

Diffusion von Tau auf Mikrotubuli und Auswirkung auf die Kinesin-Funktion

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biochem. Maike Hinrichs
geboren am 13.02.1981 in Hannover

2011

Referent: Prof. Dr. med. Bernhard Brenner

Korreferent: Prof. Dr. rer.nat. Walter Müller

Tag der Promotion: 05.09.2011

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat.“

Johann Wolfgang von Goethe

Zusammenfassung

Das Protein Tau gehört zur Gruppe der strukturellen Mikrotubuli-assoziierten Proteine. Im Axon von neuronalen Zellen bindet es an Mikrotubuli, fördert den Aufbau von Mikrotubuli und erhöht deren Stabilität. Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer entwickelt Tau jedoch eine pathologische Funktion. Es kommt zu einer erhöhten Expression, die zu einer Störung des Kinesin-abhängigen axonalen Transports von Vesikeln und Zellorganellen und schließlich zur Ausbildung der für Alzheimer typischen paarweisen helikalen Filamenten führt. Als Ursache für die Störung des Kinesin-abhängigen Transports wird ein Blockade-Modell favorisiert. Dabei soll Tau durch Blockade der Mikrotubuli-Protofilamente die zum Plus-Ende gerichtete Bewegung von Kinesin behindern.

Damit nicht vereinbar scheinen Berichte wonach Tau selbst, auch bei erhöhtem Vorkommen, stets gleichmäßig im Axon verteilt bleibt, obwohl für den Transport und somit die Verteilung von Tau ebenfalls ein Mitwirken von Kinesin vermutet wird. Zudem wurde eine dynamische Interaktion von Tau und Mikrotubuli gezeigt, die gegen ein reines Blockade-Modell bei der Tau-Kinesin-Interaktion spricht.

Um die dynamische Interaktion von Tau und Mikrotubuli näher zu untersuchen und die Relevanz dieser dynamischen Interaktion für den Transport von Tau und bei seiner Interaktion mit Kinesin zu beleuchten, wurde in dieser Arbeit die Wechselwirkung von fluoreszenzmarkiertem Tau mit Mikrotubuli mittels der *Totalen internen Reflexions Fluoreszenz* (TIRF)-Mikroskopie auf Einzelmolekülebene charakterisiert. Diese Experimente zeigten dabei erstmals, dass Tau-Moleküle nicht ausschließlich stationär an Mikrotubuli binden. 60% aller untersuchten Tau-Moleküle zeigten eine ATP-unabhängige Diffusion entlang des Mikrotubuli-Gitters, parallel zur Mikrotubuli-Achse. Die ermittelten Diffusionsparameter, wie Diffusionskoeffizient, Diffusionsdauer und maximaler End-zu-End-Abstand, waren von der eingesetzten Tau-Konzentration weitgehend unbeeinflusst. Eine gegenseitige Beeinflussung der Tau-Moleküle ist daher unwahrscheinlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Tau-Diffusion auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht und der Interaktionspartner hierfür der Tubulin C-Terminus auf der Mikrotubuli-Oberfläche ist.

Im Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass trotz Tau-Diffusion die lokale Tau-Konzentration auf der Mikrotubuli-Oberfläche unterschiedlich sein kann und ursächlich für die Störung der Kinesin-Funktion ist. Dabei verringern sich mit zunehmender lokaler Tau-Konzentration die Bindungsfrequenz und die Lauflänge von Kinesin, nicht jedoch die Laufgeschwindigkeit. Dies deutet auf eine komplexere Störung als vom Blockade-Modell erwartet, da im Blockade-Modell zusätzlich zur verminderten Lauflänge auch eine verringerte Geschwindigkeit zu erwarten gewesen wäre.

Abschließend wurde in dieser Arbeit ein Modell der physiologischen und pathophysiologischen Funktion von Tau inklusive der Interaktion mit Kinesin entwickelt. Dabei führt eine erhöhte Anzahl von Tau-Molekülen auf der Mikrotubuli-Oberfläche zu einer gestörten Interaktion des Kinesin „neck-linkers“ mit der jeweiligen Mikrotubulus-Oberfläche, was zu einer verringerten Kommunikation zwischen vorderem und hinterem Kinesin-Kopf und somit zur Abnahme der Kinesin-Lauflänge führt.

Schlagwörter: Tau, Mikrotubuli, Diffusion

Abstract

The Protein Tau belongs to the group of structural-microtubule-associated proteins. Within the axon of neuronal cells it binds to microtubules, promotes the assembly of microtubules and increases their stability. During neurodegenerating diseases, like Alzheimer's disease, Tau develops a pathological role. The Tau expression gets elevated which results in an interference with the kinesin-dependent axonal transport of vesicles and cellular organelles. Finally the formation of the Alzheimer-typical paired helical filaments takes place. The reason for the interference with the kinesin-dependent axonal transport of Tau is thought to be through Tau molecules acting as roadblocks on the microtubule. Thus, Tau could hinder the plus-end directed motion through a direct blockage of microtubule protofilaments.

The transport of tau has been reported to be mediated by kinesin. This result would suggest that, with elevated Tau, and a road block mechanism, tau would be distributed unevenly over the surface of the microtubules. However, inconsistent with this assumption are data that show an equally distributed tau at elevated tau concentrations. Furthermore a dynamic interaction between Tau and microtubules has been shown. These two observations indicate that a simple road block mechanism is not sufficient to explain the effect on axonal transport.

The transport of Tau has been reported to be mediated by kinesin. Apparently not consistent with this assumption are data that show an equally distributed Tau even at higher Tau concentrations where the kinesin-dependent transport is already interrupted. Furthermore a dynamic interaction between Tau and microtubules has been shown, which speaks against a pure roadblock model for the Tau-kinesin-interaction.

In this study the interaction between Tau and microtubules was further investigated to check the relevance of the dynamic interaction for the transport of Tau and for the interference with kinesin. Therefore the interplay between fluorescently-labelled Tau and Microtubules was characterized at the single molecule level by *total internal reflection fluorescence* (TIRF)-Microscopy. With this approach it was possible to show for the first time, that Tau is not exclusively stationary on microtubules. 60% of all molecules showed ATP-independent diffusion along the microtubule lattice, parallel to the axis. The determined diffusion parameters like the diffusion coefficient, the duration of diffusion and the peak-to-peak-distance showed no dependence on the used Tau concentration. A self-interference between two Tau molecules is therefore unlikely. In this study could further be demonstrated, that the diffusion is based on electrostatic interactions between Tau and the Tubulin C-terminus on the microtubule surface.

In addition this study showed, that despite the Tau diffusion the local Tau concentration can be unequal and the reason for the interference with the function of kinesin. With increasing local Tau concentration the binding frequency and the run length decreases, but not the velocity. This indicates a more complex interaction than a simple roadblock model where also a reduced velocity would have been anticipated.

Finally a model for the physiological and pathophysiological function including the interference with kinesin was developed. In this model a increased number of Tau molecules at the microtubule surface leads to a disturbed interaction of the kinesin neck-linker with the microtubule surface. This results in a reduced front-head-gating and consequently leads to a reduced kinesin run length.

Key words: Tau, microtubules , diffusion

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Mikrotubuli-assoziierte Proteine	1
1.2 Tau	3
1.2.1 Domänen und Isoformen	3
1.2.2 Funktion und Lokalisation	4
1.2.3 Tauopathien	6
1.2.4 Transport von Tau	7
1.3 Zielsetzung	8
2. Material und Methoden	11
2.1 Materialien	11
2.1.1 Chemikalien	11
2.1.2 Weitere Proteine	12
2.1.2.1 Restriktionsenzyme	12
2.1.2.2 Proteine	12
2.1.3 Vektoren	13
2.1.4 Farbstoffe	13
2.1.5 Antikörper	13
2.1.6 Puffer und Lösungen	13
2.1.7 Bakterien	15
2.1.8 verwendete Tierspezies	15
2.1.9 Sonstige Produkte	15
2.1.10 Software	16
2.1.11 Geräte	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Tubulin-Extraktion aus Schweinegehirn	17
2.2.2 Transformation von Bakterien	18
2.2.3 Bakterienkultur	18
2.2.3.1 Allgemein	18
2.2.3.2 Bakterienkultur zur Proteinexpression	19
2.2.4 Proteinextraktion von rK555-GFP aus Escherichia coli	19
2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	20
2.2.6 Agarosegelelektrophorese	21

2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.2.8 Restriktionsschnitte	21
2.2.9 Markierung von Tubulin mit Cy5-NHS Ester oder Rhodamin-NHS Ester	21
2.2.10 Markierung von hTau40 mit 5'-Tetramethylrhodamin (5'-TMR)-maleimid	23
2.2.11 Tubulin-Polymerisation zu Mikrotubuli für TIRF-Messungen	23
2.2.11.1 Cy5-Mikrotubuli	23
2.2.11.2 Cy5-Mikrotubuli, Subtilisin-verdaut	23
2.2.11.3 unmarkierte Mikrotubuli	24
2.2.12 Experimente am <i>Totale Interne Reflexions Fluoreszenz</i> (TIRF)-Mikroskop	24
2.2.12.1 Funktionsprinzip	24
2.2.12.2 Aufbau des TIRF-Mikroskops	25
2.2.12.3 Durchführung der Experimente	27
2.2.12.4 Datenauswertung	28
3. Ergebnisse	33
3.1 Analyse der verwendeten Proteine	33
3.2 Verhalten von hTau40 auf Mikrotubuli	35
3.2.1 Kolokalisation von hTau40 und Mikrotubuli	35
3.2.2 Charakterisierung der Bewegung von hTau40 entlang der Mikrotubuli-Achse	37
3.2.3 Einfluss der Ionenstärke und Mikrotubuli-Oberfläche auf die hTau40 Diffusion	41
3.3 Interaktion von hTau40 und Kinesin	44
3.3.1 hTau40 beeinflusst die Lauflänge und Bindungsrate, jedoch nicht die Geschwindigkeit einzelner Kinesinmoleküle	44
3.3.2 Lokale Tau-Konzentration beeinflusst Bindung und Dissoziation von Kinesin an Mikrotubuli	48
4. Diskussion	52
4.1 Diffusion von Tau auf Mikrotubuli	53
4.2 Beeinflussung von Kinesin durch Tau	58
4.3 Modell und Ausblick	65
5. Literaturverzeichnis	72

6. Abkürzungsverzeichnis	79
7. Danksagung	80
Lebenslauf	
Publikationsliste	
Erklärung zur Dissertation	

1. Einleitung

Transportvorgänge in Zellen sind von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion. Es werden z.B. Vesikel sowie Zellorganellen an Filamenten des Zytoskeletts transportiert. Die Bewegung entlang von Mikrotubuli ist dabei besonders für den Transport über größere Distanzen wichtig. Kritisch sind vor allem Mikrotubulus-abhängige Bewegungen im Axon von Nervenzellen. Die Geometrie des Axons stellt die Zellen vor besondere Herausforderungen: Hier ist ein Transport vom Soma der Nervenzellen bis in die Peripherie über eine vergleichsweise sehr große Distanz zu bewältigen. Ein stabiler axonaler Transport ist daher essentiell für die Aufrechterhaltung neurozellulärer Funktionen.

1.1 Mikrotubuli-assoziierte Proteine

Mikrotubuli bestehen aus α/β -Tubulindimeren. Diese lagern sich zu Protofilamenten zusammen, wovon meist 13 oder 14 die röhrenförmigen Mikrotubuli bilden. Mikrotubuli sind dynamische Strukturen. Sie haben die Fähigkeit zwischen Phasen des Wachstums und des Schrumpfens zu wechseln. Dies wird als dynamische Instabilität bezeichnet. Dabei wächst das sogenannte Minus-Ende (mit α -Tubulin am Ende - zeigt in Zellen meist zum Mikrotubuli organisierenden Zentrum (MTOC) im Zellzentrum) weniger schnell als das sogenannte Plus-Ende (mit β -Tubulin am Ende, zeigt in Zellen meist in die Peripherie) (Mitchison und Kirschner (1984), Nogales *et al.* (1998)) (Abb. 1.1). Mikrotubuli sind an vielfältigen zellulären Prozessen beteiligt, z.B. der Ausbildung der Morphologie, der Zellteilung und am intrazellulären Transport (Review: Valiron *et al.* (2001)). Zudem dienen sie den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) als Bindungspartner.

Zur Gruppe der Mikrotubuli-assoziierten Proteine gehören Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen. Am bekanntesten sind dabei die Motorproteine, die sich entlang der Mikrotubuli unter ATP-Verbrauch bewegen können. Bei diesen Proteinen werden wiederum zwei Klassen unterschieden: die Kinesine und Dynein. Dynein bewegt sich zum Minus-Ende der Mikrotubuli, Kinesine dagegen, mit einer Ausnahme, zum Plus-Ende der Mikrotubuli (Review: Mallik und Gross (2004)).

Daneben gibt es jedoch auch MAPs, die die Mikrotubuli verändern können, indem sie einzelne Tubulin-Monomere verändern, wie z.B. die Tubulin Thyrosin-Ligase (Ersfeld *et al.* (1993)). Als notwendig für die Stabilisation der, wie oben beschrieben, dynamischen Mikrotubuli, wurde eine Gruppe von Proteinen identifiziert, die auch in wiederholten Zyklen von Mikrotubuli-Polymerisation und -Depolymerisation mit Tubulin zusammen aufgereinigt werden konnten (Murphy und Borisy (1975), Sloboda *et al.* (1976)). Es konnte eine

Untergruppe mit hoher molekularer Masse (280 – 340 kDa) und eine mit niedrigerer molekularer Masse (55 – 62 kDa) abgegrenzt werden. Zur Gruppe mit hoher molekularer Masse zählen MAP1A, MAP1B, MAP2 und MAP4 (Matus (1991), Tucker (1990), Hirokawa (1994)). Die Gruppe mit niedrigerer molekularer Masse wird durch die verschiedenen Isoformen von Tau gebildet (Weingarten *et al.* (1975), Cleveland *et al.* (1977a, b)). Tau kommt hauptsächlich in Nervenzellen vor, wo die Stabilität der Mikrotubuli zur Erhaltung der Polarität der Zellen besonders wichtig ist.

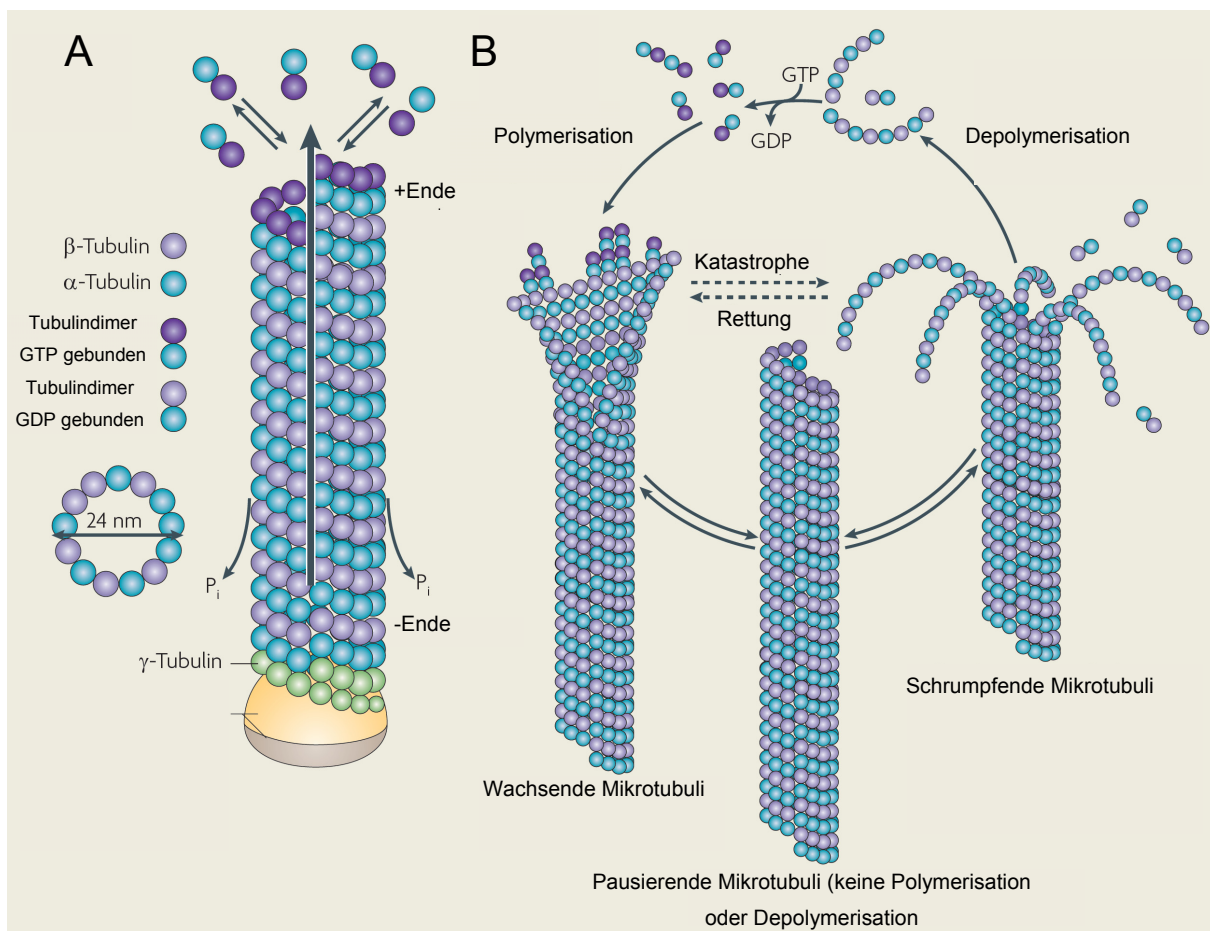


Abbildung 1.1: Aufbau und dynamische Instabilität von Mikrotubuli

A α/β -Tubulindimere lagern sich zu Protofilamenten zusammen, wovon meist 13 oder 14 einen röhrenförmigen Mikrotubulus bilden. Die durch Polymerisation am Plus-Ende neu anbindenden Tubulindimere haben am β -Tubulin GTP gebunden, welches später zu GDP hydrolysiert wird. **B** Dargestellt ist die dynamische Instabilität der Mikrotubuli. Es liegt ein steter Kreislauf zwischen Polymerisation und Depolymerisation vor. Verändert nach Conde und Cáceres (2009).

1.2 Tau

1.2.1 Domänen und Isoformen

Tau hat zwei verschiedene Hauptdomänen, die N-terminale sogenannte Projektionsdomäne und die C-terminale Mikrotubulibindungsdomäne. Obwohl nur ein Gen (auf Chromosom 17) für Tau codiert, kommen im zentralen Nervensystem sechs verschiedene Isoformen vor (Abb. 1.2). Diese entstehen durch das alternative Splicen der Exons 2, 3 und 10. Dabei kann durch die An- oder Abwesenheit von Exon 2 und Exon 3 die Projektionsdomäne in drei verschiedenen Längen vorkommen (kurz: beide Exons nicht vorhanden, mittellang: Exon 2 vorhanden, lang: Exon 2 und Exon 3 vorhanden). Durch An- oder Abwesenheit von Exon 10 besteht die Mikrotubulibindungsdomäne aus drei oder vier 18 Aminosäuren umfassenden Mikrotubulibindungsbereichen, die jeweils von einem 13-14 Aminosäuren umfassenden Zwischenbereich unterbrochen werden (Lewis *et al.* (1988)). Da die Mikrotubulibindungsgebiete untereinander eine hohe Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz aufweisen, werden sie auch als „Repeats“ bezeichnet. Tau-Isoformen mit vier solcher „Repeats“ werden daher 4R-Tau genannt, Isoformen mit drei „Repeats“ 3R-Tau. Jeder „Repeat“ trägt in etwa mit gleichem Maße zur Bindung an Mikrotubuli bei, dabei werden van der Waals-Wechselwirkungen oder stark abgeschirmte ionische Wechselwirkungen zwischen den „Repeats“ und den Mikrotubuli angenommen (Butner und Kirschner (1991)). Es gibt Hinweise, dass neben den „Repeats“ auch die Zwischenbereiche (die sogenannten „Inter-Repeats“) zur Mikrotubuli-Bindung beitragen. Dabei zeigte vor allem der erste „Inter-Repeat“ eine hohe Affinität zu Mikrotubuli, sogar stärker als die Mikrotubulibindungsgebiete (Goode und Feinstein (1994)). Neben den „Repeats“ gibt es noch Prolin-reiche Regionen, die vor den Mikrotubulibindungsgebieten liegen. Diese bildet zusammen mit einer weiteren Region, die sich direkt an die Mikrotubulibindungsgebiete anschließt und als „Pseudo-Repeat“ bezeichnet wird, die sogenannte flankierende Region (Mandelkow *et al.* (1995)). Die flankierenden Bereiche können auch alleine, ohne die Mikrotubulibindungsgebiete, an Mikrotubuli binden und verstärken die Bindung der Mikrotubulibindungsgebiete (Gustke *et al.* (1994)).

Durch die Kombination von unterschiedlich langer Projektionsdomäne und unterschiedlich langer Mikrotubulibindungsdomäne können im menschlichen Körper insgesamt sechs verschiedenen Isoformen mit 352 bis 441 Aminosäuren exprimiert werden. Während der Entwicklung der Nervenzellen wird nur die kürzeste Isoform exprimiert. Erst im erwachsenen Nervensystem kommen alle Isoformen vor. Dabei ist das Verhältnis von 3R-Tau zu 4R-Tau etwa 50:50 (Ingram und Spillantini (2002)).

Tau ist hydrophil und gut löslich. Bisher konnte keine Sekundärstruktur für Tau ermittelt werden (Voter und Erickson (1982), Schweers *et al.* (1994)). Es wird daher auch als natürlicherweise ungeordnetes Protein bezeichnet.

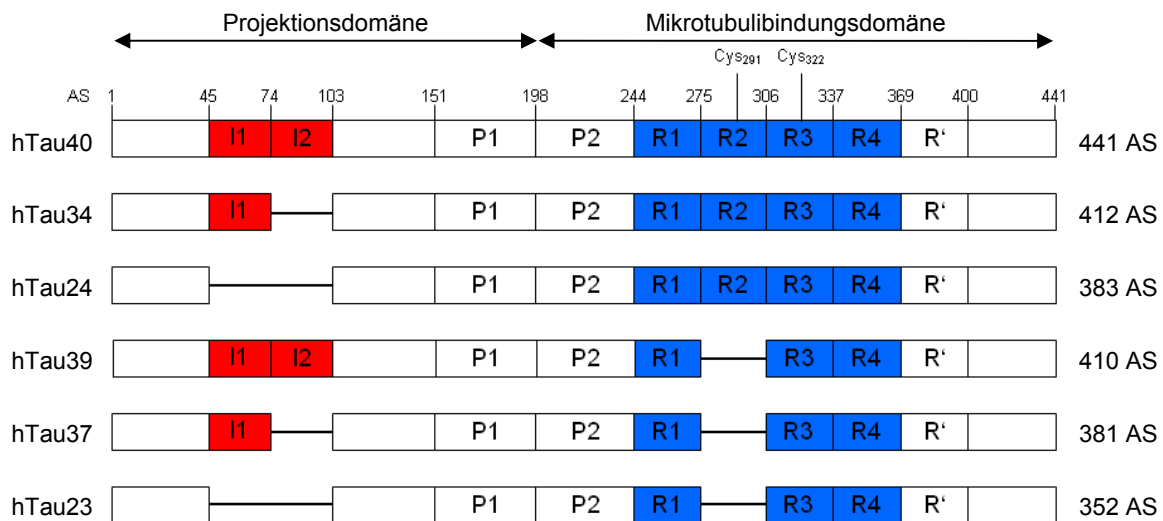


Abbildung 1.2: Tau-Isoformen

Tau kommt in sechs Isoformen vor. Sie entstehen durch alternatives Splicing der Exone 2,3 und 10 des Tau-Gens. Dabei kann die Projektionsdomäne (Exon 2 und 3, rot dargestellt) und / oder die Mikrotubulinbindungsdomäne (Mikrotubulinbindungsbereiche blau dargestellt) in ihrer Länge verändert sein. Die zur Markierung der längsten Isoform hTau40 wurden die beiden natürlicherweise vorkommenden Cysteine an den Position 291 und 322 verwendet.

1.2.2 Funktion und Lokalisation

Die physiologische Funktion von Tau ist die Bindung an Mikrotubuli. Diese wurde erstmals von Weingarten *et al.* (1975) beschrieben. Dadurch wird eine Unterstützung der Mikrotubuli-Polymerisation, durch Erhöhung der Wachstumsrate und Verringerung der Depolymerisationsrate, sowie die Stabilisierung von Mikrotubuli bewirkt (Drechsel *et al.* (1992), Cleveland *et al.* (1977a)). Für die effektive Polymerisation sind die Mikrotubulinbindungsbereiche allein nicht ausreichend. Die flankierenden Regionen sind ebenfalls notwendig und wirken wie eine Art Klammer (Brandt und Lee (1993), Brandt und Lee (1994)). Die flankierenden Regionen allein können zwar an Mikrotubuli binden, führen jedoch zu keiner Mikrotubuli-Polymerisation (Gustke *et al.* (1994)). Der Gesamtbeitrag der Mikrotubulinbindungsbereiche zur Mikrotubuli-Bindung ist eher schwach. Für den „Inter-Repeat“ zwischen den Mikrotubulinbindungsbereichen eins und zwei wird jedoch berichtet, dass dieser einen besonders großen Beitrag leistet (Goode und Feinstein (1994)). Insgesamt wurden Dissoziationskonstanten für Tau und Mikrotubuli zwischen 1 μ M und 14 nM ermittelt (Butner und Kirschner (1991), Goode *et al.* (2000), Ackmann *et al.* (2000), Kar *et al.* (2003),

Makrides *et al.* (2004)). Für die Halbwertszeit der Bindung wurden sehr unterschiedliche Werte berichtet. Sie schwanken zwischen $t_{1/2} = 280$ ms (Makrides *et al.* (2004)), $t_{1/2} = 5,8$ s (Samsonov *et al.* (2004)) und $t_{1/2} = 1733$ s (Ross *et al.* (2004)).

Für die Bindungsstöchiometrie zwischen Tau und Tubulindimeren wurden Werte von 1:2,2 über 1:3,8 bis 1:5 berichtet (Kar *et al.* (2003), Al-Bassam *et al.* (2002), Gustke *et al.* (1994), Hong *et al.* (1998), Ackmann *et al.* (2000), Sillen *et al.* (2007)).

Tau bewirkt zudem eine deutliche Zunahme der Mikrotubuli-StEIFheit. Dabei haben wiederum die flankierenden Bereiche einen deutlichen Effekt, der über den der Mikrotubulibindungsgebiete hinaus geht (Felgner *et al.* (1997)).

Daneben bestimmt Tau durch die Projektionsdomäne den Abstand zwischen einzelnen Mikrotubuli in Axonen, der für Tau bei 15 - 30 nm liegt (Chen *et al.* (1992)). Je länger die Projektionsdomäne, desto stärker ist ein Bündeln von Mikrotubuli ausgeprägt (Kanai *et al.* (1992)). Für die Projektionsdomäne wird außerdem vermutet, dass sie eine Verbindung zwischen Mikrotubuli und Membranstrukturen ermöglicht (Brandt *et al.* (1995)).

Die Bindung von Tau an die Mikrotubuli ist zudem von der Phosphorylierung von Tau abhängig. Die längste Tau-Isoform enthält 79 potentielle Serin- und Threonin-Phosphatazeptorstellen, die gehäuft um die Mikrotubulibindungsgebiete vorliegen. Für etwa 30 ist eine Phosphorylierung *in vivo* nachgewiesen worden (Review Billingsley und Kincaid (1997), Review Buee *et al.* (2000)). Die Phosphorylierung von Tau führt zu einer verminderten Bindungsaffinität für Mikrotubuli und wird durch verschiedene Kinasen *in vivo* gesteuert (Drewes *et al.* (1998)). Die Phosphorylierung eines KXGS-Motivs in einem Mikrotubulibindungsgebiet durch die MARK/Par1-Kinase bewirkte sogar eine komplette Dissoziation von Tau von Mikrotubuli (Mandelkow *et al.* (2004)).

Diese Funktionen von Tau zeigen sich nicht nur in neuronalen Zellen, auch in nicht-neuronalen Zellen führt die Expression von Tau zur Ausbildung von Neuriten-ähnlichen Ausstülpungen mit parallel verlaufenden Mikrotubuli-Bündeln (Baas *et al.* (1991), Knops *et al.* (1991)).

Tau zeigt innerhalb von Nervenzellen eine heterogene Verteilung. Die hauptsächliche Lokalisation ist im Axon, es kommt jedoch auch in Dendriten und eine spezielle Form sogar im Zellkern vor (Wang *et al.* (1993)). Für die Verteilung von Tau auf den Mikrotubuli werden unterschiedliche Beobachtungen beschrieben. Sowohl eine gleichmäßige Verteilung von Tau über das gesamte Axon (Murphy und Borisky (1975), Sloboda und Rosenbaum (1979)) als auch eine Zunahme der Tau-Dichte von proximal zu distal konnten gezeigt werden (Black *et al.* (1996)). Für die Bindung von Tau an Mikrotubuli wurde ferner berichtet, dass sie nicht kooperativ ist (Biernat *et al.* (1992)).

Die Lokalisation der Tau-Bindungsstelle auf Mikrotubuli wird kontrovers diskutiert. Es gibt sowohl Hinweise für eine Bindung auf der äußeren Oberfläche der Mikrotubuli, vermutlich an

oder in der Nähe des Tubulin C-Terminus (Al-Bassam *et al.* (2002), Santarella *et al.* (2004)), als auch für eine Bindung auf der inneren Oberfläche. Hier soll Tau an eine Bindungsstelle binden, die nahe der ebenfalls innen liegenden Taxol-Bindungsstelle liegt (Kar *et al.* (2003), Amos und Löwe (1999)).

1.2.3 Tauopathien

Viele neuronale Erkrankungen zeichnen sich durch eine Erhöhung und Mislokalisierung von Tau-Protein aus. Bei dieser, als Tauopathien bezeichnete Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, wird die Ursache für das Absterben von Neuronen und das Fortschreiten der Krankheit in einer pathologischen Tau-Funktion und der Bildung von filamentösen Tau-Ablagerungen vermutet. Es ist eine Vielzahl an Krankheiten bekannt, die zu den Tauopathien gezählt werden: die bekannteste ist Morbus Alzheimer (Review Lee *et al.* (2001)).

Morbus Alzheimer ist eine altersabhängige Demenz, gekennzeichnet durch den Verlust von kognitiven Funktionen und korrespondierenden Veränderungen im Gehirn. Die Hauptveränderungen sind Aggregate aus extrazellulärem Amyloid-Peptid A β sowie aus intrazellulärem Tau. Tau lagert sich dabei zu paarweisen helikalen Filamenten zusammen. Diese Ablagerungen treten in dystrophierten Neuriten auf. Bei fortgeschrittener Erkrankung, nach dem Absterben von Neuronen, bilden sie zusätzlich auch extrazelluläre „Knäuel“ (Mandelkow und Mandelkow (1998)). Dabei ist Tau nicht nur abnormal aggregiert, sondern auch anderweitig modifiziert (Mandelkow und Mandelkow (1993)). Besonders die übermäßige Phosphorylierung steht im Verdacht Ursache zu sein für die bei Alzheimer beobachtete Unfähigkeit von Tau an Mikrotubuli zu binden und diese zu stabilisieren (Yoshida und Ihara (1993)). Dabei kann eine Korrelation zwischen der pathologischen Tau-Veränderung (der übermäßigen Phosphorylierung mit anschließender Aggregation) und dem Verlust von Synapsen in neuronalen Zellen festgestellt werden (Terry (1996)). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass nicht erst die Phosphorylierung von Tau zur Pathogenität führt, sondern schon die übermäßige Expression von „normalem“ Tau. So zeigen Fliegen mit Tau-Überexpression Defekte im neuronalen Transport, ohne dass Tau-Aggregate sichtbar wären (Wittmann *et al.* (2001)). Es wird daher vermutet, dass es bei Morbus Alzheimer zuerst zu einer Erhöhung der Tau-Konzentration kommt, die zu einem gestörten Transport von Vesikeln und Zellorganellen führt. Anschließend erfolgt als Gegenreaktion der Zelle auf diesen gestörten Transport eine Hyperphosphorylierung von Tau mit der Ausbildung der typischen Alzheimer Kennzeichen (Mandelkow *et al.* (2003), Khatoon *et al.* (1992)).

Es wurde tatsächlich berichtet, dass Tau bei Überexpression in Zellen den Transport von Zellkomponenten (wie Vesikeln, Mitochondrien etc.) verändert. Es kommt zu einer Ansammlung der Organellen nahe dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum und einer

reduzierten Exozytoserate (Ebner *et al.* (1998)). Dies spricht für eine hauptsächlich Beeinflussung des zum Plus-Ende-gerichteten Kinesin-abhängigen und weniger des zum Minus-Ende-gerichteten Dynein-abhängigen Transports. Weitere Veröffentlichungen berichten von einem Einfluss auf Bindung und Dissoziation, nicht aber auf die Geschwindigkeit der Motoren im Mikrotubulus-abhängigen Transport. So nahm der Flux-Quotient n_+/n_- (Quotient aus transportierten Vesikeln in Richtung Plus- bzw. Minus-Ende der Mikrotubuli) bei Anwesenheit von Tau ab, ebenso wie die Lauflänge (Trinczek *et al.* (1999), Stamer *et al.* (2002)). Der Effekt auf die Bindungsrate konnte auch *in vitro* gezeigt werden (Seitz *et al.* (2002)), ebenso die Auswirkung auf die Lauflänge (Vershinin *et al.* (2006)).

1.2.4 Transport von Tau

Tau zeigt physiologisch eine heterogene Verteilung innerhalb von neuronalen Zellen. Es ist hauptsächlich in Axonen bzw. Neuriten lokalisiert. Es ist daher davon auszugehen, dass Tau speziell in die Axone bzw. Neuriten gelenkt und dort transportiert wird. Bislang werden unterschiedliche Möglichkeiten für diesen Transport diskutiert.

Zum einen lieferten zwei sehr ähnliche Versuchsansätze, bei denen die Transportzeiten von radioaktiv-markiertem endogenen Proteinen im Sehnerv von Meerschweinchen bzw. Mäusen über mehrere Tage verfolgt wurden, unterschiedliche Ergebnisse: Tytell *et al.* (1984) berichteten, dass Tau zusammen mit Tubulin langsam entlang des Axons anterograd transportiert wird. Die Transportrate lag bei 0,2 – 1,0 mm/d. Weitere MAPs konnten nicht im Axon detektiert werden. Mercken *et al.* (1995) fand dagegen eine Transportgeschwindigkeit von 0,2 – 0,4 mm/d für Tau. Die Geschwindigkeiten weiterer MAPs wie z.B. MAP1A lagen jedoch mit 0,8 – 1,0 mm/d drei- bis fünfmal höher. Tubulin dagegen zeigte eine geringere Geschwindigkeit von 0,1 – 0,2 mm/d. Tau wird demnach hier nicht zusammen mit Tubulin transportiert. Reversible Bindung und Dissoziation von Tau an die Mikrotubuli werden als Ursache für den netto verlangsamten Transport von Tau gegenüber den anderen MAPs angenommen. Dies bedeutet, dass eine dynamische Interaktion von Tau mit Tubulin vorliegt und dass nur ein gewisser Teil der Tau-Population an Mikrotubuli gebunden ist.

