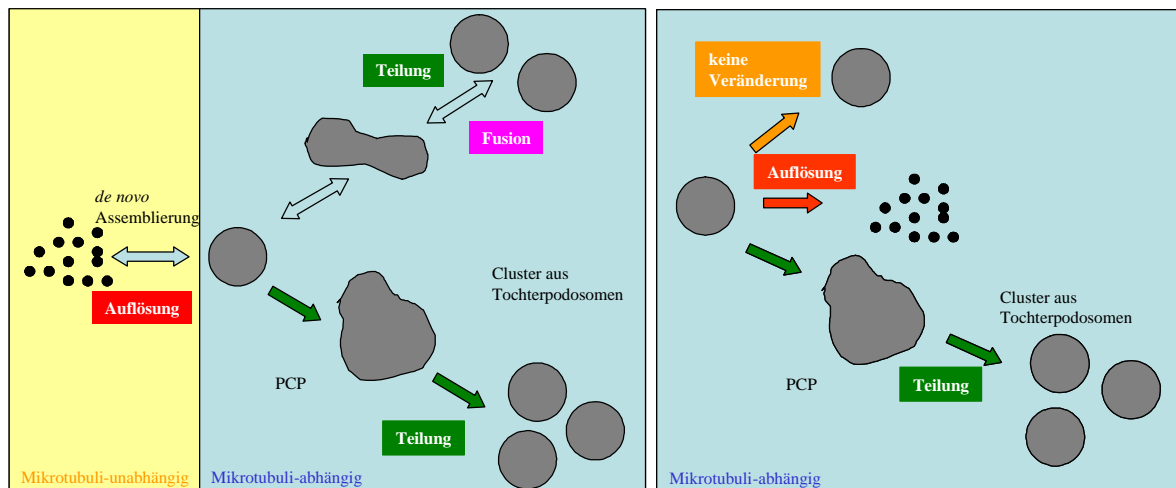
#### 4.1. Die Regulation von Podosomen durch Mikrotubuli

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von Podosomen durch Mikrotubuli in primären humanen Makrophagen untersucht. Wie konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen aus dem eigenen Labor zeigten, befinden sich Mikrotubuli und Podosomen in der Substratanheftungsebene in großer räumlicher Nähe zueinander (Linder *et al.*, 2000b). Dies konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen detergens-extrahierter Mausmakrophagen bestätigt werden (Evans *et al.* 2003). Es besteht aber auch ein funktioneller Zusammenhang zwischen Podosomen und Mikrotubuli: nach Zerstörung oder Stabilisierung des Mikrotubuli-Skeletts werden keine Podosomen mehr gebildet. Dieser Einfluss scheint allerdings einseitig zu sein, denn Zerstörung der Podosomen durch Aktin-depolymerisierende Agentien hat keinen Effekt auf die Mikrotubuli (Linder *et al.*, 2000b). Allerdings wurde bei diesen Experimenten nicht die Podosomendynamik in lebenden Makrophagen untersucht, sondern nur fixierte Präparate analysiert. Deswegen war ein Ziel dieser Arbeit, das Verhalten der Podosomen im zellulären Kontext im Zusammenspiel mit Mikrotubuli darzustellen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Mikrotubuli-Plusenden, die mit GFP-CLIP170 sichtbar gemacht wurden, die Mehrheit der Podosomen kontaktieren und diese Kontakte unterschiedliche Reaktionen zur Folge haben: jeweils ein Drittel der Podosomen teilt sich in zwei oder mehrere Podosomen oder löst sich nach Kontakt auf, ein Drittel bleibt unverändert (Abb. 3-1). Im Gegensatz dazu bleiben bei den nicht-kontaktierten Podosomen zwei Drittel unverändert. Es besteht demnach eine deutliche Beziehung zwischen Mikrotubuli und Podosomendynamik. Die direkte Interaktion in lebenden Zellen zwischen beiden Strukturen wurde hier zum ersten Mal gezeigt. Zudem konnte ein regionaler Unterschied in der Dynamik der Podosomen beobachtet werden: Podosomen in der Zellperipherie zeigen vorwiegend dynamisches Verhalten d.h. sie teilen sich oder lösen sich auf, während die Podosomen in der Zellmitte statisch bleiben.

In Mausmakrophagen konnte ebenfalls eine Regulation der Podosomen durch Mikrotubuli gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden von Evans *et al* in einem Modell zusammengefasst (siehe Abb. 4.1): Podosomen entstehen *de novo*, nehmen an Größe zu und bilden sogenannte Podosomen-Vorläufer-Komplexe. Diese teilen sich in drei bis fünf kleinere Podosomen. Der Vorgang ist reversibel, d.h. einzelne Tochterpodosomen können auch wieder fusionieren. Für die *de novo*-Assemblierung der Podosomen ist kein intaktes Mikrotubuli-Zytoskelett nötig, während hingegen die Teilungs- und Fusionsraten der Podosomen-Vorläufer-Komplexe von Mikrotubuli abhängig sind (Evans *et al.*, 2003). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden: über 80% der Podosomen in lebenden primären humanen Makrophagen wurden nicht nur von Mikrotubuli-Plusenden kontaktiert, diese enge Korrelation zwischen Kontakt und Dynamik hatte außerdem die Teilung der Podosomen in zwei oder drei Podosomen oder auch die Auflösung zur Folge. Dies widerspricht dem Modell von Evans, in dem die Podosomen-Auflösung unabhängig von Mikrotubuli ist. Jedoch führen auch bei fokalen Adhäsionen

Kontakte durch Mikrotubuli zur Auflösung dieser Anheftungsstrukturen (Kaverina *et al.*, 1999). *De novo*-Assemblierung und Fusionsvorgänge wurden in humanen Makrophagen nur mit sehr geringer Häufigkeit beobachtet (unter 0,1%). Die beschriebenen Unterschiede ergeben sich vermutlich aus den verschiedenen experimentellen Bedingungen: Das Modell von Evans *et al.* wurde mit Hilfe von 4D-Kymographen unter Verwendung von Software wie NeuronTracer und Imaris3 erstellt, womit jedoch im Gegensatz zu den Daten aus dieser Arbeit keine direkten Interaktionen zwischen Mikrotubuli und Podosomen ermittelt werden konnten, da nur F-Aktin dargestellt wurde. Der Einfluss der Mikrotubuli wurde durch Einsatz von stabilisierenden oder destabilisierenden Agentien wie Colchicin oder Taxol ermittelt, also nur indirekt gemessen. Im Gegensatz dazu wurden die Daten in der vorliegenden Arbeit ohne Verwendung von Tracking-Software ermittelt. Dabei wurden die direkten Interaktionen zwischen Mikrotubuli und Podosomen als Grundlage genommen. Die Arbeiten von Evans und Mitarbeitern wurden mit polarisierten Makrophagen durchgeführt, während hingegen in der vorliegenden Arbeit ruhende Zellen verwendet wurden. Wohl aus diesem Grunde wurden hier kaum *de novo*-Assemblierungsvorgänge beobachtet. Größtenteils wurde das von Evans aufgestellte Modell jedoch bestätigt: Mikrotubuli beeinflussen die Lebensdauer der Podosomen, da Kontakte zwischen Mikrotubuli und Podosomen zu deren Teilung aus Podosomen-*Precursor*-Komplexen in kleinere Tochterpodosomen führen. Der mögliche Einfluss der Mikrotubuli, der bei Evans nur durch modulierende Substanzen ermittelt wurde, konnte durch die direkte Beobachtung von Mikrotubuli-Plusenden und Podosomen in lebenden Makrophagen bestätigt und präzisiert werden (siehe Modell in Abb. 4-1).

Hinsichtlich der Regulation von Podosomen sind bereits Daten für die in der vorliegenden Arbeit analysierten Interaktionen zwischen Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett bekannt: in Osteoklasten wird der charakteristische periphere Podosomenring im Gegensatz zu fokalen Adhäsionen durch Mikrotubuli jedoch stabilisiert (Babb *et al.*, 1997; Destaing *et al.*, 2003). RhoA aktiviert das Adaptorprotein mDia2, welches wiederum die Histondeacetylase 6 (HDAC6) aktiviert. Dadurch kommt es zu einer verringerten Acetylierung von Mikrotubuli, was eine verminderte Stabilität dieser Polymere zur Folge hat. Umgekehrt führt eine Verminderung der RhoA-Aktivität zu einer Hyperacetylierung der Mikrotubuli und einer erhöhten Stabilität von Podosomen (Destaing *et al.*, 2003). Ein dynamisches Mikrotubuli-Zytoskelett reguliert demnach auch Podosomen in Osteoklasten, Modulationen in der Mikrotubuli-Stabilität führen zu einem veränderten Podosomenumsatz.



**Abb. 4-1. Vergleich der Modelle für Podosomenassemblierung nach Evans *et al.* (links) und der vorliegenden Arbeit (rechts)**

**links:** Am Vorderende der Lamellipodiums assembliert ein Podosom *de novo* und zerfällt in einem von Mikrotubuli unabhängigen Prozess. Die Podosomen-Lebensdauer kann in Abhängigkeit von Mikrotubuli verlängert werden durch Teilung in Tochterpodosomen, Fusion mit anderen Podosomen oder Größenzunahme zu einem sogenannten Podosomen-Vorläufer-Komplex (PCP: *Podosome-Complex-Precursor*), der wiederum in einen Tochter-Cluster zerfällt. (Evans *et al.*, 2003)

**rechts:** In ruhenden Makrophagen bleiben Podosomen nach Kontakt durch Mikrotubuli entweder unverändert, lösen sich auf oder wachsen zu Podosomen-Vorläufer-Komplexen heran, die später in Tochterpodosomen zerfallen. Auch die Auflösung ist ein Mikrotubuli-abhängiger Prozess. Fusionsvorgänge und *de novo*-Assemblierung wurden in der vorliegenden Arbeit nur mit sehr geringer Häufigkeit beobachtet und wurden deshalb nicht dargestellt.

Zur Regulation von anderen Adhäsionsstrukturen durch Mikrotubuli existieren bereits Daten: auch bei fokalen Adhäsionen existieren direkte Interaktionen zwischen Mikrotubuli und Adhäsionsstruktur. Mikrotubuli kontaktierten die fokalen Adhäsionen mehrfach, jedoch ist in diesem Fall die Regulation eine gänzlich andere: Untersuchungen mit Mikrotubuli-Inhibitoren zeigten, dass die fokalen Adhäsionen nicht nur die Mikrotubulienden halten, sondern sie auch gegenüber Nocodazol-induzierter Depolymerisierung stabilisieren können und als Polymerisationnuklei fungieren (Kaverina *et al.*, 1998). Die Kontakte führten zur Auflösung der fokalen Adhäsionen, während hingegen bei einer Hemmung der Kontakte durch das Mikrotubuli-stabilisierende Agens Taxol die Adhäsionen sich vergrößerten (Kaverina *et al.*, 1999). Die Regulation von Podosomen und fokalen Adhäsionen unterscheiden sich demnach grundlegend; während Podosomen durch Mikrotubuli sowohl positiv (Teilung) als auch negativ (Auflösung) kontrolliert werden, führen Mikrotubuli-Kontakte an fokalen Adhäsionen stets zu deren Auflösung. Dies ist ein weiterer Unterschied zwischen diesen Adhäsionsstrukturen, der bislang noch unbekannt war, da die vergleichenden Daten zur direkten Interaktion der Podosomen und Mikrotubuli erst durch die vorliegende Arbeit ermittelt wurden.

Für die Dynamik von fokalen Adhäsionen hingegen liegt schon eine Vielzahl von Daten vor, die die Regulation durch Mikrotubuli in einen größeren Zusammenhang stellen

konnten: In Fibroblasten führt die Zerstörung des Mikrotubuli-Zytoskeletts über die Aktivierung der kleinen GTPase Rho zur Bildung und Vergrößerung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen (Lloyd *et al.*, 1977; Bershadsky *et al.*, 1996; Enomoto, 1996) und zu einer Erhöhung der Aktomyosinkontraktilität (Danowski, 1989). Dies geschieht über die RhoA-Effektoren Rho-Kinase, die die Kontraktilität durch Phosphorylierung der regulatorischen Leichten Myosinkette (Ridley, 2001) erhöht und dem Formin mDia, welches nicht nur zur Bündelung von Aktinfasern (Pruyne *et al.*, 2002, Sagot *et al.*, 2002), sondern auch zur Stabilisierung von Mikrotubuli beiträgt (Palazzo *et al.*, 2002). Eine mögliche Erklärung für diese Daten bietet das sog. „Tensegrity Model“, in dem durch das Aktomyosinsystem eine Zugbelastung generiert wird, die gegen steife Mikrotubuli-„Seile“ wirkt (Ingber, 2003a; Ingber, 2003b).

Insgesamt gesehen stehen die Daten dieser Arbeit im Einklang mit den Arbeiten zum Einfluss von Mikrotubuli auf Podosomen von Evans (Evans *et al.*, 2003), Destaing (Destaing *et al.*, 2003), Linder (Linder *et al.*, 2000) und Babb (Babb *et al.*, 1997). Jede Manipulation des Mikrotubuli-Zytoskeletts hat ein verändertes Podosomenverhalten zur Folge. In dieser Arbeit konnte zudem bestätigt werden, dass Mikrotubuli und Podosomen direkt miteinander interagieren. Es wurde gezeigt, dass diese Kontakte zwischen beiden die Podosomendynamik beeinflussen, indem sie zur Teilung oder Auflösung dieser Adhäsionsstrukturen führen. Die Beobachtung der regionalen Unterschiede in der Dynamik der Podosomen stimmt ebenfalls mit den Daten von Babb und Evans überein, die eine enge räumliche Nähe zwischen Mikrotubuli und Podosomen an der Zellperipherie (Babb *et al.*, 1997) bzw. eine hohe Dynamik am Vorderende des Lamellipodiums (Evans *et al.*, 2003) zeigen konnten.

#### 4.2. Regulation der Podosomen durch KIF1C

Die Regulation der Podosomen durch Mikrotubuli ließ vermuten, dass ein aktiver Transportmechanismus eine Rolle spielt. Alle bekannten Podosomenregulatoren weisen jedoch selbst keine Motoraktivität auf, so dass die Beteiligung eines molekularen Motorproteins denkbar ist. Molekulare Motoren setzen chemische Energie in Form von ATP in mechanische Arbeit um. Deswegen wurde zunächst die Abhängigkeit der Podosomenbildung von einer ATP-Hydrolyse untersucht und bei Einsatz des nicht-hydrolysierbaren ATP-Homologs AMP-PNP eine Verringerung der podosomenhaltigen Zellen festgestellt (Abb. 3-3). Dies ist allerdings nur ein erster Hinweis, da eine Vielzahl von Vorgängen in der Zelle unter ATP-Verbrauch ablaufen.

