
Regulation der Podosomalendynamik in primären humanen Makrophagen

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

vorgelegt von
Susanne Cornfine

Mai 2010

**Regulation der Podosomendynamik
in primären humanen Makrophagen**

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

vorgelegt von
M.Sc. Susanne Cornfine
aus Erding

Erstgutachter: Prof. Dr. George Boyan
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Schleicher
Sondergutachter: Prof. Dr. Stefan Linder

eingereicht am: 11.05.2010

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2010

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

Susanne Cornfine

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2006 bis März 2009 am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie von April 2009 bis Mai 2010 am Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Linder angefertigt. Die Arbeit wurde betreut und vor der biologischen Fakultät vertreten durch Prof. Dr. George Boyan (Department Biologie II – Biozentrum Martinsried: Entwicklungs-Neurobiologie). Diese Arbeit wurde teilweise durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 413, Graduierten-programm 438 - Vaskuläre Biologie in der Medizin) unterstützt.

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung unter folgendem Titel bei *Molecular Biology of the Cell* eingereicht:

Cornfine S., Kopp P., Krüger M., Rudel T., Linder S. The kinesin KIF9 and reggie/flotillin proteins regulate matrix degradation by macrophage podosomes.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf mehreren nationalen und internationalen Tagungen präsentiert:

Cornfine S., Kopp P., Sixt M., Lammers R., Rudel T., Machuy N. and Linder S. Regulation of podosomal dynamics by microtubules and motor proteins. (Abstract A13) FEBS workshop "Invadopodia, Podosomes and Focal Adhesions in Tissue Invasion", 8.-13. September 2007, Ortona, Italien (Poster)

Cornfine S. Regulation of podosomal dynamics by microtubules and motor proteins in primary human macrophages. 4. Symposium des DFG Graduiertenkollegs "Vaskuläre Biologie in der Medizin", 10.-11. November 2007, Herrsching a. Ammersee, Deutschland (Vortrag)

Cornfine S., Kopp P., Sixt M., Lammers R., Rudel T., Machuy N., Tsiavaliaris G. and Linder S. Regulation of podosomal dynamics by microtubules and motor proteins.

47th annual Meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB) 1.-5. Dezember 2007, Washington, DC, USA (Poster)

Cornfine S., Kopp P., Sixt M., Krüger M., Lammers R., Rudel T. and Linder S. The kinesins KIF1C and KIF9 regulate different podosome subpopulations in primary human macrophages. (Abstract 307) 7th annual meeting of the European Life Scientist Organization (ELSO) 30. August-2. September 2008, Nizza, Frankreich (Poster)

Cornfine S., Smith T., Fang Z., Luna E. J. and Linder S. Supervillin couples myosin-dependent contractility to podosomes and enables their turnover. 48th annual Meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB) 13.-17. Dezember 2008, San Francisco, USA (Poster)

Cornfine S., Smith T., Fang Z., Luna E. J. and Linder S. Supervillin couples myosin-dependent contractility to podosomes and enables their turnover. (Abstract 14) SBCF Kongress "Invadopodia, Podosomes and Focal Adhesions in Tissue Invasion", 26.-30. September 2009, Hyères, Frankreich (Poster)

Cornfine S., Kopp P., Rudel T., Krüger M., Linder S. The Kinesin KIF9 regulates podosomes and extracellular matrix degradation in primary macrophages. 33th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ), 10.-13. März 2010, Regensburg, Deutschland (Poster)

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Makrophagen-Vorkommen und Funktion	1
1.2 Das Zytoskelett	3
1.2.1 Das Aktinzytoskelett	4
1.2.2 Podosomen	8
1.2.2.1 Aufbau von Podosomen	10
1.2.2.2 Regulation und Dynamik von Podosomen	11
1.2.2.3 Funktion von Podosomen	14
1.2.3 Supervillin und Gelsolin	16
1.2.4 Das Mikrotubuli-Zytoskelett	18
1.3 Molekulare Motoren	20
1.3.1 Kinesine	21
1.3.2 Myosine	23
1.4 Vesikeltransport	25
1.5 Aufgabenstellung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Laborausstattung	28
2.2 Arbeiten mit <i>E.coli</i>	29
2.2.1 Kultivierung von <i>E.coli</i>	29
2.2.2 Transformation von Plasmiden in kompetenten Zellen	30
2.2.2.1 Herstellung hitzekompetenter Bakterien	30
2.2.2.2 Hitzeschocktransformation	31
2.3 Arbeiten mit humanen Zellen	31
2.3.1 Allgemeines	31
2.3.2 Isolierung und Kultur primärer humaner Makrophagen	31
2.3.3 Ablösung adhärenter primärer humaner Makrophagen	33
2.3.4 Transfektion primärer humaner Makrophagen	33
2.4 Mikroskopische Methoden	34
2.4.1 Fixierung und Permeabilisierung	34
2.4.1.1 Formaldehyd/Aceton	34

2.4.1.2 Methanol	34
2.4.1.3 Cytoskelfix	34
2.4.2 Färbung mittels spezifischer Antikörper	34
2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie	36
2.4.4 <i>Live cell</i> Mikroskopie	36
2.4.5 TIRFM (<i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>)	37
2.4.6 FACS (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)	37
2.4.7 Beschichtung von Deckgläschen mit fluoreszenzmarkierter Gelatine	38
2.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren	39
2.5.1 Arbeiten mit DNA	39
2.5.1.1 Plasmide	39
2.5.1.2 Plasmidisolierung	40
2.5.1.3 Agarose-Gelelektrophorese	40
2.5.1.4 DNA-Isolierung mittels Gelelution	41
2.5.1.5 DNA-Restriktionshydrolyse	41
2.5.1.6 Ligation	42
2.6 PCR-Reaktionen	42
2.6.1 Oligonukleotide	43
2.6.2 Standard-PCR	43
2.6.3 Bakterien-/Kolonie-PCR	44
2.6.4 Reverse Transkriptase-PCR	45
2.6.5 Mutagenese	45
2.6.6 Aufreinigung von PCR-Produkten	45
2.7 Arbeiten mit RNA	45
2.7.1 Allgemeines	45
2.7.2 Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA	46
2.7.3 Reverse Transkriptase Reaktion	46
2.7.4 RNA-Interferenz (RNAi)	46
2.8 Arbeiten mit Proteinen	48
2.8.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	48
2.8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli	48
2.8.3 Molekulargewichtsbestimmung	49
2.8.4 Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969)	49
2.8.5 Silberfärbung (Blum <i>et al.</i> , 1987, modifiziert)	49

2.8.6	Western Blot	49
2.8.7	Nachweis von Proteinen durch Massenspektrometrie	50
2.8.8	Interaktionsstudien	50
2.8.8.1	Herstellung von Zelllysaten aus primären humanen Makrophagen	50
2.8.8.2	GFP-Immunpräzipitation	51
3	Ergebnisse	52
3.1	KIF1C	52
3.1.1	Aufreinigung KIF1C-GFP markierter Vesikel mittels <i>FACS</i>	52
3.1.2	Analyse KIF1C-GFP sortierter Vesikel mittels Massenspektrometrie	54
3.1.3	Interaktionen zwischen KIF1C und RabGTPasen	57
3.1.3.1	KIF1C und Rab6a	58
3.1.3.2	KIF1C und Rab11b	59
3.1.3.3	KIF1C und Rab14	60
3.1.3.4	KIF1C und Rab8	61
3.1.4	KIF1C und Sec22b	62
3.1.5	KIF1C und LAMP1	63
3.1.6	HAX1 als KIF1C Interaktionspartner	64
3.1.6.1	HAX1 lokalisiert mit KIF1C-K103A am MTOC	67
3.2	Podosomen-Subpopulationen in primären humanen Makrophagen	69
3.3	KIF9	70
3.3.1	KIF9 reguliert die Anzahl der Podosomen in humanen Makrophagen	70
3.3.2	Subzelluläre Lokalisation von KIF9 in humanen Makrophagen	71
3.3.3	Differentielle subzelluläre Lokalisation von KIF1C und KIF9	72
3.3.4	KIF9-positive Vesikel kontaktieren Podosomen	73
3.3.5	KIF9-positive Vesikel assoziieren mit Mikrotubuli	75
3.3.6	KIF1C und KIF9 lokalisieren an unterschiedlich modifizierten Mikrotubuli	75
3.3.7	Einfluss von KIF9 auf den Abbau extrazellulärer Matrix	77
3.3.8	Nachweis der endogenen Expression des Kinesins KIF9 in humanen Makrophagen	78
3.3.9	Der Carboxy-Terminus von KIF9 induziert eine Dispergierung des Golgi-Apparates	80
3.3.10	Reggie-1/-2 als Interaktionspartner von KIF9	84
3.3.11	Eine verminderte Expression von Reggie-1/-2 verringert den Abbau	

	extrazellulärer Matrix	88
3.4	Supervillin	90
3.4.1	Supervillin lokalisiert an eine Subpopulation von Podosomen	90
3.4.2	Nachweis der Expression von endogenem Supervillin in humanen Makrophagen	91
3.4.3	Supervillin Anreicherung korreliert mit Auflösung von Podosomen	92
3.4.4	Abhängigkeit der Podosomenregulation von der Myosin IIA-Supervillin-Interaktion	95
3.4.5	Podosomen, die Supervillin enthalten, stehen mit Aktomyosin-Kabeln in Verbindung	99
3.4.6	Supervillin beeinflusst die Lebensdauer von Podosomen	104
3.4.7	Einfluss von Supervillin auf den Abbau extrazellulärer Matrix	106
4	Diskussion	110
4.1	Charakterisierung der KIF1C-GFP assoziierten Vesikel	110
4.2	Interaktion mit HAX1	117
4.3	KIF9 reguliert Podosomen und den Abbau extrazellulärer Matrix	120
4.4	Reggie-Proteine regulieren den Abbau extrazellulärer Matrix	128
4.5	Supervillin reguliert Podosomen	132
4.6	Supervillin reguliert zusammen mit Myosin IIA und Gelsolin den Abbau extrazellulärer Matrix	138
4.7	Ausblick	142
5	Zusammenfassung	144
6	Literaturverzeichnis	147
7	Anhang	169
7.1	Inhalt der Video-CD	169
7.2	Lokalisation von GFP-Supervillin Deletionskonstrukten	171
7.3	Einfluss von GFP-Supervillin Deletionskonstrukten auf die Podosomenzahl	172
8	Danksagung	175
9	Lebenslauf	177

II. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Antigen präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
Arp	<i>actin-related protein</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bcl	<i>B cell lymphoma/leukemia-2</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Cobl	Cordon-bleu
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EtOH	Ethanol
F-	filamentöses (Aktin)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FAK	Fokale Adhäsionen-Kinase (<i>focal adhesion kinase</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HAX1	HS1-assoziiertes protein X-1
HDAC6	Histon Deacetylase 6

II Abkürzungsverzeichnis

HEPES	N-Hydroxy-Ethylpiperazin-N-Ethylsulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS1	<i>Hematopoietic lineage cell-specific protein 1</i>
IF	Intermediär-Filament
IgG	Immunglobulin G
kD	Kilodalton
KIF	<i>Kinesin superfamily protein</i>
l	Liter
LB	Luria Broth
m	Milli-
M	Molar
max.	maximal
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRFP	monomeres rotes fluoreszierendes Protein
MLC	<i>myosin light chain</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
MTOC	<i>microtubule-organizing-center</i>
NGS	Normales Ziegen Serum (<i>normal goat serum</i>)
NHS	Normales Humanserum
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
P _i	anorganisches Phosphat
PKC	Proteinkinase C
PtdIns	Phosphatidylinositol
RNA	Ribonukleinsäure

II Abkürzungsverzeichnis

RNAi	<i>RNA interference</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin-Kinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfat</i>)
sec	Sekunden
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SV	Supervillin
TIRF	<i>Total internal reflection fluorescence microscopy</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	<i>unit(s)</i>
ÜNK	über Nacht-Kultur
V	Volt
Vol	Volumina
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrome-Protein
WAVE	WASP-Family Verprolin Homologous Protein
<i>wt</i>	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec)
μ	Mikro-

1 Einleitung

1.1 Makrophagen-Vorkommen und Funktion

Makrophagen sind differenzierte Zellen, die zu den mononukleären Phagozyten gehören, welche eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von feindlichen Zellen und Molekülen spielen. Sie sind im gesamten Körper verteilt und entwickeln sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark, die im Blut zu peripheren Monozyten differenzieren (Carman, 2009; Burke *et al.*, 2002). Diese wandern ständig aus dem Blutkreislauf in das periphere Gewebe ein, wo sie zu Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), z.B. Makrophagen, differenzieren (Carman, 2009). Je nach Gewebeständigkeit werden Makrophagen unterschiedlich bezeichnet, z.B. Mikroglia-Zellen im Gehirn, Kupffer'sche Zellen in der Leber, Histozyten im Bindegewebe oder Alveolar-Makrophagen in der Lunge. Besonders gehäuft liegen stationäre Makrophagen in den Lymphknoten und der Milz vor. Mit den im Blut kursierenden Monozyten werden sie zum sog. mononukleären Phagozytensystem zusammengefasst. Makrophagen können zu vielkernigen Riesenzellen (*multinucleated giant cells*, MnGC) fusionieren. Diese Zellen sind mit Osteoklasten verwandt, die ebenfalls aus monozytären Vorläufern entstehen, jedoch hauptsächlich für Knochenresorption zuständig sind (Xia und Triffitt, 2006).

Makrophagen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems, indem sie als Phagozyten neben Mikroorganismen auch beschädigte oder apoptotische Zellen beseitigen sowie an Entzündungsreaktionen beteiligt sind (Kwiatkowska und Sobota, 1999). Diese Funktionen können sie ausüben, indem sie Zytokine, Enzyme oder auch Komponenten der extrazellulären Matrix absondern. An der Erkennung und Internalisierung von Fremdkörpern sind eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren beteiligt, z.B. *Toll like receptors* (TLRs), CD14, der Mannose-Rezeptor oder *scavenger*-Rezeptoren (Underhill und Ozinsky, 2002). Über Phagozytose werden beispielsweise Bakterien aufgenommen und im Phagolysosom anschließend hydrolytisch verdaut. Die Peptidfragmente der Pathogene werden dann an *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse II-Moleküle gebunden und den Lymphozyten an der Makrophagenoberfläche präsentiert (Platt *et al.*, 1998). Makrophagen werden deshalb auch antigen-präsentierende Zellen (APC, *antigen presenting cell*) genannt (Xia *et al.*, 2006; Gordon, 2002). Dabei werden Signalwege aktiviert, die unter anderem den Umbau

des Aktinzytoskeletts oder die Ausstülpung der Plasmamembran bewirken (Underhill und Ozinsky, 2002). Im Verlauf der Phagozytose führt eine Umgestaltung der Makrophagenmembran zu einer vollständigen Umhüllung der Partikel, welche dann als Phagosomen ins Zyto-

plasma gelangen. Nach Fusion mit Lysosomen, hydrolytischen Enzymen und anderen Substanzen im Phagosom folgen Verdau und Abbau der enthaltenen Bestandteile (Jutras und Desjardins, 2005).

Neben einer Beteiligung an der angeborenen Immunantwort und Entzündungsreaktionen spielen Makrophagen auch bei der Geweberegeneration eine bedeutende Rolle. Dabei sezernieren sie eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und regulieren so die Rekrutierung von Zellen, Proliferation sowie Differenzierung. Studien zeigten außerdem, dass die Wundheilung stark beeinträchtigt wird, wenn eine Einwanderung der Makrophagen verhindert wird (Martin, 1997; Leibovich und Ross, 1975).

Auch im Zusammenhang mit Tumoren sind Makrophagen von Bedeutung. Killian und Fidler (Killian und Fidler, 1994) zeigten, dass aktivierte Makrophagen selektiv Tumorzellen phagozytieren, während gesundes Gewebe nicht angegriffen wird. Andere Studien wiederum legen nahe, dass hämatopoetische Zellen direkt an der Tumorentwicklung und Metastase beteiligt sind. Dabei erleichtern sie in der Umgebung eines Tumors sowohl Angiogenese als auch Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix. Neuere Daten zeigen, dass Makrophagen in direktem Kontakt mit Tumorzellen stehen und dies eine Invasion der Tumorzellen in das Blutgefäßsystem zur Folge hat (Condeelis und Pollard, 2006; Hagemann *et al.*, 2005; Pukrop *et al.*, 2006).

Um ihre Funktion innerhalb des Immunsystems erfüllen zu können, müssen Leukozyten (z.B. Lymphozyten, Monozyten, dendritische Zellen und Neutrophile) ständig innerhalb des Körpers zirkulieren. Dies erfordert nicht nur Fortbewegung, sondern auch die Fähigkeit, Gewebegrenzen passieren zu können (von Andrian und Mackay, 2000; Carman 2009). Die Wanderung von Leukozyten kann im Wesentlichen in zwei Stadien unterteilt werden: Fortbewegung innerhalb des vaskulären und lymphatischen Kreislaufs sowie die Wanderung innerhalb von Geweben. Die Gefäße des vaskulären und lymphatischen Kreislaufs werden von einer Endothelzellschicht ausgekleidet, die auf einer Schicht extrazellulärer Matrix, der Basalmembran, wächst. Somit stellt das Endothel eine wichtige Abgrenzung zwischen dem Blutkreislauf und dem darunter liegenden Gewebe dar. Der

Vorgang der Wanderung von Leukozyten in oder aus dem Blutstrom erfordert somit ein Durchdringen des Endothels und wird Diapedese genannt (Carman, 2009). Es handelt sich hierbei um einen komplexen Vorgang, der sich aus mehreren Schritten zusammensetzt. Schlussendlich erfolgt die Transmigration der Leukozyten zwischen benachbarten Endothelzellen (Feng *et al.*, 1998; Marchesi und Gowans, 1964).

Die gerichtete Bewegung von Zellen ist bei einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie z.B. Embryogenese, Immunantwort oder Wundheilung, hoch reguliert. Sie erfordert außerdem die Integration von Signalen, die Zelladhäsion, Polarität und das Zytoskelett regulieren. Eine fehlerhafte Regulation der Migration kann verschiedene Krankheiten, z.B. Atherosklerose, Arthritis, Multiple Sklerose oder WAS (Wiskott-Aldrich-Syndrom) hervorrufen (Rollins, 1996), aber auch die Bildung von Tumoren und Metastasen zur Folge haben (Rooney *et al.*, 2010).

Die Migration von Zellen ist ein komplexer Prozess, der eine geregelte Veränderung der Zellgestalt in Form von Polarisierung, Adhäsion und Migration erfordert. Dies wird u.a. durch Modulation des Aktinzytoskeletts erreicht.

1.2 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett ist ein aus Proteinen aufgebautes Netzwerk im Zytoplasma eukaryontischer Zellen. Es besteht aus einem Netzwerk dynamisch auf- und abbaubarer, dünner, fadenförmiger Filamente und Tubuli, die ständigem Umbau unterliegen. Es ist verantwortlich für die mechanische Stabilisierung der Zelle und ihre äußere Form, für aktive Bewegungen der Zelle als Ganzes, sowie für Bewegungen und Transporte innerhalb der Zelle.

Die Regulation der Zytoskelettfilamente und ihre Quervernetzung ist für verschiedenste Funktionen essentiell, unter anderem für den Erhalt und die Umgestaltung der Zellmorphologie, Adhäsion und Migration, Zellpolarität sowie intrazellulärer Transportprozesse (Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2008).

Das Zytoskelett setzt sich aus drei Komponenten zusammen, welche physisch und funktionell verknüpft sind: Aktin-Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente (Kim und Coulombe, 2007; Osborn und Weber, 1977). Proteine der Intermediärfilamente

besitzen einen α -helikalen Bereich, der die Ausbildung von *coiled-coil* Dimerstrukturen begünstigt. Diese setzen sich zu Filamenten mit einem Durchmesser von 10-12 nm zusammen und dienen vor allem der Erhaltung der Zellform (Kim und Coulombe, 2007).

Das Aktin- und Mikrotubulizytoskelett hängen sowohl strukturell als auch funktionell eng zusammen. Dies wird vor allem bei der Betrachtung des Transports von Organellen deutlich, der in eukaryontischen Zellen einerseits von Aktinfilamenten und andererseits von Mikrotubuli abhängig ist. In tierischen Zellen dienen Mikrotubuli dabei dem Transport über längere Strecken, während die Aktinfilamente für Bewegungen über kurze Strecken genutzt werden (Soldati und Schliwa, 2006).

1.2.1 Das Aktinzytoskelett

Das Aktinzytoskelett ist eine komplexe Struktur und grundlegend für eine Vielzahl zellulärer Funktionen. Beispielsweise vermittelt es die Entstehung und Aufrechterhaltung der Zellmorphologie sowie die Zellmigration. Aktin ist ein hochkonserviertes Protein mit einer molekularen Masse von 43 kD. Es kommt nur in Eukaryonten vor und kann in die Isoformen α -, β - und γ eingeteilt werden. Es ist vor allem im Zytoplasma, aber auch im Nukleus zu finden. Die höchsten Konzentrationen (bis zu 20% des Gesamtproteins) kommen in gestreiften Muskelzellen vor, aber auch in anderen Zelltypen hat es viele Funktionen: Myosin-unabhängige Änderung der Zellform, Motor-basierter Organellentransport oder Regulation des Ionentransports (dos Remedios *et al.*, 2003).

Aktin kommt in zwei Organisationsformen vor: globuläres Aktin (G-Aktin) und filamentöses Aktin (F-Aktin). Dabei können G-Aktinmonomere durch ATP-Hydrolyse zu helikalen F-Aktin-Strängen polymerisieren (Reisler und Egelman, 2007) und eine linksgängige Helix bilden. Diese besteht aus zwei Strängen von Aktinpolymeren und weist einen Durchmesser von 8 nm auf (Kabsch und Vandekerckhove, 1992). Da innerhalb dieser Helix alle Aktinmoleküle die gleiche Ausrichtung aufweisen, ergibt sich eine Polarität. Am sog. stumpfen Ende (*barbed end*) werden Aktin-Monomere schneller gebunden als am spitzen Ende (*pointed end*) (Kuhn und Pollard, 2005; Pollard, 1986). Wachstum des Filaments erfolgt durch Anheften und Abspaltung von Monomeren. Wenn Monomere an das wachsende Filament angeheftet werden, wird das gebundene ATP zu ADP und Phosphat hydrolysiert. Da dies mit zeitlicher Verzögerung geschieht, entsteht am stumpfen Ende eine sog. Kappe (*ATP-cap*). Das entstandene ADP-Aktin wird durch

das Entfernen von Untereinheiten am langsam wachsenden spitzen Ende abgebaut. So ergibt sich ein Fluss von Aktinmonomeren innerhalb des Filaments. Dieser Austausch von Aktinmonomeren wird „Tretmühlenmechanismus“ (*treadmilling*) genannt und *in vivo* durch verschiedene Aktin-bindende Proteine, z.B. Cofilin und Profilin, reguliert (Baum *et al.*, 2006; Carlier, 1989; dos Remedios *et al.*, 2003; Korn *et al.*, 1987).

Aktinmonomere lagern sich zu helikalen Filamenten zusammen. Dabei verläuft die initiale „Nukleationsphase“, d.h. die Anordnung zu Dimeren und Trimeren, sehr ungünstig und langsam. Ist diese Schwelle jedoch überwunden, erfolgt das Filamentwachstum sehr viel schneller. Ohne Nukleationsfaktoren ist der Aufbau Aktin-basierter Strukturen jedoch nicht möglich (Chhabra und Higgs, 2007). Der zuerst entdeckte Aktinnukleator war der Arp2/3- (*actin-related protein*) Komplex (Pak *et al.*, 2008). Dieser setzt sich aus sieben Untereinheiten zusammen: ARPC 1-5, Arp2 und Arp3. Arp2 und Arp3 sind Aktin-ähnliche Proteine und ahmen ein Aktindimer nach, das sich zum stumpfen Ende hin verlängern kann. Das Arp2-Arp3 Dimer dient hierbei als Nukleationsstelle, und der Komplex verbleibt am spitzen Ende des Filaments. Zusätzlich bindet der Arp2/3 Komplex an bereits bestehende Aktinfilamente und durch die Nukleationsaktivität werden verzweigte Filamentstrukturen mit einem Winkel von 70° zwischen den Filamenten gebildet. Wiederholte Verzweigungen führen schließlich zu einem „dendritischen Netzwerk“ (Chhabra und Higgs, 2007; Pak *et al.*, 2008).

Der Arp2/3-Komplex allein ist jedoch nicht ausreichend, um die Ausbildung neuer Aktinfilamente zu initiieren (Machesky *et al.*, 1999). Als Hauptregulatoren dieses Komplexes wurden Mitglieder der Wiskott-Aldrich Syndrom Proteine (WASP) identifiziert (Millard *et al.*, 2004). Die Familie der WASPs besteht aus zwei Proteinklassen: WASP und SCAR/WAVE. Säugetiere besitzen typischerweise zwei WASPs (die hämatopoetische Form WASP und das universelle N-WASP) sowie drei SCAR/WAVE Proteine. In letzter Zeit wurden neue Mitglieder dieser Familie entdeckt, über deren Rolle aber noch wenig bekannt ist: WASH (*WAS protein family homolog*), WHAMM (*WASP homolog-associated protein with actin, membranes and microtubules*) und JMY (*Junction-mediating and -regulatory protein*) (Campellone *et al.*, 2008; Linardopoulou *et al.*, 2007; Zuchero *et al.*, 2009). WASP und N-WASP liegen überwiegend in autoinhibitorischer Konformation vor, bei der der C-Terminus durch Interaktion mit dem N-Terminus verdeckt ist. Diese Autoinhibition wird durch die kompetitive Bindung der kleinen GTPase Cdc42 und dem Phospholipid PtdIns(4,5)P₂ gelöst. Die Aktivität von WASP wird außerdem durch die Bindung weiterer Proteine

reguliert. Mögliche Bindungspartner sind WIP (*WASP-interacting protein*) (Ramesh *et al.*, 1997) und TOCA1. Letzteres bindet wie WASP an Cdc42 und könnte so N-WASP kooperativ aktivieren oder auch eine Inhibierung durch WIP lösen (Ho *et al.*, 2004).

SCAR/WAVE Proteine hingegen liegen nicht autoinhibiert vor und sind Teil eines größeren Regulationskomplexes mit vier weiteren Proteinen: PIR121, Nap1, Abi und HSPC300 (Eden *et al.*, 2002). Die Interaktion mit der kleinen GTPase Rac erfolgt über PIR121 (Ibarra *et al.*, 2006). Was die Dynamik und Grundaktivität dieses Komplexes betrifft, herrscht noch keine Einstimmigkeit (s. Eden *et al.*, 2002 und Ismail *et al.*, 2009). Als wichtiger Regulationsfaktor der WASP Proteine zeichnet sich die Phosphorylierung ab. Tyrosin-Phosphorylierung von WASP erhöht die Fähigkeit der Aktivierung des Arp2/3-Komplexes ohne offensichtliche Notwendigkeit von Cdc42 oder PtdIns(4,5)P₂. Obwohl eine Serin/Threonin Phosphorylierung eine Aktinpolymerisierung *in vitro* auslösen kann, wurde die physiologische Bedeutung *in vivo* noch nicht gezeigt (Cory *et al.*, 2003).

Eine weitere Familie der Aktinnukleatoren stellen die Formine dar. Sie sind an zahlreichen Zellfunktionen wie Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellmorphologie, Zellpolarität, Zellmigration, am vesikulären Transport und der Zytokinese beteiligt, und spielen daher eine bedeutende Rolle bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Wallar und Alberts, 2003; Zigmond *et al.*, 2003). Alle Formine haben die gleichen Grundeigenschaften, sind jedoch in ihrer Wirkungsweise sehr unterschiedlich. Zudem können einige Formine Aktinfilamente bündeln, schneiden oder depolymerisieren (Chhabra und Higgs, 2006; Harris *et al.*, 2006; Higgs, 2005). Alle bekannten Formine bilden durch die FH2 (*formin homology 2*) Domäne Dimere aus. Die FH2-Domäne ist außerdem für die Aktinnukleation verantwortlich. Nach der Nukleation bleibt die Domäne am stumpfen Ende gebunden und bewegt sich prozessiv mit diesem während der Verlängerung. Dadurch wird die Bindung von *capping* Proteinen verhindert und das Wachstum begünstigt. Die Formin-vermittelte Verlängerung wird außerdem durch die Bindung von Profilin an der FH1-Domäne verstärkt (Kovar, 2006).

Spire Proteine gehören ebenfalls zu den Aktinnukleatoren und wurden ursprünglich in *Drosophila* identifiziert (Kerkhoff, 2006). Es handelt sich hier um einzelne Proteine mit vier WH2 (*Wasp homology 2*) Domänen, die für die Aktinnukleation verantwortlich sind (Quinlan *et al.*, 2005). Wie Formine erzeugen sie keine verzweigten Aktinfilamente, können aber sowohl Mikrotubuli als auch Aktinfilamente quervernetzen (Rosales-Nieves

et al., 2006). In Muskelzellen ist Leiomodin ein wichtiger Aktinnukleator. Das Protein hat drei Aktinbindedomänen und der Nukleationsmechanismus ähnelt dem von Arp2/3 (Chereau *et al.*, 2008). Vor einigen Jahren wurde durch Ahuja *et al.* (Ahuja *et al.*, 2007) ein neuer Aktinnukleator -Cordon-bleu (Cobl)- identifiziert und charakterisiert. Es besitzt drei WH2-Domänen zur Aktinbindung und scheint eine Schlüsselrolle bei der Morphogenese des Zentralen Nervensystems in Vertebraten zu spielen (Ahuja *et al.*, 2007).

Der Aktin-Depolymerisierungs-Faktor ADF, auch Cofilin genannt, steuert die Depolymerisierung. Es handelt sich um ein kleines (15-18 kD) aktinbindendes Protein, das u.a. eine wichtige Rolle bei der Zytokinese und Endozytose spielt. Durch bestimmte Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder chemotaktische Peptide, wird ADF/Cofilin dephosphoryliert, woraufhin das Aktinzytoskelett umgebaut wird. In ruhenden Zellen weist ADF/Cofilin eine diffuse Verteilung im Zytoplasma auf, das aktivierte (dephosphorylierte) Protein hingegen findet man in Bereichen mit hochdynamischen Aktinfilamenten, z.B. am *leading edge* (Carlier *et al.*, 1999). Proteine der ADF/Cofilin Familie binden sowohl G- als auch F-Aktin, bevorzugt jedoch die ADP-gebundene Form (Svitkina und Borisy, 1999). Durch Bindung wird die Drehbewegung des Aktinfilaments reduziert und es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes ADF und Cofilin die Dissoziationsrate am spitzen Ende des Aktinfilaments erhöht (Southwick, 2000). Zwar gibt es noch einige Unstimmigkeiten, die meisten Daten sprechen jedoch dafür, dass ADF/Cofilin den Aktinmonomer *turnover* durch Schneiden der Aktinfilamente erhöht, wodurch die Zahl der freien Filamentenden zunimmt (Bamburg, 1999).

Gelsolin (s. auch 1.2.3), das strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu ADF/Cofilin aufweist, ist eines der effektivsten der Aktinfilament-schneidenden Proteine. Nach dem Schneiden bleibt Gelsolin als Kappe am stumpfen Ende des Filaments gebunden. Dadurch entstehen kurze Aktinfilamente, die sich nicht mehr miteinander verbinden können, so dass das Aktinnetzwerk abgebaut wird (Sun *et al.*, 1999).

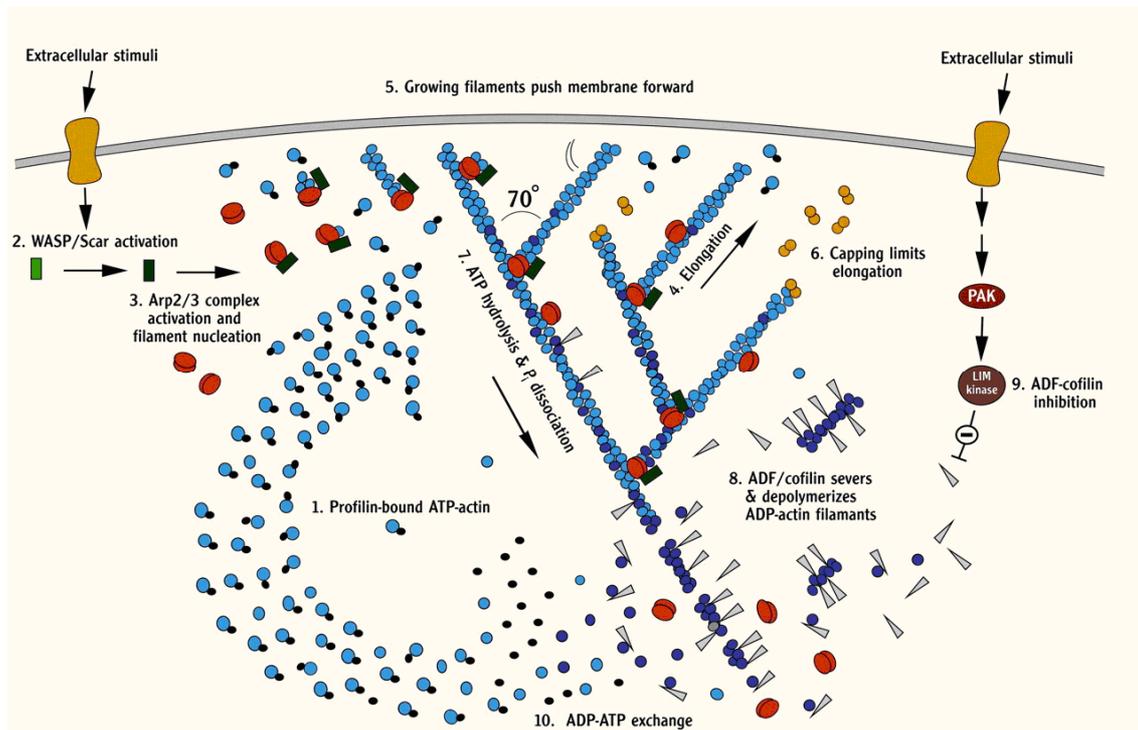


Abb. 1.1: Modell der dendritischen Nukleation. (1) Aktinmonomere sind an Profilin gebunden, es gibt keine freien stumpfen Enden und die Komponenten des Aktinzytoskeletts sind für die Assemblierung bereit. (2) Die Aktivierung von Proteinen der WASP Familie führt zur Aktivierung des Arp2/3 Komplexes, was neue stumpfe Enden und somit neue Filamente erzeugt (3). Diese Filamente wachsen schnell (4) und schieben die Membran nach außen (5). Durch *Capping* wird das Wachstum der stumpfen Enden beendet (6). ATP-Hydrolyse sowie Abgabe von Pi (7) löst Abtrennung und Depolymerisierung von Aktinfilamenten durch ADF/Cofilin aus (8), welche durch LIM Kinase inhibiert werden (9). Nukleotidaustausch durch Profilin führt ADP-gebundene Aktinuntereinheiten wieder in den Pool der ATP-Aktin-Monomere zurück (10). Nach Pollard *et al.*, 2000)

1.2.2 Podosomen

Zellen können verschiedene Arten von Adhäsionsstrukturen ausbilden: fokale Komplexe, fokale Adhäsionen, fibrilläre Adhäsionen, Podosomen und Invadopodien (Albiges-Rizo *et al.*, 2009; Zamir and Geiger, 2001). Fokale Adhäsionen reifen aus fokalen Komplexen, verankern Aktin-Stressfasern und ermöglichen eine starke Anheftung an das Substrat (Buccione *et al.*, 2004a). Fibrilläre Adhäsionen bestehen aus länglichen Fibrillen im Zellzentrum, sind mit Tensin angereichert und binden Integrine an Fibronectin-Fibrillen (Zaidel-Bar *et al.*, 2003; Zamir *et al.*, 1999).

Podosomen und Invadopodien stellen punkt-artige Matrix-Kontakte dar, die, im Gegensatz zu Strukturen wie fokalen Adhäsionen, extrazelluläre Matrix abbauen können (Linder, 2009; Linder und Kopp, 2005). Obwohl sie zahlreiche Ähnlichkeiten aufweisen, unterscheiden sie sich auch in vielerlei Hinsicht. Invadopodien, die vor allem in

Krebszellen beobachtet wurden, sind größer als Podosomen, kommen aber weniger zahlreich in der Zelle vor. Podosomen sind außerdem hoch dynamische, Invadopodien dagegen stabilere Strukturen.

Podosomen wurden erstmals in der Mitte der 1980er Jahre entdeckt (Marx, 2006). Sie werden vor allem in monozytären Zellen, wie Makrophagen (Lehto *et al.*, 1982; Linder *et al.*, 1999), Osteoklasten (Marchisio *et al.*, 1984) und dendritischen Zellen (Burns *et al.*, 2001) beobachtet, aber auch in Epithel- und Endothelzellen (Moreau *et al.*, 2003; Osiak *et al.*, 2005), glatten Muskelzellen (Hai *et al.*, 2002; Gimona *et al.*, 2003) sowie in einigen transformierten Fibroblasten (Marchisio *et al.*, 1987; Mizutani *et al.*, 2002; Tarone *et al.*, 1985) beschrieben. Neueste Daten schließen auch ein Vorkommen podosomaler Strukturen in Fettzellen nicht aus (Hishida *et al.*, 2008).

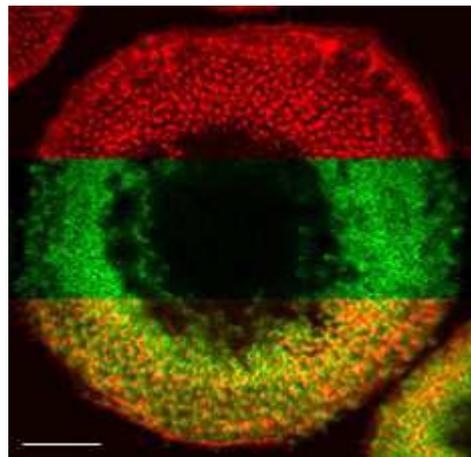


Abb. 1.2: Podosomen in primären humanen Makrophagen. Podosomen in primären humanen Makrophagen. Konfokalmikroskopische Aufnahme der ventralen Zellseite. Oberes Drittel: F-Aktin (rot), mittleres Drittel: Talin (grün), unteres Drittel: Überlagerung beider Signale (gelb). Jedes Podosom ist von einer Ringstruktur umgeben, die Talin enthält. Weißer Balken: 10 µm (aus Linder und Aepfelbacher, 2003)

Podosomen sind hoch dynamische, punktförmige und F-Aktin-reiche Adhäsionsstrukturen auf der ventralen Seite der Zelle. Typische Markerproteine sind aktin-regulatorische Proteine wie der Arp2/3-Komplex, Cortactin und WASP oder N-WASP (Buccione *et al.*, 2009; Linder, 2007; Weaver, 2006). Viele Komponenten werden durch Tyrosin-Kinasen reguliert, wodurch es zu einer Anreicherung von Phosphotyrosinresten kommt (Linder und Aepfelbacher, 2003; Luxenburg *et al.*, 2006). In einigen Zellen bilden sich aus einzelnen Podosomen sog. Rosetten (David-Pfeuty und Singer, 1980), *Cluster* (Evans *et al.*, 2003) oder auch konfluente Ringe (Luxenburg *et al.*, 2007).

1.2.2.1 Aufbau von Podosomen

Podosomen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von anderen Adhäsionsstrukturen. Podosomen besitzen einen Kern aus F-Aktin und aktin-assoziierten Proteinen. Dieser hat einen Durchmesser von ca. 1 μm und eine Höhe von ca. 0,5 μm (Linder, 2009). Der Kern ist in eine Ringstruktur aus Integrinen und Integrin-assoziierten Proteinen eingebettet, welche bei keiner anderen Adhäsionsstruktur zu finden ist. Ring und Kern sind wahrscheinlich durch Brückenmoleküle, wie z.B. α -Aktinin, vernetzt. Die gesamte Struktur wird von einer Wolke aus monomeren Aktinmolekülen umgeben (Akisaka *et al.*, 2001; Destaing *et al.*, 2003). Vom Kern gehen sternförmig F-Aktinfilamente aus, die einzelne Podosomen miteinander verbinden (Evans *et al.*, 2003; Trotter, 1981). Typische Komponenten des Kerns sind F-Aktin, Aktinregulatoren wie WASP, der Arp2/3-Komplex, Gelsolin und Cortactin. Paxillin, Vinkulin oder Talin findet man hingegen in der Ringstruktur, ebenso die Kinasen PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) oder Pyk2/FAK (Fokale Adhäsions-Kinase) (Linder und Aepfelbacher, 2003; (Bruzaniti *et al.*, 2005; Buccione *et al.*, 2004). Eine Verankerung am Substrat wird durch Integrine (Isotyp $\beta 1$ im Kern, $\beta 2$ und $\beta 3$ im Ring) ermöglicht (Linder und Aepfelbacher, 2003). Weitere Komponenten von Podosomen sind die Proteinkinase Src (Gavazzi *et al.*, 1989), Proteinkinase C (PKC) (Teti *et al.*, 1992) sowie Vertreter der Rho-Kinasen (Chellaiah, 2006; Linder und Aepfelbacher, 2003).

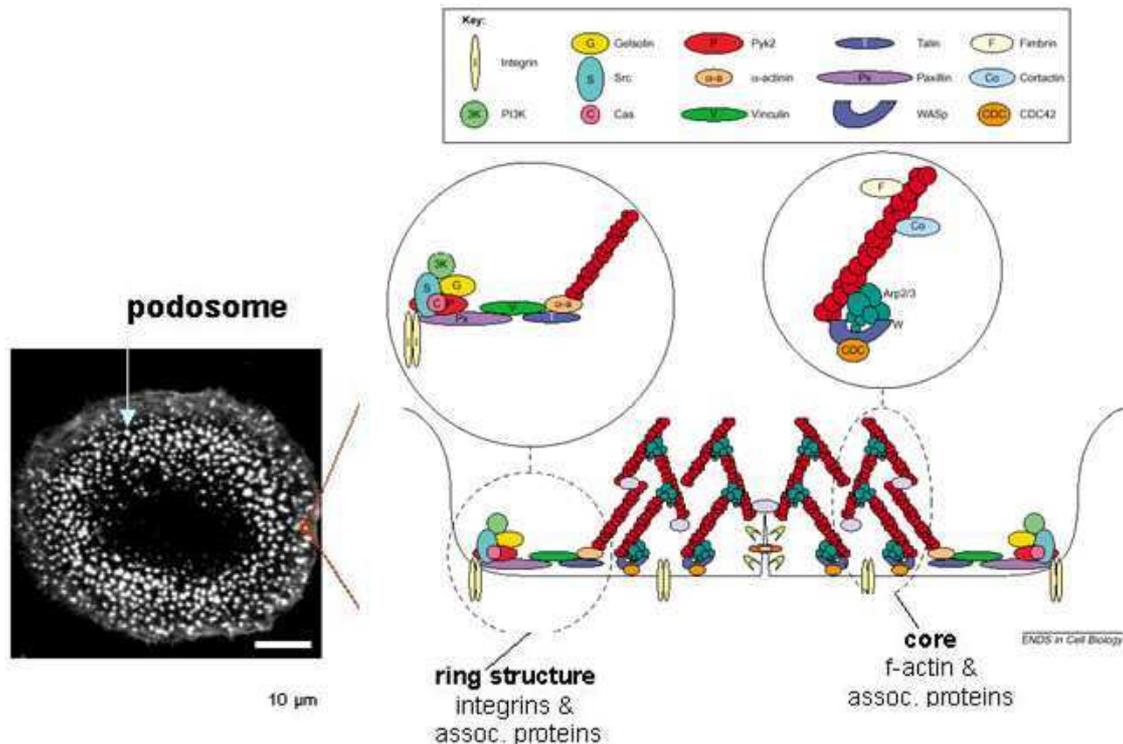


Abb. 1.3: Podosomenmodell. Schematische Darstellung der zweigeteilten Architektur eines einzelnen Podosoms (Querschnitt senkrecht zum Substrat); Oben links: Ausschnitt aus der podosomalen Ringstruktur (vereinfachte Darstellung). Integrine binden an die extrazelluläre Matrix, während Paxillin als Gerüst für einen intrazellulären Komplex aus Src, Pyk2/FAK, Gelsolin und Phosphoinositolkinase (PI3K) und p130cas dient. Dieser Komplex ist über Vinculin, Talin und α -Actinin an F-Aktin des Kerns gebunden; 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 Matrixmetalloproteinasen sekretiert werden (gelbe „Schwalbenschwänze“). (Nach Linder und Aepfelbacher, 2003)

1.2.2.2 Regulation und Dynamik von Podosomen

Podosomen sind hochdynamische Proteinkomplexe mit einer Lebensdauer von 2-12 Minuten (Chen, 1989; Destaing *et al.*, 2003), deren Regulation über eine Vielzahl zellulärer Signalwege erfolgt. Bereits 1h nach Substratkontakt kann eine Ausbildung von Podosomen beobachtet werden. Sie entstehen entweder durch *de novo*-Synthese, oder aber durch die Abspaltung aus Podosomen-Vorläufern. Auch Fusions- und Auflösungsereignisse wurden beobachtet (Evans *et al.*, 2003; Kopp *et al.*, 2006).

Die bedeutendste Eigenschaft der Podosomen ist der F-Aktin reiche Kern, der auch für die Stabilität der gesamten Struktur von Bedeutung ist (Lehto *et al.*, 1982). Mitglieder der WASP-Familie sowie der Arp2/3-Komplex sind im Kern angereichert. Ein Fehlen dieser Proteine führt zur Zerstörung der Podosomen (Calle *et al.*, 2004). Gelsolin ist ebenfalls an

der Aktinregulation beteiligt und trägt mit der Eigenschaft, Aktinfilamente schneiden zu können, zum Umbau von Aktin bei (Chellaiiah *et al.*, 1998).

Es ist unumstritten, dass RhoGTPasen wie RhoA, Rac1 und Cdc42 die Podosomendynamik beeinflussen, die Wirkungsweise kann jedoch in verschiedenen Zelltypen variieren. In dendritischen Zellen kann sowohl eine dominant aktive als auch inaktive Mutante dieser GTPasen mit der Podosomenbildung interferieren (Burns *et al.*, 2001). Eine Expression der dominant aktiven Form von Cdc42 führt in Endothelzellen der Aorta zu Podosomenbildung (Moreau *et al.*, 2003). Dovas *et al.* (Dovas *et al.*, 2009) zeigten, dass die Bindung von Cdc42 sowie die Aktivierung von WASP für die Podosomenbildung nötig sind. Außerdem konnte aktives Rho in Invadopodien transformierter Fibroblasten nachgewiesen werden (Berdeaux *et al.*, 2004). Dies spricht dafür, dass die Regulation der Podosomen ein genau abgestimmtes Zusammenspiel der Aktivität und des GDP-GTP Zyklus mehrerer Rho-GTPasen voraussetzt.

Podosomale Adhäsionen können durch Transfektion von Zellen mit Viren, deren Onkogene Tyrosinkinase wie v-Src kodieren, induziert werden (Marchisio *et al.*, 1984; Marchisio *et al.*, 1987). Auch die zellulären Tyrosinkinase Src und Csk spielen eine wichtige Rolle bei der Podosomenregulation (Howell und Cooper, 1994). So können durch Src-Kinase Inhibitoren Podosomen zerstört (Linder *et al.*, 2000b) und mit Hilfe des Phosphotyrosin-Phosphatase Inhibitors Vanadat Podosomenbildung induziert werden (Marchisio *et al.*, 1988). Ein Substrat der Kinase Src ist Tks5 (SH3PXD2A) und wird als wichtiger Regulator für Podosomen diskutiert (Übersicht bei (Mao *et al.*, 2009)). Nach Src Aktivierung wird Tks5 durch Interaktion mit $\text{PtIns}(3,4)\text{P}_2$ an die Plasmamembran rekrutiert. Dies wiederum hat die Rekrutierung weiterer Proteine wie WASP und N-WASP zur Folge, die dann die Arp2/3-Komplex vermittelte Aktinnukleation und Podosomenneubildung auslösen (Oikawa *et al.*, 2008).

Eine proteolytische Spaltung von WASP durch die Protease Calpain ist für einen *turnover* der Podosomen entscheidend, da die Unterbindung der Calpain-Aktivität zu einer verlängerten Lebensdauer in dendritischen Zellen führt (Calle *et al.*, 2006). Außerdem wurde gezeigt, dass die Src-abhängige Phosphorylierung von Paxillin für die Ausbreitung von Podosomen-Rosetten in Rous-Sarcoma-Virus-transformierten Nierenzellen erforderlich ist (Badowski *et al.*, 2008).

Podosomen werden außerdem durch die Interaktion mit Mikrotubuli reguliert. Kopp *et al.* (Kopp *et al.*, 2006) zeigten, dass Podosomen in primären humanen Makrophagen von

Mikrotubuli-Plusenden kontaktiert werden. Daraufhin konnten drei Reaktionen beobachtet werden: Teilung, Auflösung oder statisches Verhalten. Dabei trat dynamisches Verhalten (Teilung, Auflösung) vermehrt in der Zellperipherie an Podosomen Vorläufern auf, während Podosomen in der Zellmitte stabiler waren. In humanen Makrophagen konnte in diesem Zusammenhang für das Motorprotein KIF1C eine Funktion in der Podosomenregulation gezeigt werden (Kopp *et al.*, 2006). In Osteoklasten wird der Podosomenring durch Mikrotubuli stabilisiert (Babb *et al.*, 1997), und in Mausmakrophagen beeinflussen Mikrotubuli die Fusions- und Teilungsraten von Podosomen-Vorläufern (Evans *et al.*, 2003).

Die Signalwege, die letztendlich zur Ausbildung von Podosomen führen, wurden in verschiedenen Zelltypen untersucht. Ein vereinfachtes Modell ist in Abb. 1.5 dargestellt.

Der Auslöser für die Podosomenbildung ist die Substratanheftung der Zelle, da Podosomen bisher nur in adhären Zellen beobachtet wurden. Dies führt zu einer Zusammenlagerung und Aktivierung von Integrinen sowie Signalweiterleitung durch Rezeptor Tyrosin-Kinasen zu PKC (Proteinkinase C). Dass es sich hierbei um einen sehr wichtigen Schritt handelt, konnten Gimona *et al.* (Gimona *et al.*, 2003) zeigen, da durch PKC-aktivierende Substanzen, wie z.B. Phorbol ester, die Bildung von Podosomen induziert werden kann. Anschließend wird Src aktiviert, wodurch wiederum eine Vielzahl weiterer Signalwege stimuliert wird. Vor allem die Weiterleitung durch PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) ist von Bedeutung (Chellaiah *et al.*, 1998), da dies zur Bildung von Phosphatidylinositolen $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ und $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ führt, was die Aktivierung von FAK (*focal adhesion kinase*) bzw. dessen Homolog Pyk2 in hämatopoietischen Zellen zur Folge hat. Die RhoGTPasen Rho und Rac beeinflussen ebenso die Weiterleitung durch 3'-Phosphoinositide (Chellaiah *et al.*, 2001; Sechi und Wehland, 2000).

Entscheidend für die Aktivierung der Aktinfilamentbildung ist außerdem Cdc42, das die Ausbildung der aktin-reichen Kernstruktur auslöst. Hierzu muss die Autoinhibition von WASP/ N-WASP aufgehoben werden, was wiederum den Arp2/3-Komplex aktiviert (Burns *et al.*, 2001; Linder *et al.*, 2000; Linder *et al.*, 1999). Eine Umwälzung der Aktinfilamente im Podosomenkern wird möglicherweise durch Gelsolin (Chellaiah *et al.*, 1998) und die GTPase Dynamamin (Buccione *et al.*, 2004) ermöglicht. Die Koordinierung der Kern- und Ringbildung ist ungeklärt. Wichtige Proteine der Podosomenringstruktur,

wie Talin und Vinkulin, werden durch Phosphoinositide reguliert (Sechi und Wehland, 2000). Die Aktivierung von Paxillin durch Integrin-vermittelte Signalweiterleitung könnte eines der ersten Signale der Ringbildung darstellen (Pfaff and Jurdic, 2001).

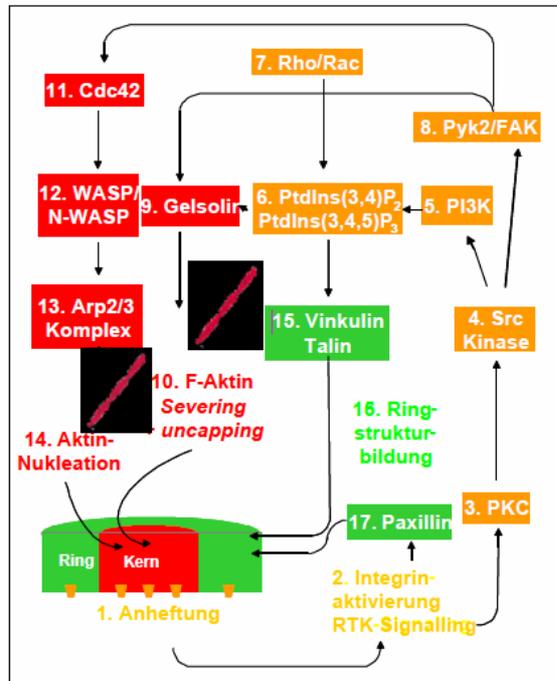


Abb.1.4: Vereinfachtes Modell für die Podosomenregulation. Die Anheftung an das Substrat ist ein bedeutender Auslöser für die Bildung von Podosomen (1). Es folgt die Gruppierung und Aktivierung von Integrinen, Rezeptor Tyrosin-Kinasen (RTK (2)) leiten die Signale zu PKC (3) und Src Kinasen (4) weiter. Letztere aktiviert PI3K (5), was zur Bildung von Phosphatidylinositolen PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ (6) führt. Diese werden auch von den RhoGTPasen Rho und Rac beeinflusst (7). Es kommt auch zu einer Aktivierung von FAK bzw. deren hämatopoetischem Homolog Pyk2 (8), welche das Aktin-schneidende Protein Gelsolin aktivieren (9) und dadurch den Aktinumsatz beeinflussen (10). Die Nukleation der Aktinfilamente wird durch Cdc42 gesteuert (11), indem die Autoinhibition von WASP/N-WASP aufgehoben wird (12). Somit kann durch WASP/N-WASP der Arp2/3-Komplex aktiviert werden (13). Die Koordinierung der Kern- und Ringstrukturbildung ist bislang unbekannt. Vinkulin und Talin (15) sind wichtige Komponenten der Ringstruktur (16) und werden u.a. durch Phosphoinositide (6) reguliert. Paxillin (17) kann über Integrine (2) aktiviert werden. (Linder und Kopp, 2005)

1.2.2.3 Funktion von Podosomen

Die Hauptfunktionen von Podosomen sind höchstwahrscheinlich Zelladhäsion und Matrixabbau. Für eine Beteiligung an der Adhäsion spricht, dass Podosomen engen Kontakt zum Substrat haben, was durch *total internal reflection microscopy* (TIRF) gezeigt wurde. Weiter sind sie mit Integrinen, Transmembranproteinen und Adhäsionsrezeptoren angereichert, die Adhäsion vermitteln und sie wurden bisher ausschließlich auf der ventralen Seite der Zelle beobachtet (Linder und Aepfelbacher, 2003).

Podosomen wurden auch mit Invasion und Migration in Verbindung gebracht. Durch lokalisierte Anheftung könnten sie Zellprotrusionen stabilisieren und so eine gerichtete Bewegung ermöglichen. Weiter wurde beobachtet, dass Podosomen an Zellprotrusionen rekrutiert werden, vor allem an das sog. *leading edge*. Die physiologische Funktion der Podosomen wurde am besten in Osteoklasten charakterisiert, wo sie zur Bildung einer sog. *sealing zone* beitragen, die am Knochenabbau beteiligt ist.

Da Podosomen bis jetzt nur in Zellkulturen auf künstlichen Oberflächen (*in vitro*) und nicht im Organismus (*in vivo*) untersucht wurden, war ihre Funktion lange Zeit unklar. Neueste Daten von Rottiers *et al.* (Rottiers *et al.*, 2009) konnten zum ersten Mal das Vorkommen von Podosomen Rosetten in Endothelzellen *in vivo* zeigen. Da sie auch am Abbau der Basalmembran beteiligt sind, ermöglicht dies neue Wege, ihre Rolle in der vaskulären Pathophysiologie zu untersuchen. Weitere Forschungsergebnisse sprechen dafür, dass Podosomen für das Verständnis und möglicherweise auch die Behandlung verschiedener Krankheiten äußerst wichtig sind (Marx, 2006).

Da podosomale Adhäsionen vor allem in Zellen gebildet werden, die Gewebeschranken überwinden müssen, z.B. in Monozyten, unreifen dendritischen Zellen oder bestimmten Krebszellen, könnte Matrix-Abbau am *leading edge* der Zelle zum invasiven Potential beitragen (Linder und Kopp, 2005).

Invadopodien zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, Matrix abbauen zu können (Buccione *et al.*, 2004; McNiven *et al.*, 2004). Ob diese Eigenschaft auch für Podosomen zutrifft, war lange Zeit unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Podosomen von Osteoklasten mit Matrix-Metalloproteasen angereichert sind (Delaisse *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 1997) und Podosomen in verschiedenen Zelltypen mit Bereichen des Matrixabbaus kolokalisieren (Burgstaller und Gimona, 2005; Osiak *et al.*, 2005). Matrixabbau durch Podosomen scheint im Vergleich zu Invadopodien oberflächlich und großflächig stattzufinden, was an der kurzen Lebensdauer und ihrer hohen Zahl innerhalb der Zelle liegen könnte (Linder, 2007).

Die Fähigkeit, extrazelluläre Matrix abzubauen, wird durch die Rekrutierung lytischer Enzyme wie z.B. Matrix-Metalloproteasen (MMPs) oder Serin-Proteasen, ermöglicht. Zu ersteren gehören MT1-MMP (*membrane-type* MMP-1), MMP-2 und MMP-9, die von

zentraler Bedeutung zu sein scheinen (Guegan *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 1997). Die GTPase Dynamamin erleichtert hierbei möglicherweise die Freisetzung der Matrix-Metalloproteasen (Linder und Kopp, 2005). ADAMs (*disintegrin and metalloproteinase domain-containing proteins*) lokalisieren ebenfalls an Podosomen, wo sie mit dem Integrin $\beta 1$ (Seals und Courtneidge, 2003) oder dem Adapterprotein Tks5 (Abram *et al.*, 2003) interagieren. Serinproteasen wie Seprase oder DPP4 (Dipeptidyl Peptidase) wurden bislang nur an Invadopodien in Krebszellen (Artym *et al.*, 2006) oder in transformierten Fibroblasten (Gherzi *et al.*, 2002) beobachtet. Ob sich diese auch an Podosomen finden, bleibt ebenso zu klären wie die Signalwege, die zu einer Anreicherung dieser Proteasen an Podosomen führen.

Weiter könnten Podosomen in Leukozyten eine Art Sensor-Komplex darstellen, um einen möglichen Weg für die transzelluläre Migration aufzuspüren. Hinweise dafür gibt es durch Lymphozyten von WASP-defizienten Patienten, die keine Podosomen bilden können, wohingegen Ausbreitung und laterale Bewegung nicht eingeschränkt sind. Außerdem zeigten diese Lymphozyten kaum transzelluläre Migration, während parazelluläre Migration nicht beeinträchtigt war (Hidalgo und Frenette, 2007).

1.2.3 Supervillin und Gelsolin

Supervillin (SV) ist ein Membran- und F-Aktin-assoziiertes Adapterprotein in der Familie der Villin/Gelsolin Proteine, das direkt an nicht muskuläres Myosin IIA und IIB sowie an den N-Terminus der langen Form der MLCK (*myosin light chain kinase*) und Calponin bindet (Chen *et al.*, 2003b; Takizawa *et al.*, 2007). Außerdem enthält es drei F-Aktin-Bindungsdomänen, durch die Aktinfilamente entweder gebündelt oder quervernetzt werden können. Die Fähigkeit, Myosin und Aktin binden zu können, spricht für eine Beteiligung am intrazellulären Transport. Die C-terminale Villin-Domäne ist hoch konserviert, wohingegen im N-Terminus spezie- oder gewebsspezifische Spleißvarianten auch in nah verwandten Organismen vorkommen (Archer *et al.*, 2005).

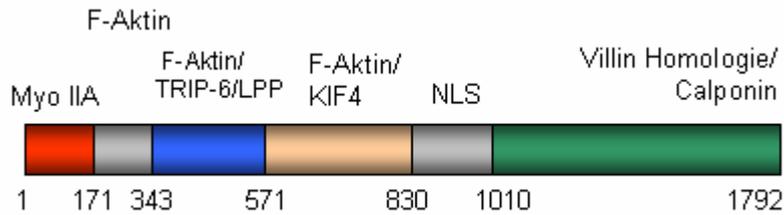


Abb. 1.5 Domänenstruktur von Supervillin. Supervillin besitzt eine N-terminal gelegene Myosin IIA-Bindedomäne (rot), danach schließen sich drei F-Aktinbindedomänen an, die sich mit der TRIP6-/ LPP- (blau) bzw. der KIF4-Bindedomäne (beige) überschneiden. An die NLS (*nuclear localisation sequence*) schließt sich C-terminal die Villin Homologie-/ Calponin-Bindedomäne (grün) an.

Supervillin aus nicht muskulären Zellen wurde mit der Plasmamembran von Neutrophilen als Bestandteil eines *lipid-raft*-artigen Komplexes aufgereinigt. Dieser enthält außerdem noch heterotrimere G-Proteine, Src Kinasen und MT6-MMP (Nebl *et al.*, 2002), die alle an Tumorbildung sowie Matrixabbau beteiligt sind (Ingleby, 2008; Mareel und Leroy, 2003; Sohail *et al.*, 2008). Pope *et al.* zeigten, dass Supervillin in den meisten Krebszelllinien stark angereichert ist (Pope *et al.*, 1998).

Eine Isoform von Supervillin in glatten Muskelzellen, SmAV (*smooth muscle archyillin*) lokalisiert an Podosomen, die durch Phorbolester induziert wurden und ist an der Aktivierung von ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases*) beteiligt. Über die Funktion von Supervillin Isoformen an der Bildung podosomaler Strukturen ist hingegen wenig bekannt (Crowley *et al.*, 2009).