Ferner wurde von einem aktiven Tau-Transport entlang von Mikrotubuli berichtet. Die Anzahl der Mikrotubulibindungsgebiete spielte dagegen keine Rolle. GFP-markiertes 3R-Tau und 4R-Tau wurden netto jeweils mit 1 mm/d in kultivierten Neuronen transportiert (Utton *et al.* (2002)). Tau wurde in Partikel-ähnlichen Strukturen gefunden für die eine Kollokalisierung mit Kinesin-1 beschrieben wurde. Weiterhin konnte eine Interaktion der leichten Ketten von Kinesin-1 mit Tau gezeigt werden (Utton *et al.* (2005)).

Die ermittelten Transportraten entsprechen jenen, die für den langsamen axonalen Transports berichtet wurden. Bei dieser Transportform ist der zu Grunde liegende

Mechanismus noch nicht gänzlich geklärt. Es wird allerdings angenommen, dass sich die langsame Bewegung aus der Summe von zwei unterschiedlichen Phasen ergibt. Eine Phase mit schneller Bewegung, die nur 20% der Gesamtdauer ausmacht, und eine Wartephase, in der keine Bewegung stattfindet. Die schnelle Bewegung zeigt mit 1 $\mu\text{m/s}$ eine Geschwindigkeit, die dem schnellen axonalen Transport, vermittelt durch Motoren, entspricht. Die Bewegung findet asynchron und sowohl retrograd als auch anterograd statt. Im Mittel ergab sich allerdings eine anterograde Bewegungsrichtung (Roy *et al.* (2000), Wang *et al.* (2000), Wang und Brown (2002)).

Ein anderer Mechanismus des Tau-Transports wurde für P19-Zellen berichtet. Hier wird nicht erst das Tau-Protein sondern schon dessen mRNA entlang des Axons transportiert. Dabei liegt die mRNA in einem Komplex mit dem Protein HuD sowie Kinesin KIF3A vor. KIF3A, ein Kinesin-2, wurde als Heterodimer zusammen mit KIF3B beschrieben. Für KIF3A/KIF3B wurde berichtet, dass es den anterograden Transport von membranumhüllten Organellen bewirkt (Yamazaki *et al.* (1995)). Die Translation der transportierten Tau-mRNA soll erst lokal im Axon stattfinden, so dass sich das Tau Protein direkt gleichmäßig im Axon verteilen kann (Aronov *et al.* (2002)).

Kommt der axonale Transport, z.B. durch Tau-Überexpression, zum Erliegen, sollte auch der Tau-Transport durch Motoren nicht mehr stattfinden können. Trotzdem kann Tau gleichmäßig im Axon verteilt sein, selbst wenn der Transport von Mitochondrien und Vesikeln bereits gestört ist (Stamer *et al.* (2002), Utton *et al.* (2002), Mandelkow *et al.* (2004)). Auch bleiben die Mikrotubuli noch lange nachdem sich Mitochondrien, Peroxisomen und Vesikel im Zellkörper angesammelt haben, stabil. Tau ist also noch an die Mikrotubuli gebunden, und es wird spekuliert, dass der Transport bzw. die Verteilung von Tau nicht ausschließlich durch Motoren stattfinden kann (Mandelkow *et al.* (2003)).

1.3 Zielsetzung

Tau führt bei erhöhter intrazellulärer Konzentration zu einer Störung des Kinesin-abhängigen Transports von Vesikeln und Zellorganellen entlang von axonalen Mikrotubuli in neuronalen Zellen. Für Tau selbst wird der Transport durch den langsamen axonalen Transport angenommen. Für den langsamen axonalen Transport wurde gezeigt, dass er sich aus Phasen mit schnellem, vermutlich Motorprotein-abhängigen Transport und dazwischen liegenden ausgedehnten Pausen zusammensetzt. Dementsprechend wurde über Tau ebenso berichtet, dass der Transport aktiv entlang von Mikrotubuli stattfindet. Es wird eine Abhängigkeit von Kinesin-1 oder Kinesin-2 (KIF3A) vermutet. Demgegenüber stehen Berichte über den Transport von Tau durch Bindung an aktiv transportiertes Tubulin.

Wenn Tau Kinesin-vermittelt entlang der Axone transportiert wird, sollte eine Tau-induzierte Störung des Kinesin-abhängigen Transports auch zu einem verminderten Tau-Transport führen. Dies wiederum würde zu einer Aufhebung der Tau-induzierten Störung führen, da Tau dann nicht mehr im Axon lokalisiert wäre. Dies konnte jedoch nicht gezeigt werden. Im Gegenteil: Trotz einer Störung des axonalen Transports ist Tau gleichmäßig im Axon verteilt. Zumindest der alleinige Transport von Tau durch Kinesin scheint dadurch fraglich. Tau zeigt zudem eine hohe Dynamik in der Interaktion mit Mikrotubuli. Dies spricht im Grunde gegen einen Transport mittels Bindung an aktiv transportiertes Tubulin, da Tau wiederholt von Tubulin dissoziieren würde. Tau würde im besten Falle langsamer transportiert als Tubulin. Zusätzlich widerspricht die dynamische Interaktion dem Bild von Tau als einer Blockade für Kinesin bei dessen Bewegung entlang der Mikrotubuli.

Diese Gegensätze in den bisher veröffentlichten Daten zeigen, dass sowohl der Tau-Transport, besonders unter pathologischen Bedingungen, als auch die Interaktion von Tau, Mikrotubuli und Kinesin bislang noch nicht gänzlich verstanden sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass drei prinzipielle Möglichkeiten des Transports bzw. der Verteilung von Tau zur Wahl stehen: 1) Der Transport von Tau erfolgt aktiv. Entweder über die direkte Bindung an Motoren, vorrangig Kinesin, oder über die Bindung an aktiv transportiertes Tubulin, quasi ein Kotransport. 2) Der Transport bzw. die Verteilung von Tau erfolgt nicht aktiv, sondern durch Diffusion. Dabei ist zum einen einfache freie Diffusion im Axonplasma unterbrochen durch kurzzeitige Bindung an die Mikrotubuli vorstellbar. Zum anderen wurde für Kinesin-13 (MCAK) durch Helenius *et al.* (2006) eine direkte Diffusion auf der Mikrotubulus-Oberfläche entlang des Mikrotubulus-Gitters beschrieben. Sollte Tau ähnlich Eigenschaften wie MCAK haben, ist auch ein solcher alternativer Mechanismus für die Verteilung von Tau im Bereich des Möglichen. Bei einer ausreichenden Zeitspanne ist eine Verteilung von Tau im gesamten Axon auch durch die Diffusion denkbar. 3) Eine Kombination aus 1) und 2), also von aktivem Transport und nicht-aktiver Verteilung.

Um den Transport von Tau näher zu untersuchen, sollte daher in der hier vorliegenden Arbeit die Interaktion zwischen Tau und Mikrotubuli erstmals auf Einzelmolekülebene charakterisiert werden. So sollte eine Aussage darüber möglich werden, ob Tau entweder fest an Mikrotubuli bindet und ein Kotransport mit aktiv transportiertem Tubulin denkbar ist, oder ob die Tau-Mikrotubuli-Interaktion so dynamisch ist, dass eher eine Verteilung über Diffusion mit schnellem Wechsel von Assoziation und Dissoziation am Mikrotubuli in Frage kommt. Ferner sollte untersucht werden, ob die angenommene Beeinflussung vom Kinesin-abhängigen axonalen Transport durch Tau tatsächlich auf einer Blockade von Kinesin beruht, oder ob dies auf Grund der vermuteten dynamischen Tau-Mikrotubuli-Interaktion nicht möglich ist und der Mechanismus ein anderer sein muss.

Es wurde die längste humane Tau-Isoform, genannt hTau40, für die Untersuchungen ausgewählt, da beide Tau-Domänen, die Projektionsdomäne und die Mikrotubulibindungsdomäne in der längsten Variante vorkommen und so alle möglichen Bindungs- oder Interaktionsbereiche vorhanden sind. Außerdem finden sich Isoformen mit vier Mikrotubulibindungsbereichen (4R-Tau) am häufigsten in pathologischen paarweisen helikalen Filamenten. 4R-Tau scheint daher eine höhere pathologische Relevanz zu haben als Isoformen mit nur drei Mikrotubulibindungsbereichen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

AEBSF	AppliChem
Agar	AppliChem
Ampicillin	Sigma
Aprotinin	Sigma
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma
Benzamidin	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Bradford-Reagenz (Protein-Reagenz)	BioRad
Dichlordimethylsilanlösung	Fluka
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
EGTA (Ethylenglycoltetraacetat)	Sigma
Ethanol, 99,9%	Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol, 100%	Sigma
GTP (Guanosintriphosphat)	Sigma, AppliChem
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure)	Sigma
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	AppliChem
Kaliumchlorid, KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Sigma
Kaliumglutamat	Sigma
Kaliumhydroxid, KOH	Merck
LB Medium	Sigma
Leupeptin	Sigma
Magnesiumchlorid, MgCl_2 , 1M	Sigma
Magnesiumsulfat, MgSO_4	Sigma
Natriumchlorid, NaCl	Merck
Natriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4	Merck
PIPES (Piperazin-N,N'- bis(2-ethansulfonsäure))	Roth

Pepstatin	Sigma
Pluronic F-127	Sigma
4x Roti-Load	Roth
Salpetersäure, HNO ₃ , 10M	Merck
Soybean Trypsin Inhibitor	Sigma
TAME (<i>p</i> -Toluen-sulphonyl-DL-argininmethylester)	Sigma
Taxol	Sigma
TCEP (Tris[2-carboxyethyl] phosphin)	Molecular Probes (jetzt Invitrogen)
Tetrazyklin	Sigma
TPCK (Tosylphenylalanylchloromethylketon)	Sigma
Trichloethylen	AppliChem
Wasser, HPLC-gereinigt	Baker

2.1.2 Proteine

2.1.2.1 Restriktionsenzyme

Es werden ausschließlich Restriktionsenzyme der Firma Fermentas mit den dazugehörigen Puffern verwendet.

2.1.2.2 Weitere Proteine

BSA, A6003	Sigma
DNase I	Promega
Glukoseoxidase aus <i>Aspergillus niger</i> Typ II-S	Sigma
hTau40	humanes Tau, 441 Aminosäuren, zur Verfügung gestellt von E. Mandelkow, Hamburg, 13,9 mg/ml, MW 46.400 Da, vgl. Gustke et al. (1994), Präparation von Dr. J. Biernat
Katalase aus Rinderleber	Sigma
Lysozym	Sigma
Proteinase (Subtilisin), P8038	Sigma

2.1.3 Vektoren

pET21a-rK555-GFP

zur Verfügung gestellt von E. Mandelkow, Hamburg, vgl. Seitz et al. (2002)

2.1.4 Farbstoffe

Cy5 NHS Ester, PA 15101

GE Healthcare (früher Amersham)

5'Tetramethylrhodamin-maleimid (5'-TMR),
T6027

Invitrogen (früher Molecular Probes)

Rhodamin-succinimidylester, C1171

Invitrogen (früher Molecular Probes)

2.1.5 Antikörper

Tub2.1 monoklonal Maus anti β -Tubulin

NOVUS Biologicals NB 120-11308

2.1.6 Puffer und Lösungen

Extraktionspuffer A

20 mM K-PIPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM AEBSF, 1 mM Benzamidin, pH 6,9 (KOH)

Extraktionspuffer B

20 mM K-PIPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM AEBSF, 1 mM Benzamidin, pH 7,5 (KOH)

Glycerol-PB

80 mM K-PIPES, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1mM GTP, 33% (v/v) Glycerol, pH 6,8 (bei 37 °C)

HEPES

0,1 M Na-HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1mM EGTA, pH 8,6

High pH-cushion

HEPES-Puffer mit 60% (v/v) Glycerol, pH 8,6 (bei 37 °C)

Inhibitorengemisch A	50 mg/ml Leupeptin, 10 mg/ml Soybean Trypsin Inhibitor, 25 mg/ml AEBSF in ddH ₂ O
Inhibitorengemisch B	1 mg/ml Pepstatin, 1 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml TAME, 1 mg/ml TPCK, in DMSO
Injection Puffer (IB), 10x	500 mM K-Glutamat, 5 mM MgCl ₂ , pH 7,0
Low pH-cushion	BRB80 mit 60% (v/v) Glycerol, pH 6,8 (bei 37 °C)
Labelling-Puffer	HEPES-Puffer mit 40% (v/v) Glycerol, pH 8,6
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,14 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,76 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 (0 °C)
BRB12	12 mM K-PIPES, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, pH 6,8 (KOH)
BRB80	80 mM K-PIPES, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, pH 6,8 (KOH)
1 M PIPES-Puffer	1 M PIPES, 1 mM MgSO ₄ , 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1% β-Mercaptoethanol, pH 6,9 (KOH, 0 °C)
PIPES-Puffer	100 mM PIPES, 1 mM MgSO ₄ , 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1% β-Mercaptoethanol, 2,5 µg/ml AEBSF, pH 6,9 (KOH, 0 °C)

PIPES-Puffer 4 M Glycerol	100 mM PIPES, 1 mM MgSO ₄ , 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1% β-Mercaptoethanol, 4 M Glycerol, 0,1% Inhibitorengemisch A, 0,1% Inhibitorengemisch B, pH 6,9 (KOH, 0 °C)
PIPES-Puffer 8 M Glycerol	PIPES-Puffer, 8 M Glycerol, pH 6,9 (KOH, 0 °C)
TSS-Medium	LB-Medium, 10%PEG, 50mm MgCl ₂ , 5% DMSO, pH 6,6

2.1.7 Bakterien

Escherichia coli XL-1-blue	Stratagene K12-Derivat, recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]
BLR(DE3) Escherichia coli	Novagen BL21 Derivat, F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) Δ(srl-recA)306::Tn10(Tet ²)

2.1.8 verwendete Tierspezies

Schwein	<i>sus scrofa domestica</i>
---------	-----------------------------

2.1.9 Sonstige Produkte

Stickstoff, flüssig	Linde Gas
Dialyseschläuche, 12-14kDa Ausschlussgrenze	Sigma
Mikro-Dialysierkapseln	Roth
ZelluTrans, Flachmembran zur Dialyse 3,5 kDa, 12-14kDa Ausschlussgrenze	Roth
Sephadex G25	Sigma
P11 Phosphozellulose	Whatman, Schleicher & Schuell
Deckgläser 24x24mm, #1	Menzel Gläser

Deckgläser 24x36 mm, #1	Menzel Gläser
TetraSpecBeads, 0,1µm	Invitrogen
ResourceQ-Chromatographiesäule, 1ml	Pharmacia (heute GE Healthcare)

2.1.10 Software

Andor Solis Version 4.13.3	Andor
Origin 7G	OriginLab Corporation
ImageJ 1.43u	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, ImageJ ist Freeware
Office	Microsoft
Argus X1, Version 5.0.13	biostep
TotalLab	BioSystematica

2.1.11 Geräte

Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann
Rotor TLA120.2	
Rotor TLA110	
Ultrazentrifuge LE 80 K	Beckmann
Rotor Ti70	
Rotor Ti50.2	
Biofuge primoR	Heraeus
SDS-PAGE-Kammer	Eigenbau, ähnlich Biometra
Geldokumentation	Biostep
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin
Centrikon T-124	Kontron
Rotor 8.24	
Rotor 6.9	
Chromatographiesystem	Pharmacia (heute GE Healthcare)
Dounce-Homogenisatoren 5, 15, 30 ml	B.Braun
Ultraschall-Gerät (Mikrospitze)	Bandelin
Wärmebad RTE-110	Neslab
Netzgerät, PowerPac 300	BioRad

2.2 Methoden

2.2.1 Tubulin-Extraktion aus Schweinegehirn

Tubulin wurde aus Schweinegehirn gewonnen, da es dort reichlich natürlicherweise vorkommt. Nach der Homogenisierung (A) des Gewebes wurde Tubulin durch drei Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation (B) sowie anschließender Ionenaustauscherchromatographie (C) aufgereinigt.

A) Etwa 600 g frisches Schweinegehirn werden in vorgekühlten Edelstahlschalen von den Meningen und geronnenem Blut gereinigt und mit kaltem PBS gespült. Pro g Schweinegehirn werden 1 ml PIPES Puffer 4 M Glycerol zur Homogenisierung mit einem Handmixer verwendet. Das entstandene Homogenisat wurde zur Klärung zunächst mit 9000 rpm bei 4 °C für 30 Minuten (Kontron-Zentrifuge, Rotor A6.9) und der Überstand anschließend mit 33000 rpm bei 4 °C für 30 Minuten (Beckmann Ultrazentrifuge, Rotor Ti50.2) zentrifugiert.

B) Dem Überstand wurde 0,5 mM GTP bzw. 1,5 mM ATP zugegeben. Das enthaltene Tubulin wurde durch Erwärmung der Lösung auf 35 °C für 45 Minuten polymerisiert und anschließend durch Zentrifugation mit 33000 rpm bei 35 °C für 45 Minuten (Beckmann UZ, Rotor Ti50.2) pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in eisgekühltem PIPES-Puffer resuspendiert (0,25 fachem Volumen des Überstandes nach A)) und mit einem Douncehomogenisator homogenisiert. Die resultierende Lösung wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert, um die Depolymerisation der Mikrotubuli zu ermöglichen und anschließend mit 37000 rpm bei 4 °C für 45 Minuten zentrifugiert (Beckmann UZ, Rotor Ti70), um Tubulinaggregate abzutrennen. Die erhaltene Lösung wurde mit dem gleichen Volumens PIPES Puffer 8 M Glycerol, 50 mg/ml Leupeptin, 10 mg/ml Soybean Trypsin Inhibitor, 25 mg/ml AEBSF, 1 mg/ml Pepstatin, 1 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml TAME und 1 mg/ml TPCK versetzt sowie auf 0,5 mM GTP und 1,5 mM ATP gebracht. Es folgte der zweite Zyklus der Polymerisation durch Inkubation bei 35 °C für 45 Minuten mit nachfolgender Zentrifugation mit 33000 rpm bei 35 °C für 45 Minuten. Die resultierenden Mikrotubuli-Pellets wurden in einem Zehntel des Volumens des Überstandes nach A) resuspendiert, homogenisiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der folgenden Zentrifugation mit 37000 rpm bei 4 °C für 45 Minuten (Beckmann UZ, Rotor Ti70) wurde der entstehende Überstand auf final 500 mM PIPES, 33% Glycerol, 0,5 mM GTP und 1,5 mM ATP gebracht. Der dritte Polymerisationszyklus startete durch erneute Inkubation bei 35 °C für 45 Minuten mit anschließender Zentrifugation mit 33000 rpm bei 35 °C für 45 Minuten. Die Pellets wurden in einem Viertel des vorherigen Volumens resuspendiert (kalter PIPES-Puffer ohne Inhibitoren) homogenisiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (37000 rpm, 4 °C für 45 Minuten, Beckmann UZ, Rotor Ti70).

C) Die entstandene Tubulin-Lösung wurde zur weiteren Reinigung einer Phosphozellulose-Ionenaustauscher-Chromatographie unterzogen. Dazu wurde P11-Säulenmaterial nach Herstellerhinweis aktiviert und als Säule mit 1,5 cm Durchmesser und einer Höhe von etwa 30 cm mit entgastem PIPES-Puffer bei einer Flussrate von 1ml/min gepackt. Die Säule wurde mit BSA blockiert (30mg/ml, 6 ml), anschließend mit je 2,5-fachem Säulenvolumen 1 M KCl, mit einfachem Säulenvolumen PIPES-Puffer, mit 2,5-fachem Säulenvolumen 10 mM Magnesiumsulfat in PIPES-Puffer und abschließend nochmals mit einfachem Säulenvolumen PIPES-Puffer gespült.

Nun erfolgte der Auftrag der Tubulin-Lösung und anschließend die Elution mit PIPES-Puffer bei 0,2 ml/min. Es wurden Fraktionen zu 1 ml gesammelt und die Konzentration mittels Absorption bei 280 nm bestimmt. Vielversprechende Fraktionen wurden vereinigt, 0,1 mM GTP zugesetzt, aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration wurde densitometrisch nach Polyacrylamidgelelektrophorese (vgl. 2.2.5) bestimmt.

2.2.2 Transformation von Bakterien

Zur Herstellung von kompetenten Bakterien wurden Escherichia coli XL1-blue bis zu einer OD_{600nm} von 0,3 bis 0,4 in LB-Medium bei 37 °C herangezogen und anschließend mit 2000g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 20 ml TSS-Medium aufgenommen und auf Eis resuspendiert. Die Bakterien wurden zu 200µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 200 µl Bakteriensuspension XL1-blue (vgl. oben) oder 50 µl Bakteriensuspension BLR(DR3) (Novagen) 10 ng Plasmid-DNA zugesetzt, vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 45 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. Danach folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis und die Zugabe von 800 µl LB-Medium. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurden 100 µl auf vorgewärmten LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Klone wurden zur weiteren Kultivierung und ggf. DNA-Extraktion in LB-Medium überführt.

2.2.3 Bakterienkultur

2.2.3.1 Allgemein

Die Bakterien der Spezies Escherichia coli wurden bei 37 °C mit 200 rpm in (zuvor autoklaviertem) LB Medium kultiviert. Zur Selektion wurden ggf. Ampicillin (75 µg/ml) zugesetzt. Agarose-Plattchen wurden durch Zusatz von 20 g/l Agar in LB-Medium hergestellt.

Zur Lagerung wurden die Bakterien bis zu eine OD_{600nm} von 0,3 bis 0,4 herangezogen, mit 20% Glycerol versetzt und nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3.2 Bakterienkultur zur Proteinexpression

Die Bakterien der Spezies *Escherichia coli* BL21 mit dem Expressionsvektor pET21a-rK555-GFP wurden bei 37°C und 200 rpm in LB Medium kultiviert. Zur Selektion wurden $75\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin zugesetzt.

Zur Expression wurden die Bakterien bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-0,8 herangezogen, die Expression durch Zugabe von $0,1\text{ mM}$ IPTG induziert und die Bakterien für 24 Stunden bei $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde anschließend mit 6000 rpm bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 Minuten zentrifugiert (Kontron-Zentrifuge, Rotor A6.9), die Pellets vereinigt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Proteinextraktion (s.2.2.4) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.4 Proteinextraktion von rK555-GFP aus *Escherichia coli*

Für die Extraktion des Fusionsproteins bestehend aus den ersten 555 Aminosäuren des Kinesin-1 der Ratte mit dem grün fluoreszierenden Protein (rK555-GFP) wird die von Seitz et al. (2002) beschriebene Methode leicht abgewandelt angewendet.

Das eingefrorene Bakterienpellet (s. 2.2.3.2) wurde auf Eis aufgetaut und in Extraktionspuffer A mit zusätzlich $0,2\text{ U/ml}$ DNase I und $0,1\text{ mg/ml}$ Lysozym resuspendiert. Die Zellen wurden durch 6×10 Sekunden Ultraschall (Mikrospitze, 80% Intensität) mit je 10 Sekunden Pause auf Eis aufgeschlossen und Zellrümmer anschließend abzentrifugiert (14000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 Minuten, Kontron, Rotor 8.24). Der Überstand wurde mit 10 ml P-11 Phosphozellulose-Ionenaustauscher Säulenmaterial (nach Herstellerangabe aktiviert und mit Extraktionspuffer A äquilibriert) versetzt und 30 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ drehend inkubiert. Anschließend wurde das P-11 Material als Säule gegossen und mit dreifachen Volumen Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Säulenvolumen Extraktionspuffer A mit zusätzlich $0,3\text{ M}$ NaCl.

Das Eluat wurde anschließend auf eine in Extraktionspuffer B äquilibrierte G25-Sephadex Gelfiltrationssäule geladen. Die Gelfiltrationssäule wurde anschließend mit 1ml/min Puffer B gespült und Fraktionen zu 2,5 ml aufgefangen. Dabei wurde kontinuierlich die Absorption des Eluates bei 280nm gemessen und die proteinenthaltenen und grünlich aussehenden Fraktionen anschließend vereinigt.

Zur weiteren Reinigung wurden die erhaltene Protein-Lösung über eine mit Extraktionspuffer B mit $0,15\text{ M}$ NaCl äquilibrierte Resource-Q Anionenaustauschersäule geladen. Die Elution erfolgte über einen Salzgradienten von $0,15\text{ M} - 1\text{ M}$ NaCl in Extraktionspuffer B (1 ml/min, Gradient innerhalb von 30 Minuten) in Fraktionen zu 0,5 ml. Das Protein eluiert bei etwa $0,4\text{ M}$ NaCl. Die proteinenthaltenen und grünlichen Fraktionen wurden vereinigt.

Um die Konzentration an erhaltenem Protein zu erhöhen wurde abschließend eine Mikrotubuli-Affinitäts-Aufreinigung durchgeführt. Dafür wurden etwa 15mg Tubulin in BRB80, 10µM Taxol, 1mM GTP und 10% Glycerol 30 Minuten bei 37 °C polymerisiert. Anschließend wird weiteres Taxol auf 20 µM Endkonzentration und 2,1 mg AMP-PNP (final 1 mM) sowie die vereinigten kinesinhaltigen Fraktionen zugefügt und weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der folgenden Zentrifugation mit 40000 rpm bei 30 °C für 45 Minuten (Beckmann ZU, Rotor Ti70) wurde der Überstand abgenommen, das entstandene Pellet mit 37 °C warmem BRB80 gewaschen und in 1 ml BRB80, 5 mM ATP, 200 mM KCl und 20 µM Taxol vorsichtig nach und nach (innerhalb von 20 Minuten, dazwischen wird die Kinesin-Lösung im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert) resuspendiert. Die noch enthaltenen Mikrotubuli wurden durch erneute Zentrifugation mit 55.000 rpm bei 30 °C für 45 Minuten (Beckmann Tisch-ZU, Rotor TLA 120.2) abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen, 20% (v/v) Glycerol zugesetzt und die Lösung in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Die Überprüfung der richtigen Größe sowie die Bestimmung der Konzentration des extrahierten Proteins wurde densitometrisch nach SDS-PAGE (s.2.2.5) und Coomassie-Färbung durchgeführt. Eine BSA-Konzentrationsreihe diente dabei als Standard zur Konzentrationsbestimmung.

2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden ausschließlich Gele mit 12,5% Acrylamid im Trenngel (12,5% Acrylamid in 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 8% Glycerol mit 0,3% APS und 0,06% TEMED zur Polymerisation) und 4% Acrylamid im Sammelgel (4% Acrylamid in 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, ebenfalls mit APS und TEMED polymerisiert) verwendet. Durch das dem Trenngel zugesetzten Glycerol ist es möglich, dass das Sammelgel direkt auf das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen wird, ohne dass eine starke Vermischung beider Phasen eintritt.

Die aufzutrennende Proteinlösung wurde 1:4 oder 1:2 mit 4xRoti-Load versetzt, bei 95°C für fünf Minuten erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden bei konstanten 12 mA und nach Eintritt der Proben in das Trenngel bei 18 mA - 20 mA aufgetrennt, der Laufpuffer war 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS.

Das Gel wurde mit 0,1% Coomassie R 350 in 10% Methanol und 10% Essigsäure gefärbt. Zur Entfärbung wurde 10% Methanol mit 10% Essigsäure verwendet. Das Gel wurde mit Argus X1 aufgenommen und die Bandenintensität mit Hilfe des TotalLab densitometrisch ausgewertet.

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit einem 1%igem Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer. Die zu analysierende DNA wurde in 0,1 M EDTA, 0,25% Bromphenolblau, 40% Sucrose aufgenommen und aufgetragen. Zur Auftrennung wurde für eine Stunde eine Spannung von 80V angelegt. Das Gel wurde mit Argus X1 bei UV-Licht aufgenommen und mit TotalLab ausgewertet.

2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

1 ml Bakteriensuspension (vgl. 2.2.3.1) wurde zentrifugiert, das Pellet in 100 µl Wasser mit 2 µg/ml RNase resuspendiert, 100 µl 2x Lysepuffer zugegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl 2 M MgCl₂ (zweiminütige Inkubation bei Raumtemperatur) wird genomische DNA ausgefällt. Diese wurde anschließend mit 13.000 rpm für fünf Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 50 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4,0) versetzt, für fünf Minuten auf Eis inkubiert und zentrifugiert (s.o.). Die Plasmid-DNA befindet sich nun im Überstand und wurde in einem neuen Gefäß mit 600 µl absolutem Ethanol bei -20 °C für eine Stunde gefällt, zentrifugiert, das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach der Trocknung der pelletierten DNA wurde diese in 50 µl Wasser aufgenommen.

Die Konzentration der DNA wird durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt und die DNA bei -20 °C gelagert oder direkt für weitere Arbeiten eingesetzt.

2.2.8 Restriktionsschnitte

Die Restriktionsschnitte erfolgten jeweils in den vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Puffern. Der Verdau erfolgte in 20 µl Reaktionsvolumen mit etwa 200 ng DNA, Temperatur und Enzymmenge wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Die Analyse des Verdau erfolgte über ein ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel unter UV-Licht (vgl. 2.2.6).

2.2.9 Markierung von Tubulin mit Cy5-NHS Ester oder Rhodamin-NHS Ester

Die Markierung von Tubulin mit Cy5-NHS Ester oder Rhodamin-succinimidylester erfolgte im Wesentlichen wie in „Preparation and Characterization of Caged Fluorescein Tubulin“ von Desai and Mitchison in *Methods in Enzymology*, 1998[12] beschrieben.

20 mg Tubulin in BRB80 (vgl. 2.2.1) wurden auf Eis aufgetaut und durch Zusatz von weiterem BRB80, MgCl₂ und GTP-Stammlösung auf 4 mM MgCl₂, 1 mM GTP gebracht. Nach fünf Minuten Inkubation bei 37°C wurde DMSO bis auf eine Endkonzentration von 10% zugegeben und für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die entstandene Mikrotubuli-

Suspension wurde in einem Zentrifugenröhrchen auf 3-5 ml vorgewärmten 100 mM Na-HEPES, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 60% (v/v) Glycerol pH 8,6 (bei 37 °C) geschichtet und mit 37.000 rpm bei 35 °C für 45 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Phasengrenze abnehmen, die Grenze mit 100 mM Na-HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 40% (v/v) Glycerol, pH 8,6 gewaschen und der restliche Überstand anschließend abgenommen. Das Pellet wurde bei 37 °C mit 0,5 ml desselben Puffers (Tubulin-Konzentration 20-50 mg/ml) gut, aber vorsichtig resuspendiert. 1mg Farbstoff wurde in 400 µl wasserfreien DMSO gelöst und in zwei Schritten zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde gemischt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Durch die Zugabe des gleichen Volumens 2xBRB80, 100 mM K-Glutamat, 40% (v/v) Glycerol, pH 6,8 wird die Reaktion gestoppt. Die Lösung wurde danach in einem Zentrifugenröhrchen auf 5 ml vorgewärmten BRB80, 60% (v/v) Glycerol, pH 6,8 (bei 37°C) geschichtet und abermals zentrifugiert (37.000 rpm, 35 °C, 45 Minuten, Beckmann UZ, Rotor Ti70). Der Überstand wurde wie bei der vorangegangenen Zentrifugation in zwei Schritten abgenommen und die Phasengrenze mit BRB80 gewaschen. Das Pellet wurde in etwa 0,5 ml BRB80 (so dass die 10-20 mg/ml Proteinkonzentration entstehen) resuspendiert. Zur Depolymerisation erfolgte eine Inkubation auf Eis für 40 Minuten und anschließend eine Zentrifugation, um Aggregate zu entfernen (53.000 rpm, 4 °C, 20 Minuten, Beckmann Tisch-UZ, Rotor TLA 120.2).

Zur Aufreinigung wurde das erhaltene Cy5-markierte Tubulin im Überstand erneut polymerisiert. Dazu wurde die Tubulin-Lösung auf BRB80, 4 mM MgCl₂, 1 mM GTP und 33% (v/v) Glycerol eingestellt und für 30 Minuten bei 37 °C polymerisiert. Anschließend wurde die Mikrotubuli-Lösung auf 5ml vorgewärmten BRB80, 60% (v/v) Glycerol, pH 6,8 geschichtet und zentrifugiert (37.000 rpm, 35 °C, 45 Minuten, Beckmann UZ, Rotor Ti70). Danach wurde der Überstand wieder in zwei Schritten abgenommen, das Pellet in 150-300 µl BRB80 resuspendiert (so dass die resultierende Tubulinkonzentration bei >10 mg/ml liegt) und für 40 Minuten auf Eis depolymerisiert. Inkompetentes Tubulin wurde durch eine letzte Zentrifugation abgetrennt (53.000 rpm, 4 °C, 15 Minuten, Beckmann Tisch-UZ, Rotor TLA 120.2).

Die erhaltene Cy5-Tubulin-Lösung wurde zur Lagerung bei -80 °C aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Proteinkonzentration (meist 20 mg/ml) und der Markierungsgrad werden durch Absorptionsmessung bei 280 nm und 650 nm bzw. 540 nm bestimmt. Dabei muss bei Markierungen mit Cy5-NHS Ester ein Korrekturfaktor von 5% der Cy5-Absorption bei 650 nm für die Tubulin-Konzentration berücksichtigt werden, da der Farbstoff auch bei 280 nm absorbiert (Produktinformation für Cy5-NHS Ester von Amersham).

$$[\text{Tubulin}] = \frac{(A_{280\text{nm}} - (0,05 \cdot A_{650\text{nm}}))}{(115000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm})}$$

2.2.10 Markierung von hTau40 mit 5'-Tetramethylrhodamin (5'-TMR)-maleimid

Es wurden etwa 35 nmol Tau (100 µl, 350 µM) zur Markierung eingesetzt und erschöpfend gegen BRB80 dialysiert (Porengroße 12 kDa), um noch vorhandenes DTT zu entfernen. Die Tau-Lösung wurde anschließend mit 10mM TCEP versetzt, so dass ein etwa 10 facher molarer Überschuss von TCEP zu Tau entsteht. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten unter Vakuum.

Der Farbstoff 5'TMR wurde in wasserfreiem DMSO als 12,5 mM Lösung aufgenommen. Die Markierung erfolgt mit siebenfachem molarem Überschuss von Farbstoff zu Tau für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Überschüssiger freier Farbstoff wurde durch erschöpfende Dialyse gegen BRB80 mit 1 mM DTT bei 4°C im Dunkeln entfernt. Die Proteinkonzentration von Tau in der erhaltenen Lösung wurde densitometrisch nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung mit BSA als Konzentrationsstandard ermittelt, der Markierungsgrad wird photometrisch über die Absorption bei 541 nm bestimmt.