Kinesine sind Mikrotubuli-basierte Motoren, die sich in Richtung der Plusenden bewegen. Da die Podosomendynamik durch Mikrotubuli-Plusenden reguliert wird, wurde versucht, ein Kinesin mit Beteiligung an der Podosomenregulation zu identifizieren. Dazu wurden verschiedene Wildtyp- und mutierte Konstrukte von schweren und leichten Kinesinketten eingesetzt (Abb. 3-9) und *knock-down*-Versuche mit RNAi durchgeführt (Abb. 3-10). Von allen untersuchten Kinesinen hatte jedoch nur KIF1C sowohl in den Transfektions-



versuchen mit Wildtyp- und mutierten Konstrukten als auch in den *knock-down*-Versuchen einen Einfluss auf die Podosomenbildung.

GFP-KIF1C reichte sich nicht nur an den Mikrotubuli-Plusenden an, sondern lokalisierte hauptsächlich an der Zellperipherie in der Substratanheftungsebene. Dort findet man hauptsächlich dynamische Podosomen, die sich teilen oder auflösen. Dieser Befund korreliert gut mit einer Beeinflussung der Podosomendynamik durch KIF1C.

Ähnlich zu der Regulation durch Mikrotubuli wurde ca. die Hälfte der Podosomen von KIF1C-vesikelartigen Strukturen kontaktiert (Abb. 3-13). Im Gegensatz dazu wurden über 80% der Podosomen von Mikrotubuli-Plusenden kontaktiert. GFP-KIF1C ist nur an einer Subpopulation von Mikrotubuli zu finden und kontaktiert vornehmlich die dynamischen Podosomen in der Zellperipherie.

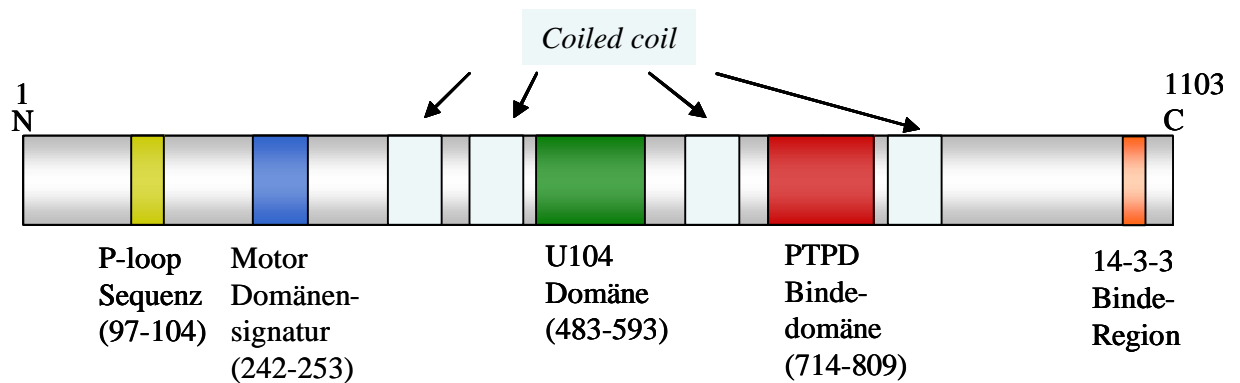
Auch nach Kontakt mit GFP-KIF1C verteilen sich hier die Reaktionen Auflösung, Teilung bzw. keine Reaktion der Podosomen nach Kontakt auf jeweils ca. ein Drittel. Bei Einsatz der im *P-loop* mutierten katalytisch inaktiven Mutante KIF1C-K130A sinkt jedoch wie bei siRNA-induziertem *knock-down* von KIF1C der Anteil der sich teilenden Podosomen während der Anteil sich auflösender Podosomen konstant bleibt (Abb. 3-18). Dies lässt vermuten, dass Kontakte zwischen KIF1C und Podosomen zur Teilung dieser in zwei oder mehrere Tochterpodosomen führt. Dies erklärt auch die Verminderung der Podosomenhaltigen Zellen in den Versuchen mit fixierten Proben nach *knock-down* von KIF1C (Abb. 3-19): es werden noch Podosomen *de novo* gebildet, die Teilung bleibt jedoch aus bei einer unveränderten Auflösungsrate, so dass netto nur noch deutlich weniger bzw. bei Überwiegen der Auflösung gar keine Podosomen mehr in den Zellen vorliegen. Fixierte Proben, die zuvor mit der Mutante KIF1C-K103A transfiziert wurden, zeigen das gleiche Verhalten (Abb. 3-19).

Demnach konnte KIF1C in der vorliegenden Arbeit nicht nur als Motor mit Einfluss auf die Podosomenregulation identifiziert werden, sondern ihm konnte außerdem noch eine Rolle bei der Regulation der Podosomenteilung zugeschrieben werden. KIF1C transportiert möglicherweise einen (oder mehrere) Podosomenregulator(en), der (die) zur Teilung aus Podosomen-Vorläufer-Komplexen in Tochterpodosomen führt.

Dies stellt einen weiteren, bislang unbekanntem Unterschied zu der Regulation der fokalen Adhäsionen dar: Hier konnte eine Beteiligung des konventionllen Kinesins KIF5B gezeigt werden, das womöglich regulatorische Faktoren zu den fokalen Adhäsionen transportiert, die zur Auflösung derselben führen (Krylyshkina *et al.*, 2002). In der Podosomenregulation hat jedoch KIF5B keinen Einfluss, wie mit mehreren unterschiedlichen Versuchsansätzen, wie Mikroinjektion eines inhibitorischen Antikörpers und Transfektion verschiedener Wildtyp und mutierter Konstrukte von KIF5 und der leichten Ketten gezeigt werden konnte (Abb. 3-7, 3-8, 3-9, 3-10).

Zum Kinesin KIF1C selbst existieren bislang nicht viele Erkenntnisse. Es wurde mittels *Yeast Two Hybrid-Screen* einer cDNA-Bank aus humanen Skelettmuskelzellen mit der Ezrindomäne der Proteintyrosinphosphatase PTPD1 als Köder identifiziert (Dorner *et al.* 1998). Das 1103 Aminosäuren umfassende KIF1C besitzt eine N-terminale Motordomäne

mit einem ATP-bindenden *P-loop* (AS 97-104) und eine für alle Kinesine typische Motordomänensignatur (AS 242-253) mit Mikrotubuli-Bindestelle gefolgt von einer U104-Domäne und bindet an seine Fracht wahrscheinlich über C-terminale Sequenzen. Der U104-Domäne konnte bislang noch keine Funktion zugeschrieben werden (Ponting, 1995).



**Abb. 4-1. Domänenstruktur von KIF1C**

Schematische Darstellung der Domänen von KIF1C. Konservierte Domänen: *P-loop* (ockerfarben), Motordomänensignatur (blau), U104-Domäne (grün), PTPD1-Bindedomäne (rot) und 14-3-3-Proteinbinderegion (orange). Die hellblauen Kästchen geben die potentiellen *coiled-coil*-Sequenzen dar. Die Ziffern geben die jeweiligen Aminosäuren der Domänen an, für die 14-3-3-Proteinbinderegion wurden diese nicht ermittelt.

KIF1C ist in Maus Fibroblasten (293, NIH3T3) hauptsächlich am Golgi-Apparat lokalisiert und scheint dort für den retrograden Membranfluss zwischen Golgi-Apparat und Endoplasmatischen Retikulum (ER) verantwortlich zu sein (Dorner, 1998). Hierzu existieren jedoch widersprüchliche Ergebnisse aus Experimenten mit *Knock-out*-Mäusen. Der retrograde Membranfluss von Golgi-Apparat zu ER unterschied sich in Fibroblasten dieser Mäuse nicht signifikant von dem in Wildtyp-Fibroblasten (Nakajima *et al.*, 2002). Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten sich einerseits aus den verschiedenen untersuchten Zelltypen, andererseits aus den unterschiedlichen experimentellen Vorgehensweisen erklären.

In der vorliegenden Arbeit mit primären humanen Makrophagen konnte keine Lokalisation von KIF1C am Golgi-Apparat festgestellt werden, was mit den unterschiedlichen Zelltypen erklärt werden kann. Die bisher durchgeführten Untersuchungen zu KIF1C der Arbeitsgruppen Lammers und Hirokawa wurden an Skelettmuskelzellen und Fibroblasten durchgeführt.

KIF1C interagiert mit der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1, die am Vesikel-*Trafficking* und der Regulation der Tec Tyrosin-Kinase beteiligt ist (Lammers *et al.*, 1993). KIF1C kann nach Behandlung mit dem PTP-Inhibitor Peroxovanadat *in vitro* durch c-Src tyrosinphosphoryliert werden (Dorner *et al.* 1998). Mittels eines *Yeast-Two-Hybrid-Screens*, bei

dem die 350 carboxy-terminalen Aminosäuren von KIF1C als Köder eingesetzt wurden, konnten die  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$  Isoformen der 14-3-3 Proteine als weiterer Interaktionspartner identifiziert werden. Diese Bindung wurde mit Ko-Immünpräzipitationen bestätigt. Sie ist abhängig von einer Phosphorylierung des Serins 1092 innerhalb des Motivs RRQRS(p)AP, die Teil einer Konsensussequenz für Casein Kinase II-Substrate ist. 14-3-3-Proteine sind eine Familie ubiquitär exprimierter Proteine, die an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt sind und denen allgemein eine Funktion als Gerüstproteine zugeschrieben wird. Casein Kinase II ist eine Serin/Threonin-Kinase, die in der Zellproliferation und Signaltransduktion eine Rolle spielt. Zu ihren Substraten zählen Transkriptionsfaktoren, Rezeptortyrosinkinasen, Clathrin und zytoskelettale Proteine wie  $\beta$ -Tubulin (Übersicht bei Allende und Allende, 1995).

KIF1C ist ein wichtiger Mediator für die Resistenz von Makrophagen gegenüber dem Lethalen Faktor LF des Anthraxtoxins von *Bacillus anthracis*. Das zentrale Toxin LeTx ist aus zwei Proteinen aufgebaut, von dem das protektive Antigen PA an die Zellen bindet und den katalytisch aktiven lethalen Faktor LF in das Zytoplasma injiziert (Dixon *et al.*, 1999). Dort agiert LF als Zink-Metalloprotease, die MAP Kinase Kinase (MAPKK) spaltet. (Duesberry *et al.*, 1998). LeTx kann zwar in die meisten Zelltypen eindringen, aber nur Makrophagen lysieren ca. 2 h nach Infektion in Kultur. Aber auch bei den Makrophagen selbst gibt es Unterschiede in der Anfälligkeit: Zellen mit Wildtyp-KIF1C sind gegenüber LF resistent, Makrophagen mit mutiertem KIF1C lysieren nach Infektion mit LF. KIF1C spielt allerdings trotz seiner Funktion im intrazellulären Transport keine Rolle bei der Aufnahme oder Aktivierung von LF (Watters *et al.*, 2001). DNA-array-Untersuchungen zur Änderung der Physiologie in Makrophagen nach Intoxikation mit LeTx zeigten, dass die Expression von MAPKK-regulierten Genen nicht verändert ist, jedoch eine Vielzahl von Genen, die unter Kontrolle von Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) im Wnt-Signalweg stehen. Der zytotoxische Effekt von LeTx scheint sich aus einer Kombination von mehreren Ereignissen zu ergeben, die jedoch noch nicht geklärt sind. (Tucker *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten eine Beteiligung von KIF1C an der Regulation von Podosomen zeigen. In diesem Zusammenhang mit der Rolle von KIF1C in der Anfälligkeit gegenüber LeTx ist interessant, dass ausschließlich Makrophagen durch Einfluss von LeTx lysieren. Eventuell trägt eine Beeinträchtigung der Funktion von KIF1C und gestörte Podosomenbildung in Kombination mit anderen Effekten wie einer Störung des Wnt-Signalweges und der Spaltung von MAPKK zur Zytotoxizität von LeTx bei. Somit könnte erklärt werden, warum ausschließlich Makrophagen durch LeTx getötet werden.

Experimente zur Hemmung von Dynein, das sich in Richtung der Mikrotubuli-Minusenden bewegt, zeigten, dass dieser Motor keine Rolle in der Podosomenregulation zu spielen scheint (Abb 3-5, Abb 3-6). Es könnte jedoch sein, dass Dynein eine mittelbare Funktion im Rücktransport der Plusenden-gerichteten Motoren spielt. Eventuell werden die Kinesine

in einem koordinierten Recyclingprozess wie im intraflagellaren-Transport (Cole *et al.*, 1998, Porter *et al.*, 1999, Lucker *et al.* 2005) von Dyneinen gebunden und in Richtung des MTOC transportiert. Von dort aus bewegen sie sich wieder in Richtung der Plusenden, es sei denn, sie sind katalytisch inaktiv wie Rigor-Mutanten. In diesem Falle sammeln sich diese am MTOC an. Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit bei Einsatz der vermutlich katalytisch inaktiven Mutante KIF1C-K103A beobachtet: Das Kinesin akkumulierte am MTOC (Abb. 3-16, 3-17). Über die Lokalisation von Rigor-Kinesin-Mutanten ist noch sehr wenig bekannt. Katalytisch inaktives KIF1B $\beta$  sammelte sich ebenfalls im perinuklearen Bereich an (Zhao *et al.*, 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte für das Kinesin KIF1C eine neue Funktion ermittelt werden: neben dem retrograden Membranfluss zwischen Golgi-Apparat und ER in Fibroblasten und glatten Muskelzellen (Dorner, *et al.*, 1998) und als Mediator für die Anfälligkeit gegenüber dem Lethalen Faktor des Anthraxtoxins (Watters *et al.*, 2001) ist KIF1C nötig für eine dynamische Regulation von Podosomen in primären humanen Makrophagen. Podosomen werden durch GFP-KIF1C kontaktiert, woraufhin sich ein Drittel teilt. Bei Einsatz einer nicht-funktionellen Mutante oder bei *knock-down* des KIF1C sinkt der Anteil der sich teilenden Podosomen. Daraus lässt sich nicht nur schließen, dass KIF1C eine wichtige Rolle in der Regulation der Podosomen hat, sondern auch, dass es womöglich einen Faktor zu den Adhäsionsstrukturen transportiert, der zur Teilung dieser Strukturen in mehrere Tochterpodosomen führt.

### 4.3. KIF1C interagiert mit Myosin IIA

KIF1C spielt eine Rolle in der Regulation der Podosomendynamik, möglicherweise durch den Transport eines Regulators. Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht, den Mechanismus der Regulation durch Identifizierung eines möglichen Bindungspartners aufzuklären. Durch Immunpräzipitationsversuche unter Niedrigsalzbedingungen konnte der Aktin-basierte Motor Myosin IIA in HUVEC als Interaktionspartner für das überexprimierte KIF1C identifiziert werden. Diese Interaktion konnte durch Ko-Immunpräzipitationen sowohl mit anti-KIF1C- als auch mit anti-MyosinIIA-Antikörper unter physiologischen Bedingungen in primären humanen Makrophagen bestätigt werden. Die Bindestelle für Myosin IIA konnte zudem durch Einsatz verschieden trunkierter GST-KIF1C-Proteine auf die PTPD-Bindedomäne des KIF1C eingeschränkt werden. Myosin IIA bindet demnach im C-terminalen Bereich des Kinesins, der generell als frachtbindende Domäne des Motors angesehen wird. Die Phosphorylierungs-abhängige Interaktion mit der Proteinphosphatase PTPD1 erfolgt auch in diesem Bereich (Dorner *et al.*, 1998). Möglich ist auch eine Regulation der Bindung sowohl von PTPD1 als auch von Myosin IIA über eine Phosphorylierung durch eine bislang unbekannte Kinase.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigten zudem, dass beide Motoren besonders in der Zellperipherie angereichert sind, wo auch die höchste Podosomen-Dynamik zu ver-

zeichnen ist. In Versuchen mit CLIP170-markierten Mikrotubuli zeigte sich, dass sich in der Zellmitte die Podosomen durch die Kontakte nicht verändern, in der Zellperipherie dagegen überwiegend auflösen und teilen. In GFP-KIF1C-transfizierten Zellen fiel auf, dass die Kontakte mit den Podosomen ebenfalls hauptsächlich an der Zellperipherie stattfanden (Abb. 3-14), während hingegen bei GFP-CLIP170-transfizierten Zellen Podosomen überall in der Zelle kontaktiert wurden (Abb. 3-2).