Aufgrund der biochemischen Eigenschaften ist es denkbar, dass Supervillin Veränderungen im Aktinzytoskelett an Membranen vermittelt. Weiter ist Supervillin an der negativen Regulation fokaler Adhäsionen beteiligt. Eine Überexpression verringert die Zelladhäsion an Fibronectin, wohingegen *knock-down* mittels RNA-Interferenz die Anheftung der Zelle erhöht (Takizawa *et al.*, 2006). Durch Bindung von Calponin werden Podosomen in glatten Muskelzellen negativ reguliert (Gimona *et al.*, 2003), die N-terminale Sequenz des Proteins (SV1-171) zerstört Stressfasern, indem eine Hyperkontraktilität von Myosin II induziert wird (Takizawa *et al.*, 2006; Takizawa *et al.*, 2007). Die Sequenz, die hauptsächlich für die Regulation von fokalen Adhäsionen verantwortlich ist (SV342-571) bindet über die LIM Domäne an zwei Proteine der Zyxin-Familie, TRIP6 (*thyroid receptor-interacting protein 6*) und LPP (*lipoma-preferred partner*), jedoch nicht an Zyxin selbst (Takizawa *et al.*, 2006). Allerdings ist der Mechanismus, über den Supervillin und TRIP6 Adhäsionen regulieren, nicht vollständig verstanden. Eine mögliche Hypothese besagt, dass Supervillin den Verlust fokaler

Adhäsionen hervorruft, indem die Bildung von Podosomen und Abbau der extrazellulären Matrix vorangetrieben wird (Crowley *et al.*, 2009).

Gelsolin ist ein weiteres Mitglied in der Familie der Gelsolin/Villin Familie. Es ist ein verbreitetes Aktin bindendes Protein, das Zellmorphologie, Motilität, Signalweiterleitung und Apoptose reguliert. Es wird sowohl für die Bildung als auch die degradativen Eigenschaften in Osteoklasten Podosomen benötigt und begünstigt die Invasion und Motilität von Krebszellen (MacLennan *et al.*, 1999; Rieder *et al.*, 2005; Van den Abbeele *et al.*, 2007). Gelsolin *knock-out* Mäuse weisen im Hinblick auf Motilität und Aktin zahlreiche Defekte auf, wie z.B. ausgeprägte Stressfasern oder gestörte Chemotaxis und Wundheilung (Sun *et al.*, 1999). Diese Beispiele zeigen, dass Gelsolin in der Erhaltung der Zellmotilität sowie der Aktindynamik eine entscheidende Rolle spielt.

1.2.4 Das Mikrotubuli-Zytoskelett

Mikrotubuli sind dynamische, polarisierte Filamente, die einer schnellen Umwälzung unterliegen und in verschiedenen zellulären Funktionen eine wichtige Rolle spielen, wie z.B. Zellstruktur, Anordnung der Organellen, Chromosomentrennung oder intrazellulärer Transport (Verhey und Gaertig, 2007). Mikrotubuli setzen sich aus α - und β -Untereinheiten zusammen. Tubulinmoleküle liegen in sog. Protofilamenten vor, jeweils ca. 13 bilden eine Röhre mit einem Durchmesser von 18-25 nm. Durch den polaren Einbau von α - und β -Tubulin entsteht ein schnell wachsendes Plusende und ein langsamer wachsendes Minusende. Während das Plusende meist zur Zellperipherie weist, wird das Minusende am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum MTOC (*microtubule-organizing center*) im Zentrum der Zelle stabilisiert (Hyams und Lloyd, 1993; (Bergen und Borisy, 1980). Mikrotubuli liegen meist als Einzelstrang vor, können aber auch zu Doppelsträngen (bei Cilien) oder Triplets (bei Zentriolen) fusionieren.

Die Nukleation der Mikrotubuli erfolgt hauptsächlich am MTOC, das meist aus einem Paar zylindrischer Zentriolen zusammengesetzt ist. Hier kommt eine weitere Tubulin-Isoform vor, die für die Nukleation der Mikrotubuli von Bedeutung ist: γ -Tubulin. Es bildet dabei einen großen ringförmigen Proteinkomplex mit weiteren Proteinen. Dieser sogenannte „ γ -Tubulin-Ring-Komplex“ kann die Polymerisation von α - und β -Tubulin zur Bildung von Mikrotubuli bewirken.

Der Aufbau der Mikrotubuli läuft in drei Schritten ab, die in einer Übersicht in Abb. 1.6 dargestellt sind. Freie α - und β -Untereinheiten assoziieren der Länge nach und bilden kurze Protofilamente (Schritt 1). Da diese möglicherweise instabil sind, assoziieren sie schnell zu stabileren Faltblattstrukturen (Schritt 2). Anschließend biegt sich ein Blatt zu einem Mikrotubulus aus 13 Protofilamenten. Das Wachstum erfolgt durch das Anfügen weiterer Untereinheiten an das Ende des Protofilamentes (Schritt 3).

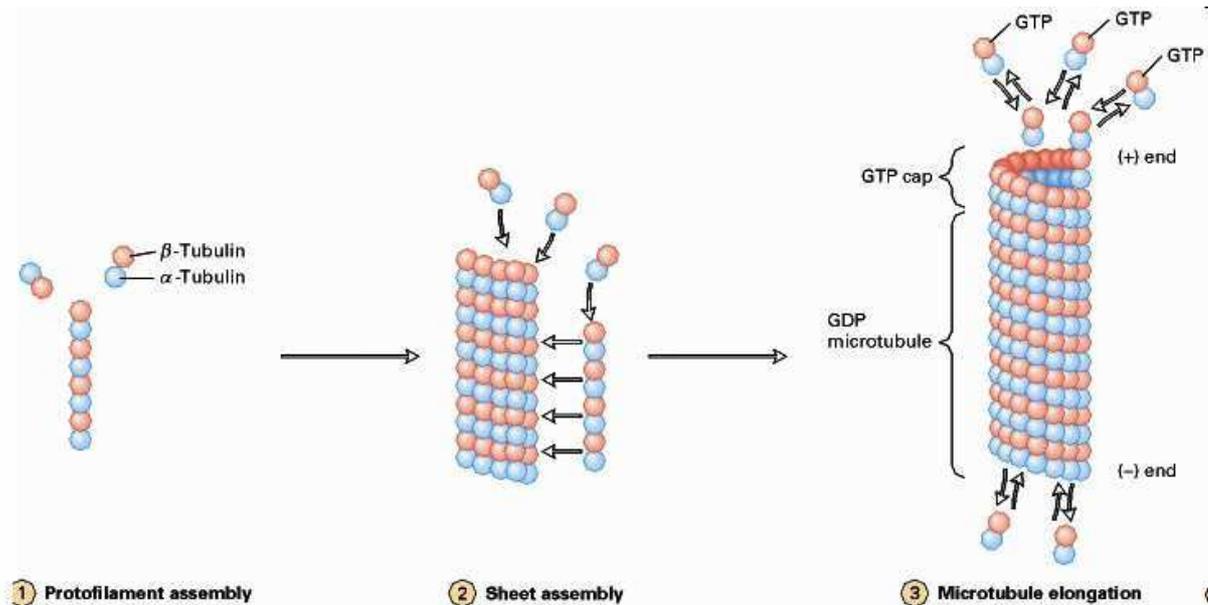


Abb. 1.6: Aufbau der Mikrotubuli. Freie α - β -Tubulindimere assoziieren der Länge nach und bilden kurze Protofilamente (Schritt 1). Protofilamente assoziieren schnell und bilden die Mikrotubuli Wand (Schritt 2). Durch Anheftung weiterer Untereinheiten an das Ende der Protofilamente werden die Mikrotubuli verlängert (Schritt 3). Nach Lodish *et al.*, 2000

Die freien Tubulin-Dimere haben GTP am β -Tubulin Monomer gebunden. Nachdem eine dimere Untereinheit in einen Mikrotubulus eingebaut wurde, wird das GTP am β -Tubulin zu GDP hydrolysiert (Heald und Nogales, 2002). Wenn die Rate der Polymerisation die Rate der GTP Hydrolyse übertrifft, bildet sich am (+)-Ende eine Kappe aus GTP-gebundenen Untereinheiten, obwohl die Mehrheit der β -Tubulin Untereinheiten GDP enthält. Die Polymerisationsgeschwindigkeit ist am (+)-Ende doppelt so hoch wie am (-)-Ende (Lodish *et al.*, 2000).

Durch Austausch der Untereinheiten unterliegen Mikrotubuli einer schnellen Umwälzung. Die Situation, in der die Mikrotubuli einem schnellen Wechsel aus Wachstum und Schrumpfung ausgesetzt sind, wird als dynamische Instabilität bezeichnet (Verhey und Gaertig, 2007).

Innerhalb des zytoplasmatischen Netzwerks findet sich neben der hochdynamischen auch eine stabilere Mikrotubuli-Subpopulation. Deren Funktion ist noch nicht genau geklärt, es gibt jedoch Hinweise, dass diese Mikrotubuli für die Zellmorphologie von Bedeutung sein könnten (Heald und Nogales, 2002).

Die Stabilität der Mikrotubuli wird zum Großteil durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) vermittelt. Klassische MAPs, wie MAP2 und Tau, binden an die Oberfläche der Mikrotubuli und verbinden so mehrere Untereinheiten. CLIP-170 und EB1 sind Proteine, die an die Plusenden der Mikrotubuli binden. Sie können mit neuen Tubulin-Untereinheiten polymerisieren oder selektiv an eine spezifische Konformation am Ende der Mikrotubuli binden. Das Protein Katanin schneidet Mikrotubuli, wobei Enden ohne GTP-Kappe gebildet werden, die depolymerisieren können (Heald und Nogales, 2002). Op18/Stathmin bindet Tubulindimere und erhöht so die dynamische Instabilität (Heald und Nogales, 2002; Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2008; (Neuwald *et al.*, 1999).

Mikrotubuli sind einem Wechsel aus Wachstums- und Schrumpfungsphasen unterworfen, die auch durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden (Heald und Nogales, 2002; Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2008). Durch posttranslationale Modifizierungen der Tubulindimere, z.B. Polyglutamylierung, Detyrosinierung, Phosphorylierung, Palmitoylierung oder Acetylierung von α -Tubulin am Lysin 40 können stabile Mikrotubuli unterschieden werden. Es wird allerdings noch diskutiert, ob eine Tubulin-Acetylierung *per se* eine stabilisierende Wirkung vermittelt (Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2008). Eine Destabilisierung erfolgt durch Deacetylierung durch Histon Deacetylase 6 (HDAC6) (Purev *et al.*, 2009).

1.3 Molekulare Motoren

Molekulare Motoren wandeln chemische Energie in Form von ATP in mechanische Arbeit um. Neben rotatorischen Motoren, z.B. $F_1/V_1/A_1$ -ATPasen, und bakteriellen Flagellenmotoren gibt es auch lineare Motoren, welche sich entlang von Zytoskelett-Polymeren bewegen (Vale und Milligan, 2000). Unter den molekularen Motoren, die für die meisten zellulären Bewegungsabläufe und den Transport neu synthetisierter Proteine verantwortlich sind, gibt es drei Superfamilien: Myosine, die vorwiegend an

Aktinfilamenten laufen, sowie Dyneine und Kinesine, die sich entlang Mikrotubuli bewegen. Alle drei Motoren wandeln chemische Energie durch die Hydrolyse von ATP in mechanische Arbeit um, was eine Konformationsänderung in der globulären Motordomäne auslöst. Zusätzliche Domänen außerhalb der Motordomäne sind für Dimerisierung, Regulation sowie Interaktion mit anderen Molekülen verantwortlich (Hirokawa *et al.*, 2009; Schliwa und Woehlke, 2003). Während Kinesine ihre Fracht in Richtung der Mikrotubuli-Plusenden transportieren, bewegen sich Dyneine zum Minusende hin. Man unterscheidet axonemales und zytoplasmatisches Dynein. Letzteres ist in höheren eukaryontischen Zellen möglicherweise für die Lokalisation des Golgi-Apparates verantwortlich (Henry *et al.*, 2006). Weiter ist es am Transport von Vesikeln und möglicherweise an der Chromosomenverteilung sowie der Positionierung der Mitosespindel beteiligt. Axonemales Dynein ist für die ATP-gerichtete Bewegung von Flagellen und Zilien verantwortlich (Karp G, 2005).

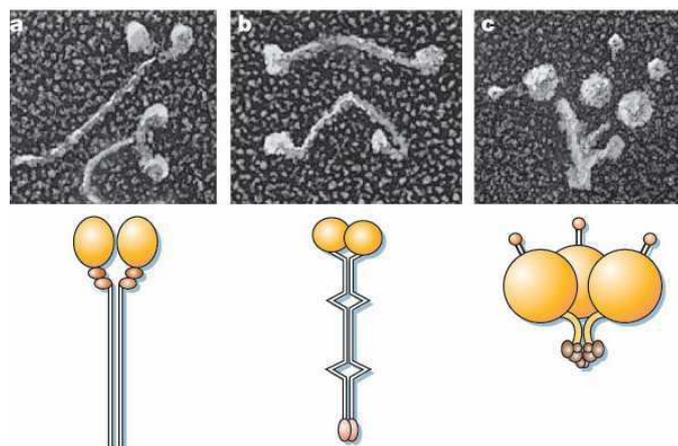


Fig. 1.7 Repräsentative Zytoskelettmotoren. (a) Myosin II; (b) konventionelles Kinesin; (c) ziliäres Dynein. Die obere Reihe zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen schockgefrorener Moleküle. In der schematischen Übersicht sind die Motordomänen in gelb, assoziierte Proteine in braun, und die *coiled-coil*-Domänen durch parallele schwarze Linien dargestellt. Nach Schliwa und Woehlke, 2003

1.3.1 Kinesine

Kinesine wurden 1985 bei Untersuchungen zur Zellmotilität *in vitro* entdeckt (Vale und Milligan, 2000). Seitdem konnten den Proteinen der Kinesin Superfamilie (KIFs) durch zahlreiche zellbiologische Ansätze bedeutende Funktionen im intrazellulären Transport, der zellulären Morphogenese sowie für das Überleben und die Funktionsfähigkeit der Zelle zugewiesen werden (Hirokawa und Noda, 2008). Genetische Inaktivierung

zahlreicher KIFs in Mäusen und *Drosophila melanogaster* führte zu embryonaler oder perinataler Letalität, was die Bedeutung dieser Motorproteine verdeutlicht (Plitz und Pfeffer, 2001).

Proteine der Kinesin Superfamilie sind, neben Dyneinen, molekulare Mikrotubuli-basierte Motoren (Langford, 1995) für den gerichteten Transport unterschiedlicher Fracht wie z.B. membranumhüllter Organellen, Proteinkomplexe oder mRNS. Jellali *et al.* (Jellali *et al.*, 1994) wiesen nach, dass Kinesine Mikrosomen, synaptische Vesikel und Mitochondrien binden.

KIFs umfassen 15 Kinesin Familien, die gemäß phylogenetischer Analysen Kinesin 1 bis Kinesin 14B genannt werden. Diese wiederum können, abhängig von der Position der Motordomäne, in drei Typen unterteilt werden: bei N-Kinesinen befindet sich die Motordomäne in der Amino-terminalen Region, bei M-Kinesinen ist diese in der Mitte und bei C-Kinesinen in der Carboxy-terminalen Region. Üblicherweise bewegen sich N- und C-Kinesine zum Mikrotubuli-Plusende bzw. -Minusende, M-Kinesine hingegen bauen Mikrotubuli ab.

Der klassische Kinesinmotor ist ein multimeres Protein, bestehend aus zwei schweren Ketten (130 kD) und zwei leichten Ketten (65 kD) (Walker und Sheetz, 1993). Die schweren Ketten der meisten Kinesine können in mehrere Domänen unterteilt werden: eine globuläre Kopfdomäne, die Kraft erzeugt und an Mikrotubuli bindet. Der α -helikale Stiel dient als „Abstandshalter“ und überträgt die erzeugte Kraft. Die globuläre Schwanzdomäne bindet die leichten Ketten und verbindet den Proteinkomplex mit der Fracht, z.B. Vesikel oder Organellen (Sack *et al.*, 1999). Kinesine binden normalerweise über Adapterproteine an Vesikel, in manchen Fällen erfolgt die Bindung aber auch direkt. (Hirokawa *et al.*, 2009b).

Innerhalb der verschiedenen Kinesin-Familien gibt es monomere, dimere, trimere oder auch tetramere Motoren. Die meisten bewegen sich zum Plusende der Mikrotubuli und wenige zum Minusende, einige machen einen Schritt, andere mehrere, ehe sie sich vom Mikrotubulus ablösen (Sack *et al.*, 1999; Schliwa und Woehlke, 2003). Bei ersteren handelt es sich um nicht-prozessive, bei letzteren um prozessive Motoren. Konventionelles Kinesin, ein dimeres Motorprotein, ist ein Beispiel für einen prozessiven Motor, bei dem die Reaktionszyklen der beiden Motorköpfe verknüpft sind (Schliwa und Woehlke, 2003). Die meisten Modelle schlagen einen „*hand-over-hand*“ Modus vor, bei dem sich der freie Kopf am Mikrotubulus-gebundenen Kopf vorbei zu einer neuen

Bindestelle auf dem Mikrotubulus bewegt. Dabei wird pro Schritt ein Molekül ATP verbraucht.

Konventionelles Kinesin läuft an Mikrotubuli-Protofilamenten, indem sie sich von einer Tubulin-Untereinheit zur nächsten bewegen, was ca. einer Strecke von 80 \AA entspricht. Die einseitige Bewegung erfolgt durch eine Konformationsänderung in der „neck linker“-Region, ein 15 Aminosäuren langer Bereich am C-terminalen Ende der katalytischen Domäne. Die Halsverbindung ist beweglich, wenn Kinesine ADP gebunden haben. Wenn an Mikrotubuli-gebundene Kinesine ATP binden, bindet die Halsverbindung an die katalytische Domäne, wobei der C-Terminus in Richtung der Mikrotubuli-Plusenden zeigt. Somit bewirkt die durch ATP bereitgestellte Energie eine Vorwärtsbewegung der Halsverbindung. Im Kinesin-Dimer ist die Halsverbindung mit einer *coiled-coil* Dimerisierungsdomäne verbunden, so dass die Bewegung der Halsverbindung des einen Kopfes auf den anderen übertragen wird, um eine prozessive Bewegung zu ermöglichen (Vale und Milligan, 2000).

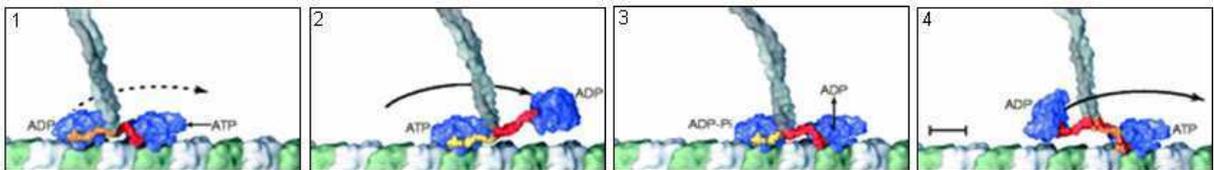


Abb. 1.8 Modell für den Bewegungsablauf von konventionellem Kinesin. Die katalytische Domäne (grau) bindet die Kinesin-Fracht. **Bild 1:** jede katalytische Domäne (blau) bindet an ein Tubulin Heterodimer (grün = β -Untereinheit; weiß = α -Untereinheit) eines Tubulin-Protofilamentes. ATP-Bindung am vorderen Kopf bewirkt ein Anheften der Halsverbindung (orange bzw. rot). **Bild 2:** durch die ATP-Bindung wird die Halsverbindung des vorderen Kopfes an die Motordomäne angelagert, wodurch der hintere Kopf um ca. 160 \AA zur nächsten Tubulin-Bindestelle geschleudert wird. **Bild 3:** Der nun vordere Kopf bindet fest an die Bindestelle und vervollständigt so die 80 \AA Bewegung der mitgeführten Fracht. Diese Bindung beschleunigt die ADP-Freisetzung, während der hintere Kopf ATP hydrolysiert. **Bild 4:** Nach ADP-Freisetzung bindet ATP an den vorderen Kopf. Der hintere Kopf wird nach Phosphatfreisetzung und Loslösen der Halsverbindung nach vorne geschleudert (Vale and Milligan, 2000).

1.3.2 Myosine

Hoch auflösende Kristallstrukturen der Motordomänen der Kinesine und Myosine zeigten eine unerwartete Verwandtschaft der beiden Motorklassen: der Bereich um die ATP-bindende Domäne ist in ihrer Struktur nahezu identisch, obwohl die Homologie der Aminosäuresequenz nicht sehr hoch ist. Weiter wurde eine Verwandtschaft zu den G-

Proteinen entdeckt, was auf eine gemeinsame evolutionäre Entstehung hinweist (Schliwa und Woehlke, 2003; Vale und Milligan, 2000). Früher wurden zwei Gruppen von Myosinen unterschieden: konventionelles Myosin/Muskelfmyosin (Myosin II) und unkonventionelles Myosin/Nichtmuskelfmyosin. Heute sind mindestens 18 verschiedene Klassen der Myosine bekannt, und jede für sich enthält mehrere Dutzend Mitglieder (Schliwa und Woehlke, 2003). Myosine sind bei der Muskelkontraktion, Phagozytose, intrazellulärem Transport sowie der Zellteilung von großer Bedeutung (Mermall *et al.*, 1998) Schliwa und Woehlke, 2003). Myosin besteht meist aus einem Paar schwerer Ketten (300 kD) und zwei Paaren leichter Ketten (15-28 kD). Allen gemeinsam ist eine globuläre Motordomäne am N-Terminus der schweren Kette. Sie ist hochkonserviert und enthält neben der aktinbindenden Region auch die ATP-Bindestelle. Daran schließt eine α -helikale Halsregion an. Sie wird als regulatorische Domäne bezeichnet und dient als Bindestelle für die leichten Ketten (Cheney und Mooseker, 1992; Heintzelman und Schwartzman, 1997). Die Schaftregion der Myosine kann *coiled-coil* Domänen enthalten, wodurch Myosindimere mit zwei Motorköpfen entstehen können (Sellers, 2000).

Die Myosinaktivität wird durch Phosphorylierung der leichten Kette reguliert, was durch zwei unterschiedliche Enzyme erfolgen kann: *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK), welche durch Calcium/Calmodulin aktiviert wird und *Rho-dependent coiled-coil Kinase* (ROCK), ein Effektor der kleinen GTPase Rho (Smith *et al.*, 2003). Der katalytische Mechanismus während des Bewegungsablaufs scheint für alle Myosin-Isoformen konserviert zu sein und ist in Abb. 1.9 schematisch für Muskelmyosin dargestellt.

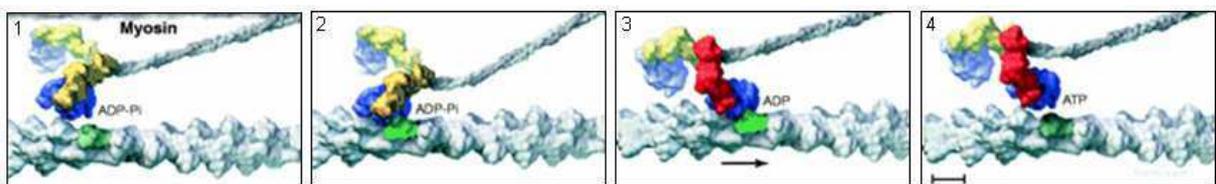


Abb. 1.9 Modell für den Bewegungsablauf von konventionellem Myosin/Muskelfmyosin. Bild 1: Muskelmyosin ist ein Dimer aus zwei identischen Motorköpfen, welche durch eine *coiled-coil* Domäne (grauer Stab, der sich nach rechts oben erstreckt) am dicken Filament befestigt sind (katalytische Taschen sind blau, die Hebelarme vor dem Ruderschlag sind gelb). In ADP-Pi gebundenem Zustand bindet die katalytische Tasche nur schwach an Aktin. Bild 2: Ein Kopf bindet fest an die Aktinbindestelle (grün). Die beiden Myosinköpfe bewegen sich unabhängig voneinander und nur jeweils einer der beiden ist an Aktin gebunden. Bild 3: Das Andocken von Aktin setzt Phosphat von der aktiven Seite frei. Der Hebelarm wechselt in ein ADP-gebundenes Stadium (rot), wodurch das Aktinfilament um $\sim 100 \text{ \AA}$ versetzt wird. Bild 4: Anschließend dissoziiert ADP, und ATP bindet an die aktive Seite. Dadurch kann die katalytische Tasche nur noch schwach an Aktin binden und der Hebelarm fällt in die Ausgangsposition zurück (d.h. Bild 1). (Vale und Milligan, 2000)

1.4 Vesikeltransport

Vesikel sind kleine, intrazelluläre, membranumhüllte Kompartimente, die für den Transport verschiedenster Stoffe verantwortlich sind. Je nach Inhalt und Funktion unterscheidet man Endosomen, Phagosomen, Lysosomen, Vakuolen, sekretorische Vesikel oder Transportvesikel (Alberts, 1994).

Zellen enthalten zahlreiche Vesikel, die mit Hilfe von Motorproteinen entlang der Filamente und Tubuli des Zytoskeletts transportiert werden. Verschiedene Motorproteine sind auf den Transport bestimmter Fracht in eine bestimmte Richtung spezialisiert. So wird sichergestellt, dass die Vesikel ihren jeweiligen Bestimmungsort erreichen (Genetic Science Learning Center).

Im Hinblick auf intrazellulären Transport könnten posttranslationale Modifikationen von Mikrotubuli eine wesentliche Rolle spielen. Neuere Daten zeigen, dass posttranslationale Modifikationen Mikrotubuli-Populationen markieren und somit möglicherweise als „Wegweiser“ dienen, so dass beispielsweise Fracht von Motorproteinen zu bestimmten subzellulären Zielen transportiert wird (Hammond *et al.*, 2008; Verhey und Gaertig, 2007a).

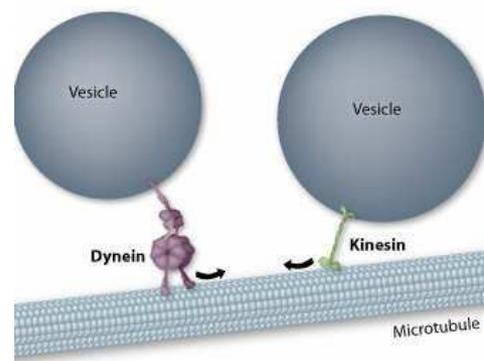


Abb.1.10 Motorproteine binden an Vesikel und bewegen sich entlang Mikrotubuli. Dyneine laufen zum Minusende der Mikrotubuli, Kinesine meist in die entgegengesetzte Richtung (nach Genetic Science Learning Center)

Der erste Schritt des vesikulären Transports ist die Bildung eines Vesikels durch Abschnürung von der Plasmamembran. Die zytoplasmatische Oberfläche der

Transportvesikel ist dabei mit Proteinen bedeckt, wobei man drei Arten dieser beschichteten Vesikel unterscheiden kann. Clathrin-beschichtete Vesikel sind verantwortlich für die Aufnahme extrazellulärer Moleküle durch Endozytose sowie für den Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu Lysosomen. Clathrin bildet eine korbartige Gitterstruktur, die eine Ausstülpung der Membran und Vesikelknospung bewirkt. Bei den COP-(*coat protein*) beschichteten Vesikeln unterscheidet man COPI- und COPII-beschichtete Vesikel. Die Hüllen der COPI- und -II Vesikel setzen sich aus verschiedenen Proteinkomplexen zusammen, die eine analoge Funktion zu Clathrin und Adapterproteinen bei der Vesikelknospung haben. COPII-Vesikel schnüren sich vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) ab und transportieren ihre Fracht entlang des sekretorischen Signalwegs zum Golgi-Apparat. COPI-beschichtete Vesikel hingegen entspringen dem ER-Golgi *intermediate compartment* oder dem Golgi-Apparat. Ihre Funktion besteht im Rücktransport von Proteinen, die ständig am Golgi-Apparat oder im ER präsent sind. Eine Komplexbildung spezifischer v-SNAREs auf dem Vesikel und t-SNAREs auf der Plasmamembran der Zielstruktur führt schließlich zur Fusion der Membranen. Neben den SNAREs sind für die Vesikelfusion auch Rab-Proteine von Bedeutung. Rab (*Ras-related proteins in brain*) GTPasen sind konservierte, essentielle Regulatoren, die u.a. an einer Vielzahl von Schritten des Vesikeltransports beteiligt sind (Schwartz *et al.*, 2007). Mehr als 70 humane Proteine der Ras Superfamilie wurden identifiziert (Colicelli, 2004) und für 36 RabGTPasen wurden Funktionen beschrieben. Trotz ihrer geringen Größe (20-25 kD) besitzen sie zahlreiche Interaktionsflächen, durch die sie mit regulatorischen Molekülen interagieren (Chen *et al.*, 2003; Pereira-Leal und Seabra, 2000; Pfeffer, 2005). RabGTPasen sind molekulare Schalter, die zwischen einem aktiven (GTP-gebundenem) und inaktiven (GDP-gebundenem) Stadium wechseln und viele grundlegende zelluläre Funktionen, wie beispielsweise Vesikeltransport, regulieren (Schwartz *et al.*, 2007).

1.5 Aufgabenstellung

Podosomen sind hochdynamische, aktinreiche Adhäsionsstrukturen monozytärer Zellen, die aber auch in vielen anderen Zelltypen gebildet werden können. Sie sind beteiligt am Abbau extrazellulärer Matrix und übernehmen eine wichtige Funktion bei Zelladhäsion und Invasion. Weiter stellen sie eine Schnittstelle verschiedener Zytoskelettsysteme dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Kontakt von Mikrotubuli-Plusenden eine Voraussetzung für dynamisches Verhalten von Podosomen ist. Über Mikrotubuli scheinen wichtige Regulationsfaktoren transportiert zu werden, beispielsweise durch die Motorproteine der Kinesin-Familie. In einer früheren Dissertation von P. Kopp konnte bereits gezeigt werden, dass KIF1C eine wichtige Rolle in der Regulation der peripheren Podosomen (*Precursor*) spielt. Weiter konnten das Kinesin KIF9 sowie das periphere Membranprotein Supervillin als wichtige Regulatoren identifiziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher die transportierte Fracht bzw. die Wirkungsweisen dieser Regulation identifiziert werden, um einen besseren Einblick in die molekularen Mechanismen der Podosomendynamik zu erhalten.

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich daraus folgende Fragen:

- I) Wie sind die durch KIF1C transportierten Vesikel auf molekularer Ebene zusammengesetzt?
- II) Welche molekularen Wirkungsweisen stehen hinter den durch KIF1C transportierten Regulationsfaktoren?
- III) Welche Rolle spielt KIF9 hinsichtlich der Regulation von Podosomen?
- IV) Welche Effektormoleküle werden durch KIF9 transportiert?
- V) Welche Supervillin-Domänen sind an der Regulation der Podosomendynamik beteiligt?
- VI) Beeinflusst Supervillin die Funktion von Podosomen?

2 Material und Methoden

2.1 Laborausstattung

Autoklav	Bioclav (Fa. Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen, Deutschland) Varioklav (Fa. MediTech, Norderstedt, Deutschland)
Eismaschine	Flockeneisbereiter AF-10 (Fa. Scotsman, Vernon Hills, IL, USA) Hoshizaki Ice Maker (Fa. Hoshizaki Electric Co., Ltd., Japan)
Feinwaage	Fa. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Gelapparaturen	Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gel-Dokumentation	UV-Illuminator Model N90M (Fa. UniEquip, Martinsried, Deutschland) Canon PowerShot S5Is, 8,0 MP (Fa. Canon, Tokyo, Japan) ChemiDoc TM XRS (Fa. BioRad, München, Deutschland)
Grobwaage	Fa. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland Fa. Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland
Inkubatoren	Fa. Binder Labortechnik, Tuttlingen, Deutschland Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Netzgeräte	Power Pac 200 und Power Pac 300 Power Supply (Fa. Biorad, Hercules, CA, USA)
Petrischalen	Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
pH-Meter	Fa. Knick (Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin, Deutschland) Fa. Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
Pinzetten	Fa. neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs-GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Magnetrührer	MR 3001 (Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland) IKA [®] colorsquid wildcat (Fa. IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
Schüttelinkubatoren	GFL-3031 (Gesellschaft f. Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) Infors HT, Ecotron (Fa. Infors AG, Bottmingen, Schweiz)
Spektrophotometer	SmartSpec TM Plus Spectrophotometer, Bio-Rad (Fa. Hercules, CA, USA) Nanodrop 1000 (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
Sterilbank	Fa. BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)

Sterilbank	MSC Advantage (Fa. Thermoscientific, Deutschland)
Transfektions-Geräte	Microporator (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
Tankblot-kammer	Modell EB-10 (Fa. Scie-Plas, Gainsborough, Großbritannien)
Thermocycler	Uno-Thermoblock (Fa. Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) Mastercycler gradient (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) Primus25 advanced (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
Vortex-Gerät	REAX top, (Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland)
Zentrifugen	Centricon H-401 (Fa. Kontron Instruments, Watford, UK) Omnifuge 2.0RS (Fa. Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) Biofuge <i>fresco</i> (Fa. Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) Biofuge A (Fa. Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) Universal 320R (Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland) MiniSpin® (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.2 Arbeiten mit *E. coli*

2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Bakterienstamm:

- *Escherichia coli* DH5 α : F- ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1
endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1(GibcoBRL)

Das für die Kultivierung von *Escherichia coli* verwendete LB-Medium wurde vor dem Gebrauch für 20 min bei 121°C im Autoklav (Bioclav, Fa. Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen) sterilisiert. Alle Komponenten wurden mit deionisiertem und filtriertem Wasser (Ionenaustauscher, Fa. Millipore) hergestellt. Hitzelabile Zusätze, wie Glucose und Antibiotika, wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren des Mediums zugegeben.

E. coli wurde bei 37°C in LB-Medium kultiviert. Die Selektion von Bakterien, die mit einem resistenzverleihenden Plasmid transformiert wurden, erfolgte mittels Anzucht auf

LB-Medium in Anwesenheit von Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) (Fa. Sigma-Aldrich). Die Inokulation von LB-Agarplatten erfolgte mit Hilfe einer Impföse mit anschließender Bebrütung über Nacht bei 37°C. Kleinere Volumina (5 ml LB-Medium) wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht schüttelnd inkubiert. Für die Kultivierung größerer Volumina (100 ml) wurde eine Vorkultur angelegt und nach einer Inkubationszeit von ca. 8 h in einer Verdünnung von 1: 500 zu LB-Medium gegeben und schüttelnd erneut bei 37°C inkubiert.

Zur längerfristigen Aufbewahrung transformierter Bakterien wurden 0,5 ml einer über Nacht angezogenen Kultur mit 0,5 ml LB-Medium inkl. 40 % Glycerin in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde in Plastikkuvetten gegen unbeimpftes LB-Medium bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektrophotometer bestimmt. Eine OD₆₀₀-Einheit entspricht hierbei ungefähr einer Konzentration von 10⁸ Zellen/ml Medium bei OD<1.

2.2.2 Transformation von Plasmiden in kompetente Zellen

2.2.2.1 Herstellung hitzekompetenter Bakterien

100 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden bis zu einer optischen Dichte von 0,4 bei 37°C kultiviert und anschließend durch 15-minütige Zentrifugation (1900 x g, 4°C) geerntet. Das Sediment wurde in 50 ml eiskaltem 100 mM MgCl₂ aufgenommen, für 30 min auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert und in 50 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Sedimentierung der Bakterien durch Zentrifugation. Die Zellen wurden in 2 ml 100 mM CaCl₂ aufgenommen und für 24 h bei 4 °C inkubiert, mit 0,5 ml Glycerin und 2,5 ml 100 mM CaCl₂ versetzt und in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Hitzeschocktransformation

Es wurden 1-5 µl des jeweiligen Ligationsansatzes zu den kompetenten Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock (45 sek bei 42° C) und eine sofortige Inkubation auf Eis für ca. 2 Minuten. Nach einer Zugabe von 300 ml LB-Medium und 15 µl Sucrose (20%) wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37° C schüttelnd inkubiert und danach auf LB-Agarplatten mit dem selektivem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Bei Verwendung des Alligator-DNA-Ligations-Kits (Fa. Genaxxon, Stafflangen, Deutschland) erfolgte die Transformation hitzekompetenter Bakterien gemäß der Anleitung.

2.3 Arbeiten mit humanen Zellen

2.3.1 Allgemeines

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (Thermo Scientific, MSC Advantage) mit Einmal-Kunststoffkulturschalen (Fa. Corning, NY, USA) durchgeführt.

Alle Medien, Lösungen und Supplemente, die nicht bereits steril erworben wurden, wurden für die Zellkultur mit einem an eine Vakuumpumpe angeschlossenes 0,2 µm Filtermembran-filtrationssystem (Stericup, Fa. Millipore, Bedford, USA) oder mit 0,2 µm Spritzenfilter sterilisiert.

2.3.2 Isolierung und Kultur primärer humaner Makrophagen

Primäre humane Makrophagen wurden wöchentlich frisch aus peripherem humanem Blut isoliert. Buffycoats wurden freundlicherweise von Frank Bentzien, Institut für Transfusionmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf gestellt. Die Blutentnahme wurde mit 50 ml-Spritzen vorgenommen, in die zuvor je 1000 µl (= 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 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 460 x g (Eppendorf Centrifuge 5810 R) aufgetrennt. Die Leukozyten wurden abpipettiert, jeweils 2 Proben vereinigt und mit kaltem RPMI 1640 (Fa. PromoCell, Heidelberg) auf 50 ml aufgefüllt. Danach erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4°C und 460 x g. Nach dieser Zentrifugation wurden die Zellen mit kaltem RPMI 1640 gewaschen, erneut 2 Proben vereinigt, mit kaltem RPMI 1540 auf 50 ml aufgefüllt und wie beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurde der Waschschrift wiederholt. Die Zellen wurden in je 1 ml kaltem RPMI 1640 aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 2 Minuten bei 4°C und 400 x g (Eppendorf Centrifuge 5417 R) zentrifugiert. Die Sedimente wurden in je 400 µl Monopuffer (PBS mit 5 mM EDTA pH 7,4, 0,5% humanes Serumalbumin) resuspendiert, 100 µl mit anti-CD14-Antikörper gekoppelte Magnetkugeln (Fa. Miltenyi, Bergisch Gladbach) zugegeben, vorsichtig gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Säulen mit 500 µl kaltem Monopuffer äquilibriert und ein 50 ml-Röhrchen mit 15-20 µl kaltem RPMI 1640 vorbereitet. Die oben genannte Suspension wurde anschließend auf die Säule gegeben, diese mit 500 µl Monopuffer gewaschen und die isolierten Monozyten mit 1 ml Monopuffer in das vorbereitete Röhrchen eluiert. Anschließend erfolgte eine 10minütige Zentrifugation bei 460 x g und 4°C. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 40 ml RPMI aufgenommen und in einer Neuenbauer Zählkammer (Fa. Marienfeld, Lauda-Königsfeld) unter Verwendung eines Mikroskops (Nikon Eclipse TS100) gezählt. Anschließend wurden die Zellen auf 6-*well* Platten (Sarstedt, Newton, USA) mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen je *well* ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen wurde das RPMI mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und je *well* 2 ml Kulturmedium (RPMI 1640 mit 100 µg/µl Penicillin/Streptavidin und 20% Humanserum) hinzugefügt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Heraeus Instrument). Alle 3-4 Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

Zur Präparation und Kultivierung verwendete Lösungen und Medien:

Heparin (Fa. Braun, Melsungen)

Ficoll (Fa. PromoCell, Heidelberg)

RPMI 1640 (Fa. PromoCell, Heidelberg)

Monopuffer (5mM EDTA pH 7,4; 0,5% Humanserumalbumin in PBS)

Kulturmedium: RPMI mit 20% Humanserum und 1% Penicillin

2.3.3 Ablösung adhärenter primärer humaner Makrophagen

Die Zellen wurden nach Absaugen des Kulturmediums einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Alfazyme (Fa. PAA, Pasching, Österreich) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Alfazyme-Aktivität wurde durch die Zugabe der doppelten Menge Kulturmedium gestoppt und die Zellen danach mittels Zentrifugation für 5 Minuten bei 460 x g und RT (Eppendorf Centrifuge 5810 R) sedimentiert und für nachfolgende Versuche verwendet.

2.3.4 Transfektion primärer humaner Makrophagen

Primäre humane Makrophagen wurden mit Hilfe des Microporator-Systems der Firma Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland) transfiziert.

Für die transiente Transfektion wurden die in Tabelle 2.1 angegebenen Parameter eingestellt. Die Transfektion wurde laut Herstellerangaben im 10 µl- („MP-10“), bzw. 100 µl- („MP-100“) Maßstab durchgeführt. Für die Transfektion von 1×10^5 Zellen wurden 0,5 µg DNA, für 1×10^6 Zellen 5 µg DNA eingesetzt. Die optimale DNA-Menge musste für jedes Konstrukt individuell ermittelt werden.

Tabelle 2.1 Für die Transfektion von Makrophagen verwendete Einstellung des Microporator-Systems

Parameter	
Pulsintensität	1000 V
Pulslänge	40 ms
Anzahl Pulse	2

2.4 Mikroskopische Methoden

2.4.1 Fixierung und Permeabilisierung

2.4.1.1 Formaldehyd/Aceton

Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden für 10 min in 3,7 % [v/v] Formaldehyd in PBS bei RT fixiert. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch Inkubation in eiskaltem Aceton bei -20°C. Um restliches Aceton abzutrennen wurden die *coverslips* abschließend in PBS gewaschen.

2.4.1.2 Methanol

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

2.4.1.3 Cytoskelfix

Cytoskelfix konserviert feine molekulare Strukturen, wie z.B. Mikrotubuli, besonders gut. Daher wurden Zellen, die für die Färbung von Mikrotubuli verwendet wurden, mit Cytoskelfix (Fa. Cytoskeleton Inc., Denver, USA) behandelt.

Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden 4 Minuten in eiskaltem Cytoskelfix bei -20°C fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Danach wurden die *coverslips* sofort in PBS gewaschen, um das restliche Methanol zu entfernen.

2.4.2 Färbung mittels spezifischer Antikörper

Die Immunfluoreszenzfärbung der fixierten und permeabilisierten Zellen erfolgte in einer feuchten Kammer. Zu diesem Zweck wurde in einer Plastikpetrischale eine Lage Parafilm (Fa. American National Can, Chicago, IL, USA) auf einem mit Wasser befeuchteten Zellstofftuch platziert und 30 µl der vorbereiteten Antikörperlösung darauf pipettiert. Auf diese Weise konnte die Menge des eingesetzten Antikörpers so gering

wie möglich gehalten und die Verdunstung eingeschränkt werden. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten auf die vorpipettierte Lösung gegeben.

Die Färbung selbst erfolgte in drei Schritten. Zuerst erfolgte die Inkubation der Zellen mit PBS + 1% [w/v] BSA (Bovines Serumalbumin), 5% [v/v] NGS (normales Ziegen Serum (*normal goat serum*)) und 5% [w/v] NHS (normales Humanserum (*normal human serum*)). Auf diese Weise wurden unspezifische Bindungen abgesättigt. Nach einem Waschschrift mit PBS + 1% [w/v] BSA wurden die Zellen für 45 min bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert. Falls mehrere Proteine detektiert werden sollten, wurden die entsprechenden primären Antikörper sukzessive in mehreren Inkubationsschritten auf die Zellen gegeben. Durch dreimaliges Waschen mit PBS + 1% [w/v] BSA wurden nichtgebundene primäre Antikörpermoleküle von den Deckgläschen entfernt. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem bzw. den sekundären Antikörper(n) für 30 min bei RT. Die Färbung von F-Aktin erfolgte durch die Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin zeitgleich mit dem (den) sekundären Antikörper(n). Nach diesem Färbeschritt wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS + 1% [w/v] BSA gewaschen und anschließend auf einem Objektträger in Mowiol eingebettet. Dazu wurden 4 µl auf 37 °C vorgewärmtes Mowiol auf den Objektträger pipettiert und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf den Mowioltropfen gelegt. Mowiol enthält *p*-Phenylendiamin, welches als Antibleichmittel wirkt. Abschließend wurden die Deckgläschen mit Nagellack auf dem Objektträger versiegelt und fixiert.

Tabelle 2.2 Verwendete primäre Antikörper

Antigen	Donorspezies	Hersteller/bezogen von
Aktin	Maus	Chemicon
flag	Kaninchen	Sigma
GFP	Maus	J. Faix
HA	Maus	Cell Signaling
KIF1C	Kaninchen	Cytoskeleton
KIF9	Kaninchen	E. Schecklies
LAMP1	Maus	Santa Cruz
myc	Maus	R. Gräf
Myosin IIA	Kaninchen	Sigma
MLCK	Maus	Sigma
phosphorylierte MLC	Kaninchen	Abcam
Rab6a	Maus	Abcam

Antigen	Donorspezies	Hersteller/bezogen von
Reggie-1	Maus	BD
TGN 46	Schaf	AbD Serotec
α -Tubulin	Maus	Sigma
Tubulin (acetyliert)	Maus	Sigma
Tubulin (tyrosiniert)	Maus	Sigma
γ -Tubulin	Maus	Sigma
Supervillin	Kaninchen	E. Luna

Tabelle 2.3. Verwendete sekundäre Antikörper

gekoppelter Farbstoff	Isotyp	aus Spezies	gerichtet gegen	Hersteller
Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Ziege	Kaninchen	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Ziege	Maus	Molecular Probes
Alexa Fluor® 568	IgG (H+L)	Ziege	Kaninchen	Molecular Probes
Alexa Fluor® 568	IgG (H+L)	Ziege	Maus	Molecular Probes
Alexa Fluor® 647	IgG (H+L)	Ziege	Kaninchen	Molecular Probes
Alexa Fluor® 647	IgG (H+L)	Ziege	Maus	Molecular Probes

2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse fluoreszenzmarkierter Zellpräparate erfolgte mittels des konfokalen *laser scanning* Mikroskops Leica TCS SP5 (Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland).

Die Bildverarbeitung erfolgte anhand der Programme „imaging“ (Fa. Microsoft, Seattle, USA), „imageJ“ (National Institutes of Health, Washington, USA) und „Photoshop“ (Fa. Adobe, San Jose, USA).

2.4.4 *Live cell* Mikroskopie

In vivo-Aufnahmen von primären humanen Makrophagen wurden mit Hilfe der konfokalen „spinning disc“-Systeme *UltraView Confocal Live Cell Imaging* (Fa. Perkin Elmer, Wellesley, USA) und *Spinning disc CSU22* (Yokogawa, Japan) durchgeführt. Bei den verwendeten Mikroskopen handelte es sich um das inverse Mikroskop Eclipse TE300 der Firma Nikon (Düsseldorf, Deutschland) bzw Axiovert 200M der Firma Zeiss

(Jena, Deutschland). Die an das Mikroskop angeschlossene Inkubationskammer Modell Incubator Controller (EMBL, Heidelberg) bzw. der Firma Solent Scientific (Regensworth, UK) sorgte für eine konstante Inkubation der beobachteten Zellen bei 37°C und 5% CO₂. Die Aufnahme und Erstellung der Filme erfolgte mit der UltraView Software Version 5.5.0.2 von Perkin Elmer bzw Volocity (Improvision, Coventry, UK).

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^4 auf *Glass Bottom μ -Dishes* der Firma ibidi (Martinsried, Deutschland) pro Schälchen ausgesät. Zuvor erfolgte die Transfektion mit dem gewünschten GFP-, mRFP- oder pTagRFP-Konstrukt wie unter Punkt 2.3.4. beschrieben.

2.4.5 TIRFM (*total internal reflection fluorescence microscopy*)

Die TIRF-Mikroskopie wird zur Untersuchung von Strukturen genutzt, die sich sehr nahe (ca. 200 nm für sichtbares Licht) an Oberflächen befinden. Bei klassischer Fluoreszenzmikroskopie würde das oberflächennahe Signal vom Hintergrundstreulicht überdeckt. Die TIRF-Mikroskopie der mittels *FACS* separierten KIF1C-Vesikel wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Michael Sixt (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) übernommen.

2.4.6 FACS (*fluorescence activated cell sorting*)

Die Sortierung der GFP-fusionierten Vesikel aus transfizierten primären humanen Makrophagen wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Michael Sixt (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) mit Hilfe des BD FACS Aria *cell-sorting* Systems der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden primäre humane Makrophagen mittels Microporator-System (s. Punkt 2.3.4.2.) entweder mit GFP-KIF1C oder GFP-HAX-1 transfiziert und 6 h kultiviert.

Nach der Expressionszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 200 μ l Lysepuffer (20 mM HEPES pH 7,5; 300 mM Sucrose, 5 mM MgCl₂; 5 mM EDTA; protease inhibitor) lysiert. Die lysierten Zellen wurden danach mit Hilfe eines Glaspistills (Fa. Glas-Col, Terre Haute, USA) vollständig aufgeschlossen. Nach 5-minütiger Zentri-

fugation bei 2000 rpm und 4°C wurde der Überstand mit den GFP-markierten Vesikeln in ein neues Eppendorfggefäß überführt und danach mit Hilfe des BD FACSAria *cell-sorting* Systems in 300 mM Sucrose sortiert. Die GFP-positiven Vesikel wurden anschließend 45 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µl abgenommen und als Kontrolle verwendet. Die im Eppendorfggefäß verbleibenden 100 µl enthielten die GFP-markierten Vesikel und dienten als spezifische Probe. Beides wurde anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert.

2.4.7 Beschichtung von Deckgläschen mit fluoreszenzmarkierter Gelatine

Gelatine (aus Schwein, ROTH, Karlsruhe, Deutschland) wurde mit NHS-Rhodamin (ThermoScientific, Rockford, IL) nach Chen *et al.* (1996) markiert. Um den Effekt auf den Matrix-Abbau unterschiedlich transfizierter primärer humaner Makrophagen zu untersuchen wurden Deckgläschen mit Rhodamin-markierter Gelatine beschichtet. Es wurde eine 2% ige Sucroselösung (in PBS) in Rhodamin-markierter Gelatine hergestellt und 30 µl davon je Deckgläschen auf Parafilm vorgelegt. Nach einer 15-minütigen Inkubation (im Dunkeln bei Raumtemperatur) erfolgte eine weitere Inkubation der Deckgläschen in 0,5% Glutaraldehyd (in H₂O) auf Eis (15 Minuten, im Dunkeln). Nach 3x waschen in PBS folgte eine Inkubation in 70% igem Ethanol (15 Minuten bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Deckgläschen 15 Minuten in RPMI, danach 2x 15 Minuten in RPMI mit 20 % Humanserum inkubiert (jeweils bei 37 °C und 5 % CO₂). Mit siRNA transfizierte Zellen wurden mit einer Dichte von 8×10^5 auf die beschichteten Deckgläschen ausgesät und nach einer Inkubationszeit von 5 h fixiert.

Die Auswertung des Matrix-Abbaus erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Die Fluoreszenzintensität von nicht-abgebauter Gelatine wurde auf 100% gesetzt und die Reduktion der Fluoreszenzintensität diente als Nachweis des Matrix-Abbaus. Die Laserintensität wurde zwischen den einzelnen Messungen nicht verändert, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Für jeden Wert wurden 3 x 30 Zellen ausgezählt und mit Excel software ausgewertet. Unterschiede zwischen den einzelnen Werten wurden mit Hilfe des Student's T-Test ausgewertet, dabei wurde ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant und ein p-Wert < 0,01 als hoch signifikant angesehen.

2.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1 Arbeiten mit DNA

2.5.1.1 Plasmide

Bei den verwendeten eukaryontischen Expressionsplasmiden für GFP bzw. RFP-Fusionsproteine handelte es sich um pEGFP-N1, pEGFP-C1 (Clontech, vertrieben über BD Biosciences, Palo Alto, USA) und pTagRFP-N (Fa. Evrogen, Moskau, Russland), sowie das psiSTRIKE U6 hairpin Cloning System (human)-hMGFP Expressionsvektor für RNAi-*knockdown* Versuche (Fa. Promega, Madison, USA).

Eine Auflistung der freundlicherweise von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellten Konstrukte ist in Tabelle 2.4 zu finden.

Tabelle 2.4 Verwendete Konstrukte von Kooperationspartnern

Konstrukt	Insert	Vektor	tag	Spezies	Herkunft
GFP-Rab6a	Wildtyp	pEGFP-C1	GFP	Mensch	M. Scidmore
GFP-Rab8	Wildtyp	pEGFP-C1	GFP	Krallenfrosch	D. Sheff
GFP-Rab11b	Wildtyp	pEGFP-C2	GFP	Maus	M. Scidmore
GFP-Rab14	Wildtyp	pEGFP-C1	GFP	Ratte	R.Scheller
GFP-HAX1	Wildtyp	pEGFP-C2	GFP	Mensch	D. Lees/ J. Marshall
flag-HAX1	Wildtyp	pRK5-myc	myc	Mensch	D. Lees/ J. Marshall
myc-HAX1	Wildtyp	pFlagCMV2	flag	Mensch	D. Lees/ J. Marshall
GFP-Supervillin	Wildtyp	pEGFP-C1	GFP	Rind	E. Luna
mVenus-Sec22b	Wildtyp	pmVenus-C1	Venus	Mensch	K. Hatsuza- wa
mRFP-Supervillin	Wildtyp	pmRFP-N1	RFP	Rind	E. Luna
GFP-SV Δ 343-570	Wildtyp ohne AS 343-570	pEGFP-C1	GFP	Rind	E. Luna
GFP-SV343-570	AS 343-570	pEGFP-C1	GFP	Rind	E. Luna
GFP-SV1-174	AS 1-174	pEGFP-C1	GFP	Rind	E. Luna
GFP-SV570-830	AS 570-830	pEGFP-C1	GFP	Rind	E. Luna
GFP-SV1-830	AS 1-830	pEGFP-C1	GFP	Rind	E. Luna
GFP-SV830-1792	AS 830-1792	pEGFP-C1	GFP	Rind	E. Luna

Konstrukt	Insert	Vektor	tag	Spezies	Herkunft
GFP-SV1010-1792	AS 1010-1792	pEGFP-C1	GFP	Rind	E. Luna
GFP-SV171-1792	AS 171-1792	pEGFP-C1	GFP	Rind	E. Luna
GFP-SV1-1445	AS 1-1445	pEGFP-C1	GFP	Rind	E. Luna
GFP-SV1-1570	AS 1-1570	pEGFP-C1	GFP	Rind	E. Luna
mRFP-SV1-1445	AS 1-1445	pmRFP-N1	RFP	Rind	E. Luna
mRFP-SV1-1570	AS 1-1570	pmRFP-N1	RFP	Rind	E. Luna
Reggie-1-GFP	AS 1-428	pEGFP-N1	GFP	Ratte	R. Tikkanen
Reggie-2-GFP	Wildtyp	pEGFP-N1	GFP	Ratte	M. Langhorst

2.5.1.2 Plasmidisolierung

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte mit dem „QIA[®] Spin Miniprep Kit“ (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers.

Für die Durchführung von Transfektionsversuchen wurden Endotoxin-freie Plasmid-Präparationen verwendet. Die Präparation Endotoxin-freier Plasmide erfolgte mit dem „Endofree[®] Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Dadurch wurden aus der Bakterienmembran stammende Endotoxine entfernt. Die Durchführung erfolgte gemäß Anleitung des Herstellers.

2.5.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA.

1 % [w/v] Agarose (Biozym LE GP Agarose, Fa. BiozymScientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) wurde in 0,5 x TBE Elektrophoresepuffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA) gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die flüssige Agarose-lösung wurde

in einen Elektrophoresetank (Sub-Cell GT Agarosegelelektrophoresesystem, Fa. Bio-Rad, München, Deutschland) gegeben und nach dem Erkalten mit 0,5 x TBE Puffer übergossen. Aufzutragende DNA-Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer (0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 0,25 % [w/v] Xylencyanol, 30 % [v/v] Glycerol, 50 mM EDTA) versetzt und in die Taschen des Agarosegels gegeben. Für die Ermittlung der Größe und der ungefähren Konzentration der DNA wurden zusätzlich 5 µl Smart-Ladder (Fa. Peq-

Lab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-110 Volt. Zur Visualisierung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA wurde das Gel mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt (UV-Illuminator Model N90M; Fa. UniEquip, Martinsried, Deutschland). Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer digitalen Kamera (Canon PowerShot S5Is, 8,0 MP, Fa. Canon, Tokyo, Japan).

2.5.1.4 DNA-Isolierung mittels Gelelution

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, erfolgte mit dem „QIAquick™ Gel-Extraction Kit“ der Firma Qia-gen (Hilden, Deutschland) nach der Anleitung des Herstellers.

2.5.1.5 DNA-Restriktionshydrolyse

Der enzymatische Verdau mit Typ II Restriktionsendonukleasen wurde zur Vorbereitung von Insert- und Vektor-DNA für die Ligation sowie zur Kontrolle von Vektoren eingesetzt. Die Menge der eingesetzten DNA betrug ca. 100-200 ng bei einem Gesamtvolumen des Ansatzes von 20 µl. Das optimale Ionen- und pH-Milieu wurde spezifisch für das oder die jeweils eingesetzten(n) Enzym(e) durch die Wahl des entsprechenden Restriktionspuffers gewährleistet. Das Endvolumen wurde durch die Zugabe von H₂O_{dd} erreicht. Für den präparativen Restriktionsverdau, z. B. für eine anschließende Aufreinigung per Gelelution, wurde das Volumen auf 40-100 µl erhöht.

Tabelle 2.5 Allgemeiner Reaktionsansatz zum Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen.

Substanz	Menge
DNA	100 – 200 ng
10 x Puffer	5 µl
Restriktionsenzym 1	1 µl
ggf. Restriktionsenzym 2	1 µl
H ₂ O _{dd}	ad 50 µl

Bei der Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen wurde entweder ein simultaner Verdau unter kompatiblen Pufferbedingungen durchgeführt oder, falls eine

Inkompatibilität bestand, ein sequentieller Verdau. In diesem Fall wurde die DNA nach dem ersten Verdau mittels „QIAquickTM PCR Purification Kit“ (Fa. Quiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

Restriktionshydrolysereaktionen wurden für 1h bei der für das jeweilige Restriktionsenzym vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur durchgeführt.

2.5.1.6 Ligation

Für die Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor wurden Zielvektor und Insert mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, so dass kompatible Schnittstellen entstanden. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung per Gelelution. Zur Ligation wurden 50 ng des geschnittenen und aufgereinigten Vektors und 250-500 ng des präparierten DNA-Fragments eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden mit Hilfe des Alligator-Kits (Fa. Genaxxon GmbH, Stafflangen, Deutschland) oder der T4-Ligase (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) nach den jeweiligen Herstellerangaben prozessiert, in hitzekompetente *E. coli*-Bakterien transformiert, in 300 µl LB-Medium mit 1 % Glucose 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und auf LB-Agarplatten mit dem selektivem Antibiotikum ausplattiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht.

2.6 PCR-Reaktionen

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte. Sie wurde mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide („Primer“) im Thermocycler (Mastercycler gradient, Fa. Eppendorf, Hamburg; Primus 25 advanced, Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Die Temperatur des Annealing-Schrittes und die Dauer der Extension wurden jeweils an die verwendeten Oligonukletid-Paare beziehungsweise an die Länge der zu amplifizierenden DNA angepasst.

2.6.1 Oligonukleotide

Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide:

Name	Zielvektor	Sequenz (5'-3')
9Bgl II-Spez	KIF9 bluescript	ctg gta caa tag atc ttt tgt cat ccc tg
9S_BamHI	KIF9 bluescript	cga tga ggt tgg atcctc tat gtg cc

Zur Sequenzierung und für Bakterien-PCR verwendete Oligonukleotide:

Name	Bindungsort	Zielvektor	Sequenz (5'- 3')
EGFP-N1-f	<i>upstream</i> der MCS	EGFP-N1	gca gag ctg gtt tag tga acc g
EGFP-N1-r2	<i>downstream</i> der MCS	EGFP-N1	cgtc gcc cgc gtc cag ctc gac cag
EGFP-C1-f	<i>upstream</i> der MCS	EGFP-C1	atc act ctc ggc atg gac
EGFP-C1-r	<i>downstream</i> der MCS	EGFP-C1	tct aca aat gtg gta tgg c
TagRFP-F2	<i>upstream</i> der MCS	ptagRFP	cag acc atg aga atc aag g
TagRFP-R2	<i>downstream</i> der MCS	ptagRFP	gat ctt gac gtt gta gat g
mCherry-r	<i>downstream</i> der MCS	EGFP-N1	ctc ggc gcg ttc gta ctg ttc
KIF9-f	<i>upstream</i> der MCS	EGFP-N1	agt att gcc agc acc tag

Für RT-PCR verwendete Oligonukleotide:

Name	Bindungsort	Sequenz (5'- 3')
3- β -Aktin	1161-1142 in β -Aktin	att tgc ggt gga cga tgg ag
5- β -Aktin	716-735 in β -Aktin	aga gat ggc cac ggc tgc tt
SV2-f	3547-3569 in Supervillin	aa gaa gtc aca tta gca caa cg
SV2-r	4071-4094 in Supervillin	gtg ctc acc atg aac ttc cac ttg

2.6.2 Standard-PCR

Standard-Reaktionsansatz

Substanz	Menge
10x Reaktionspuffer	5 μ l
dNTP-Mix	1 μ l (200 μ M)
<i>forward</i> -Primer	0,5 μ l (100 pmol)
<i>reverse</i> -Primer	0,5 μ l (100 pmol)
DNA- <i>template</i>	100 ng
Taq-Polymerase	2 U pro Ansatz
H ₂ O _{dd} , steril	ad 50 μ l

Standard-PCR-Protokoll

Schritt	Dauer
1. Denaturierung (95-98°C)	0,5 - 5 min
2. Denaturierung (95-98°C)	0,5 - 1 min
3. Annealing (55-72°C)	0,5 min
4. Elongation (72°C)	0,5 min / 1 kbp
5. 30-40 Zyklen der Schritte 2-4	
Finale Extension (72°C)	10 min

2.6.3 Bakterien-/Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Bakterien-PCR ist es möglich, positive Klone direkt mittels PCR-Analyse zu identifizieren, ohne zuvor Plasmid-DNA isolieren zu müssen.

