

**Untersuchungen zur Bindung von 14-3-3-Proteinen
an das Kinesin KIF1B α**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2010

vorgelegt von

Anna-Maria Kovacs

Tag der mündlichen Prüfung:

17. Mai 2010

Dekan

Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter

Prof. Dr. Reiner Lammers

2. Berichterstatter

Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Reiner Lammers in der Inneren Medizin IV am Universitätsklinikum Tübingen (UKT), im Rahmen des Graduiertenkollegs 1302 der DFG.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Reiner Lammers, danke ich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die gute Betreuung und Unterstützung im Laufe der letzten Jahre. Vielen Danke für die Möglichkeit zu einem interessanten Kongress zu fahren und neue Erfahrungen während meines Auslandsaufenthaltes zu sammeln.

Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Häring danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein Interesse an meine Arbeit.

Frau Prof. Dr. Carol MacKintosh danke ich herzlich für die Möglichkeit vier Monate am MRC arbeiten zu können und ihre freundliche Unterstützung und gute Betreuung während dieser Zeit.

Mein Dank geht an die wissenschaftlich tätigen Kollegen und Kolleginnen der Inneren Medizin IV für ihre Diskussionsbereitschaft und den regen Austausch. Ich danke besonders Dr. Mary-Ann Schneider, Martina Melzer, Angelika Hartung, Anna Teske, Julia Dorn und Jan Niederländer für die angenehme Arbeitsatmosphäre und persönliche Unterstützung.

Den Mitgliedern der AG Wesselborg danke ich für den regen Austausch.

Mein größter Dank geht an meine Familie. Ich danke meinem Verlobten Felix Ordelheide für seine Unterstützung, seine unendliche Geduld, gutes Zureden in schwierigen Situationen und nicht zuletzt seine Hilfe bei jeder Art von IT-Problemen. Meinen Eltern danke ich herzlich für ihre finanzielle und persönliche Unterstützung, ohne dich ich das Studium nicht geschafft hätte. Sie haben mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und dafür bin ich ihnen unendlich dankbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Motorproteine.....	1
1.1.1	Kinesine.....	3
1.1.2	Dyneine.....	7
1.2	Das Zytoskelett als Transportsystem für biologische Frachten.....	7
1.3	Bidirektionaler Organelltransport.....	10
1.4	14-3-3-Proteine.....	12
1.5	Signaltransduktion.....	14
1.6	Motorprotein vermittelter Transport von Mitochondrien.....	17
1.7	Zielsetzung.....	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Chemikalien.....	21
2.1.2	Enzyme.....	21
2.1.3	Oligonukleotide.....	21
2.1.4	<i>E. coli</i> Stämme.....	22
2.1.5	Vektoren.....	22
2.1.6	Expressionsvektoren.....	22
2.1.7	Plasmidvektor für RNA-Interferenz.....	23
2.1.8	Zelllinien.....	23
2.1.9	Antikörper.....	24
2.2	Puffer und Stammlösungen.....	25
2.2.1	Molekularbiologie	25
2.2.2	Bakterien-Medien und Platten	26
2.2.3	Zellkulturmedien.....	27
2.2.4	Transfektionslösung.....	27
2.2.5	Proteinbiochemie.....	28
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.3.1	Aufreinigung von Oligonukleotiden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel.....	30

2.3.2	Polymerasekettenreaktion.....	31
2.3.3	DNA Auftrennung durch Gelelektrophorese und Elution aus dem Agarosegel.....	31
2.3.4	Ligation und Transformation von Bakterien.....	32
2.3.5	Präparation von DNA aus Bakterien, Konzentrationsbestimmung und Restriktionsverdau.....	33
2.3.6	Klonierung der shRNA für RNA-Interferenz.....	34
2.4	Zellkulturtechniken.....	34
2.4.1	Allgemeine Zellkulturtechniken.....	34
2.4.2	Transfektion von Säugerzellen.....	35
2.4.3	KIF1B α -Knockdown durch RNA-Interferenz.....	36
2.4.4	Herstellung permanenter Zelllinien mit induzierbarer KIF1B α -Expression.....	36
2.4.5	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen.....	38
2.4.6	Zellyse mit Triton X-100.....	38
2.4.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	39
2.4.8	Immunpräzipitation (IP).....	39
2.4.9	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.4.10	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot).....	40
2.4.11	Immunblotanalyse und Detektion durch Chemilumineszenz (ECL).....	41
2.4.12	Proteindephosphorylierung durch λ -PPase.....	41
2.4.13	<i>In vitro</i> Kinase-Assay.....	41
2.4.14	Stimulierung von Zellen mit Aktivatoren und Inhibitoren verschiedener Kinasen bzw. dem Phosphatasehemmer Calyculin A.....	42
2.4.15	Overlay-Assay/ Far Western.....	43
2.5	Immunfluoreszenzanalyse.....	43
2.5.1	Spreading-Assay.....	44
2.5.2	Bestimmung der Quotienten aus Zelllänge und -breite.....	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Das Motorprotein KIF1B α ist ein 14-3-3-Bindungspartner.....	46
3.2	KIF1B α -Stabilität und -Tritonlöslichkeit.....	53
3.2.1	14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α erhöht dessen Stabilität und Tritonlöslichkeit.....	53

3.2.2	KIF1B α -S1053A,S1141A-Expression in permanenten Zelllinien ist niedriger als bei Wildtyp KIF1B α	54
3.3	Die KIF1B α -Dimerisierung ist unabhängig von der 14-3-3-Proteinbindung.....	56
3.4	Akt und AMPK sind potentielle KIF1B α phosphorylierende Kinasen.....	58
3.5	Die 14-3-3-Bindung an KIF1B α ist durch Aktivierung verschiedener Kinasen induzierbar.....	59
3.6	Charakterisierung spezifischer p-S1053 und p-S1141 Antikörper.....	62
3.7	<i>In vitro</i> Kinase-Assay.....	63
3.8	<i>In vivo</i> Phosphorylierung von KIF1B α	65
3.8.1	KIF1B α wird durch Akt an S1053 phosphoryliert, nicht jedoch durch S6K	65
3.8.2	PKC phosphoryliert KIF1B α an S1053, aber nicht an S1141.....	66
3.8.3	PKA phosphoryliert KIF1B α an S1053, nicht jedoch an S1141.....	67
3.8.4	Die Phosphorylierung an S1141 ist nicht eindeutig auf AMPK zurückzuführen.....	68
3.9	Die shRNA-vermittelte Reduktion der KIF1B α -Expression.....	70
3.10	Transiente Überexpression des 14-3-3-bindungsdefekten KIF1B α hat keinen Einfluss auf die Mitochondrienverteilung.....	72
3.11	Eine katalytisch inaktive KIF1B α -Mutante bindet an das Zytoskelett.....	74
3.12	Dimerisierungsdefektes 14-3-3 führt zur Akkumulation der Mitochondrien um den Zellkern und zu runden Zellen.....	78
3.13	Die Bindung von 14-3-3-Proteinen an KIF1B α ist wichtig für Mitochondrien-transport, Zellform und Mikrotubulistabilität in sich ausbreitenden Zellen.....	82
4	Diskussion.....	88
4.1	14-3-3-Proteine sind Bindungspartner von KIF1B α	88
4.2	Die 14-3-3-Proteinbindung beeinflusst die KIF1B α -Stabilität und -Tritonlöslichkeit.....	90
4.3	Regulation der 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α	92
4.4	Die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α hat keine Bedeutung für dessen Dimerisierung oder Motilität.....	94
4.5	KIF1B α -Knockdown reduziert die Zellgröße und hemmt den Mitochondrientransport.....	96
4.6	Eine katalytisch inaktive KIF1B α -Mutante destabilisiert das Zytoskelett.....	97

4.7	Die 14-3-3-Dimerisierung spielt eine Rolle bei der Zellform, der Mikrotubulistabilität und der Verteilung der Mitochondrien.....	98
4.8	Die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α ist besonders während des Zellsreadings von Bedeutung.....	99
4.8.1	KIF1B α stabilisiert das Zytoskelett in sich ausbreitenden Zellen.....	99
4.8.2	KIF1B α ist bei sich ausbreitenden Zellen an der Ausbildung der Zellform beteiligt.....	100
4.8.3	Die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α ist am Mitochondrientransport beteiligt.....	101
5	Zusammenfassung.....	104
6	Literaturverzeichnis.....	105

Abkürzungsverzeichnis

α	anti-
A-769662	AMP-Analog
A23187	Kalziumionophor
aa	Aminosäuren
AICAR	Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonucleosid
Akt	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APC	Adenomatous Polyposis Coli Protein
AS160	Akt-Substrat mit einem Molekulargewicht von 160 kDa
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BES	N-N-Bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethan-Sulfansäure
BID1870	RSK-Inhibitor
bzw.	beziehungsweise
CaMKII	Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase
cDNA	DNA-Kopie einer mRNA
CKII	Caseinkinase II
DIG	Digoxigenin-3-O-succinyl-e-aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimide ester
DMEM	„Dulbeccos's modified Eagle's medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dSlo	kalziumabhängiger Kaliumkanal in <i>Drosophila</i>
DSTT	Division of Signal Transduction Therapy
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	„microtubule plus end-binding protein“
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EHNA	Erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)adenin
Erk	extrazellulär regulierte Kinase
et al.	und andere
FCS	fötale Kälberserum
FHA-Domäne	Forkhead-assozierte Domäne
FoxO	Forkhead-Box Transkriptionsfaktor O
FRT	„Flippase Recognition Target site“
FSK	Forskolin
g, μ g, ng	Gramm, Mikrogramm, Nanogramm
GFP	„green fluorescent protein“
GIPC/GLUT1CBP	GLUT1 C-terminal bindendes Protein
GLUT	Glukosetransporter
Gö6976 und Gö6983	PKC-Inhibitoren
GSK3 β	Glykogensynthasekinase 3 beta
GST	Glutathion-S-Transferase

h, min, s	Stunde, Minute, Sekunde
H89	PKA-Inhibitor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HRP/POD	Meerrettichperoxidase
IFAP	„intermediate-filament-associated proteins“
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IP	Immunpräzipitation
IRS	Insulinrezeptor-Substrat
KBP	KIF1 bindendes Protein
KD	kinaseinaktiv
kDa	Kilodalton
KHC	Kinesin schwere Kette („kinesin heavy chain“)
KIF	Protein der Kinesin Familie („kinesin family protein“)
KLC	Kinesin leichte Kette („kinesin light chain“)
KLH	Keyhole-Limpet-Hemocyanin
Kontr.	Kontrolle
λ -PPase	Lambda Proteinphosphatase
LKB1	Serin-Threonin Kinase LKB1
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF	Mausembryo-Fibroblasten
MELK	„maternal embryonic leucin zipper kinase“
ml, μ l	Milliliter, Mikroliter
mRNA	Boten-(messenger-) RNA
MTOC	Mikrotubuli Organisationszentrum
mTOR	„mammalian target of rapamycin“
myc	Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
NEB	New England Biolabs
NGF	„nerve growth factor“
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p-	phospho-
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte, physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PK1	„phosphoinositide-dependent-kinase-1“
PDZ	PSD-95/Dlg (disc large)/ZO-1 (zonula occludens-1)
PH-Domäne	Pleckstrin-homology-Domäne
PI103	PI3K-Inhibitor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat,
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A/ cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSD-95	„postsynaptic density-95“
PTEN	„phosphatase and tensin homolog“
Raf	„rapidly growing fibrosarcoma“
RNA	Ribonukleinsäure

RSK	p90 Ribosomale S6 Kinase (p90 ribosomal S6 kinase)
S-SCAM	„synaptic scaffolding molecule“
S6K	p70 Ribosomale S6 Kinase (p70 ribosomal S6 kinase)
SAP97	„synapse-associated protein-97“
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	„short hairpin RNA“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
TSC2	Tuberin
U	Enzymeinheit
VSV	Vesicular stomatitis virus
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
4EBP1	„eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1“

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Grundausrüstung an molekularen Motoren (Vale, 2003).....	2
Abbildung 1.2: Gliederung der Kinesine in 15 Familien (Hirokawa et al., 2009).....	4
Abbildung 1.3: KIF1B α und KIF1B β entstehen durch alternatives Spleißen der mRNA (Chen et al., 2003).....	5
Abbildung 1.4: Interaktion zwischen den Filamenttypen des Zytoskeletts (Chang und Goldman, 2004).....	9
Abbildung 1.5: Modelle des bidirektionalen Organelltransport (Welte, 2004).....	11
Abbildung 1.6: 14-3-3-Proteine sind an vielen Vorgängen der Zelle beteiligt.....	13
Abbildung 1.7: Die Akt- und AMPK-Signalwege regulieren verschiedene zelluläre Vorgänge unterschiedlich.....	15
Abbildung 2.1: Das Flp-In TM -System.....	37
Abbildung 3.1: KIF1B α ist homologer zu KIF1C als zu KIF1B β	48
Abbildung 3.2: Hohe Homologie zwischen S1053 in KIF1B α und S1092 in KIF1C.....	49
Abbildung 3.3: Weitere potentielle 14-3-3-Bindungsstellen in KIF1B α	50
Abbildung 3.4: 14-3-3 γ -Bindung an KIF1B α	51
Abbildung 3.5: Bindung von endogenem KIF1B α und 14-3-3 γ bzw. 14-3-3 β	52
Abbildung 3.6: Die KIF1B α -Stabilität und -Tritonlöslichkeit wird durch 14-3-3 γ - Bindung erhöht.....	53
Abbildung 3.7: Eine vergleichbare permanente Expression von Wildtyp bzw. KIF1B α - S1053A,S1141A in Flp-In-Zellen ist nicht möglich.....	55
Abbildung 3.8: Die Dimerisierung von KIF1B α ist unabhängig von der 14-3-3- Proteinbindung.....	57
Abbildung 3.9: Durch eine ScanSite-Analyse wurden S1053 und S1141 als Phosphorylierungsstellen für Akt bzw. AMPK identifiziert.....	58
Abbildung 3.10: Die Bindung von 14-3-3-Proteinen an KIF1B α ist stimulierbar.....	60
Abbildung 3.11: Die Phosphoantikörper erkennen spezifisch die phosphorylierten Aminosäuren S1053 bzw. S1141 in KIF1B α	62
Abbildung 3.12: KIF1B α wird <i>in vitro</i> durch Akt, S6K, PKC, PKA und AMPK phosphoryliert.....	64

Abbildung 3.13: KIF1B α wird von Akt an S1053 phosphoryliert, nicht jedoch von S6K.....	65
Abbildung 3.14: KIF1B α wird durch PKC an S1053 phosphoryliert, nicht jedoch an S1141.....	66
Abbildung 3.15: PKA phosphoryliert KIF1B α an S1053, nicht jedoch an S1141.....	67
Abbildung 3.16: Die Phosphorylierung an S1141 kann weder durch A23187, A-769662 noch durch AICAR erhöht werden.....	68
Abbildung 3.17: KIF1B α wird nicht von AMPK phosphoryliert.....	69
Abbildung 3.18: KIF1B α wird durch spezifische shRNA herunterreguliert.....	71
Abbildung 3.19: KIF1B α -Knockdown führt zur Mitochondrien-Akkumulation um den Zellkern und geschrumpften Zellen.....	71
Abbildung 3.20: Überexpression von Wildtyp bzw. KIF1B α -S1053A,S1141A hat keinen Einfluss auf die Mitochondrienverteilung.....	73
Abbildung 3.21: KIF1B α mit der Mutation K103A bindet an eine filamentöse Struktur in NIH3T3-Zellen und destabilisiert das Mikrotubulinetzwerk.....	75
Abbildung 3.22: KIF1B α -K103A bindet nicht ausschließlich an Mikrotubuli.....	76
Abbildung 3.23: Die Mitochondrienverteilung wird durch KIF1B α -K103A nicht gestört.....	77
Abbildung 3.24: Überexpression von dimerisierungsdefektem 14-3-3 γ führt zur Akkumu- lation der Mitochondrien um den Zellkern und abgerundeten Zellen.....	79
Abbildung 3.25: Überexpression von dimerisierungsgestörtem 14-3-3 γ führt zu destabili- sierten Mikrotubuli.....	81
Abbildung 3.26: KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierende Zellen sind in ihrer Ausbreitung gehemmt.....	82
Abbildung 3.27: Mutiertes KIF1B α hemmt in sich ausbreitenden Zellen die Relokalisation der Mitochondrien	84
Abbildung 3.28: KIF1B α -S1053A,S1141A Überexpression destabilisiert das Mikrotubuli- netzwerk in sich ausbreitenden Zellen.....	86
Abbildung 3.29: Die Mutation der 14-3-3-Bindungsstellen in KIF1B α beeinflusst die Zentrosomen nicht.....	87

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen eingegangen:

Anna-Maria Kovacs, Martina Melzer, Mary-Ann Schneider, Hans-Ulrich Häring, Carol MacKintosh, Reiner Lammers. Binding of 14-3-3 proteins is essential for KIF1B α function. (*submitted*)

Poster:

Anna-Maria Kovacs, Hans-Ulrich Häring, Carol MacKintosh, Reiner Lammers. The binding of 14-3-3 to the novel Akt substrate KIF1B α . PI3-Kinase Signaling in Disease (Z3), Keystone Symposia, Olympic Valley, CA – 2009

1 Einleitung

Die Größe und Komplexität der meisten eukaryotischen Zellen erfordert einen aktiven und zielgerichteten Transport von Zellbestandteilen, um die intrazelluläre Ordnung und Kommunikation zu gewährleisten. Der Großteil der Proteinsynthese erfolgt im Zellkörper. Die neu synthetisierten Proteine werden meist in membranumschlossenen Vesikeln oder als Proteinkomplexe in die Peripherie der Zelle transportiert. Die mRNA für Proteine, die in der Peripherie synthetisiert werden, wird in großen Proteinkomplexen zum Zielort transportiert. Neben Proteinkomplexen und Vesikeln sind Organelle die wichtigsten Frachten, die zielgerichtet transportiert werden.

Der gerichtete intrazelluläre Transport wird größtenteils von Motorproteinen ausgeführt. Dieser Transport erfolgt unter ATP-Verbrauch entlang des Zytoskeletts.

1.1 Motorproteine

Im Laufe der Evolution hat sich eine große Anzahl von Motorproteinen entwickelt, um den gerichteten Transport unterschiedlicher Frachten entlang weniger Zytoskelettstrukturen - Mikrofilament, Mikrotubuli und Intermediärfilament - zu ermöglichen.

Bereits primitive einzellige Eukaryoten besitzen eine Grundausstattung an Motorproteinen (Abbildung 3.1), die sich zu der Vielfalt an Motorproteinen, die in höheren Eukaryoten vorkommt, durch Genduplikation und alternatives Splicen entwickelt hat (Vale, 2003). Motorproteine weisen einen allgemeinen Aufbau auf: sie liegen oft als Dimere vor, besitzen eine Motordomäne und eine frachtbindende Domäne, die durch einen Stiel verbunden sind. Dieser Stiel weist in den meisten Fällen eine oder mehrere Coiled-Coil-Domänen auf, die aus α -Helices bestehen und durch Zusammenlagerung die Dimerisierung hervorrufen. Ein Teil der Motorproteine assoziiert mit weiteren Proteinen, welche die Frachtbindung ermöglichen. Im Zytosol lassen sich drei Motorproteintypen unterscheiden: Kinesine, Dyneine und Myosine, wobei Kinesine und Dyneine für den schnellen Transport entlang der Mikrotubuli verantwortlich sind und Myosine den langsamen Transport entlang der Mikrofilamente gewährleisten.

So sind Kinesine und Dyneine für den Transport der Mitochondrien zuständig, wobei zwischen dem anterograden Transport in Richtung Plasmamembran durch die Kinesine und dem retrograden Transport in Richtung Zellkörper durch zytoplasmatisches Dynein unterschieden wird (Nangaku et al., 1994; Schnapp und Reese, 1989; Tanaka et al., 1998). Andere Motorproteine spielen bei der Bildung der mitotischen Spindel eine Rolle (Blangy et al.,

1995; Scholey et al., 1985) oder sind für die Organisation des Zytoskeletts von entscheidender Bedeutung. So sind bestimmte Motorproteine für die Dynamik der Filamente wichtig, indem sie destabilisierende Funktionen übernehmen (Desai et al., 1999). Andere fassen Filamente zu Bündeln zusammen (Sharp et al., 1999) oder sind für das aneinander Vorbeigleiten von Filamenten wichtig. Es konnte gezeigt werden, dass sich Vimentin-Intermediärfilamente mit Hilfe von Kinesin und Dynein an Mikrotubuli entlang bewegen (Clarke und Allan, 2002).

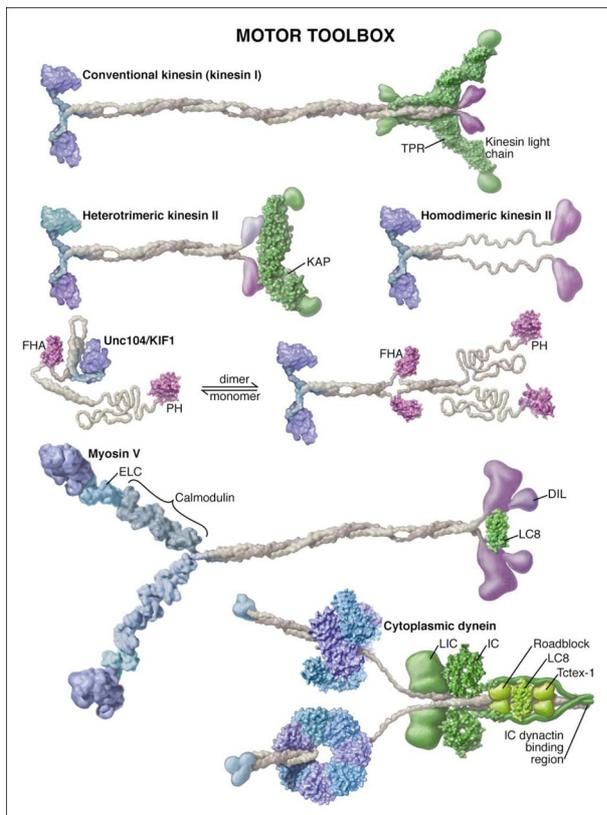


Abbildung 1.1: Grundausstattung an molekularen Motoren (Vale, 2003)

Dargestellt ist die durch Vale vorgeschlagene „Toolbox“ der Motorproteine. Vertreter dieser fünf Grundtypen sind bereits in primitiven Eukaryoten vorhanden. Die gezeigten Strukturen sind von Röntgenstrukturanalysen abgeleitet, wobei die glatten Formen Domänen mit unbekannter Struktur zeigen. Die Motor-domänen sind in blau, die frachtbindenden Schwanzdomänen in lila und assoziierte Proteine in grün dargestellt. Die Mitglieder der Unc104/KIF1 Kinesine können sowohl als Monomere als auch als Dimere vorliegen.

Im Folgenden werden die mikrotubulibindenden Motorproteinklassen der Kinesine und Dyneine im Detail beschrieben, da diese für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

1.1.1 Kinesine

Die Familie der Kinesine wird durch eine hoch konservierte ca. 360 Aminosäuren umfassende Motordomäne definiert, die sowohl die ATP-Bindungsstelle als auch die Mikrotubuli-bindungsstelle umfasst (Vale et al., 1985). Die Bewegungsrichtung dieser Motorproteine wird in den meisten Fällen durch die Position der Motordomäne im Protein bestimmt. So bewegen sich Kinesine, deren Motordomäne am C-Terminus liegt (C-Kinesine) retrograd, während solche, bei denen sie N-terminal liegt (N-Kinesine), sich in anterograder Richtung an Mikrotubuli entlang bewegen. Die Mitglieder einer dritten Kinesinklasse, deren Motordomänen sich mittig im Protein befinden (M-Kinesine), haben oft eine depolymerisierende Wirkung auf die Mikrotubuli (Hirokawa und Takemura, 2004). Die meisten Kinesine bewegen sich anterograd in Richtung des (+)-Endes der Mikrotubuli voran. In der Maus werden Kinesine von 45 Genen kodiert, wobei durch alternatives Splicen mehr als doppelt so viele Proteine entstehen könnten (Miki et al., 2001). Anhand phylogenetischer Untersuchungen wurden die Kinesine in 15 Familien (1 bis 14B) unterteilt (Abbildung 1.2) (Hirokawa et al., 2009). Die Domänen außerhalb der Motordomäne bestimmen die Zugehörigkeit zu einer Familie.

Die Kinesin-1-Familie besitzt ein familienspezifisches β -Faltblatt und eine hoch konservierte Coiled-Coil-Struktur im Stiel der Motorproteine. Zu dieser Familie gehört das erste beschriebene Kinesin: konventionelles Kinesin oder KIF5 (kinesin family protein), wie es heute heißt (Vale et al., 1985). Es besteht aus zwei schweren (KHC, kinesin heavy chain) und zwei leichten Ketten (KLC, kinesin light chain). Die beiden schweren Ketten enthalten die ATPase Aktivität und binden an Mikrotubuli, während die leichten Ketten die Bindung der Fracht vermitteln. Durch unterschiedliche leichte Ketten wird die Anzahl der Frachten, die konventionelles Kinesin binden und transportieren kann, erhöht (Gyoeva et al., 2000; Khodjakov et al., 1998).

Konventionelles Kinesin schreitet in 8 nm Schritten pro ATP-Hydrolyse in anterograder Richtung an Mikrotubuli mit einer Geschwindigkeit von 800 nm/s entlang (Coy et al., 1999). Diese Schrittlänge entspricht dem Abstand zweier hinter einander liegenden α/β -Tubulin Dimeren im Mikrotubulus. Man geht davon aus, dass eine Motordomäne des Dimers an Mikrotubuli gebunden ist, während die andere sich löst und einen Schritt in Bewegungsrichtung macht (Asbury, 2005). Das Vorhandensein zweier Motordomänen im Kinesindimer ist entscheidend für die Prozessivität des Proteins (Hancock und Howard,

1998). Für die Geschwindigkeit des Kinesins ist sowohl die Bindung der Mikrotubuli selbst wichtig (Kikkawa, 2008) als auch die Länge der Halsverbindung (neck-linker) zwischen Motordomäne und Coiled-Coil-Domäne (Yildiz et al., 2008).

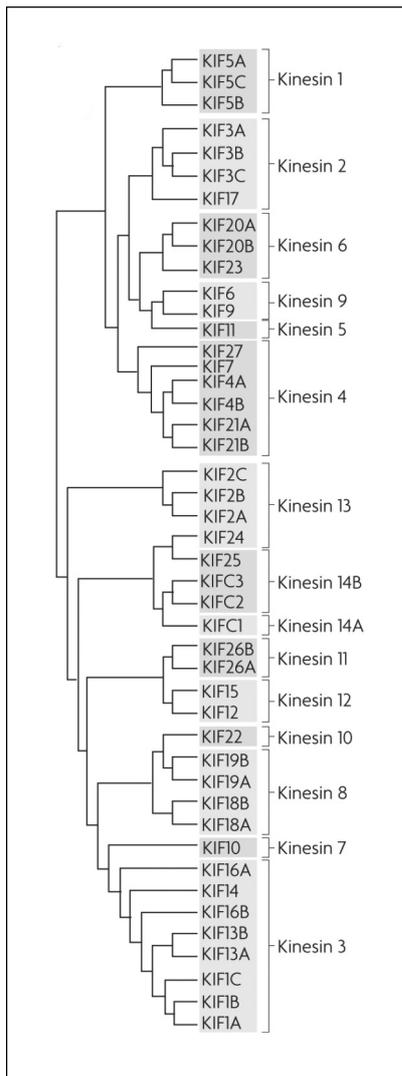


Abbildung 1.2: Gliederung der Kinesine in 15 Familien (Hirokawa et al., 2009)

Anhand phylogenetischer Untersuchungen werden die Kinesine der Maus in 15 Familien unterteilt. Die Mitglieder einer Familie haben oft ähnliche Funktionen.

Das herausragendste Merkmal der Kinesin-3-Familie, zu der auch KIF1B α gehört, ist die C-terminal der Motordomäne gelegene Unc104-Domäne, die als eine FHA-Domäne (Forkhead-assoziierte Domäne) identifiziert wurde (Westerholm-Parvinen et al., 2000) und die auf eine Interaktion dieser Kinesine mit phosphorylierten Proteinen schließen lässt. Diese Familie umfasst eine große Anzahl von Kinesinen, die für den Vesikel- und Organelltransport zuständig sind und als Monomere bzw. Homodimere in der Zelle vorkommen. KIF1A wurde als Monomer beschrieben und ist eines der schnellsten anterograd gerichteten Motorproteine, das für den Transport synaptischer Vesikel zuständig ist. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass KIF1A als Dimer in der Zelle vorliegen kann und womöglich durch die Bindung an die Fracht aktiviert wird (Hammond et al., 2009). Ein weiteres Mitglied der Familie ist KIF1C, dessen Homodimerisierung durch Dorner et al. beschrieben wurde. Dieses Motorprotein ist in den Transport von Vesikeln vom Golgi-Apparat zum ER involviert (1999).

KIF1B wurde 1994 entdeckt und als Mitochondrien transportierendes Motorprotein beschrieben. Es co-lokalisiert *in vivo* mit Mitochondrien und wurde durch Zellfraktionierung verstärkt in der Mitochondrienfraktion nachgewiesen (Nangaku

et al.). KIF1B wurde aufgrund des Vorhandenseins der Unc104-Domäne in die Kinesin-3-Familie eingeordnet. Bereits 1994, bei der Entdeckung von KIF1B, wurde das Vorhandensein verschiedener Isoformen hypothetisiert, da in Gehirn und Herz unterschiedliche Proteingrößen nachgewiesen wurden. Das damals als KIF1B bezeichnete Protein besaß eine hohe Homologie zur Motordomäne des ebenfalls bekannten KIF1A, unterschied sich jedoch erheblich in der C-terminalen frachtbindenden Domäne. 1999 wurde eine zweite KIF1B-Isoform beschrieben, deren C-terminale Domäne eine hohe Homologie zu KIF1A aufwies (Conforti et al.) und sich grundlegend vom C-terminalen Bereich der ersten Isoform unterschied. Das *kif1b* Gen kodiert für insgesamt 48 Exons. KIF1B α beinhaltet die Exons 1 bis 21 während KIF1B β bis auf Exon 21 alle durch *kif1b* kodierten Exons umfasst (Abbildung 1.3) (Chen et al., 2003). Allerdings treten durch alternatives Splicen bis zu acht verschiedene Splicevarianten des durch *kif1b* kodierten Proteins auf. Diese wurden in zwei Gruppen unterteilt: KIF1Bp130 (KIF1B α) und KIF1Bp204 (KIF1B β). Diese beiden Gruppen unterscheiden sich - abgesehen von der C-terminalen frachtbindenden Domäne - in einem Insert von sechs Aminosäuren, das KIF1Bp204 zusätzlich innerhalb der ersten 706

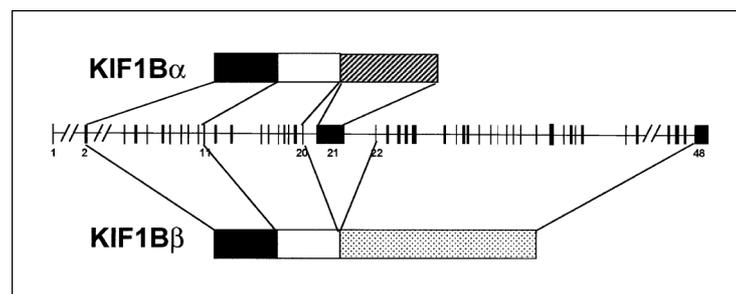


Abbildung 1.3: KIF1B α und KIF1B β entstehen durch alternatives Splicen der mRNA (Chen et al., 2003)

Das *kif1b* Gen besteht aus 48 Exons (als schwarze Balken dargestellt). KIF1B α und KIF1B β entstehen durch alternatives Splicen der mRNA: KIF1B α umfasst die Exons 1 bis 21 und KIF1B β beinhaltet bis auf Exon 21 alle Exons, die durch *kif1b* kodiert werden. Dadurch besitzen die beiden Isoformen verschiedene C-terminale Domänen und unterschiedliche Spezifität für die zu transportierende Fracht.

Aminosäuren aufweist. Beiden Gruppen können zusätzlich zwei weitere Inserts enthalten. Diese können zusammen, getrennt oder gar nicht vorkommen (Gong et al., 1999).

KIF1B α ist besonders im Herzen und in der Skelettmuskulatur exprimiert, während KIF1B β hauptsächlich in Neuronen vorkommt (Chen et al., 2003). Die einzige bisher bekannte Funktion von KIF1B α ist der Transport von Mitochondrien, während für KIF1B β eine Vielzahl von Funktionen beschrieben wurden. KIF1B β ist unter anderem in den Transport synaptischer Vesikel involviert und wurde kürzlich in Zusammenhang mit dem mRNA-Transport in Oligodendrozyten gebracht (Lyons et al., 2009).

Der homozygote Knockout beider Isoformen in Mäusen führte zum Tod der Tiere binnen 30 min nach der Geburt, der vermutlich durch Atemstillstand ausgelöst wurde. Diese Mäuse zeigten vielfache neurologische Störungen und ihre Gehirne waren 10% kleiner als die von Kontrollmäusen. Da Hippokampusneuronen dieser Mäuse in Kultur durch KIF1B β -Transfektion gerettet werden konnten, gingen die Autoren davon aus, dass die Mehrzahl der Effekte in den *kif1b*^{-/-} Mäusen durch den Verlust von KIF1B β hervorgerufen wurden und neurologischer Natur waren. Heterozygote Mäuse entwickelten im Laufe des ersten Lebensjahres eine Muskelschwäche (Zhao et al., 2001).

Bisher wurden mehrere KIF1B α -bindende Proteine beschrieben. Die meisten dieser Proteine binden an die am C-Terminus gelegene PDZ-Domänen-Bindungsstelle (PSD (postsynaptic density)-95/Dlg (disc large)/ZO-1 (zonula occludens-1)). So konnte gezeigt werden, dass die PDZ-Domänen enthaltenden Proteine PSD-95, SAP97 (synapse-associated protein-97) und S-SCAM (synaptic scaffolding molecule) an KIF1B α binden (Mok et al., 2002). In einer weiteren Publikation wurde GIPC/GLUT1CBP (GLUT1 C-terminal bindendes Protein) als Bindungspartner von KIF1B α beschrieben (Bunn et al., 1999). GIPC spielt eine entscheidende Rolle bei der GLUT1 (Glukosetransporter 1) Translokation an die Plasmamembran (Wieman et al., 2009). Somit ist eine Verbindung von KIF1B α zur Glukoseaufnahme hergestellt worden. Palsgaard et al. stellten einen Zusammenhang zwischen Diabetes und KIF1B her. So wiesen Verwandte ersten Grades von Typ 2 Diabetes Patienten eine erhöhte KIF1B-mRNA Konzentration auf, während Typ 2 Diabetiker eine niedrigere Konzentration aufwiesen als Kontrollpersonen (Palsgaard et al., 2009). Ein weiteres KIF1B α -bindendes Protein wurde durch Wozniak et al. publiziert: KBP (KIF1 bindendes Protein). KBP bindet im C-terminalen Bereich der Motordomäne um Aminosäure 300 und ist somit kein

Adaptorprotein für die Frachtbindung, sondern in die Regulation der KIF1B α -Aktivität involviert, denn die Überexpression einer Deletionsmutante bzw. der Knockdown des Proteins führten zur Akkumulation der Mitochondrien um den Zellkern (2005).

1.1.2 Dyneine

Dyneine sind sehr große Moleküle mit einer molekularen Masse von 1000-2000 kDa, die in zwei Klassen unterschieden werden: zytoplasmatische und axonemale Dyneine. Sie sind komplizierter aufgebaut als Kinesine und enthalten neben zwei schweren mehrere leichte Ketten, deren Funktion nicht vollständig geklärt ist, die jedoch an der Frachtbindung beteiligt sind (Schnapp und Reese, 1989; Tynan et al., 2000). Die schweren Ketten der Dyneine tragen die Motoraktivität und vermitteln die ATP-abhängige Bewegung entlang der Mikrotubuli. Für die meisten Funktionen erfordert Dynein die Bindung von Dynactin, das die Motoraktivität verstärkt und zur Frachtbindung beiträgt (Gill et al., 1991). Während axonemales Dynein für die Bewegung von Flagellen und Zilien verantwortlich ist (Gibbons und Rowe, 1965), wird der retrograde Transport von biologischen Frachten in Zellen hauptsächlich von zytoplasmatischen Dyneinen übernommen (Schnapp und Reese, 1989). Zu diesen Frachten gehören auch die Mitochondrien (Varadi et al., 2004). Weitere Funktionen des zytosolischen Dyneins sind die Lokalisation des Golgi-Apparates, Organisation des Zytoskeletts und das Mitwirken an Mitosevorgängen (Corthesy-Theulaz et al., 1992; Helfand et al., 2002; Sharp et al., 2000).

1.2 Das Zytoskelett als Transportsystem für biologische Frachten

Viele Vorgänge in eukaryotischen Zellen werden durch das Zytoskelett ermöglicht, welches das Gerüst der Zelle bildet und aus drei Filamenttypen aufgebaut ist: Mikrotubuli, Mikro- oder Aktinfilament und Intermediärfilament. Diese Filamente bilden ein dichtes Netzwerk in den Zellen aus, das für Stabilität und Struktur, intrazellulären Transport und Organisation und die Mobilität bestimmter Zellen verantwortlich ist.

Mikrotubuli sind aus α - und β -Tubulin Untereinheiten aufgebaut, die röhrenförmig polymerisieren und einen Durchmesser von ca. 25 nm erreichen. Den Ursprung der Mikrotubuli bildet der MTOC (Mikrotubuli Organisationszentrum), an dem die (-)-Enden der Mikrotubuli verankert sind und in dem γ -Tubulin vorkommt (Bornens, 2002). Die Mikrotu-

buli durchziehen strahlenförmig das Zytosol und ihre (+)-Enden sind in den meisten Zelltypen zur Plasmamembran hin ausgerichtet. Dieser Filamenttyp ist am schnellen intrazellulären Transport von Vesikeln und Organellen beteiligt (Morris und Hollenbeck, 1995), wobei der anterograde Transport vom Zellkörper zur Plasmamembran durch Kinesine und der retrograde Transport zurück in den Zellkörper durch Dyneine erfolgt.

Das Mikrofilament, mit einem Durchmesser von 7 nm das dünnste Filament des Zytoskeletts, durchzieht ebenfalls das gesamte Zytosol und ist hauptsächlich an intrazellulären Membranen und der Plasmamembran ausgerichtet. Die Polymerisierung des G-Aktin zu Aktinfilamenten erfolgt unter ATP-Verbrauch, und der schnelle Kreislauf zwischen Polymerisierung und Depolymerisierung an den beiden Enden des Aktinfilaments ist wichtig für die Zellbewegung (Mitchison und Cramer, 1996), z.B. in Immunzellen, die zur Abwehr von Pathogenen in Gewebe einwandern. In Muskelzellen ist Aktin an der Kontraktion beteiligt. Entlang der Aktinfilamente erfolgt der Kurzstreckentransport von Vesikeln zur Membran durch Myosin, somit sind Mikrofilamente an der Exo- und Endozytose beteiligt. Des Weiteren spielt das Aktinnetzwerk am Transport und an der Verankerung von Organellen eine wichtige Rolle (Chada und Hollenbeck, 2004).

Die Zusammensetzung des Intermediärfilaments hängt vom Zelltyp, aber auch von der intrazellulären Lokalisation ab. So kommt Lamin in allen Zelltypen im Zellkern vor, während Vimentin im Zytoplasma mesenchymaler Zellen und Keratin in Epithelzellen vorkommt. Diese Proteine bilden Homo- oder Heterodimere, die sich durch ihre Coiled-Coil-Domänen zusammenlagern. Durch Zusammenlagerung vieler Dimere entsteht das Intermediärfilament mit einem Durchmesser von ca. 10 nm. Das zytoplasmatische Intermediärfilament umgibt den Zellkern und breitet sich im Zytosol bis zur Plasmamembran aus. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass das Intermediärfilament in *Xenopus* Pigmentzellen sowohl am anterograden als auch am retrograden Transport der Melanosomen beteiligt ist (Chang et al., 2009).

Das Intermediärfilament einer Zelle spielt eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen Aktin- und Mikrotubulinnetzwerk. Da die Zusammensetzung des Intermediärfilaments vom Zelltyp abhängig ist, unterscheidet sich die Kommunikation zwischen Aktin und Mikrotubuli je nach Zelltyp (Chang und Goldman, 2004). Der Aufbau des Vimentinnetzwerks ist oft vom Mikrotubulinnetzwerk abhängig, wie in Fibroblasten gezeigt wurde. Kleinste Vimentinfragmente werden entlang der Mikrotubuli transportiert, treffen aufeinander

und verbinden sich zu Intermediärfilamenten (Helfand et al., 2003). Die treibende Kraft hinter dem Transport sind Kinesin und Dynein, wobei die Kinesin-Vimentin-Interaktion über eine spezielle leichte Kette des Kinesins ermöglicht wird (Avsiuk et al., 1995). Mikrofilamente interagieren über Myosin mit Intermediärfilamenten. In Fibroblasten konnte die Co-Lokalisation von Aktinbündeln mit Keratinbündeln gezeigt werden (Green et al., 1986).