2.2.11 Tubulin-Polymerisation zu Mikrotubuli für TIRF-Messungen

2.2.11.1 Cy5-Mikrotubuli

300 µg Tubulin (vgl. 2.2.1, 20µl á ~15 mg/ml) wurden mit 60 µg Cy5-Tubulin (vgl. 2.2.9, 3 µl á 20 mg/ml) sowie 40 µl BRB80, 10% (v/v) Glycerol, 4 mM GTP gemischt, für fünf Minuten auf Eis inkubiert und mit 70.000 rpm bei 2 °C für 15 Minuten zentrifugiert (Beckmann Tisch-UZ, Rotor TLA120.2). 60 µl Überstand wurden abgenommen und bei 37 °C für 30 Minuten polymerisiert. Nach Zugabe von 140 µl BRB80, 10 µM Taxol wurde vorsichtig gemischt und die Lösung auf vorgewärmten BRB80 mit 40% Glycerol geschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (50.000 rpm, 35 °C, 15 Minuten, Beckmann Tisch-UZ, Rotor TLA 120.2) wurde der Überstand verworfen, das entstandene Pellet mit 37 °C warmem Wasser gewaschen und in 100 µl BRB80, 10 µM Taxol für zehn Minuten gequollen und anschließend vorsichtig resuspendiert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die erhaltene Mikrotubuli-Suspension 1:4 mit BRB80 verdünnt und mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach 10 Minuten wurde die Absorption bei 595 nm gegen Stopp-Puffer als Leerwert gemessen und die Konzentration über eine BSA-Standardkurve berechnet.

2.2.11.2 Cy5-Mikrotubuli, Subtilisin-verdaut

Zur Herstellung von Subtilisin-verdauten Mikrotubuli wurde zunächst der gleiche Ablauf wie in 2.2.11.1 zur Herstellung unverdauter Mikrotubuli verwendet. Nach der Polymerisation und anschließender Zugabe von BRB80, 10 µM Taxol werden 200 µg/ml Subtilisin zugegeben.

Nach 20 Minuten Inkubation bei 37 °C erfolgte die weitere Aufreinigung und Resuspendierung wie unter 2.2.11.1 beschrieben.

Der Verdau wurde mittels SDS-PAGE (s. 2.2.5) im Vergleich mit unverdauten Mikrotubuli überprüft.

2.2.11.3 unmarkierte Mikrotubuli

Unmarkierte Mikrotubuli wurden wie unter 2.2.11.1 beschrieben hergestellt, jedoch ohne die Verwendung von Cy5-Tubulin.

2.2.12 Experimente am *Totale Interne Reflexions Fluoreszenz (TIRF)*-Mikroskop

2.2.12.1 Funktionsprinzip

Das Funktionsprinzip des hier verwendeten TIRF-Mikroskops beruht auf dem Phänomen der evaneszenten Welle, die bei der Totalreflexion von Licht an einer Oberfläche entstehen kann.

Beim Übergang von einem optischen Medium (Brechungsindex n_1) in ein anderes optisches Medium (Brechungsindex n_2) wird ein auf die Grenzfläche treffender Lichtstrahl gebrochen. Die Stärke der Brechung hängt dabei bei gegebenen Brechungsindizes vom Winkel der auftreffenden Strahlung zum Lot der Grenzfläche ab. Beim Übergang von einem optisch dichten in ein optisch weniger dichtes Medium (wie es bei der TIRF-Mikroskopie der Fall ist) tritt eine Brechung von Lot weg auf (Abb. 2.1 A).

Dies bedeutet, dass bei einem bestimmten Winkel, dem sogenannten kritischen Winkel α_k , die totale Reflexion des auftreffenden Lichtstrahls an der Grenzfläche eintritt (Abb.2.1 B).

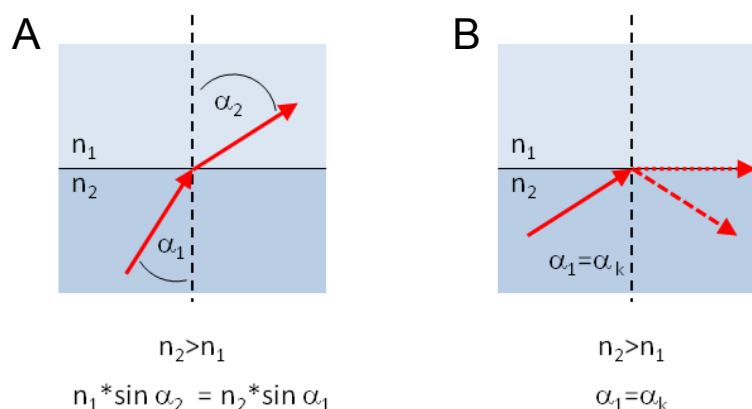


Abbildung 2.1: Brechungsverhalten von Lichtstrahlen

A Beim Übergang von Lichtstrahlen aus einem optisch dichten (n_2) in eine optisch weniger dichtes (n_1) Medium erfolgt eine Brechung vom Lot weg ($\alpha_1 < \alpha_2$). **B** Erreicht der Einfallswinkel den kritischen Winkel ($\alpha_1 = \alpha_k$) erfolgt eine komplette (totale) Reflexion des einfallenden Lichtstrahles. Es entsteht eine evaneszente Welle im optisch weniger dichten hier hellblau dargestellten Medium.

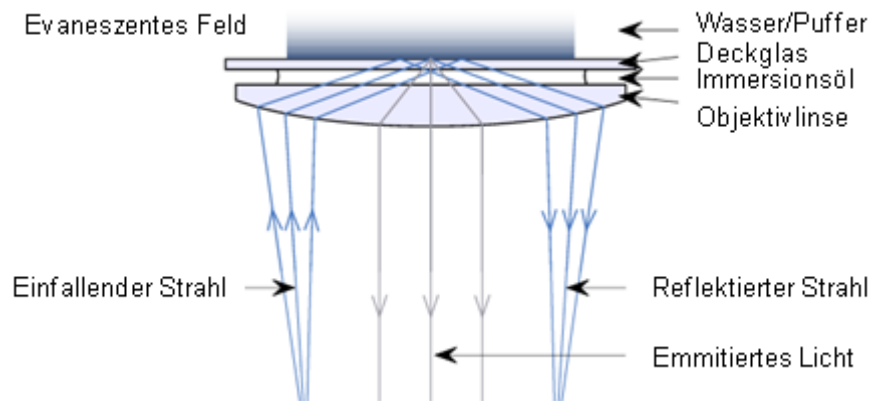


Abbildung 2.2: Lichtstrahlenweg im Objektiv eines TIRF-Mikroskops

Die einfallenden Lichtstrahlen werden seitlich in das Objektiv gelenkt, so dass es zu einer totalen Reflexion an der Grenzfläche des aufliegenden Deckglases und dem darüber befindlichen Wasser in der Messkammer kommt. Dadurch entsteht direkt oberhalb des Deckglases in der Lösung der Messkammer eine evaneszente Welle, die Fluorophore anregen kann. Das von den angeregten Fluorophoren emittierte Licht wird durch der Mitte des Objektivs auf die nachfolgende Kamera gelenkt. Der am Deckglas reflektierte Strahl läuft ebenfalls seitlich im Objektiv entlang. Abgewandelt nach Amrute-Nayak *et al.* (2008).

Aufgrund der Wellennatur des Lichts kommt es dabei zur Ausbildung einer evaneszenten Welle im optisch weniger dichten Medium. Die Feldstärke dieser Welle nimmt exponentiell mit dem Abstand von der Grenzfläche ab (Axelrod *et al.* (2001)).

Für eine beobachtete Probe bedeutet dies, dass nur die in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche (Grenzfläche) liegenden Fluorophore durch die evaneszente Welle angeregt und somit beobachtet werden können. Dadurch können auch sehr geringe Mengen und sogar einzelne Fluorophore dargestellt werden, da störende Fluoreszenz von Fluorophoren im Hintergrund im Vergleich zur Epifluoreszenz massiv reduziert ist.

Beim hier verwendeten Mikroskop tritt die Totalreflexion beim Übergang vom gläsernen Objektträger der Messkammer (Abb. 2.2) zum Wasser bzw. Puffer in der Messkammer auf.

2.2.12.2 Aufbau des TIRF-Mikroskops

Eine schematische Zeichnung des verwendeten TIRF-Mikroskops ist in Abbildung 2.3 gezeigt. Es wird im Prinzip der Aufbau wie in Amrute-Nayak *et al.* (2008), leicht angepasst, verwendet. Die Strahlen von drei Lasern verschiedener Wellenlänge (633 nm, 25 mW, HeNe, 05-LHP-928, Melles Griot mit PM Single Mode Fiber, Schäfer und Kirchhof; 532 nm, 50 mW Nd:YAG DPSS mit PM Single Mode Fiber, Schäfer und Kirchhof; 473 nm, 100 mW, DPSS Laser, MBL 473, HB-Laser mit HC Laser Clean-up Filter, Max Diode 473/10, Semrock) wurden mittels eines Strahlverteilungswürfels (*beam splitting cube*, BS) überlagert und in zwei senkrecht zueinander verlaufende Strahlen zerteilt. Zwei akusto-optische Modulatoren (AOM und AOM', polychromatische akustisch-optische Modulatoren, Model: N48062-2.5-.55; RF-Driver Module, Model no. N64040-75-1-4CH-5-M, NEOS Technologies)

erlauben die individuelle Kontrolle der Intensitäten für jede der drei Wellenlängen in beiden Strahlen. Die linear polarisierten Strahlen werden durch eine achromatische Doppellinse (L3 und L3') auf die hintere Brennebene des Objektivs (Plan Apo 60x, NA 1,45, Öl; Olympus) fokussiert. Jeder Strahl wird durch die Spiegel M und M' so parallel zur optischen Achse verschoben, dass der polarisierte die Objektivlinse verlassende Strahl relativ zur optischen Achse gedreht ist.

Wird der Verkippungswinkel größer als der kritische Winkel kommt es zur Totalreflektion an der Grenze zwischen Deckglas und Wasser bzw. Puffer (vgl. Abbildung 2.2). Sowohl der einfallende als auch der reflektierte Strahl werden über Prismen (P ein / P' ein und P ref/ P' ref) in bzw. aus dem Objektiv gelenkt.

Irisblenden (IB und IB') werden benutzt, um den Durchmesser der angeleuchteten Fläche in der Objektivenebene zu kontrollieren. Es werden zwei senkrecht zueinander stehende Strahlen, (jeder in der Deckglass / Wasser-Ebene (an der die Totalreflektion stattfindet) polarisiert), verwendet, um eine gleichmäßige Anregung aller Fluorophore zu gewährleisten, unabhängig von der Orientierung ihrer Absorptions-Dipole.

Sperrfilter (*Notch filter*, NF in Abbildung 2.3, für 633 nm NF01-633-U, für 532 nm NF01-532U, für 473 nm RS 473CP (Razor-Edge Sperrfilter), alle von Semrock) werden verwendet, um etwaiges Streulicht der anregenden Laserstrahlen abzublocken. Ein dichroitischer Spiegel (M_D , 550DCXR, Chroma) nach der Tubuslinse (TL) wird verwendet, um die Emission von GFP bei 509 nm abzuzweigen. So entstehen zwei Strahlen, die auf unterschiedlichen Bereichen des Chips der CCD Kamera (Andor iXon DV887DCS-BV

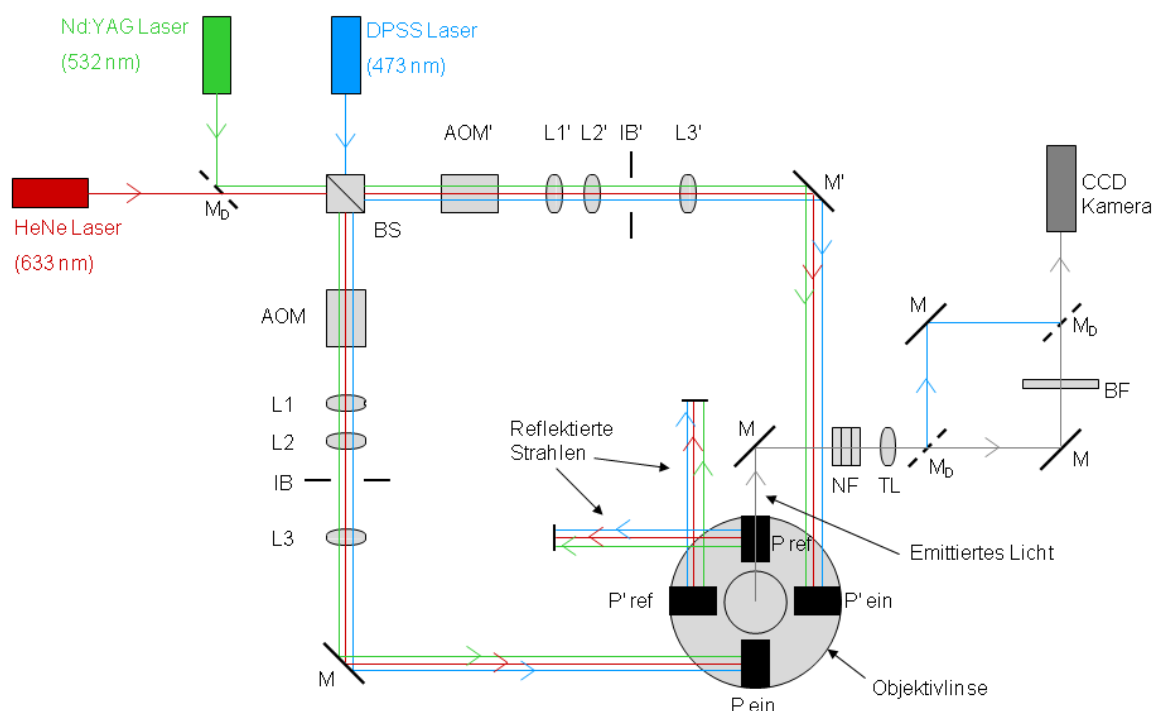


Abbildung 2.3: Schematische Zeichnung des hier verwendeten TIRF-Mikroskops

Abgewandelt nach Amrute-Nayak *et al.* (2008)

backilluminated CCD) abgebildet werden. Die Emmission von Cy5 bei 670 nm und TMR bei 573 nm kann außerdem durch verschiedenen Bandpassfilter (BF, Filterrad mit FF01-697/75 und FF01-582/75, Simrock) ausgewählt werden. Die gleichzeitige Aufnahme von Cy5- und GFP- bzw. TMR- und GFP-Emmission ist so möglich.

Die Fokussierung des Präparats erfolgt über einen z-Positionierer (P-723 PIFOC Microscope Objective NanaPositioner, maximale Hubhöhe 360 μm , Controller E-662, Physik Instrumente), die x/y-Feinpositionierung über einen Piezotisch (P-730.20 PZT, Maximum 50 μm , Controller E-500.00, Physik Instrumente).

2.2.12.3 Durchführung der Experimente

Die hier verwendeten Messkammern wurden für jede Messung neu aus einem 24x36 mm großem und einem 24x24 mm großem Deckglass mit doppelseitigem Klebeband konstruiert. Es entstand eine Messkammer mit einem Volumen von etwa 5 - 8 μl (Abb. 2.4).

Um die Beobachtung von einzelnen Fluorophoren bzw. einzelnen Proteinen, die mit Fluorophoren oder fluoreszierenden Proteinen markiert sind, möglich zu machen, müssen speziell gereinigte Deckgläser zum Bau einer Messkammer verwendet werden. Dazu wurden diese für je 15 Minuten mit 10 M Salpetersäure, 0,1 M KOH, absolutem Ethanol sowie HPLC-Wasser im Ultraschallbad sonifiziert. Zwischen den einzelnen Schritten (bis auf den letzten) erfolgte jeweils ein Spülschritt mit doppelt destilliertem Wasser. Die Gläser wurden anschließend bei 85 °C mindestens fünf Stunden im Wärmeschrank getrocknet. Die

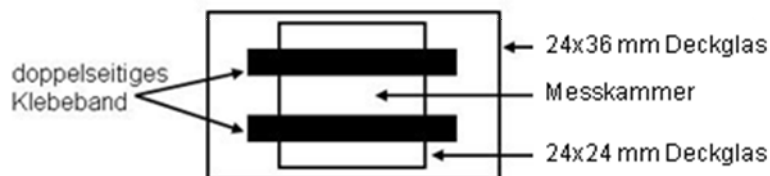


Abbildung 2.4: Schematische Zeichnung der verwendeten Messkammern aus zwei Deckgläsern

größeren Deckgläser (24x36 mm) wurden anschließend noch durch eine Behandlung mit Dichlordimethylsilan funktionalisiert. Dazu wurden die Gläser für eine Stunde in einer 0,05%igen Dichlordimethylsilanlösung in Trichloethylen inkubiert, danach viermal mit Methanol und einmal mit HPLC-Wasser für jeweils zwei Minuten sonifiziert. Abschließend wurde noch zweimal mit HPLC-Wasser gespült und die Gläser für mindestens fünf Stunden bei 50 °C getrocknet.

Experimente für Tau-Diffusion auf Mikrotubuli und Kinesin-Motilität

Bei allen Experimenten wurden Mikrotubuli (vgl. 2.2.11) mittels eines anti-Tubulin-Antikörpers an das silanisierte Glas gebunden. Dazu wurden die entsprechende Menge

Mikrotubuli oder ein Gemisch aus Mikrotubuli und hTau40 in folgendem Puffer für 20 Minuten bei 35 °C vorinkubiert: BRB12, 10 mg/ml Glukose, 10 µM Taxol. Danach wurde die Lösung in eine mit 0,0067% - 0,1%igen Tub2.1-Antikörper-Lösung und 1%iger Pluronic-Lösung (jeweils in BRB80) vorbehandelte Kammer gespült und für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit dreifachem Kammervolumen BRB12, 10 mg/ml Glucose, 10 mM DTT, 50 U/ml Glucoseoxidase, 7600 U/ml Katalase, 10 µM Taxol und 0,5 mg/ml BSA gespült und nachfolgend gemessen. Dem letzten Spülpuffer wurde noch die entsprechende Menge hTau40 (dieselbe wie in der Vorinkubationslösung) und gegebenenfalls Kinesin und 1 mM ATP zugesetzt. Die Kinesinkonzentration wurde dabei so gewählt, dass ausreichend Signale zu sehen waren (finale Konzentration zwischen 0,45 nM und 0,9 nM).

Pro Messkammer wurden jeweils drei Aufnahmeserien durchgeführt. Zu einer Serie gehörten jeweils eine einzelne Aufnahme der Mikrotubuli und eine anschließende Aufnahme des hTau40 oder hTau40 und Kinesin von 60 Sekunden mit 5 Hz (entspricht 200 ms / Aufnahme) an derselben Stelle. Die Temperatur wurde dabei konstant auf 23 °C gehalten.

Experimente für Tau-Diffusion bei erhöhter Salzkonzentration und auf Subtilisin-verdauten Mikrotubuli

Die Mikrotubuli wurden bei dieser Art Messung zuerst in BRB12, 10 µM Taxol 1:50 - 1:200 verdünnt, in eine mit 0,0067% - 0,1%igen Tub2.1-Antikörper-Lösung und 1%iger Pluronic-Lösung (jeweils in BRB80) vorbehandelte Kammer gespült und für fünf Minuten inkubiert. Bei der Messung mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen wurden nur Cy5-markierte Mikrotubuli verwendet (s. 2.2.11.1). Bei der Messung mit Subtilisin-verdauten Mikrotubuli wurde eine Mischung aus verdauten, Cy5-markierten (s. 2.2.11.2) und unverdauten, nicht-markierten (s. 2.2.11.3) (etwa 1:1) Mikrotubuli verwendet.

Anschließend wurde hTau40-TMR in einer Konzentration von 50 – 200 pM eingespült und wie oben beschrieben gemessen.

2.2.12.4 Datenauswertung

Die mit dem Programm zur Kamerasteuerung "Andor SOLIS" gefertigten Aufnahmen werden zunächst in ein TIF-Format konvertiert (im 16-bit Modus) um die generierten Bilddateien auch für andere Programme zugänglich zu machen.

Kinesin: Geschwindigkeit, Lauflänge, Anbindungsrate

Um die Geschwindigkeit, die Lauflänge und die Anbindungsrate von Kinesin auf Mikrotubuli bzw. an Mikrotubuli bestimmen zu können, werden zunächst die Aufnahme der Mikrotubuli und die des Kinesin in das Programm ImageJ geladen. Beide Aufnahmen werden dann

ausgeschnitten und ggf. gedreht, so dass sich die Koordinaten beider Aufnahmen genau entsprechen. Die dafür benötigten Parameter wurden zuvor durch das Messen einer Kammer mit Tetraspec-Beads (0,1 μm , Invitrogen, Anregung/Emission: 360/430 nm (blau), 505/515 nm (grün), 560/580 nm (orange) und 660/680 nm (dunkelrot)), die bei allen verwendeten Wellenlängen angeregt werden, ermittelt. So ist es möglich, die Position der Mikrotubuli direkt in die Kinesin-Aufnahme zu übertragen. Dies wurde genutzt, um entlang der Mikrotubuliachse einen Kymographen der Kinesinbewegung anzufertigen. Ein Kymograph ermöglicht es, die Bewegung eines Moleküls in einer Serie von Bildern (wie z.B. den hier gemachten Aufnahmen) in einem einzigen Bild darzustellen. Dafür wurden in jedem Einzelbild der Serie entlang der Mikrotubulusachse jeweils die Intensitätswerte ermittelt und für eine neue Abbildung verwendet. Die Intensitätswerte entlang der Achse im ersten Einzelbild (Frame 1) bilden die oberste Zeile der neuen Abbildung. Die Intensitätswerte des zweiten Einzelbildes (Frame 2) bilden die nächste (zweite) Zeile der neuen Abbildung usw. (vgl. Ergebnisteil, Abb. 3.2 C). Zur Erstellung der Kymographen wurde das "MultipleKymograph"-Zusatzprogramm für ImageJ (J. Rietdorf FMI Basel + A. Seitz EMBL Heidelberg) verwendet.

Um die Geschwindigkeit und die Lauflänge jedes einzelnen Kinesin-Laufs zu ermitteln, wurden in dem erstellten Kymograph mit einer segmentierten Linie die Kinesin-Läufe nachvollzogen und die Koordinaten der Linie zur Berechnung der Parameter verwendet („segmented line“ Werkzeug und „ListSelectionCoordinates“ Macro, ImageJ).

Es wurden alle auswertbaren Kinesin-Läufe bei der Ermittlung der Geschwindigkeit verwendet. Bei der Lauflänge wurden nur solche Läufe berücksichtigt, die nicht in ersten oder letzten Einzelbild anfangen bzw. endeten und die nicht am Mikrotubulus-Anfang oder Ende starteten bzw. endeten. So wurde gewährleistet, dass die Lauflänge der Kinesine nicht unterschätzt wird. Für die Anbindungsrate wurden Moleküle, die schon im ersten Einzelbild der Messung vorhanden waren nicht mit einbezogen (vgl. Ergebnissteil Abb. 3.8 C). Für diese kann keine Aussage gemacht werden, in welchem Zeitrahmen sie angebunden hatten.

Tau: Intensitätswerte, Kombination mit Kinesin-Bewegung

Die angefertigten Parallelaufnahmen von Kinesin, hTau40 und Mikrotubuli werden mit dem Programm ImageJ bearbeitet, so dass sich die Koordinaten der einzelnen Aufnahmen anschließend entsprechen (vgl. Beschreibung oben). Um den Verlauf der durch hTau40-TMR generierten Intensität entlang der Mikrotubuliachse zu ermitteln, wurde die Mikrotubulusachse mit einer Linie nachempfunden und die Koordinaten dieser in die hTau40-TMR Aufnahme übertragen. Die Intensität der Pixel entlang dieser Linie wurde als neue Abbildung (Intensität gegen Pixel entlang der Achse) dargestellt („segmented line“

Werkzeug, „PlotProfile“ Funktion, ImageJ). Die so gewonnen Intensitätsdaten können mit den, wie oben beschrieben generierten, Motilitätsdaten von Kinesin kombiniert werden.

Die durch den Laser generierte Anregung ist nicht homogen. Um Daten von Mikrotubuli, die an verschiedenen Stellen im Sichtfeld aufgenommen wurden, miteinander vergleichbar zu machen, muss diese Inhomogenität korrigiert werden. Dazu wurden Messkammern mittels Bindung an den Tubulin-Antikörper komplett mit Rhodamin-markiertem nicht polymerisiertem Tubulin bedeckt, in insgesamt vier Kammern 200 Einzelbilder an verschiedenen Stellen aufgenommen, die Intensität gemittelt und das resultierende Bild über einen Gaußschen Unschärfefilter mit Radius 1 gefiltert („Accurate_Gaussian_Blur“ Zusatzprogramm für „ImageJ“ von Michael Schmid). Dieses Feldkorrekturbild wurde dazu verwendet alle ermittelten Intensitäten von hTau40-TMR anhand der Intensität an der jeweils entsprechenden Stelle im Feldkorrekturbild zu korrigieren. Gleichzeitig wurde auf die maximale Intensität im Feldkorrekturbild sowie die dabei verwendete Laserintensität (in μW) normiert.

Tau: Diffusion

Um die Bewegung der hTau40-TMR Partikel entlang von Mikrotubuli auszuwerten, wurde zuerst der Bereich, in dem Diffusion von hTau40-TMR entlang eines Mikrotubulus zu sehen ist, möglichst klein ausgeschnitten, um Hintergrundbewegungen von der Analyse auszuschließen.

Anschließend wurden in jedem Einzelbild der Aufnahme die Partikel über lokale Maxima in der Intensität ermittelt und ihre genaue Position durch die Anpassung einer 2D-Gausskurve an das Intensitätsprofil der Partikel berechnet. Die Positionen in aufeinanderfolgenden Einzelbildern wurden danach zu Bewegungsbahnen für die einzelnen Partikel verknüpft. Für diese Auswertung wurde das „ParticleTracker“-Zusatzprogramms (Geschrieben von Guy Levy und gepflegt von Janick Cardinale in der MOSAIC Gruppe, ETH Zurich, vgl. Sbalzarini und Koumoutsakos, Journal of Structural Biology, 2005) verwendet.

Das Zusatzprogramm ermöglicht die einzelne Anwahl aller gefundenen Bewegungsbahnen und gibt die Koordinaten für die ausgewählte Bewegungsbahn aus.

Der Diffusionskoeffizient eines Partikels kann aus dem mittleren Verschiebungsquadrat berechnet werden, das sich aus dem Fick'schen Diffusionsgesetz zu

$$\overline{x^2} = 2Dt \quad (1)$$

für eindimensionale Diffusion ergibt (Principles of Physical Biochemistry, van Holde, Johnson, Ho, Prentice-Hall, Inc., 1998, Teil3, Kapitel 14: Thermodynamics of Transport Processes, S. 572).

Das mittlere Verschiebungsquadrat wurde aus den durch ImageJ generierten Daten berechnet und mittels linearer Regression (Origin 7G) für jedes diffundierende Tau-Partikel ein eigener Diffusionskoeffizient ermittelt. Außerdem wurde die Dauer der Diffusion, sowie der maximale End-zu-End-Abstand einer Bewegungsbahn bestimmt.

Berechnung der am Mikrotubulus gebundenen Tau Konzentration aus der Dissoziationskonstante und den eingesetzten Konzentrationen für Tau und Mikrotubuli

Aus den eingesetzten Konzentrationen von Tau und Mikrotubuli wurde die tatsächlich am Mikrotubulus gebundene Tau-Konzentration zu berechnen. Ausgangspunkt war das Massenwirkungsgesetz für die Dissoziation:

$$K_D = \frac{[\tau] * [MT]}{[\tau * MT]} \quad (2)$$

$[\tau]$ ist die noch freie Tau-Konzentration, $[MT]$ die freie Mikrotubuli-Konzentration und $[\tau * MT]$ die Konzentration vom Tau-Mikrotubuli-Komplex. Bekannt ist jedoch nur die Ausgangskonzentration von Tau $[\tau_0]$ und Mikrotubuli $[MT_0]$. Daher müssen die in (2) vorkommenden Konzentrationen mittels Umformung durch bekannte Konzentrationen ausgedrückt werden:

$$[\tau * MT] = [\tau_0] - [\tau] \quad (3)$$

$$[MT] = [MT_0] - [\tau * MT] = [MT_0] - ([\tau_0] - [\tau]) = [MT_0] - [\tau_0] + [\tau] \quad (4)$$

Durch einsetzen von (3) und (4) in (2) ergibt sich:

$$K_D = \frac{[\tau] * ([MT_0] - [\tau_0] + [\tau])}{[\tau_0] - [\tau]} \quad (5)$$

Und durch Umformen und Ausklammern:

$$K_D = \frac{[\tau] * [MT_0] - [\tau] * [\tau_0] + [\tau]^2}{[\tau_0] - [\tau]}$$

$$K_D * ([\tau_0] - [\tau]) = [\tau]^2 + [\tau] * [MT_0] - [\tau] * [\tau_0]$$

$$[\tau_0] * K_D - [\tau] * K_D = [\tau]^2 + [\tau] * [MT_0] - [\tau] * [\tau_0]$$

$$[\tau_0] * K_D = [\tau]^2 + [\tau] * [MT_0] - [\tau] * [\tau_0] - [\tau] * K_D$$

$$[\tau_0] * K_D = [\tau]^2 + [\tau] * ([MT_0] - [\tau_0] - K_D)$$

$$0 = [\tau]^2 + [\tau] * ([MT_0] - [\tau_0] - K_D) - [\tau_0] * K_D \quad (6)$$

In die so entstandene quadratische Gleichung können die bekannten Konzentrationen für Tau und Mikrotubuli eingesetzt und $[\tau]$ ermittelt werden. Für 2,5 nM Tau, 50 nM Mikrotubuli sowie einer K_D von 75 nM (Ackmann et al. (2000)) ergibt sich so:

$$0 = [\tau]^2 + [\tau] * 122,5 \text{ nM} - 187,5 \text{ nM}$$

Die freie Tau-Konzentration $[\tau]$ ergibt sich zu 1,5 nM. Der gebundene Tau-Anteil ist daher $2,5 \text{ nM} - 1,5 \text{ nM} = 1 \text{ nM}$.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der verwendeten Proteine

Um einzelne Moleküle mittels der *Totalen internen Reflexions Fluoreszenz* (TIRF) Mikroskopie beobachten zu können, müssen diese mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert oder an fluoreszierende Proteine gekoppelt vorliegen. Des Weiteren müssen die Vorgänge oder Ereignisse, die beobachtet werden sollen, in räumlicher Nähe zur Oberfläche der Grenzfläche stattfinden (vgl. 2.2.12). In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen des Proteins Tau mit Mikrotubuli und dem Motorprotein Kinesin untersucht. Dazu wurde ein Versuchsaufbau verwendet, bei dem mit Tau bedeckte Mikrotubuli durch die Verwendung eines tubulinspezifischen Antikörpers oberflächennah fixiert wurden.

Tubulin wurde dafür in nativer Form aus Gewebe aufgereinigt. Hierzu wurde Gehirn vom Schwein verwendet, da Tubulin natürlicherweise in Nervengewebe reichlich vorhanden und gut zugänglich ist. Dabei wurde die Eigenschaft von Tubulin ausgenutzt, bei Anwesenheit von GTP bei 35°C spontan zu polymerisieren und bei 4°C zu depolymerisieren. Durch drei solcher Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation wurde Tubulin zum einen aus Gehirngewebe angereichert und zum anderen von mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) gereinigt. Um die Reinheit zu erhöhen, folgte anschließend noch eine Ionenaustauschchromatographie mit nachfolgender Kontrolle durch SDS-PAGE (Abb. 3.1 A).

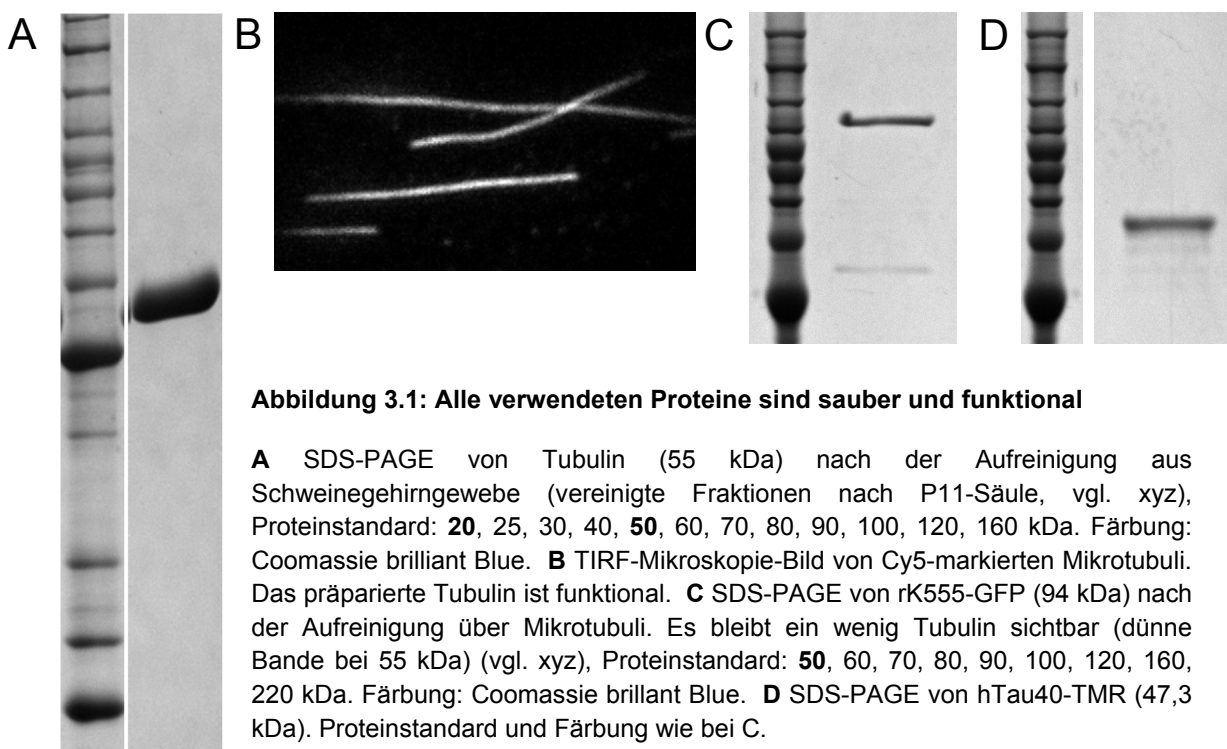


Abbildung 3.1: Alle verwendeten Proteine sind sauber und funktional

A SDS-PAGE von Tubulin (55 kDa) nach der Aufreinigung aus Schweinehirngewebe (vereinigte Fraktionen nach P11-Säule, vgl. xyz), Proteinstandard: 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 kDa. Färbung: Coomassie brilliant Blue. **B** TIRF-Mikroskopie-Bild von Cy5-markierten Mikrotubuli. Das präparierte Tubulin ist funktional. **C** SDS-PAGE von rK555-GFP (94 kDa) nach der Aufreinigung über Mikrotubuli. Es bleibt ein wenig Tubulin sichtbar (dünne Bande bei 55 kDa) (vgl. xyz), Proteinstandard: 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160, 220 kDa. Färbung: Coomassie brilliant Blue. **D** SDS-PAGE von hTau40-TMR (47,3 kDa). Proteinstandard und Färbung wie bei C.