Pro kultivierter LB-Platte wurden 10-15 Klone mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 15 µl sterilem H₂O_{dd} resuspendiert. 5 µl der Bakteriensuspension wurden in 5 ml LB-Medium (mit selektivem Antibiotikum) überführt. Die übrige Menge wurde bei einer Temperatur von 95°C gekocht, um den Zellaufschluss zu gewährleisten. Die freigesetzte Plasmid-DNA wurde direkt für die PCR eingesetzt.

Reaktionsansatz für Bakterien-PCR

Substanz	Menge
10x Reaktionspuffer	5 µl
dNTP-Mix	1 µl (200 µM)
<i>forward</i> -Primer	0,5 µl (100 pmol)
<i>reverse</i> -Primer	0,5 µl (100 pmol)
DNA- <i>template</i>	100 ng
Taq-Polymerase	2 U pro Ansatz
H ₂ O _{dd} , steril	ad 50 µl

2.6.4 Reverse Transkriptase-PCR

Reaktionsansatz für Reverse Transkriptase-PCR

Substanz	Menge
Reaktionspuffer	5 μ l
dNTP-Mix	3 μ l (200 μ M)
<i>forward</i> -Primer	1 μ l (100 pmol)
<i>reverse</i> -Primer	1 μ l (100 pmol)
cDNA	2 μ l
Deep Vent Polymerase	1 μ l pro Ansatz
H ₂ O _{dd} , steril	ad 50 μ l

2.6.5 Mutagenese

Punktmutationen in eukaryotischen Expressionvektoren wurden mit Hilfe des Quik-ChangeTM Mutagenesis Kits (Fa. Stratagene, La Jolla, USA) nach Herstellerangaben eingeführt.

2.6.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem „QIAquickTM PCR-Purification Kit“ oder per Gelelektion mit dem „QIAquickTM Gel-Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

2.7 Arbeiten mit RNA

2.7.1 Allgemeines

Für alle Arbeiten mit RNA wurden peqGOLD SafeGuardTM Pipettenspitzen verwendet. Sämtliche Arbeitsflächen und Geräte wurden mit 0,5 M NaOH behandelt, um RNase Kontaminationen zu vermeiden.

2.7.2 Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA

Gesamt-RNA wurde mittels Trizol (Invitrogen, Oregon, USA) isoliert. Die Zellen wurden 1x mit PBS (Invitrogen, Oregon, USA) gewaschen und mit 1 ml PBS lysiert. Nach Zentrifugation (10,000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde das Pellet in 1 ml Trizol homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 200 µl Chloroform zugegeben, kräftig per Hand geschüttelt und 2-3 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (12,000 rpm, 15 min, 4 °C) wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt, 500 µl Isopropanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugefügt und 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (12,000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und 1 ml 75 % Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugefügt und mittels Vortexer gemischt. Nach Zentrifugation (7,500 rpm, 5 min, RT) wurde der Ethanol abgenommen, die RNA in 30 µl DEPC-behandeltem Wasser (Invitrogen, Oregon, USA) aufgenommen und bei 55 °C für 10 min inkubiert, um die RNA sicher aufzunehmen. Eine längerfristige Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.7.3 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 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.

2.7.4 RNA-Interferenz (RNAi)

Vektorkodierte siRNA wurde mit Hilfe des psiSTRIKE™ U6 hairpin Cloning System hMGFP (Fa. Promega, Madison, USA) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden nach Herstellerangaben geeignete Oligonukleotide entworfen und in den psiSTRIKE-Vektor eingesetzt. Dieser Vektor kodiert zusätzlich für (human)-hMGFP, wodurch eine Identifikation und Lokalisation transfizierter Zellen gewährleistet wird. Die Transfektion primärer humaner Makrophagen mit vektorkodierter siRNA erfolgte mit dem Micropora-

tor-System (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) (s. 2.3.4.2.). Es wurden 5 µg vektorkodierte siRNA pro 1 Mio. Zellen eingesetzt. Zur Kontrolle wurde eine unspezifische Sequenz (*scrambled sequence*) transfiziert.

Der *knock-down* von zellinternem KIF9, Reggie-1/-2 und Myosin IIA erfolgte mittels siRNA der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland), *knock-down* von Supervillin und Gelsolin mittels stealth siRNA der Firma Invitrogen. Für die Transfektion mit dem Microporator-System (MP-100) wurden 5 µl 20 µM siRNA pro 1 Mio. primärer humaner Makrophagen eingesetzt. Als unspezifische Kontrolle diente Luciferase siRNA, da dieses Protein in humanen Zellen nicht exprimiert wird.

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 vorkommt. Der Abbau der mRNA eines Zielproteins und die damit verbundene Reduktion der Proteinmenge wird durch sog. „*small interfering RNAs*“, kurz siRNAs, vermittelt (Hannon, 2002; Tijsterman *et al.*, 2002; Tuschl, 2001).

Tabelle 2.6 Für *knock-down*-Versuche eingesetzte Oligonukleotide und Sequenzen

Name	Sequenz (5'-3')
shRNA-KIF9-scr-f	acc ggt acc taa atc caa aga att caa gag att ctt tgg att tag gta cct ttt
shRNA-KIF9-f	acc gga gag gag ttg tca ata att caa gag att att gac aac tcc tct cct ttt
STRIKE_SV_OligoA	acc gcc cgc agc gtg gat tat aat ata agt tct cta tat tat aat cca cgc tgc ggg ctt ttt c
STRIKE_SV_OligoB	tgc aga aaa agc ccg cag cgt gga tta taa tat aga gaa ctt ata tta taa tcc acg ctg cgg g
shRNA-SV_scr_1	acc gcg ttc tcg gaa cga agc aat tta agt tct cta aat tgc ttc gtt ccg aga acg ctt ttt c
shRNA-SV_scr_2	tgc aga aaa agc gtt ctc gga acg aag caa ttt aga gaa ctt aaa ttg ctt cgt tcc gag aac g
siRNA-KIF9	cag gac ttg gtt tat gag aca
siRNA-Reggie-1	guu cau ggc aga cac caa g
siRNA-Reggie-2	cac acu gac ccu caa ugu c
SV-stealth (siRNA)	cag cca uaa gga auc uaa aua ugc u
Gelsolin_stealth (siRNA)	cag uuc uau gga ggc gac agc uac a
siRNA_MyoIIA	gau cug aac ucg uuu gag ctt

Name	Sequenz (5'-3')
unspez. Kontrolle (Luciferase; siRNA)	agg uag ugu aac cgc cuu gtt

2.8 Arbeiten mit Proteinen

2.8.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BIORAD Protein Assay, das auf der Methode nach Bradford (1976) beruht.

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 eingesetzt.

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden zu 800 µl Probe (Proteinstandard in der oben angegebenen Konzentration) 200 µl *Dye Reagent Concentrate* gegeben. Als "Leerwert" wurden 800 µl Puffer eingesetzt. Die so entstandenen Lösungen wurden mit Hilfe des Vortex-Gerätes gemischt. Nach einer Inkubationsdauer von 5 min bis 1 h erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm. Die Standardwerte der BSA-Proben wurden gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen und dienten als Eichgerade. Aus der Eichgerade ließen sich dann die Proteinkonzentrationen ablesen.

2.8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurden die Proben mit Probenpuffer nach Laemmli (0,5 M Tris-HCL, 20 % Glycerin, 8 % [w/v] SDS, 10 % [v/v] Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Auftragsmenge betrug je nach Gelgröße 30, bzw. 60 µl. Auf jedes Gel wurde zusätzlich eine Spur eines Größenstandards (10 µl, *peqGOLD Prestained Protein-Marker III*; Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) aufgetragen, um die Größe der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können (5 bzw. 15 µl, je nach Gelgröße).

Die Gelelektrophorese erfolgte bei konstant 100 V (kleines Gel) oder bei konstant 45 mA (großes Gel).

2.8.3 Molekulargewichtsbestimmung

Zur Abschätzung der molekularen Masse der aufgetrennten Proteine wurden die Laufstrecken der Markerproteine vom oberen Rand des Trenngels gemessen und gegen den Logarithmus der molekularen Massen aufgetragen. Die apparenten molekularen Massen der zu bestimmenden Proben wurden aus der so erhaltenen Eichkurve abgelesen.

2.8.4 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.

2.8.5 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% $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für je 20 s in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ wurden die Gele 20 min imprägniert (Imprägnierlösung: 0,2 % [w/v] 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] $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, 1 % [v/v] Thiosulfatlösung, 0,1 % [v/v] Formaldehyd) an. Sobald die Proteine deutlich zu sehen waren, wurde die Entwicklung mit 0,186 % [w/v] EDTA gestoppt.

2.8.6 Western blot

Diese Methode diente dem immunologischen Nachweis von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen. Der Transfer vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Fa. Pall, Portsmouth, Großbritannien) erfolgte nach dem Tankblot-Verfahren (Tankblotkammer Modell EB10, Fa. Scie-Plas, Gainsborough, Großbritannien). Zum Äquilibrieren der Membran wurde diese für wenige Sekunden in 100 % Methanol geschwenkt und anschließend für 10 min bei RT in *Blotting*-Puffer (25 mM Tris-Base, 96 mM Glycin) mit 20 % Methanol inkubiert. Die Membran, das Gel und das Filterpapier

(Fa. Whatman, Maldstone, USA) wurden direkt vor Gebrauch in *Blotting*-Puffer getränkt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei konstant 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, Deutschland) und 5 % Magermilchpulver (Fa. Biorad, München, Deutschland) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde die Membran für 1 h in TBST geschwenkt, dem der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:2000 zugesetzt worden war. Nicht gebundene und nichtspezifisch gebundene primäre Antikörper wurden durch dreimaliges 10-minütiges Waschen mit TBST entfernt. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit HRP-gekoppelten Antikörpern (Fa. Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) in TBST inkubiert. Nach weiterem dreimaligem 10-minütigen Waschen wurde die Membran für 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 (zeitlich der Stärke des Signals entsprechendes) Auflegen eines Röntgenfilmes (Fa. Kodak AG, Stuttgart, Deutschland) dokumentiert.

2.8.7 Nachweis von Proteinen durch Massenspektrometrie

Zur Bestimmung möglicher Interaktionspartner von GFP-fusionierten Konstrukten wurden Lysate nach GFP-Immunpräzipitation (s. 2.5.8.3) nach Proteingrößen auf einem SDS-Gel (s. 2.5.2) aufgetrennt und anschließend mittels Silberfärbung (s. 2.5.5) gefärbt. Das Ausschneiden und analysieren der Banden übernahm freundlicherweise Dr. Marcus Krüger (Max-Planck-Institut für Herz-und Lungenforschung, Bad Nauheim).

2.8.8 Interaktionsstudien

2.8.8.1 Herstellung von Zellysaten aus primären humanen Makrophagen

Primäre humane Makrophagen wurden zweimal mit PBS (Dulbecco's PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , Fa. PAA; Linz, Österreich) gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers (Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz) in 600 μl entsprechendem Lysepuffer vom Kulturgefäß entfernt. Die Zusammensetzung des Lysepuffers variierte je nach zu präzipitierendem Protein. Der Zellaufschluss erfolgte durch 30-minütige Inkubation in detergenshaltigem

Lysepuffer bei 4°C. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 3500 x g bei 4°C wurden Zelltrümmer entfernt und der Überstand in Immunpräzipitationsversuchen eingesetzt.

2.8.8.2 GFP-Immunpräzipitation

Zur Präzipitation von in primären humanen Makrophagen synthetisierten GFP-Fusionsproteinen wurde das *µMACS GFP Tagged Protein Isolation Kit* der Firma Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 500 µl Lysepuffer (150 mM NaCl, 1 % Igepal CA-630, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 50 mM Tris HCl (pH 8,0) mit Complete Mini protease inhibitor) lysiert und anschließend für 30 min bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 10,000 rpm für 10 min bei 4 °C. Zum Überstand wurden 50 µl anti-GFP Magnet-*beads* gegeben und für 30min bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. *µMACS*-Säulen wurden im *µMACS*-Multi-Ständer mit 200 µl Lysepuffer äquilibriert und das Gemisch aus Zell-Lysat und Magnet-*beads* darauf gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen, die Säulen wurden dann viermal mit je 200 µl Waschpuffer 1 (150 mM NaCl, 1 % Igepal CA-630, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 50 mM Tris HCl (pH 8,0)) und einmal 100 µl Waschpuffer 2 (20 mM Tris HCl (pH 7,5)) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 µl 95 °C heißem SDS-Puffer nach Laemmli.

3 Ergebnisse

3.1 KIF1C

3.1.1 Aufreinigung KIF1C-GFP markierter Vesikel mittels FACS

Arbeiten aus dem eigenen Labor zeigten, dass Podosomen auf zahlreiche Weise reguliert werden. Wichtige Rollen spielen WASP (Hufner *et al.*, 2001; Linder *et al.*, 1999), der Arp2/3-Komplex (Linder *et al.*, 2000a), RhoGTPasen (Linder *et al.*, 1999; Osiak *et al.*, 2005) und PAK4 (Gringel *et al.*, 2006). Auch Mikrotubuli sind maßgeblich an der Regulation beteiligt (Linder *et al.*, 2000b). Kopp *et al.* (2006) identifizierten das Kinesin KIF1C (s. Abb. 3.14) als ersten Mikrotubuli-assoziierten Podosomenregulator. Dieser ist an Mikrotubuliplusenden angereichert und kontaktiert Podosomen *Precursor* in der Zellperipherie. Durch *live cell imaging* Experimente (P. Kopp) konnte gezeigt werden, dass sich nach wiederholtem Kontakt die Mehrheit der Podosomen *Precursor* auflöste oder teilte. Durch KIF1C werden also vermutlich Vesikel mit Regulationsfaktoren transportiert, die die Podosomendynamik beeinflussen. Die Identifizierung dieser Regulatoren war ein wesentlicher Gegenstand der vorliegenden Arbeit, wozu zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt wurden. Einerseits wurden KIF1C-GFP-markierte Vesikel mittels *FACS* aufgereinigt und anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert (Abb. 3.1). In einem weiteren Ansatz wurde direkt nach Proteinen gesucht, die mit KIF1C kolokalisieren (s. 3.1.10).

Zur Untersuchung der durch KIF1C transportierten Fracht wurden 6-8 Tage alte primäre humane Makrophagen mit KIF1C-GFP transfiziert. Nach einer Expressionszeit von ca. 6 Stunden erfolgte die Lyse der Zellen. Um diese vollständig aufzuschließen, wurden sie mit Hilfe eines Glaspistills homogenisiert.

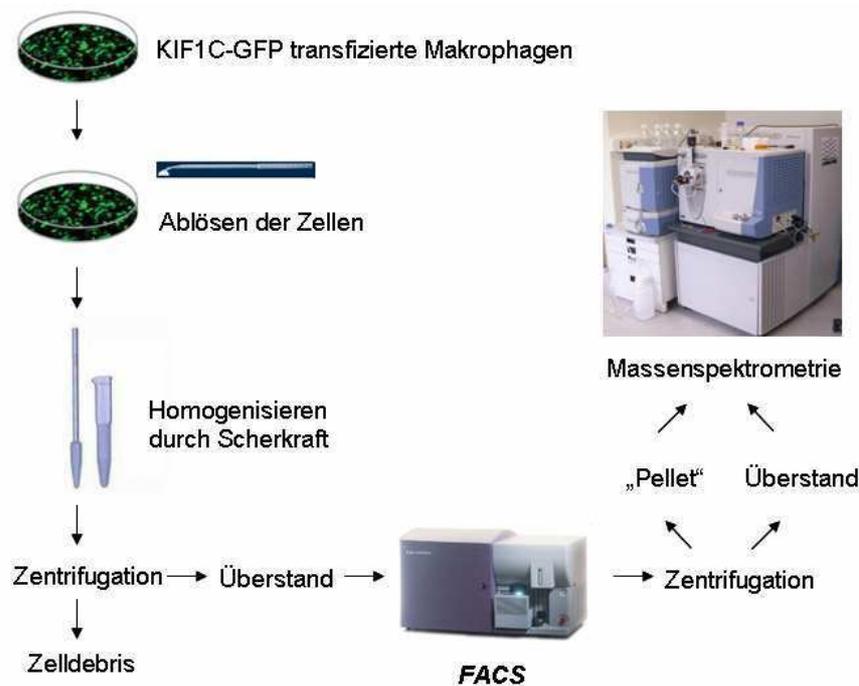


Abb. 3.1 Vesikelaufreinigung für die FACS-Analyse. KIF1C-GFP transfizierte Makrophagen wurden nach einer Expressionszeit von 6h lysiert und mit Hilfe eines Glaspistills homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Zelldebris verworfen und aus dem Überstand KIF1C-GFP positive Vesikel mittels FACS sortiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden sowohl Überstand als auch Pellet mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert.

Durch Zentrifugation wurde der Zelldebris entfernt, die Vesikel aus dem Überstand wurden anschließend in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Sixt (MPI, Martinsried) mittels FACS aufgereinigt. Dabei wurden *forward*- und *side-scatter* so eingestellt, dass Partikel subzellulärer Größe erfasst wurden. Abb. 3.2 zeigt Diagramme der KIF1C-GFP Vesikel vor (A) und nach (B) der Aufreinigung. Nach der Analyse mittels FACS ist eine deutliche Verschiebung der Kurve auf der x-Achse nach rechts erkennbar, was auf eine Anreicherung KIF1C-GFP positiver Vesikel hinweist. Diese gereinigte Fraktion wurde anschließend noch einmal bei sehr hoher Rotationsgeschwindigkeit (13 000 rpm) zentrifugiert, um die Vesikel am Boden des Eppendorfgefäßes zu sammeln. Der Überstand wurde aufbewahrt und diente später in der Massenspektrometrie zur Messung als „Hintergrundsignal“. Bei Betrachtung der aufkonzentrierten Vesikel im TIRF-Mikroskop war eine kreisförmige Verteilung des GFP-Signals (Abb. 3.2, C) erkennbar, was wiederum auf das Vorhandensein von Vesikeln schließen lässt.

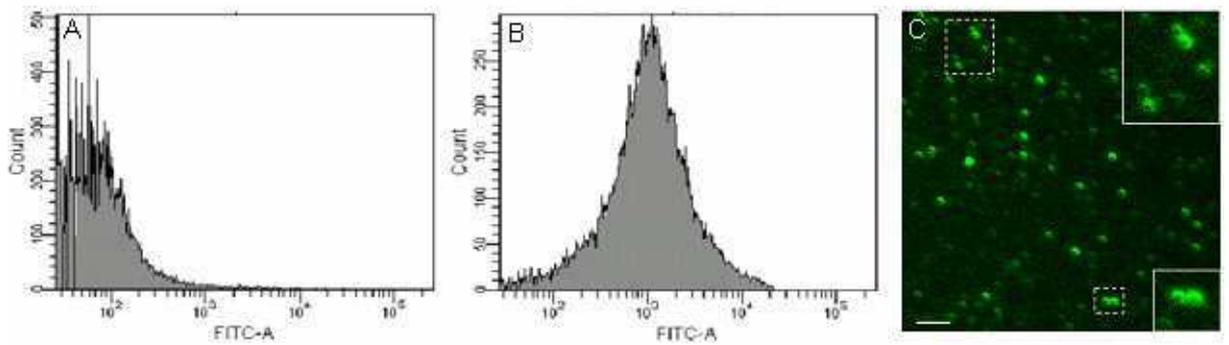


Abb. 3.2 KIF1C-GFP markierte Vesikel vor und nach der Aufreinigung mittels FACS. FACS Analyse subzellulärer Komponenten von KIF1C-GFP exprimierenden primären humanen Makrophagen. (A und B) Darstellung der Vesikelpopulationen vor (A) und nach (B) der FACS-Analyse. *Forward-* und *Side-Scatter* wurden so gewählt, dass Partikel subzellulärer Größe erfasst wurden. Auf der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität, auf der y-Achse die Zahl der gereinigten Vesikel dargestellt. Das linke Diagramm (A) zeigt die Vesikelpopulation vor, das rechte Diagramm (B) nach der Aufreinigung. In (B) ist eine deutliche Verschiebung der Kurve erkennbar, was die Anreicherung des GFP-Signals zeigt. (C) zeigt eine Aufnahme der gereinigten Vesikel im TIRF-Mikroskop, Ausschnitte sind vergrößert dargestellt. Es ist eine kreisförmige Verteilung des GFP-Signals erkennbar, was das Vorhandensein intakter KIF1C-GFP positiver Vesikel zeigt. Weißer Balken: 2 μ m

3.1.2 Analyse KIF1C-GFP sortierter Vesikel mittels Massenspektrometrie

Wie unter 3.1.1 dargestellt, konnten KIF1C-GFP behaftete Vesikel mittels FACS aufgereinigt werden.

Um einen Einblick in die molekulare Zusammensetzung der durch KIF1C-GFP transportierten Vesikel zu bekommen, wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Dies wurde freundlicherweise von Dr. Marcus Krüger (MPI, Bad Nauheim) übernommen. Weiter könnte dies Hinweise auf das Vorhandensein weiterer Motorproteine an diesen Vesikeln oder auf Interaktion mit Adaptermolekülen geben, die KIF1C entweder rekrutieren oder dessen Bindung regulieren.

Das Ergebnis der Analyse umfasste mehr als 250 Proteine, die in verschiedene Kategorien eingeteilt wurden. Weiter musste beachtet werden, dass nur jene Proteine berücksichtigt werden, bei denen die Zahl der einzigartigen Peptide (*unique peptides*) in der KIF1C-Fraktion („Pellet“) im Vergleich zum Überstand erhöht war. So können Proteine ausgeschlossen werden, die unspezifisch an GFP-KIF1C-Vesikel binden und somit falsch positive Ergebnisse liefern würden. Die Zahl der *unique peptides* gibt Aufschluss über die Häufigkeit/Menge der mit KIF1C-Vesikeln assoziierten Proteine, wobei bei größeren Proteinen auch eine höhere Anzahl von *unique peptides* detektiert wird. Je wei-

ter oben die Proteine in der Tabelle aufgelistet wurden, desto mehr einzigartige Peptide wurden identifiziert. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Proteine vermehrt bzw. stärker an KIF1C binden. Eine Auswahl der Ergebnisse ist in Tab. 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1 Ergebnisse der Massenspektrometrie KIF1C-GFP positiver Vesikel. Die Tabelle zeigt ausgewählte Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse KIF1C-GFP positiver Vesikel sowie die Anzahl der *unique peptides*. Eine höhere Anzahl der *unique peptides* lässt auf ein vermehrtes Vorkommen in KIF1C-GFP Vesikeln schließen.

<u>Gruppe</u>	
Aktin-assoziierte Proteine	Anzahl der <i>unique peptides</i>
Filamin	60
Aktin	21
α -Aktinin 1	15
Plastin-2	19
Tyrosin-Protein Phosphatase (Ptpn6, SHP1)	6
Arp2/3-Komplex, Untereinheit (UE) 2,4 und 5	UE 2: 5; UE 4: 4; UE5: 3
Coronin 1C	5
Cofilin 1	3
Motorproteine	
Myosin IIA	37
Dynein (schwere und leichte Ketten)	schwere Kette:4; leichte Kette: 2
Zytoskelettproteine	
Vimentin	30
Moesin	18
14-3-3 Proteine (Isoformen δ , γ , ϵ)	δ : 9; γ : 3; ϵ : 2
Ezrin	2
Adhäsionsproteine	
Talin-1	29
Vinkulin	2

Vesikel-assoziierte Proteine	Anzahl der <i>unique peptides</i>
SEC22b	4
GTPasen	
IQGAP1	16
ARF1	8
Dynamin-2	2
Rab1a	7
Rab5c	3
Rab6a	2
Rab7	5
Rab11b	2
Rab14	2
weitere Proteine	
Annexin (A2, A5, A1)	A2: 2; A5: 18; A1: 6
Lamp1	4

Es wurden Proteine ausgewählt, die entsprechenden Konstrukte anschließend mit KIF1C-GFP oder KIF1C-TagRFP in humanen Makrophagen kotransfiziert und entweder mittels konfokaler Mikroskopie oder *live cell imaging* im Hinblick auf Kollokalisierung oder *kiss-and-run*-Kontakt untersucht. *Kiss-and-run* bezeichnet einen dynamischen Prozess, bei dem sich einzelne Vesikel aufeinander zubewegen, kurzzeitig berühren und dann wieder voneinander entfernen. Mit Kollokalisierung wird hier eine beständige Interaktion von KIF1C-Vesikeln mit einem ausgewählten Protein bei deutlich sichtbarer Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzsignale bezeichnet. Tab. 3.2 gibt einen Überblick über untersuchte Proteine sowie die Ergebnisse.

Tab. 3.2 Übersicht über Proteine, die im Zusammenhang mit KIF1C-GFP Vesikeln in der Massenspektrometrie detektiert wurden. x: positives Ergebnis; -: negatives Ergebnis (hinsichtlich Kotransfektion von KIF1C-GFP bzw. KIF1C-TagRFP mit den ausgewählten Konstrukten).

Protein	partielle Kolokalisation mit KIF1C	<i>kiss-and-run</i>-Kontakt mit KIF1C
Filamin	-	-
α -Aktinin	-	x
Plastin	-	x
Shp1	-	x
IQGAP	-	-
Dynamin2	-	-
Rab 5C	x	-
Rab 6a	x	x
Rab7	-	x
Rab 11b	x	x
Rab 14	x	x
Sec 22b	-	-
Annexin2	-	-

Im Folgenden wird auf ausgewählte Ergebnisse, die in Tab. 3.2 genannt wurden, genauer eingegangen.

3.1.3 Interaktionen zwischen KIF1C und RabGTPasen

Um zu überprüfen, ob die mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine mit KIF1C gleiche subzelluläre Lokalisation aufweisen und so möglicherweise bei der Regulation der Podosomendynamik von Bedeutung sind, wurden ausgewählte Proteine aus der Ergebnisliste mit KIF1C-TagRFP kotransfiziert. Die Auswertung erfolgte entweder in fixierten Zellen durch konfokale Mikroskopie oder in lebenden Makrophagen mittels *live cell* Mikroskopie.

Als erstes wurde die Lokalisation verschiedener RabGTPasen in humanen Makrophagen im Hinblick auf Kolokalisation mit KIF1C überprüft.

3.1.3.1 KIF1C und Rab6a

Für Rab6a wurde eine Funktion im Transport vom Golgi zum ER, von Endosomen zum Golgi sowie im intra-Golgi Transport beschrieben (Rzomp *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 2007). Die Lokalisation von KIF1C und Rab6a in primären humanen Makrophagen wurde durch Kotransfektion von KIF1C-TagRFP und GFP-Rab6a untersucht. In polarisierten Zellen zeigt sich die für KIF1C typische Lokalisation am *leading* und *trailing edge* (Abb. 3.3, B). Bei Rab6a ist eine ringartige Lokalisation im Zellzentrum, möglicherweise in der Nähe des Golgi-Apparates, zu erkennen (Abb. 3.3, A). Daneben lokalisieren einzelne Vesikel in der Zellperipherie, oft in der Nähe von KIF1C-Akkumulationen (s. Abb. 3.3, C).

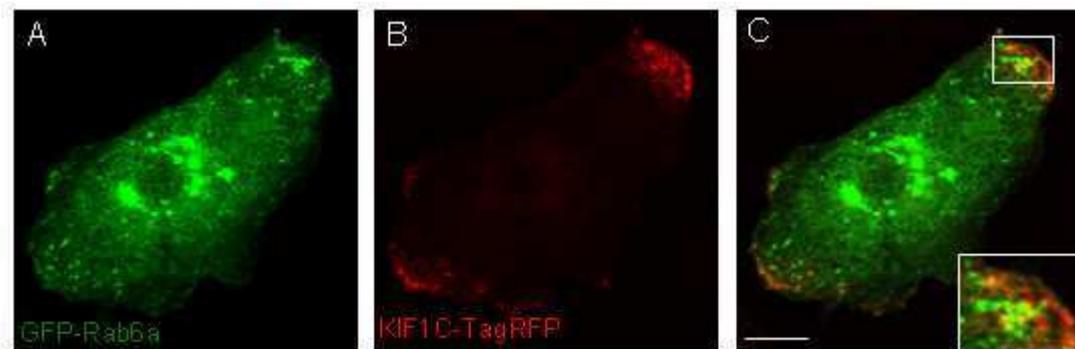


Abb. 3.3 Lokalisation von GFP-Rab6a in fixierten humanen Makrophagen. Immunfluoreszenzaufnahmen eines primären humanen Makrophagen, der mit GFP-Rab6a (grün, A) und KIF1C-TagRFP (rot, B) transfiziert wurde. Rab6a lokalisiert am Golgi-Apparat, aber auch in der Zellperipherie. Die Überlagerung (C) zeigt eine partielle Kolokalisation mit KIF1C-TagRFP. Weißer Balken: 10 μ m.

In *live cell imaging* Experimenten konnte eine partielle Kolokalisation von KIF1C und Rab6a in der Peripherie gezeigt werden (Abb. 3.4 und Film 1). Der Kontakt der beiden Vesikelpopulationen dauerte meist mehrere Sekunden, war also deutlich länger als bei *kiss-and-run* Ereignissen.

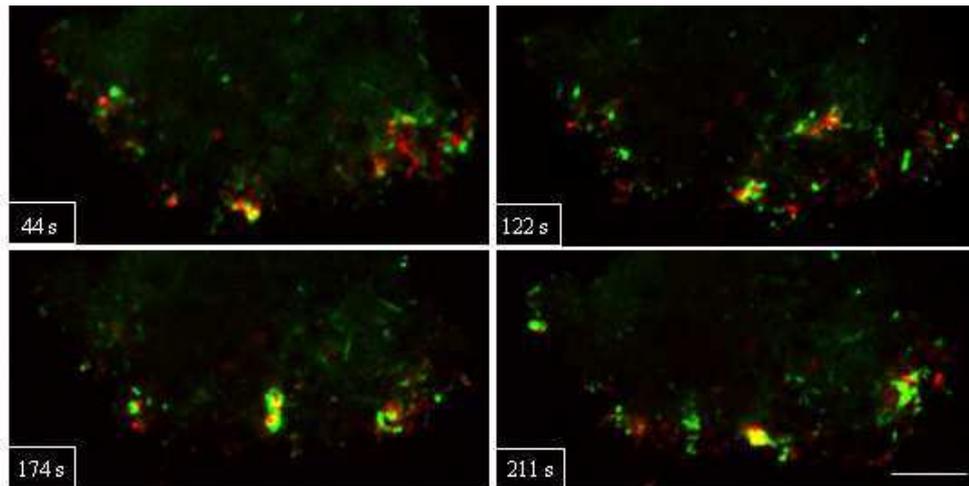


Abb. 3.4 GFP-Rab6a kolokalisiert partiell mit KIF1C-TagRFP in lebenden Zellen. Konfokalmikroskopische Momentaufnahmen aus einem *live cell* Film zeigen die Lokalisation von GFP-Rab6a (grün, A) und KIF1C-TagRFP (rot, B) in der Zellperipherie eines lebenden primären humanen Makrophagen. Gelbe Färbung zeigt die Überlagerung der beiden Signale (C), die Insets geben die Sekunden seit Beginn des Films an. Weißer Balken: 10 μ m.

Die Interaktion von KIF1C-GFP und Rab6a konnte in einer GFP-Immunpräzipitation mit KIF1C-GFP transfizierten primären humanen Makrophagen mit einem Antikörper gegen Rab6a nachgewiesen werden (s. Abb. 3.5). Als Kontrolle für unspezifische Bindungen an GFP dienten Zellen, die mit dem Leervektor pEGFP-N1 transfiziert wurden.

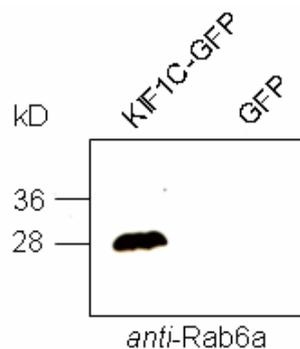


Abb. 3.5 KIF1C bindet Rab6a. GFP-Immunpräzipitation KIF1C-GFP transfizierter (links) humaner Makrophagen. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit dem Leervektor pEGFP-N1 transfiziert wurden (rechts). Der *Western Blot* wurde mit einem Antikörper spezifisch gegen Rab6a entwickelt.

3.1.3.2 KIF1C und Rab11b

Rab11 gehört zu den endosomalen Rab Proteinen, die hinsichtlich Lokalisation und funktioneller Interaktion mit Effektorproteinen am besten charakterisiert sind. Rab11 kann möglicherweise direkt oder indirekt mit Mikrotubuli-basierten Motorproteinen

interagieren (Hammer, III und Wu, 2002), auch eine Beteiligung am Transport von Plasmamembranproteinen wird diskutiert (Lapierre *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2005). Um die Lokalisation von Rab11b in Makrophagen sowie eine mögliche Kolokalisation mit KIF1C zu überprüfen, wurden primäre humane Makrophagen mit KIF1C-TagRFP und GFP-Rab11b kotransfiziert. KIF1C-TagRFP zeigt eine eindeutige Akkumulation in der Zellperipherie (Abb. 3.6, B), GFP-Rab11b ist im gesamten Zytoplasma der Zelle verteilt, in der Zellmitte sind die Vesikel etwas größer und liegen dichter zusammen als in der Peripherie (Abb. 3.6, A). In Bereichen hoher KIF1C-Dichte ist aber auch eine Ansammlung von GFP-Rab11b Vesikeln zu erkennen. Bei genauer Betrachtung ist hier auch eine partielle Kolokalisation der beiden Signale erkennbar (s. Ausschnittsvergrößerung Abb. 3.6, C).

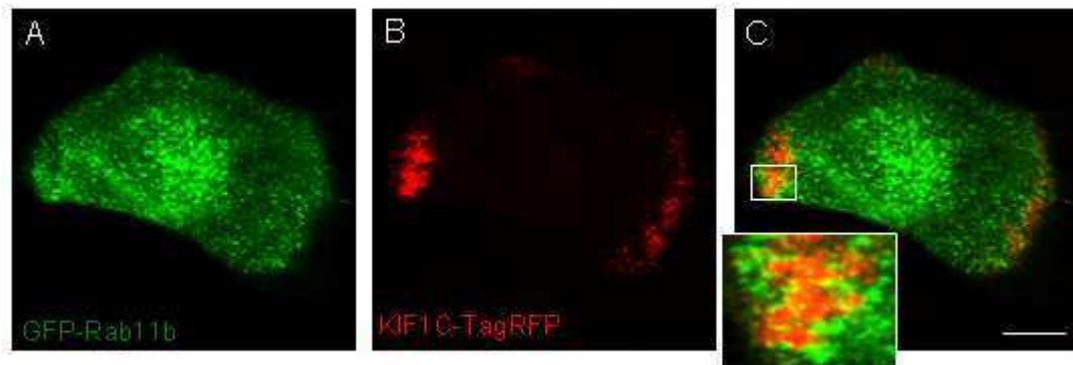


Abb. 3.6 GFP-Rab11b kolokalisiert partiell mit KIF1C-TagRFP. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit GFP-Rab11b (grün, A) und KIF1C-TagRFP (rot, B) transfiziert wurde. Die Überlagerung (C) zeigt, dass sich die beiden Proteine in der Zellperipherie in räumlicher Nähe befinden und partiell kolokalisieren. Weißer Balken: 10 µm

3.1.3.3 KIF1C und Rab14

Die Lokalisation von Rab14 wurde am rauhen Endoplasmatischen Reticulum, Golgi und Trans-Golgi Netzwerk sowie an endosomalen Kompartimenten (z.B. frühe Endosomen) beschrieben (Schwartz *et al.*, 2007; Junutula *et al.*, 2004). Um zu untersuchen, ob KIF1C mit Rab14 in Makrophagen kolokalisiert, wurden primäre humane Makrophagen mit KIF1C-TagRFP und GFP-Rab14 kotransfiziert. KIF1C-TagRFP ist, wie auch für KIF1C-GFP beschrieben, vorrangig in der Zellperipherie zu finden (s. Abb. 3.7, B). Bei GFP-Rab14 (Abb. 3.7, A) sind vesikelartige Strukturen zu erkennen, die im gesamten Zytoplasma verteilt sind. Die Vesikel im inneren Teil der Zelle sind dabei kleiner als die Vesikel in der Zellperipherie. Die größeren Rab14-Vesikel schei-

nen dabei mit KIF1C zu lokalisieren. Die Überlagerung zeigt jedoch, dass nur selten Kolokalisation stattfindet (s. Ausschnittsvergrößerung Abb. 3.7, C). Rab14 befindet sich allerdings oft in räumlicher Nähe zu KIF1C. Möglicherweise handelt es sich um einen sog. „*kiss-and-run*“ Kontakt, bei dem sich die beiden Proteine für kurze Zeit räumlich sehr nahe kommen.

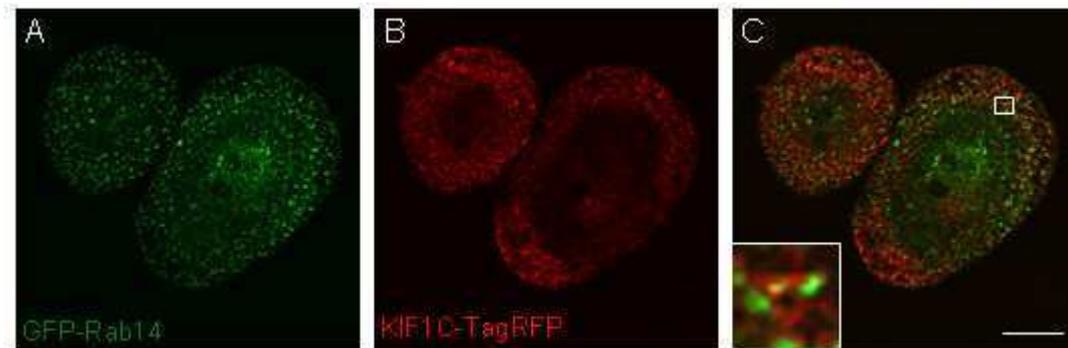


Abb. 3.7 GFP-Rab14 kolokalisiert partiell mit KIF1C-TagRFP. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit GFP-Rab14 (grün, A) und KIF1C-TagRFP (rot, B) transfiziert wurde. Die Überlagerung (C) zeigt, dass sich die beiden Proteine in der Zellperipherie in räumlicher Nähe befinden und partiell kolokalisieren (weißer Pfeil). Weißer Balken: 10 µm

3.1.3.4 KIF1C und Rab8

Die bisher untersuchten Rab-Proteine zeigen eine Auswahl der Ergebnisse der Massenspektrometrie. Um die Spezifität zu überprüfen, wurde als Kontrolle eine weitere RabGTPase gewählt, die nicht im Zusammenhang mit den gereinigten KIF1C-GFP Vesikeln gefunden wurde.

Rab8 lokalisiert am Golgi und an Endosomen und ist am Transport zwischen Golgi, Endosomen und Plasmamembran beteiligt (Schwartz *et al.*, 2007). Weiterhin wurde eine Funktion im gerichteten Transport neu synthetisierter Membranproteine (in Fibroblasten) beschrieben (Zerial und McBride, 2001). Abb. 3.8 zeigt einen primären humanen Makrophagen, der mit KIF1C-TagRFP (Abb. 3.8, B) und GFP-Rab8 (Abb. 3.8, A) kontransfiziert wurde.

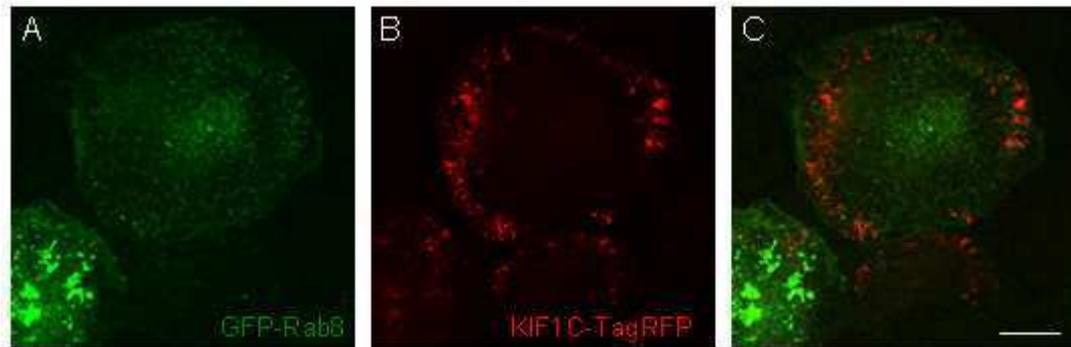


Abb. 3.8 GFP-Rab8 kolokalisiert nicht mit KIF1C-TagRFP. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit GFP-Rab8 (grün, A) und KIF1C-TagRFP (rot, B) transfiziert wurde. Die Überlagerung (C) zeigt, dass die beiden Proteine getrennt voneinander in der Zelle lokalisieren. Weißer Balken: 10 μ m

KIF1C zeigt die spezifische Lokalisation in der Zellperipherie. Rab8 Vesikel sind meist wesentlich kleiner und akkumulieren bevorzugt in der Zellmitte. In diesem Fall konnte weder eine (partielle) Kolokalisation noch ein *kiss-and-run* Kontakt beobachtet werden (Abb. 3.8, C).

3.1.4 KIF1C und Sec22b

Dass die Aufreinigung von Vesikeln mittels *FACS* funktionell ist, wurde durch die Identifizierung von sog. *vesicle trafficking* Proteinen, wie Sec22b, bestätigt. Sec22b spielt eine Rolle im vesikulären Transport zwischen ER und Golgi ((Hatsuzawa *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1999). Da dieses Protein als möglicher Bestandteil der KIF1C-Vesikel identifiziert wurde, wurden mVENUS-Sec22b und KIF1C-TagRFP in humanen Makrophagen überexprimiert und hinsichtlich Kolokalisation in fixierten und lebenden Zellen überprüft. Wie in Abb. 3.9 (und Film 2) zu sehen ist, lokalisiert mVENUS-Sec22b vor allem in der Zellmitte, um den Kern sowie am Golgi-Apparat. Zwar akkumulieren einige Sec22b-Vesikel auch in der Peripherie, meist in der Nähe von KIF1C-TagRFP, eine Kolokalisation ist jedoch nicht erkennbar.

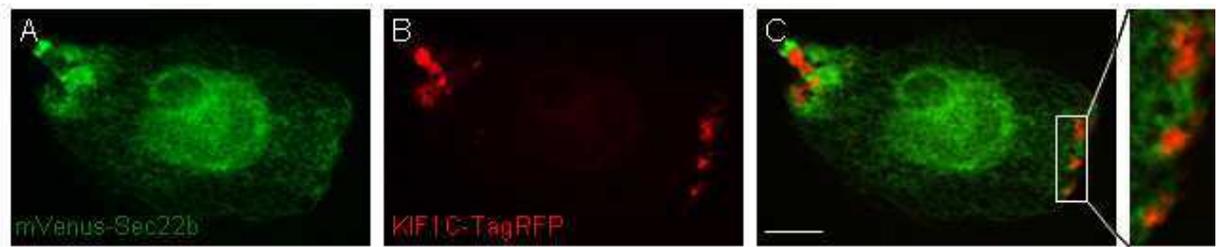


Abb. 3.9 mVENUS-Sec22b kolokalisiert in lebenden Zellen nicht mit KIF1C-TagRFP. Die konfokalmikroskopische Momentaufnahme aus einem *live cell* Film zeigt die Lokalisation von mVENUS-Sec22b (grün, A) und KIF1C-TagRFP (rot, B) in lebenden primären humanen Makrophagen. In der Überlagerung der beiden Signale (C) ist keine Kolokalisation der Proteine erkennbar. Weißer Balken: 10 μ m.

3.1.5 KIF1C und LAMP1

LAMP1 ist ein TypI Transmembranprotein, das vor allem an Lysosomen und späten Endosomen lokalisiert. Neu synthetisierte Moleküle werden vom trans-Golgi Netzwerk zu Endosomen und dann zu Lysosomen transportiert (Rohrer *et al.*, 1996).

Um eine Kolokalisation von KIF1C und LAMP1 zu überprüfen, wurden primäre humane Makrophagen mit KIF1C-GFP transfiziert und Lamp1 mit einem anti-LAMP1-Antikörper sichtbar gemacht. Während KIF1C-GFP vorrangig in der Zellperipherie angereichert ist (Abb. 3.10, A), akkumuliert Lamp1 vor allem in der Mitte der Zelle, es finden sich aber auch einzelne Vesikel im gesamten Zytoplasma (Abb. 3.10, B). In der Überlagerung der beiden Signale ist allerdings keine Kolokalisation zwischen KIF1C-GFP und LAMP1 erkennbar.

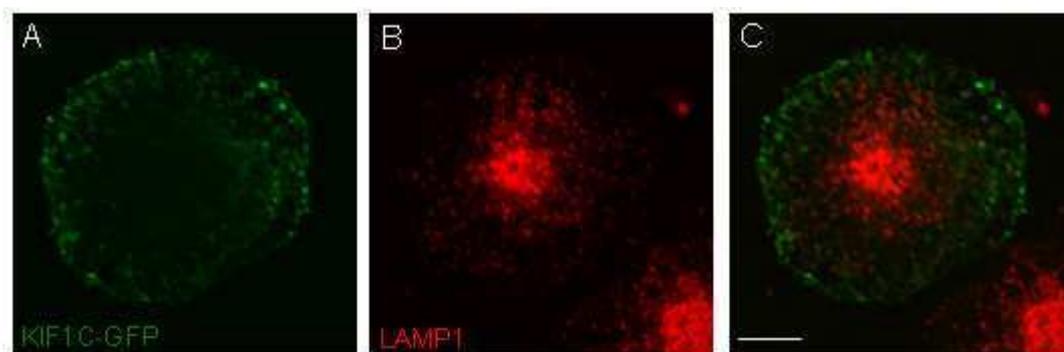


Abb. 3.10 KIF1C-GFP kolokalisiert nicht mit LAMP1. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit KIF1C-GFP (grün, A) transfiziert wurde, LAMP1 wurde mit einem Antikörper (rot, B) gefärbt. Die Überlagerung (C) zeigt, dass die beiden Proteine getrennt voneinander in der Zelle lokalisieren. Weißer Balken: 10 μ m

Für die bisher dargestellten Ergebnisse kann man zusammenfassend sagen, dass die Aufreinigung KIF1C-GFP-positiver Vesikel mittels *FACS* funktionell ist. Dies konnte durch die Detektion von *vesicle trafficking* Proteinen (z.B. Sec22b) sowie die Kolokalisation von KIF1C mit den detektierten Rab-Proteinen Rab6A, Rab11b und Rab14 gezeigt werden. Das Beispiel von LAMP1 zeigt jedoch auch, dass die Methode noch zu verbessern ist, um die Detektion von Proteinen des „Hintergrunds“ zu reduzieren.

3.1.6 HAX1 als KIF1C Interaktionspartner

In einem parallelen Ansatz wurde direkt nach Proteinen gesucht, die möglicherweise auch mit KIF1C interagieren. Hierbei wurde das Protein HAX1 (HS1-assoziiertes protein X-1; HS1 = *hematopoietic lineage cell-specific protein 1*) identifiziert. HAX1 wurde durch Arbeiten von John F. Marshall (Centre for Tumour Biology, London) mittels Immunpräzipitation als Interaktionspartner von KIF1C identifiziert. Im Rahmen einer Kooperation wurde das Verhalten der beiden Proteine in primären humanen Makrophagen genauer untersucht.

HAX1 wurde erstmals 1997 in humanen Geweben als mitochondriales Protein in B Lymphozyten beschrieben, das möglicherweise an der Signaltransduktion von B-Zell Antigen-Rezeptoren beteiligt ist. Seitdem wurden eine Vielzahl von Bindungspartnern (beispielsweise Cortactin), Funktionen und subzellulärer Lokalisationen (z.B. im Zellkörper) für HAX1 beschrieben (Lees *et al.*, 2008).

Um die Lokalisation von HAX1 in primären humanen Makrophagen zu untersuchen, wurden Zellen mit GFP-HAX1 transfiziert, nach einer Expressionszeit von 6h fixiert und F-Aktin mit Alexa568-Phalloidin gefärbt, um Podosomen sichtbar zu machen. In radiärsymmetrischen Makrophagen konnte neben einer zytoplasmatischen Verteilung von GFP-HAX1 (s. Abb. 3.11, A) auch eine vesikuläre Akkumulation beobachtet werden (Abb. 3.11, D).

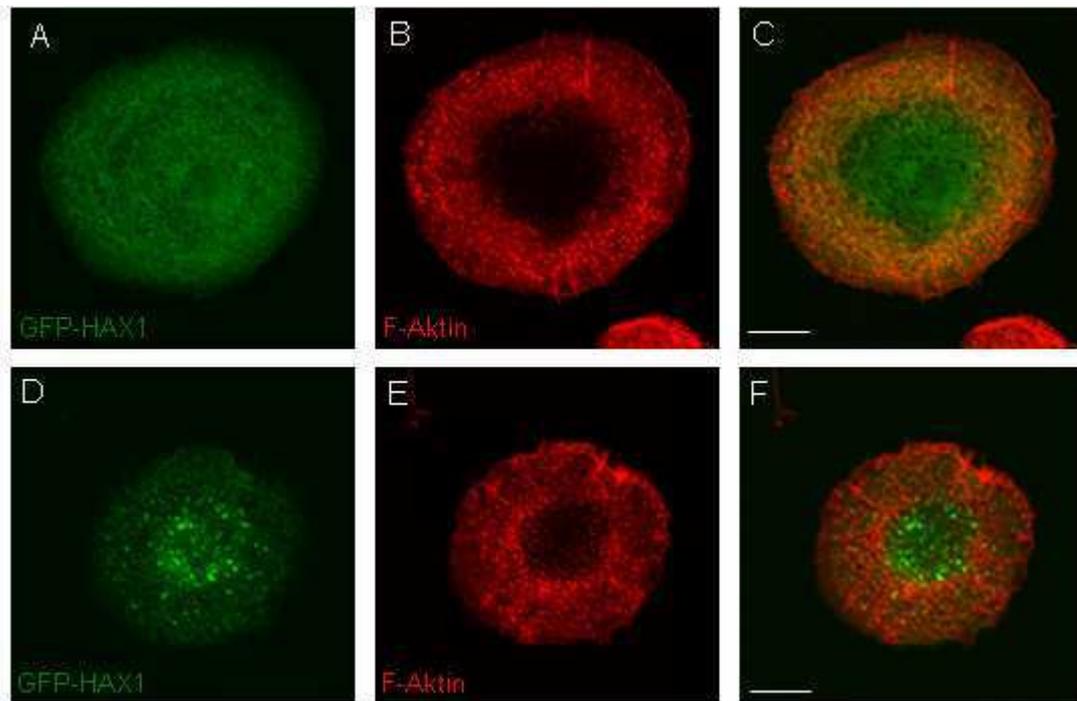


Abb. 3.11 Lokalisation von GFP-HAX1 in primären humanen Makrophagen. Immunfluoreszenzaufnahmen primärer humaner Makrophagen, die mit GFP-HAX1 (grün, A und D) transfiziert sind. F-Aktin wurde mit Alexa568-Phalloidin gefärbt (rot, B und E). HAX1 zeigte entweder eine zytoplasmatische Verteilung in der Zelle (A) oder lokalisierte an vesikulären Strukturen (D). Weißer Balken: 10 μ m.

Um die Verteilung von HAX1 und KIF1C in humanen Makrophagen zu untersuchen, wurden GFP-HAX1 und KIF1C-TagRFP in humanen Makrophagen kotransfiziert. Abb. 3.12 zeigt eine polarisierte Zelle, bei der GFP-HAX1-Vesikel neben einer zytoplasmatischen Verteilung eine Anhäufung in der Peripherie aufweisen (Abb. 3.12, A).

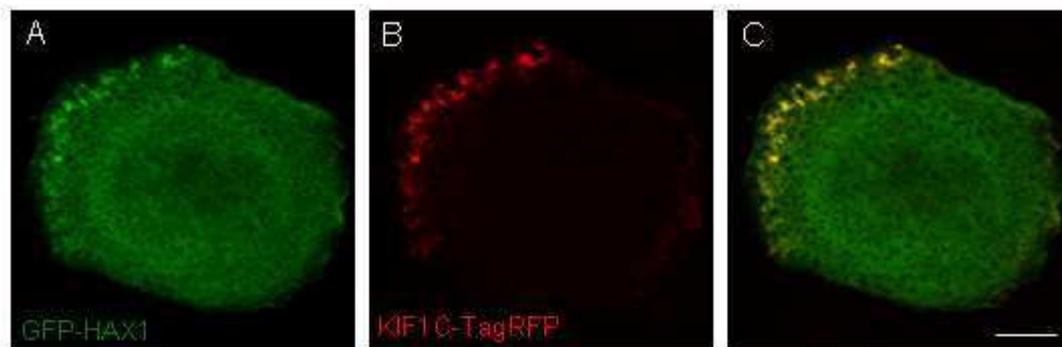


Abb. 3.12 KIF1C-TagRFP kolokalisiert mit GFP-HAX-1. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit GFP-HAX-1 (grün, A) und KIF1C-TagRFP (rot, B) transfiziert wurde. Die Überlagerung (C) zeigt eine deutliche Kolokalisation der beiden Proteine in der Zellperipherie. Weißer Balken: 10 μ m

KIF1C-TagRFP akkumuliert in der Zellperipherie (Abb. 3.12, B). Die Überlagerung (Abb. 3.12, C) zeigt, dass in der Zellperipherie in Bereichen hoher KIF1C-Dichte eine deutliche Kolokalisation der vesikelartigen Strukturen vorliegt (s. auch Film 3).

Um auszuschließen, dass die beobachtete Lokalisierung von HAX1 bei Koexpression mit KIF1C-TagRFP durch den GFP-tag ausgelöst wird, wurde KIF1C-TagRFP zum einen mit myc-HAX und zum anderen mit flag-HAX in humanen Makrophagen exprimiert. Zur Sichtbarmachung der HAX1-Konstrukte wurden diese anschließend mit einem anti-myc bzw. anti-flag Antikörper gefärbt. Sowohl bei der Expression von myc-HAX1 (Abb. 3.13, A) als auch bei flag-HAX1 (Abb. 3.13, D) konnte eine Kolokalisation mit KIF1C-TagRFP in der Zellperipherie beobachtet werden (Abb. 3.13, C bzw. F).

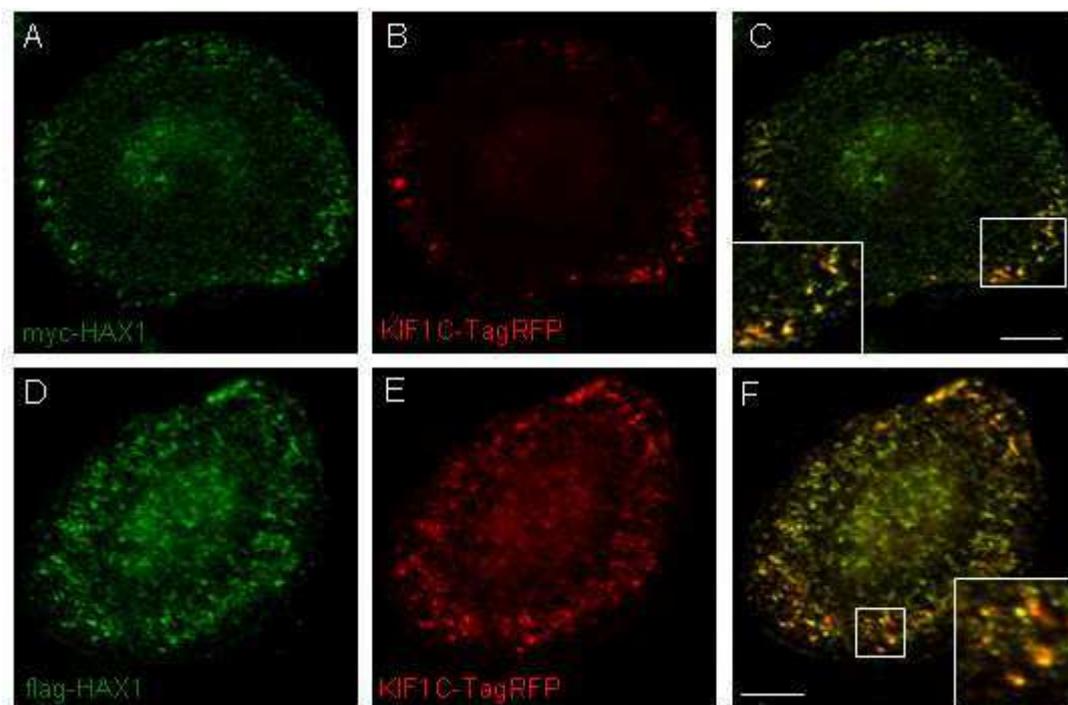


Abb. 3.13 KIF1C-TagRFP kolokalisiert mit myc-HAX1 und flag-HAX1. Immunfluoreszenzaufnahmen eines primären humanen Makrophagen, der mit myc-HAX1 (grün, A) bzw. flag-HAX1 (grün, D) und KIF1C-TagRFP (rot, B und E) transfiziert wurde. Zur Sichtbarmachung von myc-HAX1 bzw. flag-HAX1 wurden die Zellen mit einem spezifischen Antikörper gefärbt. Die Überlagerung (C und F) zeigt eine deutliche Kolokalisation der Proteine in der Zellperipherie. Weißer Balken: 10 µm

3.1.6.1 HAX1 kolokalisiert mit KIF1C-K103A am MTOC

Die bisher dargestellten Ergebnisse lassen auf eine Bindung zwischen HAX1 und KIF1C schließen. Zur Überprüfung, ob eine Relokalisierung von KIF1C auch eine Umverteilung von HAX1 zur Folge hat, wurde eine Rigormutante von KIF1C verwendet, die nicht mehr in der Zellperipherie, sondern in der Zellmitte, am MTOC (*microtubule-organizing-center*), lokalisiert (P. Kopp, 2005).

Durch Punktmutation im ATP-Bindemotiv (GXXXXGKS/T), auch Walker-Motiv A genannt, können molekulare Motoren in einen sogenannten Rigor-Zustand versetzt werden. In diesem Zustand kann ATP zwar gebunden, aber nicht mehr hydrolysiert werden, so dass das Motorprotein fest an Mikrotubuli gebunden bleibt (Nakata und Hirokawa, 1995). Im Falle von KIF1C wurde die Mutation in der *P-loop* an Position 103 eingefügt, wodurch Lysin durch Alanin ersetzt wurde (s. Abb. 3.14).

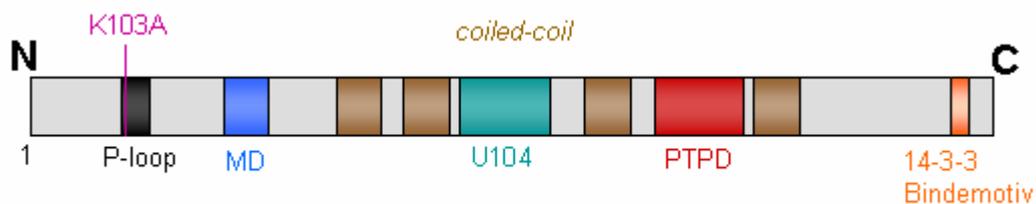


Abb. 3.14 Domänenstruktur von KIF1C. Schematische Darstellung der Domänen von KIF1C. Konservierte Domänen: *P-loop* (schwarz), Motordomäne (MD, blau), U104-Domäne (grün), PTPD1-Bindedomäne (rot) und 14-3-3-Proteinbinderegion (orange). Die braunen Kästchen stellen die potentiellen *coiled-coil* Sequenzen dar. 1 bezeichnet den N-Terminus, 1103 den C-Terminus. K103A (pink) zeigt die Mutationsstelle in der *P-loop* Sequenz des Rigor-Konstrukts an.

Für die Untersuchungen im Zusammenhang mit HAX1 wurde ein rot fluoreszierendes Konstrukt für die Rigormutante von KIF1C (KIF1C-K103A-TagRFP) hergestellt.

Primäre humane Makrophagen wurden mit KIF1C-K103A-TagRFP transfiziert und die Lokalisation in fixierten Zellen untersucht. Die Rigor-Mutante lokalisierte nicht mehr vesikelartig in der Zellperipherie, sondern akkumulierte punktartig in der Zellmitte (Abb. 3.15, A). Zur Sichtbarmachung des MTOC wurde γ -Tubulin gefärbt (Abb. 3.15, B). In der Überlagerung der Signale (Abb. 3.15, C) konnte eine Anhäufung von KIF1C-K103A-TagRFP am MTOC bestätigt werden.

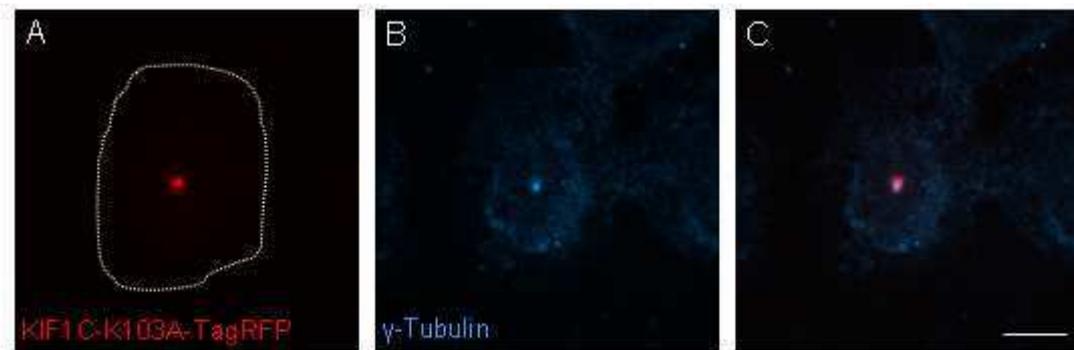


Abb. 3.15 KIF1C-K103A-TagRFP akkumuliert am MTOC. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit KIF1C-K103A-TagRFP (rot, A) transfiziert wurde, das MTOC wurde mit einem Antikörper gegen γ -Tubulin (blau, B) gefärbt. Die Überlagerung (C) zeigt eine Akkumulation von KIF1C-K103A-TagRFP am MTOC. Zur besseren Darstellung wurde die Zelle weiß umrandet. Weißer Balken: 10 μ m

Um das Verhalten von HAX1 im Zusammenhang mit der Rigor-Mutante von KIF1C zu untersuchen, wurden GFP-HAX1 und KIF1C-K103A-TagRFP in humanen Makrophagen kotransfiziert. Wie Abb. 3.16 zeigt, relokalisiert GFP-HAX1 zusammen mit KIF1C-K103A-TagRFP am MTOC. Um sicherzustellen, dass es sich um das MTOC handelt, wurde in fixierten Zellen γ -Tubulin mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Die Überlagerung (s. Abb. 3.16: D) zeigt eindeutig eine Akkumulation der beiden Proteine am MTOC. In *live cell* Experimenten konnte eine Kollokalisierung von GFP-HAX1 und KIF1C-TagRFP in der Zellmitte bestätigt werden (s. Film 4).

