

# Die Rolle von Mikrotubuli-regulierenden Proteinen während der neuronalen Differenzierung

Technische Universität Dortmund  
Fakultät für Chemie

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Dipl. Biologin

**Julia Arens**

aus Attendorn

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage

1. Gutachter: Prof. Dr. Philippe Bastiaens

2. Gutachter: Prof. Dr. Frank Wehner



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Philippe Bastiaens an der Technischen Universität Dortmund und am Max-Planck Institut für molekulare Physiologie in der Zeit von Januar 2008 bis Februar 2012 angefertigt.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Von der Stammzelle zur neuronalen Zelle - Die Entwicklung von Nervenzellen . . . . .	10
1.2	Die Rolle des Zytoskeletts in der neuronalen Differenzierung	12
1.2.1	Das Mikrotubuli-Zytoskelett . . . . .	12
1.2.2	Das Aktin-Zytoskelett . . . . .	16
1.2.3	Interaktionen des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts während der Neuriten Initiation . . . . .	17
1.3	Regulatoren des Mikrotubuli-Zytoskeletts . . . . .	18
1.3.1	MAPs - Mikrotubuli-assoziierte Proteine . . . . .	18
1.4	P19 Zellen als Modellsystem zur Untersuchung der Neurogenese . . . . .	29
1.5	Zielsetzung . . . . .	32
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>33</b>
2.1	Material . . . . .	33
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	33
2.1.2	Geräte . . . . .	35
2.1.3	Mikroskope . . . . .	37
2.1.4	Software . . . . .	37
2.1.5	Verbrauchsmaterial . . . . .	38
2.1.6	Größenstandards . . . . .	39
2.1.7	Enzyme . . . . .	39
2.1.8	Reagenzienkits . . . . .	40

2.1.9	Verwendete Oligonukleotid-Primer . . . . .	40
2.1.10	Verwendete Konstrukte . . . . .	40
2.1.11	Antikörper . . . . .	42
2.1.12	Verwendete Mikroorganismen ( <i>E. coli</i> -Stämme) . . . . .	43
2.1.13	Nährmedien für Bakterien . . . . .	44
2.1.14	Verwendete Zelllinien . . . . .	44
2.1.15	Nährmedien für Zelllinien . . . . .	44
2.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	46
2.2.1	Polymeraseketten-Reaktion (PCR) . . . . .	46
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	47
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	48
2.2.4	Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese . . . . .	48
2.2.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen . . . . .	49
2.2.6	Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen . . . . .	49
2.2.7	Dephosphorylierung von Vektoren . . . . .	50
2.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	50
2.2.9	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	51
2.2.10	Transformation und Retransformation von chemisch kompetenten Zellen . . . . .	52
2.2.11	Langfristige Lagerung von Bakterien als Glycerinkulturen . . . . .	53
2.2.12	DNA-Sequenzierung . . . . .	53
2.3	Biochemische Methoden . . . . .	55
2.3.1	Herstellung von Zelllysaten mittels RIPA-Puffer . . . . .	55
2.3.2	Herstellung von Zelllysaten mittels heißer SDS-Lösung . . . . .	56
2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	57
2.3.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	57
2.3.5	Western Blot und Immunodetektion . . . . .	58
2.4	Zellbiologische Methoden . . . . .	60
2.4.1	Kultivierung von P19 Zellen . . . . .	60
2.4.2	Kultivierung von Plat-E Zellen . . . . .	60

2.4.3	Bestimmung der Zellzahl . . . . .	61
2.4.4	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen .	61
2.4.5	Transiente Transfektion mit Lipofectamine2000 . . . .	62
2.4.6	Transfektion von Plasmid-DNA mittels FuGENE6 . .	63
2.4.7	Differenzierung von P19 Zellen . . . . .	63
2.4.8	Erstellung stabiler Zelllinien mittels Transduktion . .	66
2.4.9	Erstellung stabiler Zelllinien mittels Transfektion . .	67
2.4.10	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung - FACS . . . . .	67
2.4.11	RNA-Interferenz . . . . .	68
2.4.12	Immunohistochemie . . . . .	69
2.5	Mikroskopische Methoden . . . . .	71
2.5.1	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	71
2.5.2	Langzeit <i>live</i> -Zell Aufnahmen - Timelapse Filme . . .	71
2.5.3	Total Interne Reflexion Fluoreszenz Mikroskopie (TIRF- M) . . . . .	72
2.5.4	High-Content Screen . . . . .	73
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>78</b>
3.1	Etablierung des Modellsystems: Neuronale Differenzierung von P19 Maus-embryonalen Stammzellen .	78
3.1.1	Von der pluripotenten Stammzelle zum Neuron: Cha- rakterisierung der Differenzierung . . . . .	79
3.1.2	Generierung von stabilen Zelllinien zur Detektion von Zytoskelettstrukturen . . . . .	82
3.1.3	Analyse der Zytoskelett-Dynamik während der Neu- ritenentwicklung . . . . .	84
3.1.4	Optimierung der neuronalen Differenzierung von P19 Zellen im 384- <i>well</i> Format „High-Content“ Screen . .	86
3.1.5	Spezifischer <i>knock down</i> von neuronalen Proteinen in der neuronalen Differenzierung . . . . .	88
3.2	siRNA Screen zur Charakterisierung von Mikrotubuli-regulie- renden Proteinen in der neuronalen Differenzierung . . . . .	91

3.2.1	Primärer Screen: Objektiver Vergleich aller bisher beschriebener Mikrotubuli-regulierender Proteine . . . . .	91
3.2.2	Sekundärer Screen: Validierung der Beobachtungen aus dem primären Screen . . . . .	105
3.3	Weiterführende Studien zur detaillierten Untersuchung von ausgewählten Kandidaten . . . . .	110
3.3.1	Konkurrenzsituation unter EB-Proteinen moduliert das Neuritenwachstum . . . . .	110
3.3.2	Die Rolle des Dynein-Dynactin Komplexes in der Neuriten Initiation . . . . .	115
3.3.3	Charakterisierung des Phänotyps „vergrößerter Neuritendurchmesser“ . . . . .	120
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>127</b>
4.1	Mikrotubuli-Regulatoren mit einem Einfluss auf die neuronale Entwicklung . . . . .	129
4.1.1	Mikrotubuli-Regulatoren mit essentieller zellulärer Funktion . . . . .	129
4.1.2	Bedeutung der Mikrotubuli-Stabilität für das Neuritenwachstum . . . . .	130
4.1.3	Aktin-Mikrotubuli-überbrückende Proteine in der neuronalen Entwicklung . . . . .	131
4.1.4	Negative Regulation des Neuritenwachstums . . . . .	132
4.1.5	Regulation des Neuritendurchmessers . . . . .	133
4.2	Rolle von Mikrotubuli-Regulatoren in wechselseitigen Interaktionen von zellulären Komponenten in der Neuriten Initiation . . . . .	135
4.2.1	Rolle des Dynein/Dynactin-Komplexes in der Neuriten Initiation . . . . .	135
4.2.2	Proteine der EB-Familie mit gegensätzlichem Einfluss auf die Mikrotubuli-Stabilität . . . . .	141



4.2.3	Suppression von bekannten Mitose Regulatoren beeinflusst den Durchmesser und die Größe von Neuronen . . . . .	143
4.3	Optimierung des neuronalen Differenzierungsassays . . . . .	146
4.4	Hypothetisches Modell der Neuromorphogenese . . . . .	150
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>152</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>154</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>177</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>178</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>182</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>184</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>186</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Von der Stammzelle zur neuronalen Zelle - Die Entwicklung von Nervenzellen

Die Entwicklung und Funktionen des Nervensystems sind aufgrund von vielen zellulären Regulationsmechanismen bis heute nur unzureichend verstanden. Zahlreiche Fragen sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Erforschung von neuronalen Erkrankungen warten auf eine Antwort, um ein ganzheitliches Bild des Nervensystems von Säugetieren und dem Menschen zu erhalten. Insbesondere neurodegenerative Erkrankungen lassen sich auch mit den heutigen medizinischen Methoden nur schwer behandeln oder gar heilen. Daher ist die Erforschung von einzelnen Neuronen sowie das Zusammenspiel verschiedener Neuronen im zentralen und im peripheren Nervensystem ein wichtiges Ziel der aktuellen Forschung in den Neurowissenschaften.

In dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die frühen Stadien der Entwicklung von Neuronen gelegt. Im Zuge der Umwandlung von Stammzellen in ausgereifte Nervenzellen durchlaufen diese eine Reihe von funktionellen und morphologischen Veränderungen. Um neuronale Erkrankungen besser verstehen zu können, ist es essentiell, den gesamten Prozess der Entwicklung von Stammzellen zu Nervenzellen im Detail zu untersuchen. Insbesondere eine frühe Phase der neuronalen Entwicklung,

die initiale Bildung von Neuriten, wurde bisher nur unzureichend in geeigneten Modellsystemen untersucht. Bei der Neuriten Initiation werden die ersten morphologischen Veränderungen der differenzierten Zellen erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt exprimieren die Zellen typische neuronale Faktoren wie z.B. das neuronale  $\beta$ III-Tubulin - die transkriptionsbasierte Reprogrammierung zur neuronalen Differenzierung wurde daher bereits eingeleitet. Darauf folgt die Bildung von initialen Zellfortsätzen, welche im Folgenden verlängert werden. Diese Fortsätze, welche zunächst als Neuriten bezeichnet werden, spezialisieren sich im Laufe der neuronalen Entwicklung in Axone und Dendriten. Es ist anzunehmen, dass der initialen Bildung von Neuriten eine Reorganisation des Zytoskeletts vorausgeht. Die zelluläre Regulation dieser Restrukturierung ist bisher jedoch weitgehend unbekannt. Es wurde daher eine Studie angestrebt, in der die Regulatoren des Mikrotubuli-Zytoskeletts identifiziert werden sollten, welche einen Einfluss auf die initiale Bildung von Neuriten haben. Die Funktion solcher Regulatoren sollte durch Charakterisierung untersucht werden.

## 1.2 Die Rolle des Zytoskeletts in der neuronalen Differenzierung

In Zellen kommen drei Komponenten des Zytoskeletts vor: Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Das Zytoskelett ist maßgeblich an der Form der Zelle, der Zellbewegung, der Zellteilung, dem Materialtransport sowie an morphologischen Formänderungen von Zellen beteiligt. Das Besondere an den drei Zytoskelettelementen ist, dass sie aus Proteinuntereinheiten bestehen, welche dynamisch auf- und abgebaut werden können. Insbesondere Aktinfilamente und Mikrotubuli polymerisieren und depolymerisieren ausschließlich an ihren Enden und können aufgrund ihrer asymmetrischen Struktur durch Motorproteine directional verschoben werden. Intermediäre Filamente polymerisieren und depolymerisieren auch entlang ihrer Seiten. Sie können aufgrund ihrer symmetrischen Struktur nicht directional verschoben werden und verhalten sich daher in ihrer zeitlich-räumlichen Organisation wesentlich undynamischer. Bei den morphologischen Veränderungen während der neuronalen Differenzierung spielen sowohl Mikrotubuli als auch das Aktin-Zytoskelett aufgrund ihrer hohen Dynamik eine essentielle Rolle und werden daher im Folgenden genauer vorgestellt.

### 1.2.1 Das Mikrotubuli-Zytoskelett

Mikrotubuli (MT) sind sehr dynamische, röhrenförmige Filamente, welche viele zelluläre Funktionen vermitteln, wie z.B. die Aufrechterhaltung der Zellform, Mitose, Zellmigration oder den intrazellulären Transport. Aufgebaut sind Mikrotubuli aus  $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimeren, welche längliche Protofilamente bilden. In einem Protofilament bindet die  $\alpha$ -Tubulin Untereinheit eines Heterodimers jeweils an die  $\beta$ -Tubulineinheit eines anderen Heterodimers (*head-to-tail* Anordnung). Diese Anordnung bedingt eine intrinsische Polarität der Filamente (äußeres  $\beta$ -Tubulin am Plus-Ende, äußeres  $\alpha$ -Tubulin am Minus-Ende). Durch seitliche Anlagerungen weiterer Protofilamente werden laterale Anordnungen (sogenannte *Sheets*) ge-

bildet, welche sich wiederum zu einer röhrenförmigen Struktur - einem Mikrotubulus - aus insgesamt 13 Protofilamenten mit einem Durchmesser von etwa 25 nm zusammenlagern (s. Abb. 1.1).

Mikrotubuli können spontan zwischen Phasen des Wachstums (Polymerisation) und des Abbaus (Depolymerisation) wechseln. Dieses Verhalten wird als dynamische Instabilität bezeichnet [1]. Der Wechsel von Polymerisation zu Depolymerisation wird als „Katastrophe“ definiert, der Wechsel von Depolymerisation zu Polymerisation als „Rettung“. Aufgrund ihrer intrinsischen Polarität können zwei verschiedene Enden unterschieden werden, ein schnell wachsendes Plus-Ende und ein langsamer wachsendes Minus-Ende. Beide Tubulin Untereinheiten binden Guanin-Nukleotid-Moleküle. Während die mit  $\alpha$ -Tubulin assoziierten GTPs (Guanin-tri-Phosphat) nicht hydrolysiert werden, wird GTP, welches an  $\beta$ -Tubulin gebunden ist, in GDP (Guanin-di-Phosphat) umgewandelt, kurz nachdem die Tubulinuntereinheit in einen Mikrotubulus eingebaut wurde. Es ist allgemein anerkannt, dass zwischen dem Einbau der GTP-bindenden Tubulin-Untereinheiten und der GTP-Hydrolyse eine Zeitverzögerung liegt. Daraus resultiert die Entstehung einer sogenannten GTP-Kappe am wachsenden Mikrotubuli-Ende. Diese GTP-Kappe schützt das wachsende Ende des Mikrotubulus vor Depolymerisation.

In Säugetierzellen sind die Minus-Enden der Mikrotubuli meist stabil im Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC) nahe dem Nukleus verankert, wohingegen die Plus-Enden hoch dynamisch sind und zwischen Phasen der Polymerisation und der Depolymerisation wechseln [2]. Sowohl die Polymerisation als auch die Depolymerisation von Mikrotubuli können Kräfte erzeugen [3, 4], die denen von Motorproteinen sehr ähneln und welche genutzt werden können, um Vesikel zu verschieben, Druck auf die Zellmembran auszulösen oder Chromosomen während der Mitose zu bewegen.

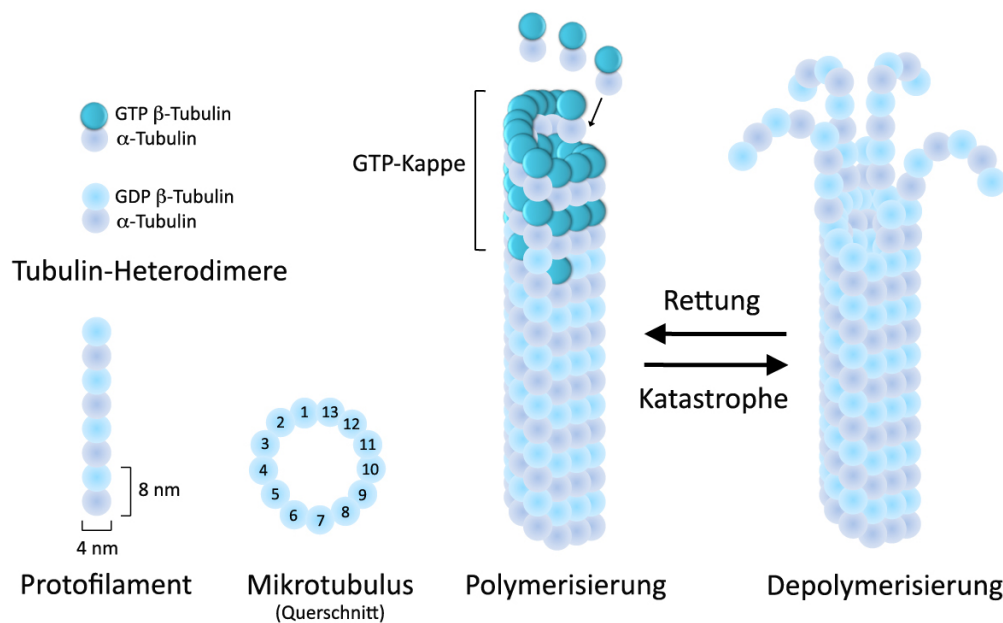


Abbildung 1.1: **Aufbau und Dynamik von Mikrotubuli.**  $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimere formen längliche Protofilamente in einer *head-to-tail*-Anordnung. Diese Anordnung bedingt eine intrinsische Polarität, wodurch das Plus- und Minus-Ende voneinander unterschieden werden können. Für die Bildung eines Mikrotubulus sind 13 Protofilamente notwendig, die sich seitlich aneinander lagern und eine röhrenförmige Struktur formen. Das Wachsen von Mikrotubuli wird als Polymerisation bezeichnet. Dabei lagern sich weitere GTP-Tubulin-Heterodimere an das schnell wachsende Plus Ende ( $\beta$ -Tubulin am äußeren Ende) der Mikrotubuli an. Das GTP der  $\beta$ -Tubulin Untereinheit wird kurz nach der Anlagerung hydrolysiert. Aufgrund der leichten Zeitverzögerung entsteht eine GTP-Kappe am wachsenden Ende der Mikrotubuli. Der Abbau von Mikrotubuli wird als Depolymerisation bezeichnet. Hierbei spalten sich die Enden auf und einzelne Heterodimere oder ganze Protofilamente lösen sich von der röhrenförmigen Struktur. Diese Phasen des Wachstums und des Abbaus sind sehr dynamisch und können jederzeit wechseln. Dabei wird der Wechsel von Polymerisation zu Depolymerisation als Katastrophe bezeichnet, der umgekehrte Fall von Depolymerisation zu Polymerisation als Rettung.

## Post-translationale Tubulin Modifikationen

Mikrotubuli spielen in zellulären Prozessen sehr unterschiedliche Rollen. Sie dienen hauptsächlich als Transportstrecke beim intrazellulären Transport und bilden die mitotische Spindel während der Zellteilung. Des Weiteren unterstützen und beeinflussen sie die Zellform insbesondere in der Ausbildung der Zellpolarität oder der Bildung von Neuriten während der neuronalen Differenzierung. Lange Zeit war unklar wie Mikrotubuli derart viele verschiedene Funktionen übernehmen können und ob es Unterschiede zwischen einzelnen Mikrotubuli Populationen gibt. Prinzipiell kann die Zelle eine Diversität von Mikrotubuli auf zwei verschiedenen Wegen erzeugen [5]. Einerseits durch die Expression von unterschiedlichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin Isoformen, die in der Zelle spezifische Aufgaben übernehmen. Zum Anderen kann eine hohe Diversität an verschiedenen Mikrotubuli mit Hilfe von reversiblen post-translationalen Modifikationen (PTMs) generiert werden [6]. Es ist bekannt, dass Mikrotubuli durch De-Tyrosinierung,  $\Delta 2$  Modifikation, Polyglutamylierung, Polyglycylierung, Acetylierung, Phosphorylierung und Palmitoylierung modifiziert werden können (Reviews [7, 8]). Meist erfolgt eine Modifikation der polymerisierten Mikrotubuli, seltener von unpolymerisierten Tubulindimeren. Stabile, langlebige Mikrotubuli können daher deutlich mehr PTMs anreichern als dynamische, kurzlebige Mikrotubuli [9].

Es wird angenommen, dass diese Modifikationen eine wichtige Rolle bei den vielfältigen Funktionen von Mikrotubuli in der Zelle spielen. Beim De-Tyrosinierungs-/Tyrosinierungskreislauf wird vom  $\alpha$ -Tubulin ein C-terminales Tyrosin von einer bisher nicht näher identifizierten Carboxypeptidase entfernt bzw. durch die Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL) wieder angefügt [10, 11, 7, 9]. Für diese Tubulin Modifikation wurde u.a. gezeigt, dass ein funktionierender De-Tyrosinierungs-/Tyrosinierungskreislauf die neuronale Organisation beeinflusst. TTL-defiziente Mäuse wiesen in postmitotischen Zellen kein tyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin auf und starben postnatal aufgrund von neuronalen Fehlbildungen [12]. Post-translationale Modifikationen beeinflussen zudem die Bindung von Mikrotubuli-assoziierten



Proteinen. In dieser Hinsicht wird vermutet, dass v.a. die Acetylierung von stabilen Mikrotubuli eine Rolle bei Motorprotein-basierten Transportvorgängen in Säugetierzellen spielen [13]. PTMs weisen daher eine Fülle von Regulationsmöglichkeiten auf, welche Einfluss auf die Struktur und Stabilität von Mikrotubuli sowie auf die Bindungsaffinität assoziierter Proteine, einschließlich der Mikrotubuli basierten Motorproteine, nehmen.

## 1.2.2 Das Aktin-Zytoskelett

Aktin bildet ein weiteres zelluläres Zytoskelett-Netzwerk. Es werden drei Haupt-Isoformen von Aktin in Wirbeltieren unterschieden, die  $\alpha$ -Isoform der skelettalen, kardialen und der glatten Muskulatur sowie die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoformen, welche in nicht-muskulösem Gewebe und in Muskelzellen exprimiert werden [14]. Diese Proteine sind hoch konserviert und haben wichtige zelluläre Funktionen in der Zellmotilität, der Aufrechterhaltung der Zellform und Polarität, Regulation der Transkription sowie in der Lokalisation und dem Transport von Protein-Komplexen in der Zelle [15, 14]. Die vielfältigen Funktionen von Aktin erklären auch die sehr hohe Expressionsrate dieses Proteins in der Zelle. Mengenmäßig ist Aktin eines der häufigsten Proteine in eukaryotischen Zellen. Die Isoformen variieren meist nur in einigen wenigen Aminosäuren, wobei diese Veränderungen meist im N-terminalen Bereich auftreten [16]. In der Zelle kommen zwei Formen von Aktin vor, das monomere, globuläre Aktin (G-Aktin) sowie das polymere, filamentöse Aktin (F-Aktin). Aktinfilamente sind ebenso wie Mikrotubuli asymmetrisch. Aktin-Monomere binden vorwiegend an das schnell wachsende *barbed* (sogenannte „dornige“) Ende und dissoziieren vorwiegend vom *pointed* (sogenannten „spitzen“) Filamentende. ATP-gebundenes Aktin bevorzugt die Bindung an das F-Aktin Polymer, insbesondere die Assoziation mit dem schnell wachsenden *barbed* Ende. Im Aktinfilament wird die Umwandlung von ATP in ADP durch Hydrolyse gefördert. Das hierdurch entstandene ADP-gebundene Aktin bevorzugt die Dissoziation vom *pointed* Ende [14]. Im „*steady-state*“-Zustand, also bei gleicher Polymerisations- und Depolymerisationsrate (Fließgleichge-

wicht), bleibt die Polymermenge konstant. Dieser Effekt, der oft für Aktin beobachtet werden kann, wird als „Tretmühlen“ - Effekt (*treadmilling*) bezeichnet [17]. Zahlreiche Aktin-bindende Proteine sind in die Regulation dieser Aktin-Zytoskelett Dynamik involviert, z.B. ADF/Cofilin, welches die Depolarisation fördert oder Profilin, welches den Austausch von ADP gegen ATP katalysiert [18].

Basierend auf diesen dynamischen Eigenschaften bilden Aktinfilamente zahlreiche zelluläre Strukturen, wie z.B. Sarkomere in Muskelzellen oder Lamellipodien und Filopodien in migrierenden Zellen. Lamellipodien bestehen aus einem dünnen, dicht verzweigten Netzwerk von filamentösem Aktin, welches in der Zellperipherie mit den schnell wachsenden, dornigen Enden in Richtung der Zellmigration orientiert ist [19]. Ein Filopodium ist eine weitere verwandte Struktur, welche jedoch nicht aus einem verzweigten Netzwerk, sondern aus parallel gebündelten Aktinfilamenten besteht [20]. Ähnlich wie in den Lamellipodien sind die dornigen Enden der Aktinfilamente innerhalb der Filopodien zellauswärts gerichtet [20].

### **1.2.3 Interaktionen des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts während der Neuriten Initiation**

Während der neuronalen Differenzierung sind morphologische Veränderungen der Zellen zu beobachten, welche mit Umstrukturierungen des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts korrelieren. Mikrotubuli werden in bündelartigen Anordnungen organisiert, welche die Basis von Zellausstülpungen bilden. Während des Wachstums dieser Mikrotubuli-basierten Ausstülpungen werden aktinreiche Lamellipodien und Filopodien ausgehend vom Zellkörper in einem koordinierten Prozess nach außen verschoben [21]. Die entstehenden länglichen Zellstrukturen, welche aus einem Mikrotubuli gefüllten Schaft und einer aktinreichen Endregion, dem sogenannten Wachstumskegel (*Growth cone*) bestehen, werden als Neuriten bezeichnet [22]. Neuriten spezialisieren sich in späteren Stadien der neuronalen Entwicklung in Axone und Dendriten.

## **1.3 Regulatoren des Mikrotubuli-Zytoskeletts**

Zahlreiche Proteine beeinflussen die Organisation und das dynamische Verhalten von Mikrotubuli, damit diese ihre vielseitigen zellulären Funktionen durchführen können. Dazu zählen alle in der Zelle vorkommenden Tubulin-Isoformen, Tubulin-modifizierende Enzyme, Zentrosom-assoziierte Proteine, Kinetochor-assoziierte Proteine sowie Mikrotubuli-assoziierte Proteine, welche auf unterschiedliche Weise mit Mikrotubuli interagieren können. Einige dieser Regulatoren bilden Protein-Komplexe, in denen nicht alle Untereinheiten direkt mit Mikrotubuli interagieren. Für den funktionellen Einfluss auf das Verhalten von Mikrotubuli sind allerdings auch diese Protein-Komplex-Untereinheiten relevant, da sie die Funktion des Komplexes beeinflussen. Des Weiteren beeinflussen zahlreiche Signalproteine den Aktivitätszustand von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen und können daher indirekt Einfluss auf das Verhalten von Mikrotubuli nehmen.

Zusammen kann diese Vielzahl von Regulatoren verschiedene Aspekte von Mikrotubuli kontrollieren. Einerseits können diese Regulatoren Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Mikrotubuli nehmen, in dem sie die Polymerisations- und Depolymerisationsrate beeinflussen bzw. die Frequenz von Katastrophen oder Rettungen modulieren. Außerdem können solche Regulatoren Verknüpfungen zwischen einzelnen Mikrotubuli ausbilden. Mittels dieser Verknüpfungen können mehrere Mikrotubuli in übergeordneten Strukturen, wie z.B. sternförmige Aster oder Bündel organisiert werden. Schließlich können Mikrotubuli-Regulatoren die zelluläre Lokalisation von Mikrotubuli oder deren Interaktionen mit anderen zellulären Strukturen beeinflussen.

### **1.3.1 MAPs - Mikrotubuli-assoziierte Proteine**

Unter dem Begriff Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) werden im Allgemeinen alle Proteine zusammengefasst, die auf unterschiedliche Weise mit Mikrotubuli in der Zelle direkt interagieren. Zu den bekanntes-

ten Vertretern der MAPs zählen Mikrotubuli-basierte Motorproteine wie Dyneine oder Kinesine. Sie vermitteln den intrazellulären Transport. Aber auch sogenannte strukturelle MAPs wie die Mitglieder der MAP2/*tau* Familie, welche keine enzymatische Aktivität besitzen und nur durch Bindung entlang von Mikrotubuli deren Verhalten modulieren oder auch Adapterproteine, welche kritisch für die Funktion einzelner MAPs sind (z.B. LIS1 (*Lissencephaly-1*), NudE1 (*Nuclear distribution gene E homolog 1*) oder NudEL (*NudE-like protein*) für Dynein [23]) sowie die Mikrotubuli Plus-Ende-bindenden Proteine zählen zu den gut untersuchten MAPs. Einige Gruppen von MAPs sind aufgrund ihrer bisher bekannten zellulären Funktion besonders interessante Kandidaten zur Regulation des Mikrotubuli-Zytoskeletts während der Neuriten Initiation. Daher werden diese im Folgenden genauer vorgestellt.

### **Mikrotubuli Plus-Ende bindende Proteine**

Wachsende Mikrotubuli-Enden bilden eine Plattform für die Anlagerung einer großen Gruppe von Proteinen, den sogenannten Mikrotubuli-Plus-Ende bindenden Proteinen (+TIPs) (Review [24]). Diese Faktoren haben einen starken Einfluss auf die Dynamik von Mikrotubuli und können diese mit einer Vielzahl zellulärer Strukturen verlinken, wie z.B. dem Aktin-Zytoskelett mittels Spektraplakine [25], APC (*Adenomatous polyposis coli*) [26] oder CLASPs (*CLIP-associated proteins*) [27]. Typischerweise binden +TIPs nur an wachsende, jedoch nicht an schrumpfende Mikrotubuli-Enden. Seit ihrer Entdeckung wurden bereits mehr als 20 verschiedene +TIP-Familien identifiziert.

Normalerweise sind +TIPs Proteine, welche aus mehreren Domänen und/oder Untereinheiten aufgebaut sind. Die Größe einzelner Vertreter umfasst einige hundert bis zu mehreren tausend Aminosäureresten. Sie können im Zytosol oder membrangebunden vorkommen und manche besitzen funktionelle Motordomänen (Review [28]). Klassifiziert werden die +TIPs anhand von konservierten Strukturelementen, wie z.B. der Calponin Homologie (CH) Domäne, welche die Interaktion mit Mikrotubuli er-

möglichst, sowie der Basic/Serin reichen Domäne, der EBH-Domäne (auch bekannt als EB1-like Motif) oder der CAP-Gly Domäne (*Cytoskeleton-associated protein glycine-rich*), welche Interaktionen mit anderen +TIPs vermitteln (Review [28]).

Mikrotubuli +TIPs sind in der Lage komplexe Interaktionsnetzwerke zu bilden. Besonders intensiv werden zur Zeit die Proteine der *End-binding* (EB)-Familie untersucht [2]. Diese relativ kleinen, aber hoch konservierten Proteine binden direkt an die schnell wachsenden Mikrotubuli-Enden, wo sie akkumulieren und weitere +TIPs rekrutieren [29, 30, 31]. Wachsende Mikrotubuli zeigen eine charakteristische, kometenartige EB-Assoziation an ihrem Plus-Ende. EB-Proteine binden Mikrotubuli sehr dynamisch und transient an deren Plus-Enden [32]. Es wird vermutet, dass die EB-Proteine eine spezifische Struktur am wachsenden Ende der Mikrotubuli erkennen. Hinsichtlich dieser Struktur stehen aktuell mehrere Modelle zur Diskussion. Zum Einen wurden vergrößerte Tubulin-Sheets am Mikrotubuli-Ende von wachsenden Mikrotubuli *in vitro* durch Elektronen-mikroskopischen Analysen beschrieben, welche selektiv von EB-Proteinen erkannt werden könnten [33, 34]. Zum Anderen ergaben Beobachtungen in Hefe, in welcher das EB1 Homolog Mal3 bevorzugt an die Saumregion von Mikrotubuli bindet, eine alternative Erklärung [35, 36]. Mal3 akkumuliert demnach nicht nur an den wachsenden Plus-Enden der Mikrotubuli, sondern auch entlang der Verbindungsnaht (Saum) der lateral verbundenen Protofilamente. Es wird daher diskutiert, ob Mal3 auf diese Weise die Bildung von Mikrotubuli aus Protofilamenten fördert [36]. Schließlich ist die GTP-Kappe der polymerisierenden Mikrotubuli ein lange diskutierter Kandidat, da nachgewiesen wurde, dass EB1-GFP bevorzugt an Mikrotubuli in der Anwesenheit des GTP-Homologs GMPCPP bindet [37].

Auch wenn der genaue Bindungsort am Mikrotubuli Plus-Ende noch nicht genau definiert wurde, scheinen die EB-Proteine eine Art Hauptintegrator im Aufbau des +TIP-Proteininteraktions-Netzwerks zu sein, da sie unabhängig von anderen Bindungspartnern an die wachsenden Mikrotubuli-Enden assoziieren [29, 38]. EB-Proteine können mit Hilfe ihrer N-terminalen CH-Domäne direkt an Mikrotubuli binden [39, 40] und weisen weitere

Domänen (*Coiled-coil*, EBH, EEY/F) auf, die zur Bindung anderer +TIPs dienen, wie z.B. APC, CLIP-170 (*Cytoplasmic linker protein*), MCAK (Mitotic centromer-associated kinesin) oder CLASP [31, 41, 42, 28].

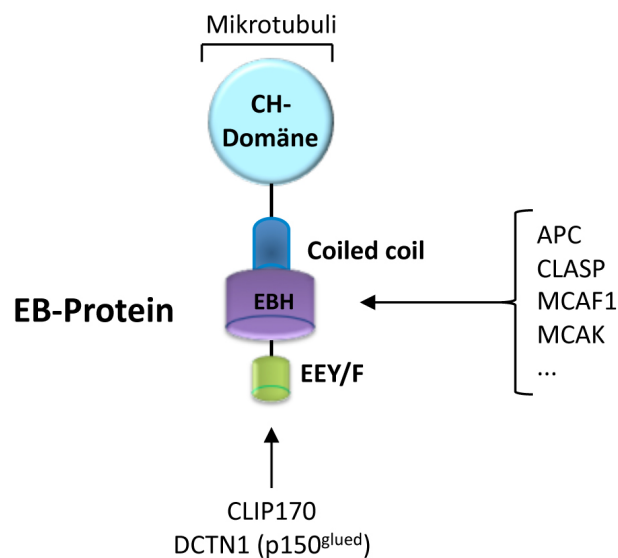


Abbildung 1.2: **Aufbau der EB-Proteine.** Bei den EB-Proteinen werden vier Domänenstrukturen unterschieden. N-Terminal befindet sich die Mikrotubuli-bindende Calponin Homologie (CH)-Domäne. Weiterhin folgt eine *Coiled coil*-Region, an welche die EBH-Domäne anschließt. EBH vermittelt Bindungen zu weiteren +TIP Proteinen, u.a. APC, CLASP, MACF1 oder MCAK. C-Terminal befindet sich die EEY/F Domäne (Glu-Glu-Thr/Phe Tripeptid-Motiv), an welche verschiedene CAP-Gly Proteine wie z.B. CLIP-170 oder DCTN1 binden können. Schema verändert nach Akhmanova *et al.* (2010).

Die exakte Funktion der EB-Proteine bei der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik ist bisher unklar, da die Effekte je nach untersuchter Kon-dition variierten. In Zellen erhöhen EBs normalerweise das Mikrotubuli-Wachstum und reduzieren die Katastrophenrate [43, 44, 45]. Messungen bezüglich einzelner Mitglieder der EB-Familie sind in *in vitro* Experimenten jedoch teilweise widersprüchlich, da in unterschiedlichen Publikationen Änderungen in der Wachstums- und Abbaurate sowie Induktion und

Suppression von Katastrophen oder auch ein gänzlich fehlender Einfluss auf die Mikrotubuli-Dynamik beobachtet wurde [38, 29, 30, 46, 44, 47, 34]. Es ist jedoch klar, dass ein Netzwerk von interagierenden +TIP-Proteinen am Plus-Ende der Mikrotubuli gebildet wird, welches verschiedene Aspekte der Mikrotubuli-Dynamik regulieren kann. Dabei wird das Wachstum beispielsweise durch die XMAP215 katalysierte Anlagerung von Tubulin an die Mikrotubuli-Enden reguliert [48], die Induzierung von Katastrophen durch MCAK [49] sowie von Rettungen durch CLIP-170 [50] oder die Stabilisierung von Mikrotubuli am Zellkortex durch die Regulatoren CLASPs, APC und MACF [25, 51, 52].

### **Aktin-Mikrotubuli verbindenden Proteine**

Zellen exprimieren auch MAPs, welche gleichzeitig an Mikrotubuli und Aktin binden können. Gut studierte Vertreter dieser Proteinklasse sind die Spektriplakine. Diese Proteine sind in eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert, u.a. in der Wundheilung oder der neuronalen Entwicklung [53, 54]. Die Säugetier-Spektriplakine ACF7 (*Actin crosslinking factor 7*, auch bekannt als Macf1) und Bpag1/Dystonin sowie das *Drosophila* Spektriplakin Short stop (Shot) und Vab10 aus *Caenorhabditis elegans* wurden bislang besonders gut charakterisiert [55, 56, 57].

### **Mikrotubuli-Motorproteine**

Aufgrund der Größe und komplexen Organisation von eukaryotischen Zellen sind aktive und direktionale intrazelluläre Transportmechanismen essentiell. Eukaryotische Zellen nutzen Motorproteine, welche sich directional auf Zytoskelettstrukturen durch die Zelle bewegen. Diese Motorproteine werden in drei große Klassen unterteilt: Myosine, Kinesine und Dyneine. Myosine sind Aktin-basierte Motorproteine, im Gegensatz zu den Kinesinen und Dyneinen, die sich entlang Mikrotubuli bewegen. Gerade in Neuronen ist der intrazelluläre Transport entlang von Mikrotubuli essentiell für die neuronale Morphogenese und Funktion der Zellen, da z.B. menschliche Axone eine Länge von bis zu 1 m aufweisen kön-

nen. Im Axon selber findet keine Proteinbiosynthese statt, daher ist es notwendig das benötigte Material entlang von Mikrotubuli zu seinem Bestimmungsort zu transportieren [58]. Unterschieden werden dabei zwei verschiedene Transportrichtungen, der retrograde und der anterograde Transport. Beim retrograden Transport werden Zellbestandteile von der Peripherie zum Zellkörper transportiert, im Gegensatz zum anterograden Transport, der vom Zellkörper zur Zellperipherie gerichtet ist. Die Richtungsabhängigkeit des Transports ist abhängig von der Polarität der Mikrotubuli. Mikrotubuli-Motoren werden daher basierend auf ihrer Laufrichtung entweder als Plus-Ende oder Minus-Ende gerichtete Motorproteine unterschieden. Die Polarität der Mikrotubuli ist abhängig vom Zelltyp und von der subzellulären Region; in neu gebildeten Neuriten, sowie in spezialisierten Axonen und den distalen Enden von Dendriten sind die Mikrotubuli mit ihren Plus-Enden zellauswärts gerichtet, wohingegen in proximalen Dendriten und im Zellkörper die Polarität der Mikrotubuli gemischt vorkommt [59].

Dynein zählt zu den Mikrotubuli-assoziierten Motorproteinen. Diese Motoren bewegen sich entlang der Mikrotubuli, indem sie ATP hydrolysieren. Es kommen zwei Formen dieses Proteins in der Zelle vor. Das zyttoplasmatische Dynein, welches primär für den retrograden intrazellulären Transport in Richtung der Mikrotubuli Minus-Enden verantwortlich ist. Zusätzlich spielt dieses Protein in einer Vielzahl von mitotischen Funktionen einschließlich der Spindel-Orientierung und der Nukleus-Positionierung eine zentrale Rolle. Das axonemale Dynein spielt keine Rolle im intrazellulären Transport. Dieser Motor treibt die Bewegung von Zilien und Flagellen durch rhythmische Verschiebungen zwischen einzelnen Mikrotubuli an [60]. Dyneine gehören zu der Superfamilie der AAA+ ATPasen [61]. Mitglieder dieser Proteinfamilie weisen eine oder mehrere konservierte AAA-Domänen auf, welche eine Nukleotid Bindestelle sowie eine Hydrolyse-Konsensus Seite beinhalten. Obwohl Dynein-Proteine in eine Vielzahl von funktionellen Aufgaben eingebunden sind, ist ihr struktureller Aufbau bemerkenswert konserviert. Dies liegt daran, dass nur eine einzige Untereinheit des zyttoplasmatischen Dyneins in eine große Vielfalt



von zellulären Funktionen eingebunden ist. Bei dieser Untereinheit handelt es sich um die Motordomäne von Dynein, die schwere Kette 1 (*heavy chain Typ 1*, *Dync1h1*). Eine große Vielfalt von akzessorischen Untereinheiten ermöglicht jedoch den Aufbau vieler unterschiedlicher Motorprotein-Komplexe, welche in ihren zellulären Funktionen selektiv reguliert werden können (s. Abb 1.3). In den meisten Fällen kommt Dynein als homodimerer Komplex vor, welcher aus einer C-terminalen Motordomäne (Kopf, schwere Kette) und einer N-terminalen Tailregion, an welche eine Reihe von akzessorischen Untereinheiten bindet, zusammengesetzt ist.