Eine direkte Interaktion zwischen KIF1C und Myosin IIA wäre zwar ungewöhnlich, aber durchaus möglich. So konnten Huang und Mitarbeiter bereits eine Assoziation zwischen einem Kinesin und einem Myosin zeigen. Mittels eines *Yeast Two Hybrid Screens*, bei dem die Schwanzregion von Myosin VA als Köder eingesetzt wurde, konnte das Maus-Kinesin KhcU identifiziert werden. Hierbei bindet KhcU mit dem distalen Teil seiner Stielregion. N-terminal von dieser Bindestelle findet man die für die Homodimerisierung verantwortlichen *coiled-coil*-Regionen, C-terminal davon liegen die sog. Heptad-Repeats, die für eine Interaktion zwischen schweren und leichten Ketten nötig sind. Die Interaktion würde also weder mit der Homodimerisierung noch mit der Bindung der leichten Ketten interferieren, so dass der Motor weiterhin funktionell ist und zusätzlich zu Myosin VA noch Fracht binden kann. (Huang *et al.*, 1999).

Weitere Beispiele für die Interaktion eines Myosins aus der Myosine-V- Klasse mit einem Mikrotubuli-basierten Motor ist die Wechselwirkung zwischen Myosin VA und Dynein. Die Klasse V-Myosine sind für Organellentransport verantwortlich und binden Calmodulin und eine 8-kDa leichte Kette des zytoplasmatischen Dynein (Benashski *et al.*, 1997; Espindola *et al.*, 2000). An einem Organell können demnach sowohl ein Aktin- als auch ein Mikrotubuli-basierter Motor binden. Auch in der Hefe gibt es Beispiele für eine Interaktion zwischen dem Kinesin Smy1p und dem Myosin Myo2p (Lillie und Brown, 1992). Bei solchen Hetero-Motor-Komplexen stellt sich die Frage, wie die Aktivitäten der beiden Enzyme koordiniert werden. Eine Erklärung wäre ein dominierender Motor im Komplex, z.B. würde ein dominanter Mikrotubuli-Motor die Fracht bis zu den Enden der Mikrotubuli transportieren, wo dann eine Fortsetzung der Bewegung auf Aktinfilamenten möglich wäre. Es ist jedoch auch vorstellbar, dass die beiden Aktivitäten der Motoren durch komplexere Mechanismen kontrolliert werden mit einer möglichen Rückkopplungsregulation und/oder einer unterschiedliche Regulation in subzellulären Kompartimenten (Goode *et al.*, 2000).

Für Myosin IIA konnte bislang gezeigt werden, dass es eine Rolle in der Ausbildung der Zellform spielt, da bei Einsatz einer dominant-negativen Mutante in HeLa-Zellen keine fokalen Adhäsionen mehr gebildet wurden (Wei und Adelstein, 2000). Neuere Daten konnten sogar einen Zusammenhang zwischen Myosin IIA und Defekten in der Zelladhäsion von Endoderm-Zellen in Mäuseembryonen herstellen. Hier führt nicht-funktionelles Myosin IIA zu einer fehlerhaften Lokalisation der Zell-Zell-Kontaktproteine E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin (Conti *et al.*, 2004). Eine Isoform von Myosin IIA, Myosin IIB

hat eine Bedeutung in der gerichteten Zellmigration von Fibroblasten (Lo *et al.*, 2004) und Neuronen während der Gehirnentwicklung (Ma *et al.*, 2004). Eine Rolle von Myosin IIA bei der Podosomenregulation stünde demnach mit den bisher für diesen Motor gewonnenen Erkenntnissen im Einklang.

Die in dieser Arbeit beobachtete Interaktion zwischen KIF1C und Myosin IIA ist die erste dieser Art für diese beiden Motorproteine. Generell wurden für Kinesine/Dyneine und Myosin bereits derartige wechselseitige Bindungen beobachtet (Huang *et al.*, 1999, Benashski *et al.*, 1997, Espindola *et al.*, 2000). Für KIF1C wurden bislang erst zwei Interaktionspartner beschrieben: 14-3-3-Proteine und die Protein-Tyrosin-Phosphatase 1 (Dorner *et al.*, 1998, 1999).

#### **4.4. Die Interaktion zwischen KIF1C und Myosin IIA hat einen funktionellen Einfluss auf Podosomen**

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Interaktion zwischen den beiden Motoren auch einen funktionellen Einfluss auf die Podosomen hat. Dazu wurde versucht, diese Bindung zwischen KIF1C und Myosin IIA durch Injektion der mit Myosin IIA-interagierenden P-Domäne von KIF1C in Makrophagen zu hemmen. Die Injektion führte zu einer gestörten Podosomenbildung: es war eine Dosis-abhängige Verringerung der Zellen mit Podosomen festzustellen, zudem waren Aktinverklumpungen zu beobachten (Abb. 3-23). Die mögliche Disruption der Interaktion durch das Peptid führt also zu einer Veränderung der Podosomendynamik, höchstwahrscheinlich durch Hemmung der Teilung der Podosomen-Vorläufer-Komplexe (siehe Punkt 4-1), wodurch es einerseits zu einer geringeren Podosomenanzahl und andererseits zu großen Verschmelzungen aus mehreren Podosomen-Vorläufer-Komplexen kommen könnte.

Auch die Inhibition der Myosin IIA-Aktivität mit dem für Myosin IIA und B spezifischen Hemmstoff Blebbistatin hatte deutlich Effekte auf die Podosomen. Auch hier war eine Dosis-abhängige Verringerung der Anzahl der Podosomen-haltigen Zellen zu beobachten, jedoch gab es in diesem Fall keine Aktinverklumpungen, sondern subzelluläre Unterschiede in der Podosomendichte. In der Mitte wiesen die Podosomen meist eine normale Verteilung auf, am Rand hingegen war die Dichte stark verringert. Auffällig ist hierbei, dass in Kontrollzellen vornehmlich am Zellrand Myosin IIA zu finden war und dort mit KIF1C kolokalisierte (Abb. 3-24). An der Zellperipherie findet man hauptsächlich dynamische Podosomen, die sich teilen oder auflösen (Abb. 3-2). Es konnte in der vorliegenden Arbeit also zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen beiden Motoren für eine normale Podosomendynamik nötig ist.

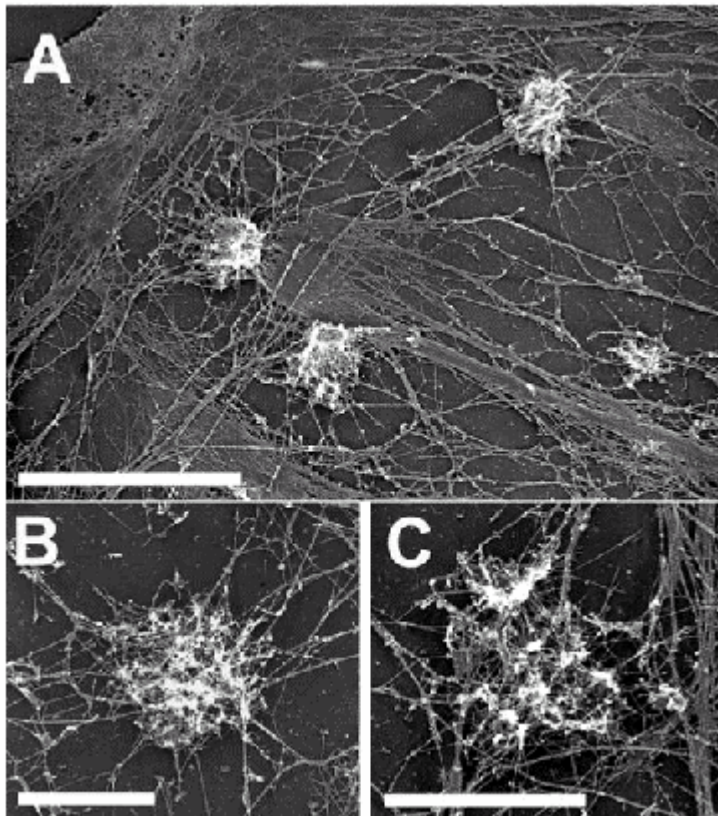
#### 4.5. Modelle für die Regulation von Podosomen durch koordinierte Aktivität von KIF1C und Myosin IIA

Es gibt für die unter Punkt 4.3. und 4.4. genannten Beobachtungen drei Deutungsmöglichkeiten, die sich in die zwei Kategorien Transport und *Targeting* einteilen lassen:

- 1a ein dualer Transport mit Umladen der Fracht
- 1b ein stabiler Hetero-Motor-Komplex an Vesikeln
- 2. ein Führungsmechanismus des Kinesins entlang von Aktinfilamenten durch Myosin IIA.

Die erste Möglichkeit bezieht sich auf einen universellen Prozess beim Vesikel- und Organellentransport, der auf Aktin-Mikrotubuli-Wechselwirkungen basiert. Die Fracht wird zunächst durch Kinesine entlang von Mikrotubuli transportiert und wird dann auf Myosine an Aktinfilamenten übertragen. Ein Beispiel hierfür ist der Transport von Vesikeln in Neuronen. Der „Langstreckentransport“ aus dem Zellkörper wird durch Kinesin entlang von Mikrotubuli katalysiert, am Wachstumskegel wird die Fracht dann umgeladen auf Myosine, das Aktinzytoskelett dient hierbei dem „Nahverkehr“ (Brown, 1999). Dieses duale Transport-Konzept wurde auch beim der Dispersion von Pigmentgranula in Melanophoren beobachtet: über Mikrotubuli werden die Pigmentgranula schnell in die Zellperipherie gebracht, dort werden sie mit Hilfe von Aktinfilamenten gleichmäßig verteilt. Auch hier findet also ein koordinierten Transport und ein Transfer von Mikrotubuli auf Aktinfilamente statt (Rodionov *et al.*, 1991). Ebenso wurde für Mitochondrien in Neuriten von kultivierten Neuronen ein Transport sowohl entlang von Aktinfilamenten als auch entlang von Mikrotubuli beobachtet (Morris und Hollenbeck, 1995).

Betrachtet man die Daten aus der vorliegenden Arbeit in diesem Zusammenhang, so eröffnet sich folgende Interpretationsmöglichkeit: KIF1C könnte Podosomenregulatoren, die u.U. für eine Teilung der Podosomen nötig sind, an Mikrotubuli an die Substratanheftungsebene bringen und dort nach Interaktion mit Myosin IIA an diesen Motor „übergeben“. Myosin IIA transportiert dann die Regulatoren weiter zu den Podosomen entlang der Aktinfilamente, die die Podosomen miteinander verbinden. Diese Verbindungen konnten sehr bald nach der ersten Beschreibung von Podosomen von Gavazzi und Mitarbeitern (Gavazzi *et al.*, 1989) und später von Gimona (Gimona *et al.*, 2003) in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden (siehe Abb. 4-3). In der vorliegenden Arbeit gibt es Hinweise aus konfokalmikroskopischen Aufnahmen, dass Myosin IIA an diesen Aktinfilamenten zwischen den Podosomen lokalisiert (Abb. 3-22).



**Abb. 4-3: Elektronenmikroskopische Aufnahme** von Zytoskelettpräparationen. (A) Podosomen bilden sich bevorzugt an den Enden und Seiten von dicken Aktinfilamentbündeln und sind durch Aktinfilamente miteinander verbunden. Weißer Balken: 5  $\mu\text{m}$ . (B und C). Die höhere Vergrößerung zeigt, dass von Podosomen sternförmig Aktinfilamente ausgehen. Weißer Balken: 2  $\mu\text{m}$ . (Gimona *et al.*, 2003)

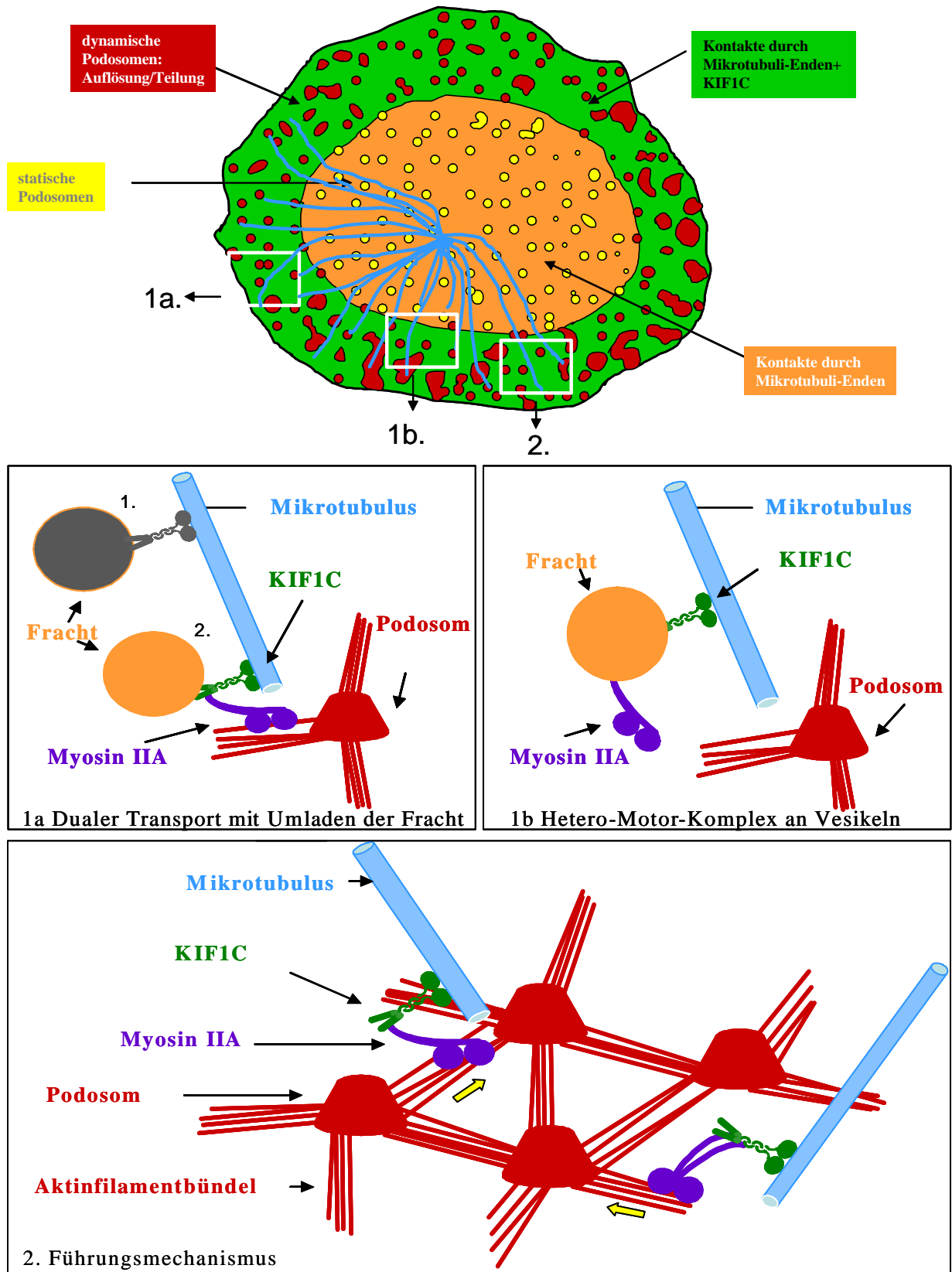
Dieses Modell erscheint jedoch fragwürdig, da Mikrotubuli bzw. KIF1C in diesem Falle nicht mehrere Podosomen nacheinander kontaktieren müssten, da die Feinverteilung der Regulatoren durch das Myosin IIA erfolgen würde und der Mikrotubuli-basierte Transport nur dem schnellen Anliefern von Regulatoren dienen würde. In Falle der Podosomenregulation könnte die Interaktion zwischen KIF1C und Myosin IIA einerseits eine kurzfristige sein, die nur für den Prozess des Umladens besteht. Eine Verstärkung dieser Interaktion könnte durch MAPs wie CLIP170 erfolgen, denn an diesen „Zytoskelett-Kreuzungen“ sind weitere Proteine lokalisiert, die beide miteinander verbinden können. Ein Beispiel hierfür ist MAP1B, dessen Assoziation mit den Mikrotubuli durch Phosphorylierung reguliert werden kann (Togel *et al.*, 1998). Andere MAPs können außerdem noch an Endosomen, Kinetochoren und anderen Partikeln in der Zelle binden. CLIP170 zum Beispiel bindet bevorzugt an wachsende Mikrotubuli-Enden und kann an unkonventionelles Myosin binden. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass CLIPs Mikrotubuli