Diese Ergebnisse lassen auf eine enge Interaktion zwischen KIF1C und HAX-1 schließen.

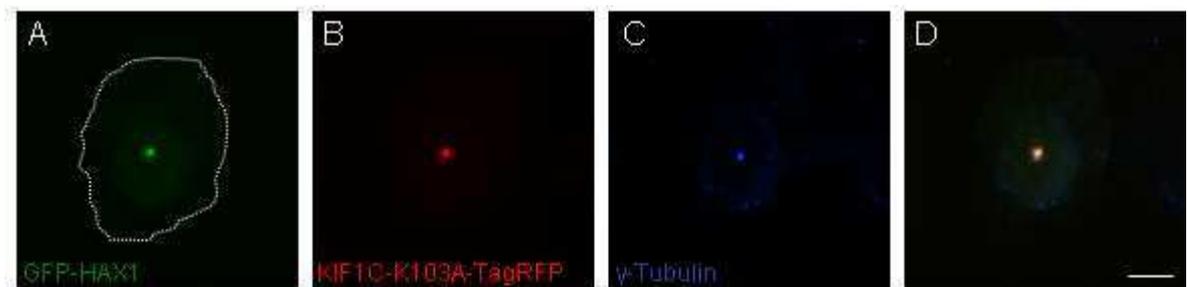


Abb. 3.16 GFP-HAX-1 kolokalisiert mit -KIF1C-K103A-TagRFP und akkumuliert am MTOC.

Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit GFP-HAX-1 (grün, A) und KIF1C-K103A-TagRFP (rot, B) transfiziert wurde, das MTOC wurde mit einem Antikörper gegen γ -Tubulin (blau, C) gefärbt. Die Überlagerung (D) zeigt eine deutliche Akkumulation der beiden Proteine am MTOC. Zur besseren Darstellung wurde die Zelle weiß umrandet. Weißer Balken: 10 μ m

3.2 Podosomen-Subpopulationen in primären humanen Makrophagen

Durch frühere Arbeiten in unserem Labor konnte gezeigt werden, dass in primären humanen Makrophagen unterschiedliche Podosomen-Subpopulationen vorkommen (Kopp *et al.*, 2005): große, dynamische *Precursor* in der Zellperipherie und kleinere, langlebigere Podosomen in der Zellmitte. Abb. 3.17 zeigt einen primären humanen Makrophagen, bei dem die unterschiedlichen Podosomen-Subpopulationen gemäß ihrer Dynamik farblich markiert wurden.

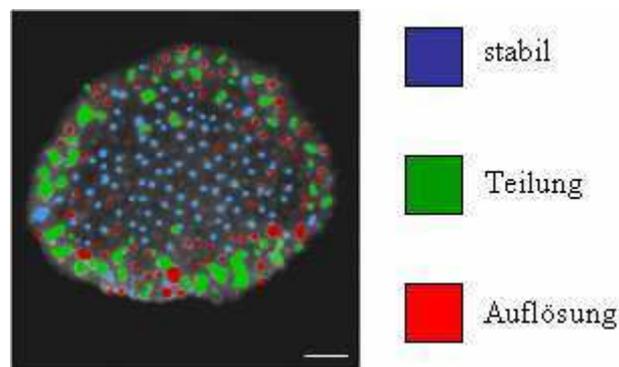


Abb. 3.17 Analyse der Podosomendynamik in primären humanen Makrophagen. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, transfiziert mit mRFP- β -actin (Bildausschnitt aus *live cell* Film). Podosomen wurden gemäß ihres Verhaltens während des Experiments unterschiedlich farblich markiert: stabile Podosomen (blau), sich teilende Podosomen (grün), sich auflösende Podosomen (rot). Kleinere, stabilere Podosomen konzentrieren sich in der Zellmitte, größere Podosomen-*Precursor* in der Zellperipherie teilen sich, kleinere lösen sich auf. Weißer Balken: 10 μ m (aus Kopp *et al.*, 2006).

Podosomen in der Zellperipherie werden von Mikrotubuli-Plusenden kontaktiert. Auch das Motorprotein KIF1C lokalisiert in der Zellperipherie an Mikrotubuli-Plusenden und kontaktiert wiederholt Podosomen. Es wurde beobachtet, dass ca. 60 % aller Podosomen von KIF1C-GFP Akkumulationen kontaktiert werden, verglichen mit ca. 84 %, die von Mikrotubuli-Plusenden kontaktiert werden. Dies deutet darauf hin, dass nur ein Teil der Mikrotubuli-Plusenden mit KIF1C angereichert ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass KIF1C-markierte Mikrotubuli-Plusenden vor allem Podosomen in der Zellperipherie kontaktieren und somit zu deren Umwälzung beitragen (Kopp *et al.*, 2006).

Infolgedessen kam die Frage auf, ob es ein weiteres Kinesin gibt, das spezifisch an die stabileren Podosomen in der Zellmitte lokalisiert und zu deren *turnover* beiträgt. Durch siRNA-basierten *knock-down* in primären humanen Makrophagen konnte gezeigt wer-

den, dass die Zahl der Zellen mit Podosomen nach *knock-down* von KIF9 im Vergleich zu Kontrollzellen auf ca. 40 % reduziert war (P. Kopp).

3.3 KIF9

3.3.1 KIF9 reguliert die Anzahl der Podosomen in humanen Makrophagen

Um den Einfluss von KIF9 auf Podosomen zu bestätigen, wurde mit Hilfe des vektor-kodierten siRNA-Systems psiSTRIKE eine shRNA gegen KIF9 entwickelt. Durch Ligation in einen bicistronischen Vektor exprimieren transfizierte Zellen neben der Zielsequenz auch GFP. Der Vorteil daran ist, dass transfizierte Zellen mit Sicherheit identifiziert werden können. Die eindeutige Identifikation war bei Einsatz von siRNA nicht möglich, weshalb früher zusätzlich zur siRNA substöchiometrische Mengen eines GFP-Leervektors kotransfiziert wurden. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit der Zielsequenz in randomisierter Basenabfolge (einer sog. *scrambled* Sequenz) transfiziert wurden. Die Zellen wurden nach einer Expressionszeit von 24, 48 und 72 Stunden fixiert und Podosomen durch Färbung mit Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Podosomen von 3 x 30 Zellen gezählt und statistisch ausgewertet. Abb. 3.18 zeigt Zellen, die 48 Stunden nach Transfektion fixiert wurden. Spezifisch mit KIF9 shRNA transfizierte Zellen (3.18, B) wiesen deutlich weniger Podosomen auf als Kontrollzellen (3.18, A). Die Quantifizierung (Abb. 3.18, C und D) ergab, dass sich die Zahl der Podosomen in den Kontrollzellen über den beobachteten Zeitraum kaum veränderten und meist mehr als 50 Podosomen je Zelle vorhanden waren. Bei spezifisch mit KIF9 shRNA transfizierten Zellen war bereits nach 24 Stunden eine deutlich verringerte Podosomenzahl je Zelle zu beobachten ($50,0 \pm 2,7$ % der Zellen hatten mehr als 50 Podosomen, verglichen mit $92,9 \pm 8,9$ % der Kontrollzellen). Diese nahm weiter ab, und nach einer Expressionszeit von 72 Stunden wiesen nur noch $29,7 \pm 7,3$ % der Zellen mehr als 50 Podosomen auf, bei $48,4 \pm 6,1$ % konnten jedoch nur weniger als 10 Podosomen je Zelle gezählt werden. In Zellen, die als Negativkontrolle mit einer *scrambled* Sequenz transfiziert wurden, hatten nach 72 Stunden noch $98,8 \pm 20,7$ % der Zellen mehr als 50 Podosomen. Daraus kann man schließen, dass KIF9 die Podosomenbildung in primären humanen Makrophagen beeinflusst.

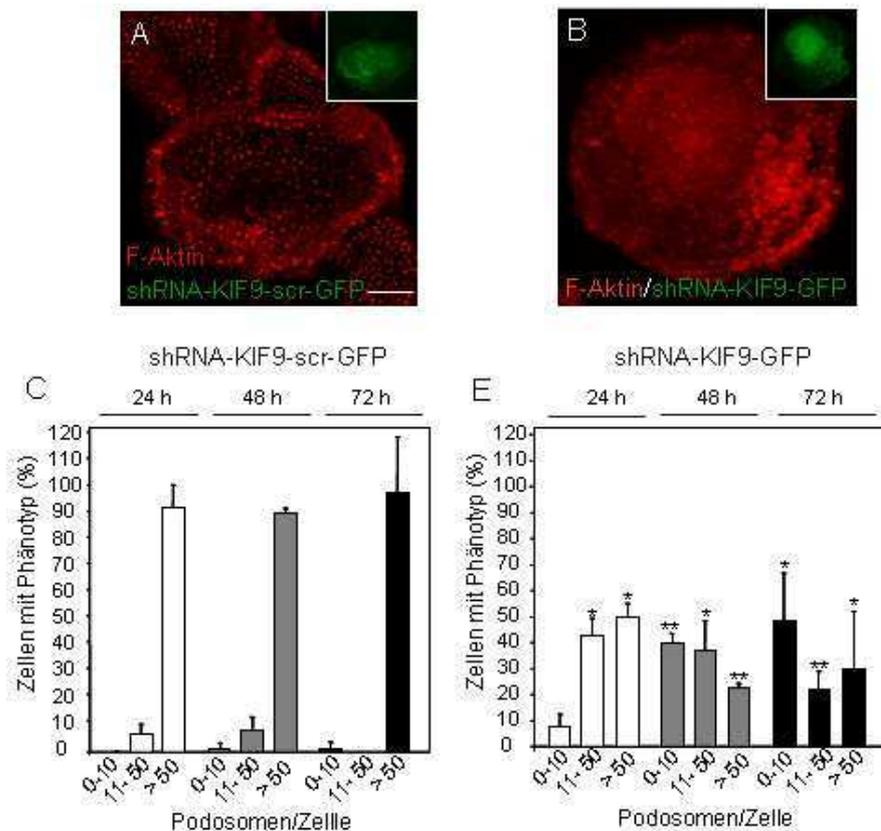


Abb. 3.18 KIF9-GFP beeinflusst die Anzahl der Podosomen. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, 72 h nach Transfektion mit einer shRNA einer *scrambled* Sequenz gegen KIF9 (A) oder einer spezifischen Sequenz gegen KIF9 (B). F-Aktin wurde mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Nach 72h haben Zellen, die mit spezifischer shRNA transfiziert wurden, weniger Podosomen als Zellen, die mit einer scrambled Sequenz transfiziert wurden. Weißer Balken: 10 μ m. (C,D) Quantifizierung der Podosomenbildung in primären humanen Makrophagen. Makrophagen wurden mit shRNA mit einer *scrambled* Sequenz (C) oder einer spezifischen Zielsequenz gegen KIF9 (D) transfiziert. Der Einfluss der shRNA wurde 24h, 48h und 72h nach Transfektion quantifiziert. In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

3.3.2 Subzelluläre Lokalisation von KIF9 in humanen Makrophagen

Wie die Ergebnisse der RNAi-Versuche zeigten, hat KIF9 einen deutlichen Einfluss auf die Podosomenbildung (s. 3.18). Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von KIF9 wurden der Vektor pEGFP-KIF9 hergestellt, d.h. an das Wildtyp KIF9-Gen wurde das Gen für EGFP angefügt. Abb. 3.19 zeigt eine konfokalmikroskopische Aufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit KIF9-GFP transfiziert wurde. Zur Sichtbarmachung von Podosomen wurde F-Aktin mit 568-Phalloidin gefärbt.

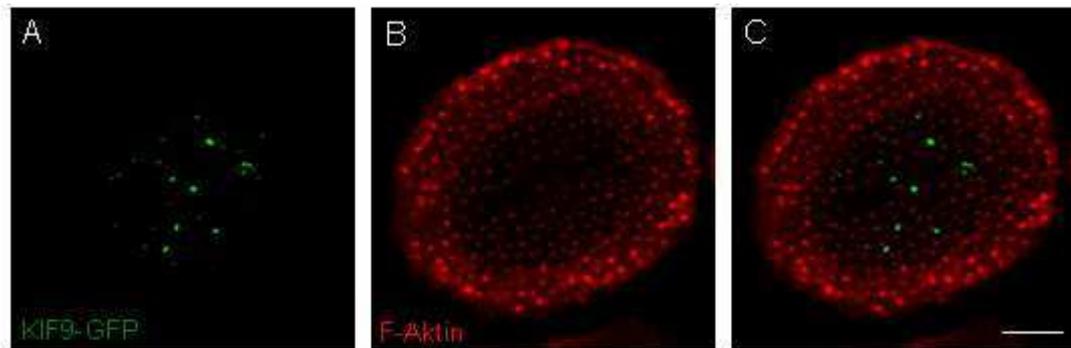


Abb. 3.19 KIF9 lokalisiert an Podosomen im Zellzentrum. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, transfiziert mit KIF9-GFP (grün, A), zur Sichtbarmachung der Podosomen wurde F-Aktin (rot, B) mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Die Überlagerung (C) zeigt, dass KIF9-GFP vor allem im Zentrum der Zelle lokalisiert. Weißer Balken: 10 μm

Im Unterschied zu KIF1C, das vor allem in der Zellperipherie lokalisiert, waren KIF9 Vesikel vor allem im Zentrum der Zelle zu beobachten (Abb. 3.19, A). Außerdem scheint KIF9 vor allem die stabileren Podosomen im Zentrum der Zelle zu kontaktieren (Abb. 3.19,C).

3.3.3 Differentielle subzelluläre Lokalisation von KIF1C und KIF9

Um zu überprüfen, ob KIF1C und KIF9 tatsächlich in unterschiedlichen Bereichen der Zelle lokalisieren, wurden primäre humane Makrophagen mit KIF9-GFP und KIF1C-TagRFP transfiziert.

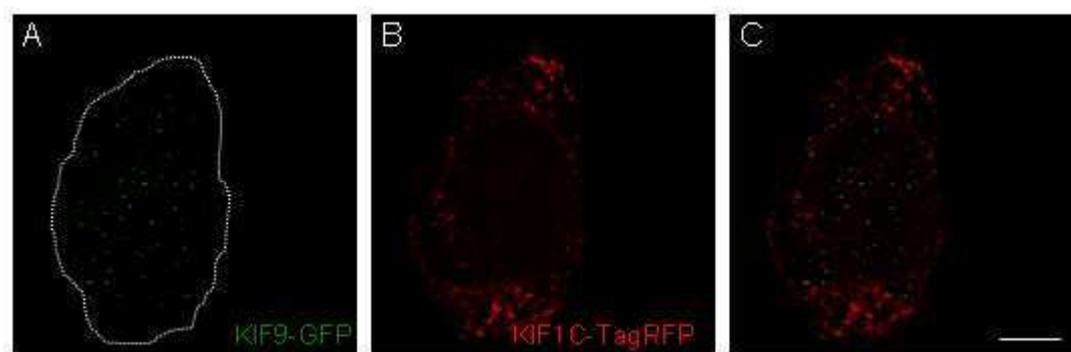


Abb. 3.20 KIF1C-TagRFP und KIF9-GFP lokalisieren an verschiedenen Vesikeln. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, transfiziert mit KIF9-GFP (grün, A) und KIF1C-TagRFP (rot, B). Die Überlagerung (C) zeigt, dass die Proteine in unterschiedlichen Bereichen der Zelle lokalisieren. Zur besseren Darstellung wurde die Zelle weiß umrandet. Weißer Balken: 10 μm .

Es konnte bestätigt werden, dass KIF9-GFP vor allem an kleineren Vesikeln in der Zellmitte lokalisiert (Abb. 3.20, A), wohingegen sich KIF1C-TagRFP in größeren Ak-

kumulationen in der Zellperipherie befindet (Abb. 3.20, B). Die Überlagerung (Abb. 3.20, C) zeigt, dass KIF9 und KIF1C nicht kolokalisieren und es sich somit um Kinesine mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation handelt.

3.3.4 KIF9-positive Vesikel kontaktieren Podosomen

Wie in Abb. 3.19 zu sehen ist, scheint KIF9 Podosomen im Zellzentrum zu kontaktieren.

Um eine mögliche Interaktion zwischen KIF9 Vesikeln und Podosomen zu prüfen, wurden primäre humane Makrophagen mit KIF9-GFP und β -Aktin-mRFP transfiziert und mittels *live cell imaging* (Abb. 3.21 und Film 5) untersucht. Dabei zeigte sich, dass KIF9-GFP Vesikel an der ventralen Zellseite lokalisierten und dynamisch Podosomen im Zellzentrum kontaktierten. Dies spricht möglicherweise für eine direkte Beteiligung von KIF9 an der Podosomenregulation .

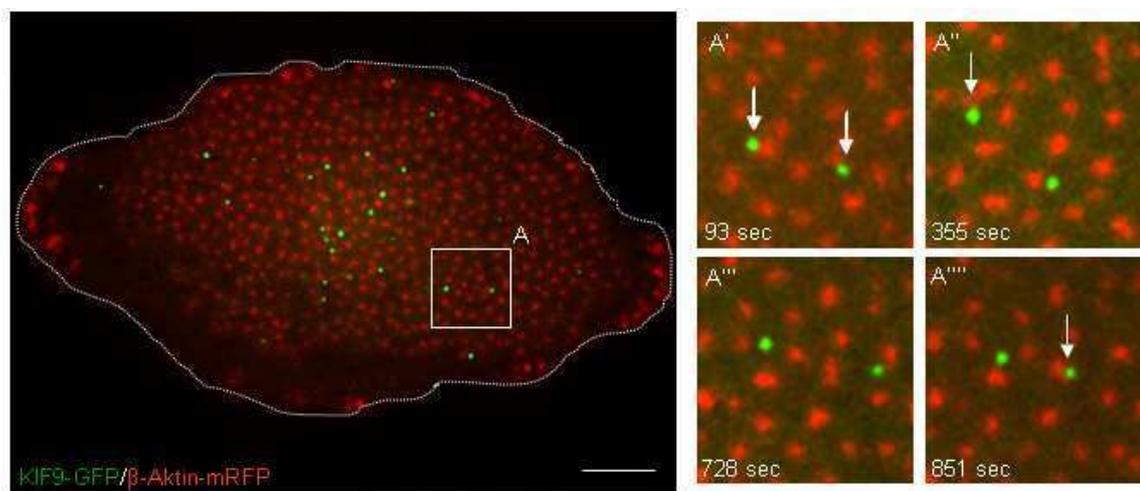


Abb. 3.21 KIF9-GFP kontaktiert Podosomen. Konfokalmikroskopische Momentaufnahme eines lebenden primären humanen Makrophagen, der mit KIF9-GFP (grün) und mRFP- β -Aktin (rot) zur Sichtbarmachung der Podosomen transfiziert wurde. Zur besseren Darstellung der Zelle wurde diese weiß umrandet. Die Ausschnittsvergrößerungen sind auf der rechten Seite dargestellt und wurden 93, 355, 728 and 851 sec nach Start des Experiments aufgenommen. Die weißen Pfeile zeigen den dynamischen Kontakt von KIF9-GFP Vesikeln in der Zellmitte an. In der Zellperipherie ist jedoch kein Kontakt erkennbar. Weißer Balken: 10 μ m.

Durch RNAi-Versuche konnte bereits ein Einfluss von KIF9 auf Podosomen in primären humanen Makrophagen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Durch oben darge-

stellte *live cell* Experimente konnte gezeigt werden, dass KIF9-GFP Podosomen dynamisch kontaktiert (s. Abb. 3.21).

Verfolgt man nun die Bewegung eines KIF9-GFP-Vesikels in lebenden Makrophagen, wird deutlich, dass nacheinander mehrere Podosomen kontaktiert werden (Abb. 3.22). Nach einer Verweildauer von wenigen Sekunden an den einzelnen Podosomen wanderte das KIF9-GFP-Vesikel weiter zum nächsten Podosom. Dies ist in Abb. 3.22 beispielhaft für drei ausgewählte Vesikel dargestellt. KIF9-GFP scheint also mehrere Podosomen nacheinander zu kontaktieren, die Wegstrecke, die dabei zurückgelegt wird, ist jedoch relativ kurz.

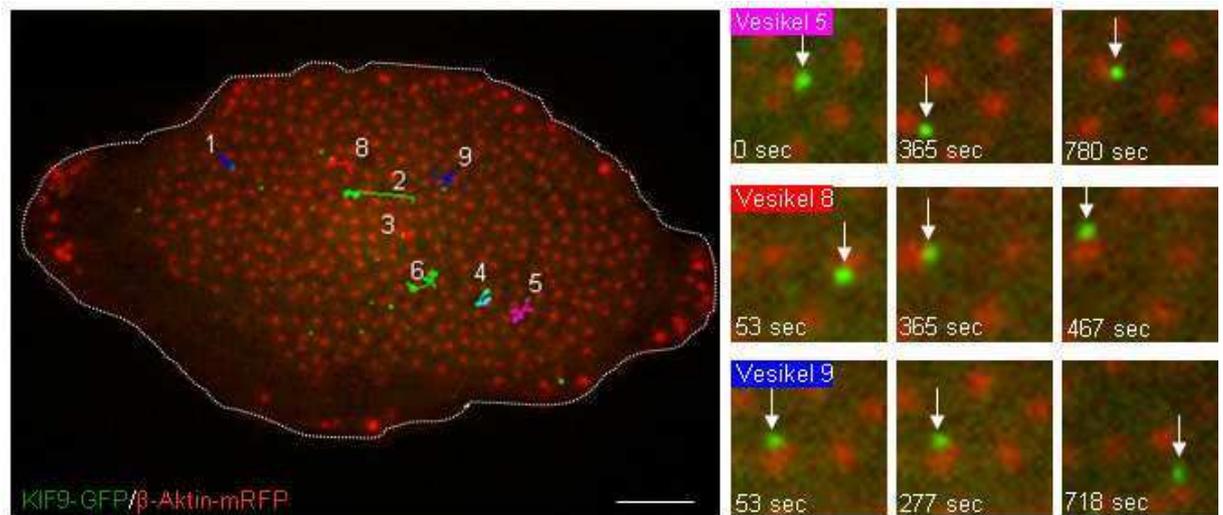


Abb. 3.22 KIF9-GFP kontaktiert mehrere Podosomen nacheinander. Konfokalmikroskopische Momentaufnahme eines lebenden primären humanen Makrophagen, der mit KIF9-GFP (grün) und mRFP-β-Aktin (rot) zur Sichtbarmachung der Podosomen transfiziert wurde. Zur besseren Darstellung der Zelle wurde diese weiß umrandet. Die durch Zahlen markierten Vesikel wurden mit Hilfe von Image J analysiert, die farbigen Linien zeigen den Weg des analysierten Vesikels. Die Ausschnittsvergrößerungen auf der rechten Seite zeigen, dass KIF9-GFP mehrere Podosomen nacheinander kontaktiert. Weißer Balken: 10 μm

Durch den Kontakt mit Podosomen erfolgt somit möglicherweise eine zielgenaue Anlieferung von Regulationsfaktoren, die dann wiederum einen Einfluss auf die Podosomendynamik haben.

3.3.5 KIF9-positive Vesikel assoziieren mit Mikrotubuli

Kopp *et al.* (2006) zeigten, dass KIF1C mit Mikrotubuli bzw. Mikrotubuli-Plusenden assoziiert. Infolgedessen wurde untersucht, ob diese Beziehungen auch für KIF9 bestehen. Hierzu wurden zunächst primäre humane Makrophagen mit KIF9-GFP transfiziert und Mikrotubuli durch Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen α -Tubulin sichtbar gemacht. Abb. 3.24 zeigt die Lokalisation von KIF9 vor allem im Zentrum der Zelle, in der Ausschnittsvergrößerung ist außerdem eine Kolo-kalisation mit Mikrotubuli erkennbar.

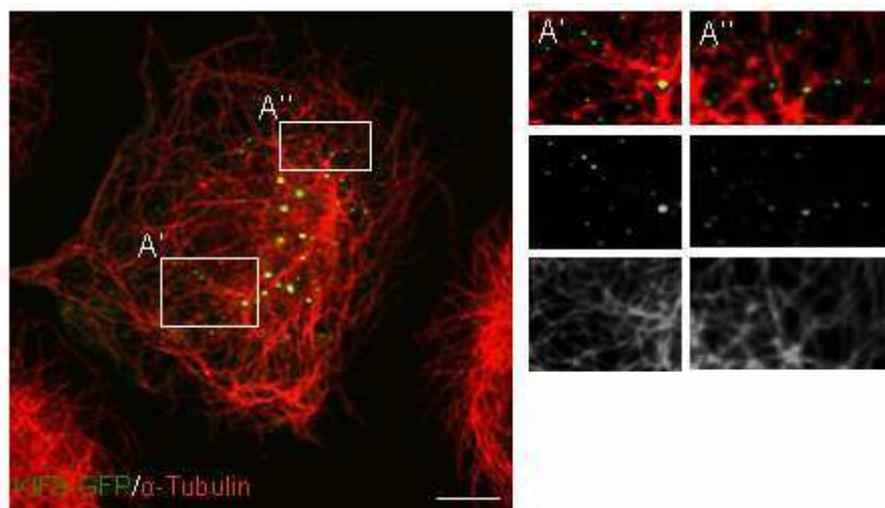


Abb. 3.23 KIF9-GFP kontaktiert Mikrotubuli. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit KIF9-GFP (grün) transfiziert wurde. α -Tubulin wurde mit einem spezifischen Antikörper gefärbt (rot). Die weiß umrahmten Bildausschnitte sind auf der rechten Seite vergrößert dargestellt. Weißer Balken: 10 μ m.

3.3.6 KIF1C und KIF9 lokalisieren an unterschiedlich modifizierten Mikrotubuli

Wie gezeigt, handelt es sich bei KIF1C um ein Kinesin, das vor allem Podosomen *Pre-cursor* kontaktiert, während KIF9 wahrscheinlich an den stabileren Podosomen im Zellzentrum lokalisiert. Daraus ergab sich die Frage, wie die Kinesine zu den unterschiedlichen Populationen innerhalb der Zelle gelangen, da sie sich alle an Mikrotubuli entlang bewegen.

Mikrotubuli werden durch die Polymerisierung von α - und β -Tubulin Untereinheiten gebildet, durch post-translationale Modifikationen entstehen jedoch auch strukturelle Unterschiede (Cai *et al.*, 2009). Cai *et al.* (2009) zeigten außerdem, dass unterschiedli-

che Kinesin-Motoren verschiedene Mikrotubuli-Subpopulationen für den Transport nutzen, um Vesikel zu verschiedenen subzellulären Kompartimenten zu transportieren.

Um zu untersuchen, ob KIF9 und KIF1C in humanen Makrophagen an unterschiedlich modifizierten Mikrotubuli lokalisieren, wurden die Proteine in primären humanen Makrophagen exprimiert und die fixierten Zellen gegen acetyliertes bzw. tyrosiniertes Tubulin gefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass KIF9 vorwiegend an acetyliertem Tubulin lokalisiert, das die inneren Bereiche der ventralen Zellseite kontaktiert (Abb. 3.24). KIF1C hingegen ist meist an tyrosiniertem Tubulin angereichert, das vorwiegend in der Zellperipherie lokalisiert (Abb. 3.25).

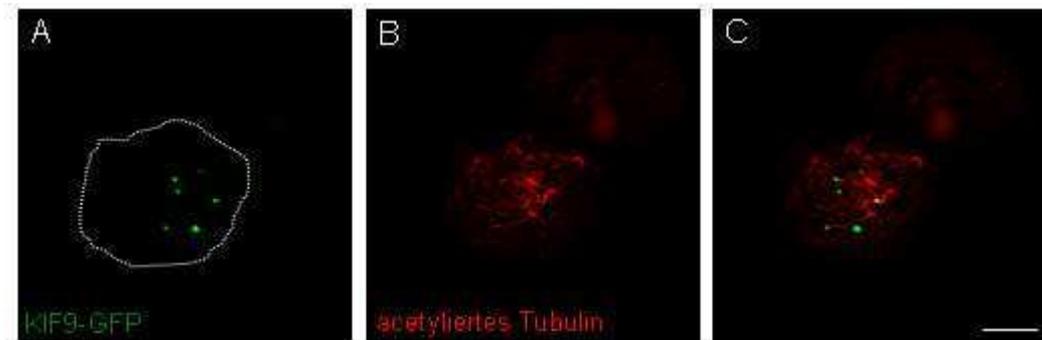


Abb. 3.24 KIF9-GFP lokalisiert vorwiegend an acetyliertem Tubulin. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, transfiziert mit KIF9-GFP (grün, A), acetyliertes Tubulin wurde mit einem spezifischen Antikörper gefärbt (rot, B). In der Überlagerung (C) ist erkennbar, dass KIF9-GFP hauptsächlich an acetyliertem Tubulin lokalisiert. Zur besseren Darstellung wurde die Zelle weiß umrandet. Weißer Balken: 10 µm

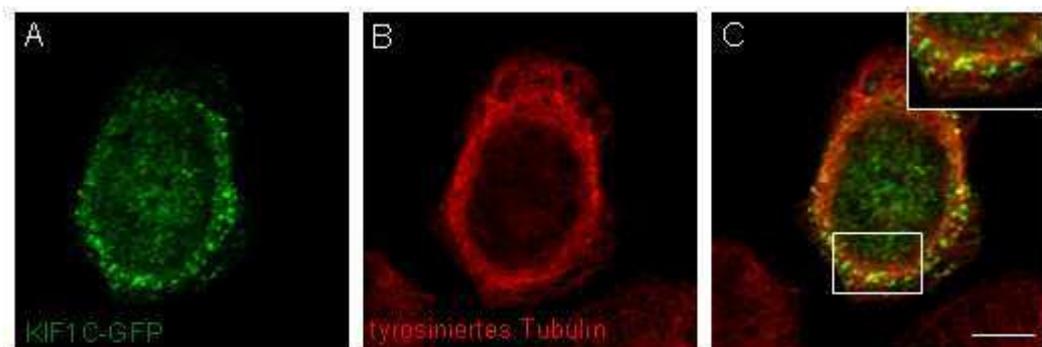


Abb. 3.25 KIF1C-GFP lokalisiert vorwiegend an tyrosiniertem Tubulin. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, transfiziert mit KIF1C-GFP (grün, A), tyrosiniertes Tubulin wurde mit einem spezifischen Antikörper gefärbt (rot, B). In der Überlagerung (C) ist erkennbar, dass KIF1C-GFP hauptsächlich an tyrosiniertem Tubulin in der Zellperipherie lokalisiert. Weißer Balken: 10 µm

3.3.7 Einfluss von KIF9 auf den Abbau extrazellulärer Matrix

Wie bereits in 3.3.1 durch *knock-down*-Versuche gezeigt wurde, ist KIF9 an der Regulation der Podosomen in primären humanen Makrophagen beteiligt.

Da Podosomen auch eine Rolle beim Abbau extrazellulärer Matrix spielen, sollte im Folgenden untersucht werden, ob KIF9 auch einen Einfluss auf den Matrixabbau ausübt. Hierzu wurde die RNAi-Technologie angewandt.

Da mittlerweile bekannt ist, dass bei Einsatz von siRNA eine Transfektionseffizienz > 90% erreicht wird, wurden hier primäre humane Makrophagen mit siRNA gegen KIF9 transfiziert. Die siRNA für KIF9 wurde in Zusammenarbeit mit T. Rudel (MPI für Infektionsbiologie, Berlin) entworfen. Eine Validierung mittels RT-PCR ergab einen *knock-down* von 85,6 %. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit siRNA gegen Luciferase (als unspezifische siRNA) transfiziert wurden. Nach einer Expressionszeit von 72 Stunden wurden die Zellen erneut mit siRNA transfiziert und anschließend auf *coverslips* ausgesät, die mit Rhodamin-markierter Gelatine beschichtet waren. Nach weiteren 5 Stunden wurden die Zellen fixiert und Podosomen durch Phalloidin-Färbung sichtbar gemacht. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass ein Effekt nur auf den Matrixabbau beobachtbar ist.

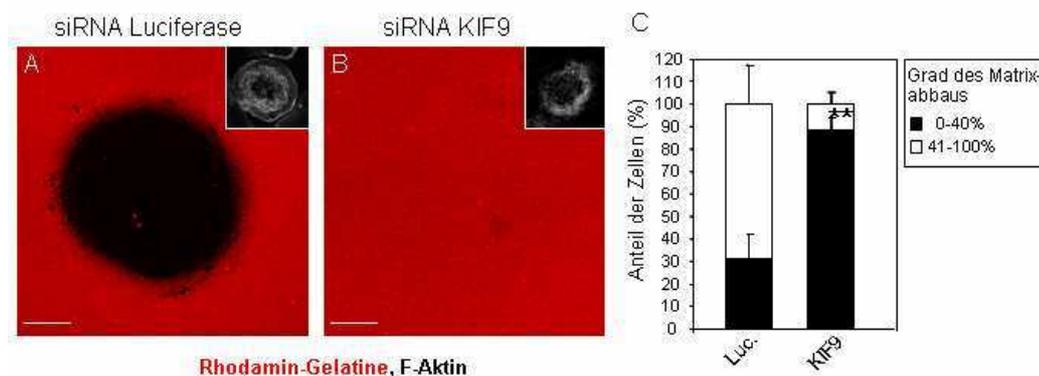


Abb. 3.26 Knock-down von KIF9 beeinflusst den Matrixabbau. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit einer siRNA spezifisch gegen Luciferase (A) oder spezifisch gegen KIF9 (B) transfiziert wurde. Die Zellen wurden auf Rhodamin-markierter Gelatine (rot) ausgesät. Die dunklen Flächen zeigen den Matrixabbau, F-Aktin wurde durch Cy5-markiertes Phalloidin sichtbar gemacht (weiß). Bei Einsatz der spezifischen siRNA gegen KIF9 wird keine Gelatine mehr abgebaut. Weißer Balken: 10 μ m. (C) Quantifizierung des Matrixabbaus in siRNA transfizierten Zellen. Die abgebaute Fläche wurde anhand des fehlenden Fluoreszenzsignals ermittelt. Die Zellen wurden gemäß des Matrixabbaus in Gruppen eingeteilt (0-40% und 41-100%). In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. **: $p < 0,01$

Die abgebaute Fläche wurde anhand des fehlenden Fluoreszenzsignals ermittelt, dafür wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 30 Zellen ausgewertet und anhand der Intensität des Matrixabbaus in zwei Gruppen eingeteilt (0-40% und 41-100%).

Der *knock-down* von KIF9 zeigte eine deutliche Verringerung des Matrixabbaus (s. Abb. 3.26, B): bei $88,6 \pm 5,0$ % der Zellen konnte ein verminderter Matrixabbau (0-40%) beobachtet werden, verglichen mit $31,0 \pm 10,6$ % der Zellen, die mit der Kontroll siRNA transfiziert wurden (Abb. 3.26, C).

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass KIF9 in primären humanen Makrophagen nicht nur die Ausbildung von Podosomen beeinflusst, sondern auch die Fähigkeit der Podosomen, extrazelluläre Matrix abzubauen.

3.3.8 Nachweis der endogenen Expression des Kinesins KIF9 in humanen Makrophagen

Die Expression von KIF9 in primären humanen Makrophagen wurde bereits von P. Kopp in unserem Labor nachgewiesen. Mittels reverser Transkriptase-PCR wurde mit spezifischen Oligonukleotiden für KIF9 mRNA aus 7 Tage alten Makrophagen in cDNA überführt. Als Kontrolle für die vollständige Entfernung von genomischer DNA wurden Oligonukleotide spezifisch für ein Exon im Gen für β -Aktin verwendet. 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 das PCR-Amplifikat in diesem Falle noch Introns enthielte. Die Bande bei 435 bp zeigt, dass KIF9 in primären humanen Makrophagen auf mRNA-Ebene vorhanden ist (s. Abb. 3.27).

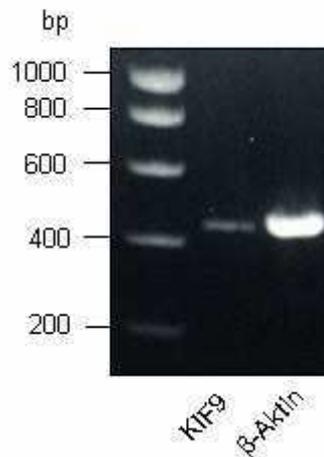


Abb. 3.27 KIF9 wird in primären humanen Makrophagen exprimiert. Reverse Transkriptase-PCR-Produkt eines Primerpaars spezifisch für KIF9 (links), Kontrollreaktion mit einem Primerpaar spezifisch für ein β -Aktin-Exon (mit freundlicher Genehmigung von Dr. P. Kopp).

KIF9 besitzt eine N-terminale Motordomäne mit einem ATP-bindenden *P-loop* sowie Mikrotubulibindestelle. Am C-Terminus befindet sich eine für KIF9 einzigartige Sequenz, die auch für die Bindung von Fracht verantwortlich ist. Der zentrale Bereich von KIF9 enthält Sequenzen, die möglicherweise *coiled-coil* Strukturen ausbilden können (s. Abb. 3.29).

Um KIF9 in primären humanen Makrophagen zu detektieren, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen den C-terminalen Bereich von KIF9 (AS 710-790) als Teil eines GST-Fusionsproteins (GST-KIF9-CT81) generiert. Durch Thrombinspaltung wurde der GST-Anteil des Fusionsproteins anschließend entfernt. Im Immunblot konnte mit diesem Antikörper die entsprechende KIF9-Sequenz als Teil des GST-CT81 Fusionsproteins detektiert werden (nicht gezeigt).

Wie viele andere Mitglieder der Kinesin Superfamilie liegt KIF9 sehr wahrscheinlich als Dimer vor (Pfister *et al.*, 1989; Piddini *et al.*, 2001), was aufgrund der *coiled-coil* Sequenz möglich wäre.

Da eine Detektion von KIF9 in Makrophagenlysaten nicht möglich war, sollte endogenes KIF9 durch Kopräzipitation mit überexprimiertem KIF9-GFP aufkonzentriert werden. Hierzu wurden GFP-Immunpräzipitationen von Lysaten KIF9-GFP bzw. GFP transfizierter Makrophagen durchgeführt. Der linke *Western blot* in Abb. 3.28 wurde mit einem Antikörper gegen GFP entwickelt und zeigt die erfolgreiche Durchführung der

GFP-Immunpräzipitation. Der rechte *Western blot* (Abb. 3.28) wurde mit dem Antikörper gegen KIF9 (KIF9-CT81) entwickelt und zeigt eine Bande, die dem KIF9-GFP Fusionskonstrukt entspricht. Zusätzlich sind zwei Banden zwischen 85-90 kD zu sehen. Die Doppelbande könnte darauf hindeuten, dass durch alternatives Spleißen eine weitere Isoform von KIF9 vorliegt. Möglicherweise handelt es sich aber auch um eine posttranslationale Modifikation von KIF9, beispielsweise eine Phosphorylierung. Daneben wäre auch denkbar, dass es sich um teilweise degradiertes Protein handelt.

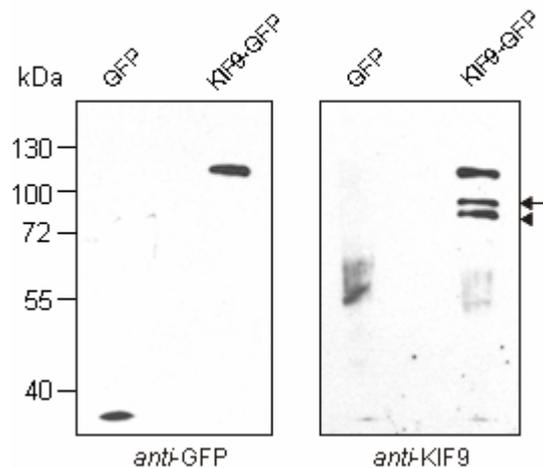


Abb. 3.28 KIF9 wird in primären humanen Makrophagen exprimiert und bildet Oligomere. GFP-Immunpräzipitation primärer humaner Makrophagen, die mit GFP (linke Bande) bzw. KIF9-GFP (rechte Bande) transfiziert wurden. Der *Western blot* wurde mit anti-GFP-Antikörper bzw. mit einem gegen KIF9 gerichteten Antikörper (KIF9-CT81) entwickelt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass endogenes KIF9 zusammen mit überexprimiertem KIF9-GFP kopräzipitiert werden kann, was wahrscheinlich an der Bildung von (Hetero-) Dimeren liegt.

3.3.9 Der Carboxy-Terminus von KIF9 induziert eine Dispergierung des Golgi-Apparates

Um die Domänen zu identifizieren, die für die Effekte von KIF9 auf Podosomen verantwortlich sind, wurden mehrere Trunkationskonstrukte hergestellt (Abb. 3.29). Von besonderer Bedeutung war dabei der C-terminale Teil, da hier die Bindungsstelle für Vesikel und/oder assoziierte Proteine lokalisiert ist. Hierzu wurde die Nukleotidsequenz der letzten 402 oder 81 C-terminalen Aminosäuren in den GFP-N1-Vektor kloniert (KIF9-CT402-GFP bzw. KIF9-CT81-GFP) und in primären humanen Makrophagen

exprimiert. Podosomen wurden durch Färbung von F-Aktin mit Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemacht.

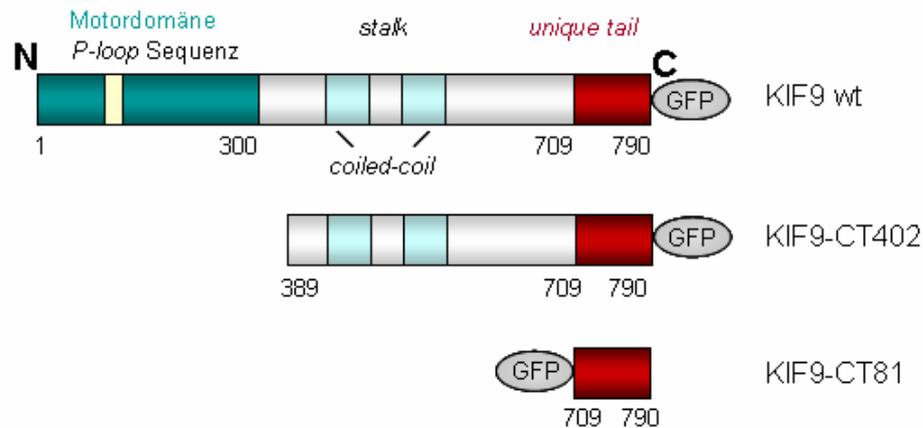


Abb. 3.29 Schematische Darstellung der Domänenstruktur von KIF9 sowie verwendeter Expressionskonstrukte. Motordomäne (grün) mit *P-loop*-Sequenz für die ATP-Bindung (gelb), *stalk*: stalk Domäne (grau), *unique tail*: für KIF9 spezifische Sequenz am C-Terminus (rot). Die hellblauen Kästchen innerhalb der *stalk*-Domäne stellen die potentiellen *coiled-coil* Sequenzen dar.

Abb. 3.30 (B) zeigt die Lokalisation des Volllängen-Konstrukts, das vor allem die Podosomen im Zellzentrum kontaktiert. KIF9-CT402-GFP lokalisiert als vesikuläre Strukturen (Abb. 3.30, E) und weist eine ähnliche Lokalisation wie das Volllängenkonstrukt auf. Dies liegt möglicherweise an einer Dimerisierung mit endogenem KIF9. Dies könnte durch die *stalk*-Domäne, die putative *coiled-coil*-Domänen enthält, ermöglicht werden. Ähnlich dem Volllängenkonstrukt wurde bei der Expression von KIF9-CT402-GFP keine Veränderung hinsichtlich Lebensfähigkeit der Zellen oder Physiologie der Podosomen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu fällt bei der Expression von GFP-KIF9-CT81 (Abb. 3.30, H) eine ringartige Akkumulation im Inneren der Zelle auf. Außerdem scheinen die Vesikel zu verklumpen und sind nicht mehr einzeln erkennbar. Dieser Phänotyp war bereits 6-7 Stunden nach Transfektion erkennbar. Danach lösten sich transfizierte Zellen meist vom *coverslip* ab, was auf einen deutlichen Einfluss von GFP-KIF9-CT81 auf die Lebensdauer von Makrophagen hindeutet (nicht gezeigt).

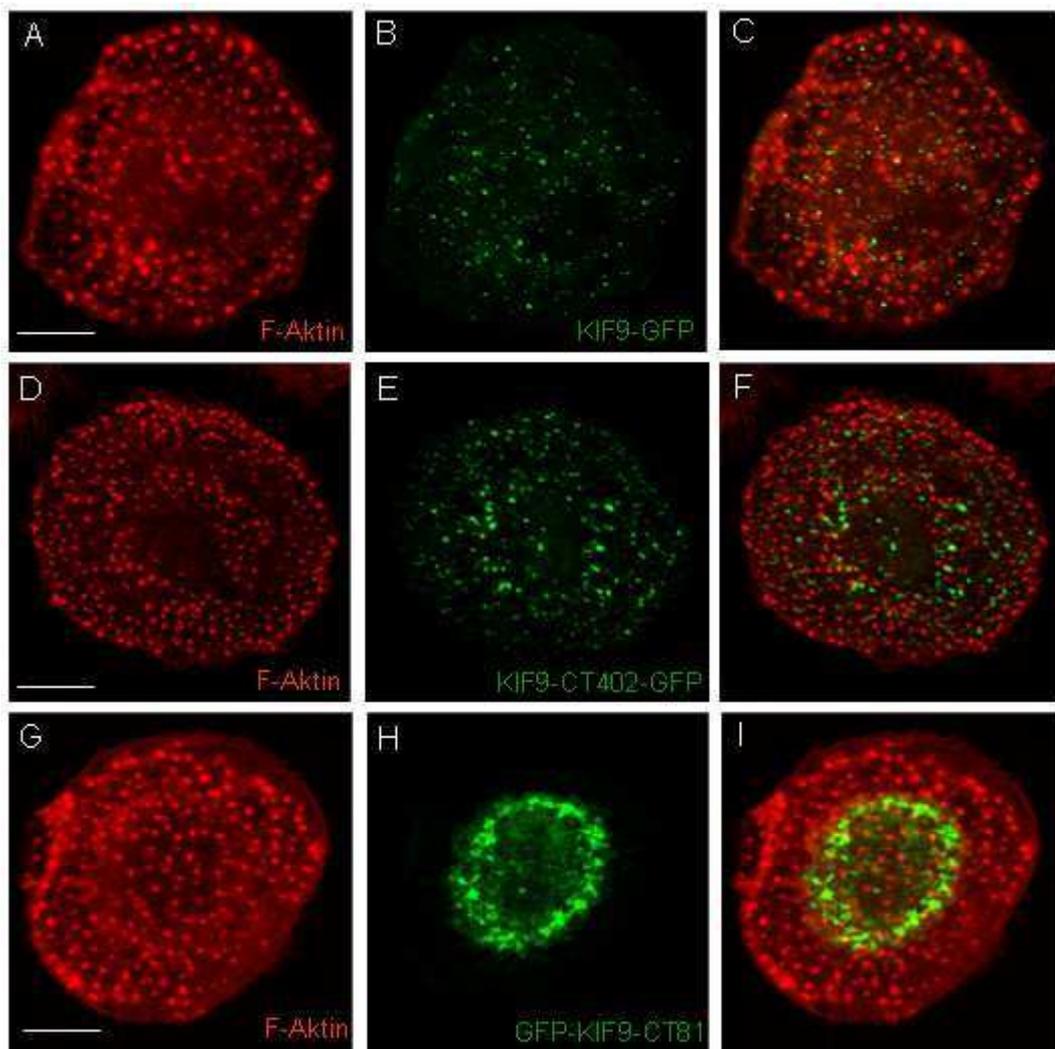


Abb. 3.30 Immunfluoreszenzaufnahmen, die die Expression unterschiedlicher KIF9-GFP Konstrukte in primären humanen Makrophagen zeigen. (A-I) F-Aktin (rot) wurde durch Färbung mit Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemacht. (A) KIF9-GFP (B) KIF9-CT402-GFP (C) GFP-KIF9-CT81. Das rechte Bild zeigt jeweils die Überlagerung der beiden Bilder links daneben. Weißer Balken: 10 μ m.

Um die Lokalisation und Effekte von GFP-KIF9-CT81 genauer zu untersuchen, wurden primäre humane Makrophagen mit GFP-KIF9-CT81 transfiziert (Abb. 3.31, A) und gegen zahlreiche vesikuläre und zytoskelettale Proteine gefärbt. Dabei wurde eine partielle Kolokalisation mit Proteinen des Golgi-Apparates, z.B. TGN46, der am *trans* Golgi-Netzwerk lokalisiert, beobachtet (s. Abb. 3.31). Die Überlagerung (Abb. 3.31, C) zeigt eine räumliche Nähe von KIF9-CT81-GFP zum Golgi-Apparat sowie eine partielle Kolokalisation. Weiter fällt auf, dass der Golgi-Apparat in transfizierten Zellen weniger kompakt ist als in untransfizierten Zellen (Abb. 3.31, B). Diese Beobachtung konnte durch quantitative Auswertung bestätigt werden (Abb. 3.31, D). $93,3 \pm 2,6$ % der KIF9-CT81-GFP transfizierten Zellen wiesen einen dispergierten Golgi-Apparat auf. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Leervektor pEGFP-N1 transfiziert wurden. Hier

zeigten nur $13,3 \pm 8,8$ % der Zellen einen dispergierten Golgi-Apparat. Die Expression des C-terminalen Teils von KIF9 scheint also mit der Integrität des Golgi-Apparates zu interferieren, was die Lebensfähigkeit der Zellen beeinflussen könnte.

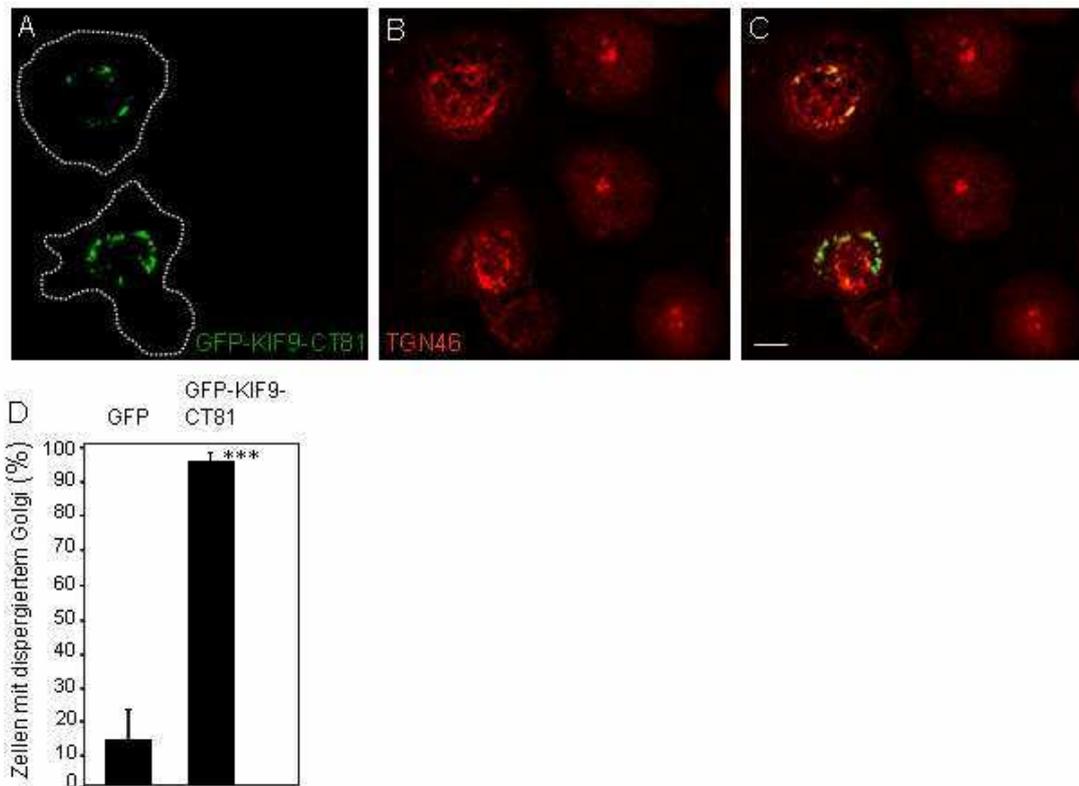


Abb. 3.31 Die Expression von KIF9-CT81-GFP beeinflusst die Integrität des Golgi-Apparates. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit KIF9-CT81-GFP transfiziert wurde (grün, A). Nach 7-stündiger Expressionszeit wurde die Zelle fixiert und das trans-Golgi-Netzwerk mit einem Antikörper (anti-TGN46) sichtbar gemacht (rot, B). Die Überlagerung (C) zeigt, dass der Golgi-Apparat in transfizierten Zellen weniger kompakt ist als in untransfizierten Zellen. Zur besseren Sichtbarmachung wurden die Zellen weiß umrandet. Weißer Balken: 10 μ m. (D) Quantifizierung der Golgi-Integrität 7h nach Transfektion von KIF9-CT81-GFP bzw. GFP als Kontrolle. In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. ***: $p < 0,0005$. Bei der Expression von GFP-KIF9-CT81 weisen nur $6,7 \pm 2,6$ % der Zellen einen kompakten Golgi-Apparat auf, bei Expression des GFP-Leervektors sind es hingegen $86,7 \pm 8,8$ %.

Bei der Expression von GFP-KIF9-CT81 war oftmals ein Verlust von Podosomen zu beobachten, was jedoch auch an der Ablösung der Zellen vom Deckgläschen liegen könnte. Um spezifische Effekte des C-Terminus von KIF9 zu untersuchen, wurde bereits durch P. Kopp ein GST-fusioniertes Konstrukt (GST-KIF9-CT81) hergestellt. Durch Mikroinjektion konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Teil von KIF9 die Neubildung von Podosomen unterbindet (nicht gezeigt). Daraus kann man schließen,

dass der C-Terminus von KIF9 für die Neuausbildung von Podosomen von Bedeutung ist.

3.3.10 Reggie-1/-2 als Interaktionspartner von KIF9

Als nächstes sollten potentielle Interaktionspartner des KIF9 C-Terminus mittels Immunpräzipitation identifiziert werden. Da die Expression von GFP-KIF9-CT81 nachweislich Effekte zeigt, wurden mit GFP-KIF9-CT81 transfizierte Makrophagen verwendet. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen an GFP wurden Zellen verwendet, die mit dem Leervektor pEGFP-N1 transfiziert wurden. Abb. 3.32 (A) zeigt ein mit Silbernitrat gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, bei dem im Lysat GFP-KIF9-CT81 transfizierter Zellen im Vergleich zur Kontrolle zusätzliche Banden zu sehen sind. Die Gelbanden wurden anschließend ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert. Ein Proteinsignal mit einer molekularen Masse von ca. 42 kD wurde dabei als Reggie-1 bzw. Reggie-2 identifiziert (Abb. 3.32, A, schwarzer Pfeil auf der rechten Seite). Die schwarze Pfeilspitze im Präzipitat der GFP-KIF9-CT81 transfizierten Makrophagen zeigt GFP-KIF9-CT81 an. Der schwarze Pfeil auf der linken Seite weist auf den präzipitierten GFP-Leervektor.

Daraufhin sollte ein möglicher Kontakt zwischen KIF9 und Reggie-1 untersucht werden. Da die erhältlichen Antikörper gegen Reggie-1 und KIF9 für Immunpräzipitationen nicht geeignet sind, wurden entweder KIF9-GFP oder Reggie-1-GFP in primären humanen Makrophagen exprimiert und anschließend eine anti-GFP-Immunpräzipitation der Makrophagen-Lysate durchgeführt. Abb. 3.32 zeigt, dass KIF9-GFP mit internem Reggie-1 (B) bzw. Reggie-1-GFP mit internem KIF9 (C) kopräzipitiert.

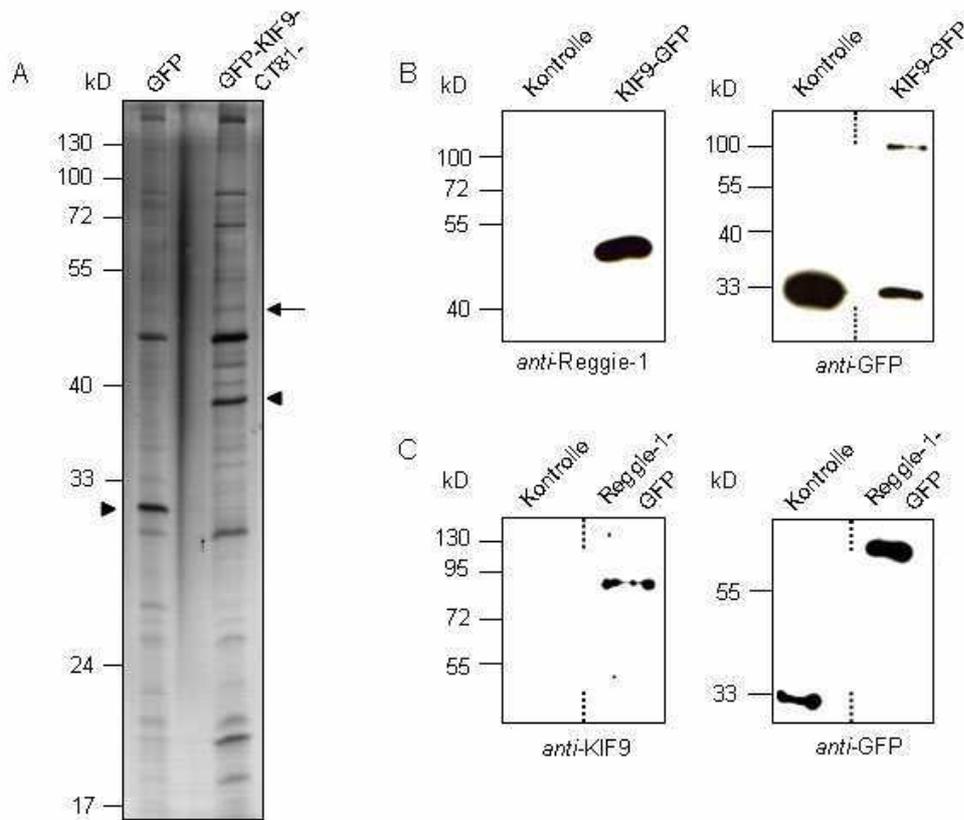


Abb. 3.32 KIF9 interagiert mit Reggie-1/-2. (A) Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels, auf das ein Aliquot der GFP-Immunpräzipitation aufgetragen wurde. Primäre humane Makrophagen wurden mit GFP-KIF9-CT81 transfiziert, 7h inkubiert und eine anti-GFP-Immunpräzipitation durchgeführt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit pEGFP-N1 transfiziert wurden. Die Banden wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. Der schwarze Pfeil der rechten Seite weist auf eine Proteinbande, die als Reggie-1/-2 identifiziert wurde, die Pfeilspitze auf GFP-KIF9-CT81. Die Pfeilspitze auf der linken Seite zeigt den präzipitierten GFP-Leervektor an. (B) Nachweis der Interaktion von KIF9-GFP und Reggie-1 (links). Der Einsatz eines GFP-Antikörpers zeigt die erfolgreiche Durchführung der IP (rechts). Als Kontrolle wurden jeweils Zellen verwendet, die mit dem Leervektor GFP-N1 transfiziert wurden. (C) Nachweis der Interaktion von Reggie-1-GFP und KIF9 (links). Der Einsatz eines GFP-Antikörpers zeigt die erfolgreiche Durchführung der IP (rechts). Als Kontrolle wurden jeweils Zellen verwendet, die mit dem Leervektor GFP-N1 transfiziert wurden.

In weiteren Versuchen wurden primäre humane Makrophagen mit Reggie-1-GFP und KIF9-HA kotransfiziert und wiederum eine anti-GFP-Immunpräzipitation der Lysate durchgeführt. Hier konnte ebenfalls eine Kopräzipitation von KIF9-HA mit Reggie-1-GFP bestätigt werden (nicht gezeigt).

Diese Daten sprechen für eine starke Interaktion zwischen KIF9 und Reggie-1.

Um die biochemischen Daten zu bestätigen, wurden zuerst fixierte humane Makrophagen hinsichtlich Kollokalisation von KIF9 und Reggie-1/-2 untersucht. Da der anti-KIF9-Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen nicht geeignet war, wurde GFP- oder

TagRFP-fusioniertes KIF9 in humanen Makrophagen überexprimiert und mit einem Antikörper gegen Reggie-1 gefärbt. Abb. 3.33 (A) zeigt eine ringartige Lokalisation von GFP-KIF9-CT81 in der Zellmitte, Reggie-1 zeigt ebenfalls Akkumulationen im Zentrum der Zelle (Abb. 3.33, B). In der Überlagerung (Abb. 3.33, C) der Signale ist partielle Kolokalisation der beiden Proteine erkennbar. Die Koexpression des Volllängen-Proteins von KIF9 (KIF9-mCherry, Abb. 3.33, E) mit Reggie-1-GFP (Abb. 3.33, D) zeigt in der Überlagerung (Abb. 3.33, F) eine Kolokalisation der Vesikel in der Zellmitte. Die Lokalisation von endogenem Reggie-2 im Zusammenhang mit GFP-KIF9-CT81 konnte leider nicht gezeigt werden, da der Antikörper in der Immunfluoreszenzfärbung keine zufrieden stellenden Ergebnisse lieferte. Wie jedoch auch für Reggie-1-GFP konnte bei der Koexpression des Volllängen-Proteins von KIF9 (KIF9-mCherry, Abb. 3.33, H) mit Reggie-2-GFP (Abb. 3.33, G) eine Kolokalisation der beiden Proteine in der Zellmitte beobachtet werden (Abb. 3.33, I).