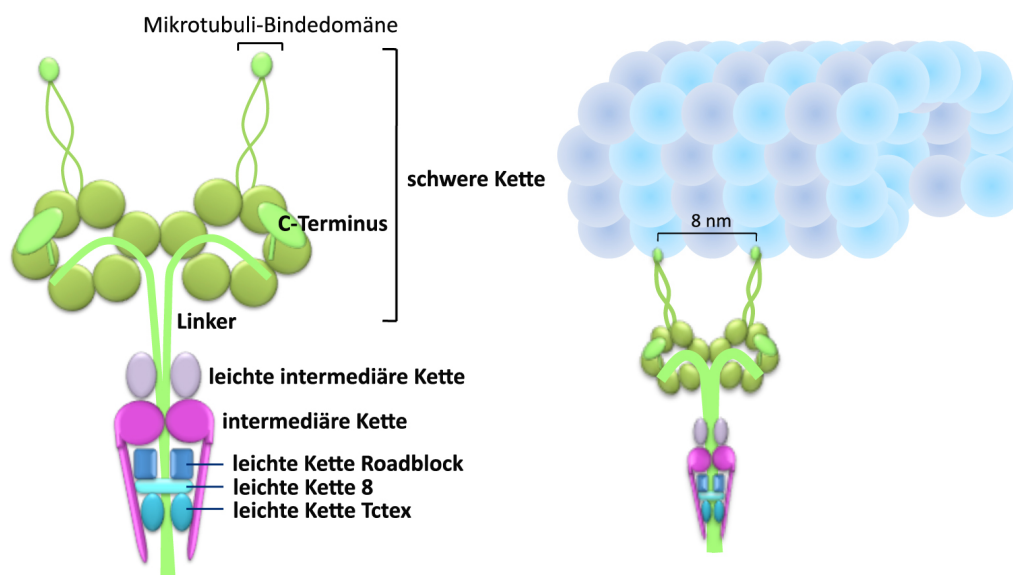


Abbildung 1.3: **Aufbau des zytosplasmatischen Dyneins.** Dynein ist ein Multidomänen Komplex und kommt vorwiegend als Homodimer vor. Einzelne Dyneine setzen sich aus einer schweren Kette, welche die Motordomäne, bestehend aus sechs AAA-ATPasen sowie der Mikrotubuli-Bindedomäne, und einer Linker-Region, an die eine intermediäre Kette, eine leichte intermediäre Kette sowie drei leichte Ketten (*Roadblock*, *Leichte Kette 8*, *Tctex*) binden, zusammen.

Die Dynein-Motoreinheit besitzt sechs AAA ATPase Untereinheiten, welche ringförmig angeordnet sind [61, 62] und die Kopfregeion bilden.

Aus diesem Ring ragen drei weitere Strukturen hervor: eine Verknüpfungsstruktur (*Linker*), welche vermutlich als mechanischer Hebel während der Generierung von Kraft funktioniert [63, 64]; eine sehr feine, 12 - 15 nm lange,  $\alpha$ -helikale *coiled-coil* Struktur (Stängel) mit einer globulären, helikalen Mikrotubuli-Bindedomäne am oberen Ende [65, 66]; sowie einem C-terminalen Endbereich, dessen Funktion bisher nicht näher bekannt ist. Die Tail-Domäne vermittelt die Homodimerisierung der schweren Kette von Dynein und agiert als eine Art Gerüst zur Bindung von weiteren nicht katalytischen Untereinheiten, welche zusammengenommen den Dynein-Komplex bilden [23]. Dabei bindet die Dynein intermediäre Kette (*intermediate chain; IC*) sowie die leichte, intermediäre Kette (*light intermediate chain; LIC*) direkt an die schwere Kette (*heavy chain; HC*). Die kleineren, leichten Ketten (*light chains; LCs*), LC8, LC7 (auch bekannt als *roadblock*) und Tctex1 (*T-complex testis-specific protein 1*), assemblieren mit der intermediären Kette. Aufgrund der verschiedenen Isoformen der einzelnen Dynein-Untereinheiten können viele verschiedene Kargo-Moleküle spezifisch gebunden und transportiert werden [59]. Weiterhin interagiert Dynein mit einer Reihe von Adapterproteinen, welche die Funktion des Komplexes regulieren, u.a. bindet die Dynactin-Untereinheit p150<sup>glued</sup> direkt an die intermediäre Kette von Dynein [67]. Dynactin ist für die Funktionalität von Dynein ein sehr wichtiges assoziiertes Protein, da es sowohl die Aktivität als auch die Bindungskapazität von Dynein zu dessen interzellulärem Kargo reguliert [68]. Die Interaktion mit dem Transportgut wird jedoch nicht ausschließlich durch Dynactin vermittelt. Auch für einige Dynein-Untereinheiten konnte eine direkte Bindung an intrazellulärer Kargo nachgewiesen werden, wie z.B. für die leichte Kette Typ *Tctex1*, welche direkt an das Pigment Rhodopsin bindet und auf diese Weise dessen Transport innerhalb der Photorezeptoren ermöglicht [69] oder die leichte intermediäre Kette 1, welche für die Rekrutierung von Lysosomen und späten Endosomen verantwortlich ist [70]. Allerdings kann auch in diesen Fällen nicht ausgeschlossen werden, dass Dynactin eine wichtige Rolle bei der Funktionalität von Dynein spielt, auch wenn dieses nicht für die Interaktion mit dem Transportgut essentiell ist.

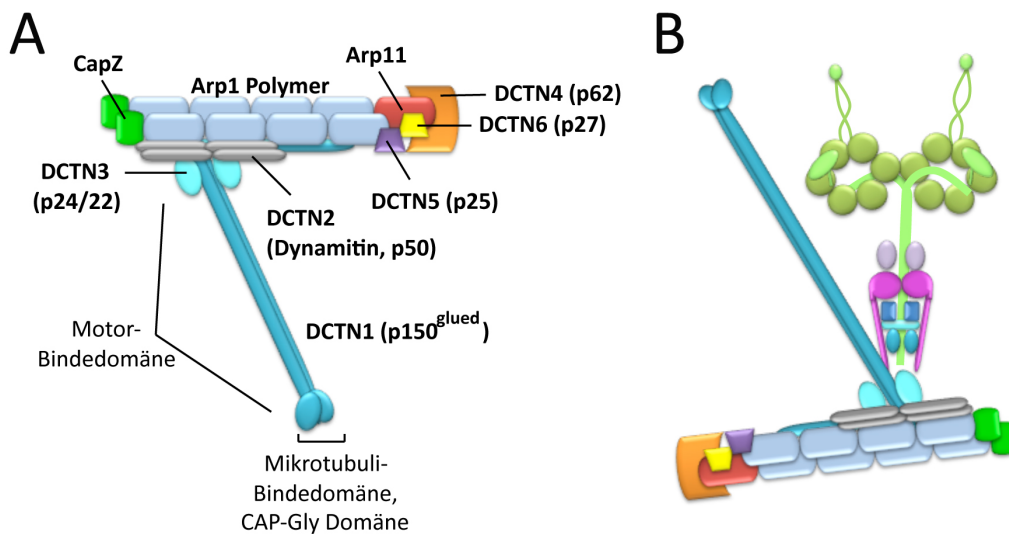


Abbildung 1.4: **Aufbau des Dynactin Komplexes.** **A:** Dynactin ist ein Multidomänen-Komplex. Es werden zwei grobe Strukturen unterschieden, die Stab- und die Arm-Region. Die Stabregion besteht hauptsächlich aus einem kleinen Arp1-Filament (*Actin related Protein 1*). Am spitzen Ende dieses Filaments binden das akzessorische Protein Arp11 sowie DCTN4, DCTN5 und DCTN6. Am dornigen Ende binden einige CapZ Proteine (*Actin capping proteins*) sowie die Untereinheiten DCTN1, DCTN2 und DCTN3. DCTN1 ist die größte Dynactin Untereinheit und formt die Arm-Struktur, an dessen Ende sich die Mikrotubuli Bindedomäne sowie eine CAP-GLy Domäne befinden. **B:** Die Interaktion mit Dynein findet am seitlichen Armbereich von DCTN1 statt und bindet an die intermediäre Kette von Dynein.

Bei Dynactin handelt es sich ebenfalls um einen Multiprotein-Komplex. Dieser Komplex ist asymmetrisch aufgebaut und beinhaltet zwei morphologisch verschiedene, strukturelle Domänen (Stab und Arm; s. Abb. 1.4) [71]. Die größere Masse nimmt die etwa 10 nm dicke und 40 nm lange Stabdomäne ein, welche aus verschiedenen Polypeptiden besteht [72]. Ein kurzes ARP1-Filament (*Actin related protein 1*) bildet das zentrale Gerüst dieser Struktur [73]. Dieses Filament besitzt ebenfalls eine intrinsische Polarität und weist wie Aktin ein sogenanntes dorniges (*barbed*) und ein spitzes

(*pointed*) Ende auf. Am spitzen Filamentende bindet ein Unterkomplex bestehend aus ARP11 und p62 (DCTN4), welcher vermutlich die Interaktion von Dynactin mit dem kortikalen Aktin vermittelt sowie die Untereinheiten p25 (DCTN5) und p27 (DCTN6) ([74], [72], [75], [76]). Am dornigen Filamentende binden ein p150<sup>glued</sup> (DCTN1) Dimer, ein Tetramer der Untereinheit p50 (DCTN2, Dynamitin) sowie p24 (DCTN3) und CapZ (*Actin-capping protein Z*) Heterodimere [77, 71, 72].

Ausgehend vom ARP1-Filament des Stabs ragt ein etwa 25 nm langer Arm hervor, welcher von der größten Dynactin Untereinheit p150<sup>glued</sup> gebildet wird. Das äußere Ende dieses Arms bildet den N-Terminus und enthält in seiner globulären Endstruktur eine Mikrotubuli-Bindestelle sowie eine CAP-Gly Domäne [71, 68]. Demnach kann diese Armstruktur sowohl an Mikrotubuli binden, als auch mittels der CAP-Gly Domäne mit den +TIP Proteinen EB1 und CLIP170 interagieren [23].

Proteine der Kinesin Superfamilie (KIFs) bilden die zweite große Gruppe an Mikrotubuli-basierten Motorproteinen, welche ebenso wie das zytosplasmatische Dynein primär für den intrazellulären Transport zuständig sind [58, 78, 79]. Kinesine spielen jedoch auch im Aufbau und der Funktion der mitotischen Spindel eine wichtige Rolle [80, 81, 82]. In ihrer globulären Motordomäne weisen Kinesine zwei konservierte Sequenzen mit hoher Sequenzhomologie (30-60 %) auf, welche ATP bzw. Mikrotubuli binden können [78, 81, 83]. Zwei andere Regionen, der filamentöse Stiel und der globuläre Schwanzbereich, sind hingegen sehr variabel [80, 84]. Die globuläre Motordomäne wird oft als "Kopf" bezeichnet. Hier wird ATP hydrolysiert und in mechanische Energie umgewandelt, welche zur Bewegung entlang von Mikrotubuli genutzt werden kann [83]. Die meisten Kinesine bilden über ihre Stielregion Dimere. Es wurden sowohl Homo- als auch Heterodimere beschrieben. Einige Kinesine mit kurzen *Coiled-Coil* Strukturen existieren auch als funktionelle Monomere (Review [83]). Kinesine binden ihr Transportgut mit Hilfe der variablen Schwanzregion [80, 84]. Einige dieser Motorproteine können zudem in der mitotischen und meiotischen Spindel Chromosomen entlang von Mikrotubuli gegeneinander verschieben [83].

Die Kinesin Superfamilie (KIFs) unterteilt sich in drei Hauptgruppen, die bezüglich der Positionierung der Motordomäne innerhalb des Moleküls unterschieden werden: Kinesine mit N-terminaler Motordomäne (N-KIFs), Kinesine mit mittiger (M-KIFs) oder C-terminaler Motordomäne (C-KIFs). Dabei bestimmt die intramolekulare Position der Motordomäne auch die Direktionalität der KIFs (Review [85]). N-terminale und M-KIFs zählen zu den Mikrotubuli Plus-Ende gerichteten Motoren, wohingegen die C-KIFs zu den Minus-Ende gerichteten Motoren gehören. Die N-KIFs nehmen die größte Gruppe der bisher identifizierten Kinesine ein. Diese Kinesinproteine kommen sowohl als Monomere, Dimere oder Tetramere vor [85] und sie spielen vielfältige Rollen im intrazellulären Transport und der Mitose. Einer der bekanntesten Vertreter der M-Kinesine ist MCAK (*Mitotic Centromer Associated Kinesin*, KIF2C), der vorwiegend in der Mitose aktiv ist und besonders konzentriert am Zentrosom und den inneren Kinetochoren lokalisiert ist [86]. Sowohl MCAK als auch das verwandte M-KIF, KIF2A, können Mikrotubuli depolymerisieren [59]. Eine Mikrotubuli destabilisierende Rolle wird auch Vertretern der N-KIFs (Kinesin-8 Familie) zugeschrieben. Es ist jedoch nicht klar, ob die Kinesinproteine aus Säugetieren (KIF18A und KIF18B) aktiv depolymerisieren oder als Mikrotubuli-“capping“ Proteine die Polymerisation blockieren [87]. Zu den C-terminalen KIFs zählen hauptsächlich Kinesine, die in der Meiose, der Mitose oder in den dendritischen Transport involviert sind [85, 88]. Es wurden in Säugetieren 45 KIF-Gene identifiziert [85]. Im Jahr 2004 wurde von Lawrence *et al.* eine neue, einheitliche Nomenklatur für Kinesine eingeführt [89], welche 14 verschiedene Kinesin-Familien unterscheidet. 12 Familien umfassen die N-KIFs mit insgesamt 39 Vertretern. Die M- und C-KIFs werden nur jeweils durch eine Familie mit jeweils 3 Vertretern repräsentiert. Somit wird deutlich, dass Kinesine überwiegend für den Transport in Richtung des Mikrotubuli Plus-Endes, wie z.B. im anterograden Transport zur Zellperipherie zuständig sind.

## 1.4 P19 Zellen als Modellsystem zur Untersuchung der Neurogenese

Zur Untersuchung der neuronalen Differenzierung wurden in dieser Arbeit P19 Zellen als Modellsystem ausgewählt. P19 zählen zu den embryonalen Karzinoma-Zelllinien. Dabei handelt es sich um pluripotente Stammzellen von murinen Teratokarzinomen, welche aus C3H/He Mäusen isoliert wurden [90]. Diese Zelllinie wurde direkt aus einem primären Teratom generiert und weist einen normalen männlichen Karyotyp, 40:XY, auf [90]. Die Zellen können im undifferenzierten Zustand kultiviert werden, nur ein sehr kleiner Anteil der Population differenziert sich spontan in Endodermzellen [91]. Werden P19 Zellen über mehrere Tage mit DMSO behandelt, so differenzieren sie zu Skelett- und Herzmuskelzellen. Neuronale Zelltypen können in diesen Populationen nicht detektiert werden [92]. Nach einer Behandlung mit Retinsäure (RA) differenzieren P19 Zellen hingegen in verschiedene neuronale Zelltypen, inklusive Neuronen, Gliazellen und Oligodendrozyten [91]. Unter diesen Bedingungen werden keine Muskelzellen gebildet. Eine zweitägige Behandlung mit RA genügt, um die Differenzierung einzuleiten [93]. Nach fünf bis sechs Tagen entsteht je nach Kultivierungsbedingungen eine mehr oder weniger homogene Population von kleinen postmitotischen Zellen mit länglichen Auswüchsen (Neuriten) [94]. Die verschiedenen Stadien der neuronalen Differenzierung von P19 Zellen ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

Die Entwicklung der Neuronen aus undifferenzierten P19 Zellen verläuft auf eine sehr ähnliche Weise wie die Entwicklung von embryonalem Hirngewebe [91, 93]. So führt zum Beispiel die Implantierung von embryonalen Karzinoma-Zellen in Embryos eines frühen Entwicklungsstadiums zu chimären Mäusen [95], bzw. die intrakranielle Implantierung von P19 Zellen zur Entwicklung von stabilen ausdifferenzierten Neuronen *in vivo* [96].

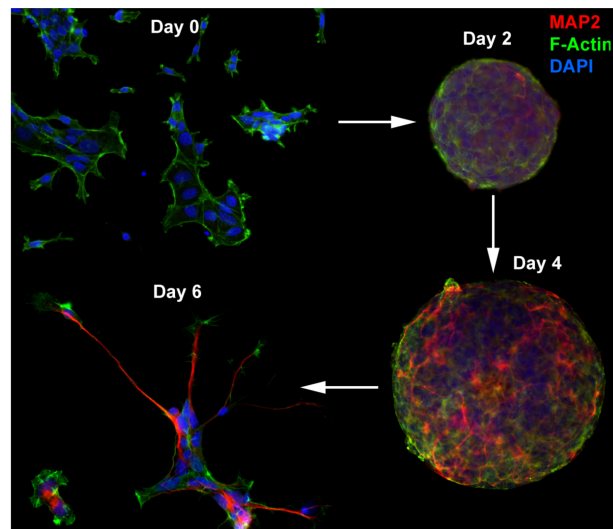


Abbildung 1.5: **Mittels Retinsäure induzierte Differenzierung von P19 Zellen** Gezeigt sind verschiedene Stadien der neuronalen Differenzierung von P19 Zellen ausgelöst durch eine Behandlung mit Retinsäure. In den ersten 48 h wird dem Differenzierungsmedium RA zugegeben (Endkonzentration  $0,5 \mu\text{M}$ ), um die Differenzierung einzuleiten. Während dieser Zeit werden die P19 Zellen in nicht-beschichteten Gewebeschalen kultiviert, so dass sich schwimmende Zellaggregate, sogenannte *embryonic bodies*, bilden. Bereits nach 48 Stunden sind die ersten differenzierten Neuronen in diesen *embryonic bodies* identifizierbar. Nach dem vierten Tag werden die P19 normalerweise trypsinisiert und auf beschichteten Kulturschalen ausgesät. Die ausdifferenzierten Zellen exprimieren typische neuronale Marker, wie z.B. MAP2 und bilden Neuriten mit einer für Neuronen typischen Morphologie. Bild: Dr. Leif Dehmelt

Als weitere Methode zur Einleitung der neuronalen Differenzierung erwies sich die transiente Transfektion von neuronalen Transkriptionsfaktoren. Dabei handelt es sich um *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren wie z.B. NeuroD, NeuroD2, MASH1, MATH1-3 und Neurogenin1-3. Alle diese Faktoren werden während der neuronalen Determinierung und Differenzierung exprimiert [97]. Die Dauer und der Zeitraum der Expression dieser Faktoren variiert jedoch. Interessanterweise korre-

lieren diese Faktoren nicht nur mit der neuronalen Differenzierung - sie fungieren auch als Masterregulatoren in der neuronalen Differenzierung. So konnte gezeigt werden, dass bereits transiente Expression von NeuroD2, MASH1, Neurogenin1 oder verwandten bHLH Proteinen ausreicht, P19 Zellen in Abwesenheit von Retinsäure zu differenzieren [97]. Die Differenzierung nach Transfektion dieser Faktoren verlief nach einem stabilen Programm, welches eine Umprogrammierung der Genexpression, inklusive der Aktivierung endogener neuronaler Transkriptionsfaktoren und weiterer Neuronen-spezifischer Gene, Veränderungen der Zellmorphologie, wie z.B. die Bildung von Neuriten, und die Fähigkeit zur elektrischen Signalweiterleitung, einschloss [97].



## 1.5 Zielsetzung

Die Differenzierung von Stammzellen in spezialisierte Zelltypen ist ein kritischer Prozess, in den viele zelluläre Komponenten involviert sind. In dieser Arbeit wurde das Augenmerk auf die frühen Entwicklungsstadien von Neuronen gelegt, insbesondere auf morphologische Veränderungen wie die Initiation von Neuriten. Frühere Untersuchungen legen nahe, dass das Zytoskelett eine wichtige Rolle bei dieser Änderung der Zellform spielt. Besonderes Interesse lag daher an der Charakterisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts, das durch eine Vielzahl, bisher meist unzureichend studierter Regulatoren kontrolliert wird. Zunächst sollte die Relevanz einzelner Regulatoren in frühen Stadien der neuronalen Entwicklung bewertet werden. Basis dieser Untersuchung war ein Phänotyp-basierter Screen, mit dessen Hilfe Unterschiede in der Morphologie von neuronal differenzierten Zellen detektiert werden sollten. Als Modellsystem wurde die murine Stammzelllinie P19 verwendet. Nach Transfektion eines neurogenen Transkriptionsfaktors differenzieren P19 Zellen in Neuronen. Die Kombination von Differenzierung und RNA Interferenz sollte die Untersuchung von Effekten einer spezifischen Suppression einzelner Regulatoren auf die neuronale Entwicklung von P19 Zellen ermöglichen. Unterschiede zwischen Wildtyp und dem durch RNA Interferenz induzierten Phänotyp sollten im Hinblick auf den Prozess der neuronalen Differenzierung und die hiermit verbundenen morphologischen Veränderungen der Zellform interpretiert werden. Detailliertere mikroskopische Untersuchungen sollten zum Testen spezifischer Hypothesen und zur genaueren Charakterisierung ausgewählter Regulatoren hinzugezogen werden.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Material

Zusätzlich zu den aufgeführten Materialien sind Medien, Lösungen sowie verwendete Antikörper bei der jeweiligen Methode aufgeführt. Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit Aqua dest. angesetzt und autoklaviert oder steril filtriert.

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Es wurden Chemikalien der Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Applied Biosystems (Langen, Deutschland), Bio-Rad (München, Deutschland), Gibco (Karlsruhe, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), LI-COR (Lincoln, USA), PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) sowie Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Agarose Broad Range	Roth
Ampicillin	Roth
Blocking Buffer	LI-COR
Bradford Reagenz B6916	Sigma Aldrich
BSA	Serva
DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma Aldrich
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	PAN Biotech GmbH
DMSO	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Roth
FBS	PAN Biotech GmbH
FuGENE6 Transfektionsreagenz	Roche
Glycerin (wasserfrei)	AppliChem
HEPES	Roth
Kanamycin	Roth
Lipofectamine2000	Invitrogen
MEM Eagle (synthetisches Kulturmedium)	PAN Biotech GmbH
MEM clear (synthetisches Kulturmedium)	PAN Biotech GmbH
Methanol	Roth
Neomycin G418	Sigma Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH
Pyromycin	Sigma Aldrich
Pyruvat	PAN Biotech GmbH
Triton X-100	Serva
Trypsin-EDTA	PAN Biotech GmbH
Trypsin Inhibitor, <i>soybean</i>	Gibco
Tween-20	Serva
"BigDye" Terminator-Kit	Applied Biosystems

Tabelle 2.1: Reagenzien

### **2.1.2 Geräte**

Es wurden Geräte der folgenden Firmen genutzt: Amersham Biosciences (München, Deutschland), BioRad (München, Deutschland), Biostep (Jahnsdorf, Deutschland), Brandt (Wertheim, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland), Grant (Cambridge, USA), Heraeus (Hanau, Deutschland), Kern (Balingen-Frommern, Deutschland), Köttermann (Uetze/Hänigsen, Deutschland), LI-COR (Lincoln, USA), Memmert (Schwabach, Deutschland), Millipore (Schwalbach, Deutschland), New Brunswick Scientific (Enfield, USA), Techne (Jahnsdorf, Deutschland), Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland).

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Agarosegelkammer		Biostep
Bakterienschüttler	TC-7, I 26	New Brunswick Scientific
Mastercycler		Eppendorf
Mini Trans-Blot Cell System		BioRad
Neubauer-Zählkammer		Brandt
Odyssey Infrarot Imaging System		LI-COR
Pipetten		Eppendorf
PAGE Kammer		BioRad
Reinstwasseranlage	Milli-Q	Millipore
Thermoblock	QBD4	Grant
	DB-3D	Techne
Tischmixer	G-560 Vortex	Fisher Scientific
Tischzentrifugen	Eppendorf 5424	Eppendorf
	Eppendorf 5809 R	Eppendorf
UV/Vis-Spektrometer	Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
Waage	440-35N	Kern
Wärmeschrank	Modell 100-800	Memmert
Wasserbad	D-3162	Köttermann
Zellinkubator	HERA cell 150	Heraeus
Zentrifugen	Sorvall Evolution RC	Thermo Scientific
Zentrifugenrotor	Sorvall SS-34	Thermo Scientific

Tabelle 2.2: Verwendete Geräte

### 2.1.3 Mikroskope

Mikroskop	Zubehör	Mikroskopie
Olympus IX81	Hamamatsu ORCA ER C4742-80-12AG Kamera Software: <i>ScanR</i> Filter: YFP/GFP/RFP, BFP	widefield
Olympus IX81	Hamamatsu ImageEM CCd-C9100-13 Kamera Software: <i>CellR</i> Filter: YFP/GFP/RFP, BFP, Cy7 TIRF Laser: 488 nm, 561 nm	widefield
Nikon Eclipse TE200		widefield
Zeiss Axiovert 200		widefield
Olympus FV1000	Laser: 488 nm, 568 nm	konfokal

Tabelle 2.3: Mikroskope

### 2.1.4 Software

NeuriteQuant [98]

ImageJ-Image Processing and Analysis in Java (Open Source Programm)

*ScanR*-Software (Olympus, Hamburg, Deutschland)

*CellR*-Software (Olympus)

ApE - A Plasmid Editor (Open Source Programm)

PRISM (GraphPad, La Jolla, USA)

## 2.1.5 Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
384-Loch Platten	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Anzuchtröhrchen für <i>E. coli</i> (13 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Deckel für 384-Loch Platten	Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
Reagiergefäße (0.5, 1.5, 2 ml)	Sarstedt
Reagiergefäße (5, 50 ml)	Sarstedt
Sterilgefäß mit Filteraufsatz für Medien	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Zellkulturschalen mit Glasboden (35 mm)	MatTek Corporation (Ashland, USA)
Falcon Zellkulturschalen (10 cm)	Sarstedt
Falcon Zellkulturschalen (6 cm)	Sarstedt
Zellkulturplatten (6-Loch Platten)	Greiner
Zellkulturplatten (12-Loch Platten)	Greiner
Zellkulturplatten (24-Loch Platten)	Greiner
Zellschaber	Sarstedt

Tabelle 2.4: Verbrauchsmaterial

Alle weiteren genutzten Verbrauchsmaterialien entsprachen der üblichen Laborausstattung.

## 2.1.6 Größenstandards

Verwendung	Größenstandard	Firma
Agarose-Gelelektrophorese	GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
	GeneRuler 50bp DNA Ladder	Fermentas
SDS-PAGE / Western Blot	HiMark™ Pre-Stained HMW	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
	Odyssey Two Color Protein Marker	LI-COR (Lincoln, USA)
	Precision Plus Protein Dual Color Standards	BioRad (München, Deutschland)

Tabelle 2.5: Verwendete Größenstandards

## 2.1.7 Enzyme

Enzyme	Verwendung	Bezugsquelle
<i>Phusion Hot Start</i> DNA-Polymerase	PCR	Finnzymes (Vantaa, Finland)
Restriktionsendonukleasen	Restriktion	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Calf Intestine Phosphatase (CIP)	Dephosphorylierung	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	Ligation	New England Biolabs

Tabelle 2.6: Verwendete Enzyme



## 2.1.8 Reagenzienkits

Kit	Bezugsquelle
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

Tabelle 2.7: Reagenzienkits

## 2.1.9 Verwendete Oligonukleotid-Primer

Nr.	Primer	Primersequenz 5'-3'	Schnittstelle
161	ECFP BamHI 1s	CGGGATCCGGGATGGTGAGCAAGGGCGAG	BamHI
162	ECFP NotI 726as	CGCGCCGGCGCCCTTACTTGTACAGCTCGTCCA	NotI
85	GFP1 EcoRI s	CGGAATTCACCGGTCGCCACCATGGTG	EcoRI
84	GFP734 BamHI as	CGGGATCCTTAAGATAACATTGATGAGTTTGGAC	BamHI
116	Ub AseI 1s	CGGCATTAATGATCTGGCCTCCGCGCCGGGT	AseI
117	Ub NheI 1216 as	GGCCGCTAGCCGACCTGCAGCCCAAGCTTCGTC	NheI
154	Seq Ub 833s	CACATGAAGCAGCAGACTT	
22	pBabe 5s	CTTTATCCAGCCCTCAC	
17	pBabe 3rev	ACCCTAACTGACACACATTCC	
158	pEGFP-N1 500F	TAACAACCTCCGCCCCATTGAC	
95	T7 long forward	TAATACGACTCACTATAGGG	
97	Terminator reverse	AGTGGCACCTTCCAGGGTCAA	
155	pEGFP-C1 1266s	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	
159	pEGFP-N1 771R	GACACGCTGAACTTGTGGC	

Tabelle 2.8: Verwendete Oligonukleotid-Primer

## 2.1.10 Verwendete Konstrukte

Es wurden für diverse Experimente sowie zur Klonierung weiterer DNA-Konstrukte folgende Plasmide verwendet: pBABEpuro (Bob Weinbergs Labor), pCS2-NeuroD2 [97], pEGFP-Tub (Clontech), pEGFP-N1 (Clontech), pmCherry-N1 (Clontech) und pUB-GFP [99].

In der nachfolgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit bzw. von der Masterstudentin Verena Hannak erstellten Konstrukte aufgelistet. pUB-NeuroD2 wurde durch Einsetzen des Inserts NeuroD2 aus dem Plasmid pCS2-NeuroD2 in den Vektor pUB-GFP über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und NotI erzeugt. Über die gleichen Schnittstellen wurde auch das DNA-Konstrukt pUB-mCherry erzeugt, dabei wurde das Insert mCherry des Plasmids pm-Cherry-N1 sowie der Vektor pUB-GFP verwendet. pBABEpuro-UB wurde durch Einsetzen des hUBc-Promoters aus dem Plasmid pUB-GFP in den Vektor pBABEpuro über die Restriktionsschnittstellen Sall und EcoRI generiert. Die DNA-Konstrukte pUB-mCherry-Aktin sowie pUB-EGFP-Tubulin wurden im Rahmen der Masterarbeit von Verena Hannak generiert [100].

<b>Konstrukt</b>	<b>Vektor</b>	<b>Insert</b>	<b>Enzyme</b>
pUB-NeuroD2 (diese Arbeit)	pUB-GFP [99]	NeuroD2 [97]	EcoRI-NotI
pUB-mCherry (diese Arbeit)	pUB-GFP [99]	mCherry (Clontech)	EcoRI-NotI
pBABEpuro-UB (diese Arbeit)	pBABEpuro (Bob Weinbergs Labor)	hUBc-Promoter [99]	Sall-EcoRI
pUB-mCherry-Aktin [100]	pUB-mCherry (diese Arbeit)	mRFP-Actin [101]	EcoRI-BamHI
pUB-EGFP-Tubulin [100]	pEGFP-Tub (Clontech)	hUBc-Promoter [99]	AseI-NheI

Tabelle 2.9: Verwendete Konstrukte

## 2.1.11 Antikörper

1. Antikörper	Spender	Konzentration	Bezugsquelle
Dync1h1	Maus	IF [1:50] WB [1:200]	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
EB1 (KT51)	Ratte	IF [1:500] WB [1:2000]	Absea (Beijing, China)
EB2 (KT52)	Ratte	IF [1:500] WB [1:2000]	Absea
EB3 (KT36)	Ratte	IF [1:500]	Absea
EB3 (KT53)	Ratte	WB [1:500]	Absea
Eg5	Kaninchen	IF [1:500]	Abcam (Cambridge, UK)
GAPDH	Maus	WB [1:1000]	Pierce-Antibody (Rockford, USA)
GAPDH	Kaninchen	WB [1:1000]	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
INCENP	Kaninchen	WB [1:1000]	Sigma Aldrich
INCENP (C-18)	Ziege	WB [1:200]	Santa Cruz Biotechnology
MKLP1 (N-19)	Kaninchen	IF [1:100]	Santa Cruz Biotechnology
MTAP2	Kaninchen	IF[1:2000]	Shelley Halpains Labor
Oct4	Kaninchen	IF [1:1000]	Abcam
TPX2 (C-21)	Ziege	IF [1:500]	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -Tubulin (acetyliert)	Maus	IF [1:500]	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -Tubulin (tyronisiert)	Ratte	IF [1:500]	Santa Cruz Biotechnology
TU20 (neuronales Tubulin)	Maus	IF [1:2000]	Exbio (Vestec, Tschechien)
TUJ1 (neuronales Tubulin)	Maus	IF [1:2000]	A. Frankfurters Labor

Tabelle 2.10: Erstantikörper

<b>2. Antikörper</b>	<b>Spender</b>	<b>Reaktivität</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Alexa Fluor 488 IgG	Ziege	Kaninchen	IF [1:1000]	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa Fluor 488 IgG	Ziege	Maus	IF [1:1000]	Invitrogen
Alexa Fluor 568 IgG	Ziege	Kaninchen	IF [1:1000]	Invitrogen
Alexa Fluor 568 IgG	Ziege	Maus	IF [1:1000]	Invitrogen
Alexa Fluor 568 IgG	Ziege	Ratte	IF [1:1000]	Invitrogen
Alexa Fluor 750 IgG	Ziege	Maus	IF [1:1000]	Invitrogen
Odyssey IRDye680 IgG	Esel	Ziege	WB [1:5000]	LI-COR (Lincoln, USA)
Odyssey IRDye680 IgG	Ziege	Kaninchen	WB [1:5000]	LI-COR
Odyssey IRDye680 IgG	Ziege	Maus	WB [1:5000]	LI-COR
Odyssey IRDye800 IgG	Esel	Ziege	WB [1:5000]	LI-COR
Odyssey IRDye800 IgG	Ziege	Kaninchen	WB [1:5000]	LI-COR
Odyssey IRDye800 IgG	Ziege	Maus	WB [1:5000]	LI-COR

Tabelle 2.11: Zweitantikörper

### 2.1.12 Verwendete Mikroorganismen (*E. coli*-Stämme)

Es wurden folgende *E. coli*-Bakterienstämme zur Transformation von Plasmid-DNA verwendet.

<b><i>E. coli</i> Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Herkunft</b>
Top10	Bakterienstamm von Invitrogen $F^-$ mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 araD139 $\Delta$ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL ( <i>Str</i> <sup>R</sup> ) endA1 nupG $\Delta$ -	Invitrogen (Karlsruhe)
XL10Gold	Bakterienstamm von Stratagene TetR $\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10(TetR) Amy CamR]	Stratagene (Mannheim)

Tabelle 2.12: *E. coli*-Stämme

### 2.1.13 Nährmedien für Bakterien

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

Tabelle 2.13: Nährmedien für Bakterien

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

Tabelle 2.14: Antibiotika für Nährmedien

### 2.1.14 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Gewebe	Morphologie	DSMZ Nr.
P19	Maus	Embryo	Teratoma	ACC 316
Plat-E	Mensch	Embryo	Niere	RV 101

Tabelle 2.15: Verwendete Zelllinien

### 2.1.15 Nährmedien für Zelllinien

Die Nährmedien für eukaryotische Zellen wurden steril filtriert und bei 4°C gelagert.

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
P19 Wachstumsmedium	10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Pyruvat 1 % (v/v) x mM L-Glutamin 100 µg/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin ad x ml MEM Eagle
Plat-E Wachstumsmedium	10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) x mM L-Glutamin 100 µg/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin ad x ml DMEM
P19 Differenzierungsmedium	5 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Pyruvat 1 % (v/v) x mM L-Glutamin ad x ml MEM Eagle oder MEM clear
Einfriermedium	Wachstumsmedium 5 % DMSO (steril)

Tabelle 2.16: Nährmedien für Zelllinien

Zur Selektion von stabilen eukaryotischen Zelllinien wurden folgende Antibiotika den bereits beschriebenen Nährmedien zugesetzt.

<b>Antibiotikum</b>	<b>Konzentration</b>
Blastomycin	10 µg/ml
Puromycin	0,5 µg/ml
G418	1 mg/ml

Tabelle 2.17: Antibiotika zur Selektion von stabilen Zelllinien

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Polymeraseketten-Reaktion (PCR)

Die Polymeraseketten-Reaktion ist eine Standardmethode zur selektiven Amplifizierung von DNA-Segmenten durch eine sich zyklisch wiederholende Abfolge von Reaktionsschritten [102, 103]. Die zu vermehrenden DNA-Abschnitte werden dabei durch die Wahl der 5'- und 3'-Oligonukleotide festgelegt. Die Abfolge, der sich wiederholenden Schritte, beinhaltet die Denaturierung der DNA, die Hybridisierung der einsträngigen DNA mit den Oligonukleotid-Primern und die Kettenverlängerung (Elongation) mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase an den 3'OH-Primer-Enden.

Die DNA-Amplifikationen wurden im präparativem Maßstab im Mastercycler von Eppendorf durchgeführt und es wurde die *Phusion Hot Start High-Fidelity*-DNA-Polymerase (Finnzymes) eingesetzt. Zur optimalen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde ein 2-Stufen-Programm verwendet, da durch eine schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur eine unspezifische Bindung der Primer an die Template-DNA verhindert wird. Die Hybridisierungstemperaturen wurden aufgrund der angegebenen Schmelztemperaturen der gewählten Oligonukleotidprimer festgelegt.

Ein präparativer Reaktionsansatz einer PCR setzte sich folgendermaßen zusammen:

Volumen	Komponente	Endkonzentration
10 µl	5x <i>Phusion</i> HF Puffer	1x
1 µl	dNTP Mix (10 mM)	200 µM
2,5 µl	Primer 5'	0,5 µM
2,5 µl	Primer 3'	0,5 µM
1 µl	Template DNA	100-300 ng
0,5 µl	<i>Phusion Hot Start</i> DNA Polymerase	0,02 unit/µl
32,5 µl	ddH <sub>2</sub> O	

Tabelle 2.18: Pipettierschema für einen 50 µl PCR-Ansatz

	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
	Initiale Denaturierung	98°C	30 s	1
Stufe 1	Denaturierung	98°C	15 s	
	Hybridisierung	52°-59°C	10 s	5
	Elongation	72°C	60 s	
Stufe 2	Denaturierung	98°C	15 s	
	Hybridisierung	59°-68°C	10 s	35
	Elongation	72°C	60 s	
	Finale Elongation	72°C	5 min	1
		8°C	∞	

Tabelle 2.19: 2-Stufen-PCR-Programm

## 2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli*-Kulturen wurde mittels QIA-prep Spin Miniprep Kit oder im größeren Maßstab mit Hilfe des Endo-Free Plasmid Maxi Kits (beide von Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.



### **2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von DNA wurde über die Bestimmung der Absorption im UV/VIS Spektrometer (Amersham Biosciences) ermittelt. Basierend auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm (OD<sub>260</sub>, Optische Dichte) lässt sich die Konzentration an doppelsträngiger DNA berechnen. Einen Absorptionswert von 1 besitzt eine DNA-Lösung mit der Konzentration von 50 µg/ml in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Proteine absorbieren aufgrund der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm. Das Verhältnis von OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> gibt Aufschluss über eine Proteinkontamination der DNA-Probe. Der Quotient beträgt bei einer reinen DNA-Lösung 1,8 - 2,0.