Während Intermediärfilamente durch Motorproteine entlang der Mikrofilamente und Mikrotubuli transportiert werden, gibt es noch eine Reihe von Proteinen, welche die Assoziation der Filamente stabilisieren, darunter Plectin. Die Assoziation der drei Filamenttypen (Abbildung 1.4) in Zellen ist ausgesprochen wichtig, da sie komplementär an den selben Vorgängen beteiligt sind. So ist das Zusammenspiel von Mikrofilamenten und Mikrotubuli für die Lokalisierung von Melanosomen in den Dendriten der Melanocyten von Bedeutung. Die Melanosomen werden entlang der Mikrotubuli durch Kinesin und Dynein in die Fortsätze transportiert, wo sie an Myosin gebunden und an Mikrofilamenten verankert

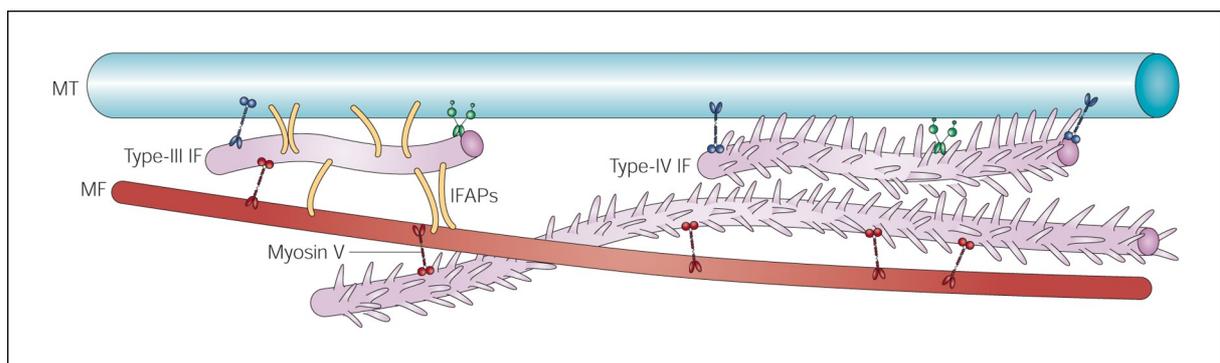


Abbildung 1.4: Interaktion zwischen den Filamenttypen des Zytoskeletts (Chang und Goldman, 2004)

Schematisch dargestellt sind die drei Filamenttypen des Zytoskeletts und deren Interaktion. Der schnelle Transport von Intermediärfilament-Abschnitten (lila) entlang der Mikrotubuli (hellblau) erfolgt durch Kinesin (blau) und Dynein (grün), in anterograder bzw. retrograder Richtung, während der langsame Transport entlang der Mikrofilamente (rot) durch Myosin (rot) vermittelt wird. Sogenannte IFAPs (intermediate-filament-associated proteins, gelb), zu denen z.B. Plectin gehört, stabilisieren die Interaktion der Intermediärfilamente mit den Mikrotubuli bzw. den Mikrofilamenten.

werden. Durch diese Verankerung wird der Rücktransport in den Zellkörper verhindert (Wu et al., 1998).

Die Plectin-Isoform 1b bindet Mitochondrien an Intermediärfilamente und ist maßgeblich an der Erhaltung der Mitochondrienform beteiligt, denn Knockout-Zellen weisen vermehrt röhrenförmig vernetzte Mitochondrien auf (Winter et al., 2008). Durch Überexpression der Plectin-Isoform 1b wird die normale Mitochondrienform wieder hergestellt. Somit ist das Intermediärfilament neben der Kommunikation zwischen Mikrotubuli und Mikrofilamenten auch für die Verankerung von Organellen zuständig.

1.3 Bidirektionaler Organelltransport

Die unterschiedlichsten biologischen Frachten in Zellen unterliegen einem bidirektionalen Transport, z.B. Mitochondrien (Hollenbeck, 1996), Endosomen (Murray et al., 2000), Phagosomen (Blocker et al., 1997), sekretorische Vesikel (Wacker et al., 1997) und Intermediärfilamentbausteine (Shah et al., 2000). Diese Frachten werden in der Zelle abwechselnd anterograd und retrograd bewegt. Die endgültige Bewegungsrichtung der Fracht wird durch die Summe der Bewegungsdistanzen in die eine bzw. die andere Richtung bestimmt.

Es gibt verschiedene Modelle, wie der bidirektionale Transport zustande kommen könnte. Das einfachste Modell geht davon aus, dass immer nur ein Motorproteintyp an Fracht und Mikrotubuli gebunden ist und die Bewegungsrichtung bestimmt. Der oft schnelle Wechsel zwischen den Bewegungsrichtungen legt jedoch nahe, dass die Motorproteine für anterograden und retrograden Transport gleichzeitig an die Organellen gebunden vorliegen müssen (Ma und Chisholm, 2002). Die Organellen in einem Axon sind konstant in Bewegung, und Pausen zwischen den einzelnen Läufen sind selten. Dies lässt auf eine koordinierte Funktion der einen oder anderen Motorproteine schließen, da Organelle, an denen die Motorproteine unkoordiniert in beide Richtungen ziehen würden, vermutlich mehr oder weniger bewegungslos wären. Das zweite Modell geht daher davon aus, dass eine Tauzieh-Situation vorliegt, in der die Motorproteine für die beiden Richtungen miteinander konkurrieren und die Richtung durch die Stärke bzw. die Anzahl der Motorproteine bestimmt wird, die an das Organell gebunden sind (Kural et al., 2005). Bei diesem Modell ist der schnelle Wechsel der Richtung schwer zu erklären, wenn man davon ausgeht, dass die Motorproteine permanent an ihre Fracht gebunden sind. Das dritte Modell geht von dem Vorhandensein von Adaptorproteinen

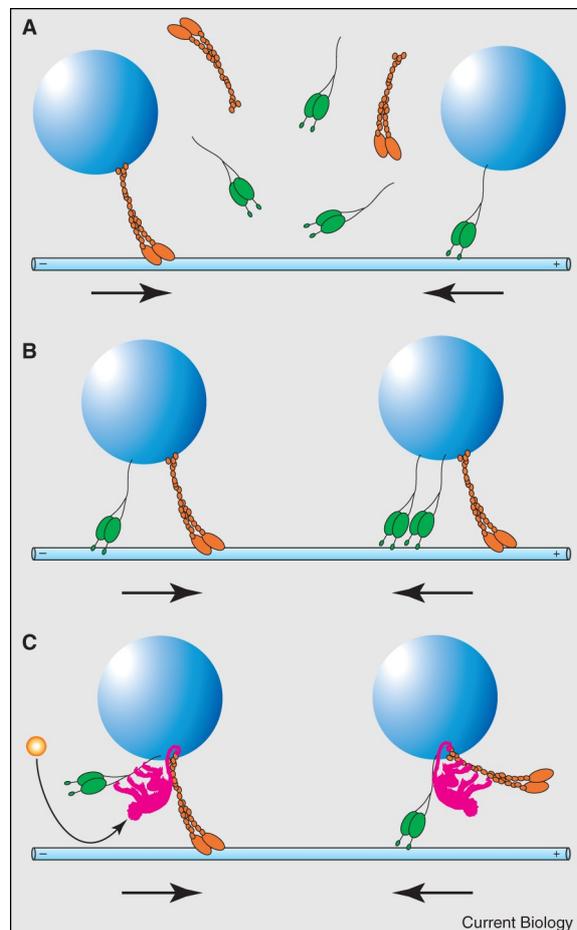


Abbildung 1.5: Modelle des bidirektionalen Organelltransport (Welte, 2004)

Hier sind drei Modelle des bidirektionalen Organelltransports dargestellt. Motorproteine für den anterograden Transport sind orange und die für den retrograden Transport sind grün dargestellt. Es sind keine Adaptorproteine dargestellt. (A) An der Fracht sind nur Motorproteine für eine Richtung gebunden, diese werden ausgetauscht, wenn sich die Bewegungsrichtung ändert. (B) Es sind Motorproteine für beide Richtungen an die Fracht und die Mikrotubuli gebunden, die Richtung wird durch die relative Stärke der Motorproteine bestimmt. Im vorliegenden Beispiel ist ein retrograd gerichtetes Motorprotein schwächer, während zwei stärker sind als das anterograd gerichtete. Somit wird die Fracht im ersten Fall anterograd transportiert, während sie im zweiten Fall retrograd transportiert wird. (C) Die gleich Anzahl Motorproteine für beide Richtungen sind an die Fracht gebunden und die Transportrichtung wird durch koordinierende Proteine (pink) bestimmt, die selektiv einen der beiden Motorproteintypen deaktivieren, indem sie deren Bindung an die Mikrotubuli stören.

aus, die entweder die einen oder die anderen Motorproteine hemmen, wodurch die Transportrichtung bestimmt wird (Abbildung 1.5) (Welte, 2004).

So konnte für Dynactin gezeigt werden, dass es entweder den anterograden oder den retrograden Transport fördert. Durch die Bindung von Dynactin über ein Adaptorprotein an konventionelles Kinesin wird dieses aktiviert und Dynein inaktiviert, da dessen Bindung an die Mikrotubuli verhindert wird. Daher erfolgt der Transport der Fracht in anterograder Richtung. Umgekehrt wird Dynein durch die Bindung an Dynactin aktiviert und Kinesin inaktiviert, wodurch die Fracht retrograd transportiert wird (Gross, 2003).

1.4 14-3-3-Proteine

14-3-3-Proteine wurden erstmals 1967 bei der systematischen Klassifizierung von Gehirnproteinen entdeckt (Moore und Perez, 1967). Sie sind ubiquitär exprimierte, 28-33 kDa große Proteine und wurden in allen bisher untersuchten Organismen und Geweben gefunden. In Säugern kommen sieben (beta, gamma, eta, epsilon, sigma, tau und zeta), in Pflanzen 15 und in Hefe (Bmh1 und Bmh2), *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* jeweils zwei Isoformen vor (Dougherty und Morrison, 2004). Die Tertiärstruktur der 14-3-3-Proteine weist neun α -Helices auf, die zwei Domänen bilden. In den meisten Fällen kommen 14-3-3-Proteine als Homo- bzw. Heterodimere vor. Die Dimerisierung erfolgt über die N-Termini, wodurch ein negativer Kanal entsteht in dem die N-terminalen α -Helices der Monomere den Boden und die C-terminalen die Wände bzw. Seiten des Kanals bilden (Xiao et al., 1995). Die einzelnen Isoformen weisen eine sehr hohe Homologie zueinander auf, wobei die Aminosäuren im Kanal am stärksten konserviert sind und diejenigen der Außenseiten des Dimers variieren können (Bridges und Moorhead, 2004). Die Bindung der 14-3-3-Proteine erfolgt in den meisten Fällen an p-Serin bzw. p-Threonin, wobei auch Bindungen an unphosphorylierte Proteine nachgewiesen werden konnten. Die klassischen Konsensussequenzen für die phosphorylierungsabhängige 14-3-3-Bindung sind in Abbildung 3.3 aufgeführt (Tzivion und Avruch, 2002). In den letzten Jahren wurde eine dritte Konsensussequenz für die 14-3-3-Bindung an den C-Terminus eines Proteins beschrieben. Diese setzt ein p-Serin bzw. ein p-Threonin als vorletzte Aminosäure voraus (Coblitz et al., 2006).

Die Bindung eines 14-3-3-Dimers kann an zwei Bindungsstellen im selben Protein erfolgen bzw. an einzelne Bindungsstellen in zwei Proteinen. Man geht davon aus, dass die 14-3-3-

Proteinbindung an zwei Bindungsstellen im selben Protein eine Konformationsänderung des Bindungspartners hervorruft (Yaffe, 2002), da 14-3-3-Dimere steife Proteinkomplexe sind, deren Konformation durch Bindung eines anderen Proteins nur minimal verändert wird (Rittinger et al., 1999). Die Dimer-Bindung kann die Funktion, Stabilität oder Lokalisation des Bindungspartners beeinflussen. Eine Gruppe sehr gut erforschter 14-3-3-Bindungspartner sind die FoxO-Transkriptionsfaktoren (Forkhead-Box Transkriptionsfaktor O). In unstimulierten Zellen liegt FoxO größtenteils im Zellkern vor. Infolge einer Stimulation, z.B. mit IGF-1 (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1), wird FoxO durch Akt phosphoryliert, es erfolgt die 14-3-3-Bindung und FoxO relokalisiert ins Zytoplasma. Obsilova et al. wiesen nach, dass die 14-3-3-Bindung zu einer starken Konformationsänderung des C-terminal gelegenen Kernlokalisierungssignals führt, wodurch der Rücktransport von FoxO in den Zellkern verhindert wird und es im Zytoplasma akkumuliert (2005).

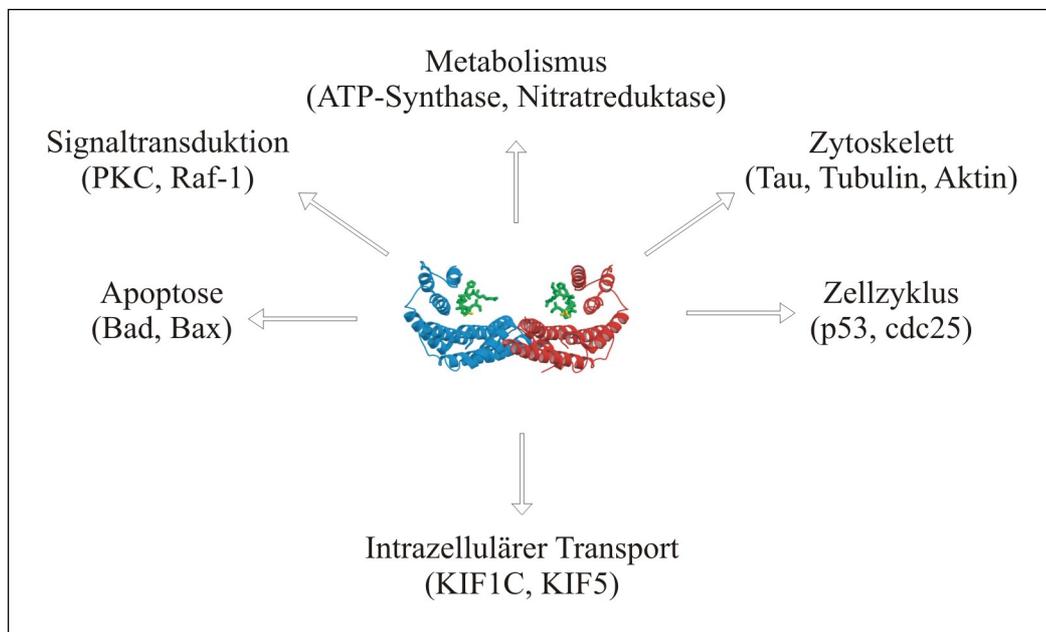


Abbildung 1.6: 14-3-3-Proteine sind an vielen Vorgängen der Zelle beteiligt

In der Mitte der Abbildung ist ein 14-3-3-Dimer als Faden-Diagramm dargestellt, wobei die einzelnen 14-3-3-Proteine in rot bzw. blau dargestellt sind. Das 14-3-3-bindende Peptid ARSHpSYPA ist in grün, die Phosphatgruppe ist gelb dargestellt (Bridges und Moorhead, 2004). Durch 14-3-3-Bindung werden vielfältige Prozesse in der Zelle beeinflusst.

Während durch die 14-3-3-Bindung an ein Protein eine Konformationsänderung hervorgerufen wird, führt die Dimer-Bindung an zwei Proteine zu deren Dimerisierung. Beispiele, in denen 14-3-3 eine „Brückenfunktion“ übernehmen, sind Raf-1 und B-Raf (rapidly growing fibrosarcoma), deren Heterodimerisierung durch 14-3-3-Bindung erleichtert wird (Rushworth et al., 2006), und GSK3 β (Glykogensynthasekinase 3 beta) und Tau. Durch die räumliche Annäherung der Proteine wird die Phosphorylierung von Tau durch GSK3 β verstärkt (Agarwal-Mawal et al., 2003).

Bislang wurden mehr als 300 Interaktionspartner für 14-3-3-Proteine beschrieben, welche die unterschiedlichsten Funktionen in der Zelle übernehmen. Sie sind in die Regulation der Proliferation (Ajjappala et al., 2009), der Apoptose (van Hemert et al., 2001), des Metabolismus (Bunney et al., 2001), des intrazellulären Transports (Taya et al., 2007) und in die Genregulation (Brunet et al., 1999) involviert (Abbildung 1.6).

1.5 Signaltransduktion

Alle zellulären Vorgänge werden durch ein komplexes Netzwerk aus Signalwegen reguliert. Jeder Signalweg besteht aus einer Kette von Kinasen, die ein Signal über Phosphorylierung weiterleiten und dadurch die Aktivität verschiedener Proteine steuern. Viele Signalwege sind miteinander verknüpft und beeinflussen sich gegenseitig oder haben antagonistische Funktionen. Die wichtigsten Signalwege, die in die Regulation des Metabolismus involviert und an der Entstehung von Krebs beteiligt sind, sind die PI3K/Akt (Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B) und AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) Transduktionskaskaden (Hajdich et al., 2001; Nicholson und Anderson, 2002).

Der PI3K/Akt-Signalweg hat eine wichtige Bedeutung in der Krebsentstehung und im Metabolismus der Zelle. Die Lipidkinase PI3K wird durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert und katalysiert die Phosphorylierung des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), wodurch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) entsteht. Dieses Phospholipid dient verschiedenen Proteinen, die eine PH-Domäne (Pleckstrin-homology-Domäne) besitzen, als Anker in der Plasmamembran, darunter Akt und deren Kinase PDK1 (phosphoinositide-dependent-kinase-1). Ein negativer Regulator des PI3K-Signalweges ist die Lipidphosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog). PTEN dephosphoryliert PIP₃ zu PIP₂, wodurch die Proliferation gehemmt wird und pro-apoptotische Signale induziert werden.

Aktiviertes Akt setzt eine Transduktionskaskade in Gang, die einerseits verschiedene Apoptose-auslösende Effektorproteine hemmt (Song et al., 2005) und andererseits Vorgänge

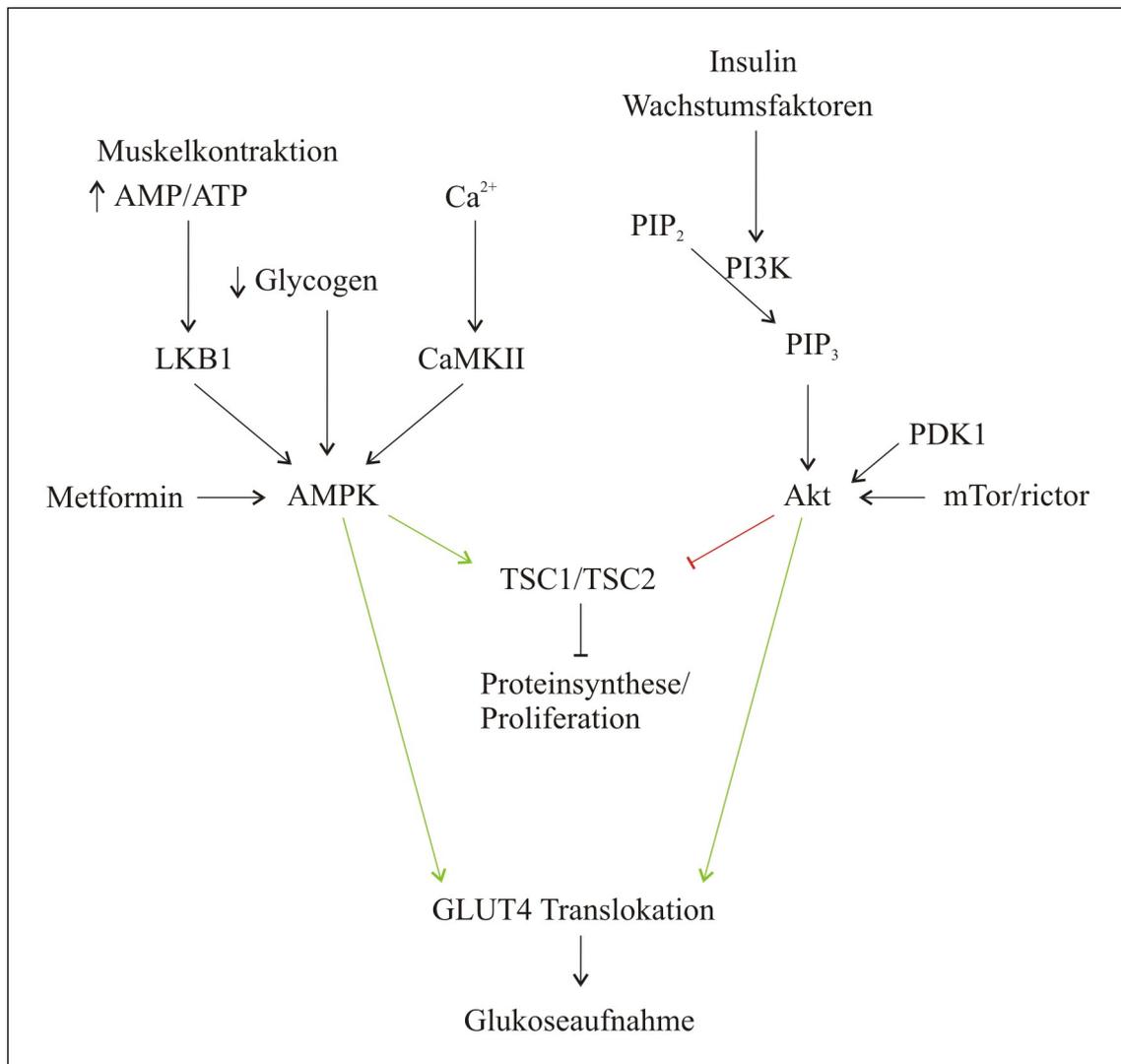


Abbildung 1.7: Die Akt- und AMPK-Signalwege regulieren verschiedene zelluläre Vorgänge unterschiedlich

Die Akt- und AMPK-Signalwege werden durch verschiedene Stimuli aktiviert. AMPK wird u.a. durch Muskelkontraktion, Energiemangel und Ca^{2+} -Ionen stimuliert, während Akt über den PI3K-Signalweg durch Insulin und Wachstumsfaktoren stimuliert wird. Es gibt verschiedene Proteine und intrazelluläre Vorgänge, die durch die Aktivierung dieser Signalwege beeinflusst werden. Die Proteinsynthese wird z.B. durch Akt-Aktivierung gesteigert, während sie durch aktives AMPK gehemmt wird (Inoki et al., 2002; Inoki et al., 2003). Im Gegensatz dazu fördern beide Signalwege die GLUT4-Translokation und damit die Glukoseaufnahme (Kurth-Kraczek et al., 1999; Wang et al., 1999).

aktiviert, die das Überleben der Zelle fördert. So wird durch Akt die GLUT4-Translokation an die Plasmamembran induziert und die GSK3 β inhibiert, wodurch Glukose aufgenommen und in Form von Glykogen gespeichert werden kann. Infolge dessen fördert dieser Signalweg die Proliferation und kann, wenn er gestört wird, zur Entstehung von Krebs oder Diabetes führen (Engelman, 2009; Luo et al., 2006). Die Hinweise, wonach Akt unter bestimmten Umständen auch pro-apoptotisch wirken kann, mehren sich jedoch (Los et al., 2009; Nogueira et al., 2008).

Die AMPK fungiert als Energiesensor und bewahrt die Zelle vor ATP-Mangel, indem sie Energie verbrauchende Vorgänge wie die Protein- und Fettsäuresynthese hemmt und die ATP Produktion durch Fett- und Glukoseoxidation in Gang setzt (Carling, 2004). Diese Kinase ist aus drei Untereinheiten (α , β und γ) zusammengesetzt, von denen verschiedene Isoformen exprimiert werden. Je nach Gewebetyp variieren die Isoformen in AMPK, wodurch die unterschiedlichen Funktionen in Leber, Muskel und Fettgewebe erklärt werden (Stapleton et al., 1996; Thornton et al., 1998). Aktivierung der AMPK im Muskel führt zu erhöhter Glukoseaufnahme und Fettoxidation, während chronische Stimulation zur Biogenese der Mitochondrien führt (Winder et al., 2000). Diese Vorgänge erhöhen den ATP-Gehalt der Zellen. In Leberzellen reduziert AMPK die Glukose- und Fettsäuresynthese und erhöht die Fettsäureoxidation, während sie im Fettgewebe die Lipolyse und Lipogenese reduziert.

All diese Vorgänge führen zu einem metabolischen Zustand, der Typ2 Diabetes vorbeugt bzw. zu dessen Behandlung beiträgt, da sowohl die Blutglukosekonzentration als auch der Plasmafettsäuregehalt reduziert wird, bei gleichzeitig gesteigerter Insulinsensitivität (Misra und Chakrabarti, 2007). Dies macht die AMPK zu einem Ziel für pharmakologische Ansätze zur Behandlung des Typ2 Diabetes. AMPK kann durch verschiedene Stimuli aktiviert werden. Natürliche Stimuli dieser Kinase sind Glykogendepletion (McBride et al., 2009), erhöhte AMP/ATP Quotienten (Hardie und Carling, 1997) und Muskelkontraktion (Winder und Hardie, 1996). AMPK kann jedoch auch durch AMP-Analoga aktiviert werden. Die AMPK übergeordneten Kinasen sind LKB1 (Serin-Threonin Kinase LKB1) und CaMKII (Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase). Für die kontraktionsabhängige Aktivierung der AMPK ist die übergeordnete LKB1 von entscheidender Bedeutung, wie in Mäusen mit sehr geringer Expression dieser Kinase gezeigt werden konnte. Die durch das AMP-Analog AICAR (Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonucleosid) bzw. Muskelkontraktion stimulierte

Glukoseaufnahme war in Muskeln dieser Tiere stark reduziert, während die Insulin-stimulierte Aufnahme nicht beeinträchtigt wurde (Sakamoto et al., 2005).

Die Signalwege, die durch Akt und AMPK induziert werden, haben sowohl antagonistische als auch gleichgerichtete Effekte. Einerseits fördern beide Signalwege die Glukoseaufnahme durch Translokation des GLUT4 Glukosetransporters an die Plasmamembran, andererseits haben sie entgegengesetzte Effekte auf die Proteinsynthese (Abbildung 1.7).

Akt gehört in die AGC-Kinasefamilie, während AMPK ein Mitglied der CAMK-Familie ist. Der Phosphorylierung durch ein Mitglied beider Kinasefamilien folgt oft die Bindung eines 14-3-3-Proteins, da in den Konsensussequenzen der Kinasen bzw. der 14-3-3-Bindungsstellen jeweils ein Arginin an Position -3 bzw. -4 liegt und dieses sowohl für die Phosphorylierung durch die Kinasen als auch für die 14-3-3-Bindung wichtig ist (Dougherty und Morrison, 2004).

1.6 Motorprotein vermittelter Transport von Mitochondrien

Mitochondrien sind dynamische Organellen der Zelle, die vielfältige Formen annehmen können und gerichtet in der Zelle transportiert werden (Collins und Bootman, 2003). Sie sind von zwei Membranen umschlossen und enthalten zwei Kompartimente. Die innere Membran trennt den Intermembranraum von der zentralen Matrix. Mitochondrien sind die Hauptlieferanten für chemische Energie in Form von ATP, das durch die katabolen Reaktionen des Zitronensäure-Zyklus und der oxidativen Phosphorylierung generiert wird. Des Weiteren sind Mitochondrien an Apoptose, Fettstoffwechsel, Häm-synthese und der Regulation der lokalen Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle beteiligt, da sie durch einen in der inneren Membran gelegenen Uniport schnell Ca^{2+} -Ionen aufnehmen können (Kirichok et al., 2004). Zusammentreffende Mitochondrien verschmelzen (Fusion) miteinander und werden wieder getrennt (Fission), so dass ein ständiger Austausch zwischen den Organellen besteht. Durch das genau abgestimmte Gleichgewicht zwischen Fission und Fusion bleibt die Gestalt der Mitochondrien erhalten (Bereiter-Hahn und Voth, 1994). Ist das Gleichgewicht zur einen oder anderen Seite verschoben, so enthalten die Zellen entweder untypisch kleine, runde Mitochondrien oder ein großes Netzwerk, das aus verbundenen Mitochondrien besteht. Um ihren vielfältigen Aufgaben gerecht werden zu können, müssen Mitochondrien an bestimmte Stellen in der Zelle transportiert werden, an denen z.B. erhöhter Energiebedarf vorliegt. In

Hefe ist der mitochondriale Transport vom Mikrofilament abhängig, während der schnelle Mitochondrientransport in Eukaryoten entlang der Mikrotubuli erfolgt. So werden Mitochondrien in Neuronen zwar im Zellkörper vermehrt und regeneriert, jedoch müssen diese über das Axon an die Synapsen transportiert werden. Diesen anterograden Transport übernehmen die Kinesine KIF1B α und KIF5 (Nangaku et al., 1994; Tanaka et al., 1998). Den retrograden Transport zurück in den Zellkörper übernimmt zytoplasmatisches Dynein (Varadi et al., 2004). In kultivierten Zellen befinden sich die Mitochondrien größtenteils im Bereich um den Zellkern, wobei ihr Aufkommen zur Plasmamembran hin stetig abnimmt. Vereinzelt Mitochondrien kommen in der Nähe der Plasmamembran und in Fortsätzen vor.

Die Regulation des Transports der Mitochondrien ist nicht vollständig geklärt. Er wird jedoch durch verschiedene Stimuli beeinflusst. In T-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Mitochondrien infolge Ca^{2+} -Einstroms an die Plasmamembran transportiert werden, wo sie vermehrt Ca^{2+} -Ionen aufnehmen und damit den weiteren Ca^{2+} -Einstrom ermöglichen, indem sie die Schließung Ca^{2+} -abhängiger CRAC Kanäle verhindern (Quintana et al., 2006). Andererseits konnte gezeigt werden, dass der Transport der Mitochondrien durch hohe lokale Ca^{2+} -Konzentrationen gestoppt wird. Da der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen an Stellen mit hohem Energiebedarf wie Nervenenden erfolgt, führt Arretieren der Mitochondrien infolge erhöhter Ca^{2+} -Konzentrationen zur Positionierung an Stellen mit hohem Energiebedarf und dem Bedarf an Ca^{2+} -Pufferung. Die Ca^{2+} induzierte Mitochondrienarretierung erfolgt über Miro, einem Protein, das zur Interaktion zwischen KIF5 und den Mitochondrien beiträgt. Miro, ein Transmembranprotein, das in der äußeren Membran der Mitochondrien verankert ist, besitzt zwei EF-Hand Domänen, die Ca^{2+} -Ionen binden und zur Konformationsänderung des Proteins beitragen. Dadurch kann Miro die Interaktion zwischen Kinesin und Mikrotubuli stören und das Mitochondrion wird angehalten (Wang und Schwarz, 2009). Des Weiteren wurde in Axonen nachgewiesen, dass Mitochondrien mit hohem Membranpotential anterograd Richtung Synapse transportiert werden, während Mitochondrien mit geringem Potential retrograd Richtung Zellkörper wandern (Miller und Sheetz, 2004).

Der Transport der Mitochondrien wird neben der Regulation über Ionenkonzentrationen auch über Signaltransduktion reguliert. Durch lokale Behandlung von Axonen mit dem Nervenwachstumsfaktor NGF (nerve growth factor) konnte eine Akkumulation der Mitochondrien erreicht werden, die vom F-Aktin abhängig war und das Mitwirken der PI3K- und MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signalwege erforderte (Chada und

Hollenbeck, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der MAPK zu einer Hyperphosphorylierung der leichten Kette von KIF5 führt, was wiederum den Transport der Mitochondrien hemmt (De Vos et al., 2000). GSK3 phosphoryliert die leichte Kette des KIF5 an bestimmten Phosphorylierungsstellen, so dass leichte und schwere Kette getrennt werden und der anterograde Transport der Mitochondrien gehemmt wird, während der retrograde Transport nicht beeinflusst wird (Morfini et al., 2002). Da der PI3K-Signalweg GSK3 hemmt, wirkt er aktivierend auf den Mitochondrientransport. NGF aktiviert sowohl den PI3K als auch den MAPK-Signalweg, wodurch Mitochondrien womöglich schneller in den NGF-stimulierten Bereich gezogen werden, jedoch gestoppt werden, sobald sie den Bereich der Stimulation erreicht haben.

Eine weitere Kinase, die in Zusammenhang mit dem Mitochondrientransport gebracht wird, ist die Proteinkinase C (PKC, Kalzium- und Diacylglycerol-abhängige Kinase). Aktivierung der PKC führt zur erhöhten Mobilität der Mitochondrien, während die Hemmung selbiger die Bewegung der Mitochondrien stoppte (Nekrasova et al., 2007). Die erhöhte Mobilität war von einem intakten Intermediärfilamentnetzwerk abhängig.

1.7 Zielsetzung

Da bereits das zu KIF1B α stark homologe KIF1C durch Dorner et al. als 14-3-3-Bindungspartner identifiziert wurde (Dorner et al., 1999), sollte untersucht werden, ob KIF1B α ein 14-3-3-Bindungspartner ist, wie die Bindung reguliert wird und welche physiologische Bedeutung sie hat. KIF1B α wurde bisher als Monomer beschrieben. Da jedoch nachgewiesen wurde, dass Mitglieder der selben Familie auch als Dimere in den Zellen vorliegen können (Dorner et al., 1999; Tomishige et al., 2002), sollte die Dimerisierung von KIF1B α und der mögliche Einfluss der 14-3-3-Bindung auf die Dimerisierung untersucht werden.

Die einzige bekannte Funktion von KIF1B α ist der mitochondriale Transport (Nangaku et al., 1994). KIF1B α wurde durch Zellfraktionierung in der Mitochondrienfraktion nachgewiesen und war in der Lage, Mitochondrien *in vitro* zu transportieren. Des Weiteren konnte dessen Co-Lokalisation mit Mitochondrien durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der 14-3-3-Bindung an KIF1B α für den Mitochondrientransport untersucht werden. Die 14-3-3-Bindung erfolgt in den meisten Fällen nach der

Phosphorylierung des Bindungspartners und es wurden bereits verschiedene Signalwege beschreiben, die in den Mitochondrientransport involviert sind, jedoch sind die Effektorproteine oft noch nicht bekannt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und durch welche Kinasen der KIF1B α -vermittelte Mitochondrientransport reguliert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anderweitig aufgeführt, wurden Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Merck (Darmstadt, DE), Roth (Karlsruhe, DE), Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) oder Fluka (Neu-Ulm, DE) in p.a.-Qualität bezogen. Ein Teil der Vektoren und die rekombinanten Kinasen wurden durch das DSTT (Division of Signal Transduction Therapy, Dundee, UK) zur Verfügung gestellt.

PeqGOLD Universal Agarose	Peqlab (Erlangen, DE)
Insulin (Humulin)	Eli Lilly (Indianapolis, USA)
Formaldehyd	Polysciences, Inc. (Warrington, USA)

2.1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus, DE)
Pfx-Polymerase	Invitrogen (Eggenstein, DE)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus, DE)

2.1.3 Oligonukleotide

Bezugsquelle: Operon (Köln, DE)

Oligonukleotid	Sequenz
KIF1B_anti_2180	AAAAATTAAGATCTGAGATGGTGACCCACTTGGACCAATCC AAGTGGGTCACCATCTCAGATCTTAAGGTGTTTCGTCCTTTC CACAA
U6_fwd	AAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA

2.1.4 *E. coli* Stämme

Bakterienstamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> 298 F'	F+, kanr, lr, recA-, tonA-, lacI-; aus MM 294	Genentech (San Francisco, USA)
<i>E. coli</i> DH5 α	F-, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17, phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus, DE)

2.1.5 Vektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pCR \emptyset -blunt	Klonierungsvektor für PCR-Produkte, P _{lac} lacZ α ccdB zeo ^r kan ^r ColE1-ori	Invitrogen (Eggenstein, DE)
pCR \emptyset -blunt U6 prom	PCR \emptyset -blunt, in den der U6 Promotor kloniert wurde	AG Lammers

2.1.6 Expressionsvektoren

Plasmidname	Expressionsvektor für:	Referenz
pRK _{rs} _KIF1B α	KIF1B α Wildtyp	AG Lammers
pRK _{rs} _KIF1B α myc CT	Fusionsprotein aus KIF1B α und myc-Epitop, myc-Epitop befindet sich C-terminal	AG Lammers
pRK _{rs} _KIF1B α -S1053A	KIF1B α mit der Mutation Serin 1053 zu Alanin	AG Lammers
pRK _{rs} _KIF1B α -S1141A	KIF1B α mit der Mutation Serin 1141 zu Alanin	AG Lammers
pRK _{rs} _KIF1B α -S1053,1141A	KIF1B α mit den Mutationen Serin 1053 bzw. S1141 zu Alanin	AG Lammers
pRK _{rs} _KIF1B α -K103A	KIF1B α mit der Mutation Lysin 103 zu Alanin	AG Lammers
pRK _{rs} _VSV KIF1B α -no motor	KIF1B α mit der Deletion der C-terminalen 349 aa, mit VSV-Epitop-Tag versehen	AG Lammers
pRK _{rs} _14-3-3 γ	14-3-3 γ Wildtyp	AG Lammers
pRK _{rs} _14-3-3 γ mut	14-3-3 γ mit den Aminosäureaustauschen Q6K, L13AE zu Q13QR, Y85Q, K88N, E90Q	AG Lammers

pRK _{rs_14-3-3γ} myc	Fusionsprotein aus myc-Epitop und pRK _{rs_14-3-3γ}	AG Lammers
pRK _{rs_14-3-3γ} mut myc	Fusionsprotein aus myc-Epitop und pRK _{rs_14-3-3γ} mut	AG Lammers
pRK _{rs_GIPC} VSV CT	GIPC, mit VSV-Epitop-Tag versehen	AG Lammers
pcDNA5/FRT/TO-GFP KIF1Bα	Fusionsprotein aus GFP und KIF1Bα	DSTT
pcDNA5/FRT/TO-GFP KIF1Bα S1053A S1141A	Fusionsprotein aus GFP und KIF1Bα mit den Mutationen Serin 1053 bzw. 1141 zu Alanin	DSTT

2.1.7 Plasmidvektor für RNA-Interferenz

Plasmidname	shRNA gegen	Referenz
pCRØ_U6-prom_KIF1B anti 2180	humanes und murines KIF1Bα	diese Arbeit

2.1.8 Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
HEK293	mit den Adenovirus Genen E1A und E1B transfizierte humane embryonale Nierenfibroblasten	ATCC CRL-1573 (Graham et al., 1977)
NIH3T3	immortalisierte Mausfibroblasten	ATCC CRL-1658 (Jainchill et al., 1969)
HEK293/GFP-KIF1Bα	HEK293-Flp-In-Zellen, die GFP-KIF1Bα exprimieren	diese Arbeit
HEK293/GFP-KIF1Bα-S1053A,S1141A	HEK293-Flp-In-Zellen, die GFP-KIF1Bα-S1053A,S1141A exprimieren	diese Arbeit
Hela/LKB1	Hela-Zellen, die Wildtyp LKB1 überexprimieren	(Sapkota et al., 2002)
Hela/KD LKB1	Hela-Zellen, die katalytisch inaktives LKB1 überexprimieren (T366A)	(Sapkota et al., 2002)
MEF/AMPK +/-	Mausembryo-Fibroblasten, aus Wildtyp Mäusen isoliert	(Laderoute et al., 2006)
MEF/AMPK -/-	Mausembryo-Fibroblasten, aus AMPK Knockout Mäusen (<i>AMPKα1</i> ^{-/-} und <i>AMPKα2</i> ^{-/-}) isoliert	(Laderoute et al., 2006)

2.1.9 Antikörper

Primärantikörper:

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
α -myc	monoklonaler Maus IgG gegen myc-Decapeptid EQKLISEEDL (Klon 9E10)	AG Lammers
α -VSV	monoklonaler Maus IgG gegen das VSV-G-Peptid YTDIEMNRLGK (Klon P5D4)	AG Lammers
α -KIF1B α	polyklonaler Kaninchen IgG gegen KIF1B α (GST-Fusionsprotein, aa 743-1153)	AG Lammers (Wozniak et al., 2005)
α -KIF1B α pS1053	polyklonaler Kaninchen IgG gegen das KLH gekoppelte Peptid LRWRSN(pS)LNNGQP	AG Lammers
α -KIF1B α pS1141	polyklonaler Kaninchen IgG gegen das KLH gekoppelte Peptid C+RMRRQF(pS)APNLKA	AG Lammers
α -KIF1B α	polyklonaler Kaninchen IgG gegen Aminosäuren 964 bis 1153 des humanen KIF1B α	Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, USA)
α -14-3-3 γ	polyklonaler Kaninchen IgG gegen C-Terminus des humanen 14-3-3 γ	Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, USA)
α -14-3-3 β	polyklonaler Kaninchen IgG gegen C-Terminus des humanen 14-3-3 β	Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, USA)
α -GSK3	monoklonaler Maus IgG gegen GSK3 β aus <i>Xenopus</i> , detektiert auch GSK3 α	Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, USA)
α -p-Vasp	monoklonaler Maus IgG gegen phosphoryliertes Serin 157 in VASP	Calbiochem (Nottingham, UK)
α -p-Akt (T308)	polyklonaler Kaninchen IgG gegen phosphoryliertes Threonin 308 in Akt	CST (Danvers, USA)
α -p-Erk	monoklonaler Kaninchen IgG gegen phosphoryliertes Threonin 202 in Erk1 bzw. 204 in Erk2	CST (Danvers, USA)
α -p-S6K	polyklonaler Kaninchen IgG gegen phosphoryliertes S371 in S6K	CST (Danvers, USA)
α -p-AMPK	polyklonaler Kaninchen IgG gegen p-AMPK (T172)	CST (Danvers, USA)
α -AMPK α	monoklonaler Kaninchen IgG gegen AMPK α	CST (Danvers, USA)
α -LKB1	monoklonaler Maus IgG gegen LKB1	Abcam (Cambridge, UK)
α - α -Tubulin	monoklonaler Maus IgG gegen α -Tubulin (Klon DM1A)	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)