Die bisher gezeigten Ergebnisse stammen aus Untersuchungen in fixierten Makrophagen. Daher wurde im Folgenden der Kontakt von KIF9-mCherry mit Reggie-1-GFP in lebenden Zellen beobachtet (Abb. 3.33, J und Film 6). Wie in fixierten Zellen lokalisieren sowohl KIF9-mCherry als auch Reggie-1-GFP Vesikel im Zellzentrum. Weiter war zu beobachten, dass die Kolokalisation zwischen Reggie-1 und KIF9 nicht beständig, sondern ein dynamischer Prozess ist, bei dem zwei Vesikelpopulationen in „*kiss-and-run*“ Ereignissen interagieren. Abb. 3.33 J', J'' und J''' zeigen jeweils einen Ausschnitt einer transfizierten Zelle einer konfokalmikroskopischen Aufnahme eines lebenden primären humanen Makrophagen. Zusammengefasst sprechen diese Daten dafür, dass Reggie und KIF9 in lebenden Makrophagen dynamisch kolokalisieren, was wahrscheinlich durch den C-Terminus von KIF9 vermittelt wird.

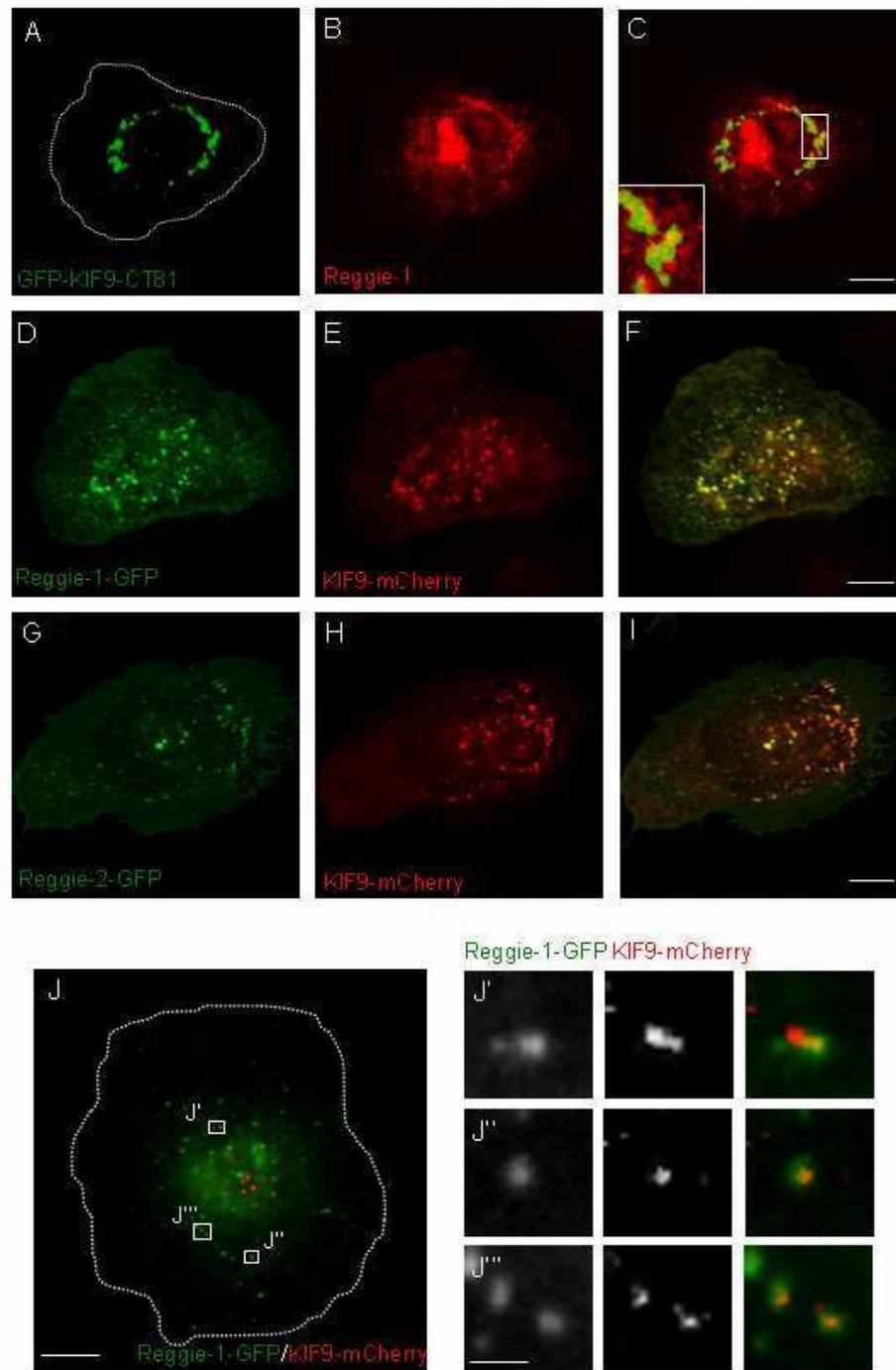


Abb. 3.33 KIF9 kolokalisiert partiell mit Reggie-1/-2. (A-J) Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit GFP-KIF9-CT81 (grün, A) transfiziert wurde. Reggie-1 wurde mit einem Antikörper (rot, B) sichtbar gemacht. Die Überlagerung (C) zeigt eine Akkumulation des Reggie-1 Signals in räumlicher Nähe zu GFP-KIF9-CT81. Zur besseren Sichtbarmachung wurde die Zelle weiß umrandet. (D-F) Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit Reggie-1-GFP (grün, D) und KIF9-mCherry (rot, E) transfiziert wurde. Die Überlagerung (F) zeigt eine partielle Kolokalisation der beiden Proteine. (G-I) Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit Reggie-2-GFP (grün, G) und KIF9-mCherry (rot, H) transfiziert wurde. Die Überlagerung (I) zeigt eine partielle Kolokalisation der beiden Proteine. Weißer Balken: 10 µm. (J) Konfokalmikroskopische Momentaufnahme eines lebenden primären humanen Makrophagen, der mit Reggie-1-GFP (grün) und KIF9-mCherry (rot) transfiziert wurde. Zur besseren Sichtbarmachung wurde die Zelle weiß umrandet. Weißer Balken: 10 µm. (J'-J''') Ausschnittsvergrößerungen aus J. Weißer Balken: 1 µm.

3.3.11 Eine verminderte Expression von Reggie-1/-2 verringert den Abbau extrazellulärer Matrix

Als nächstes wurde untersucht, ob Reggie-Protein, vergleichbar mit dem Interaktor KIF9, an der Regulation der Podosomen beteiligt sind. Um einen möglichen Einfluss auf die Anzahl der Podosomen zu überprüfen, wurden primäre humane Makrophagen mit siRNA gegen Reggie-1, Reggie-2 oder einer Kombination aus beiden siRNAs transfiziert. Reggie-spezifische Sequenzen wurden nach Solis *et al.* (Solis *et al.*, 2007) entworfen, da hier die Funktionalität der siRNAs auf mRNA- und Proteinebene bereits gezeigt werden konnte. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit siRNA gegen Luciferase transfiziert wurden. Nach einer Expressionszeit von 72 Stunden wurden die Zellen fixiert und mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt, um Podosomen sichtbar zu machen.

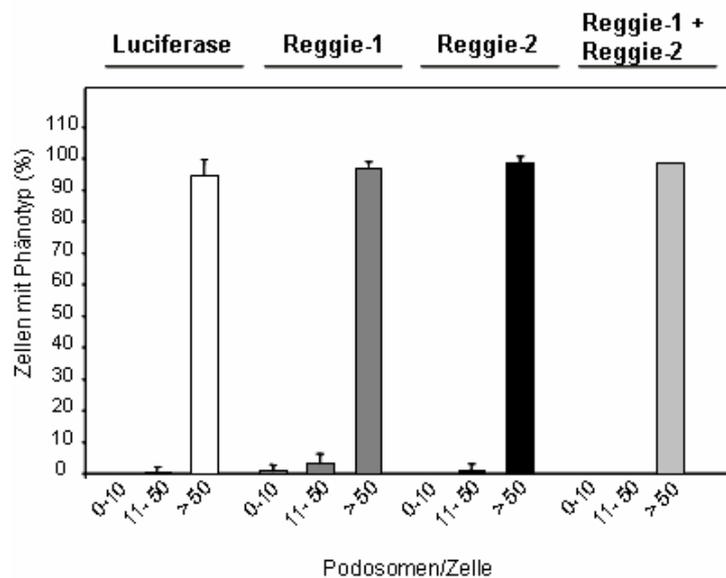


Abb. 3.34 Knock-down von Reggie hat keinen Einfluss auf die Anzahl der Podosomen. Quantifizierung der Podosomenbildung in primären humanen Makrophagen. Makrophagen wurden mit siRNA gegen Reggie-1, Reggie-2 oder Reggie-1 + Reggie-2 transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit siRNA gegen Luciferase transfiziert wurden. Der Einfluss der siRNA wurde 72h nach Transfektion quantifiziert. In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Zwischen spezifisch transfizierten Zellen und Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, war kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl der Podosomen zu beobachten. Daraus kann man schließen, dass der *knock-down* von Reggie keinen Einfluss auf die Anzahl der Podosomen in primären humanen Makrophagen hat.

Um einen eventuellen Einfluss der Reggie-Proteine auf den podosomalen Matrixabbau zu bestimmen, wurden primäre humane Makrophagen mit siRNA gegen Reggie-1, Reggie-2 oder einer Kombination aus beiden siRNAs transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit siRNA gegen Luciferase (als unspezifische siRNA) transfiziert wurden. Nach einer Expressionszeit von 72 Stunden wurden die Zellen erneut mit siRNA transfiziert und anschließend auf *coverslips* ausgesät, die mit Rhodamin-markierter Gelatine beschichtet waren. Nach weiteren 5 Stunden wurden die Zellen fixiert und Podosomen durch Phalloidin-Färbung sichtbar gemacht.

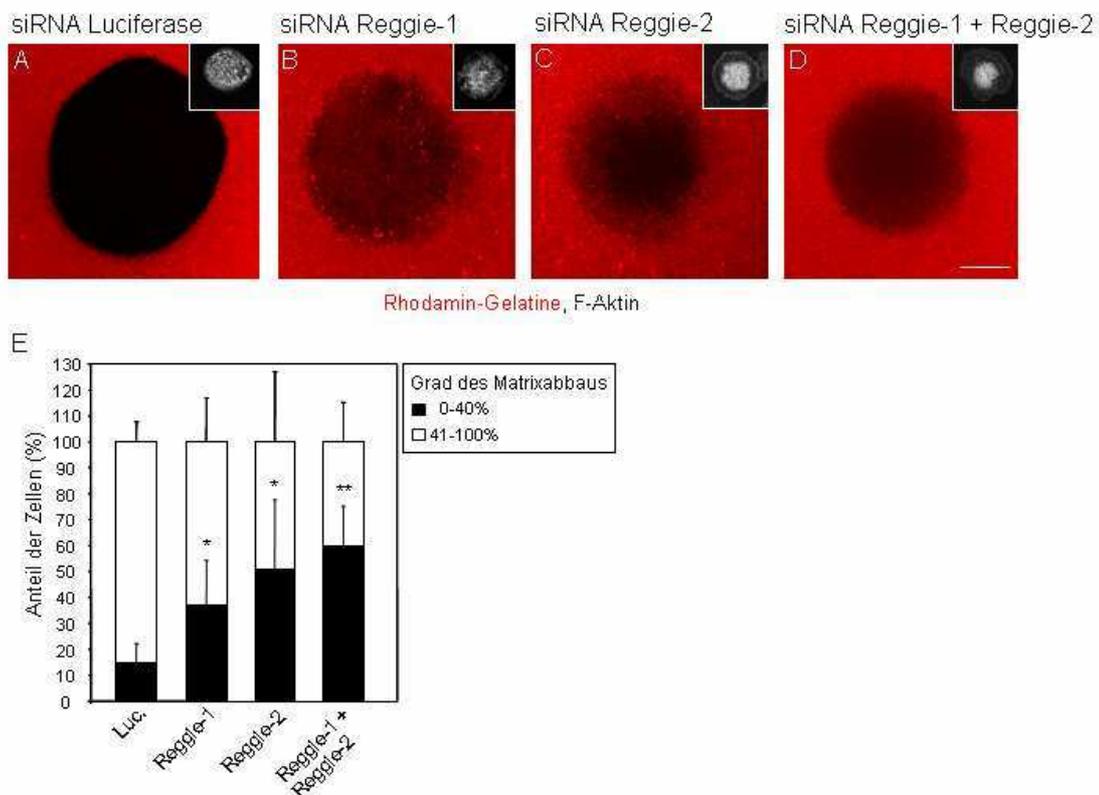


Abb. 3.35 Knock-down von reggie-1/-2 beeinflusst den Matrixabbau. Immunfluoreszenzaufnahmen primärer humaner Makrophagen, die mit einer siRNA spezifisch gegen Luciferase (A), spezifisch gegen Reggie-1 (B) oder spezifisch gegen Reggie-2 (C) oder einer Kombination beider siRNAs (D) transfiziert wurden. Die Zellen wurden auf Rhodamin-markierter Gelatine (rot) ausgesät. Die dunklen Flächen zeigen den Matrixabbau, F-Aktin wurde durch Cy5-markiertes Phalloidin sichtbar gemacht (weiß). Weißer Balken: 10 μ m. (E) Quantifizierung des Matrixabbaus in siRNA transfizierten Zellen. Das Ausmaß des Matrixabbaus wurde durch Analyse der Fluoreszenz gemessen. Die Zellen wurden gemäß des Matrixabbaus in Gruppen eingeteilt (0-40% und 41-100%). In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Abb. 3.35 zeigt, dass siRNA gegen Reggie-1 (Abb. 3.35, B) bzw. Reggie-2 (Abb. 3.35, C) den Abbau der Rhodamin-markierten Gelatine verringert. Bei einer Kombination der beiden spezifischen siRNAs (Abb. 3.35, D) war der Matrixabbau im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.X, A) noch weiter reduziert. Die quantitative Auswertung (Abb. 3.35, E)

ergab, dass bei *knock-down* von Reggie-1 $37,3 \pm 16,6$ % der Zellen, bei *knock-down* von Reggie-2 $50,6 \pm 26,6$ % der Zellen einen verringerten Matrixabbau (0-40 %) aufwiesen. Bei einer Kombination beider siRNAs stieg dieser Wert sogar auf $60,0 \pm 15,0$ %. Im Vergleich dazu wiesen nur $14,6 \pm 7,6$ % der Kontrollzellen einen verringerten Matrixabbau auf.

Vergleicht man die endogene Reduktion von Reggie-1 mit Reggie-2, so ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Der *knock-down* von Reggie-1 bzw. Reggie-2 hingegen zeigte einen signifikanten, der gleichzeitige *knock-down* beider Proteine sogar einen hochsignifikanten Unterschied hinsichtlich Matrixabbau im Vergleich zu Kontrollzellen.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass Reggie-Proteine, wie auch KIF9, in humanen Makrophagen am Matrix-Abbau oder an der Regulation des Matrix-Abbaus beteiligt sind.

3.4 Supervillin

Wie bereits erläutert, besitzen humane Makrophagen zwei Podosomen-Subpopulationen: größere, sog. *Precursor* und kleinere, stabilere Podosomen, welche sich in Größe, Dynamik und subzellulärer Lokalisation unterscheiden (Evans *et al.*, 2003; Kopp *et al.*, 2006). Dieser Unterschied ist besonders in polarisierten Makrophagen ausgeprägt, wo *Precursor* am *leading edge* und reguläre Podosomen im hinteren Bereich der Zelle lokalisieren. In ruhenden, d.h. radiärsymmetrischen Zellen, lokalisieren *Precursor* in der Zellperipherie und reguläre Podosomen im Zellzentrum.

3.4.1 Supervillin lokalisiert an eine Subpopulation von Podosomen

Um mögliche Unterschiede der molekularen Zusammensetzung der Podosomen-Subpopulationen aufzudecken, wurden primäre humane Makrophagen mit verschiedenen GFP-fusionierten Konstrukten von Zytoskelett-Proteinen transfiziert und gegen F-Aktin gefärbt, um Podosomen sichtbar zu machen. Dabei zeigte sich, dass GFP-Supervillin v.a. an den regulären Podosomen im hinteren Bereich der Zelle lokalisiert

(Abb. 3.36). Zusätzlich wurde eine Anreicherung von GFP-Supervillin am Zellcortex des *trailing edge* (Abb. 3.36, A) beobachtet. Dadurch konnte erstmals eine unterschiedliche molekulare Zusammensetzung von Podosomen gezeigt werden.

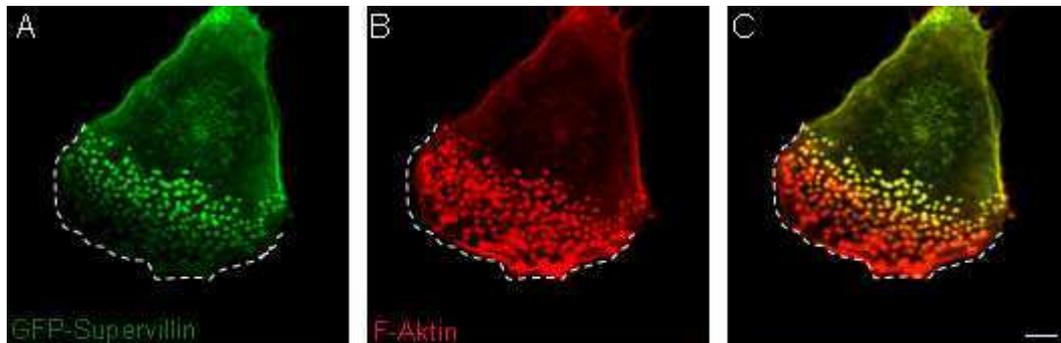


Abb. 3.36 GFP-Supervillin lokalisiert an eine bestimmte Podosomen-Subpopulation. Immunfluoreszenzaufnahme eines polarisierten primären humanen Makrophagen (das *leading edge* ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt), der mit GFP-Supervillin (grün, A) transfiziert wurde. Zur Darstellung der Podosomen wurde die Zelle mit F-Aktin gefärbt (rot, B). GFP-Supervillin lokalisiert v.a. an den „hinteren“ Podosomen und nicht an den größeren *Precursor*-Podosomen. Weißer Balken: 10 μm

3.4.2 Nachweis der Expression von endogenem Supervillin in primären humanen Makrophagen

Um die Expression von endogenem Supervillin zu bestätigen, wurde mittels reverser Transkriptase-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für Supervillin mRNA aus 7 Tage alten Makrophagen in cDNS überführt. Als Kontrolle für die vollständige Entfernung von genomischer DNS wurden Oligonukleotide spezifisch für ein Exon im Gen für β -Aktin verwendet (s. auch 3.3.8, RT-PCR KIF9). Die DNS-Bande bei 550 bp zeigt, dass das Transkript für Supervillin in primären humanen Makrophagen nachweisbar ist (Abb. 3.37).

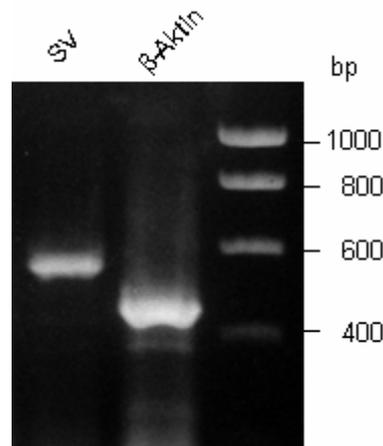


Abb. 3.37 Supervillin wird in primären humanen Makrophagen exprimiert. Reverse Transkriptase-PCR-Produkt eines Primerpaars spezifisch für Supervillin (links), Kontrollreaktion mit einem Primerpaar spezifisch für ein β -Aktin-Exon.

Durch Färbung mit einem Antikörper wurde die Lokalisation von endogenem Supervillin mittels Immunfluoreszenz überprüft. Gleichzeitige Färbung mit Alexa-488-Phalloidin zeigte, dass endogenes Supervillin in humanen Makrophagen eine punktförmige Verteilung aufweist und mit Podosomen kolokalisiert (Abb. 3.38).

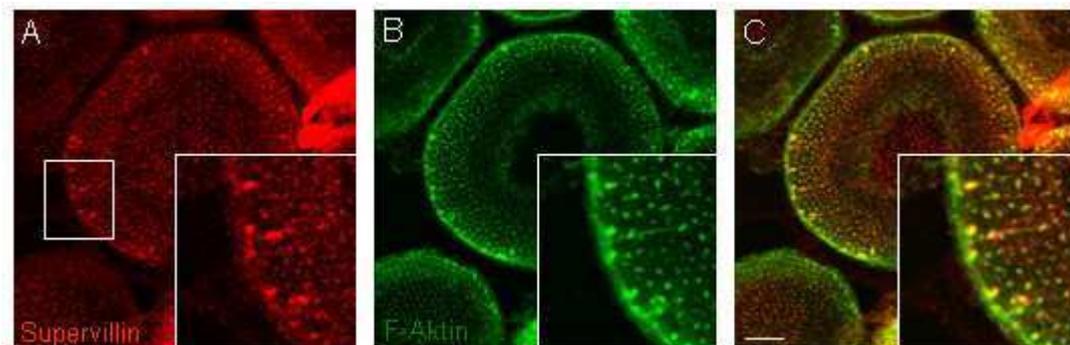


Abb. 3.38 Endogenes Supervillin lokalisiert an Podosomen. Immunfluoreszenzfärbung eines primären humanen Makrophagen, der mit einem Antikörper gegen Supervillin gefärbt wurde (rot, A). Podosomen wurden durch Alexa-488-Phalloidin sichtbar gemacht (grün, B). Die Überlagerung (C) zeigt, dass Supervillin mit Podosomen kolokalisiert. Weißer Balken: 10 μ m

3.4.3 Supervillin Anreicherung korreliert mit Auflösung von Podosomen

Um die Dynamik von Supervillin zu untersuchen und die Lokalisation an Podosomen Subpopulationen zu klären, wurden 7 Tage alte Makrophagen mit GFP-Supervillin und mRFP- β -Aktin transfiziert und nach einer Expressionszeit von 16 Stunden entweder

fixiert oder mittels *live cell imaging* analysiert. Dabei war in fixierten sowie lebenden Makrophagen die gleiche Lokalisation von Supervillin erkennbar.

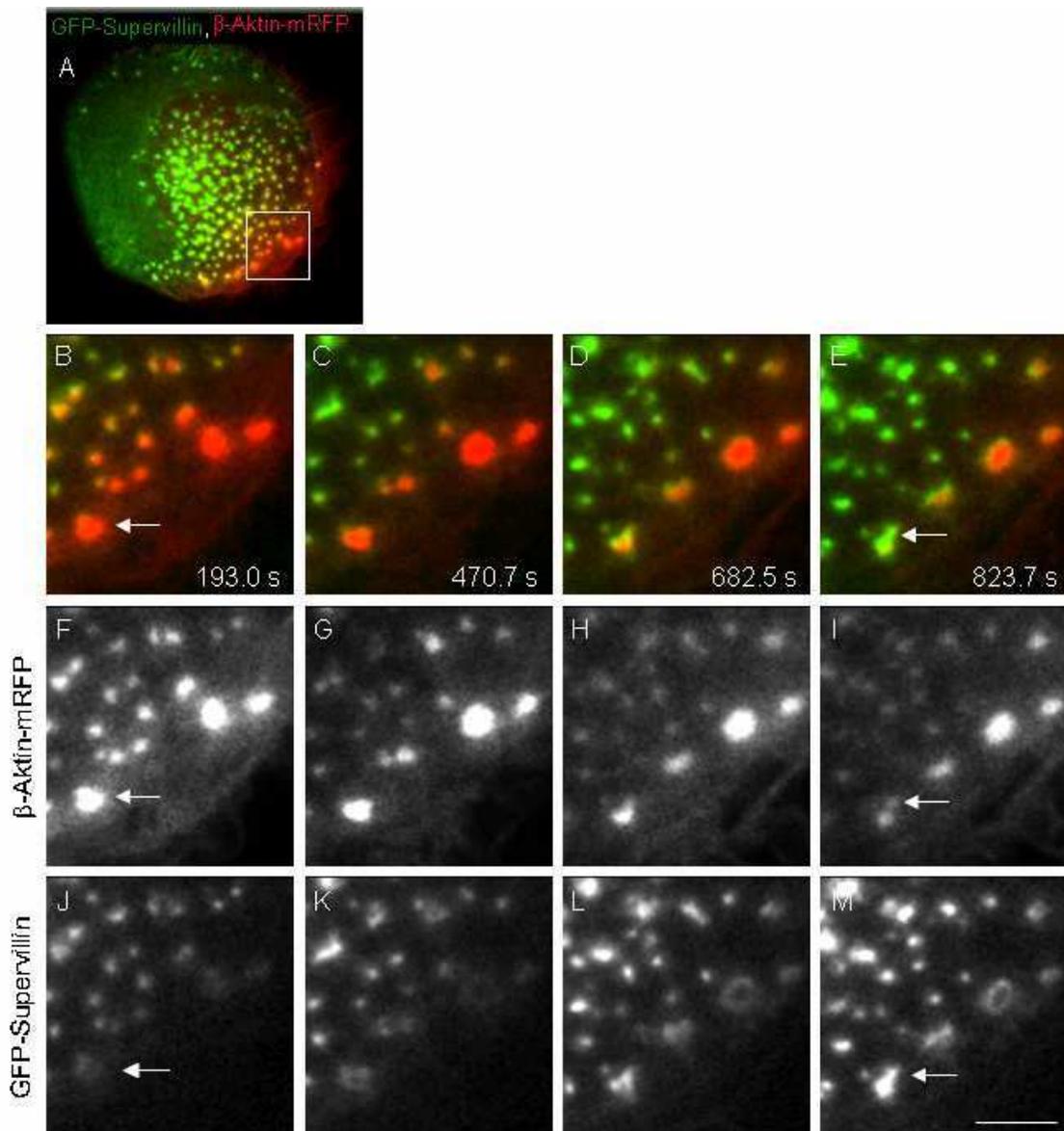


Abb. 3.39 Podosomen, die sich auflösen, reichern Supervillin an. (A) Immunfluoreszenzaufnahme eines lebenden Makrophagen, der mit GFP-Supervillin (grün) und β -Aktin-mRFP (rot) transfiziert wurde. Der Zeitpunkt nach Start des Experiments ist rechts unten angegeben. Die Ausschnittsvergrößerungen (B-M) zeigen, dass im Verlauf des Films ein Rückgang des β -Aktin-mRFP Signals (F-I) mit einer Anreicherung von GFP-Supervillin (J-M) einhergeht. Der weiße Pfeil zeigt auf einen Podosomen *Precursor* zu Beginn des Films (B, F, J) bzw. am Ende des Films (E, I, M). Weißer Balken: 5 μ m.

Supervillin akkumulierte an den stabileren Podosomen im *trailing edge*, nicht jedoch an den größeren *Precursor* am *leading edge* (s. weißer Pfeil in Abb. 3.39, B, F, J). In Filmaufnahmen war mit beginnender Retraktion des *trailing edge* der Zelle (s. Film 7) auch eine ringförmigen Anreicherung von Supervillin um die Podosomen *Precursor* (Abb.

3.39, D) erkennbar. Im weiteren Verlauf der Aufnahme ging ein sukzessives Nachlassen des β -Aktin-mRFP Signals (Abb. 3.39, B-E, F-I), wobei es sich nicht um das Ausbleichen des Fluoreszenzsignals handelte, mit einer vermehrten Anreicherung von GFP-Supervillin einher (Abb. 3.39, B-E, J-M, Film 8). Der weiße Pfeil in Abb. 3.39 zeigt auf ein Podosom, das über den Verlauf des Films immer mehr Supervillin anreichert, bis das β -Aktin-mRFP-Signal fast vollständig verschwunden ist.

Diese Beobachtungen bestätigen die bevorzugte Lokalisation von Supervillin an stabilen Podosomen und weisen darauf hin, dass Supervillin möglicherweise eine Rolle bei der Auflösung von Podosomen spielt. Tatsächlich führte eine Überexpression von GFP-Supervillin über 48 und 72 Stunden zu einem Rückgang der Podosomenzahl, verglichen mit Kontrollzellen (Abb. 3.40). Zur Quantifizierung wurden Zellen nach einer Expressionszeit von 24, 48 und 72 Stunden fixiert und Podosomen durch Färbung mit Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Podosomen von 3 x 30 Zellen gezählt und statistisch ausgewertet.

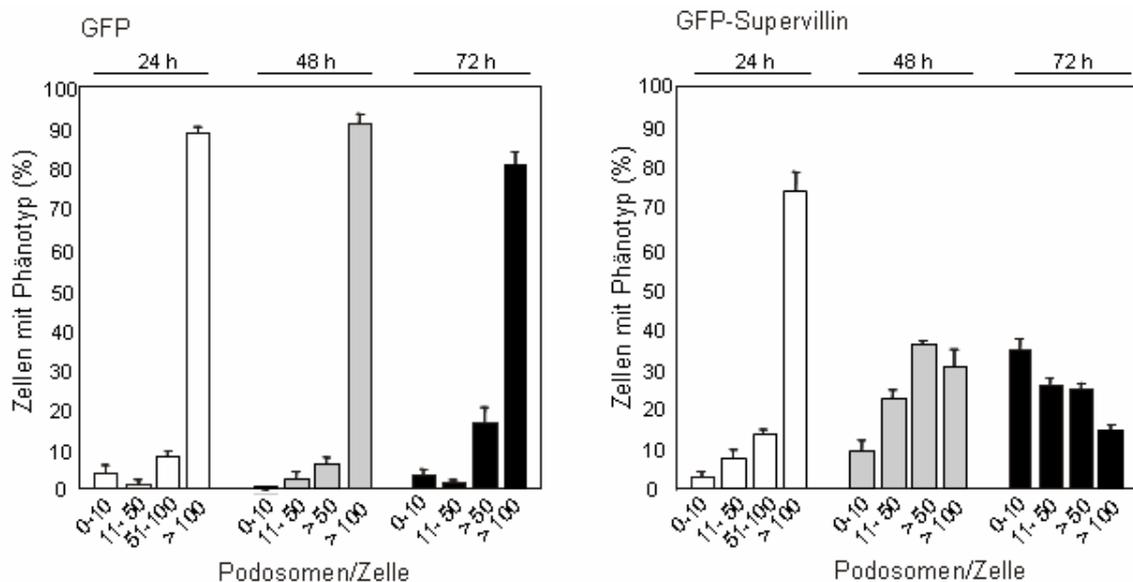


Abb. 3.40 Die Überexpression von Supervillin führt zu einem Verlust von Podosomen. Makrophagen wurden mit dem GFP-Leervektor (A) oder mit GFP-Supervillin (B) transfiziert. Die Quantifizierung erfolgte 24h, 48h und 72h nach Transfektion. In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Die Quantifizierung ergab, dass sich die Anzahl der Podosomen in den Kontrollzellen über den beobachteten Zeitraum kaum veränderten und meist mehr als 100 Podosomen je Zelle vorhanden waren. Bei GFP-Supervillin transfizierten Zellen zeigte sich ab einer

Expressionszeit von 48 Stunden ein deutlicher Rückgang der Podosomenanzahl. Nur noch $30,8 \pm 4,4 \%$ der Zellen wiesen mehr als 100 Podosomen auf, verglichen mit $91,2 \pm 2,3 \%$ der Kontrollzellen. Die Anzahl nahm weiter ab und nach einer Expressionszeit von 72 Stunden wiesen nur noch $14,4 \pm 1,3 \%$ der Zellen mehr als 100 Podosomen auf, bei $35,6 \pm 2,8 \%$ konnten jedoch nur weniger als 10 Podosomen je Zelle gezählt werden. In Zellen, die als Negativkontrolle mit dem GFP-Leervektor transfiziert wurden, hatten nach 72 Stunden noch $80,9 \pm 3,0 \%$ der Zellen mehr als 100 Podosomen und nur $2,2 \pm 1,2 \%$ weniger als 10 Podosomen.

Die Überexpression von GFP-Supervillin führt also zu einem Verlust von Podosomen in humanen Makrophagen. Da dieser Effekt interessanterweise erst ab einer Expressionszeit von 48 Stunden auftrat, war es möglich, den regulären Einfluss von Supervillin zu früheren Zeitpunkten, beispielsweise im *live cell imaging*, zu untersuchen.

3.4.4 Abhängigkeit der Podosomenregulation von der Myosin IIA-Supervillin-Interaktion

Supervillin besitzt zahlreiche Bindedomänen (Abb. 3.41). Die N-terminale Region kann mit Myosin IIA und MLCK interagieren. Weiterhin enthält es drei F-Aktin Bindedomänen und eine Region mit Kern-Lokalisations-Sequenz (*nuclear localization sequence*, NLS). Der C-terminale Bereich weist Homologie zu Villin, das Calponin binden kann, auf. Die zweite F-Aktin Bindedomäne kann zusätzlich TRIP-6 sowie LPP binden und ist an der Regulation fokaler Adhäsionen beteiligt (Takizawa *et al.*, 2006).

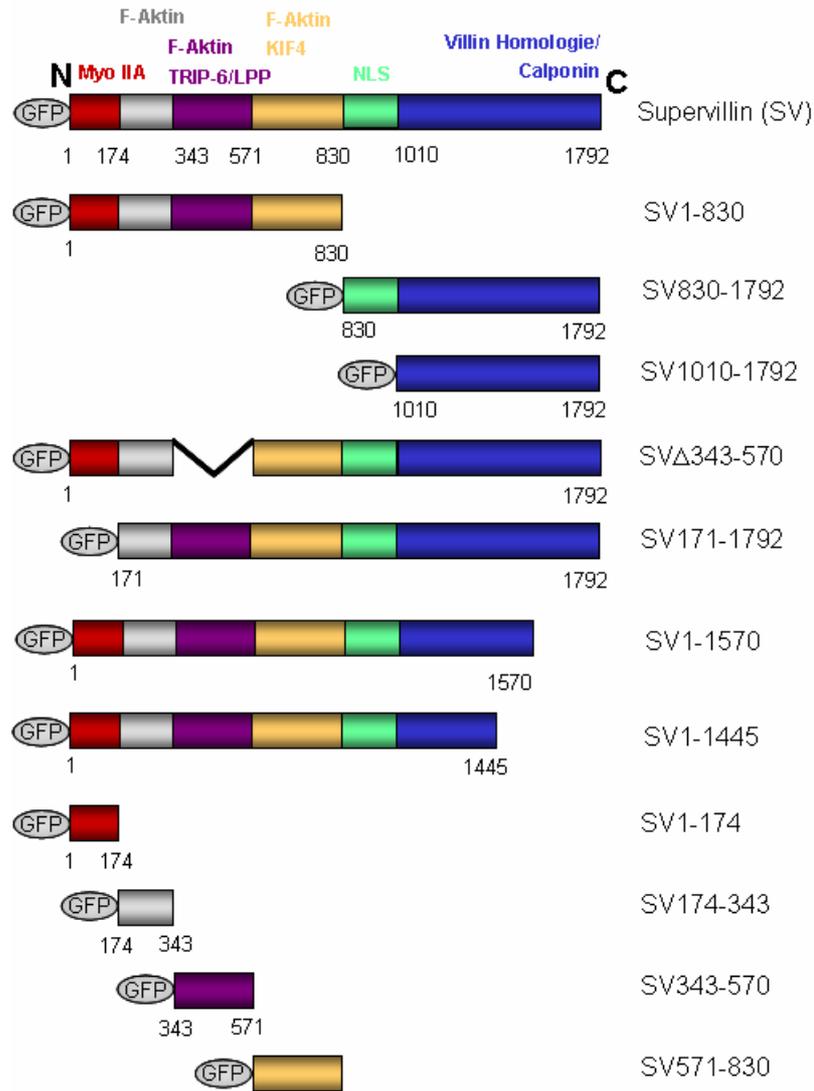


Abb. 3.41 Domänenorganisation von Supervillin und verschiedener Trunktionskonstrukte. Myo IIA: Myosin IIA-Bindedomäne (rot), F-Aktin: F-Aktin-Bindedomänen (grau, violett, gelb), TRIP-6/LPP: TRIP-6/LPP-Bindedomäne (violett), KIF4: KIF4-Bindedomäne (gelb), NLS: Kernlokalisationssequenz (*nuclear localisation sequence*, grün), Villin-Homologie-/Calponin-Bindedomäne (blau). Die geknickte Linie des Konstrukts SV Δ 343-570 zeigt ein Fehlen der AS 343-570 an.

Um zu überprüfen, welche dieser Domänen hinsichtlich der Regulation der Podosomen von Bedeutung ist, wurden primäre humane Makrophagen mit GFP-fusionierten Trunktionskonstrukten transfiziert und im Hinblick auf subzelluläre Lokalisation und Anzahl der Podosomen je Zelle ausgewertet.

Abb. 3.42 zeigt die subzelluläre Lokalisation ausgewählter GFP-fusionierter Trunktionskonstrukte in primären humanen Makrophagen (Abbildungen der hier nicht aufgeführten Konstrukte finden sich im Anhang). Die N-terminale Hälfte (GFP-SV1-830)

zeigt, wie das Volllängen-Konstrukt, eine Lokalisation an den regulären Podosomen (Abb. 3.42, A-C).

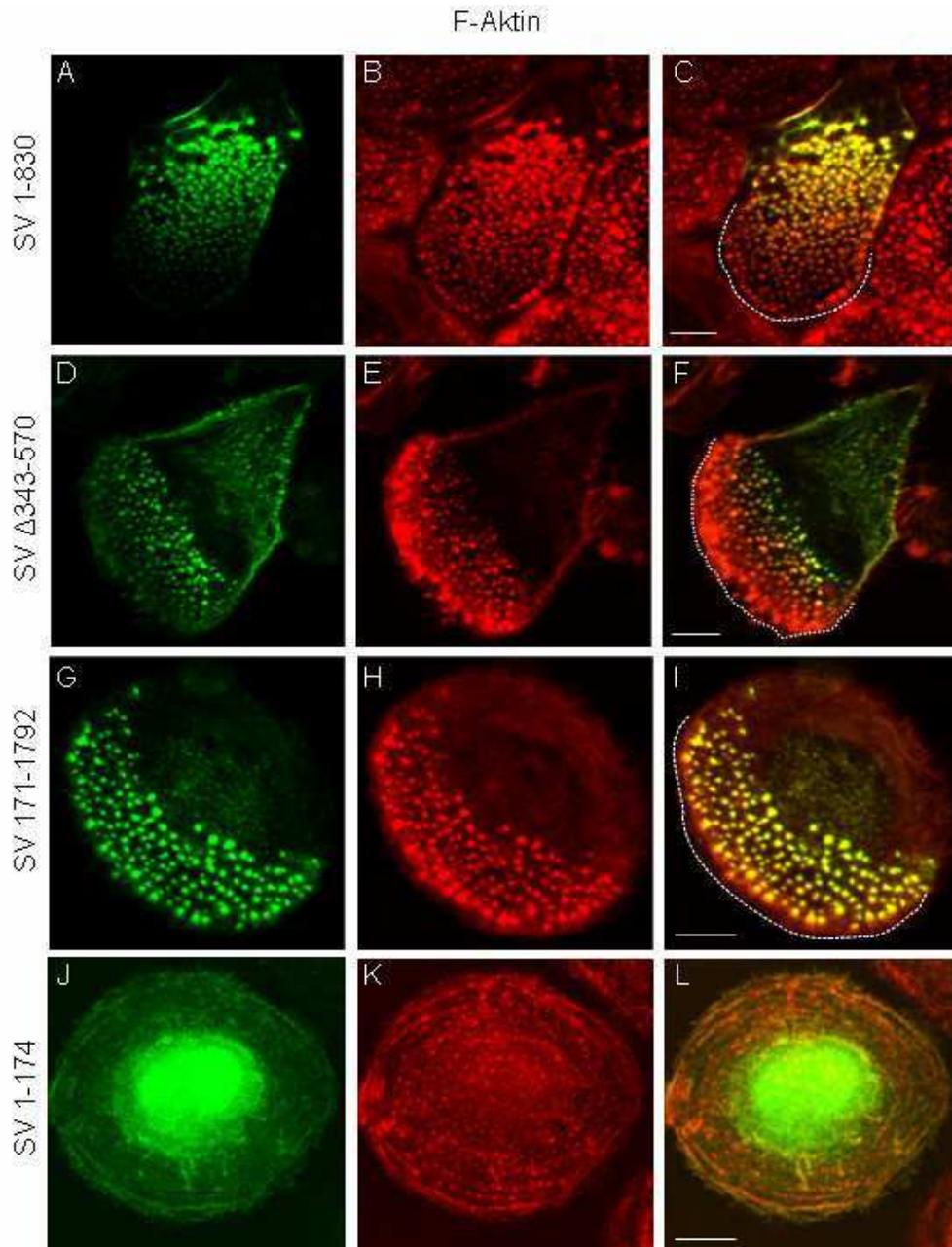


Abb. 3.42 Subzelluläre Lokalisation ausgewählter Supervillin-Deletionskonstrukte. Podosomen wurden jeweils durch Färbung mit Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemacht, die gestrichelte Linie zeigt das *leading edge* der Makrophagen an. GFP-SV1-830 (grün, A) und GFP-SV Δ 343-570 (grün, D) lokalisieren jeweils an den regulären Podosomen und nicht an Podosomen-*Precursor*. Ein Konstrukt ohne Myosinbindedomäne (grün, G) lokalisiert an alle Aktin-Strukturen, die isolierte Myosin-Bindedomäne (grün, J) führt zu einem Verlust von Podosomen und lokalisiert periphär an faserartigen Strukturen. Weißer Balken: 10 μ m.

In vielen Fällen war bei der Expression dieses Konstrukts auch eine Ausbildung von Fasern im *trailing edge* der Zelle erkennbar (Abb. 3.42, A). Auch durch einen Verlust der TRIP-6/LPP-Domäne (GFP-SV Δ 343-570) ändert sich die bisher beobachtete Loka-

lisation nicht (Abb. 3.42, D-F). Fehlt jedoch die Myosin-Bindedomäne (GFP-SV171-1792), so ist keine differentielle Lokalisation an die Podosomen Subpopulationen mehr zu beobachten, sondern eine Lokalisation an allen F-Aktin-Strukturen (Abb. 3.42, G-I). In diesem Fall scheint Supervillin nur noch als Aktinbindendes Protein zu fungieren. Die N-terminale Hälfte von Supervillin lokalisiert also ähnlich wie das Volllängenprotein, dabei scheint die Myosin-Bindedomäne für die differentielle Lokalisation verantwortlich zu sein.

Bei einer Expression der isolierten Myosin-Bindedomäne (GFP-SV1-174) konnte neben einer starken Anreicherung im Zellzentrum auch eine ring- oder faserartige Verteilung in der Zellperipherie beobachtet werden (Abb. 3.42, J-L). Außerdem war hier ein Verlust von Podosomen erkennbar. Zwar ging auch die Überexpression des Volllängenkonstrukts mit einer verringerten Anzahl von Podosomen einher, in diesem Fall trat der Effekt jedoch erst nach einer Expressionszeit ab 48 Stunden auf. Bei der Expression der isolierten Myosin-Bindedomäne war dies bereits nach ca. 16 Stunden zu sehen.

In fixierten Zellen konnte bei Expression der isolierten Myosin-Bindedomäne eine verminderte Anzahl von Podosomen beobachtet werden (s. Abb. 3.42, K). Um dies zu quantifizieren, wurden primäre humane Makrophagen mit GFP-SV171-1792 transfiziert und nach 24, 48 bzw. 72 Stunden fixiert. Podosomen wurden durch Färbung mit Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Podosomen von 3 x 30 Zellen gezählt und quantifiziert (Abb. 3.43). Die statistische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Kontrollzellen, die mit dem GFP-Leervektor transfiziert wurden. Auch nach einer Expressionszeit von 72 Stunden wiesen $93,3 \pm 2,2$ % der Zellen, die mit GFP-SV171-1792 transfiziert wurden, mehr als 100 Podosomen auf (Kontrollzellen: $80,9 \pm 3,0$ %). Das Deletionskonstrukt SV171-1792 hat somit weder einen Einfluss auf die Zahl der Podosomen noch lokalisiert es differentiell (s. Abb. 3.42, J). Hierfür ist die Myosin IIA-Bindedomäne (SV1-174) wichtig.

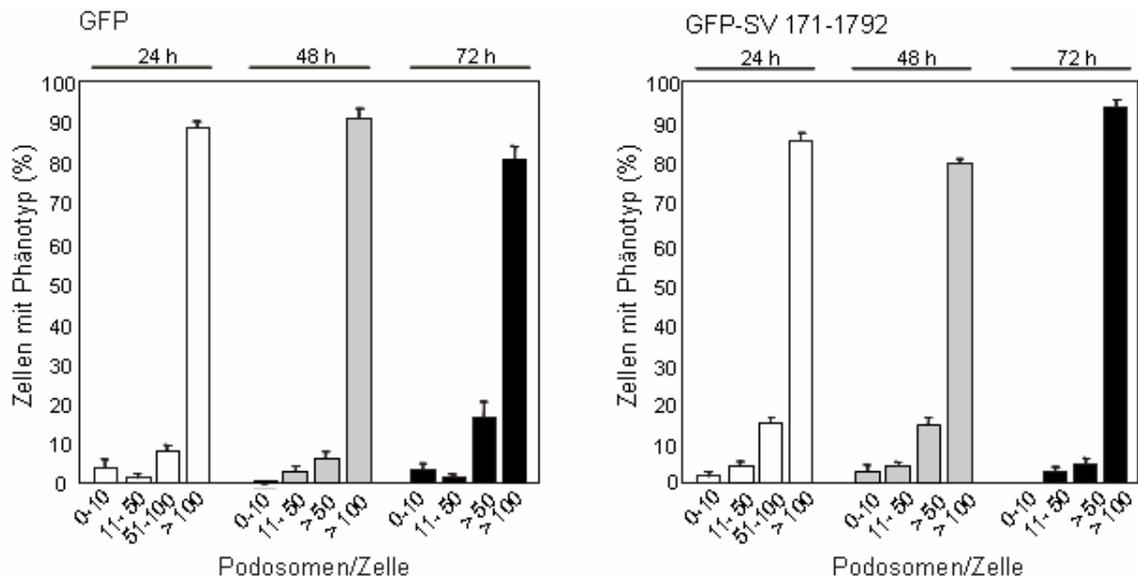


Abb. 3.43 Ohne Myosin IIA-Bindedomäne bleiben Podosomen erhalten. Makrophagen wurden mit dem GFP-Leervektor (A) oder mit GFP-SV174-1792 (B) transfiziert. Die Quantifizierung erfolgte 24h, 48h und 72h nach Transfektion. In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Myosin IIA-Bindedomäne und lassen möglicherweise darauf schließen, dass die differentielle Rekrutierung von Supervillin an Podosomsubpopulationen von einer Aktomyosin- Kontraktilität abhängig ist.

3.4.5 Podosomen, die Supervillin enthalten, stehen mit Aktomyosin-Kabeln in Verbindung

Um die Lokalisation von Supervillin und Myosin IIA zu überprüfen, wurden primäre humane Makrophagen mit GFP-Supervillin transfiziert (Abb. 3.44, B) und mit einem Antikörper gegen Myosin IIA (Abb. 3.44, A) gefärbt. Podosomen wurden durch Färbung mit Phalloidin-Cy5 sichtbar gemacht (Abb. 3.44,C).

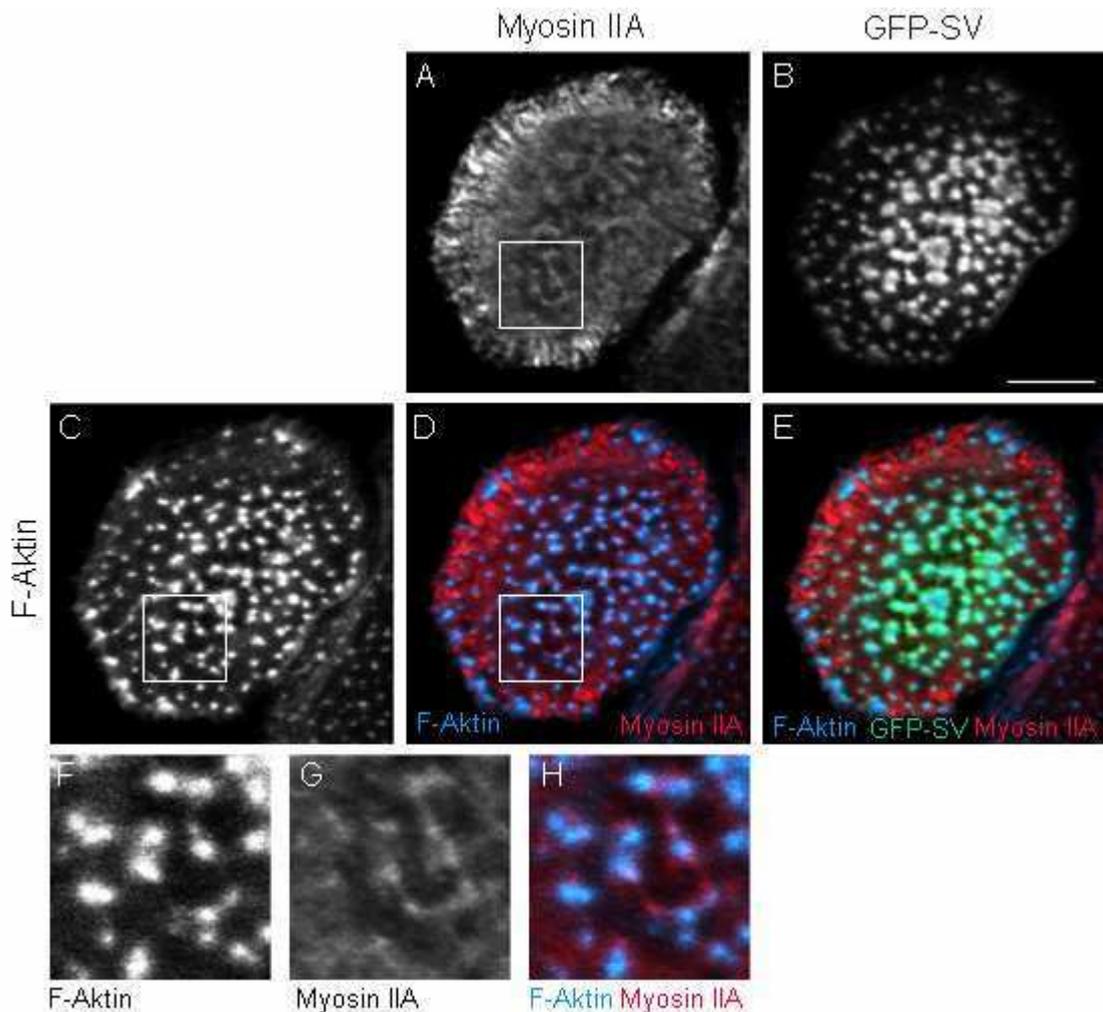


Abb. 3.44 Myosin IIA lokalisiert mit GFP-Supervillin an regulären Podosomen. Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit GFP-Supervillin transfiziert wurde (B). Myosin IIA wurde mit einem Antikörper gefärbt (A) und Podosomen durch Phalloidin-Färbung sichtbar gemacht (C). Weißer Balken: 10 μm . Die Überlagerung (E) zeigt die Lokalisation von GFP-Supervillin an regulären Podosomen sowie die Verteilung von Myosin IIA. In der Ausschnittsvergrößerung (H) ist erkennbar, dass Myosin IIA-Fasern reguläre Podosomen verbinden.

Myosin IIA zeigt neben einer deutlichen peripheren Lokalisation auch eine Akkumulation an Podosomen, die GFP-Supervillin angereichert haben. Bei genauer Betrachtung ist erkennbar, dass Myosin IIA benachbarte Podosomen miteinander verbindet (Abb. 3.44, H).

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Hälfte von Supervillin am ehesten wie das Vollängen-Konstrukt lokalisiert (s. Abb. 3.42, A), bei sehr starker Expression konnte außerdem die Bildung von Supervillin-Kabeln im *trailing edge* der Zelle beobachtet werden (Abb. 3.42, A). Durch diese Kabel stehen auch be-

nachbarte Podosomen miteinander in Verbindung. Dies lässt möglicherweise den Schluss zu, dass Supervillin eine Zugspannung auf Podosomen ausübt.

Da Zugspannung durch Myosin vermittelt wird, wurden im Folgenden primäre humane Makrophagen mit GFP-SV1-830 transfiziert und Myosin IIA mit einem Antikörper gefärbt (Abb. 3.45, B). Es zeigte sich, dass einzelne Podosomen durch Myosin IIA miteinander verbunden sind (Abb. 3.45, C).

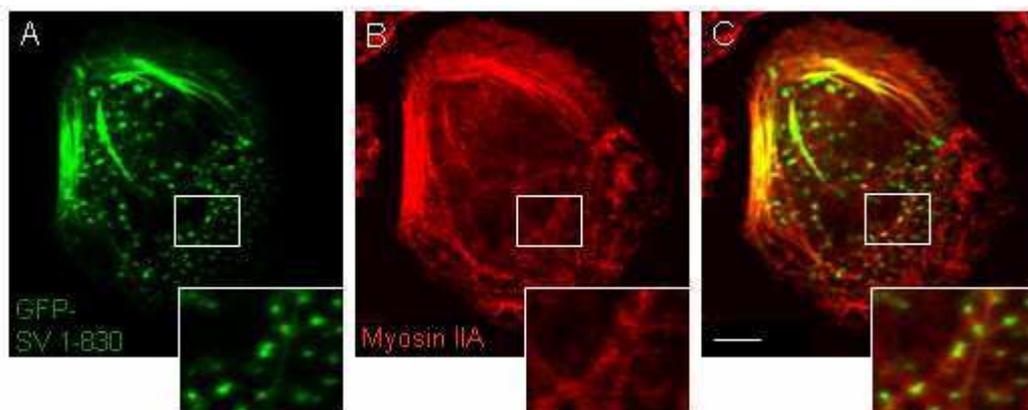


Abb. 3.45 Myosin IIA lokalisiert an Supervillin-Kabeln. (A-C) Konfokalmikroskopische Aufnahme eines primären humanen Makrophagen, der GFP-SV1-830 (grün, A) exprimiert und mit einem Antikörper gegen Myosin IIA (rot, B) gefärbt wurde. Die Überlagerung (C) zeigt die Lokalisation von GFP-SV1-830 an Myosin IIA-Kabeln.

Da Myosin nur in phosphoryliertem Zustand kontraktile ist, wurden primäre humane Makrophagen mit GFP-SV1-830 transfiziert (Abb. 3.46, A) und mit einem Antikörper gegen phospho-MLC gefärbt (Abb. 3.46, B), wodurch aktives Myosin IIA angezeigt wird. Dabei wurde deutlich, dass vor allem reguläre Podosomen, an die auch Supervillin bindet, unter hoher Zugspannung zu stehen scheinen. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass eine Überexpression von GFP-Supervillin und Bindung von phosphoryliertem, und damit kontraktilem, Myosin IIA zu einer Polarisierung der Zellen führt. Supervillin bewirkt also möglicherweise eine Myosin-Aktivierung und könnte dadurch die Auflösung von Podosomen auslösen.

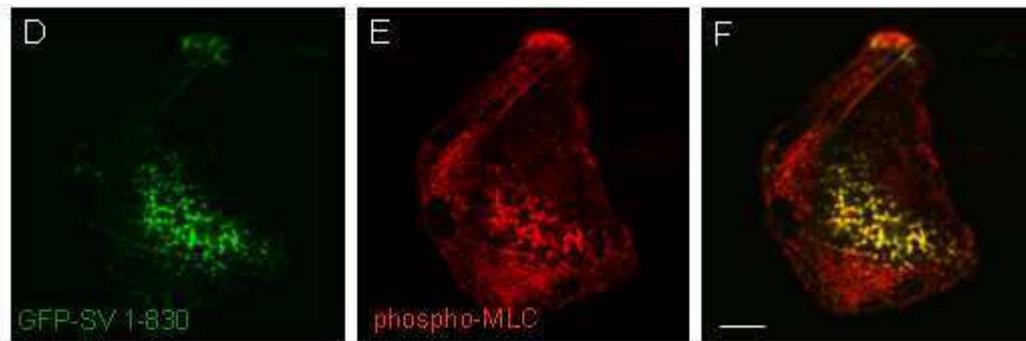


Abb. 3.46 Phosphoryliertes Myosin lokalisiert an Supervillin-Kabeln. (A-C) Konfokalmikroskopische Aufnahme eines primären humanen Makrophagen, der GFP-SV1-830 (grün, A) exprimiert und mit einem Antikörper gegen phospho-MLC (rot, B) gefärbt wurde. Die Überlagerung (C) zeigt die Lokalisation von GFP-SV1-830 mit phospho-MLC. Weißer Balken: 10 μ m

Um zu überprüfen, ob die Rekrutierung von Myosin IIA mit der Auflösung von Podosomen korreliert, wurden primäre humane Makrophagen mit GFP-Myosin IIA und mRFP-Supervillin transfiziert und mittels *live cell imaging* analysiert (Abb. 3.49).

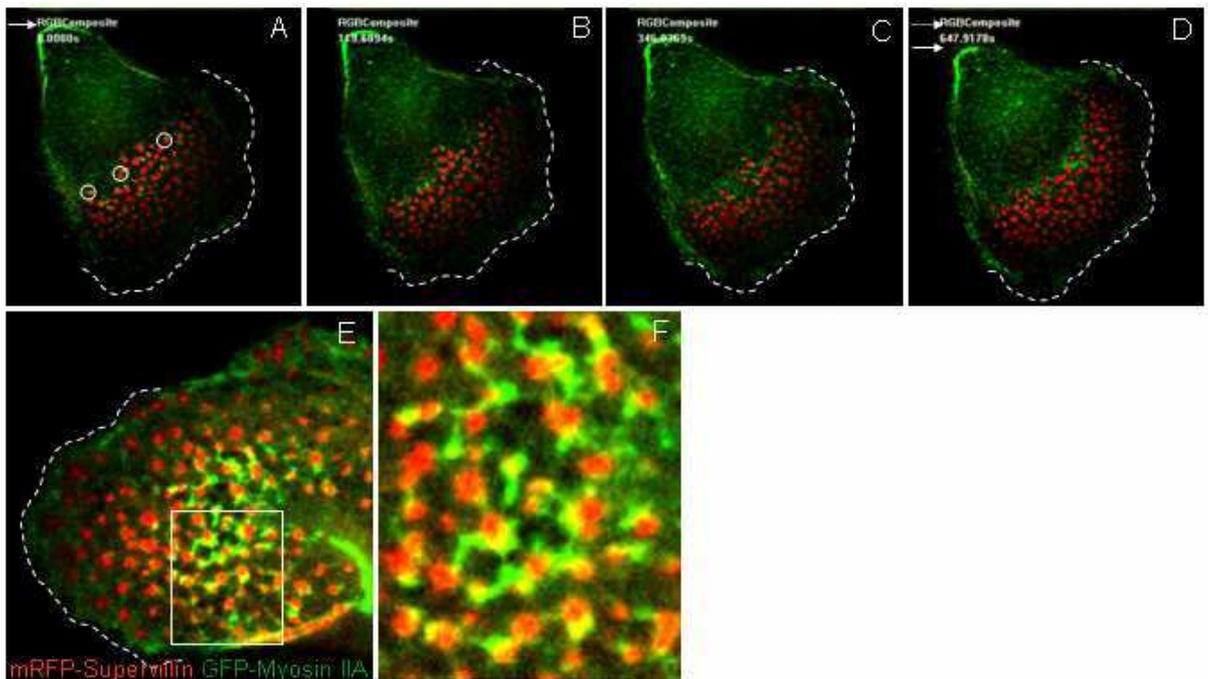


Abb. 3.47 GFP-Myosin IIA lokalisiert an Podosomen, die sich auflösen. Konfokalmikroskopische Momentaufnahmen lebender primärer humaner Makrophagen, die transient mit GFP-Myosin IIA (grün) und mRFP-Supervillin (rot) transfiziert wurden. (A-D) Moderat exprimierende Zelle, (E-F) stärker exprimierende Zelle. Das *leading edge* ist zur besseren Darstellung weiß umrandet. Der weiße Pfeil zeigt die aktuelle Position des *trailing edge* (A, D), der gestrichelte weiße Pfeil zeigt seine vorherige Position (D). Einer Anreicherung von Myosin IIA an den hinteren Podosomen folgt oftmals deren Auflösung (weiße Ringe, A).

In der moderat exprimierenden Zelle in Abb. 3.47 (A-D) sind keine deutlichen Myosin IIA-Fasern in der Zelle erkennbar, sondern Myosin IIA ist v.a. am Zellcortex im *trailing edge* der Zelle angereichert. Es ist erkennbar, dass Supervillin an den stabileren Podosomen lokalisiert und Myosin IIA bei Auflösung der Podosomen angereichert wird (weiße Ringe in Abb. 4.47, A; s. auch Film 9). In einer stark exprimierenden Zelle (Abb. 3.47, E und F) sind deutlich kontraktile Myosin IIA-Kabel erkennbar, die mit Podosomen in Verbindung stehen und eine Zugspannung an diesen ausüben (s. auch Film 10), was schließlich zur Auflösung der Podosomen führt. Möglicherweise bindet Supervillin also kontraktiles Myosin an Podosomen und ermöglicht dadurch deren Umwälzung/Auflösung.

Zwei Supervillin-Domänen spielen eine Rolle bei der Umwälzung fokaler Adhäsionen (AS 1-174 und AS 343-570) (Takizawa *et al.*, 2006). In humanen Makrophagen hingegen ist nur SV1-174, das die schwere Kette von Myosin IIA und *Myosin light chain kinase* (MLCK) bindet, an der Regulation von Podosomen beteiligt (s. Abb. 3.43 und Anhang). Diese Interaktion konnte in humanen Makrophagen in GFP-Immunpräzipitationen GFP-SV1-174 transfizierter Zellen mit Antikörpern gegen Myosin IIA und MLCK bestätigt werden (Abb. 3.48, A-C).