### **2.2.4 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese**

Die horizontale Agarosegelelektrophorese trennt doppelsträngige DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe auf. Diese Methode wurde sowohl zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau, als auch zur analytischen Restriktionsanalyse bzw. zur Charakterisierung von PCR-Produkten verwendet.

Bei dieser Methode wird die negative Ladung des Phosphatrückgrates der DNA genutzt, da aufgrund dieser sich die DNA-Moleküle im elektrischen Feld in Richtung des Pluspoles bewegen und somit nach ihrer Größe im Gel aufgetrennt werden können. Die Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in 1 %igen Agarosegelen in 1x-TAE-Puffer bei 100 V aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurden Agarosegele gegossen, die mit einer 0,025 % Ethidiumbromidlösung (4 Tropfen pro 100 ml) versetzt waren. Ethidiumbromid ist ein sequenzspezifischer Fluoreszenzfarbstoff, welcher in dsDNA interkaliert, so dass die DNA-Fragmente mit Hilfe eines UV-Illuminators bei einer Anregungswellenlänge von 302 nm detektiert und dokumentiert werden konnten.

<b>Pufferlösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
6x DNA-Probenpuffer	50% Glycerol 0,25% (w/v) Bromphenolblau
1x TAE Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,3

Tabelle 2.20: Verwendete Puffer bei einer Gelelektrophorese

### 2.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden nach der Gelelektrophorese aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extrak-tion Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

### 2.2.6 Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktions- endonukleasen

Die hydrolytische Spaltung von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von Re-striktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs durchgeführt. Für einen Reaktionsansatz wurden die mitgelieferten, auf die entsprechen-  
den Enzyme abgestimmten Puffer verwendet und nach Angaben des Her-  
stellers inkubiert. Die Hydrolyse mit zwei Enzymen wurde gleichzeitig  
durchgeführt, sofern die Bedingungen identisch waren, andernfalls wur-  
de sequentiell restringiert. Die Reaktion erfolgte in einer zwei stündigen  
Inkubation bei 37°C. Nach allen präparativen Restriktionsansätzen wurde  
eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, um die gewünschten DNA-  
Fragmente aus dem Gel zu extrahieren. Bei analytischen Ansätzen diente  
das folgende Agarosegel lediglich zur Dokumentierung der Restriktions-  
banden.

<b>Volumen</b>	<b>Komponente</b>
x $\mu\text{l}$	Plasmid-DNA (3-5 $\mu\text{g}$ )
2-2,5 $\mu\text{l}$	Restriktionsendonuklease 1
2-2,5 $\mu\text{l}$	Restriktionsendonuklease 2
5 $\mu\text{l}$	10x NEB-Puffer
(0,5 $\mu\text{l}$	100x BSA)
ad 50 $\mu\text{l}$	ddH <sub>2</sub> O

Tabelle 2.21: Präparativer Reaktionsansatz

<b>Volumen</b>	<b>Komponente</b>
1 $\mu\text{l}$	Plasmid-DNA
1 $\mu\text{l}$	Restriktionsendonuklease 1
1 $\mu\text{l}$	Restriktionsendonuklease 2
2 $\mu\text{l}$	5x NEB-Puffer
(0,2 $\mu\text{l}$	100x BSA)
ad 20 $\mu\text{l}$	ddH <sub>2</sub> O

Tabelle 2.22: Analytischer Reaktionsansatz

## 2.2.7 Dephosphorylierung von Vektoren

Nach der hydrolytischen Spaltung wurden Vektoren mittels der Calf Intestine Phosphatase (CIP) von New England Biolabs nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert, um eine Verknüpfung der beiden restringierten Enden ohne Einbau eines Inserts zu verhindern.

## 2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation wurden ein restringierter Vektor und ein mit den gleichen Restriktionsschnittstellen versehenes Insert miteinander verknüpft. Es wurde eine T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) verwendet, welche die DNA-Enden unter ATP-Hydrolyse kovalent miteinander verknüpft.

Eingesetzt wurden 10 - 50 ng linearisierter Vektor mit einem 3 - 5 fach molaren Überschuss an Insert-DNA zusammen mit 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase und 2  $\mu$ l T4-Ligase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l. Ein Ligationsansatz wurde 1 - 2 Stunden bei RT inkubiert.

### **2.2.9 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen**

Für die Herstellung von chemisch kompetenten Zellen wurde zunächst eine Vorkultur (XL-10 Gold oder Top10-Zellen) in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotika angesetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden mit dieser Vorkultur 200 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD von 0,6 bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Sobald die Bakterienkultur diese OD erreichte, wurde sie 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,4 fachem Volumen eisgekühlten Tbf-I Puffers resuspendiert. Es folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 5 min und eine Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 4000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Bakterienpellet in 0,04 fachem Volumen ebenfalls eiskalten Tbf-II Puffers resuspendiert. Die Zellsuspension inkubierte noch weitere 15 min auf Eis und wurde anschließend in 50  $\mu$ l Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Tbf-I	30 mM Kaliumacetat 100 mM Rubidiumchlorid 10 mM Calciumchlorid 50 mM Manganchlorid 15 % Glycerin mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 einstellen
Tbf-II	10 mM MOPS 10 mM Rubidiumchlorid 75 mM Calciumchlorid 15 % Glycerin mit 0,2 M Essigsäure auf pH 6,5 einstellen

Tabelle 2.23: Puffer zur Herstellung von kompetenten Zellen

### 2.2.10 Transformation und Retransformation von chemisch kompetenten Zellen

Bei einer Transformation wurde ein 50  $\mu$ l Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Zellen mit 5  $\mu$ l eines Ligationsansatzes versetzt, im Falle einer Retransformation mit 1  $\mu$ l Plasmid-DNA. Der Ansatz inkubierte für 30 min auf Eis und zur Steigerung der Transformationseffizienz folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min. Zur Ausbildung der plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz mit 1 ml LB (ohne Antibiotika) versetzt und für 1 - 2 Stunden bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert (10000 rpm, 1 min, Tischzentrifuge, Eppendorf), überschüssiges Medium abgenommen, das Pellet im Rücklauf resuspendiert und auf vorgewärmten LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert. Zum Wachsen der Transformanden wurde die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.11 Langfristige Lagerung von Bakterien als Glycerinkulturen

*E. coli*-Bakterien können in Form von Glycerinkulturen dauerhaft gelagert werden. Dafür wurde eine unter Selektionsdruck gehaltene Flüssigkultur mit 50% sterilem Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.12 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung der DNA-Sequenz wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* angewandt [104]. Diese Methode beruht auf der Vervielfältigung eines zu sequenzierenden DNA-Fragments mittels einer DNA-Polymerase. Die Komplementärstränge werden von einem Oligonukleotid-Primer zu einzelsträngiger DNA synthetisiert. Es wurde ein Ansatz gemacht, in dem sich die vier 2',3' Dideoxynukleotide (ddNTPs) ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP befanden. Diese wurden in die Sequenz an einer zufälligen Position eingebaut. An dieser Stelle brach die DNA-Synthese ab und es entstanden auf diese Weise Fragmente unterschiedlicher Länge. Die Detektion dieser markierten Dideoxynukleotide erfolgte über Fluoreszenz. Verwendet wurde das "BigDye" Terminator-Kit von Applied Biosystems.

Volumen	Komponenten
0,5 $\mu\text{l}$	Miniprep DNA (ca. 50 ng)
0,5 $\mu\text{l}$	Sequenzier-Oligonukleotidprimer (10 $\mu\text{M}$ )
2 $\mu\text{l}$	Terminator Mix
7 $\mu\text{l}$	ddH <sub>2</sub> O (RNase frei)

Tabelle 2.24: Sequenzieransatz

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	96°C	30 s
Denaturierung	96°C	30 s
Hybridisierung	50°C	15 s
Elongation	60°C	240 s

Tabelle 2.25: PCR-Programm der Sequenzierung

Wiederholung der Schritte 2-4 (25 Zyklen).

Auf die PCR folgte eine Ethanol-fällung der DNA. Dazu wurden 1  $\mu$ l EDTA (125 mM), 1  $\mu$ l Natrium-Acetat (3 M, pH 4,7) und 25  $\mu$ l Ethanol absolut dem Ansatz zugegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200  $\mu$ l Ethanol (70%) gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, Tischzentrifuge, Eppendorf). Der Überstand wurde wieder abgenommen und das Pellet bei RT getrocknet. Die Analyse der Sequenzierung erfolgte in einem ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) nach der Methode der Kapillarelektrophorese.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Herstellung von Zelllysaten mittels RIPA-Puffer

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden P19 Zellen in einer 12-Loch Platte (Fläche  $3,8 \text{ cm}^2$  pro *well*) kultiviert. Es wurden 180.000 P19 Zellen in 1 ml Differenzierungsmedium pro Loch ausplattiert und einen Tag im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden  $1,6 \mu\text{g}$  pUB-NeuroD2, gegebenenfalls zusammen mit  $80 \text{ pmol}$  siRNA ( $20 \mu\text{l}$  einer  $4 \mu\text{M}$  Stocklösung), ko-transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine2000 von Invitrogen ( $4 \mu\text{l}$  pro Loch) nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei Differenzierungs- bzw. siRNA-Experimenten folgte eine viertägige Inkubation im Brutschrank. Daraufhin wurde die Platte mit den Zellen auf Eis überführt und  $100 \mu\text{l}$  RIPA-Puffer pro Loch zugegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Schalenboden abgelöst, anschließend die Zellsuspension in ein  $1,5 \text{ ml}$  Eppendorfgefäß überführt, mehrfach auf- und abpipettiert und für  $30 \text{ min}$  auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation für  $30 \text{ min}$  bei  $4^\circ\text{C}$  und  $14000 \text{ rpm}$ . Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.



<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
RIPA-Puffer	1 ml Tris-HCl, pH 7,5 1 ml NaCl (Stock 1,5 M) 1 ml Na <sub>2</sub> EDTA (Stock 10 mM) 1 ml EGTA (Stock 10 mM) 1 ml Igepal (Stock 10 %) 1 ml Na-deoxycholate (Stock 10 %) 1 ml Na-pyrophosphate (Stock 25 mM) 1 ml $\beta$ -glycerophosphate (Stock 10 mM) 100 $\mu$ l SDS (Stock 10 %) 1 Tablette Protease-Inhibitoren (für 10 ml) 100 $\mu$ l PMSF (Stock 1 M) mit ddH <sub>2</sub> O auf 10 ml auffüllen

Tabelle 2.26: RIPA-Puffer zur Herstellung von Zelllysaten

### 2.3.2 Herstellung von Zelllysaten mittels heißer SDS-Lösung

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden P19 Zellen in einer 6-Loch Platte (Fläche 9,8 cm<sup>2</sup> pro *well*) kultiviert. Es wurden 360.000 P19 Zellen in 2 ml Medium pro Loch ausplattiert und einen Tag im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 4  $\mu$ g pUB-NeuroD2, gegebenenfalls zusammen mit 160 pmol siRNA (8  $\mu$ l einer 20  $\mu$ M Stocklösung), ko-transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine2000 von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet (5  $\mu$ l pro Loch). Bei Differenzierungs- bzw. siRNA-Experimenten folgte eine viertägige Inkubation im Brutschrank. Von den Zellen wurde das Medium abgenommen, 200  $\mu$ l Trypsin/EDTA pro Loch zugegeben und im Brutschrank für 10 min inkubiert. Danach wurden 800  $\mu$ l P19 Wachstumsmedium zugegeben und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit vorgewärmten PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. In der

Zwischenzeit wurde ein Heizblock auf 97°C vorgeheizt und darin eine 10 % ige SDS-Lösung (in 50 mM Tris-Puffer) vorgewärmt. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und sofort 40 µl heiße SDS-Lösung auf das Pellet gegeben. Die Proben wurden für weitere 10 min bei 97°C gekocht und anschließend bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Schließlich wurde der (möglichst) DNA-freie Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellysaten wurde die Methode nach Bradford verwendet [105]. Dazu wurde 500 µl Bradford-Reagenz mit 500 µl bidestilliertem Wasser verdünnt und 1 µl der zu bestimmenden Proteinlösung zugegeben. Die optische Dichte der Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Durch die Erstellung bzw. den Vergleich mit einer BSA-Eichgerade (16, 8, 4, 2, 1 mg/ml BSA) wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

### **2.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Es wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe im elektrischen Feld angewendet (Tris-Glycin-System). Dafür wurden 30 oder 50 µg Gesamtzellprotein mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben in Gradientengelen (4-15 %) von BioRad aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte bei 150 V für etwa 1-1,5 h je nach Proteingrößen. Die verwendeten Proteinstandards sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
5x SDS-Probenpuffer	0,6 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8 5 ml 50 % Glycerol 2 ml 10 % SDS pH-Wert einstellen nicht nötig
10x SDS-Laufpuffer	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS auffüllen auf 1 l mit ddH <sub>2</sub> O

Tabelle 2.27: Puffer für SDS-PAGE

### 2.3.5 Western Blot und Immunodetektion

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Millipore) transferiert. Dafür wurde zunächst die PVDF-Membran mit Methonal aktiviert und im Transferpuffer äquilibriert. Es wurde das Mini Trans-Blot Cell System von Bio-Rad verwendet, wobei das ungefärbte Polyacrylamidgel und die PVDF-Membran zwischen zwei Transferpuffer getränkte Whatman Papiere sowie Schwämme eingelegt und anschließend in die Aparatur eingehängt wurden. Der Behälter wurde mit eiskaltem Transferpuffer aufgefüllt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Spannung von 100 V für eine Stunde.

Mittels Immunodetektion wurden die immobilisierten Proteine auf der PVDF-Membran nachgewiesen. Dazu wurde die Membran zunächst in 5 ml Block-Puffer (LI-COR) inkubiert, wobei alle freien Bindungsstellen blockiert wurden. Anschließend wurde die Membran 1x mit TBS-T gewaschen und ÜN mit dem Primärantikörper (in Block-Puffer) unter Schwenken bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal mit TBST für jeweils 10 min bei RT gewaschen und anschließend für eine Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper (in TBS-Puffer) für 1 h bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem Odyssey

Infrarot Imaging System der Firma LI-COR. Die verwendeten Antikörper sind den Tabellen 2.10 und 2.11 zu entnehmen.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10x Transfer-Puffer	144 g Glycin 30 g Tris in 1 l ddH <sub>2</sub> O lösen pH-Wert einstellen nicht nötig
1x Transferpuffer	100 ml 10x Transfer-Puffer 700 ml ddH <sub>2</sub> O 200 ml Methanol
1x TBS-Puffer	6,06 g Tris 8,76 g NaCl in 800 ml ddH <sub>2</sub> O lösen einstellen auf pH 7,5 mit 1 M HCl mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
TBST-Puffer	1 ml Tween-20 in 1 l 1x TBS-Puffer

Tabelle 2.28: Puffer für Westernblots

## 2.4 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank der Firma NuAire durchgeführt sowie stets sterile Materialien und Medien verwendet. Sofern nicht anders erwähnt, wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die verwendeten Medien sind der Tabelle 2.16 zu entnehmen.

### 2.4.1 Kultivierung von P19 Zellen

Die Kultivierung von P19 Zellen erfolgte in 10 cm Zellkulturschalen mit 15 ml P19 Wachstumsmedium. Bei den P19 Zellen handelt es sich um adhärenz wachsende Zellen. Die Zellen wurden beim Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % passagiert. Dabei wurde zunächst das alte Medium von den Zellen abgenommen, die Kulturschale mit 2 ml Trypsin/EDTA gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA für 10 min im Brutschrank inkubiert. Trypsin löst enzymatisch Verbindungen der Zellen mit dem Schalenboden. Nach der Inkubation wurden 5 ml vorgewärmtes Wachstumsmedium zugegeben und die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren vom Schalenboden abgelöst und vereinzelt. Durch die Zugabe des serumhaltigen Wachstumsmediums wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins gestoppt. In eine neue Kulturschale wurden 15 ml vorgewärmtes P19 Wachstumsmedium gegeben und ca.  $5-6 \times 10^6$  Zellen (0,3-0,5 ml der Zellsuspension) ausgesät.

### 2.4.2 Kultivierung von Plat-E Zellen

Die Kultivierung der Plat-E Zellen verlief nach dem gleichen Protokoll wie bei den P19 Zellen. Allerdings wurden diese Zellen in einem separaten Inkubator kultiviert, da es sich um eine Virus-produzierende Zelllinie handelt. Die Zellen enthalten das Gen für die viralen Hüllproteine, welches durch eine regelmäßige Selektion mit Blasticidin stabil im Genom gehalten wird (s. Tab. 2.17). Plat-E Zellen produzieren Viren gegen Maus-spezifische Proteine erst nach einer Transfektion mit Plasmiden des

pBABE-Systems (retrovirales Expressionssystem), jedoch wurden bereits die untransfizierten Plat-E Zellen separiert, um mögliche Kontaminationen von anderen Maus-Zelllinien zu verhindern.

### 2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl von eukaryotischen Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurden nach der Trypsinierung 20  $\mu\text{l}$  der 1:5 verdünnten Zellsuspension auf die Kammer gegeben und die Zellen im mittleren Großquadrat gezählt. Diese Zahl wurde mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert, der aus der Fläche, dem Volumen und der Tiefe der Zählkammer hervorgeht. Aus dieser Rechnung ergibt sich die Anzahl der Zellen pro ml.

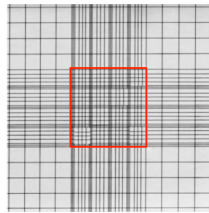


Abbildung 2.1: Neubauer-Zählkammer

### 2.4.4 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Um eukaryotische Zellen stabil aufbewahren zu können, wurden diese eingefroren und bei  $-150^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bei einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen trypsinisiert und abhängig von der Zelllinie inkubiert. Nach der Inkubation wurden 5 ml Wachstumsmedium zugegeben und die Zellsuspension 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen von einer 10 cm Kulturschale wurden in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und aliquotiert (je 500  $\mu\text{l}$ ). Diese Aliquots wurden in einem Isopropanolbad bei  $-80^{\circ}\text{C}$  ÜN langsam heruntergekühlt. Am folgenden Tag wurden die Zell-Aliquots in den  $-150^{\circ}\text{C}$  Schrank überführt und dort gelagert.

Eingefrorene Zellen müssen sehr schnell aufgetaut werden, damit sich bei dem Prozess keine Eiskristalle bilden, die die Zellen beschädigen könnten. Daher wurden die Aliquots in einem 37°C warmen Wasserbad geschwenkt bis die Zellsuspension wieder flüssig wurde. Die Zellen wurden in eine 10 cm Kulturschale transferiert, die zuvor mit frischem Wachstumsmedium im Brutschrank vorgewärmt und mit CO<sub>2</sub> angereichert wurde. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank nach dem normalen Kultivierungsprotokoll inkubiert.

#### 2.4.5 Transiente Transfektion mit Lipofectamine2000

Für die transiente Transfektion von DNA bzw. für die Ko-Transfektion von DNA und siRNA wurde Lipofectamine2000 von Invitrogen verwendet. Dieses Reagenz basiert auf kationischen Lipiden und besteht aus mehreren Komponenten, welche mit der negativ-geladenen DNA einen Komplex eingehen. Dieser gebildete Komplex kann von der Zielzelle aufgenommen werden. Transiente *forward*-Transfektionen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde dieses Reagenz hauptsächlich für die *reverse* Transfektion von DNA bzw. für die Ko-Transfektion von DNA und siRNA in 384-Loch-Platten (384 *well*-Platten) verwendet. In Versuchen, in denen nur DNA transfiziert werden musste, wurden 50-120 ng DNA in 7,5 µl klarem MEM pro *well* pipettiert. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt (1 min bei 1000 rpm). In der Zwischenzeit wurden 120 nl Lipofectamine2000 in 7,5 µl klarem MEM (pro *well*) für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Lipofectamine-Mix ins *well* gegeben und erneut zentrifugiert. Damit sich die Komplexe von DNA und Transfektionsreagenz bilden konnten, wurde die Platte für 20 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurden die P19 Zellen passagiert und die Zellzahl auf 8000 bzw. 4000 Zellen pro 85 µl eingestellt. Nach der 20-minütigen Inkubation wurde die Zellsuspension in die *wells* pipettiert und die Platte im Brutschrank inkubiert. Bei Differenzierungsversuchen wurden die P19 Zellen für vier Tage inkubiert.

Wurden Versuche mit siRNA durchgeführt, so wurde ein Pipettierschritt hinzugefügt. Erst wurde die gewünschte Menge an siRNA in 5  $\mu$ l klarem MEM in die *wells* pipettiert, zentrifugiert und anschließend die DNA sowie das Transfektionsreagenz in jeweils 5  $\mu$ l klarem MEM, Beschreibung siehe oben, hinzugegeben.

#### **2.4.6 Transfektion von Plasmid-DNA mittels FuGENE6**

Für transiente Transfektionen von Plasmid-DNA in größerem Maßstab (MatTek-Dish, 6-Loch-Platten) wurde das Reagenz FuGENE6 von Roche nach Angaben des Herstellers verwendet. Die zu transfizierenden Zellen wurden am Tag zuvor in einer 6-Loch-Platte oder einem MatTek in 2 ml Wachstumsmedium ausgesät. Die Zelldichte war abhängig von der verwendeten Zelllinie. Am darauffolgenden Tag sollten die Zellen eine Konfluenz von 70 - 80 % aufweisen. Für die Transfektion in einer 6-Loch-Platte oder einem MatTek wurden 6  $\mu$ l FuGENE6 mit 94  $\mu$ l klarem MEM vermennt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 1-2  $\mu$ g Plasmid-DNA zugegeben und der Ansatz für weitere 20 min bei RT inkubiert. Das DNA-Reagenz-Gemisch wurde daraufhin tropfenweise ins Medium der zu tranfizierenden Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Die Zellen wurden im Brutschrank mindestens einen Tag inkubiert.

#### **2.4.7 Differenzierung von P19 Zellen**

##### **Einleitung der neuronalen Differenzierung mittels NeuroD2**

Die Differenzierung von P19 Zellen kann durch eine transiente Transfektion des neuronalen Transkriptionsfaktors NeuroD2 eingeleitet werden. Die P19 Zellen wurden nach der Transfektion für vier Tage im Brutschrank inkubiert und anschließend fixiert oder nach zwei Tagen für Langzeit Live-Zell Experimente verwendet. Während der Differenzierung wurden die P19 Zellen in P19 Differenzierungsmedium gehalten, welches nur 5 % FBS



enthielt und ohne Antibiotika angesetzt wurde. In Differenzierungsexperimenten wurde das Konstrukt pUB-NeuroD2 verwendet (50 ng pro *well* einer 384 *well*-Platte; 1,6 µg pro *well* einer 12 *well*-Platte; 4 µg pro *well* einer 6 *well*-Platte). Bei Versuchen in 384-*well*-Platten oder in Kombination mit siRNA wurde NeuroD2 mittels Lipofectamine2000 (120 nl pro *well* einer 384 *well*-Platte) transfiziert. Im 384 *well*-Format wurde häufig pUB-GFP als Transfektionskontrolle ko-transfiziert. Dabei wurden 10 ng pUB-GFP verwendet. siRNAs wurden in den Mengen 0,5 pmol, 1 pmol, 2 pmol und 4 pmol pro *well* einer 384 *well*-Platte verwendet.

### **Neuronale Differenzierung mittels Retinsäure (RA)**

Um P19 mit Hilfe von Retinsäure differenzieren zu lassen, wurde zuerst eine 1 mM Stocklösung (verdünnt mit Ethanol) angesetzt. Diese Stocklösung wurde bei -20°C gelagert, sollte jedoch rechtzeitig vor dem Gebrauch aus dem Gefrierschrank geholt werden, so dass die Lösung RT erreicht. Bei diesem Differenzierungsprotokoll wurden P19 Zellen nicht in Zellkulturschalen ausplattiert, sondern in unbeschichteten Bakterienkulturschalen, damit sie sich nicht am Boden absetzen und einen Monolayer bilden konnten. Am ersten Tag wurden  $1,3 \cdot 10^6$  Zellen in 10 ml P19 Differenzierungsmedium in die Bakterienkulturschale ausgesät. Die Zellen wurden für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Am Tag drei wurde das Medium gewechselt. Da die Zellen wegen der fehlenden Beschichtung nicht adhärend wachsen konnten, wurde dafür die gesamte Zellsuspension abgenommen und in ein 15 ml Falcon gegeben. Nun wurde das Falcon für 10 min in den Brutschrank gestellt, so dass sich die Zellen unten absetzen konnten. Daraufhin wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen in frischen 10 ml Differenzierungsmedium, welchem Retinsäure (Endkonzentration 0,5 µM; 5 µl der 1 mM Stocklösung pro 10 ml Medium) zugefügt wurde, wieder resuspendiert und zurück auf die Bakterienkulturplatte gegeben. Die Zellen inkubierten erneut zwei Tage im Brutschrank.

Abhängig vom geplanten Versuch wurden an Tag vier MatTek-Dishes (3,5

cm, mit Glasboden) mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Dafür wurden 150  $\mu$ l einer 0,1 % igen PLL-Lösung auf die Glasfläche pipettiert und die Dishes ÜN bei RT inkubiert. Vor Gebrauch der Dishes wurden diese am folgenden Tag mit sterilem PBS und klarem MEM gewaschen.

An Tag fünf wurden die P19 Zellen trypsiniert und entweder für mikroskopische Experimente auf MatTek-Dishes neu ausplattiert oder es wurde ein Zelllysate (z.B. für Westernblot, siehe 2.3.5) hergestellt. Die P19 Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt deutlich erkennbare, schwimmende Zellaggregate gebildet. Diese wurden vorsichtig mitsamt der kompletten Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt und für 10 min im Brutschrank inkubiert bis sich die Aggregate unten abgesetzt hatten. Daraufhin wurde das Medium abgenommen, 1 ml Trypsin/EDTA zugegeben und erneut im Brutschrank für 10 min inkubiert. Bei diesem Mal wurde das Falcon auf die Seite gelegt und ab und zu angeschnipst, so dass sich die Zellen aus den Aggregaten lösten. Um die enzymatische Aktivität des Trypsins zu stoppen, wurden 2 ml P19 Wachstumsmedium zugegeben und die Zellen durch auf und abpipettieren vereinzelt. Als nächstes wurden die Zellen gezählt und auf eine Dichte von 500.000 Zellen pro MatTek (entspricht 31.250 Zellen/150  $\mu$ l) mit dem P19 Differenzierungsmedium eingestellt. Die Zellsuspension wurde nur auf die beschichtete Glasfläche des Dishes gegeben. Vorsichtig wurden die Dishes in den Brutschrank gestellt und für zwei Stunden inkubiert. In der Zeit setzten sich die Zellen auf der PLL-Beschichtung ab und es konnte 2 ml vorgewärmtes Differenzierungsmedium zugegeben werden, ohne dass sich die Zellen erneut ablösten.

Nun wurden die Zellen noch ein bis zwei Tage weiter inkubiert. Je länger diese Inkubationszeit gewählt wurde, desto weiter fortgeschritten war das Wachstum der differenzierten Neuronen bzw. die Ausbildung der Neuriten. Diese konnte zusätzlich mit der Zugabe von Laminin (10  $\mu$ g/ml, in 1 ml Medium) stimuliert werden.

Die auf diese Weise differenzierten P19 Zellen wurden in Live-Zell Experimenten zur Untersuchung der Zytoskelett-Dynamik und in fixierter Form für spezifische Immunohistochemie verwendet.

## 2.4.8 Erstellung stabiler Zelllinien mittels Transduktion

Zur Erstellung stabiler Zelllinien mittels Transduktion wurden Plat-E Zellen [106] in Verbindung mit dem pBABE-System verwendet. Dabei handelt es sich um ein retrovirales Expressionssystem der dritten Generation, welches unter S1-Bedingungen gehandhabt werden kann. Die Plat-E Zellen sind eine Verpackungszelllinie, die virale Hüllproteine exprimiert. Die pBABE-Vektoren enthalten ein minimales virales Genom und Resistenzgene gegen verschiedene Antibiotika. Mit pBABE-Vektoren transfizierte Plat-E Zellen beginnen Virionen zu produzieren, die von dem *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV) abgeleitet sind. Diese Virionen können aufgrund der Spezifität ihrer Hüllproteine ausschließlich Mäusezellen infizieren. Diese Retroviren wurden zur Transduktion von P19 Zellen verwendet.

Zu Anfang wurden Plat-E Zellen mit einer Dichte von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml in einer 6-Loch-Platte ausplattiert und am nächsten Tag mittels FuGENE6 mit der gewünschten Plasmid-DNA transfiziert. Am Tag drei wurde das Medium der Plat-E Zellen durch P19 Wachstumsmedium ausgetauscht. Auf diese Weise konnte eine bessere Transduktion der P19 Zellen erreicht werden. Die P19 Zellen wurden ebenfalls in einer 6-Loch-Platte ausplattiert mit einer Dichte von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml. Am Morgen des vierten Tages wurde der Virusüberstand von den Plat-E Zellen abgenommen, mit  $4 \mu\text{g/ml}$  Polybrene versetzt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Von den P19 Zellen wurde das Wachstumsmedium abgenommen und 1 ml Virusüberstand zugefügt. Daraufhin wurden die P19 8 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde 1 ml frisches P19 Wachstumsmedium zugegeben. Die Virionen-produzierenden Plat-E Zellen konnten noch weitere Tage kultiviert werden, wobei jeden Tag erneut Virionen geerntet werden konnten. So war es möglich, die Transduktion am folgenden Tag zu wiederholen. Am Tag fünf wurden die transduzierten P19 Zellen passagiert und über die Virus-vermittelte Antibiotikaresistenz selektiert. In den ersten zwei Wochen wurde mit einer höheren Antibiotikakonzentration selektiert (s. Tab. 2.17). Nach dieser initialen Selektion wurde auf ein Zehntel

dieser Konzentration reduziert, um auch weiterhin einen geringen Selektionsdruck aufrecht zu erhalten.

#### **2.4.9 Erstellung stabiler Zelllinien mittels Transfektion**

Bei der Erstellung von stabilen Zelllinien mittels Transfektion wurde zunächst die gewünschte Plasmid-DNA mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease linearisiert und mit dem PCR-Purification Kit von Qiagen aufgereinigt. Die P19 Zellen wurden mit einer Dichte von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml in einer 6-Loch-Platte ausplattiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 1-2  $\mu\text{g}$  linearisierter DNA mittels FuGENE6 nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die Zellen wurden für einen Tag im Brutschrank inkubiert und anschließend mit Antibiotika selektiert. Die initialen Konzentrationen der verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 2.17 zu finden. Auch in diesem Fall wurde bei der initialen Selektion in den ersten zwei Wochen eine 10-fach höhere Konzentration als in der folgenden Kultivierung verwendet. Um eine Vereinzellung der stabil-transfizierten Zellen zu erreichen wurde FACS verwendet.

#### **2.4.10 Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung - FACS**

Zellen können anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften mittels der Fluoreszenz aktivierten Zellsortierung (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) voneinander getrennt werden. Bei dieser Methode können morphologische Unterschiede, die die Lichtstreuungseigenschaften beeinflussen oder welche verschiedene Fluoreszenzintensitäten von gelabelten Proteinen innerhalb der Zellen bei der Sortierung genutzt werden.

Bei der FACS-Analyse werden die einzelnen Zellen in einem Hüllstrom an einer Lichtquelle vorbeigeführt, wobei es sich bei der Lichtquelle um einen Laser mit definierter Wellenlänge handelt. Dabei lenken die Zellen spezifisch Photonen ab, welche von umgebenden Kollektoren aufgenommen werden. Die Ablenkung dieser Photonen wird mittels eines Computers analysiert. Auf diese Weise können Zellen beispielsweise aufgrund ver-

schiedener Fluoreszenzintensitäten voneinander unterschieden und getrennt werden.

In dieser Arbeit wurde die Methode bei der Generierung von stabilen Zelllinien angewandt. Zur Zellsortierung wurde das FACS Aria verwendet. Die Zellen wurden zuvor transfiziert oder mit viralen Partikeln transduziert, so dass die gewünschten Fluorophore bereits exprimiert wurden. Kurz vor der Zellsortierung wurden die Zellen passagiert, die Zellzahl bestimmt und auf eine Dichte von mindestens  $10^6$  pro ml eingestellt. Dem Wachstumsmedium wurde HEPES (Endkonzentration 10 mM; Stocklösung 1 M, pH 7,0) zugefügt, um den pH-Wert während der Prozedur konstant zu halten. Außerdem wurden die Zellen in ein spezielles FACS-Probenröhrchen überführt, welches mit Hilfe eines eingebauten Filters die Zellen noch einmal vereinzelt. Als Referenzprobe wurden nicht-transfizierte Zellen der zur sortierenden Zelllinie verwendet.

#### **2.4.11 RNA-Interferenz**

Sämtliche siRNAs, sowohl Mischungen aus vier Einzel-siRNAs als auch die separaten Einzel-siRNAs, wurden von der Firma Dharmacon (Thermo Fisher) bezogen. Die siRNAs (*small interfering RNAs*) wurden mittels reverser Transfektion in die Zellen eingebracht. Verwendet wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine2000, da es das gleichzeitige Einbringen von DNA und siRNA in die Zellen ermöglicht.

Da siRNA, ebenso wie DNA, sehr stabil ist, konnten 384-Loch-Platten für die Screenexperimente vorbereitet und eingefroren werden. Zur Vorbereitung bzw. Pipettierung der siRNA-Bibliothek wurde der Pipettierroboter MICROLAB®STAR von Hamilton (Martinsried, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe dieses Pipettierroboters wurde die siRNA zuerst mit klarem MEM verdünnt (0,5 pmol, 1 pmol, 2 pmol und 4 pmol pro *well* in einem Volumen von 5  $\mu$ l) und anschließend in die 384-Loch-Platten gegeben. Zur längeren Aufbewahrung der vorpipettierten Platten, wurden diese mit einer selbstklebenden Aluminiumfolie verschlossen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden die Platten aufgetaut und abzentrifugiert.

### 2.4.12 Immunohistochemie

Zur speziellen Anfärbung von Zellkomponenten wurde Immunohistochemie angewandt. Die Zellen wurden dafür zunächst mit vorgewärmter Fixierlösung für 20 min bei 37°C fixiert. Darauf folgte ein dreimaliger Waschschriff mit PBS. Anschließend wurden die Zellen mittels Triton-X-Lösung für 7 min bei RT permeabilisiert. Auch hier folgte ein dreimaliger Waschschriff mit PBS. Zum Blockieren der freien Bindungsstellen wurde eine 10% ige BSA-Lösung verwendet und die Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abnehmen des Block-Puffers wurde die primäre Antikörperlösung auf die Zellen gegeben und ÜN bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde bei 37°C mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Die Antikörperlösung wurde abgenommen, die Probe mehrmals mit PBS gewaschen und die Zellen in PBS bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für ein *well* einer 384-Loch-Platte wurde 80 µl der jeweiligen Lösung verwendet.

<b>Pufferlösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
1x PBS	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 2,68 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 0,24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen einstellen auf pH 7,4 mit HCl
Fixierlösung	4 % Formaldehyd in 1x PBS
Triton X-100 Puffer	0,25% Triton X-100 in 1x PBS
Block-Puffer	10 % (w/v) BSA in 1x PBS
Antikörperlösung	2 % (w/v) BSA in 1x PBS Antikörper (Tabellen 2.10; 2.11)

Tabelle 2.29: Verwendete Puffer bei der Immunohistochemie

## 2.5 Mikroskopische Methoden

### 2.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmessungen wurden am Olympus IX81 Mikroskop durchgeführt (siehe Tabelle 2.3). Es wurden je nach Experiment verschiedene Objektive (UPlans APO 10x NA 0,4; 20x NA 0,75; 40x 0,9 Luftobjektive) verwendet. Als Lichtquelle diente eine MT20-Einheit. Das Mikroskop wurde mit der *CellR*-Software gesteuert.

### 2.5.2 Langzeit *live*-Zell Aufnahmen - Timelapse Filme

Es wurden Langzeit *live*-Zell Aufnahmen durchgeführt, um die Differenzierung von P19 Zellen über einen längeren Zeitraum beobachten zu können. Die Aufnahmen erfolgten bei einer konstanten Temperatur von 35°C, da lebende Zellen verwendet wurden. Die Transfektion der Zellen erfolgte bereits zwei Tage zuvor in 384-Loch Platten. Die Differenzierung der P19 Zellen wurden daher nur an Tag drei und vier mikroskopisch aufgenommen, da an diesen Tag die Initiation und das Auswachsen der Neuriten zu beobachten ist. Der Zeitraum wurde so kurz wie möglich gewählt, um den Zellen übermäßigen Photostress durch Belichtung und Aufnahmen zu ersparen und um sicher zu gehen, dass die Differenzierung nicht zu sehr durch die äußeren Bedingungen beeinflusst wird.

Für die Langzeit-Aufnahmen wurden die Zellen mit 4 pmol/*well* siRNA sowie 50 ng NeuroD2 und 10 ng GFP ko-transfiziert. Die Kontrollzellen wurden mit „non-targeting“-siRNA (Dharmacon) transfiziert. Für den Autofokus wurde ein *well* nahe den Zellen mit fluoreszierendem Textmarker (Stabilo, Heroldsberg) dünn angefärbt. Während des gesamten Zeitraums der Differenzierung wurden die P19 in Differenzierungsmedium gehalten. Dem Medium wurde kurz vor Beginn der Aufnahmen HEPES (Endkonzentration 10 mM; Stocklösung 1 M, pH 7,0) zugegeben, um den pH-Wert während der Messung konstant zu halten. Um ein Verdunsten des Mediums zu vermeiden, wurden die *wells* mit Hilfe von Silicagel und einer Glasplatte luftdicht verschlossen. Abbildung 2.2 zeigt eine typische Ver-



suchsanordnung. Die verwendeten mikroskopischen Einstellungen sind Tabelle 2.30 zu entnehmen.

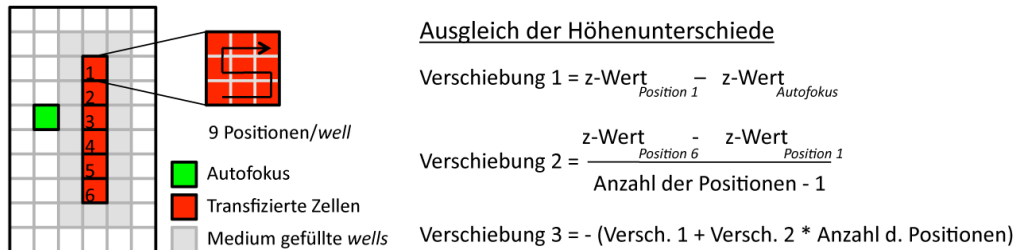


Abbildung 2.2: Versuchsanordnung und Einstellungen für eine Langzeit Live-Zell Aufnahme

<i>wells</i> mit transfizierten Zellen	Exposure	50 ms
	EMCCD Gain	40
	Lichtintensität	70-100 %
Autofokus	Exposure	5 ms
	EMCCD Gain	40
	Lichtintensität	3-12 %
	Range	3 $\mu\text{m}$
	Big Step	1 $\mu\text{m}$
	Fine Step	1 $\mu\text{m}$
Aufnahme	Filter	RFP/YFP/CFP
	Objektiv	UPlans APO 20x NA 0,75
	Wiederholungen	300-350
	Aufnahme-Zyklen	10 min
	Gesamtaufnahmezeit	ca. 48 h

Tabelle 2.30: Mikroskopische Einstellungen bei Langzeit-Aufnahmen

### 2.5.3 Total Interne Reflexion Fluoreszenz Mikroskopie (TIRF-M)

Die TIRF-Mikroskopie basiert auf der totalen Reflexion eines einstrahlenden Laserstrahls und der daraus resultierenden evaneszenten Welle. Da-

bei wird das einstrahlende Licht in einem Winkel auf den Objektträger gestrahlt, so dass eine Totalreflexion auftritt. Aufgrund dieser Totalreflexion entsteht diese sogenannte evaneszente Welle, die etwa 50 - 200 nm tief in die Probe eindringt. Infolge der geringen Eindringtiefe können nur Fluorophore in oder nahe der Zellmembran angeregt werden.