binden und halten und somit den Transfer zwischen Mikrotubuli- und Aktin-basierten Motoren erleichtern (Lantz und Miller., 1998).

Eine zweite Möglichkeit wäre eine stabile Interaktion, d.h. KIF1C und Myosin IIA würden in diesem Falle bereits zu Beginn an dieselbe Fracht binden. KIF1C wäre für den ersten Weg entlang der Mikrotubuli der dominierende Motor, der die Fracht mitsamt dem gebundenem Myosin IIA transportiert bis zur Substratanheftungsebene, an der Myosin IIA den Transport entlang der Aktinfilamente übernimmt. Es gibt Daten zu synaptischen Vesikeln, die mit Mikrotubuli und Aktin kolokalisieren und an denen Myosin 5a gebunden ist (Evans *et al.*, 1997). Für einen bislang nicht charakterisierten Aktin-basierten Motor wurde sogar in *Live Cell Imaging* Experimenten eine Bewegung entlang von Mikrotubuli beobachtet (Kuznetsov *et al.*, 1992). Myosine können also als „Passagiere“ an Organellen entlang von Mikrotubuli transportiert werden. GFP-KIF1C ist bei Überexpression in den Zellen an vesikelartigen Strukturen zu finden, die u. U. solche Organellen mit Hetero-Motor-Komplex darstellen könnten. Ob jedoch diese Strukturen von Membranen umgeben sind, ist unbekannt, jedoch ist KIF1C bei differentieller Ultrazentrifugation in den Hochgeschwindigkeits-Fractionen zu finden, was für eine Assoziation mit Membranen von kleinen Vesikeln spricht (Nakajima *et al.*, 2002). In diesem Falle wäre die Interaktion zwischen den beiden Motoren aber wahrscheinlich keine direkte, sondern würde über die Vesikel bewerkstelligt. Es sind jedoch auch direkte Interaktionen der Motoren am Vesikel denkbar. Hierzu sind weiterführende Versuche zur Identifizierung solcher Vesikel nötig, die Gegenstand zukünftiger Experimente sein werden, bzw. zum Nachweis einer direkten Interaktion durch Einsatz gereinigter Myosin IIA-Moekküle.

Eine dritte Interpretationsmöglichkeit für die Daten aus der vorliegenden Arbeit ist ein Mechanismus, bei dem Mikrotubuli durch die Verbindung KIF1C und Myosin IIA entlang von Aktinfilamenten zu den Podosomen und zwischen ihnen geführt werden. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Myosin IIA und Aktin (Abb. 3-22) zeigen die Lokalisation des Motors an den Aktinfilamenten zwischen den Podosomen. KIF1C könnte so mehrere Podosomen hintereinander kontaktieren (siehe Abb. 3-14) und Podosomenregulatoren anliefern, die u. U. durch weitere Kinesin-basierte Motoren an den Mikrotubuli oder auch durch KIF1C selbst herantransportiert werden. Dieser Einfluss des Aktins auf die Organisation der Mikrotubuli in migrierenden Zellen ist bereits bekannt: Im Lamellipodium motiler Zellen werden Mikrotubuli durch das Aktomyosinsystem in Richtung Zellmitte transportiert (Mikhailov und Gundersen, 1995; Waterman-Storer und Salmon, 1997; Yvon und Wadsworth, 2000). Es wurde beobachtet, dass Mikrotubuli entlang von Aktinbündeln wachsen können und dass die Enden von Mikrotubuli oft durch das Zytoplasma gezogen werden, indem sie an sich bewegenden Aktinbündel gebunden sind (Salmon *et al.*, 2002).



**Abb. 4-4. Modelle der Regulation von Podosomen durch Motorproteine**

**oben:** dynamische Podosomen (rot) findet man hauptsächlich in der Zellperipherie und werden von Mikrotubuli und KIF1C kontaktiert (grüner Bereich), statische (gelb) in der Zellmitte und werden nur von Mikrotubuli kontaktiert (orangefarbener Bereich). Es wurde nur ein Teil Mikrotubuli (blau) eingezeichnet.

**Fortsetzung der Bildunterschrift von Abb. 4-4**

**1a, Dualer Transport mit Umladen der Fracht:** KIF1C ist als Homodimer dargestellt mit einer globulären Motordomäne, die an Mikrotubuli (hellblaue Röhren) bindet, einem *coiled-coil*-Stiel und einem langgestreckten C-Terminus (grün) und transportiert die Fracht entlang der Mikrotubuli (blau) zur Substratanheftungsebene, interagiert dort temporär mit Myosin IIA (violett), wobei die Fracht umgeladen wird und über Aktinfilamente (rote Linien) zwischen den Podosomen (rote konische Strukturen) an diese verteilt wird.

**1b, Hetero-Motor-Komplex an Vesikeln:** KIF1C (grün) und Myosin IIA (violett) binden an ein Frachtvesikel (orange), der Transport zur Substratanheftungsebene erfolgt über Kinesin entlang von Mikrotubuli (blau), bei Erreichen von Aktinfilamenten (rot) übernimmt Myosin IIA die Transportfunktion.

**2, Führungsmechanismus:** Podosomen sind über Aktinfilamente (rote Linien) miteinander verbunden. An den Aktinfilamenten entlang transloziert Myosin IIA (blau), KIF1C (grün) bindet an Myosin IIA. Durch die Verbindung Myosin IIA-KIF1C werden die Mikrotubuli zu den Podosomen geführt. Weitere Faktoren werden über diese Mikrotubuli angeliefert, entweder direkt durch KIF1C oder weitere Motorproteine

Diese Interpretationsmöglichkeiten wurden in Modellen dargestellt (Abb. 4-4):

Die subzellulären Unterschiede in der Podosomendynamik könnten sich daraus ergeben, dass nur in der Zellperipherie Podosomen von Mikrotubuli mit gebundenem KIF1C kontaktieren (Abb. 4.4 oben). Bei einem dualen Transportmodell erfolgt die Bewegung der Fracht zunächst über Mikrotubuli bis zum Erreichen der Substratanheftungsebene, wo die Fracht auf Myosin IIA an Aktinfilamenten umgeladen wird (Abb. 4-4, 1a). Ein Hetero-Motor-Komplex würde auch zunächst einen Transport entlang von Mikrotubuli katalysieren, hier wären beide Motoren jedoch dauerhaft an einem Vesikel gebunden, es erfolgt kein Umladen. KIF1C transportiert die Frachtvesikel mitsamt dem gebundenen Myosin IIA. Beim Führungsmechanismus bindet KIF1C an Mikrotubuli und an Myosin IIA. Dieses wiederum bewegt sich entlang der Aktinfilamente zwischen den Podosomen. Über die Verbindung KIF1C-Myosin IIA könnten also die Mikrotubuli zu den Podosomen geführt und weitere Podosomenregulatoren angeliefert werden. Dies würde auch die gestörte Podosomendynamik bei Hemmung von Myosin IIA oder bei Injektion des Myosin IIA-bindenden KIF1C-Fragments erklären. KIF1C ohne gebundenes Myosin IIA ist in diesen Modellen nicht in der Lage, die Podosomen korrekt zu kontaktieren, woraus sich der gestörte Podosomenumsatz erklärt. Die subzelluläre Verteilung von Myosin IIA in einem Ring in der Zellperipherie führt in diesem Fall dazu, dass wie beobachtet, dort eine höhere Podosomendynamik resultiert.

#### 4.5. Ausblick

Durch Einsatz von fluoreszenzmarkiertem Myosin IIA und KIF1C soll in lebenden primären humanen Makrophagen untersucht werden, ob das vorgeschlagene Modell zum Führungsmechanismus der Wirklichkeit entspricht.

Des Weiteren soll die Frage geklärt werden, ob es sich bei den KIF1C-haltigen Strukturen wirklich um membranöse Vesikel handelt und ob daran bereits auch Myosin IIA gebunden ist. Bei Isolation dieser Vesikel könnten eventuell auch weitere Interaktionspartner identifiziert werden, die wahrscheinlich zu den Podosomen transportierte Regulatoren darstellen. Um welche es sich hierbei handelt, soll in zukünftigen Experimenten ermittelt werden.

KIF1C ist sicherlich nicht der einzige Motor, der bei der Regulation der Podosomen eine Rolle spielt, denn bei *knock-down* von KIF1C sank der Anteil der Podosomen-haltigen Zellen nur auf 50%. Podosomen werden durch eine Vielzahl von Proteinen reguliert, die höchstwahrscheinlich separat durch spezifische Motoren transportiert werden. Deswegen sollen in weiterführenden Untersuchungen noch weitere Motoren identifiziert werden und deren Rolle im Podosomenumsatz ermittelt werden.

## **5. Zusammenfassung**

Podosomen sind aktinreiche Adhäsionsstrukturen monozytärer Zellen (Makrophagen, dendritischen Zellen, Osteoklasten) und anderer Zelltypen. Ihre funktionelle Rolle liegt wahrscheinlich in der Adhäsion, gerichteten Migration und Invasion in Gewebe. Mikrotubuli haben in ihrer Regulation eine wichtige Bedeutung, der genaue Mechanismus war jedoch bislang noch nicht bekannt. Es war zudem unklar, ob ein direkter Kontakt zwischen beiden Strukturen besteht. Deswegen wurde die räumliche und funktionelle Beziehung zwischen Podosomen und Mikrotubuli in primären humanen Makrophagen untersucht. Dabei wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. Mikrotubuli-Plusenden traten in lebenden Makrophagen mit der überwiegenden Mehrheit der Podosomen in Kontakt, woraufhin sich je ein Drittel der Podosomen entweder auflöste, sich in zwei oder mehrere Tochterpodosomen teilte oder unverändert blieb. Nicht kontaktierte Podosomen blieben vorwiegend statisch. Die Häufigkeit der jeweiligen Reaktion war hierbei abhängig vom Zellbereich mit einem Vorherrschen der Teilungen und Auflösungen in der Zellperipherie und einer vorherrschend statischen Podosomenpopulation in der Zellmitte. Podosomen werden also durch direkte Interaktionen mit Mikrotubuli reguliert.
2. Mikrotubuli dienen möglicherweise zum Transport von Regulatoren oder Komponenten der Podosomen. Da keiner der bekannten Regulatoren eine Motoraktivität besitzt, lag die Vermutung nahe, dass ein Mikrotubuli-basierter Motor für diesen Transport verantwortlich ist. Als erster Hinweis für die Beteiligung eines Motors wurde die Abhängigkeit der Podosomenbildung von einer ATP-Hydrolyse durch Mikroinjektion eines nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons gezeigt.
3. Es gibt zwei Gruppen von Mikrotubuli-basierten Motoren: Kinesine und Dynein. Der sich in Richtung der Mikrotubuliminusenden bewegende Motor Dynein spielt keine unmittelbare Rolle in der Podosomenbildung, wie durch Mikroinjektion eines inhibitorischen Antikörpers gegen Dynein und eines chemischen Dynein-Inhibitors gezeigt werden konnte.
4. Als zweite Gruppe von Motorproteinen wurden die zum Plusende transportierenden Kinesine untersucht. Fokale Adhäsionen, eine weitere Art von Adhäsionsstrukturen in anderen Zelltypen, werden durch konventionelles Kinesin KIF5B reguliert. Jedoch ergab die Mikroinjektion eines hemmenden Antikörpers gegen KIF5B keinen Hinweis auf eine Beteiligung von KIF5B an der Podosomenregulation.

In einem breit angelegten Versuch mit verschiedenen Wildtyp- und mutierten Konstrukten von unterschiedlichen schweren und leichten Ketten von Kinesinen konnte KIF1C als Motor identifiziert werden, der eine Rolle bei der Podosomenregulation

spielt. Dies konnte durch *knock-down*-Experimente mit siRNA bzw. shRNA bestätigt werden.