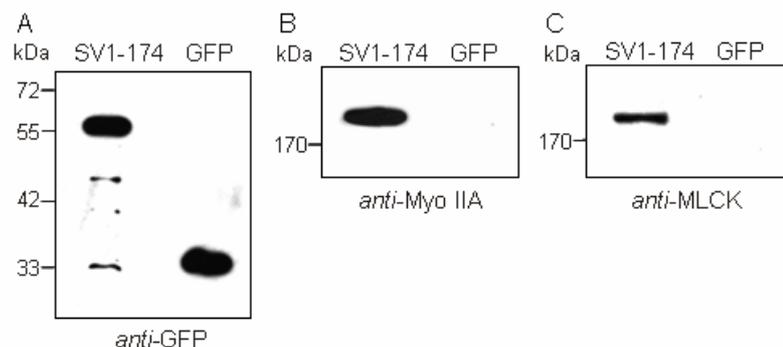


Abb. 3.48 Supervillin bindet Myosin IIA und MLCK. (A-C) GFP-Immunpräzipitation von Makrophagen, die mit GFP-SV1-174 transfiziert wurden. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit dem Leervektor GFP-C1 transfiziert wurden. Die Detektion mit einem *anti-GFP*-Antikörper zeigt die erfolgreiche Durchführung der IP (A). Durch Inkubation mit einem *anti-Myosin IIA*-Antikörper (B) bzw. *anti-MLCK*-Antikörper (C) konnte eine Bindung von Myosin IIA bzw. MLCK an die entsprechende Domäne von Supervillin nachgewiesen werden.

Um die Lokalisation von Myosin IIA mit der Myosinbindedomäne von Supervillin in humanen Makrophagen zu untersuchen, wurden Zellen mit GFP-SV 1-174 transfiziert

(Abb. 3.49, A) und mit einem Antikörper gegen Myosin IIA (B) gefärbt. In der Überlagerung (C) ist eine Kolokalisation der beiden Signale an kortikalen Fasern in der Zellperipherie erkennbar.

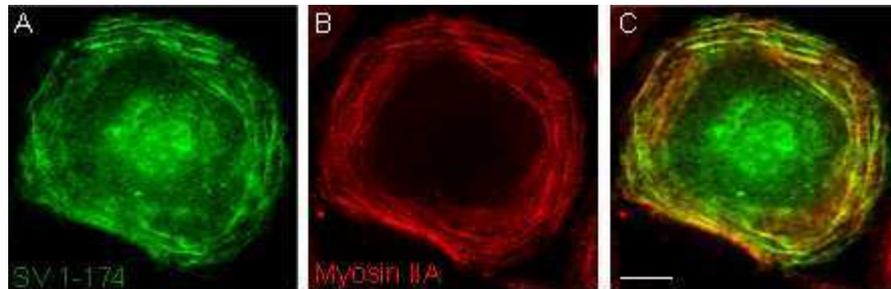


Abb. 3.49 GFP-SV1-174 lokalisiert mit Myosin IIA. (A-C) Immunfluoreszenzaufnahme eines primären humanen Makrophagen, der mit GFP-SV1-174 transfiziert wurde (A). Myosin IIA wurde mit einem Antikörper nachgewiesen (B). Die Überlagerung (C) zeigt eine Kolokalisation der Supervillin-Domäne mit Myosin IIA an Fasern in der Zellperipherie. Weißer Balken: 10 μm .

3.4.6 Supervillin beeinflusst die Lebensdauer von Podosomen

Takizawa *et al.* (Takizawa *et al.*, 2006) zeigten eine negative Regulation fokaler Adhäsionen durch Supervillin in COS7 Zellen. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob Supervillin auch die Lebensdauer von Podosomen in primären humanen Makrophagen beeinflusst.

Hierzu wurde ein *knock-down* von Supervillin mit dem Vektor-basierten siRNA-System psiSTRIKE durchgeführt. Die shRNA wurde bereits im Labor von E. Luna in HeLa Zellen verifiziert (Abb. 3.50). In spezifisch transfizierten Zellen ist ein geringeres Signal für Supervillin als in Kontrollzellen, die mit einer *scrambled* Sequenz transfiziert wurden, zu sehen. Dies zeigt, dass die shRNA-RNA effektiv ist und wird im Folgenden auch in primären humanen Makrophagen verwendet.

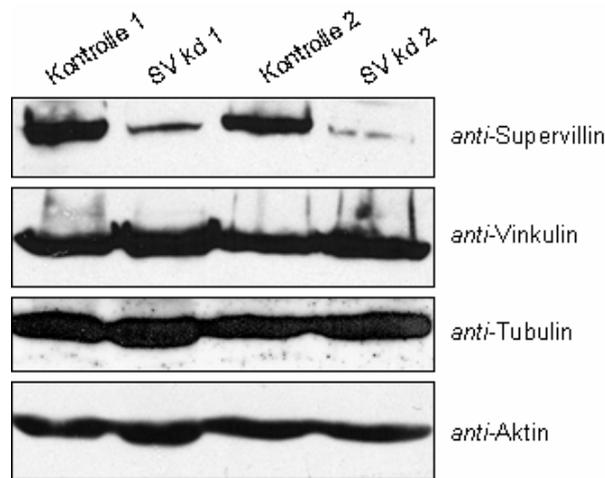


Abb. 3.50 Knock-down von endogenem Supervillin. Reduktion von endogenem Supervillin in HeLa Zellen mittels RNAi. HeLa Zellen wurden mit psiSTRIKE mit Zielsequenzen gegen Supervillin (Spuren 2, 4) oder mit *scrambled* Sequenzen (Spuren 1, 3) transfiziert. Die Zellen wurden zweimal mit dem Plasmid transfiziert und 84 h nach der ersten Transfektion lysiert. Die Expression von Supervillin wurde durch einen Antikörper (anti-H340) nachgewiesen. Der obere Teil der Abbildung zeigt die durch die Zielsequenz hervorgerufene Reduktion der Protein-Expression. Durch die Detektion von Vinkulin, Tubulin und Aktin mittels spezifischer Antikörper wurde gezeigt, dass andere Zytoskelettproteine vom *knock-down* nicht beeinflusst sowie vergleichbare Proteinmengen auf das Gel aufgetragen wurden.

Um zu untersuchen, ob die Reduktion von endogenem Supervillin die Lebensdauer bzw. Umwälzung von Podosomen beeinflusst, wurden primäre humane Makrophagen mit psiSTRIKE, der eine gegen Supervillin gerichtete Zielsequenz enthielt, transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einer *scrambled* Sequenz transfiziert wurden. Nach einer Expressionszeit von 72 h wurden die Zellen zusätzlich mit lifeact-mRFP transfiziert, um Podosomen sichtbar zu machen, und mittels *live cell imaging* untersucht.

Die Auswertung der Filme ergab, dass die Lebensdauer der Podosomen von Supervillin abhängig ist. In Makrophagen, die als Negativkontrolle mit einer *scrambled* Sequenz transfiziert wurden, hatten Podosomen eine durchschnittliche Lebensdauer von $196,6 \pm 29,5$ sec. (Abb.3.51). Im Falle des *knock-down* von Supervillin verlängerte sich diese hingegen deutlich auf $584,3 \pm 138,2$ sec. Daraus kann man schließen, dass Supervillin unmittelbar an der Regulation der Podosomendynamik beteiligt ist.

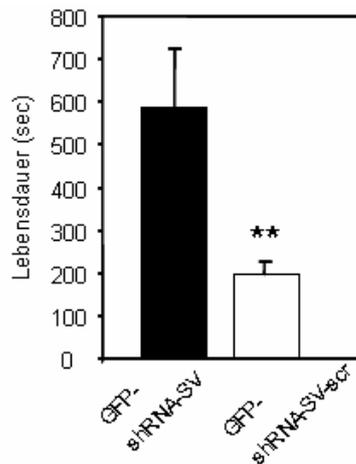


Abb. 3.51 Knock-down von Supervillin beeinflusst die Lebensdauer von Podosomen. Primäre humane Makrophagen wurden mit psiSTRIKE transfiziert, der eine gegen Supervillin gerichtete Zielsequenz enthielt (links). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einer *scrambled* Sequenz transfiziert wurden. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mittels *live cell imaging* beobachtet. In je 6 Zellen wurde die Lebensdauer von je 10 zufällig ausgewählten Podosomen ausgewertet. Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Lebensdauer in sec \pm Standardabweichung. **: $p < 0,01$

3.4.7 Einfluss von Supervillin auf den Abbau extrazellulärer Matrix

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *knock-down* von Supervillin in MDA-MB-231 Zellen zu verringertem Matrixabbau führt. Gelsolin wird sowohl für die Bildung als auch die degradative Aktivität von Podosomen in Osteoklasten benötigt (Crowley *et al.*, 2009). Daher sollte der Einfluss dieser Proteine auf den Matrixabbau in primären humanen Makrophagen untersucht werden. Da in der vorliegenden Arbeit bereits ein Einfluss der Myosin-Bindedomäne von Supervillin auf Podosomen beobachtet wurde, wurde im folgenden Versuch auch der Einfluss von endogenem Myosin IIA hinsichtlich Matrixabbau untersucht. Primäre humane Makrophagen wurden mit siRNAs gerichtet gegen Supervillin, Myosin IIA und Gelsolin einzeln sowie in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Die hier verwendeten siRNAs gegen Supervillin und Gelsolin sind bereits in Crowley *et al.* (Crowley *et al.*, 2009) beschrieben. Die siRNA gegen Myosin IIA wurde nach Vicente-Manzanares *et al.* (Vicente-Manzanares *et al.*, 2007) entworfen und in humanen Makrophagen validiert (Abb. 3.52).

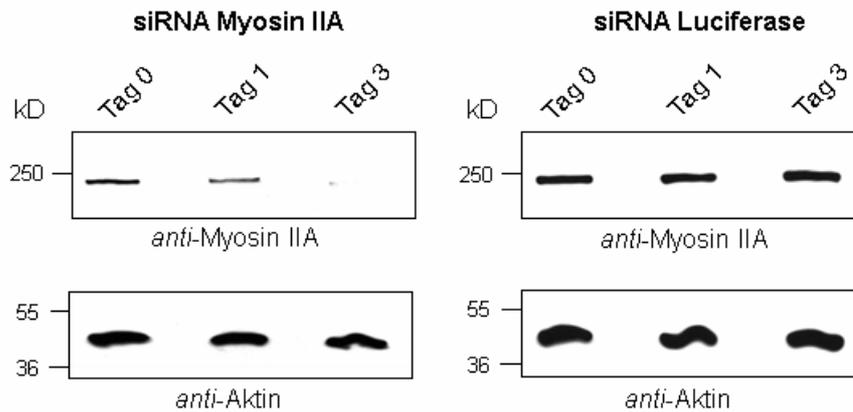


Abb. 3.52 Etablierung des *knock-down* von Myosin IIA. Reduktion von endogenem Myosin IIA in primären humanen Makrophagen mittels siRNA. Makrophagen wurden mit siRNA gegen Myosin IIA (links) oder siRNA gegen Luciferase als Kontrolle transfiziert (rechts) und nach 0, 24 und 72 h lysiert. Die Expression von Myosin IIA wurde mit *anti-Myosin IIA* nachgewiesen (oben). Der obere Teil der Abbildung zeigt die durch spezifische siRNA hervorgerufene Reduktion der Expression (links) im Vergleich zur Kontrolle (rechts). Der untere Teil der Abbildung zeigt anhand der Detektion von Aktin mittels *anti-Aktin*-Antikörper den Einsatz ungefähr gleicher Proteinmengen.

Nach einer Expressionszeit von 72 Stunden wurden die Zellen erneut transfiziert und anschließend auf *coverslips*, die mit Alexa-468-markierter Gelatine beschichtet waren, ausgesät. Nach weiteren 5 Stunden wurden die Zellen fixiert und mit Phalloidin-Cy5 gefärbt, um Podosomen sichtbar zu machen. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass ein Effekt nur auf den Matrixabbau beobachtbar ist. Durch Quantifizierung konnte bestätigt werden, dass die Zahl der Podosomen in spezifisch transfizierten Zellen gegenüber Kontrollzellen nicht verändert war (Daten nicht gezeigt). Um den Grad des Matrixabbaus zu bestimmen, wurde in 3 x 30 Zellen die rhodamin-basierte Fluoreszenz unterhalb der Podosomenfläche gemessen. Anschließend wurden die Zellen in Gruppen eingeteilt (0 %-25 %: geringer Matrixabbau; 26 %-100 %: hoher Matrixabbau). Es zeigte sich, dass eine Reduktion der Expression des endogenen Supervillins (Abb. 3.53, B) allein keine Verringerung des Matrixabbaus im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA (Abb. 3.53, A) transfiziert wurden, bewirkt. Der *knock-down* von Myosin IIA (Abb. 3.53, C) bzw. Gelsolin (Abb. 3.53, D) hingegen hat eine leichte Reduktion des Matrixabbaus zur Folge. Bei gleichzeitigem *knock-down* von Supervillin und Myosin IIA (Abb. 3.53, E), Supervillin und Gelsolin (Abb. 3.53, F) oder Supervillin, Myosin IIA und Gelsolin (Abb. 3.53, G) konnte hingegen eine deutliche Abnahme des Matrixabbaus beobachtet werden.

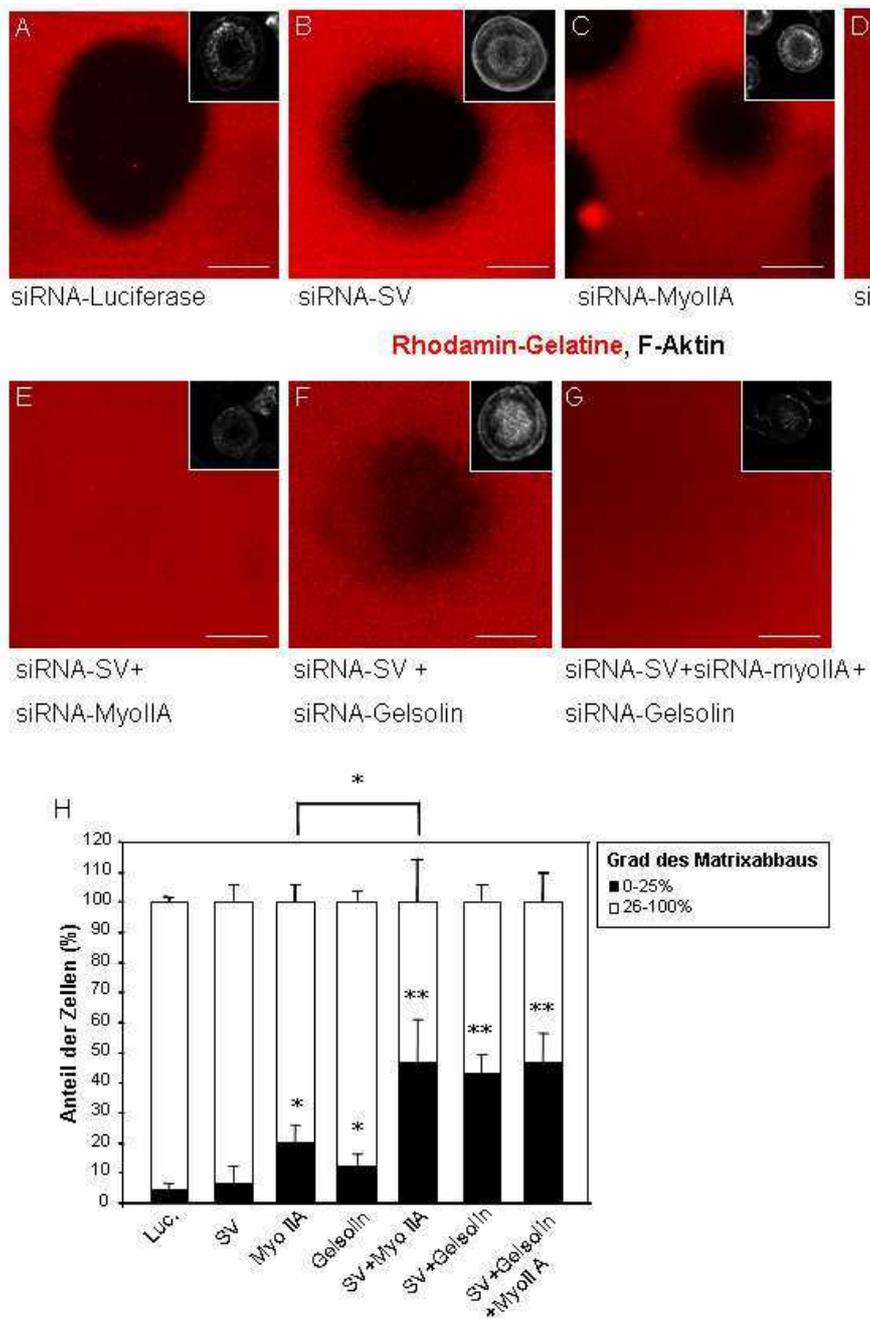


Abb. 3.53 Einfluss des knock-downs von Supervillin, Myosin IIA und Gelsolin auf den Matrixabbau. Immunfluoreszenzaufnahmen primärer humaner Makrophagen, die mit einer siRNA spezifisch gegen Luciferase (A), Supervillin (B), Myosin IIA (C), Gelsolin (D), einer Kombination aus Supervillin und Myosin IIA (E), einer Kombination aus Supervillin und Gelsolin (F) oder einer Kombination aus Supervillin, Myosin IIA und Gelsolin (G) transfiziert wurden. Die Zellen wurden auf Rhodamin-markierter Gelatine (rot) ausgesät. Die dunklen Flächen zeigen den Matrixabbau, F-Aktin wurde durch Cy5-markiertes Phalloidin sichtbar gemacht (weiß). Weißer Balken: 10 μ m. (C) Quantifizierung des Matrixabbaus in siRNA transfizierten Zellen. Das Ausmaß des Matrixabbaus wurde durch Analyse der Fluoreszenz gemessen. Die Zellen wurden gemäß des Matrixabbaus in Gruppen eingeteilt (0-25% und 26-100%). In 3 unabhängigen Experimenten wurden je 30 Zellen gezählt. Die Prozentsätze für transfizierte Zellen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. *: p < 0,05; **: p < 0,01

Durch Quantifizierung konnten die Beobachtungen hinsichtlich Matrixabbau bestätigt werden. Nur $6,6 \pm 5,6$ % der Zellen, die mit siRNA gegen Supervillin transfiziert wur-

den, wiesen einen verringerten Matrix-Abbau (0-25%) auf. Damit war kein Unterschied zu den Kontrollzellen ($4,3 \pm 1,7 \%$) erkennbar. Bei Reduktion von endogenem Myosin IIA und Gelsolin stieg dieser Wert auf $20,0 \pm 5,7 \%$ bzw. $12,3 \pm 3,8 \%$. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen zeigten sich sowohl bei gleichzeitigem *knock-down* von Supervillin und Myosin IIA ($46,7 \pm 15,3 \%$) oder Supervillin und Gelsolin ($43,3 \pm 5,7 \%$) sowie einer Kombination aus allen drei spezifischen siRNAs ($46,7 \pm 10,0 \%$). Auch zwischen dem *knock-down* von Myosin IIA alleine und einer Kombination der siRNAs gegen Supervillin und Myosin IIA war ein signifikanter Unterschied hinsichtlich Matrix-Abbau erkennbar.

Der *knock-down* von Supervillin allein zeigt interessanterweise keinen Effekt auf den Matrix-Abbau. Erst eine gleichzeitige Reduktion der Proteinexpression von Supervillin und Myosin IIA oder Gelsolin bzw. allen drei Proteinen hat eine signifikante bzw. hoch signifikante Veränderung der Matrix-lytischen Aktivität gegenüber den Kontrollzellen zur Folge. Da alle untersuchten Zellen eine ähnliche Anzahl an Podosomen aufwiesen wie die Kontrollzellen, wird die Ausbildung der Podosomen durch den *knock-down* nicht beeinflusst. Daraus kann man schließen, dass der Matrixabbau an Podosomen auf geringere Effektivität zurückzuführen ist, die von mehreren Effektorproteinen in einer kooperativen Funktion beeinflusst wird.

4 Diskussion

Podosomen sind Zell-Matrix-Kontakte mit der Fähigkeit, extrazelluläre Matrix abzubauen. Da sie vor allem in Zellen gebildet werden, die Gewebegrenzen überwinden müssen, wie beispielsweise monozytäre Zellen (Linder und Aepfelbacher 2003), scheinen sie eine Schlüsselrolle bei der Invasion von Zellen zu spielen (Gimona *et al.* 2008, Buccione *et al.* 2009, Linder 2009).

In ruhenden primären humanen Makrophagen gibt es mindestens zwei verschiedene Subpopulationen von Podosomen: dynamische Podosomen in der Peripherie und stabilere Podosomen in der Mitte der Adhäsionsfläche. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Podosomen wiederholt von Mikrotubuli-Plusenden kontaktiert werden. Vor allem die kontaktierten Podosomen in der Zellperipherie reagieren daraufhin dynamisch, d.h. sie teilen sich oder lösen sich auf. Es wird nun vermutet, dass Mikrotubuli-abhängige Motorproteine an dieser Regulation beteiligt sind. Durch Überexpression sowie *knock-down* verschiedener Kinesine konnte dem Motorprotein KIF1C eine Rolle bei der Regulation von Podosomen zugeschrieben werden. KIF1C lokalisiert an Mikrotubuli-Plusenden und kontaktiert Bereiche hoher Podosomendynamik. Podosomen, die von KIF1C kontaktiert wurden, zeigten außerdem eine hohe Teilungs- oder Auflösungsrate (Kopp *et al.*, 2006). KIF1C spielt also eine zentrale Rolle bei der Mikrotubuli-abhängigen Regulation der Podosomen. In diesem Zusammenhang galt es zu klären, ob KIF1C lediglich eine Art Adapter zu Mikrotubuli-Plusenden darstellt, oder ob es auch für den Transport von Regulationsfaktoren verantwortlich ist. Ergebnisse aus *live cell* Experimenten ließen vermuten, dass KIF1C Vesikel transportiert. Bereits Pfister *et al.* (Pfister *et al.*, 1989c) und Brady *et al.* (Brady *et al.*, 1990) konnten zeigen, dass Kinesine an vesikelartigen Strukturen lokalisieren.

4.1 Charakterisierung der KIF1C-GFP assoziierten Vesikel

Durch die nicht konservierten, variablen Domänen am C-Terminus können Proteine der Kinesin-Familie mit ihrer Fracht spezifisch interagieren. Die molekulare Identifizierung dieser Fracht ist ein wichtiger Schritt, um die Funktion des Motors aufzuklären (Santama *et al.*, 1998). Murines KIF1B (Nangaku *et al.*, 1994) beispielsweise

transportiert Mitochondrien, dessen Isoform KIF1A transportiert Vorläufer synaptischer Vesikel entlang von Axonen (Okada *et al.*, 1995). Die Fracht von KIF4 (Sekine *et al.*, 1994) und KIF2 (Morfini *et al.*, 1997) hingegen konnte noch nicht endgültig identifiziert werden.

Daher stellte die Identifizierung der Komponenten von KIF1C transportierter Fracht einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar. Ein erster Schritt bestand in der Aufreinigung KIF1C-GFP markierter Vesikel mittels *FACS*. Anschließend wurde die Zusammensetzung mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert.

Durch die massenspektrometrische Analyse der mittels *FACS* isolierten KIF1C-GFP positiven Vesikel wurden viele Aktin-assoziierte Proteine, die auch bei der Podosomenregulation eine Rolle spielen (u.a. Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes) sowie Proteine, die an der Adhäsion von Podosomen beteiligt sind (Talin, Vinkulin, Integrin), detektiert. Unter den Zytoskelettproteinen wurden auch Proteine der 14-3-3 Familie detektiert. Bereits Dorner *et al.* (1999) konnten eine direkte Interaktion des C-terminalen Endes von KIF1C mit einigen Isoformen dieser Proteine zeigen. Die Interaktion von KIF1C mit Proteinen der 14-3-3 Familie in primären humanen Makrophagen wird daher ein wichtiger Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

In der massenspektrometrischen Analyse der KIF1C-GFP-markierten Vesikel wurden auch die Rab-Proteine Rab1a, Rab5c, Rab6a, Rab7, Rab11b und Rab14 ermittelt. RabGTPasen spielen eine wichtige Rolle im intrazellulären Vesikeltransport und aktivierte Rab-Proteine rekrutieren eine Vielzahl von Effektoren, die u.a. den Transport von Vesikeln durch Bindung an Kinesin- und Myosin-Motoren vermitteln (Beraud-Dufour und Balch, 2002; Chabrilat *et al.*, 2005). Die Detektion der RabGTPasen könnte also ein erster Hinweis darauf sein, dass es sich bei der von KIF1C transportierten Fracht tatsächlich um Vesikel handelt. Daher wurde die Lokalisation von KIF1C und Rab-Proteinen in primären humanen Makrophagen genauer untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Verbindung von Rab-Proteinen und KIF1C zuerst für Rab6a gezeigt werden. Rab6a lokalisiert am Golgi-Apparat und ist am

retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum beteiligt (Goud, 2002). In humanen Makrophagen wurde in fixierten Zellen neben einer Lokalisation in der Nähe des Golgi-Apparates auch eine Verteilung von Rab6a-Vesikeln in der Zellperipherie beobachtet, die partiell mit KIF1C-TagRFP kolokalisierten (s. Abb. 3.3). In *live cell imaging* Experimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass der Kontakt zwischen KIF1C-TagRFP und GFP-Rab6a über mehrere Sekunden bestehen blieb, also deutlich länger war als bei *kiss-and-run* Ereignissen (s. Abb. 3.4 und Film 1). Dies zeigt erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen den beiden Proteinen. Um dies zu überprüfen, wurde eine GFP-Immunpräzipitation mit Lysaten KIF1C-GFP transfizierter Makrophagen durchgeführt. Tatsächlich konnte endogenes Rab6a kopräzipitiert werden. Dadurch konnte eine enge Interaktion zwischen KIF1C und Rab6a bestätigt werden. Somit scheint Rab6a am Vesikeltransport von KIF1C beteiligt zu sein. Diese Ergebnisse werden unterstützt von Ergebnissen von Dorner *et al.* (1998), die für eine Beteiligung von KIF1C am retrograden Membranfluss zwischen Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum in Maus Fibroblasten (Dorner *et al.*, 1998) sprechen.

Rab11 gehört zu den endosomalen Rab-Proteinen, die hinsichtlich Lokalisation und funktioneller Interaktion mit Effektorproteinen am besten charakterisiert sind. Rab11 wurde an post-Golgi Vesikeln, am *trans*-Golgi Netzwerk sowie an *recycling endosomes* detektiert (Ullrich *et al.*, 1996; Wilcke *et al.*, 2000) und spielt beim *Recycling* von Lipiden und Rezeptoren von frühen Endosomen zur Plasmamembran eine Rolle (Kyei *et al.*, 2006). Auch gibt es bereits Hinweise, dass Rab11 direkt oder indirekt mit Mikrotubuli-basierten Motorproteinen interagieren kann (Hammer, III und Wu, 2002). In fixierten primären humanen Makrophagen lokalisiert Rab11b vorrangig als vesikuläre Strukturen in der gesamten Zelle. In Bereichen hoher KIF1C-Dichte lokalisierten jedoch auch Rab11b-Vesikel, die partiell mit KIF1C kolokalisieren (s. Abb. 3.6).

Rab14 lokalisiert am rauhen endoplasmatischen Retikulum, am Golgi-Apparat und am *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) sowie an endosomalen Kompartimenten (frühe Endosomen und assoziierte Vesikel). Es reguliert den Transport zwischen frühen Endosomen und Golgi-Apparat und die Fusion von Phagosomen und frühen Endosomen (Junutula *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 2007). In RAW 264.7 Makrophagen lokalisiert Rab14 hauptsächlich an frühen Endosomen (Kyei *et al.*, 2006). In primären

humanen Makrophagen konnte eine partielle Lokalisation von GFP-Rab14 mit KIF1C-TagRFP in der Zellperipherie beobachtet werden. Allerdings war die Kolo­kalisierung geringer als zwischen KIF1C-TagRFP und GFP-Rab6a. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass es sich bei Rab14 nur um einen *kiss-and-run*-Kontakt handelt (s. Abb. 3.7), bei dem die beiden Vesikelpopulationen nur sehr kurz miteinander in Kontakt treten.

Die bisher genannten Ergebnisse aus Untersuchungen mit Rab-Proteinen unterstützen die Hypothese, dass es sich bei der von KIF1C transportierten Fracht um Vesikel handelt. Eine Interaktion von KIF1C mit RabGTPasen erscheint auch daher sinnvoll, da es bereits einige Beispiele für die Interaktion von Mikrotubuli-basierten Motoren und RabGTPasen gibt.

Echard *et al.* (Echard *et al.*, 1998) zeigten, dass Rabkinesin-6 (ein murines *kinesin-like* Protein) mit der aktivierten Form von Rab6 durch eine Domäne innerhalb des C-Terminus interagiert. In humanen Makrophagen könnte Rab6a auch über den C-Terminus mit KIF1C interagieren, da hier die Bindestelle für die transportierten Vesikel lokalisiert ist.

Die Interaktion zwischen einem Mikrotubuli-basierten Motor und Rab5, das an der Regulation von Bildung und Fusion früher Endosomen beteiligt ist, wurde von Zerial und McBride beschrieben (Zerial and McBride, 2001). Aktiviertes Rab5 löst eine Umverteilung der Endosomen aus: sie lokalisieren nicht mehr im Zytoplasma, sondern akkumulieren um das MTOC. Neilsen *et al.* (Nielsen *et al.*, 1999) zeigten eine bidirektionale Bewegung von Rab5-positiven Endosomen an Mikrotubuli. Zwar konnte das Motorprotein, das für diesen Transport verantwortlich ist, noch nicht identifiziert werden, es scheint sich aber möglicherweise um zytoplasmatisches Dynein oder ein Kinesin, das zum Minusende der Mikrotubuli läuft, zu handeln (Hammer, III und Wu, 2002). Darüber hinaus gibt es Daten zu Rab33, das mit dem Kinesin-like Protein Rab33b-BP interagiert (Koda *et al.* 1999).

Um die Spezifität der Vesikelaufreinigung zu überprüfen, wurde als Negativkontrolle Rab8 verwendet, das nicht mit den anderen RabGTPasen als Bestandteil der durch KIF1C transportierten Vesikel aufgereinigt wurde. GFP-Rab8 dekoriert in primären

humanen Makrophagen eine geringe Anzahl kleiner Vesikel. Eine gemeinsame Lokalisation mit KIF1C-TagRFP konnte nicht beobachtet werden (s. Abb. 3.8). Da Rab8 in den meisten Zelltypen vorhanden ist, scheint es allgemein für die Zellmorphogenese von Bedeutung zu sein (Peranen *et al.*, 1996). Weiter spielt Rab8 eine wichtige Rolle im gerichteten Membrantransport an die Zelloberfläche (Hattula *et al.*, 2002). Aus der Beobachtung der vorliegenden Arbeit lässt sich jedoch schließen, dass Rab8 in primären humanen Makrophagen nicht an Transportprozessen mit KIF1C beteiligt zu sein scheint. Dieses Ergebnis bestätigt aber, dass die mittels Massenspektrometrie identifizierten RabGTPasen spezifisch mit KIF1C-GFP-positiven Vesikeln assoziiert sind.

Durch Massenspektrometrie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die RabGTPasen Rab1a, Rab5c, Rab6a, Rab7, Rab11b und Rab14 als mögliche Fracht KIF1C-GFP positiver Vesikel identifiziert. Durch Koexpressionsstudien in primären humanen Makrophagen konnten für Rab11b und Rab14 sog. *kiss-and-run* Kontakte, bei denen sich die unterschiedlichen Vesikel kurzzeitig treffen, gezeigt werden. Bei Rab6a zeigte sich außerdem eine deutliche Kollokalisierung mit KIF1C-TagRFP in der Zellperipherie. Durch GFP-Immunpräzipitation konnte darüber hinaus eine Interaktion zwischen KIF1C-GFP und endogenem Rab6a gezeigt werden. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass die Aufreinigung mittels *FACS* erfolgreich war und tatsächlich Vesikel isoliert wurden. Außerdem bekräftigt dies die Hypothese, dass KIF1C Vesikel zu Podosomen für deren Regulation transportiert.

Mit den KIF1C-GFP assoziierten Vesikeln wurde auch das Vesikel-assoziierte Protein Sec22b identifiziert. Dieses spielt wahrscheinlich eine Rolle im Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und ist an der Phagozytose in murinen J774 Makrophagen beteiligt (Becker *et al.*, 2005). Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 1999) beschrieben endogenes Sec22b in Nierenzellen (NRK und Vero-Zellen) an vesikulären Strukturen in der gesamten Zelle, mit einer verstärkten Akkumulation am Golgi-Apparat. In weiteren Studien wurde eine Assoziation von Sec22b mit COPII-Vesikeln beschrieben (Rowe *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnten in lebenden primären humanen Makrophagen neben einer deutlichen Lokalisation im Zellzentrum auch Vesikel in der Peripherie beobachtet werden. Über eine mögliche

Interaktion von Sec22b mit Kinesinen gibt es bisher allerdings keine Daten. Zwar konnte in vorliegender Arbeit keine Kolokalisation von Sec22b und KIF1C in humanen Makrophagen nachgewiesen werden, es zeigte sich aber eine Anreicherung von Sec22b in Bereichen hoher KIF1C Dichte (s. Abb. 3.9 und Film 2). Die Identifizierung von Sec22b im Zusammenhang mit KIF1C Vesikeln bestätigt darüber hinaus noch einmal, dass mittels *FACS* tatsächlich Vesikel aufgereinigt wurden und diese Methode funktionell ist.

Lamp1 wurde ebenfalls durch massenspektrometrische Analyse der KIF1C-GFP positiven Vesikel identifiziert. Dabei handelt es sich um ein Typ I Transmembranprotein, das vor allem an Lysosomen und späten Endosomen lokalisiert (Rohrer *et al.*, 1996). Während frühe Endosomen im gesamten Zytoplasma verteilt sind, lokalisieren späte Endosomen und Lysosomen meist juxt nukleär im Bereich des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums durch Interaktion mit Mikrotubuli (Hoepfner *et al.*, 2005; Santama *et al.*, 1998). Auch in humanen Makrophagen konnte eine Akkumulation des Lamp1-Signals vor allem im Zentrum der Zelle beobachtet werden (s. Abb. 3.10). Durch Motorproteine, die sich in Richtung des Mikrotubuli-Plusendes bewegen (z.B. *kinesin-like* Proteine), können Lysosomen in die Zellperipherie transportiert werden. Das verantwortliche Kinesin ist bisher allerdings nicht bekannt (Santama *et al.*, 1998). Da KIF1C ebenfalls an das Plusende der Mikrotubuli läuft ist eine Verbindung zu Lysosomen und/oder späten Endosomen nicht auszuschließen. In humanen Makrophagen scheint ein Transport von Lysosomen durch KIF1C jedoch unwahrscheinlich, da keine Kolokalisation von KIF1C und Lamp1 beobachtet werden konnte.

Da Lamp1 durch die massenspektrometrische Analyse GFP-KIF1C markierter Vesikel identifiziert wurde, lässt sich allerdings auch nicht ausschließen, dass es sich hierbei um Ergebnisse von unspezifischem Hintergrund handelt und daher keine Verbindung zu KIF1C besteht.

Die mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine der gereinigten KIF1C-GFP markierten Vesikel stimmen zum Teil mit Ergebnissen von Hoffmann *et al.* (nicht publiziert) überein, die die Zusammensetzung reifer Phagosomen in murinen J774.A1 Makrophagen untersuchten. Dabei wurden neben phagosomalen und lysosomalen

Proteinen (Untereinheiten der V-ATPase, Lamp1 und Lamp2, Vesikel assoziierte Membranproteine (*vesicle associated membrane proteins*, VAMPs), Signalmolekülen und Rezeptoruntereinheiten (Annexine, HSP70, *Toll-like* Rezeptoren) auch zahlreiche Rab-Proteine (z.B. Rab1a, Rab7, Rab14) identifiziert. Weiter wurden Proteine des Zytoskeletts (zytoplasmatisches Aktin, Arp2/3, Tubulin Untereinheiten und Vimentin) sowie eine Vielzahl Aktin-assoziiierter Proteine detektiert.

Die Bewegung von Phagosomen ist Mikrotubuli-abhängig, wobei der Transport bidirektional erfolgt (Blocker *et al.*, 1997). Durch immunologische Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass konventionelles Kinesin an der Oberfläche von Phagosomen lokalisiert und somit wahrscheinlich für den Transport zum Mikrotubuli-Plusende verantwortlich ist (Blocker *et al.*, 1997). Daher ist nicht auszuschließen, dass ein Transport von Phagosomen durch Kinesine in Richtung der Mikrotubuli-Plusenden erfolgt. Diese Daten, sowie eine Übereinstimmung einiger mittels Massenspektrometrie identifizierter Proteine der KIF1C-GFP positiven Vesikel mit den Ergebnissen von Hoffmann *et al.*, unterstützen weiter die bisherigen Hinweise, dass durch KIF1C Vesikel zu Podosomen transportiert werden. Zwar scheint es Gemeinsamkeiten zu phagosomalen Vesikeln zu geben, ein Transport von Phagosomen durch KIF1C zu Podosomen ist jedoch unwahrscheinlich. Daher wird die genaue Charakterisierung der von KIF1C transportierten Fracht ein wichtiger Gegenstand zukünftiger Experimente sein.

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aufreinigung KIF1C-GFP markierter Vesikel mittels *FACS* funktionell ist. Darüber hinaus sollte die Methode der Vesikelaufreinigung aber noch optimiert werden, da zahlreiche Proteine analysiert wurden, die bei Kollokalisationsstudien mit KIF1C negative Resultate lieferten (Daten nicht gezeigt). Auch bei Betrachtung der ermittelten *unique peptides* kam es zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen. Große Proteine erzeugen eine höhere Anzahl *unique peptides* als kleinere. Eine erhöhte Anzahl der *unique peptides* lässt aber auch auf ein vermehrtes Vorkommen eines Proteins (beispielsweise in KIF1C-GFP transportierten Vesikeln) schließen. Die Proteine Rab6a und Sec22b haben beide eine molekulare Masse von ca. 24 kD. Für Sec22b wurden 4 *unique peptides*, für Rab6a hingegen nur 2 *unique peptides* ermittelt. Daraus würde man auf eine engere Interaktion von KIF1C mit Sec22b als mit Rab6a schließen. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit jedoch

zeigten neben einer Kolo­kalisierung auch eine Interaktion zwischen KIF1C-GFP und endogenem Rab6a, wohingegen für Sec22b keine Verbindung zwischen diesen Proteinen gefunden wurde. Eine Interpretationsmöglichkeit hierfür wäre, dass Rab6a kein Bestandteil der von KIF1C transportierten Fracht ist, sondern nur an den Vesikeln lokalisiert und während der Aufreinigung von diesen dissoziiert.

4.2 Interaktion mit HAX1

Neben der Analyse der von KIF1C transportierten Vesikel mittels Massenspektrometrie wurden parallel weitere Proteinen gesucht, die ebenfalls mit KIF1C interagieren. Dabei wurde in Zusammenarbeit mit J. Marshall (School of Medicine and Dentistry, London, England) HAX1 (HS1-associated protein X-1) identifiziert. HAX1 ist ein mitochondriales Protein in B Lymphozyten, das mit HS1 (*haematopoietic specific protein 1*) interagiert und drei mutmaßliche Domänen aufweist: eine PEST Domäne, zwei Bcl-2 Homologie-Domänen sowie eine Transmembranregion nahe des C-Terminus (Yap *et al.*, 2009).

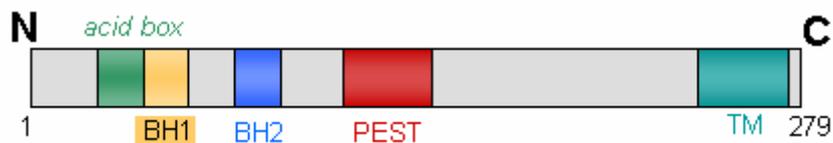


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Domänenstruktur von HAX1. In humanen Geweben gibt es acht Spleißvarianten von HAX1. Hier ist das prototypische HAX1, vermutlich Transkriptionsvariante I, dargestellt. Die Funktion der *acid box* (grün) ist noch unbekannt. BH1 (gelb) und BH2 (blau): bcl- (*B cell lymphoma/leukemia-2*) Homologie-Domänen; PEST-Domäne (rot): Prolin, Glutaminsäure, Serin, Threonin; TM (türkis): Transmembrandomäne.

Unter anderem übernimmt HAX1 eine Kontrollfunktion in der Apoptose und dient als Adapterprotein, um so die subzelluläre Lokalisation von Proteinen und mRNAs zu regulieren (Lees *et al.*, 2008). Weiter scheint HAX1 auch an Zellmigration und Signaltransduktion beteiligt zu sein (Ramsay *et al.*, 2007).

In primären humanen Makrophagen war bei Koexpression von GFP-HAX1 mit KIF1C-TagRFP eine vesikuläre Akkumulation mit KIF1C in der Zellperipherie erkennbar. Diese Kolo­kalisierung konnte auch in *live cell imaging* Experimenten beobachtet werden

(s. Film 3), woraus man auf eine potentielle Interaktion zwischen KIF1C und HAX1 schließen kann.

Bei Expression von GFP-HAX1 alleine zeigte sich entweder eine zytoplasmatische Verteilung oder eine vesikuläre Ansammlung in der Zellmitte. Um zu zeigen, dass die davon abweichende Lokalisierung von GFP-HAX1 in der Zellperipherie in Anwesenheit von KIF1C-TagRFP nicht durch den GFP-*tag* ausgelöst wird, wurden sowohl HAX1-myc als auch HAX1-flag Konstrukte mit KIF1C-TagRFP in humanen Makrophagen koexprimiert. Auch hier zeigte sich, wie bei GFP-HAX1, eine Akkumulation der beiden Proteine in der Zellperipherie (s. Abb. 3.13). Dies liefert einen weiteren wichtigen Hinweis, dass HAX1 und KIF1C möglicherweise miteinander interagieren.

HAX1 könnte eine Rolle bei der korrekten intrazellulären Lokalisation von Bindungspartnern spielen. Beispielsweise lokalisiert EBNA-LP in der Abwesenheit von HAX1 nukleär, bei Koexpression mit HAX1 zeigte sich eine Kolokalisation im Zytoplasma (Kawaguchi *et al.*, 2006). Phospholamban, ein Protein in Herzmuskelzellen, induziert eine Translokation von HAX1 von Mitochondrien zum Endoplasmatischen Retikulum (Vafiadaki *et al.*, 2007). Möglicherweise kommt KIF1C eine ebensolche Funktion zu, da für GFP-HAX1 in Abwesenheit von KIF1C-TagRFP auch eine von der Zellperipherie abweichende zelluläre Lokalisation beobachtet wurde. Dies bestärkt die bisherigen Hinweise, dass KIF1C und HAX1 miteinander interagieren. Möglicherweise handelt es sich bei HAX1 um ein für KIF1C spezifisches Adapterprotein, das die KIF1C-spezifische Fracht markiert und so die Bindung der Vesikel an KIF1C ermöglicht. Eine ähnliche Funktion wurde bereits für Kinectin im Zusammenhang mit Kinesin vorgeschlagen (Hirokawa, 1996).

Um die Hinweise auf eine Interaktion zwischen KIF1C und HAX1 zu überprüfen, wurde eine Rigor-Mutante von KIF1C (KIF1C-K103A-TagRFP) mit GFP-HAX1 in primären humanen Makrophagen überexprimiert. Es war bereits bekannt, dass diese Rigormutante von KIF1C nicht mehr in der Zellperipherie, sondern am MTOC lokalisiert (s. Kopp *et al.*, 2006). Tatsächlich zeigte sich bei Koexpression der beiden Proteine sowohl in fixierten als auch in lebenden primären humanen Makrophagen eine Relokalisierung von HAX1 an das MTOC. Diese Ergebnisse lassen auf eine enge Interaktion der beiden Proteine schließen.

HAX1 spielt weiterhin bei der Zellmigration eine Rolle, ebenso wurden Interaktionen mit Proteinen, die an der Bewegung von Zellen beteiligt sind, nachgewiesen (Szwarc *et al.*, 2007). In primären humanen Makrophagen lokalisiert GFP-HAX1 bei Koexpression mit KIF1C-TagRFP als vesikuläre Strukturen in der Zellperipherie. Hier finden sich auch dynamische Podosomen, deren Teilung für die Migration der Zelle von Bedeutung sein könnte. Durch die Interaktion von HAX1 und KIF1C werden also möglicherweise über die gebundene Fracht Regulationsfaktoren zu diesen Podosomen transportiert, die dann deren Umwälzung ermöglichen und die Zelle auch zur Migration befähigen.

Unter den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse der von KIF1C-GFP transportierten Vesikel wurde HAX1 nicht identifiziert. Dies könnte daran liegen, dass die Interaktion von KIF1C und HAX1 während des Zellaufschlusses nicht bestehen bleibt oder HAX1 kein Bestandteil der von KIF1C transportierten Vesikel ist, sondern möglicherweise nur an diesen lokalisiert. Für letzteres spricht, dass in humanen Makrophagen die Expression von GFP-HAX1 alleine eine abweichende zelluläre Lokalisation zeigt als bei Koexpression mit KIF1C-TagRFP. Um einen Einblick in möglicherweise weitere (gemeinsame) Interaktionspartner zu erhalten, wurden humane Makrophagen mit GFP-HAX1 transfiziert, die GFP-markierten Vesikel analog zu KIF1C mittels *FACS* aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Ein Vergleich der Ergebnisse mit KIF1C-GFP markierten Vesikeln zeigte eine Übereinstimmung bei mehr als 20 identifizierten Proteinen, u.a. Myosin IIA, Arp2/3, Sec22b und Vimentin. Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass KIF1C und HAX1 möglicherweise an eine gemeinsame Vesikelpopulation lokalisieren und diese gemeinsam transportieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aufreinigung KIF1C-GFP-markierter Vesikel mittels *FACS* funktionell ist. Dabei wurden mit RabGTPasen oder Sec22b auch Proteine detektiert, die darauf hinweisen, dass es sich bei der transportierten Fracht tatsächlich um Vesikel handelt. Dies wird durch die gezeigte Interaktion mit dem Vesikel-assoziierten Protein Rab6a nochmals unterstützt.

Bisher sind für KIF1C 14-3-3 Proteine, die Protein-Tyrosin-Phosphatase-1 (Dorner *et al.*, 1998; Dorner *et al.*, 1999) und Myosin IIA (Kopp *et al.*, 2006) als Interaktionspartner bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten nun zwei weitere hinzugefügt werden: die GTPase Rab6a sowie HAX1. Letzteres fungiert möglicherweise als Adapterprotein beim Vesikeltransport durch KIF1C. Ob dadurch eine gemeinsame Vesikelpopulation mit Regulationsfaktoren zu Podosomen-*Precursor* in der Zellperipherie transportiert wird, wird ein wichtiger Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.3 KIF9 reguliert Podosomen und den Abbau extrazellulärer Matrix

Dem Kinesin KIF1C konnte bereits eine wichtige Funktion in der Regulation der Podosomendynamik zugeschrieben werden (Kopp *et al.*, 2006). Auf der Suche nach weiteren Kinesinen mit einer Beteiligung an der Regulation von Podosomen wurde durch siRNA-basierte Versuche KIF9 identifiziert (P. Kopp). Hierzu wurden primäre humane Makrophagen mit siRNA gegen KIF9 transfiziert und die Zahl der Zellen mit Podosomen (d.h. ≥ 10 Podosomen/Zelle) nach 24 und 48 Stunden gezählt. Verglichen mit Kontrollzellen, die entweder mit dem Leervektor pEGFP-N1 oder einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, war die Zahl der Zellen mit Podosomen bei KIF9-transfizierten Makrophagen auf ca. 40 % der Kontrolle reduziert (Daten nicht gezeigt).

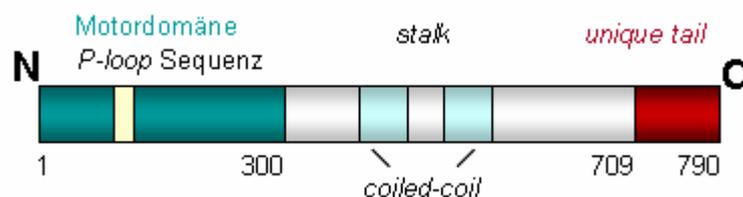


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Domänenstruktur von KIF9. Motordomäne (grün) mit *P-loop*-Sequenz für die ATP-Bindung (gelb), *stalk*: *stalk* Domäne (grau), *unique tail*: für KIF9 spezifische Sequenz am C-Terminus (rot). Die hellblauen Kästchen innerhalb der *stalk*-Domäne stellen die potentiellen *coiled-coil* Sequenzen dar.

Dieser Effekt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels shRNA-basiertem *knock-down* bestätigt werden. In transfizierten Makropagen war bereits 24 Stunden nach

Transfektion ein Rückgang der Podosomenanzahl deutlich erkennbar. Eine Quantifizierung der transfizierten Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden zeigte, dass die Anzahl der Zellen mit vielen (d.h. > 50) Podosomen deutlich reduziert war, wohingegen die Mehrheit der Zellen nur noch wenige (≤ 10) Podosomen aufwies. In Kontrollzellen, die eine *scrambled* Version der shRNA exprimierten, zeigte sich im beobachteten Zeitraum keine Veränderung, die meisten Zellen enthielten zahlreiche Podosomen (Abb. 3.18, C, D). Die dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass ein *knock-down* von KIF9 die Anzahl der Podosomen in primären humanen Makrophagen reduziert. Dies spricht für eine Beteiligung von KIF9 an der Podosomenregulation.

Nakagawa *et al.* (Nakagawa *et al.*, 1997) identifizierten KIF9 mittels PCR in Mäusen, eine eindeutige Funktion konnte jedoch nicht beschrieben werden. KIF9 wird in zahlreichen Geweben, jedoch nicht ubiquitär exprimiert. mRNA konnte in Hirn, Nieren, Milz, Lunge und Hoden nachgewiesen werden, fehlte jedoch in Leber, Herz und Darm. Die Expression scheint außerdem entwicklungsabhängig reguliert zu sein (Nakagawa *et al.*, 1997; Piddini *et al.*, 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun auch eine Expression in primären humanen Makrophagen nachgewiesen werden (s. Abb. 3.27).

Der zentrale Bereich von KIF9 enthält Aminosäuresequenzen, die möglicherweise *coiled-coil* Strukturen ausbilden können. Daher liegt das Protein, wie viele andere Mitglieder der Kinesin Superfamilie, sehr wahrscheinlich als Dimer vor (Pfister *et al.*, 1989; Piddini *et al.*, 2001). Viele Kinesine bilden Heterotetramere mit zwei schweren und zwei leichten Ketten (Arnal und Wade, 1998), die meisten Kinesine bilden jedoch Homodimere aus (Pfister *et al.*, 1989b). Auch konventionelles Kinesin liegt als homodimeres Motorprotein vor (Fan *et al.*, 2008).

Die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass KIF9 in primären humanen Makrophagen auch als Oligomer vorliegt. Dies konnte mittels anti-GFP-Immunpräzipitation und *Western Blot* gezeigt werden: neben KIF9-GFP wurde in diesem Versuch auch endogenes KIF9 detektiert, das offensichtlich mit KIF9-GFP interagiert (s. Abb. 3.28). Die Bildung von Dimeren wird wahrscheinlich durch die *coiled-coil*-Domänen ermöglicht. Ein Konstrukt, das keine Motordomäne, jedoch die

coiled-coil-Domäne enthält (KIF9-CT402-GFP), lokalisiert an Vesikeln. Dies liegt vermutlich an einer Interaktion mit dem endogenen Motorprotein.

Die detektierte Doppelbande des endogenen KIF9 (s. Abb. 3.28) könnte außerdem auf eine posttranslationale Modifikation oder das Vorkommen einer Spleißvariante von KIF9 hinweisen. In höheren Eukaryonten spielt das alternative Spleißen von Proteinen bei zahlreichen zellulären Funktionen eine wichtige Rolle (Stetefeld und Ruegg, 2005; Yura *et al.*, 2006). Die Existenz verschiedener Isoformen ermöglicht beispielsweise Motorproteinen, unterschiedliche Fracht zu transportieren (Wozniak und Allan, 2006). Für die Existenz von Spleißvarianten bei Kinesinen in Säugetieren gibt es bereits zahlreiche Beispiele. Von KIF2A liegen 2 Isoformen vor (Santama *et al.*, 1998) und bei KIF2C führt alternatives Spleißen zu Isoformen, bei denen die Sequenzen außerhalb der Motordomäne stark verändert vorliegen (Cheng *et al.*, 2002). Eine Isoform von KIF23 enthält eine Insertion, die für die Bindung von Aktin verantwortlich ist (Kuriyama *et al.*, 2002). Zwei Insertionen im aminoterminalen Bereich von KIF1B scheinen für die Kinesin-Aktivität von Bedeutung zu sein und ATPase Aktivität sowie Motilität zu beeinflussen (Matsushita *et al.*, 2009). Von anderen Kinesinen sind ebenfalls Spleißvarianten in Mäusen bekannt: KIF3B, KIF9, KIF17, KIF24 (Miki *et al.*, 2003). Die funktionelle Bedeutung ist allerdings noch nicht geklärt.

Es gibt bereits Hinweise, dass es sich bei Kinesinen um Phosphoproteine handelt, und dass Phosphorylierung eine Rolle bei der Assoziation mit Organellen oder der ATPase-Aktivität *in vitro* spielt (Hollenbeck, 1993; Sato-Yoshitake *et al.*, 1992). Lee *et al.* (Lee und Hollenbeck, 1995) konnten zeigen, dass Kinesin *in vivo* an mehreren Stellen phosphoryliert ist. Weiter ist die Motilität von Kinesin-1 (KIF5B) durch Phosphorylierung reguliert und ermöglicht so vermutlich den korrekten Transport bestimmter Fracht (Morfini *et al.*, 2007). Die hier aufgeführten Daten belegen, dass Kinesin-abhängige Transportprozesse durch Phosphorylierung des Motorproteins reguliert werden. Die Analyse der Sequenz von KIF9 mit Hilfe der Software *Phosida* (*Phosphorylation site database*) ergab eine putative Phosphorylierungsstelle bei S738. Ob eine Phosphorylierung von KIF9 den Vesikeltransport in primären humanen Makrophagen beeinflusst, wird daher ein wichtiger Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Für KIF1C konnte bereits gezeigt werden, dass wiederholt Podosomen kontaktiert werden und dieser Kontakt 30 Sekunden oder länger Bestand hatte (P. Kopp). In vorliegender Arbeit konnte nun auch ein Kontakt von KIF9 mit Podosomen bestätigt werden (s. Abb. 3.22). Die Verweildauer an jeweils einem Podosom betrug allerdings meist nur wenige Sekunden. Der beobachtete Kontakt mit Podosomen bestärkt die Vermutung, dass durch KIF9 gezielt Vesikel bzw. Regulationsfaktoren zu Podosomen transportiert werden.

Zu KIF9 existieren bislang nicht viele Daten. Das 790 Aminosäuren umfassende Protein besitzt eine N-terminale Motordomäne (AS 1-300) mit einer ATP-bindenden *P-loop*-Sequenz (AS 93-100) und eine für alle Kinesine typische Motordomänensignatur (AS 1-300) mit Mikrotubulibindestelle. Es folgt eine sog. *stalk*-Domäne (AS 301-709), die auch zwei *coiled-coil* Domänen enthält. Daran schließt sich eine für KIF9 einzigartige C-terminale Sequenz (AS 709-790) an. Letztere ist vermutlich für die Bindung von Fracht verantwortlich (Pfister *et al.*, 1989). Da die Motordomäne, die hoch konservierte Konsensussequenzen enthält, am N-Terminus lokalisiert ist, bewegt sich KIF9, wie die meisten Kinesine (Vale und Milligan, 2000), wahrscheinlich in Richtung der Mikrotubuli-Plusenden (Piddini *et al.*, 2001).

Piddini *et al.* (2001) zeigten, dass es sich in COS Zellen bei KIF9 um ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) handelt. Das Motorprotein kosedimentierte spezifisch mit Mikrotubuli, die durch Taxol stabilisiert wurden. Wenn die Polymerisierung der Mikrotubuli durch Nocodazol verhindert wurde, war der Anteil von KIF9 in der Pellet-Fraktion vernachlässigbar. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Kontakt von KIF9 mit Mikrotubuli in humanen Makrophagen untersucht werden. Eine Bewegung entlang Mikrotubuli konnte durch *live-cell imaging* Experimente leider nicht gezeigt werden, da die Expression des Tubulin-Konstrukts keine zufrieden stellenden Ergebnisse lieferte. Daher wurden primäre humane Makrophagen mit KIF9-GFP transfiziert und mittels α -Tubulin spezifisch gegen Mikrotubuli gefärbt. In fixierten Zellen konnte dadurch ein Kontakt von KIF9 mit Mikrotubuli bestätigt werden (s. Abb. 3.23).

Wie bereits durch Kopp *et al.* (2006) gezeigt wurde, reguliert KIF1C die Dynamik der Podosomen-*Precursor* in der Zellperipherie. KIF9 hingegen kontaktiert die stabileren

Podosomen im Zellzentrum. Dies weist darauf hin, dass spezifische Kinesine unterschiedliche Effekte auf Podosomen ausüben. Die molekulare Grundlage dieser Regulation wird daher ein wichtiger Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Eine Möglichkeit der Interpretation wäre jedoch die Bewegung spezifischer Kinesine entlang unterschiedlicher modifizierter Mikrotubuli, was bereits von Cai *et al.* (2009) berichtet wurde. Versuche aus vorliegender Arbeit zeigen, dass KIF1C vor allem an tyrosinierten Mikrotubuli in der Zellperipherie (s. Abb. 3.25) und KIF9 meist an acetylierten Mikrotubuli in der Zellmitte lokalisiert (s. Abb. 3.24). Es ist bekannt, dass die Bildung des peripheren Podosomenrings in Osteoklasten zumindest teilweise vom Acetylierungszustand der Mikrotubuli abhängig ist (Destaing *et al.*, 2003; Destaing *et al.*, 2005; Gil-Henn *et al.*, 2007). Neuere Daten zeigen, dass verschiedene Kinesine unterschiedlich auf posttranslationale Modifizierungen (PTMs) reagieren (Verhey und Gaertig, 2007; Westermann und Weber, 2003). Das Motorprotein Kinesin-1 bindet bevorzugt an detyrosinierte Mikrotubuli, was den Transport unterschiedlicher Fracht entlang dieser Mikrotubuli ermöglichen könnte (Kreitzer *et al.*, 1999; Liao und Gundersen, 1998; Lin *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2006). Auch KIF5C bindet bevorzugt an detyrosinierte Mikrotubuli. *In vitro* Studien zeigten, dass die ATP-Umsetzung an diesen Mikrotubuli verlangsamt und dadurch eine höhere Prozessivität ermöglicht wird (Dunn *et al.*, 2008).

Zwar sind posttranslationale Modifikationen (PTMs) von Mikrotubuli schon länger bekannt, die zellulären Funktionen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Zum einen können Stabilität und/oder Struktur der Mikrotubuli, zum anderen die Rekrutierung mikrotubuli-assoziiierter Proteine (+TIPS und Motorproteine) beeinflusst werden. Im Falle des Motorprotein-abhängigen Transports wäre es denkbar, dass PTMs als „Wegweiser“ fungieren und so den gerichteten Transport regulieren. Weiter wäre möglich, dass durch PTMs stabile Mikrotubuli für vorrangige Transporte gekennzeichnet werden. Dies könnte verhindern, dass molekulare Motoren diejenigen Mikrotubuli als Transportweg nutzen, die zerfallen, bevor der Motor/Fracht-Komplex sein Ziel erreicht hat (Hammond *et al.*, 2008).

Durch die Bewegung entlang unterschiedlich posttranslational modifizierter Mikrotubuli könnten KIF1C und KIF9 unterschiedliche Podosomen-Subpopulationen kontaktieren und so gezielt Regulationsfaktoren für deren Umwälzung anliefern. Ob eine Veränderung der PTMs in primären humanen Makrophagen beispielsweise eine

veränderte Regulation der Podosomen zur Folge hat, wird ein wichtiger Gegenstand zukünftiger Versuche sein.

Ein *knock-down* von KIF9 mittels RNAi führte zu einem deutlichen Verlust von Podosomen, was auf eine Rolle von KIF9 hinsichtlich Bildung und/oder Umwälzung dieser Adhäsionsstrukturen hinweist. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für KIF1C beschrieben (Kopp *et al.*, 2006).

Da Podosomen unter anderem zum Abbau extrazellulärer Matrix beitragen, wurde durch Einsatz spezifischer siRNA untersucht, ob eine Reduktion des endogenen KIF9-Levels den Abbau extrazellulärer Matrix beeinflusst. Hierbei wurde beobachtet, dass selbst in humanen Makrophagen, die noch zahlreiche Podosomen bildeten, der Abbau der extrazellulären Matrix deutlich reduziert war (s. Abb. 3.26). Dies weist darauf hin, dass KIF9 auch eine Funktion in der Regulation des podosomalen Matrixabbaus einnimmt, möglicherweise durch eine gezielte Anlieferung von Regulationsfaktoren. Dieser Effekt tritt möglicherweise unabhängig von der Regulation der Podosomenanzahl auf, könnte jedoch auch über eine Rückkopplungsschleife, die die Bildung von Podosomen mit podosomalem Matrixabbau verbindet, verknüpft sein (Übersicht s. Linder 2007).

Da der C-Terminus von Kinesinen als Frachtbindestelle, beispielsweise für Regulatoren, dient, ist dieser Bereich von besonderem Interesse. Da die Aminosäuresequenz für KIF9 in diesem Bereich einzigartig ist (Piddini *et al.* 2001), sollte der C-Terminus genauer untersucht werden.