α - γ -Tubulin	monoklonaler Maus IgG gegen γ -Tubulin (aus Aszitesflüssigkeit aufgereinigt)	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
α -DIG-POD	Schaf Fab-Fragment Antikörper gegen DIG, konjugiert mit HRP	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, DE)

Sekundärantikörper:

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
Ziege- α -Maus, HRP konjugiert	Antikörper aus Ziege gegen Maus IgG (Fc-Spec.), konjugiert mit HRP	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Ziege- α -Kaninchen, HRP konjugiert	Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG (Fc-Spec.), konjugiert mit HRP	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Ziege- α -Maus, Alexa 488 konjugiert	Antikörper aus Ziege gegen Maus IgG, konjugiert mit Alexa 488	Molecular Probes (Leiden, NL)
Ziege- α -Kaninchen, Alexa 488 konjugiert	Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG, konjugiert mit Alexa 488	Molecular Probes (Leiden, NL)
Ziege- α -Maus, Alexa 546 konjugiert	Antikörper aus Ziege gegen Maus IgG, konjugiert mit Alexa 546	Molecular Probes (Leiden, NL)
Ziege- α -Kaninchen, Alexa 546 konjugiert	Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG, konjugiert mit Alexa 546	Molecular Probes (Leiden, NL)

2.2 Puffer und Stammlösungen

2.2.1 Molekularbiologie

6x DNA-Ladepuffer	0,05% (w/v)	Bromphenolblau
	0,05% (w/v)	Xylencyanol
	30% (v/v)	Glycerin
	100 mM	EDTA (pH 8)
10x TAE	400 mM	Tris
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
		pH 8 (Acetat)

1x TE	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	0,1 mM	EDTA
Rotiphorese 40 Gelmix (Roth)	38% (w/v)	Acrylamid
	2% (w/v)	Bisacrylamid
10x TBE	890 mM	Tris
	890 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA
	pH 8	
Polyacrylamid-Harnstoff Gel 10% (50 ml)	12,5 ml	Rotiphorese 40 Gelmix
	7 M	Harnstoff
	2,5 ml	0,5x TBE
	450 µl	APS (10%)
	35 µl	TEMED
Sequenzierpuffer	980 µl	Formamid
	20 µl	EDTA [0,5 M]
	0,05%	Bromphenolblau
	0,05%	Xylencyanol
Elutionspuffer	0,5 M	NH ₄ Ac
	1 mM	EDTA

2.2.2 Bakterien-Medien und Platten

LB-Medium	Luria-Broth-Medium (Miller's Modification)
	1,5% (w/v) LB
	1,0% (w/v) NaCl
	pH 7,2 (HCl)
LB-Medium mit Antibiotika	LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin
LB-Nährböden mit Antibiotika	100 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin
	1,5% (w/v) Agar

KCM	0,5 M	KCl
	0,15 M	CaCl ₂
	0,25 M	MgCl ₂

2.2.3 Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 4,5 g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin Cambrex (Verviers, B)	
Medienzusätze	10% bzw. 0,5% (v/v) FCS, Perbio (Bonn) Blasticidin, Invitrogen (Eggenstein, DE) Hygromycin B, Invitrogen (Eggenstein, DE) Zeozin, Invitrogen (Eggenstein, DE)	
Trypsin/EDTA	200 mg/l EDTA 500 mg/l Trypsin Cambrex (Verviers, B)	
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	(pH 7,5) Cambrex (Verviers, B)	
Einfriermedium	FCS + 10% DMSO	

2.2.4 Transfektionslösung

2x BBS Puffer	50 mM	BES (pH 6,96)
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄

2.2.5 Proteinbiochemie

Lysepuffer	10% (v/v)	Glycerin
	1% (v/v)	Triton X-100
	50 mM	Hepes, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1,5 mM	MgCl ₂
	1 mM	EGTA
	100 mM	NaF
	10 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	PMSF
	20 µg/ml	Aprotinin
HNTG	20 mM	HEPES (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
	0,1% (v/v)	Triton X-100
	10% (v/v)	Glycerin
	10 mM	NaF
	1 mM	Na ₃ VO ₄
3x Lämmli Puffer	3% (w/v)	SDS
	3% (v/v)	β-Mercaptoethanol
	10 mM	EDTA (pH 8)
	20% (v/v)	Glycerin
	0,05% (w/v)	Bromphenolblau
10x Tris-Glycin (TG)	248 mM	Tris
	1918 mM	Glycin
	35 mM	SDS
Upper Tris (4x)	0,5 M	Tris Base
	0,4% (w/v)	SDS
	pH 6,8 (HCl)	

Lower Tris (4x)	1,5 M	Tris Base
	0,4% (w/v)	SDS
	pH 8,8 (HCl)	
Rotiphorese 30 Gelmix	29,22% (w/v)	Acrylamid
	0,78% (w/v)	Bisacrylamid
Trenngel (8%); 40 ml	10,66 ml	Rotiphorese 30 Gelmix
	10 ml	Lower Tris
	19,33 ml	H ₂ O
	270 µl	APS (10%)
	66 µl	TEMED
Trenngel (10%); 40 ml	13,33 ml	Rotiphorese 30 Gelmix
	10 ml	Lower Tris
	16,66 ml	H ₂ O
	270 µl	APS (10%)
	66 µl	TEMED
Sammelgel (4%); 15 ml	2 ml	Rotiphorese 30 Gelmix
	3,75 ml	Upper Tris (4x)
	9,25 ml	H ₂ O
	150 µl	APS (10%)
	25 µl	TEMED
Transblot	48 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	39 mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
	0,004% (w/v)	SDS
Ponceau-S Färbelösung	0,2%	Ponceau S
	2%	Trichloressigsäure
	in H ₂ O lösen und filtrieren	

NET (10x)	1,5 M	NaCl
	50 mM	EDTA (pH 8)
	0,5 M	Tris-HCl (pH 7,5)
	0,5% (v/v)	Triton X-100
Blocklösung (NET-G)	1x NET	
	0,25% (w/v)	Gelatine

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Aufreinigung von Oligonukleotiden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel

Für die Klonierung der shRNA wurden besonders lange Oligonukleotide benötigt. Eine Aufreinigung war erforderlich und erfolgte über ein Harnstoffgel, da bei der Herstellung oft Nebenprodukte entstehen, die kürzer bzw. länger als das gewünschte Oligonukleotid sind. Die Zusammensetzung des Gels ist unter 2.2.1 beschrieben. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE. 100 µg des Oligonukleotids wurden in Sequenzierpuffer aufgenommen und aufgetragen. Das Gel wurde mit 100 V gestartet und, sobald die DNA ca. 1 cm ins Gel gelaufen war, auf 150 V eingestellt und ca. 3 h laufen gelassen. Das Färben des Gels erfolgte in einer Ethidiumbromid-Lösung, so dass die Bande der richtigen Größe unter UV-Bestrahlung aus dem Gel geschnitten werden konnte. Das ausgeschnittene Gelstück wurde zerkleinert, mit Elutionspuffer überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Elutionspuffer wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Gelstückchen erneut mit 0,5 Volumen Elutionspuffer gewaschen, der ebenfalls in das neue Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte durch Phenolextraktion, indem das Eluat mit 1/3 Volumen Phenol versetzt, gemischt und bei 13200 g abzentrifugiert wurde. Die obere Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,9) und 3 Volumen EtOH (100%) versetzt, gemischt und bei -20°C für 1 h inkubiert. Das Abzentrifugieren der DNA erfolgte 10 bis 15 min bei 13200 g und 4°C. Das Pellet wurde zwei Mal mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 10 µl TE aufgenommen.

2.3.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist die Methode der Wahl, um DNA *in vitro* zu amplifizieren (Saiki et al., 1988). In einer PCR wird ein bestimmter Bereich der eingesetzten DNA durch sich wiederholende Zyklen aus Denaturierung, Hybridisierung der Oligonukleotide an den Matrizenstrang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligonukleotide amplifiziert. Dazu benötigt man neben dem Template (50 ng) eine thermostabile Polymerase (2,5 U), geeignete Oligonukleotide („sense“ und „antisense“, 25 pmol), Nukleotide (0,2 mM) und 1x Reaktionspuffer zur Einstellung der Salzkonzentration.

Wie bereits angedeutet, besteht die PCR aus drei sich wiederholenden Schritten: Denaturierung (94°C, 5 min zu Beginn der Reaktion, im Zyklus 94°C, 1 min), Hybridisierung (im Zyklus 52 - 65°C, 1 min) und Elongation (im Zyklus 68°C, 1 min; finale Elongation 68°C, 10 min). Der Zyklus wurde 25 Mal wiederholt. Anschließend wurde die PCR auf 4°C abgekühlt. Der PCR-Ansatz wurde zur Aufreinigung auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.3.3 DNA Auftrennung durch Gelelektrophorese und Elution aus dem Agarosegel

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Fragmentgröße durch Gelelektrophorese auf horizontalen 0,8 bis 2%igen Agarosegelen. Die Agarose wurde zusammen mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) in 1x TAE-Puffer aufgekocht, bevor das Gel in einer Gelkammer gegossen und mit einem Kamm versehen wurde, um Probenaschen für die DNA-Auftragung zu erzeugen. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die Proben wurden mit 6x Laufpuffer 1:5 versetzt und auf das Gel aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung von 70-80 V wanderte die negativ geladene DNA im Gel in Richtung des positiven Pols und wurde somit der Größe nach aufgetrennt. Zur Längenbestimmung diente ein Längenstandard in einer der Probenaschen. Mittels UV-Licht und der Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht.

Neben der Längenbestimmung von DNA-Fragmenten kann über Gelelektrophorese auch eine Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgen. Dafür wurde das gewünschte Fragment durch Ausschneiden aus dem Gel entfernt und mit der „freeze and squeeze“ Methode aufgereinigt. Das Fragment wurde in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, welches am Boden mit einem Loch versehen und dessen Spitze mit silanisierter Glaswolle ausgestopft war. Nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurde das 0,5 ml Reaktionsgefäß in ein 2 ml

Reaktionsgefäß gesteckt, in dem sich je nach Größe des Gelstückes 50 bis 80 µl Phenol befanden. Die beiden ineinander gesteckten Reaktionsgefäße wurden 10 min bei 3300 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, das Volumen bestimmt und die Phenolmenge gegebenenfalls auf 1/3 aufgefüllt. Das Gemisch wurde gevortext, nochmals 3 min bei 13200 g zentrifugiert und die obere Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,9) und 3 Volumen EtOH (100%) versetzt, eine Stunde bei -20°C inkubiert und anschließend bei 13200 g, 4°C und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei Mal mit 70% EtOH gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und anschließend in 10 µl TE-Puffer gelöst (4°C, über Nacht oder 10 - 20 min bei 37°C). Zur Konzentrationsbestimmung wurden 0,5 µl der Probe neben 5, 10 und 20 ng Mengenstandard auf einem Agarosegel aufgetragen.

2.3.4 Ligation und Transformation von Bakterien

Unter Ligation versteht man eine enzymkatalysierte Verknüpfung von DNA-Strängen. Die aufgereinigten PCR-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in Vektoren eingefügt. Dazu wurden Vektor, PCR-Fragment, Ligase und Puffer gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde die Methode nach Chung und Miller (1988) eingesetzt. Die Bakterien wurden 2 h bis 4 h bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀= 0,3, - 0,5) bei 37°C in LB-Medium kultiviert, abzentrifugiert und in eiskaltem TSB (LB-Medium, 10% (v/v) PEG 3350, 5% (v/v) DMSO, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) resuspendiert. Aliquotierte Bakterien (100 µl) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die kompetenten Bakterien wurden vor der Transformation langsam auf Eis aufgetaut und der Ligationsansatz (10 µl) mit 20 µl KCM und 70 µl Wasser versetzt. Die aufgetauten Bakterien wurden zu diesem Ansatz pipettiert und das Gemisch 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Bakterien 40 s bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen wurden. Daraufhin wurden die Bakterien 1 min auf Eis abgekühlt und 800 µl LB-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden weitere 50 min bei 37°C inkubiert, bevor sie auf antibiotikaenthaltende Agarplatten ausplattiert wurden. Die Platten wurden kopfüber über Nacht bei 37°C inkubiert. Kolonien wurden in 2 ml bzw. 3 ml LB-Kulturmedium aufgenommen und über Nacht unter konstantem Schütteln bei 37°C inkubiert, bevor die Kulturen lysiert und die DNA aufgereinigt wurde (2.3.5).

2.3.5 Präparation von DNA aus Bakterien, Konzentrationsbestimmung und Restriktionsverdau

Zur Präparation von DNA aus Bakterien wurden zwei unterschiedliche Verfahren genutzt: Phenolextraktion und Säulenaufreinigung.

Um Kolonien zu testen, wurden Plasmid-Minipräparationen nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Einzelne Kolonien wurden in 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C unter konstantem Schütteln kultiviert. Die Bakterienkultur wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 1320 g abzentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl TE aufgenommen. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 100 µl 0,2 M NaOH/1% SDS auf Eis. Die Lösung wurde mit 50 µl 5 M Kaliumacetat (pH 4,8-5,3) neutralisiert und mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Die Plasmide wurden durch Zentrifugation (13200 g, 3 min) von den Bakterienbestandteilen getrennt und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem 200 µl Phenol vorlagen. Durch Zentrifugation (13200 g, 3 min) wurde die wässrige Phase von der Phenolphase getrennt und die obere wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol und anschließender Zentrifugation (13200 g, 5 min). Das Pellet wurde ein Mal mit 70%igem EtOH gewaschen und anschließend getrocknet, bevor es in 50 µl TE + RNase (30 min bei 37°C, 1 h bei RT bzw. bei 4°C über Nacht) aufgenommen wurde. RNA, die zusammen mit der DNA gefällt wurde, wurde so verdaut.

Plasmide, die für die Transfektion von Säugerzellen bestimmt waren, wurden mit dem NucleoSpin-Plasmid-Kit von Macherey und Nagel aus den Bakterien aufgereinigt. Eine Übernachtskultur (3 ml) wurde laut Vorschrift aufbereitet, und die DNA wurde an Silikamatrixsäulen gebunden und eluiert.

Die Konzentration der durch Säulenaufreinigung gewonnenen DNA wurde in einem Photometer bestimmt. Gemessen wurde bei $\lambda=260$ bzw. 280 nm. DNA und RNA absorbieren Licht bei 260 nm, während Kontaminationen durch Proteine oder Phenol ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm haben. Der Quotient aus den Messwerten bei 260 und 280 nm gibt Aufschluss über die Qualität der DNA und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Aus dem Messwert bei 260 nm kann die DNA-Konzentration berechnet werden: Messwert x Verdünnung x 50 µg/ml (1 OD = 50 µg/ml).

Der Restriktionsverdau einer DNA gibt u.a. Aufschluss über die Länge der in den Vektor eingebrachten DNA. Die zu untersuchende DNA wurde mit einem Restriktionsenzym im dafür geeigneten Puffer 1 h bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und die Fragmentlänge anhand eines Längenmarkers bestimmt.

2.3.6 Klonierung der shRNA für RNA-Interferenz

Um die Expression bestimmter Proteine in Säugerzellen zu reduzieren, wurden Vektoren kloniert, die für spezifische shRNAs kodierten. Die Polymerase III, welche ribosomale 5S RNA (5S rRNA), tRNAs und diverse andere kleine RNAs transkribiert, benötigt den U6 Promotor. Daher wurde ein PCR-Fragment hergestellt, das sowohl die Sequenz der shRNA als auch den U6-Promotor enthielt, indem eine PCR auf den Vektor pCRØ-blunt-U6-prom mit den Oligonukleotiden U6 fwd und KIF1B-anti-2180 durchgeführt wurde (2.3.2). Dieses PCR-Fragment wurde aufgereinigt (2.3.3) und in den Vektor pCRØ-blunt ligiert, der durch Restriktionsverdau des Vektors mit dem Enzym Stu hergestellt wurde. Der neue Vektor wurde in *E. coli* DH5α transformiert (2.3.4). Von Kolonien wurden Übernachtskulturen (3 ml) in LB-Medium mit Kanamycin kultiviert und die DNA durch Phenolextraktion gewonnen. Durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym Stu wurden positive Kolonien durch Größenvergleich identifiziert. Eine positive Kolonie wurde kultiviert und die DNA auf einer Säule aufgereinigt (2.3.5). Nach Konzentrationsbestimmung im Photometer wurde die DNA zu der Endkonzentration 1 µg/µl verdünnt.

2.4 Zellkulturtechniken

2.4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in Sterilbänken der Sicherheitsstufe 2a durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium mit 10% FCS bei 37°C und hoher Luftfeuchtigkeit in einem CO₂ Inkubator (7%) kultiviert. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin inkubiert, bis sich die Zellen von der Oberfläche der Kulturschale lösten. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium aufgenommen und ein Teil der Zellen 1:10 für die neue Kultur verdünnt. Für Versuche wurden die Zellen vor dem Aussäen ausgezählt (in Neubauer-Zählkammer) und im Fall von HEK293-Zellen auf 225000/ml bzw. für NIH3T3-Zellen auf 20000/ml in Kultur-

medium verdünnt. 2 ml der HEK293-Zellen wurden in Behälter einer 6-Loch-Kulturschale überführt, während 1 ml der NIH3T3-Zellen in Behälter einer 12-Loch-Kulturschale, in der sterile Glasplättchen lagen, überführt wurden.

Die kultivierten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen hin untersucht. Hierfür wurden mykoplasmenfreie Zellen auf Glasplättchen angezogen. Für diesen Versuch waren NIH3T3-Zellen besonders geeignet, da sie gut an Glas haften. Sobald diese Zellen angewachsen waren, wurden sie mit konditioniertem Kulturmedium der zu untersuchenden Zelllinien weitere 24 h inkubiert. Die Zellen wurden mit Methanol 5 min bei -20°C fixiert und anschließend ein Mal mit PBS gewaschen und 20 min bei Raumtemperatur mit DAPI ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) inkubiert. Um das überschüssige DAPI zu entfernen, wurden die Zellen fünf bis sechs Mal mit PBS gewaschen und anschließend in einen Tropfen einer 25% Glycerin-Lösung in PBS auf einen Objektträger gelegt. Die Zellen wurden in einem Fluoreszenzmikroskop unter UV-Licht untersucht. Mycoplasmen erkennt man an der Färbung ihrer DNA als verstreute Punkte im Zytoplasma der Zellen.

2.4.2 Transfektion von Säugerzellen

Es gibt mehrere Möglichkeiten, Säugerzellen zu transfizieren. Dabei kann DNA mechanisch oder durch Elektroporation in die Zellen geschleust werden, oder aber die DNA wird Zellen in Form von Präzipitaten oder Lipidvesikeln dargeboten, die von den Zellen phagozytotisch aufgenommen werden.

In dieser Arbeit wurde die Kalzium-Phosphat-Methode gewählt, um Säugerzellen zu transfizieren (Chen und Okayama, 1987). Bei dieser Methode bildet sich ein schwerlösliches Kalzium-Phosphat-Präzipitat, das die DNA einschließt und von den Zellen aufgenommen wird. Die aufgenommene DNA liegt dabei in den meisten Fällen als Transgenom vor und geht im Laufe weniger Tage verloren. Daher liegt die höchste Konzentration des durch die transfizierte DNA kodierten Proteins 48 h bis 72 h nach der Transfektion vor.

Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (2.4.1) transfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurden $86\ \mu\text{l}$ H_2O , $10\ \mu\text{l}$ CaCl_2 (2,5 M) und $4\ \mu\text{l}$ DNA ($1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) gemischt, bevor $100\ \mu\text{l}$ BBS zugegeben wurden. Diese Lösung wurde 10 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und in das Kulturmedium der Zellen pipettiert. Die Zellen wurden 15 h bis 18 h bei 37°C und 3%

CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen ein Mal mit Kulturmedium gewaschen und weitere 24 h bei 37°C und 7% CO₂ in Kulturmedium mit 0,5% bzw. ohne FCS inkubiert.

2.4.3 KIF1B α -Knockdown durch RNA-Interferenz

Durch RNA Interferenz kann die Expression eines bestimmten Proteins in Säugerzellen gezielt unterdrückt werden. Dabei wird ein natürlicher Mechanismus der Zellen genutzt, der bei der Genregulation wichtig, jedoch auch bei der Viren-Abwehr von Bedeutung ist. Bei dieser Methode wird doppelsträngige RNA, die zur mRNA des auszuschaltenden Proteins komplementär ist, in die Zelle eingebracht.

In dieser Arbeit wurde die shRNA-Methode gewählt (Paddison et al., 2002). Bei dieser Methode werden Zellen mit einem Vektor transfiziert, der für ein RNA-Molekül kodiert, das zwei komplementäre Sequenzen enthält. Diese beiden Sequenzen sind durch einen Loop verbunden, so dass sie sich zu einem doppelsträngigen RNA-Molekül zusammenlagern. Der Loop wird durch das Protein Dicer entfernt, wodurch die antisense-RNA entsteht. Diese wird entwunden und einer der Stränge wird in den RISC-Komplex eingebaut, der dann die gewünschte mRNA abbauen kann. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene shRNAs eingesetzt, um humanes (in HEK293-Zellen) und murines (in NIH3T3-Zellen) KIF1B α herunter zu regulieren.

HEK293- Zellen bzw. NIH3T3-Zellen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben kultiviert und wie unter 2.4.2 beschrieben mit den Vektoren transfiziert. HEK293-Zellen wurden 48 h bzw. 72 h nach Transfektion geerntet, die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt, die Proteine durch SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert (2.4.9, 2.4.10). KIF1B α und GSK3 β (als Ladekontrolle) wurden mit den entsprechenden Antikörpern in einer Immunblotreaktion detektiert (2.4.11). NIH3T3-Zellen wurden 40 h nach Transfektion mit MitoTracker gefärbt und wie unter 2.5 beschrieben fixiert. Der Nachweis von KIF1B α erfolgte mit dem spezifischen KIF1B α -Antikörper und einem Alexa 488 gekoppelten Kaninchen-Antikörper (2.5).

2.4.4 Herstellung permanenter Zelllinien mit induzierbarer KIF1B α -Expression

Zur Herstellung permanenter Zelllinien wurde das Flp-InTM-System (Invitrogen, Eggenstein, DE) benutzt. Dieses System hat mehrere Vorteile: (1) die gewünschte DNA wird an einer

bestimmten Stelle im Genom eingebaut, da in die genomische Sequenz der benutzten Zelllinien eine Erkennungssequenz (FRT, Flippase Recognition Target site) für die Flp-

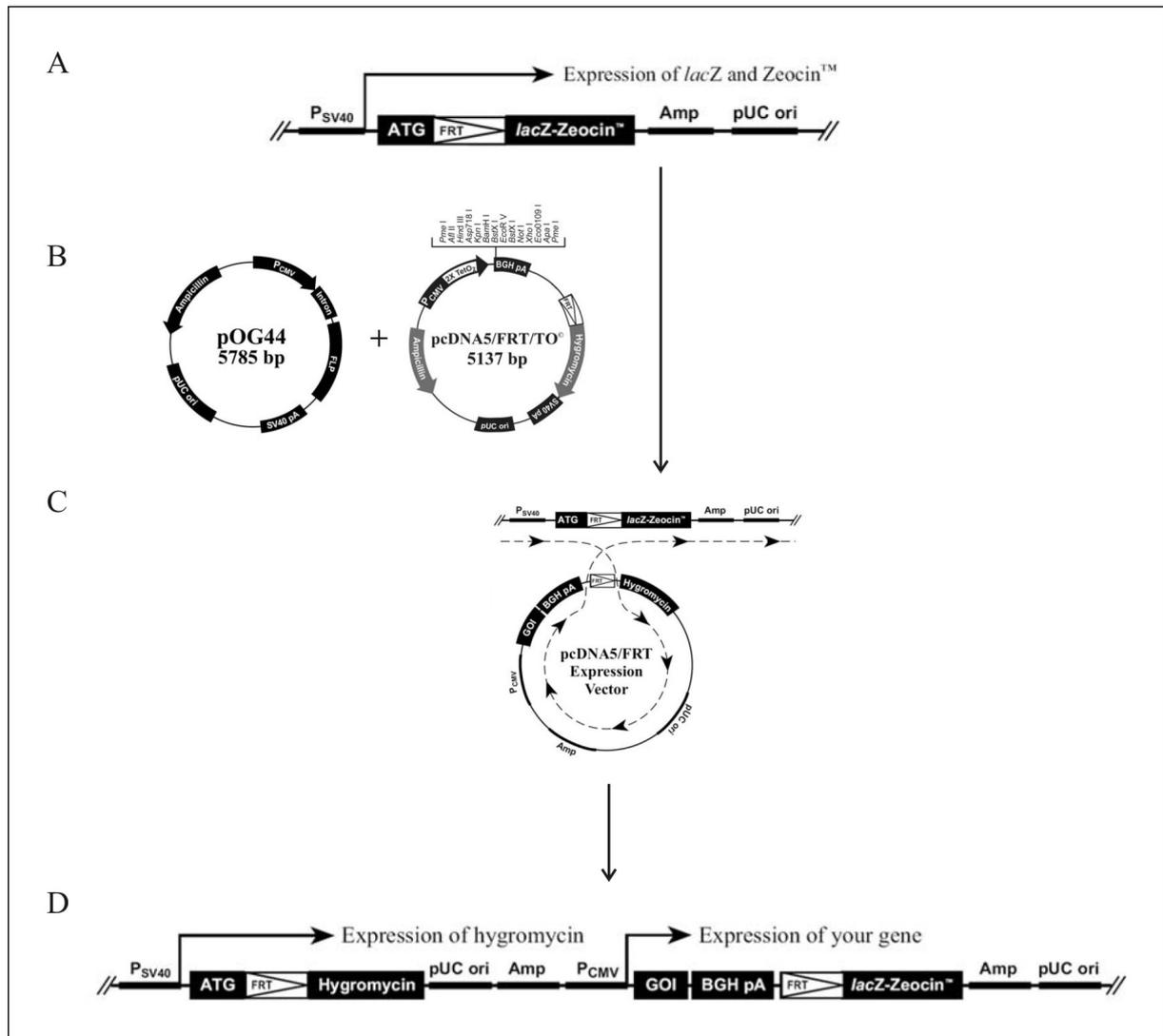


Abbildung 2.1: Das Flp-In™-System

(A) Die Flp-Erkennungssequenz (FRT) ist permanent in das Genom der Zelle integriert. (B) Karten der Vektoren pOG44 und pcDNA5/FRT/TO. (C) Darstellung der homologen Rekombination durch die Flp-Rekombinase. (D) Das Konstrukt ist stabil in das Genom der Zelle integriert. Die Zelle ist Hygromycin-resistent und kann selektiert werden. Die Abbildung ist folgender Homepage entnommen: <https://commerce.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=iProtocol.unitSectionTree&treeNodeId=55F2130DA22F656ED0E5906186F8965>

B

Rekombinase stabil integriert ist, (2) die Expression des gewünschten Proteins wird durch Tetracyclin-Zugabe (1 µg/ml) induziert.

Die FRT-Erkennungssequenz liegt in der kodierenden Sequenz eines Fusionsproteins aus β -Galaktosidase und einem Zeozin-Resistenz bewirkenden Protein. Diese Flp-In-Zellen können mit Zeozin selektiert werden und sind zusätzlich resistent gegen Blasticidin. Die cDNAs für Wildtyp und KIF1B α -S1053A,S1141A wurden in den die FRT-Sequenz enthaltenden Vektor pcDNA5/FRT/TO kloniert und gemeinsam mit dem die Flp-Rekombinase kodierenden Vektor pOG44 in die Flp-In-Zellen transfiziert. Zellen, die beide Plasmide aufgenommen hatten, exprimierten die Flp-Rekombinase, welche die Rekombination der DNAs einleitet. Der Vektor pcDNA5/FRT/TO enthielt zusätzlich zur gewünschten Sequenz eine Hygromycin B Resistenz. Somit konnten Zellen, die das Konstrukt permanent in das Genom integriert hatten, mit Hygromycin und Blasticidin selektiert werden (Abbildung 2.1). Die Zelllinien wurden kultiviert und 24 h vor Versuchsbeginn mit 1 µg/ml Tetracyclin inkubiert, um die KIF1B α -Expression zu stimulieren.

2.4.5 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Um sicherzustellen, dass man über Jahre mit derselben Zelllinie arbeiten kann, müssen Zellen eingefroren und gelagert werden. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese mit Trypsin von der Kulturschale gelöst, in Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden daraufhin mindestens 24 h bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Die so gelagerten Zellen sind über Jahre haltbar.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis die Zellen fast vollständig aufgetaut waren. Daraufhin wurden sie in Zentrifugenröhrchen mit frischem Medium überführt und 1 min bei 1200 g abzentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in Kulturschalen überführt. Die Kultur der Zellen erfolgte wie unter 2.2.3 beschrieben.

2.4.6 Zellyse mit Triton X-100

Durch Lyse der Zellen mit dem Detergenz Triton X-100 wurden zytoplasmatische und membranständige Proteine in Lösung gebracht, während der Zellkern und Teile des Zytoskeletts in diesem Puffer unlöslich waren.

Die Zellen wurden mit dem Medium von der Oberfläche der Kulturschale ab gespült und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend bei 1200 g 1 min abzentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in 200 µl Lysepuffer aufgenommen und 3 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde 15 min bei 13000 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, während das Pellet bei Bedarf in 200 µl Lämmli-puffer aufgenommen wurde. Beide Fraktionen wurden kurze Zeit auf Eis oder für mehrere Tage bei -20°C bzw. -80°C aufbewahrt.

2.4.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Messung der Proteinkonzentration der Lysate wurde die Bradford-Methode eingesetzt (Bradford, 1976). Der Nachweis erfolgt hierbei über die Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Die Lysate wurden 1:800 in der Bradford-Lösung verdünnt und die Absorption in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Standard wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (1-10 µg/ml) eingesetzt und über lineare Regression die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt.

2.4.8 Immunpräzipitation (IP)

Protein-G bindet spezifisch an den konstanten Teil der IgG-Klasse von Immunglobulinen. Durch kovalente Kopplung an Sepharosekügelchen entsteht eine Substanz mit hoher Affinität zu diversen IgG Antikörpern verschiedener Organismen, die sowohl in Lösungen resuspendierbar ist, als auch durch Zentrifugation von der flüssigen Phase getrennt werden kann. In dieser Arbeit wurden Protein-G Sepharosekügelchen zur Präzipitation von Proteinen, an die Maus-IgG gebunden waren, eingesetzt. Fusionsproteine aus GFP (green fluorescent protein) und KIF1B α wurden mit speziellen GFP-bindenden Agarosekügelchen (Chromotek, Hannover, DE) präzipitiert, an die ein Fragment eines GFP-bindenden Antikörpers kovalent gebunden vorlag.

Je IP wurden 180 µl Lysat, 180 µl HNTG und 15 µl Protein-G Sepharose bzw. GFP-Agarosekügelchen zusammenpipettiert und 3 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die IPs abzentrifugiert (3000 g, 10 s) und der Überstand verworfen. Das Entfernen ungebundener Proteine erfolgte durch dreimaliges Waschen mit HNTG. Abschließend wurden die IPs in Lämmli-puffer aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt, um die Bindung zwischen den Proteinen zu trennen.

2.4.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch Elektrophorese in Polyacrylamidgelen. In dieser Arbeit wurde die SDS-PAGE verwendet, bei der die Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden. Das im Lämmli-puffer enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert inter- und intramolekulare Disulfidbrücken und das SDS bindet an die Proteine, wodurch negativ geladene SDS-Protein-Komplexe entstehen. Zusätzlich denaturiert SDS Proteine und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Somit werden die Proteine nur noch anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die Wanderungstrecke der Proteine hängt von der Dichte des Gels ab. Daher wurden abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine 8 bzw. 10%ige SDS-Polyacrylamidgele benützt, auf die ein 4%iges Sammelgel gegossen wurde. Als Molekulargewichtsstandard wurden folgende Proteine eingesetzt:

Myosin	200 kDa
β -Galactosidase	116 kDa
Phosphorylase b	97 kDa
Rinderserumalbumin	66 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Kohlenstoff-Anhydrase	31 kDa
Trypsin-Inhibitor	21 kDa
Lysozym	14 kDa

2.4.10 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot)

Proteine werden beim Blotten elektrophoretisch vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und auf ihr immobilisiert. In dieser Arbeit wurde das Semi-dry Blot Verfahren eingesetzt. Dabei wurden drei Lagen mit Transblot-Puffer getränktes Filterpapier auf die Anode gelegt. Auf diese Schicht wurde die ebenfalls in Transblot-Puffer getränkte Nitrozellulose platziert. Das SDS-Gel wurde 5 min in Transblot-Puffer inkubiert und blasenfrei auf die Nitrozellulosemembran gelegt. Zuletzt wurde das Gel mit drei Lagen getränktem Filterpapier bedeckt. Der Transfer erfolgte bei 4°C mit 0,34 mA/cm² für 3 h. Anschließend wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran durch Ponceau S gefärbt und die Banden des Molekulargewichtsstandards markiert. Die Membranen wurden durch Waschen mit NET entfärbt und mindestens 1 h in NET-G inkubiert, wobei einmalig der Puffer gewechselt wurde. Durch das Blocken der Membran mit NET-G sollten unspezifische Bindungen der Antikörper an Proteine und Membran verhindert werden.

2.4.11 Immunblotanalyse und Detektion durch Chemilumineszenz (ECL)

Die auf Nitrozellulose immobilisierten Proteine wurden durch Bindung spezifischer Antikörper in einer Immunblotreaktion nachgewiesen. Die in dieser Arbeit benutzten Antikörper sind in 2.1.9 aufgeführt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:1000) erfolgte in NET-G über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Die Membranen wurden anschließend drei Mal 30 min bei Raumtemperatur mit NET gewaschen, bevor sie mit dem an Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörper (1:15000) in NET für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Abschließend wurden die Membranen erneut drei Mal mit NET gewaschen. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des Luminols, das in der ECL-Lösung enthalten ist. Die dabei entstehende Chemilumineszenz wurde durch Auflegen eines Röntgenfilmes detektiert. Für die Auswertung wurden die Filme eingescannt und bei Bedarf densitometrisch ausgewertet.

2.4.12 Proteindephosphorylierung durch λ -PPase

Um die Spezifität der in Kaninchen erzeugten Antikörper gegen zwei phosphorylierte Aminosäuren in KIF1B α zu untersuchen, wurde ein Fusionsprotein aus myc-Epitop und KIF1B α in HEK293-Zellen transient überexprimiert. Dieses Fusionsprotein wurde mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper 3 h auf einem Drehrad bei 4°C immunpräzipitiert und die IPs anschließend drei Mal mit dem NEB-Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,01% Brij 35, pH 7.5) gewaschen. Die Hälfte der IPs wurde in Lämmli-puffer aufgenommen. Die restlichen IPs wurden 30 min bei 30°C auf einem Schüttler mit 50 U λ -PPase in NEB-Puffer mit 1 mM MnCl₂ inkubiert. Anschließend wurden diese IPs in Lämmli-puffer aufgenommen und vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel 5 min bei 95°C erhitzt.

2.4.13 *In vitro* Kinase-Assay

Der *in vitro* Kinase-Assay ist eine Methode, um potentielle Kinasen eines Substrates zu identifizieren. Das in diesem Kinase-Assay benutzten Fusionsprotein aus GST und KIF1B α wurde rekombinant in Bakterien hergestellt und anschließend aufgereinigt (DSTT). Der Kinase-Assay wurde mit 5 μ g Fusionsprotein je Probe durchgeführt. Das Fusionsprotein wurden in An- bzw. Abwesenheit von 0,1 mM MgATP mit 1 mU/ μ l Kinase 30 min bei 30°C in einem Reaktionsmix (50 mM TrisCl, 100 μ M EGTA, 1 mM DTT) unter konstantem Schütteln inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde Lämmli-puffer zugefügt und die

Proben aufgeköcht. Die Fusionsproteine wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (2.4.9, 2.4.10). Die Phosphorylierung der Fusionsproteine wurde durch spezifische Phosphoantikörper in einer Immunblotanalyse nachgewiesen (2.4.11). Die benutzten rekombinanten Kinasen sind in Abbildung 3.12 aufgeführt.

2.4.14 Stimulierung von Zellen mit Aktivatoren und Inhibitoren verschiedener Kinasen bzw. dem Phosphatasehemmer Calyculin A

Um die Aktivität der Kinasen herab zu setzen, wurden HEK293-Zellen 24 h nach der Transfektion in Kulturmedium ohne FCS über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mit verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren inkubiert. Die Konzentrationen und Inkubationszeiten sind unten aufgeführt. Die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren erfolgte vor der Zugabe der Aktivatoren. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert (2.4.6). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (2.4.9) aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert (2.4.10). Die Phosphorylierung wurde entweder in einem Overlay-Assay durch 14-3-3-Bindung (2.4.15) oder mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (2.4.11).

Substanz	Konzentration	Inkubationsdauer	Bezugsquelle
IGF-1	50 ng/ml	15 min	Invitrogen (Eggenstein, DE)
PI103	1 μ M	30 min	DSTT (Dundee, UK)
EGF	100 ng/ml	15 min	Invitrogen (Eggenstein, DE)
PMA	100 ng/ml	30 min	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
BID1870	10 μ M	30 min	Böhringer Ingelheim (Ingelheim, DE)
FSK	20 μ M	30 min	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
H89	30 μ M	30 min	Calbiochem (Darmstadt, DE)
A23187	10 μ M	15 min	Calbiochem (Darmstadt, DE)
A-769662	50 μ M	1 h	DSTT (Dundee, UK)
Calyculin A	50/100 nM	10 min	Calbiochem (Darmstadt, DE)
AICAR	1 mM	1 h	Biomol (Hamburg, DE)
Akti-1/2	10 μ M	30 min	Calbiochem (Darmstadt, DE)
Rapamycin	50 nM	30 min	Calbiochem (Darmstadt, DE)
Gö6976 und Gö6983	1 μ M	30 min	Calbiochem (Darmstadt, DE)

2.4.15 Overlay-Assay/ Far Western

Bei einem Overlay-Assay bzw. Far Western wird die *in vitro* Bindung zweier Proteine untersucht. In dieser Arbeit wurde die Bindung der 14-3-3-Isoformen Bmh1 und Bmh2 aus *Saccharomyces cerevisiae* an KIF1B α untersucht.

Die 14-3-3-Isoformen wurden rekombinant hergestellt und mit dem DIG-Protein Labeling Kit (Roche, Mannheim, DE) mit Digoxigenin gekoppelt. Die freien Aminogruppen der zu markierenden Proteine reagieren dabei mit Digoxigenin-3-0-succinyl-e-aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimide ester (DIG-NHS) unter Bildung einer stabilen Amidbindung. DIG-NHS, dass nicht mit den Proteinen reagiert hatte, wurde über Nacht durch Dialyse gegen PBS entfernt. Die Proteine wurden auf 1 μ g/ml in einem Tris-Puffer (25 mM Tris, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1% Milchpulver) verdünnt.

Für den Overlay-Assay wurden transient GFP-KIF1B α überexprimierende Zellen mit verschiedenen Substanzen behandelt und lysiert (2.4.14, 2.4.6). Das Fusionsprotein wurde mit GFP-bindenden Agarosekügelchen präzipitiert (2.4.8), durch SDS-PAGE (2.4.9) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2.4.10) und in Tris-Puffer mit 1% Milchpulver geblockt. Diese Membran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit der 14-3-3-DIG Lösung inkubiert. Die gebundenen 14-3-3-Proteine wurden mit Hilfe eines Meerrettichperoxidase gekoppelten Fab-Fragment Antikörpers in einer Immunblotanalyse mit ECL nachgewiesen (2.4.15).

2.5 Immunfluoreszenzanalyse

Durch Immunfluoreszenz können bestimmte Proteine in Zellen detektiert und somit ihre genau Lokalisation bestimmt werden. Dazu werden Zellen fixiert und deren Membranen permeabilisiert, damit spezifische Antikörper eindringen und an das gewünschte Protein binden können. Diese spezifischen Antikörper werden dann durch Farbstoff-gekoppelte Antikörper nachgewiesen, die im Fluoreszenzmikroskop sichtbar sind.