Daher wurde die TRIF-Mikroskopie in dieser Arbeit nur für Studien verwendet, in denen das dynamische Verhalten des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts in der Nähe des Zellkortex untersucht werden sollte. In diesem Fall war es von Vorteil, dass nur Bereiche nahe der Zellmembran betrachtet werden konnten, da sonst die Fülle an Zytoskelettstrukturen in der Zelle keine derart genaue Beobachtung, z.B. von einzelnen Mikrotubuli, erlaubt hätte.

Für die TIRFM Studien wurden P19 Zellen in Kulturschalen mit Glasboden (MatTek) ausgesät (Dichte 300.000 Zellen pro 3,5 cm Schale). Am folgenden Tag wurden die Zellen mittels FuGENE6 transfiziert (siehe 2.4.6), weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und dann am TIRF-Mikroskop (Olympus IX81) mit temperierter Wärmekammer aufgenommen. Zur Untersuchung des dynamischen Verhaltens von Zytoskelettstrukturen wurden die Zellen kurz vor den mikroskopischen Aufnahmen mit Laminin (Stock 1 mg/ml; Arbeitskonzentration: 10 µg/ml) stimuliert.

#### **2.5.4 High-Content Screen**

Als Screening-Methode wurde der High-Content Screen (HCS) gewählt. Hierbei handelt es sich im Gegensatz zum Hochdurchsatz-Screen (*High-Throughput-Screen*, HTS) um einen Zell-basierten Assay. Bei dieser Methode können multiple Parameter, wie zum Beispiel solche zur Beschreibung morphologischer Strukturen, gemessen werden. Diese Parameter können zur Identifizierung von Hits verwendet werden.

In dieser Arbeit sollten Änderungen in der Morphologie von differenzierten Neuronen identifiziert werden. Grundlage dieser Messungen waren in erster Linie Bilder von Zellen, welche mit einem Antikörper gegen das Neuronen-spezifische  $\beta$ III-Tubulin angefärbt wurden. Zusätzlich wurden

Bilder des ko-transfizierten, zytosolischen GFPs verwendet. In diesem HCS wurde die Differenzierung von P19 Zellen mit der Suppression von Mikrotubuli-regulierenden Proteinen mittels siRNA (siehe 2.4.11) kombiniert. Als Format wurden 384-*well* Platten der Firma Greiner verwendet. Pro Platte wurden maximal 60 verschiedene siRNAs getestet, dazu kamen noch jeweils 20 Positiv- und Negativkontrollen. Jede von diesen siRNAs wurde in vier verschiedenen Konzentrationen verwendet (Menge pro *well*: 0,5; 1; 2; 4 pmol). Diese verschiedenen Konzentrationen pro siRNA wurden jeweils in einem Quadrat angeordnet.



**Abbildung 2.3: Aufbau und Pipettierschema des High Content Screens.** Für den HCS wurden 384-*well* Platten verwendet. Es wurden pro Platte 20 Positiv- und 20 Negativkontrollen pipettiert. Zwischen diesen Reihen wurden die siRNAs der Mikrotubuli-Regulatoren in kleinen Quadranten angeordnet. Innerhalb dieser Quadrate wurden die verschiedenen siRNA-Mengen pipettiert. Es wurden pro Platte bis zu 60 Kandidaten getestet. Die äußeren Reihen an allen vier Seiten wurden für Konditionen des Screens nicht verwendet, da es problematisch ist diese Reihen bei der automatischen Bildaufnahme am Mikroskop anzufahren. Des Weiteren wird hierdurch die Problematik von ungleichmäßigem Zellwachstum durch ungleichmäßigen Gasaustausch bzw. ungleichmäßige Evaporation des Mediums in diesen äußeren Reihen umgangen. Zusätzlich angegeben ist ein Beispielansatz für einen Kandidaten.

Im primären Screen wurden siRNA-Mischungen aus vier Einzel-siRNAs verwendet, wohingegen im sekundären Screen nur von ausgesuchten Kandidaten die vier Einzel-siRNAs verwendet wurden. Auch diese wurden in vier verschiedenen Konzentrationen pipettiert. Pro Loch wurde die entsprechende siRNA, 50 ng pUB-NeuroD2 und 10 ng pUB-GFP ko-transfiziert (siehe Tabelle 2.9). Die Positivkontrollen wurden ebenfalls wie die Kan-

didaten mit dem neuronalen Transkriptionsfaktor NeuroD2 sowie einem zytosolischen GFP ko-transfiziert, jedoch ohne siRNA. Die Negativkontrollen wurden lediglich mit GFP transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine2000 verwendet, wovon 120 nl pro Loch pipettiert wurden.

In die 384-Loch Platten wurden zunächst die siRNAs (in 5  $\mu$ l) durch den Hamilton Pipettierroboter pipettiert. Von jeder Platte wurden gleich mehrere Wiederholungen angesetzt. Die fertigen Platten wurden mit einer selbstklebenden Alufolie verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Daraufhin wurden die Platten aufgetaut und einmal kurz zentrifugiert. Die Folien wurden entfernt und es folgte eine reverse Transfektion (siehe 2.4.5). Pro Loch wurden 8000 P19 Zellen ausgesät. Nach der Transfektion wurden die Platten für 4 Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und angefärbt (siehe 2.4.12). Zur Anfärbung des neuronalen Mikrotubuli-Zytoskeletts wurde der TU20 Antikörper von Invitrogen in einer Konzentration von [1:2000] verwendet. Es wurden sowohl der Zweitantikörper Alexa Fluor Goat-anti-Mouse 568 in einer Konzentration von [1:1000] als auch der Zellkernmarker DAPI [1:1000] verwendet. Es folgte die mikroskopische Aufnahme der Zellmorphologie. Die Aufnahmen wurden am Olympus IX81 mit der Software *ScanR* gemacht. Mit Hilfe dieser Software wurden automatisch Bilder von 6 Positionen pro Loch der 384-Loch Platte aufgenommen. Es wurde das UPlans APO 10x NA 0,4 Objektiv und Filter für GFP, RFP und BFP verwendet, um Bilder vom zytosolischen GFP, dem mit Alexa 568 angefärbten Mikrotubuli-Zytoskelett sowie den Nuklei zu erhalten. Somit wurden pro Loch 18 Bilder aufgenommen. Zur automatischen Analyse dieser Aufnahmen wurde das Open-Source Tool NeuriteQuant verwendet [98].

### **Morphometrische Analyse**

Um die Morphologie von differenzierten Zellen quantifizieren zu können, wurde das ImageJ Plugin NeuriteQuant verwendet. Mittels dieser Software konnten automatisch mehrere Parameter berechnet werden. Bei den

zu analysierenden, differenzierten P19 Zellen waren vor allem die Neuritenlänge, die Menge an differenzierten Zellen sowie der Durchmesser der einzelnen Neuriten von Interesse. Außerdem wurden noch weitere Parameter wie die GFP-Intensität, die Überschneidungspunkte von Neuriten und Zellkörpern, Endpunkte der Neuriten und die Intensität der Zellkernfärbung bestimmt.

Zur morphometrischen Analyse wurden die Aufnahmen vom neuronalen Tubulin verwendet. Zur Messung der Neuritenlänge wurde die Gesamtlänge an neuritartigen (dünnen, länglichen) Strukturen ermittelt und pro Bild summiert. Zur Messung der Zellkörperfläche wurden die Gesamtfläche aller globulären (runden) Strukturen detektiert und pro Bild summiert. Der Durchmesser der Neuriten wurde als Quotient der Fläche und Länge der Neuriten pro Bild berechnet. Die Gesamtintensität des GFP-Signals nach Subtraktion des Hintergrundsignals wurde als Messwert für das Gesamtwachstum der transfizierten Zellpopulation verwendet.

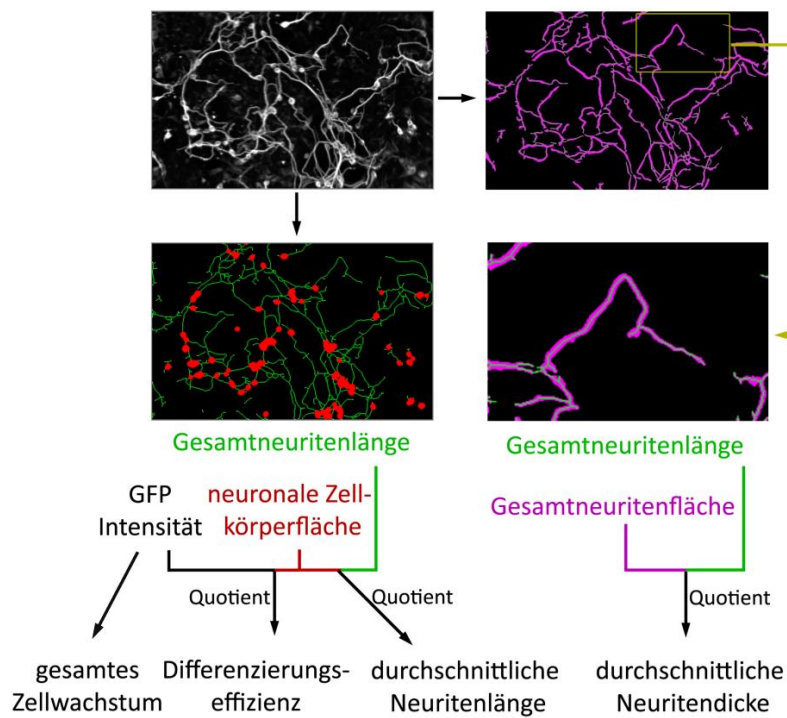


Abbildung 2.4: **Analyse der Morphologie von differenzierten Neuronen mittels NeuriteQuant.** Gezeigt ist das Konzept der morphometrischen Analyse von differenzierten P19 Zellen. Zunächst werden die Gesamtneuritenlänge, die neuronale Zellkörperfläche, die GFP-Intensität sowie die Gesamtneuritenfläche pro Bild bestimmt. Anschließend werden diese Parameter miteinander verrechnet, so dass Aussagen zum Wachstum der transfizierten Zellpopulation, der Differenzierungseffizienz sowie der durchschnittlichen Neuritenlänge und des -durchmessers gemacht werden können.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### **3.1 Etablierung des Modellsystems: Neuronale Differenzierung von P19 Maus-embryonalen Stammzellen**

Zur Untersuchung der neuronalen Differenzierung wurden P19 Zellen als Modellsystem gewählt. Diese Zelllinie eignete sich besonders aufgrund ihrer Pluripotenz, der Fähigkeit sich in verschiedene Zelltypen, inklusive Neuronen, Glia oder Muskelzellen zu differenzieren. Anders als andere Zelllinien, die zur Untersuchung von neuronalen Fragestellungen verwendet werden, wie z.B. Neuro2a oder PC12 Zellen, welche sowohl vor als auch nach der Differenzierung neuronale und nicht-neuronale Gene exprimieren, durchlaufen die P19 Zellen ihre komplette Entwicklung von nicht-neuronalen, sich teilenden Stammzellen zu post-mitotischen Neuronen. Im Vergleich zu primären Neuronen, als auch gegenüber totipotenten embryonalen Stammzellen, sind sie leichter zu handhaben und zu manipulieren. Insbesondere können sie sich schneller und effektiver zu Neuronen differenzieren.

### 3.1.1 Von der pluripotenten Stammzelle zum Neuron: Charakterisierung der Differenzierung

Um die Pluripotenz der verwendeten P19 Zellen zu überprüfen, wurde der Stammzellmarker Oct4 verwendet. Oct4 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung von Zellen inhibiert und nur in stammzellartigen Zellen exprimiert wird. Während der Differenzierung wird dieser Faktor abgebaut. Daher ist Oct4 ein geeigneter Marker für pluripotente Zellen. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers konnte die Expression von Oct4 in differenzierten und undifferenzierten P19 Zellen analysiert werden.

In Abbildung 3.1 sind P19 Zellen zu sehen, die durch Transfektion des neurogenen Transkriptionsfaktors NeuroD2 differenziert wurden. Es wurden Antikörper gegen den neuronalen Marker  $\beta$ III-Tubulin und den Stammzellmarker Oct4 sowie DAPI zur Zellkernanfärbung verwendet. Bei einem Vergleich der Bilder ist klar zu erkennen, dass nicht alle Zellen differenziert sind. Es ist jedoch auch nicht zu erwarten, dass alle Zellen mit dem neurogenen Transkriptionsfaktor transfiziert wurden. Zellen, welche positiv für den neuronalen Marker  $\beta$ III-Tubulin sind, haben jedoch klare neuronale Merkmale wie z.B. lange Auswüchse (Neuriten) entwickelt. Anhand der Pfeile ist zu erkennen, dass der Anteil von Oct4 im Nukleus der neuronal differenzierten P19 Zellen (türkiser Pfeil) deutlich geringer ist als in undifferenzierten Zellen (gelber Pfeil).



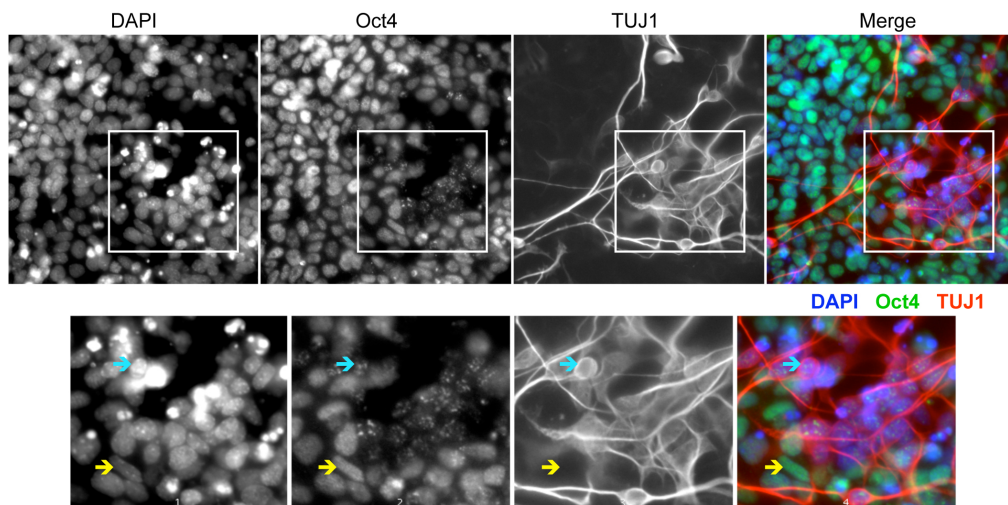


Abbildung 3.1: **Pluripotenznachweis mittels Oct4 Antikörper.** Abgebildet sind P19 Zellen, welche mit NeuroD2 transfiziert und vier Tage inkubiert wurden. Zur Unterscheidung von differenzierten und undifferenzierten Zellen wurden sowohl Antikörper gegen den Stammzellmarker Oct4 als auch gegen die neuronale  $\beta$ III-Tubulin Isoform (TUBB3) verwendet. Zusätzlich wurden die Zellkerne mittels DAPI angefärbt. Zu jedem Bild ist ein Ausschnitt mit höherer Auflösung dargestellt. Die türkisen Pfeile kennzeichnen eine differenzierte,  $\beta$ III-Tubulin positive P19 Zelle. Die gelben Pfeile zeigen eine undifferenzierte Zelle mit hohem Oct4-Gehalt im Nukleus.

Zur weiteren Charakterisierung von differenzierten P19 Zellen wurden ausgewählte post-translationalen Modifikationen (PTMs) von Tubulin untersucht. Insbesondere das de-tyrosinierte und acetylierte Tubulin sind Marker für das Alter von Mikrotubulistrukturen und können daher verwendet werden, um die Stabilität von Mikrotubuli zu bestimmen. Das Vorkommen und die Lokalisation dieser PTMs in Neuriten war daher von Interesse. Bei der De-Tyrosinierung wird das C-terminale Tyrosin des  $\alpha$ -Tubulins entfernt [10, 11]. Diese Modifikation ist reversibel, jedoch enthalten frisch gebildete Mikrotubuli dieses Tyrosin, welches mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden kann (Review [7]). Die

Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin an Lysin40, welche ebenfalls mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden kann, ist in fast allen Zelltypen in der stabilen Mikrotubulipopulation zu finden [9]. In differenzierten P19 Zellen wurde tyrosiniertes und acetyliertes Tubulin angefärbt. Wie in Abbildung 3.2 zu erkennen ist, kommt sowohl tyrosiniertes als auch acetyliertes Tubulin in Neuriten vor. Dabei markieren grüne Pfeile das acetylierte Tubulin und rote Pfeile das tyrosinierte Tubulin. Anhand der gelben Pfeile werden Bereiche markiert, in denen beide PTMs vorkommen. Ein lang ausgebildeter, vermutlich recht stabiler Neurit weist ein hohes Vorkommen an acetyliertem Tubulin auf (s. Abb. 3.2 grüner Pfeil). Lediglich im Bereich des Wachstumskegels wird auch tyrosiniertes Tubulin detektiert (roter Pfeil). Kürzere, jüngere Neuriten weisen hingegen nur geringe Mengen an acetyliertem Tubulin auf. Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass die Acetylierung im Neuriten stattfindet. Es sind folglich zu Beginn dynamische Mikrotubuli an der Initiation und dem Auswachsen von Neuriten beteiligt, in späteren Stadien der Entwicklung werden diese stabilisiert und acetyliert. Die Acetylierung wirkt sich auf die Affinität von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen, u.a. auf Motorproteine und die +TIPs, aus [13]. Daher könnten diese Modifikationen sowohl im Motorprotein-basierten Transport innerhalb der Neuriten, als auch in der Regulation der Mikrotubulistabilität eine Rolle spielen.

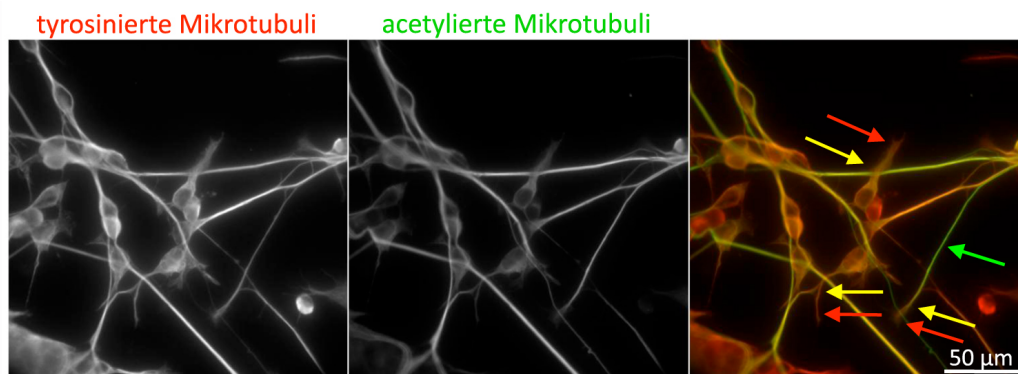


Abbildung 3.2: **Post-translationale Modifikationen von  $\alpha$ -Tubulin.** In differenzierten P19 Zellen wurde mittels Antikörper-Färbung tyrosiniertes (rot) und acetyliertes (grün)  $\alpha$ -Tubulin lokalisiert. Die Pfeile markieren Neuriten mit tyrosiniertem (rot) und acetyliertem (grün) Tubulin sowie wenn beide Formen auftreten (gelb).

### 3.1.2 Generierung von stabilen Zelllinien zur Detektion von Zytoskelettstrukturen

Zur direkten Analyse von dynamischen, zellulären Prozessen ist es vorteilhaft stabile Zelllinien zu generieren, in denen zelluläre Komponenten direkt durch die Fusion mit fluoreszierenden Proteinen markiert sind. Ausgehend von solchen Zellen können ohne komplexe und kostspielige Manipulationen große Mengen differenzierter Zellen für detaillierte Analysen generiert werden. So können z.B. P19 Zellen durch die Kultivierung in Anwesenheit von Retinsäure effektiv in Neuronen differenziert werden. Retinsäure wird dem Medium zugefügt, diffundiert in die Zellen und initiiert die Differenzierung. Eine kostspielige Transfektion mit neurogenen Transkriptionsfaktoren ist nicht nötig. In Abbildung 3.3 sind P19 Zellen abgebildet, welche mittels Retroviren erzeugt wurden und ein unfusioniertes, grün fluoreszierendes Protein (GFP) stabil exprimieren. Die undifferenzierten und differenzierten Zellen in Abbildung 3.3 zeigen eine nicht klonale Mischpopulation mit verschieden starker GFP-Intensität. Im direkten Vergleich zwischen zytosolischem GFP und dem neuronalen

Marker  $\beta$ III-Tubulin in differenzierten Zellen wird allerdings klar deutlich, dass die Intensität des nicht fusionierten GFPs im Zytosol und Nukleus am höchsten ist. In dieser Studie sind jedoch gerade die Neuritenstrukturen von großem Interesse und diese werden von dem unfusionierten GFP nur schwach angefärbt.

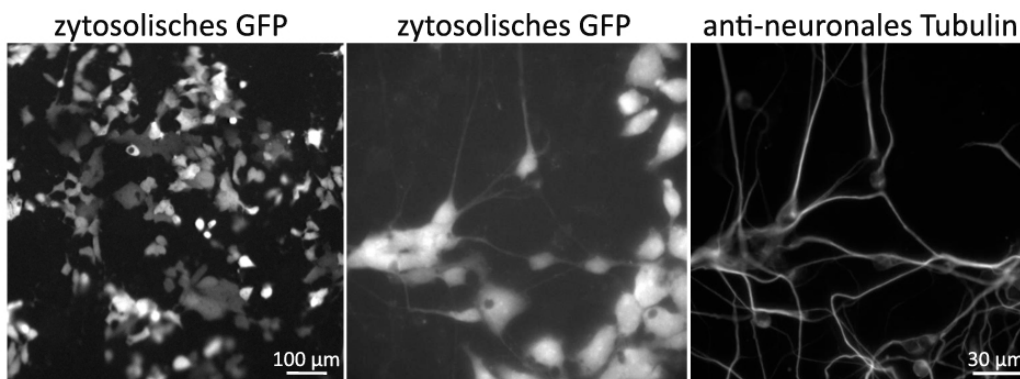


Abbildung 3.3: **Stabile P19 Zelllinie mit zytosolischem GFP.** Abgebildet sind undifferenzierte (links, 10x Objektiv) und differenzierte (Mitte und rechts, 40x Objektiv) P19 Zellen, welche stabil unfusioniertes GFP exprimieren und mit einem Antikörper gegen neuronales  $\beta$ III-Tubulin (anti-TUBB3) angefärbt wurden.

Um Neuriten besser visualisieren zu können, wurden daher P19 Zellen generiert, welche fluoreszierende Proteine in Fusion mit Zytoskelettkomponenten exprimieren. In Zusammenarbeit mit der Masterstudentin Verena Hannak wurde zunächst ein mCherry-fusioniertes Aktin-Konstrukt mit Hilfe von Retroviren in P19 Zellen stabil eingebaut [100]. Im Anschluss wurde ein EGFP-Tubulin Konstrukt in die Zellen transfiziert, mittels Antibiotika selektiert und per FACS sortiert. Schließlich wurde eine monoklonale Zelllinie generiert (s. Abb. 3.4), in der beide Proteine eine vergleichbare Intensität aufwiesen. Die entstandene mCherry-Aktin/EGFP-Tubulin P19 Zelllinie konnte nun für detaillierte Studien von Zytoskelettstrukturen während der neuronalen Differenzierung verwendet werden.



Abbildung 3.4: **Stabile P19 Zelllinie mit mCherry-Aktin und EGFP-Tubulin.** Der stabile Einbau von mCherry-Aktin erfolgte über Transduktion mittels Retroviren. Hierauf wurde EGFP-Tubulin transfiziert und mittels Antibiotikaresistenz sowie FACS selektiert. Anschließend wurde ein einzelner Klon dieser Zelllinie isoliert und kultiviert.

### 3.1.3 Analyse der Zytoskelett-Dynamik während der Neuritenentwicklung

Die oben beschriebene stabile mCherry-Aktin/EGFP-Tubulin P19 Zelllinie wurde verwendet, um die Dynamik von Mikrotubuli und des Aktinzytoskeletts mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie zu untersuchen. Hierfür wurde diese Zelllinie mit Retinsäure differenziert und auf einer dünnen Glasoberfläche (MatTek) kultiviert. Akute Zugabe von Laminin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zu diesen Kulturen stimuliert das Wachstum von Neuriten.

Neuriten sind Zellausstülpungen, die sich zu länglichen Strukturen weiterentwickeln, aus welchen in späteren Stadien der neuronalen Differenzierung Axone und Denriten gebildet werden. Bei der Neuriten Initiation werden Mikrotubuli zu parallelen, bündelartigen Anordnungen reorganisiert, welche die Basis, bzw. den Schaft des Neurits bilden. Dynamische Aktinfilamente formen Lamellipodien und Filopodien an der Spitze dieser Auswüchse, dem sogenannten Wachstumskegel (*Growth Cone*).

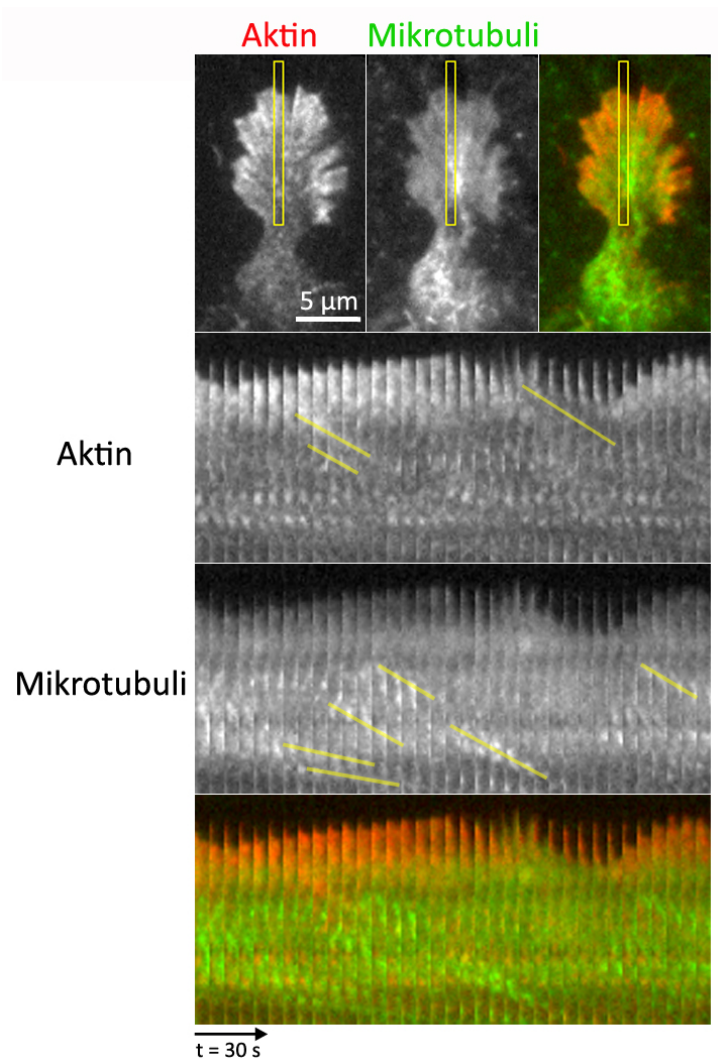


Abbildung 3.5: **Dynamik der Zytoskelettkomponenten während des Neuritenauswuchses.** TIRF Aufnahmen zeigen die dynamische Reorganisation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts im Wachstumskegel eines neu gebildeten Neurits. Die Differenzierung wurde durch Zugabe von Retinsäure eingeleitet und das Neuritenwachstum mittels Laminin stimuliert. Die Bildreihen geben Aufschluss über das dynamische Verhalten der einzelnen Zytoskelettstrukturen im Wachstumskegel. Gelbe Markierungen verdeutlichen die Bewegungsrichtungen.

In Abbildung 3.5 ist ein neu gebildeter Neurit zu erkennen. In diesem

Beispiel wächst ein Neurit mit einem ausgeprägten, Aktin-reichem Wachstumskegel. Innerhalb des Wachstumskegels sind Mikrotubuli zu erkennen. Zur Verdeutlichung des dynamischen Verhaltens der beiden angefärbten Zytoskelettstrukturen wurde eine Bildreihe eines schmalen Bereiches des Wachstumskegels über einen Zeitraum von sieben Minuten dargestellt. Anhand der gelben Markierungen werden die Bewegungsrichtungen von Aktin und Mikrotubuli verdeutlicht. Es ist ein typischer retrograder Aktinfluss zu erkennen, welcher entgegen der Bewegungsrichtung der Mikrotubuli zelleinwärts gerichtet ist (siehe Anhang: Film 6.1).

Die Kombination aus TIRF Mikroskopie und die Verwendung dieser stabilen Zelllinie ermöglicht es weitere detaillierte Studien der Dynamik von Mikrotubuli und Aktin während der Neuriten Initiation sowie des Wachstums von Neuriten durchzuführen. In Kombination mit stabiler Transfektion von shRNA-Konstrukten sind sogar Studien über Einflüsse nach spezifischem Protein *knock down* auf die Dynamik möglich.

### **3.1.4 Optimierung der neuronalen Differenzierung von P19 Zellen im 384-*well* Format „High-Content“ Screen**

Zur Vorbereitung des „High-Content“ Screens wurden Vorexperimente durchgeführt, um die optimalen Versuchsbedingungen zu bestimmen. In diesem Screen sollten P19 Zellen im 384 *well*-Format mit dem neurogenen Transkriptionsfaktor NeuroD2 transfiziert werden, um deren Differenzierung einzuleiten. Durch Ko-Transfektion von siRNA sollten gezielt einzelne Gene supprimiert werden. Wichtige Parameter für diese Optimierung waren die Dichte der Zellen, die Menge an siRNA, DNA und Transfektionsreagenz pro *well* sowie der Zeitrahmen der Differenzierung.

Zusätzlich zum neuronalen Transkriptionsfaktor NeuroD2 wurde ein GFP-Konstrukt ko-transfiziert. Die Intensität des GFP-Signals sollte Aufschluss über die Transfektionseffizienz geben, da in den Differenzierungsexperimenten ein unmarkiertes NeuroD2 verwendet wurde. Ferner sollte die Intensität des GFP-Signals verwendet werden, um das Wachstum der transfizierten Zellpopulation abzuschätzen. Eine direkte Zählung der transfi-

zierten Zellen für eine genaue Bestimmung des Zellwachstums war aufgrund der hohen Zelldichte, welche für eine effiziente Differenzierung erforderlich ist, nicht möglich. Bei der Wahl der DNA-Konstrukte für NeuroD2 und GFP musste insbesondere darauf Rücksicht genommen werden, dass während der neuronalen Differenzierung der sonst sehr verbreitete CMV-Promoter durch Methylierung inaktiviert wird [107]. Diese Inaktivierung während der Differenzierung betrifft jedoch nicht den humanen Ubiquitin C-Promoter (UB). In einem Testexperiment wurde nur bei Verwendung des UB-Promoters und nicht für den CMV-Promoter eine hohe Intensität von GFP nach der neuronalen Differenzierung detektiert. Daher wurde dieser Promoter sowohl für das NeuroD2- als auch für das kotransfizierte GFP-Konstrukt gewählt, um eine maximale Differenzierung und stabile Messung der GFP-Intensität zu ermöglichen. Wie in Abbildung 3.6 gezeigt ist, war bei Verwendung des UB-Promoters im Vergleich zum CMV-Promoter die Differenzierungsrate deutlich erhöht.

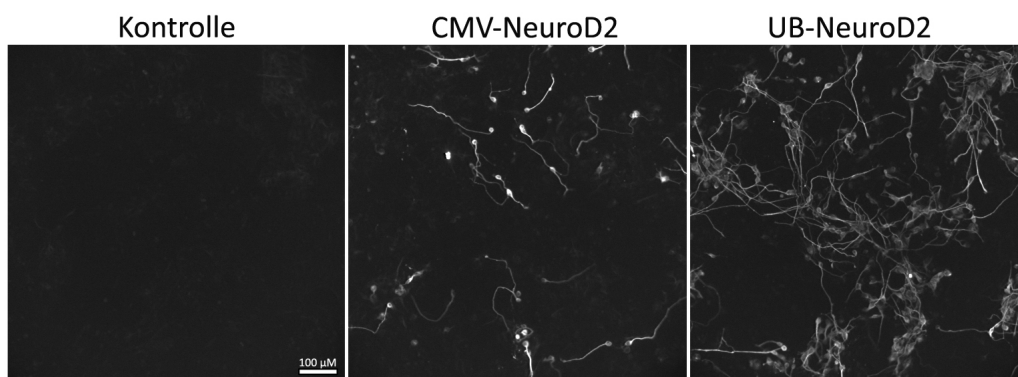


Abbildung 3.6: **Vergleich verschiedener Promoter während der neuronalen Differenzierung.** Gezeigt sind P19 Zellen, welche mit einem Antikörper gegen das anti-neuronale  $\beta$ III-Tubulin (anti-TUBB3) angefärbt wurden. Links: Nicht transfizierte Kontrollzellen. Mitte: Zellen, welche mit CMV-NeuroD2 transfiziert wurden, zeigen eine unregelmäßige Differenzierung von sehr wenigen Zellen. Rechts: Zellen, welche mit UB-NeuroD2 transfiziert wurden, differenzieren wesentlich effektiver.

Die weiteren experimentellen Parameter wurden in Kombination va-



riert, um ein optimales Verhältnis zwischen Signal (differenzierte Zellen durch NeuroD2 Transfektion) und Hintergrund (spontan differenzierte Zellen ohne NeuroD2) zu identifizieren. Um eine optimale Kombination der Parameter zu identifizieren, wurden folgende Bedingungen verglichen (Angaben jeweils pro *well*): Zellzahl zwischen 2000 und 10000; pUB-NeuroD2 zwischen 50 und 120 ng; siRNA zwischen 0,5 und 6 pmol; Transfektionsreagenz Lipofectamine2000 zwischen 30 und 180 nl; Differenzierungszeit zwischen 3 und 5 Tagen. Mit 8000 P19 Zellen pro *well* einer 384-Loch-Platte, 50 ng pUB-NeuroD2, 10 ng pUB-GFP, 120 nl Lipofectamine2000 und vier Tagen Inkubation konnte eine maximale Differenzierung beobachtet werden. Eine weitere Erhöhung des Transfektionsreagenzes und/oder der NeuroD2 DNA hatte keine weitere Erhöhung der Differenzierung zur Folge. Die maximal sinnvoll einsetzbare Menge an siRNA war 4 pmol pro *well*. Höhere Mengen oder Konzentrationen führten zu einer starken Inhibition der Differenzierungseffizienz. In Abwesenheit von NeuroD2 ist unter diesen Bedingungen die spontane Differenzierung vernachlässigbar (s. Abb. 3.8 Negativkontrolle).

### **3.1.5 Spezifischer *knock down* von neuronalen Proteinen in der neuronalen Differenzierung**

Der geplante High-Content Screen basiert auf Protein-Suppression mittels RNA-Interferenz. Zunächst wurde die Eignung dieser Methode zur spezifischen Suppression von Mikrotubuli-Regulatoren in P19 Zellen anhand zweier Beispiele, Mtap2 und Tubb3, bewertet. Diese Gene werden durch die neuronale Differenzierung stark induziert. MTAP2 (MAP2) ist ein Neuronen-spezifisches Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches an die äußere Struktur (*lattice*) der Mikrotubuli bindet. TUBB3 ist die neuronale  $\beta$ III-Tubulin-Isoform, welche ausschließlich in differenzierten Neuronen exprimiert wird.

P19 Zellen wurden entweder mit Mtap2, Tubb3 oder Kontroll- (*non-targeting*) siRNA und mit NeuroD2 ko-transfiziert, für vier Tage inkubiert und anschließend immunohistochemisch angefärbt. In Abbildung 3.7 ist zu er-

kennen, dass Neuriten von neuronal differenzierten Zellen, welche mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, sowohl durch Antikörper gegen Mtap2 als auch gegen Tubb3 angefärbt werden. Die Suppression von Mtap2 bzw. Tubb3 durch die jeweilige siRNA ist ebenfalls klar zu erkennen. Nach der Mtap2 siRNA-Behandlung ist durch den Mtap2 Antikörper kein spezifisches Signal mehr detektierbar. Die Intensität der Tubb3 Färbung in differenzierten Neuronen wird jedoch nicht beeinflusst. Umgekehrt bewirkt die Tubb3 siRNA die vollständige Suppression des TUBB3 Proteins ohne die Mtap2 Färbung zu beeinflussen.

Die Induktion dieser neuronalen Gene wurde durch die siRNAs selektiv unterdrückt. Es konnte daher bestätigt werden, dass sich diese Methode für die Untersuchung dieser Proteine im Screen-Format eignet. Es ist möglich, dass einzelne Zielproteine, z.B. aufgrund hoher Expression oder langsamen Proteinabbaus, weniger effizient supprimiert werden. Die Kombination aus hoher siRNA Konzentration, schneller Teilungsrate der P19 Zellen und Suppression über vier Tage legt jedoch nahe, dass die Mehrzahl an Zielproteinen signifikant unterdrückt werden können. Durch Kombination von Differenzierung und RNA-Interferenz sollte in jedem Fall die durch neuronale Differenzierung induzierte Genexpression unterdrückt werden.

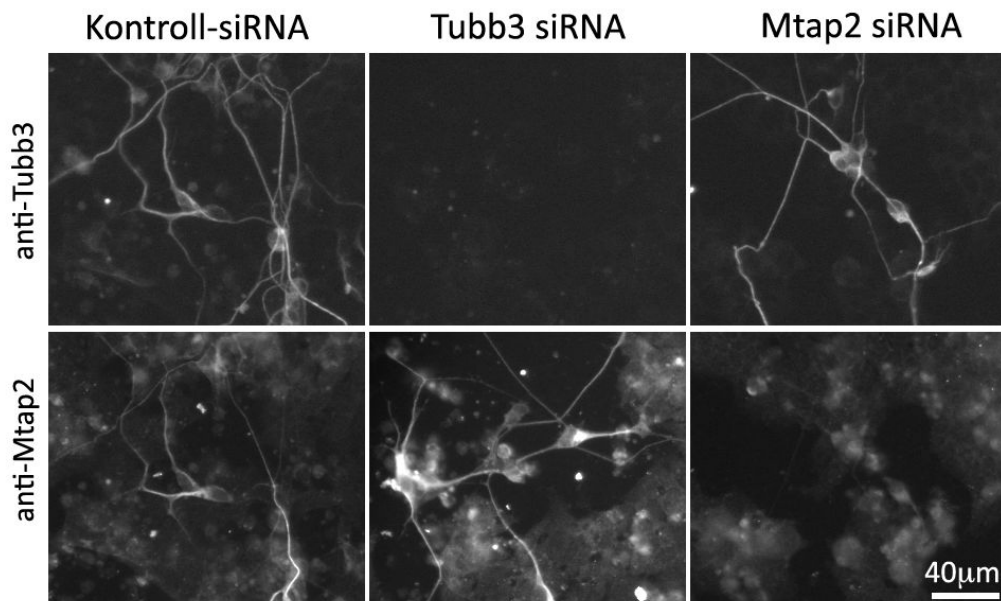


Abbildung 3.7: **Spezifischer *knock down* von neuronalen Genen mittels siRNA.** Abgebildet sind differenzierte P19 Zellen, die mit 4 pmol Mtap2 bzw. Tubb3 siRNA oder 4 pmol Kontroll-siRNA (*non-targeting*) behandelt wurden. Die Expression beider Proteine wird in differenzierenden Zelle stark induziert. Die verwendeten siRNAs konnten beide Proteine spezifisch und vollständig supprimieren.