Tubulin wurde in Konzentrationen von etwa 15 mg/ml aufgereinigt. Ein Teil des so gewonnenen Tubulins wurde nachfolgend mit Cy5-NHS Ester für die Beobachtung im TIRF-Mikroskop fluoreszenzmarkiert. Der Markierungsgrad (markiertes Protein / Gesamtprotein) lag bei 70 %, die Tubulin-Konzentration betrug 20 mg/ml. Die Funktionalität des extrahierten und markierten Tubulins wurde durch die Polymerisierung zu Mikrotubuli überprüft (vgl. 2.2.11). Das Verhältnis von unmarkiertem zu Cy5-markiertem Tubulin betrug dabei 5:1. In der TIRF-Mikroskop-Aufnahme zeigten sich viele Mikrotubuli, die gut durch den tubulinspezifischen Antikörper immobilisiert wurden (Abb. 3.1 B).

Zur Beobachtung der Wirkungen von Tau auf Kinesin wurde ein Kinesin-GFP-Fusionsprotein verwendet. Es enthält die ersten 555 Aminosäuren der nativen Kinesinsequenz (aus *rattus norvegicus*) fusioniert mit der GFP-Sequenz. Die DNA-Sequenz des Konstrukts liegt in einem pET21a-Vektor unter Kontrolle eines Lac-Operons vor, der von E. Mandelkow (Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt wurde (Seitz *et al.* (2002)). Der Vektor wurde durch Restriktionsverdau mit *Pst*I, *Nde*I und *Eco*RI auf die Korrektheit der Sequenz überprüft und anschließend wie in 2.2.2 beschrieben in BLR(DE3) *Escherichia coli*-Bakterien eingeschleust. Diese Bakterien sind speziell für die Proteinproduktion ausgelegt. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG induziert und das Protein wie unter 2.2.4 beschrieben extrahiert. Durch den C-terminalen GFP-Teil hat das Protein auch unter normalem Tageslicht eine grünliche Färbung. Diese wurde während der Aufreinigung genutzt, um die proteinhaltigen Fraktion zu identifizieren. Abbildung 3.1 C zeigt eine SDS-PAGE von rK555-GFP nach der Aufreinigung über Mikrotubuli. Es ist deutlich eine Bande bei der erwarteten Größe von 94 kDa erkennbar. Da die im letzten Schritt zur Aufreinigung von funktionellem Kinesin eingesetzten Mikrotubuli nicht komplett wieder entfernt werden können, bleibt eine Tubulin-Bande bei 55 kDa erkennbar. Die Funktionalität des erhaltenen Proteins wurde in einem Einzelmolekülassay überprüft. Es zeigte deutliche Motilität mit einer Geschwindigkeit von 430 nm/s bei 1 mM ATP und 23°C. Seitz *et al.* (2002) hatte für dasselbe Konstrukt vergleichbare Geschwindigkeiten ermittelt (410nm/s).

hTau40 wurde ebenfalls von E. Mandelkow (Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt und mit 5'Tetramethylrhodamin (5'TMR)-maleimid wie unter 2.2.10 beschrieben markiert. Der Markierungsgrad war 200 %, dies entspricht einer vollständigen Markierung der beiden in hTau40 vorkommenden Cysteine (vgl. Abb. 1.2), die Konzentration lag bei 67 µM. Das Protein wurde anschließend durch SDS-PAGE analysiert, um eine Verunreinigung durch andere Proteine, vor allem Motorproteine, auszuschließen (Abb. 3.1 D).

3.2 Verhalten von hTau40 auf Mikrotubuli

3.2.1 Kolokalisation von hTau40 und Mikrotubuli

Zur Beobachtung des Verhaltens von fluoreszenzmarkiertem hTau40-TMR auf Mikrotubuli wurde der oben beschriebene Versuchsaufbau gewählt (vgl. 3.1). 2 - 10000 pM hTau40-TMR wurde mit jeweils 50 nM Mikrotubuli (berechnet auf $\alpha\beta$ -Tubulindimere) gemischt, für 20 Minuten bei 35 °C inkubiert und anschließend in einer vorbereiteten Messkammer im TIRF-Mikroskop vermessen. Als Puffer wurde 12 mM PIPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 6,8 (BRB12) gewählt. Die geringe Ionenstärke (30 mM) verbessert die Interaktion von Tau und Mikrotubuli bei den geringen Konzentrationen, die für die Beobachtung einzelner Moleküle notwendig sind (Seitz *et al.* (2002), Vale *et al.* (1996)).

Um das Verhalten von hTau40-TMR auf Mikrotubuli zu untersuchen, wurde eine niedrige Tau-Konzentration gewählt, um einzelne Moleküle beobachten zu können. Abbildung 3.2 A zeigt Turf-Aufnahmen von 100 pM hTau40-TMR auf 50 nM Mikrotubuli. hTau40-TMR zeigt eine deutliche Kolokalisation, sowie Anreicherung entlang der Mikrotubuli (Abb. 3.2 A, unten). Neben der erwarteten Bindung von hTau40 an Mikrotubuli war in der Aufnahme zusätzlich eine Bewegung der hTau40 Moleküle entlang der Mikrotubuli-Achse zu sehen. Diese wurde bisher für hTau40 nicht beobachtet und daher eingehender untersucht. Die in 3.2 A gezeigten Versuchsbedingungen enthalten für die Untersuchung von einzelnen hTau40 Molekülen zu viele fluoreszenzmarkierte Moleküle. Daher wurde im Folgenden eine Mischung von 5 pM markiertem mit 95 pM unmarkiertem Tau für die Messungen verwendet. Auch bei dieser geringen Konzentration an markiertem hTau40 zeigte sich die zuvor beobachtete Beweglichkeit der Tau-Moleküle entlang von Mikrotubuli. Abbildung 3.2 B zeigt exemplarisch Einzelbilder einer Aufnahme im Abstand von einer Sekunde, auf denen die Bewegung eines hTau40-TMR Moleküls (grün) entlang eines Mikrotubulus (rot) gut erkennbar ist. Um Bewegungen entlang einer Achse deutlich und einfach darzustellen, bietet sich die Verwendung eines Kymographen zur Darstellung an. Bei einem Kymograph wird die Zeit entlang der y-Achse und die Position entlang einer vordefinierten Linie entlang der x-Achse dargestellt. Für die Anfertigung einer solchen Abbildung wurde in jedem Einzelbild einer hTau40-TMR Aufnahme die Pixelreihe entlang der Mikrotubulusachse ausgeschnitten und diese entsprechend ihrer Reihenfolge in der Aufnahme untereinander zu einer neuen Abbildung zusammengefügt (Abb. 3.2 C, vgl. 2.2.12.4). Stationäre Moleküle würden in einem Kymographen als vertikale Linien abgebildet, da sie ihre Position über die Zeit nicht verändern. Bewegt sich ein Molekül, so findet sich diese Bewegung als seitliche Abweichung im Kymographen wieder. Die Geschwindigkeit der Bewegung kann aus der Steigung der entstehenden Linie abgelesen werden. Je flacher der Linienvorlauf, desto schneller war die

Bewegung. Abbildung 3.2 D zeigt den Kymographen der in 3.2 B gezeigten hTau40 Bewegung entlang eines Mikrotubulus. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Bewegung in beide Richtungen stattfindet.

Um auszuschließen, dass die Bewegung durch eine Wechselwirkung der zur Markierung verwendeten Farbstoffe Cy5 und 5'TMR verursacht wird, wurde der gleiche Assay mit hTau40-TMR mit nicht markierten Mikrotubuli durchgeführt. Zur Visualisierung der Mikrotubuli wurde dabei Kinesin verwendet. Abbildung 3.2 E zeigt deutlich, dass es hier zu einer Bewegung von Tau auf Mikrotubuli kommt. Zusätzlich wurde hTau40 mit Alexa-633 fluoreszenzmarkiert, um einen Effekt des 5'TMR Farbstoffes an sich auszuschließen. In Abbildung 3.2 F ist die Bewegung eines so markierten hTau40 auf Rhodamin-Mikrotubuli gezeigt. Zusätzlich wurde überprüft, ob womöglich freier Farbstoff allein für die Beobachtung verantwortlich sein könnte. Dies war aber nicht der Fall (nicht gezeigt). Die Bewegung von

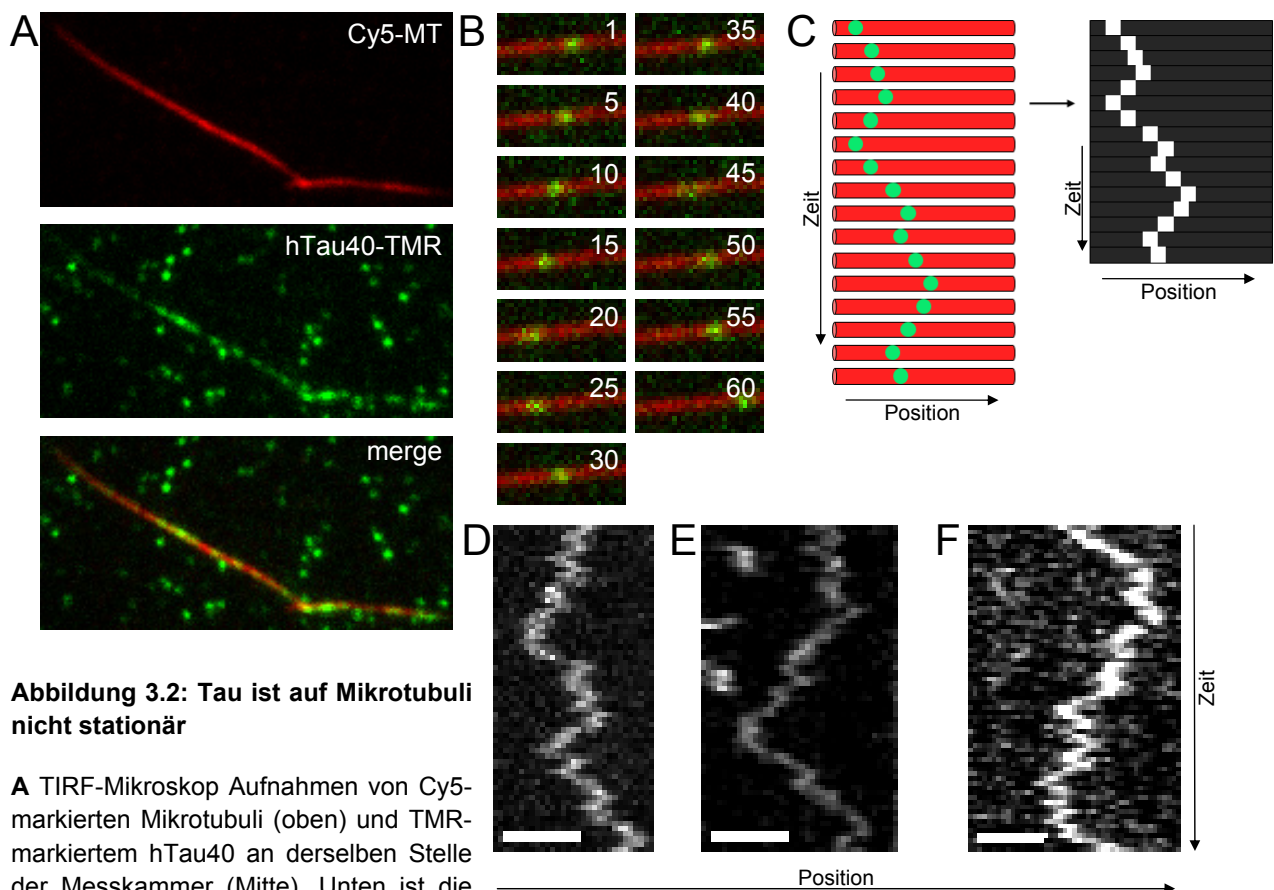


Abbildung 3.2: Tau ist auf Mikrotubuli nicht stationär

A TIRF-Mikroskop Aufnahmen von Cy5-markierten Mikrotubuli (oben) und TMR-markiertem hTau40 an derselben Stelle der Messkammer (Mitte). Unten ist die Überlagerung beider Bilder gezeigt (Tau:Tubulin 100 pM : 50 nM). hTau40-TMR zeigt Kolokalisation mit und Anreicherung an Cy5-markierten Mikrotubuli. **B** Ein hTau40-TMR Molekül (grün) bewegt sich auf einem Mikrotubulus (rot) in Abwesenheit von ATP (Tau:Tubulin 100 pM : 50 nM, 5 pM Tau TMR-markiert). Einzelbilder aus einer Aufnahmesequenz mit 200ms/Bild, die Nummern geben die jeweilige laufende Bildnummer an. **C** Schematische Zeichnung der Erstellung eines Kymographen. **D** Kymograph der in B gezeigten Bewegung von hTau40-TMR entlang eines Cy5-markierten Mikrotubulus. Die Dauer (y-Achse) entspricht 12,6 Sekunden. Der Maßstabsbalken entspricht 2,5 μm . **E** Kymograph der Bewegung eines hTau40-TMR Moleküls entlang eines nicht fluoreszenzmarkierten Mikrotubulus. Maßstabsbalken und Dauer wie D. **F** Kymograph der Bewegung eines hTau40-Alexa 633-Moleküls auf einem Rhodamin-markiertem Mikrotubulus. Maßstabsbalken wie D. Die Dauer entspricht 13,8 Sekunden.

hTau40-TMR ist daher eine Eigenschaft des Proteins und nicht durch die Farbstoffe oder die Wechselwirkung solcher untereinander verursacht.

3.2.2 Charakterisierung der Bewegung von hTau40 entlang der Mikrotubuli-Achse

hTau40 zeigt entlang der Mikrotubulus-Achse eine ungerichtete Bewegung. Dabei handelt es sich vermutlich um eindimensionale Diffusion entlang des Mikrotubuli-Gitters. Diese kann über die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten beschrieben werden. Aus dem 1. und 2. Fick'schen Diffusionsgesetz ergibt sich $\langle x^2 \rangle = 2Dt$. $\langle x^2 \rangle$ ist das mittlere Verschiebungsquadrat (Principles of Physical Biochemistry, van Holde). x ist dabei die zurückgelegte Strecke des beobachteten Moleküls zwischen zwei Zeitpunkten (t und $t+\tau$). t ist jeder Zeitpunkt an dem das Molekül beobachtet wurde, τ entsprach der Aufnahmedauer für ein Einzelbild (0,2 Sekunden) oder einem Vielfachen davon. Das mittlere Verschiebungsquadrat wurde für jedes Molekül als gleitender Mittelwert der Verschiebungsquadrate für jedes t und $t+\tau$ berechnet. Der Diffusionskoeffizient wurde anschließend durch lineare Regression ermittelt (vgl. 2.2.12.4). Abbildung 3.3 B zeigt ein Beispiel der Auswertung. Die halbe Steigung der Graden entspricht dem Diffusionskoeffizienten für das beobachtete Molekül, hier $0,29 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Im Vergleich mit der Auswertung eines Kinesin-Moleküls, (Abb. 3.3 B, blaue Punkte) ist deutlich der Unterschied zwischen dem Kurvenverlauf für Diffusion und linearer Bewegung zu erkennen. Die Diffusion zeigt einen geraden Datenverlauf, die lineare Bewegung dagegen einen parabelartigen.

Abbildung 3.3 C zeigt ein Tau-Molekül bei dem während der Diffusion das Bleichen eines der beiden gebundenen Farbstoffmoleküle beobachtet werden konnte. Die Intensität zeigt eine Abnahme von im Mittel 2125 a.u. auf 1430 a.u. bei einem Hintergrundlevel von 1136 a.u.. Der nicht gleichwertige Beitrag beider Farbstoffmoleküle zur Gesamtintensität kann durch eine unterschiedliche Umgebung der Farbstoffe im Protein oder durch eine unterschiedlich starke Anregung bedingt durch eine unterschiedliche Position der Dipolmomente zu Stande kommen. Für alle diffundierenden Tau-Moleküle bei denen die Intensität überprüft wurde, fanden sich Werte zwischen 2000 und 2500 a.u.. Dies entspricht einem einzelnen Tau-Molekül, das zwei Farbstoffmoleküle trägt.

Es wurden nur Moleküle in die Auswertung einbezogen, die während der gesamten sichtbaren Diffusion ausgewertet werden konnten. Bei Überschneidung mit anderen Molekülen war dies nicht möglich. Neben dem Diffusionskoeffizienten wurde die Dauer der Diffusion und der maximale End-zu-End-Abstand der Bewegungsbahn für jedes Molekül

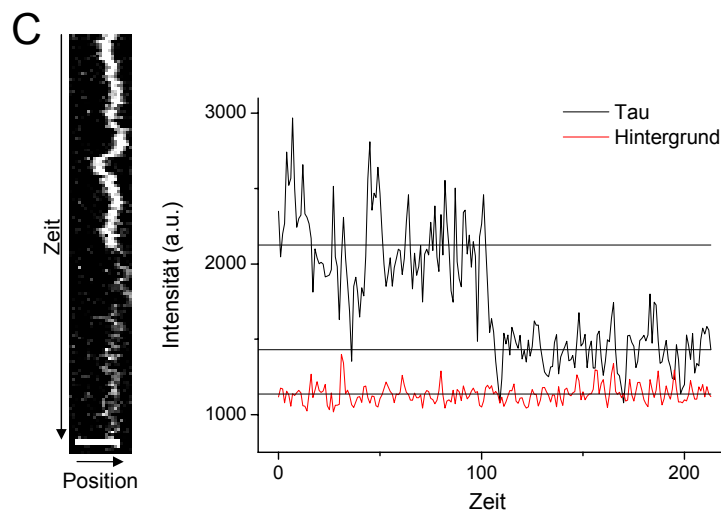
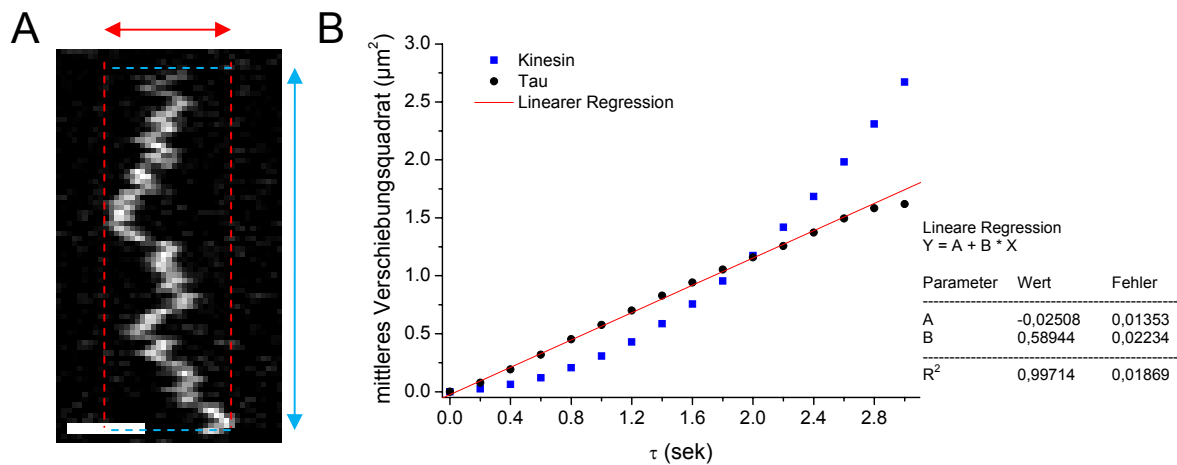


Abbildung 3.3: Tau diffundiert entlang von Mikrotubuli

A Kymograph eines weiteren Beispiels von hTau40-TMR-Diffusion entlang eines Cy5-markierten Mikrotubulus. Der Maßstabsbalken entspricht $2,5 \mu\text{m}$, die Dauer des gezeigten Ausschnitts betrug $15,2$ Sekunden. In rot ist der maximale End-zu-End-Abstand eingezeichnet, in hellblau die Diffusiondauer.

B Vergleich von linearer Bewegung eines Kinesin-Moleküls (blau) mit ungerichteter Bewegung des in A dargestellten Tau-Moleküls (schwarz)

mittels der Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrates gegen das Zeitinkrement τ . Zur Ermittlung des Diffusionskoeffizienten für Tau wird eine lineare Regression der ersten sechs Werte (bis $\tau = 1$ sek) durchgeführt (rote Linie). Die Steigung der Regressionsgeraden entspricht dem zweifachen Diffusionskoeffizienten ($2 \cdot D$). **C** Kymograph der Diffusion eines Tau-Moleküls während ein Farbstoff bleicht. Der Maßstabsbalken entspricht $2,5 \mu\text{m}$, die Dauer des Ausschnitts betrug $28,6$ Sekunden (links). Die Intensität des diffundierenden Moleküls wurde gegen die Zeit im Vergleich zur Hintergrundintensität aufgetragen. Die Mittelwerte der beiden Intensitätslevel bzw. der Hintergrundlevels sind zusätzlich eingezeichnet (rechts). Es ist ersichtlich, dass das Tau-Molekül zwei Farbstoffmoleküle gebunden hatte.

ermittelt. Um einen Einfluss der Temperatur auf die Messwerte auszuschließen, wurde die Temperatur konstant bei 23°C gehalten.

Die Parameter der Tau-Diffusion wurden über einen großen Tau-Konzentrationsbereich ermittelt, um den Bereich unter als auch oberhalb des physiologischen Verhältnisses von Tau und Mikrotubuli abzudecken. Dieses liegt bei $1:17$ (Drubin *et al.* (1985)). Es wurden Messungen mit $2, 5, 10, 20, 100, 250, 500, 750, 1000, 5000$ und 10000 pM hTau40 in Anwesenheit von 50 nM Mikrotubuli durchgeführt. Da eine Auswertung nur bei einzelnen erkennbaren Molekülen möglich ist, wurde ab einer Gesamtkonzentration von 20 pM eine Mischung aus wenig hTau40-TMR (5 oder 10 pM) und unmarkiertem hTau40 eingesetzt.

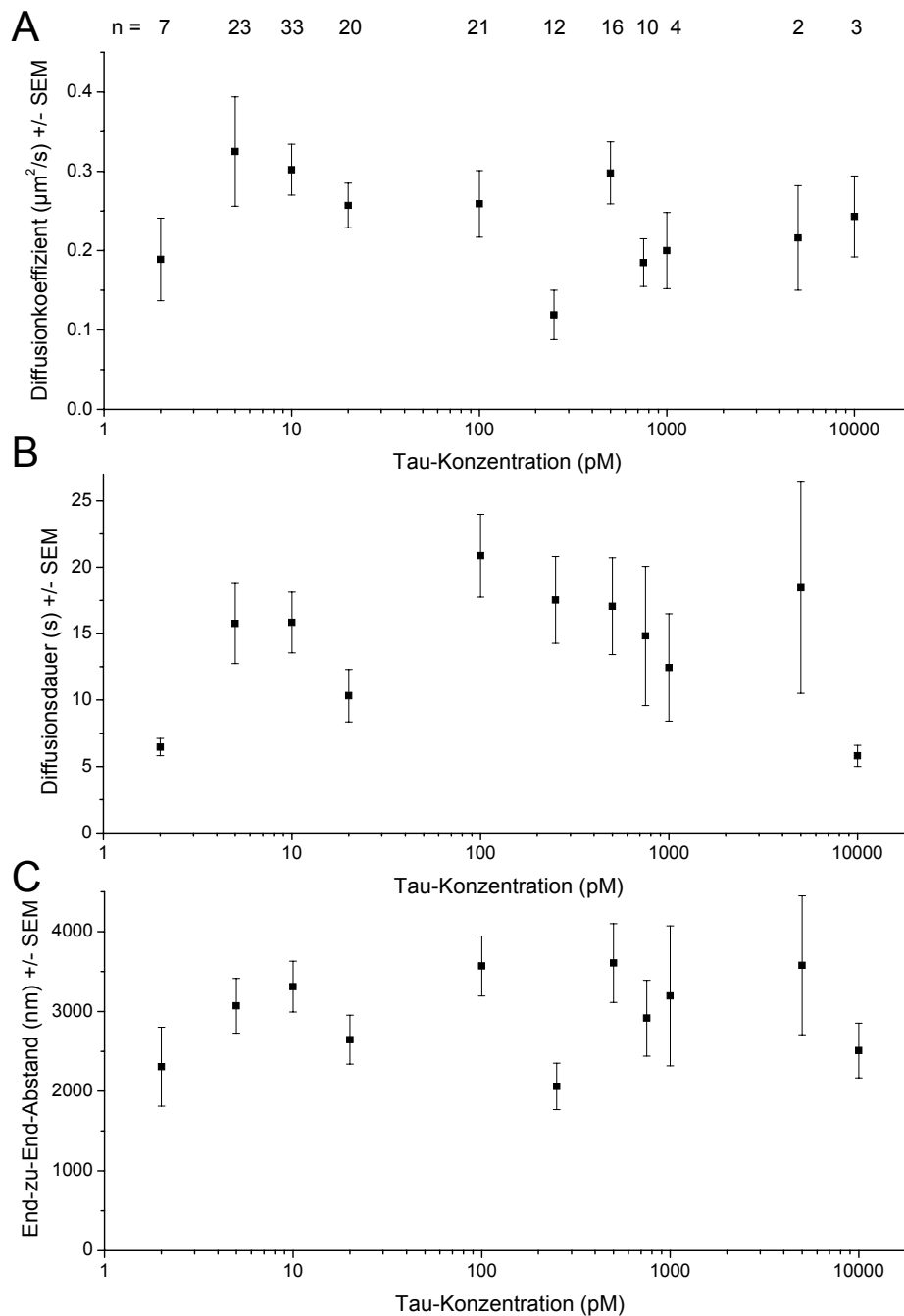


Abbildung 3.4: Kaum konzentrationsabhängige Änderung der Tau-Diffusion

A Mittelwerte der Diffusionskoeffizienten von hTau40-TMR Molekülen bei 2, 5, 10, 20, 100, 250, 500, 750, 1000, 5000 und 10000 pM Tau auf je 50 nM Mikrotubuli. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die Zahlen oberhalb der Werte geben die Anzahl an ausgewerteten Molekülen für A, B und C an.

B Mittelwerte der Diffusionsdauer von hTau40-TMR Molekülen, bei denselben Konzentrationen wie in A. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an. **C** Mittelwerte der maximalen End-zu-Endabstände der Diffusionsbewegungsbahn entlang der Mikrotubulusachse, bei denselben Konzentrationen wie in A. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an.

Abbildung 3.4 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Die sehr geringe Anzahl an ausgewerteten Tau-Molekülen bei 5000 pM und 10000 pM hTau40 resultiert daraus, dass durch die prozentual nur noch geringe Menge an zugegebenem hTau40-TMR, im Vergleich

zur Gesamtkonzentration, nur sehr wenige Tau-Moleküle auf den Mikrotubuli erkennbar sind. Zusätzlich konnten von diesen wenigen (vgl. auch Abb. 3.5) kaum Moleküle für die Auswertung verwendet werden, da sie die Voraussetzungen nicht erfüllten (s.o.).

Es zeigen sich sowohl für den Diffusionskoeffizienten (Abb. 3.4 A) also auch für die Diffusionsdauer (Abb. 3.4 B) und den maximalen End-zu-End Abstand (Abb. 3.4 C) nur geringe Änderungen der ermittelten Werte. Die Bewegung der Tau-Moleküle entlang von Mikrotubuli zeigt hier keine Konzentrationsabhängigkeit und die Diffusion eines hTau40-TMR Molekül scheint nicht durch andere hTau40 Moleküle beeinflusst zu werden. Daher kann ein Gesamtmittelwert über alle gemessenen Konzentrationen berechnet werden, dieser ist $0,259 \pm 0,016 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für den Diffusionskoeffizienten, $15,3 \pm 1,1 \text{ s}$ für die Diffusionsdauer und $3065 \pm 134 \text{ nm}$ für den maximalen End-zu-End-Abstand (jeweils Mittelwert \pm SEM, $n=151$). Um nochmals den Einfluss des verwendeten Farbstoffes auf die Messwerte auszuschließen, wurde auch für das als Kontrolle verwendete hTau40-Alexa633 der Diffusionskoeffizient ermittelt. Dieser ist mit $0,21 \pm 0,034 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Mittelwert \pm SEM, $n=9$) vergleichbar mit dem von htau40-TMR. Ein Einfluss der Farbstoffe kann daher ausgeschlossen werden.

Ebenfalls überprüft wurde, ob sich der Anteil von mobilen bzw. stationären Tau-Molekülen bei steigender Gesamtkonzentration ändert. Abbildung 3.5 zeigt keine signifikante Änderung des Verhältnisses von mobilen zu stationären Tau-Molekülen. (Ausnahme bildet der Wert für

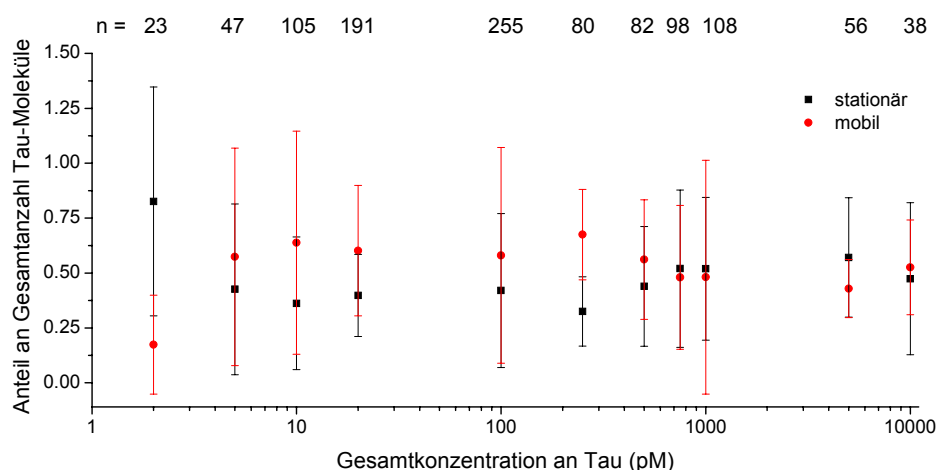


Abbildung 3.5: Der Anteil an stationären Tau-Molekülen ändert sich über einen weiten Konzentrationsbereich kaum

Dargestellt ist der Anteil an stationären bzw. mobilen Tau-Molekülen an der Gesamtzahl der Tau-Moleküle. Die angegebene Konzentration ist die im Experiment vorhandene Gesamtkonzentration. Die Gesamtzahl an ausgewerteten Tau-Molekülen ist über jedem Wert angegeben. Bei Konzentrationen oberhalb von 20 pM wurde auch unmarkiertes hTau40 eingesetzt. 5 oder 10 pM markiertes hTau40-TMR wurden mit unmarkiertem hTau40 gemischt, um die jeweilige Konzentration zu erreichen. Es wird davon ausgegangen, dass sich die unmarkierte Population wie die markierte verhält und somit ein Rückschluss auf die Gesamtpopulation möglich ist.

2 pM, dieser wurde als Ausreißer betrachtet.) Allerdings ist ein leichter Trend erkennbar: Bei zunehmender Tau-Konzentration ändert sich das Verhältnis von 60:40 mobil:stationär in Richtung 50:50. Allerdings ist die Varianz der Werte so hoch, dass keine definitive Aussage möglich ist.

Ein kooperatives oder anti-kooperatives Verhalten von mobilen oder stationären Tau-Molekülen kann zumindest für Konzentrationen bis 10 nM Tau (bei 50 nM Mikrotubuli) damit ausgeschlossen werden.

3.2.3 Einfluss der Ionenstärke und Mikrotubuli-Oberfläche auf die hTau40 Diffusion

Nach der Charakterisierung der Diffusion von hTau40 entlang von Mikrotubuli liegt es nahe, auch die notwendigen Voraussetzungen bzw. Art der Interaktion von Tau und Mikrotubuli, die diese Diffusion ermöglichen, zu untersuchen.

Helenius *et al.* (2006) zeigte für das ebenfalls entlang von Mikrotubuli diffundierende Kinesin-13 (MCAK), dass die Erhöhung der Salzkonzentration die Bindungsdauer von MCAK an Mikrotubuli reduziert. Dies spricht für eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen MCAK und Mikrotubulus. Für MCAK wurde unter vergleichbaren Versuchsbedingungen mit $0,38 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ein ähnlicher Diffusionskoeffizient wie in dieser Arbeit für Tau ermittelt. Daher

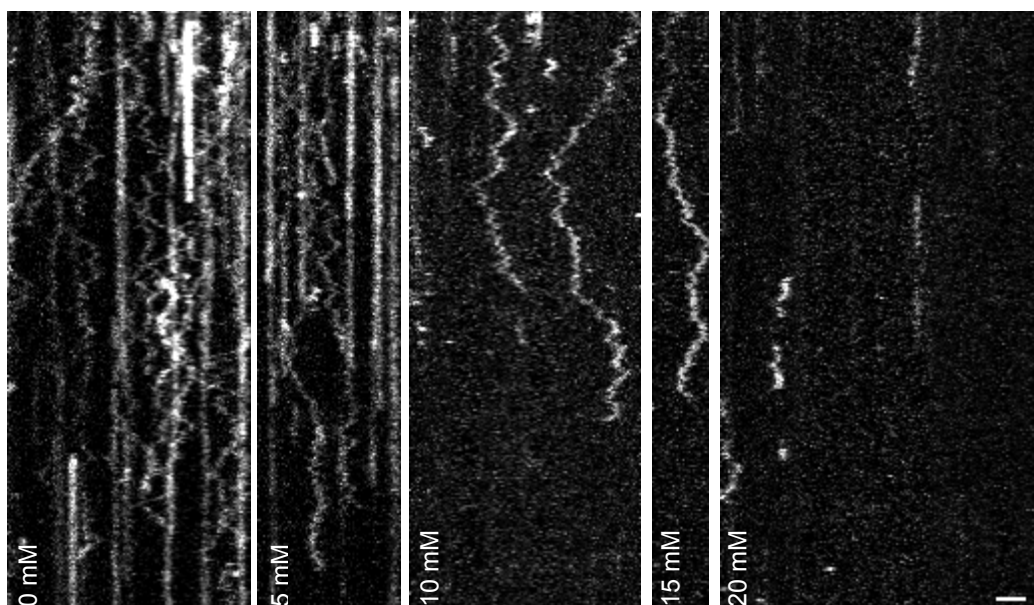


Abbildung 3.6: Die Tau-Bindung und -Diffusion ist salzkonzentrationsabhängig

Tau-Diffusion bei steigender KCl-Konzentration. Es sind Kymographen von TIRF-Messung bei 0, 5, 10, 15 und 20 mM KCl in BRB12 gezeigt. Die Aufnahmedauer war jeweils 60 Sekunden (y-Achse). Der Maßstabsbalken in der Abbildung mit 20 mM KCl entspricht $2,5 \mu\text{m}$ und gilt für alle Abbildungen. Es ist deutlich erkennbar, dass die Anzahl an sichtbaren Tau-Molekülen, die stationär oder mobil auf dem Mikrotubulus binden, mit steigender Salzkonzentration abnimmt.

liegt es nahe, für Tau einen ähnlichen Bindungscharakter zu vermuten. Deswegen wurde die Ionenstärke durch Zugabe von KCl erhöht. Die zugesetzte Salzkonzentration wurde schrittweise von 0 mM auf 20 mM KCl erhöht. Abbildung 3.6 zeigt beispielhaft das Verhalten von Tau auf Mikrotubuli bei den entsprechenden zusätzlichen KCl-Konzentrationen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der stationären sowie der diffundierenden Tau-Moleküle mit steigender Salzkonzentration abnimmt. Dieses Verhalten spricht für die These, dass die Wechselwirkungen zwischen Tau und Mikrotubulus auf elektrostatischen Interaktionen beruhen und dass diese auch für die Diffusion eine Rolle spielen.