NIH3T3 Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und entsprechend des Versuchsprotokolls behandelt. Zellen, deren Mitochondrien angefärbt wurden, wurden vor dem Fixieren 30 min bei 37°C mit MitoTracker (1 μ g/ml) inkubiert. Die Zellen wurden zwei Mal kurz mit PBS gewaschen und mit einer PBS gepufferten 3,7% Formaldehydlösung 10 min bei 4°C und

anschließend 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Das Formaldehyd wurde in drei Waschgängen mit 10% FCS in PBS entfernt. Das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch 20-minütige Inkubation mit 10% FCS, 0,1% Saponin in PBS bei Raumtemperatur, wobei das Saponin die Zellmembran permeabilisierte. Die Zellen wurden 1 h bei 37°C mit dem primären Antikörper (2.1.9) in 10% FCS in PBS inkubiert. Um den Verbrauch des Antikörpers gering zu halten, wurden je Glasplättchen 35 µl der Antikörperlösung hergestellt und auf Parafilm getropft. Die Glasplättchen wurden dann mit der Zellseite nach unten in die Tropfen gelegt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer, um das Eintrocknen der Antikörperlösung zu verhindern. Der primäre Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 10% FCS in PBS entfernt, bevor die Zellen mit dem sekundären Antikörper (1:400, 1 h, 37°C) inkubiert wurden. Es wurde wie mit dem Primärantikörper verfahren. Das Entfernen nicht gebundener Antikörper erfolgte durch dreimaliges Waschen in PBS und einmaligem Waschen in destilliertem Wasser, bevor die Glasplättchen in Permafluor (Immunotech, Marseille, FR) auf einem Objektträger eingebettet wurden. Nach Aushärten des Einbettmediums wurden die Zellen unter einem konfokalen Lasermikroskop von Leica untersucht.

2.5.1 Spreading-Assay

In einem sogenannten „spreading assay“ kann die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion und Ausbreitung nach erfolgter Trypsinierung untersucht werden. Beim Trypsinieren kugeln sich die Zellen ab und die strikte intrazelluläre Organisation geht verloren. Beim Absetzen und Ausbreiten der Zellen reorganisieren die Zellen ihre intrazellulären Strukturen, das Zytoskelett nimmt wieder seine filamentöse Form an und Organelle werden wieder an die vorgesehene Position transportiert. Daher gibt diese Methode Aufschluss darüber, ob die Zellen in der Lage sind, ihre intrazellulären Strukturen und Organellen neu zu organisieren.

NIH3T3-Zellen wurden in 6-Loch-Kulturschalen ausgesät, transient transfiziert und 36 h nach der Transfektion trypsiniert und auf Glasplättchen ausgesät (2.4.1). Die Fixierung der Zellen erfolgte 24 h nach der Aussaat und mit Hilfe von Antikörpern bzw. MitoTracker wurden bestimmte Proteine bzw. die Mitochondrien angefärbt (2.5).

2.5.2 Bestimmung der Quotienten aus Zelllänge und -breite

NIH3T3-Zellen sind länglich Zellen mit mehreren Fortsätzen. Im Spreading-Assay, mit KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierenden Zellen, zeigte sich, dass die Zellen runder waren und nur wenige Fortsätze ausbildeten. Um diesen Effekt quantifizieren zu können wurden Aufnahmen der überexprimierenden Zellen gemacht. Die Bestimmung der Zelllänge und Zellbreite erfolgte im LeicaLite Programm. Die Zelllänge wurde zwischen den beiden am entferntesten voneinander liegenden Punkten der Zelle gemessen, während die Zellbreite zwischen den am nächsten zueinander liegenden Plasmamembranen bestimmt wurde. Die Messstrecken wurden immer durch den Zellkern gelegt. Aus diesen Werten wurde der Quotient Zelllänge:Zellbreite ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Das Motorprotein KIF1B α ist ein 14-3-3-Bindungspartner

KIF1B α und KIF1B β sind die wichtigsten Splicevarianten des *kif1b* Gens (Gong et al., 1999) und gehören zur Kinesin-3-Familie. Die Mitglieder der Kinesin-3-Familie (Lawrence et al., 2004) zeichnet eine starke Homologie der N-terminalen Motordomäne und das Vorhandensein einer C-terminal von der Motordomäne gelegenen FHA-Domäne aus (Hirokawa und Noda, 2008). Die restliche Proteinsequenz dieser Kinesine unterscheidet sich, wodurch die unterschiedliche Spezifität der Motorproteine für verschiedene Frachten bedingt ist. Obwohl KIF1B α und KIF1B β durch dasselbe Gen kodiert werden, unterscheiden sich die C-terminalen Bereiche dieser beiden Motorproteine erheblich. Dies kommt durch alternatives Splicen der prä-mRNA von *kif1b* zustande. Während KIF1B α eine hohe Homologie zu KIF1C im C-terminalen Bereich besitzt, gleicht KIF1B β sowohl in der Länge als auch in der Sequenz KIF1A (Abbildung 3.1). In Veröffentlichungen werden oft Kinesin-Phylogramme dargestellt, in denen nicht zwischen KIF1B α und KIF1B β unterschieden wird, sondern nur KIF1B dargestellt ist, wie auch in Abbildung 1.2 zu sehen ist. Die Autoren dieser Veröffentlichungen beziehen sich in den meisten Fällen auf KIF1B β und zeigen dementsprechend eine höhere Homologie zu KIF1A.

KIF1C wurde durch Dorner et al. als ein 14-3-3-Bindungspartner identifiziert, wobei die Bindung an S1092 erfolgt (1999). Durch Sequenzvergleich der C-terminalen Bereiche in KIF1C und KIF1B α konnte eine zu S1092 in KIF1C homologe potentielle 14-3-3-Bindungsstelle in KIF1B α an S1141 ermittelt werden (Abbildung 3.2). Die Aminosäuresequenz um S1141 in KIF1B α weist eine hohe Homologie zu den in Abbildung 3.3 gezeigten Konsensusstellen für die 14-3-3-Proteinbindung auf. Die Homologie der Aminosäuresequenz um S1141 in KIF1B α zu der 14-3-3-Bindungsstelle in KIF1C einerseits und zu den 14-3-3-Konsensusbindungsstellen andererseits führte zu der These, dass S1141 in KIF1B α eine potentielle 14-3-3-Bindungsstelle ist. Um diese Hypothese zu untermauern, wurde die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α in einem Überexpressionsversuch untersucht.

(Abbildung 3.4, Spur 1). Die Bindung zwischen KIF1B α und 14-3-3 γ in diesen Zellen ist ein Zeichen dafür, dass KIF1B α auch in gehungerten und unstimulierten Zellen zu einem gewissen Grad phosphoryliert vorlag.

Um die Bedeutung der Aminosäure S1141 in KIF1B α für die Bindung an 14-3-3-Proteine aufzuklären, wurde die cDNA derart mutiert, dass Serin an Position 1141 durch Alanin ersetzt wurde. Durch IP des 14-3-3-Fusionsproteins konnte eine verminderte Bindung der KIF1B α -Mutante (S1141A) gezeigt werden. Die Bindung konnte jedoch nicht vollständig durch diese Mutation verhindert werden (Abbildung 3.4, Spur 2). Dies deutet auf eine weitere 14-3-3-Bindungsstelle in KIF1B α hin. Im Gegensatz dazu verhinderte die Mutation S1092A in KIF1C die Bindung an 14-3-3-Proteine vollständig (Dorner et al., 1999).

Weitere potentielle 14-3-3-Bindungsstellen in KIF1B α wurden durch eine Analyse mit dem Programm ScanSite identifiziert. Diese Analyse ergab drei weitere 14-3-3-Bindungsstellen in KIF1B α an S1053, S1051 und S420, wobei S1053 die höchste Wahrscheinlichkeit hatte, eine 14-3-3-Bindungsstelle zu sein (Abbildung 3.3).

Diese potentielle 14-3-3-Bindungsstelle wurde entsprechend S1141 durch Alanin ersetzt. Die Bindung zwischen 14-3-3 γ und KIF1B α -S1053A war ebenfalls schwächer als an Wildtyp

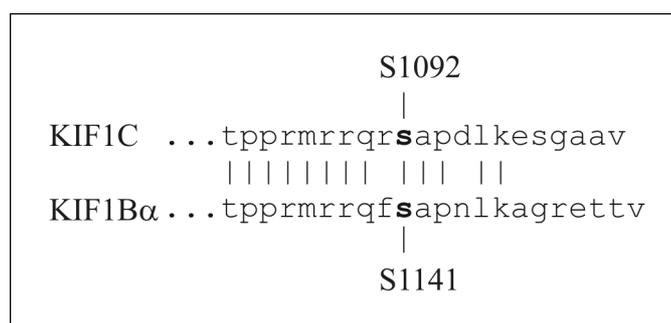


Abbildung 3.2: Hohe Homologie zwischen S1053 in KIF1B α und S1092 in KIF1C

Durch Vergleich der C-terminalen Bereiche von KIF1C und KIF1B α wurde eine potentielle 14-3-3-Bindungsstelle in KIF1B α identifiziert, die homolog zu S1092 in KIF1C ist: S1141. Diese Aminosäure ist von einer Aminosäuresequenz umgeben, die eine hohe Homologie zu den 14-3-3-Konsensusbindungsstellen rsxSxp und rxxxSxp aufweist, wobei r für Arginin, s für Serin, p für Prolin und x für eine beliebige Aminosäure steht. Die fett gedruckten s stellen die für eine 14-3-3-Bindung nötigen Phosphorylierungsstellen dar.

KIF1B α , aber etwas stärker als die Bindung zwischen 14-3-3 γ und KIF1B α -S1141A (Abbildung 3.4, Spur 3), wodurch nahe gelegt wird, dass S1141 eine stärkere Bindungsstelle für 14-3-3 γ ist als S1053. Erst durch Mutation beider 14-3-3-Bindungsstellen konnte die Bindung verhindert werden (Abbildung 3.4, Spur 4). Dies zeigt, dass S1053 und S1141 14-3-3-Bindungsstellen sind und dass bereits eine Bindungsstelle für eine schwache 14-3-3-Bindung ausreicht. Daraus ergibt sich die Frage, ob KIF1B α sowohl dimere als auch monomere 14-3-3-Proteine binden kann. Diese Fragestellung ist von Interesse, denn für viele Proteine mit zwei 14-3-3-Bindungsstellen ist es entscheidend, dass 14-3-3 als Dimer vorliegt, um eine stabile Bindung zu erhalten (Shen et al., 2003).

Um zu prüfen, ob KIF1B α auch monomere 14-3-3-Proteine binden kann, wurden KIF1B α und dimerisierungsdefektes 14-3-3 γ (Tzivion et al., 1998) überexprimiert und ihre Bindung durch eine Co-IP untersucht (Abbildung 3.4, Spur 5). KIF1B α war nicht in der Lage, monomeres 14-3-3 γ zu binden, sondern konnte nur mit dimeren 14-3-3-Proteinen eine stabile Bindung eingehen. Es gibt viele Beispiele, in denen ein Protein nur mit dimeren 14-3-3-Proteinen eine stabile Bindung eingehen kann, darunter sind der IGF-1 Rezeptor, IRS-1 (Insulinrezeptor-Substrat-1) und Vimentin (Tzivion und Avruch, 2002).

	S1053	...pqlrwrns sl nnggpks...
	S1051	...qppqlrwr sn slnnggp...
	S420	...tsiqerim st pggeeai...
14-3-3 konsensus 1		rsx s xp
14-3-3 konsensus 2		rxxx s xp

Abbildung 3.3: Weitere potentielle 14-3-3-Bindungsstellen in KIF1B α

Die Analyse wurde auf der Internetseite http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml mit mittlerer Stringenz („medium stringency“) durchgeführt. Die drei zusätzlichen 14-3-3-Bindungsstellen sind S1053, S1051 und S420, wobei S1053 die höchste Wahrscheinlichkeit hat, eine 14-3-3-Bindungsstelle zu sein. r steht für Arginin, s für Serin, p für Prolin und x für eine beliebige Aminosäure. Die fett gedruckten s stehen für die potentiellen Phosphorylierungsstellen, die für eine 14-3-3-Bindung nötig sind.

Obwohl die Zellen in Abbildung 3.4 mit den gleichen DNA-Mengen transfiziert wurden, wird deutlich, dass Wildtyp KIF1B α im Lysat in einer höheren Konzentration vorlag als dessen Mutanten, wenn 14-3-3 γ co-transfiziert wurde. Durch eine Co-Transfektion von Wildtyp KIF1B α und dimerisierungsdefektem 14-3-3 γ reduzierte sich die Menge an KIF1B α im Lysat ebenfalls. Dies kann sowohl eine geringere Expression der Proteine bedeuten als auch eine Änderung der Tritonlöslichkeit. Dieser Aspekt wird im folgenden Kapitel weiter beleuchtet.

Die Bindung zwischen endogenem KIF1B α und 14-3-3-Proteinen wurde anhand von 14-3-3 γ und 14-3-3 β untersucht. Da gezeigt werden konnte, dass die Bindung von 14-3-3-Proteinen an KIF1B α von der Phosphorylierung der Bindungsstellen abhängig ist, wurden HEK293-Zellen mit Calyculin A inkubiert. Ser/Thr-Phosphatasen wurden dadurch gehemmt und damit die allgemeine Proteinphosphorylierung in den Zellen erhöht. Nach der Lyse der Zellen erfolgte

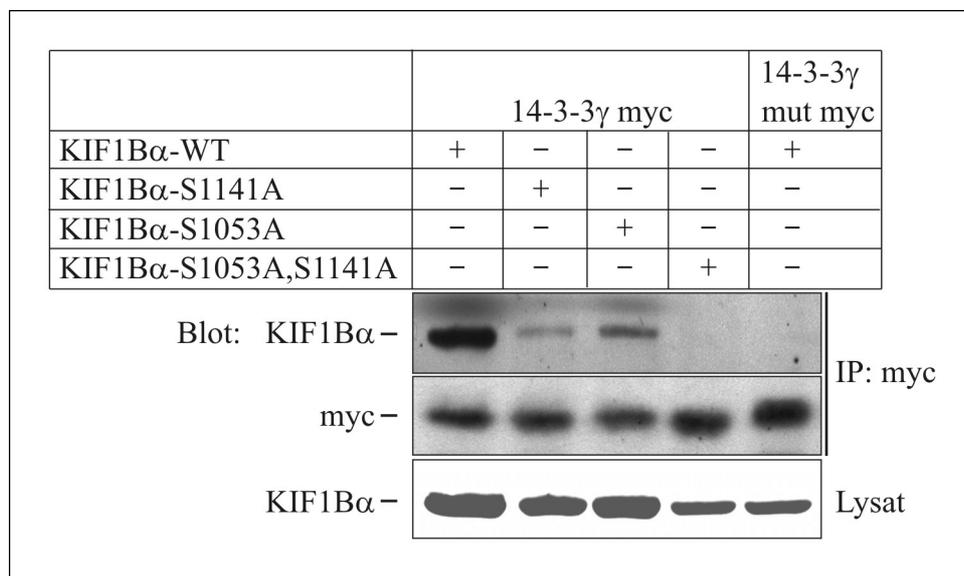


Abbildung 3.4: 14-3-3 γ -Bindung an KIF1B α

HEK293-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Wildtyp bzw. mutiertes KIF1B α und dem Fusionsprotein aus myc-Epitop und Wildtyp bzw. dimerisierungsdefektem 14-3-3 γ transient transfiziert. Die Zellen wurden in einem Tritonpuffer lysiert und die Proteine mit einem myc-Antikörper immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Membranen wurden mit den entsprechenden Antikörpern gegen KIF1B α bzw. myc inkubiert und die Proteine wurden in einer Immunblotanalyse mit ECL detektiert.

eine IP mit 14-3-3 γ und 14-3-3 β -bindenden Antikörpern. Als Kontrolle wurden IPs mit einem GST-Antikörper durchgeführt. Dadurch wurde eine unspezifische Bindung von KIF1B α und den 14-3-3-Proteinen an Antikörper bzw. G-Sepharose ausgeschlossen. KIF1B α wurde ausschließlich in Proben detektiert, in denen 14-3-3-Proteine präzipitiert wurden. Dieser Versuch zeigt, dass sowohl 14-3-3 γ als auch 14-3-3 β endogen an KIF1B α binden (Abbildung 3.5).

KIF1B α und KIF1C sind über weite Bereiche homolog, unterscheiden sich allerdings in den Aminosäuresequenzen um S1053 in KIF1B α stark. Dies wird in Abbildung 3.1 deutlich. S1053 in KIF1B α liegt in der Grafik an Position 1511. KIF1C ist in diesem Proteinabschnitt nicht homolog zu KIF1B α . Dies zeigt, dass KIF1B α und KIF1C nicht auf die gleiche Weise durch 14-3-3-Bindung reguliert werden.

Somit ist gezeigt, dass KIF1B α ebenso wie KIF1C ein 14-3-3-bindendes Protein ist. Die 14-3-3-Bindung an KIF1B α erfolgt im Gegensatz zu KIF1C an zwei Bindungsstellen und KIF1B α kann keine stabile Bindung mit monomeren 14-3-3-Proteinen eingehen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass endogenes KIF1B α mit endogenem 14-3-3 γ bzw. 14-3-3 β eine Bindung eingeht.

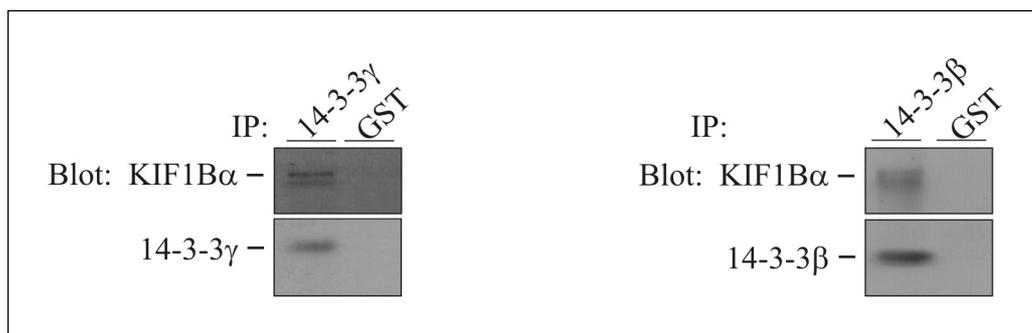


Abbildung 3.5: Bindung von endogenem KIF1B α und 14-3-3 γ bzw. 14-3-3 β

HEK293-Zellen wurden 10 min mit 100 nM Calyculin A inkubiert. Der Lyse im Tritonpuffer folgte eine IP mit spezifischen anti-14-3-3 γ bzw. anti-14-3-3 β Antikörpern. Der GST-Antikörper wurde in einer Kontroll-IP eingesetzt. Nachdem die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert waren, wurden KIF1B α und 14-3-3 γ bzw. 14-3-3 β mit spezifischen Antikörpern in einer Immunblotanalyse nachgewiesen.

3.2 KIF1B α -Stabilität und -Tritonlöslichkeit

3.2.1 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α erhöht dessen Stabilität und Tritonlöslichkeit

Wie bereits in Abbildung 3.4 deutlich wurde, ist die KIF1B α -Menge in Tritonlysaten transient überexprimierender Zellen von Mutationen in KIF1B α selbst bzw. von Mutationen im co-transfizierten 14-3-3 γ abhängig. Daher sollte die Bedeutung der 14-3-3-Bindung an KIF1B α auf die Stabilität bzw. Tritonlöslichkeit des endogenen Proteins untersucht werden.

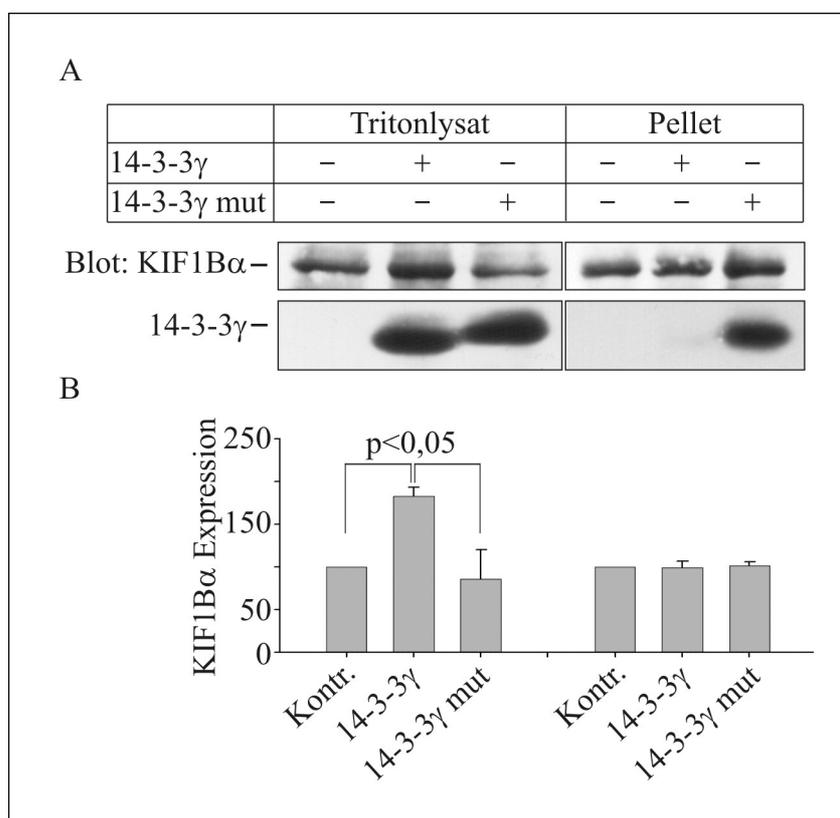


Abbildung 3.6: Die KIF1B α -Stabilität und -Tritonlöslichkeit wird durch 14-3-3 γ -Bindung erhöht

(A) Transient Wildtyp bzw. dimerisierungsdefektes 14-3-3 γ überexprimierende HEK293-Zellen wurden in einem Tritonpuffer lysiert. Die tritonunlöslichen Pellets wurden in Lämmli-puffer resuspendiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. (B) Die resultierenden Banden wurden densitometrisch ausgewertet (n = 3)

Zu diesem Zweck wurde die endogene KIF1B α -Menge in Wildtyp bzw. dimerisierungsdefektes 14-3-3 γ transient überexprimierenden HEK293-Zellen bestimmt. Um einen Einfluss der Transfektion selbst auf die KIF1B α -Menge ausschließen zu können, wurden die Kontrollzellen mit einem Kontrollvektor transfiziert. Nach der Tritonlyse wurden die Pellets in Lämmli-puffer resuspendiert, um die KIF1B α -Menge im tritonunlöslichen Anteil der Proteine zu bestimmen. Die KIF1B α -Menge im Tritonlysat Wildtyp 14-3-3 γ überexprimierender Zellen war signifikant erhöht, während die Überexpression des dimerisierungsdefekten 14-3-3 γ bzw. des Kontrollproteins keinen Einfluss auf die KIF1B α -Menge im Lysat hatte. Die KIF1B α -Menge im tritonunlöslichen Anteil der Proteine war in allen drei Proben vergleichbar hoch (Abbildung 3.6). Dieses Ergebnis wurde durch densitometrische Bestimmung der Bandenstärke in drei unabhängigen Versuchen verifiziert.

Dieses Experiment zeigt, dass durch die 14-3-3-Bindung an KIF1B α das endogene Protein stabilisiert wird und dass sich gleichzeitig dessen Tritonlöslichkeit erhöht. Durch Lyse in Tritonpuffer werden zytosolische und membranständige Proteine von Kernproteinen getrennt. Zytoskelettbestandteile liegen hingegen sowohl in der tritonlöslichen, als auch in der tritonunlöslichen Fraktion vor, wobei sich im tritonunlöslichen Teil der filamentöse Anteil des Zytoskeletts befindet. Durch 14-3-3-Bindung an KIF1B α ändert sich dessen Tritonlöslichkeit und damit die intrazelluläre Lokalisation bzw. die Bindung an tritonunlösliche Strukturen des Zytoskeletts.

3.2.2 KIF1B α -S1053A,S1141A-Expression in permanenten Zelllinien ist niedriger als bei Wildtyp KIF1B α

Da KIF1B α in Zusammenhang mit der Translokation von GLUT1 (Bunn et al., 1999) und kürzlich mit Diabetes gebracht wurde (Palsgaard et al., 2009), sollte untersucht werden, ob KIF1B α eine Bedeutung bei der Glukoseaufnahme hat.

Zu diesem Zweck wurden permanente Wildtyp bzw. KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierende Zelllinien hergestellt. Da es Schwierigkeiten bei der Herstellung der Zelllinien gab, wurden verschiedene parentale Zelllinien transfiziert und in Selektionsmedium vermehrt. Die Zelllinien, die in HEK293- und C₂C₁₂-Zellen hergestellt wurden, verloren die Expression sehr schnell, wobei die Expression der Mutante schneller verloren ging und meist niedriger war als die Expression des Wildtyp Proteins.

In einem weiteren Versuch wurden HEK293 Flp-In-Zellen mit Expressionsvektoren für die Fusionsproteine GFP-KIF1B α und GFP-KIF1B α -S1053A,S1141A transfiziert. Eine parallel überexprimierte Rekombinase integrierte das Konstrukt an einer bestimmten Stelle im Genom. Diese Zelllinien waren dazu vorgesehen, die GLUT1-vermittelte Glukoseaufnahme zu untersuchen. Da es Belege dafür gibt, dass die GLUT1-Expression durch Langzeitbehandlung mit niedrigen Insulinkonzentrationen induziert wird (Sargeant und Paquet, 1993), wurde die KIF1B α -Expression der Zellen unter diesen Bedingungen untersucht. Die KIF1B α -Expression wurde vor Versuchsbeginn durch eine 24-stündige Tetracyclin-Behandlung induziert. Auch in diesen Zelllinien stellte sich heraus, dass die KIF1B α -Mutante in einer viel niedrigeren Menge exprimiert wurde als Wildtyp KIF1B α . Die Wildtyp KIF1B α -Expression

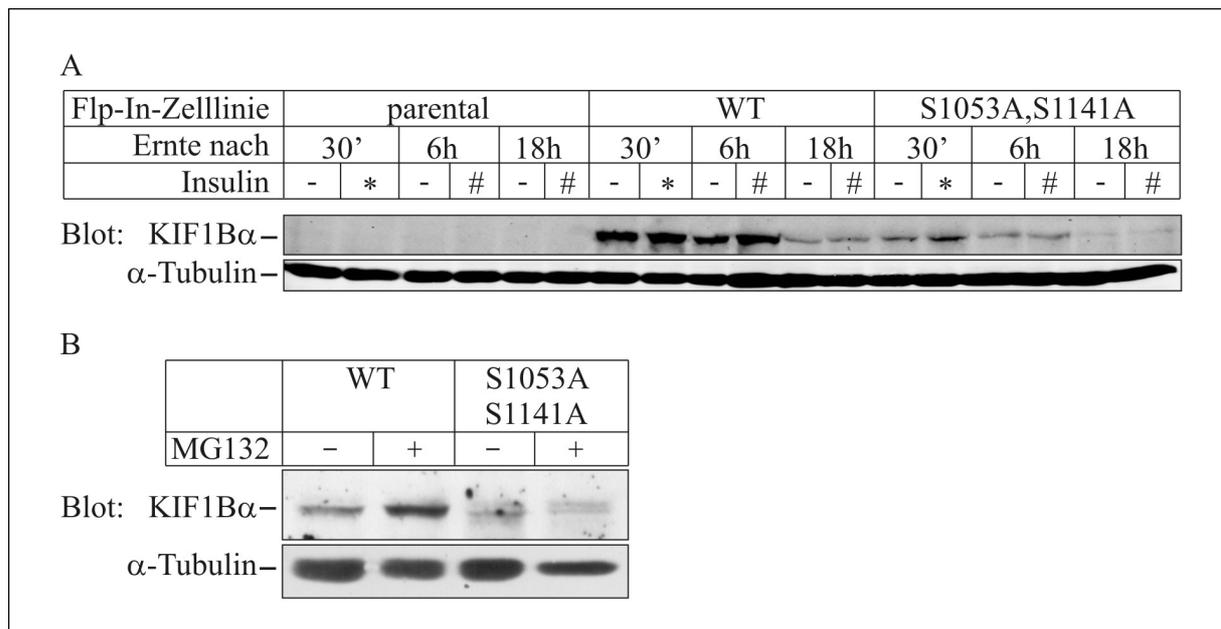


Abbildung 3.7: Eine vergleichbare permanente Expression von Wildtyp bzw. KIF1B α -S1053A,S1141A in Flp-In-Zellen ist nicht möglich

(A) Flp-In HEK293-Zelllinien wurden mit 1 μ M (*) bzw. 100 nM (#) Insulin behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Lämmli-puffer lysiert. (B) Flp-In HEK293-Zelllinien wurden unbehandelt oder 30 h mit 100 nM MG132 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Lämmli-puffer lysiert. (A, B) Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Membranen wurden mit den entsprechenden Antikörpern gegen KIF1B α und α -Tubulin inkubiert und die Proteine in einer Immunblotanalyse detektiert.

wurde durch 6 h Insulinbehandlung minimal gesteigert, während die Expression der Mutante nach 30-minütiger Insulinbehandlung leicht gesteigert war. Nach 18 h ist sowohl die Expression von Wildtyp als auch von mutiertem KIF1B α sehr stark reduziert gewesen (Abbildung 3.7-A). Da die Zellen Wildtyp und KIF1B α -S1053A,S1141A nicht gleich stark überexprimierten, waren sie nicht für die vergleichende Untersuchung der Glukoseaufnahme geeignet.

In einem weiteren Versuch wurde der KIF1B α -Abbau näher beleuchtet. Hierfür wurden die Zellen über Nacht mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Die Inkubation der Wildtyp KIF1B α überexprimierenden Zellen führte zu einer Stabilisierung des Proteins, während die Mutante nicht stabilisiert werden konnte (Abbildung 3.7-B). Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit in Lämmli-puffer aufgenommen, so dass die Banden die Gesamtmenge an KIF1B α in den Zellen repräsentierten.

Die Versuche in HEK293 Flp-In-Zellen zeigten, dass es nicht möglich ist Wildtyp und KIF1B α -S1053A,S1141A in gleichem Maße permanent zu exprimieren. Ein Grund könnte sein, dass die Mutante kein 14-3-3 binden kann und somit instabiler ist. Bei der Untersuchung der KIF1B α -Stabilität zeigte sich, dass endogenes KIF1B α durch Überexpression des Bindungspartners 14-3-3 γ stabilisiert wurde und sich gleichzeitig dessen Tritonlöslichkeit erhöhte. Die Tetracyclin-induzierte Expression von Wildtyp bzw. KIF1B α -S1053A,S1141A in permanenten Flp-In-Zelllinien ergab, dass mutiertes KIF1B α schwächer von den Zellen exprimiert wurde als Wildtyp KIF1B α . Im Gegensatz zu mutiertem KIF1B α konnte die Stabilität des Wildtyp Proteins durch den Proteasom-Inhibitor MG132 erhöht und die Expression durch Insulin-Inkubation induziert werden. Diese Versuche zeigen, dass die Bindung von 14-3-3-Proteinen an KIF1B α wichtig für dessen Stabilität und intrazelluläre Lokalisation ist.

3.3 Die KIF1B α -Dimerisierung ist unabhängig von der 14-3-3-Proteinbindung

Die Kinesine der Kinesin-3-Familie wurden als Monomere beschrieben, da ihnen die für dimere Kinesine typische sehr lange Coiled-Coil-Domäne fehlt. KIF1C war das erste Mitglied dieser Familie, das durch Dorner et al. als Dimer beschrieben wurde (Dorner et al., 1999),

später folgte auch KIF1A (Tomishige et al., 2002). KIF1B α wurde bisher als Monomer beschrieben. Daher sollte in folgendem Versuch geklärt werden, ob KIF1B α als Dimer in den Zellen vorliegt und ob die Dimerisierung von der 14-3-3-Proteinbindung abhängig ist.

Zu diesem Zweck wurden HEK293-Zellen mit Expressionsvektoren für Wildtyp bzw. KIF1B α -S1053A,S1141A und einem mit VSV-Epitop-Tag versehenen KIF1B α -no motor transient transfiziert. KIF1B α -no motor ist eine Deletionsmutante von KIF1B α , deren Motordomäne entfernt wurde. Daher ist KIF1B α -no motor kleiner als Wildtyp KIF1B α und kann von diesem durch SDS-PAGE getrennt werden. Die Zellen wurden in einem Tritonpuffer lysiert und VSV-KIF1B α -no motor wurde immunpräzipitiert.

Durch die IP konnte gezeigt werden, dass sowohl Wildtyp KIF1B α als auch KIF1B α -S1053A,S1141A mit VSV-KIF1B α -no motor co-präzipitierten (Abbildung 3.8). Da sich KIF1B α -no motor in der Coiled-Coil-Domäne nicht von Wildtyp KIF1B α unterscheidet, kann

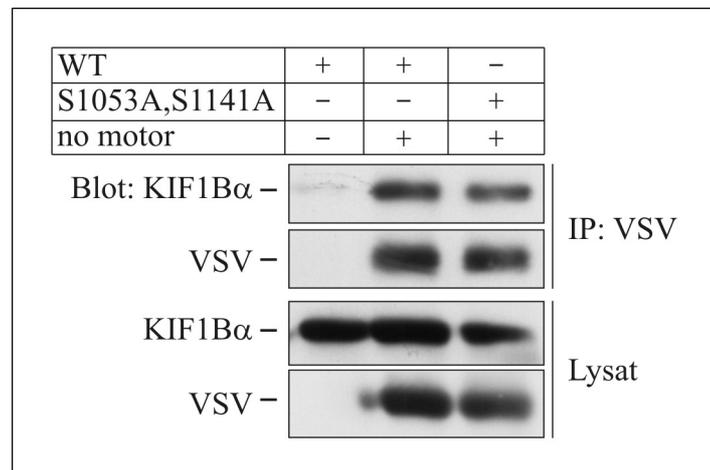


Abbildung 3.8: Die Dimerisierung von KIF1B α ist unabhängig von der 14-3-3-Proteinbindung

HEK293-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Wildtyp bzw. KIF1B α -S1053A,S1141A und einem Fusionsprotein aus VSV-Epitop und KIF1B α -no motor transient transfiziert. KIF1B α -no motor wurde mit einem VSV-Antikörper immunpräzipitiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit spezifischen KIF1B α und VSV Antikörpern in einer Immunblotanalyse mit ECL detektiert.

davon ausgegangen werden, dass KIF1B α homodimerisieren kann. Des Weiteren wird deutlich, dass die Mutation der 14-3-3-Bindungsstellen keinen Einfluss auf die Dimerisierung hat, da auch KIF1B α -S1053A,S1141A und KIF1B α -no motor co-präzipitierten. Demnach ist die Bindung von 14-3-3-Proteinen an KIF1B α nicht nötig für die Dimerisierung, sie unterbindet sie aber auch nicht.

3.4 Akt und AMPK sind potentielle KIF1B α phosphorylierende Kinasen

Die 14-3-3-Bindung an Proteine wird durch die Phosphorylierung ihrer 14-3-3-Bindungsstellen reguliert. Um die Regulation der 14-3-3-Bindung an KIF1B α besser zu verstehen, sollten die Kinasen, die für die Phosphorylierung der Bindungsstellen verantwortlich sind,

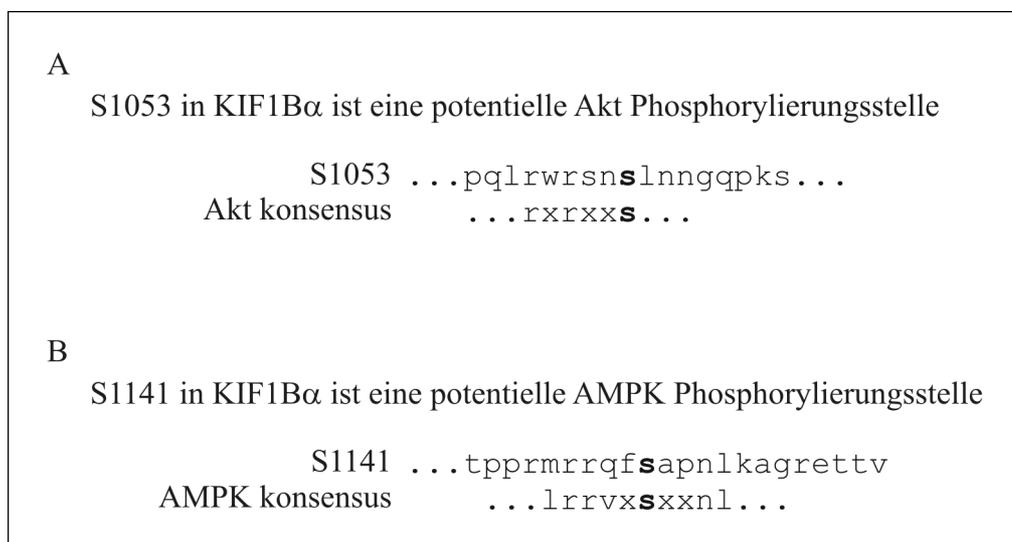


Abbildung 3.9: Durch eine ScanSite-Analyse wurden S1053 und S1141 als Phosphorylierungsstellen für Akt bzw. AMPK identifiziert

Die Analyse wurde auf der Internetseite http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml mit mittlerer Stringenz durchgeführt. Die S1053 umgebenden Aminosäuren entsprechen einer optimalen Akt-Phosphorylierungsstelle (Franke, 2008), während die S1141 umgebenden Aminosäuren zu einer optimalen AMPK-Konsensussequenz (Gwinn et al., 2008) homolog sind. Fett gedrucktes s stellt die Phosphorylierungsstellen dar. x in den Konsensussequenzen steht für eine beliebige Aminosäure, während es sich bei den anderen Buchstaben um den Einbuchstabencode der entsprechenden Aminosäuren handelt.

identifiziert werden. Die KIF1B α -Aminosäuresequenz wurde in einer ScanSite Analyse mit mittlerer Stringenz auf potentielle Kinasen für die 14-3-3-Bindungsstellen S1053 und S1141 untersucht. Das Programm ermittelte die beiden Kinasen Akt und AMPK als die Kinasen, die KIF1B α an S1053 bzw. S1141 am wahrscheinlichsten phosphorylieren (Abbildung 3.9).

Die Aminosäuresequenz N-terminal von S1053 ist zu der Akt-Konsensussequenz RXXRXX(S/T) homolog. Des Weiteren ist S1053 eine optimale Akt-Phosphorylierungsstelle, da sich an Position +1 ein Leucin befindet und an Position -2 ein Serin (Franke, 2008). Die zweite 14-3-3-Bindungsstelle S1141 zeigt eine hohe Homologie zur in Abbildung 3.9 gezeigten optimalen AMPK-Phosphorylierungsstelle (Gwinn et al., 2008). Akt gehört in die AGC-Kinasefamilie, während AMPK ein Mitglied der CAMK-Familie ist.

3.5 Die 14-3-3-Bindung an KIF1B α ist durch Aktivierung verschiedener Kinasen induzierbar

Die 14-3-3-Bindungsstellen in KIF1B α erfüllen die Voraussetzungen für eine Akt- bzw. AMPK-Phosphorylierungsstelle. Der Einfluss dieser und weiterer Kinasen auf die 14-3-3-Bindung an KIF1B α wurde in einem Overlay-Assay mit rekombinanten 14-3-3-Proteinen untersucht. Der Overlay-Assay wurde mit transient GFP-KIF1B α überexprimierenden Zellen durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden diese Zellen in Medium ohne FCS gehungert, um die Aktivität der Kinasen zu minimieren. Eine Probe wurde weiter in Medium mit 10% FCS inkubiert, um einen eventuellen Unterschied zu gehungerten Zellen festzustellen. Die gehungerten Zellen wurden mit verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren inkubiert und anschließend in einem Tritonpuffer lysiert. KIF1B α wurde mit GFP-bindenden Agarosekugeln immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran immobilisiert. Die Membran wurde mit einer 14-3-3-Proteinlösung inkubiert. Phosphorylierte 14-3-3-Bindungsstellen in KIF1B α wurden indirekt durch Detektion der gebundenen 14-3-3-Proteine in einer Immunblotanalyse nachgewiesen.

Trotz der allgemein reduzierten Kinase-Aktivität konnte eine 14-3-3-Bindung an KIF1B α in gehungerten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.10, Spur 1), wobei die Bindung in ungehungerten Zellen stärker war (Spur 12).

Die Stimulation der HEK293-Zellen mit IGF-1 führte zu einer stärkeren 14-3-3-Bindung an KIF1B α . Die 14-3-3-Proteinbindung wurde durch Hemmung der PI3K durch Vorinkubation mit PI103 stark reduziert (Spuren 2 und 3). Daraus geht hervor, dass eine oder mehrere Kinasen des PI3K-Signalweges KIF1B α phosphorylierten, was zur Bindung von 14-3-3-Proteinen führte. Infrage kommende Kinasen sind Akt und S6K (p70 ribosomal S6 kinase), da sie zur AGC-Kinasefamilie gehören und S6K eine ähnliche Substratspezifität aufweist wie Akt.

Stimulation der Zellen mit EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), das in erster Linie den MAPK-Signalweg aber auch den PI3K-Signalweg aktiviert, führte zu einer vergleichsweise schwachen 14-3-3-Bindung (Spur 4).