## **3.2 siRNA Screen zur Charakterisierung von Mikrotubuli-regulierenden Proteinen in der neuronalen Differenzierung**

Die neuronale Differenzierung ist ein sehr komplexer Prozess, auf den viele verschiedene Regulatoren direkt oder indirekt Einfluss nehmen können. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Mikrotubuli-regulierenden Proteinen auf die Differenzierung und die damit verbundene Umstrukturierung des Zytoskeletts zu untersuchen. Dafür mussten zunächst die Mikrotubuli-Regulatoren identifiziert werden, die an diesem Prozess beteiligt sind. Hierzu wurde ein High-Content Screen basierend auf dem Prinzip der RNA-Interferenz durchgeführt. Bei der RNA-Interferenz werden einzelne Proteine mit Hilfe von siRNAs (*small interfering RNAs*) supprimiert. Der hier verwendete High-Content Screen ist eine Phänotyp-basierte, automatisierte, mikroskopische Methode, mit deren Hilfe Veränderungen der Morphologie von P19 Zellen während der Differenzierung detektiert und quantifiziert werden können.

### **3.2.1 Primärer Screen: Objektiver Vergleich aller bisher beschriebener Mikrotubuli-regulierender Proteine**

Dem primären Screen ging eine intensive Literaturrecherche voraus, in der alle zurzeit beschriebenen Mikrotubuli-Regulatoren identifiziert wurden. Basierend auf dieser Recherche wurde eine Bibliothek von sogenannten on-target Plus siRNAs der Firma Dharmacon (Thermo Fisher) bestellt. Diese Bibliothek enthielt siRNA-Mischungen, bestehend aus vier spezifischen Einzel-siRNAs, gegen jeden einzelnen Kandidaten. Im primären Screen wurden insgesamt 408 verschiedene Mikrotubuli-Regulatoren untersucht. Eine Auflistung mit allen Kandidaten und siRNAs ist im Anhang zu finden (siehe Tabelle 6.5).

Alle Mikrotubuli-regulierenden Proteine wurden durch eine Titrations-Serie mit steigender siRNA-Menge (0,5; 1; 2; 4 pmol pro *well*) supprimiert.

Es wurde erwartet, dass die Suppression von Regulatoren, die einen Einfluss auf die Neuriten Initiation und/oder deren Auswuchs haben, eine messbare Änderung der Zellmorphologie hervorruft. Durch die Titration der siRNAs sollte die Dosis-Wirkungs-Beziehung der experimentellen Behandlung untersucht werden. Außerdem war es hierdurch möglich sehr hohe Mengen einzusetzen, um auch Kandidaten zu identifizieren, die nur bei effizienter oder vollständiger Suppression einen messbaren Effekt zeigen. In Einzelfällen kann die Suppression mit der höchsten Menge einen allgemein negativen Effekt auf die P19 Zellen haben, welcher eine detaillierte Analyse unmöglich macht. In solchen Fällen könnte auf Behandlungen mit niedrigeren siRNA-Mengen zurückgegriffen werden, welche weniger dramatische Zelländerungen und daher möglicherweise detailliertere Aussagen ermöglichen könnten.

Um einen möglichst großen Überblick über die einzelnen Konditionen zu bekommen, wurden Bilder von sechs Positionen pro *well* der 384-Loch-Platte mit einem UPlans APO 10x NA 0,4-Objektiv aufgenommen. An jeder Position wurden drei Bilder gemacht, um das neuronale Tubulin-Signal (Morphologie der Neuronen), das zytosolische GFP (Transfektionseffizienz und Wachstum der transfizierten Zellpopulation) sowie die Gesamtmenge aller Zellen bzw. die Zellverteilung anhand der Nuklei (DAPI-Färbung) zu dokumentieren. Es wurde eine dreifache Wiederholung des High-Content Screens durchgeführt, um zufällige Unterschiede von reproduzierbaren Effekten zu unterscheiden (Screen A - Screen C). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit Hilfe des ImageJ Plugins NeuriteQuant morphometrisch analysiert. Dabei waren vor allem die Parameter Neuritenlänge, Fläche (als Projektion) von neuronalen Zellkörpern, Neuritendurchmesser (alle auf der Basis von Bildern des neuronalen  $\beta$ III-Tubulin-Signals) und GFP-Intensität pro *well* von großem Interesse. Einen ersten Überblick über die Ergebnisse lieferten sogenannte Heatmaps. Anhand des Verhältnisses von Gesamtneuritenlänge zu Gesamtfläche an neuronalen Zellkörpern sowie der detektierten Intensität des  $\beta$ III-Tubulin-Signals wurde jedem Bild des Screens eine Farbe zugeordnet. Eine Heatmap ist demnach eine Zusammenstellung dieser farblich dargestellten Ergeb-

nisse; Neuritenlänge in rot; Fläche der neuronalen Zellkörper in grün; Intensität des  $\beta$ III-Tubulin-Signals in blau. Die rötlich/pink gefärbten *wells* weisen daher auf eine erhöhte Neuritenlänge pro Zellkörperfläche hin, wohingegen grünlich gefärbte *wells* eine deutlich verminderte Neuritenlänge pro neuronaler Zellkörperfläche anzeigen. In Abbildung 3.8 sind Heatmaps von drei Screen-Wiederholungen einer Platte repräsentativ dargestellt.

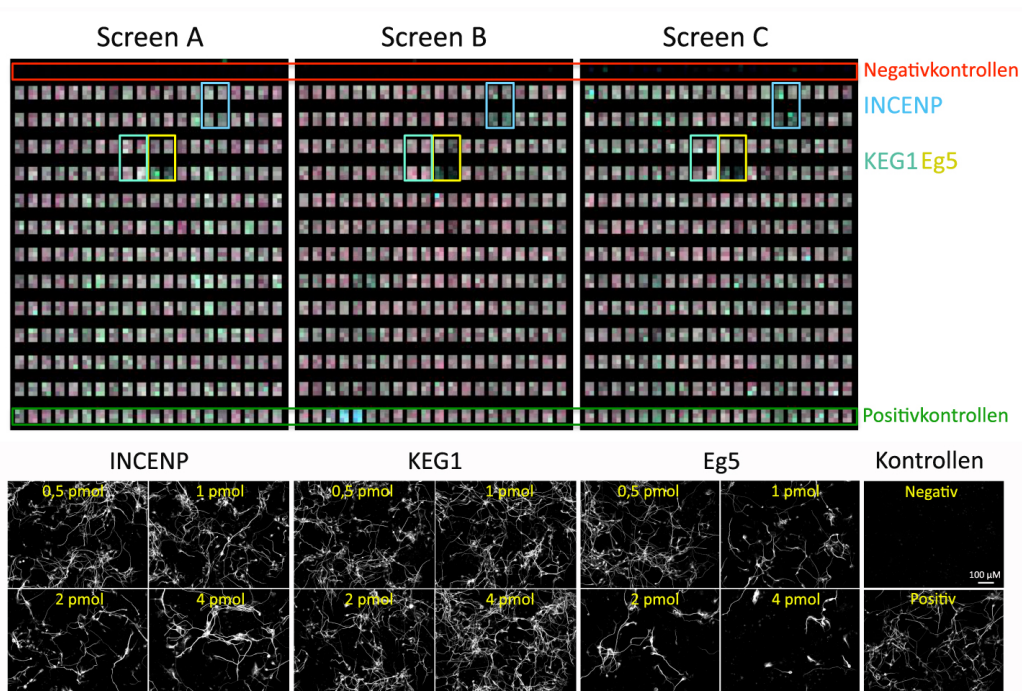


Abbildung 3.8: In Heatmaps veranschaulichte Ergebnisse der morphometrischen Analyse. Vergleichende Darstellung der Heatmaps der drei Screen-Wiederholungen am Beispiel einer Screen-Platte. Die Farbkombination gibt Auskunft über das Verhältnis von Neuritenlänge (rot) zu neuronaler Zellkörperfläche (grün) und über die Gesamtintensität des  $\beta$ III-Tubulin-Signals (blau). Mikroskopische Aufnahmen der siRNA-Titrations von INCENP, KEG1 und Eg5 wurden beispielhaft hervorgehoben.

Dieser Überblick der Screen-Durchläufe gibt zunächst Auskunft über

die Reproduzierbarkeit der morphologischen Messungen. Insbesondere ist in einigen hervorgehobenen Beispielen klar erkennbar, dass diese *wells* in allen Heatmaps eine ähnliche Veränderung der Farbnuance mit steigender siRNA Menge zeigen und damit eine ähnliche Änderung der morphometrischen Messungen darstellen.

Die obere Reihe der Heatmaps stellt die Negativkontrollen dar, welche nicht mit dem neurogenen Transkriptionsfaktor NeuroD2 transfiziert wurden, demnach auch keine Differenzierung durchliefen und kein neuronales  $\beta$ III-Tubulin exprimieren. Diese *wells* sind aufgrund des fehlenden  $\beta$ III-Tubulin-Signals überwiegend schwarz dargestellt. Die untere Reihe enthält die Positivkontrollen (mit NeuroD2, ohne siRNA). Die durchschnittliche Differenzierung der P19 Zellen dieser 20 *wells* diente als Referenz für die siRNA-behandelten Kandidaten. Als Beispiele für Kandidaten mit veränderter Morphologie von dieser Platte sind INCENP (eher grünlich, 4 pmol), KEG1 (rötlich, 4 pmol) und Eg5 (grün bis schwarz, 4 pmol) dargestellt. Bei allen drei Kandidaten ist die Reproduzierbarkeit dieser morphologischen Veränderungen erkennbar, da die Farbnuancen der Bilder in allen drei Wiederholungen ähnlich sind. Zusätzlich sind Bilder der vier siRNA Titrationsschritte dieser Kandidaten abgebildet, in denen die Korrelation von steigender siRNA Menge zu Ausprägung des morphologischen Phänotyps klar erkennbar ist.

Wie bereits in Abbildung 3.8 zu sehen ist, wies die Morphologie der differenzierten P19 Zellen Unterschiede in der Länge und dem Durchmesser von Neuriten auf. Aus der morphometrischen Analyse des primären Screens gingen drei Phänotypen hervor, welche klar von den Kontrollzellen unterschieden werden konnten (s. Abb. 3.9); kürzere Neuriten, längere Neuriten und erhöhter Neuritendurchmesser. Die Klassifizierung von neuronalen Populationen in diese Kategorien erfolgte durch Vergleich von einem oder zwei morphologischen Parametern mit entsprechenden Messungen der gepaarten positiven und negativen Kontrollen aus der selben 384-Loch Platte. Die detaillierte Analyse wird im Folgenden beschrieben. Definiert wurden die Phänotypen mit kürzeren bzw. längeren Neuriten anhand des Verhältnisses der Gesamtsumme der ermittelten Neuritenlän-

ge zur Gesamtfläche an neuronalen Zellkörpern pro Bild. Dieses Verhältnis wurde durch Auftragen aller Messungen der Gesamtneuritenlänge gegen die Gesamtfläche der neuronalen Zellkörper ermittelt (s. Abb. 3.9). In dieser Auftragung wurde zunächst eine Regressionsgerade durch die positiven Kontrollmessungen berechnet. Der Abstand einer einzelnen Messung zu dieser Regressionsgeraden entspricht der Divergenz zu den positiven Kontrollen bezüglich des Wachstums der Neuriten. Lag dieser Wert höher oder niedriger als die dreifache Standardabweichung der positiven Kontrollen, so galt der entsprechende Regulator als potentieller Kandidat. Beim Phänotyp „erhöhter Neuritendurchmesser“ wurde der durchschnittliche Durchmesser der Neuriten bestimmt. Auch hier war eine Abweichung vom durchschnittlichen Durchmesser der positiven Kontrollen um die dreifache Standardabweichung Voraussetzung für die Identifizierung als potentieller Kandidat. Mikrotubuli-Regulatoren, deren Suppression einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Vorläuferzellen hatten, wurden ausgeschlossen, da in diesen Konditionen nicht genügend neuronale Strukturen vorhanden waren, um eine sichere Messung der Neuritenlänge zu gewährleisten. Daher mussten diese Konditionen zur Vermeidung von falsch-positiven oder falsch-negativen Hits herausgefiltert werden.



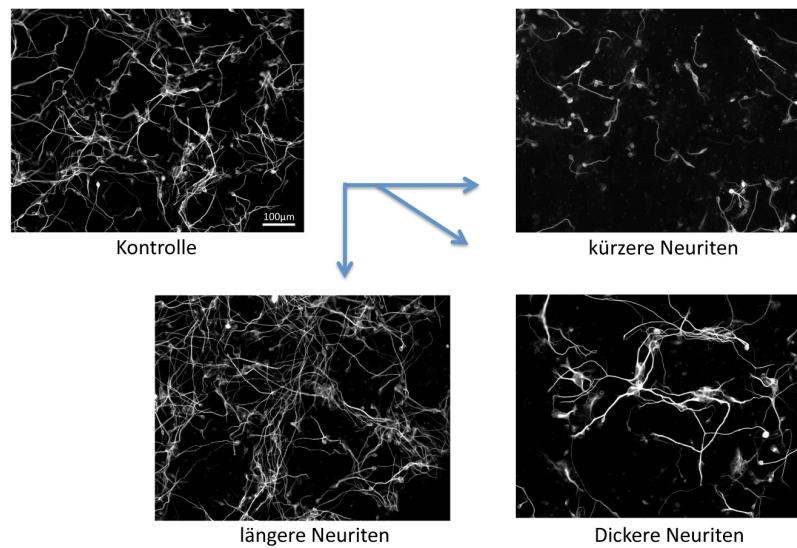


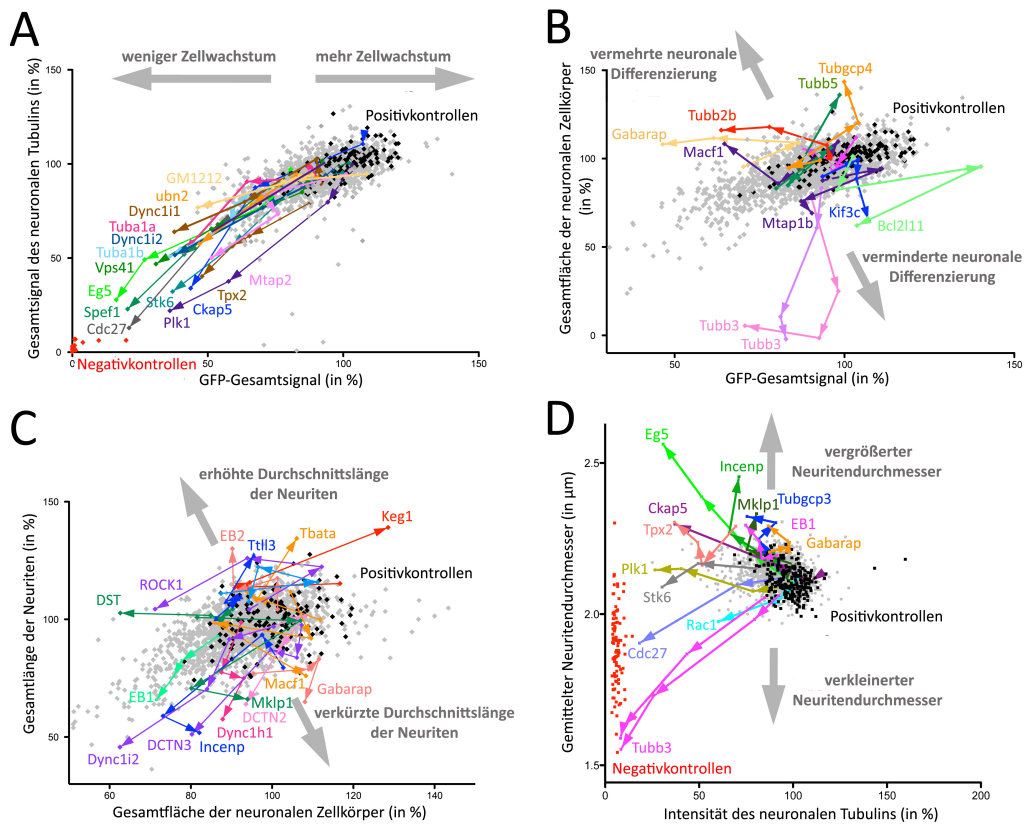
Abbildung 3.9: **Darstellung der drei Phänotypen nach siRNA Behandlung im primären Screen.** Gezeigt sind drei Phänotypen, die sich eindeutig von der Morphologie differenzierter Kontrollzellen unterscheiden. Als Beispiele für die einzelnen Phänotypen dienten zytosolisches Dynein (Dync1h1; 4 pmol) für „kürzere Neuriten“, EB2 (4 pmol) für „längere Neuriten“ sowie Eg5 (4 pmol) für „erhöhter Neuritendurchmesser“. Alle Bilder wurden im Rahmen des primären Screens am Olympus IX81 mit der *ScanR*-Software aufgenommen.

### Quantifizierung von siRNA-induzierten morphologischen Phänotypen

In Abbildung 3.10 sind die Intensitäten von allen morphologischen Messungen aller Wiederholungen des primären Screens dargestellt. Jeder Graph zeigt die relative Verteilung von zwei Messungen auf der x- und der y-Achse. Die Titrations von einzelnen, markierten siRNAs sind durch farbige Pfeile gekennzeichnet, wobei die Pfeile die ansteigende siRNA Menge anzeigen. Einige siRNAs induzieren eine gleichzeitige Reduktion der Gesamt-GFP-Intensität sowie des neuronalen Tubulin-Signals (s. Abb. 3.10 A und Tab. 3.1). Dieser Effekt wird als Reduktion des Gesamtwachstums von transfizierten Vorläuferzellen gewertet, welcher eine proportionale Verringerung der Anzahl an differenzierten Neuronen verursacht und so-

mit auch eine Reduktion des gesamten neuronalen Tubulin-Signals bewirkt. Als Schwellenwert für einen potentiellen Hit dieses Phänotyps wurde eine Abweichung der Gesamt-GFP-Intensität von drei Standardabweichungen (SD) im Vergleich zu den Positivkontrollen verwendet. Beobachtet wird dieser Effekt vor allem nach der Suppression von wichtigen Regulatoren des Zellzyklus, wie z.B. Eg5 (Kif11), Cdc27 (*Adenomatous Polyposis coli 3*), Dync1i1/Dync1i2 (*Dynein intermediate chain*), Plk1 (*Poly-like Kinase 1*) oder chTOG (Ckap5, Homolog von Xmap215). Mit keiner der siRNA Behandlungen wurde eine Zunahme des Wachstums der transfizierten Vorläuferzellen um mehr als drei Standardabweichungen nach siRNA Suppression beobachtet.

Ein weiterer Effekt, der beobachtet wurde, war ein Anstieg oder Abfall der Anzahl differenzierter Neuronen ohne signifikanten Einfluss auf das Wachstum der transfizierten Vorläuferzellen (s. Abb. 3.10 **B**). Ein solcher Effekt suggeriert, dass ein spezifischer Einfluss der supprimierten Mikrotubuli-Regulatoren auf die neuronale Differenzierung vorliegt. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurde die Anzahl der Neuronen anhand der Gesamtfläche an neuronalen Zellkörpern und das Wachstum der Vorläuferzellen anhand der GFP-Intensität bestimmt. Potentielle Hits wurden auf der Basis des Verhältnisses dieser Messungen identifiziert. Hierzu wurden in einem Graphen alle Messungen der Gesamtfläche der neuronalen Zellkörpern gegen die GFP-Intensität aufgetragen (s. Abb. 3.10 **B**). Auch in dieser Auftragung wurde eine Regressionsgerade durch die positiven Kontrollmessungen berechnet. Der Abstand eines Messpunkts zu dieser Regressionsgeraden entspricht der Divergenz der entsprechenden experimentellen Kondition zu den Positivkontrollen. Lag dieser Wert höher oder niedriger als die dreifache Standardabweichung der positiven Kontrollen, so galt der entsprechende Regulator als potentieller Kandidat.



**Abbildung 3.10: Quantifizierung verschiedener relevanter Parameter nach RNA-Interferenz der Mikrotubuli-Regulatoren.** **A:** Bestimmung des Wachstums transfizierter Vorläuferzellen anhand der GFP-Intensität. Die Gesamtmenge an GFP- und  $\beta$ III-Tubulin-positiven, differenzierten Zellen hängt signifikant vom initialen Wachstum der Vorläuferzellen ab. Daher ist zu erwarten, dass ein eingeschränktes initiales Zellwachstum zu einer Reduktion des GFP- sowie des Tubulin-Signals führt. **B:** Bestimmung der neuronalen Differenzierung anhand des Verhältnisses zwischen der Gesamtfläche an neuronalen Zellkörpern und dem GFP-Gesamtsignal. **C:** Messung der durchschnittlichen Neuritenlänge anhand des Verhältnisses zwischen Gesamtlänge der Neuriten zur Gesamtfläche an neuronalen Zellkörpern. **D:** Bestimmung des Neuritendurchmessers. Da bei geringer Differenzierung nur wenige Neuriten vorhanden sind, ist die Bestimmung des Durchmessers mit einer hohen Ungenauigkeit behaftet. Dies wird anhand der großen Messwertstreuung der Negativkontrollen deutlich. Die graphische Darstellung zeigt die Streuung der Messungen des Neuritendurchmessers in Abhängigkeit von der  $\beta$ III-Tubulin Intensität.

<b>Gensymbol</b>	<b>Reduktion der Wachstumsrate</b>	<b>Gen-Beschreibung</b>
Eg5	5,68±0,55	Kinesin-5 Familie, KIF11
Eg5 (2 pmol)	4,96±0,40	Kinesin-5 Familie, KIF11
Cdc27	4,67±0,51	APC3, Zellzyklus Regulator [108]
Spef1	3,86±0,43	Sperm Flagella 1 [109] 4931426K16RIK
Dync1i1	3,53±0,76	Dynein-Untereinheit, intermediäre Kette 1
Dync1i2	3,53±0,76	Dynein-Untereinheit, intermediäre Kette 2
Plk1	3,47±1,03	Polo-like Kinase 1
Ckap5	3,34±0,71	ch-TOG, XMAP215 Homolog 4930432B04RIK
GM1212	3,34±0,71	Neil2
ubn2	3,20±0,66	Ubinuclein, Histon Chaperone [110] D130059P03RIK
Vps41	3,25±0,32	VPS41, related to protein trafficking
Gabarap	3,03±0,52	Gamma-aminobutyric acid receptor associated protein
Mtap2	3,03±0,52	MAP2, stabilisiert/nukleiert MTs

Tabelle 3.1: **Mikrotubuli-Regulatoren mit positivem Einfluss auf das Wachstum von Vorläuferzellen.** Aufgelistet sind Kandidaten, deren Suppression zu einem verminderten Wachstum der transfizierten Vorläuferzellen in Einheiten der Standardabweichungen ( $\pm$ Standardfehler (SEM) von drei Wdh) führte. Die Suppression dieser 13 Kandidaten führte zu einer Reduktion der GFP-Intensität um mehr als drei Standardabweichungen im Vergleich zu den Positivkontrollen. Wurde keine Angabe zur siRNA Menge gemacht, so handelt es sich um 4 pmol/well. Eine Auflistung aller Kandidaten ist im Anhang zu finden (Tabelle 6.1).

Gensymbol	Verminderte neuro- nale Differenzierung	Gen-Beschreibung
Bcl2l11	-3,10±0,28	Pro-apoptotic mediator Bim
Mtap1b	-2,49±0,36	Mikrotubuli assoziiertes Protein 1B
Kif3c	-2,34±0,82	Kinesin Family Member 3C

Tabelle 3.2: **Mikrotubuli-Regulatoren mit positivem Einfluss auf die neuronale Differenzierung.** Aufgelistet sind Kandidaten, nach dessen Suppression eine Verminderung der neuronalen Differenzierung zu beobachten war. Bei einer Reduzierung der neuronalen Differenzierung um mehr als drei Standardabweichungen ( $<-3$  SD) wurden die entsprechenden Gene von der Analyse ausgeschlossen. In diesem Fall war eine quantitative Analyse der neuronalen Differenzierungseffizienz aufgrund der starken Reduzierung nicht mehr möglich. Angaben in Einheiten der Standardabweichung ( $\pm$ SEM von drei Wdh). Wurde keine Angabe zur siRNA Menge gemacht, so handelt es sich um 4 pmol/*well*. Eine Auflistung aller Kandidaten ist im Anhang zu finden (Tabelle 6.2).

Wie zu erwarten, hat die Suppression der neuronalen  $\beta$ III-Tubulin-Isoform (TUBB3), welche als Markerprotein für neuronale Differenzierung dient, einen drastischen Abfall in der Gesamtfläche an detektierten neuronalen Zellkörpern zur Folge. Über diesen trivialen Fall hinaus induziert nur die siRNA gegen den Apoptose-Regulator Bcl2l11 eine Reduktion der neuronalen Differenzierung von mehr als drei Standardabweichungen (s. Tab. 3.2). Einen Anstieg der neuronalen Differenzierung von mehr als drei Standardabweichungen wurde mit fünf siRNAs beobachtet (s. Tab. 3.3). Zu dieser Gruppe gehört das mit MAP1c verwandte GABA-Rezeptor-assoziierte Protein GABARAP, die gamma-Tubulin Komplex Komponente TUBGCP4 und der Mikrotubuli-Crosslinker MACF1. Auffällig ist auch, dass die Suppression von anderen Tubulin-Isoformen wie TUBB2b und möglicherweise auch TUBB5 einen Anstieg der Gesamtfläche detektierte neuronaler Zellkörper verursacht. Eine kompensatorische Induktion der TUBB3 Isoform, die als Marker zur Identifizierung der neuronalen Zell-

körper verwendet wurde, könnte diesen Effekt möglicherweise erklären. Im Allgemeinen war dieser Phänotyp jedoch nur relativ schwach ausgeprägt und mit einem relativ hohen Fehler, im Vergleich der drei experimentellen Repetitionen, behaftet.

<b>Gensymbol</b>	<b>Anstieg der neuronalen Differenzierung</b>	<b>Gen-Beschreibung</b>
Gabarap	3,89±1,08	Gamma-aminobutyric acid receptor associated protein
Tubgcp4	3,62±1,50	Tubulin Ringkomplex Komponente
Gabarap (2 pmol)	3,17±1,09	Gamma-aminobutyric acid receptor associated protein
Tubb2b	3,09±0,43	Tubulin, beta 2B, linked to neuronal migration disorder
Macf1	3,07±1,25	Mikrotubule-Actin crosslinking factor 1
Tubb5	2,39±0,91	Tubulin, beta 5

**Tabelle 3.3: Mikrotubuli-Regulatoren mit negativem Einfluss auf die neuronale Differenzierung.** Aufgelistet sind Kandidaten, nach dessen Suppression eine vermehrte neuronale Differenzierung zu beobachten und detektieren war, in Einheiten der Standardabweichung ( $\pm$ SEM von drei Wdh). Wurde keine Angabe zur siRNA Menge gemacht, so handelt es sich um 4 pmol/well. Eine Auflistung aller Kandidaten ist im Anhang zu finden (Tabelle 6.2).

Eine relativ große Anzahl von siRNAs induziert einen Anstieg oder Abfall der Durchschnittslänge von Neuriten. Die durchschnittliche Länge von Neuriten wurde hier aus dem Verhältnis von Gesamtlänge der Neuriten zur Gesamtfläche an neuronalen Zellkörpern abgeleitet (s. Abb. 3.10 C). Die hierdurch detektierten Phänotypen mit längeren bzw. kürzeren Neuriten lassen auf einen spezifischen Effekt auf die Regulation der Neuriten Initiation bzw. der darauf folgenden Neuritenverlängerung schlie-

ßen. Analog zur Quantifizierung der neuronalen Differenzierung wurde dieser Effekt durch Bestimmung des Abstands eines experimentellen Messpunktes von einer Regressionsgeraden durch die positiven Kontrollmessungen berechnet. Hier wurde dieser Abstand jedoch in einer Auftragung der Gesamneuritenlänge gegen die Gesamtfläche der neuronalen Zellkörper verwendet (s. Abb. 3.10 C). Wenn der Abstand einer Messung höher oder niedriger als die dreifache Standardabweichung der Positivkontrollen war, galt der entsprechende Regulator als potentieller Kandidat. In den Tabellen 3.4 und 3.5 sind jeweils 10 Kandidaten mit dem ausgeprägtesten Phänotyp aufgelistet.

<b>Gensymbol</b>	<b>Abnahme der Neuritenlänge</b>	<b>Gen-Beschreibung</b>
Dctn3	7,93 ± 2,19	Dynactin 3
Dctn2	6,93 ± 2,43	Dynactin 2
Incenp	6,01 ± 1,27	Inner Centromer Protein
Nefl (1 pmol)	5,41 ± 3,19	Neurofilament, leichtes Polypeptid
Incenp (2 pmol)	5,20 ± 1,88	Inner Centromer Protein
Dync1h1	5,20 ± 0,87	zytosolisches Dynein 1, schwere Kette 1
Kif3c	5,12 ± 0,97	Kinesin Family Member 3C
Dctn4	5,08 ± 0,99	Dynactin 4
Ctnnd1	5,04 ± 2,03	Catenin, Delta 1
Poc5	4,93 ± 1,52	Centriolar Protein Homolog

Tabelle 3.4: **Mikrotubuli-Regulatoren mit einem positiven Einfluss auf das Neuritenwachstum.** Gezeigt sind Kandidaten, deren Suppression zu einer Verkürzung der Neuriten führt. Die Abnahme der Neuritenlänge wurde aus der Änderung der Distanz zur Regressiongeraden der Positivkontrollen ermittelt, angegeben in Einheiten der Standardabweichung ( $\pm$ SEM von drei Wdh). In dieser Tabelle sind 10 Kandidaten mit dem stärksten Effekt abgebildet. Wurde keine Angabe zur siRNA Menge gemacht, so handelt es sich um 4 pmol/well. Eine Auflistung aller Kandidaten ist im Anhang zu finden (Tabelle 6.3).

Bereits in früheren Veröffentlichungen wurde eine mögliche Rolle vom zytoplasmatischen Dynein während des Neuritenauswachsens diskutiert ([101], [111], [112]). Daher war eine Verkürzung der Neuritendurchschnittslänge nach Suppression verschiedener Dynein-Dynactin Untereinheiten zu erwarten.

Gensymbol	Anstieg der Neuritenlänge	Gen-Beschreibung
Tbata	6,52 ± 2,38	Spatial
EB2	5,27 ± 0,82	RP/EB Familie, Mapre 2
Ttl13	4,53 ± 1,49	Tubulin tyrosine ligase-like family, member 3
Keg1	4,05 ± 0,28	Kidney expressed gene 1
Dst	3,86 ± 2,07	Dystonin, Zytoskelett Linker
Serpina3c (2 pmol)	3,70 ± 1,26	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3c
Rock1 (2 pmol)	3,59 ± 0,79	Rho-associated coiled coil containing protein kinase 1
Tubb1 (1 pmol)	3,46 ± 1,02	Tubulin, beta 1
Vps4b	3,35 ± 0,40	Vacuolar protein sorting 4b
Tubb3 (1 pmol)	3,35 ± 0,87	Tubulin, beta 3 (neuronaler Marker)

Tabelle 3.5: **Mikrotubuli-Regulatoren, welche einen negativen Einfluss auf das Neuritenwachstum haben.** Gezeigt sind Kandidaten, deren Suppression eine Verlängerung der Neuriten verursacht. Der Anstieg der Neuritenlänge wurde durch die Veränderung des Abstands zur Regressionsgeraden der Positivkontrollen bestimmt, angegeben in Einheiten der Standardabweichung ( $\pm$ SEM von drei Wdh). In dieser Tabelle sind 10 Kandidaten mit dem stärksten Effekt abgebildet. Wurde keine Angabe zur siRNA Menge gemacht, so handelt es sich um 4 pmol/well. Eine Auflistung aller Kandidaten ist im Anhang zu finden (Tabelle 6.3).

Ebenso wurde in früheren Veröffentlichungen gezeigt, dass die Rho



Kinase (ROCK1) die Axon-Initiation bzw. Verlängerung reduziert [113]. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung führt die Suppression von ROCK1 mittels siRNA zu einem Anstieg in der Durchschnittslänge von Neuriten. Interessanterweise induzierte eine Suppression des Mikrotubuli-Plus-Ende bindenden Proteins EB2 ebenfalls eine Verlängerung der Neuriten, wohingegen die Herunterregulierung der Isoform EB3 kürzere Neuriten verursachte.

Einige wenige siRNAs induzierten unerwartet eine drastische Zunahme des Neuritendurchmessers. Meist war dieser Effekt verbunden mit einer deutlichen Abnahme des gesamten neuronalen Tubulin-Signals. Andere siRNAs, wie beispielsweise Cdc27 oder Plk1, welche ebenfalls eine starke Abnahme des gesamten neuronalen Tubulin Signals bewirkten, verursachten einen eher geringeren Neuritendurchmesser. siRNAs gegen die Mikrotubuli-Motorproteine Eg5, MKLP1 oder das Motor-assoziierte Protein INCENP induzierten einen signifikanten, reproduzierbaren Anstieg des Neuritendurchmessers.

<b>Gensymbol</b>	<b>Zunahme des Neuritendurchmessers</b>	<b>Gen-Beschreibung</b>
Eg5	8,03 ± 2,60	Kinesin-5 Familie, KIF11
Incenp	5,35 ± 1,82	Inner Centromer Protein
Mklp1	3,73 ± 1,78	Mitotic Kinesin-like Protein1, KIF23
Ckap5	3,47 ± 1,08	ch-TOG, Säugetierhomolog von XMAP216
Gabarap	3,45 ± 0,24	Gamma-aminobutyric acid receptor associated protein
EB1	3,20 ± 1,10	RP/EB Familie, Mapre 1

Tabelle 3.6: **Mikrotubuli-Regulatoren mit Einfluss auf den Neuritendurchmesser.** Die siRNA Suppression dieser Kandidaten verursacht eine Vergrößerung des Neuritendurchmessers. Der durchschnittliche Neuritendurchmesser wurde aus dem Verhältnis der Gesamtfläche von Neuriten pro Neuritenlänge berechnet, angegeben in Einheiten der Standardabweichung ( $\pm$ SEM von drei Wdh). Wurde keine Angabe zur siRNA Menge gemacht, so handelt es sich um 4 pmol/*well*. Eine Auflistung aller Kandidaten ist im Anhang zu finden (Tabelle 6.4).

### 3.2.2 Sekundärer Screen: Validierung der Beobachtungen aus dem primären Screen

Im sekundären Screen wurde eine Reihe ausgesuchter Kandidaten detaillierter untersucht, welche im primären Screen eine Veränderung in der Neuritenlänge bzw. dem Neuritendurchmesser von mehr als drei Standardabweichung zu den Kontrollzellen aufwiesen.

In allen siRNA-Experimenten sind *off-target* Effekte der verwendeten siRNAs möglich - die unspezifische Bindung an weitere mRNAs, welche nicht das Zielprotein kodieren und daher eine Suppression von unbekanntem Proteinen („*off-target*“) zur Folge haben. Diese *off-target* Effekte können somit zur Ausbildung von falsch interpretierten Resultaten führen. Um

eventuelle falsch-positive Kandidaten herauszufiltern bzw. real positive zu verifizieren, wurde ein sekundärer Screen mit vier Einzel-siRNAs durchgeführt. Ein Kandidat galt hierbei als bestätigt, wenn mindestens zwei der vier Einzel-siRNAs den gleichen Phänotyp verursachten wie die siRNA-Mixtur aus dem primären Screen.

Die in Tabelle 3.7 aufgelisteten Regulatoren zeigten im primären Screen den eindeutigen Phänotyp „längere Neuriten“. Die Neuriten waren signifikant ( $>3$  SD) länger als in Kontrollzellen. Im sekundären Screen konnten zwei (Eb2, Keg1) dieser sechs Kandidaten validiert werden, da mindestens zwei der Einzel-siRNAs den vorher beobachteten Phänotyp reproduzierten. Bei drei weiteren Kandidaten (Tbata, Dst, Disc1) zeigte jeweils eine Einzel-siRNA diesen Phänotyp. Diese Kandidaten können noch nicht als bestätigt angesehen werden, da zuerst *off-target* Effekte ausgeschlossen werden müssen. Vps4b, ein Kandidat, der im primären Screen eine marginale Erhöhung des Neuritenwachstums bewirkte, wurde von keiner Einzel-siRNA bestätigt.

Gen	siRNA-Mix	siRNA A	siRNA B	siRNA C	siRNA D	bestätigt
Tbata	6,52±2,38	1,98±1,44	<b>3,66±1,42</b>	1,00±1,3	0,42±1,18	nein
EB2	5,27±0,82	-0,38±0,83	<b>7,43±1,44</b>	<b>6,94±0,83</b>	<b>4,03±0,34</b>	3x
Keg1	4,05±0,82	-0,33±1,54	<b>3,79±1,74</b>	<b>3,64±0,88</b>	<b>-6,86±3,38</b>	2x
Dst	3,86±2,07	0,16±0,75	-0,49±0,81	-0,53±0,71	<b>6,29±2,24</b>	1x
Vps4b	3,35±0,40	1,24±1,82	-0,63±1,32	0,56±2,30	2,14±0,87	nein
Disc1	3,16±0,15	<b>4,01±0,85</b>	2,28±1,70	-1,37±0,82	2,83±0,59	1x

**Tabelle 3.7: Suppression von Mikrotubuli-Regulatoren, die einen negativen Einfluss auf die Neuritenlänge aufweisen.** In der Tabelle sind alle im sekundären Screen getesteten Regulatoren aufgelistet, welche den Phänotyp „längere Neuriten“ im primären Screen aufwiesen. Zum Vergleich zu den Werten der Einzel-siRNAs (A - D) wurde der Durchschnittswert zur Neuritenlänge aus dem primären Screen angegeben. Alle bestätigten Werte der Einzel-siRNAs sind fett gedruckt, wenn sie einen Unterschied von mehr als drei Standardabweichungen zu den Kontrollen aufwiesen. Rote Werte geben an, wenn ein gegensätzlicher Phänotyp detektiert wurde.

Die Ergebnisse der Suppression von Mikrotubuli-Regulatoren, die einen positiven Effekt auf das Neuritenwachstum haben, sind in Tabelle 3.8 dargestellt. Es wurden im sekundären Screen 18 Regulatoren getestet, deren Suppression den Phänotyp „kürzere Neuriten“ im primären Screen signifikant auslöste. Acht Kandidaten wurden durch mindestens zwei unabhängige Einzel-siRNAs bestätigt. Darunter fallen auffällig viele Untereinheiten des Dynein/Dynactin Komplexes (Dctn3, Dctn2, Dync1h1, Dynlr1) sowie Incenp, Mklp1, Tpx2 und Mtap2. Bei weiteren sechs Mikrotubuli-Regulatoren zeigt eine der Einzel-siRNAs den Phänotyp, vier andere wurden nicht bestätigt. Auch hier zeigt sich, dass Kandidaten, welche nur marginale Effekte im primären Screen bewirkten, weniger reproduzierbar waren. Unter den nicht reproduzierbaren Kandidaten befinden sich auch eine leichte Kette des zytoplasmatischen Dyneins (Dyntl1b) sowie die Dynactin Untereinheit Dctn4, welche beide im primären Screen einen recht deutlichen Effekt induzierten. Auffällig sind auch die Ergebnisse des Mikrotubuli-Nukleators und Stabilisators Tpx2, die von drei Einzel-siRNAs eindeutig bestätigt wurden - die vierte Einzel-siRNA jedoch einen gegensätzlichen Phänotyp (längere Neuriten) induziert. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei diesem gegensätzlichen Phänotyp um einen *off-target* Effekt handelt. Sicherheit kann hier jedoch nur eine detailliertere Analyse liefern.