Durch Mikroinjektion von GST-KIF9-CT81 konnte bereits gezeigt werden, dass der C-terminale Teil von KIF9 die Neubildung von Podosomen inhibiert. Die Zahl der Zellen mit Podosomen war im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich reduziert (P. Kopp, Daten nicht gezeigt). Ein GFP-fusioniertes Konstrukt, das weder die Motordomäne noch die *coiled-coil*-Domäne enthält (GFP-KIF9-CT81) akkumuliert ringförmig in der Mitte der Zelle (s. Abb. 3.30, H). Durch Färbungen unterschiedlicher Vesikelproteine sowie Proteine des Zytoskeletts konnte eine partielle Kolokalisation mit Proteinen des Golgi-Apparates beobachtet werden (Abb. 3.31).

Zur Lokalisation von Kinesinen am Golgi-Apparat gibt es bereits zahlreiche Daten. Marks *et al.* (Marks *et al.*, 1994) zeigten, dass Kinesin an Golgi-artigen Strukturen in primären Ratten-Hepatozyten angereichert ist. In Maus Fibroblasten (293, NIH3T3) lokalisiert KIF1C hauptsächlich am Golgi (Dorner *et al.*, 1998). Auch für Rabkinesin-6, ein Mitglied der Kinesin-9 Familie in Vertebraten, konnte eine Lokalisation am Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Echard *et al.*, 1998). In NRK-Zellen scheint das Motorprotein Kinesin an Membranen zu lokalisieren, die sich zwischen Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum bewegen. Durch Mikroinjektion eines Kinesin-Antikörpers konnte der Transport zwischen Golgi-Apparat und ER, jedoch nicht zwischen ER und Golgi-Apparat, blockiert werden (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1995).

Diese Ergebnisse passen zum beobachteten Phänotyp bei Überexpression von GFP-KIF9-CT81 in humanen Makrophagen, die mit einer Dispergierung des Golgi-Apparates einhergeht. Nur 6,7 % der mit GFP-KIF9-CT81 transfizierten Zellen wiesen einen kompakten Golgi-Apparat auf, verglichen mit 86,7 % der Kontrollzellen. Es ist denkbar, dass KIF9 mit Proteinen des Golgi-Apparates interagiert und das Volllängenprotein diese Fracht entlang Mikrotubuli transportiert. Der isolierte C-Terminus hingegen enthält keine Motordomäne mehr und kann folglich nicht mehr an Mikrotubuli laufen, so dass eine Überexpression zu einer Komplexbildung von Golgi-Proteinen führen könnte. Dies könnte die beobachtete veränderte Morphologie des Golgi-Apparates nach sich ziehen.

Ein ähnlicher Phänotyp konnte bereits in Mäusen beobachtet werden, bei denen das Gen für die zytoplasmatische schwere Kette von Dynein, einem weiteren Motorprotein, ausgeschaltet war. Auch hier teilte sich der Golgi-Komplex in zahlreiche Fragmente, die im gesamten Zytoplasma verteilt waren (Harada *et al.*, 1998). Der Golgi-Apparat befindet sich wahrscheinlich in einem Gleichgewicht zwischen anterogradem Membranfluss, vermittelt von Kinesin-Motoren, und einem retrograden Fluss, vermittelt durch Dyneine. Eine Störung dieses Gleichgewichts führt also vermutlich zur Fragmentierung des Golgi-Apparates sowie zu dessen Verteilung im Zytoplasma.

Ein Effekt der Überexpression von GFP-KIF9-CT81 auf bestehende Podosomen konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht ermittelt werden, da längere Expression (> 7 Stunden) eine Ablösung der Zellen zur Folge hatte. Möglicherweise hängt dies mit der beobachteten Dispergierung des Golgi-Apparates zusammen. Zwar zeigten Cole *et al.*

(Cole *et al.*, 1996), dass in HeLa und NRK-Zellen die Funktion des Golgi-Apparates in fragmentiertem Zustand erhalten bleibt. In humanen Makrophagen scheint jedoch die Dispergierung des Golgi-Komplexes, ausgelöst durch die Expression eines trunkierten Motorproteins, die Vitalität der Zellen zu beeinträchtigen. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass der C-terminale Bereich von KIF9 an der Regulation von Podosomen beteiligt ist, möglicherweise durch Bindung spezifischer Interaktionspartner.

Da eine Überexpression des C-terminalen Bereichs von KIF9 einen offensichtlichen Effekt in humanen Makrophagen bewirkt, sollte im Folgenden versucht werden, mögliche Bindungspartner für KIF9 zu identifizieren. Durch Immunpräzipitation von GFP-KIF9-CT81 aus Lysaten transfizierter primärer humaner Makrophagen und anschließender Analyse mittels Massenspektrometrie konnten die *lipid raft*/ Aktin-bindenden Proteine Reggie-1 und Reggie-2 (Flotillin-2 bzw. Flotillin-1) als potentielle Interaktionspartner für den C-terminalen Bereich von KIF9 identifiziert werden.

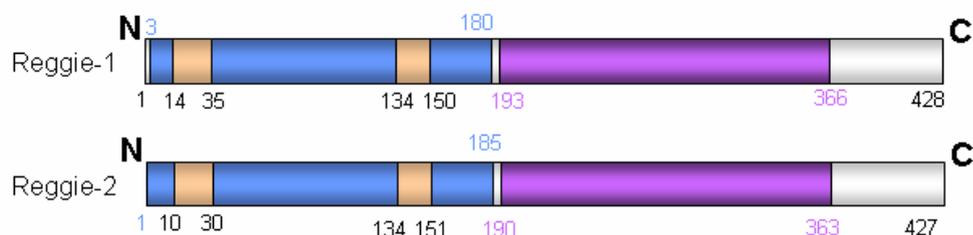


Abb. 4.3 Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Reggie-1 und Reggie-2. SPFH (Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C) Domäne (blau), hydrophobe Domänen (hellbraun), Flotillin-Domäne (violett).

Reggie-1 und Reggie-2 wurden ursprünglich als neuronale Proteine während der Regeneration von Axonen entdeckt. Kurz danach wurden sie unabhängig voneinander in *flotation assays* als Bestandteil der *lipid rafts* identifiziert und daher Flotillin-1 (Reggie-2) bzw. Flotillin-2 (Reggie-1) genannt (Bickel *et al.*, 1997). Es handelt sich um hoch konservierte Proteine, die in allen bisher untersuchten Vertebratenzellen vertreten sind. Da sie auch in Bakterien und Pflanzen vorkommen, scheinen sie grundlegende zelluläre Funktionen auszuüben. Die beiden bekannten Isoformen Reggie-1 und Reggie-2 (Flotillin-2 bzw. Flotillin-1) können durch Interaktion C-terminaler Domänen Hetero-Oligomere bilden (Babuke and Tikkanen, 2007; Glebov *et al.*, 2006). Weiter wurde die

Bindung an Aktin (Munderloh *et al.*, 2009; Rajendran *et al.*, 2003) sowie eine Modifizierung der Aktin-Zytoskelett Dynamik beschrieben (Langhorst *et al.*, 2007). Reggie-1/-2 lokalisieren an der Plasmamembran in sog. Mikrodomänen, assoziieren aber auch mit Vesikeln intrazellulärer Kompartimente, z.B. Golgi-assoziierte Vesikel (Langhorst *et al.*, 2008), späte Endosomen/Lysosomen (Langhorst *et al.*, 2006; Stuermer *et al.*, 2001) oder Phagosomen in Makrophagen (Dermine *et al.*, 2001; Garin *et al.*, 2001). Es wird diskutiert, dass Reggie-positive Vesikel an einem Kontakt zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten beteiligt sind (Langhorst *et al.*, 2008; Stuermer, 2010).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen dabei auf eine enge Interaktion zwischen KIF9 und Reggie-1 in primären humanen Makrophagen hin. Nach Immunpräzipitation von KIF9-GFP aus Lysaten transfizierter Makrophagen konnte endogenes Reggie-1 kopräzipitiert werden. Umgekehrt wurde bei Immunpräzipitation von Reggie-1-GFP endogenes KIF9 präzipitiert (s. Abb. 3.32). Interessanterweise wurde nach Immunpräzipitation von Reggie-1-GFP nur eine Bande mit endogenem KIF9 detektiert. Dies lässt den Schluss zu, dass Reggie-1 möglicherweise nur mit einer Spleißvariante bzw. einer phosphorylierten Form von KIF9 interagiert. Dies zu klären, wird Gegenstand zukünftiger Versuche sein.

4.4 Reggie-Proteine regulieren den Abbau extrazellulärer Matrix

Um die biochemischen Daten zu bestätigen, wurden Lokalisation und Verhalten von KIF9 und Reggie in lebenden und fixierten primären humanen Makrophagen untersucht. In fixierten Zellen konnte dabei eine partielle Kolokalisation zwischen GFP-KIF9-CT81 und Reggie-1, in der Nähe des Golgi-Apparates, beobachtet werden. Weiter handelt es sich bei Reggie-1/-2 auch um vesikuläre Strukturen, die partiell mit KIF9-mCherry kolokalisieren (Abb. 3.33). Eine Lokalisation von Reggie-2 am Golgi-Apparat konnte bereits gezeigt werden (Gkantiragas *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu einer deutlichen Kolokalisation in fixierten Zellen zeigten *live cell* Studien in lebenden Makrophagen einen transienten Kontakt zwischen Reggie-1-GFP und KIF9-mCherry-Vesikeln (Film 6). Diese erinnerten an „*kiss-and-run*“ Kontakte, bei dem sich die

Proteine nur sehr kurz berühren. Daher ist nicht auszuschließen, dass es sich bei der ausgeprägten Kolo-kalisation in fixierten Zellen um ein Fixierungsartefakt handelt.

Durch die Interaktion zwischen KIF9 und Reggie-1 bzw. weiterer Golgi-Proteine ließe sich möglicherweise die beobachtete Dispergierung des Golgi-Apparates bei Überexpression von GFP-KIF9-CT81 erklären. Der isolierte C-Terminus, der keine Motordomäne mehr enthält, kann nicht mehr an Mikrotubuli binden und an diesen wandern. Eine Überexpression würde folglich zu einer Ansammlung von Proteinen am Golgi-Apparat führen. Dies ist möglicherweise ein Grund für die beobachtete veränderte Morphologie und könnte auch eine Ablösung der Zellen nach sich ziehen.

In HeLa Zellen lokalisieren weder endogenes Reggie-1 noch Reggie-1-GFP am Golgi-Apparat. Ein Deletionskonstrukt ohne N-Terminus jedoch akkumulierte am Golgi-Komplex, was durch Immunfluoreszenzfärbung mit dem Golgi-Protein GM130 gezeigt wurde (Langhorst *et al.*, 2007). Dieser Effekt wurde auch für KIF9-GFP in humanen Makrophagen beobachtet. Bei Expression des Vollängenkonstrukts sind zahlreiche Vesikel, vor allem im Zentrum der Zelle, erkennbar. KIF9-CT81-GFP hingegen lokalisiert ebenfalls ringförmig in der Nähe des Golgi-Apparates (s. Abb. 3.31). Daraus kann man schließen, dass Informationen für die Assoziation mit und den Transport durch den Golgi-Apparat in der Aminosäuresequenz von Reggie-1 sowie KIF9 kodiert sind.

Weiter stellte sich die Frage, ob die Interaktion zwischen KIF9 und Reggie Podosomen und deren Funktion in primären humanen Makrophagen beeinflusst.

Wie bereits gezeigt wurde, wird die Anzahl der Podosomen durch einen *knock-down* von KIF9 in humanen Makrophagen deutlich reduziert. Zusätzlich ist in Makrophagen, die noch Podosomen enthalten, der Abbau der extrazellulären Matrix deutlich verringert (s. Abb. 3.26). Im Gegensatz dazu beeinflusste weder ein Einzel-*knock-down* von Reggie-1 oder Reggie-2 noch ein kombinierter *knock-down* der beiden Proteine die Podosomenanzahl. Bei der Quantifizierung zeigte sich, dass die Mehrheit der Zellen zahlreiche (> 50) Podosomen enthielt. Hinsichtlich Matrixabbau konnte bei *knock-down* von Reggie-1 und Reggie-2 ein deutlicher Effekt gezeigt werden. Ein Einzel-*knock-down* der Proteine zeigte vergleichbare Effekte auf den Matrixabbau, nämlich eine signifikante Reduktion im Vergleich zu Kontrollzellen. Bei gleichzeitigem *knock-down* von Reggie-1 und Reggie-2 ergab die Quantifizierung eine hoch signifikante Reduktion.

Da Reggie-1 und Reggie-2 dazu neigen, Heterooligomere zu bilden (Langhorst *et al.*, 2008), könnten sie möglicherweise nur dann Einfluss auf den Matrixabbau ausüben, wenn sie als Komplex vorliegen.

Vergleicht man den Matrixabbau bei *knock-down* von KIF9 mit *knock-down* von Reggie-1/-2, so fällt auf, dass dieser bei Reduktion des endogenen KIF9-Levels stärker abnimmt als bei Reggie-1/-2. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass es sich bei KIF9 um ein essentielles Motorprotein für den Transport verschiedener Regulationsfaktoren handelt. Bei *knock-down* von KIF9 in humanen Makrophagen waren zwei Effekte zu beobachten: die Anzahl der Podosomen ist reduziert und in Zellen, die noch Podosomen haben, ist der Matrixabbau inhibiert. KIF9 scheint somit neben Reggie-1/-2 weitere Faktoren zu transportieren, die zum einen den Abbau extrazellulärer Matrix, zum anderen aber auch die Podosomenstruktur regulieren.

Dieses Ergebnis stimmt mit weiteren unveröffentlichten Daten aus unserem Labor überein: durch spezifischen *knock-down* von KIF5B, KIF3A, KIF3B konnte ebenfalls ein verminderter Abbau der extrazellulären Matrix gezeigt werden (C. Wiesner). In diesem Fall konnte nachgewiesen werden, dass der Abbau mit dem Transport von MT1-MMP Vesikeln durch die genannten Kinesine in Verbindung steht. Über den Einfluss weiterer Kinesine auf den Abbau extrazellulärer Matrix gibt es bislang keine weiteren Daten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte für das wenig bekannte Kinesin KIF9 nicht nur eine Expression in humanen Makrophagen, sondern auch zum ersten Mal eine Funktion beschrieben werden: neben der Regulation von Podosomen ist es auch am Abbau extrazellulärer Matrix beteiligt. Bei *knock-down* von endogenem KIF9 sinkt die Anzahl der Podosomen und sogar in Zellen, die noch Podosomen haben, ist der Matrixabbau deutlich beeinträchtigt. Dabei kommt dem C-Terminus von KIF9 eine entscheidende Bedeutung zu.

Weiter wurde für KIF9 neben dem bisher bekannten Interaktionspartner Ras-like GTPase Gem (Piddini *et al.*, 2001) ein weiterer identifiziert: Reggie-1. Auch für dieses Protein wurde eine neue Funktion ermittelt: neben einer bereits bekannten Beteiligung bei Phagozytose, Regulierung des Aktinzytoskeletts und intrazellulärem

Membrantransport (Babuke *et al.*, 2009) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Reggie-1, und auch Reggie-2, am Abbau extrazellulärer Matrix in primären humanen Makrophagen beteiligt sind. Dies könnte durch den Transport von Vesikeln geschehen, die beispielsweise Matrix-Metalloproteasen enthalten, welche für die lytischen Eigenschaften der Podosomen von Bedeutung sind (Linder 2007).

Die in den ersten beiden Teilen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse können schematisch in folgendem Modell dargestellt werden:

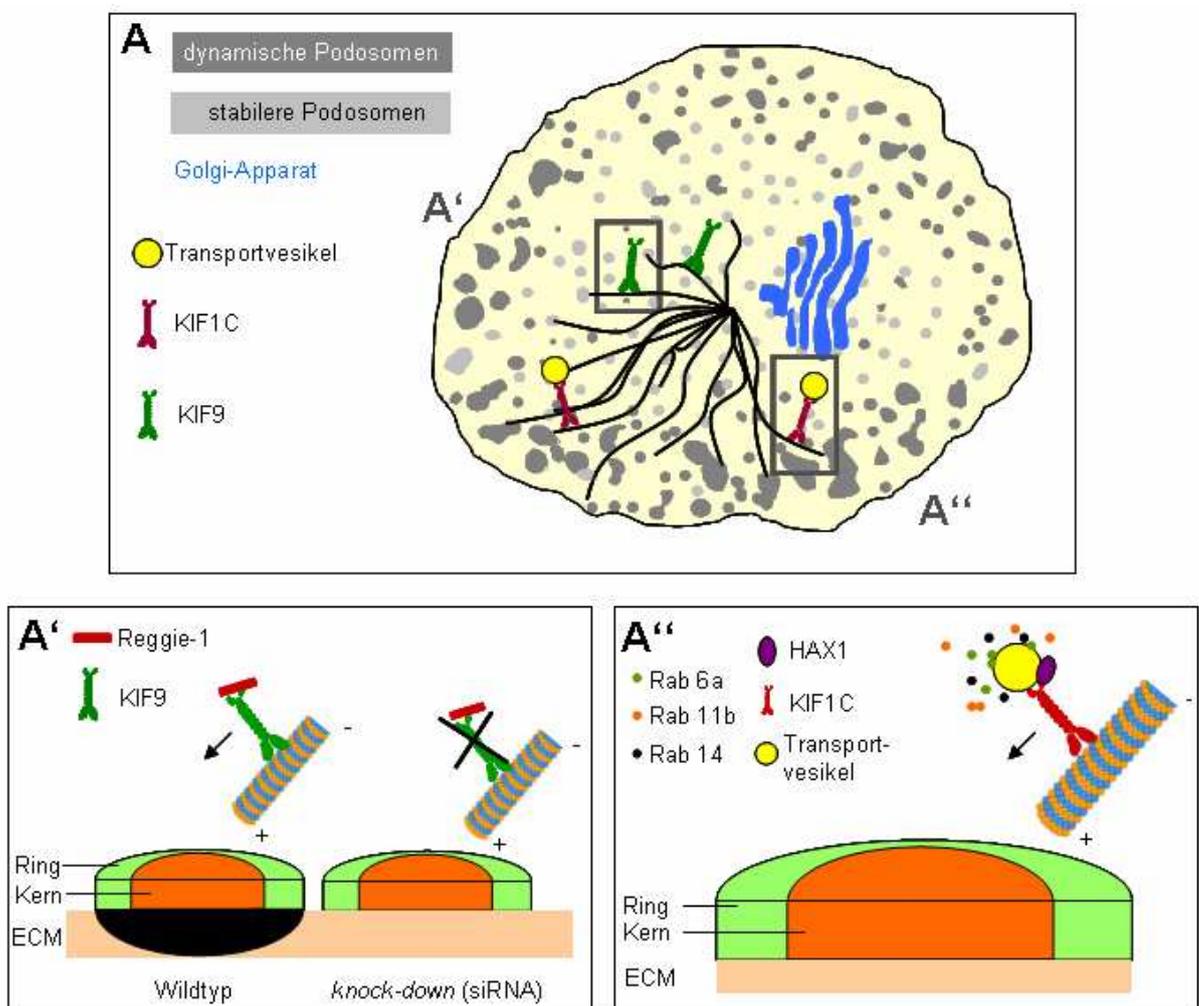


Abb. 4.4 Modelle der Regulation durch KIF9 und KIF1C

(A) Dynamische Podosomen (dunkelgrau) findet man hauptsächlich in der Zellperipherie, diese werden von KIF1C (rot), das Vesikel (gelb) transportiert, kontaktiert. Stabilere Podosomen (hellgrau) findet man eher in der Zellmitte, diese werden von KIF9 (grün) kontaktiert. Es wurde nur ein Teil Mikrotubuli eingezeichnet (schwarze Linien), der Golgi-Apparat ist in blau dargestellt. (A') **Transport durch KIF9.** KIF9 (grün) ist als Homodimer dargestellt, mit einer globulären Motordomäne, die an Mikrotubuli bindet, einem *coiled-coil*-Stiel und dem C-Terminus. KIF9 kontaktiert Podosomen und transportiert Reggie-1 (rot). Der Pfeil zeigt die Bewegung von KIF9 in Richtung der Mikrotubuli-Plusenden an. Der schwarze

Halbkreis unterhalb des Podosomes stellt den Abbau extrazellulärer Matrix dar (links). Bei *knock-down* von KIF9 oder Reggie-1 ist der Abbau der Matrix (ECM) blockiert (rechts). (A'') **Transport durch KIF1C**. KIF1C (rot) ist als Homodimer dargestellt, mit einer globulären Motordomäne, die an Mikrotubuli bindet, einem *coiled-coil*-Stiel und dem C-Terminus. KIF1C transportiert Vesikel (gelb), wahrscheinlich gemeinsam mit dem Adapterprotein HAX1 (violett). Der Transport der Vesikel wird möglicherweise durch Rab-Proteine (grüne, orangefarbene und schwarze Kreise) unterstützt. Der Pfeil zeigt die Bewegung von KIF1C in Richtung der Mikrotubuli-Plusenden an.

4.5 Supervillin reguliert Podosomen

Eine Teilung der Podosomen *Precursor* und Auflösung der regulären Podosomen sind grundlegende und essentielle Vorgänge für die Aufrechterhaltung der Podosomen einer Zelle. Trotz der Bedeutung dieser Prozesse ist über ihre Regulation nur wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die Motorproteine KIF1C und KIF9 an der Regulation beteiligt sind (Kopp *et al.*, 2006) sowie Daten der vorliegenden Arbeit). Über Unterschiede in der molekularen Zusammensetzung der verschiedenen Subpopulationen der Podosomen war bislang allerdings nichts bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte Supervillin als erstes Protein identifiziert werden, das differentiell an den unterschiedlichen Podosomen Subpopulationen lokalisiert. Dies zeigt auch zum ersten Mal, dass die verschiedenen Podosomen Subpopulationen eine unterschiedliche molekulare Zusammensetzung aufweisen. In primären humanen Makrophagen lokalisiert GFP-Supervillin vor allem an reguläre Podosomen sowie am Zellcortex des *trailing edge* (s. Abb. 3.36, A). Weiter gibt es Hinweise, dass Supervillin an der Auflösung der *Precursor* beteiligt ist. Diese enthalten zunächst kein Supervillin, sondern reichern es im Verlaufe der Auflösung an (s. Abb. 3.39; Filme 7 und 8). Außerdem wurde in Zeitreihen beobachtet, dass eine verlängerte Expression (> 48 Stunden) von GFP-Supervillin eine verringerte Podosomenzahl je Zelle zur Folge hatte (s. Abb. 3.40). Interessanterweise trat der Effekt der Podosomen-Auflösung in primären humanen Makrophagen erst ab einer Expressionszeit ab 48 Stunden auf. So war es möglich, zu früheren Zeitpunkten das reguläre Verhalten von Supervillin zu untersuchen.

Diese Daten stimmen mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, in denen eine negative Regulation fokaler Adhäsionen durch Supervillin gezeigt wurde (Ballestrem *et al.*, 2001; Carragher und Frame, 2004; Pestonjamas *et al.*, 1997; Pope *et al.*, 1998).

Eine Lokalisation von Supervillin an F-Aktinfasern und F-Aktin *punctae* in COS7-Zellen wurde durch Crowley *et al.* (Crowley *et al.*, 2009) und Wulfkühle *et al.* (Wulfkühle *et al.*, 1999) beschrieben. Endogenes Supervillin lokalisiert in MDA-MB-231 Krebszellen an Invadopodien und an Podosomen in Src-transfizierten COS7-Zellen (Crowley *et al.*, 2009). Zellen, die relativ große Mengen endogenes Supervillin enthalten, wie beispielsweise Krebszellen oder Neutrophile, enthalten keine fokalen Adhäsionen, was mit dem beobachteten Supervillin-vermittelten Verlust dieser Strukturen übereinstimmt (Pestonjamasp *et al.*, 1997; Pope *et al.*, 1998b). Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression von GFP-Supervillin in COS7-Zellen zu einer erhöhten Anzahl punktartiger F-Aktinstrukturen (*F-actin punctae*) (Crowley *et al.*, 2009).

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass Supervillin in primären humanen Makrophagen eine Rolle bei der Regulation der Podosomendynamik spielt, analog zu einem Supervillin-vermittelten Verlust fokaler Adhäsionen (Takizawa *et al.*, 2006).

Anhand verschiedener Trunktionskonstrukte von Supervillin sollte in Transfektionsversuchen ermittelt werden, welche Abschnitte des Proteins die Auflösung der Podosomen vermitteln. Abb. 4.5 zeigt einen Überblick der bedeutendsten Ergebnisse.

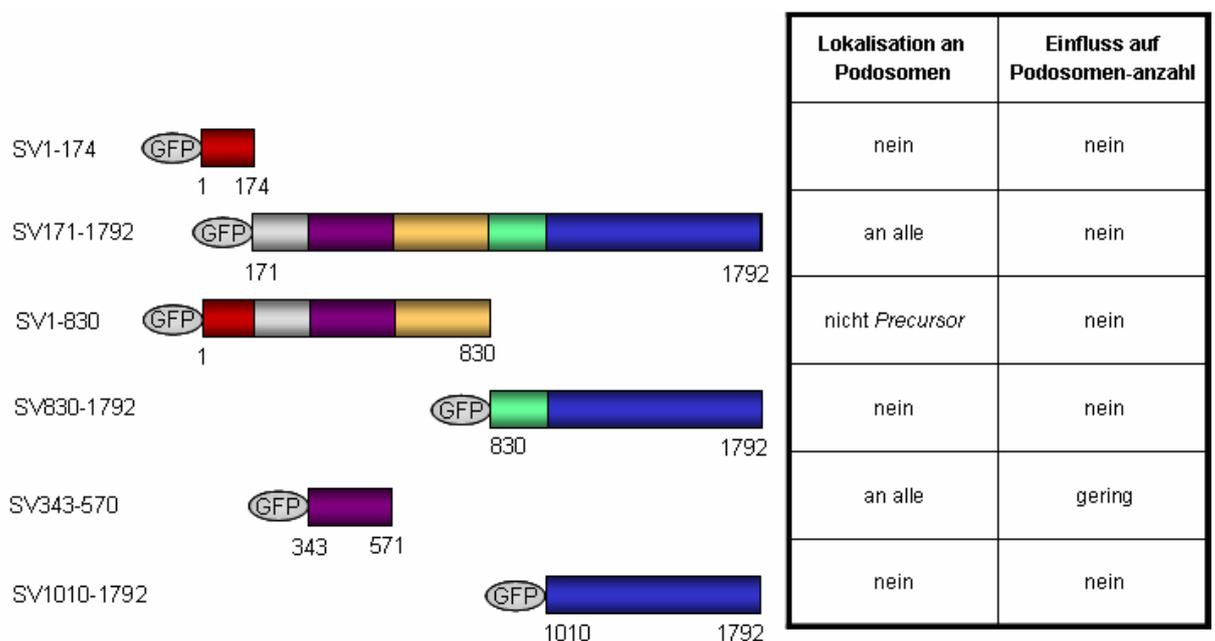


Abb. 4.5 Die Myosin IIA-Bindestelle ist essentiell für die differentielle Lokalisation an Podosomen. Durch Expression mehrerer Teilkonstrukte von Supervillin konnte gezeigt werden, dass die Myosin IIA-Bindungsdomäne (AS 1-174) für die differentielle Lokalisation an Podosomen essentiell ist. Die isolierte Domäne oder Konstrukte ohne diese Domäne lokalisieren entweder gar nicht mehr an Podosomen oder an alle Subpopulationen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in primären humanen Makrophagen die Myosin IIA-Bindedomäne von Supervillin (SV1-174) von entscheidender Bedeutung ist. SV1-174 bindet die S2 regulatorischen Domänen der schweren Ketten von Nichtmuskelmyosin IIA und Myosin II in glatten Muskelzellen (Chen *et al.*, 2003). Eine Überexpression der isolierten Myosin IIA-Bindedomäne in humanen Makrophagen zeigte neben einer starken Akkumulation im Zellzentrum auch die Lokalisation an peripheren Fasern. Durch Färbung von Myosin IIA mit einem spezifischen Antikörper konnte eine Koloalisation gezeigt werden. Mittels Immunpräzipitation von Lysaten GFP-SV1-174 transfizierter Makrophagen konnte auch eine Interaktion mit endogenem Myosin IIA nachgewiesen werden (s. Abb. 3.47).

Ein Verlust der Myosinbindenden Domäne (SV171-1792) in primären humanen Makrophagen zeigte auf die Anzahl der Podosomen keinen Effekt mehr. Weiter war keine differentielle Rekrutierung an die Podosomen-*Precursor* mehr erkennbar, sondern eine Lokalisation an allen Podosomen (s. Abb. 3.42 und 3.43). Supervillin scheint in diesem Fall also nur noch als Aktin-bindendes Protein zu fungieren. In COS7-Zellen hingegen reduziert ein Supervillin-Konstrukt ohne TRIP6-Bindungsdomäne die Anzahl reifer fokaler Adhäsionen, lokalisiert jedoch nicht mehr an diesen Strukturen (Takizawa *et al.*, 2006). Möglicherweise übernimmt Myosin IIA in humanen Makrophagen die Funktion von TRIP6 in COS7-Zellen und reguliert gemeinsam mit Supervillin die Umwälzung von Podosomen, analog zum *turnover* fokaler Adhäsionen. Weiter ist es denkbar, dass eine Bindung von Supervillin an Myosin IIA Podosomen destabilisiert bzw. deren Auflösung vermittelt. Dadurch ließe sich auch erklären, dass bei Expression eines Konstrukts ohne Myosinbindungsdomäne (SV171-1792) kein Podosomenverlust mehr zu beobachten war.

Alternativ ist es vorstellbar, dass durch diese Interaktion positive Regulatoren, die Podosomen stabilisieren, verdrängt werden. Dies könnte entweder durch sterische Behinderung an der Adhäsionsstruktur selbst oder durch Bindung an eine gemeinsame Bindestelle geschehen. Eine ähnliche Hypothese wurde auch für die negative Regulation fokaler Adhäsionen vorgeschlagen: Supervillin könnte die Interaktion

zwischen TRIP6 und Endoglin, einem Bestandteil des TGF- β -Komplexes, der die Bildung von Stressfasern und die Lokalisation von TRIP6 und Zyxin an fokalen Adhäsionen unterstützt, zerstören (Takizawa *et al.*, 2006). Daher wird die Ermittlung weiterer möglicher Bindungspartner von Supervillin in primären humanen Makrophagen ein wichtiger Gegenstand zukünftiger Versuche sein.

Nach Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2003) vermittelt Supervillin die Interaktion zwischen Myosin IIA und Aktinfilamenten. Durch diese Bindung hat Supervillin wahrscheinlich eine Funktion in der Regulation des Aufbaus des Zytoskeletts. Eine ringartige Lokalisation von Myosin IIA um Invadopodien (Alexander *et al.*, 2008) und Podosomen (van Helden *et al.*, 2008) wurde bereits beschrieben. Auch in humanen Makrophagen konnte eine Lokalisation von Myosin IIA in der Ringstruktur von Podosomen beobachtet werden. Dabei verbinden einzelne Myosin-Kabel benachbarte Podosomen miteinander (s. Abb. 3.44).

Aktomyosin basierte Kontraktilität spielt bei der Bildung und Umwälzung von Podosomen eine wichtige Rolle. Auch die Lokalisation von Myosin II an Podosomen in Osteoklasten (Krits *et al.*, 2002) oder in dendritischen Zellen (van Helden *et al.*, 2008) um den aktinreichen Kern der Podosomen wurde bereits beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch Zeitreihen gezeigt werden, dass die Anreicherung von GFP-Supervillin an Podosomen mit einer Kopplung dieser Strukturen an Myosin IIA-positive Kabel einhergeht, woraufhin sich Podosomen auflösen. Diese Beobachtung passt zu Ergebnissen aus anderen Arbeitsgruppen, nach denen eine basale Aktivität von Myosin II für die Bildung und Stabilisierung der Podosomen nötig ist, wohingegen ein Anstieg der Aktomyosin-Kontraktilität wahrscheinlich die Auflösung von Podosomen induziert (van Helden *et al.*, 2008). Myosin-bedingte Kontraktilität kann, abhängig von der Festigkeit des Substrats, auch in Zugspannung unterhalb der Podosomen umgewandelt werden, wodurch diese als Mechanosensoren fungieren könnten (Collin *et al.*, 2008).

Eine Überexpression der N-terminalen Hälfte von Supervillin (SV1-830) hatte keine Funktion mehr in der Regulation der Podosomenanzahl. Während nach Überexpression des Volllängen-Proteins nach 48 Stunden eine Reduktion der Podosomenanzahl zu beobachten war, zeigte sich bei Überexpression von GFP-SV1-830 keine Veränderung. Hinsichtlich Lokalisation verhält sich GFP-SV1-830 hingegen ähnlich dem

Volllängenprotein: es lokalisiert an reguläre Podosome und nicht an *Precursor*. Bei starker Expression war jedoch eine verstärkte Faserbildung im *trailing edge* der Zellen zu beobachten. Außerdem verbinden diese Kabel auch einzelne Podosome miteinander (s. Abb. 3.45).

Diese Beobachtungen ähneln Ergebnissen von Wulfskuhle *et al.* (1999): ein erhöhtes Expressionslevel von GFP-SV1-830 in CV-1 Zellen verursachte Veränderungen der Zellmorphologie, was mit der Bildung zahlreicher Stressfasern einherging.

Daher wurde vermutet, dass Supervillin eine Zugspannung auf Podosome ausüben könnte. Da Spannung von Myosin IIA vermittelt wird, wurden GFP-SV1-830 transfizierte Zellen mit Antikörpern spezifisch gegen Myosin IIA gefärbt. Dabei konnte eine Kollokalisierung der Kabel mit Myosin IIA bestätigt werden. Da Myosin nur in phosphoryliertem Zustand kontraktile ist, wurden in GFP-SV1-830 transfizierten Zellen auch die phosphorylierte leichte Kette von Myosin IIA (pMLC) gefärbt (s. Abb. 3.46). Auch hier konnte eine Kollokalisierung gezeigt werden. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass v.a. reguläre Podosome, die auch Supervillin angereichert haben, unter Spannung stehen. Außerdem scheint Supervillin kontraktiles Myosin an Podosome zu binden und dadurch deren Auflösung zu vermitteln.

In COS7-Zellen kollokalisiert SV1-174 mit der mono- und diphosphorylierten Form von MLC (Takizawa *et al.*, 2006). Die Bindung von SV1-174 an Myosin könnte die Entfaltung des Myosin-Monomers begünstigen und so die Myosin-Aktivierung durch MLC Phosphorylierung erleichtern (Kolega, 1998; Kolega und Taylor, 1993). Umgekehrt könnte Supervillin durch Bindung an Myosin auch eine Bindung der Myosinphosphatase verhindern (Johnson *et al.*, 1997; Mitsui *et al.*, 1992). Dies würde schließlich zu einer Akkumulation der phosphorylierten MLC an Supervillin führen (Takizawa *et al.*, 2007).

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die differentielle Rekrutierung von Supervillin an die Podosomensubpopulationen von einer Aktomyosinbindung bzw. Aktomyosinkontraktilität abhängig ist. Trunktionskonstrukte ohne Myosinbindungsdomäne agieren nur noch als Aktin bindende Proteine, die die Umwälzung der Podosome nicht mehr beeinflussen.

Eine Expression der TRIP6-Bindedomäne von Supervillin (GFP-SV343-570) in primären humanen Makrophagen zeigte nur eine geringe Reduktion der Podosomenanzahl, und das erst nach 72 Stunden. In COS7-Zellen hingegen hat diese

Domäne den größten Effekt hinsichtlich Struktur und Funktion fokaler Adhäsionen (Takizawa *et al.* 2006). Dabei ist TRIP6 möglicherweise für die Rekrutierung von Supervillin an fokale Adhäsionen verantwortlich, da ein Supervillin-Konstrukt ohne diese Domäne nicht mehr an fokalen Adhäsionen lokalisiert (Takizawa *et al.*, 2006). Für die Regulation fokaler Adhäsionen in COS7-Zellen sind mehrere Supervillindomänen verantwortlich (Takizawa *et al.*, 2006). Beispielsweise zerstört SV1-174 Stressfasern, indem durch Myosin II eine Hyperkontraktilität erzeugt wird. SV343-571 hingegen wirkt der Bildung von Stressfasern sowie großer fokaler Adhäsionen im Zentrum der Zelle durch Interaktion mit TRIP6 entgegen (Takizawa *et al.*, 2007; Takizawa *et al.*, 2006). In humanen Makrophagen hingegen scheint die TRIP6-Bindedomäne keine wesentliche Rolle bei der Regulation der Podosomen zu spielen.

In humanen Makrophagen zeigte eine Expression der AS 1010-1792 (GFP-SV1010-1792) keine Lokalisation mehr an Podosomen, sondern eine diffuse Verteilung im gesamten Zytoplasma. Weiter hatte der C-terminale Bereich auch keinen Effekt mehr auf die Anzahl der Podosomen. Bereits von Wulfschlegel *et al.* (1999) wurde beschrieben, dass die Expression der Villin-Homologie-Domäne (AS 1010-1792) *in vivo* nicht mehr an das Aktinzytoskelett bindet.

Bei Expression von GFP-SV830-1792 zeigte sich eine Akkumulation im Zellzentrum, möglicherweise im Kern. Für Supervillin sind neben einer Kernlokalisationssequenz für die AS 830-1010 (Wulfschlegel *et al.*, 1999) drei weitere im N-Terminus (AS 1-830) beschrieben. Im C-Terminus scheint jedoch diese eine Sequenz ausreichend für eine Relokalisierung zu sein. Bis 24 Stunden nach Transfektion des C-terminalen Konstrukts waren in humanen Makrophagen auch keine Auswirkungen auf die Anzahl der Podosomen zu erkennen. Allerdings war eine Auswertung zu späteren Zeitpunkten auch nicht mehr möglich, da es zu einer Ablösung der Zellen kam. Eine Überexpression des C-terminalen Bereichs von Supervillin scheint also die Vitalität der Makrophagen allgemein zu beeinträchtigen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus den Untersuchungen der einzelnen Supervillin-Domänen, dass die Myosin IIA-Bindungsdomäne sowohl für die differentielle Lokalisation an die Podosomen Subpopulationen als auch für die Regulation der Podosomenanzahl essentiell ist.

Die durchschnittliche Lebensdauer von Podosomen in primären humanen Makrophagen beträgt 2-12 Minuten. Um zu ermitteln, ob Supervillin die Lebensdauer beeinflusst, wurden primäre humane Makrophagen mit einer shRNA spezifisch gegen Supervillin transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einer *scrambled version* transfiziert wurden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Supervillin die Lebensdauer von Podosomen beeinflusst. Durch *knock-down* von Supervillin blieben Podosomen durchschnittlich 10 Minuten bestehen, was ca. dem dreifachen Wert der Kontrollzellen (3 Minuten) entspricht (s. Abb. 3.51).

Supervillin gehört zur Familie der Villin/Gelsolinproteine. Gelsolin ist ein Aktinfilament-schneidendes Protein und ein wichtiger Bestandteil des Podosomenrings in humanen Makrophagen (Linder und Kopp, 2005). Weiterhin ist es für die Bildung von Podosomen in Osteoklasten von Bedeutung (Chellaiah *et al.*, 2000; De, V *et al.*, 2002). Möglicherweise hat die Gelsolin-Homologie-Domäne im C-terminalen Bereich von Supervillin ebenfalls eine Aktinfilament-schneidende Funktion (Wulfkühle *et al.* 1999), so dass ein Verlust des Proteins die interne Umwälzung von Aktin verlangsamt, was in einer verlängerten Lebensdauer resultieren könnte.

4.6 Supervillin reguliert zusammen mit Myosin IIA und Gelsolin den Abbau extrazellulärer Matrix

In Src-transfizierten MDA-MB-231 Zellen war der Abbau der extrazellulären Matrix nach *knock-down* von Supervillin reduziert (Crowley *et al.*, 2009). Supervillin bindet und reguliert Myosin II (Takizawa *et al.* 2007), wodurch Exozytose in zahlreichen Zelltypen beeinflusst wird (Togo und Steinhardt, 2004). Eine Inhibierung von Myosin IIA inhibiert den Abbau extrazellulärer Matrix an Invadopodien (Alexander *et al.*, 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bereits die Bedeutung von Myosin IIA zusammen mit Supervillin im Hinblick auf die Regulation von Podosomen in primären humanen Makrophagen gezeigt werden. Supervillin ist ein Mitglied der Proteine der Villin/Gelsolin Familie (Pestonjamasp *et al.*, 1997). Gelsolin wird in Osteoklasten sowohl für die Bildung als auch die degradative Aktivität von Podosomen benötigt. Es vermittelt Prozesse der Invasion und Motilität von Krebszellen, Prozesse, für die der

Abbau der extrazellulären Matrix eine Voraussetzung ist (Chellaiah *et al.*, 2000; MacLennan *et al.*, 1999; Rieder *et al.*, 2005; Van den Abbeele *et al.*, 2007).

Im Folgenden sollten daher mögliche Effekte eines Verlusts von Supervillin, Myosin IIA und/oder Gelsolin hinsichtlich Matrixabbau in primären humanen Makrophagen untersucht werden. Nach *knock-down* mittels siRNA wurden die Zellen auf Rhodamin-markierte Gelatine ausgesät und der Abbau der extrazellulären Matrix analysiert.

Bei Reduktion des endogenen Supervillin-Levels konnte jedoch kein wesentlicher Unterschied zu Kontrollzellen beobachtet werden, der Matrixabbau war nicht beeinträchtigt. Ein *knock-down* von Myosin IIA oder Gelsolin hingegen reduzierte den Matrixabbau im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant. Darüber hinaus hatte ein gleichzeitiger *knock-down* von Supervillin und Myosin IIA bzw. Supervillin und Gelsolin einen hochsignifikanten Rückgang des Matrixabbaus zur Folge. Ein gleichzeitiger *knock-down* aller drei Proteine resultierte ebenfalls in einem hochsignifikanten Rückgang im Vergleich zu Kontrollzellen.

Ein *knock-down* von Supervillin, Myosin IIA und/oder Gelsolin mittels siRNA führte in keinem Fall zu einem Rückgang der Podosomenanzahl in humanen Makrophagen. In allen Versuchen wiesen die Zellen eine Vielzahl (> 100) von Podosomen auf (Daten nicht gezeigt). Die Bildung von Podosomen scheint also weder von Supervillin, Myosin IIA oder Gelsolin abhängig zu sein.

Zu diesen Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit gibt es bereits (zum Teil widersprüchliche) Daten. Crowley *et al.* (Crowley *et al.*, 2009) berichteten, dass eine Reduktion des endogenen Supervillin-Levels in MDA-MB-231 Zellen einen verringerten Matrixabbau zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu zeigte ein *knock-down* von Gelsolin keine Effekte, eine gleichzeitige Reduktion von Supervillin und Gelsolin war nicht effektiver hinsichtlich Matrixabbau als der Einzel-*knock-down* von Supervillin.

Osteoklasten von Gelsolin *knock-out* Mäusen haben weder Podosomen noch Aktinringe (Chellaiah *et al.*, 2000), der Matrixabbau ist jedoch nicht beeinträchtigt (Gimona *et al.*, 2005). Diese gegensätzlichen Ergebnisse könnten sich durch die verschiedenen untersuchten Zelltypen oder durch unterschiedliche experimentelle Vorgehensweisen ergeben.

Crowley *et al.* (Crowley *et al.*, 2009) zeigten auch, dass MDA-MB-231 Zellen nach *knock-down* von Supervillin noch eine normale Anzahl von F-Aktin-Strukturen aufwiesen. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus vorliegender Arbeit überein, denn auch hier wurde nach *knock-down* von Supervillin keine Abnahme der Podosomenanzahl beobachtet.

Aus diesen Versuchen lässt sich schließen, dass die Bildung von Podosomen in primären humanen Makrophagen bei *knock-down* von Supervillin, Gelsolin und/oder Myosin IIA nicht beeinträchtigt war, gleichzeitig wurde jedoch, mit Ausnahme des Einzel-*knock-downs* von Supervillin, eine Reduktion des Matrixabbaus ermittelt. Daraus kann man auf eine beeinträchtigte Funktion der Podosomen schließen, die möglicherweise durch eine funktionelle Kooperation von Supervillin mit Myosin IIA und Gelsolin reguliert wird.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass in humanen Makrophagen verschiedene Podosomen-Subpopulationen existieren. Supervillin konnte hier als erstes Protein identifiziert werden, das differentiell an eine Podosomen Subpopulation lokalisiert. Supervillin lokalisiert normalerweise an den stabileren Podosomen und wird erst bei Auflösung der dynamischeren Podosomen-*Precursor* an diese rekrutiert. Diese Ergebnisse zeigen auch zum ersten Mal eine unterschiedliche molekulare Zusammensetzung der Podosomen Subpopulationen. Durch Kopplung Myosin IIA-abhängiger Kontraktilität an Podosomen hat Supervillin auch eine wichtige Funktion bei der Auflösung von Podosomen. Zusammen mit Myosin IIA und Gelsolin scheint Supervillin außerdem den Abbau extrazellulärer Matrix an Podosomen zu regulieren.

Bisher sind als Liganden für den C-Terminus von Supervillin nur Androgen- und Östrogenrezeptoren (Ting *et al.*, 2002) sowie Calponin (Gangopadhyay *et al.*, 2004) bekannt. Durch persönliche Kommunikation mit unserer Kooperationspartnerin Elizabeth Luna (University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA) haben wir die Information, dass es ca. 25 neue Proteine als potentielle funktionelle Interaktoren gibt. Für mindestens 17 von diesen konnte bereits eine Kollokalisierung mit GFP-Supervillin in COS7-Zellen gezeigt werden. Durch eine Interaktion mit zwei

Proteinen der Kinesinfamilie (KIFC3, STARD9) wird eine allgemeine Rolle für Supervillin und assoziierte Proteine bei der Koordination von Mikrotubuli-Motoren mit Aktin und der Myosin II Funktion an Membranen vorgeschlagen.

Interessanterweise wurde außerdem von einer möglichen Interaktion zwischen Supervillin und HAX1 berichtet. Erste Ergebnisse aus dem eigenen Labor in fixierten humanen Makrophagen zeigten eine Kolokalisation von GFP-HAX1 und mRFP-Supervillin an den stabileren Podosomen oder auch in Akkumulationen im Zentrum der Zelle (nicht gezeigt). Die Bedeutung dieser Interaktion in primären humanen Makrophagen, auch im Zusammenhang mit KIF1C, gilt es in zukünftigen Studien zu erforschen.

Die Ergebnisse für diesen Teil der Arbeit können schematisch in folgendem Modell dargestellt werden:

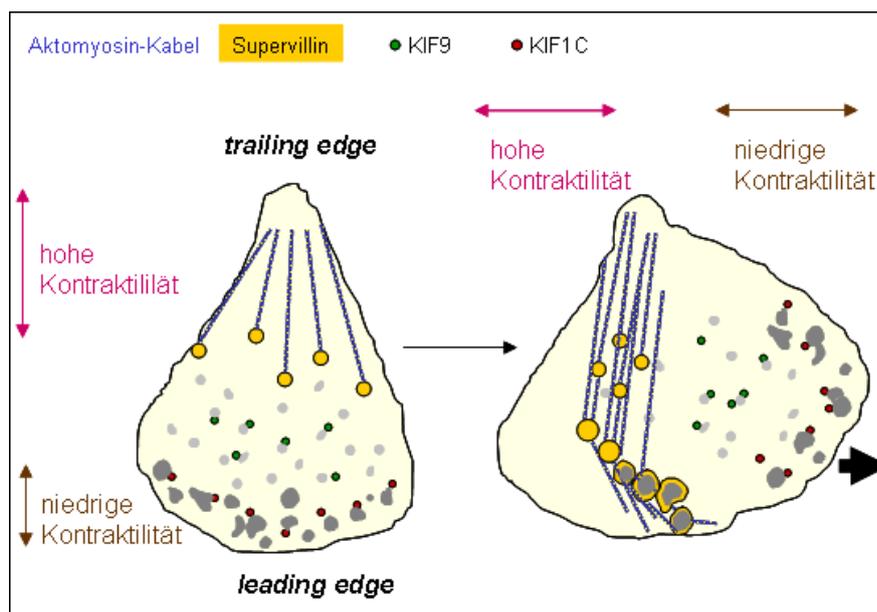


Abb. 4.6 Regulation der Podosomendynamik durch Supervillin. In migrierenden Makrophagen lokalisieren große, dynamische Podosomen *Precursor* (dunkelgrau) am *leading edge* der Zelle und werden von KIF1C (rot) kontaktiert. Kleinere, stabilere Podosomen (hellgrau) lokalisieren im Bereich hinter den *Precursor*-Podosomen und werden von KIF9 (grün) kontaktiert. Supervillin (gelb) bindet ebenfalls an die regulären Podosomen im *trailing edge* und steht mit Aktomyosinkabeln (blaue Linien) in Verbindung. Dadurch ergeben sich zwei Kontraktilitätszonen in der Zelle: hohe Kontraktilität im *trailing edge* und *niedrige Kontraktilität* im *leading edge*. Bei Wechsel der Bewegungsrichtung entstehen neue Podosomen am *leading edge*, was durch KIF1C erleichtert wird. Podosomen, die nicht mehr benötigt werden, reichern nun Supervillin an und treten mit Aktomyosinkabeln in Verbindung, woraufhin sie aufgelöst werden. Der schwarze Pfeil zeigt die Migrationsrichtung der Zelle an.

Die Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden, zeigen die Bedeutung einer fein abgestimmten Regulation von Podosomen in primären humanen Makrophagen. Aktuelle Schwerpunkte der Forschungsarbeiten über Podosomen sind u.a. Transmigration, Atherosklerose oder Metastasierung. Die Identifikation der Motorproteine KIF1C und KIF9 sowie Interaktoren liefert einen wichtigen Beitrag für ein detaillierteres Verständnis der molekularen Prozesse, die die Dynamik von Podosomen regulieren. Podosomen sind nicht nur Adhäsionsstrukturen, sondern auch am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt, wodurch eine Invasion von Zellen in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen ermöglicht wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte neben KIF9 und Reggie-1/-2 auch Supervillin - in Kooperation mit Myosin IIA und/oder Gelsolin- eine wichtige Rolle hinsichtlich dieser Funktion zugeschrieben werden. Möglicherweise könnten diese Proteine auch als Zielmoleküle benutzt werden, die neue Ansätze zur therapeutischen Regulation von Zelladhäsion und -invasion ermöglichen.

4.7 Ausblick

Ein wesentlicher Gegenstand zukünftiger Versuche wird die Verbesserung der Aufreinigung der von KIF1C transportierten Vesikel sein. Durch Kotransfektion von unterschiedlich fluoreszenzmarkiertem KIF1C mit ausgewählten Proteinen der ersten Analyse, beispielsweise Rab6a, und anschließendem *dual colour sorting* wäre es möglich, die transportierte Fracht der Vesikelpopulationen spezifischer zu analysieren. In weiterführenden Untersuchungen sollen außerdem durch Einsatz spezifischer Markerproteine die von KIF1C transportierten Vesikel genauer charakterisiert werden.

- Des Weiteren soll die Frage geklärt werden, über welche Domänen die Proteine HAX1 und KIF1C miteinander interagieren. Von großem Interesse ist auch das Verhalten von KIF1C bei knock-down von HAX1 und vice versa. Mittels *dual colour sorting* könnte schließlich auch Aufschluss über die gemeinsam transportierte Fracht gewonnen werden.

- Weiter gilt es zu klären, ob posttranslationale Modifikationen der Mikrotubuli den Transport von Fracht durch KIF1C und KIF9 entlang dieser Strukturen beeinflussen.
- Die von KIF9 transportierten Vesikel sollen, analog zu KIF1C, mittels *FACS* aufgereinigt und durch Massenspektrometrie analysiert werden. Dadurch können weitere potentielle Interaktionspartner sowie Proteine, die für die Regulation von Podosomen von Bedeutung sind, identifiziert werden.
- Durch Einsatz unterschiedlicher Trunkationskonstrukte/Domänen von KIF9 und Reggie-Proteinen sollen in Immunpräzipitations- und *pull down* Versuchen diejenigen Domänen ermittelt werden, die die Interaktion zwischen beiden Proteine vermitteln.
- Durch Immunpräzipitation von Reggie-1-GFP wurde nur eine endogene KIF9-Bande detektiert. Durch Einsatz verschieden phosphorylierter Formen von KIF9 soll überprüft werden, ob die Interaktion möglicherweise spezifisch für eine phosphorylierte Variante ist.
- Ein weiterer interessanter Punkt ist die im Labor von E. Luna ermittelte Interaktion zwischen Supervillin und HAX1. Ob dies auch in humanen Makrophagen der Fall ist sowie mögliche Funktionen dieser Interaktion, auch im Zusammenhang mit KIF1C, sollen in zukünftigen Versuchen erforscht werden.

5 Zusammenfassung

Podosomen sind aktinreiche Adhäsionsstrukturen, die vor allem in monozytären Zellen, aber auch in dendritischen Zellen, Osteoklasten, Endothelzellen oder glatten Muskelzellen vorkommen. In primären humanen Makrophagen gibt es zwei Subpopulationen von Podosomen: größere, hochdynamische *Precursor* in der Peripherie sowie kleinere, stabilere Podosomen im Zellzentrum. Die Regulation der Podosomendynamik in der Zellperipherie erfolgt durch das Mikrotubuli-basierte Motorprotein KIF1C, wahrscheinlich durch den Transport von Regulationsfaktoren. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag daher in der Identifizierung dieser Regulatoren.

- Die Aufreinigung KIF1C-GFP positiver Vesikel mittels FACS ist grundsätzlich funktionell. Die Analyse zahlreicher Vesikel-assoziiierter Proteine spricht weiter für die Hypothese, dass es sich bei der von KIF1C transportierten Fracht um vesikuläre Strukturen handelt. Die Detektion zahlreicher unspezifischer Proteine zeigt jedoch auch, dass die Methode der Aufreinigung zukünftig noch verbessert werden muss.
- RabGTPasen, die auch am Transport von Vesikeln beteiligt sind, haben oftmals eine ähnliche subzelluläre Lokalisation wie KIF1C. Vor allem zwischen Rab6a und KIF1C war ein häufiger und länger dauernder Kontakt in der Zellperipherie zu beobachten. Mittels GFP-Immunpräzipitation konnte eine Interaktion bestätigt werden.
- Auf der Suche nach weiteren potentiellen Interaktionspartnern von KIF1C wurde das Protein HAX1 identifiziert. Sowohl in fixierten als auch in lebenden primären humanen Makrophagen konnte eine eindeutige Kolo-kalisation der Proteine in der Zellperipherie beobachtet werden. Bei Einsatz der Rigormutante von KIF1C (KIF1C-K103A) akkumulierten beide Proteine am MTOC. Diese Ergebnisse lassen auf eine Interaktion zwischen KIF1C und HAX1 schließen.

Das Motorprotein KIF9 lokalisiert vor allem an den stabileren Podosomen im Zentrum der Zelle. Bei der Ermittlung der Rolle von KIF9 hinsichtlich der Regulation dieser Podosomensubpopulation wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

- *Knock-down* von KIF9 reduziert die Anzahl der Podosomen und inhibiert bei noch bestehenden Podosomen den Abbau extrazellulärer Matrix. Für KIF9 konnte demnach nicht nur eine Beteiligung an der Podosomenregulation sondern auch eine Rolle im Matrixabbau zugewiesen werden.
- KIF9-GFP positive Vesikel assoziieren mit Mikrotubuli und kontaktieren mehrere Podosomen nacheinander. Dies spricht für eine direkte Verbindung von KIF9-vermitteltem, mikrotubuli-basiertem Transport mit Podosomen, die durch KIF9 reguliert werden.
- Durch Immunpräzipitationsversuche wurden Hinweise gefunden, dass KIF9 möglicherweise in unterschiedlichen Spleißvarianten oder verschiedenen phosphorylierten Zuständen existiert.
- Als Interaktionspartner für KIF9 konnte Reggie-1 identifiziert werden. Durch *knock-down* von Reggie-1 und auch Reggie-2 konnte diesen Proteinen eine Beteiligung am Abbau extrazellulärer Matrix zugeschrieben werden.

Die Teilung der Podosomen-*Precursor* sowie Auflösung der regulären Podosomen sind grundlegende Vorgänge. Unterschiede in der molekularen Zusammensetzung der Podosomen-Subpopulationen waren bisher allerdings unbekannt.

- Supervillin konnte als erstes Protein identifiziert werden, das differentiell an die unterschiedlichen Subpopulationen lokalisiert. Dies zeigt zum ersten Mal eine unterschiedliche molekulare Zusammensetzung der Podosomen-Subpopulationen.
- Podosomen reichern Supervillin an, bevor diese sich auflösen. Überexpression von GFP-Supervillin führte außerdem zu einem Verlust von Podosomen, wohingegen shRNA-basierter *knock-down* die Lebensdauer verlängerte. Supervillin scheint somit eine Rolle in der Regulation von Podosomen zu spielen.

- Die Myosin IIA-Bindedomäne ist sowohl für die Anzahl der Podosomen als auch für die differentielle Rekrutierung an die unterschiedlichen Subpopulationen essentiell.
- Supervillin steht mit Myosin IIA und der phosphorylierten leichten Kette von Myosin in Verbindung und koppelt kontraktiles Myosin an Podosomen, was deren Auflösung auslöst.
- Durch siRNA-basierten *knock-down* konnte gezeigt werden, dass Supervillin erst zusammen mit Myosin IIA und/oder Gelsolin die Effektivität der Podosomen hinsichtlich Matrixabbau beeinflusst. Die Podosomenanzahl hingegen war nicht verändert.

6 Literaturverzeichnis

Abram,C.L., Seals,D.F., Pass,I., Salinsky,D., Maurer,L., Roth,T.M., and Courtneidge,S.A. (2003). The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 16844-16851.

Ahuja,R., Pinyol,R., Reichenbach,N., Custer,L., Klingensmith,J., Kessels,M.M., and Qualmann,B. (2007). Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell* *131*, 337-350.

Akisaka,T., Yoshida,H., Inoue,S., and Shimizu,K. (2001). Organization of cytoskeletal F-actin, G-actin, and gelsolin in the adhesion structures in cultured osteoclast. *J. Bone Miner. Res.* *16*, 1248-1255.

Albiges-Rizo,C., Destaing,O., Fourcade,B., Planus,E., and Block,M.R. (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J. Cell Sci.* *122*, 3037-3049.

Alexander,N.R., Branch,K.M., Parekh,A., Clark,E.S., Iwueke,I.C., Guelcher,S.A., and Weaver,A.M. (2008). Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr. Biol.* *18*, 1295-1299.

Archer,S.K., Claudianos,C., and Campbell,H.D. (2005). Evolution of the gelsolin family of actin-binding proteins as novel transcriptional coactivators. *Bioessays* *27*, 388-396.

Arnal,I. and Wade,R.H. (1998). Nucleotide-dependent conformations of the kinesin dimer interacting with microtubules. *Structure.* *6*, 33-38.

Artym,V.V., Zhang,Y., Seillier-Moiseiwitsch,F., Yamada,K.M., and Mueller,S.C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res.* *66*, 3034-3043.

Babb,S.G., Matsudaira,P., Sato,M., Correia,I., and Lim,S.S. (1997). Fimbrin in podosomes of monocyte-derived osteoclasts. *Cell Motil. Cytoskeleton* *37*, 308-325.

Babuke,T., Ruonala,M., Meister,M., Amaddii,M., Genzler,C., Esposito,A., and Tikkanen,R. (2009). Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cell Signal.* *21*, 1287-1297.

Babuke,T. and Tikkanen,R. (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *Eur. J. Cell Biol.* *86*, 525-532.

Badowski,C., Pawlak,G., Grichine,A., Chabadel,A., Oddou,C., Jurdic,P., Pfaff,M., Albiges-Rizo,C., and Block,M.R. (2008). Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization. *Mol. Biol. Cell* 19, 633-645.

Ballestrem,C., Hinz,B., Imhof,B.A., and Wehrle-Haller,B. (2001). Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J. Cell Biol.* 155, 1319-1332.

Bamburg,J.R. (1999). Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 185-230.

Baum,J., Papenfuss,A.T., Baum,B., Speed,T.P., and Cowman,A.F. (2006). Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 621-628.

Becker,T., Volchuk,A., and Rothman,J.E. (2005). Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 4022-4026.

Beraud-Dufour,S. and Balch,W. (2002). A journey through the exocytic pathway. *J. Cell Sci.* 115, 1779-1780.

Berdeaux,R.L., Diaz,B., Kim,L., and 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.

Bergen,L.G. and Borisy,G.G. (1980). Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J. Cell Biol.* 84, 141-150.

Bickel,P.E., Scherer,P.E., Schnitzer,J.E., Oh,P., Lisanti,M.P., and Lodish,H.F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 13793-13802.

Blocker,A., Severin,F.F., Burkhardt,J.K., Bingham,J.B., Yu,H., Olivo,J.C., Schroer,T.A., Hyman,A.A., and Griffiths,G. (1997). Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *J. Cell Biol.* 137, 113-129.

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.

Brady,S.T., Pfister,K.K., and Bloom,G.S. (1990). A monoclonal antibody against kinesin inhibits both anterograde and retrograde fast axonal transport in squid axoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 1061-1065.

Bruzzaniti,A., Neff,L., Sanjay,A., Horne,W.C., De,C.P., and Baron,R. (2005). Dynamin forms a Src kinase-sensitive complex with Cbl and regulates podosomes and osteoclast activity. *Mol. Biol. Cell* 16, 3301-3313.

Buccione,R., Caldieri,G., and Ayala,I. (2009). Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 137-149.

Buccione,R., Orth,J.D., and McNiven,M.A. (2004a). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 647-657.

Burgstaller,G. and Gimona,M. (2005). Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 288, H3001-H3005.

Burke,B., Tang,N., Corke,K.P., Tazzyman,D., Ameri,K., Wells,M., and Lewis,C.E. (2002). Expression of HIF-1alpha by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J. Pathol.* 196, 204-212.

Burns,S., Thrasher,A.J., Blundell,M.P., Machesky,L., and Jones,G.E. (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* 98, 1142-1149.

Cai,D., McEwen,D.P., Martens,J.R., Meyhofer,E., and Verhey,K.J. (2009). Single molecule imaging reveals differences in microtubule track selection between Kinesin motors. *PLoS. Biol.* 7, e1000216.