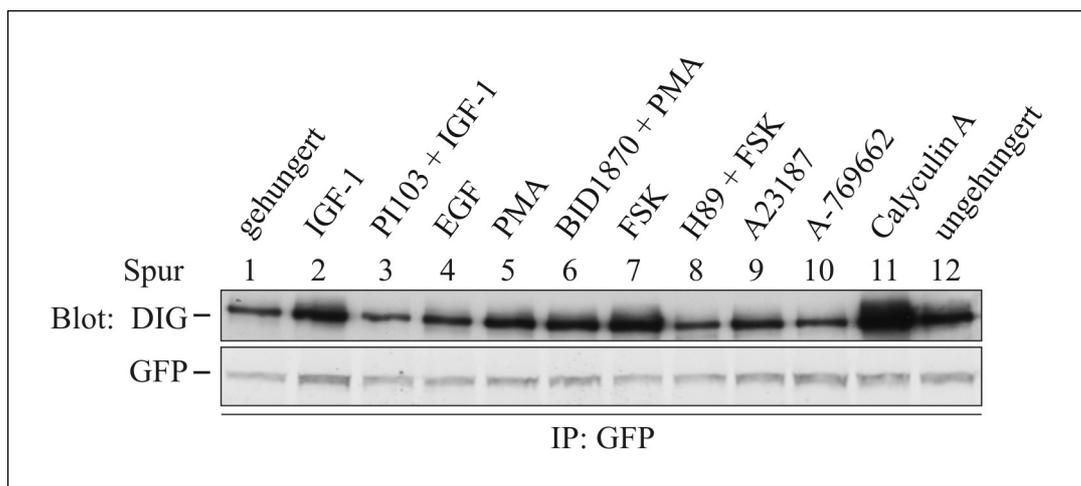


Abbildung 3.10: Die Bindung von 14-3-3-Proteinen an KIF1B α ist stimulierbar

HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid für das Fusionsprotein aus GFP und KIF1B α transient transfiziert. Vor der Behandlung wurden die Zellen über Nacht in Medium ohne FCS gehungert (Spuren 1-11). Die Zellen in Spur 12 wurden weiterhin in 10% Medium inkubiert. Die Zellen wurden wie folgt behandelt: IGF-1 (50 ng/ml, 15 min), PI103 (1 μ M, 30 min), EGF (100 ng/ml, 15 min), PMA (100 ng/ml, 30 min), BID1870 (10 μ M, 30 min), Forskolin (FSK; 20 μ M, 30 min), H89 (30 μ M, 30 min), A23187 (10 μ M, 15 min), A-769662 (50 μ M, 1 h), Calyculin A (50 nM, 10 min). Anschließend wurden die Zellen in einem Tritonpuffer lysiert und das KIF1B α -Fusionsprotein mit GFP-bindenden Agarosekügelchen immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Membranen wurden in einer 14-3-3-Proteinlösung inkubiert. Diese DIG-markierten 14-3-3-Proteine wurden durch einen DIG-Antikörper und einen entsprechenden sekundären Antikörper in einer Immunblotanalyse detektiert.

Die Beteiligung einer PKC an der 14-3-3-Bindung an KIF1B α wurde durch Inkubation der Zellen mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat), einem spezifischen Aktivator der klassischen (cPKCs; α , $\beta_{1/2}$ und γ) und neuen PKCs (nPKCs; δ , ϵ , η und θ), nicht jedoch der atypischen PKCs (aPKCs; ζ und λ/i), untersucht. Die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α wurde durch PMA-Behandlung stark induziert. Dies weist auf eine KIF1B α -Phosphorylierung durch eine Kinase der PKC-Familie hin (Spur 5).

RSK (p90 ribosomal S6 kinase) ist eine Kinase, die eine ähnliche Substratspezifität wie Akt hat und durch PMA aktiviert wird, da sie PKC im Signalweg nachgeschaltet ist. Die Hemmung der RSK mit dem spezifischen Inhibitor BID1870 hatte keinen Einfluss auf die PMA-induzierte Bindung zwischen 14-3-3-Proteinen und KIF1B α . Daher konnte RSK als KIF1B α phosphorylierende Kinase ausgeschlossen werden (Spur 6).

Die Stimulation der Zellen mit FSK (Forskolin), einem Aktivator der PKA (Proteinkinase A/cAMP-abhängige Proteinkinase), führte zu einer starken 14-3-3-Bindung an KIF1B α (Spur 7), die mit der in Spur 2 durch IGF-1 induzierten Bindung vergleichbar war. Die FSK stimulierte Aktivierung der PKA konnte durch den spezifischen PKA-Inhibitor H89 verhindert werden. Durch Hemmung der PKA wurde auch die 14-3-3-Bindung an KIF1B α unterbunden, woraus geschlossen werden kann, dass PKA eine weitere KIF1B α phosphorylierende Kinase ist (Spur 8).

Die Rolle der AMPK für die 14-3-3-Bindung wurde mithilfe zweier Aktivatoren untersucht. Die Substanz A23187 (Kalziumionophor) aktiviert die CaMKII, die AMPK übergeordnet ist, durch Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, während die Stimulation durch A-769662 direkt erfolgt, da es sich bei dieser Substanz um ein AMP-Analog handelt (Goransson et al., 2007). Die Inkubation der Zellen mit dem CaMKII-Aktivator führte zu einer leicht verstärkten 14-3-3-Bindung an KIF1B α . Dies kann einerseits bedeuten, dass AMPK oder eine verwandte Kinase, die der CAMK untergeordnet ist, KIF1B α phosphorylierte. Andererseits werden jedoch auch andere Kinasen durch erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen durch A23187-Inkubation aktiviert. Da die Stimulation der Zellen mit dem AMPK-spezifischen Aktivator A-769662 keinen Effekt zeigte, ist vermutlich entweder eine AMPK-verwandte Kinase für die Assoziation von 14-3-3-Proteinen und KIF1B α verantwortlich oder eine andere Ca²⁺-abhängige Kinase.

Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit dem Phosphataseinhibitor Calyculin A behandelt, wodurch die allgemeine Proteinphosphorylierung in den Zellen erhöht und die maximale 14-3-3-Bindung an KIF1B α induziert wurde (Abbildung 3.10, Spur 11).

Dieser Versuch zeigt, dass die AGC-Familienmitglieder Akt, PKC und PKA potentielle KIF1B α phosphorylierende Kinasen sind, während keine klare Aussage über die mögliche Phosphorylierung durch AMPK gemacht werden kann.

3.6 Charakterisierung spezifischer p-S1053 und p-S1141 Antikörper

Die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α ist von der Phosphorylierung an S1053 und S1141 abhängig. Daher wurden spezifische Antikörper in Kaninchen hergestellt, um diese Phosphorylierung untersuchen zu können. Zur Charakterisierung der Antikörper wurden zwei

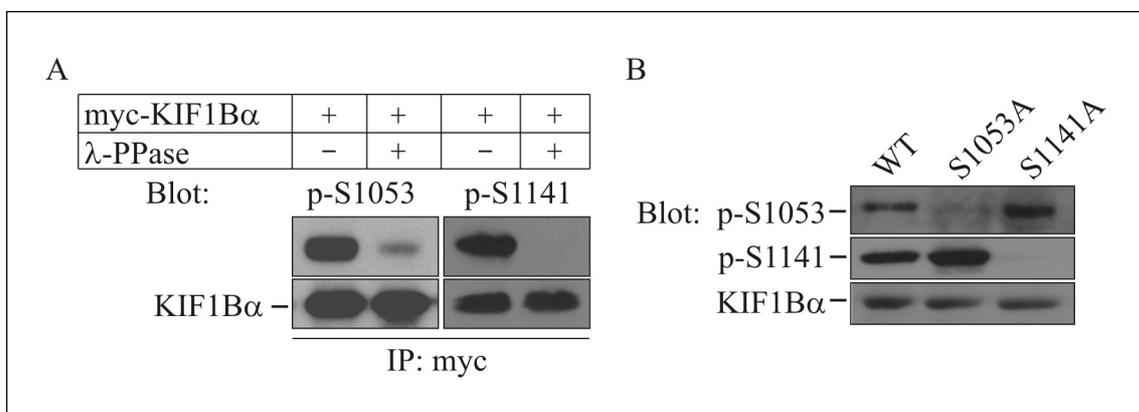


Abbildung 3.11: Die Phosphoantikörper erkennen spezifisch die phosphorylierten Aminosäuren S1053 bzw. S1141 in KIF1B α

(A) HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid für das Fusionsprotein aus myc-Epitop und Wildtyp KIF1B α transient transfiziert. Der Tritonlyse folgte eine Immunpräzipitation mit einem myc-Antikörper. Die Proben wurden entweder unbehandelt auf das Gel aufgetragen, oder zuvor 30 min bei 30°C mit 50 U λ -PPase behandelt. (B) HEK293-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Wildtyp, S1053A bzw. S1141A KIF1B α transient transfiziert. Die Zellen wurden in einem Tritonpuffer lysiert und es wurden vergleichbare KIF1B α -Mengen aufgetragen. (A, B) Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Membranen wurden mit den entsprechenden Antikörpern gegen KIF1B α , p-S1053 und p-S1141 inkubiert und die Proteine wurden in einer Immunblotanalyse detektiert.

unterschiedliche Ansätze verfolgt. Im ersten Ansatz wurde KIF1B α aus dem Lysat transient überexprimierender Zellen immunpräzipitiert und entweder unbehandelt untersucht oder mit λ -PPase dephosphoryliert, bevor die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Beide Antikörper detektierten KIF1B α in den unbehandelten Proben. Die dephosphorylierten Proteine wurden nicht bzw. nur sehr schwach von den phosphospezifischen Antikörpern detektiert (Abbildung 3.11-A).

Im zweiten Ansatz sollte bestimmt werden, ob die phosphospezifischen Antikörper Alanin-Mutanten der entsprechenden Phosphorylierungsstellen detektieren. Hierfür wurden Wildtyp KIF1B α und die entsprechenden Mutanten in HEK293-Zellen transient überexprimiert und in einer Western Blot Analyse untersucht. Der p-S1053 Antikörper detektierte Wildtyp und KIF1B α -S1141A, während der p-S1141 spezifische Antikörper Wildtyp und KIF1B α -S1053A erkannte (Abbildung 3.11-B).

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass beide Phosphoantikörper spezifisch die phosphorylierten Aminosäuren S1053 bzw. S1141 erkennen, nicht jedoch dephosphorylierte oder zu Alanin mutierte Phosphorylierungsstellen.

3.7 *In vitro* Kinase-Assay

In einem *in vitro* Kinase-Assay werden potentielle Kinasen für ein bestimmtes Substrat identifiziert. Ausgehend von dem Overlay-Assay in Abbildung 3.10 wurden Akt1 und Akt2, PKC ζ und PKC α , PKA, S6K, RSK1 und RSK2, Erk1 und Erk2 (extrazellulär regulierte Kinasen) und AMPK für diesen Versuch ausgewählt. Da die zu S1141 in KIF1B α homologe Aminosäure S1092 in KIF1C als CKII-Phosphorylierungsstelle (Caseinkinase II) beschrieben wurde, wurde auch CKII in den Versuch aufgenommen (Dorner et al., 1999).

Je Gelspur wurden 5 μ g GST-KIF1B α -Fusionsprotein in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von ATP mit der entsprechenden rekombinanten Kinase inkubiert. Nachdem die Proteine aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen übertragen waren, wurde die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindungsstellen in KIF1B α durch die phosphospezifischen Antikörper gegen p-S1053 bzw. p-S1141 detektiert (Abbildung 3.12).

Das GST-Fusionsprotein (ca. 154 kDa) war zum Teil degradiert, wodurch mehrere Banden verschiedener Größen durch die Phosphoantikörper detektiert wurden. KIF1B α wurde an

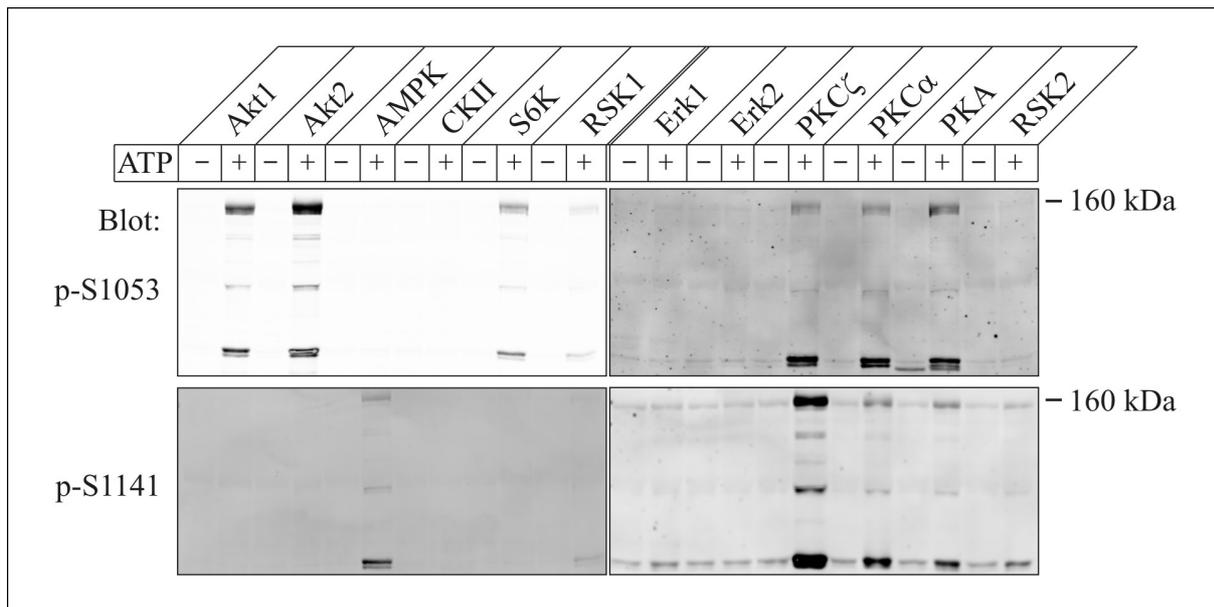


Abbildung 3.12: KIF1B α wird *in vitro* durch Akt, S6K, PKC, PKA und AMPK phosphoryliert

Pro Gelspur wurden 5 μ g KIF1B α -GST-Fusionsprotein in An- bzw. Abwesenheit von 100 μ M ATP mit 1 mU/ μ l der entsprechenden Kinase in einem Reaktionsmix (50 mM TrisCl, 100 μ M EGTA, 1 mM DTT) bei 30°C auf einem Schüttler für 30 min inkubiert. Die Proteine wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion der Phosphorylierung erfolgte durch spezifische Phosphoantikörper gegen p-S1053 und p-S1141.

S1053 durch Akt1 und Akt2, S6K, PKC ζ und PKC α und PKA phosphoryliert, wobei die Phosphorylierung durch die Akt-Isoformen besonders stark war, während die Phosphorylierung durch S6K schwach ausfiel. Trunkiertes KIF1B α wurde von den PKC-Isoformen und PKA *in vitro* stärker phosphoryliert als das intakte Fusionsprotein, da es womöglich *in vitro* besser für die Kinasen zugänglich war.

Die zweite 14-3-3-Bindungsstelle in KIF1B α , S1141, wurde *in vitro* von AMPK, PKC ζ und PKC α , PKA und sehr schwach von RSK2 phosphoryliert, nicht jedoch von CKII. Dies unterstützt die These, wonach KIF1B α eher ein AMPK-Substrat als ein CKII-Substrat ist. PKC ζ phosphorylierte S1141 sowohl im intakten, als auch im trunkierten Fusionsprotein stark, während die anderen Kinasen eher in der Lage waren das trunkierte Fusionsprotein zu phosphorylieren. Dieses Ergebnis geht einher mit der ScanSite Analyse (Abbildung 3.9) und

dem Overlay-Assay (Abbildung 3.10). Es verdichteten sich die Hinweise, dass KIF1B α an S1053 durch Akt und an S1141 durch AMPK phosphoryliert wird. Des Weiteren wurden PKC und PKA als potentielle KIF1B α phosphorylierende Kinasen bestätigt, während CKII ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 3.12).

3.8 *In vivo* Phosphorylierung von KIF1B α

Die Daten aus dem Overlay-Assay und dem *in vitro* Kinase-Assay sollten *in vivo* verifiziert werden. Hierzu wurden KIF1B α überexprimierende HEK293-Zellen mit verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren behandelt und die Phosphorylierung an S1053 bzw. S1141 detektiert.

3.8.1 KIF1B α wird durch Akt an S1053 phosphoryliert, nicht jedoch durch S6K

Akt wurde wie bereits im Overlay-Assay durch IGF-1-Stimulation aktiviert und durch Vorinkubation mit dem für Akt1 und Akt2 spezifischen Inhibitor Akti-1/2 gehemmt. Die Phosphorylierung an S1053 wurde durch IGF-1-Inkubation deutlich erhöht, jedoch nicht in

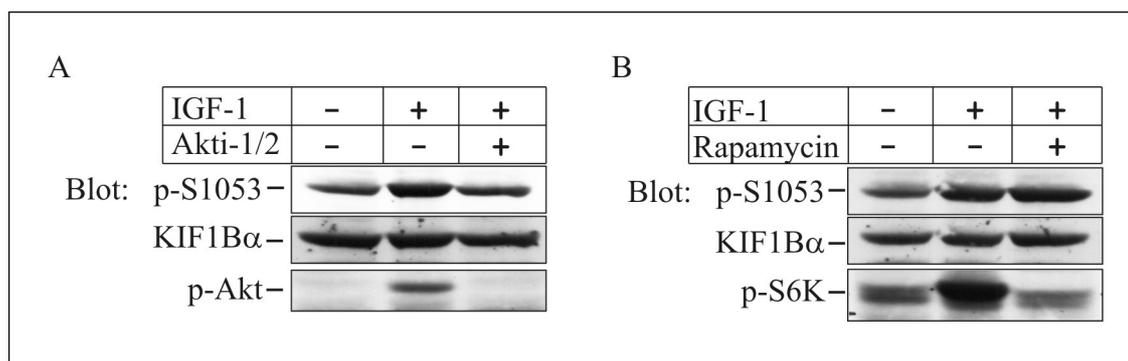


Abbildung 3.13: KIF1B α wird von Akt an S1053 phosphoryliert, nicht jedoch von S6K

Wildtyp KIF1B α überexprimierende HEK293-Zellen wurden mit IGF-1 (50 ng/ml, 15 min) stimuliert. (A) Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit Akti-1/2 (10 μ M, 30 min) behandelt. (B) Parallel wurden Zellen mit Rapamycin (50 nM, 30 min) inkubiert. (A, B) Der Stimulation folgte eine Tritonlyse. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Membranen wurden mit den entsprechenden Antikörpern gegen KIF1B α , p-S1053, p-Akt bzw. p-S6K inkubiert und die Proteine wurden in einer Immunblotanalyse detektiert.

Zellen in denen Akt gehemmt wurde. Die Akt-Stimulation und Hemmung wurde durch p-T308 Detektion in Akt bestätigt.

S6K weist eine ähnliche Substratspezifität wie Akt auf und phosphorylierte im *in vitro* Kinase-Assay KIF1B α schwach an S1053. Diese Kinase wurde durch Rapamycin-Vorinkubation gehemmt, um deren Rolle bei der durch IGF-1 stimulierten Phosphorylierung zu untersuchen. Die IGF-1-Stimulation führte zu einer erhöhten Phosphorylierung an S1053, die jedoch nicht durch Rapamycin-Vorinkubation verhindert werden konnte. Somit wird deutlich, dass Akt KIF1B α an S1053 phosphoryliert, nicht jedoch S6K (Abbildung 3.13).

3.8.2 PKC phosphoryliert KIF1B α an S1053, aber nicht an S1141

Die beiden PKC-Isoformen PKC ζ und PKC α waren im *in vitro* Kinase-Assay in der Lage beide 14-3-3-Bindungsstellen in KIF1B α zu phosphorylieren. Daher wurden in diesem Versuch sowohl p-S1053 als auch p-S1141 detektiert. Die Zellen wurden mit PMA stimuliert und mit den PKC-Inhibitoren Gö6976 (spezifisch für PKC α und PKC β) und Gö6983 (hemmt

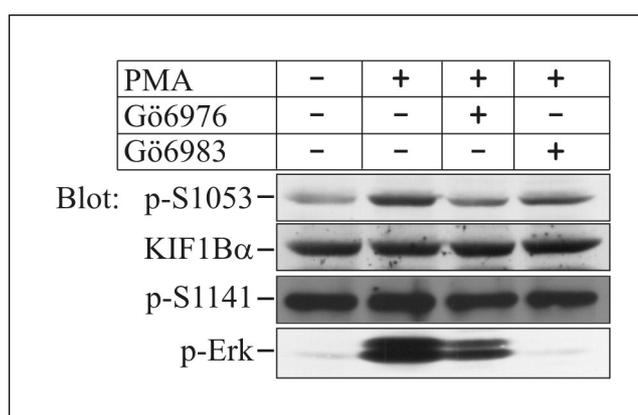


Abbildung 3.14: KIF1B α wird durch PKC an S1053 phosphoryliert, nicht jedoch an S1141

HEK293-Zellen, die Wildtyp KIF1B α überexprimierten, wurden mit PMA (100 ng/ml, 30 min) und den PKC-Inhibitoren Gö6976 bzw. Gö6983 (1 μ M, 30 min) behandelt. Die durch Tritonlyse erhaltenen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und durch Antikörper gegen KIF1B α , p-S1053, p-S1141 und p-Erk und die entsprechenden Zweitantikörper in einer Immunblotanalyse detektiert.

PKC α , PKC β , PKC γ , PKC δ und PKC ζ , allerdings erst in höherer Konzentration) vorbehandelt. Die durch PMA-Behandlung induzierte Phosphorylierung an S1053 wurde durch Vorbehandlung der Zellen mit den PKC Inhibitoren verhindert. Im Gegensatz dazu war die Phosphorylierung an S1141 unabhängig von der PMA-Stimulation oder der Hemmung der PKC. Dies bedeutet, dass KIF1B α zwar an S1053 durch eine PKC Kinase phosphoryliert werden kann, für die Phosphorylierung an S1141 jedoch eine andere Kinase verantwortlich sein muss. Um die Aktivität der PKC zu verifizieren, wurde p-Erk, das im Signalweg PKC nachgeschaltet ist, detektiert (Abbildung 3.14). Die Phosphorylierung von Erk wurde durch PMA-Inkubation induziert. Der PKC-Inhibitor Gö6983 konnte die Phosphorylierung von Erk besser verhindern als Gö6976. Nichtsdestotrotz reduzierten beide die Aktivität der PKC.

3.8.3 PKA phosphoryliert KIF1B α an S1053, nicht jedoch an S1141

Ähnlich wie für PKC verhielt es sich für PKA, die nach FSK-Stimulation KIF1B α an S1053 phosphorylierte, jedoch nicht die Phosphorylierung an S1141 steigern konnte. Die Hemmung der PKA durch H89-Vorinkubation reduzierte die Phosphorylierung an S1053, während die Phosphorylierung an S1141 unverändert blieb. Hiermit ist gezeigt, dass PKA KIF1B α an

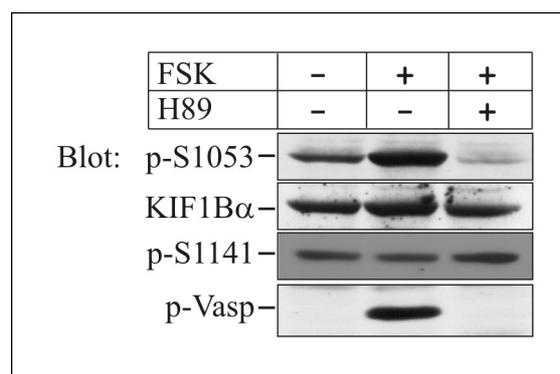


Abbildung 3.15: PKA phosphoryliert KIF1B α an S1053, nicht jedoch an S1141

In Wildtyp KIF1B α überexprimierenden HEK293-Zellen wurde PKA durch FSK-Inkubation (20 μ M, 30 min) aktiviert und durch Vorinkubation mit H89 (30 μ M, 30 min) gehemmt. Die Zellen wurden in einem Tritonpuffer lysiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt, auf Nitrozellulose transferiert und durch KIF1B α , p-S1053, p-S1141 und p-Vasp Antikörper und dem entsprechenden Zweitantikörper in einer Immunblotanalyse detektiert.

S1053 phosphoryliert, nicht jedoch an S1141. Als PKA-Substrat wurde Vasp auf Phosphorylierung untersucht (Abbildung 3.15).

Die Aktivierung bzw. Hemmung der Kinasen Akt, PKA und PKC zeigt, dass die Mitglieder der AGC-Familie für die Phosphorylierung an S1053 in KIF1B α verantwortlich sind, nicht jedoch für die Phosphorylierung an S1141. Somit folgt daraus, dass die zusätzliche 14-3-3-Bindung im Overlay-Assay (Abbildung 3.10) nach Stimulation einer dieser Kinasen an S1053 erfolgte und nicht an S1141.

3.8.4 Die Phosphorylierung an S1141 ist nicht eindeutig auf AMPK zurückzuführen

Die Stimulation der AMPK durch die beiden Aktivatoren A23187 und A-769662 im Overlay-Assay führte zu keiner deutlichen Steigerung der 14-3-3-Bindung, wobei durch Inkubation mit A23187 eine leichte Zunahme der 14-3-3-Bindung zu beobachten war. Da S1141 im *in vitro* Kinase-Assay durch AMPK phosphoryliert wurde und die umliegenden Aminosäuren eine hohe Homologie zu einer optimalen AMPK-Konsensussequenz (Abbildung 3.9) zeigen, wurde die Phosphorylierung an S1141 in Abhängigkeit von AMPK-Aktivatoren untersucht.

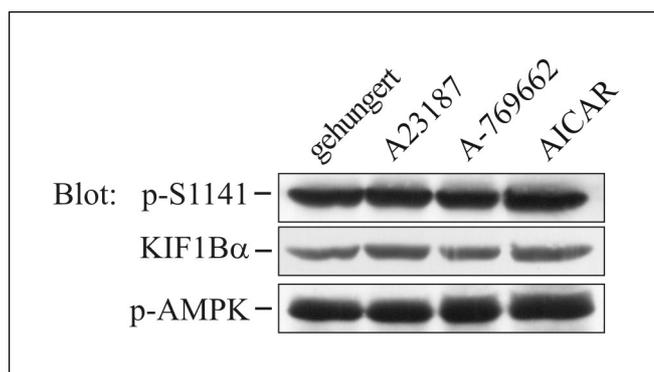


Abbildung 3.16: Die Phosphorylierung an S1141 kann weder durch A23187, A-769662 noch durch AICAR erhöht werden

HEK293-Zellen, die Wildtyp KIF1B α überexprimierten, wurden mit den AMPK-Aktivatoren A23187 (10 μ M, 15 min), A-769662 (50 μ M, 1 h) und AICAR (1 mM, 1 h) behandelt. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit KIF1B α , p-S1141 und p-AMPK Antikörpern und den entsprechenden Zweitantikörpern in einer Immunblotanalyse detektiert.

Zu diesem Zweck wurden KIF1B α überexprimierende HEK293-Zellen mit A23187, A-769662 und AICAR inkubiert. AICAR wird von den Zellen phosphoryliert und zum AMP-Analog ZMP umgesetzt und aktiviert AMPK somit direkt.

Die Stimulation der Zellen mit den AMPK-Aktivatoren führte zu keinem Anstieg der Phosphorylierung an S1141 (Abbildung 3.16). Zur Kontrolle wurde p-AMPK detektiert. Dabei wurde deutlich, dass AMPK sowohl in den Kontrollzellen, als auch in den stimulierten Zellen stark phosphoryliert vorlag. Dies liegt vermutlich an der Methodik, denn die Zellen wurden über Nacht in Medium ohne FCS inkubiert. AMPK wird durch Energiemangel aktiviert, der nicht nur durch Nährstoffentzug entsteht, sondern auch durch den Entzug von Wachstumsfaktoren. Der Entzug der Wachstumsfaktoren führt zu einer Hemmung der Atmungskette und damit zu einem Energiemangel (Gottlieb et al., 2002).

Da die Untersuchung der AMPK-Kinase in den HEK293-Zellen zu keinem Ergebnis führte, wurde die Phosphorylierung von endogenem KIF1B α an S1141 in vier Zelllinien untersucht, darunter zwei HeLa- und zwei MEF-Zelllinien. Die HeLa-Zellen exprimierten entweder Wildtyp oder kinaseinaktives LKB1 permanent. Diese Kinase ist AMPK im Signalweg

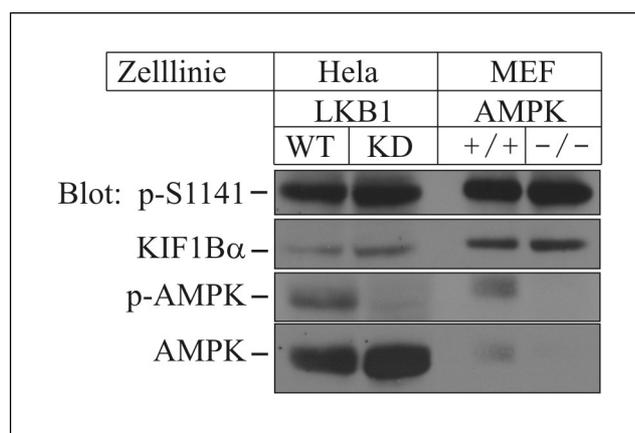


Abbildung 3.17: KIF1B α wird nicht von AMPK phosphoryliert

Die in der Abbildung angegebenen Zelllinien wurden in einem Tritonpuffer lysiert, die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Hilfe der Antikörper gegen KIF1B α , p-S1141, p-AMPK und AMPK und eines entsprechenden Zweitantikörpers in einer Immunblotanalyse detektiert (KD: kinaseinaktiv).

vorgeschaltet und wird in parentalen HeLa-Zellen nicht exprimiert. Eine der MEF-Zelllinien ist eine AMPK-Knockout-Zelllinie ($AMPK\alpha1^{-/-}$ und $AMPK\alpha2^{-/-}$), die mit einer parentalen Zelllinie verglichen wurde.

Die Zelllinien wurden bis zur Konfluenz kultiviert und in Tritonlysepuffer aufgenommen. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Durch spezifische Antikörper wurden KIF1B α und p-S1141 KIF1B α nachgewiesen. KIF1B α wurde in den vier Zelllinien exprimiert, wobei die MEF-Zelllinien das Protein stärker exprimierten als die HeLa-Zelllinien. Endogenes KIF1B α lag in diesen vier Zelllinien gleichermaßen phosphoryliert vor. Untersuchung des p-AMPK konnte zeigen, dass in HeLa-Zellen, die kinaseinaktives LKB1 überexprimierten, AMPK zwar vorhanden, aber nicht phosphoryliert war. Obwohl in den AMPK-Knockout MEF-Zellen kein AMPK vorlag, war KIF1B α phosphoryliert (Abbildung 3.17). Dieses Experiment zeigt, dass AMPK nicht alleine für die Phosphorylierung an S1141 in KIF1B α verantwortlich sein kann.

Sowohl PKC als auch PKA konnten bereits als Kandidaten für die Phosphorylierung an S1141 ausgeschlossen werden (Abbildung 3.14 und 3.15). Obiges Experiment stellt klar, dass AMPK selbst nicht allein für die Phosphorylierung von S1141 in KIF1B α verantwortlich sein kann. Es gibt aber eine AMPK-verwandte Kinase, die nicht durch LKB1 aktiviert wird, MELK (maternal embryonic leucin zipper kinase) (Bright et al., 2009). Da weder spezifische Inhibitoren, noch die cDNA von MELK vorlagen, wurde die Untersuchung an dieser Stelle beendet.

3.9 Die shRNA-vermittelte Reduktion der KIF1B α -Expression

KIF1B α ist bereits als mikrotubulibindendes Protein beschrieben worden, das für den anterograden Mitochondrientransport mit verantwortlich ist (Nangaku et al., 1994). Das Mitwirken von KIF1B α am mitochondrialen Transport soll hier durch shRNA-vermittelte Reduktion der endogenen KIF1B α -Menge untersucht werden.

In einem ersten Schritt sollte gezeigt werden, dass die KIF1B α -Expression durch shRNA reduziert werden kann. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit einer für KIF1B α spezifischen shRNA transfiziert und nach 48 h bzw. 72 h geerntet. Wie in Abbildung 3.18 deutlich wird, stieg die KIF1B α -Menge in den Zellen mit der Zeit an. Transfektion mit der KIF1B α

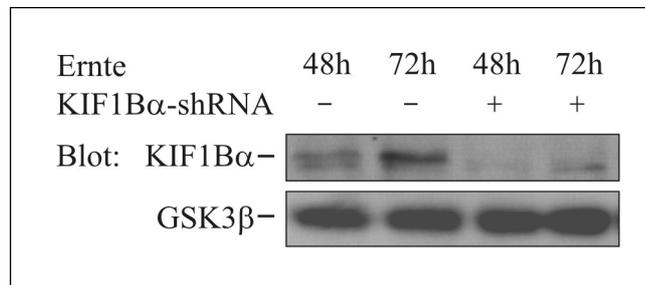


Abbildung 3.18: KIF1B α wird durch spezifische shRNA herunterreguliert

Parentale HEK293 Zellen wurden mit einer für KIF1B α spezifischen shRNA transfiziert. Die Zellen wurden 48 h bzw. 72 h nach der Transfektion lysiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und durch spezifische Antikörper gegen KIF1B α und GSK3 β gefolgt von einem entsprechenden Zweitantikörper in einer Immunblotanalyse detektiert.

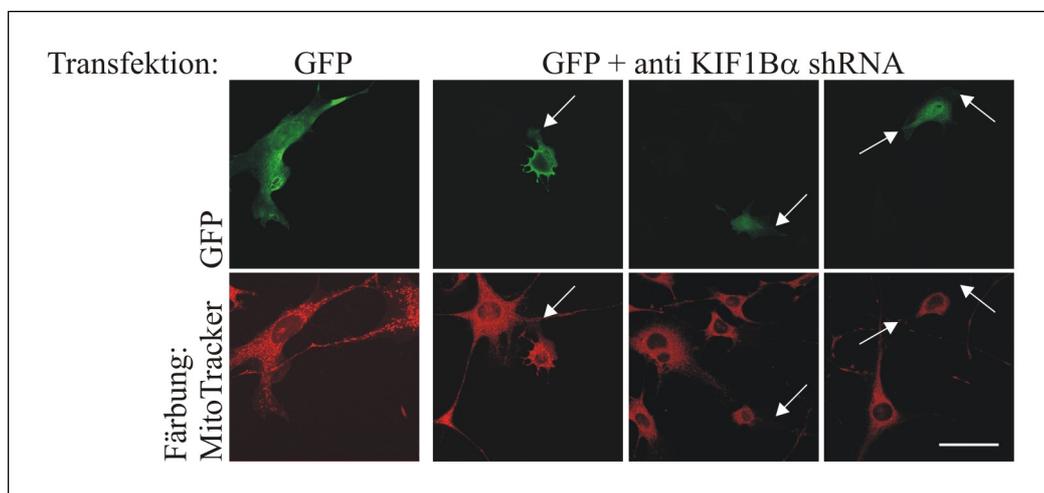


Abbildung 3.19: KIF1B α -Knockdown führt zur Mitochondrien-Akkumulation um den Zellkern und geschrumpften Zellen

NIH3T3-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für GFP und eine spezifische shRNA gegen KIF1B α im Verhältnis 1:10 transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit MitoTracker inkubiert, anschließend mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Die Pfeile weisen auf mitochondrienfreie Fortsätze in mit KIF1B α -shRNA transfizierten Zellen (Masstabsbalken entspricht 50 μ m).

spezifischen shRNA führte sowohl nach 48 h als auch nach 72 h zur deutlichen Reduktion der KIF1B α -Menge in den Zellen, während die GSK3 β -Expression nicht beeinflusst wurde.

Durch shRNA induzierte Reduktion der KIF1B α -Expression in NIH3T3-Zellen sollte die Bedeutung von KIF1B α auf den Mitochondrientransport untersucht werden. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:10 mit einem Expressionsvektor für GFP und einem shRNA enthaltenden Vektor transfiziert, so dass die Wahrscheinlichkeit, dass eine GFP-positive Zelle auch mit der shRNA transfiziert wurde, sehr hoch war. Zur Kontrolle wurde der Expressionsvektor für GFP alleine transfiziert. Diese Zellen hatten eine normale Größe, und auch die Mitochondrienverteilung entsprach der untransfizierter Zellen, in denen ein Großteil der Mitochondrien um den Zellkern angeordnet waren und ihr Aufkommen zur Plasmamembran hin abnahm. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die mit shRNA transfiziert wurden, eine Akkumulation der Mitochondrien um den Zellkern und eine stark verringerte Zellgröße (Abbildung 3.19). Der Ring aus Mitochondrien wurde daher nur von einem schmalen Streifen mitochondrienfreien Zytoplasmas umgeben, jedoch gab es vereinzelt kurze Fortsätze, die keine Mitochondrien enthielten (Pfeile). Im Gegensatz dazu befinden sich in den Fortsätzen untransfizierter und mit GFP transfizierter Zellen Mitochondrien auch in den Fortsätzen. Dies deutet darauf hin, dass KIF1B α nicht nur für den Mitochondrientransport, sondern auch für die Zellgröße von Bedeutung ist.

3.10 Transiente Überexpression des 14-3-3-bindungsdefekten KIF1B α hat keinen Einfluss auf die Mitochondrienverteilung

Da in Abbildung 3.19 bestätigt werden konnte, dass KIF1B α wichtig für die Verteilung der Mitochondrien ist, sollte nun untersucht werden, ob die 14-3-3-Bindung für diese Funktion von Bedeutung ist. Hierfür wurden NIH3T3-Zellen, die Wildtyp bzw. 14-3-3-bindungsdefektes KIF1B α (S1053A,S1141A) überexprimierten, untersucht. Die Zellen wurden vor der Fixierung mit Formaldehyd mit MitoTracker inkubiert, um die Mitochondrien sichtbar zu machen. Zusätzlich wurde KIF1B α mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Es wurde eine geringe Konzentration des Antikörpers eingesetzt, wodurch es möglich war, transfizierte von untransfizierten Zellen zu unterscheiden.

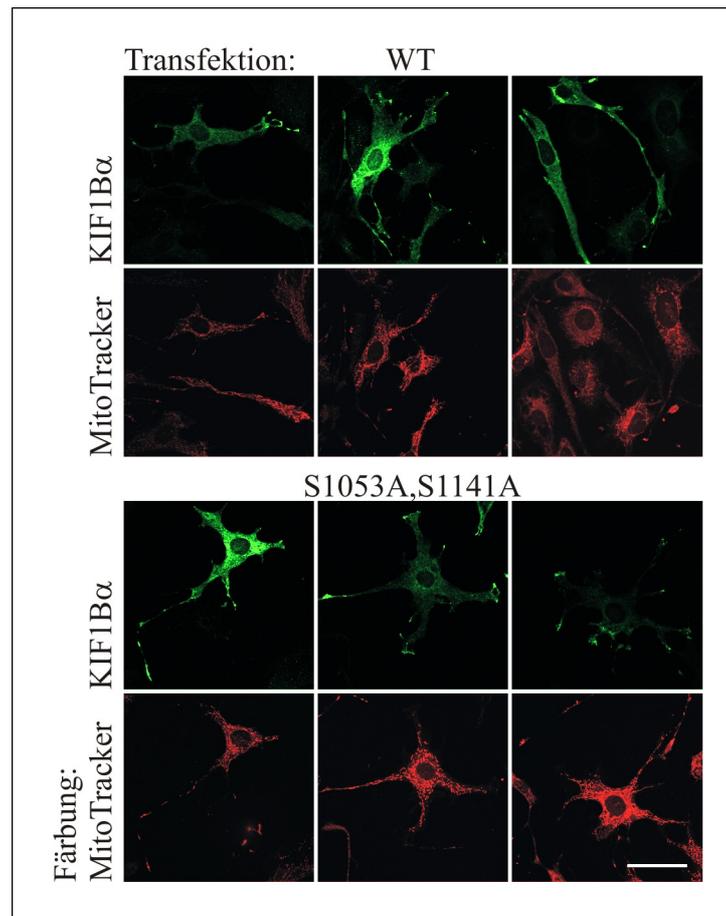


Abbildung 3.20: Überexpression von Wildtyp bzw. KIF1B α -S1053A,S1141A hat keinen Einfluss auf die Mitochondrienverteilung

NIH3T3-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp und KIF1B α -S1053A,S1141A transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit MitoTracker inkubiert, anschließend mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit 10% FCS in PBS geblockt und mit 0,1% Saponin permeabilisiert. Das Kinesin wurde durch Inkubation mit dem KIF1B α -Antikörper und einem Alexa gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht (Massstabsbalken entspricht 50 μ m).

Sowohl Wildtyp KIF1B α als auch 14-3-3-bindungsdefektes KIF1B α waren in überexprimierenden Zellen gleichmäßig über das Zytosol verteilt, mit einem besonders hohen Aufkommen in den Spitzen der Fortsätze (Abbildung 3.20). Dies zeigt, dass die Mutation der 14-3-3-Bindungsstellen keinen Einfluss auf die anterograde Motilität des Motorproteins hatte.

Zellen, die Wildtyp KIF1B α transient überexprimierten, zeigten eine normale Verteilung der Mitochondrien, vergleichbar mit untransfizierten Zellen. Das gleiche galt für Zellen, die 14-3-3-bindungsdefizientes KIF1B α überexprimierten. Ein Großteil der Mitochondrien befanden sich um den Zellkern, während ihre Dichte zur Plasmamembran hin abnahm (Abbildung 3.20). Dieser Versuch zeigt, dass eine zusätzliche Überexpression des mutierten KIF1B α keinen Effekt auf die Mitochondrienverteilung in abgesetzten Zellen hat.

3.11 Eine katalytisch inaktive KIF1B α -Mutante bindet an das Zytoskelett

Da KIF1B α ein mikrotubulibindendes Protein ist und der Knockdown des Proteins zur Verkleinerung der Zellen führte, wurde hier eine katalytisch inaktive KIF1B α -Mutante (K103A) bezüglich ihrer Lokalisierung und ihres Einflusses auf die Mitochondrienverteilung untersucht. Hierzu wurden HEK293-Zellen auf Glasplättchen kultiviert und transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp bzw. katalytisch inaktives KIF1B α -K103A transfiziert. Die Zellen wurden fixiert und mit spezifischen Antikörpern für KIF1B α und α -Tubulin gefärbt.