Die Mikrotubulibindungsdomänen (MTBD) von Tau tragen eine positive Netto-Ladung (Aizawa *et al.* (1988), Seitz *et al.* (2002)). Die Interaktionspartner von Tau für die elektrostatische Wechselwirkung müssen also negative Ladungen auf der Mikrotubuli-Oberfläche sein. Da der C-Terminus von Tubulin viele negative Ladungen trägt (Little und Seehaus (1988)), ist dieser ein potentieller Bindungspartner. Auch Helenius *et al.* (2006) untersuchte den Einfluss des C-Terminus von Tubulin auf die Diffusion von MCAK, indem Subtilisin-verdaute Mikrotubuli eingesetzt wurden. Die Protease Subtilisin schneidet spezifisch den C-Terminus von Tubulin ab (Lobert und Correia (1992)). MCAK konnte auf den Mikrotubuli ohne C-Terminus nicht mehr diffundieren. Al-Bassam *et al.* (2002) zeigte in Cryo-EM Aufnahmen zudem eine Interaktion zwischen MAP2c (einem Tau-ähnlichen mikrotubuli-assoziierten Protein) und dem C-Terminus von Tubulin. Durch diese Ergebnisse angeregt, wurde auch in dieser Arbeit der Einfluss des Tubulin C-Terminus auf die Diffusion von Tau überprüft.

Dazu wurden Mikrotubuli ohne C-Terminus (mit Subtilisin behandelt, vgl. 2.2.11.2) in ein und demselben Assay direkt mit Mikrotubuli mit C-Terminus verglichen. Abbildung 3.7 D zeigt den Größenunterschied des Tubulins nach dem Subtilisin-Verdau. Um beide Mikrotubuli-Arten unterscheiden zu können, waren die mit Subtilisin behandelten Cy5-markiert (im Folgenden als Cy5s-MT bezeichnet). Die unbehandelten Mikrotubuli (im Folgenden als Ø-MT bezeichnet) blieben unmarkiert und wurden nur über die erwartete Kollokalisierung mit dem zugegebenen hTau40-TMR sichtbar. Zeigt hTau40-TMR auf beiden Mikrotubuli-Arten dieselben Diffusionsparameter, spielt der C-Terminus für die Diffusionseigenschaft von Tau keine Rolle und der Interaktionspartner für die elektrostatischen Wechselwirkungen muss ein anderer sein. Zeigen sich jedoch Unterschiede, kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktion von hTau40-TMR mit dem C-Terminus für die Diffusion wichtig ist.

Abbildung 3.7 zeigt beispielhaft eine TIRF-Aufnahme, bei der Cy5s-MT und Ø-MT gleichzeitig in derselben Kammer gemessen wurden. In Abbildung 3.7 A ist die Einzelaufnahme der Cy5s-MT und in A1-A3 sind die dazugehörigen Kymographen von hTau40-TMR entlang der Mikrotubuliachsen gezeigt. Es ist zu erkennen, dass keine

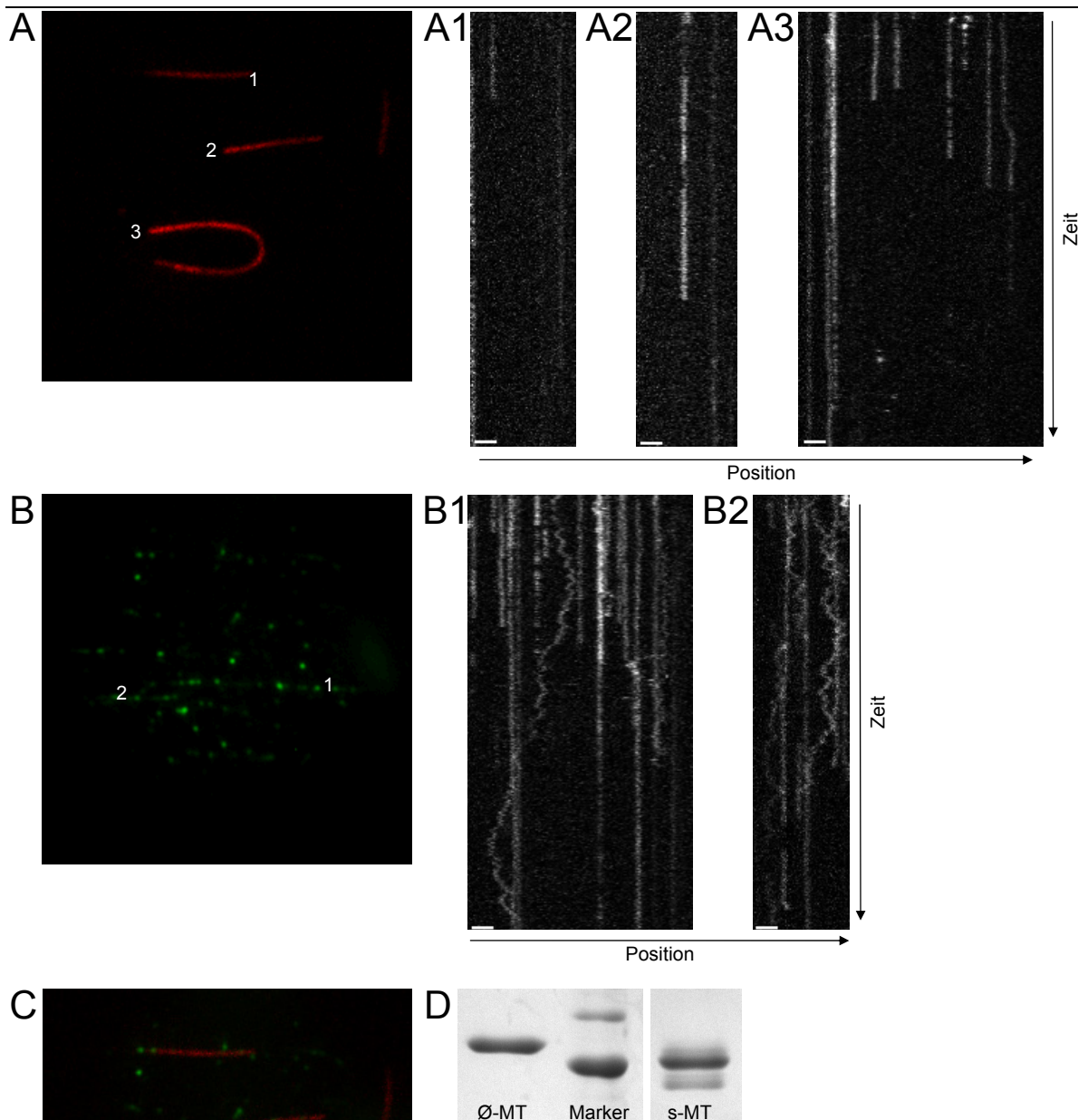


Abbildung 3.7: Der Tubulin C-Terminus ist für die Diffusion von hTau40 auf Mikrotubuli notwendig

Cy5-markierte, Subtilisin-verdaute Mikrotubuli wurden im Gemisch mit unmarkierten, nicht-verdauten Mikrotubuli verwendet. Es wurde hTau40TMR eingespült und die Diffusion im TIRF-Mikroskop verfolgt. Unmarkierte, nicht-verdaute Mikrotubuli werden durch die Kolokalisation mit hTau40TMR „sichtbar“.

A TIRF-Aufnahme von Cy5-markierten, mit Subtilisin verdauten Mikrotubuli (vgl. 2.2.11.2 und D). Es sind deutlich drei Mikrotubuli erkennbar (nummeriert: 1-3) **A1-A3** Kymographen des hTau40TMR Signals entlang der in A sichtbaren Mikrotubuli. Die Maßstabsbalken entsprechen 2,5 μm , die Aufnahmedauer war 60 Sekunden. **B** Intensitätsmittelwert des hTau40-TMR Signals (auf unmarkierten Mikrotubuli) einer 60 Sekunden TIRF-Aufnahme an derselben Stelle wie in A. In der nicht gemittelten Aufnahme (nicht gezeigt), können deutlich zwei Mikrotubuli durch Tau-Diffusion ermittelt werden (nummeriert: 1, 2). **B1, B2** Kymographen entlang der durch Tau-Diffusion sichtbaren, unmarkierten Mikrotubuli aus B. Die Maßstabsbalken entsprechen 2,5 μm . **C** Überlagerung von A und B. Es ist deutlich erkennbar, dass das mit hTau40-TMR sichtbare Signal nicht mit den Cy5-markierten Mikrotubuli kolokalisiert. **D** SDS-PAGE von nicht-verdauten Mikrotubuli (\emptyset -MT) und Subtilisin-verdauten Mikrotubuli (Cy5s-MT, 200 $\mu\text{g/ml}$ Subtilisin für 20 Minuten, vgl. 2.2.11.2), Proteinstandard: 50, 60 kDa. Färbung: Coomassie brillant Blue. Es ist deutlich erkennbar, dass der Großteil des Tubulins verdaut wurde und eine geringere Masse aufweist.

Diffusion von hTau40-TMR auf den Cy4s-MT stattfindet und viele der hTau40-TMR Moleküle nicht für die Dauer der gesamten Aufnahme (60 Sekunden) gebunden blieben. Abbildung 3.7 B zeigt einen Mittelwert der 60 Sekunden dauernden hTau40-TMR Aufnahme. Die Ø-MT lassen sich durch die stattfindende Diffusion erkennen. Diese führt bei der Mittelwertbildung dazu, dass die Ø-MT als nicht klar umgrenzte Bereiche sichtbar werden. B1 und B2 sind (wie bei A) die jeweiligen Kymographen entlang der Ø-Mikotubuliachsen. Im Vergleich mit A1-A3 ist deutlich erkennbar, dass auf den Ø-MT Tau-Diffusion stattfand und außerdem die nicht diffundierenden hTau40-TMR Moleküle ebenfalls deutlich länger (meist für die gesamte Dauer der Aufnahme) am Mikotubulus gebunden blieben. Für die diffundierenden Tau-Moleküle wurde stichprobenartig der Diffusionskoeffizient ermittelt. Es ergaben sich vergleichbare Werte wie bei den zuvor gezeigten Daten ($0,183 \pm 0,078 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Mittelwert \pm SD, $n=13$)).

Es kann ausgeschlossen werden, dass die verkürzte Bindungsdauer von hTau40-TMR auf Cy5s-MT auf verstärktes Ausbleichen des Farbstoffes anstelle von Dissoziation zurückzuführen ist. Wie auf Abbildung 3.7 C erkennbar ist, liegen die Cy5s-MT nicht direkt in der Mitte des Gesichtsfeldes, wo die Laserintensität am höchsten wäre. Die Ø-MT liegen dagegen im mittleren Bereich, und dort zeigt sich keine verkürzte Bindungsdauer von hTau40-TMR. Da für beide Mikrotubuli-Arten dieselbe hTau40-TMR Aufnahme zur Auswertung verwendet wurde, kann auch eine Änderung der Gesamtlaserintensität als etwaige Ursache ausgeschlossen werden. Die beobachteten Unterschiede zwischen Cy5s-MT und Ø-MT sind demnach direkt auf das Fehlen des Tubulin C-Terminus bei den Cy5s-MT zurückzuführen.

3.3 Interaktion von hTau40 und Kinesin

3.3.1 hTau40 beeinflusst die Lauflänge und Bindungsrate, jedoch nicht die Geschwindigkeit einzelner Kinesinmoleküle

hTau40 bindet an Mikrotubuli und kann so andere Proteine, die ebenfalls an Mikrotubuli binden, beeinflussen. Besonders der Einfluss auf Motorproteine wird mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Auf Kinesin zeigte Tau in anderen Studien unterschiedlich starke Wirkungen (Seitz *et al.* (2002), Dixit *et al.* (2008), Morfini *et al.* (2007), Vershinin *et al.* (2007)).

Wird Kinesin auch unter Versuchsbedingungen beeinflusst, unter denen Tau-Diffusion stattfindet, so ist es möglich, dass neben den stationären auch die diffundierenden Tau-Moleküle zur Beeinflussung von Kinesin beitragen.

Um Kinesin im TIRF-Mikroskop beobachten zu können, wurde ein Kinesin-GFP Fusionsprotein verwendet, das die ersten 555 Aminosäuren der nativen Ratten Kinesin-1 Sequenz enthält (rK555-GFP). Abbildung 3.8 A zeigt deutlich die Kolokalisation des aufgereinigten Fusionsproteins mit Mikrotubuli. Ferner ist die gerichtete Bewegung des Kinesins entlang der Mikrotubuli-Achse im Kymograph deutlich zu sehen (Abb. 3.8 B).

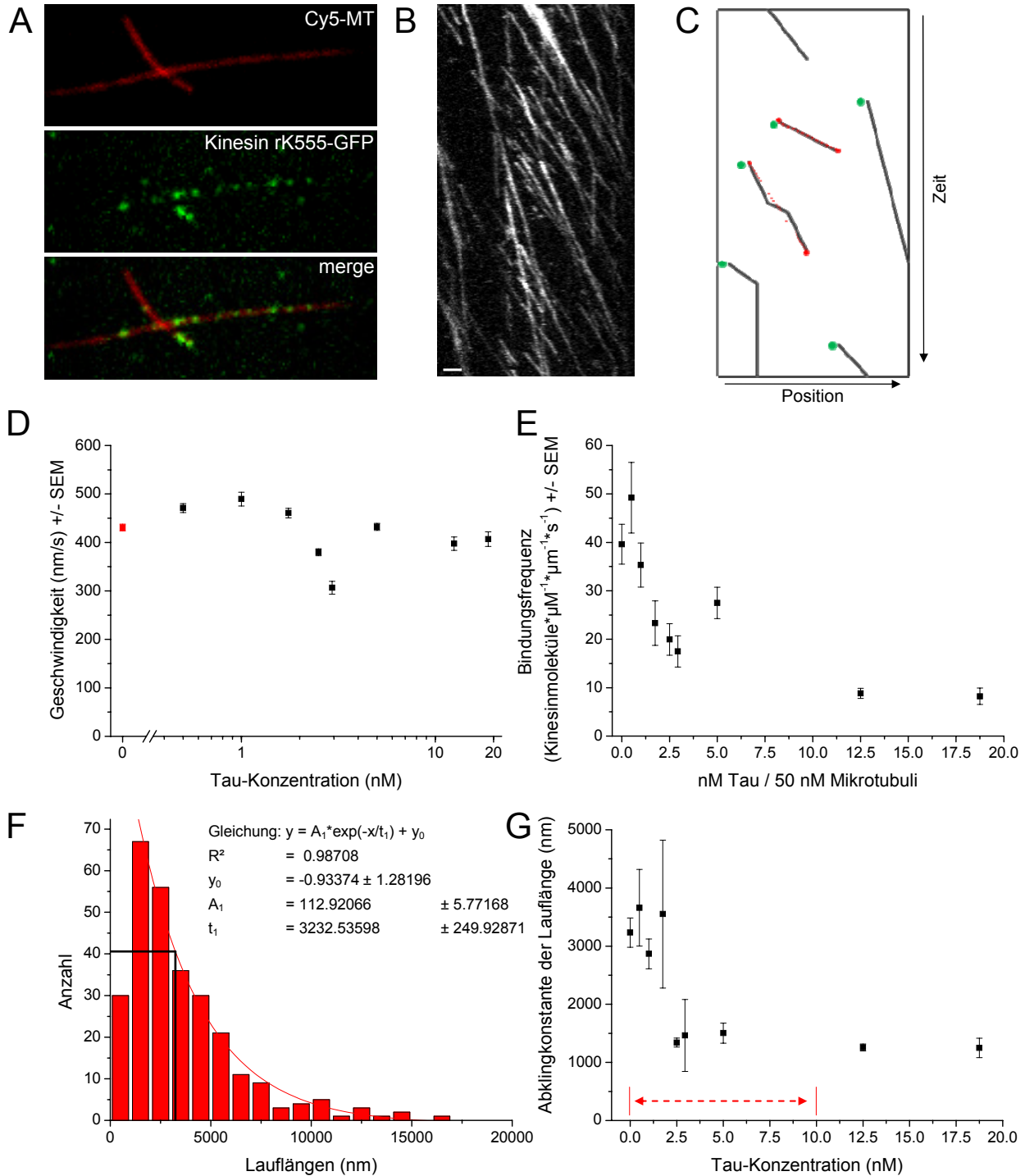


Abbildung 3.8: Beeinflussung der Kinesin-Motilität durch hTau40-TMR

Erläuterungen auf der nächsten Seite.

Zur Beschreibung der Kinesin-Motilität wurden die Geschwindigkeit, die Lauflänge und die Bindungsfrequenz an den Mikrotubulus verwendet. Diese Parameter erlauben eine Aussage über verschiedene Aspekte der Motilität. So lässt die Geschwindigkeit eine Aussage über das „Stop-and-Go“-Verhalten zu, also ob häufiger oder längere Pausen zwischen den Schritten vorkommen. Die Lauflänge kann für die Bewertung der Prozessivität herangezogen werden. Die Auswertung der Kinesinbewegung erfolgte durch Kymographen. Zur Bestimmung der Geschwindigkeit wurden alle erkennbaren Läufe mit einbezogen und jeweils die Durchschnittsgeschwindigkeit ermittelt. Für die Berechnung der Lauflänge wurden nur solche Läufe berücksichtigt, die komplett, also einschließlich Beginn und Ende, auf dem Kymograph erkennbar waren (vgl. Abb. 3.8 C, durch eine rote, gestrichelte Linie gekennzeichnet). Solche Läufe begannen nicht am Mikrotubulus-Anfang oder vor Beginn der Aufnahme und endeten nicht am Mikrotubulus-Ende bzw. liefen nicht nach dem Ende der Aufnahme noch weiter. Dadurch wird gewährleistet, dass die Lauflänge nicht unterschätzt wird. Für die Bindungsfrequenz (Anzahl der bindenden Kinesine pro μM Kinesin in der Lösung, pro μm Mikrotubuluslänge und pro Sekunde) wurden nur Läufe gezählt, die nicht bei Beginn der Aufnahme starten (Abb. 3.8 C, gekennzeichnet durch grüne Punkte). Sonst wäre keine Aussage über die Zeitabhängigkeit möglich. Außerdem wurden nur produktive Ereignisse gezählt, d.h. Kinesin muss binden und danach Motilität zeigen. Da eine solche Auswahl notwendig ist, um verlässliche Daten zu erhalten, wurde die Auswertung per Hand vorgenommen.

Abbildung 3.8: Beeinflussung der Kinesin-Motilität durch hTau40-TMR

A TIRF-Aufnahme von Cy5-markierten Mikrotubuli (oben) mit Kinesin rK555-GFP (Mitte). In der Überlagerung ist deutlich die Kollokalisierung von Kinesin auf den Mikrotubuli zu sehen (unten). **B** Kymograph von mehreren Kinesin-Molekülen auf dem in A quer verlaufenden Mikrotubulus. Es ist deutlich die gerichtete Bewegung von links nach rechts zu sehen. **C** Schematische Zeichnung der möglichen Verläufe bei Motilität von Kinesin in einem Kymographen. Bei der Geschwindigkeitsauswertung wurden alle Läufe berücksichtigt, für die Bindungsfrequenz nur die mit einem grünen Punkt gekennzeichneten, für die Lauflänge nur die mit einer roten, gestrichelten Linien markierten Läufe (weitere Erläuterungen im Text). **D** Mittelwerte der Geschwindigkeiten in nm/s von rK555-GFP bei 1 mM ATP und 23°C. Der Wert bei 0 nM Tau ist in rot dargestellt, die Werte in Gegenwart von 0,5, 1, 1,75, 2,5, 2,94, 5, 12,5 und 18,75 nM Tau (je auf 50 nM Mikrotubuli) in schwarz. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler, $n \geq 150$ Kinesin Moleküle für jede Tau-Konzentration. **E** Mittelwerte der Bindungsfrequenzen in Kinesinmoleküle $\cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bei denselben Tau-Konzentrationen wie in D. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler, $n \geq 17$ ausgewertete Mikrotubuli für jede Tau-Konzentration. **F** Beispielhaftes Histogramm der ermittelten Lauflängen einzelner Kinesin-Moleküle in Gegenwart von 0 nM Tau zur Bestimmung der Abklingkonstante der Lauflänge. Die Klassengröße beträgt 1000 nm. Die Daten zeigen jeweils einen exponentiellen Abfall, der durch eine entsprechende Kurve (rote Linie) beschrieben werden kann, wobei die erste Klasse nicht mitberücksichtigt wurde. Die Gleichung für die Kurve sowie die ermittelten Parameter sind angegeben. Die aus der Kurve ermittelte Abklingkonstante ist ein Maß für die mittlere Lauflänge. Für alle Tau-Konzentrationen wurden die Lauflängen mit unveränderter Klassengröße nach diesem Schema ermittelt. **G** Mittlere Lauflänge (jeweils ermittelt wie für F beschrieben) bei denselben Tau-Konzentrationen wie in D. Die Fehlerbalken ergeben sich aus dem Fit der Exponentialkurve an die Daten. Der Bereich in dem die Tau-Diffusion gezeigt wurde ist durch den roten gestrichelten Pfeil angegeben.

Für die Laufgeschwindigkeit und Bindungsrate wurden bei jeder gemessenen Tau-Konzentration jeweils die Mittelwerte von Kinesinmolekülen bzw. Mikrotubuli gebildet, um die einzelnen Daten zusammenzufassen. Da die Lauflängen exponentiell verteilt sind, können sie nicht durch einen einfachen Mittelwert beschrieben werden. Die ermittelten Werte für die Lauflänge wurden stattdessen zusammengefasst und als Histogramm dargestellt. Eine einfach exponentiell abfallende Kurve wurde zur Beschreibung der Daten angepasst (Abb. 3.8 F) (Block *et al.* (1990), Vale *et al.* (1996)). Da besonders kurze Kinesin-Läufe nicht als solche erkannt und daher vermehrt nicht ausgewertet wurden, wurde der erste Histogramm-Kasten von der Kurvenanpassung ausgenommen. Die die Kurve beschreibende Abklingkonstante (s. Abb. 3.8 F) wurde als Maß für die Lauflänge verwendet.

Abbildung 3.8 D zeigt die Geschwindigkeit von Kinesin bei Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen hTau40. Es wurde bei acht verschiedenen hTau40 Konzentrationen zwischen 0,5 nM und 18,75 nM Tau bei konstanten 50 nM Mikrotubuli gemessen. Die Geschwindigkeit blieb bei allen gemessenen Konzentrationen unverändert, im Mittel bei 420 +/- 55 nm/s (+/- SD). Dies entspricht dem in der Literatur beschriebenen Effekt (Seitz *et al.* (2002), Dixit *et al.* (2008)).

Die Bindungsrate von Kinesin an Mikrotubuli zeigt dagegen einen Tau-konzentrationsabhängigen Abfall (Abb. 3.8 E) Kinesin wird durch Tau bei der produktiven Bindung an einen Mikrotubulus gestört. Der volle Effekt tritt bei einem Tau:Tubulindimer-Verhältnis von 1:4 auf, zwischen 12,5 nM (8,85 +/- 1,04 (SEM) Kinesin-Moleküle* μM^{-1} * μm^{-1} *s $^{-1}$) und 18,75 nM (8,23 +/- 1,69 (SEM) Kinesin-Moleküle* μM^{-1} * μm^{-1} *s $^{-1}$) kommt es zu keiner nennenswerten Änderung mehr. Der Effekt tritt also schon bei Besetzung der Hälfte der möglichen Bindungsplätze auf (Al-Bassam *et al.* (2002)). Seitz *et al.* (2002) fand ebenfalls einen konzentrationsabhängigen Abfall, der jedoch auch für Verhältnisse bis 4:1 (Tau:Tubulindimer) eine Änderung zeigte. Auch Dixit *et al.* (2008) fand mit hTau40 eine Abnahme der Kinesin-Bindungsfrequenz, allerdings erst ab einem Tau:Tubulindimer-Verhältnis von 1:5. Bei geringerer Tau-Konzentration wurde von Dixit *et al.* (2008) kein Effekt gefunden.

Im Gegensatz zur Bindungsfrequenz zeigte die Lauflänge (Abb. 3.8 G) keinen stetigen Abfall, sondern eine Art Stufe zwischen den Messwerten in Anwesenheit von 1,75 nM und 2,5 nM Tau (entspricht einem Tau:Tubulindimer Verhältnis von 1:29 und 1:20). Die Lauflänge geht von 3330 nm auf 1360 nm zurück. Um auszuschließen, dass der unerwartete, stufenartige Verlauf auf die Art der Datenauswertung zurückzuführen ist, wurden die Daten neben dem in Abbildung 3.8 G abgebildeten 1000 nm-Binning auch mit einem 450 nm-Binning ausgewertet. Dieses führte zu keiner Veränderung (nicht gezeigt). In der Literatur werden unterschiedliche Einflüsse auf die Lauflänge von Kinesin bei Tau--Anwesenheit

berichtet. Dixit *et al.* (2008) fanden für hTau40 nur eine moderate Reduktion von etwa 3000 nm ohne Tau auf 2500 nm bei 10 nM Tau (1:5 Tau:Tubulin). Vershinin *et al.* (2007) beobachteten in der Laser-Falle eine starke Reduktion von 1460 nm ohne Tau auf nur 570 nm bei Anwesenheit von 1:5 Tau:Tubulindimer (vergleichbar den Messungen von Dixit *et al.* (2008)). Seitz *et al.* (2002) findet hingegen keine Änderung der Lauflänge, obwohl hier sogar mehr Tau als Tubulin eingesetzt wurde (Verhältnis Tau:Tubulindimer bis 1,5:1).

Bemerkenswert ist, dass die Lauflänge deutlich später als die Bindungsfrequenz einen Effekt durch die Anwesenheit von Tau zeigt. Es scheinen unterschiedliche Eigenschaften oder Mechanismen diese Parameter zu beeinflussen. Würden sowohl Lauflänge als auch die Bindungsfrequenz auf den gleichen Eigenschaften und Mechanismen beruhen, müssten diese im selben Konzentrationsbereich verändert werden.

3.3.2 Lokale Tau-Konzentration beeinflusst Bindung und Dissoziation von Kinesin an Mikrotubuli

Die Beeinflussung der Kinesinfunktion durch Tau ist durch mehrere Modelle erklärbar. Die Bindungsfrequenz von Kinesin könnte zum einen durch die sterische Blockierung der Mikrotubulioberfläche durch Tau vermindert werden. Zum anderen ist eine (evtl. zusätzliche) Interaktion von Tau mit Kinesin in der Lösung denkbar. Diese könnte Kinesin so blockieren, dass es nicht mehr in der Lage ist, an die Mikrotubuli zu binden. Die Lauflänge von Kinesin und damit die Prozessivität könnte durch eine direkte Interaktion von Tau und Kinesin auf der Mikrotubuli-Oberfläche zu Stande kommen. Außerdem wäre denkbar, dass Tau durch die Bindung an die Mikrotubuli deren Oberflächenstruktur über einen Bereich, der über die direkt gebundenen Tubulindimere hinausgeht, so verändert, dass die Prozessivität von Kinesin geringer wird, ohne dass Tau und Kinesin notwendigerweise räumlich nahe sind oder miteinander interagieren.

Um herauszufinden welches dieser Modelle zutrifft, wurde die lokale Tau-Konzentration auf dem Mikrotubulus mit der Bindung und der Dissoziation von Kinesin-Molekülen kombiniert. Verhindert eine Interaktion von Tau und Kinesin in Lösung die Bindung, besteht keine Korrelation zwischen lokaler Tau-Konzentration auf dem Mikrotubulus und Kinesin-Bindungsereignissen. Ähnliches gilt für die Prozessivität. Beeinflusst Tau die Prozessivität von Kinesin über eine Veränderung der Mikrotubuli-Oberfläche, die über die direkt gebundenen Tubulindimere hinausgeht dürfte es keine Korrelation zwischen Dissoziation (die die stärkste Form der beeinflussten Prozessivität darstellt) und lokaler Tau-Konzentration geben, sofern dieser weiträumige Einfluss in einem messbaren Bereich liegt (die minimale Auflösung ist ein Pixel, dieser entspricht 160 nm). Beispielsweise zeigte eine

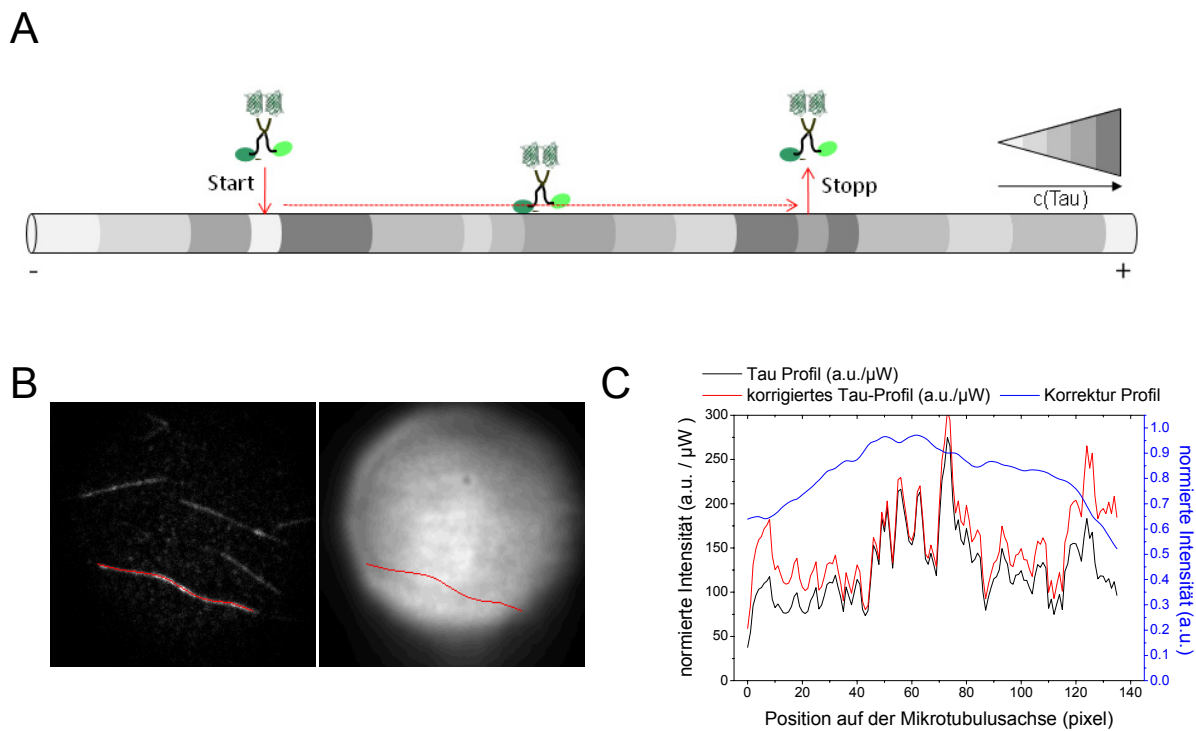


Abbildung 3.9: Kombination von Tau-Konzentration und Kinesin-Motilität

A Schematische Illustration eines Kinesin-Moleküls auf einem Tau-bedecktem Mikrotubulus. Die unterschiedliche lokale Tau-Konzentration ist durch unterschiedliche Grautöne dargestellt: je dunkler der Farbton, desto höher die lokale Tau-Konzentration. Der Lauf des Kinesin-Moleküls ist durch einen gestrichelten Pfeil gezeigt. **B** Beispiel der Intensitätsnormierung: (links) TIRF-Aufnahme von hTau40-TMR bei einem Tau:Tubulin-Verhältnis von 5 nM:50 nM. Die Mikrotubuli sind durch Kolo-kalisation gut erkennbar. Die Intensität wird entlang der roten Linie ausgewertet. (rechts) Aus 200 Einzelbildern gemittelte, Gauss-Unschärfe-gefilterte TIRF-Aufnahme von Rhodamin-Tubulin. Die Aufnahme wird zur Korrektur der ungleichmäßigen Feldausleuchtung, bedingt durch den anregenden Laser, verwendet. Die rote Linie entspricht der in der linken Abbildung. (Weitere Erläuterungen im Text.) **C** Beispiel für die Korrektur des Verlaufs der hTau40-TMR Intensität entlang der Mikrotubulus-Achse. Schwarz ist der gemessene hTau40-TMR-Intensitätsverlauf in a.u./ μW eingestrahlte Laserintensität entlang der roten Linie in B links dargestellt. Die blaue Linie zeigt das Profil der Intensität an dieser Stelle des Gesichtsfelds, normiert auf den maximalen Helligkeitswert im gesamten Feld. Die rote Datenlinie zeigt den korrigierten Intensitätsverlauf, der als Maß für die lokale Tau-Konzentration für die weitere Auswertung verwendet wurde.

Kinesin entlang des in Abbildung 3.9 (B und C) dargestellten Mikrotubulus Motilität zwischen Pixel-Position 107 und 77 (nicht eingezeichnet). Diese viel in einen mittleren Bereich der Intensität (100 bis 200 a.u./ μW). Es wäre denkbar, dass der Bereich mit der besonders hohen Intensität von 300 a.u./ μW bei Pixel-Position 72 für das Ende des Kinesin-Laufs bei Pixel-Position 77 über eine wie oben beschriebene Veränderung der Mikrotubuli-Oberfläche verantwortlich ist. Die Einflussnahme geschähe dann über eine Distanz von etwa 800 nm und würde zu keiner Korrelation der Intensität von 300 a.u./ μW mit dem Ende eines Kinesin-Laufs führen.