5. Die Expression von KIF1C in primären humanen Makrophagen wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und auf Proteinebene mit Immunpräzipitation nachgewiesen. KIF1C bindet wie für ein Kinesin zu erwarten an Mikrotubuli und kann mit diesen kosedimentiert werden. In lebenden primären humanen Makrophagen zeigte GFP-KIF1C eine Anreicherung an Plusenden an der Substratanheftungsebene.
6. Im Weiteren wurde der Einfluss von KIF1C auf die Podosomendynamik genauer untersucht. Bei Transfektion eines GFP-KIF1C-Plasmides wurden in Analogie zu den Interaktionen von Mikrotubulipusenden und Podosomen Kontakte von GFP-KIF1C mit Podosomen beobachtet. Ungefähr die Hälfte der Podosomen wurde von GFP-KIF1C kontaktiert, auch hier löste sich je ein Drittel der kontaktierten Podosomen auf, teilte sich oder blieb unverändert. Daraus kann man schließen, dass KIF1C eine Rolle in der Podosomenregulation spielt. Zudem beschränkten sich die Kontakte vorrangig auf die Zellperipherie.
7. Zur Herstellung einer dominant negativen Mutante von KIF1C wurde eine Punktmutation in das ATP-Bindemotiv eingeführt, die in einem sogenannten Rigor-Zustand des Motors resultieren sollte, d.h. das Kinesin kann zwar noch ATP binden, aber nicht mehr hydrolysieren. Transfektion dieser K103A-Mutante führte in primären humanen Makrophagen zu einer Verringerung der Zellen mit Podosomen, außerdem war eine Akkumulation des GFP-Signals am Zentrosom zu beobachten. In lebenden Makrophagen ergab sich eine Reduzierung der sich teilenden Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit dem Wildtyp-Kinesin transfiziert wurden.  
*knock-down* von KIF1C hatte ebenfalls einen verringerten Anteil podosomenhaltiger Zellen, sowie einen geringeren Prozentsatz sich teilender Podosomen zur Folge. Für KIF1C konnte demnach nicht nur eine Beteiligung an der Podosomenregulation gezeigt werden, sondern es konnte ihm auch eine spezifische Rolle in der Kontrolle der Teilungsrate zugeschrieben werden.
9. Als Interaktionspartner von KIF1C konnte Myosin IIA identifiziert werden und die Bindestelle auf die PTPD1-Bindedomäne von KIF1C eingeschränkt werden. Beide Motoren kolokalisieren in Makrophagen in der Zellperipherie, wobei Myosin IIA auch an Aktinfilamenten zu finden ist, die die einzelnen Podosomen verbinden. Die Interaktion hat auch eine funktionelle Rolle in der Podosomenregulation: bei Hemmung der Bindung durch Mikroinjektion der gereinigten Myosin IIA-bindenden Domäne von KIF1C sowie bei Inhibition von Myosin IIA durch den chemischen Inhibitor Blebbistatin war jeweils eine dosisabhängige Verringerung

der Zellen mit Podosomen zu beobachten. In lebenden Makrophagen löste sich nach Zugabe von Blebbistatin die überwiegende Zahl der Podosomen in der Zellperipherie auf, der Anteil der sich teilenden Podosomen war stark verringert.

Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass KIF1C an den Mikrotubuli-Plusenden angereichert ist und in Kooperation mit Myosin IIA die Podosomendynamik in der Zellperipherie reguliert.

Diese Daten wurden in einem Modell zusammengefasst: Podosomen sind durch Aktinfilamente miteinander verbunden, an welchen sich Myosin IIA bewegt. KIF1C bewegt sich entlang Mikrotubuli und bindet an Myosin IIA. Über diese Verbindung werden die Mikrotubuli an die Podosomen herangeführt und auch von einem zum benachbarten Podosom geleitet. KIF1C könnte über Mikrotubuli Regulatoren herantransportieren, die die Teilung in Tochterpodosomen zur Folge haben. Durch die Verbindung KIF1C-Myosin wird also wahrscheinlich eine gezielte und punktgenaue Anlieferung von Podosomenregulatoren ermöglicht.

Die Identifizierung dieser Podosomenregulatoren sowie die Ermittlung weiterer Motoren mit einer Rolle in der Kontrolle der Podosomendynamik werden Gegenstand weiterer Experimente sein.

- Adams, R. J. und Pollard, T. D.** (1986). Propulsion of organelles isolated from *Acanthamoeba* along actin. *Nature* **322**, 754-756.
- Aizawa, H., Sekine, Y., Takemura, R., Zhang, Z., Nangaku, M. und Hirokawa, N.** (1992). Kinesin family in murine central nervous system. *J. Cell Biol.* **119**, 1287–1296.
- Akira, S.** (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol* **15**, 238.
- Akisaka, T., Yoshida, H., Inoue, S. und Shimizu, K.** (2001). Organization of cytoskeletal F-actin, G-actin, and gelsolin in the adhesion structures in cultured Osteoclast. *J Bone Miner Res* **16**, 1248-55.
- Al-Bassam, J., Cui, Y., Klopfenstein, D., Carragher, B., Vale, R. und Milligan, R.** (2003). Distinct conformations of the kinesin Unc104 neck regulate a monomer to dimer motor transition. *J. Cell Biol* **163**, 743–753.
- Alblas, J., Ulfman, L., Hordijk, P. und Koenderman, L.** (2001). Activation of RhoA and ROCK Are Essential for Detachment of Migrating Leukocytes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2137–2145.
- Allende, J. E. und Allende, C. C.** (1995). Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* **9**, 313–323.
- Alon, R., Kassner, P., Carr, M., Finger, E., Hemler, M. und Springer, T.** (1995). The Integrin VLA-4 Supports Tethering and Rolling in Flow on VCAM-1. *J. Cell Biol.* **128**, 1243-1253.
- Askham, J. M., Moncur, P., Markham, A. und Morrison, E.** (2000). Regulation and function of the interaction between the APC tumour suppressor protein and EB1. *Oncogene* **19**, 1950-1958.
- Baas, P., Karabay, A. und Qiang, L.** (2005). Microtubules cut and run. *Trends Cell Biol* **15**, 518-524
- Babb, S. G., Matsudaira, P., Sato, M., Correia, I. und Lim, S. S.** (1997). Fimbrin in podosomes of monocyte-derived osteoclasts. *Cell Motil. Cytoskeleton* **37**, 308-325.
- Badolato, R., Sozzani, S., Malacarne, F., Bresciani, S., Fiorini, M., Borsatti, A., Albertini, A., Mantovani, A., Ugazio, A. G. und Notarangelo, L. D.** (1998). Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J. Immunol.* **161**, 1026-1033.
- Baggiolini, M. und Dahinden, C.** (1994). CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol. Today* **5**, 127-133.



- Balcer, H., Goodman, A., Rodal, A., Smith, E., Kugler, J., Heuser, J. und Goode, B.** (2003a). Coordinated Regulation of Actin Filament Turnover by a High-Molecular-Weight Srv2/CAP Complex, Cofilin, Profilin, and Aip1. *Curr. Biology* **13**, 2159–2169.
- Banin, S., Truong, O., Katz, D. R., Waterfield, M. D., Brickell, P. M. und Gout, I.** (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) is a binding partner for c-Src family protein-tyrosine kinases. *Curr. Biol. Bull* **6**.
- Belmont, L. und Mitchison, T.** (1996). Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* **84**, 623-631.
- Benashski, S., Harrison, A., Patel-King, R. und King, S.** (1997). Dimerization of the Highly Conserved Light Chain Shared by Dynein and Myosin V. *J. Biol. Chem* **272**, 20929–20935.
- Ben-Baruch, A., Xu, L., Young, P., Bengali, K., Oppenheim, J. und Wang, J.** (1995). Monocyte Chemoattractant Protein-3 (MCP-3) Interacts with Multiple Leukocyte Receptors. *J. Biol. Chem* **270**, 22123-22128.
- Berdeaux, R. L., Diaz, B., Kim, L. und Martin, G. S.** (2004). Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J. Cell Biol.* **166**, 317-323.
- Berg, J., Powell, B. und Cheney, R.** (2001). A Millennial Myosin Census. *Mol. Biol. Cell* **12**, 780–794.
- Bergen, L. G. und Borisy, G. G.** (1980). Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J. Cell Biol.* **84**, 141–150.
- Berlin, C., Berg, E. L., Briskin, M. J., Andrew, D. P., Kilshaw, P. J., Holzmann, B., Weissman, I. L., Hamann, A. und Butcher, E. C.** (1993). alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* **74**, 185´.
- Bershadsky, A., Chausovsky, A., Becker, E., Lyubimova, A. und Geiger, B.** (1996). Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr. Biol. Bull* **6**, 1279–1289.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Brown, S.** (1999). Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**, 63-80.
- Buccione, R., Orth, J. und McNiven, M.** (2004). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Mol. Cell Biol.* **5**, 647-657.
- Burgess, S. A., Walker, M. L., Sakakibara, H., Knight, P. J. und Oiwa, K.** (2003). Dynein structure and power stroke. *Nature* **421**, 715-718.

- Burgstaller, G. und Gimona, M.** (2005). Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.*
- Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T. und Vallee, R.** (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol.* **139**, 469–484.
- Burns, S., Thrasher, A. J., Blundell, M. P., Machesky, L. und Jones, G. E.** (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* **98**, 1142-1149.
- Burtnick, L., Urosev, D., Irobi, E., Narayan, K. und Robinson, R.** (2004). Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. *EMBO J.* **23**, 2713–2722.
- Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompierre, J. und De Mey, J.** (1998). Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr. Biol.* **8**, 541-544.
- Butcher, E. C.** (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* **67**, 1033-1036.
- Carlier, M. und Pantaloni, D.** (1988). Binding of Phosphate to F-ADP-actin and Role of F-ADP-Pi-actin in ATP-actin Polymerization. *J.Biol. Chem* **263**, 817-825.
- Carlier, M., Pantaloni, D. und Korn, E.** (1984). Evidence for an ATP Cap at the Ends of Actin Filaments and Its Regulation of the F-actin Steady State. *J. Biol. Chem.* **259**, 9983-9986.
- Carlier, M. F.** (1989). Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int. Rev. Cytol.* **115**, 139-170.
- Carvalho, P., Tirnauer, J. und Pellman, D.** (2003). Surfing on microtubule ends. *Trends Cell Biol* **13**.
- Castellano, F., Le Clainche, C., Patin, D., Carlier, M. F. und Chavrier, R.** (2001a). A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *EMBO J.* **20**, 5603–5614.
- Castellano, F., Chavrier, P. und Caron, E.** (2001b). Actin dynamics during phagocytosis. *Immunology* **13**, 347–355.
- Chellaiah, M., Fitzgerald, C., Alvarez, U. und Hruska, K. A.** (1998). c-Src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem* **273**, 11908–11916.
- Chellaiah, M. und Hruska, K. A.** (1996). Osteopontin stimulates gelsolin-associated phosphoinositide levels and phosphatidylinositol triphosphate-hydroxyl kinase. *Mol. Biol. Cell* **7**, 743–753.

- Chellaiah, M., Kizer, N., Silva, M., Alvarez, U., Kwiatkowski, D. und Hruska, K.** (2000). Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. *J Cell Biol.* **148**, 665-78.
- Chellaiah, M. A., Biswas, R. S., Yuen, D., Alvarez, U. M. und Hruska, K. A.** (2001). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate directs association of Src homology 2-containing signaling proteins with gelsolin. *J. Biol. Chem* **276**, 47434-47444.
- Chen, W. T.** (1989). Proteolytic activity of specialized surface protusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J. Exp. Zool.* **251**, 167-185.
- Cheney, R. E. und Mooseker, M. S.** (1992). Unconventional myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 27-35.
- Choi, J., Bertram, P., Drenan, R., Carvalho, J., Zhou, H. und Zheng, X.** (2002). The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO reports* **3**, 988–994.
- Chretien, D., Kenney, J., Fuller, S. und Wade, R.** (1996). Determination of microtubule polarity by cryo-electron microscopy. *Structure* **4**, 1031-1040.
- Conrad, P. A., Giulano, K. A., Fisher, G., Collins K., Matsudaira, P. T. und Taylor, D. L.** (1993). Relative distribution of actin, myosin I, and myosin II during the wound healing response of fibroblasts. *J. Cell Biol.* **120**, 1381-1391.
- Conti, M., Even-Ram, S., Liu, C., Yamada, K. und Adelstein, R.** (2004). Defects in Cell Adhesion and the Visceral Endoderm following Ablation of Nonmuscle Myosin Heavy Chain II-A in Mice. *J. Biol. Chem.*
- Cory, G. O., Garg, R., Cramer, R. und Ridley, A. J.** (2002). Phosphorylation of the tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerisation and filopodium formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 45115-45121.
- Cross, R.** (2004a). Molecular Motors: Dynein's Gearbox. *Current Biology* **14**, R355–R356.
- Cross, R. A.** (2004b). Molecular Motors: Kinesin's Interesting Limp. *Current Biology* **14**, R158–R159.
- Cole, D.G., Diener, D. R., Himelblau, A.L., Beech, P. L., Fuster, J. C., Rosenbaum, J. L.** (1998) *Chlamydomonas* Kinesin-II-dependent Intraflagellar Transport (IFT): IFT Particles Contain Proteins Required for Ciliary Assembly in *Caenorhabditis elegans* Sensory Neurons. *J. Cell Biol.*, **141**, 993-1008
- Cook TA, Nagasaki T, und Gundersen GG.** (1998) ;Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J Cell Biol.* **141**,175–185
- Cybulsky, M. und Gimbrone, M. J.** (1991). Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **251**, 788-791.

**Danowski, B. A.** (1989). Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J. Cell Sci* **93**, 255–266.

**Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A. und Hall, A.** (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J. Biol. Chem.* **276**, 1677-1680.

**De La Cruz, E. und Ostap, M.** (2004). Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Current Opinion in Cell Biology* : **16**, 61–67.

**Delaissé, J. M., Engsig, M. T., Everts, V., del Carmen Ovejero, M., Ferreras, M., Lund, L., Vu, T. H., Werb, Z., Winding, B. und Lochter, A.** (2000). Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin. Chim. Acta* **291**, 223-234.

**Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., and Walczak, C.E.** (1999). Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* **96**, 69–78.

**Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J. C., Jurdic, P. und Bard, F.** (2003). Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol. Biol. Cell* **14**, 407-416.

**Dixon, T., Meselson, M., Guillemin, J. und Hanna, P.** (1999). Medical progress: anthrax. *New Engl J Med* **341**, 815-862.

**Dorner, C., Ciossek, T., Müller, S., Møller, N., Ullrich, A. und Lammers, R.** (1998). Characterization of KIF1C, a New Kinesin-like Protein Involved in Vesicle Transport from the Golgi apparatus to the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **273**, 20267–20275.

**Duesberry, N., Webb, C., Leppla, S., Gordon, V., Klimpel, K., Copeland, T., Ahn, N., Oskarsson, M., Fukasawa, K., Paull, K. et al.** (1998). Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* **280**, 724-727.

**Duong, L. T. und Rodan, G. A.** (2000). PYK2 is an adhesion kinase in macrophages, localized in podosomes and activated by beta(2)-integrin ligation. *Cell Motil. Cytoskeleton* **47**, 174–188.

**Dutartre, H., Jean Davoust, Jean-Pierre Gorvel und Philippe Chavrier** (1996). Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J. Cell Sci* **109**, 367–377.

**Echeverri, C., Paschal, P., Vaughan, K. und Vallee, R. B.** (1996). Molecular Characterization of the 50-kD Subunit of Dynactin Reveals Function for the Complex in Chromosome Alignment and Spindle Organization during Mitosis. *J. Cell Biol.* **132**, 617-633.

**Ellis, S. und Mellor, H.** (2000). The novel Rho-family GTPase rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. *Curr Biol* **10**, 1387-1390.