KIF1B α -K103A co-lokalisierte ausnahmslos mit einer filamentösen Struktur in allen überexprimierenden Zellen (Abbildung 3.21). Dies zeugt von einer starken Affinität der KIF1B α -Mutante zu einem Protein des Zytoskeletts. Diese Lokalisation ist unabhängig von der Expression des Proteins, da sowohl stark als auch schwach exprimierende Zellen diese Verteilung des Proteins zeigten (Abbildung 3.22).

Die Mikrotubuli in KIF1B α -K103A überexprimierenden Zellen wiesen eine veränderte Struktur auf. Während die Mikrotubuli in Wildtyp KIF1B α überexprimierenden Zellen geradlinig und geordnet waren, zeigten die Mikrotubuli in den die Mutante überexprimierenden Zellen eine gewellte Struktur und hatten an Organisationsgrad verloren. Des Weiteren waren die Zellen insgesamt kleiner als Wildtyp KIF1B α überexprimierende Zellen und bildeten kürzere Fortsätze aus. (Abbildung 3.21 und 3.22).

Die Struktur und Verteilung des filamentösen Gebildes, an das KIF1B α -K103A gebunden hatte, zeigte starke Ähnlichkeit mit dem Mikrotubulizytoskelett. Durch Überlagerung der Farbkanäle für KIF1B α und α -Tubulin wurden Abbildungen erstellt, die beide Färbungen zeigten. In diesen Abbildungen ist deutlich zu erkennen, dass die KIF1B α -Färbung zwar teilweise mit der α -Tubulin-Färbung übereinstimmt, es jedoch Bereiche gibt, in denen

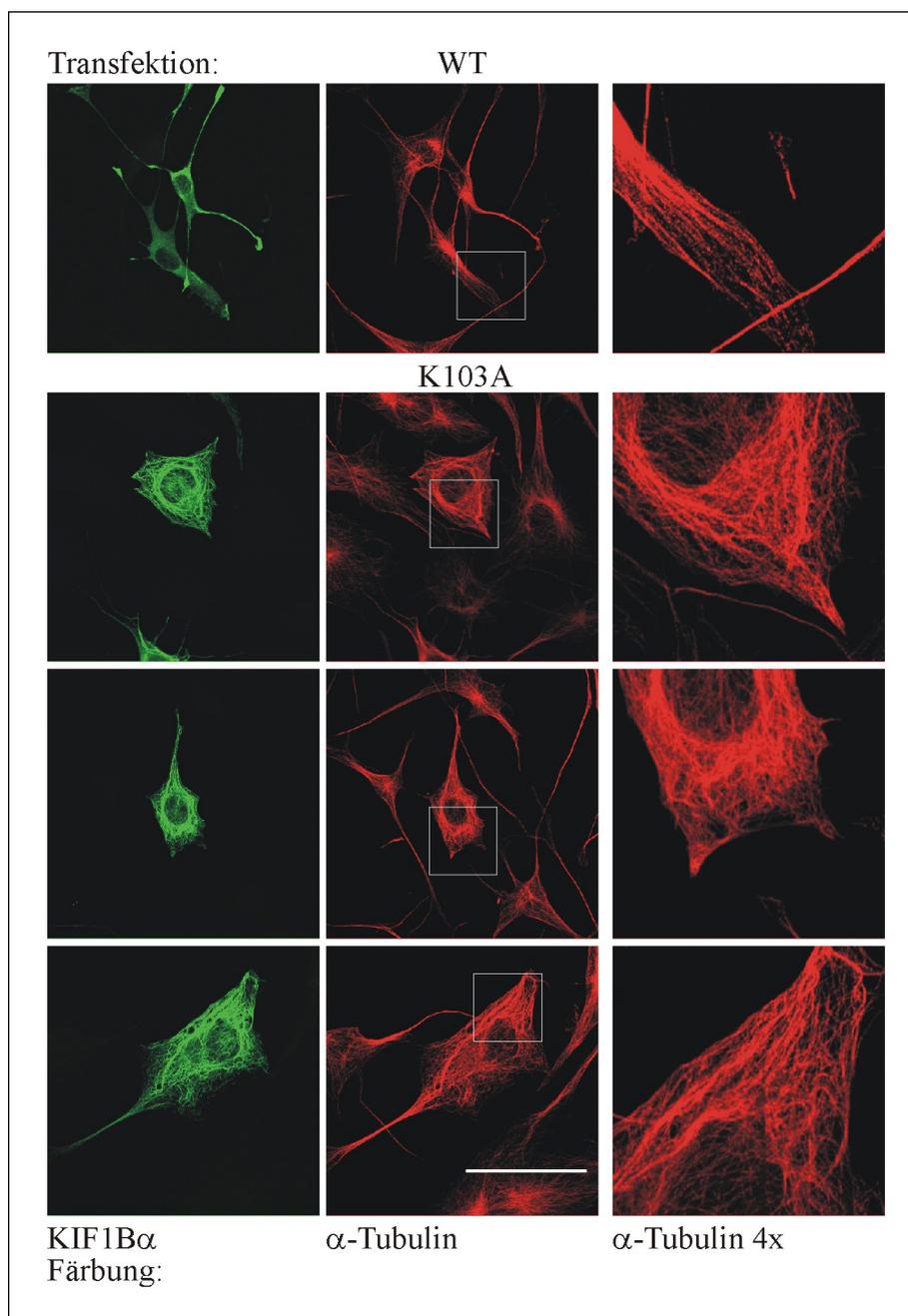


Abbildung 3.21: KIF1 β mit der Mutation K103A bindet an eine filamentöse Struktur in NIH3T3-Zellen und destabilisiert das Mikrotubulinetzwerk

NIH3T3-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp und KIF1 β -K103A transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit MitoTracker inkubiert, anschließend mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Das Kinesin wurde durch Inkubation mit dem KIF1 β -Antikörper, das Mikrotubulinetzwerk mit einem Antikörper gegen α -Tubulin und den entsprechenden Alexa gekoppelten Zweitantikörpern detektiert (Massstabsbalken entspricht 50 μ m).

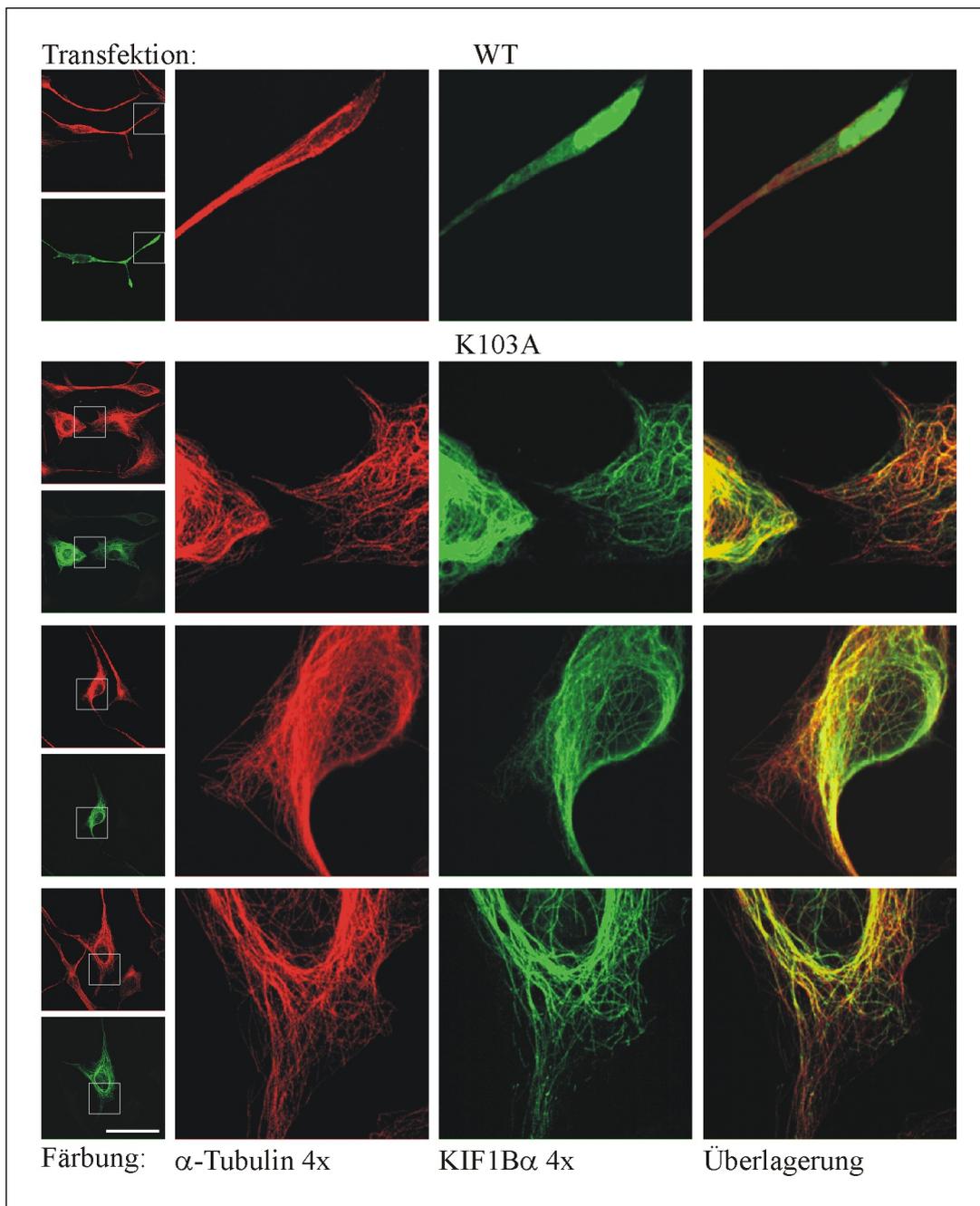


Abbildung 3.22: KIF1B α -K103A bindet nicht ausschließlich an Mikrotubuli

NIH3T3-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp und KIF1B α -K103A transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit 10% FCS in PBS geblockt und mit 0,1% Saponin permeabilisiert. Die Proteine wurden durch Inkubation mit KIF1B α (grün) bzw. α -Tubulin (rot) Antikörpern und entsprechenden Alexa gekoppelten Zweitantikörpern nachgewiesen. Zur Verdeutlichung wurden vierfach vergrößerte Aufnahmen erstellt und die Farbkanäle überlagert (Massstabsbalken entspricht 50 μ m).

KIF1B α und α -Tubulin nicht überlagert sind (Abbildung 3.22). Dies deutet darauf hin, dass KIF1B α nicht nur an die Mikrotubuli bindet, sondern auch an eine filamentöse Struktur, die in enger Nachbarschaft des Mikrotubulinetzwerkes liegt. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit das Netzwerk des Intermediärfilaments.

Die Mutation K103A in KIF1B α hatte, wie in Abbildung 3.22 gezeigt wurde, eine destabilisierende Wirkung auf das Mikrotubulinetzwerk. Da KIF1B α -K103A katalytisch

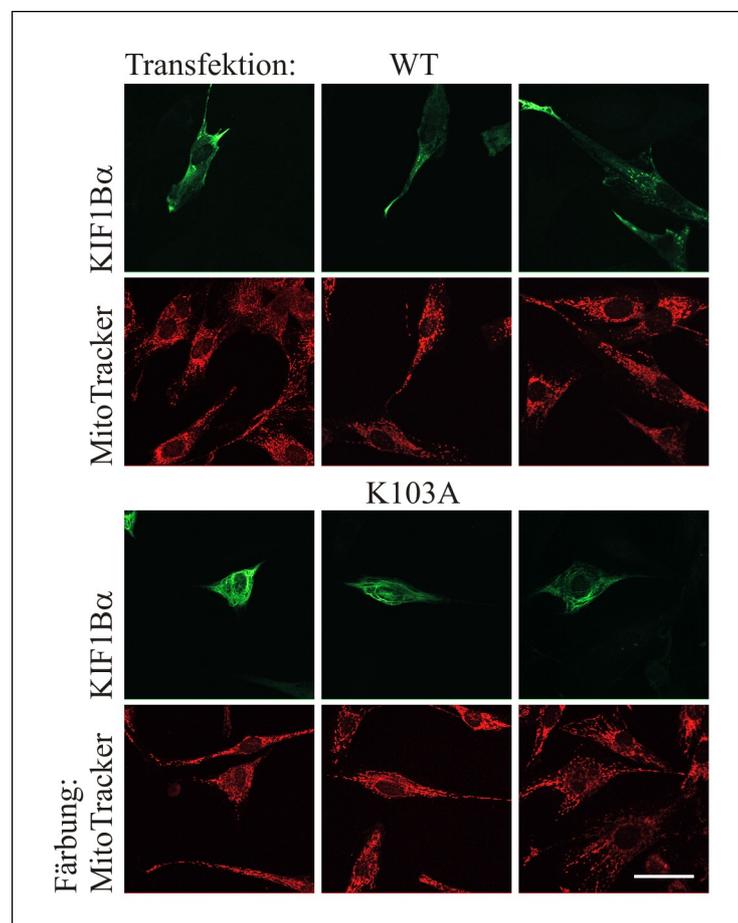


Abbildung 3.23: Die Mitochondrienverteilung wird durch KIF1B α -K103A nicht gestört

NIH3T3-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp und KIF1B α -K103A transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit MitoTracker inkubiert, anschließend mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit 10% FCS in PBS geblockt und mit 0,1% Saponin permeabilisiert. Das Kinesin wurde durch Inkubation mit dem KIF1B α -Antikörper und einem Alexa gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Die Mitochondrien wurden durch Inkubation mit MitoTracker gefärbt (Massstabsbalken entspricht 50 μ m).

inaktiv ist, liegt zusätzlich nahe, dass der Transport der Mitochondrien gestört sein könnte. In KIF1B α -K103A überexprimierenden Zellen wurden daher die Mitochondrien zusätzlich zu KIF1B α durch MitoTracker gefärbt, um deren Lokalisation zu zeigen.

Die Mitochondrienverteilung in den KIF1B α -K103A überexprimierenden Zelle unterschied sich nicht von der Verteilung in Wildtyp KIF1B α überexprimierenden oder den umgebenden untransfizierten Zellen (Abbildung 3.23). Möglicherweise reicht das endogene KIF1B α aus, um diese Funktion zu erfüllen. Andererseits ist es möglich, dass die Mitochondrien in diesen Zellen durch das mutierte KIF1B α wie verankert waren, was aus diesem Versuch nicht ersichtlich wäre.

3.12 Dimerisierungsdefektes 14-3-3 führt zur Akkumulation der Mitochondrien um den Zellkern und zu runden Zellen

Da die Überexpression der 14-3-3-bindungsdefekten KIF1B α -Mutante keinen Einfluss auf die Mitochondrienverteilung zeigte, wurde dimerisierungsdefektes 14-3-3 γ in NIH3T3-Zellen überexprimiert. Eine Überexpression der dimerisierungsgestörten 14-3-3-Mutante hat zur Folge, dass das endogene KIF1B α von dimerisierungsdefektem 14-3-3, das in starker Überzahl vorliegt, umgeben ist. Dieses konkurriert möglicherweise mit dem endogenen 14-3-3 um die Bindung an KIF1B α . Da KIF1B α jedoch nur mit dimerem 14-3-3 eine stabile Bindung eingehen kann, würde endogenes KIF1B α dann vermehrt in ungebundenem Zustand vorliegen.

In NIH3T3-Zellen, die Wildtyp bzw. dimerisierungsdefektes 14-3-3 γ überexprimierten, wurden zu diesem Zweck sowohl 14-3-3 als auch die Mitochondrien gefärbt. Zellen, die Wildtyp 14-3-3 γ überexprimierten, zeigten eine normal Verteilung der Mitochondrien. Die Dichte der Mitochondrien war um den Zellkern am höchsten und nahm zur Plasmamembran hin stetig ab. 14-3-3 γ mut Überexpression führte zu einer um 30 Prozent erhöhten Anzahl von Zellen, die eine perinukleäre Verteilung der Mitochondrien aufwiesen. Die Mitochondrien in diesen Zellen waren in einem engen Kreis um den Zellkern angeordnet und es lagen so gut wie keine peripheren Mitochondrien vor. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der anterograde Transport der Mitochondrien gestört war. Zusätzlich ist auffällig, dass die dimerisierungsgestörtes 14-3-3 γ überexprimierenden Zellen eine rundere Zellform als

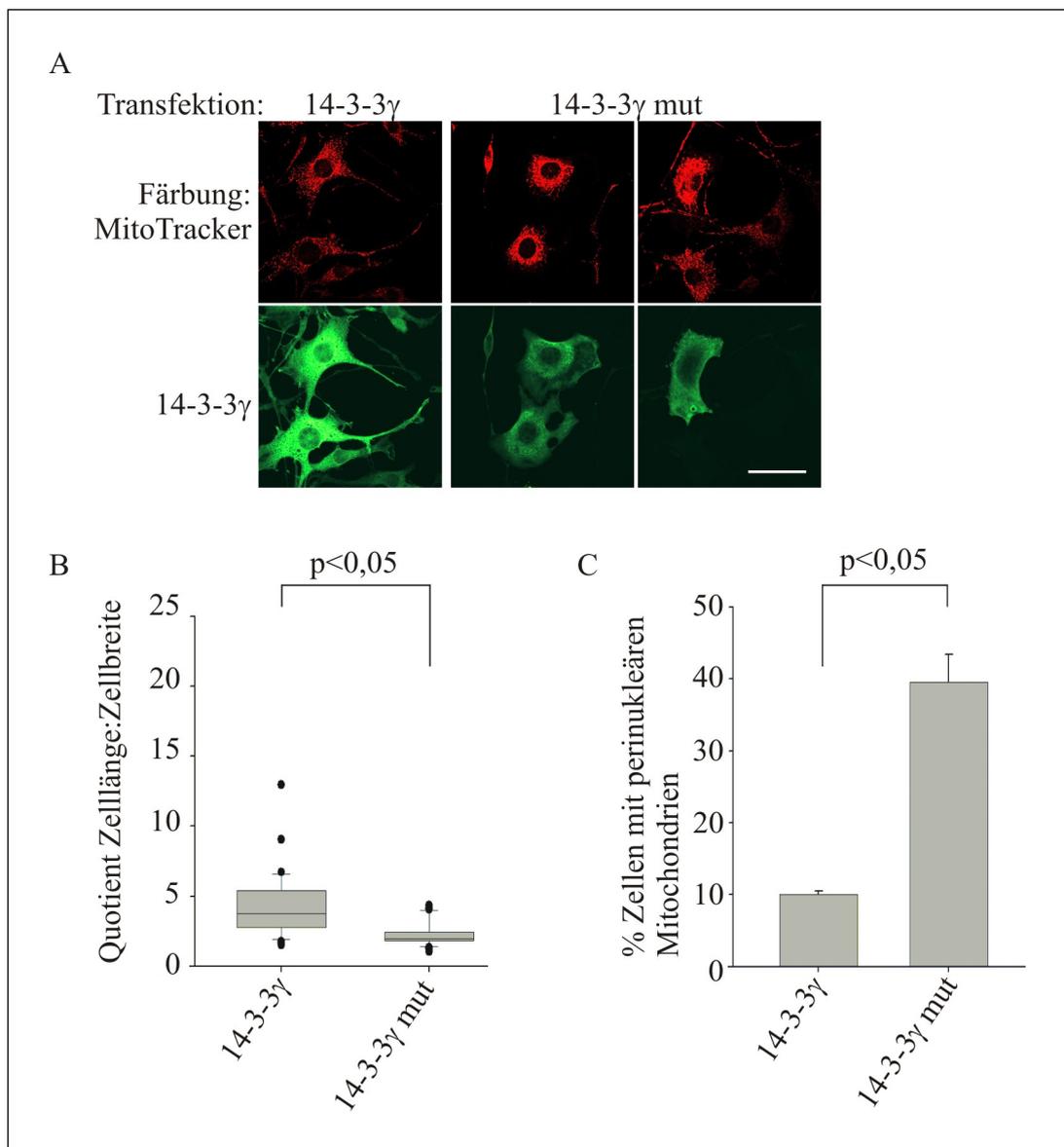


Abbildung 3.24: Überexpression von dimerisierungsdefektem 14-3-3 γ führt zur Akkumulation der Mitochondrien um den Zellkern und abgerundeten Zellen

(A) NIH3T3-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp und 14-3-3 γ mut transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit MitoTracker inkubiert, anschließend mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit 10% FCS in PBS geblockt und mit 0,1% Saponin permeabilisiert. 14-3-3 γ wurde durch Inkubation mit dem spezifischen Antikörper und einem Alexa gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht (Massstabsbalken entspricht 50 μ m). (B) Statistische Auswertung der Quotienten Zelllänge:Zellbreite. Zelllänge und Zellbreite wurden mit dem LeikaLite-Programm bestimmt (n = 720 in 3 unabhängigen Versuchen). (C) Statistische Auszählung der Zellen mit perinukleären Mitochondrien (n = 100 in 2 unabhängigen Versuchen).

Wildtyp 14-3-3 γ überexprimierende Zellen aufwiesen. Diese Zellen wiesen nur wenige Fortsätze auf, die dann sehr breit waren und nicht spitz zuliefen, sondern ein breites, abgerundetes Ende hatten. Diese Beobachtung bestätigt sich, wenn man den Quotienten der Länge und Breite der Zellen bildet. Der Quotient Wildtyp 14-3-3 γ überexprimierender Zellen lag durchschnittlich bei ca. 4, während der Quotient bei dimerisierungsgestörtes 14-3-3 γ überexprimierenden Zellen etwa halb so hoch war (Abbildung 3.24). Ein Quotient aus Zelllänge und -breite, der gegen eins geht, würde einer runden Zelle entsprechen. Somit hat die Dimerisierung der 14-3-3-Proteine einen Einfluss auf die Mitochondrienverteilung und die Zellform.

Da die Zellform entscheidend durch das Zytoskelett bestimmt wird, wurde im folgenden Experiment das Mikrotubulinetzwerk untersucht. Wildtyp 14-3-3 γ überexprimierende Zellen wiesen eine normale Organisation des Zytoskeletts auf. Die Mikrotubuli entsprangen strahlenförmig aus den Zentrosomen und reichten bis zur Plasmamembran. In Fortsätzen lagen sie mehr oder weniger parallel in Bündeln angeordnet vor und ragten bis in die Spitzen hinein. Diese Mikrotubuliorganisation entsprach der der umgebenden untransfizierten Zellen. Die Mikrotubuli der 14-3-3 γ mut überexprimierenden Zellen wiesen eine starke Störung des Mikrotubulinetzwerkes auf. Während in den sie umgebenden Zellen eine höhere Mikrotubulidichte am Zellkern zu erkennen war, waren die Mikrotubuli in den 14-3-3 γ mut überexprimierenden Zellen ohne erkennbare Anordnung im Zytoplasma verteilt.

In der Vergrößerung der Fortsätze wurde deutlich, dass die Mikrotubuli in 14-3-3 γ Wildtyp überexprimierenden Zellen vom Zellkern aus strahlenförmig in die Fortsätze ragten. Mikrotubuli der 14-3-3 γ mut überexprimierenden Zellen waren nahe der Plasmamembran gewellt und zeigten keine eindeutige Ausrichtung zur Plasmamembran hin (Abbildung 3.25), was ein Zeichen für die Destabilisierung der Mikrotubuli ist (Straube und Merdes, 2007). Dies könnte der Grund für abgerundete bzw. fehlende Fortsätze sein.

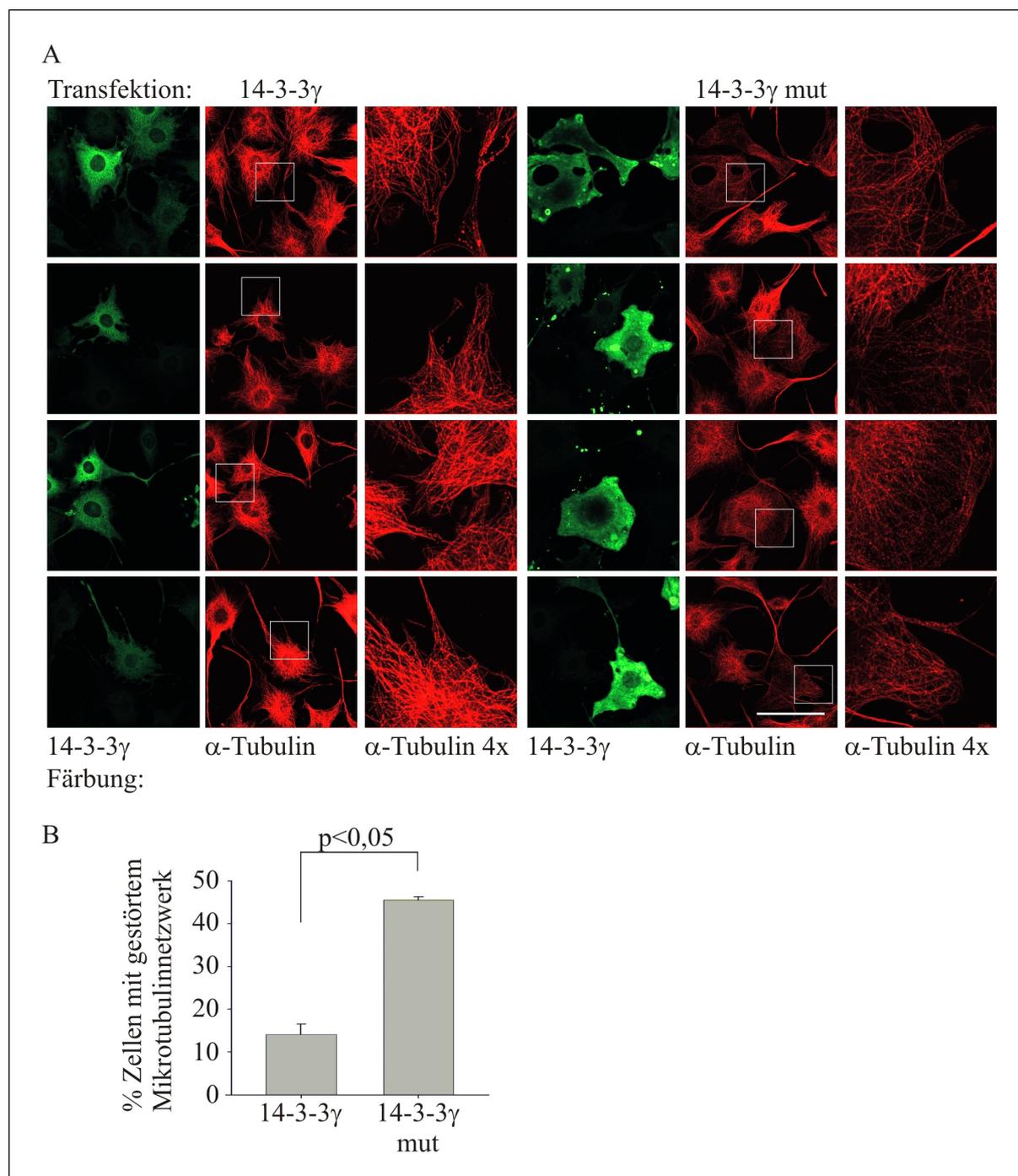


Abbildung 3.25: Überexpression von dimerisierungsgestörtem 14-3-3 γ führt zu destabilisierten Mikrotubuli

(A) NIH3T3-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp und 14-3-3 γ mut transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit 10% FCS in PBS geblockt und mit 0,1% Saponin permeabilisiert. 14-3-3 γ und α -Tubulin wurden durch Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern sichtbar gemacht. (Massstabsbalken entspricht 50 μ m) (B) Statistische Auswertung der Zellen mit gestörtem Mikrotubulinnetzwerk (n = 400 in 2 unabhängigen Versuchen).

3.13 Die Bindung von 14-3-3-Proteinen an KIF1B α ist wichtig für Mitochondrientransport, Zellform und Mikrotubulistabilität in sich ausbreitenden Zellen

Durch KIF1B α -Knockdown konnte gezeigt werden, dass KIF1B α sowohl für den Mitochondrientransport als auch für die Zellform wichtig ist. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die katalytisch defekte Mutante KIF1B α -K103A an eine filamentöse Struktur in der Zelle bindet, die jedoch nicht identisch mit dem Mikrotubulinetzwerk ist. Diese Struktur könnte das Intermediärfilament sein. Da das Intermediärfilament als Teil des Zytoskeletts wichtig für die Zellform, aber auch für das Ausbreiten der Zellen z.B. nach dem Trypsinieren

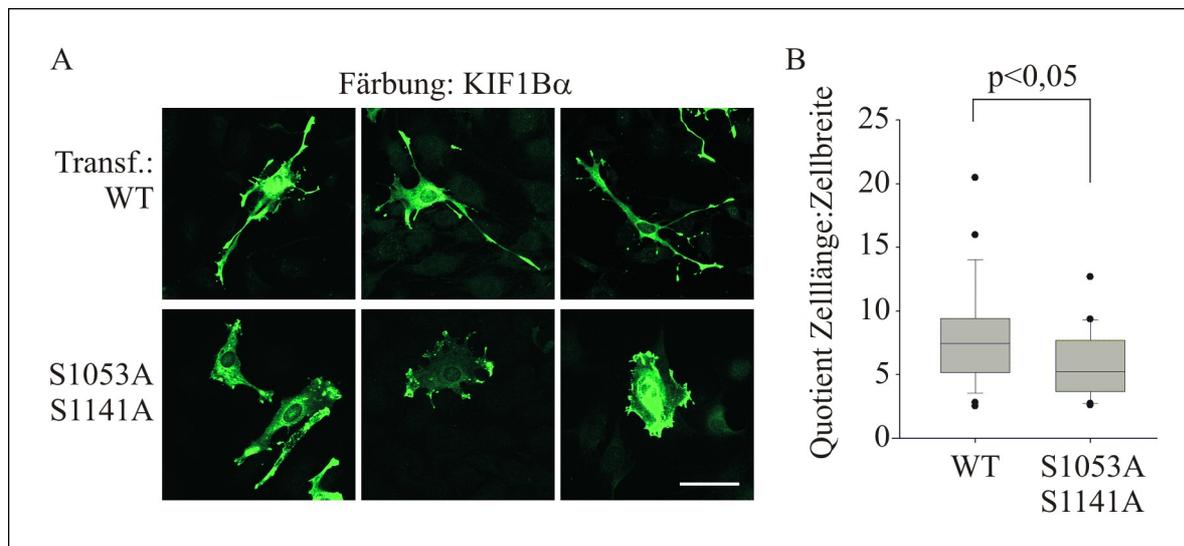


Abbildung 3.26: KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierende Zellen sind in ihrer Ausbreitung gehemmt

(A) NIH3T3-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp und KIF1B α -S1053A,S1141A transfiziert. Die Zellen wurden 36 h nach der Transfektion trypsiniert und auf Glasplättchen ausgesät. 24 h später wurden sie mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit 10% FCS in PBS geblockt und mit 0,1% Saponin permeabilisiert. KIF1B α wurde durch Inkubation mit dem spezifischen Antikörper und einem Alexa gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht (Massstabsbalken entspricht 50 μ m). (B) Statistische Auswertung der Quotienten Zelllänge:Zellbreite. Zelllänge und Zellbreite wurden mit dem LeikaLite-Programm bestimmt (n = 200 Zellen in 4 unabhängigen Versuchen).

und dem erneuten Aussäen ist, wurde ein sogenannter Spreading-Assay mit NIH3T3-Zellen, die Wildtyp bzw. KIF1B α -S1053A,S1141A transient überexprimierten, durchgeführt.

Der Spreading-Assay ist ein bewährtes Verfahren, um die Fähigkeit der Zellen zum Ausbreiten, aber auch zum Neuorganisieren des Zytoskeletts bzw. der Organellen zu untersuchen (Bao und Suresh, 2003). NIH3T3-Zellen wurden ca. 36 h nach der Transfektion trypsiniert und auf Glasplättchen ausgesät. Die Fixierung und Färbung mit Antikörpern bzw. MitoTracker erfolgte 24 h später. Da eine niedrige Antikörperkonzentration für die Färbung gewählt wurde, konnten transfizierte Zellen leicht von untransfizierten unterschieden werden.

Überexprimiertes Wildtyp KIF1B α lag in diesen Zellen gleichmäßig über das Zytosol verteilt vor und zeigt ein erhöhtes Aufkommen in den Enden der Fortsätze, während mutiertes KIF1B α zwar ebenfalls gleichmäßig in der Zelle verteilt war, jedoch eher an bestimmten Stellen in der Zelle akkumulierte. Diese Stellen lagen hauptsächlich am Zellrand. Während Wildtyp KIF1B α überexprimierende Zellen gestreckt waren und lange Fortsätze ausbildeten, waren KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierende Zellen eher rund mit wenigen kurzen Fortsätzen. Der durchschnittliche Quotienten aus Zelllänge und Zellbreite lag in Zellen, die Wildtyp KIF1B α überexprimierten, etwa anderthalb Mal so hoch wie der durchschnittliche Quotient der KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierenden Zellen (Abbildung 3.26). Im Vergleich zu den Wildtyp 14-3-3 γ überexprimierenden Zellen (Abbildung 3.24) wiesen die Wildtyp KIF1B α überexprimierenden Zellen höhere Quotienten auf. Somit sind Wildtyp KIF1B α überexprimierende Zellen gestreckter als Wildtyp 14-3-3 γ überexprimierende Zellen. Dies deutet darauf hin, dass KIF1B α den Auswuchs der Fortsätze fördert.

KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierende Zellen hingegen waren als Wildtyp überexprimierende Zellen (Abbildung 3.26 und 3.27) und wiesen einen niedrigeren Quotienten auf. Somit waren diese Zellen in ihrer Fähigkeit, sich nach dem Trypsinieren auszubreiten, gehemmt.

Im nächsten Ansatz wurde die Mitochondrienverteilung in sich ausbreitenden Zellen untersucht. Dazu wurden zusätzlich zur KIF1B α -Färbung die Mitochondrien mit MitoTracker gefärbt. Die Mehrheit der Zellen, die Wildtyp KIF1B α überexprimierten, zeigten eine normale oder verstärkt periphere Verteilung der Mitochondrien. Im Gegensatz zu untransfizierten Zellen, waren die Mitochondrien in diesen Zellen auf das gesamte Zytoplasma verteilt und zeigten ein verstärktes Auftreten in den Spitzen der Fortsätze. Dieses

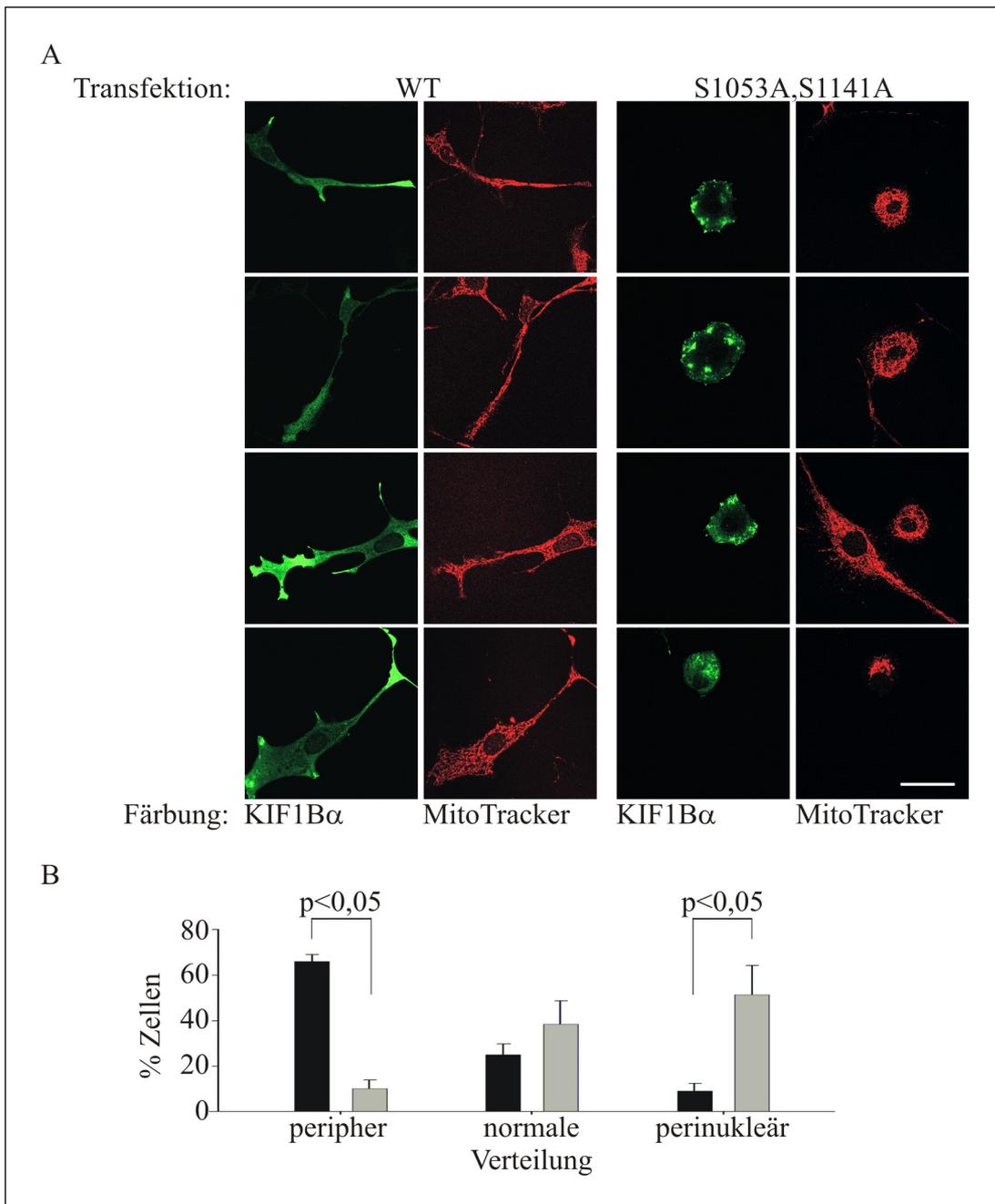


Abbildung 3.27: Mutiertes KIF1B α hemmt in sich ausbreitenden Zellen die Relokalisation der Mitochondrien

(A) NIH3T3-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp und KIF1B α -S1053A,S1141A transfiziert. Die Zellen wurden 36 h nach Transfektion trypsinisiert und auf Glasplättchen ausgesät. 24 h später wurden sie mit MitoTracker inkubiert, mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit 10% FCS in PBS geblockt und mit 0,1% Saponin permeabilisiert. KIF1B α wurde mit einem spezifischen Antikörper und dem entsprechenden alexa-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht (Massstabsbalken entspricht 50 μ m). (B) Statistische Auszählung der Zellen mit entsprechender Mitochondrienverteilung (n = 600 Zellen in 3 unabhängigen Versuchen; schwarz entspricht Wildtyp, grau Doppelmutante)

Ergebnis zeigt, dass das Gleichgewicht zwischen Dynein und Kinesinen, das für die Positionierung der Mitochondrien wichtig ist, durch KIF1B α -Überexpression gestört wurde und der anterograde Transport die Überhand gewann. KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierende Zellen waren hingegen kleiner und runder als Wildtyp KIF1B α überexprimierende Zellen und besaßen kaum Fortsätze. Die Hälfte der KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierenden Zellen wiesen eine kreisförmige Anordnung der Mitochondrien um den Zellkern herum auf. Bedingt durch ihre Zellform umgab nur ein schmales Band mitochondrienfreien Zytoplasmas den Kreis der Mitochondrien, der jedoch nicht bis zur Plasmamembran reichte (Abbildung 3.27).

Da die 14-3-3-Bindung an KIF1B α von Bedeutung für das Ausbreiten trypsinierter Zellen ist, wurde als nächstes das Zytoskelett dieser Zellen untersucht. Zusätzlich zu KIF1B α wurde daher α -Tubulin angefärbt. Wildtyp KIF1B α überexprimierende Zellen wiesen größtenteils eine normale Organisation des Mikrotubulinetzwerkes auf (Abbildung 3.28). Im Gegensatz dazu wiesen die KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierenden Zellen eine geringere Organisation des Mikrotubulinetzwerkes auf, die Mikrotubuli waren gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt. Die Mikrotubuli hatten keine parallele Ausrichtung, sondern waren wellenförmig gekraust und unorganisiert. Dies deutet auf eine reduzierte Stabilität des Mikrotubulinetzwerkes hin, wodurch die runde Zellform und das Fehlen von Fortsätzen bedingt war.

Die Effekte in den KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierenden Zellen im Spreading-Assay stehen im Einklang mit den Effekten, die in 14-3-3 γ mut überexprimierenden Zellen beobachtet wurden. Die 14-3-3-Bindung an KIF1B α ist ausschlaggebend für die Mitochondrienverteilung und die Zellform.

Eine Destabilisierung des Mikrotubulinetzwerkes kann unterschiedliche Ursachen haben. Mikrotubuli haben zwei Enden, die zur Stabilität des Makromoleküls beitragen. Das (-)-Ende der Mikrotubuli wird durch die Verankerung im MTOC stabilisiert. An die (+)-Enden binden stabilisierende Proteine, darunter die EBs (microtubule plus end-binding protein). Um einen möglichen Einfluss der S1053A,S1141A Mutante auf die Zentrosomen zu untersuchen, wurde in den Zellen aus dem Spreading-Assay γ -Tubulin angefärbt.