Von den Mikrotubuli-Regulatoren, deren Suppression einen vergrößerten Neuritendurchmesser verursachte, wurden drei Kandidaten im sekundären Screen analysiert (Eg5, Incenp, Mklp1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 aufgelistet. Die Suppression von Eg5 zeigt wie im primären Screen den ausgeprägtesten Phänotyp. Alle vier Einzel-siRNAs verursachen eine sehr deutliche Vergrößerung des Neuritendurchmessers. Auffällig ist auch, dass Tpx2, welches im primären Screen keinen erhöhten Neuritendurchmesser aufwies, für drei der vier Einzel-siRNAs einen deutlichen Anstieg im Neuritendurchmesser zeigte.

Gen	siRNA-Mix	siRNA A	siRNA B	siRNA C	siRNA D	bestätigt
Dctn3	7,93±2,19	<b>5,72±1,85</b>	<b>5,88±0,66</b>	0,48±0,82	1,79±0,83	2x
Dctn2	6,93±2,43	<b>7,67±0,80</b>	1,47±0,86	<b>7,01±0,36</b>	<b>3,07±1,11</b>	3x
Incenp	6,01±1,27	<b>6,16±1,68</b>	-0,74±0,78	1,17±1,41	<b>11,24±1,32</b>	2x
Dync1h1	5,20±0,87	<b>6,46±1,36</b>	<b>6,13±1,04</b>	0,00±1,17	2,60±0,29	2x
Kif3c	5,12±0,97	2,23±1,34	0,51±0,80	-1,10±0,64	<b>4,55±0,97</b>	1x
Dctn4	5,08±0,99	-1,71±1,65	0,96±1,55	0,67±0,42	-0,75±0,56	nein
Poc5	4,93±1,53	-0,20±0,61	1,28±0,60	-0,14±1,80	1,34±1,46	nein
Macf1	4,63±0,87	-0,70±0,70	-0,66±2,21	0,13±0,59	0,93±0,44	nein
Mklp1	4,51±1,25	<b>5,09±0,52</b>	<b>7,57±0,60</b>	-0,48±1,65	1,19±0,65	2x
Dcx	4,29±1,76	-0,83±0,85	<b>3,58±1,10</b>	1,95±0,76	-0,87±1,55	1x
Dctn6	4,23±1,23	0,69±0,64	-2,08±0,45	2,43±0,06	<b>3,17±0,93</b>	1x
TPX2	4,18±1,06	<b>4,66±0,42</b>	<b>7,54±1,10</b>	<b>6,39±0,84</b>	<b>-3,04±2,09</b>	3x
Dynlt1b	3,81±0,41	-0,54±0,93	-0,58±1,54	-0,14±0,72	1,74±0,50	nein
Mtap1b	3,70±0,50	2,71±0,38	<b>3,66±1,16</b>	2,67±1,44	<b>5,60±1,23</b>	2x
Dynlrb1	3,69±0,39	<b>3,82±0,95</b>	<b>5,44±0,57</b>	1,77±0,39	2,07±0,56	2x
EB1	3,64±0,83	-0,06±0,40	1,33±1,38	<b>3,13±0,99</b>	1,23±1,27	1x
Nde1	3,28±0,64	-2,54±0,50	0,14±0,90	-0,33±1,14	<b>4,56±0,44</b>	1x
Eml4	3,17±0,50	2,11±1,00	2,23±1,71	<b>4,84±0,57</b>	1,91±0,79	1x

Tabelle 3.8: **Einzel-siRNA Suppression von Mikrotubuli-Regulatoren, die einen positiven Einfluss auf die Neuritenlänge aufweisen.** In dieser Tabelle sind alle im sekundären Screen getesteten Gene aufgelistet, welche den Phänotyp „kürzere Neuriten“ im primären Screen aufwiesen. Zum Vergleich wurde der ermittelte Durchschnittswert aus dem primären Screen angegeben. Alle bestätigten Werte der Einzel-siRNAs sind fett gedruckt, wenn sie einen Unterschied von mehr als drei Standardabweichungen zu den Kontrollen aufwiesen. Rote Werte geben an, wenn ein gegensätzlicher Phänotyp detektiert wurde.

Gen	siRNA-Mix	siRNA A	siRNA B	siRNA C	siRNA D	bestätigt
Eg5	8,03±2,50	<b>8,79±1,95</b>	<b>5,20±1,89</b>	<b>12,06±1,23</b>	<b>14,90±2,31</b>	4x
Incenp	5,35±1,82	<b>11,56±2,12</b>	-1,20±1,01	-1,29±0,52	<b>14,55±1,85</b>	2x
Mklp1	3,73±1,87	<b>3,64±0,36</b>	<b>6,70±1,47</b>	0,49±0,70	0,82±0,90	2x
Gabarap	3,45±0,24	2,01±0,24	-0,45±0,61	0,75±0,80	0,64±0,41	nein
EB1	3,20±1,10	-0,16±0,45	0,29±0,91	2,89±1,16	1,65±0,66	nein
Tpx2	2,16±0,48	<b>6,28±1,92</b>	<b>12,26±2,03</b>	<b>4,67±0,81</b>	-1,33±0,53	3x

Tabelle 3.9: **Suppression von Mikrotubuli-Regulatoren, die den Neuritendurchmesser beeinflussen.** In der Tabelle sind alle im sekundären Screen getesteten Regulatoren aufgelistet, welche den Phänotyp „erhöhter Neuritendurchmesser“ im primären Screen aufwiesen. Kandidaten dieses Phänotyps weisen einen vergrößerten Neuritendurchmesser auf. Zum Vergleich zu den vier Einzel-siRNAs wurde der ermittelte Durchschnittswert aus dem primären Screen angegeben. Außerdem wurde der Kandidat TPX2 dieser Liste zugefügt, obwohl er im primären Screen keinen Phänotyp aufwies. Alle bestätigten Werte der Einzel-siRNAs sind fett gedruckt, wenn sie einen Unterschied von mehr als drei Standardabweichungen zu den Kontrollen aufwiesen.

Insgesamt konnten bei 22 getesteten Kandidaten der Phänotyp durch mindestens eine Einzel-siRNA reproduziert werden. Davon wurden 11 Mikrotubuli-Regulatoren bereits durch den sekundären Screen validiert.

### 3.3 Weiterführende Studien zur detaillierten Untersuchung von ausgewählten Kandidaten

#### 3.3.1 Konkurrenzsituation unter EB-Proteinen moduliert das Neuritenwachstum

Die Analyse des High-Content Screens hat gezeigt, dass die Suppression einzelner Mitglieder der EB-Familie unterschiedliche Phänotypen in der Entwicklung von Neuronen induziert. Sowohl im primären als auch im sekundären Screen wurde beobachtet, dass eine Suppression von EB2 eine Verlängerung der Neuriten bewirkt (siRNA Mix: Verlängerung um  $5,27 \pm 0,82$  SD; 3 Einzel-siRNAs: Verlängerung um mehr als 3 SD, s. Tab. 3.5, 3.7). Die Suppression von EB1 induziert nur eine geringfügige Veränderung der Neuritenlänge (Verkürzung um  $3,64 \pm 0,83$  SD, siehe Anhang: Tabelle 6.3). Das Fehlen dieses Proteins scheint nur einen geringen Effekt auf die neuronale Morphologie zu haben. Der *knock down* von EB3 verursacht ebenfalls im primären Screen eine marginale Verkürzung der Neuriten (4 pmol:  $1,43 \pm 0,90$ ) und keine der vier Einzel-siRNAs reduzierte die Neuritenlänge um mehr als 3 SD (siRNA A:  $1,52 \pm 0,37$ ; siRNA B:  $-0,32 \pm 0,76$ ; siRNA C:  $-1,44 \pm 0,85$ ; siRNA D:  $-0,70 \pm 0,31$ ). Um diese Beobachtungen detaillierter zu charakterisieren, wurden weitere Wiederholungen des *knock downs* einzelner Familienmitglieder, als auch *knock downs* mehrerer Vertreter in Kombination durchgeführt. In Abbildung 3.11 A sind mikroskopische Bilder und Quantifizierungen der Neuritenlänge nach Suppression je einer der drei EB-Isoformen dargestellt. Im Graph sind die Änderungen im Neuritenwachstum in Einheiten der Standardabweichungen aufgetragen. Mit einem One-way ANOVA-Test und einem Post-Test nach Dunnett wurde untersucht, ob die experimentellen Gruppen sich von der Kontrollgruppe signifikant unterscheiden. Nach alleiniger Suppression von EB1 konnte hier keine signifikante Änderung der Neuritenlänge detektiert werden. RNA-Interferenz von EB2 führt hingegen, wie erwartet, zu einer signifikanten Erhöhung der Neuritenlänge (sowohl mit 2, als auch mit 4 pmol siRNA:  $p < 0,001$ ). Alleinige Suppression von EB3 führ-

te zu einer schwächeren, aber signifikanten Verkürzung der Neuriten (2 pmol siRNA:  $p < 0,05$ ; 4 pmol siRNA:  $p < 0,001$ ).

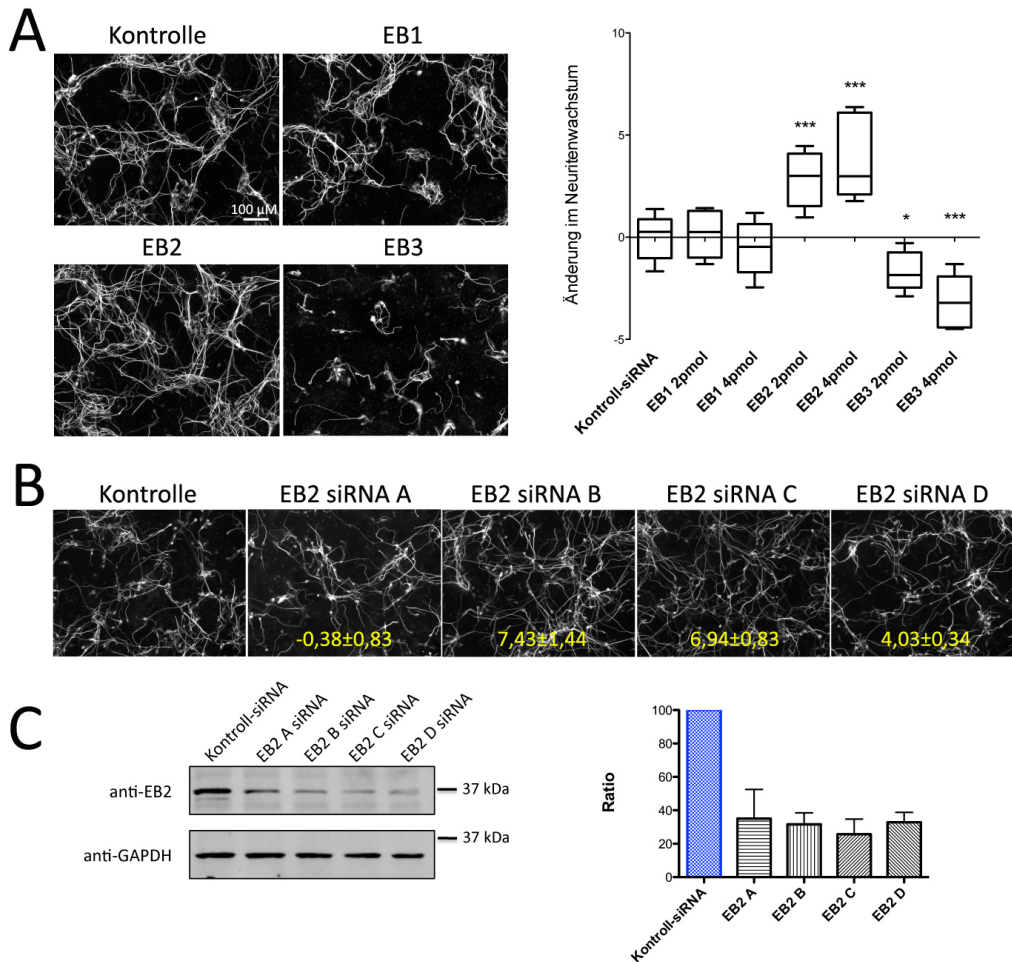


Abbildung 3.11: **Untersuchung der Rolle von EB-Proteinen während der Neuriten Initiation.** Dargestellt sind die 4 pmol siRNA Konditionen von EB1, EB2 und EB3. **A:** Die Suppression von EB2 führt zu längeren, die Suppression von EB3 zu kürzeren Neuriten. Der Graph zeigt die Änderungen im Neuritenwachstum nach siRNA Suppression in Einheiten der Standardabweichung. **B:** Bildanalyse des EB2-Phänotyps nach Einzel-siRNA Suppression (EB2 A - EB2 D; s. Tab. 3.7). Durchschnittswerte des Neuritenwachstums ( $SD \pm SEM$ ) aus dem sekundären Screen. **C:** Western Blot Analyse zur Bestimmung der Einzel-siRNA Effizienz ( $n=3$ ).



Aufgrund der breit akzeptierten Annahme, dass die Proteine der EB-Familie Mikrotubuli stabilisieren, wurde ursprünglich erwartet, dass eine Suppression dieser Regulatoren den Phänotyp „kürzere Neuriten“ induzieren sollte. Es war daher überraschend, dass die Suppression von EB2 eine Verlängerung des Neuritenwachstums bewirkte. Dieser Effekt konnte auch klar mit drei der vier Einzel-siRNAs bestätigt werden (vgl. Tab. 3.7 und Abb. 3.11 **B**). Eine besonders effektive Suppression des EB2 Proteins konnte für dieselben drei Einzel-siRNAs durch Western Blot Analysen bestätigt werden (s. Abb. 3.11 **C**). Ein direkter Vergleich zeigt, dass die Suppression von EB2 und die Erhöhung des Neuritenwachstums miteinander korrelieren.

Die drei EB-Isoformen besitzen eine Calponin Homologie (CH)-Domäne, mit welcher sie an wachsende Mikrotubuli-Enden binden können [39, 40]. Es wird angenommen, dass EB1 und EB3 einen direkten Effekt auf die Mikrotubuli-Polymerisation haben [114]. Somit zählen beide Proteine zu den Mikrotubuli-Stabilisatoren. Über EB2 ist bisher weniger bekannt. EB2 besitzt eine zu EB1 und EB3 homologe Bindedomäne (CH-Domäne) für Mikrotubuli Plus-Enden. Diese zeichnet sich jedoch durch eine geringere Bindungsaffinität zu anderen +TIPs aus, welche durch EB-Proteine an wachsende Mikrotubuli-Enden rekrutiert werden [39, 40, 114]. Die Ähnlichkeit der Mikrotubuli-Bindungsstellen an wachsenden Mikrotubuli könnten eine Konkurrenzsituation zwischen den drei EB-Isoformen bedingen. Eine solche Konkurrenzsituation wäre eine mögliche Erklärung für den beobachteten EB2-Phänotyp „längere Neuriten“, da aufgrund der EB2 Suppression mehr Bindungsstellen für EB1 und EB3 zur Verfügung stehen, welche wiederum durch ihre höhere Affinität zu stabilisierenden +TIPs die Katastrophenrate herabsetzen könnten. Eine mögliche Folge einer Reduktion von Katastrophen wäre das beobachtete verlängerte Neuritenwachstum. Dieser hypothetische Mechanismus kann durch die Kombination von siRNAs näher untersucht werden. Hierfür wurden jeweils zwei EB-Isoformen supprimiert, so dass lediglich eine Isoform auf endogenem Level exprimiert wurde. Um eine simultane Suppression mittels siRNA durchführen zu können, musste die siRNA-Menge pro Kandidat auf 2

pmol begrenzt werden, da im Kombinationsexperiment die maximal tolerierte siRNA-Menge von 4 pmol nicht überschritten werden sollte (siehe Abschnitt 3.1.4). Damit die Suppression von EB-Kombinationen und *knock down* einzelner EB-Proteine vergleichbar waren, wurden die Konditionen mit 2 pmol EB-siRNA zusätzlich mit 2 pmol Kontroll-siRNA versehen, damit jede Kondition eine siRNA-Gesamtmenge von 4 pmol aufwies. In Abbildung 3.12 A sind die morphologischen Veränderungen nach der RNA-Interferenz der einzelnen EBs sowie der supprimierten EB-Kombinationen dargestellt. EB2 und EB3 bestätigen, wie bereits oben erwähnt (s. Abb. 3.12 A), auch bei einer siRNA-Menge von 2 pmol ihre vorherigen Phänotypen. EB1 supprimierte Zellen zeigen wiederum keine signifikanten morphologischen Unterschiede zu den Kontrollzellen.

Wie in Abbildung 3.12 B gezeigt wird, führt die simultane Suppression von EB1 und EB2 nicht zu einem erhöhten Neuritenwachstum. Der *knock down* von EB2 und EB3 resultiert sogar in einer geringeren, nicht signifikanten Reduktion der Neuritenlänge. Der vorherige EB2-Phänotyp „längere Neuriten“ ist bei gleichzeitiger EB1 oder EB3 Suppression nicht detektierbar. Die Morphologie und das durchschnittliche Neuritenwachstum unterscheidet sich nicht signifikant von der Kontroll-Gruppe. Die simultane Suppression von EB1 und EB3 zeigt eine sehr ausgeprägte Verkürzung der Neuriten. Der Effekt dieser Kombination ist stärker (EB1+EB3:  $-2,41 \pm 1,91$  SD), als die Summe der einzelnen EB-Suppressionseffekte (EB1:  $0,16 \pm 1,11$  SD; EB3:  $-1,68 \pm 0,96$  SD), was auf eine synergistische Verstärkung hindeutet. Die Variabilität der einzelnen Wiederholungen ist jedoch auch höher.

Aus diesen Ergebnissen kann ein hypothetisches Modell zur Funktion der EB-Proteine vorgeschlagen werden (s. Abb. 3.12 C). In neuronalen Zellen ist EB3 der dominante Mikrotubuli-Stabilisator dieser Proteinfamilie. Die Suppression dieses Proteins resultiert in einem eindeutigen Phänotyp mit „kürzeren Neuriten“, der durch eine Reduktion der Mikrotubuli-Stabilität bedingt sein könnte. EB1 allein scheint dagegen keine entscheidene Rolle während der Neuriten Initiation zu spielen, kann jedoch den Verlust von EB3 teilweise kompensieren.

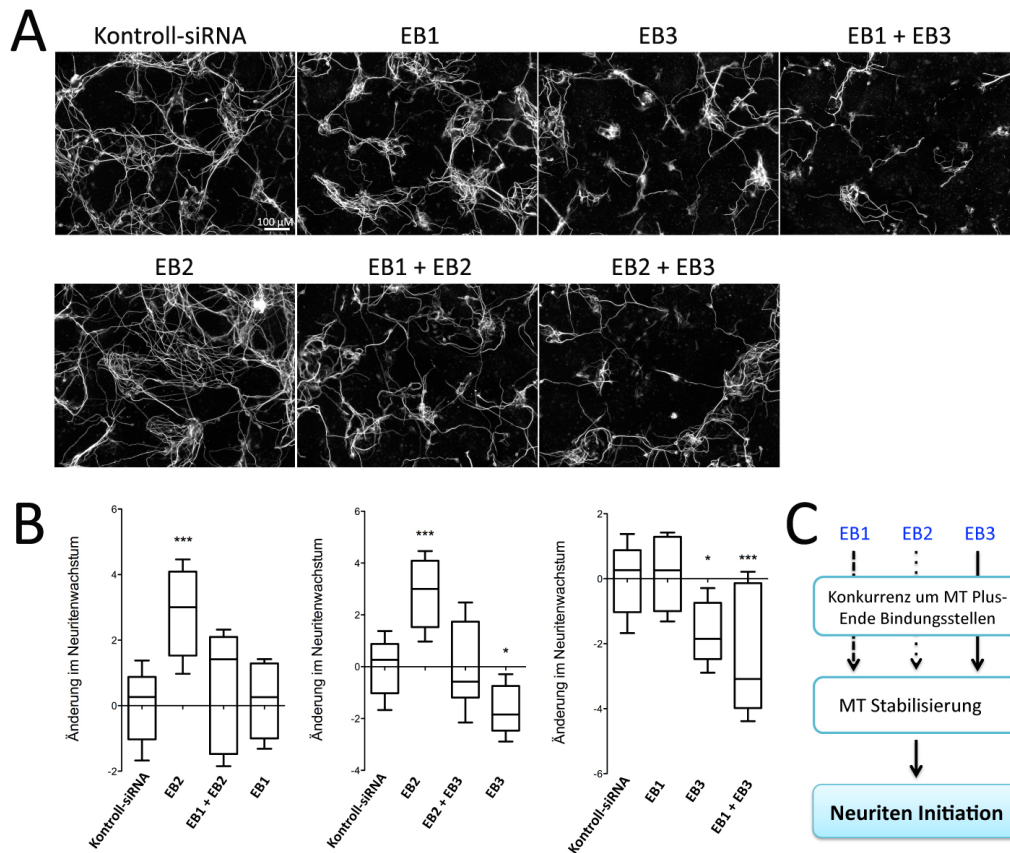


Abbildung 3.12: **Detaillierte Untersuchung der Funktionen der einzelnen EB-Proteine.** Bestimmung des Neuritenwachstums nach Einzel- und kombinierter Suppression der EB-Proteine. **A:** Zellbilder von differenzierten P19 Zellen nach der siRNA Suppression. **B:** Graphische Darstellungen der kombinatorischen Suppression von EB1-EB2, EB2-EB3 sowie EB1-EB3. Aufgetragen sind die Veränderungen des Neuritenwachstums nach siRNA Suppression in Einheiten der Standardabweichung. Mit einem One-way ANOVA-Test und einem Post-Test nach Dunnett wurde untersucht, ob sich die experimentellen Gruppen von der Kontrollgruppe (Kontroll-siRNA) signifikant unterschieden. **C:** Modell zur Rolle der EB-Proteine während der Neuriten Initiation.

Eine Erhöhung des Neuritenwachstums durch EB2 *knock down* ist hingegen abhängig von EB1 und EB3, da der durch EB2 Suppression indu-

zierte Effekt „längere Neuriten“ bei zusätzlichem *knock down* von EB1 oder EB3 nicht detektiert werden konnte. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass das Wachstum der Neuriten von einer wechselseitigen Konkurrenzsituation der drei EB-Proteine bezüglich der Mikrotubuli-Stabilisierung abhängt.

### **3.3.2 Die Rolle des Dynein-Dynactin Komplexes in der Neuriten Initiation**

Es ist bereits bekannt, dass der Dynein-Dynactin Komplex eine wichtige Rolle im Transport und der strukturellen Organisation von zellulären Mikrotubuli spielt. Die Zusammensetzung dieses Komplexes variiert je nach Funktion und Wirkort. Daher wurden im primären Screen alle Dynein- und Dynactin-Untereinheiten untersucht, um diejenigen Untereinheiten zu identifizieren, welche eine kritische Rolle in der neuronalen Entwicklung spielen.

Im primären Screen wurde nach Suppression zahlreicher Dynein/Dynactin-Untereinheiten eine Verkürzung der Neuritenlänge detektiert. Unter diesen Kandidaten befanden sich mehrere Untereinheiten des zytoplasmatischen Dynein 1: die schwere Kette 1 (Dync1h1), die intermediäre Kette (Dync1i2), die leichte Kette Typ *Roadblock* (Dynlrb1, LC7), die leichte Kette Typ *Tctex* (Dynlt1) sowie die Dynactin-Untereinheiten DCTN2, DCTN3, DCTN4 und DCTN6. In Abbildung 3.13 sind alle Untereinheiten dieses Motorprotein-Komplexes sowie die Angaben zur suppressionsbedingten Reduzierung des Neuritenwachstums aufgelistet. Zusätzlich sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen abgebildet.

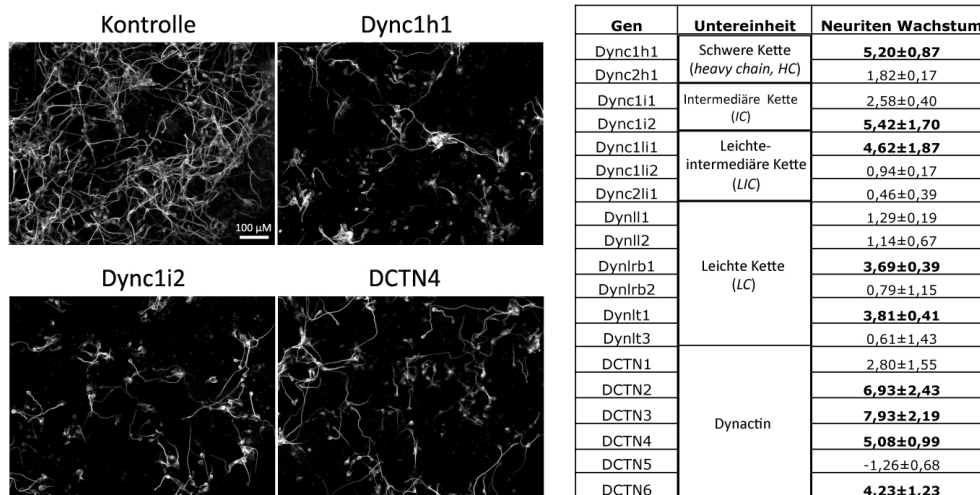


Abbildung 3.13: **Suppression der einzelnen Untereinheiten des Dynein-Dynactin Komplexes beeinflusst die Neuriten Initiation.** Repräsentative Bilder einiger Kandidaten des Dynein-Dynactin Komplexes nach siRNA Suppression. Auflistung aller im primären Screen getesteten Untereinheiten von Dynein und Dynactin mit den Durchschnittswerten in  $SD \pm SEM$  bezüglich der Reduzierung des Neuritenwachstums.

Die schwere Kette 1 des zytoplasmatischen Dynein 1 enthält die Motordomäne, bestehend aus sechs AAA ATPase Einheiten, und ist somit ein zentraler Bestandteil von funktionalen Dynein-Komplexen. Dync1h1 ist daher ein primärer Kandidat zur detaillierten Analyse des *knock down*-Phänotyps. Im sekundären Screen wurde dieser Kandidat durch zwei Einzel-siRNAs, welche den vorherigen Phänotyp induzierten, validiert. In der durchgeführten Western Blot Analyse konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen der Protein-Suppression und dem induzierten Phänotyp beobachtet werden (s. Abb. 3.14 B). Um den Einfluss dieses Proteins auf die neuronale Entwicklung genauer zu untersuchen, wurden zunächst Langzeit Live-Zell Aufnahmen durchgeführt. Über einen Zeitraum von zwei Tagen wurde das initiale Wachstum von Neuriten mit und ohne siRNA Suppression verfolgt. Auf diese Weise konnte untersucht werden, wie die verkürzten Neuriten, welche im primären und sekundären Screen detek-

tiert wurden, zustande kommen. Der Aufnahmezeitraum der Filme wurde auf die Tage drei und vier nach der Transfektion beschränkt, um einen negativen Einfluss auf die Differenzierungseffizienz durch Phototoxizität gering zu halten. Alle zehn Minuten wurde ein Bild von neun Positionen pro *well* einer 384-Loch Platte aufgenommen. Auf Basis früherer Live-Zell Aufnahmen konnte der Aufnahmezeitraum auf diese beiden Tage beschränkt werden, da vor diesem Zeitpunkt nur wenige Zellen die neuronale Differenzierung eingeleitet hatten.

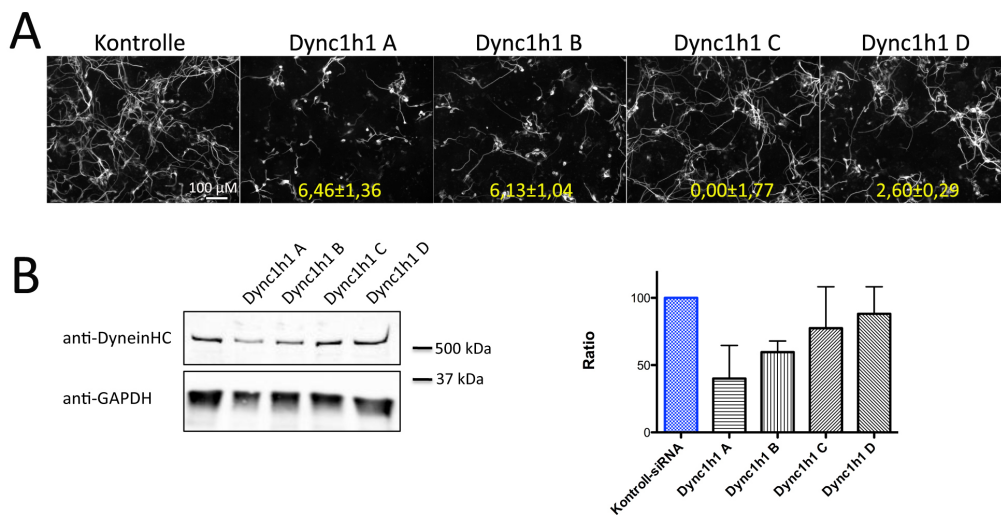


Abbildung 3.14: **Analyse des Phänotyps von Dync1h1 nach Einzel-siRNA Suppression.** **A:** Vergleichende Bildanalyse des Dync1h1-Phänotyps nach Einzel-siRNA Suppression (Dync1h1 A - Dync1h1 D; s. Tab. 3.8). Durchschnittswerte des Neuritenwachstums (SD±SEM) aus dem sekundären Screen. **B:** Western Blot-Analyse zur Bestimmung der siRNA-Effizienz (n=3).

Anhand der Bildreihe ist klar zu erkennen, dass die Dync1h1 supprimierten Zellen seltener als Kontrollzellen Neuriten initiieren und diese kaum verlängern (s. Abb. 3.15, Anhang: Film 6.2). Einmal ausgewachsene Neuriten von Kontrollzellen sind in der Regel recht stabil. In früheren Studien von Dehmelt *et al.* (2006) wurde vorgeschlagen, dass kortikale Po-

pulationen des zytoplasmatischen Dyneins in der Lage sind, Mikrotubuli gerichtet zu verschieben und auf diese Weise eine auswärtsgerichtete Kraft gegen die Zellmembran zu fokussieren. Dieser Mechanismus kann die Ausbildung von Neuriten-artigen Strukturen begünstigen. Fehlt nun diese fokussierte Verschiebung der Mikrotubuli aufgrund der Dync1h1-Suppression, so sind die Zellen nur noch eingeschränkt in der Lage, Neuriten auszubilden und zu verlängern. Die Beobachtungen aus den Langzeit-Aufnahmen sind kompatibel mit einem solchen Modell. Dync1h1 Suppression scheint zu einer Destabilisierung von neu gebildeten Neuriten zu führen, vermutlich aufgrund der fehlenden Kraft dieser Motorproteine auf die Mikrotubuli. Es ist naheliegend anzunehmen, dass auch andere Dynein-Dynactin Untereinheiten, welche den Phänotyp „kürzeren Neuriten“ mit Dync1h1 teilen, Bestandteil von kortikalen Dynein-Dynactin Komplexen sind, welche diese gerichtete Verschiebung der Mikrotubuli gegen die äußere Zellmembran erzeugen.

Des Weiteren wurde in einigen Dync1h1 supprimierten Zellen ein weiterer Phänotyp beobachtet (7-mal in sechs Dync1h1 Videos, 0-mal in 24 Kontrollvideos). Zunächst wurde eine Mikrotubuli-Ansammlung gebildet, welche eine ungewöhnliche, periodische Motilität hatte (siehe Anhang: Film 6.3). Vermutlich handelt es sich bei der Ansammlung um ein Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC). In Abbildung 3.16 ist eine Bildsequenz einer solchen Beobachtung dargestellt. Zunächst scheint die Mikrotubuli-Ansammlung kreisende Bewegungen durchzuführen, welche möglicherweise in eine Invertierung der Mikrotubuli-Organisation übergeht. Aufgrund der Suppression des Minus-Ende gerichteten Motorproteins könnte es zu einem Ungleichgewicht der von den übrigen Motorproteinen ausgelösten Kräfte auf die Mikrotubuli kommen, wodurch eine solche ungewöhnliche Bewegung einer Mikrotubuli-Ansammlung begünstigt werden könnte.

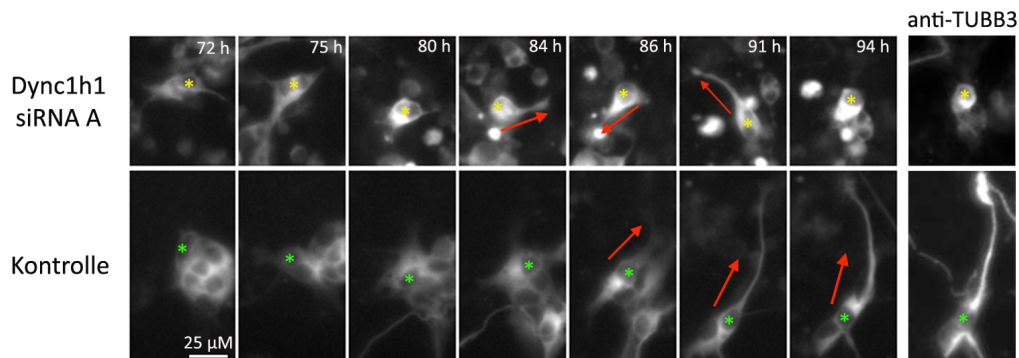


Abbildung 3.15: **Langzeitaufnahme von Dynein supprimierten P19 Zellen.** Dargestellt ist eine Bildsequenz aus einem Langzeitexperiment, in welchem Dync1h1 mittels siRNA in P19 Zellen supprimiert wurde. Die Zellen wurden zusätzlich mit NeuroD2, GFP-Tubulin und mCherry-Aktin ko-transfiziert. Abgebildet ist die Differenzierung einer Dync1h1-supprimierte Zelle und einer Kontrollzelle aus diesem Experiment (GFP-Tubulin Signal). Rote Pfeile markieren das Auswachsen und ggfs. Verlängern von initialen Neuriten. Anschließend wurde das neuronale  $\beta$ III-Tubulin mittels Antikörper angefärbt. Hierdurch wird deutlich, dass es sich bei den untersuchten Zellen um differenzierte Neuronen handelt.

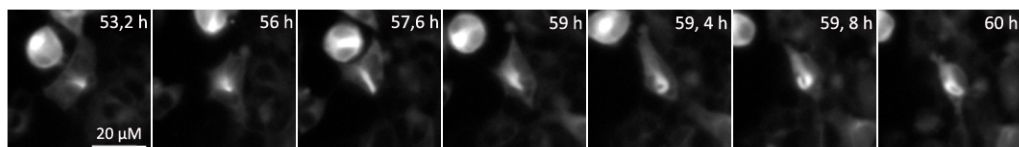


Abbildung 3.16: **Dynein supprimierte P19 Zellen mit rotierenden Mikrotubuli-Ansammlungen.** In den Langzeit-Aufnahmen von Dync1h1 supprimierten Zellen wurden instabile Mikrotubuli-Ansammlungen beobachtet, welche innerhalb der Zelle rotierende Bewegungen durchführten.



### 3.3.3 Charakterisierung des Phänotyps „vergrößerter Neuritendurchmesser“

Nach siRNA-Behandlung zur Suppression einer kleinen Gruppe von Genen konnte ein deutlicher Anstieg des Neuritendurchmessers beobachtet werden. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Eg5, INCENP, MKLP1 und TPX2. Eine Übersicht der induzierten morphologischen Veränderungen ist in Abbildung 3.17 A dargestellt.

Speziell im Fall von Tpx2 wurde dieser Phänotyp erst durch Suppression mittels Einzel-siRNAs detektiert. Im primären Screen, in welchem ein siRNA-Mix verwendet wurde, ist nur eine geringe Vergrößerung des Neuritendurchmessers zu erkennen, welche nicht außerhalb der 3-fachen Standardabweichung war.

Abgesehen von Incenp wird durch Suppression dieser Regulatoren auch das Gesamtsignal des neuronalen Tubulins deutlich reduziert. In Abbildung 3.17 B und C sind die Ergebnisse der morphometrischen Analyse beider Screens vergleichend dargestellt. Alle vier Kandidaten wurden durch mindestens zwei Einzel-siRNAs validiert. Beim sekundären Screen ist klar zu erkennen, dass die Incenp siRNA nicht nur eine Erhöhung des Neuritendurchmessers induziert, sondern auch einen Anstieg des neuronalen Tubulin-Signals bewirkt (3.17 C, grüne Pfeile). Die Suppression der Proteine Eg5, MKLP1 und TPX2 reduzierte das Gesamt-Tubulin-Signal deutlich, so dass einen Misch-Phänotyp aus kürzeren Neuriten mit erhöhtem Neuritendurchmesser entstand. In den vergrößerten Bildausschnitten sind jedoch weitere Unterschiede in der Morphologie der Phänotypen zu erkennen. Eg5 und Tpx2 suppressierte Zellen weisen einen vergrößerten Neuritendurchmesser mit stark kondensierten Mikrotubuli-Bündeln auf. Zusätzlich enthalten die Zellkerne unregelmäßige Chromatin-Strukturen und sind stark vergrößert. In Incenp und Mklp1 suppressierten Zellen ist eine weniger strukturierte Mikrotubuli-Organisation innerhalb der vergrößerten Neuriten zu erkennen. Außerdem enthalten diese Zellen oft multiple Nuklei.

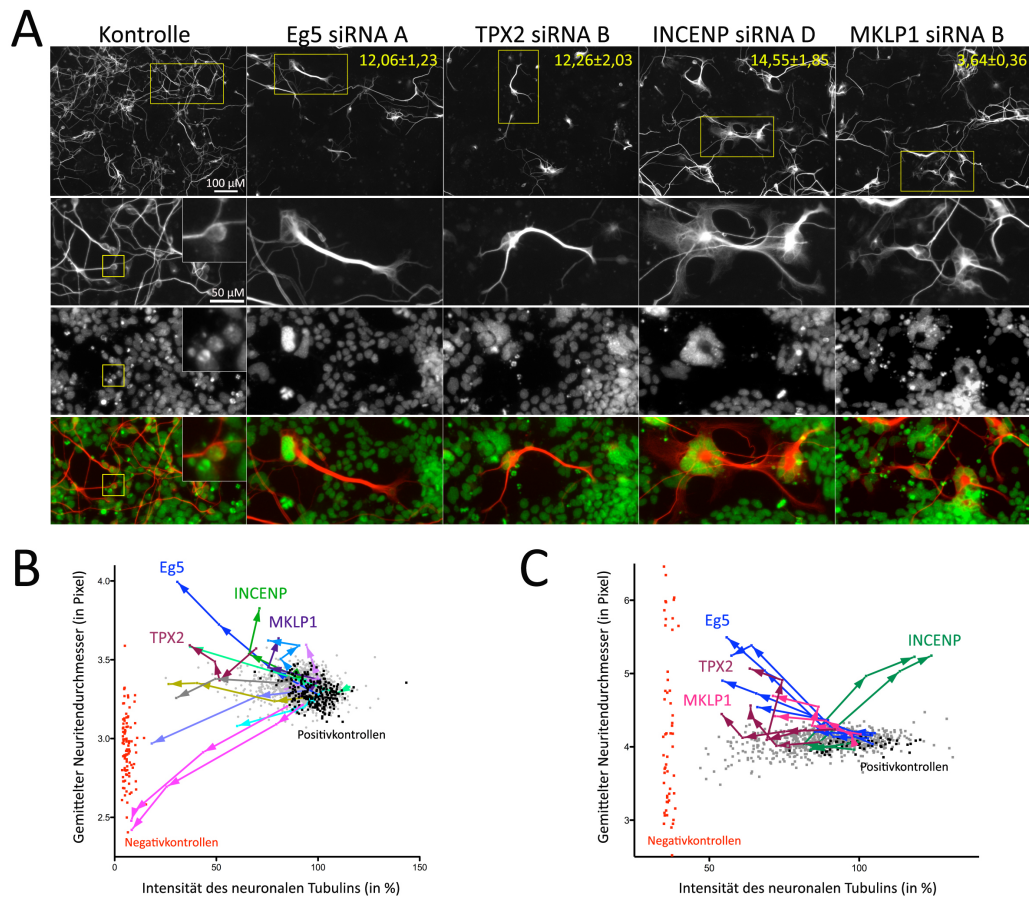


Abbildung 3.17: **Suppression von vier Proteinen resultiert in vergrößertem Neuritendurchmesser.** **A:** Mikroskopische Aufnahmen der morphologischen Veränderungen von differenzierten P19 Zellen nach Einzel-siRNA-Behandlung (4 pmol) der Proteine INCENP, MKLP1, Eg5 und TPX2. Zu jedem Bild ist zusätzlich ein Ausschnitt mit höherer Auflösung dargestellt. **B, C:** Vergleichend dargestellt sind die Ergebnisse aus dem primären (**B**) und sekundären Screen (**C**) nach morphometrischer Analyse. Die siRNA-Titrations der einzelnen Kandidaten sind farblich markiert, wobei die Pfeile ansteigende siRNA-Mengen anzeigen. Rechts: Nur Einzel-siRNAs, die im sekundären Screen einen vergrößerten Neuritendurchmesser induzierten, wurden angefärbt.