- Endow, S. und Waligora, K.** (1998). Determinants of Kinesin Motor Polarity. *Science* **281**, 1200-1202.
- Enomoto, T.** (1996). Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct. Funct.* **21**:, 317–326.
- Espindola, F., Suter, D., Partata, L., Cao, T., Wolenski, J., Cheney, R., King, S. und Mooseker, M.** (2000). The Light Chain Composition of Chicken Brain Myosin-Va: Calmodulin, Myosin-II Essential Light Chains, and 8-kDa Dynein Light Chain/PIN. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **47**, 269 –281.
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A.** (2002). RhoGTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- Evans, J., Correia, I., Krasavina, O., Watson, N. und Matsudaira, P.** (2003). Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J Cell Biol* **161**, 697-705.
- Evans, L., Hammer, J. und Bridgman, P.** (1997). Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from dilute-lethal neurons. *J. Cell Sci.* **110**, 439.
- Feng, D., Nagy, J., Pyne, K., Dvorak, H. und Dvorak, A.** (1998). Neutrophils Emigrate from Venules by a Transendothelial Cell Pathway in Response to FMLP. *J. Exp. Med.* **187**, 903–915.
- Friedl, P., Borgmann, S. und Eb, B.** (2001). Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J. Leukocyte Biol* **70**, 491-509.
- Fuchs, E. und Yang, Y.** (1999). Crossroads on Cytoskeletal Highways. *Cell* **98**, 547–550.
- Fultz, F., Li, C., Geng, W. und Wright, G.** (2000). Remodeling of the actin cytoskeleton in the contracting A7r5 smooth muscle cell. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **21**, 775±787.
- Gavazzi, I., Nermut, M. V. und Marchisio, P. C.** (1989). Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *J. Cell Sci* **94**, 85-99.
- Gee, M., Heuser, J. E. und Vallee, R.** (1997). An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature* **390**, 363-369.
- Gibbons, I. R. und Rowe, A.** (1965). Dynein: a protein with adenosine triphosphate activity from cilia. *Science* **149**, 424.
- Gimona, M., Kaverina, I., Resch, G. P., Vignal, E. und Burgstaller, G.** (2003). Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2482-2491.

- Gönczy, P., Pichler, S., Kirkham, M. und Hyman, A.** (1999). Cytoplasmic Dynein Is Required for Distinct Aspects of MTOC Positioning, Including Centrosome Separation, in the One Cell Stage *Caenorhabditis elegans* Embryo. *J. Cell Biol.* **147**, 135–150.
- Goode, B., Drubin, D. und Barnes, G.** (2000). Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol.* **12**, 63-71.
- Greenberg, S. und Grinstein, S.** (2002). Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* **14**, 136-145.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L. und Robertson, M.** (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis gene. *Cell* **66**, 589-600
- Hai, C.-H., Hahne, P., Harrington, E. und Gimona, M.** (2002). Conventional Protein Kinase C Mediates Phorbol-Dibutyrate-Induced Cytoskeletal Remodeling in A7r5 Smooth Muscle Cells. *Experimental Cell Research* **280**, 64–74.
- Hannon, G.** (2002). RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
- Harada, A., Takei, Y., Kanai, Y., Tanaka, Y., Nonaka, S. und Hirokawa, N.** (1998). Golgi Vesiculation and Lysosome Dispersion in Cells Lacking Cytoplasmic Dynein. *J. Cell Biol.* **141**, 51–59.
- Heintzelman, M. B. und Schwartzman, J. D.** (1997). A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* **271**, 139-14.
- Henderson, A., Wang, S., Taylor, A., Aitkenhead, M. und Hughes, C.** (2001). The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor HESR1 Regulates Endothelial Cell Tube Formation. *J. Biol. Chem.* **276**, 6169-6176.
- Hirokawa, N.** (1998). Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport. *Science* **279**, 519-526.
- Hirokawa, N., Pfister, K., Yorifuji, H., Wagner, M., Brady, S. und Bloom, G.** (1989). Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell* **56**, 867–878.
- Ho, H., Rohatgi, R., Lebensohn, A., Ma, L., Li, J., Gygi, S. und Kirschner, M.** (2004). Toca-1 Mediates Cdc42-Dependent Actin Nucleation by Activating the N-WASP-WIP Complex. *Cell* **118**, 203–216.
- Holy, T. und Leibler, S.** (1994). Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5682-5685.
- Howell, B. W. und Cooper, J. A.** (1994). Csk suppression of Src involves movement of Csk to sites of Src activity. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5402–5411.
- Huang, J., Brady, S., Richards, B., Stenoiien, D., Resau, J., Copeland, N. und Jenkins, N.** (1999). Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* **397**.

- Hughes, S., Vaughan, K., Herskovits, J. und Vallee, R. B.** (1995). Molecular analysis of a cytoplasmic dynein light intermediate chain reveals homology to a family of ATPases. *J. Cell Sci* **108**, 17-24.
- Hunter, A., Caplow, M., Coy, D., Hancock, W., Diez, S., Wordeman, L. und Howard, J.** (2003). The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends. *Mol Cell* **11**, 445-457.
- Hyams, J.F. and Lloyd, C.W.** (1993). Microtubules. *Wiley-Liss*, New York.
- Infante, A. S., Stein, M. S., Zhai, Y., Borisy, G. G. und Gundersen, G. G.** (2000). Detyrosinated (Glu) microtubules are stabilized by an ATP-sensitive plus-end cap. *J. Cell Sci* **113**, 3907-3919.
- Ingber, D.** (2003a). Tensegrity I. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci* **116**, 1157-1173.
- Ingber, D.** (2003b). Tensegrity II. Cell structure and hierarchical systems biology. *J. Cell. Sci* **116**, 1157-1173.
- Ingold, A. L., Cohn, S. und Scholey, J.** (1988). Inhibition of kinesin-driven microtubule motility by monoclonal antibodies to kinesin heavy chains. *J. Cell Biol* **107**, 2657-2667.
- Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L., Steffen, A., Stradal, T., Fiore, P., Carlier, M. und Scita, G.** (2004). Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat. Cell Biol* **6**, 319-327.
- Jimbo, T., Kawasaki, Y., Koyama, R., Sato, R., Takada, S., Haraguchi, K. und Akiyama, T.** (2002). Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily. *Nat. Cell. Biol.* **4**, 323-325
- Johnson, K. A.** (1985). Pathway of the microtubule-dynein ATPase and the structure of dynein: a comparison with actomyosin. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem* **14**, 161-188.
- Jones, G. E., Zicha, D., Dunn, G. A., Blundell, M. und Thrasher, A.** (2002). Restoration of podosomes and chemotaxis in Wiskott-Aldrich syndrome macrophages following induced expression of WASp. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 806-815.
- Kabsch, W. und Vandekerckhove, J.** (1992). Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol.* **21**, 49-76.
- Kanai, Y., Dohmae, N. und Hirokawa, N.** (2004). Kinesin Transports RNA: Isolation and Characterization of an RNA-Transporting Granule. *Neuron* **43**, 513-525.
- Karabay, A., Yu, W., Solowska, J., Baird, D. und Baas, P.** (2004). Axonal Growth Is Sensitive to the Levels of Katanin, a Protein That Severs Microtubules. *J. Neuroscience* **24**, 5778-5788.

**Karki, S. und Holzbaur, E. L. F.** (1995). Affinity Chromatography Demonstrates a Direct Binding between Cytoplasmic Dynein and the Dynactin Complex. *J Biol. Chemistry* **270**, 28806–28811.

**Katsuragawa, Y., Yanagisawa, M., Inoue, S. und Masaki, T.** (1989). Two distinct nonmuscle myosin-heavy-chain mRNAs are differentially expressed in various chicken tissues. Identification of a novel gene family of vertebrate non-sarcomeric myosin heavy chains. *Eur. J. Biochem* **184**, 611-616.

**Kaverina, I., Krylyshkina, O. und Small, J.** (1999). Microtubule Targeting of Substrate Contacts Promotes Their Relaxation and Dissociation. *J. Cell Biol.*, **146**, 1033–1043.

**Kaverina, I., Rottner, K. und Small, J.** (1998). Targeting, Capture, and Stabilization of Microtubules at Early Focal Adhesions. *J. Cell Biol.*, **142**, 181–190.

**Kawamoto, S. und Adelstein, R.** (1991). Chicken Nonmuscle Myosin Heavy Chains: Differential Expression of Two mRNAs and Evidence for Two Different Polypeptides. *J. Cell Biol.* **112**, 915-924.

**Khyse-Andersen, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-9.

**Kikkawa, M., Okada, Y. und Hirokawa, N.** (2000). 15 Å resolution model of the monomeric kinesin motor, KIF1A. *Cell* **100**, 241–252.

**Kikkawa, M., Sablin, E., Okada, Y., Yajima, J., Fletterick, R. und Hirokawa, N.** (2001). Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature* **411**, 439-445

**Killian, J. J. und Fidler, I. J.** (1994). Systemic targeting of liposome encapsulated immunomodulators to macrophages for treatment of cancer metastasis. *Immunomethods* **4**, 273-279

**Kim AS, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu GA und MK, R.** (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott–Aldrich syndrome protein. *Nature* **404**, 151–158.

**King, S. M. und Witman, G. B.** (1990). Localization of an intermediate chain of outer arm dynein by immunoelectron microscopy. *J. Biol. Chem* **265**, 19807-19811.

**Kirschner, M., Williams, R., Weingarten, M. und Gerhart, J.** (1974). Microtubules from mammalian brain: some properties of their depolymerization products and a proposed mechanism of assembly and disassembly. *Proc Nat Acad Sci USA* **71**, 1159-1163.

**Komarova, Y., Akhmanova, A., Kojima, S., Galjart, N. und Borisy, G. G.** (2002). Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J. Cell Biol.* **159**, 589–599.

**Korn, E. D.** (1985). The regulation of actin and myosin by ATP. *Curr. Top. Cell. Regul* **26**, 221-233.



- Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A. und Sellers, J.** (2004). Mechanism of Blebbistatin Inhibition of Myosin II. *J. Biol. Chem.* **34**, 35557-35563.
- Krebs, A., Goldie, K. und Hoenger, A.** (2004). Complex Formation with Kinesin Motor Domains Affects the Structure of Microtubules. *J. Mol. Biol.* **335**, 139–153.
- Krendel, M., Zenke, F. und Bokoch, G.** (2002). Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat. Cell. Biol.* **4**, 294-301.
- Krylyshkina, O., Kaverina, I., Kranewitter, W., Steffen, W., Alonso, M., Cross, R. und Small, J.** (2002). Modulation of substrate adhesion dynamics via microtubule targeting requires kinesin-1. *J. Cell Biol.*, **156**, 349–359.
- Kuhn, J. und Pollard, T.** (2005). Real-Time Measurements of Actin Filament Polymerization by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal* **88**, 1387–1402.
- Kull, F. J., Sablin, E. P., Lau, R., Fletterick, R. J. und Vale, R. D.** (1996). Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* **380**, 550-555.
- Kuznetsov, S. A., Langford, G. M. und Weiss, D. M.** (1992b). Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* **356**, 722-725.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lakkakorpi, P. T., Nakamura, I., Nagy, P., Parson, J., Rodan, G. A. und Duong, L. T.** (1999). Stable association of PYK2 and p130(Cas) in osteoclasts and their co-localization in the sealing zone. *J. Biol.* **274**, 4900–4907.
- Lakkakorpi, P. T., Wesolowski, G., Zimolo, Z., Rodan, G.A. und Rodane, S. B.** (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase association with the osteoclast cytoskeleton, and its involvement in osteoclast attachment and spreading. *Exp. Cell Res.* **237**, 296–306.
- Lammers, R., Bossenmaier, B., Cool, D. E., Tonks, N. K., Schlessinger, J., Fischer, E. H. und Ullrich, A.** (1993). Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J. Biol. Chem* **268**, 22456–22462.
- Lantz, V. A. und Miller., K. G.** (1998). A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of *Drosophila* embryos. *Cell Biology* **140**, 897–910.
- Larson, R. und Springer, T. A.** (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev* **114**, 181-217.
- Lehto, V.-P., Hovi, T., Vartio, T., Badley, R. und Virtanen, I.** (1982). Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophage. *Lab. Invest.* **47**, 391–399.

**Li, H., Cybulsky, M., Gimbrone, M. J. und Libby, P.** (1993). An atherogenic diet rapidly increases VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. *Arterioscler. Thromb.* **13**, 197-204.

**Ligon, L., Shelly, S., Tokito, M. und Holzbaur, E.** (2003). The Microtubule Plus-End Proteins EB1 and Dynactin Have Differential Effects on Microtubule Polymerization. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1405–1417.

**Lillie, S. H. und Brown, S. S.** (1992). Suppression of a myosin defect by a kinesin-related gene. *Nature* **356**, 358-361.

**Linder, S. und Aepfelbacher, M.** (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol* **13**, 376-385.

**Linder, S., Higgs, H., Hufner, K., Schwarz, K., Pannicke, U. und Aepfelbacher, M.** (2000a). The Polarization Defect of Wiskott-Aldrich Syndrome Macrophages Is Linked to Dislocalization of the Arp2/3 Complex. *J Immunol.* **165**, 221–220.

**Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U. und Aepfelbacher, M.** (2000b). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J. Cell Sci* **113**, 4165-4176.

**Linder, S. und Kopp, P.** (2005). Podosomes at a glance. *J. Cell Sci* **118**, 2079-2082.

**Linder, S., Nelson, D., Weiss, M. und Aepfelbacher, M.** (1999). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9648-9653.

**Lloyd, C. W., Smith, C. G., Woods, A. und D.A., R.** (1977). Mechanism of cellular adhesion. II. The interplay between adhesion, the cytoskeleton and morphology in substrate-attached cells. *Exp. Cell Res.* **110**, 427–437.

**Lo, C., Buxton, D., Chua, G., Dembo, M., Adelstein, R. und Wang, Y.** (2004). Nonmuscle Myosin IIB is involved in the guidance of fibroblast migration. *Mol. Biol. Cell* **15**, 982-989.

**Lobb, R. und Hemler, M.** (1994). The Pathophysiologic Role of  $\alpha 4$  Integrins In Vivo. *J Clin Invest* **94**, 1722-1728.

**Lucker, B. F., Behal, R. H, Qin, H., Siron, L. C., Taggart, W. D., Rosenbaum, J. L, und Cole, D. G.** (2005) Characterization of the Intraflagellar Transport Complex B Core: direct interaction of the IFT81 and IFT74/72 subunits. *J. Biol. Chem.*, **280**, 27688-27696

**Lye, R., Porter, M. E., Scholey, J. und McIntosh, J. R.** (1997). Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C.elegans*. *Cell* **51**.

**Ma, J., Kawamoto, S., Hara, Y. und Adelstein, R.** (2004). A Point Mutation in the Motor Domain of Nonmuscle Myosin II-B Impairs Migration of Distinct Groups of Neurons. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2568–2579.

**Mallik, R. und Gross, S.** (2004). Molecular Motors: Strategies to Get Along. *Current Biology* **14**, R971–R982.

**Mantovani, A., Allavena, P., Vecchi, A. und Sozzani, S.** (1998). Chemokines and chemokine receptors during activation and deactivation of monocytes and dendritic cells and in amplification of Th1 versus Th2 responses. *Int J Clin Lab Res* **28**, 77-82.