Sowohl Wildtyp als auch KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierende Zellen verfügten über intakte Zentrosome (Abbildung 3.29). Diese sind als zwei Punkte zu erkennen, die meist sehr nah beieinander und in mittelbarer Nähe des Zellkerns liegen. Daher kann davon ausgegangen

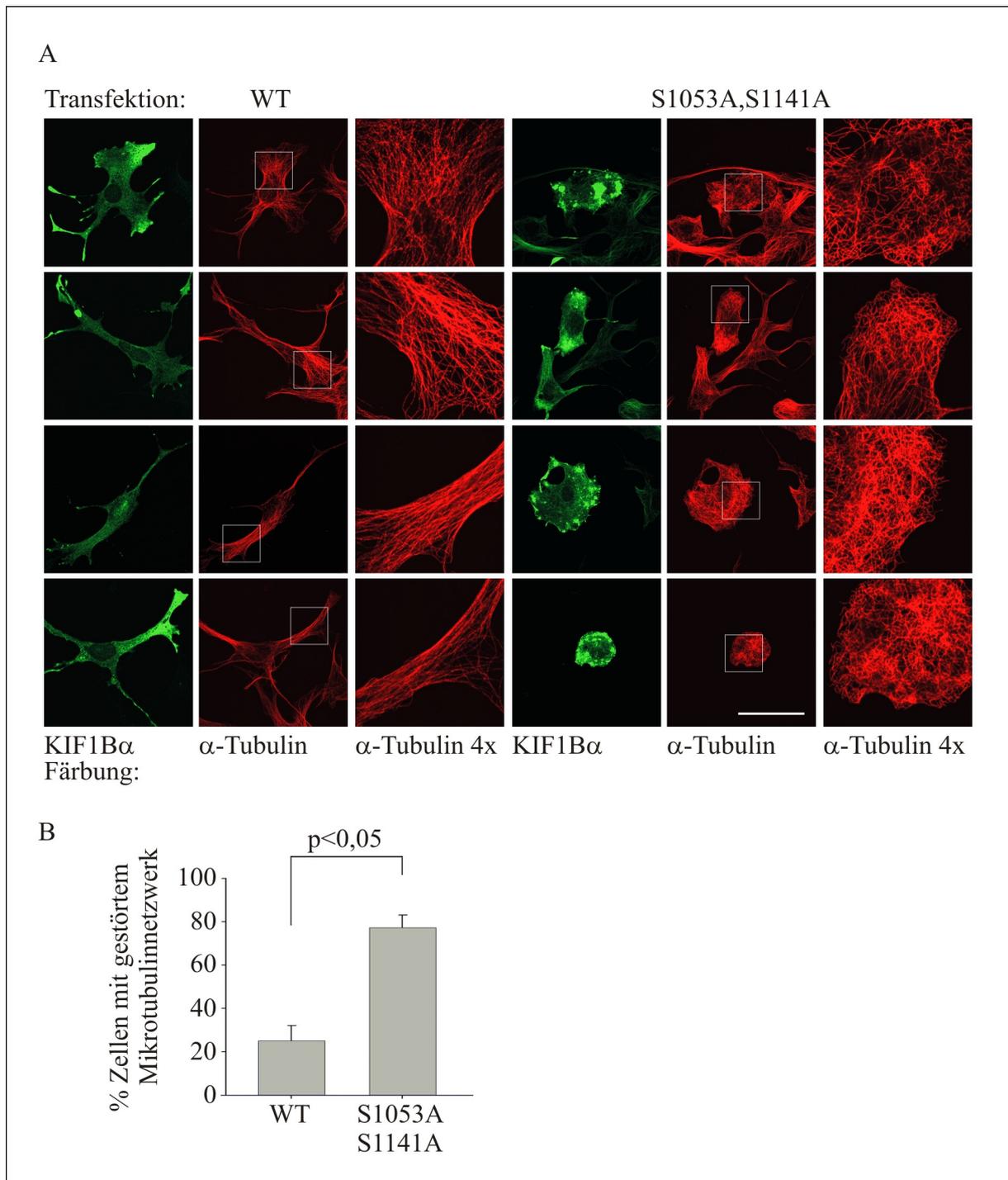


Abbildung 3.28: KIF1B α -S1053A,S1141A Überexpression destabilisiert das Mikrotubulinnetzwerk in sich ausbreitenden Zellen

(A) NIH3T3-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp oder KIF1B α -S1053A,S1141A transfiziert. Die Zellen wurden 36 h nach Transfektion trypsiniert und auf Glasplättchen ausgesät. 24 h später wurden sie mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit 10% FCS in PBS geblockt und mit 0,1% Saponin permeabilisiert. KIF1B α und α -Tubulin wurden mit entsprechenden Antikörpern detektiert (Massstabsbalken entspricht 50 μ m). (B) Statistische Auszählung der Zellen mit gestörtem Mikrotubulinnetzwerk (n = 280 Zellen in 2 unabhängigen Versuchen).

werden, dass die (-)-Enden der Mikrotubuli geschützt sind. Somit wird deutlich, dass die Destabilisierung der Mikrotubuli durch KIF1B α -S1053A,S1141A von den (+)-Enden her rührte.

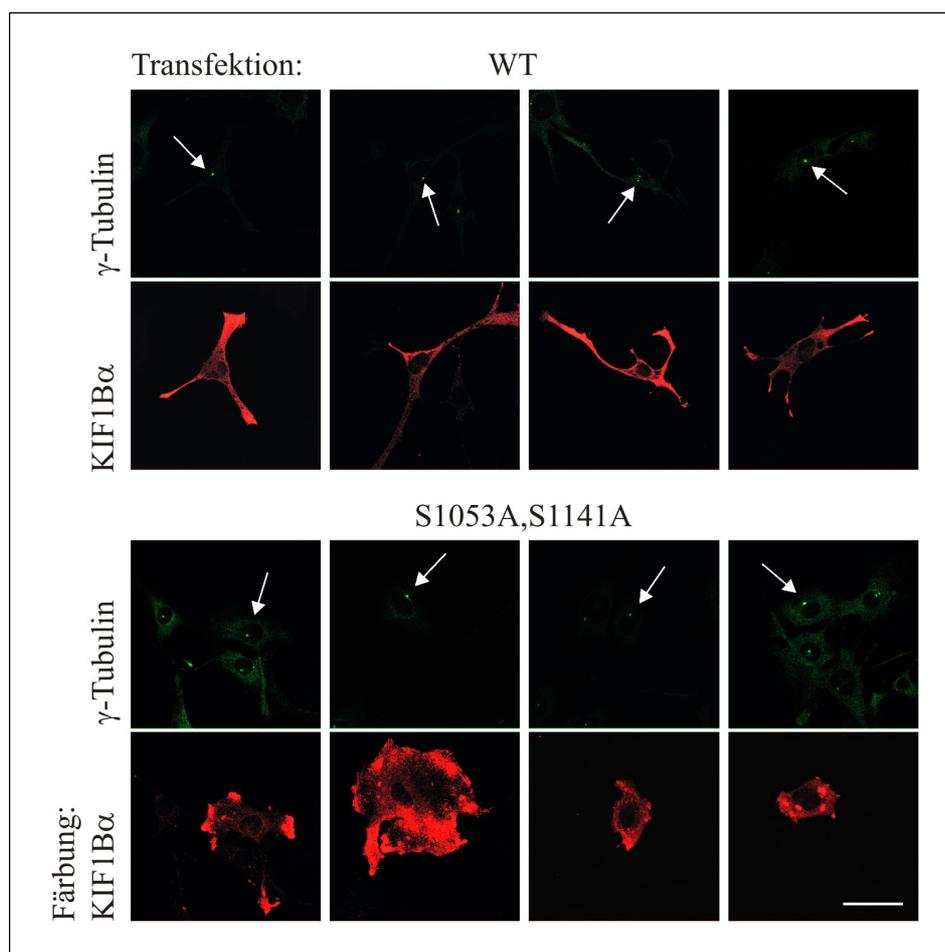


Abbildung 3.29: Die Mutation der 14-3-3-Bindungsstellen in KIF1B α beeinflusst die Zentrosomen nicht

(A) NIH3T3-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Wildtyp und KIF1B α -S1053A,S1141A transfiziert. Die Zellen wurden 36 h nach Transfektion trypsinisiert und auf Glasplättchen ausgesät. 24 h später wurden sie mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit 10% FCS in PBS geblockt und mit 0,1% Saponin permeabilisiert. KIF1B α und γ -Tubulin wurden durch Inkubation mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern und Alexa gekoppelten Zweitantikörpern detektiert. Die Pfeile weisen auf die Zentrosomen (Massstabsbalken entspricht 50 μ m).

4 Diskussion

Obwohl KIF1B α bereits 1994 beschrieben wurde, ist bisher nicht viel über dieses Protein bekannt. Nangaku et al. konnten die KIF1B α Co-Lokalisation mit Mitochondrien in Neuro2A Zellen nachweisen und *in vitro* den KIF1B α vermittelten Mitochondrientransport entlang Mikrotubuli zeigen (1994). Es wurden verschiedene KIF1B α -Bindungspartner beschrieben, jedoch konnte für die wenigsten eine physiologische Bedeutung nachgewiesen werden. Einer der Bindungspartner, für den der Nachweis einer physiologischen Funktion gelungen ist, war KBP, das sowohl an KIF1C als auch an KIF1B α bindet, da die Bindungsstelle im homologen Bereich dieser beiden Motorproteine im C-Terminus der Motordomäne liegt. Knockdown bzw. Überexpression einer KBP-Mutante führte zur Akkumulation der Mitochondrien im Bereich des Nukleus durch verminderte KIF1B α -Aktivität (Wozniak et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer KIF1B α -Bindungspartner, 14-3-3, und dessen Bedeutung für die Funktion des Motorproteins beschrieben.

4.1 14-3-3-Proteine sind Bindungspartner von KIF1B α

Es wurden zwei 14-3-3-Bindungsstellen in KIF1B α identifiziert, S1053 und S1141. Die Identifikation der C-terminalen Bindungsstelle erfolgte zunächst durch Homologievergleich mit KIF1C. In diesem Protein wurde bereits zuvor eine 14-3-3-Bindungsstelle an S1092 identifiziert (Dorner et al., 1999). Die 14-3-3-Bindung an KIF1B α konnte durch Co-Immunpräzipitation der beiden Proteine gezeigt werden. Die Bindung wurde durch Mutation der C-terminalen Bindungsstelle S1141 zu Alanin nur geschwächt, jedoch nicht verhindert. Daher wurde von einer zweiten Bindungsstelle ausgegangen, die durch eine ScanSite Analyse an S1053 identifiziert wurde. Die Bindung zwischen KIF1B α und 14-3-3-Proteinen konnte erst durch den Aminosäureaustausch beider Serine zu Alanin unterbunden werden (Abbildung 3.4). Daraus ergibt sich, dass KIF1B α zwei Bindungsstellen für 14-3-3-Proteine hat, die jeweils alleine zu schwach sind, um den Bindungspartner stabil zu binden.

Die Stabilität der 14-3-3-Bindung in Abhängigkeit von der Anzahl der Bindungsstellen wurde durch Yaffe et al. anhand verschiedener Peptide untersucht. Sie wiesen nach, dass die Bindung

eines 14-3-3-Dimers an ein Peptid mit zwei Bindungsstellen um das 30fache höher lag als an das Peptid, das nur eine Bindungsstelle enthielt (1997). In der Tat besitzen viele 14-3-3-Bindungspartner zwei oder mehr 14-3-3-Bindungsstellen (Tzivion und Avruch, 2002).

Die Bindung der einfach mutierten KIF1B α an 14-3-3 war verschieden stark. Zwar war in beiden Fällen die 14-3-3-Bindung im Vergleich zur Bindung an Wildtyp KIF1B α stark reduziert, KIF1B α -S1053A wies jedoch eine stärkere Bindung an 14-3-3 γ auf als KIF1B α -S1141A (Abbildung 3.4). S1141 ist eine starke 14-3-3-Bindungsstelle, da die sie umgebende Aminosäuresequenz homolog zu einer der 14-3-3-Konsensusbindungsstellen ist, während der das S1053 umgebenden Aminosäuresequenz das Prolin an Position +2 fehlt (Abbildung 3.3). Dieses Prolin verursacht einen „Knick“ in der Aminosäurekette, der wichtig ist für die Assoziation der 14-3-3-Proteine an den Bindungspartner (Rittinger et al., 1999). In Proteinen, die zwei 14-3-3-Bindungsstellen besitzen, wurde postuliert, dass die stärkere Bindungsstelle (wird als „gatekeeper“ bezeichnet) das 14-3-3-Protein rekrutiert, während die zweite Bindungsstelle für eine stabile Bindung zwischen den beiden Proteinen sorgt (Yaffe, 2002). Demnach wäre S1141 in KIF1B α der Gatekeeper, während S1053 für die Stabilisierung der Bindung zuständig wäre.

Wie viele andere Proteine mit zwei 14-3-3-Bindungsstellen, ging KIF1B α keine stabile Bindung mit monomeren 14-3-3-Proteinen ein (Abbildung 3.4). Shen et al. wiesen nach, dass die 14-3-3-Dimerisierung ausschlaggebend für die Bindung an phosphorylierte Bindungsstellen im selben Protein ist (2003). Die 14-3-3-Dimerisierung wird *in vivo* durch Phosphorylierung an S58 negativ reguliert (Megidish et al., 1998; Woodcock et al., 2003). Woodcock et al. wiesen zudem nach, dass die Monomerisierung keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit des Monomers an ein Phosphoserinpeptid hat. Somit müssen die 14-3-3-Dimere weitere Eigenschaften aufweisen, die eine Bindung an den Partner begünstigt. Allerdings gibt es Proteine, die sowohl monomeres als auch dimeres 14-3-3 binden können. Der kalziumabhängige Kaliumkanal dSlo in *Drosophila* wird sowohl durch die Bindung an monomeres als auch an dimeres 14-3-3 mit ähnlicher Effizienz gehemmt (Zhou et al., 2003). Es wird angenommen, dass Proteine, die sowohl monomeres als auch dimeres 14-3-3 binden, weder auf die konformationsändernde noch auf die überbrückende Funktion von 14-3-3-Proteinen angewiesen sind (Woodcock et al., 2003; Zhou et al., 2003). Proteine wie KIF1B α hingegen, die nur dimeres 14-3-3 stabil binden können, sind vermutlich auf die speziellen

Eigenschaften des Dimers angewiesen, um eine räumliche Nähe zu einem weiteren Bindungspartner herzustellen oder die eigene Konformation zu verändern.

Die Bindung zwischen endogenem KIF1B α und 14-3-3-Proteinen wurde durch Co-Immunpräzipitation von KIF1B α mit den beiden Isoformen 14-3-3 γ und 14-3-3 β nachgewiesen (Abbildung 3.5). Um die Bindung der endogenen Proteine nachweisen zu können, mussten die Zellen mit dem Ser/Thr-Phosphatase-Inhibitor Calyculin A behandelt werden, wodurch die allgemeine Proteinphosphorylierung in den Zellen erhöht wurde. Dies bestätigt, dass die 14-3-3-Bindung an KIF1B α von der Phosphorylierung der Bindungsstellen abhängig ist. In KIF1B α überexprimierenden Zellen zeigte sich, dass KIF1B α auch in gehungerten Zellen phosphoryliert vorlag. Während die Phosphorylierung an S1053 schwach war und durch Stimulation verschiedener Kinasen verstärkt wurde, lag S1141 stark phosphoryliert vor und wurde durch keine der getesteten Kinasen in einem höheren Ausmaß phosphoryliert. Durch Calyculin A wurde die Phosphorylierung beider Bindungsstellen des endogenen KIF1B α erhöht, jedoch war vermutlich die verstärkte Phosphorylierung an S1053 entscheidend für die stabile Bindung an 14-3-3.

4.2 Die 14-3-3-Proteinbindung beeinflusst die KIF1B α -Stabilität und -Tritonlöslichkeit

In Co-Überexpressionsversuchen wurde ein Zusammenhang zwischen der KIF1B α -Menge im Lysat der Zellen und der Bindung zwischen KIF1B α und 14-3-3 γ festgestellt. In Proben, in denen die 14-3-3-Bindung an KIF1B α entweder durch Mutation der Bindungsstellen in KIF1B α bzw. durch Störung der 14-3-3-Dimerisierung gehemmt war, war die KIF1B α -Menge im Lysat reduziert (Abbildung 3.4). Dies führte zu der Annahme, dass die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α entweder dessen Tritonlöslichkeit oder Stabilität erhöht. Endogenes KIF1B α wurde durch Überexpression des Wildtyp 14-3-3-Proteins einerseits stabilisiert, denn die Proteinmenge in den Zellen stieg an. Andererseits wurde die KIF1B α -Tritonlöslichkeit erhöht, denn sämtliches zusätzliches KIF1B α lag im Lysat vor. Die KIF1B α -Menge im tritonunlöslichen Anteil der Proteine änderte sich nicht durch die Überexpression von Wildtyp bzw. mutiertem 14-3-3 (Abbildung 3.6).

Die Regulation der Stabilität des Bindungspartners ist eine bekannte Funktionen der 14-3-3-Proteinbindung. Der Verlust der 14-3-3-Bindung an die Sukrosephosphatreduktase in gehungerten Pflanzenzellen führt zu dessen Abbau, der durch Proteasehemmung verhindert werden konnte (Cotelle et al., 2000). Andererseits wird die Nitratreduktase durch 14-3-3-Bindung in abgedunkelten Pflanzenblättern degradiert (Weiner und Kaiser, 1999). Die meisten bekannten Proteine, deren Stabilität durch 14-3-3-Bindung reguliert wird, wurden bisher in Pflanzen beschrieben, jedoch gibt es diese Art der Regulation auch in Vertebraten. So bindet durch Akt phosphoryliertes MDMX an 14-3-3-Proteine, wodurch das Protein stabilisiert wird (Lopez-Pajares et al., 2008). Allerdings gibt es auch anderslautende Berichte, wonach die MDMX-Stabilität durch die 14-3-3-Bindung reduziert wird (LeBron et al., 2006). Auch die Stabilität von p53 wird durch 14-3-3-Proteinbindung beeinflusst. 14-3-3 σ bindet an p53 und verhindert die Mdm2 induzierte Ubiquitinierung, wobei der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist (Yang et al., 2003). Zwischen den 14-3-3-Bindungsstellen S1053 und S1141 in KIF1B α gibt es mehrere Lysine. Die Analyse mit dem Programm UbPred (<http://www.ubpred.org/>) ergab, dass zwei dieser Lysine potentielle Ubiquitinierungsstellen sind. Durch die 14-3-3-Bindung könnten diese maskiert werden, wodurch der KIF1B α -Abbau verhindert werden würde. Ein Unterschied in der Ubiquitinierung von KIF1B α -S1053A,S1141A im Vergleich zu Wildtyp KIF1B α konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit gehört KIF1B α zu einer Reihe von Proteinen, deren Stabilität durch eine 14-3-3-Proteinbindung reguliert wird, allerdings ist der genaue Mechanismus noch nicht bekannt.

Um die Bedeutung der 14-3-3-Bindung für die physiologische Funktion der KIF1B α untersuchen zu können, wurde der Versuch unternommen, permanente Zelllinien herzustellen. Es wurden insgesamt drei verschiedene Zelllinien mit Vektoren für Wildtyp und KIF1B α -S1053A,S1141A transfiziert. Obwohl diese Zelllinien in Selektionsmedien kultiviert wurden, verloren sie die Expression von KIF1B α schnell, und KIF1B α -S1053A,S1141A wurde im Vergleich zu Wildtyp KIF1B α weniger stark exprimiert (Abbildung 3.7). Die Expression in permanenten Zellen war verglichen zu transienter Überexpression schwach, was zeigt, dass die Expression von KIF1B α in Zelllinien strikt reguliert wird, um das Gleichgewicht zwischen Dyneinen und Kinesinen zu erhalten, das wichtig für die Positionierung der Mitochondrien ist. Gleichzeitig ist KIF1B α -S1053A,S1141A in diesen Zellen weniger stabil, da keine 14-3-3-Proteinbindung erfolgt.

4.3 Regulation der 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α

In der Regel erfolgt die 14-3-3-Proteinbindung an ein phosphoryliertes Serin bzw. Threonin in einer der 14-3-3-Konsensusbindungsstellen, RSX(pS/T)XP oder RXXX(pS/T)XP. Daher wird die 14-3-3-Bindung durch die Kinasen, die den Bindungspartner phosphorylieren, reguliert. Durch eine ScanSite-Analyse wurden Akt und AMPK als potentielle KIF1B α phosphorylierende Kinasen identifiziert (Abbildung 3.9). Die Arginin-Reste an Position -3 bzw. -4 begünstigen eine Phosphorylierung durch Mitglieder der AGC- bzw. CAMK-Familien (Dougherty und Morrison, 2004; Pearson und Kemp, 1991). Die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α konnte durch die Aktivierung von Akt, PKC und PKA gesteigert werden, während durch die Aktivierung der AMPK keine deutliche Steigerung der 14-3-3-Proteinbindung in einem Overlay-Assay erreicht wurde (Abbildung 3.10). Die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindungsstellen, S1053 und S1141, wurde durch Phosphoantikörper nachgewiesen, deren Spezifität zuvor belegt wurde (Abbildung 3.11). Von dem Overlay-Assay abgeleitet, wurden verschiedene Kinasen auf ihre Fähigkeit, KIF1B α an S1053 bzw. S1141 *in vitro* und *in vivo* zu phosphorylieren, untersucht.

KIF1B α wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an S1053 durch Akt, PKC und PKA phosphoryliert (Abbildung 3.12 bis 3.15). Die Mitglieder der AGC-Kinasefamilie besitzen *in vitro* stark überlappende Substratspezifitäten und phosphorylieren Serine bzw. Threonine, die C-terminal bestimmter Abfolgen basischer Aminosäuren liegen. Mitglieder dieser Familie, wie Akt, SGK, RSK und S6K, phosphorylieren vorzugsweise das Motiv RXXRX(S/T) (Alessi et al., 1996; Kobayashi und Cohen, 1999). Substrate, die diese oder ähnliche Minimalerkennungssequenzen tragen, können so durch verschiedene Signale auf die gleiche Art reguliert werden. So wird GSK3 durch Phosphorylierung an S21 in der α -Isoform und S9 in der β -Isoform infolge verschiedener Stimuli deaktiviert. Die Phosphorylierung kann nach Stimulation mit Insulin, Wachstumsfaktoren oder Aminosäuren durch Akt, RSK oder S6K erfolgen (Cohen und Frame, 2001). Ein weiteres Beispiel ist die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), die durch verschiedene Stimuli an mehreren Aminosäureresten phosphoryliert wird. Die am stärksten phosphorylierte Stelle S1177 wird durch Akt, PKA, PKG, AMPK und CaMKII phosphoryliert und ist besonders wichtig für die Aktivität des Enzyms (Mount et al., 2007).

Obwohl PKC und PKA KIF1B α an S1141 *in vitro* phosphorylierten (Abbildung 3.12), hatte die Hemmung dieser Kinasen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung an S1141 *in vivo* (Abbildung 3.14 und 3.15). AMPK phosphorylierte S1141 zwar *in vitro*, die Stimulation der AMPK mit verschiedenen Aktivatoren führte jedoch zu keiner verstärkten S1141-Phosphorylierung (Abbildung 3.16). Daher wurde die Phosphorylierung an S1141 in Zelllinien untersucht, denen entweder AMPK selbst fehlte oder in denen die übergeordnete LKB1 durch Mutation inaktiviert war (Abbildung 3.17). S1141 war in beiden Zelllinien stark phosphoryliert, was nahe legt, dass AMPK nicht für die Phosphorylierung verantwortlich ist und es sich eher um eine AMPK-verwandte Kinase handelt, die nicht der LKB1 untergeordnet ist. Bisher ist eine solche AMPK-verwandte Kinase bekannt: MELK (Bright et al., 2009; Lizcano et al., 2004). MELK wird in vielen Zelllinien exprimiert, darunter NIH3T3, HEK293 und Hela (Gray et al., 2005). Diese Kinase wird sowohl mit der Entstehung von Brustkrebs (Lin et al., 2007) als auch von Gehirntumoren (Nakano et al., 2008) in Verbindung gebracht. MELK ist bei physiologischen intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen gehemmt, während die Kinase durch hohe Ca²⁺-Konzentrationen aktiviert wird (Beullens et al., 2005). Somit könnte MELK am verstärkten Mitochondrientransport in Bereiche mit hoher Ca²⁺-Konzentration beteiligt sein bzw. den Mitochondrientransport anregen, sobald die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration steigt.

KIF1B α wurde somit durch Mitglieder der AGC-Kinasefamilie und möglicherweise durch eine AMPK-verwandte Kinase phosphoryliert. Verschiedene Proteine, die in die Regulation des Metabolismus involviert sind, werden durch Mitglieder der AGC- und CAMK-Familien reguliert. Der TSC-Komplex (Tuberous Sclerosis Complex) wird durch Akt und AMPK reguliert. TSC2 (Tuberin) wird durch Akt an S939 und S981 phosphoryliert, wodurch es an 14-3-3 gebunden wird, von der Plasmamembran dissoziiert und seine Rheb hemmende Funktion verliert (Cai et al., 2006). AMPK hingegen phosphoryliert TSC2 an T1227 und S1345, wodurch der Komplex aktiviert wird und Rheb hemmt (Inoki et al., 2003). Rheb reguliert mTor (mammalian target of rapamycin) und führt so zur Aktivierung der S6K und Hemmung von 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1). Die Signale, die von diesen beiden Kinasen ausgehen, regulieren die Proteinsynthese und nehmen dadurch an der Regulation der Proliferation teil (Inoki et al., 2002; Inoki et al., 2003). AS160 (Akt-Substrat mit einem Molekulargewicht von 160 kDa), das in die GLUT4-Translokation involviert ist, wird durch Akt, PKC und AMPK phosphoryliert (Thong et al., 2007). Im unphosphorylierten Zustand hemmt AS160 Rab, dass an der GLUT4-Translokation beteiligt

ist. Die hier aufgeführten Proteine sind Konvergenzpunkte für die verschiedenen Signalwege. Da die Phosphorylierung beider Bindungsstellen wichtig für eine stabile 14-3-3-Bindung an KIF1B α ist, besteht die Möglichkeit, dass auch KIF1B α einen solchen Konvergenzpunkt darstellt.

Viele Signalwege sind miteinander verknüpft, so dass sich die Kinasen gegenseitig regulieren können. Durch Kovacic et al. wurde gezeigt, dass die Akt-Aktivierung durch Insulin zu einer Hemmung der AMPK im Herzen führt (Kovacic et al., 2003). Da jedoch die Phosphorylierung beider 14-3-3-Bindungsstellen essenziell für eine stabile Bindung an KIF1B α ist und die Phosphorylierung durch AMPK nicht nachgewiesen werden konnte, könnte eine AMPK-verwandte Kinase, die nicht durch Akt gehemmt wird, für die Phosphorylierung an S1141 verantwortlich sein. Inwiefern MELK durch Akt reguliert wird, ist bisher nicht bekannt, allerdings wird ARK5, eine weitere Kinase der CAMK-Familie, die eine hohe Homologie zu AMPK- α 1 und AMPK- α 2 bzw. MELK aufweist, durch Akt aktiviert (Suzuki et al., 2003). Eine der zahlreichen Autophosphorylierungsstellen (S336), die MELK aufweist (Beullens et al., 2005), ist eine potentielle Akt-Phosphorylierungsstelle, und somit könnte MELK ein Akt-Substrat sein.

4.4 Die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α hat keine Bedeutung für dessen Dimerisierung oder Motilität

KIF1B α wurde bislang als monomeres Motorprotein beschrieben (Hirokawa et al., 2009). Da mehrere Mitglieder der selben Kinesin-Familie inzwischen als Dimere beschrieben wurden (Dorner et al., 1999; Tomishige et al., 2002), wurde in dieser Arbeit die Dimerisierung von KIF1B α untersucht. Da KIF1B α durch eine Deletionsmutante, deren Motordomäne fehlte, co-immunpräzipitiert wurde (Abbildung 3.8), kann davon ausgegangen werden, dass KIF1B α *in vivo* dimerisieren kann. In vielen Studien wurde gezeigt, dass dimere Kinesine effektiver sind als monomere (Hancock und Howard, 1998). Es gibt zwar Modelle, welche die Bewegung monomerer Kinesine entlang des Zytoskeletts beschreiben (Okada und Hirokawa, 1999), allerdings konnte für KIF1A gezeigt werden, dass das Motorprotein erst durch Dimerisierung die *in vivo* Geschwindigkeit erreichen kann (Tomishige et al., 2002).

Für die Motorproteine KIF1A, KIF1B α und KIF1C wurden durch ein Computerprogramm erstellte Prognosen für potentielle Dimerisierungsdomänen (Coiled-Coil-Domänen) veröffent-

licht (Dorner et al., 1999; Lee et al., 2004). Die durch das Programm identifizierten Coiled-Coil-Domänen sind in den drei Motorproteinen relativ kurz verglichen mit den Coiled-Coil-Domänen der schweren Kette des konventionellen Kinesins. Nichtsdestotrotz konnte die Dimerisierung für KIF1A, KIF1C und hier für KIF1B α nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der KIF1A-Dimerisierung zeigte, dass diese durch intramolekulare Interaktionen zwischen der FHA-Domäne und der C-terminal gelegenen Coiled-Coil-Domäne gehemmt wird. Die Interaktion konnte durch Deletion einer der beteiligten Domänen verhindert werden, wodurch sich die Mikrotubulibindung und die Dimerisierungsrate des Motorproteins erhöhte und KIF1A in der Peripherie akkumulierte (Lee et al., 2004). Im Gegensatz zu Wildtyp KIF1A akkumulieren überexprimiertes Wildtyp KIF1C und KIF1B α in der Peripherie, wie durch Dorner et al. (1998) und diese Arbeit gezeigt werden konnte. Für KIF1C konnte keine intermolekulare Interaktion zwischen der FHA-Domäne und dem gesamten Protein gezeigt werden, wodurch eine intramolekulare Interaktion zwischen FHA-Domäne und Coiled-Coil-Domäne unwahrscheinlich ist (Dorn, persönliche Mitteilung). Da gezeigt wurde, dass Wildtyp KIF1A bei hohen Konzentrationen dimerisierte (Tomishige et al., 2002), schlugen Lee et al. ein Modell vor, wonach die Affinität zwischen FHA-Domäne und Coiled-Coil-Domäne höher ist als zwischen den Coiled-Coil-Domänen zweier KIF1A-Moleküle. Demnach würde die Interaktion zwischen FHA-Domäne und Coiled-Coil-Domäne durch eine erhöhte KIF1A-Konzentration geschwächt werden und es zur Zusammenlagerung der Coiled-Coil-Domänen und damit zur Dimerisierung von KIF1A kommen (Lee et al., 2004). Diese erhöhte KIF1A-Konzentration könnte durch Bindung an die Fracht erreicht werden. Da eine intramolekulare Interaktion in KIF1C unwahrscheinlich ist, scheinen die Coiled-Coil-Domänen in diesem Motorprotein höhere Affinitäten zu den Coiled-Coil-Domänen eines weiteren KIF1C-Moleküls aufzuweisen, als zu der intramolekularen FHA-Domäne. Dies würde bedeuten, dass sich die Regulation der Dimerisierung von KIF1A und KIF1C grundlegend unterscheidet. Da KIF1B α eine hohe Homologie zu KIF1C aufweist, ebenfalls dimerisierte und in der Peripherie akkumulierte, ist davon auszugehen, dass die Dimerisierung beider Motorproteine ähnlich reguliert wird und KIF1B α ebenfalls keine intramolekularen Interaktionen aufweist.

Zellen, die entweder Wildtyp KIF1B α oder dessen 14-3-3-bindungsdefekte Mutante transient überexprimierten, zeigten eine erhöhtes Aufkommen des Proteins in den Enden der Fortsätze. N-Kinesine wie KIF1B α bewegen sich anterograd entlang des Mikrotubulinetzwerkes in

Richtung Plasmamembran fort und werden durch einen bisher unbekanntem Mechanismus zurück transportiert. Da sowohl Wildtyp als auch mutiertes KIF1B α in den Enden der Fortsätze akkumulierten, kann davon ausgegangen werden, dass die 14-3-3-Proteinbindung keinen starken Einfluss auf die Motilität von KIF1B α hat. Im Gegensatz dazu führte die Bindung von KBP, einem weiteren Bindungspartner von KIF1B α , der im C-terminalen Bereich der Motordomäne bindet, zu einer erhöhten *in vitro* Motilität. Durch Überexpression einer KBP-Mutante, die KIF1B α nicht bindet, wurde hingegen die Laufdistanz von KIF1B α drastisch gesenkt (Wozniak et al., 2005).

4.5 KIF1B α -Knockdown reduziert die Zellgröße und hemmt den Mitochondrientransport

Der Nachweis der KIF1B α -Beteiligung am Mitochondrientransport in NIH3T3-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit durch shRNA-induzierten Knockdown erbracht. Die reduzierte KIF1B α -Expression führte in NIH3T3-Zellen zur perinukleären Akkumulation der Mitochondrien (Abbildung 3.19). Ein weiterer Effekt des Knockdowns war die Reduktion der Zellgröße. Den perinukleären Ring aus Mitochondrien umschloss lediglich ein schmaler Streifen mitochondrienfreies Zytoplasma, wobei die Zellen vereinzelte Fortsätze aufwiesen, die ebenfalls keine Mitochondrien beinhalteten. Durch Tanaka et al. wurde nachgewiesen, dass der Knockdown des zweiten Mitochondrien transportierenden Kinesins KIF5B ebenfalls zur perinukleären Akkumulation der Mitochondrien führte, allerdings zu keiner Änderung der Zellgröße oder Mikrotubuliorganisation bzw. -stabilität (1998). Da der KIF1B α -Knockdown einen starken Einfluss auf die Zellgröße hatte, sollte das Zytoskelett untersucht werden. Hierfür wurde in Zellen, in denen die KIF1B α -Expression herab reguliert wurde, α -Tubulin angefärbt. Es konnten jedoch keine filamentösen Strukturen nachgewiesen werden, da die Zellen sehr klein waren und eine starke wenn auch einheitliche Färbung der gesamten Zelle aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen filamentöser Strukturen könnte ein Zeichen für die Störung des Zytoskeletts sein.

Durch Injektion eines für die Kinesin-Motordomäne spezifischen Antikörpers in humane Fibroblasten zeigten Rodionov et al., dass Kinesine wichtig für die Zellform sind, da die Injektion zu einer runderen Zellform mit kürzeren Fortsätzen führte (1993). In späteren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass durch Injektion dieser Antikörper auch die fokalen

Adhäsionen gestört wurde, die wichtig für das Absetzen und Verankern von Zellen auf einer Oberfläche sind (Kaverina et al., 1997). Der gegen die Motordomäne in *Drosophila melanogaster* gerichtete Antikörper hemmte mit großer Wahrscheinlichkeit viele Kinesine, da deren Motordomänen stark homolog sind. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass KIF1B α eines der Kinesine sein könnte, die für die Zellform und die Ausbildung von Fortsätzen wichtig ist.

4.6 Eine katalytisch inaktive KIF1B α -Mutante destabilisiert das Zytoskelett

Eine überexprimierte katalytisch inaktive KIF1B α -Mutante (K103A) co-lokalisierte in allen transfizierten Zellen mit einer filamentösen Struktur, die starke Ähnlichkeit zum Mikrotubulinetzwerk aufwies (Abbildung 3.21). Eine Überlagerung der Farbkanäle zeigte jedoch, dass KIF1B α -K103A nicht überall mit den Mikrotubuli assoziierte, sondern verstärkt in der Nähe des Zellkerns vorlag, während periphere Bereiche des Mikrotubulinetzwerks kaum KIF1B α -Assoziation aufwiesen (Abbildung 3.22). KIF1B α -K103A könnte somit an ein weiteres Netzwerk des Zytoskeletts gebunden haben. Dies könnte das Intermediärfilament sein, das verstärkt perinukleär und in räumlicher Nähe der Mikrotubuli vorliegt. KIF1B α könnte ein Linkerprotein zwischen dem Mikrotubulinetzwerk und dem Intermediärfilament sein. Prahlad et al. wiesen eine Rolle des konventionellen Kinesins beim Aufbau des Vimentinnetzwerks nach (1998). Möglicherweise binden beide Motorproteine, KIF1B α und KIF5, das Intermediärfilament und teilen damit eine weitere Funktion. Mit verschiedenen käuflichen Vimentin-Antikörper wurde in den KIF1B α -K103A überexprimierenden NIH3T3-Zellen versucht das Intermediärfilament anzufärben. Allerdings konnte mit diesen Antikörpern keine filamentöse Struktur nachgewiesen werden, denn die Zellen wiesen eine unspezifische Färbung der gesamten Zelle auf.

Die KIF1B α -K103A überexprimierenden Zellen waren kleiner als Wildtyp überexprimierende Zellen, und die veränderte Organisation der Mikrotubuli wies auf eine Destabilisierung hin (Abbildung 3.21 und 3.22). So waren die Mikrotubuli nicht zur Plasmamembran hin ausgerichtet und zeigten gewellte Strukturen. Ähnliche veränderte Mikrotubulistrukturen wurden in Zellen gezeigt, in denen EB3 (microtubule plus end-binding protein), das die (+)-Enden der Mikrotubuli stabilisiert, herabreguliert wurden (Straube und Merdes, 2007). Auch diese Zellen waren in ihrer Ausdehnung gehemmt und kleiner als Kontrollzellen. KIF1B α -

K103A bewegt sich im Gegensatz zu Wildtyp KIF1B α nicht bis in die Fortsätze und damit nicht bis zu den (+)-Enden der Mikrotubuli fort. Möglicherweise stabilisiert KIF1B α selbst die Mikrotubuli bzw. transportiert ein die Mikrotubuli stabilisierendes Protein zu den (+)-Enden.

Die Überexpression der katalytisch inaktiven KIF1B α -Mutante hatte interessanterweise keinen Einfluss auf die Mitochondrienverteilung (Abbildung 3.23), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Überexpression der Mutante das endogene KIF1B α nicht hemmte.

4.7 Die 14-3-3-Dimerisierung spielt eine Rolle bei der Zellform, der Mikrotubulistabilität und der Verteilung der Mitochondrien

Die Überexpression der dimerisierungsgestörten 14-3-3 γ Mutante führte zur perinukleären Akkumulation der Mitochondrien, kürzeren und abgerundeten Fortsätze und einem gestörten Mikrotubulinetzwerk (Abbildung 3.24 und 3.25). Dimerisierungsgestörtes 14-3-3 könnte mit endogenem 14-3-3 um die Bindung an verschiedene Substrate konkurrieren, denn wie durch Woodcock et al. gezeigt wurde, ist die Bindungseffizienz monomerer 14-3-3-Proteine an Peptide im Vergleich zu dimeren 14-3-3-Molekülen nicht reduziert (2003). Allerdings gehen viele Proteine keine stabile Bindung mit monomeren 14-3-3-Proteinen ein, darunter Vimentin (Tzivion und Avruch, 2002), das als Teil des Zytoskeletts ebenfalls eine wichtige Rolle für die Zellform spielt. KLC2, das die Frachtbindung an KIF5B vermittelt, besitzt ebenfalls mehrere potentielle 14-3-3-Bindungsstellen (Ichimura et al., 2002), wobei nicht bekannt ist, ob es eine stabile Bindung mit monomeren 14-3-3-Proteinen eingehen kann. Daher können die beobachteten Effekte nicht alleine auf die möglicherweise gestörte Funktion von KIF1B α zurückgeführt werden. Nichtsdestotrotz ist die 14-3-3-Dimerisierung in die Regulation der Zellform, die Stabilität des Mikrotubulinetzwerks und die Mitochondrienverteilung involviert.

4.8 Die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α ist besonders während des Zellsreadings von Bedeutung

Da der Knockdown und die Überexpression der katalytisch inaktiven KIF1B α -Mutante zeigten, dass KIF1B α eine Rolle bei der Zellgröße und bei der Stabilisierung des Zytoskeletts spielen könnte, wurde in einem Spreading-Assay die Fähigkeit KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierender Zellen zur Reorganisation des Zytoskeletts und der Organellen untersucht.

4.8.1 KIF1B α stabilisiert das Zytoskelett in sich ausbreitenden Zellen

Eine hohe Anzahl der die KIF1B α -S1053A,S1141A Mutante überexprimierenden Zellen zeigten im Spreading-Assay ein gestörtes Mikrotubulinetzwerk mit meist in der Zellperipherie gewellten Mikrotubuli (Abbildung 3.28). Diese Zellen hatten jedoch normale Zentrosomen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Störung der Mikrotubulistabilität von den (+)-Enden ausging (Abbildung 3.29).