Zur detaillierteren Charakterisierung dieses Phänotyps wurden wei-

tere Experimente, insbesondere bezüglich der multimeren Motorproteine Eg5 (KIF11) und MKLP1 (KIF23) durchgeführt. Eg5 Suppression induziert im primären Screen eine klare Erhöhung des Neuritendurchmessers, welche im sekundären Screen sogar von allen vier verwendeten Einzel-siRNAs eindeutig bestätigt wurde. Eg5 ist Mitglied der Kinesin-5 Familie und ist eines der kritischen Motorproteine, die an Aufbau und Funktion der bipolaren Spindel in der Mitose beteiligt sind. Die essentielle Rolle von Eg5 in der Zellteilung ist daher eine plausible Erklärung, warum die Suppression einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Zur detaillierteren Untersuchung dieses Proteins und dessen Einfluss auf die neuronale Differenzierung wurden Langzeit Live Zell Aufnahmen durchgeführt. Dabei wurden P19 Zellen mit NeuroD2 und einem GFP-Tubulin DNA-Konstrukt sowie der Eg5 siRNA ko-transfiziert, für zwei Tage inkubiert und anschließend zwei Tage in einer temperierten Inkubationsbox mikroskopisch aufgenommen.

In Abbildung 3.18 ist eine Bildsequenz des GFP-Tubulin Signals aus Langzeitaufnahmen einer Kontrollzelle sowie zwei Eg5 supprimierten Zellen zu sehen. Im Vergleich zur Kontrolle weisen bereits die initialen Neuriten der Eg5 supprimierten Zellen einen erhöhten Neuritendurchmesser auf. Diese morphologische Veränderung der Neuriten tritt demnach direkt bei der Initiation und dem frühen Auswachsen der Neuriten auf.

Da die Suppression von Eg5 bereits das Zellwachstum negativ beeinflusst, wurde angestrebt, die Zeitspanne, in welcher Eg5 Inhibition zu einer Vergrößerung des Neuritendurchmessers führt, zeitlich einzugrenzen. Hierzu wurde Monastrol, ein kleines, zellpermeables Molekül verwendet, welches spezifisch und akut Eg5 inhibiert. Monastrol bindet an eine lange Schlaufe der Peptidkette (*Loop*) von Eg5 und inhibiert allosterisch die ATPase Aktivität. Durch Zugabe von 100  $\mu$ M Monastrol zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion mit NeuroD2 und GFP, wurde das Kinesin in neuronal differenzierenden P19 Zellen inhibiert. In Abbildung 3.19 ist zu erkennen, dass die Zellen, die bereits wenige Stunden nach der Transfektion (Tag 0) mit Monastrol behandelt wurden, eine klare Erhöhung des Neuritendurchmessers, analog zur Eg5 Suppression, aufweisen.

Diese Kondition ähnelt den Screen-Bedingungen, da auch dort die Suppression von Eg5 kurz nach Transfektion beginnt.

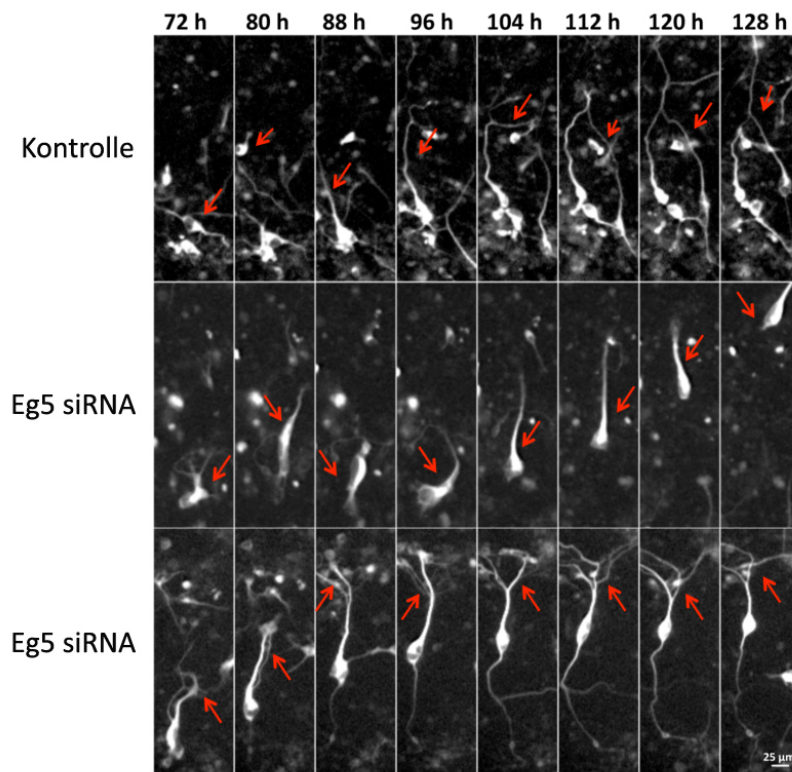
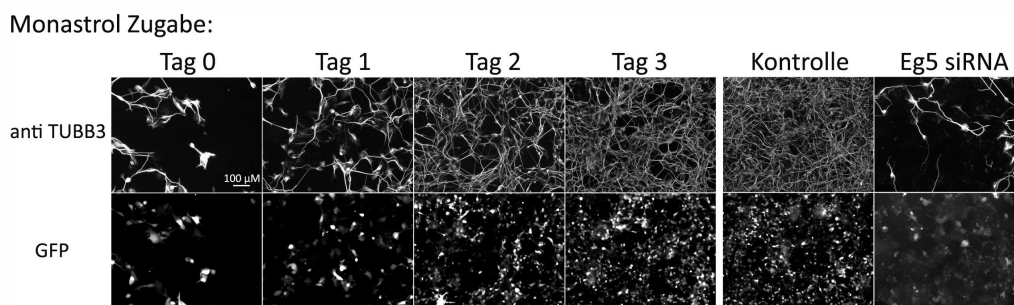


Abbildung 3.18: **Langzeitaufnahmen von Eg5 supprimierten Zellen zeigen das Auswachsen von Neuriten mit vergrößertem Durchmesser.** Dargestellt ist eine Bildsequenz, in welcher Eg5 mittels siRNA in P19 Zellen supprimiert wurde. Die Zellen wurden zusätzlich mit NeuroD2 und GFP-Tubulin ko-transfiziert. Rote Pfeile markieren das Auswachsen und die Verlängerung von initialen Neuriten. Dieser Langzeit-Film wurde im Rahmen der Masterarbeit von Verena Hannak aufgenommen [100].

Sowohl der Neuritendurchmesser als auch die Zellkörpergröße sind, ebenso wie nach der RNA-Interferenz, stark erhöht. Diese morphologischen Veränderungen sind in geringerer Ausprägung auch in Zellen zu erkennen, welche erst nach Tag 1 mit Monastrol behandelt wurden. Zellen, welche erst ab Tag 2 oder Tag 3 für lediglich 48 bzw. 24 Stunden behan-

delt wurden, zeigen hingegen wesentlich geringere morphologische Veränderungen. Da Neuriten erst ab dem dritten Tag nach der Transfektion des neurogenen Transfektionsfaktors initiiert werden, scheint der Einfluss von Monastrol einen dominanten Effekt auf die Morphologie von Zellen vor der neuronalen Differenzierung zu haben.



**Abbildung 3.19: Einfluss von Monastrol auf das Neuritenwachstum.** Monastrol wurde in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verwendet und NeuroD2/GFP ko-transfizierten P19 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten zugefügt (Tag 0 - drei Stunden nach der Transfektion). Die P19 Zellen wurden vier Tage nach der Transfektion fixiert und mit dem anti-neuronalen  $\beta\text{III}$ -Tubulin Antikörper (anti-TUBB3) angefärbt. Die Kontrollzellen wurden lediglich mit den DNA-Konstrukten ko-transfiziert. Zum Vergleich sind Bilder von P19 Zellen nach siRNA vermittelter Eg5 Suppression abgebildet.

MKLP1 (KIF23) gehört, wie Eg5, ebenfalls zu den Kinesinen, welche eine Rolle in der Mitose spielen. Im Gegensatz zu Eg5 ist MKLP1 jedoch in späteren Phasen der Mitose sowie der Zytokinese involviert. MKLP1 ist eine Komponente des Centralspindlin-Komplexes, welcher zusammen mit dem Chromosomalen-Passenger-Komplex (CPC) die Zytokinese reguliert. INCENP, ein weiterer Kandidat, dessen Suppression einen erhöhten Neuritendurchmesser induziert, ist ebenfalls eine Komponente des CPCs. Während der Anaphase sind beide Komplexe in der Äquatorialebene zwischen den bereits getrennten Chromosomen lokalisiert. Von dort aus regulieren sie den Aufbau des kontraktilen Rings, welcher u.a. das Motor-

protein Myosin II und Aktinfilamente enthält. Durch die Interaktion zwischen Myosin II und Aktin wird dieser Ring kontrahiert, wodurch sich eine Teilungsfurche bildet, um die Zellen in der Zytokinese zu trennen.

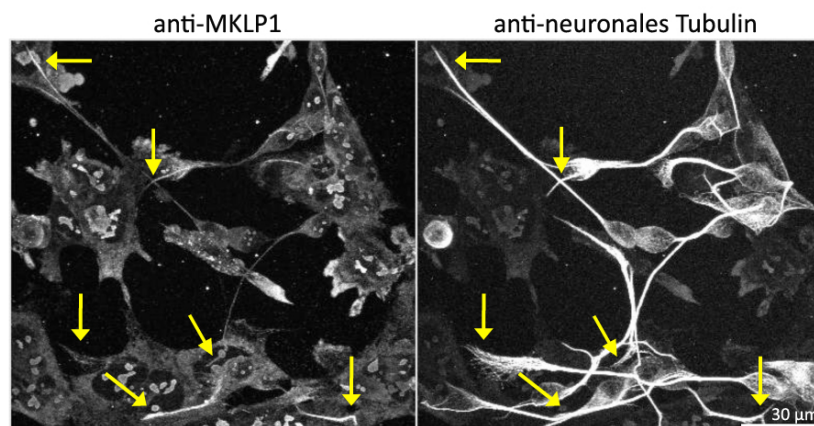


Abbildung 3.20: **Lokalisationsstudie von MKLP1 in differenzierten Neuronen.** MKLP1 wurde mittels Antikörperfärbung in differenzierten P19 Zellen lokalisiert. Die Differenzierung wurde durch Zugabe von Retinsäure initiiert, so dass die differenzierenden Zellen auf Glasoberflächen ausgesät und mikroskopisch aufgenommen werden konnten. Es wurden konfokale Bildreihen am Olympus FV1000 aufgenommen. Die Zellen wurden zusätzlich mit einem anti-neuronaalem  $\beta$ III-Tubulin Antikörper angefärbt. Gelbe Pfeile markieren vermehrtes Vorkommen von MKLP1.

Aufgrund des ähnlichen Phänotyps nach Suppression von Incenp und Mklp1 in differenzierten Neuronen ist es möglich, dass diese Proteine auch in diesem Prozess analog zur Zytokinese agieren. Eine Inhibition der Zytokinese bei intakter Zellteilung bewirkt oft eine Vergrößerung der Zellgröße und könnte hierdurch indirekt eine Vergrößerung des Neuritendurchmessers bewirken. Interessanterweise ist MKLP1 jedoch auch nach der Mitose in differenzierten Neuronen detektierbar. In solchen Zellen ist dieses Motorprotein an der Basis des Wachstumskegels angereichert (s. Abb. 3.20, gelbe Pfeile). Analog zur Ausbildung eines kontraktiven Rings könnte in diesem Zellbereich der Neuritendurchmesser kontrolliert werden. Hierfür wären möglicherweise weitere Komponenten nötig, wie z.B. INCENP

oder weitere Komponenten des CPCs bzw. Centralspindlin-Komplexes, welche die Kontraktion in der Zytokinese regulieren. Da es sich bei MKLP1 um einen Plus-Ende gerichteten Motor handelt, könnte dieser in den Transport solcher Regulatoren und deren Lokalisation zum Wachstumskegel involviert sein. Zur detaillierteren Untersuchung dieses hypothetischen Mechanismus sind weitere immunohistochemische Studien notwendig. Leider haben Antikörper gegen INCENP, Eg5 und TPX2 in vorläufigen Versuchen im P19-Modellsystem keine spezifische Färbung gezeigt. Die Beobachtung, dass ein Protein, welches als Motorprotein in der Mitose bekannt ist, in differenzierten Neuronen an der Basis des Wachstumskegels lokalisiert wird, lässt eine Rolle in neu gebildeten Neuriten jedoch zumindest vermuten.

# Kapitel 4

## Diskussion

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe von High-Content Screens Mikrotubuli-regulierende Proteine identifiziert, welche eine Rolle in der neuronalen Entwicklung von P19 Zellen spielen. Während der neuronalen Entwicklung durchlaufen diese Zellen verschiedene Stadien, in denen die Organisation und die Dynamik von Mikrotubuli eine kritische Rolle einnehmen. Eine Zusammenfassung der biologischen Prozesse während der neuronalen Entwicklung sowie die Rolle von Mikrotubuli-regulierenden Proteinen in diesen Prozessen ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Hierdurch wird deutlich, dass die Regulation des Mikrotubuli-Zytoskeletts direkt Einfluss auf verschiedene Phasen der neuronalen Differenzierung nimmt. Eine Perturbation dieses Systems durch Suppression einzelner Mikrotubuli-regulierender Proteine mittels siRNA ermöglicht es, aufgrund beobachteter Veränderungen in der neuronalen Differenzierung und der neuronalen Morphologie, Rückschlüsse auf die Funktion der untersuchten Regulatoren zu ziehen.



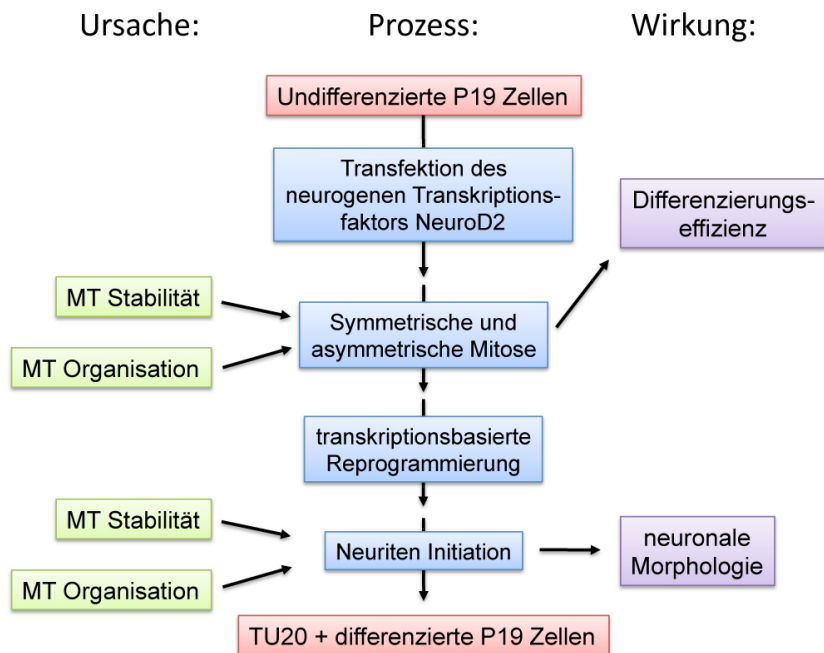


Abbildung 4.1: **Einfluss des Mikrotubuli-Zytoskeletts auf die neuronale Differenzierung.** Während der Differenzierung von pluripotenten P19 Zellen in Neuronen durchlaufen diese verschiedene Stadien. Die Differenzierung wird durch die Transfektion des neurogenen Transkriptionsfaktors NeuroD2 initiiert, welcher nach Proteinexpression eine transkriptionsbasierte Reprogrammierung der Zellen einleitet. Vor Beginn der Reprogrammierung durchlaufen die P19 Zellen symmetrische Zellteilungszyklen. Eine asymmetrische Zellteilung leitet den Eintritt in die neuronale Differenzierung ein, wobei eine Tochterzelle als Vorläuferzelle weiterhin teilungsfähig bleibt und die andere Tochterzelle ein post-mitotisches Neuron bildet. In frühen Phasen der neuronalen Entwicklung beginnen die Zellen Neuriten zu initiieren, welche später in Axone und Dendriten differenzieren. Die Reorganisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts ist ein zentraler Vorgang sowohl während der Zellteilung als auch während der neuronalen Morphogenese. Daher haben Mikrotubuli-Regulatoren einen entscheidenden Einfluss auf diese Prozesse.

## **4.1 Mikrotubuli-Regulatoren mit einem Einfluss auf die neuronale Entwicklung**

### **4.1.1 Mikrotubuli-Regulatoren mit essentieller zellulärer Funktion**

Im primären Screen wurde eine deutliche Reduktion des Wachstums transfizierter Vorläuferzellen nach siRNA Suppression von einigen Mikrotubuli-Regulatoren beobachtet. Viele dieser Regulatoren spielen eine Rolle während der Mitose (u.a. CDC27, Polo like Kinase 1, Eg5, STK6 oder TPX2) und sind somit für den Zellzyklus essentiell oder sie sind an anderen wichtigen zellulären Funktionen beteiligt wie z.B. VPS41 (vesikulärer Transport) oder Tuba1a (ubiquitäres  $\alpha$ -Tubulin). Daher zählten diese Mikrotubuli-Regulatoren zu den erwarteten Kandidaten für das beobachtete reduzierte Zellwachstum. Es wurden aber auch weitere Kandidaten für diesen Phänotyp identifiziert, bei welchen bisher keine essentielle zelluläre Funktion beschrieben wurde, wie z.B. im Fall von Spef1. Spef1 ist ein Mikrotubuli-bündelndes Protein [115], welches in die Spermienentwicklung [109] und Ausbildung von planarer Zellpolarität [116, 117] involviert ist.

In einigen Fällen, wie z.B. nach Suppression von Spef1, war das Zellwachstum so stark reduziert, dass keine oder nur sehr wenige differenzierte P19 Zellen für eine morphometrische Analyse vorlagen. In der Analyse des primären High-Content Screens wurden daher nur Bilder analysiert, in denen die GFP-Intensität innerhalb von drei Standardabweichungen der Positivkontrollen lagen. Daher kann für diese ausselektierten Kandidaten keine spezifische Aussage über eine mögliche Rolle in der späteren neuronalen Entwicklung, wie z.B. der Bildung von Neuriten, gemacht werden. Ein vermehrtes Zellwachstum wurde im primären Screen nicht beobachtet. Dies ist nicht besonders verwunderlich, da die Suppression von Proteinen generell mit Zellstress verbunden ist. Ebenso wurde weder ein ausgeprägter negativer, noch ein positiver Einfluss auf die neuronale Differenzierung beobachtet. Eine zentrale Rolle von Mikrotubuli in der primär transkriptions-basierten Umprogrammierung der Zellen während der neu-

ronalen Differenzierung war jedoch auch nicht zu erwarten.

#### **4.1.2 Bedeutung der Mikrotubuli-Stabilität für das Neuritenwachstum**

Von einigen der getesteten Mikrotubuli-stabilisierenden Proteinen wurde angenommen, dass sie eine Rolle während der neuronalen Morphogenese spielen. Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Vermutung. So wurden im primären Screen nach Suppression der bekannten neuronalen Mikrotubuli-stabilisierenden Proteine Doublecortin (DCX) und MAP1b (MTAP1b) sowie des ubiquitär exprimierten EB1 und CLASP1 verkürzte Neuriten beobachtet. Basierend auf diesen Ergebnissen ist anzunehmen, dass sie am Prozess der Neuritenbildung beteiligt sind und einen positiven Effekt auf das Neuritenwachstum haben. Als besonders interessant stellten sich dabei die Beobachtungen der Suppression von Proteinen der EB-Familie heraus, da die drei Isoformen gegensätzliche Phänotypen induzierten. EB3 suppressierte Zellen zeigten, wie erwartet, ein verkürztes Neuritenlängenwachstum, wohingegen EB2-suppressierte Zellen verlängerte Neuriten ausbilden. Die stark ausgeprägten Effekte nach Suppression von einzelnen oder paarweise suppressierten Familienmitgliedern lassen ferner vermuten, dass diese Proteine eine dominante Rolle in der Regulation der Mikrotubuli-Stabilität während der neuronalen Entwicklung spielen. (In Abschnitt 4.2 werden die Ergebnisse der EB-Familie detailliert diskutiert.)

Zusammengenommen suggerieren diese Ergebnisse, dass Regulatoren der Mikrotubuli-Stabilität in die Kontrolle der frühen Neuromorphogenese involviert sind und dass diese Regulation eine notwendige Voraussetzung für die Initiation und das Längenwachstum von Neuriten ist. Weiterführende Studien z.B. in Form von weiteren kombinatorischen siRNA Behandlungen könnten Aufschluss darüber geben, ob und mit welchen anderen Regulatoren einzelne Kandidaten gemeinsam funktionieren oder ob sie mittels separater Wirkmechanismen das Neuritenwachstum beeinflussen.

### 4.1.3 Aktin-Mikrotubuli-überbrückende Proteine in der neuronalen Entwicklung

Eine weitere interessante Gruppe von Mikrotubuli-Regulatoren, welche in dem primären Screen eingeschlossen waren sind die Aktin-Mikrotubuli-verbindenden Proteine aus der Familie der Spektraplakine. In Säugetieren kommen verschiedene Spektraplakine, wie z.B. MACF1 und Dystonin (DST, BPAG1), vor [55, 118]. Beide Proteine weisen sowohl eine N-terminale Aktin-Bindedomäne als auch eine C-terminale Mikrotubuli-Bindedomäne auf [53]. Die Aktin-Bindedomäne von MACF1 beinhaltet zwei Calponin Homologie (CH-) Domänen und kann Aktinfilamente in Säugerzellen binden, wohingegen die Mikrotubuli-Bindedomäne nicht nur an Mikrotubuli binden, sondern diese auch bündeln kann [119]. Aus früheren Studien geht hervor, dass Spektraplakine wichtige regulatorische Aufgaben in der Organisation des Zytoskeletts in Neuronen übernehmen. Sonnenberg *et al.* (2007) konnten beispielsweise nachweisen, dass Dystonin *knock-out* Mäuse eine Degeneration von sensorischen Neuronen sowie eine Disorganisation des Zytoskeletts aufweisen. Sanchez-Soriano *et al.* (2009) beobachteten, dass MACF1 eine wichtige Rolle bei der Verlängerung von Axonen spielt. In dieser Studie wurde hauptsächlich eine Mikrotubuli-bündelnde und stabilisierende Aktivität sowie ein regulatorischer Einfluss auf die Filopodien-Bildung vorgeschlagen [120]. Somit fördert MACF1 das axonale Wachstum durch Einflussnahme sowohl auf das Mikrotubuli- als auch auf das Aktin-Zytoskelett. Die Ergebnisse des primären Screens bestätigen diese Beobachtungen: Die Suppression von *Macf1* induzierte kürzere Neuriten. Dies legt die Vermutung nahe, dass dieses Spektraplakin vermutlich bereits in früheren Stadien der neuronalen Differenzierung aktiv ist und nicht erst nach der Differenzierung von Neuriten in Axon und Dendriten eine Rolle spielt. Allerdings konnten die Beobachtungen aus dem primären Screen nicht mit Einzel-siRNAs bestätigt werden. Es sind daher weitere Studien notwendig, um diese Diskrepanz aufzulösen und die Bedeutung von MACF1 für die Neuritenbildung zu bewerten. Die Suppression von Dystonin hingegen hat sowohl im primären als auch im

sekundären Screen verlängerte Neuriten verursacht. Diese Beobachtung suggeriert, dass Dystonin ein negativer Regulator des Neuritenwachstums ist. Dieser Effekt konnte jedoch nur mit einer einzelnen siRNA im sekundären Screen bestätigt werden und muss daher noch validiert werden.

#### 4.1.4 Negative Regulation des Neuritenwachstums

Insgesamt betrachtet wurden nur relativ wenige Regulatoren identifiziert, die einen negativen Effekt auf das Neuritenwachstum haben. Meist waren die Phänotypen nur gering ausgebildet und aufgrund einer relativ hohen Standardabweichung schwer zu interpretieren. Eine mögliche Erklärung könnte eine nicht ausreichende Sensitivität der Detektion zellulärer Strukturen sein. Es wurde lediglich die Gesamtlänge an Neuriten pro Bild und nicht die Länge einzelner Neuriten bestimmt. Da der durchgeführte Screen auf der Ko-Transfektion von verschiedenen DNAs und siRNA beruht, könnte dies ebenfalls ein Grund für die geringe Anzahl an identifizierten, negativen Regulatoren sein. Wie bereits oben diskutiert wurde, ist der *knock down* von Genen oft mit generellem Zellstress verbunden, welcher sich auch auf das Neuritenwachstum negativ auswirken könnte. Dennoch wurden einige weitere Regulatoren wie z.B. *Tbata* (*Thymus, brain and testes associated*, SPATIAL) und *DISC1* (*Disrupted in Schizophrenia 1*) in diesem Screen identifiziert. Welche Rolle *Tbata* im Gehirn bzw. in der Entwicklung von Gehirnbereichen einnimmt, ist noch nicht detailliert geklärt. Die Expression von *Tbata* im Gehirn überschneidet sich zeitlich mit der einsetzenden neuronalen Differenzierung [121]. Aufgrund des Vorkommens von *Tbata* in verschiedenen Teilen des Gehirns wurde eine Rolle in der Entwicklung von Hippocampus und Kleinhirn durch Einflussnahme auf die neuronale Differenzierung, die Morphogenese und synaptische Plastizität vorgeschlagen [121]. Die Assoziation von *Tbata* mit dem Kinesinmotor KIF17, welche im Flagellum und in Dendriten beobachtet wurde [121, 122], impliziert eine Funktion während der Zell-Differenzierung in einer Mikrotubuli-basierten Weise [123]. Im primären Screen induzierte die Suppression von *Tbata* einen ausgeprägten Phänotyp mit längeren

Neuriten. Diese Beobachtung würde auf einen negativen Einfluss auf das Auswachsen von initialen Neuriten hindeuten. Dieser Phänotyp wurde jedoch nur von einer Einzel-siRNA im sekundären Screen reproduziert. Es sind daher noch weitere Studien zur Bestätigung der negativen, regulatorischen Wirkung von Tbeta auf das initiale Neuritenwachstum notwendig. DISC1 steht in Verdacht an schweren mentalen Erkrankungen, wie z.B. der Schizophrenie, beteiligt zu sein und wird daher als verdächtiges Gen bzw. Risikofaktor bezeichnet. Aus unseren Ergebnissen geht hervor, dass es möglicherweise als negativer Regulator des initialen Neuritenwachstums agiert. Für diese Annahme spricht, dass DISC1 v.a. während der neuronalen Entwicklung in verschiedenen Bereichen des Gehirns exprimiert wird [124] und auch wichtige Funktionen in diesem Prozess übernimmt. Besonders hoch wird DISC1 in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und ist an deren Proliferation maßgeblich beteiligt [125].

#### **4.1.5 Regulation des Neuritendurchmessers**

Eine kleine Gruppe von Mikrotubuli-Regulatoren haben indirekt oder direkt Einfluss auf den Neuritendurchmesser. Hierzu zählen die Kinesine Eg5 (KIF11) und MKLP1 (KIF23) sowie die Motor-assoziierten Proteine TPX2 und INCENP. Die Suppression jedes einzelnen Proteins führt zu einem Anstieg sowohl in der Größe der neuronalen Zellen als auch im Durchmesser der initialen Neuriten. Da alle vier Kandidaten bekannte Regulatoren der Mitose [126, 127, 128] oder Zytokinese [129, 130, 131] sind, könnte die einfachste Erklärung lauten, dass ein Mitose-Arrest oder ein Defekt der Zytokinese als Folge der Suppression vor Eintritt der neuronalen Differenzierung auftritt. Sowohl ein Mitose-Arrest, als auch ein Defekt der Zytokinese kann bei ungestörtem Zellwachstum einen Anstieg der Zellgröße verursachen, welcher wiederum während der neuronalen Differenzierung zu einer Vergrößerung des Neuritendurchmessers führt. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieses Phänotyps und der Funktionalität der identifizierten Regulatoren während der Mitose ist daher sehr wahrscheinlich, da zusätzlich zu den morphologischen Verände-

rungen der initialen Neuriten ein negativer Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Vorläuferzellen nach Suppression von Eg5, Tpx2 und Mklp1 beobachtet wurde. Nach RNA-Interferenz von Incenp, welches vorwiegend in späten Phasen der Mitose sowie der Zytokinese aktiv ist, wurde jedoch kein negativer Einfluss auf das Zellwachstum detektiert. Da das Zellwachstum allerdings auf Basis von Signalintensitäten und nicht auf Basis von detektierten Objekten bestimmt wurde, und einzelne Zellen nach Incenp Suppression stark vergrößerte Zellkörper gebildet haben (s. Abb. 3.17), ist ein selektiver Effekt der Incenp Suppression auf die Zytokinese klar erkennbar. Es ist daher anzunehmen, dass die Funktionen dieser Regulatoren in der Mitose bzw. Zytokinese maßgeblich die Morphologie des induzierten Phänotyps nach RNA-Interferenz beeinflusst haben. Aus dem primären und sekundären Screen ist jedoch nicht ersichtlich, ob diese Proteine auch nach der neuronalen Differenzierung eine Rolle in der Mikrotubuli-Organisation spielen. In Incenp und Mklp1 supprimierten Zellen konnte zum Beispiel eine anscheinende Reduktion der Mikrotubuli-Bündelung beobachtet werden, welches ein Hinweis auf weitere Funktionen dieses Proteins sein könnte.

Es kann zusammengefasst werden, dass eine diverse Gruppe von Regulatoren Einfluss auf die Mikrotubuli-Reorganisation während der Neuriten Initiation hat. Hierbei werden Mikrotubuli sowohl direkt durch Bündelung, Förderung der Polymerisierung oder Reduktion der Katastrophenrate, als auch indirekt durch Variation der bindenden Proteine v.a. an den wachsenden Plus-Enden, beeinflusst. Mit Hilfe des High-Content Screens konnte eine Reihe von interessanten Kandidaten identifiziert werden, welche an der neuronalen Morphogenese beteiligt sind.

## **4.2 Rolle von Mikrotubuli-Regulatoren in wechselseitigen Interaktionen von zellulären Komponenten in der Neuriten Initiation**

In der Organisation der Zelle übernehmen Mikrotubuli, insbesondere in Kombination mit Motorproteinen, wichtige Funktionen. Daher war es nicht verwunderlich, dass im durchgeführten High-Content Screen zahlreiche Motoren als kritische Regulatoren der Neuritenbildung identifiziert wurden. Repräsentativ für den zytoplasmatischen Dynein-Komplex wurde daher der Phänotyp der Dynein Untereinheit Dync1h1 (schwere Kette 1) detaillierter untersucht, um Rückschlüsse auf dessen Funktion während der Neuriten Initiation ziehen zu können.

Die Regulation der Mikrotubuli-Dynamik spielt während dieses Prozesses ebenfalls eine entscheidene Rolle, da das Mikrotubuli-Zytoskelett während der neuronalen Morphogenese umfassend reorganisiert werden muss. +TIPs zählen zu den kritischen Faktoren, welche einen regulatorischen Einfluss auf die Mikrotubuli-Dynamik haben. Daher wurden die EB-Proteine als zentrale Regulatoren dieser Proteingruppe besonders detailliert untersucht.

Die Suppression einiger Regulatoren hatte einen deutlichen Einfluss auf den Neuritendurchmesser. Induziert wurde dieser unerwartete Phänotyp ausschließlich von einer kleinen Gruppe bekannter Mitose-Regulatoren. In einer initialen Charakterisierung dieser Kandidaten wurde deren Einfluss auf den Durchmesser der Neuriten genauer untersucht.

### **4.2.1 Rolle des Dynein/Dynactin-Komplexes in der Neuriten Initiation**

Es wurden mehrere Untereinheiten des Dynein-Dynactin Komplexes als Regulatoren identifiziert, welche anscheinend einen Einfluss auf das Neuritenwachstum haben. Überraschend waren diese Ergebnisse nicht, da Dynein, neben der Kinesin-Familie, für einen Großteil der zellulären Trans-



portvorgänge und Mikrotubuli-Reorganisationsprozesse verantwortlich ist. Unklar war jedoch, welche Untereinheiten speziell während der neuronalen Differenzierung beteiligt sind. Anders als der Dynactin-Komplex, welcher stets die gleichen Untereinheiten aufweist, variieren die intermediären, die leichten intermediären sowie die leichten Ketten im Dynein-Komplex, abhängig vom Transportgut und dem Zellprozess, in welchem Dynein agiert. Die schwere Kette von Dynein ist eine der zentralen Komponenten des Dynein-Komplexes und beinhaltet die Motordomäne. Des Weiteren ist die schwere Kette an der Homodimerisierung des Dynein-Komplexes beteiligt [23]. Es war daher zu erwarten, dass die Suppression dieser Untereinheit jegliche Dynein-Komplex Aktivität reduziert. Den Dync1h1 supprimierten Zellen stand nach der siRNA Behandlung nur eine geringe Menge an funktionellen Dynein Motorproteinen zur Verfügung. Die siRNAs reduzierten den Proteinlevel der schweren Kette von Dynein in der Gesamtzellpopulation auf etwa 40 % der normalen Motorproteinmenge (s. Abb. 3.14). Es ist nicht davon auszugehen, dass in dieser Gesamtpopulation alle Zellen mit siRNA transfiziert wurden. Alle differenzierten Zellen sollten jedoch aufgrund der Ko-Transfektion sowohl NeuroD2 Plasmid-DNA als auch siRNA aufgenommen haben. Es ist daher zu erwarten, dass Dync1h1 in differenzierten Zellen auf weniger als 40 % supprimiert wurde. Nach Suppression von Dync1h1 wurde die Bildung von überwiegend kurzlebigen Zellausstülpungen beobachtet, was das Fehlen eines Neuriten-stabilisierenden Mechanismus vermuten lässt. In früheren Studien wurden bereits Mechanismen beschrieben, in denen kortikale Dynein-Komplexe als treibende Kraft in der Mikrotubuli-Verschiebung fungieren [101]. Nach diesem Modell verschiebt Dynein Mikrotubuli mit den wachsenden Plus-Enden voraus gerichtet. Dies resultiert in einer Reorganisation der Mikrotubuli, welche mit ihren Plus-Enden in Richtung Zellperipherie ausgerichtet werden. Frei bewegliche Mikrotubuli können durch diese Kraft Zellausstülpungen induzieren. Wird nun die schwere Kette 1 supprimiert, bleibt eine Verschiebung der Mikrotubuli aus und somit entfällt eine Kraft, welche die Mikrotubuli in Richtung Zellperipherie verschiebt. Allein die Stabilisierung der Polymerisierungsrate

könnte in einem solchen Fall möglicherweise nicht ausreichen, um gegen die durch Aktinkontraktion stabilisierte Zellmembran eine Ausstülpung zu initiieren. Dieser Mechanismus ist eine plausible Erklärung für die Beobachtung, dass nach *Dync1h1* Suppression nur eine ineffektive Neuriteninitiation sowie ein vermindertes Neuritenwachstum stattfindet.

Die Suppression der intermediären Kette *Dync1i2* induzierte ebenfalls kürzere Neuriten. In Anbetracht der Rolle und Lokalisation dieser Kette im Dynein-Komplex war dieses Ergebnis ebenfalls nicht überraschend. Die intermediäre Kette bindet, ebenso wie die leichte intermediäre Kette, direkt an die schwere Kette von Dynein. An die intermediäre Kette binden wiederum die kleineren, leichten Ketten (LCs) [23] sowie die Dynactin-Untereinheit *DCTN1* (*p150<sup>glued</sup>*) [67]. Daher scheint die intermediäre Kette sowohl in den strukturellen Aufbau des Dynein-Komplexes als auch in die Interaktion mit dem Dynactin-Komplex während der neuronalen Differenzierung involviert zu sein. Es war jedoch vorher unklar, ob die intermediäre Kette von Typ 1 (*Dync1i1*) oder von Typ 2 (*Dync1i2*) eine wichtigere Rolle in der Neuritenbildung spielen. Ein direkter Vergleich dieser Untereinheiten zeigt, dass die Suppression der intermediären Kette vom Typ 2 eine stärkere Reduktion des Neuritenwachstums induziert (*Dync1i1* 4 pmol:  $2,58 \pm 0,40$ , 2 pmol  $2,25 \pm 0,70$ ; *Dync1i2* 4 pmol:  $5,42 \pm 1,70$ , 2 pmol  $3,43 \pm 0,15$ ; Angaben in SD, siehe Anhang: Tabelle 6.3) Ein noch klareres Bild ergibt sich bezüglich der leichten intermediären Ketten (*Dync1i1* 4 pmol:  $4,62 \pm 1,87$ ; *Dync1i2* 4 pmol:  $0,46 \pm 0,39$ ). Zwei verschiedene leichte Ketten von Dynein induzierten ebenfalls einen „kürzere Neuriten“ Phänotyp (*Dynlr1b*, *Dynlt1*). Die leichten Ketten von Dynein vermitteln die Interaktion mit einigen Adapterproteinen wie *NudE*, *NudEL* [132] oder *Bicaudal D* (durch Bindung an *Egalitarian*) [133]. Allerdings binden diese Adapterproteine an die leichte Kette 8 (*Dynll*, LC8) und nicht an die leichte Kette Typ *Roadblock* (*Dynlr1b*) oder *Tctex* (*Dynlt*), welche den Phänotyp im primären Screen verursachten (*Dynll1* 4 pmol:  $1,29 \pm 0,19$ ; *Dynlr1b1* 4 pmol:  $3,69 \pm 0,39$ ; *Dynlt1* 4 pmol:  $3,81 \pm 0,41$ ). Aufgrund der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mittels Einzel-siRNA Nachweis von *Dync1i2* und *Dynlr1b1*, ist anzunehmen (s. Tab. 3.8), dass das Vorhandensein dieser Ketten essen-

tiell für die Funktion von Dynein in der neuronalen Morphogenese ist. Die leichte Kette 8 (Dynll, LC8) und möglicherweise ebenfalls interagierende Adapterproteine scheinen keine Rolle während der Neuriten Initiation zu spielen. Dies steht im Einklang mit Berichten, dass NudE und NudEL die Lokalisation von Dynein an die mitotischen Kinetochore vermitteln [132], bisher aber noch kein Einfluss dieser Proteine auf die Dynein Lokalisation in Neuriten gezeigt wurde. Ein möglicher Einfluss von Bicaudal D ist nicht auszuschließen, da dieses Protein auch direkt an die Dynactin-Untereinheit DCTN2 (Dynamitin) binden kann [134].