**Marchesi, V. und Gowans, J.** (1964). The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymphnodes: an electron microscopy study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **159**, 283-290.

**Marchisio, P. C., Cirillo, D., Naldini, L., Primavera, M. V., Teti, A. und Zambonin-Zallone, A.** (1984). Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J. Cell Biol.* **99**, 1696-1705.

**Marchisio, P. C., Cirillo, D., Teti, A., Zambonin-Zallone, A. und Tarone, G.** (1987). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Exp. Cell Res.* **169**, 202-214.

**Marchisio, P. C., D'Urso, N., Comoglio, P. M., Giacotti, F. G. und Tarone, G.** (1988). Vanadate-treated baby hamster kidney fibroblasts show cytoskeleton and adhesion patterns similar to their Rous sarcoma virus-transformed counterparts. *J. Cell Biochem.* **37**, 151-159.

**Mattila, P., Quintero-Monzon, O., Kugler, J., Moseley, J., Almo, S., Lappalainen, P. und Goode, B.** (2004). A High-affinity Interaction with ADP-Actin Monomers Underlies the Mechanism and In Vivo Function of Srv2/cyclase-associated Protein. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5158-5171.

**McNally, F. und Vale, R.** (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* **75**, 419-429.

**Melhem, S., Zhu, X., Hailat, N., Strahler, J. und Hanash, S.** (1991). Characterization of the Gene for a Proliferation-related Phosphoprotein (Oncoprotein 18) Expressed in High Amounts in Acute Leukemia. *J Biol. Chem* **266**, 17747-17753.

**Mermall, V., Post, P. und Mooseker, M.** (1998). Unconventional Myosins in Cell Movement, Membrane Traffic, and Signal Transduction. *Science* **279**.

**Mikami, A., Paschal, B., Mazumdar, M. und Vallee, R. B.** (1993). Molecular cloning of the retrograde transport motor cytoplasmic dynein (MAP 1C). *Neuron* **10**, 787-796.

**Mikhailov, A. V. und Gundersen, G. G.** (1995). Centripetal transport of microtubules in motile cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **32**, 173–186.

**Miki, H., Okada, Y. und Hirokawa, N.** (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol.* **15**, 457-470

- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K. und Hirokawa, N.** (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *PNAS* **98**, 7004–7011.
- Miki, H. und Takenawa, T.** (2003). Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J. Biochem (Tokyo)* **134**, 309-313.
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. und Tsukita, S.** (2000). Adenomatous Polyposis Coli (APC) Protein Moves along Microtubules and Concentrates at Their Growing Ends in Epithelial Cells. *J. Cell Biol.* **148**, 505–517.
- Mitchison, T. und Kirschner, M.** (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242.
- Mizuno, N., Toba, S., Edamatsu, M., Watai-Nishii, J., Hirokawa, N., Toyoshima, Y. und Kikkawa, M.** (2004). Dynein and kinesin share an overlapping microtubule-binding site. *EMBO J* **23**, 2459–2467.
- Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H. und Takenawa, T.** (2002). Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Research* **62**, 669–674.
- Mockrin, S. C. und Korn, E. D.** (1980). Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound ATP. *Biochemistry* **19**, 5359-5362.
- Moores, C. A., Yu, M., Guo, J., Beraud, C., Sakowicz, R. und Milligan, R.** (2002). A mechanism for microtubule depolymerization by KinI kinesins. *Mol. Cell* **9**, 903–909.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C. und Genot, E.** (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell Biol* **23**, 6809-6822.
- Morris, R. und Hollenbeck, P.** (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J. Cell Biol.* **131**, 1315–26.
- Morris, R. und Scholey, J.** (1997). Heterotrimeric Kinesin-II is required for the assembly of motile 9+2 Ciliary Axonemes on Sea Urchin Embryos. *J. Cell Biol.* **138**, 1009-1022.
- Morrison, E. E., Askham, M., Clissold, P., Markham, A. und Meredith, D.** (1997). The Cellular Distribution of the Adenomatous Polyposis ColiI Tumour Suppressor Protein In Neuroblastoma Cells Is Regulated by Microtubule Dynamics. *Neuroscience* **81**, 553–563.
- Mullins, R. D., Heuser, J. A. und Pollard, T. D.** (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 6181–6186.
- Nakajima, K., Takei, Y., Tanaka, Y., Nakagawa, T., Nakata, T., Noda, Y., Setou, M. und Hirokawa, N.** (2002). Molecular motor KIF1C is not essential for mouse survival and motor-dependent retrograde Golgi apparatus-to-endoplasmic reticulum transport. *Mol. Cell Biol.* **22**, 866-873.

- Nakata und Hirokawa.** (1995). Point mutation of adenosine triphosphate-binding motif generated rigor kinesin that selectively blocks anterograde lysosome membrane transport. *J Cell Biol* **131**, 1039-1053.
- Neuwald, A., Aravind, L., Spouge, J. und Koonin, E.** (1999). AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**, 27–43.
- Nitta, R., Kikkawa, M., Okada, Y. und Hirokawa, N.** (2004). KIF1A Alternately Uses Two Loops to Bind Microtubules. *Science* **305**, 678-683
- Noda, Y., Sato-Yoshitake, R., Kondo, S., Nangaku, M. und Hirokawa, N.** (1995). KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J. Cell Biol.* **129**, 157–167.
- Ogawa, T., Nitta, R., Okada, Y. und Hirokawa, N.** (2004). A common mechanism for microtubule destabilizers – M type kinesins stabilize curling of the protofilament using the class-specific neck and loops. *Cell* **116**, 591–602.
- Okada, Y., Higuchi, H. und Hirokawa, N.** (2003). Processivity of the single-headed kinesin KIF1A through biased binding to tubulin. *Nature* **424**, 574-577.
- Ono, S., Mohri, K. und Ono, K.** (2004). Microscopic Evidence That Actin-interacting Protein 1 Actively disassembles Actin-depolymerizing Factor/Cofilin-bound Actin Filaments. *J Biol. Chem* **279**, 14207–14212.
- Ory, S., Destaing, O. und Jurdic, P.** (2002). Microtubule dynamics differentially regulate Rho and Rac activity and triggers Rho-independent stress fiber formation in macrophage polycaryons. *Eur. J. Cell Biol* **81**, 351-362.
- Osborn, M. und Weber, K.** (1977). The display of microtubules in transformed cells. *Cell* **12**, 561-571.
- Osiak, A.-E., Zenner, G. und Linder, S.** (2005). Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp. Cell Res.***307**; 342-353
- Paavilainen, V. O., Bertling, E., Falck, S. und Lappalainen, P.** (2004). Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* **14**, 386-394.
- Palazzo, A., Cook, T., Alberts, A. und Gundersen, G.** (2002). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Bio.l* **3**, 723-729.
- Paschal, B. und Vallee, R. B.** (1987). Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature* **300**, 181-183.
- Perez, F., Diamantopoulos, G., Stalder, R. und Kreis, T.** (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* **96**, 517-27.

- Pfaff, M. und Jurdic, P.** (2001). Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin alphaVbeta. *J. Cell Sci.* **114**, 2795–2807.
- Pfarr, C. M., Cove, M., Grisson, P. M., Hays, T. S., Porter, M. E. und McIntosh, J. R.** (1990). Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature* **345**, 263-265.
- Pfister, K. K., Fay, R. B. und Witman, G. B.** (1982). Purifications and polypeptide composition of dynein ATPases from *Chlamydomonas* flagella. *Cell Motil* **2**, 525-547.
- Pfister, K. K., Wagner, M., Bloom, G. und Brady, S.** (1989). Modification of the microtubule-binding and ATPase activities of kinesin by N-ethylmaleimide (NEM) suggests a role for sulfhydryls in fast axonal transport. *Biochemistry* **28**, 9006-9012.
- Pielak, R., Gaysinskaya, V. und Cohen, W.** (2003). Cytoskeletal Events Preceding Polar Body Formation in Activated Spisula Eggs. *Biol. Bull.* **205**, 192-193.
- Piperno, G. und Luck, D. J. L.** (1979). Axonemal adenosine triphosphatases from flagella of *Chlamydomonas reinhardtii*: purification of two dyneins. *J Biol. Chem* **254**, 3084-3090.
- Platt, N., da Silva, R. P. und Gordon, S.** (1998). Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* **8**, 365-378.
- Polakis, P.** (1997). The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochem. Biophys. Acta* **1332**, F127-147.
- Pollard, T.** (1986). Rate Constants for the Reactions of ATP- and ADP-Actin with the Ends of Actin Filaments. *J. Cell Biol.* **103**, 2747-2754.
- Ponting, C. P.** (1995). AF-6/cno: neither a kinesin nor a myosin, but a bit of both. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 265–266.
- Porter, M., Bower, K., Knott, J., Byrd, P., und Dentler, W.** (1999). Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Mol. Biol. Cell* **10**:693-712
- Poole, J. und Florey, H.** (1958). Changes in the endothelium of the aorta and the behavior of macrophages in experimental atheroma of rabbits. *J. Pathol. Bacteriol.* **75**, 245-253.
- Pruyne, D.** (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* **297**, 612-615.
- Rajavashisth, T., Liao, J. K., Galis, Z. S., Tripathi, S., Laufs, U., Tripathi, J., Chai, N.-N., Jovinge, S., Shah, P. K., Libby, P.** (1999). Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type-1-matrix metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 11924-11929.

- Ramamurthy, R., Yengo, C., Straight, A., Mitchison, T. und Sweeney, H.** (2004). Kinetic mechanism of blebbistatin inhibition of nonmuscle myosin IIb. *Biochemistry* **43**, 14832-14839.
- Ray, S., Meyhöfer, E., Milligan, R. und Howard, J.** (1993). Kinesin Follows the Microtubule's Protofilament Axis. *J. Cell Biol.* **121**, 1083-1093.
- Rickard, J. E. und Sheterline, P.** (1986). Cytoplasmic concentrations of inorganic phosphate affect the critical concentration for assembly of actin in the presence of cytochalasin D or ADP. *J. Mol. Biol* **191**, 273-280.
- Ridley, A.** (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* **114**.
- Ridley, A., Patersen, H., Johnston, C., Diekmann, D. und Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.
- Rodionov, V. I., Gyoeva, F. K. und Gelfand, V. I.** (1991). Kinesin is responsible for centrifugal movement of pigment granules in melanophores. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 4956-4960.
- Rodriguez, O. C., Schaefer, A., Mandato, C., Forscher, P., Bement, W. und Waterman-Storer, C.** (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 599-609.
- Rohatgi, R., Ho, H. und MW, K.** (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* **150**, 1299–1310.
- Sagot, I., Rodal, A., Moseley, J., Goode, B. und Pellman, D.** (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Na. Cell Biol.* **3**, 626-631.
- Salmon, W. C., Adams, M. C. und Waterman-Storer, C. M.** (2002). Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *J. Cell Biol.* **158**, 31-37.
- Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D. und Jurdic, P.** (2004). Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5231-5241.
- Sato, T., del Carmen Ovejero, M., Hou, P., Heegaard, A., Kumegawa, M., Foged, N. und Delaissé, J. M.** (1997). Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J. Cell Sci* **110**, 589–596.
- Schaller, M. D.** (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* **20**, 6459–6472.
- Schliwa, M., Ezzell, R. M. und Euteneuer, U.** (1984). Erythro-9-[3-(2-Hydroxyonyl)]adenine is an effective inhibitor of cell motility and actin assembly. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **81**, 6044-6048.
- Schliwa, M. und Woehlke, G.** (2003). Molecular motors. *Nature* **422**, 759-765.

- Sellers, J.** (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* **1496**, 3-22.
- Sharp, D., Rogers, G. und Scholey, J.** (2000). Roles of motor proteins in building microtubule-based structures: a basic principle of cellular design. *Biochim. Biophys. Acta* **1496**, 128-141.
- Smith, A., Bracke, M., Leitinger, B., Porter, J. und Hogg, N.** (2003). LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J. Cell Sci.* **116**, 3123-3133.
- Springer, T. A.** (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314.
- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J. und Stradal, T.** (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* **23**, 749-759.
- Steffen, W., Karki, S., Vaughan, K. T., Vallee, R. B., Holzbaur, E. L. F., Weiss, D. G. und Kuznetsov, S. A.** (1997). The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2077-2088.
- Steuer, E., Wordeman, L., Schroer, T. A. und Sheetz, M. P.** (1990). Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores. *Nature* **345**, 266-268.
- Straight, A., Cheung, A., Limouze, J., Chen, J., Westwood, N., Sellers, J. und Mitchison, T.** (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science* **299**, 1743-1747.
- Su, L., Burrell, M., Hill, D., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B. und Kinzler, K.** (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Research* **55**, 2972-2977.
- Svitkina, T., Bulanova, E. A., Chaga, Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S. und Borisy, G. G.** (2003a). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell Biol.* **160**, 409-421.
- Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S., Vasiliev, J. M. und Borisy, G. G.** (2003b). *J. Cell Biol.* **160**, 409-421.
- Symons, M. und Settleman, J.** (2000). Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol.* **10**, 415-419.
- Tai, A., Chuang, J., Bode, C., Wolfram, U. und Sung, C.** (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* **97**, 877-887.



**Tanaka, S., Takahasi, N., Udagawa, N., Murakami, H., Nakamura, I., Kurokawa, T. und Suda, T.** (1995). Possible involvement of focal adhesion kinase, p125FAK, in osteoclastic bone resorption. *J. Cell. Biochem* **58**, 424–435.

**Tang, W. J. Y., Bell, C. W., S, S. W. und Gibbons, I. R.** (1982). Structure of the dynein-1 outer arm in sea urchin sperm flagella. I. Analysis by separation of subunits. *J. Biol. Chem* **254**, 3084-3090.

**Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F. G., Comoglio, P. M. und Marchisio, P. C.** (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res.* **159**, 141-157.

**Tijsterman, M., Ketting, R. und Plasterk, R.** (2002). The genetics of RNA silencing. *Ann. Rev. Gen.* **36**, 489-519.

**Tirnauer, J., O'Toole, E., Berrueta, L., Bierer, B. und Pellman, D.** (1999). Yeast Bim1p Promotes the G1-specific Dynamics of Microtubules. *J. Cell Biol.* **145**, 993-1007.

**Togel, M., Wiche, G. und Propst, F.** (1998). Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J. Cell Biol.* **143**, 695-707.

**Tomishige, M., Klopfenstein, D. und Vale, R.** (2002). Conversion of Unc104/KIF1A Kinesin into a processive Motor After Dimerization. *Science* **297**, 2263-2267.

**Trotter, J. A.** (1981). The organization of actin in spreading macrophages. The actin-cytoskeleton of peritoneal macrophages is linked to the substratum via transmembrane connections. *Exp Cell Res* **132**, 235-48.

**Tucker, A., Salles, I., Voth, D., Ortiz-Leduc, W., Wang, H., Dozmorov, I., Centola, M. und Ballard, J.** (2003). Decreased glycogen synthase kinase 3-beta levels and related physiological changes in *Bacillus anthracis* lethal toxin-treated macrophages. *Cell. Microbiol.* **5**, 523–532.