Für den Vergleich zwischen Tau-Konzentration und Kinesin-Bindung bzw. Dissoziation wurden Kinesin-GFP und hTau40-TMR zeitgleich parallel aufgenommen. Abbildung 3.9 A

zeigt schematisch einen Mikrotubulus an den Kinesin bindet (Start), sich auf dem Mikrotubulus bewegt und anschließend dissoziiert (Stopp). Die lokale hTau40-Konzentration ist in verschiedenen Graustufen dargestellt. Je dunkler der Farbton, desto höher die hTau40-Konzentration. Für die Analyse der Korrelation von Start bzw. Stopp-Ereignissen und hTau40-Konzentration wurde für jedes Start- bzw. Stopp-Ereignis die hTau40-Konzentration ermittelt. Da die hTau40-Konzentration nicht mit direkten Methoden (Absorptionsmessung o.ä.) ermittelt werden kann, wurde stattdessen die Intensität der hTau40-TMR-Fluoreszenz verwendet. Diese kann der Konzentration äquivalent gesetzt werden, da alle hTau40-Moleküle an beiden vorhandenen Cystein-Resten mit 5'TMR markiert sind (vgl. 3.1).

Das Feld der Fluoreszenzanregung durch die Laserstrahlung ist nicht gleichmäßig. Die Intensität in der Mitte des Anregungsfeldes ist stets stärker als am Rand. Die ausgewerteten Mikrotubuli waren über das gesamte Gesichtsfeld verteilt, so dass eine Korrektur für die unterschiedlich starke Anregungsintensität vor der eigentlichen Auswertung der Intensität notwendig wurde. Dafür wurde zunächst ein Abbild der Anregung generiert, in dem ein Mittelwert aus 200 Einzelbild-Aufnahmen einer flächig mit Rhodamin-Tubulin beschichteten Messkammer gebildet wurde. Die verwendeten Einzelbild-Aufnahmen wurden an unterschiedlichen Stellen der Messkammer gemacht, um eine eventuell unregelmäßige Beschichtung auszugleichen. Der Mittelwert wurde zusätzlich noch Gauss-Unschärfe-gefiltert (vgl. 2.2.12.4). Das fertige, zur Anregungskorrektur verwendete Anregungsabbild zeigt Abbildung 3.9 B. Für die Korrektur der hTau40-TMR-Intensität wurde wie folgt vorgegangen: Zuerst wurde die Lage des Mikrotubulus im Gesichtsfeld markiert (Abb. 3.9 B links) und die Intensität entlang der Achse ermittelt und auf die zur Anregung verwendete Intensität des Laserstrahls normiert (a.u./ μW) (Abb. 3.9 C, schwarze Kurve). Anschließend wurde die Lage des Mikrotubulus in das Anregungsabbild übertragen und dort ebenfalls der Verlauf der Intensität (entlang der Mikrotubulusachse) ermittelt (Abb. 3.9 C, blaue Kurve). Die Korrektur der Intensität erfolgt durch Division der hTau40-TMR-Intensität durch die Anregungsabbild-Intensität. Das resultierende Intensitätsprofil ist in Abb. 3.9 C als rote Datenkurve dargestellt. Dabei ändern sich die Intensitätswerte von Regionen der hTau40-TMR-Intensität, die im Randbereich des Anregungsfeldes lagen, sichtbar stärker als solche, die weiter in der Mitte des Anregungsfeldes lagen.

Die Start- und Stopp-Ereignisse von Kinesin wurden über einen Kymographen ausgewertet. Dieser wurde entlang der exakt gleichen Positionen, wie die zuvor bestimmte hTau40-TMR-Intensität, erstellt. So konnten die hTau40-Intensität und die Kinesin-Position direkt miteinander korreliert werden. Die durch die Korrektur erhaltenen Intensitätswerte wurden in fünf Bereiche unterteilt (50-300 a.u. / μW in 50er Schritten, der Hintergrund lag bei etwa 30 a.u. / μW), die Anzahl der Start- bzw. Stoppereignisse pro Intensitätsintervall gezählt und auf den Anteil Mikrotubuluslänge im selben Intensitätsintervall normiert. Startereignisse wurden

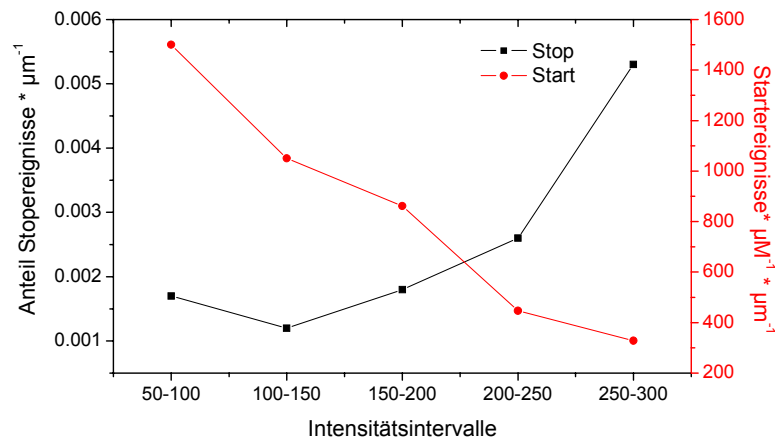


Abbildung 3.10: Kinesin-Beeinflussung durch lokale Tau-Konzentration

Die Daten von Messungen mit 5 nM, 12,5 nM und 18,75 nM hTau40-TMR wurden zusammengefasst und gemeinsam ausgewertet. Dies ist durch die Normierung der Intensitäten möglich (vgl. Abb. 3.9).

In schwarz dargestellt ist der Anteil Stoppereignisse (Kinesine die den Lauf beenden, bezogen auf die Summe laufender oder stoppender Kinesin-Moleküle) bei der jeweils vorherrschenden hTau40-TMR-Intensität, pro μm Mikrotubulus derselben Tau-Intensität. In rot sind die Startereignisse (Kinesin bindet und läuft los) bei der jeweils vorherrschenden hTau40-TMR-Intensität pro μm Kinesin in der umgebenden Lösung und pro μm Mikrotubulus derselben Tau-Intensität dargestellt. Die Stoppereignisse nehmen mit steigender hTau40-TMR-Intensität zu, die Startereignisse dagegen ab.

ferner auf die im Assay verwendete Kinesinkonzentration normiert. Stoppereignisse wurden auf die Gesamtzahl der sich im jeweiligen Intensitätsbereich befindenden Kinesinmoleküle normiert.

Da die Normierung der Intensität für alle gemachten Messungen vorgenommen wurde, war die Zusammenfassung von Messungen mit verschiedenen Tau-Konzentrationen möglich. Abbildung 3.10 zeigt die gemeinsame Auswertung der Messungen mit 5, 12,5 und 18,75 nM hTau40-TMR (je auf 50 nM Mikrotubuli). Die Start-Ereignisse nahmen mit steigender hTau40-TMR-Intensität (und damit auch hTau40-TMR-Konzentration) ab, die Stopp-Ereignisse nahmen dagegen bei steigender hTau40-TMR-Intensität zu. Es fällt auf, dass diese Ergebnisse die vorher unter Betrachtung der Gesamtkonzentration an hTau40 gemachten Daten widerspiegeln. Auch hier zeigten die Bindungsfrequenz und die Lauflänge eine Veränderung in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Die Start-Ereignisse, die die Bindungsfrequenz widerspiegeln, zeigten schon bei den niedrigeren hTau40-TMR-Intensitäten einen deutlichen Effekt. Die Stopp-Ereignisse, und damit auch die Prozessivität, zeigten diesen erst bei einer höheren Intensität. Es lässt sich also zeigen, dass die lokale Tau-Konzentration einen direkten Einfluss auf das Binden bzw. Dissoziieren von Kinesin an bzw. von Mikrotubuli hat. Ein Einfluss von Tau auf Kinesin in der Lösung und eine Fernwirkung über mehr als 160 nm auf dem Mikrotubulus kann so als Grund für die veränderten Motilitätsparameter ausgeschlossen werden.

4. Diskussion

Die physiologische Funktion von Tau ist die Stabilisierung von Mikrotubuli und Unterstützung von deren Polymerisation. Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer kommt es durch eine erhöhte Konzentration an Tau in den Zellen zu einer Störung des Kinesin-abhängigen axonalen Transports. Trotz dieser Transportstörung bleibt Tau über das gesamte Axon verteilt. Dies warf die Frage auf, ob Tau ausschließlich durch aktiven Transport innerhalb der Zellen verteilt wird oder ob es weitere Mechanismen gibt. Im Prinzip sind drei Varianten für den Transport bzw. die Verteilung von Tau denkbar: 1) Tau wird aktiv transportiert. Dabei kann zwischen direktem aktivem Transport mittels Motorproteinen, vorrangig Kinesin und einem Kotransport durch Bindung an aktiv transportiertes Tubulin unterschieden werden. 2) Tau wird nicht aktiv transportiert, sondern verteilt sich durch Diffusion. Dabei sind ebenfalls zwei Varianten möglich: freie Diffusion im Axonplasma unterbrochen von kurzzeitiger Bindung an die Mikrotubuli oder ein schneller Wechsel von Assoziation und Dissoziation unterbrochen von Diffusion von Tau auf der Mikrotubulus-Oberfläche. 3) Eine Kombination aus aktivem Transport und nicht-aktiver Verteilung von Tau. Um eine Aussage über die tatsächliche Form der Tau-Verteilung zu ermöglichen, wurde daher die Tau-Mikrotubuli-Interaktion mittels Einzelmoleküluntersuchungen eingehend charakterisiert.

In dieser Arbeit konnte erstmals auf Einzelmolekülbasis gezeigt werden, dass Tau sowohl stationär an Mikrotubuli bindet, als auch Mobilität entlang der Mikrotubuli zeigt. Diese Mobilität konnte als ATP-unabhängige Diffusion beschrieben werden. Der mittlere Diffusionskoeffizient lag bei $0,259 \pm 0,016 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bei 23°C . Die Diffusionsdauer lag bei $15,3 \pm 1,1 \text{ s}$ und der End-zu-End-Abstand (die Distanz zwischen den erreichten Extrempositionen während der Tau-Mikrotubuli-Interaktion) bei $3065 \pm 134 \text{ nm}$ (jeweils Mittelwert \pm SEM, $n=151$). Die Tau-Moleküle zeigten dabei keine gegenseitige Beeinflussung. Weder änderten sich die Diffusionseigenschaften bei höheren Konzentrationen, noch kam es zu einer starken Änderung beim Verhältnis stationäre zu mobile Tau-Molekülen. Dies entspricht früheren Berichten, dass die Bindung von Tau nicht kooperativ ist (Biernat *et al.* (1992)).

Eine solche mobile Bewegung direkt auf der Mikrotubuli-Oberfläche ist zuvor für Tau nicht beschrieben worden.

4.1 Diffusion von Tau auf Mikrotubuli

Die Bindung von Tau an Tubulin wurde zuerst als sehr fest, wenn nicht sogar irreversibel angenommen, da während mehrerer Polymerisations- und Depolymerisationszyklen kein Austausch von gebundenem Tau zwischen verschiedenen Tubulin-Fraktionen gefunden wurde (Weingarten *et al.* (1975)). Nachfolgende Studien revidierten dies zum Teil. Sie fanden für Tau unterschiedlich starke Bindungen an Mikrotubuli (K_D zwischen 1 μM und 14 nM) (Butner und Kirschner (1991), Goode *et al.* (2000), Ackmann *et al.* (2000), Kar *et al.* (2003), Makrides *et al.* (2004)). Für den Austausch von gebundenen und nicht gebundenen Tau-Molekülen wurden unterschiedliche Zeiten berichtet. Sie schwanken stark zwischen $t_{1/2} = 280$ ms (Makrides *et al.* (2004), ermittelt mit Stop-Flow-Experimenten), $t_{1/2} = 5,8$ s (Samsonov *et al.* (2004), in *Xenopus* Embryon Neuronen) und $t_{1/2} = 1733$ s, dies würde einer Dissoziation von nur einem Tau-Molekül in 42 Minuten entsprechen (Ross *et al.* (2004), 5 μM eingesetzt, Tubulin:Tau 1:1). Allen diesen Studien ist gemein, dass sie von einer ausschließlich stationären Bindung zwischen Tau und Mikrotubuli ausgehen.

Erst kürzlich erschienenen Studien, die sich *in vivo* mit der Mobilität der Verteilung von fluoreszenzmarkiertem Tau beschäftigten. Konzack *et al.* (2007) untersuchten die Verteilung von fluoreszenzmarkiertem Tau auf Mikrotubuli in Vero-Zellen. Die Regeneration der Fluoreszenz nach forciertem Ausbleichen von Tau wurde dort als Kombination von Diffusion von Tau im Zytoplasma mit Bindung von Tau an die Mikrotubuli interpretiert. Für die Gesamtheit an Tau ein Diffusionskoeffizient von 3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt. Weissmann *et al.* (2009) ermittelt mittels photoaktivierbarem GFP-Tau die Verteilung von Tau entlang der Neuriten von PC12 Zellen und konnten ebenfalls einen Diffusionskoeffizienten für die Verteilung bestimmen (0,8 $\mu\text{m}^2/\text{s}$). In beiden beschriebenen Arbeiten bleibt unklar, ob die Diffusion im Zytoplasma oder auf der Mikrotubuli-Oberfläche stattfindet. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Varianten ist bei *in vivo* Experimenten, wie sie in den beschriebenen Arbeiten durchgeführt wurden, technisch jedoch auch nicht möglich. Die in den oben genannten Veröffentlichungen ermittelten Diffusionskoeffizienten lagen höher als der in dieser Arbeit bestimmte. Der bei Konzack *et al.* (2007) und Weissmann *et al.* (2007) ermittelte Diffusionskoeffizient ist wahrscheinlich ein Mittelwert aus dem frei (und vermutlich schneller) im Plasma diffundierenden Tau-Molekülen und solchen, die entlang von Mikrotubuli diffundieren. Als weiterer Faktor, der den höheren Diffusionskoeffizienten erklären könnte, ist die höhere zelluläre Ionenstärke zu berücksichtigen. In den hier durchgeführten Messungen lag sie bei 30 mM, in Zellen um 150 mM.

Seitz *et al.* (2002) und Dixit *et al.* (2008) untersuchten Tau ebenfalls *in vitro* mittels TIRF-Mikroskopie. In beiden Publikationen wurde jedoch keine Mobilität von Tau auf den Mikrotubuli beobachtet. Allerdings wurde von diesen Autoren als Minimum 1 nM Tau auf 50

nM Mikrotubuli eingesetzt. Bei dieser Konzentration ist der Bedeckungsgrad der Mikrotubuli schon so hoch, dass in unserem Ansatz die Beobachtung einzelner Moleküle nicht mehr möglich war. Allerdings lag der Schwerpunkt beider Studien auch nicht, wie in dieser Arbeit, auf der Untersuchung individueller Tau-Moleküle.

Diffusion als prinzipielle Möglichkeit der Verteilung entlang des Mikrotubuli-Gitters ist nicht neu. So wurde z.B. die Diffusion eines Kinesins entlang des Mikrotubuli-Gitters von Helenius *et al.* (2006) beschrieben. In dem dort vorgeschlagenen Modell soll Kinesin-13 (MCAK) nach Bindung an die Mikrotubuli-Oberfläche durch die Diffusion schneller zu den Enden der Mikrotubuli finden, wo es dann aktiv zum Abbau der Mikrotubuli beiträgt. Der für MCAK ermittelte Diffusionskoeffizient entlang von Mikrotubuli war mit $0,38 \mu\text{m}^2/\text{s}$ dem hier ermittelten recht nahe. Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsaufbau ist dem von Helenius *et al.* (2006) ebenfalls sehr ähnlich. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Unterschied zwischen den *in vivo* und *in vitro* ermittelten Diffusionskoeffizienten tatsächlich auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen ist. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen mit Tau zeigen, dass gerichtete Diffusion möglicherweise eine generell genutzte Möglichkeit ist, gebundene Proteine über da Mikrotubuli-Gitter zu verteilen.

Eine ähnliche Diffusion entlang eines strukturellen Gitters wurde für basenpaar-spezifische DNA-bindende Proteine beschrieben. Diese erreichen durch eindimensionale Diffusion entlang der DNA schneller ihre Zielsequenz, als es durch diffusions-limitierte Bewegung in der Lösung der Fall wäre. Die Reduktion von drei- auf eindimensionale Diffusion beschleunigt also das Erreichen des Zielortes (Halford und Marko (2004)). Zudem ist auf kurzen Strecken, bis etwa $1 \mu\text{m}$, Diffusion auch schneller als ein aktiver Transport (vgl. Abb. 3.3). Ein weiterer Nutzen der Diffusion kann die Erhöhung der Anzahl an produktiven Bindungen an die Mikrotubuli sein: Für MCAK wirkt der Mikrotubulus als eine Art Antenne. Durch die Diffusion ermöglicht auch die Bindung in der Nähe des Mikrotubulus-Endes das Erreichen vom Funktionsort, somit führen mehr Bindungen zum favorisierten Ergebnis. Ähnliches ist auch für Tau denkbar. Die Diffusion ermöglicht eventuell das schnellere Erreichen von Bereichen auf den Mikrotubuli, die stabilisiert werden sollen. So fanden Samsonov *et al.* (2004), dass Tau sich besonders stark an gekrümmten Bereichen der Mikrotubuli anreichert. Änderte sich die Mikrotubuli-Krümmung z.B. bei Zellwachstum, so passte sich die Verteilung von Tau an die veränderte Lage an. Der Mechanismus hierfür blieb aber unklar.

Anschließend an die bisher beschriebenen Ergebnisse stellte sich die Frage, wie die Bindung und die Diffusion von Tau vermittelt wird und ob ein Bindungspartner für Tau auf der Mikrotubulus-Seite identifiziert werden könnte. Um diese Frage zu klären, wurde die Abhängigkeit der Tau-Diffusion von der Salzkonzentration und vom Tubulin C-Terminus

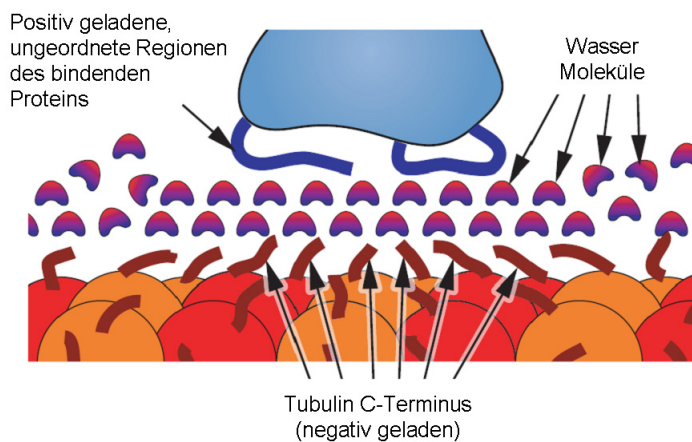


Abbildung 4.1: Mikrotubuli-bindende Proteine können auf der Mikrotubuli-Oberfläche diffundieren

Eine oder mehrere Schichten aus Wassermolekülen vermitteln die elektrostatische Interaktion zwischen Mikrotubulus-assoziiertem Protein (blau) und Mikrotubulus (rot-orange).
Verändert nach Cooper und Wordeman (2009).

untersucht. Schon 20 mM KCl waren ausreichend, um die Bindung und Diffusion von Tau an Mikrotubuli zu unterbinden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der Tubulin C-Terminus essentiell für diese elektrostatische Interaktion ist. Es kann daher angenommen werden, dass die Diffusion durch Interaktion zwischen positiven Aminosäuren auf Seiten des Tau-Moleküls und dem negativ geladenen C-Terminus von Tubulin vermittelt wird. Cooper und Wordemann (2009) entwickelten ein Modell, das sich allgemein mit der Diffusion entlang des Mikrotubuli-Gitters und den Voraussetzungen sowie Folgen beschäftigt. In diesem Modell spielen die C-Termini von Tubulin eine wesentliche Rolle. Die negativ geladenen, flexiblen C-Termini der Mikrotubuli bewirken die Ausbildung einer „Mikrotubuli-Domäne“. An diese können Mikrotubuli-assoziierte Proteine elektrostatisch binden und unterstützt von vermittelnden Wasser-Molekülen entlang gleiten (Abb. 4.1). Durch die hohe Flexibilität der C-Termini gibt es kaum energetische Unterschiede zwischen den einzelnen Tubulin-Monomeren. Dies gilt auch für den Übergang von einem Protofilament zum nächsten. Die in dieser Arbeit ermittelten und nicht konzentrationsabhängigen Parameter Diffusionsdauer und der End-zu-Endabstand der Diffusionsbewegungsbahnen unterstützen dieses Modell der „Mikrotubuli-Domäne“. Für den End-zu-End-Abstand war vor Beginn der Arbeit erwartet worden, dass dieser mit zunehmender Tau-Konzentration auf den Mikrotubuli kürzer wird. Je mehr Tau-Moleküle auf einem Mikrotubulus binden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese auf demselben Protofilament um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren. Kann Tau das Protofilament nicht verlassen, sollte ein kürzerer End-zu-End-Abstand (durch „Anstoßen“ an andere Tau-Moleküle) oder eine verkürzte Diffusionsdauer (durch Dissoziation mangels Bindungsplatz) zu beobachten sein. Es wurde jedoch weder das eine, noch das andere beobachtet. Der End-zu-End-Abstand blieb im Mittel bei 3065 +/- 134 nm, die Diffusionsdauer bei 15,3 +/- 1,1 s (jeweils +/- SEM). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Tau-Moleküle die Protofilamente wechseln können. Dies unterstützt das Modell von Cooper und Wordeman (2009). Zur weiteren Untersuchung des Interaktionspartners auf Seiten des Tau-Moleküls ist die Verwendung eines Konstruktes z.B. ohne Mikrotubuli-Bindungsdomänen denkbar (ähnlich Seitz *et al* (2002), Tau-Konstrukt K23). Dadurch könnte

der bei der Diffusion interagierende Bereich des Tau-Moleküls eingegrenzt und die Art der Interaktion genauer beschrieben werden.

Für Tau wurden bisher zwei verschiedene Bindungsstellen auf den Mikrotubuli mittels Cryo-Elektronenmikroskop-Aufnahmen beschrieben (Kar *et al.* (2003), Al-Bassam *et al.* (2002)). Eine Bindungsstelle liegt auf β -Tubulin, überlappend mit der Taxol-Bindungsstelle (Nogales *et al.* (1998), Amos und Löwe (1999)). Sie zeigt zur inneren Oberfläche der Mikrotubuli. Es wird angenommen, dass die Bindung von Tau an diese Bindungsstelle zu einer quer zur Mikrotubulus-Achse verlaufenden Bindung von Tau an Mikrotubuli führt. Diese Bindungsstelle ist jedoch nur zugänglich, wenn Tau schon bei der Polymerisation von Mikrotubuli anwesend ist. Außerdem können die hier gebundenen Tau-Moleküle nicht gegen Moleküle in der umgebenden Lösung ausgetauscht werden (Kar *et al.* (2003), Makrides *et al.* (2004)). Die zweite Bindungsstelle liegt auf der äußeren Oberfläche der Mikrotubuli, zur umgebenden Lösung gerichtet. Die Bindung erfolgt vermutlich parallel entlang der Protofilamente und Tau interagiert mutmaßlich mit dem C-Terminus der Tubulin-Monomere (Al-Bassam *et al.* (2002)). Andere Studien finden ebenfalls eine Bindung auf der äußeren Oberfläche, jedoch ohne deutliche räumliche Eingrenzung. Der Hauptbindungsort wurde allerdings an α -Tubulin ermittelt (Santarella *et al.* (2004)).

Die äußere Bindungsstelle hat wichtige Eigenschaften, die sich mit den für die Diffusion ermittelten decken. Die gebundenen Tau-Moleküle können ausgetauscht werden, und die C-Termini von Tubulin sind an dieser Interaktion beteiligt. Dass die Position von Tau auf der äußeren Oberfläche nicht präzise einer bestimmten Position zugeordnet werden konnte (Santarella *et al.* (2004)), passt ebenfalls gut zu einem diffundierenden Molekül. Die innere Bindungsstelle kommt schon deswegen nicht für die hier beobachtete Diffusion in Frage, da die an eine solche Bindungsstelle gebundenen Moleküle nicht mit denen in der Lösung austauschen können (Makrides *et al.* (2004)). In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten konnte jedoch deutlich ein Binden und Dissoziieren von Tau beobachtet werden.

Für die äußere Bindungsstelle wurden zusätzlich zwei verschiedene Bindungsphasen beschrieben (Ackmann *et al.* (2000)). Eine sättigbare Phase, die eine begrenzte Anzahl Bindungsplätze beinhaltet, an die Tau mit hoher Affinität gebunden werden kann, und eine nicht sättigbare Phase, ohne definierte Anzahl von Bindungsplätzen, an die Tau mit niedrigerer Affinität gebunden werden kann. In dieser Arbeit wurden neben den mobilen Tau-Molekülen auch 40-50% stationäre Tau-Moleküle beobachtet. Da sie stationär sind, haben sie wahrscheinlich eine hohe Affinität und scheinen daher an die definierten Bindungsstellen zu binden. Die mobilen Tau-Moleküle haben wahrscheinlich eine geringere Affinität und

binden nicht an definierte Plätze. Dies deckt sich erneut mit den Überlegungen von Cooper und Wordeman (2009).

Vielen der hier erwähnten Experimente ist gemein, dass die Mikrotubuli während der Experimente durch Taxol stabilisiert wurden. Die Rolle von Taxol wird jedoch teilweise kritisch in der Literatur diskutiert (Kar *et al.* (2003), Makrides *et al.* (2004)). Taxol stabilisiert Mikrotubuli in dem es den Abbau, die sogenannte Katastrophe, verhindert bzw. deutlich verlangsamt. Dabei bindet es nur an β -Tubulin, an eine Bindungsstelle, die der inneren Oberfläche zugewandt ist (Nogales *et al.* (1998), Amos und Löwe (1999)). Die Bindung führt interessanterweise zu einer erhöhten Flexibilität der Mikrotubuli (Dye *et al.* (1993), Felgner *et al.* (1997)). Auch bei den hier präsentierten Ergebnissen war stets Taxol bei den Messungen anwesend. Daher ist ein möglicher Einfluss von Taxol auf die hier gezeigten Ergebnisse zu diskutieren. Kar *et al.* (2003) berichteten, dass bei Zugabe von 20 μ M Taxol zu 10 μ M Mikrotubuli 12% weniger einer Tau-Isoform mit vier Mikrotubulibindungsregionen (MTBR) binden konnten als ohne Taxol. Samsonov *et al.* (2004) fanden sogar, dass die Zugabe von nur 1 μ M Taxol zu Tau-GFP exprimierenden *Xenopus* Zellen nach wenigen Minuten zu einer nahezu vollständigen Dissoziation von Tau-GFP von den Mikrotubuli führte. Für die Bindung von Tau an vorab polymerisierten Mikrotubuli fanden Makrides *et al.* (2004) allerdings keinen Unterschied zwischen solchen Mikrotubuli, die in An- oder Abwesenheit von Taxol polymerisiert wurden. Ein vergleichbares Ergebnis fanden auch Ross *et al.* (2004). An- oder Abwesenheit von Taxol während der Mikrotubuli-Polymerisation und/oder während der Messung der Tau-Dissoziation von Mikrotubuli bewirkte dabei keine Änderung der ermittelten Dissoziationskonstante. Erst kürzlich wurde zudem beschrieben, dass eine Tau-Isoform mit vier MTBR den Effekt von Taxol auf die Flexibilität von Mikrotubuli wieder rückgängig machen oder zumindest maskieren kann (Peck *et al.* (2011)). Da in dieser Arbeit ebenfalls mit einer Tau-Isoform mit vier MTBR gearbeitet wurde, und die hier verwendete Methode zur Polymerisation von Mikrotubuli der von Ross *et al.* (2004) sehr ähnlich ist, ist ein Einfluss des verwendeten Taxols auf die ermittelten Ergebnisse eher unwahrscheinlich. Jedoch sollten die Ergebnisse mit Mikrotubuli, die nicht Taxol-stabilisiert sind, wiederholt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Tau nicht, wie bisher allgemein angenommen, ausschließlich stationär an Mikrotubuli gebunden ist, sondern zwei verschiedene Komponenten zeigt, eine stationäre und eine mobile. Die Mobilität wird über über elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Tau und Mikrotubuli vermittelt, die wahrscheinlich auf der Interaktion zwischen den positiv geladenen MTBR von Tau und dem negativ geladenen C-Terminus von Tubulin beruhen. Damit ergibt sich auch ein neuer Aspekt für den Transport von Tau. Der vermutete Transport von Tau durch Kinesin wäre unter pathologischen Bedingungen nicht mehr oder nur sehr eingeschränkt möglich. Durch

die Diffusion von Tau ergibt sich eine Möglichkeit die Diskrepanz zwischen gestörtem axonalem Transport und trotzdem gleichmäßig verteiltem Tau zu erklären. Laut den Ergebnissen dieser Arbeit scheint eine „nicht-aktive“ Verteilung von Tau entlang des Axons durch gerichtete Diffusion mittels elektrostatischer Interaktion von Tau mit den Mikrotubuli möglich zu sein.

4.2 Beeinflussung von Kinesin durch Tau

Neben der Frage wie sich Tau im pathologischen Fall in der Zelle verteilt, stellte sich auch die Frage, auf welchem Mechanismus die beobachtete Blockade des Kinesin-abhängigen axonalen Transports durch Tau beruht. Da eine dynamische Interaktion von Tau und Mikrotubuli schon beschrieben worden war, schien das von Bass und Qiang (2005) und Dixit *et al.* (2008) zu Grunde gelegte Blockade-Modell zumindest fraglich. Daher wurde anschließend an die Charakterisierung der Tau-Diffusion die Interaktion von Tau und Kinesin untersucht, um zu überprüfen, ob eine Interaktion zwischen Tau und Kinesin auch unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen gezeigt werden kann. Alle bisherigen Studien gingen von ausschließlich stationär an Mikrotubuli gebundenen Tau-Molekülen aus. In dieser Arbeit konnte jedoch zusätzlich die Diffusion von 50-60% aller Tau-Moleküle entlang des Mikrotubuli-Gitters beschrieben werden. Unter Umständen führt dies dazu, dass mit den hier gewählten Bedingungen keine oder eine andere Interaktion mit Kinesin auftritt. Dies würde bedeuten, dass die Tau-Diffusion zwar eine theoretische Fähigkeit der Tau-Moleküle ist, aber biologisch keine Relevanz hat, da *in vivo* eine Störung der Kinesin-Funktion zu finden ist. Kann hingegen unter den Tau-Diffusions-Bedingungen auch eine Störung der Kinesin-Funktion nachgewiesen werden, sollte die neu entdeckte Tau-Eigenschaft bei den Überlegungen zur Interaktion von Tau und Kinesin mit herangezogen werden.

Wie schon im Ergebnissteil dargestellt, konnte in dieser Arbeit eine Beeinflussung der Kinesin-Aktivität durch Tau direkt nachgewiesen werden. Der verwendete Konzentrationsbereich ging von 0,5 nM bis 18,75 nM Tau (auf 50 nM Mikrotubuli). Bis zu einer Konzentration von 10 nM wurde die Diffusion von Tau direkt gezeigt und keine Veränderung der Diffusionsparameter festgestellt (vgl. Abb. 3.4). Bei höheren Tau-Konzentrationen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Eigenschaften von Tau verändern.

Die Bindungsfrequenz und die Lauflänge von Kinesin wurden deutlich durch Tau vermindert. Sie nahm von rund 40 auf 8 Kinesin-Moleküle* μM^{-1} * μm^{-1} * s^{-1} bzw. von rund 3300 auf 1300 nm ab. Die Geschwindigkeit blieb dabei unverändert, im Mittel 425,8 +/- 3,4 nm/s (+/- SEM, n=3161). Die bei Anwesenheit von 2,94 nM Tau ermittelte Geschwindigkeit zeigt zwar verglichen mit den anderen Werten eine relativ große Abweichung, jedoch kommt diese

höchstwahrscheinlich durch die geringere Anzahl an analysierten Kinesin-Molekülen zu Stande (n=160).

Der Effekt von Tau auf den Mikrotubuli-abhängigen Transport wurde in der Vergangenheit vielfach untersucht, um ein besseres Verständnis der Vorgänge in erkrankten Zellen zu erhalten, da bei Morbus Alzheimer der Transport in den Nervenzellen gestört ist und eine Erhöhung der Tau-Konzentration als mögliche Ursache diskutiert wird (Khatoun *et al.* (1992), Mandelkow *et al.* (2003)).

Eine Überexpression von Tau führte zu einer gestörten Zellfunktion und einer erhöhten Anfälligkeit der Zelle gegen oxidativen Stress (Stamer *et al.* (2002), Ebner *et al.* (1998)). Die Beobachtung von Vesikeln und Organellen, die entlang der Mikrotubuli transportiert wurden, ergab eine hauptsächliche Inhibition des zum Mikrotubuli Plus-Ende gerichteten Transports (Ebner *et al.* (1998)), Trinczek *et al.* (1999), Stamer *et al.* (2002), Mandelkow *et al.* (2004)). Die beobachteten Resultate einer erhöhten Tau-Konzentration beruhen daher höchstwahrscheinlich auf einer Störung des Kinesin-abhängigen Transport entlang von Mikrotubuli, da der zum Plus-Ende gerichtete Transport vor allem von Kinesin-Molekülen vermittelt wird. Dabei wurde festgestellt, dass die Störung zwei verschiedene Aspekte hat. Zum einen war die Bindung von Kinesin an Mikrotubuli stärker gestört als die von Dynein (Trinczek *et al.* (1999), Stamer *et al.* (2002)). Dies resultierte in einer Netto-Abnahme der Anzahl der zum Plus-Ende transportierten Vesikel. Für diesen Effekt scheint die Anwesenheit der Projektionsdomäne von Tau notwendig zu sein, da eine Überexpression eines Konstrukts ohne Projektionsdomäne diesen Effekt nicht zeigte (Trinczek *et al.* (1999)). Zum anderen wurde in einigen Studien auch eine reduzierte Lauflänge (sowohl für Kinesin als auch Dynein) als Resultat auf die Tau-Überexpression ermittelt (Mandelkow *et al.* (2004), Trinczek *et al.* (1999)). Hierbei konnte der gleiche Effekt auch mit Tau-Konstrukten ohne Projektionsdomäne erzielt werden; vermutlich ist die Bindung von Tau mittels der Mikrotubulibindungsregionen (MTBR) ausreichend. Allen *in vivo* Studien gemein ist die unveränderte Geschwindigkeit der beobachteten Vesikel bzw. Organellen.

Neben den Studien, die den Effekt mittels Überexpression in Zellen untersuchten, gab es auch zwei Studien, die Tau zu Axonplasma aus Tintenfisch-Axonon hinzufügten. Im Gegensatz zu den Studien in Zellen, wurde dabei kein direkter Einfluss von Tau auf den schnellen axonalen Transport gefunden (Morfini *et al.* (2007), LaPointe *et al.* (2009)).