Calle,Y., Carragher,N.O., Thrasher,A.J., and Jones,G.E. (2006). Inhibition of calpain stabilises podosomes and impairs dendritic cell motility. *J. Cell Sci.* 119, 2375-2385.

Calle,Y., Jones,G.E., Jagger,C., Fuller,K., Blundell,M.P., Chow,J., Chambers,T., and Thrasher,A.J. (2004). WASp deficiency in mice results in failure to form osteoclast sealing zones and defects in bone resorption. *Blood* 103, 3552-3561.

Campellone,K.G., Webb,N.J., Znameroski,E.A., and Welch,M.D. (2008). WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell* 134, 148-161.

Carlier,M.F. (1989). Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int. Rev. Cytol.* 115, 139-170.

Carlier,M.F., Ressad,F., and Pantaloni,D. (1999). Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *J. Biol. Chem.* 274, 33827-33830.

Carman VC. (2009). Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by „invadosome-like protrusions”. *JCS* 122, 3025-3035.

Carragher,N.O. and Frame,M.C. (2004). Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol.* 14, 241-249.

Chabrilat,M.L., Wilhelm,C., Wasmeier,C., Sviderskaya,E.V., Louvard,D., and Coudrier,E. (2005). Rab8 regulates the actin-based movement of melanosomes. *Mol. Biol. Cell* 16, 1640-1650.

Chellaiah,M., Fitzgerald,C., Alvarez,U., and Hruska,K. (1998). c-Src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 11908-11916.

Chellaiah,M., Kizer,N., Silva,M., Alvarez,U., Kwiatkowski,D., and Hruska,K.A. (2000). Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. *J. Cell Biol.* 148, 665-678.

Chellaiah,M.A. (2006). Regulation of podosomes by integrin alphavbeta3 and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 311-317.

Chellaiah,M.A., Biswas,R.S., Yuen,D., Alvarez,U.M., and 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,J. *et al.* (2003a). MMDB: Entrez's 3D-structure database. *Nucleic Acids Res.* 31, 474-477.

Chen,W.T. (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J. Exp. Zool.* 251, 167-185.

Chen,Y., Takizawa,N., Crowley,J.L., Oh,S.W., Gatto,C.L., Kambara,T., Sato,O., Li,X.D., Ikebe,M., and Luna,E.J. (2003b). F-actin and myosin II binding domains in supervillin. *J. Biol. Chem.* 278, 46094-46106.

Cheney,R.E. and Mooseker,M.S. (1992). Unconventional myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 27-35.

Cheng,L.J., Zhou,Z.M., Li,J.M., Zhu,H., Zhu,H., Zhou,Y.D., Wang,L.R., Lin,M., and Sha,J.H. (2002). Expression of a novel HsMCAK mRNA splice variant, tsMCAK gene, in human testis. *Life Sci.* 71, 2741-2757.

Chereau,D., Boczkowska,M., Skwarek-Maruszewska,A., Fujiwara,I., Hayes,D.B., Rebowski,G., Lappalainen,P., Pollard,T.D., and Dominguez,R. (2008). Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science* 320, 239-243.

Chhabra,E.S. and Higgs,H.N. (2006). INF2 Is a WASP homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization. *J. Biol. Chem.* 281, 26754-26767.

Chhabra,E.S. and Higgs,H.N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* 9, 1110-1121.

Cole,N.B., Sciaky,N., Marotta,A., Song,J., and Lippincott-Schwartz,J. (1996). Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell* 7, 631-650.

Colicelli,J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci. STKE*. 2004, RE13.

Collin,O., Na,S., Chowdhury,F., Hong,M., Shin,M.E., Wang,F., and Wang,N. (2008). Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Curr. Biol.* 18, 1288-1294.

Condeelis,J. and Pollard,J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263-266.

Cory,G.O., Cramer,R., Blanchoin,L., and Ridley,A.J. (2003). Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP. *Mol. Cell* 11, 1229-1239.

Crowley,J.L., Smith,T.C., Fang,Z., Takizawa,N., and Luna,E.J. (2009). Supervillin reorganizes the actin cytoskeleton and increases invadopodial efficiency. *Mol. Biol. Cell* 20, 948-962.

David-Pfeuty,T. and Singer,S.J. (1980). Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 6687-6691.

De,C., V, Bruyneel,E., Boucherie,C., Mareel,M., Vandekerckhove,J., and Gettemans,J. (2002). Gelsolin-induced epithelial cell invasion is dependent on Ras-Rac signaling. *EMBO J.* 21, 6781-6790.

Delaisse,J.M. *et al.* (2000). Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin. Chim. Acta* 291, 223-234.

Dermine,J.F., Duclos,S., Garin,J., St-Louis,F., Rea,S., Parton,R.G., and Desjardins,M. (2001). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 18507-18512.

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

Destaing,O., Saltel,F., Gilquin,B., Chabadel,A., Khochbin,S., Ory,S., and Jurdic,P. (2005). A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J. Cell Sci.* 118, 2901-2911.

Dorner,C., Ciossek,T., Muller,S., Moller,P.H., Ullrich,A., and 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.

Dorner,C., Ullrich,A., Haring,H.U., and Lammers,R. (1999). The kinesin-like motor protein KIF1C occurs in intact cells as a dimer and associates with proteins of the 14-3-3 family. *J. Biol. Chem.* *274*, 33654-33660.

dos Remedios,C.G., Chhabra,D., Kekic,M., Dedova,I.V., Tsubakihara,M., Berry,D.A., and Nosworthy,N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* *83*, 433-473.

Dovas,A., Gevrey,J.C., Grossi,A., Park,H., Abou-Kheir,W., and Cox,D. (2009). Regulation of podosome dynamics by WASp phosphorylation: implication in matrix degradation and chemotaxis in macrophages. *J. Cell Sci.* *122*, 3873-3882.

Dunn,S., Morrison,E.E., Liverpool,T.B., Molina-Paris,C., Cross,R.A., Alonso,M.C., and Peckham,M. (2008). Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J. Cell Sci.* *121*, 1085-1095.

Echard,A., Jollivet,F., Martinez,O., Lacapere,J.J., Rousselet,A., Janoueix-Lerosey,I., and Goud,B. (1998). Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* *279*, 580-585.

Eden,S., Rohatgi,R., Podtelejnikov,A.V., Mann,M., and Kirschner,M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* *418*, 790-793.

Evans,J.G., Correia,I., Krasavina,O., Watson,N., and Matsudaira,P. (2003). Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J. Cell Biol.* *161*, 697-705.

Fan,D., Zheng,W., Hou,R., Li,F., and Wang,Z. (2008). Modeling motility of the kinesin dimer from molecular properties of individual monomers. *Biochemistry* *47*, 4733-4742.

Feng,D., Nagy,J.A., Pyne,K., Dvorak,H.F., and Dvorak,A.M. (1998). Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J. Exp. Med.* *187*, 903-915.

Gangopadhyay,S.S., Takizawa,N., Gallant,C., Barber,A.L., Je,H.D., Smith,T.C., Luna,E.J., and Morgan,K.G. (2004). Smooth muscle archvillin: a novel regulator of signaling and contractility in vascular smooth muscle. *J. Cell Sci.* *117*, 5043-5057.

Garin,J., Diez,R., Kieffer,S., Dermine,J.F., Duclos,S., Gagnon,E., Sadoul,R., Rondeau,C., and Desjardins,M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* *152*, 165-180.

Gavazzi,I., Nermut,M.V., and Marchisio,P.C. (1989). Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *J. Cell Sci.* 94 (Pt 1), 85-99.

Genetic Science Learning Center, "Directing Traffic: How Vesicles Transport Cargo," Learn.Genetics. 2010

Gherzi,G., Dong,H., Goldstein,L.A., Yeh,Y., Hakkinen,L., Larjava,H.S., and Chen,W.T. (2002). Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *J. Biol. Chem.* 277, 29231-29241.

Gil-Henn,H. *et al.* (2007). Defective microtubule-dependent podosome organization in osteoclasts leads to increased bone density in *Pyk2(-/-)* mice. *J. Cell Biol.* 178, 1053-1064.

Gimona,M., Grashoff,C., and Kopp,P. (2005). Oktoberfest for adhesion structures. *EMBO Rep.* 6, 922-926.

Gimona,M., Kaverina,I., Resch,G.P., Vignal,E., and Burgstaller,G. (2003). Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 2482-2491.

Gkantiragas,I., Brugger,B., Stuken,E., Kaloyanova,D., Li,X.Y., Lohr,K., Lottspeich,F., Wieland,F.T., and Helms,J.B. (2001). Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* 12, 1819-1833.

Glebov,O.O., Bright,N.A., and Nichols,B.J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 46-54.

Gordon S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 329-930.

Goud,B. (2002). How Rab proteins link motors to membranes. *Nat. Cell Biol.* 4, E77-E78.

Gringel,A., Walz,D., Rosenberger,G., Minden,A., Kutsche,K., Kopp,P., and Linder,S. (2006). PAK4 and alphaPIX determine podosome size and number in macrophages through localized actin regulation. *J. Cell Physiol* 209, 568-579.

Guegan,F., Tatin,F., Leste-Lasserre,T., Drutel,G., Genot,E., and Moreau,V. (2008). p190B RhoGAP regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. *J. Cell Sci.* 121, 2054-2061.

Hagemann,T., Wilson,J., Kulbe,H., Li,N.F., Leinster,D.A., Charles,K., Klemm,F., Pukrop,T., Binder,C., and Balkwill,F.R. (2005). Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J. Immunol.* 175, 1197-1205.

Hammer, J.A., III and Wu, X.S. (2002). Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 69-75.

Hammond, J.W., Cai, D., and Verhey, K.J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 71-76.

Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* *418*, 244-251.

Harada, A., Takei, Y., Kanai, Y., Tanaka, Y., Nonaka, S., and Hirokawa, N. (1998). Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol.* *141*, 51-59.

Harris, E.S., Rouiller, I., Hanein, D., and Higgs, H.N. (2006). Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, FRL1 and mDia2. *J. Biol. Chem.* *281*, 14383-14392.

Hatsuzawa, K., Hirose, H., Tani, K., Yamamoto, A., Scheller, R.H., and Tagaya, M. (2000). Syntaxin 18, a SNAP receptor that functions in the endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and cis-Golgi vesicle trafficking. *J. Biol. Chem.* *275*, 13713-13720.

Hattula, K., Furuholm, J., Arffman, A., and Peranen, J. (2002). A Rab8-specific GDP/GTP exchange factor is involved in actin remodeling and polarized membrane transport. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3268-3280.

Heald, R. and Nogales, E. (2002). Microtubule dynamics. *J. Cell Sci.* *115*, 3-4.

Heintzelman, M.B. and Schwartzman, J.D. (1997). A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* *271*, 139-146.

Henry, T., Gorvel, J.P., and Meresse, S. (2006). Molecular motors hijacking by intracellular pathogens. *Cell Microbiol.* *8*, 23-32.

Hidalgo, A. and Frenette, P.S. (2007). Leukocyte podosomes sense their way through the endothelium. *Immunity*. *26*, 753-755.

Higgs, H.N. (2005). Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 342-353.

Hirokawa, N. (1996). Organelle transport along microtubules - the role of KIFs. *Trends Cell Biol.* *6*, 135-141.

Hirokawa, N. and Noda, Y. (2008). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev.* *88*, 1089-1118.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 682-696.

Hishida,T., Eguchi,T., Osada,S., Nishizuka,M., and Imagawa,M. (2008). A novel gene, fad49, plays a crucial role in the immediate early stage of adipocyte differentiation via involvement in mitotic clonal expansion. *FEBS J.* 275, 5576-5588.

Ho,H.Y., Rohatgi,R., Lebensohn,A.M., Le,M., Li,J., Gygi,S.P., and Kirschner,M.W. (2004). Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118, 203-216.

Hoepfner,S., Severin,F., Cabezas,A., Habermann,B., Runge,A., Gillooly,D., Stenmark,H., and Zerial,M. (2005). Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell* 121, 437-450.

Hollenbeck,P.J. (1993). Phosphorylation of neuronal kinesin heavy and light chains in vivo. *J. Neurochem.* 60, 2265-2275.

Howell,B.W. and Cooper,J.A. (1994). Csk suppression of Src involves movement of Csk to sites of Src activity. *Mol. Cell Biol.* 14, 5402-5411.

Hufner,K., Higgs,H.N., Pollard,T.D., Jacobi,C., Aepfelbacher,M., and Linder,S. (2001). The verprolin-like central (vc) region of Wiskott-Aldrich syndrome protein induces Arp2/3 complex-dependent actin nucleation. *J. Biol. Chem.* 276, 35761-35767.

Hyams JF und Llyod, CW. (1993). *Microtubules. Wiley-Liss, New York.*

Ibarra,N., Blagg,S.L., Vazquez,F., and Insall,R.H. (2006). Nap1 regulates Dictyostelium cell motility and adhesion through SCAR-dependent and -independent pathways. *Curr. Biol.* 16, 717-722.

Ingley,E. (2008). Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 56-65.

Ismail,A.M., Padrick,S.B., Chen,B., Umetani,J., and Rosen,M.K. (2009). The WAVE regulatory complex is inhibited. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 561-563.

Jellali,A., Metz-Boutigue,M.H., Surgucheva,I., Jancsik,V., Schwartz,C., Filliol,D., Gelfand,V.I., and Rendon,A. (1994). Structural and biochemical properties of kinesin heavy chain associated with rat brain mitochondria. *Cell Motil. Cytoskeleton* 28, 79-93.

Johnson,D., Cohen,P., Chen,M.X., Chen,Y.H., and Cohen,P.T. (1997). Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin. *Eur. J. Biochem.* 244, 931-939.

Junutula,J.R., De Maziere,A.M., Peden,A.A., Ervin,K.E., Advani,R.J., van Dijk,S.M., Klumperman,J., and Scheller,R.H. (2004). Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Mol. Biol. Cell* 15, 2218-2229.

- Jutras,I. and Desjardins,M. (2005). Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 511-527.
- Kabsch,W. and Vandekerckhove,J. (1992). Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *21*, 49-76.
- Kawaguchi,Y., Nishimagi,E., Tochimoto,A., Kawamoto,M., Katsumata,Y., Soejima,M., Kanno,T., Kamatani,N., and Hara,M. (2006). Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 14501-14506.
- Kerkhoff,E. (2006). Cellular functions of the Spir actin-nucleation factors. *Trends Cell Biol.* *16*, 477-483.
- Killian JJ und Fidler IJ. (1994). Systemic targeting of liposome encapsulated immunomodulators to macrophages for treatment of cancer metastasis. *Immunomethods* *4*, 273-279.
- Kim,S. and Coulombe,P.A. (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev.* *21*, 1581-1597.
- Kolega,J. (1998). Fluorescent analogues of myosin II for tracking the behavior of different myosin isoforms in living cells. *J. Cell Biochem.* *68*, 389-401.
- Kolega,J. and Taylor,D.L. (1993). Gradients in the concentration and assembly of myosin II in living fibroblasts during locomotion and fiber transport. *Mol. Biol. Cell* *4*, 819-836.
- Kopp,P., Lammers,R., Aepfelbacher,M., Woehlke,G., Rudel,T., Machuy,N., Steffen,W., and Linder,S. (2006). The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Mol. Biol. Cell* *17*, 2811-2823.
- Korn,E.D., Carlier,M.F., and Pantaloni,D. (1987). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* *238*, 638-644.
- Kovar,D.R. (2006). Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 11-17.
- Kreitzer,G., Liao,G., and Gundersen,G.G. (1999). Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* *10*, 1105-1118.
- Krits,I., Wysolmerski,R.B., Holliday,L.S., and Lee,B.S. (2002). Differential localization of myosin II isoforms in resting and activated osteoclasts. *Calcif. Tissue Int.* *71*, 530-538.

Kuhn,J.R. and Pollard,T.D. (2005). Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 88, 1387-1402.

Kuriyama,R., Gustus,C., Terada,Y., Uetake,Y., and Matuliene,J. (2002). CHO1, a mammalian kinesin-like protein, interacts with F-actin and is involved in the terminal phase of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 156, 783-790.

Kwiatkowska,K. and Sobota,A. (1999). Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays* 21, 422-431.

Kyei,G.B., Vergne,I., Chua,J., Roberts,E., Harris,J., Junutula,J.R., and Deretic,V. (2006). Rab14 is critical for maintenance of Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest. *EMBO J.* 25, 5250-5259.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Langford,G.M. (1995). Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 82-88.

Langhorst,M.F., Reuter,A., Jaeger,F.A., Wippich,F.M., Luxenhofer,G., Plattner,H., and Stuermer,C.A. (2008). Trafficking of the microdomain scaffolding protein reggie-1/flotillin-2. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 211-226.

Langhorst,M.F., Reuter,A., Luxenhofer,G., Boneberg,E.M., Legler,D.F., Plattner,H., and Stuermer,C.A. (2006). Preformed reggie/flotillin caps: stable priming platforms for macrodomain assembly in T cells. *FASEB J.* 20, 711-713.

Langhorst,M.F., Solis,G.P., Hannbeck,S., Plattner,H., and Stuermer,C.A. (2007). Linking membrane microdomains to the cytoskeleton: regulation of the lateral mobility of reggie-1/flotillin-2 by interaction with actin. *FEBS Lett.* 581, 4697-4703.

Lapierre,L.A., Dorn,M.C., Zimmerman,C.F., Navarre,J., Burnette,J.O., and Goldenring,J.R. (2003). Rab11b resides in a vesicular compartment distinct from Rab11a in parietal cells and other epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 290, 322-331.

Lee,K.D. and Hollenbeck,P.J. (1995). Phosphorylation of kinesin in vivo correlates with organelle association and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 270, 5600-5605.

Lees,D.M., Hart,I.R., and Marshall,J.F. (2008). Existence of multiple isoforms of HS1-associated protein X-1 in murine and human tissues. *J. Mol. Biol.* 379, 645-655.

Lehto,V.P., Hovi,T., Vartio,T., Badley,R.A., and Virtanen,I. (1982). Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophages. *Lab Invest* 47, 391-399.

Leibovich,S.J. and Ross,R. (1975). The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am. J. Pathol.* 78, 71-100.

Liao,G. and Gundersen,G.G. (1998). Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin. *J. Biol. Chem.* 273, 9797-9803.

Lin,S.X., Gundersen,G.G., and Maxfield,F.R. (2002). Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (glu) microtubules and kinesin. *Mol. Biol. Cell* 13, 96-109.

Linardopoulou,E.V., Parghi,S.S., Friedman,C., Osborn,G.E., Parkhurst,S.M., and Trask,B.J. (2007). Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS. Genet.* 3, e237.

Linder,S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* 17, 107-117.

Linder,S. (2009). Invadosomes at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3009-3013.

Linder,S. and 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., and Aepfelbacher,M. (2000). The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the Arp2/3 complex. *J. Immunol.* 165, 221-225.

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

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

Lippincott-Schwartz,J., Cole,N.B., Marotta,A., Conrad,P.A., and Bloom,G.S. (1995). Kinesin is the motor for microtubule-mediated Golgi-to-ER membrane traffic. *J. Cell Biol.* 128, 293-306.

Lodish,H., Berk,A., Kaiser,C.A., Krieger,M., Scott,M.P., Bretscher,A. (2000). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company

Luxenburg,C., Addadi,L., and Geiger,B. (2006). The molecular dynamics of osteoclast adhesions. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 203-211.

Luxenburg,C., Geblinger,D., Klein,E., Anderson,K., Hanein,D., Geiger,B., and Addadi,L. (2007). The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS. One.* 2, e179.

Machesky,L.M., Mullins,R.D., Higgs,H.N., Kaiser,D.A., Blanchoin,L., May,R.C., Hall,M.E., and Pollard,T.D. (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 3739-3744.

MacLennan,A.J., Orringer,M.B., and Beer,D.G. (1999). Identification of intestinal-type Barrett's metaplasia by using the intestine-specific protein villin and esophageal brush cytology. *Mol. Carcinog.* *24*, 137-143.

Mao,M., Thedens,D.R., Chang,B., Harris,B.S., Zheng,Q.Y., Johnson,K.R., Donahue,L.R., and Anderson,M.G. (2009). The podosomal-adaptor protein SH3PXD2B is essential for normal postnatal development. *Mamm. Genome* *20*, 462-475.

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

Marchisio,P.C., Cirillo,D., Naldini,L., Primavera,M.V., Teti,A., and 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., and 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., Giancotti,F.G., and 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.

Mareel,M. and Leroy,A. (2003). Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev.* *83*, 337-376.

Marks,D.L., Larkin,J.M., and McNiven,M.A. (1994). Association of kinesin with the Golgi apparatus in rat hepatocytes. *J. Cell Sci.* *107* (Pt 9), 2417-2426.

Martin P. (1997). Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science.* *276*, 75-81

Marx J. (2006). Podosomes and invadopodia help mobile cells step lively. *Science.* *312*,1868-1869.

Matsushita,M., Yamamoto,R., Mitsui,K., and Kanazawa,H. (2009). Altered motor activity of alternative splice variants of the mammalian kinesin-3 protein KIF1B. *Traffic.* *10*, 1647-1654.

Mermall,V., Post,P.L., and Mooseker,M.S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 279, 527-533.

Miki,H., Setou,M., and Hirokawa,N. (2003). Kinesin superfamily proteins (KIFs) in the mouse transcriptome. *Genome Res.* 13, 1455-1465.

Millard,T.H., Sharp,S.J., and Machesky,L.M. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem. J.* 380, 1-17.

Mitsui,T., Inagaki,M., and Ikebe,M. (1992). Purification and characterization of smooth muscle myosin-associated phosphatase from chicken gizzards. *J. Biol. Chem.* 267, 16727-16735.

Mizutani,K., Miki,H., He,H., Maruta,H., and Takenawa,T. (2002). Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res.* 62, 669-674.

Moreau,V., Tatin,F., Varon,C., and 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.

Morfini,G., Pigino,G., and Brady,S.T. (2007). Approaches to kinesin-1 phosphorylation. *Methods Mol. Biol.* 392, 51-69.

Morfini,G., Quiroga,S., Rosa,A., Kosik,K., and Caceres,A. (1997). Suppression of KIF2 in PC12 cells alters the distribution of a growth cone nonsynaptic membrane receptor and inhibits neurite extension. *J. Cell Biol.* 138, 657-669.

Munderloh,C., Solis,G.P., Bodrikov,V., Jaeger,F.A., Wiechers,M., Malaga-Trillo,E., and Stuermer,C.A. (2009). Reggies/flotillins regulate retinal axon regeneration in the zebrafish optic nerve and differentiation of hippocampal and N2a neurons. *J. Neurosci.* 29, 6607-6615.

Nakagawa,T., Tanaka,Y., Matsuoka,E., Kondo,S., Okada,Y., Noda,Y., Kanai,Y., and Hirokawa,N. (1997). Identification and classification of 16 new kinesin superfamily (KIF) proteins in mouse genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 9654-9659.

Nakata,T. and Hirokawa,N. (1995). Point mutation of adenosine triphosphate-binding motif generated rigor kinesin that selectively blocks anterograde lysosome membrane transport. *J. Cell Biol.* 131, 1039-1053.

Nangaku,M., Sato-Yoshitake,R., Okada,Y., Noda,Y., Takemura,R., Yamazaki,H., and Hirokawa,N. (1994). KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 79, 1209-1220.

Neuwald,A.F., Aravind,L., Spouge,J.L., and Koonin,E.V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9, 27-43.

Nielsen,E., Severin,F., Backer,J.M., Hyman,A.A., and Zerial,M. (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat. Cell Biol.* 1, 376-382.

Oikawa,T., Itoh,T., and Takenawa,T. (2008). Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *J. Cell Biol.* 182, 157-169.

Okada,Y., Yamazaki,H., Sekine-Aizawa,Y., and Hirokawa,N. (1995). The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* 81, 769-780.

Osborn,M. and Weber,K. (1977). The display of microtubules in transformed cells. *Cell* 12, 561-571.

Osiak,A.E., Zenner,G., and Linder,S. (2005). Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp. Cell Res.* 307, 342-353.

Pak,C.W., Flynn,K.C., and Bamberg,J.R. (2008). Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 136-147.

Peranen,J., Auvinen,P., Virta,H., Wepf,R., and Simons,K. (1996). Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 135, 153-167.

Pereira-Leal,J.B. and Seabra,M.C. (2000). The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J. Mol. Biol.* 301, 1077-1087.

Pestonjamas,K.N., Pope,R.K., Wulfschlegel,J.D., and Luna,E.J. (1997). Supervillin (p205): A novel membrane-associated, F-actin-binding protein in the villin/gelsolin superfamily. *J. Cell Biol.* 139, 1255-1269.

Pfaff,M. and Jurdic,P. (2001). Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin α V β 3. *J. Cell Sci.* 114, 2775-2786.

Pfeffer,S.R. (2005). Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *J. Biol. Chem.* 280, 15485-15488.

Pfister,K.K., Wagner,M.C., Bloom,G.S., and Brady,S.T. (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.

Pfister,K.K., Wagner,M.C., Stenoien,D.L., Brady,S.T., and Bloom,G.S. (1989c). Monoclonal antibodies to kinesin heavy and light chains stain vesicle-like structures, but not microtubules, in cultured cells. *J. Cell Biol.* *108*, 1453-1463.

Piddini,E., Schmid,J.A., de,M.R., and Dotti,C.G. (2001). The Ras-like GTPase Gem is involved in cell shape remodelling and interacts with the novel kinesin-like protein KIF9. *EMBO J.* *20*, 4076-4087.

Platt,N., da Silva,R.P., and Gordon,S. (1998). Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* *8*, 365-372.

Plitz,T. and Pfeffer,K. (2001). Intact lysosome transport and phagosome function despite kinectin deficiency. *Mol. Cell Biol.* *21*, 6044-6055.

Pollard,T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* *103*, 2747-2754.

Pope,R.K., Pestonjamas,K.N., Smith,K.P., Wulfkuhle,J.D., Strassel,C.P., Lawrence,J.B., and Luna,E.J. (1998). Cloning, characterization, and chromosomal localization of human superillin (SVIL). *Genomics* *52*, 342-351.

Pukrop,T., Klemm,F., Hagemann,T., Gradl,D., Schulz,M., Siemes,S., Trumper,L., and Binder,C. (2006). Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 5454-5459.

Purev,E., Neff,L., Horne,W.C., and Baron,R. (2009). c-Cbl and Cbl-b act redundantly to protect osteoclasts from apoptosis and to displace HDAC6 from beta-tubulin, stabilizing microtubules and podosomes. *Mol. Biol. Cell* *20*, 4021-4030.

Quinlan,M.E., Heuser,J.E., Kerkhoff,E., and Mullins,R.D. (2005). *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature* *433*, 382-388.

Rajendran,L., Masilamani,M., Solomon,S., Tikkanen,R., Stuermer,C.A., Plattner,H., and Illges,H. (2003). Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 8241-8246.

Ramesh,N., Anton,I.M., Hartwig,J.H., and Geha,R.S. (1997). WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 14671-14676.

Ramsay,A.G., Keppler,M.D., Jazayeri,M., Thomas,G.J., Parsons,M., Violette,S., Weinreb,P., Hart,I.R., and Marshall,J.F. (2007). HS1-associated protein X-1 regulates carcinoma cell migration and invasion via clathrin-mediated endocytosis of integrin alphavbeta6. *Cancer Res.* *67*, 5275-5284.

Reed,N.A., Cai,D., Blasius,T.L., Jih,G.T., Meyhofer,E., Gaertig,J., and Verhey,K.J. (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* *16*, 2166-2172.

Reisler,E. and Egelman,E.H. (2007). Actin structure and function: what we still do not understand. *J. Biol. Chem.* *282*, 36133-36137.

Rieder,G., Tessier,A.J., Qiao,X.T., Madison,B., Gumucio,D.L., and Merchant,J.L. (2005). Helicobacter-induced intestinal metaplasia in the stomach correlates with Elk-1 and serum response factor induction of villin. *J. Biol. Chem.* *280*, 4906-4912.

Rohrer,J., Schweizer,A., Russell,D., and Kornfeld,S. (1996). The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J. Cell Biol.* *132*, 565-576.

Rollins,B.J. (1996). Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* *2*, 198-204.

Rooney,C., White,G., Nazgiewicz,A., Woodcock,S.A., Anderson,K.I., Ballestrem,C., and Malliri,A. (2010). The Rac activator STEF (Tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly. *EMBO Rep.* *11*, 292-298.

Rosales-Nieves,A.E., Johndrow,J.E., Keller,L.C., Magie,C.R., Pinto-Santini,D.M., and Parkhurst,S.M. (2006). Coordination of microtubule and microfilament dynamics by Drosophila Rho1, Spire and Cappuccino. *Nat. Cell Biol.* *8*, 367-376.

Rottiers,P., Saltel,F., Daubon,T., Chaigne-Delalande,B., Tridon,V., Billottet,C., Reuzeau,E., and Genot,E. (2009). TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. *J. Cell Sci.* *122*, 4311-4318.

Rowe,T., Dascher,C., Bannykh,S., Plutner,H., and Balch,W.E. (1998). Role of vesicle-associated syntaxin 5 in the assembly of pre-Golgi intermediates. *Science* *279*, 696-700.

Rzomp,K.A., Scholtes,L.D., Briggs,B.J., Whittaker,G.R., and Scidmore,M.A. (2003). Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infect. Immun.* *71*, 5855-5870.

Sack,S., Kull,F.J., and Mandelkow,E. (1999). Motor proteins of the kinesin family. Structures, variations, and nucleotide binding sites. *Eur. J. Biochem.* *262*, 1-11.

Santama,N., Krijnse-Locker,J., Griffiths,G., Noda,Y., Hirokawa,N., and Dotti,C.G. (1998). KIF2beta, a new kinesin superfamily protein in non-neuronal cells, is associated with lysosomes and may be implicated in their centrifugal translocation. *EMBO J.* *17*, 5855-5867.

Sato,T., del Carmen,O.M., Hou,P., Heegaard,A.M., Kumegawa,M., Foged,N.T., and Delaisse,J.M. (1997). Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J. Cell Sci.* *110 (Pt 5)*, 589-596.

Sato-Yoshitake,R., Yorifuji,H., Inagaki,M., and Hirokawa,N. (1992). The phosphorylation of kinesin regulates its binding to synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* *267*, 23930-23936.

Schliwa,M. and Woehlke,G. (2003). Molecular motors. *Nature* *422*, 759-765.

Schwartz,S.L., Cao,C., Pylypenko,O., Rak,A., and Wandinger-Ness,A. (2007). Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* *120*, 3905-3910.

Seals,D.F. and Courtneidge,S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* *17*, 7-30.

Sechi,A.S. and Wehland,J. (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* *113 Pt 21*, 3685-3695.

Sekine,Y., Okada,Y., Noda,Y., Kondo,S., Aizawa,H., Takemura,R., and Hirokawa,N. (1994). A novel microtubule-based motor protein (KIF4) for organelle transports, whose expression is regulated developmentally. *J. Cell Biol.* *127*, 187-201.

Sellers,J.R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* *1496*, 3-22.

Smith,A., Bracke,M., Leitinger,B., Porter,J.C., and 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.

Sohail,A., Sun,Q., Zhao,H., Bernardo,M.M., Cho,J.A., and Fridman,R. (2008). MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *27*, 289-302.

Soldati,T. and Schliwa,M. (2006). Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 897-908.

Solis,G.P., Hoegg,M., Munderloh,C., Schrock,Y., Malaga-Trillo,E., Rivera-Milla,E., and Stuermer,C.A. (2007). Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *Biochem. J.* *403*, 313-322.

Southwick FS. (2000). Gelsolin and ADF/cofilin enhance the actin dynamics of motile cells. *Commentary. Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 6936-6938.

Stetefeld, J. and Ruegg, M.A. (2005). Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* 30, 515-521.

Stuermer, C.A. (2010). The reggie/flotillin connection to growth. *Trends Cell Biol.* 20, 6-13.

Stuermer, C.A., Lang, D.M., Kirsch, F., Wiechers, M., Deininger, S.O., and Plattner, H. (2001). Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol. Biol. Cell* 12, 3031-3045.

Sun, H.Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., and Yin, H.L. (1999). Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 274, 33179-33182.

Svitkina, T.M. and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145, 1009-1026.

Szwarc, M., Sarnowska, E., and Grzybowska, E.A. (2007). [HAX-1 protein: multifunctional factor involved in apoptosis, cell migration, endocytosis and mRNA transport]. *Postepy Biochem.* 53, 218-227.

Takizawa, N., Ikebe, R., Ikebe, M., and Luna, E.J. (2007). Supervillin slows cell spreading by facilitating myosin II activation at the cell periphery. *J. Cell Sci.* 120, 3792-3803.

Takizawa, N., Smith, T.C., Nebl, T., Crowley, J.L., Palmieri, S.J., Lifshitz, L.M., Ehrhardt, A.G., Hoffman, L.M., Beckerle, M.C., and Luna, E.J. (2006). Supervillin modulation of focal adhesions involving TRIP6/ZRP-1. *J. Cell Biol.* 174, 447-458.

Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M., and 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.

Teti, A., Colucci, S., Grano, M., Argentino, L., and Zamboni, Z.A. (1992). Protein kinase C affects microfilaments, bone resorption, and $[Ca^{2+}]_o$ sensing in cultured osteoclasts. *Am. J. Physiol* 263, C130-C139.

Tijsterman, M., Ketting, R.F., and Plasterk, R.H. (2002). The genetics of RNA silencing. *Annu. Rev. Genet.* 36, 489-519.

Ting, H.J., Yeh, S., Nishimura, K., and Chang, C. (2002). Supervillin associates with androgen receptor and modulates its transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 661-666.

Togo, T. and Steinhardt, R.A. (2004). Nonmuscle myosin IIA and IIB have distinct functions in the exocytosis-dependent process of cell membrane repair. *Mol. Biol. Cell* 15, 688-695.

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*, 235-248.

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

Ullrich,O., Reinsch,S., Urbe,S., Zerial,M., and Parton,R.G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* *135*, 913-924.

Underhill,D.M. and Ozinsky,A. (2002a). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 825-852.

Underhill,D.M. and Ozinsky,A. (2002b). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* *14*, 103-110.

Vafiadaki,E., Sanoudou,D., Arvanitis,D.A., Catino,D.H., Kranias,E.G., and Kontrogianni-Konstantopoulos,A. (2007). Phospholamban interacts with HAX-1, a mitochondrial protein with anti-apoptotic function. *J. Mol. Biol.* *367*, 65-79.

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

Valenzuela-Fernandez,A., Cabrero,J.R., Serrador,J.M., and Sanchez-Madrid,F. (2008). HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends Cell Biol.* *18*, 291-297.

Van den Abbeele,A., De,C., V, Van,I.K., Bruyneel,E., Boucherie,C., Bracke,M., Vandekerckhove,J., and Gettemans,J. (2007). Downregulation of gelsolin family proteins counteracts cancer cell invasion in vitro. *Cancer Lett.* *255*, 57-70.

van Helden,S.F., Oud,M.M., Joosten,B., Peterse,N., Figdor,C.G., and van Leeuwen,F.N. (2008). PGE2-mediated podosome loss in dendritic cells is dependent on actomyosin contraction downstream of the RhoA-Rho-kinase axis. *J. Cell Sci.* *121*, 1096-1106.

Verhey,K.J. and Gaertig,J. (2007a). The tubulin code. *Cell Cycle* *6*, 2152-2160.

Verhey,K.J. and Gaertig,J. (2007b). The tubulin code. *Cell Cycle* *6*, 2152-2160.

Vicente-Manzanares,M., Zareno,J., Whitmore,L., Choi,C.K., and Horwitz,A.F. (2007). Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J. Cell Biol.* *176*, 573-580.

Walker,R.A. and Sheetz,M.P. (1993). Cytoplasmic microtubule-associated motors. *Annu. Rev. Biochem.* *62*, 429-451.

Waller,B.J. and Alberts,A.S. (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* *13*, 435-446.

Weaver,A.M. (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin. Exp. Metastasis* *23*, 97-105.

Westermann,S. and Weber,K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 938-947.

Wilcke,M., Johannes,L., Galli,T., Mayau,V., Goud,B., and Salamero,J. (2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J. Cell Biol.* *151*, 1207-1220.

Wilson,G.M., Fielding,A.B., Simon,G.C., Yu,X., Andrews,P.D., Hames,R.S., Frey,A.M., Peden,A.A., Gould,G.W., and Prekeris,R. (2005). The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* *16*, 849-860.

Wozniak,M.J. and Allan,V.J. (2006). Cargo selection by specific kinesin light chain 1 isoforms. *EMBO J.* *25*, 5457-5468.

Wulfkuhle,J.D., Donina,I.E., Stark,N.H., Pope,R.K., Pestonjamas,K.N., Niswonger,M.L., and Luna,E.J. (1999). Domain analysis of supervillin, an F-actin bundling plasma membrane protein with functional nuclear localization signals. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 13)*, 2125-2136.

Xia,Z. and Triffitt,J.T. (2006). A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomed. Mater.* *1*, R1-R9.

Yap,S.V., Vafiadaki,E., Strong,J., and Kontrogianni-Konstantopoulos,A. (2009). HAX-1: A multifaceted antiapoptotic protein localizing in the mitochondria and the sarcoplasmic reticulum of striated muscle cells. *J. Mol. Cell Cardiol.*

Yura,K. *et al.* (2006). Alternative splicing in human transcriptome: functional and structural influence on proteins. *Gene* *380*, 63-71.

Zaidel-Bar,R., Ballestrem,C., Kam,Z., and Geiger,B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J. Cell Sci.* *116*, 4605-4613.

Zamir,E. and 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., and Kam,Z. (1999). Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 11)*, 1655-1669.

Zerial,M. and McBride,H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107-117.

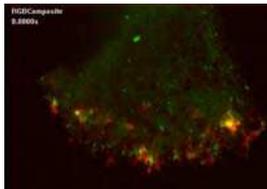
Zhang,T., Wong,S.H., Tang,B.L., Xu,Y., and Hong,W. (1999). Morphological and functional association of Sec22b/ERS-24 with the pre-Golgi intermediate compartment. *Mol. Biol. Cell* 10, 435-453.

Zigmond,S.H., Evangelista,M., Boone,C., Yang,C., Dar,A.C., Sicheri,F., Forkey,J., and Pring,M. (2003). Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr. Biol.* 13, 1820-1823.

Zuchero,J.B., Coutts,A.S., Quinlan,M.E., Thangue,N.B., and Mullins,R.D. (2009). p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat. Cell Biol.* 11, 451-459.

7 Anhang

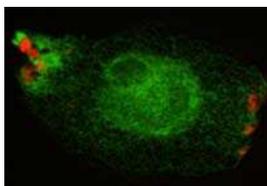
7.1 Inhalt der Video-CD



Film 1 (7,2 min): Lokalisation von KIF1C-TagRFP und GFP-Rab6a

zu Abb. 3.4

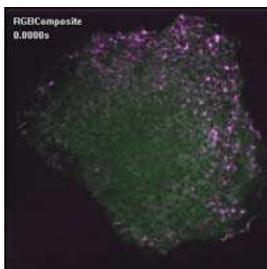
Live cell konfokalmikroskopische Aufnahme eines primären humanen Makrophagen, 6h nach Transfektion mit GFP-Rab6a und KIF1C-TagRFP.



Film 2 (9min): Lokalisation von mVenus-Sec22b und KIF1C-TagRFP

zu Abb. 3.9

Live cell konfokalmikroskopische Aufnahme eines primären humanen Makrophagen, 6h nach Transfektion mit mVenus-Sec22 und KIF1C-TagRFP.

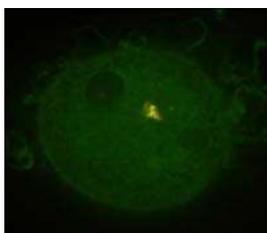


Film 3 (11,8 min): Lokalisation von GFP-HAX1 und KIF1C-TagRFP

zu Abb 3.12

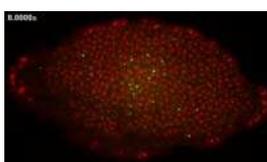
Live cell konfokalmikroskopische Aufnahme eines primären humanen Makrophagen, 6h nach Transfektion mit GFP-HAX1 und KIF1C-TagRFP.

Für eine bessere Sichtbarmachung ist KIF1C-TagRFP in blau dargestellt.



Film 4 (4 min): GFP-HAX1 und KIF1C-K103A-TagRFP lokalisieren am MTOC zu Abb. 3.16

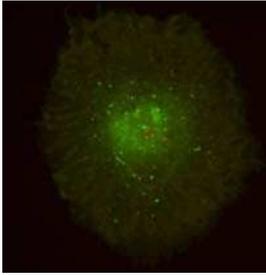
Live cell konfokalmikroskopische Aufnahme eines primären humanen Makrophagen, 6h nach Transfektion mit GFP-HAX1 und pTagRFP-KIF1C-K103A.



Film 5 (20,4 min): KIF9-GFP kontaktiert Podosomen

zu Abb. 3.21

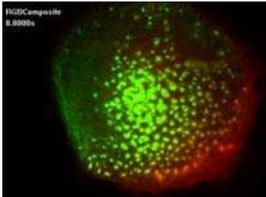
Live cell konfokalmikroskopische Aufnahme eines primären humanen Makrophagen, 27h nach Transfektion mit KIF9-GFP und mRFP-β-Aktin.



Film 6 (8 min): Reggie-1-GFP und KIF9-mCherry

zu Abb. 3.33

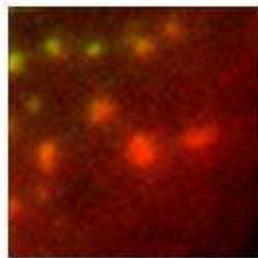
Live cell konfokalmikroskopische Aufnahme eines primären humanen Makrophagen, 6h nach Transfektion mit GFP-Reggie und mCherry-KIF9.



Film 7 (16,1 min): Podosomen, die sich auflösen, rekrutieren Supervillin

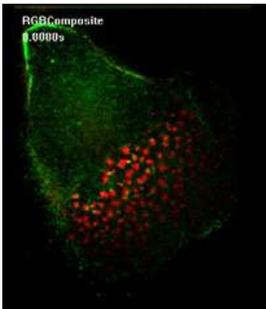
zu Abb. 3.39

Live cell konfokalmikroskopische Aufnahme eines primären humanen Makrophagen, 16h nach Transfektion mit GFP-Supervillin und mRFP- β -Aktin.



Film 8: Ausschnittsvergrößerung aus Film 7

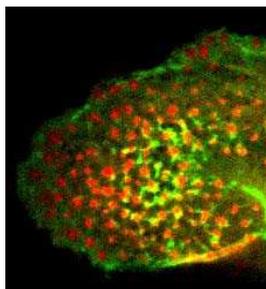
zu Abb. 3.39



Film 9 (13,1min): GFP-Myosin IIA lokalisiert an Podosomen, die sich auflösen

zu Abb. 3.49

Live cell konfokalmikroskopische Aufnahme eines moderat exprimierenden primären humanen Makrophagen, 16h nach Transfektion mit GFP-Myosin IIA und RFP-Supervillin.

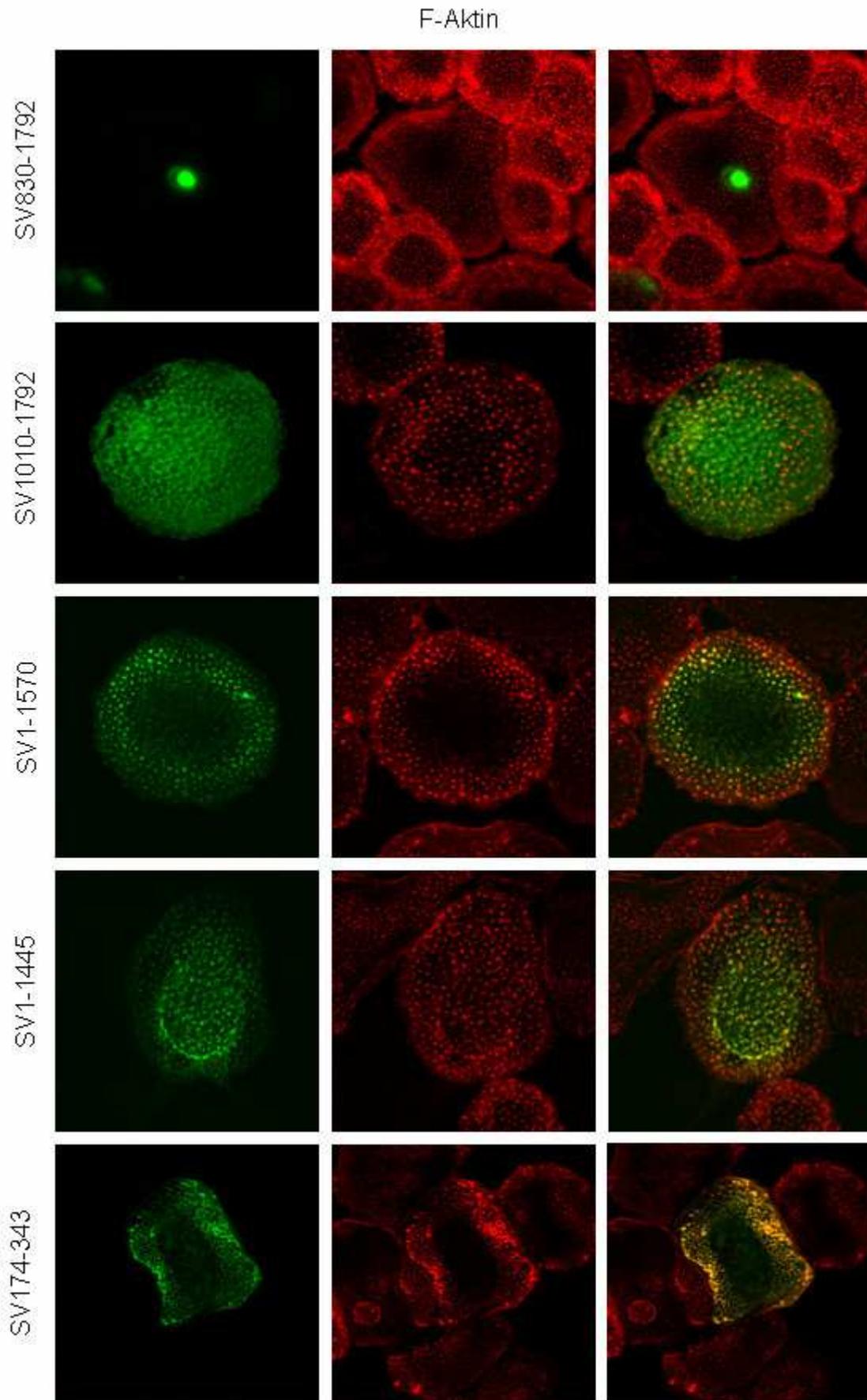


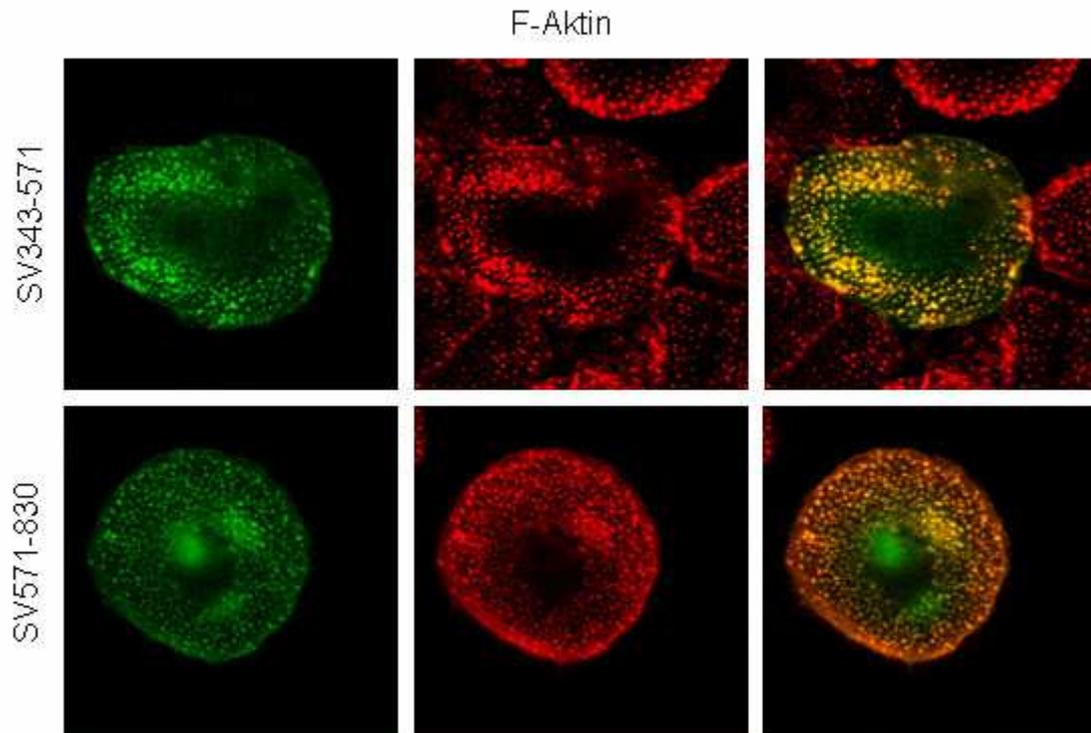
Film 10 (5 min): GFP-Myosin IIA lokalisiert an Podosomen, die sich auflösen

zu Abb. 3.49

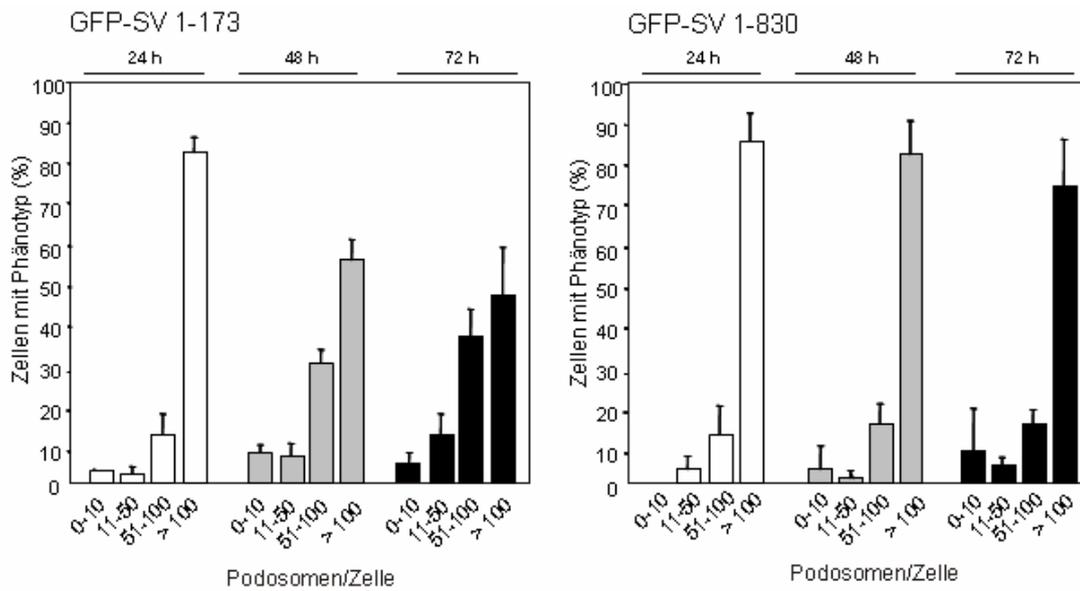
Live cell konfokalmikroskopische Aufnahme eines stark exprimierenden primären humanen Makrophagen, 16h nach Transfektion mit GFP-Myosin IIA und RFP-Supervillin.

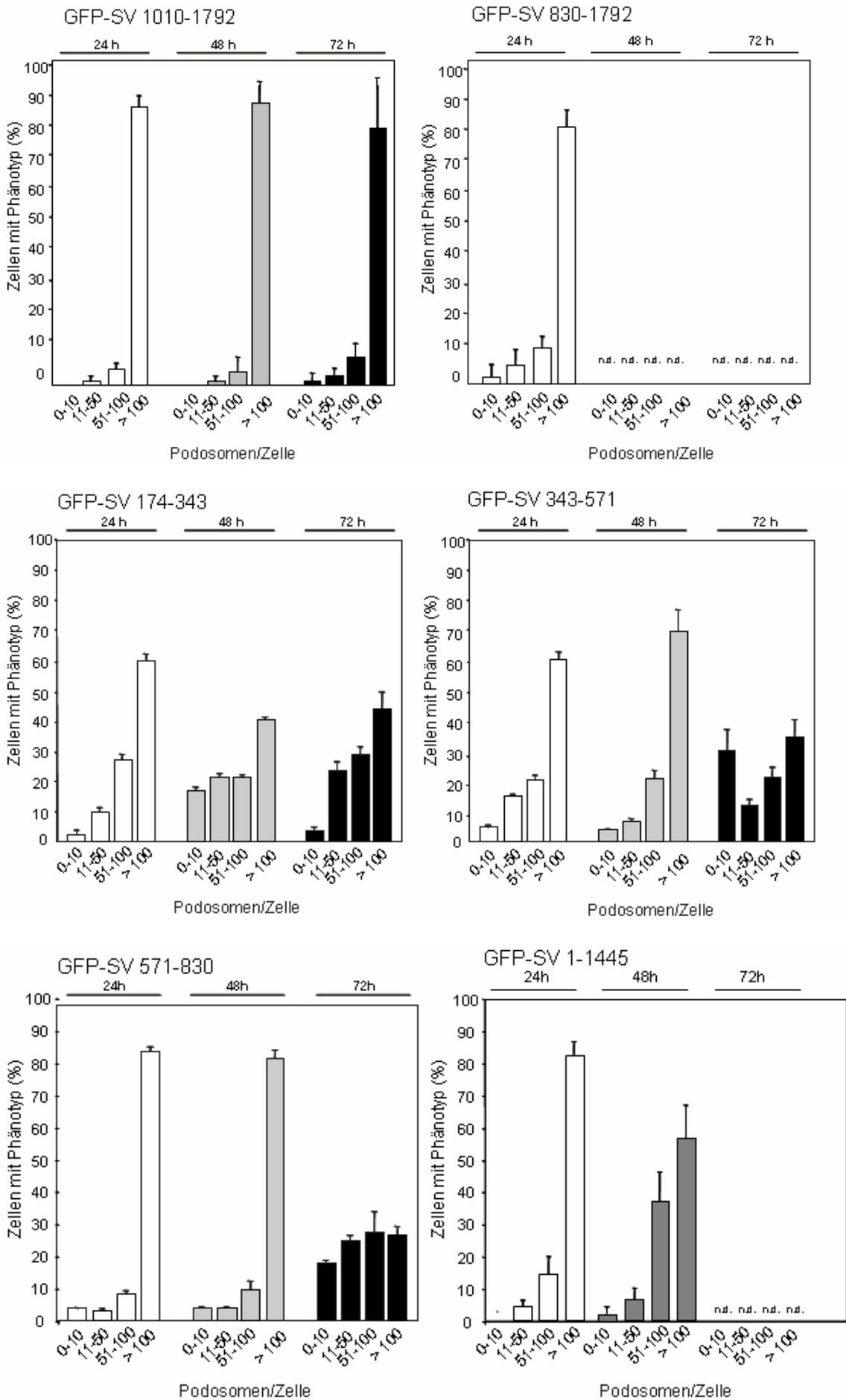
7.2 Lokalisation von GFP-Supervillin Deletionskonstrukten

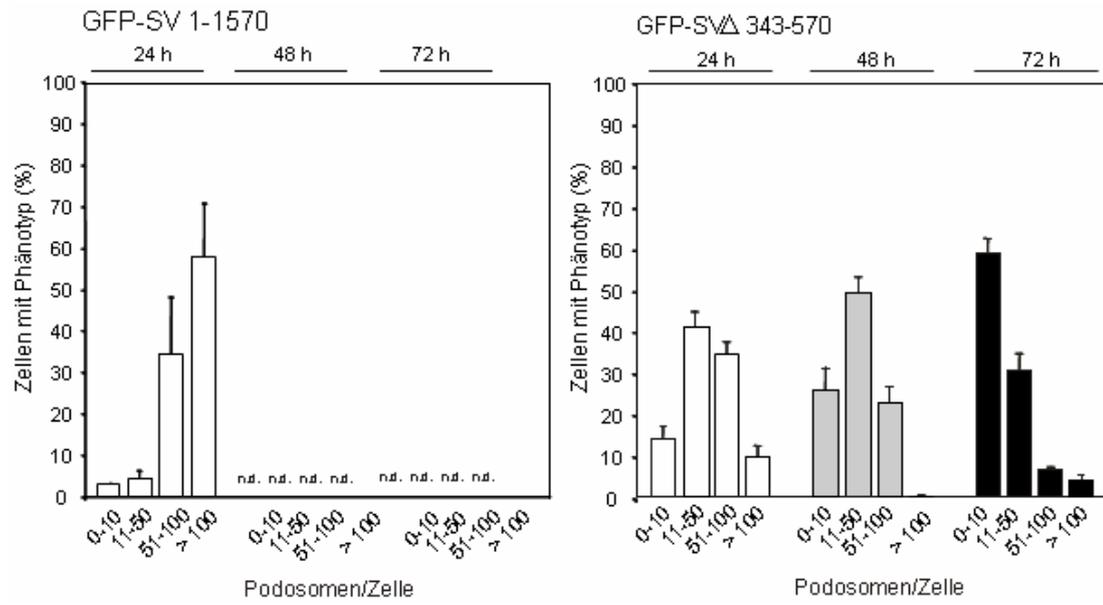




7.3 Einfluss von GFP-Supervillin Deletionskonstrukten auf die Podosomenanzahl







8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. P.C. Weber für die freundliche Aufnahme am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten und das stete Interesse an meiner Arbeit.

Für die freundliche Bereitschaft, meine Arbeit vor der biologischen Fakultät zu vertreten und das Interesse an meiner Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. George Boyan sowie Prof. Dr. Michael Schleicher für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Linder bedanken. Nicht nur für die Vergabe des interessanten Themas, sondern auch für die sehr gute Betreuung der Doktorarbeit, die stetige Unterstützung und dafür, wirklich jederzeit bei Fragen und Problemen Rat und Hilfe zu erhalten.

Bei Dr. Michael Sixt bedanke ich mich für die Durchführung der FACS-Analysen und bei Dr. Marcus Krüger für die Durchführung der Massenspektrometrie. Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Elizabeth Luna für die Kooperation und Hilfe hinsichtlich Supravillin. Mein Dank gilt natürlich auch allen anderen Kooperationspartnern für die Bereitstellung ihrer Konstrukte oder Antikörper.

Ein herzliches Dankeschön an Dr. Petra Kopp für die gute Einarbeitung und Zusammenarbeit sowie für ihre Hilfe und Beantwortung zahlreicher Fragen „über den Kanal“ hinweg.

Ein großer Dank gilt Barbara Böhlig für ihren tollen Einsatz im Labor sowie die stete Hilfsbereitschaft bei sämtlichen Fragen, auch nach unserem Umzug.

Vielen Dank auch an Vanessa und Nadja. Zum einen für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe im Labor, aber auch für den stetigen Rezepteaustausch sowie zahlreiche Kochereignisse außerhalb des Labors. Mit euch habe ich nicht nur nette Kolleginnen, sondern auch sehr gute Freundinnen gewonnen!

Danke auch an alle anderen „Pavillonier“ für die gute Zusammenarbeit, ganz besonders Antje und Reini für viele fachliche und manchmal auch weniger fachliche Gespräche im Labor.

Im Rahmen unseres Laborumzugs gilt mein Dank auch Herrn Prof. Dr. Martin Aepfelbacher für die freundliche Aufnahme am Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKE Hamburg.

Bei Chrissy möchte ich mich nicht nur für ihre sehr gute Hilfe im Labor (und die fluoreszierenden Makrophagen in Abb. 3.1), sondern auch für das nette Zusammenleben in unserer WG bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Mirko Himmel. Nicht nur für seine Hilfe am Mikroskop, sondern auch für seine Vorschläge und Ideen sowie zahlreiche fachliche Diskussionen.

Ein großes Dankeschön gilt Jens für seinen unermüdlichen Einsatz in allen Belangen im Labor - vor allem für seine Geduld bei den *Western Blots*. Viele hätten wohl verzweifelt aufgegeben.

Vielen Dank an Kerstin, Karim und Pasquale für die nette Zusammenarbeit und die gute Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe.

Bei allen anderen Mit-Doktorandinnen und -Doktoranden des Instituts möchte ich mich für die nette Aufnahme und die gute Zusammenarbeit bedanken. Man trifft wohl selten so viele nette Menschen auf einmal.

Auch bei meiner Schwester will ich mich bedanken: für ihre Unterstützung und die vielen motivierenden Gespräche, selbst über den „großen Teich“ hinweg.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt meinen Eltern. Dafür, dass sie mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben, sowie dafür, dass sie mich immer unterstützen und für mich da sind.

9 Lebenslauf

Name:	Susanne Cornfine	
Geburtsdatum:	25.11.1981	
Geburtsort:	Erding	
Schulbildung:	1988-1992 1992-2001 2001	Grundschule Altenerding Gymnasium Erding Allgemeine Hochschulreife
Studium:	Okt. 2001- Juli 2006	Studium der Biologie an der Technischen Universität München- Weihenstephan Hauptfach: Technische Biologie Neben- fächer: Virologie, Humanbiologie, Öko- toxikologie und Technischer Umwelt- schutz Abschluss: Master of Science Note: 1,1
	Dez. 2005 - Juni 2006	Master-Thesis am International Institute for Brewing and Distilling, Heriot-Watt- University, Edinburgh, Schottland Arbeitsgruppe Prof. Dr. Graham G. Stewart Thema: „Production of Bioethanol from wheat“
Promotion:	April 2009 – Mai 2010	Doktorarbeit am Institut für Mikrobiolo- gie, Virologie und Hygiene des Uni- versitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Betreuung von Prof. Dr. Stefan Linder und Prof. Dr. George Boyan
	Okt. 2006- März 2009	Doktorarbeit am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauf- krankheiten unter der Betreuung von PD Dr. Stefan Linder und Prof. Dr. George Boyan Thema: „Regulation der Podosomendy- namik in primären humanen Makrophagen“
	Okt. 2006 - Dez. 2006	Mitglied im Graduiertenprogramm 438: „Vaskuläre Biologie in der Medizin“