**Turner, C. E.** (2000). Paxillin interactions. *J. Cell Sci* **113**, 4139–4140.

**Tuschl, T.** (2001). RNA interference and small interfering RNAs. *Chemobiochem* **2**, 239-245.

**Ulitzur, N., Humbert, M. und Pfeffer, S.** (1997). Mapmodulin: A possible modulator of the interaction of microtubule-associated proteins with microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5084–5089.

**Underhill, D. und Ozinsky, A.** (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immun.* **14**, 103–110.

**Vale, R.** (1999). Millennial Musing on microtubule motors. *Trends Cell Biol.* **9**, M38-M42.

**Vale, R. und Milligan, R.** (2000). The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* **288**, 88-95.

**Vale, R. und Toyoshima, Y.** (1988). Rotation and translocation of microtubules in vitro induced by dyneins from *Tetrahymena* cilia. *Cell* **52**, 459-469.

**Vallee, R. B. und Sheetz, M. P.** (1996). Targeting of motor proteins. *Science* **271**, 1539-1544.

**Vaughan, K.** (2004). Surfing, regulating and capturing: are all microtubule-tip-tracking proteins created equal? *Trends Cell Biol* **14**, 491-496

**Vaughan, K. und Vallee, R. B.** (1995). Cytoplasmic Dynein Binds Dynactin through a Direct Interaction between the Intermediate Chains and p150 Glued. *J. Cell Biol.* **131**, 1507-1516.

**Volkman, N., Amann, K. J., Stoilova-McPhie, S., Egile, C., Winter, D. C., Hazelwood, L., Heuser, J. E., Li, R., Pollard, T. D. und Hanein, H.** (2001). Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* **293**, 2456-2459.

**Wang, H. und Nogales, E.** (2005). Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature* **435**, 911-915.

**Wang, Z., Khan, S. und Sheetz, M. P.** (1995). Single cytoplasmic dynein molecule movements: characterization and comparison with kinesins. *Biophys. J* **69**, 2011-2023.

**Waterman-Storer, C. M. und Salmon, E. D.** (1997). Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J. Cell Biol.* **139**, 417-434.

**Watters, J. W., Dewar, K., Lehoczky, J., Boyartchuk, V. und Dietrich, W. F.** (2001). Kif1C, a kinesin-like motor protein, mediates mouse macrophage resistance to anthrax lethal factor. *Curr. Biol. Bull* **11**, 1503-1511.

**Weber, J. E. und Osborn, M.** (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **224**, 4406-4412.

**Wei, Q. und Adelstein, R.** (2000). Conditional Expression of a Truncated Fragment of Nonmuscle Myosin II-A Alters Cell Shape but Not Cytokinesis in HeLa Cells. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3617-3627.

**Welch, M. und Mitchison, T.** (1998). Purification and assay of the platelet Arp2/3 complex. *Methods Enzymol* **298**, 52-61.

**West, M. A., Prescott, A., Eskelinen, E., Ridley, A. J. und Watts, C.** (2000). Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr. Biol. Bull* **10**, 839-848.

**Wittmann, T., Bokoch, G. und Waterman-Storer, C.** (2003). Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J. Cell Biol.* **161**, 845-851.

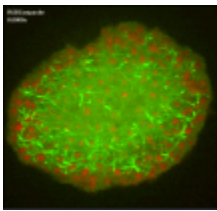
- Woehlke, G.**, (2001). A look into kinesin's powerhouse. *FEBS Lett.* **508**, 291-294
- Worthylake, R. und Burridge, K.** (2001). Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 569–577.
- Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T. et al.** (2005). Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP–Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J. Cell Biol.* **168**.
- Yonekawa, Y., Harada, A., Okada, Y., Funakoshi, T., Kanai, Y., Takei, Y., Terada, S., Noda, T. und Hirokawa, N.** (1998). Defect in Synaptic Vesicle Precursor Transport and Neuronal Cell Death in KIF1A Motor Protein–deficient Mice. *J. Cell Biol.* **141**, 431–441.
- Yvon, A. und Wadsworth, P.** (2000). Region-specific Microtubule Transport in Motile Cells. *J. Cell Biol.* **151**, 1003–1012.
- Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z und B, G.** (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci* **116**, 4605-4613.
- Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Grano, M., Rubinacci, A., Abbadini, M., Gaboli, M. und Marchisio, P.** (1989). Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: A beta3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp. Cell Res.* **182**, 645–652.
- Zamir, E. und Geiger, B.** (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **114**, 3583–3590.
- Zamir, E., Katz, B. Z., Aota, S., Yamada, K. M., Geiger, B. und Kam, Z.** (1999). Molecular diversity of cell-matrix adhesion. *J. Cell Sci* **112**, 1655-1669.
- Zhang, D., Udagawa, N., Nakamura, I., Murakami, H., Saito, M., Yamasaki, K., Shibasaki, Y., Morii, N., Narumiya, S., Takahashi, N. et al.** (1995). The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J. Cell Sci* **108**, 2285–2292.
- Zhang, Z., Tanaka, Y., Nonaka, S., Aizawa, H., Kawasaki, H., Nakata, T. und Hirokawa, N.** (1993). The primary structure of rat brain (cytoplasmic) dynein heavy chain, a cytoplasmic motor enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7928-7932.
- Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H., Terada, T. S., Nakata, T., Takei, Y. et al.** (2001). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1B $\beta$ . *Cell* **105**, 587–597.
- Zicha, D., Allen, W., Brikell, P., Kinnon, C., Dunn, G., Jones, G. E. und Trasher, A.** (1998). Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Br. J. Haematol.* **101**, 659–665.

## 7. Anhang

### Inhalt der Video-CD

Für eine optimale Abspielgeschwindigkeit von der CD wurden die Filme komprimiert (siehe Ordner „komprimierte Fassung der Filme“), die Originalfassung der Filme befindet sich im Ordner „Filme in Originalauflösung“.

#### **Film 1. CLIP170-markierte Mikrotubuliplusenden kontaktieren Podosomen**

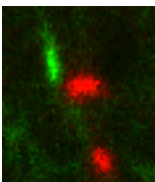


primäre humane Makrophagen, transfiziert mit pmRFP-Aktin und pEGFP-CLIP170. Die Aufnahmen zeigen die Substratanheftungsebene der Zellen, Mikrotubuliplusenden (grün) kontaktieren Podosomen (rot).

Die Zeit seit Beginn des Filmes ist in sec in der linken oberen Ecke des Films zu sehen.

Dauer des Films: 4 sec (entspricht in Echtzeit 6 min)

#### **Film 1A: Kontaktierte Podosomen bleiben unverändert**

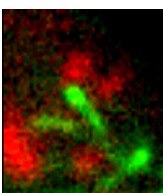


Ausschnittsvergrößerung aus Film 1

Das Podosom (rot) wird von mehrfach von CLIP170-markierten Mikrotubuliplusende (grün) kontaktiert, bleibt aber während des Beobachtungszeitraumes unverändert.

Dauer des Filmes: 7 sec (entspricht in Echtzeit 10 min)

#### **Film 1B: Kontaktierte Podosomen lösen sich auf**

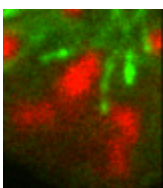


Ausschnittsvergrößerung aus Film 1

Das Podosom (rot) wird von einem CLIP170-markierten Mikrotubuliplusende (grün) kontaktiert und sich daraufhin auflöst

Dauer des Filmes: 7 sec (entspricht in Echtzeit 10 min)

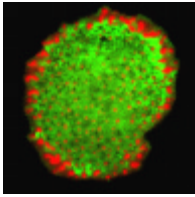
#### **Film 1C: Kontaktierte Podosomen teilen sich in Tochterpodosomen**



Ausschnittsvergrößerung aus Film 1

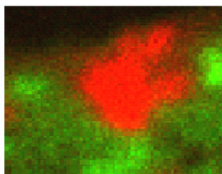
Der Podosomen-Precursor-Cluster (rot) wird vielfach von mehreren CLIP170-markierten Mikrotubuliplusenden (grün) kontaktiert und teilt sich daraufhin in mehrere Tochterpodosomen

Dauer des Filmes: 7 sec (entspricht in Echtzeit 10 min)

**Film 2. KIF1C kontaktiert Podosomen**

primäre humane Makrophagen, transfiziert mit pmRFP-Aktin und pEGFP-KIF1C, die Aufnahmen zeigen die Substratanheftungsebene der Zellen, vesikelartige Strukturen mit GFP-KIF1C (grün) kontaktieren besonders an der Zellperipherie Podosomen (rot).< Die Zeit seit Beginn des Filmes ist in sec in der linken oberen Ecke zu sehen.

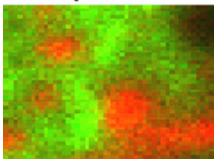
Dauer des Filmes: 7sec (entspricht in Echtzeit 12 min)

**Film 2A: Von KIF1C kontaktierte Podosomen teilen sich in drei Tochterpodosomen**

Ausschnittsvergrößerung aus Film 2

Der Podosomen-*Precursor-Cluster* (rot) wird mehrfach von verschiedenen GFP-KIF1C-Strukturen (grün) kontaktiert und teilt sich daraufhin in drei Tochterpodosomen.

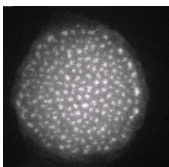
Dauer des Filmes: 7 sec (entspricht in Echtzeit 12 min)

**Film 2B: Von KIF1C kontaktierte Podosomen lösen sich auf**

Ausschnittsvergrößerung aus Film 2.

Das Podosom (rot) wird mehrfach von GFP-KIF1C-Strukturen (grün) kontaktiert und löst sich daraufhin auf.

Dauer des Filmes: 7 sec (entspricht in Echtzeit 12 min)

**Film 3: Hemmung von Myosin IIA durch Blebbistatin führt zur Auflösung der Podosomen**

primäre humane Makrophagen, transfiziert mit pmRFP-Aktin, zu Beginn der Aufnahmen wurde 40  $\mu$ M Blebbistatin zugegeben. Der Effekt tritt nach ca. 5 min auf. Die Mehrzahl der Podosomen löst sich auf, so dass nach 13 min nur noch eine geringe Anzahl vorhanden ist.

Dauer des Filmes: 8 sec (entspricht in Echtzeit 16 min)

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne deren Unterstützung, Hilfe, Verständnis und Anregungen diese Arbeit erst möglich gemacht wurde.

Ich danke Herrn Prof. Dr. P.C. Weber für die freundliche Aufnahme in sein Institut und das stete Interesse an meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Leonhardt für die freundliche Bereitschaft, meine Arbeit vor der biologischen Fakultät zu vertreten und Herrn Prof. Dr. M. Schliwa für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn PD Dr. Stefan Linder und Herrn Prof. Dr. Martin Aepfelbacher danke ich für die Vergabe dieses interessanten Themas, für ihr stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, für die umfangreiche Betreuung, die ständige Ansprechbarkeit und die tatkräftige Unterstützung.

Dem Leiter des Max von Pettenkofer-Instituts, Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann danke ich für die wohlwollende Unterstützung.

Ich danke allen Kooperationspartnern, die mir ihre Konstrukte oder Antikörper zur Verfügung gestellt haben: R. Lammers, G. Woehlke, P. Aspenström, S. Deacon, Y. Takai, T. Akiyama, Y. Lee, R. Diefenbach, B. Schnapp, T. Ichimura, N. Galjart, Y. Mimory-Kiyosue.

Allen Mitgliedern des Instituts für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten sowie des Max von Pettenkofer Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke Barbara Böhlig für unzählige Makrophagenpräparationen, Protein- und DNA-Reinigungen, wertvolle technische Hinweise, für ihre Geduld und dafür, dass sie das Labor „am Laufen“ hält.

Dr. Christian Johannes danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz als Administrator und Beauftragter für eigentlich fast alles und die hervorragenden Kostproben seiner Backkünste.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Aepfelbacher/Linder für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Den „Pavillonieren“ Anna, Barbara, Barbara, Bernhard, Daniel, Florian, Sandra und Vanessa danke ich für das freundschaftliche Verhältnis, durch das ich gern an diese Jahre zurückdenke.

Ohne Andreas Schröder und seine schier unerschöpfliche Hilfsbereitschaft bei jeglichen Problemen mit dem *Live Cell Imaging*-System wäre ein großer Teil dieser Arbeit unmöglich gewesen. Ich danke außerdem Raphael Kland für seine Hilfe bei der Komprimierung der Filme.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Barbara Schröder (geb. Schell), die nicht nur im Labor unermüdlich mit Rat und zur Stelle war, mir stets durch Anregungen, Diskussionen und konstruktiver Kritik weiterhalf und die neuerdings nicht einmal die große Entfernung davon abhielt, dieser Arbeit durch das engagierte und gewissenhafte Korrigieren den letzten Schliff zu geben.

Bei meinen Eltern und meiner Familie bedanke ich mich für die Unterstützung in allen Belangen und ihr großes Verständnis und Geduld.

## 9. Lebenslauf

<b>Name:</b>	Petra Magdalena Kopp	
<b>Geburtsdatum:</b>	14.09.1973	
<b>Geburtsort:</b>	München	
<b>Ausbildung:</b>	1980-1984	Grundschule
	1984-1993	Elsa-Brändström-Gymnasium München
	1993	Allgemeine Hochschulreife
	1994-1996	Fachakademie für Übersetzer und Dolmetscher am Fremdspracheninstitut der Landeshauptstadt München Hauptsprache Spanisch, Zusatzsprache Englisch, Fachgebiet Wirtschaft
	Dez. 1996	Staatliche Prüfung für Übersetzer in der spanischen Sprache
	Nov. 1997	Öffentliche Bestellung und Beeidigung am Landgericht München I für die spanische Sprache
<b>Studium:</b>	Nov. 1996- Feb. 2002	Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfächer Biochemie, Genetik, Pharmakologie/Toxikologie Abschluss: Diplom-Biologin (Note 1,2)
		Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. V. Müller am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München Thema: Untersuchungen zur physiologischen Funktion der 8- und 16 kDa-Proteolipide der Na <sup>+</sup> - F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase aus <i>Acetobacterium woodii</i>
<b>Promotion</b>	Juli 2002- Okt. 2005	Doktorarbeit am Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten unter Leitung von PD Dr. Stefan Linder und Betreuung durch Prof. Dr. H. Leonhardt Thema: Regulation von Podosomen in Makrophagen durch Mikrotubuli und Motorproteine

Dateiname: Gesamtdatei 090206  
Verzeichnis: C:\Dokumente und Einstellungen\Petra\Desktop  
Vorlage: C:\Dokumente und  
Einstellungen\Petra\Anwendungsdaten\Microsoft\Vorlagen\Normal.dot  
Titel: Institut für Prophylaxe und Epidemiologie  
Thema:  
Autor: Petra  
Stichwörter:  
Kommentar:  
Erstelldatum: 09.02.2006 9:06  
Änderung Nummer: 2  
Letztes Speicherdatum: 09.02.2006 9:06  
Zuletzt gespeichert von: Petra  
Letztes Druckdatum: 09.02.2006 9:07  
Nach letztem vollständigen Druck  
Anzahl Seiten: 127  
Anzahl Wörter: 65.876 (ca.)  
Anzahl Zeichen: 415.020 (ca.)