Bei *in vivo* Studien kann jedoch keine definitive Aussage über die Tau-Konzentration in den Zellen gemacht werden, ferner wurden in keinem Fall Kinesin-Moleküle direkt beobachtet. Daher ist ein direkter Vergleich der *in vivo*-Studien mit den auf Einzelmolekülebene ermittelten Daten schwierig. Eine genauere Diskussion der hier ermittelten Werte ist deshalb nur mit den Arbeiten von Seitz *et al.* (2002) und Dixit *et al.* (2008) sinnvoll, die beide den

Einfluss von Tau ebenfalls auf Einzelmolekülebene untersuchten. Der große Vorteil der *in vitro* Experimente ist, dass die Konzentrationen aller beteiligten Proteine genau bekannt und auch frei wählbar sind. So ist mittels *in vitro* Messungen neben einer qualitativen auch eine quantitative Aussage über den Effekt von Tau auf Kinesin möglich.

Die beiden erwähnten Studien von Seitz *et al.* (2002) und Dixit *et al.* (2008) finden im Einklang mit den *in vivo* Experimenten (vgl. oben) keine veränderte Geschwindigkeit von Kinesin und eine Abnahme der Bindung von Kinesin an Mikrotubuli bei Anwesenheit von Tau. Bei den ermittelten Lauflängen des Kinesin unterscheiden sich die beiden Studien jedoch. Seitz *et al.* (2002) findet keine Veränderung, Dixit *et al.* (2008) hingegen findet eine verkürzte Lauflänge in Gegenwart von Tau. Dieser Effekt tritt hier allerdings vor allem bei Verwendung der kürzesten Tau-Isoform auf, bei der längsten Isoform ist er weniger stark ausgeprägt.

In dieser Arbeit wurde analog zu Seitz *et al.* (2002) und Dixit *et al.* (2008) ebenfalls eine gleichbleibende Geschwindigkeit ermittelt. Diese war erwartet worden, da neben den oben genannten alle bisher veröffentlichten Studien dies ebenso beschrieben (Ebner *et al.* (1998), Trinczek *et al.* (1999), Stamer *et al.* (2002), Mandelkow *et al.* (2004)). Dass eine erhöhte Tau-Konzentration zu einer Reduktion der Bindungsfrequenz und der Lauflänge führt, deckt sich ebenfalls im Großen und Ganzen mit den meisten der oben genannten Studien.

Seitz *et al.* (2002) ermittelten wie oben erwähnt im Gegensatz zu den hier präsentierten Daten keine Abnahme der Lauflänge bei Messungen mit derselben Isoform (hTau40), sie blieb konstant bei etwa 1600 nm. Die Ursache für diesen Unterschied könnte darin liegen, dass Seitz *et al.* (2002) während der Messungen dem Puffer kein Tau zugegeben hatten. Dies kann netto in einer Dissoziation von einem Teil der Tau-Moleküle führen, da die Tau-Dissoziation nur ungenügend durch neue Tau-Bindung ausgeglichen werden konnte. Daher könnte die Anzahl der tatsächlich während der Messung auf dem Mikrotubulus vorhandenen Tau-Moleküle geringer gewesen sein als angenommen. Dixit *et al.* (2008) berichteten zwar eine Abnahme der Lauflänge, jedoch in deutlich geringerem Maße als in dieser Arbeit gefunden. So bewirkten 10 nM hTau40 (ebenfalls auf 50 nM Mikrotubuli) nur eine Reduktion um 16% der Lauflänge (3000 nm auf 2500 nm), wohingegen in dieser Arbeit bei 12,5 nM eine Reduktion um 61% gefunden wurde (3230 nm auf 1260 nm). Ebenfalls auffällig ist, dass die von Dixit *et al.* (2008) ermittelten Werte für die Bindungsfrequenz in Bereichen von nur 1-3 Kinesin-Moleküle* μm^{-1} *s $^{-1}$ * μM^{-1} liegen, selbst ohne Tau. Diese Werte liegen deutlich unter den in dieser Arbeit ermittelten und auch deutlich unter den von Seitz *et al.* (2002) beschriebenen. Diese liegen zwischen 40 und 50 Kinesin-Moleküle* μm^{-1} *s $^{-1}$ * μM^{-1} . Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der von Dixit *et al.* (2008) verwendete Versuchsaufbau, das verwendete Kinesin (K560-GFP, Woehlke *et al.* (1997)) oder eventuell schon vor Tau-

Zugabe mit MAPs behaftetes Tubulin zu den sehr niedrigen Werten führte. Gegen das Kinesin als Ursache für die Abweichung spricht, dass es mit 420 nm/s eine Geschwindigkeit zeigte, die mit der hier ermittelten vergleichbar und nur fünf Aminosäuren länger ist, als das in dieser Arbeit verwendete rK555-GFP. Analog zu den Beobachtungen in dieser Arbeit wurde eine starke Reduktion der Lauflänge außerdem für Experimente in einer Laser-Falle beschrieben (Vershinin *et al.* (2007)). Bei einem vergleichbaren Tau:Tubulindimer-Verhältnis wie bei Dixit *et al.* (2008) wurde die Lauflänge um 60% von ursprünglich 1460nm auf nur 570 nm vermindert. Weder der ermittelte Effekt auf die Lauflängen, noch die Werte für die Bindungsfrequenz von Dixit *et al.* (2008) stimmten mit anderen Veröffentlichungen überein. Daher ist es fraglich, ob die beschriebenen Werte ohne weiteres mit den hier ermittelten verglichen werden können.

Auffällig an der in dieser Arbeit ermittelten Lauflänge von Kinesin war, dass sie nicht kontinuierlich mit steigender Tau-Konzentration sondern in einer Stufe abnimmt. Es konnte leider keine schlüssige Erklärung für diese Beobachtung gefunden werden, so dass die Ursache hierfür unklar bleibt.

Wie schon erwähnt, beschrieben Seitz *et al.* (2002) die Bindungsfrequenz in einer vergleichbaren Größenordnung wie in dieser Arbeit ermittelt. Die maximale Störung der Kinesin-Bindung an Mikrotubuli wurde von Seitz *et al.* (2002) bei einem Verhältnis von 4:1 Tau:Tubulindimer erreicht. Die Bindungsfrequenz reduzierte sich von ursprünglich $46,4 \text{ Kinesin-Moleküle} \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ auf $9,4 \text{ Kinesin-Moleküle} \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$. Eine Reduktion von etwa demselben Ausmaß konnte in dieser Arbeit ermittelt werden. Der minimale ermittelte Wert liegt bei $10 \text{ Kinesin-Moleküle} \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$. Allerdings wurde dieser schon bei einem viel geringeren Tau:Tubulindimer-Verhältnis von 1:4 gemessen. Hier war also eine 16fach geringere Tau-Konzentration ausreichend, um einen vergleichbaren Effekt zu erreichen. Allerdings muss berücksichtigt werden, wie bei der Lauflänge schon erwähnt, dass Seitz *et al.* (2002) während der Messungen dem umgebenden Puffer kein Tau zugesetzt hatten. Dies kann auch für den hier beschriebenen Unterschied zwischen den Daten von Seitz *et al.* (2002) und den in dieser Arbeit präsentierten Daten ursächlich sein. Nicht unerwähnt bleiben darf, dass Seitz *et al.* (2002) die Mikrotubuli unspezifisch auf dem Boden der Messkammer fixiert hatten. Für die hier präsentierten Daten wurden die Mikrotubuli dagegen mittels anti-Tubulin-Antikörper an die Oberfläche gebunden. Dieser erkennt die Region um den Tubulin-C-Terminus. Daher kam es wahrscheinlich bei höheren Tau-Konzentrationen zur Konkurrenz zwischen Antikörper und Tau um die Bindung an den Mikrotubulus. Dies resultierte vermutlich in einer Selektion von weniger stark bedeckten Mikrotubuli gegenüber solchen, die vollständig mit Tau bedeckt waren. Diesen Nachteil hat die von Seitz *et al.* (2002) verwendete unspezifische Bindung nicht. Es kann daher nicht

ausgeschlossen werden, dass bei Bindung der Mikrotubuli an die Oberfläche durch unspezifische Bindung niedrigere Bindungsfrequenzen für Kinesin messbar gewesen wären. Angesichts der zueinander passenden minimalen Werte (9,4 vs. 10 Kinesin-Moleküle* μm^{-1} * s^{-1} * μM^{-1}) der Bindungsfrequenz erscheint dies jedoch recht unwahrscheinlich. Ebenso kann es jedoch nicht den großen Unterschied der benötigten Tau-Konzentration für die Änderung der Bindungsfrequenz erklären.

Die hier ermittelte maximale Reduktion der Bindungsfrequenz bei einem Verhältnis von 1:4 Tau:Tubulindimere liegt passt zu den Daten von Al-Bassam *et al.* (2002) und Ackmann *et al.* (2000). In diesen Arbeiten wurde die maximale Sättigung der Mikrotubuli durch Tau bei einem Tau:Tubulindimer-Verhältnis mit 1:3,8 bzw. 1:5 ermittelt. Dies würde bedeuten, dass selbst bei höheren Tau:Tubulindimer-Verhältnissen es zu keiner nennenswerten Änderung in der Besetzung der Mikrotubuli-Oberfläche mehr kommt. Dies wird durch die hier ermittelten Ergebnisse bestätigt, da es zu keiner weiteren Reduktion der Bindungsfrequenz oberhalb von 1:4 Tau:Tubulindimere kam.

Betrachtet man die beiden Parameter Bindungsfrequenz und Lauflänge zusammen, fällt auf, dass die Bindungsfrequenz schon bei geringen Tau-Konzentrationen einen Effekt zeigte, die Lauflänge jedoch erst bei höheren Tau-Konzentrationen. Dies könnte darauf hindeuten, dass unterschiedliche Mechanismen diese Parameter beeinflussen. Wäre der gleiche Mechanismus die Ursache, sollten Bindungsfrequenz und Lauflänge im selben Konzentrationsbereich verändert werden. Trinczek *et al.* (1999) beobachteten in CHO-Zellen, dass für die Reduktion der Lauflänge von Vesikeln ein Konstrukt ausreichend war, das nur drei MTBR und die flankierende Prolin-reiche Region enthielt (Tau-Konstrukt K35). Zur Reduktion des Flux-Quotienten n_+/n_- (Quotient aus transportierten Vesikeln in Richtung Plus- bzw. Minus-Ende der Mikrotubuli) war K35 jedoch nicht in der Lage, das längere hTau40 allerdings sehr wohl. Der Flux-Quotient verringert sich, wenn die Bindung von Kinesin gestört ist. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass zur Störung der Kinesin-Bindung die Projektionsdomäne notwendig ist, die K35 jedoch fehlt. Die Ergebnisse von Trinczek *et al.* (1999) legen nahe, dass die Projektionsdomäne von hTau40 die Bindungsfrequenz und die Mikrotubulibindungsdomänen die Lauflänge von Kinesin beeinflussen. Die Projektionsdomäne hat dabei vermutlich einen größeren Einflussbereich als die MTBR, da ihr Effekt schon bei weniger hohen Tau-Konzentrationen auftritt.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass Kinesin auch unter den hier gewählten Versuchsbedingungen, bei denen eine stationäre und eine diffundierende Population von Tau auftreten, durch hTau40 beeinflusst wird. Die Interaktion von Tau und Kinesin führt zu ähnlichen Ergebnissen wie in der Literatur beschrieben, im Wesentlichen zu einer Reduktion der Lauflänge und der Bindungsfrequenz von Kinesin. Es stellt sich die Frage, ob die

beobachtete Störung der Kinesin-Funktion auch allein durch den Anteil an stationären Tau-Molekülen erklärt werden kann, oder ob auch die diffundierenden Moleküle einen Einfluss haben könnten. Aus der ermittelten Lauflänge von Kinesin in Abwesenheit von Tau (~3230 nm bei einer Schrittlänge von 8 nm) ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit $P_{\text{kein Tau}}$ für Kinesin am Mikrotubulus gebunden zu bleiben von $e^{-(8/3230)} = 0,9976$ pro Zyklus (Vale *et al.* (1996)). Für die Lauflänge von etwa 1300 nm in Anwesenheit von 2,5 nM Tau ist die Wahrscheinlichkeit $P_{2,5\text{nM Tau}}$ dagegen nur noch 0,9939. Aus einer K_D von 75 nM bei 50 nM Mikrotubuli (Ackmann *et al.* (2000)) ergibt sich, dass bei Anwesenheit von 2,5 nM Tau nur 1 nM tatsächlich am Mikrotubuli gebunden sind (detaillierte Rechnung unter 2.2.11.4). Von diesen 1 nM Tau sind nur etwa 50 % stationär gebunden. Wenn jedes Aufeinandertreffen von Kinesin und einem stationären Tau-Molekül zum Abbruch eines Laufs führen würde, muss $P_{\text{kein Tau}}$ mit der Wahrscheinlichkeit ein Tau zu treffen $1 - (0,5/50) = 0,99$ multipliziert werden, um die neue Wahrscheinlichkeit am Mikrotubulus gebunden zu bleiben, zu berechnen. $P_{1\text{nM Tau berechnet}}$ ist daher $0,9976 * 0,99 = 0,9876$. Dieser Wert ist geringer als der aus der tatsächlich ermittelten Lauflänge berechnete und würde einer Lauflänge von 641 nm bei einer homogenen Verteilung der Tau-Moleküle auf den Mikrotubuli entsprechen.

Aus diesen Überlegungen lassen sich verschiedene Schlüsse ziehen. Zum einen kann ein so simples, starres Blockade-Modell ausgeschlossen werden, wenn Tau homogen entlang der Mikrotubuli verteilt ist. Kinesin ist zwar in der Lage bei einer Blockade das Protofilament zu wechseln, um den Lauf fortsetzen zu können, dabei wäre allerdings eine Reduktion der Geschwindigkeit zu erwarten (Dreblow *et al.* (2008)). Dieses wurde jedoch nicht beobachtet. Daher muss die Störung der Kinesin-Funktion durch Tau durch einen anderen Mechanismus erfolgen, oder die stationären Tau-Moleküle sind nicht homogen entlang der Mikrotubuli verteilt. Dies wurde zum Teil bei den gemachten Messungen beobachtet, jedoch fanden sich keine Mikrotubuli auf denen Bereiche gänzlich ohne gebundenes Tau vorlagen.

Zum anderen zeigt die Berechnung, dass die stationären Tau-Moleküle ausreichend sein können, um die Beeinflussung von Kinesin hervorzurufen. Ein möglicher zusätzlicher Effekt durch die diffundierenden Tau-Moleküle kann allerdings weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Vorstellbar wäre auch ein umgekehrter Effekt der diffundierenden Tau-Moleküle. Durch die Diffusion tritt der Effekt einer erhöhten Tau-Konzentration erst bei einer höheren Konzentration ein, als wenn alle Moleküle stationär wären. Dadurch ist eine höhere Tau-Gesamtkonzentration möglich, ohne die negativen Auswirkungen auf den Transport zu erhöhen.

Es bleibt die Frage, durch welchen Mechanismus oder durch welche Art von Interaktion Tau die Kinesin-Funktion beeinträchtigt. Theoretisch kann der Einfluss von Tau auf die Kinesin durch mehrere Modelle erklärt werden. Es sind für beide beeinflusste Parameter mindestens

zwei Formen der Interaktion mit Tau denkbar: Die Bindungsfrequenz von Kinesin könnte zum einen durch eine sterische Blockierung der Mikrotubuli-Oberfläche und zusätzliche Verringerung der „Attraktivität“ der Mikrotubuli für Kinesin durch Abschirmen der negativen Ladung durch Tau vermindert werden. Dafür spricht, dass Tau mit hoher Affinität an Mikrotubuli binden kann (Ackmann *et al.* (2000), Kar *et al.* (2003), Butner und Kirschner (1991), Goode *et al.* (2000), Makrides *et al.* (2003)). Dies spricht für die Beeinflussung durch stationäre Tau-Moleküle. Zum anderen ist eine (evtl. zusätzliche) Interaktion von Tau mit Kinesin in der Lösung denkbar. Diese könnte Kinesin so blockieren, dass es nicht mehr in der Lage ist, an die Mikrotubuli zu binden. Ein solches Verhalten wurde zwar noch nie beschrieben, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. Bei *in vivo* Untersuchungen konnte bisher (wenn überhaupt) nur die zelluläre Verteilung von Tau beobachtet werden, nicht aber Kinesin. Bei den veröffentlichten *in vitro* Studien, sowie auch in dieser Arbeit, wäre es zwar theoretisch möglich eine Interaktion von Kinesin und Tau zu beobachten, da beide Moleküle einen Fluoreszenzfarbstoff bzw. ein fluoreszierendes Protein tragen. Jedoch ist der Beobachtungsbereich bei der in dieser Arbeit, wie auch z.B. bei Seitz *et al.* (2002) und Dixit *et al.* (2008), verwendeten TIRF-Mikroskopie auf oberflächennahe, fixierte Objekte beschränkt. Sich schnell in Lösung bewegende und dabei interagierende Teilchen ließen sich in den gemachten TIRF-Mikroskop-Ansätzen nicht analysieren.

Da die Lauflänge wie oben erläutert nicht durch eine simple, direkte sterische Behinderung zu Stande kommen kann, müssen andere Interaktionsarten in Betracht gezogen werden. Die Lauflänge von Kinesin und damit die Prozessivität könnte zum einen durch eine direkte, aber nicht final behindernde Interaktion von Tau und Kinesin auf der Mikrotubuli-Oberfläche zu Stande kommen. Untersuchungen zur Kinesin Prozessivität konnten zeigen, dass die Interaktion des Tubulin C-Terminus mit dem Hals-Bereich von Kinesin essentiell ist (Thorn *et al.* (2000)). Da auch Tau mit den Tubulin C-Termini wechselwirkt, könnte es zu einer Konkurrenzsituation kommen, die zu einer verringerten Prozessivität führt. Daneben wäre jedoch auch denkbar, dass Tau durch die Bindung an die Mikrotubuli deren Oberflächenstruktur über einen Bereich von einigen Tubulindimeren verändert. Dadurch könnte ebenfalls die Prozessivität (und damit die Lauflänge) von Kinesin geringer werden, ohne dass Tau und Kinesin notwendigerweise räumlich nahe sind oder miteinander interagieren. Eine solche Veränderung der Mikrotubuli-Struktur durch die Bindung von Tau wurde für ein Verhältnis von 1:200 Tau:Tubulindimere schon beschrieben (Makrides *et al.* (2003)). Die Ergebnisse in dieser Arbeit erstreckten sich über einen Bereich zwischen 1:100 und 1:2,6. Eine Veränderung der Mikrotubuli-Struktur wäre daher als Ursache der Beobachtung denkbar.

Durch die Korrelation der lokalen Tau-Konzentration auf der Mikrotubulus-Oberfläche mit der Bindung und Dissoziation von Kinesin konnte in dieser Arbeit der direkte Einfluss von Tau auf Kinesin nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen Dissoziation (die die stärkste Form der beeinflussten Prozessivität darstellt) sowie Bindung von Kinesin und der lokalen Tau-Konzentration. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktion von Kinesin und Tau, die zu der beobachteten Störung von Kinesin führt, direkt auf dem Mikrotubulus stattfindet. Ferner zeigen die Daten, dass die Dissoziation erst bei einem höherem Tau-Bedeckungsgrad beeinflusst wird, als die Bindung.

4.3 Modell und Ausblick

Der Vergleich der hier gezeigten Ergebnisse mit den bisher berichteten Daten lässt die Frage aufkommen, ob sich ein gemeinsames Modell zur Erklärung der Tau-Mikrotubuli-Interaktion und der Tau-Kinesin-Interaktion entwickeln und ggf. überprüfen lässt. Dazu wurden möglichst viele Ergebnisse aus publizierten Arbeiten mit den in dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnissen kombiniert und das folgende Modell entwickelt:

Da Tau in einer Zelle während der Polymerisation der Mikrotubuli ständig vorhanden ist, kann es die innen liegende Bindungsstelle erreichen und besetzen (Kar *et al.* (2003)). Daher ist davon auszugehen, dass Tau unter physiologischen Bedingungen sehr wahrscheinlich auch oder sogar hauptsächlich auf der inneren Seite der Mikrotubuli gebunden ist. Für Mikrotubuli in Neuriten von PC12-Zellen wurden von Okabe und Hirokawa (1988) gezeigt, dass diese auch in differenzierten Zellen sehr dynamisch sind. Daher wird, sehr wahrscheinlich, stetig neues Tau am Plus-Ende der Mikrotubuli benötigt. Noch vorhandenes freies Tau kann auf der äußeren Mikrotubuli-Oberfläche binden und durch Diffusion schneller die Plus-Enden der Mikrotubuli erreichen, um dort während der Polymerisation an die innere Bindungsstelle binden zu können. Passend dazu beschrieben Black *et al.* (1996) eine erhöhte Tau-Konzentration am Plus-Ende von Mikrotubuli. Diese Theorie der zwei Bindungsstellen findet Bestätigung in der Arbeit von Markides *et al.* (2004), die eine austauschbare und eine nicht-austauschbare Tau-Bindungsstelle beschreiben, wenn Tau während der Mikrotubuli-Polymerisation anwesend ist. Auch Weingarten *et al.* (1975) fand bei der Untersuchung von Mikrotubuli aus Nervengewebe eine nahezu irreversible Tau-Bindung an Mikrotubuli. Bei nahezu allen weiteren in der Literatur beschriebenen Daten wurden Taxol-stabilisierte Mikrotubuli verwendet. Da Taxol kein physiologischer Bestandteil von Nervenzellen ist, kommen die Ergebnisse von Weingarten *et al.* (1975), Kar *et al.* (2003) und Markides *et al.* (2004) der Realität vermutlich am nächsten. Allerdings muss beachtet werden, dass Kar *et al.* (2003) Cryo-Elektronenmikroskopie verwendeten, die keine Methode

unter physiologischen Bedingungen ist und jeweils nur eine Momentaufnahme abbilden und stationäres von dynamischem Verhalten nicht unterscheiden kann.

Die bisherigen Überlegungen bedeuten, dass das meiste des physiologisch vorhandenen Tau nicht auf der Oberfläche der Mikrotubuli bindet (Abb. 4.2 A). Für die Interaktion mit Motorproteinen wie Kinesin ist jedoch höchstwahrscheinlich nur das auf der äußeren Oberfläche gebundene Tau verantwortlich. Bei einer nur geringen Menge an auf der äußeren Oberfläche gebundenem Tau ist dieses vermutlich durch Diffusion so mobil, dass

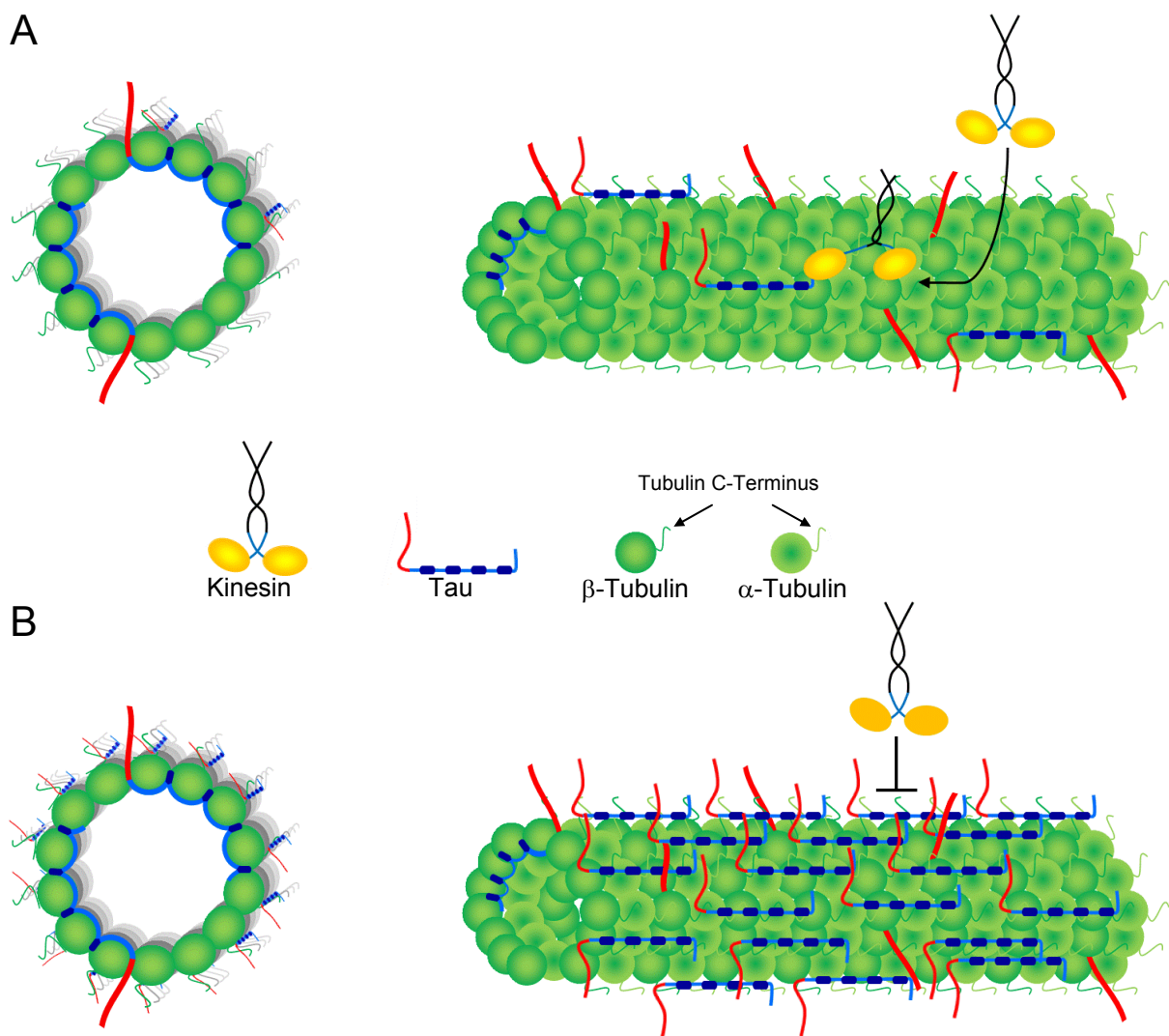


Abbildung 4.2: Physiologische und pathophysiologische Lokalisation und Funktion von Tau

Es ist jeweils der Querschnitt (links) sowie die Seitenansicht (rechts) eines Mikrotubulus dargestellt. Die Tubulinmonomere sind in hell- und dunkelgrün, Kinesin in gelb dargestellt. Die Projektionsdomäne von Tau ist in rot, die Mikrotubulibindungsdomäne in blau gezeigt. Die einzelnen Mikrotubulibindungsregionen sind zusätzlich in dunkelblau abgesetzt. **A** Unter physiologischen Bedingungen ist Tau hauptsächlich an der inneren Oberfläche gebunden (Kar et al. (2003), nur ein geringer Anteil bindet auf der äußeren Oberfläche. Die Kinesin-Funktion ist nicht gestört. **B** Bei pathophysiologischen Bedingungen mit Überexpression von Tau kommt es zur vermehrten Anlagerung von Tau auf der äußeren Oberfläche des Mikrotubulus. Dadurch ist die Funktion von Kinesin gestört.

es noch zu keiner Störung der Kinesin-Funktion kommt. Bei einer neurodegenerativen Erkrankung wie Morbus Alzheimer kommt es zu einer Erhöhung der Tau-Konzentration (Mandelkow *et al.* (2003)). Dieses Tau kann nicht einfach vermehrt an die inneren Bindungsstellen der Mikrotubuli binden. Diese sind zum einen vermutlich schon unter physiologischen Bedingungen weitestgehend besetzt. Zum anderen können leere Bindungsstellen, z.B. in der Mitte eines Mikrotubuli, nicht durch Tau-Moleküle aus der umgebenden Lösung besetzt werden (Makrides *et al.* (2004)). Überschüssiges Tau reichert sich deshalb auf der äußeren Oberfläche der Mikrotubuli an, da es hier die Möglichkeit hat, über die Interaktion mit den C-Termini des Tubulins zu binden. Dieses zusätzlich vorhandene Tau führt schließlich zur Störung der Kinesin-Funktion (Abb. 4.2 B).

Schon relativ geringe Mengen an Tau auf der Oberfläche vermindern jedoch die Bindungsfrequenz von Kinesin an die Mikrotubuli, da Tau durch die Bindung an den C-Terminus des Tubulins die Anzahl der möglichen Bindungsplätze verringert. Zusätzlich kann es durch die, in das umgebende Zytoplasma zeigende, Projektionsdomäne von Tau zu einer sterischen Behinderung von Kinesin kommen, schon bevor dieses die Mikrotubuli-Oberfläche erreicht. Dadurch benötigt ein Kinesin, das aus der Lösung an den Mikrotubulus binden will, mehr Zeit um einen geeigneten Bindungsplatz zu finden. Dies führt dann häufiger zu einer Zurückdiffusion in die Lösung und damit zu einer verringerten Bindungsfrequenz. Die Lauflänge ändert sich erst bei höherer Tau-Konzentration auf der äußeren Oberfläche, da das mit einem Kopf an den Mikrotubulus gebundene Kinesin für die Bindung des zweiten Kopfes eine höhere effektive Mikrotubuli-Konzentration zur Verfügung hat. Dadurch stehen trotz Blockade eines gewissen Prozentsatzes der Bindungsplätze durch Tau effektiv mehr mögliche Bindungsplätze zur Verfügung als bei der initialen Bindung aus Lösung.

Die kürzere Lauflänge und damit die verringerte Prozessivität bei gleichbleibender Geschwindigkeit lassen sich jedoch nicht durch ein einfaches Blockade-Modell erklären. Eine Blockade würde dazu führen, dass Kinesin länger warten müsste, bis ein geeigneter Bindungsplatz durch Wegdiffundieren von Tau frei wird. Oder Kinesin müsste sogar das Protofilament wechseln, um das Hindernis zu umgehen und weiter laufen zu können. Beides würde zu einer Reduktion der Geschwindigkeit führen (Dreblow *et al.* (2008)), welche nicht beobachtet wurde. Eine mögliche Erklärung lässt sich finden, wenn davon ausgegangen wird, dass Tau mit der Koordination der beiden Kinesin-Köpfe interagiert. Dies wurde auch von Trinczek *et al.* (2007) vorgeschlagen.

Der Kinesin-Kopf bindet ohne Nukleotid, mit ATP oder ADP•Pi fest an den Mikrotubulus, mit ADP dagegen nur schwach. Die Koordination der beiden Köpfe gewährleistet normalerweise, dass immer ein Kopf fest an den Mikrotubulus gebunden ist und Kinesin dadurch eine sehr hohe Prozessivität erreicht (Gilber *et al.* (1998)) (Abb. 4.3). Die Tau-Interaktion könnte nun

dazu führen, dass der an den Mikrotubulus gebundene Kopf das gebundene ATP hydrolysiert, das entstehende Phosphat abgibt und so vom Mikrotubulus dissoziiert, bevor der vordere, freie Kopf eine Bindungsstelle am Mikrotubulus gefunden hat (entspricht einem Übergang von C zu A in Abbildung 4.3). Es wird davon ausgegangen, dass dies normalerweise durch die Steuerung des rückwärtigen Kopfes verhindert wird (Hancock und Howard (1999), Crevel *et al.* (2004), Schief *et al.* (2004)). Es wäre allerdings auch denkbar, dass die Tau-Interaktion dazu führt, dass im doppelköpfig gebundenen Zustand von Kinesin die Bindung von ATP an den vorderen nukleotidfreien Kopf nicht verhindert wird und so durch Hydrolyse und Phosphatabgabe ein Zustand entstehen kann, bei dem beide Köpfe ADP enthalten und somit beide dissoziieren können (entspricht einem Übergang von E zu A in Abbildung 4.3). Normalerweise wird dies durch die Steuerung des vorderen Kopfes verhindert. Dabei wird die ATP-Bindung am vorderen gebundenen Kopf durch intramolekulare Spannung verlangsamt (Rosenfeld *et al.* (2003), Uemura und Ishiwata (2003), Block *et al.* (2003)). Für beide Varianten der Steuerung der beiden Kinesin-Köpfe ist

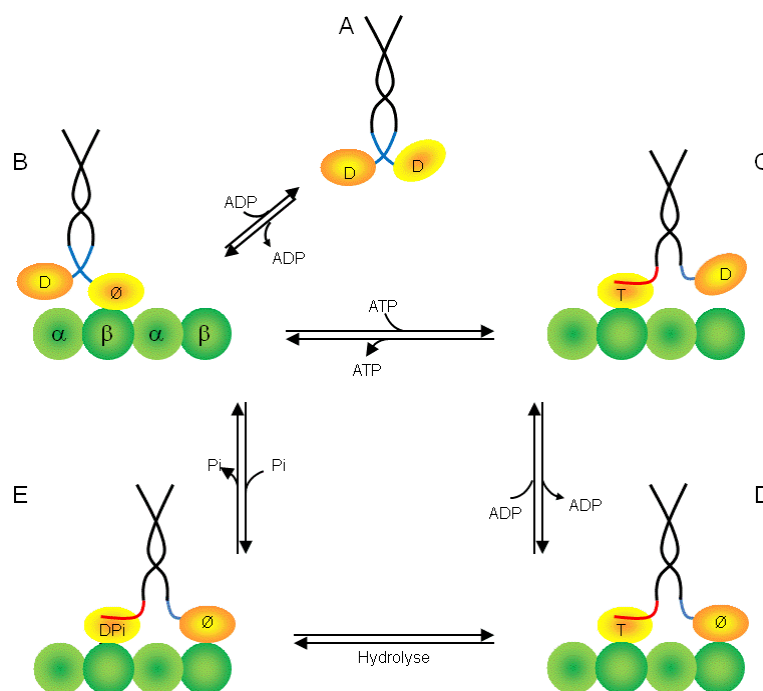


Abbildung 4.3: Mechanochemisches Modell des prozessiven Zyklus von Kinesin

Freies Kinesin in Lösung hat ADP gebunden (A). Durch die Bindung an einen Mikrotubulus (in hell und dunkelgrün dargestellt) erfolgt die Freisetzung von ADP vom nun gebundenen Kopf (B). Durch die Bindung von ATP in die freie Nukleotidtasche des gebundenen Kopfes erfolgt das Docken des „neck-linkers“ (jetzt in rot dargestellt). Dies bringt den freien Kinesin-Kopf in die vordere Position (C). Dadurch wird das Suchen und Finden einer weiteren Bindungsstelle ermöglicht. Auf die Bindung des vorderen Kopfes erfolgt die ADP Freisetzung von diesem. Kinesin ist nun mit beiden Köpfen fest an den Mikrotubulus gebunden (D). Nach der Hydrolyse des ATP im gelb dargestellten hinteren Kopf zu ADP•Pi (E) kommt es zur Freisetzung von Phosphat. Dadurch enthält der hintere Kopf nur noch ADP und ist schwach gebundenen. Der Zyklus kann von neuem beginnen.

eine Interaktion von Tau denkbar, so dass es zu einer reduzierten Kopplung der beiden Köpfe kommt und dadurch die Prozessivität von Kinesin verringert wird.