In vielen Organismen wurde nachgewiesen, dass Kinesine direkt an der Stabilität des Zytoskeletts beteiligt sind. In dem filamentösen Schlauchpilz *Aspergillus nidulans* wirken unter anderem die Kinesine KipA und KipB an der Stabilisierung der Mikrotubuli und dem Auswachsen der Hyphen mit (Konzack et al., 2005; Rischitor et al., 2004). Die Mitglieder der Kinesin-13-Familie, KIF2A, KIF2B und KIF2C, spielen eine Rolle bei der Mitose und depolymerisieren Mikrotubuli (Wordeman, 2005). Die 14-3-3-Bindung hatte allerdings keinen Einfluss auf die KIF1B α -Motilität und somit auch nicht auf die Mikrotubulibindung (Abbildung 3.26 bis 3.29). Da sich also auch KIF1B α , das 14-3-3 nicht binden konnte, bis in die Enden der Fortsätze fortbewegte, besteht die Möglichkeit, dass KIF1B α ein Protein transportieren könnte, das die (+)-Enden der Mikrotubuli stabilisiert und dessen Bindung an KIF1B α von der 14-3-3-Bindung abhängig ist. Durch die 14-3-3-Bindung könnte z.B. eine Domäne exponiert werden, an die andere Proteine binden könnten. Eine Möglichkeit könnte die C-terminale PDZ-Domänen bindende Domäne sein. Ein Mikrotubuli stabilisierendes Protein, das womöglich durch KIF1B α transportiert wird und eine PDZ-Domäne enthält, ist Dishevelled-1 (Krylova et al., 2000). Miller et al. untersuchten den intrazellulären Transport und die Lokalisation von Dishevelled in befruchteten *Xenopus* Eiern (1999). Dieses Protein assoziierte mit Vesikeln, die anterograd und mit für Kinesine typischer Geschwindigkeit

transportiert wurden. Da es selbst keine Motordomäne besitzt, schlugen die Autoren einen durch Kinesine vermittelten Transport vor. Dishevelled hemmt GSK3 β , wodurch die APC-Phosphorylierung (Adenomatous Polyposis Coli Protein), die die Bindung an Mikrotubuli verhindert, gesenkt wird. APC bindet an die (+)-Enden der Mikrotubuli und stabilisiert sie (Zumbrunn et al., 2001). Interessanterweise wird APC durch die Kinesine KIF3A und KIF3B an die (+)-Enden der Mikrotubuli transportiert (Jimbo et al., 2002). KIF1B α könnte somit über Dishevelled-1 und APC oder einen ähnlichen Mechanismus an der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt sein.

4.8.2 KIF1B α ist bei sich ausbreitenden Zellen an der Ausbildung der Zellform beteiligt

Im Spreading-Assay mit NIH3T3-Zellen, die KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierten, wurde deutlich, dass die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α auch wichtig für die Ausbildung der neuen Zellform in sich ausbreitenden Zellen ist (Abbildung 3.26 bis 3.29). Im Gegensatz zu Wildtyp KIF1B α überexprimierenden Zellen, die lange Fortsätze ausbildeten und gestreckt vorlagen, wiesen die KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierenden Zellen eine insgesamt rundere Form auf mit wenigen Fortsätzen, deren Enden oft abgerundet waren. Die Überexpression des Wildtyp bzw. mutierten KIF1B α in NIH3T3-Zellen, die bereits fest an einer Oberfläche angewachsen waren, hatte hingegen keinen Effekt auf die Zellform (Abbildung 3.20). Der wichtige Unterschied zwischen den Versuchen liegt darin, dass die Zellen im letzteren Versuch bereits abgesetzt und ausgebreitet waren, bevor sie mit Wildtyp bzw. KIF1B α -S1053A,S1141A transfiziert wurden. Die Zellen im Spreading-Assay hingegen exprimierten bereits Wildtyp bzw. KIF1B α -S1053A,S1141A, als sie trypsinisiert und erneut ausgesät wurden. Des Weiteren wurden die Zellen im Spreading-Assay 24 h nach der erneuten Aussaat fixiert, während die Zellen aus dem zweiten Versuch ca. 48 h nach der Transfektion bzw. 72 h nach der Aussaat fixiert wurden, da den Zellen Zeit zur Erholung von der Transfektion gegeben wurde. Es gibt die Möglichkeit, dass die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α besonders während des Zellsreadings von Bedeutung ist, da während dieses Prozesses sehr viele Organellen und Proteinkomplexe relokalisiert werden müssen.

Andererseits führte der KIF1B α -Knockdown in bereits abgesetzten Zellen zu einer starken Reduktion der Zellgröße (Abbildung 3.19), so dass davon ausgegangen werden kann, dass

KIF1B α selbst nicht nur während der Zellsreadings von Bedeutung ist, sondern auch im ausgebreiteten Zustand wichtig für die Zellgröße ist.

Lyons et al. wiesen kürzlich nach, dass KIF1B β für das Auswachsen von Axonen in Zebrafisch wichtig ist, nicht jedoch KIF1B α (2009). Angesichts dessen, dass KIF1B β hauptsächlich in Nervengewebe exprimiert ist und KIF1B α verstärkt im Herzen und der Skelettmuskulatur vorkommt, ergibt sich die Möglichkeit, dass KIF1B α an der Entwicklung von Muskeln beteiligt ist oder beim Einwandern von Satellitenzellen zur Reparatur von Verletzungen eine Rolle spielt. *kif1b*-Knockout Mäuse waren kleiner als Wildtyp Mäuse und wiesen starke Entwicklungsstörungen auf, die nicht nur das Gehirn und das Nervensystem betrafen. Diese Effekte wurden durch Zhao et al. auf den Verlust von KIF1B β zurückgeführt. Da KIF1B α jedoch eine erhebliche Rolle bei der Morphologie der Zellen spielt, könnte der Verlust von KIF1B α die Entwicklung von Muskeln und anderen Organen verlangsamt oder gestört haben. Des Weiteren entwickelten heterozygote Mäuse eine Muskelschwäche, die ebenfalls durch das Fehlen von KIF1B α erklärt werden könnte (Zhao et al., 2001).

KIF1B α wurde durch Massenspektrometrie auf Phosphorylierungsstellen untersucht (Daten nicht gezeigt). Neben S1053 und S1141 wurden weitere potentielle Phosphorylierungsstellen gefunden, von denen sich zwei zwischen den beiden 14-3-3-Bindungsstellen an S1067 und T1132 befanden. In einer ScanSite-Analyse erwies sich S1067 als eine potentielle PKC δ Phosphorylierungsstelle und T1132 als eine potentielle Cdk5 bzw. mit geringer Wahrscheinlichkeit Cdc2 Phosphorylierungsstelle. Diese Phosphorylierungsstellen könnten durch die 14-3-3-Bindung entweder exponiert oder verborgen werden. Interessanterweise spielen sowohl PKCs als auch Cdk5 eine Rolle bei der Zelladhäsion und dem Zellspeading (Goel und Dey, 2002; Negash et al., 2002). Die Hemmung des Zellsreadings in KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierenden Zellen könnte auf der Störung der Mikrotubulistabilität beruhen. Straube et al. wiesen nach, dass die Stabilisierung der Mikrotubuli-(+)-Enden zum Spreading der Zellen beiträgt. EB3-Knockdown-Zellen waren in ihrer Ausbreitung gehemmt und wiesen kürzere Fortsätze auf als Wildtyp Zellen (Straube und Merdes, 2007).

4.8.3 Die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α ist am Mitochondrientransport beteiligt

Im Spreading-Assay wiesen die Mitochondrien in den KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierenden Zellen eine perinukleäre Verteilung auf, während die Wildtyp überexpri-

mierenden Zellen eine normale Verteilung der Mitochondrien aufwiesen bzw. eine verstärkt periphere Verteilung (Abbildung 3.27). Zellen, die mutiertes KIF1B α überexprimierten, waren kleiner als Wildtyp überexprimierende Zellen, und die Mitochondrien wurden von einem schmalen Streifen mitochondrienfreiem Zytoplasma umgeben. Zellen, in denen KIF1B α herunter reguliert wurde, wiesen eine ähnliche Verteilung der Mitochondrien auf (Abbildung 3.19). Somit zeigt sich, dass die 14-3-3-Proteinbindung an KIF1B α besonders während der Neuorganisation der Mitochondrien von Bedeutung ist, KIF1B α selbst jedoch auch in bereits abgesetzten Zellen wichtig für die Lokalisation der Mitochondrien ist. Zusätzlich wird deutlich, dass überexprimiertes KIF1B α zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen dem anterograden Transport und dem durch Dynein vermittelten retrograden Transport der Mitochondrien führt und diese verstärkt in die Fortsätze transportiert werden. Ein ähnlicher Effekt wurde in Zellen beobachtet, die mit dem Dynein-Inhibitor EHNA (Erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)adenin) behandelt wurden. EHNA inhibiert selektiv den retrograden Transport und beeinflusst kaum den anterograden (Forman et al., 1983). Die perinukleäre Mitochondrienmenge nahm ab und die Mitochondrien wurden verstärkt in die Peripherie der Zellen transportiert (Daten nicht gezeigt). Die perinukleäre Verteilung der Mitochondrien durch mutiertes KIF1B α könnte auch als sekundärer Effekt gedeutet werden, da die Zellgröße durch die gestörte Zytoskelettstabilität stark reduziert war. Dagegen spricht allerdings, dass die Mitochondrien auch in sehr kleinen Zellen nicht über das ganze Zytosol verteilt vorlagen, sondern einen engen Ring um den Zellkern bildeten. Zusätzlich förderte die Wildtyp KIF1B α -Überexpression den anterograden Transport der Mitochondrien stark, wodurch die Funktion der 14-3-3-Bindung an KIF1B α für den Mitochondrientransport untermauert wird. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die 14-3-3-Bindung an KIF1B α eine Rolle beim Transport der Mitochondrien spielt und an der Frachtbindung beteiligt sein könnte.

14-3-3-Proteine sind möglicherweise auch in den KIF5B vermittelten Mitochondrientransport involviert. Humanes KLC2, das an KIF5B bindet und am Mitochondrientransport beteiligt ist (Khodjakov et al., 1998), besitzt drei potentielle 14-3-3-Bindungsstellen am C-terminalen Ende des Proteins. Jede der drei Bindungsstellen ist auch eine potentielle Akt-Phosphorylierungsstelle, und die Stelle mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für eine 14-3-3-Bindung (S575) könnte zusätzlich durch PKC, PKA und AMPK phosphoryliert werden. Durch Ichimura et al. wurde die 14-3-3-Bindung an S575 nachgewiesen (2002). Takazawa

et al. zeigten, dass die Aktivierung der PKA die 14-3-3-Bindung an KLC2 steigert. Eine Stimulation von Akt und AMPK führte jedoch zu keiner verstärkten 14-3-3-Bindung in dieser Studie (2008). Die Phosphorylierung des KLC2-C-Terminus durch GSK3 führte zur Hemmung des anterograden Transports durch Dissoziation des Motorproteins von der Fracht (Morfini et al., 2002), und eine durch TNF induzierte Hyperphosphorylierung von KLC2 durch TNF hemmte den anterograden Mitochondrientransport (De Vos et al., 2000). Allerdings wurde die 14-3-3-Bindung in diesen Studien nicht untersucht. Obwohl für die Frachtbindung an KLC2 die Tetratricopeptid-Domäne in der Mitte des Proteins entscheidend ist (Adio et al., 2006), wird angenommen, dass der C-Terminus die Bindung spezifischer Frachten reguliert (Wozniak und Allan, 2006). Ein direkter Zusammenhang zwischen der 14-3-3-Bindung an KLC2 und dem Mitochondrientransport wurde jedoch noch nicht nachgewiesen.

Das Vorhandensein von Phosphorylierungsstellen für Akt und AMPK in Motorproteinen deutet darauf hin, dass die Regulation der Motorproteine durch Signalwege erfolgt, die auch den Metabolismus regulieren. Zusätzlich spielt die 14-3-3-Bindung eine wichtige Rolle beim durch Motorproteine vermittelten Transport von Mitochondrien. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kann der Mitochondrientransport durch Stimulation verschiedener Signalwege beeinflusst werden. Allerdings ist der molekulare Mechanismus oft nicht bekannt. KIF1B α könnte einer der Konvergenzpunkte sein, an dem verschiedene Signale zusammenlaufen und der über die 14-3-3-Proteinbindung den Mitochondrientransport, die Mikrotubulistabilität und die Regulation der Zellform regelt.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Motorprotein KIF1B α . KIF1B α ist stark homolog zu dem Motorprotein KIF1C, das als 14-3-3-Bindungspartner beschrieben wurde. Da KIF1B α eine zu der 14-3-3-Bindungsstelle in KIF1C homologe Aminosäuresequenz aufwies, wurde KIF1B α auf eine mögliche 14-3-3-Proteinbindung hin untersucht. Des Weiteren wurde die Regulation der 14-3-3-Bindung und deren physiologische Bedeutung für die KIF1B α -Funktionalität untersucht.

In KIF1B α wurden zwei 14-3-3-Bindungsstellen identifiziert: S1053 und S1141. Durch Mutation der einzelnen Bindungsstellen konnte die Bindung geschwächt werden, aber erst durch die Mutation beider Bindungsstellen wurde die Bindung vollständig unterbunden. S1053 wird von drei verschiedenen Kinasen der AGC-Familie phosphoryliert: Akt, PKA und PKC. Die zweite und zu KIF1C homologe Bindungsstelle wird möglicherweise durch eine AMPK-verwandte Kinase phosphoryliert. AMPK phosphorylierte KIF1B α zwar *in vitro*, AMPK selbst konnte jedoch ausgeschlossen werden, da KIF1B α in Zellen, die kein AMPK exprimierten bzw. denen die übergeordnete Kinase LKB1 fehlte, phosphoryliert vorlag. Somit kommt nur eine AMPK-verwandte Kinase in Frage.

KIF1B α kann, entgegen bisheriger Berichte, als Dimer in den Zellen vorliegen, die 14-3-3-Bindung spielt jedoch keine Rolle bei der Dimerisierung oder der Motilität. Die Bedeutung der 14-3-3-Bindung an KIF1B α zeigt sich in resuspendierten und sich neu ausbreitenden Zellen. Zellen, die eine 14-3-3-bindungsdefiziente KIF1B α -Mutante exprimieren, sind in ihrer Fähigkeit, sich nach dem Absetzen auszubreiten und Fortsätze auszubilden, gehemmt. Des Weiteren wird die Relokalisation der Mitochondrien gehemmt, die in den KIF1B α -S1053A,S1141A überexprimierenden Zellen perinukleär angeordnet sind. Zusätzlich weisen diese Zellen eine veränderte Struktur der Mikrotubuli auf. Da die Zentrosomen intakt waren, kann davon ausgegangen werden, dass die Destabilisierung von den (+)-Enden der Mikrotubuli ausgeht.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit gezeigt, dass KIF1B α nicht nur am mitochondrialen Transport beteiligt ist, sondern auch für die Stabilität des Zytoskeletts und die Zellform von Bedeutung ist.

6 Literaturverzeichnis

Adio, S., Reth, J., Bathe, F., and Woehlke, G. (2006). Review: regulation mechanisms of Kinesin-1. *J Muscle Res Cell Motil* 27, 153-160.

Agarwal-Mawal, A., Qureshi, H.Y., Cafferty, P.W., Yuan, Z., Han, D., Lin, R., and Paudel, H.K. (2003). 14-3-3 connects glycogen synthase kinase-3 beta to tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex. *J Biol Chem* 278, 12722-12728.

Ajjappala, B.S., Kim, Y.S., Kim, M.S., Lee, M.Y., Lee, K.Y., Ki, H.Y., Cha, D.H., and Baek, K.H. (2009). 14-3-3 gamma is stimulated by IL-3 and promotes cell proliferation. *J Immunol* 182, 1050-1060.

Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., and Cohen, P. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 399, 333-338.

Asbury, C.L. (2005). Kinesin: world's tiniest biped. *Curr Opin Cell Biol* 17, 89-97.

Avsiuk, A.V., Minin, A.A., and Gioeva, F.K. (1995). [Kinesin, associated with intermediate vimentin filaments, contains a specific light chain]. *Dokl Akad Nauk* 345, 119-122.

Bao, G., and Suresh, S. (2003). Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nat Mater* 2, 715-725.

Bereiter-Hahn, J., and Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27, 198-219.

Beullens, M., Vancauwenbergh, S., Morrice, N., Derua, R., Ceulemans, H., Waelkens, E., and Bollen, M. (2005). Substrate specificity and activity regulation of protein kinase MELK. *J Biol Chem* 280, 40003-40011.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

- Blangy, A., Lane, H.A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., and Nigg, E.A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83, 1159-1169.
- Blocker, A., Severin, F.F., Burkhardt, J.K., Bingham, J.B., Yu, H., Olivo, J.C., Schroer, T.A., Hyman, A.A., and Griffiths, G. (1997). Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *J Cell Biol* 137, 113-129.
- Bornens, M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 14, 25-34.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bridges, D., and Moorhead, G.B. (2004). 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* 2004, re10.
- Bright, N.J., Thornton, C., and Carling, D. (2009). The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases. *Acta Physiol (Oxf)* 196, 15-26.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Bunn, R.C., Jensen, M.A., and Reed, B.C. (1999). Protein interactions with the glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provide a link between GLUT1 and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 10, 819-832.
- Bunney, T.D., van Walraven, H.S., and de Boer, A.H. (2001). 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4249-4254.
- Cai, S.L., Tee, A.R., Short, J.D., Bergeron, J.M., Kim, J., Shen, J., Guo, R., Johnson, C.L., Kiguchi, K., and Walker, C.L. (2006). Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol* 173, 279-289.
- Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29, 18-24.
- Chada, S.R., and Hollenbeck, P.J. (2004). Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Curr Biol* 14, 1272-1276.

Chang, L., Barlan, K., Chou, Y.H., Grin, B., Lakonishok, M., Serpinskaya, A.S., Shumaker, D.K., Herrmann, H., Gelfand, V.I., and Goldman, R.D. (2009). The dynamic properties of intermediate filaments during organelle transport. *J Cell Sci* 122, 2914-2923.

Chang, L., and Goldman, R.D. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 601-613.

Chen, C., and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-2752.

Chen, Y.Y., Takita, J., Chen, Y.Z., Yang, H.W., Hanada, R., Yamamoto, K., and Hayashi, Y. (2003). Genomic structure and mutational analysis of the human KIF1B α gene located at 1p36.2 in neuroblastoma. *Int J Oncol* 23, 737-744.

Chung, C.T., and Miller, R.H. (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res* 16, 3580.

Clarke, E.J., and Allan, V. (2002). Intermediate filaments: vimentin moves in. *Curr Biol* 12, R596-598.

Coblitz, B., Wu, M., Shikano, S., and Li, M. (2006). C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins. *FEBS Lett* 580, 1531-1535.

Cohen, P., and Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 769-776.

Collins, T.J., and Bootman, M.D. (2003). Mitochondria are morphologically heterogeneous within cells. *J Exp Biol* 206, 1993-2000.

Conforti, L., Buckmaster, E.A., Tarlton, A., Brown, M.C., Lyon, M.F., Perry, V.H., and Coleman, M.P. (1999). The major brain isoform of kif1b lacks the putative mitochondria-binding domain. *Mamm Genome* 10, 617-622.

Corthesy-Theulaz, I., Pauloin, A., and Pfeffer, S.R. (1992). Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *J Cell Biol* 118, 1333-1345.

Cotelle, V., Meek, S.E., Provan, F., Milne, F.C., Morrice, N., and MacKintosh, C. (2000). 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *EMBO J* 19, 2869-2876.

Coy, D.L., Wagenbach, M., and Howard, J. (1999). Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes. *J Biol Chem* 274, 3667-3671.

De Vos, K., Severin, F., Van Herreweghe, F., Vancompernelle, K., Goossens, V., Hyman, A., and Grooten, J. (2000). Tumor necrosis factor induces hyperphosphorylation of kinesin light chain and inhibits kinesin-mediated transport of mitochondria. *J Cell Biol* 149, 1207-1214.

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

Dorner, C., Ciossek, T., Muller, S., Moller, P.H., Ullrich, A., and Lammers, R. (1998). Characterization of KIF1C, a new kinesin-like protein involved in vesicle transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273, 20267-20275.

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

Dougherty, M.K., and Morrison, D.K. (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* 117, 1875-1884.

Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9, 550-562.

Forman, D.S., Brown, K.J., and Promersberger, M.E. (1983). Selective inhibition of retrograde axonal transport by erythro-9-[3-(2-hydroxyonyl)]adenine. *Brain Res* 272, 194-197.

Franke, T.F. (2008). PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27, 6473-6488.

Gibbons, I.R., and Rowe, A.J. (1965). Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science* 149, 424-426.

Gill, S.R., Schroer, T.A., Szilak, I., Steuer, E.R., Sheetz, M.P., and Cleveland, D.W. (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* 115, 1639-1650.

Goel, H.L., and Dey, C.S. (2002). Role of protein kinase C during insulin mediated skeletal muscle cell spreading. *J Muscle Res Cell Motil* 23, 269-277.

- Gong, T.W., Winnicki, R.S., Kohrman, D.C., and Lomax, M.I. (1999). A novel mouse kinesin of the UNC-104/KIF1 subfamily encoded by the Kif1b gene. *Gene* 239, 117-127.
- Goransson, O., McBride, A., Hawley, S.A., Ross, F.A., Shpiro, N., Foretz, M., Viollet, B., Hardie, D.G., and Sakamoto, K. (2007). Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 282, 32549-32560.
- Gottlieb, E., Armour, S.M., and Thompson, C.B. (2002). Mitochondrial respiratory control is lost during growth factor deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12801-12806.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Gray, D., Jubb, A.M., Hogue, D., Dowd, P., Kljavin, N., Yi, S., Bai, W., Frantz, G., Zhang, Z., Koeppen, H., *et al.* (2005). Maternal embryonic leucine zipper kinase/murine protein serine-threonine kinase 38 is a promising therapeutic target for multiple cancers. *Cancer Res* 65, 9751-9761.
- Green, K.J., Talian, J.C., and Goldman, R.D. (1986). Relationship between intermediate filaments and microfilaments in cultured fibroblasts: evidence for common foci during cell spreading. *Cell Motil Cytoskeleton* 6, 406-418.
- Gross, S.P. (2003). Dynactin: coordinating motors with opposite inclinations. *Curr Biol* 13, R320-322.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30, 214-226.
- Gyoeva, F.K., Bybikova, E.M., and Minin, A.A. (2000). An isoform of kinesin light chain specific for the Golgi complex. *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 2047-2054.
- Hajdуч, E., Litherland, G.J., and Hundal, H.S. (2001). Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett* 492, 199-203.
- Hammond, J.W., Cai, D., Blasius, T.L., Li, Z., Jiang, Y., Jih, G.T., Meyhofer, E., and Verhey, K.J. (2009). Mammalian Kinesin-3 motors are dimeric in vivo and move by processive motility upon release of autoinhibition. *PLoS Biol* 7, e72.

- Hancock, W.O., and Howard, J. (1998). Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *J Cell Biol* *140*, 1395-1405.
- Hardie, D.G., and Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* *246*, 259-273.
- Helfand, B.T., Chang, L., and Goldman, R.D. (2003). The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu Rev Cell Dev Biol* *19*, 445-467.
- Helfand, B.T., Mikami, A., Vallee, R.B., and Goldman, R.D. (2002). A requirement for cytoplasmic dynein and dynactin in intermediate filament network assembly and organization. *J Cell Biol* *157*, 795-806.
- Hirokawa, N., and Noda, Y. (2008). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* *88*, 1089-1118.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 682-696.
- Hirokawa, N., and Takemura, R. (2004). Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res* *301*, 50-59.
- Hollenbeck, P.J. (1996). The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci* *1*, d91-102.
- Ichimura, T., Wakamiya-Tsuruta, A., Itagaki, C., Taoka, M., Hayano, T., Natsume, T., and Isobe, T. (2002). Phosphorylation-dependent interaction of kinesin light chain 2 and the 14-3-3 protein. *Biochemistry* *41*, 5566-5572.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* *4*, 648-657.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577-590.
- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A., and Todaro, G.J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* *4*, 549-553.

- Jimbo, T., Kawasaki, Y., Koyama, R., Sato, R., Takada, S., Haraguchi, K., and Akiyama, T. (2002). Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily. *Nat Cell Biol* 4, 323-327.
- Kaverina, I.N., Minin, A.A., Gyoeva, F.K., and Vasiliev, J.M. (1997). Kinesin-associated transport is involved in the regulation of cell adhesion. *Cell Biol Int* 21, 229-236.
- Khodjakov, A., Lizunova, E.M., Minin, A.A., Koonce, M.P., and Gyoeva, F.K. (1998). A specific light chain of kinesin associates with mitochondria in cultured cells. *Mol Biol Cell* 9, 333-343.
- Kikkawa, M. (2008). The role of microtubules in processive kinesin movement. *Trends Cell Biol* 18, 128-135.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., and Clapham, D.E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427, 360-364.
- Kobayashi, T., and Cohen, P. (1999). Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* 339 (Pt 2), 319-328.
- Konzack, S., Rischitor, P.E., Enke, C., and Fischer, R. (2005). The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 16, 497-506.
- Kovacic, S., Soltys, C.L., Barr, A.J., Shiojima, I., Walsh, K., and Dyck, J.R. (2003). Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem* 278, 39422-39427.
- Krylova, O., Messenger, M.J., and Salinas, P.C. (2000). Dishevelled-1 regulates microtubule stability: a new function mediated by glycogen synthase kinase-3beta. *J Cell Biol* 151, 83-94.
- Kural, C., Kim, H., Syed, S., Goshima, G., Gelfand, V.I., and Selvin, P.R. (2005). Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement? *Science* 308, 1469-1472.

Kurth-Kraczek, E.J., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., and Winder, W.W. (1999). 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 48, 1667-1671.

Laderoute, K.R., Amin, K., Calaoagan, J.M., Knapp, M., Le, T., Orduna, J., Foretz, M., and Viollet, B. (2006). 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol* 26, 5336-5347.

Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., *et al.* (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* 167, 19-22.

LeBron, C., Chen, L., Gilkes, D.M., and Chen, J. (2006). Regulation of MDMX nuclear import and degradation by Chk2 and 14-3-3. *EMBO J* 25, 1196-1206.

Lee, J.R., Shin, H., Choi, J., Ko, J., Kim, S., Lee, H.W., Kim, K., Rho, S.H., Lee, J.H., Song, H.E., *et al.* (2004). An intramolecular interaction between the FHA domain and a coiled coil negatively regulates the kinesin motor KIF1A. *EMBO J* 23, 1506-1515.

Lin, M.L., Park, J.H., Nishidate, T., Nakamura, Y., and Katagiri, T. (2007). Involvement of maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) in mammary carcinogenesis through interaction with Bcl-G, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *Breast Cancer Res* 9, R17.

Lizcano, J.M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Makela, T.P., Hardie, D.G., *et al.* (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J* 23, 833-843.

Lopez-Pajares, V., Kim, M.M., and Yuan, Z.M. (2008). Phosphorylation of MDMX mediated by Akt leads to stabilization and induces 14-3-3 binding. *J Biol Chem* 283, 13707-13713.

Los, M., Maddika, S., Erb, B., and Schulze-Osthoff, K. (2009). Switching Akt: from survival signaling to deadly response. *Bioessays* 31, 492-495.

Luo, J., Sobkiw, C.L., Hirshman, M.F., Logsdon, M.N., Li, T.Q., Goodyear, L.J., and Cantley, L.C. (2006). Loss of class IA PI3K signaling in muscle leads to impaired muscle growth, insulin response, and hyperlipidemia. *Cell Metab* 3, 355-366.

- Lyons, D.A., Naylor, S.G., Scholze, A., and Talbot, W.S. (2009). Kif1b is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons. *Nat Genet* 41, 854-858.
- Ma, S., and Chisholm, R.L. (2002). Cytoplasmic dynein-associated structures move bidirectionally in vivo. *J Cell Sci* 115, 1453-1460.
- McBride, A., Ghilagaber, S., Nikolaev, A., and Hardie, D.G. (2009). The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab* 9, 23-34.
- Megidish, T., Cooper, J., Zhang, L., Fu, H., and Hakomori, S. (1998). A novel sphingosine-dependent protein kinase (SDK1) specifically phosphorylates certain isoforms of 14-3-3 protein. *J Biol Chem* 273, 21834-21845.
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., and Hirokawa, N. (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7004-7011.
- Miller, J.R., Rowning, B.A., Larabell, C.A., Yang-Snyder, J.A., Bates, R.L., and Moon, R.T. (1999). Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *J Cell Biol* 146, 427-437.
- Miller, K.E., and Sheetz, M.P. (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci* 117, 2791-2804.
- Misra, P., and Chakrabarti, R. (2007). The role of AMP kinase in diabetes. *Indian J Med Res* 125, 389-398.
- Mitchison, T.J., and Cramer, L.P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84, 371-379.
- Mok, H., Shin, H., Kim, S., Lee, J.R., Yoon, J., and Kim, E. (2002). Association of the kinesin superfamily motor protein KIF1B α with postsynaptic density-95 (PSD-95), synapse-associated protein-97, and synaptic scaffolding molecule PSD-95/discs large/zona occludens-1 proteins. *J Neurosci* 22, 5253-5258.
- Moore, B.W., and Perez, V.J. (1967). Specific acidic proteins of the nervous system. *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*, Carlson FD (Ed), 343-359.

- Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N., and Brady, S.T. (2002). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J* 21, 281-293.
- Morris, R.L., and Hollenbeck, P.J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* 131, 1315-1326.
- Mount, P.F., Kemp, B.E., and Power, D.A. (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 42, 271-279.
- Murray, J.W., Bananis, E., and Wolkoff, A.W. (2000). Reconstitution of ATP-dependent movement of endocytic vesicles along microtubules in vitro: an oscillatory bidirectional process. *Mol Biol Cell* 11, 419-433.
- Nakano, I., Masterman-Smith, M., Saigusa, K., Paucar, A.A., Horvath, S., Shoemaker, L., Watanabe, M., Negro, A., Bajpai, R., Howes, A., *et al.* (2008). Maternal embryonic leucine zipper kinase is a key regulator of the proliferation of malignant brain tumors, including brain tumor stem cells. *J Neurosci Res* 86, 48-60.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H., and Hirokawa, N. (1994). KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 79, 1209-1220.
- Negash, S., Wang, H.S., Gao, C., Ledee, D., and Zelenka, P. (2002). Cdk5 regulates cell-matrix and cell-cell adhesion in lens epithelial cells. *J Cell Sci* 115, 2109-2117.
- Nekrasova, O.E., Kulik, A.V., and Minin, A.A. (2007). Protein kinase C regulates motility of mitochondria. *Biologicheskie Membrany* 24, 126-131.
- Nicholson, K.M., and Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14, 381-395.
- Nogueira, V., Park, Y., Chen, C.C., Xu, P.Z., Chen, M.L., Tonic, I., Unterman, T., and Hay, N. (2008). Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 14, 458-470.
- Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E., and Obsil, T. (2005). 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry* 44, 11608-11617.

- Okada, Y., and Hirokawa, N. (1999). A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science* 283, 1152-1157.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., and Conklin, D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948-958.
- Palsgaard, J., Brons, C., Friedrichsen, M., Dominguez, H., Jensen, M., Storgaard, H., Spohr, C., Torp-Pedersen, C., Borup, R., De Meyts, P., *et al.* (2009). Gene expression in skeletal muscle biopsies from people with type 2 diabetes and relatives: differential regulation of insulin signaling pathways. *PLoS One* 4, e6575.
- Pearson, R.B., and Kemp, B.E. (1991). Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* 200, 62-81.
- Prahlad, V., Yoon, M., Moir, R.D., Vale, R.D., and Goldman, R.D. (1998). Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. *J Cell Biol* 143, 159-170.
- Quintana, A., Schwarz, E.C., Schwindling, C., Lipp, P., Kaestner, L., and Hoth, M. (2006). Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane. *J Biol Chem* 281, 40302-40309.
- Rischitor, P.E., Konzack, S., and Fischer, R. (2004). The Kip3-like kinesin KipB moves along microtubules and determines spindle position during synchronized mitoses in *Aspergillus nidulans* hyphae. *Eukaryot Cell* 3, 632-645.
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J., and Yaffe, M.B. (1999). Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell* 4, 153-166.
- Rodionov, V.I., Gyoeva, F.K., Tanaka, E., Bershadsky, A.D., Vasiliev, J.M., and Gelfand, V.I. (1993). Microtubule-dependent control of cell shape and pseudopodial activity is inhibited by the antibody to kinesin motor domain. *J Cell Biol* 123, 1811-1820.
- Rushworth, L.K., Hindley, A.D., O'Neill, E., and Kolch, W. (2006). Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol* 26, 2262-2272.

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

Sakamoto, K., McCarthy, A., Smith, D., Green, K.A., Grahame Hardie, D., Ashworth, A., and Alessi, D.R. (2005). Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J* 24, 1810-1820.

Sapkota, G.P., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., Goodarzi, A.A., Smythe, C., Shiloh, Y., Lees-Miller, S.P., and Alessi, D.R. (2002). Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *Biochem J* 368, 507-516.

Sargeant, R.J., and Paquet, M.R. (1993). Effect of insulin on the rates of synthesis and degradation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 290 (Pt 3), 913-919.

Schnapp, B.J., and Reese, T.S. (1989). Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1548-1552.

Scholey, J.M., Porter, M.E., Grissom, P.M., and McIntosh, J.R. (1985). Identification of kinesin in sea urchin eggs, and evidence for its localization in the mitotic spindle. *Nature* 318, 483-486.

Shah, J.V., Flanagan, L.A., Janmey, P.A., and Leterrier, J.F. (2000). Bidirectional translocation of neurofilaments along microtubules mediated in part by dynein/dynactin. *Mol Biol Cell* 11, 3495-3508.

Sharp, D.J., McDonald, K.L., Brown, H.M., Matthies, H.J., Walczak, C., Vale, R.D., Mitchison, T.J., and Scholey, J.M. (1999). The bipolar kinesin, KLP61F, cross-links microtubules within interpolar microtubule bundles of *Drosophila* embryonic mitotic spindles. *J Cell Biol* 144, 125-138.

Sharp, D.J., Rogers, G.C., and Scholey, J.M. (2000). Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* 2, 922-930.

- Shen, Y.H., Godlewski, J., Bronisz, A., Zhu, J., Comb, M.J., Avruch, J., and Tzivion, G. (2003). Significance of 14-3-3 self-dimerization for phosphorylation-dependent target binding. *Mol Biol Cell* 14, 4721-4733.
- Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9, 59-71.
- Stapleton, D., Mitchelhill, K.I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B.J., Teh, T., House, C.M., Fernandez, C.S., Cox, T., Witters, L.A., *et al.* (1996). Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem* 271, 611-614.
- Straube, A., and Merdes, A. (2007). EB3 regulates microtubule dynamics at the cell cortex and is required for myoblast elongation and fusion. *Curr Biol* 17, 1318-1325.
- Suzuki, A., Kusakai, G., Kishimoto, A., Lu, J., Ogura, T., Lavin, M.F., and Esumi, H. (2003). Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein. *J Biol Chem* 278, 48-53.
- Takazawa, K., Noguchi, T., Hosooka, T., Yoshioka, T., Tobimatsu, K., and Kasuga, M. (2008). Insulin-induced GLUT4 movements in C2C12 myoblasts: evidence against a role of conventional kinesin motor proteins. *Kobe J Med Sci* 54, E14-22.
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A., and Hirokawa, N. (1998). Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* 93, 1147-1158.
- Taya, S., Shinoda, T., Tsuboi, D., Asaki, J., Nagai, K., Hikita, T., Kuroda, S., Kuroda, K., Shimizu, M., Hirotsune, S., *et al.* (2007). DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1. *J Neurosci* 27, 15-26.
- Thong, F.S., Bilan, P.J., and Klip, A. (2007). The Rab GTPase-activating protein AS160 integrates Akt, protein kinase C, and AMP-activated protein kinase signals regulating GLUT4 traffic. *Diabetes* 56, 414-423.
- Thornton, C., Snowden, M.A., and Carling, D. (1998). Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J Biol Chem* 273, 12443-12450.

- Tomishige, M., Klopfenstein, D.R., and Vale, R.D. (2002). Conversion of Unc104/KIF1A kinesin into a processive motor after dimerization. *Science* 297, 2263-2267.
- Tynan, S.H., Gee, M.A., and Vallee, R.B. (2000). Distinct but overlapping sites within the cytoplasmic dynein heavy chain for dimerization and for intermediate chain and light intermediate chain binding. *J Biol Chem* 275, 32769-32774.
- Tzivion, G., and Avruch, J. (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 277, 3061-3064.
- Tzivion, G., Luo, Z., and Avruch, J. (1998). A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* 394, 88-92.
- Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112, 467-480.
- Vale, R.D., Reese, T.S., and Sheetz, M.P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39-50.
- van Hemert, M.J., Steensma, H.Y., and van Heusden, G.P. (2001). 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 23, 936-946.
- Varadi, A., Johnson-Cadwell, L.I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V.J., and Rutter, G.A. (2004). Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci* 117, 4389-4400.
- Wacker, I., Kaether, C., Kromer, A., Migala, A., Almers, W., and Gerdes, H.H. (1997). Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J Cell Sci* 110 (Pt 13), 1453-1463.
- Wang, Q., Somwar, R., Bilan, P.J., Liu, Z., Jin, J., Woodgett, J.R., and Klip, A. (1999). Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol Cell Biol* 19, 4008-4018.
- Wang, X., and Schwarz, T.L. (2009). The mechanism of Ca²⁺-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell* 136, 163-174.
- Weiner, H., and Kaiser, W.M. (1999). 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Lett* 455, 75-78.
- Welte, M.A. (2004). Bidirectional transport along microtubules. *Curr Biol* 14, R525-537.

- Westerholm-Parvinen, A., Vernos, I., and Serrano, L. (2000). Kinesin subfamily UNC104 contains a FHA domain: boundaries and physicochemical characterization. *FEBS Lett* 486, 285-290.
- Wieman, H.L., Horn, S.R., Jacobs, S.R., Altman, B.J., Kornbluth, S., and Rathmell, J.C. (2009). An essential role for the Glut1 PDZ-binding motif in growth factor regulation of Glut1 degradation and trafficking. *Biochem J* 418, 345-367.
- Winder, W.W., and Hardie, D.G. (1996). Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* 270, E299-304.
- Winder, W.W., Holmes, B.F., Rubink, D.S., Jensen, E.B., Chen, M., and Holloszy, J.O. (2000). Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 88, 2219-2226.
- Winter, L., Abrahamsberg, C., and Wiche, G. (2008). Plectin isoform 1b mediates mitochondrion-intermediate filament network linkage and controls organelle shape. *J Cell Biol* 181, 903-911.
- Woodcock, J.M., Murphy, J., Stomski, F.C., Berndt, M.C., and Lopez, A.F. (2003). The dimeric versus monomeric status of 14-3-3zeta is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface. *J Biol Chem* 278, 36323-36327.
- Wordeman, L. (2005). Microtubule-depolymerizing kinesins. *Curr Opin Cell Biol* 17, 82-88.
- Wozniak, M.J., and Allan, V.J. (2006). Cargo selection by specific kinesin light chain 1 isoforms. *EMBO J* 25, 5457-5468.
- Wozniak, M.J., Melzer, M., Dorner, C., Haring, H.U., and Lammers, R. (2005). The novel protein KBP regulates mitochondria localization by interaction with a kinesin-like protein. *BMC Cell Biol* 6, 35.
- Wu, X., Bowers, B., Rao, K., Wei, Q., and Hammer, J.A., 3rd (1998). Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. *J Cell Biol* 143, 1899-1918.

Xiao, B., Smerdon, S.J., Jones, D.H., Dodson, G.G., Soneji, Y., Aitken, A., and Gamblin, S.J. (1995). Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* 376, 188-191.

Yaffe, M.B. (2002). How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 513, 53-57.

Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., and Cantley, L.C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961-971.

Yang, H.Y., Wen, Y.Y., Chen, C.H., Lozano, G., and Lee, M.H. (2003). 14-3-3 sigma positively regulates p53 and suppresses tumor growth. *Mol Cell Biol* 23, 7096-7107.

Yildiz, A., Tomishige, M., Gennerich, A., and Vale, R.D. (2008). Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. *Cell* 134, 1030-1041.

Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H.W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., *et al.* (2001). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105, 587-597.

Zhou, Y., Reddy, S., Murrey, H., Fei, H., and Levitan, I.B. (2003). Monomeric 14-3-3 protein is sufficient to modulate the activity of the *Drosophila* slowpoke calcium-dependent potassium channel. *J Biol Chem* 278, 10073-10080.

Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A.A., and Nathke, I.S. (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol* 11, 44-49.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Blattner, Buschmann, Diabaté, Fenske, Krug, Lammers, MacKintosh, Puchta, Richert,
Seyfried, Sleeman, Weg-Remers, Weisenseel, Pankratz

Lebenslauf

02.02.1980	Geboren in Temeschburg (Rumänien)
09/1987 bis 10/1989	Grundschule Temeschburg
11/1989 bis 07/1990	Grundschule Gernsbach
09/1990 bis 06/1999	Gymnasium Gernsbach
WS 99/00 bis WS 05/06	Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe (TU) Hauptfächer: Genetik und Botanik Nebenfächer: Toxikologie und Organische Chemie
04/2005 bis 11/2005	Diplomarbeit am Institut für Toxikologie und Genetik Forschungszentrum Karlsruhe mit dem Thema: „Untersuchung der Häm-Oxygenase-I-Induktion in RAW264.7 Makrophagen durch Flugasche“
07/06 bis 09/2009	Wissenschaftliche Anstellung in der Innerem Medizin IV am Universitätsklinikum Tübingen im Rahmen des Graduiertenkollegs 1302 der DFG: „Der PI3K Signalweg bei Tumorwachstum und Diabetes“ Beginn der Dissertation zum Thema „Untersuchungen zur 14-3-3-Proteinbindung an das Kinesin KIF1B α “ unter der Anleitung von Herrn Prof. Reiner Lammers