Shastry und Hancock (2010) simulierten kürzlich den Einfluss von verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten auf die Lauflänge und die Geschwindigkeit von Kinesin-1. Wurde die Geschwindigkeitskonstante der ATP-Bindung an den vorderen Kopf (im doppelköpfig gebundenen Zustand) von $0,02 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Wert für ein Molekül mit intramolekularer Spannung) auf $2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Wert für ein Einzelkopf-Kinesin, ohne intramolekulare Spannung) erhöht, so führte dies zu einem deutlichen Abfall der Lauflänge, jedoch ohne die Geschwindigkeit zu beeinflussen. Dies spiegelt genau die Veränderung der ermittelten Parameter durch die Anwesenheit von Tau wider. Da die postulierte Erhöhung der ATP-Bindungsrate dem Fehlen einer intramolekularen Spannung entspricht, fehlt in diesem Modell die Steuerung des vorderen Kopfes. Sollte dieses Modell der Realität entsprechen, legt dies für die hier ermittelten Daten nahe, dass durch die Interaktion des an die Mikrotubuli gebundenen Tau mit Kinesin die intramolekulare Steuerung des vorderen Kopfes von Kinesin gestört wird. Diese wird durch intramolekulare Spannung vermittelt,

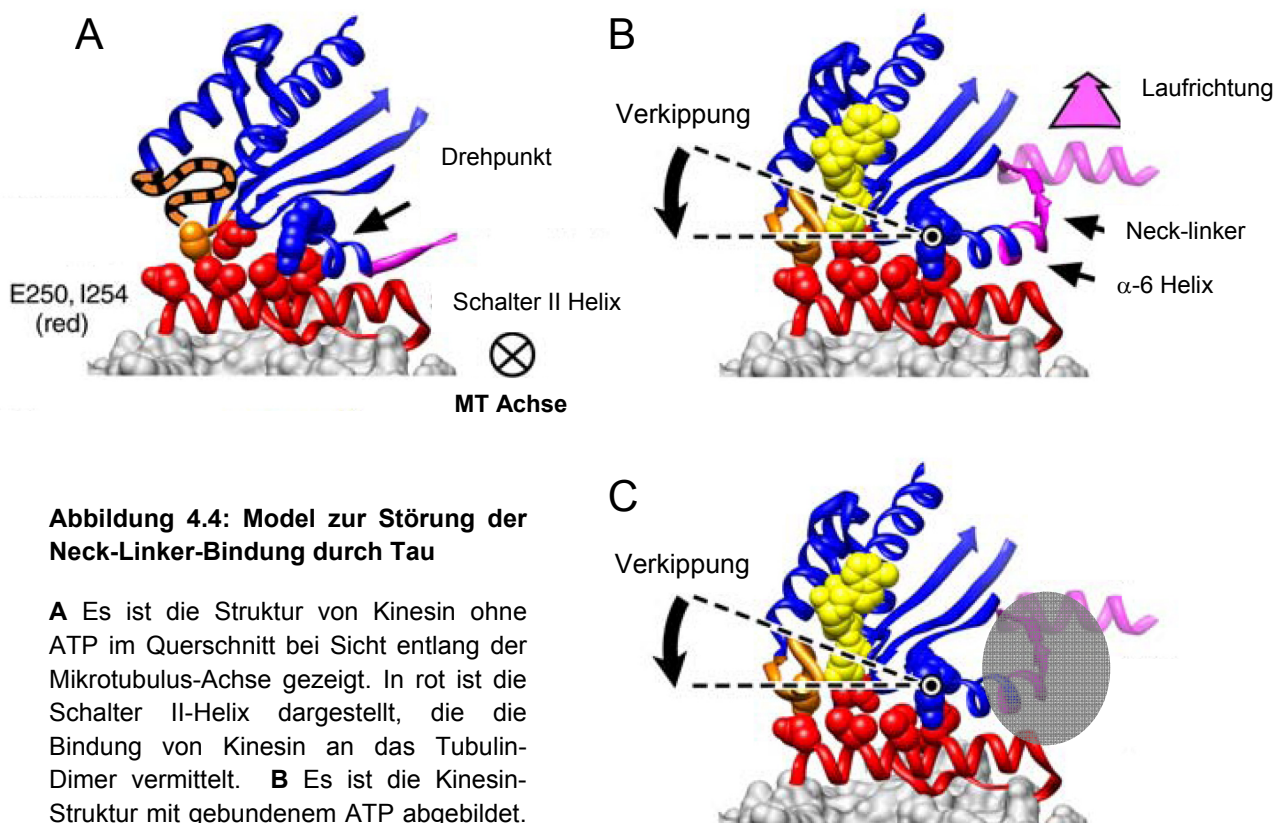


Abbildung 4.4: Model zur Störung der Neck-Linker-Bindung durch Tau

A Es ist die Struktur von Kinesin ohne ATP im Querschnitt bei Sicht entlang der Mikrotubulus-Achse gezeigt. In rot ist die Schalter II-Helix dargestellt, die die Bindung von Kinesin an das Tubulin-Dimer vermittelt. **B** Es ist die Kinesin-Struktur mit gebundenem ATP abgebildet. Deutlich ist die Verkipfung des in blau dargestellten oberen Teils des Kinesin-Kopfes zu erkennen. Dadurch entsteht genug Platz, so dass das Andocken des Neck-Linkers auf die Motordomäne ermöglicht wird. **C** In grau ist der Bereich markiert, an dem Tau mit Kinesin interagieren kann und dadurch zu einer Veränderung der Steuerung des vorderen Kopfes führt. Verändert nach Sindelar und Downing (2010).

vermutlich durch Zug des hinteren Kopfes an dem vorderen Kopf. Es wird angenommen, dass der Zug durch das Andocken des „neck-linkers“ an den hinteren Kopf bei ATP-Bindung zu Stande kommt (Review Schief und Howard (2001)).

In derselben Studie von Shastry und Hancock (2010) wurde auch gezeigt, dass die Einführung von positiver Ladung in den „neck-linker“ zu einer erhöhten Prozessivität von Kinesin führt. Es wird vermutet, dass der „neck-linker“ durch die stärkere positive Ladung stärker mit der negativen Ladung auf der Mikrotubuli-Oberfläche interagieren kann. Bei den in dieser Arbeit gezeigten Daten könnte der umgekehrte Effekt die Ursache für die gestörte Kinesin-Funktion sein. Tau interagiert mit den negativen Ladungen des Tubulin C-Terminus und schirmt diese vermutlich ab. Dadurch oder durch eine sterische Behinderung kann die Interaktion des Kinesin „neck-linkers“ mit dem Mikrotubulus verringert sein. Sindelar und Downing (2010) zeigten kürzlich, dass erst durch die Bindung von ATP und die nachfolgende Verkipfung des Kinesin-Kopfes relativ zum Mikrotubulus genügend Platz für das Andocken des „neck-linkers“ entsteht. Wird diese zugänglich gemachte Region jedoch durch Tau besetzt, ist das Andocken des „neck-linkers“ vermutlich erschwert (Abb. 4.4). Der Zug des hinteren Kinesin-Kopfes auf den vorderen ist dadurch wahrscheinlich geringer. Dies könnte in einer erhöhten ATP-Affinität des vorderen Kopfes (im Zustand mit zwei gebundenen Köpfen) resultieren und damit zu einer gestörten Steuerung des vorderen Kopfes gefolgt von vorzeitiger Dissoziation vom Mikrotubulus führen.

Ist eine gestörte Steuerung des vorderen Kopfes die Ursache für die Verringerung der Lauflänge ohne Änderung der Geschwindigkeit, sollte dieser Effekt bei einer niedrigeren ATP-Konzentration weniger stark ausgeprägt sein. Wenn die Überlegungen zutreffend sind, sollte auch eine erhöhte Ionenstärke dazu führen, dass der Effekt geringer wird. Dabei müsste jedoch gleichzeitig sicher gestellt sein, dass die Menge an gebundenem Tau äquivalent der hier verwendeten bleibt. Ansonsten würde vermutlich eher der Effekt des weniger vorhandenen Tau als der Effekt der höheren Ionenstärke gemessen. Es ist sinnvoll, diese beiden Parameter in weiteren Messungen zu verändern und so ihren Einfluss auf die Kinesin-Funktion zu überprüfen.

Bei sehr hohen Tau-Konzentrationen kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zusätzlich zu einer Bildung von Tau-Clustern auf dem Mikrotubulus kommt. Diese würde dann zusätzlich zu dem Einfluss auf die Steuerung zu einer vermehrten sterischen Behinderung des Transports führen. Dabei könnte es zu einer Bindung der positiv geladenen Mikrotubulibindungsregionen von Tau an die nach außen ragenden, positiv geladenen Projektionsdomänen der innen gebundenen Tau-Moleküle kommen. Zwar wurde bis zu einem Tau:Tubulidimer Verhältnis von 1:5 keine solche Eigenschaft beobachtet, jedoch waren während der Experimente auch keine Tau-Moleküle an die innere Oberfläche gebunden. Es wäre daher sinnvoll zu überprüfen, ob eine solche „Eigen-Bindung“ auftritt,

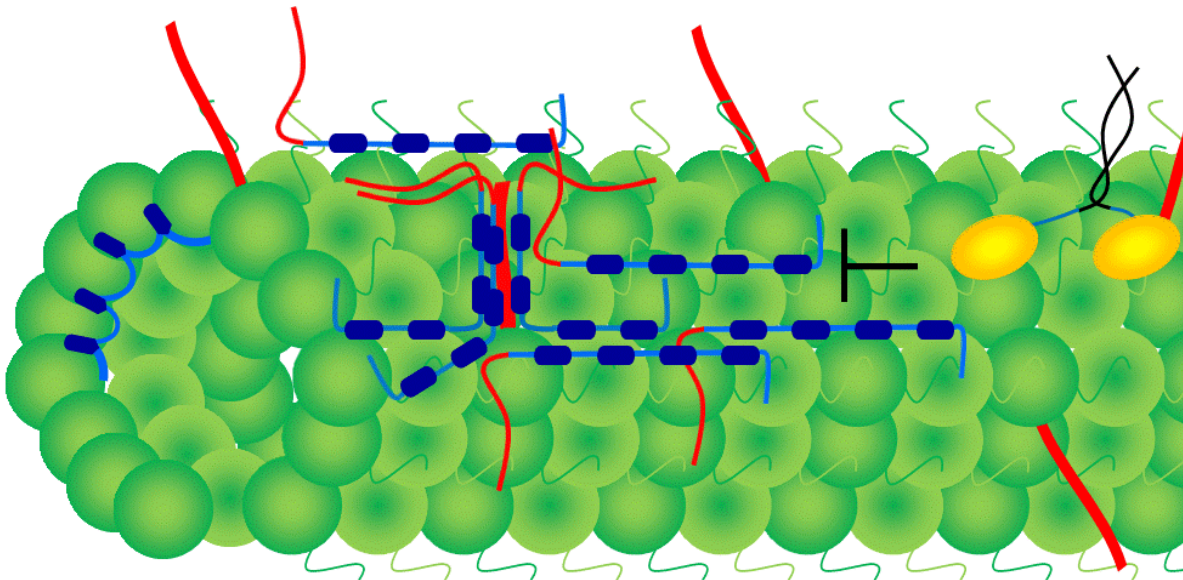


Abbildung 4.5: "Eigen-Bindung" der Mikrotubulibindungsgebiete an die Projektionsdomäne

Auf der äußeren Mikrotubulus-Oberfläche vorhandenes Tau bindet durch positive Ladungen seiner Mikrotubulusbindungsgebiete an die Projektionsdomäne von an die inneren Mikrotubulus-Oberfläche gebundenen Tau-Molekülen. Da die inneren Moleküle nicht mobil sind und dadurch die nach außen ragende Projektionsdomäne einen Ankerpunkt bieten, können sich Cluster aus vielen Tau-Molekülen bilden. Dadurch ist die Kinesin-Funktion gestört. Die Legende der gezeigten Strukturelemente ist bei Abbildung 4.2 zu finden.

wenn Mikrotubuli eingesetzt werden, die in Anwesenheit von Tau polymerisiert wurden und dadurch stationäre Projektionsdomänen auf der äußeren Seite präsentieren (Abb. 4.5).

In dieser Arbeit wurde für ein nicht-Motor-MAP die Diffusion entlang der Mikrotubuli-Achse gezeigt. In jüngerer Zeit wurde für viele Mikrotubuli-assoziierte Proteine ebenfalls berichtet, dass sie entlang des Mikrotubuli-Gitters diffundieren können: Kinesin-1 (Lu *et al.* (2009)), Kinesin-3 (Nitta *et al.* (2004)), Kinesin-5 (Kapitein *et al.* (2008)), Kinesin-13 (Helenius *et al.* (2006)), Kinesin-14 (Furuta *et al.* (2008)) sowie der Dam1-Komplex (Gestaut *et al.* (2008)) zeigten alle auf Einzelmolekülebene Diffusion. Neueste Forschungsergebnisse berichten sogar über die Diffusion von artifiziellen, positiv geladenen Partikeln entlang von Mikrotubuli (Minoura *et al.* (2010)).

Daher kann postuliert werden, dass die Diffusion entlang des Mikrotubuli-Gitters einen generellen Mechanismus für die Verteilung von gebundenen Molekülen auf Mikrotubuli darstellt und für zukünftige Interpretationen von Daten mit berücksichtigt werden muss.

5. Literaturverzeichnis

- Ackmann, M., H. Wiech, and E. Mandelkow. 2000. Nonsaturable binding indicates clustering of tau on the microtubule surface in a paired helical filament-like conformation. *J Biol Chem.* 275:30335-43.
- Aizawa, H., H. Kawasaki, H. Murofushi, S. Kotani, K. Suzuki, and H. Sakai. 1988. Microtubule-binding domain of tau proteins. *J Biol Chem.* 263:7703-7.
- Al-Bassam, J., R.S. Ozer, D. Safer, S. Halpain, and R.A. Milligan. 2002. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol.* 157:1187-96.
- Amos, L.A., and J. Lowe. 1999. How Taxol stabilises microtubule structure. *Chem Biol.* 6:R65-9.
- Amrute-Nayak, M., M. Antognozzi, T. Scholz, H. Kojima, and B. Brenner. 2008. Inorganic phosphate binds to the empty nucleotide binding pocket of conventional myosin II. *J Biol Chem.* 283:3773-81.
- Aronov, S., G. Aranda, L. Behar, and I. Ginzburg. 2002. Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci.* 115:3817-27.
- Axelrod, D. 2001. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic.* 2:764-74.
- Baas, P.W., T.P. Pienkowski, and K.S. Kosik. 1991. Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization. *J Cell Biol.* 115:1333-44.
- Baas, P.W., and L. Qiang. 2005. Neuronal microtubules: when the MAP is the roadblock. *Trends Cell Biol.* 15:183-7.
- Biernat, J., E.M. Mandelkow, C. Schroter, B. Lichtenberg-Kraag, B. Steiner, B. Berling, H. Meyer, M. Mercken, A. Vandermeeren, M. Goedert, and et al. 1992. The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *Embo J.* 11:1593-7.
- Billingsley, M.L., and R.L. Kincaid. 1997. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J.* 323 (Pt 3):577-91.
- Black, M.M., T. Slaughter, S. Moshiach, M. Obrocka, and I. Fischer. 1996. Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J Neurosci.* 16:3601-19.
- Block, S.M., C.L. Asbury, J.W. Shaevitz, and M.J. Lang. 2003. Probing the kinesin reaction cycle with a 2D optical force clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2351-6.
- Block, S.M., L.S. Goldstein, and B.J. Schnapp. 1990. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature.* 348:348-52.
- Brandt, R., and G. Lee. 1993. Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *J Biol Chem.* 268:3414-9.

- Brandt, R., and G. Lee. 1994. Orientation, assembly, and stability of microtubule bundles induced by a fragment of tau protein. *Cell Motil Cytoskeleton*. 28:143-54.
- Brandt, R., J. Leger, and G. Lee. 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol*. 131:1327-40.
- Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte, and P.R. Hof. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*. 33:95-130.
- Butner, K.A., and M.W. Kirschner. 1991. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol*. 115:717-30.
- Chen, J., Y. Kanai, N.J. Cowan, and N. Hirokawa. 1992. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. 360:674-7.
- Cleveland, D.W., S.Y. Hwo, and M.W. Kirschner. 1977a. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol*. 116:227-47.
- Cleveland, D.W., S.Y. Hwo, and M.W. Kirschner. 1977b. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol*. 116:207-25.
- Cooper, J.R., and L. Wordeman. 2009. The diffusive interaction of microtubule binding proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 21:68-73.
- Crevel, I.M., M. Nyitrai, M.C. Alonso, S. Weiss, M.A. Geeves, and R.A. Cross. 2004. What kinesin does at roadblocks: the coordination mechanism for molecular walking. *Embo J*. 23:23-32.
- Desai and Mitchison. „Preparation and Characterization of Caged Fluorescein Tubulin”, *Methods in Enzymology*, 1998[12]
- Dixit, R., J.L. Ross, Y.E. Goldman, and E.L. Holzbaur. 2008. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science*. 319:1086-9.
- Dreblow, K., N. Kalchishkova, and K.J. Bohm. 2008. Kinesin passing permanent blockages along its protofilament track. *Biochem Biophys Res Commun*. 395:490-5.
- Drechsel, D.N., A.A. Hyman, M.H. Cobb, and M.W. Kirschner. 1992. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*. 3:1141-54.
- Drewes, G., A. Ebner, and E.M. Mandelkow. 1998. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci*. 23:307-11.
- Drubin, D.G., S.C. Feinstein, E.M. Shooter, and M.W. Kirschner. 1985. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol*. 101:1799-807.
- Dye, R.B., S.P. Fink, and R.C. Williams, Jr. 1993. Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. *J Biol Chem*. 268:6847-50.
- Ebner, A., R. Godemann, K. Stamer, S. Illenberger, B. Trinczek, and E. Mandelkow. 1998. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol*. 143:777-94.

- Ersfeld, K., J. Wehland, U. Plessmann, H. Dodemont, V. Gerke, and K. Weber. 1993. Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J Cell Biol.* 120:725-32.
- Felgner, H., R. Frank, J. Biernat, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, B. Ludin, A. Matus, and M. Schliwa. 1997. Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J Cell Biol.* 138:1067-75.
- Furuta, K., M. Edamatsu, Y. Maeda, and Y.Y. Toyoshima. 2008. Diffusion and directed movement: in vitro motile properties of fission yeast kinesin-14 Pkl1. *J Biol Chem.* 283:36465-73.
- Gestaut, D.R., B. Graczyk, J. Cooper, P.O. Widlund, A. Zelter, L. Wordeman, C.L. Asbury, and T.N. Davis. 2008. Phosphoregulation and depolymerization-driven movement of the Dam1 complex do not require ring formation. *Nat Cell Biol.* 10:407-14.
- Gilbert, S.P., M.L. Moyer, and K.A. Johnson. 1998. Alternating site mechanism of the kinesin ATPase. *Biochemistry.* 37:792-9.
- Goode, B.L., M. Chau, P.E. Denis, and S.C. Feinstein. 2000. Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease. *J Biol Chem.* 275:38182-9.
- Goode, B.L., and S.C. Feinstein. 1994. Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol.* 124:769-82.
- Gustke, N., B. Trinczek, J. Biernat, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1994. Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry.* 33:9511-22.
- Halford, S.E., and J.F. Marko. 2004. How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res.* 32:3040-52.
- Hancock, W.O., and J. Howard. 1999. Kinesin's processivity results from mechanical and chemical coordination between the ATP hydrolysis cycles of the two motor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:13147-52.
- Helenius, J., G. Brouhard, Y. Kalaidzidis, S. Diez, and J. Howard. 2006. The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends. *Nature.* 441:115-9.
- Hirokawa, N. 1994. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 6:74-81.
- Hong, M., V. Zhukareva, V. Vogelsberg-Ragaglia, Z. Wszolek, L. Reed, B.I. Miller, D.H. Geschwind, T.D. Bird, D. McKeel, A. Goate, J.C. Morris, K.C. Wilhelmsen, G.D. Schellenberg, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 1998. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science.* 282:1914-7.
- Ingram, E.M., and M.G. Spillantini. 2002. Tau gene mutations: dissecting the pathogenesis of FTDP-17. *Trends Mol Med.* 8:555-62.
- Kanai, Y., J. Chen, and N. Hirokawa. 1992. Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *Embo J.* 11:3953-61.
- Kapitein, L.C., B.H. Kwok, J.S. Weinger, C.F. Schmidt, T.M. Kapoor, and E.J. Peterman. 2008. Microtubule cross-linking triggers the directional motility of kinesin-5. *J Cell Biol.* 182:421-8.

- Kar, S., J. Fan, M.J. Smith, M. Goedert, and L.A. Amos. 2003. Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *Embo J.* 22:70-7.
- Khatoun, S., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1992. Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem.* 59:750-3.
- Knops, J., K.S. Kosik, G. Lee, J.D. Pardee, L. Cohen-Gould, and L. McConlogue. 1991. Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol.* 114:725-33.
- Konzack, S., E. Thies, A. Marx, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 2007. Swimming against the tide: mobility of the microtubule-associated protein tau in neurons. *J Neurosci.* 27:9916-27.
- LaPointe, N.E., G. Morfini, G. Pigino, I.N. Gaisina, A.P. Kozikowski, L.I. Binder, and S.T. Brady. 2009. The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity. *J Neurosci Res.* 87:440-51.
- Lee, V.M., M. Goedert, and J.Q. Trojanowski. 2001. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 24:1121-59.
- Levy, S.F., A.C. Leboeuf, M.R. Massie, M.A. Jordan, L. Wilson, and S.C. Feinstein. 2005. Three- and four-repeat tau regulate the dynamic instability of two distinct microtubule subpopulations in qualitatively different manners. Implications for neurodegeneration. *J Biol Chem.* 280:13520-8.
- Lewis, S.A., D.H. Wang, and N.J. Cowan. 1988. Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science.* 242:936-9.
- Little, M., and T. Seehaus. 1988. Comparative analysis of tubulin sequences. *Comp Biochem Physiol B.* 90:655-70.
- Lobert, S., and J.J. Correia. 1992. Subtilisin cleavage of tubulin heterodimers and polymers. *Arch Biochem Biophys.* 296:152-60.
- Lu, H., M.Y. Ali, C.S. Bookwalter, D.M. Warshaw, and K.M. Trybus. 2009. Diffusive movement of processive kinesin-1 on microtubules. *Traffic.* 10:1429-38.
- Makrides, V., M.R. Massie, S.C. Feinstein, and J. Lew. 2004. Evidence for two distinct binding sites for tau on microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:6746-51.
- Makrides, V., T.E. Shen, R. Bhatia, B.L. Smith, J. Thimm, R. Lal, and S.C. Feinstein. 2003. Microtubule-dependent oligomerization of tau. Implications for physiological tau function and tauopathies. *J Biol Chem.* 278:33298-304.
- Mallik, R., and S.P. Gross. 2004. Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol.* 14:R971-82.
- Mandelkow, E., and E.M. Mandelkow. 1995. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 7:72-81.
- Mandelkow, E.M., and E. Mandelkow. 1993. Tau as a marker for Alzheimer's disease. *Trends Biochem Sci.* 18:480-3.
- Mandelkow, E.M., and E. Mandelkow. 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8:425-7.

- Mandelkow, E.M., K. Stamer, R. Vogel, E. Thies, and E. Mandelkow. 2003. Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging*. 24:1079-85.
- Mandelkow, E.M., E. Thies, B. Trinczek, J. Biernat, and E. Mandelkow. 2004. MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J Cell Biol*. 167:99-110.
- Matus, A. 1991. Microtubule-associated proteins and neuronal morphogenesis. *J Cell Sci Suppl*. 15:61-7.
- Mercken, M., I. Fischer, K.S. Kosik, and R.A. Nixon. 1995. Three distinct axonal transport rates for tau, tubulin, and other microtubule-associated proteins: evidence for dynamic interactions of tau with microtubules in vivo. *J Neurosci*. 15:8259-67.
- Minoura, I., E. Katayama, K. Sekimoto, and E. Muto. One-dimensional Brownian motion of charged nanoparticles along microtubules: a model system for weak binding interactions. *Biophys J*. 98:1589-97.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 312:237-42.
- Morfini, G., G. Pigino, N. Mizuno, M. Kikkawa, and S.T. Brady. 2007. Tau binding to microtubules does not directly affect microtubule-based vesicle motility. *J Neurosci Res*. 85:2620-30.
- Murphy, D.B., and G.G. Borisy. 1975. Association of high-molecular-weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72:2696-700.
- Nitta, R., M. Kikkawa, Y. Okada, and N. Hirokawa. 2004. KIF1A alternately uses two loops to bind microtubules. *Science*. 305:678-83.
- Nogales, E., S.G. Wolf, and K.H. Downing. 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. 391:199-203.
- Okabe, S., and N. Hirokawa. 1988. Microtubule dynamics in nerve cells: analysis using microinjection of biotinylated tubulin into PC12 cells. *J Cell Biol*. 107:651-64.
- Peck, A., M.E. Sargin, N.E. LaPointe, K. Rose, B.S. Manjunath, S.C. Feinstein, and L. Wilson. Tau isoform-specific modulation of kinesin-driven microtubule gliding rates and trajectories as determined with tau-stabilized microtubules. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 68:44-55.
- Rosenfeld, S.S., P.M. Fordyce, G.M. Jefferson, P.H. King, and S.M. Block. 2003. Stepping and stretching. How kinesin uses internal strain to walk processively. *J Biol Chem*. 278:18550-6.
- Ross, J.L., C.D. Santangelo, V. Makrides, and D.K. Fygenson. 2004. Tau induces cooperative Taxol binding to microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:12910-5.
- Roy, S., P. Coffee, G. Smith, R.K. Liem, S.T. Brady, and M.M. Black. 2000. Neurofilaments are transported rapidly but intermittently in axons: implications for slow axonal transport. *J Neurosci*. 20:6849-61.
- Samsonov, A., J.Z. Yu, M. Rasenick, and S.V. Popov. 2004. Tau interaction with microtubules in vivo. *J Cell Sci*. 117:6129-41.
- Santarella, R.A., G. Skiniotis, K.N. Goldie, P. Tittmann, H. Gross, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, and A. Hoenger. 2004. Surface-decoration of microtubules by human tau. *J Mol Biol*. 339:539-53.

- Schief, W.R., R.H. Clark, A.H. Crevenna, and J. Howard. 2004. Inhibition of kinesin motility by ADP and phosphate supports a hand-over-hand mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:1183-8.
- Schief, W.R., and J. Howard. 2001. Conformational changes during kinesin motility. *Curr Opin Cell Biol.* 13:19-28.
- Schweers, O., E. Schonbrunn-Hanebeck, A. Marx, and E. Mandelkow. 1994. Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem.* 269:24290-7.
- Seitz, A., H. Kojima, K. Oiwa, E.M. Mandelkow, Y.H. Song, and E. Mandelkow. 2002. Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *Embo J.* 21:4896-905.
- Shastry, S., and W.O. Hancock. Neck linker length determines the degree of processivity in kinesin-1 and kinesin-2 motors. *Curr Biol.* 20:939-43.
- Sillen, A., P. Barbier, I. Landrieu, S. Lefebvre, J.M. Wieruszeski, A. Leroy, V. Peyrot, and G. Lippens. 2007. NMR investigation of the interaction between the neuronal protein tau and the microtubules. *Biochemistry.* 46:3055-64.
- Sindelar, C.V., and K.H. Downing. An atomic-level mechanism for activation of the kinesin molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:4111-6.
- Sloboda, R.D., W.L. Dentler, and J.L. Rosenbaum. 1976. Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro. *Biochemistry.* 15:4497-505.
- Sloboda, R.D., and J.L. Rosenbaum. 1979. Decoration and stabilization of intact, smooth-walled microtubules with microtubule-associated proteins. *Biochemistry.* 18:48-55.
- Stamer, K., R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow, and E.M. Mandelkow. 2002. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol.* 156:1051-63.
- Terry, R.D. 1996. The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55:1023-5.
- Thorn, K.S., J.A. Ubersax, and R.D. Vale. 2000. Engineering the processive run length of the kinesin motor. *J Cell Biol.* 151:1093-100.
- Trinczek, B., A. Ebnet, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1999. Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci.* 112 (Pt 14):2355-67.
- Tucker, R.P. 1990. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Brain Res Rev.* 15:101-20.
- Tytell, M., S.T. Brady, and R.J. Lasek. 1984. Axonal transport of a subclass of tau proteins: evidence for the regional differentiation of microtubules in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:1570-4.
- Uemura, S., and S. Ishiwata. 2003. Loading direction regulates the affinity of ADP for kinesin. *Nat Struct Biol.* 10:308-11.

- Utton, M.A., J. Connell, A.A. Asuni, M. van Slegtenhorst, M. Hutton, R. de Silva, A.J. Lees, C.C. Miller, and B.H. Anderton. 2002. The slow axonal transport of the microtubule-associated protein tau and the transport rates of different isoforms and mutants in cultured neurons. *J Neurosci.* 22:6394-400.
- Utton, M.A., W.J. Noble, J.E. Hill, B.H. Anderton, and D.P. Hanger. 2005. Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. *J Cell Sci.* 118:4645-54.
- Vale, R.D., T. Funatsu, D.W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada, and T. Yanagida. 1996. Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature.* 380:451-3.
- Valiron, O., N. Caudron, and D. Job. 2001. Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci.* 58:2069-84.
- van Holde, Johnson, Ho, Prentice-Hall, Inc., 1998, Teil3, Kapitel 14: Thermodynamics of Transport Processes, S. 572
- Vershinin, M., B.C. Carter, D.S. Razafsky, S.J. King, and S.P. Gross. 2007. Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:87-92.
- Voter, W.A., and H.P. Erickson. 1982. Electron microscopy of MAP 2 (microtubule-associated protein 2). *J Ultrastruct Res.* 80:374-82.
- Wang, L., and A. Brown. 2002. Rapid movement of microtubules in axons. *Curr Biol.* 12:1496-1501.
- Wang, L., C.L. Ho, D. Sun, R.K. Liem, and A. Brown. 2000. Rapid movement of axonal neurofilaments interrupted by prolonged pauses. *Nat Cell Biol.* 2:137-41.
- Wang, Y., P.A. Loomis, R.P. Zinkowski, and L.I. Binder. 1993. A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *J Cell Biol.* 121:257-67.
- Weingarten, M.D., A.H. Lockwood, S.Y. Hwo, and M.W. Kirschner. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:1858-62.
- Weissmann, C., H.J. Reyher, A. Gauthier, H.J. Steinhoff, W. Junge, and R. Brandt. 2009. Microtubule binding and trapping at the tip of neurites regulate tau motion in living neurons. *Traffic.* 10:1655-68.
- Wittmann, C.W., M.F. Wszolek, J.M. Shulman, P.M. Salvaterra, J. Lewis, M. Hutton, and M.B. Feany. 2001. Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science.* 293:711-4.
- Woehlke, G., A.K. Ruby, C.L. Hart, B. Ly, N. Hom-Booher, and R.D. Vale. 1997. Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell.* 90:207-16.
- Yamazaki, H., T. Nakata, Y. Okada, and N. Hirokawa. 1995. KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. *J Cell Biol.* 130:1387-99.
- Yoshida, H., and Y. Ihara. 1993. Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: assembly incompetence of paired helical filament-tau. *J Neurochem.* 61:1183-6.

6. Abkürzungsverzeichnis

MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
TIRF	Totale interne Reflexions Fluoreszenz
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
bzw.	beziehungsweise
DNA	Desoxiribonucleic Acid, Desoxiribonukleinsäure
etc.	et cetera
GTP	Guanodintriphosphat
GDP	Guanodindiphosphat
OD	optische Dichte
Pi	anorganisches Phosphat (PO_4^{3-})
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
a.u.	arbitrary units; frei gewählte Einheiten

7. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Bernhard Brenner für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Institut durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Tim Scholz für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung, Hilfe und Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Vielen Dank an Prof. Dr. Walter Müller für die Übernahme des Koreferats, sowie an PD Dr. Heiner Wolfes und Prof. Dr. Andreas Kirschning für die Begutachtung bzw. Prüfung meiner Arbeit.

Petra Uta möchte ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung im Labor danken. Für die technische Betreuung und Instandhaltung des TIRF-Mikroskops danke ich Torsten Beier.

Wim, Aike und Nils danke ich für eine immer angenehme lustige Atmosphäre, interessante Gespräche und hilfreiche Diskussionen.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die schöne Atmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken, die mich immer gern zur Arbeit kommen ließ.

Meinen Eltern möchte ich für die stete Unterstützung in allen Lebenslagen und ihren Glauben an mich danken.

Ein großer Dank geht an Daniela, die stets mit Zuspruch, Aufmunterung oder auch nur für eine Kaffeepause für mich da war.

Zuletzt möchte ich mich bei Dennis bedanken, der mich über die gesamte Promotionszeit unterstützt, angespornt, an mich geglaubt und in schwierigen Zeiten auch ausgehalten hat. Vielen Dank!

Lebenslauf

Kontaktdaten

Name	Hinrichs
Vorname	Maike
Anschrift	Lutherstr. 48 30171 Hannover Tel. 0511-64207103
Geburtsdatum, -ort	13.02.1981, Hannover
Nationalität	deutsch

Ausbildung

Juni 2000	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Abitur) am Gymnasium Goetheschule, Hannover (Abschlussnote: 1,9)
2000- 2005	Leibniz-Universität Hannover, Diplomstudiengang Biochemie Hauptfach: Biochemie, Nebenfächer: Biophysikalische Chemie und Pharmakologie, Abschluss: Diplom-Biochemikerin (Note: sehr gut)
2005	Diplomarbeit unter Leitung von PD Dr. Mahtab Noubakhsh im Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover, zum Thema „Posttranslationale Modifikationen des Transkriptionsfaktors NRF".
2006-2011	Arbeit an der Promotion zum Thema „Diffusion von Tau auf Mikrotubuli und Auswirkung auf die Kinesin-Funktion" im Institut für Molekular- und Zellphysiologie (Medizinische Hochschule Hannover)

Publikationen

Rump, A. *, Scholz, T. *, Thiel, C., Hartmann, F.K., Uta, P., **Hinrichs, M.H.**, Taft, M.H., Tsiavaliaris, G. (2011) Myosin-1C associates with microtubules and stabilizes the mitotic spindle during cell division. Manuskript akzeptiert bei JCS (ID#: JOCES/2010/084335). (*geteilte Erstautorenschaft)

Poster-Beitrag:

"Myosin-1 Function Extends to Microtubule-Dependent Processes"

Scholz, T., Rump, A., Uta, P., **Hinrichs, M.**, Thiel, C. und Tsiavaliaris, G., 2010, Biophys J. 98(3) pp. 561a

Erklärung zur Dissertation

Gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass meine Dissertation mit dem Titel „Diffusion von Tau auf Mikrotubuli und Auswirkung auf die Kinesin-Funktion“ selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Maike Hinrichs