Wie bereits erwähnt induzierten auch mehrere Untereinheiten des Dynactin-Komplexes den Phänotyp „kürzere Neuriten“. P19 Zellen, in denen die Dynactin-Untereinheiten 2 (Dynamitin) und 3 (p24/22) supprimiert wurden, zeigten hier einen besonders klaren Phänotyp mit deutlich verkürzten Neuriten. Die Beobachtungen aus dem primären Screen wurden durch mindestens zwei Einzel-siRNAs im sekundären Screen bestätigt. Diese beiden Untereinheiten sind an der Basis der von DCTN1 gebildeten Armdomäne lokalisiert. Möglicherweise nehmen diese Untereinheiten an dieser Position einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung zu Dynein. Zusätzlich ist DCTN2 notwendig für die Stabilisierung des gesamten Komplexes, in dem es neben DCTN1 auch an Arp1 bindet, welches das Filament der Dynactin-Stabdomäne bildet [135]. In *C. elegans* wurde DCTN3 als Kernkomponente des Dynactin-Komplexes identifiziert, da es essentiell für die Bildung des Arm-Komplexes von Dynactin ist und direkt mit DCTN1 und DCTN2 interagiert [136].

In der Zelle kommt der Dynactin-Komplex stets mit den gleichen Untereinheiten vor. Daher ist anzunehmen, dass alle Untereinheiten essentiell für einen funktionellen Komplex sind. Aufgrund dieser Annahme wurde erwartet, dass die Suppression der einzelnen Einheiten in dem gleichen Phänotyp resultieren sollte. Dies ist in einzelnen Fällen nicht der Fall, wie z.B. bei DCTN1. Die Suppression der größten Unterheit DCTN1 (p150<sup>glued</sup>) rief im primären Screen nur einen schwachen morphologischen Phänotyp hervor (DCTN1 4 pmol:  $2,80 \pm 1,55$ ), obwohl nachgewiesen wurde, dass die intermediäre Kette von Dynein an die von DCTN1 gebildete Armdomäne

direkt bindet und so dieser Motorprotein-Komplex geformt wird. Speziell im Fall von DCTN1, als zentrale Einheit des Komplexes, ist das Fehlen eines Phänotyps verwunderlich und das Ausbleiben eines morphologischen Effekts vermutlich auf ineffiziente RNA-Interferenz zurückzuführen. Zur Klärung der Rolle von DCTN1 im Dynactin-Komplex während der Neuriten Initiation sind daher noch weitere Experimente nötig, u.a. auch um die Effizienz der eingesetzten siRNAs zu überprüfen.

Die Suppression der Dynactin-Untereinheiten DCTN4 und DCTN6 resultierte zwar in einer detektierbaren Reduktion des Neuritenwachstums im primären Screen, diese Beobachtung konnte jedoch nur im Fall von DCTN6 mit einer einzelnen siRNA reproduziert werden. Suppression von DCTN5 führte auch im primären Screen zu keinem detektierbaren Effekt auf die neuronale Morphologie. Basierend auf den vorliegenden Experimenten ist der Effekt dieser Untereinheiten schwer interpretierbar. Daher bleibt offen, welche Funktionen diese Untereinheiten während der neuronalen Differenzierung haben. In Anbetracht der deutlichen Effekte, welche mit einigen Untereinheiten beobachtet wurden und den klar detektierbaren Effekten der meisten Untereinheiten im primären Screen, ist eine Funktion von Dynactin in der Neuritenbildung als definierter Komplex aus mehreren bekannten Untereinheiten sehr wahrscheinlich.

In videomikroskopischen Untersuchungen nach RNA-Interferenz der schweren Kette 1 von Dynein (Dync1h1) wurde eine weitere interessante Beobachtung gemacht. In sehr frühen Stadien der Differenzierung bzw. vor Eintritt in die neuronale Differenzierung wurden dynamische Mikrotubuli-Ansammlungen in einzelnen Zellen beobachtet (s. Abb. 3.16). Vermutlich handelt es sich bei dieser Ansammlung um das Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC). In videomikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, wie diese Mikrotubuli sich von einer zentralen, dem Zellkern nahen Position lösen und sich kometenartig in der Zelle bewegen (siehe Anhang: Film 6.3). Die Beobachtung könnte ein ungleiches Kräfteverhältnis in der Zelle widerspiegeln.

Dynein als wichtiger Minus-Pol gerichteter Motor kann Mikrotubuli direkt verschieben. In diesem Zusammenhang sind vor allem kortikale Dyn-

eine interessant, da durch die Dynactin-vermittelte Bindung an den Kortex, freie Mikrotubuli gebunden und verschoben werden können (Biesemann *et al.* unveröffentlicht). Eine sehr ähnliche Beobachtung wie in dieser Arbeit wurde auch im Rahmen der Masterarbeit von Olga Müller, nach Suppression von Dync1h1 in den Neuroblastoma (N2a) Zellen, gemacht. Die N2a Zellen durchlaufen nach Überexpression des neuronalen Mikrotubuli-stabilisierenden Proteins MAP2c eine Reorganisation des Mikrotubuli-Zyoskeletts, ähnlich der Umstrukturierung in frühen Stadien der neuronalen Differenzierung. In diesen Experimenten wurden sogar Zellausstülpungen durch ähnliche Mikrotubuli-Ansammlungen nach Dync1h1 Suppression induziert [137]. Ähnliche kometenartige Mikrotubuli-Strukturen wurden ebenfalls von Koonce *et al.* (1999) und Brito *et al.* (2005) nach Überexpression von dominant-negativen Dynein-Fragmenten in *Dictyostelium* beobachtet. Da Mikrotubuli sowohl von Dynein- als auch von Kinesin-vermittelten Kräften bewegt werden können, liegt die Vermutung nahe, dass ein Gleichgewicht der Kräfte, welche durch beide Motorproteine vermittelt werden, eine wichtige Rolle in der Mikrotubuli-Organisation in Zellen spielt [138, 139]. Das Fehlen eines dieser Motorproteine würde somit ein Ungleichgewicht in der Balance von Mikrotubuli-verschiebenden Kräften in der Zelle bedeuten und eine Veränderung der Mikrotubuli-Organisation zur Folge haben. Brito *et al.* (2005) kamen daher zu dem Schluss, dass die kometenartigen Mikrotubuli-Ausstülpungen eine Folge der Dynein Inhibition sein könnten, da die verminderte Dynein-generierte Kraft nicht mehr den schiebenden Kräften der Kinesine entgegen wirken kann. Durch Dynein werden die Mikrotubuli Plus-Enden eines MTOCs in Richtung Zellperipherie gezogen. Diese Kraft bewirkt eine Zentrierung des MTOCs in der Zelle. Nach Dynein Inhibition dominiert die durch Kinesine vermittelte Kraft auf die Mikrotubuli. Diese Kraft könnte eine mögliche Umorientierung der Mikrotubuli-Organisation zur Folge haben. Da Kinesine Plus-Ende gerichtete Motorproteine sind, werden die Minus-Enden zunächst gegeneinander und nach einem Symmetriebruch in Richtung Zellperipherie verschoben. Die Spindelbildung in der Mitose bietet ein klassisches Beispiel, in wel-

chem ein antagonistisches Zusammenspiel von Plus-Pol gerichteten Kinesinen und Minus-Pol gerichtetem Dynein für die Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts in der Zelle verantwortlich ist. In diesem System wurden Dynein und das Kinesin Eg5 als antagonistische Partner identifiziert [140]. Ferenz *et al.* (2009) konnten anhand von experimentellen Daten eine neue Funktion für Dynein vorschlagen. Dynein nimmt zunächst eine Verlinker-Rolle ein und verbindet antiparallele Mikrotubuli in der Äquatorialebene. Die gegensätzlich gerichteten Kräfte von Dynein und Eg5 können die bipolare Spindelstruktur stabilisieren [140].

Mit Hilfe dieser gegensätzlich gerichteten Motorproteine ist die Zelle in der Lage die Mikrotubuli nicht nur durch Änderung der Polymerisationsrate zu beeinflussen, sondern auch direkt durch Verschiebung, Bündelung und Transport innerhalb der Zelle zu reorganisieren. Demnach könnte dieser Phänotyp der Dynein supprimierten Zellen auf eine hypothetische, von kortikalen Kinesinen generierte Kraft zurückgeführt werden.

#### **4.2.2 Proteine der EB-Familie mit gegensätzlichem Einfluss auf die Mikrotubuli-Stabilität**

Zellen bilden eine große Anzahl von Mikrotubuli-stabilisierenden Proteinen. Eine besonders wichtige Rolle spielen die Mitglieder der EB-Familie. Sie gehören zu den +TIPs, einer Gruppe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen, die spezifisch an die wachsenden Enden der Mikrotubuli binden und diese separat oder in Verbindung mit weiteren +TIPs stabilisieren. Daher wurde erwartet, dass eine Suppression dieser Regulatoren einen negativen Effekt auf das Neuritenwachstum hat. Diese Erwartung wurde auch von der Isoform EB3 bestätigt. EB3 supprimierte Zellen wiesen verkürzte Neuriten gegenüber den Kontrollen auf. Im Gegensatz zu EB3 induzierte RNA-Interferenz von EB2 überraschenderweise „längere Neuriten“. Dieser gegensätzliche Phänotyp deutet auf eine Konkurrenzsituation zwischen den einzelnen Familienmitgliedern um Bindungsstellen an den wachsenden Mikrotubuli Plus-Enden hin. Fehlt EB2, welches als schwächster Stabilisator vermutet wird, so können EB3 und EB1 die Mikrotubuli

effizienter stabilisieren, so dass längere Neuriten gebildet werden können. EB3 und EB1 stabilisieren Mikrotubuli nicht nur direkt durch Erhöhung der Polymerisationsrate, sie bewirken auch eine veränderte Zusammensetzung von +TIPs am wachsenden Mikrotubuli-Ende. Von einigen dieser +TIPs ist bekannt, dass sie ebenfalls Mikrotubuli stabilisieren können (APC [141], CLASPs [142], MACF1 [25] oder CLIP-170 [143]). Die Bindung dieser +TIPs an die Plus-Enden wird durch EB vermittelt [31, 28]. Interessanterweise variiert die Affinität dieser +TIPs zu den einzelnen EB-Isoformen. Komarova *et al.* (2005) beobachteten, dass CLIP-170 sowie das verwandte Protein CLIP-115 direkt an EB1 und EB3 binden, jedoch eine viel geringere Affinität gegenüber EB2 aufweisen.

Weiterhin konnten Komarova *et al.* (2005) zeigen, dass eine simultane Suppression von EB1 und EB3 eine Veränderung im Bindungsverhalten von CLIP-170 induziert. Es wurden deutlich weniger Akkumulationen an den äußeren Mikrotubuli-Enden beobachtet. Auch die Verweildauer auf den Mikrotubuli war deutlich verkürzt; die Proteine dissoziierten wesentlich schneller als in Anwesenheit von EB1 und EB3. Strukturelle Unterschiede der drei EB-Proteine wurden als mögliche Ursache für die variierenden Bindungsaffinitäten vermutet. EB2 weist eine abweichende Sequenz im C-terminalen Endbereich gegenüber EB1 und EB3 auf; dieser Sequenzunterschied könnte einen Einfluss auf die Bindungsaffinitäten zu weiteren +TIPs haben [114]. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Screenanalysen sowie der durchgeführten Kombinationsexperimente ist davon auszugehen, dass der Expressionslevel der drei EB-Isoformen Auswirkungen auf die Zusammensetzung und die Assoziationsdauer anderer +TIPs an wachsenden Mikrotubuli-Enden hat. Die EB-Proteine nehmen damit eine kritische Rolle in der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik ein. Leterrier *et al.* (2011) konnten Änderungen im Expressionslevel von EB3 während der Entwicklung von Neuronen nachweisen. In frühen Entwicklungsstadien enthielten die Zellen nur eine geringe Menge an EB3, welche in späteren Stadien deutlich anstieg. Die Expressionslevel von EB1 und EB2 waren während der gesamten Entwicklung relativ konstant [144]. Demnach könnte eine Suppression von EB3 in späteren Stadien der neuronalen Dif-

ferenzierung ausgeprägte morphologische Veränderungen induzieren. In den hier vorgestellten High-Content Screens wurden die P19 Zellen bereits nach vier Tagen Inkubation fixiert, so dass nur die frühen Stadien der neuronalen Differenzierung durchlaufen wurden. Dennoch wurde in dieser Arbeit eine deutlichere Reduktion des Neuritenwachstums nach EB3 *knock down* im Vergleich zu EB1 *knock down* detektiert. Dies steht im Einklang mit Studien von Geraldo *et al.* (2008), in denen ein überexprimiertes EB3-Fragment, welches nur die *Coiled coil* und EBH-Domänen enthielt, das Neuritenwachstum in primären hippocampalen Neuronen reduzierte. Dieses Fragment bindet u.a. an das Aktin-assoziierte Protein Drebrin. Es wurde vorgeschlagen, dass diese Interaktion die Assoziation zwischen Mikrotubuli und Aktinfilamenten während der Neuritenbildung vermittelt [145]. Obwohl EB1 und EB3 eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, konnte mit dem analogen EB1-Fragment weder eine Bindung an Drebrin, noch ein Einfluss auf das Neuritenwachstum detektiert werden. Ein ähnlicher Mechanismus könnte den beobachteten Phänotyp in EB3 supprimierten P19 Zellen verursachen. Welche Rolle EB2 in ausdifferenzierten Neuronen spielt, ist bisher nicht bekannt.

#### **4.2.3 Suppression von bekannten Mitose Regulatoren beeinflusst den Durchmesser und die Größe von Neuriten**

Wie bereits vorgestellt, induziert die Suppression einer kleinen Gruppe von Mitose-Regulatoren Neuriten mit vergrößertem Durchmesser. Mit dieser morphologischen Veränderung der Neuriten ging eine Vergrößerung der gesamten Zelle einher. Es ist mit dem hier durchgeführten Zell-basierten Assay allerdings nicht möglich, Unterschiede zwischen Mitose- und Differenzierungseffekten aufzudecken. Daher gibt es verschiedene Erklärungsansätze für diesen Phänotyp.

INCENP zählt zu den chromosomalen Passenger Proteinen und agiert u.a. mit MKLP1 in der Regulation von Myosin II-induzierten Aktinkontraktionen während der Zytokinese [146, 147]. In der Zytokinese bindet



MKLP1 RhoGEFs, wie z.B. ECT2, einen Austauschfaktor (GEF) der GTPase RhoA, und transportiert diese zur Äquatorialebene der mitotischen Spindel. ECT2 ist kritisch für die Aktivierung von RhoA während der Zytokinese [148]. RhoA fördert die Bildung des kontraktilen Rings. In diesem Vorgang wird durch RhoA sowohl die Aktivierung von Myosin II als auch die Aktin-Polymerisation eingeleitet [148]. Hierdurch werden kontraktile Kräfte induziert, welche während der Zytokinese die Teilungsfurche formen.

Das beobachtete Vorkommen von MKLP1 an der Basis des Wachstumskegels eines initialen Neurits lässt vermuten, dass dieses Protein während der neuronalen Differenzierung in analoger Weise als Regulator der Neuriten-Morphologie fungiert. In Neuronen könnte durch Suppression von Incenp oder Mklp1 der Transport von RhoGEFs zur Basis des Wachstumskegels beeinträchtigt sein. Eine hieraus folgende, fehlende Aktivierung von RhoA und ausbleibende Aktin-Kontraktionen könnten demnach eine Ursache für den beobachteten vergrößerten Neuritendurchmesser sein. Als alternative Erklärung könnte die beobachtete Vergrößerung des Neuritendurchmessers das Ergebnis einer fehlerhaften Zytokinese vor Eintritt in die neuronale Differenzierung sein. Es ist zu erwarten, dass unvollendete Zytokinesen zu einem Anstieg der Zellkörpergröße führen. Größere Zellkörper könnten indirekt zu einer Vergrößerung des Neuritendurchmessers führen. Dies bestätigen auch die Screenergebnisse: Sowohl in Mklp1 als auch in Incenp supprimierten Zellen wurden mehrere Nuklei pro Zelle (*polylobed*) beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen auch nach siRNA-Behandlung die Mitose einleiten, die Chromosomen trennen können, jedoch Probleme in der Zytokinese aufweisen.

Eg5 und Tpx2 supprimierte Zellen wiesen ebenfalls einen erhöhten Neuritendurchmesser und vergrößerten Zellkörper auf. Im Gegensatz zu Incenp und Mklp1 supprimierten Zellen enthielten diese jedoch meist nur einen Nukleus. Dieser war jedoch stark vergrößert und oft unförmig. Sowohl Eg5 als auch TPX2 sind essentiell für die korrekte Organisation der mitotischen Spindel. Eg5 wirkt als antagonistischer Partner von Dynein in der Verschiebung von antiparallelen Mikrotubuli in der Äquatorialebene

der Spindel [140]. TPX2 fördert u.a. die Nukleierung und Stabilisierung von Spindelmikrotubuli [149]. Aufgrund der bekannten Funktion in der Bildung der Spindel war ein möglicher Effekt auf die Mitose nach siRNA Suppression von Eg5 oder TPX2 zu erwarten. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Suppression von Eg5 und Tpx2 eine normale Kernteilung in den P19 Zellen verhindert und es daher zur Entstehung von unregelmäßigen, großen Nuklei kommt. Die Ausbildung einer bipolaren Spindel mit anschließender Chromosomensegregation ist vermutlich nach der siRNA-Behandlung nur unzureichend durchführbar. Nach unvollendeter Mitose könnte es zu einer Kernbildung kommen - jedoch mit einer nicht normalen Anzahl von Chromosomen. Auch im Falle des beobachteten Mitosedefekts kann es zu einer Vergrößerung der Zellkörper kommen, welche möglicherweise ebenfalls indirekt zu einer Erhöhung des Neuritendurchmessers führt.

Um dieses Phänomen näher zu studieren, wurden Experimente mit dem spezifischen Eg5 Inhibitor Monastrol durchgeführt. Monastrol inhibiert allosterisch die ATPase Aktivität von Eg5 und sorgt auf diese Weise für eine minimierte Menge an funktionellem Eg5 in der Zelle. Es wurde erwartet, dass die Inhibierung des Motorproteins den gleichen Phänotyp hervorruft wie die siRNA Suppression, da in beiden Fällen der Zelle nur geringe Mengen an funktionellem Eg5 Motoren zur Verfügung standen. Nach Monastrol Zugabe wiesen die behandelten P19 Zellen Neuriten mit stark vergrößertem Durchmesser sowie vergrößerte Zellkörper auf. Die Ausprägung des Phänotyps war jedoch am klarsten erkennbar, wenn die Zellen vor Beginn der neuronalen Differenzierung behandelt wurden, sprich die Monastrol Zugabe erfolgte direkt einige Stunden nach der Transfektion. Spätere Zugabe von Monastrol zeigte nur marginale Effekte auf die Morphologie der differenzierten P19 Zellen. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass die Suppression von Eg5 durch einen Mitosedefekt indirekt den Neuritendurchmesser beeinflusst.

Zusammengenommen stehen die Beobachtungen zur Morphologie bzw. Anzahl von Nuklei nach Eg5 und Tpx2, als auch nach Mklp1 und Incenp *knock down* im Einklang mit einer Studie zur Rolle aller Gene in der Mitose

[150].

Es ist jedoch bekannt, dass Eg5 in post-mitotischen Neuronen exprimiert wird, und daher möglicherweise auch eine Funktion nach der Mitose hat [151, 152, 153]. Prinzipiell kann Eg5 antiparallele sowie parallele Mikrotubuli gegeneinander verschieben und miteinander verknüpfen [154, 155, 156, 157]. Durch diese Eigenschaft könnte Eg5 eine Rolle in der Bündelung von Mikrotubuli während der Initiation von Neuriten spielen. Die Plus-Enden der Mikrotubuli sind in Neuriten zellauswärts gerichtet. In einem hypothetischen Mechanismus bewegt sich Eg5 entlang der Mikrotubuli in Richtung deren Plus-Enden, überträgt aufgrund der Bewegungsrichtung Kraft auf die Mikrotubuli, welche sich hierdurch zusammenlagern und von Eg5 gebündelt werden können. Nach Suppression oder Inhibition von Eg5 würden sowohl bewegende Kräfte auf die Mikrotubuli als auch die Verknüpfung von einzelnen Mikrotubuli fehlen. Dies könnte ebenfalls eine Ursache für die beobachtete Initiierung von Neuriten mit vergrößertem Durchmesser in Eg5 supprimierten Zellen sein. In einer analogen Analyse von post-mitotischen Neuronen könnten diese alternativen Modelle unterschieden werden.

### **4.3 Optimierung des neuronalen Differenzierungsassays**

In dieser Arbeit wurde ein High-Content Screen in Verbindung mit RNA-Interferenz zur Identifizierung von Regulatoren des Mikrotubuli-Zytoskeletts durchgeführt. Die Suppression einzelner, wichtiger Regulatoren resultierte, wie erwartet, in einer veränderten Morphologie der entwickelnden Neuronen. Zur morphologischen Charakterisierung wurden hauptsächlich die durchschnittliche Länge der Neuriten und der durchschnittliche Neuritendurchmesser verwendet. Durch diese Strategie wurden zahlreiche Kandidaten identifiziert, deren Suppression eine Verkürzung der Neuritenlänge bewirkt. Es wurden jedoch nur wenige Regulatoren identifiziert, die nach Suppression ein erhöhtes Neuritenwachstum induzieren.

Es wäre sinnvoll, die Sensitivität des neuronalen Differenzierungsassays hinsichtlich der Bestimmung von längeren Neuriten zu optimieren. Analysen auf Einzelzell-Basis bieten beispielsweise eine Möglichkeit die Sensitivität zu verbessern, indem auch Effekte, die nur in einer definierten Subpopulation von Zellen auftreten, detektiert werden können. Eine Einzelzellanalyse ist aufgrund der unmittelbaren Nähe von Neuronen und deren überlappenden Zellauswüchse sehr schwierig, könnte aber mittels des Brainbow-Prinzips von Livet *et al.* (2007) realisiert werden. Livet *et al.* (2007) haben eine Methode zur Visualisierung von synaptischen Kreisläufen vorgestellt, die auf genetisch markierten Neuronen beruht. Mittels Cre-Lox Rekombination wurde eine stochastische Auswahl der Expression eines von drei bzw. vier fluoreszierenden Proteinen eines Plasmids getroffen. Die Integration verschiedener Brainbow-Transgene in Mäusen, mit jeweils mehreren rekombinierenden Farbgenen, ergab eine kombinatorische Expression von verschiedenen Fluorophoren, welche als unterschiedliche Farbnuancen detektiert werden konnten [158]. Auf diese Weise ist es möglich einzelne, benachbarte Neuronen voneinander zu unterscheiden. Mit Hilfe dieser Methode könnte die Differenzierung einzelner Zellen genauer verfolgt werden. Dazu kämen zusätzliche Daten über die neuronale Morphologie einzelner Neuronen, es könnte z.B. die Anzahl und die Länge von Neuriten pro Zelle bestimmt werden. Bisher ist dies nicht möglich, da alle differenzierten Zellen mit einem anti-neuronalen  $\beta$ III-Tubulin Antikörper angefärbt wurden. Aufgrund der gleichen Anfärbung aller Neuronen konnten die Neuriten den Zellkörpern nicht zuverlässig zugeordnet werden.

Eine weitere Optimierung von Einzelzellanalysen ist das Zellkern-Tracking anhand von stabil angefärbten Nuklei während videomikroskopischer Aufnahmen. Diese Methode wurde bereits in Zusammenarbeit mit der Masterstudentin Melanie Gräßl entwickelt [159]. Es stehen daher bereits P19 Zelllinien zur Verfügung, welche stabil ein GFP bzw. YFP markiertes Histon 2B sowie mCherry-Tubulin exprimieren. Mit dieser Methode können einzelne Zellen während der videomikroskopischen Aufnahme verfolgt und auf diese Weise verschiedene Stadien der neuronalen Differenzierung

untersucht werden. Eine Quantifizierung der Migration, Dynamik und morphologischen Veränderungen der Zellen geben Aufschluss über die zeitliche Abfolge der Entwicklung von Neuronen aus pluripotenten P19 Stammzellen. Bisher wurde diese Methode jedoch nur zur Analyse von Wildtyp-Zellen angewendet.

Neben siRNAs sind shRNAs (*small hairpin*) eine alternative Methode zur Suppression einzelner Proteine. Bei dieser Methode werden shRNA Sequenzen in Plasmide eingebaut, welche ebenso wie andere DNA-Plasmide in die gewünschten Zellen transfiziert und die gewünschten RNAs anschließend in diesen Zellen exprimiert werden. Die Suppression der Zielproteine erfolgt etwas verzögert nach der Transfektion, da erst das Plasmid abgelesen und die shRNAs exprimiert werden müssen. siRNAs supprimieren direkt nach Transfektion ihre Zielproteine. Es kommt daher auf das Versuchsziel an, welche dieser beiden RNA-Varianten sich optimal für das geplante Experiment eignet. In dieser Arbeit wurden ausschließlich siRNAs verwendet - es ist aber durchaus von Interesse zu untersuchen, ob eine verzögerte Suppression von kritischen Regulatoren einen Einfluss auf die Induzierung der vorher beobachteten Phänotypen hat. Im Screen wurde die neuronale Differenzierung durch den neurogenen Transkriptionsfaktor NeuroD2 initiiert. Da dieser als DNA-Plasmid in die P19 Zellen transfiziert wurde und die transkriptionsbasierte Reprogrammierung der Zellen erst nach eigener Expression einleitet, begann die Suppression einzelner Mikrotubuli-Regulatoren bereits vor Beginn der neuronalen Differenzierung. Möglicherweise wurden so einige Phänotypen durch siRNA Behandlung gefördert, die nicht im direkten Zusammenhang mit der neuronalen Entwicklung standen. Die Verwendung von shRNAs in einer Ko-Transfektion mit dem neurogenen Transfektionsfaktor könnte Aufschluss über mögliche „falsch-positive“ Kandidaten geben. Eine noch präzisere Kontrolle könnte durch induzierbare Promotoren in shRNA-kodierenden Vektoren erreicht werden. Insbesondere in post-mitotischen Neuronen sind shRNA Vektoren wesentlich stabiler als siRNAs und bewirken daher auch einen länger andauernden Suppressions-Effekt.

Eine noch klarere Trennung zwischen einer Rolle von Mikrotubuli-Regula-

toren in der Mitose und der neuronalen Morphogenese kann durch die Verwendung von primären Neuronen erreicht werden. Im Gegensatz zu P19 Zellen durchlaufen primäre Zellen keine vollständige neuronale Differenzierung. Diese post-mitotischen Zellen können aus dem Hippocampus von Mäuseembryonen extrahiert und in diesem relativ frühen Stadium der neuronalen Entwicklung manipuliert werden. Zu diesem Zeitpunkt exprimieren diese Zellen bereits neuronale Faktoren. Ein Vergleich der induzierten Phänotypen zwischen P19 Zellen und primären Neuronen könnte Aufschluss über eine Abhängigkeit der beobachteten Phänotypen vom Entwicklungszustand der Zellen geben. Außerdem könnte in diesen Zellen die Rolle solcher Mikrotubuli-Regulatoren auf die morphologische Entwicklung von Neuronen untersucht werden, welche in P19 Zellen einen essentiellen Prozess, wie z.B. die Zellteilung, blockieren. Bei dem verwendeten P19-Modellsystem handelt es sich um pluripotente Zellen, welche sowohl in neuronale, als auch in Muskelzellen differenziert werden können. Zur weiteren Validierung der Ergebnisse wurden jedoch auch Experimente mit omnipotenten embryonalen Stammzellen angestrebt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erste Experimente mit der murinen Stammzelllinie 46C durchgeführt, welche im Labor von Austin Smith generiert wurde. Ergebnisse der ersten Studien lassen auf eine Tendenz zur Bestätigung der identifizierten Phänotypen nach siRNA Behandlung schließen. Allerdings sind diese präliminären Ergebnisse nicht einfach interpretierbar, da die Differenzierungseffizienz dieser Zellen wesentlich geringer und wesentlich variabler war. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Experimente nicht mehr weiter optimiert werden. In einer anschließenden Doktorarbeit wird daher angestrebt, ausgewählte Kandidaten sowohl in embryonalen Stammzellen als auch in primären Zellen zu untersuchen.

## 4.4 Hypothetisches Modell der Neuromorphogenese

In der durchgeführten Studie wurden systematisch alle Regulatoren des Mikrotubuli-Zytoskeletts analysiert. Mit Hilfe von RNA-Interferenz und einem Phänotyp-basierten High-Content Screen war es möglich Mikrotubuli-Regulatoren zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Initiation von Neuriten in der frühen neuronalen Morphogenese haben. Hierbei wurde weniger auf Kandidaten fokussiert, welche die primär transkriptionsbasierten Mechanismen der neuronalen Differenzierung gegenüber dem Zellwachstum von Vorläuferzellen regulieren. Stattdessen wurden speziell Mikrotubuli-Regulatoren untersucht, welche die neuronale Morphogenese der P19 Zellen beeinflussen. Zusammengefasst lassen sich aus den Beobachtungen des High-Content Screens einige zelluläre Prozesse hervorheben, die einen großen Einfluss auf die neuronale Morphogenese haben: die Regulation der Stabilität von Mikrotubuli, Kräfte, welche von Dynein-Motorproteinen generiert werden und Mikrotubuli gegen den Zellkortex verschieben, sowie Kinesin-vermittelte Kräfte, die möglicherweise durch Bündelung von Mikrotubuli deren räumliche Organisation in der Zelle beeinflussen.

Das vorgeschlagene Schema in Abbildung 4.2 fasst diese zellulären Schlüsselfunktionen zusammen und erweitert diese durch einen antagonistischen Mechanismus - die Aktinkontraktion, welche den Dynein-vermittelten Kräften auf stabilisierte Mikrotubuli entgegen wirken. Wichtige Regulatoren, welche in dieser Arbeit identifiziert wurden, sind ebenfalls in diesem Schema aufgeführt. Dieses hypothetische Modell kann als Ausgangspunkt für weiterführende Studien der beschriebenen dynamischen Interaktionen zwischen Zytoskelettkomponenten dienen und einen Startpunkt zu einem besseren Verständnis der Rolle des Zytoskeletts während der neuronalen Morphogenese liefern.

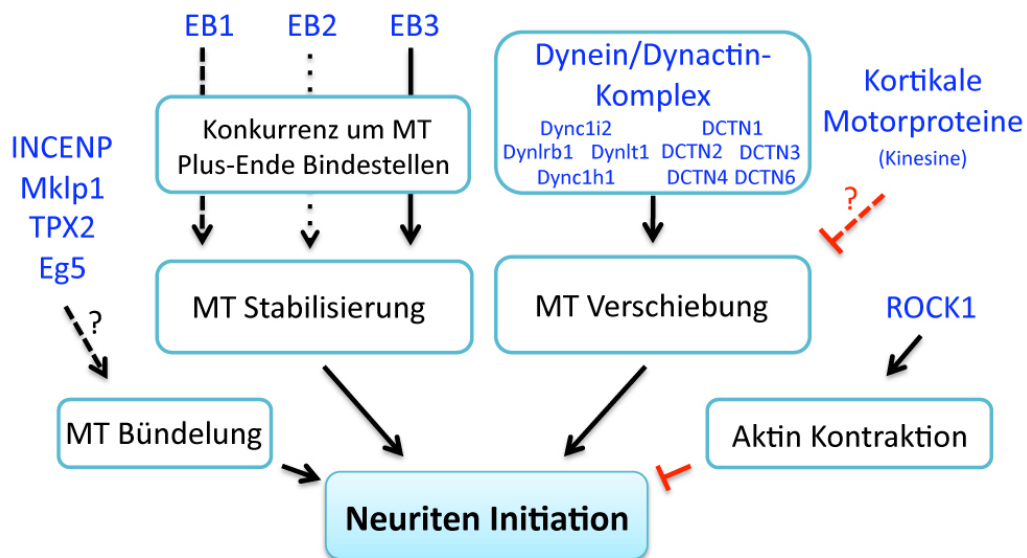


Abbildung 4.2: **Mögliche Funktionen von Mikrotubuli-Regulatoren in der Neuriten Initiation.** Die Initiation von Neuriten wird von verschiedenen Komponenten des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts beeinflusst. Diverse Eigenschaften der Mikrotubuli begünstigen die Neuriten Initiation, wohingegen die Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts einen negativen Einfluss auf diesen Prozess hat. In dieser Arbeit konnten zahlreiche Regulatoren identifiziert werden, die einen Einfluss auf diese Zytoskeletteigenschaften und somit auf die neuronale Morphogenese haben.



# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Während der Entwicklung von Stammzellen in Neuronen verändern sich sowohl die Morphologie als auch die Funktionalität der Zellen. Nach anfänglicher transkriptionsbasierter Reprogrammierung und asymmetrischer Teilung der Vorläuferzellen werden die ersten morphologischen Veränderungen anhand der Initiation von länglichen Zellauswüchsen, den Neuriten, sichtbar, welche im weiteren Verlauf in Axone und Dendriten differenzieren. Während dieser frühen Phasen der neuronalen Morphogenese ist eine Reorganisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts zu beobachten, welche den Mikrotubuli eine kritische Rolle in der Initiation und dem Wachstum von Neuriten nahelegt. In dieser Arbeit wurde die Reorganisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts während der neuronalen Differenzierung in P19 Zellen genauer untersucht. In der Literatur sind mehr als 400 Mikrotubuli-regulierende Proteine bekannt, welche auf eine mögliche Funktion während der neuronalen Morphogenese untersucht werden sollten. Mittels Phänotyp-basierten High-Content Screens und spezifischem Protein *knock down* durch RNA-Interferenz wurden Regulatoren des Mikrotubuli-Zytoskeletts identifiziert, welche in die Neuriten Initiation involviert sind. Es konnten drei verschiedene Phänotypen nach Protein Suppression unterschieden werden, bei denen Änderungen in der Neuritenlänge (kürzer oder länger als bei den Kontrollzellen) oder eine Erhöhung des Neuritendurchmessers detektiert wurden. Weitere detaillierte Studien konnten ver-

schiedene Untereinheiten des Dynein/Dynactin Motorprotein-Komplexes identifizieren, die in die Neuriten Initiation involviert sind. Außerdem induzierte die Suppression einiger bekannter Mitose- und Zytokinese-Proteine, Eg5 (KIF11), TPX2, INCENP und MKLP1 (KIF23), eine signifikante Erhöhung des Neuritendurchmessers, welche eine mögliche Rolle dieser Regulatoren in der Bündelung von Mikrotubuli suggeriert. Die Mitglieder der EB-Familie binden als +TIPs an wachsende Mikrotubuli-Enden und nehmen Einfluss auf die Stabilität von Mikrotubuli. Anhand der Ergebnisse der High-Content Screens sowie weiterer Studien mit kombinierter Protein Suppression konnten kompetitive Wechselwirkungen der drei Isoformen dieser Familie hinsichtlich des Neuritenwachstums beobachtet werden. Zusammengefasst konnten Regulatoren mit unterschiedlichem Einfluss auf die Dynamik und Organisation von Mikrotubuli identifiziert werden. In einem hypothetischen Modell wird der Einfluss dieser Mikrotubuli-Regulatoren auf die Neuritenbildung vorgestellt.

# Kapitel 6

## Anhang

Die angehängten Dateien sind auf einer der Arbeit beigelegten DVD gespeichert. Auf der DVD sind ein Film zur Dynamik von Zytoskelettstrukturen sowie zwei Langzeit Live-Zell Aufnahmen von Dynein supprimierten Zellen zu finden. Weiterhin beinhaltet die DVD die Ergebnis-Tabellen des primären High-Content Screens zum Gesamtzellwachstum, der neuronalen Differenzierung, dem Neuritenwachstum sowie zum Neuritendurchmesser aller getesteter Mikrotubuli-Regulatoren sowie eine Tabelle mit allen Informationen zu den verwendeten siRNAs.

Film 6.1: **Zytoskelett-Dynamik.** TIRF-Aufnahmen zeigen die dynamische Reorganisation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts im Wachstumskegel eines neu gebildeten Neurits. P19 Zellen wurden mittels Retinsäure differenziert und auf MatTek Schalen ausplattiert. In diesem Experiment wurde die stabile mCherry-Aktin/EGFP-Tubulin P19 Zelllinie verwendet. Das Neuritenwachstum wurde mittels akuter Zugabe von Laminin (10 µg/ml) stimuliert. Der Film wurde über einen Zeitraum von sieben Minuten am Olympus IX81 TIRF Mikroskop aufgenommen.

Film 6.2: **Langzeitaufnahme von Dynein supprimierten P19 Zellen.** In diesem Langzeitexperiment wurde die schwere Kette 1 des zytoplasmatischen Dynein 1 (Dync1h1) mittels Einzel-siRNAs in P19 Zellen supprimiert (Einzel-siRNA: Dync1h1 A). Die Zellen wurden mit NeuroD2 und

GFP-Tubulin ko-transfiziert. Im linken Bild sind Kontroll-P19 Zellen zu erkennen, die rechte Aufnahme zeigt die Dynein supprimierten Zellen. Abgebildet sind die Aufnahmen des GFP-Tubulin Signals. Zeitliche Angabe: in Stunden nach der Transfektion.

Film 6.3: **Rotierenden Mikrotubuli-Ansammlungen nach Dynein Suppression.** In den Langzeitaufnahmen von Dync1h1 supprimierten Zellen wurden instabile Mikrotubuli-Ansammlungen beobachtet, welche schnell ihre Position in der Zelle wechselten und zu rotieren begannen. Dieser Film zeigt beispielhaft an einer Zelle die beschriebene Beobachtung. Vermutlich handelt es sich bei dem rotierenden Mikrotubuli-Fokus um das Mikrotubulus-Organisationszentrum. Dieser Phänotyp tritt in einer frühen Phase der Langzeitaufnahme und nur in einem sehr kurzen Zeitraum auf. Zeitliche Angabe: in Stunden nach der Transfektion.

Tabelle 6.1: **Gesamtzellwachstum.** Angaben zum Wachstum der transfizierten Zellen anhand der gemessenen GFP-Intensität (primärer Screen). Aufgelistet sind die spezifische Screen-Identifikationsnummer (ID) des entsprechenden Gens und die siRNA-Menge sowie der Durchschnittswert von allen drei Screenwiederholungen in Einheiten der Standardabweichung (SD) und der entsprechende Standardfehler (SEM).

Tabelle 6.2: **Neuronale Differenzierung.** Der Anteil an neuronal differenzierten Zellen wurde anhand des Verhältnisses der Gesamtfläche an neuronalen Zellkörpern zum GFP-Gesamt signal bestimmt (Angaben vom primären Screen). Aufgelistet sind die spezifische Screen-Identifikationsnummer (ID) des entsprechenden Gens und die siRNA-Menge sowie der Durchschnittswert von allen drei Screenwiederholungen in Einheiten der Standardabweichung (SD) und der entsprechende Standardfehler (SEM).

Tabelle 6.3: **Neuritenwachstum.** Das Wachstum der Neuriten wurde anhand des Verhältnisses der Gesamtneuritenlänge zur Gesamtfläche an neuronalen Zellkörpern bestimmt (Angaben vom primären Screen). Aufgelistet sind die spezifische Screen-Identifikationsnummer (ID) des entsprechenden Gens und die siRNA-Menge sowie der Durchschnittswert von allen drei Screenwiederholungen in Einheiten der Standardabweichung (SD) und der entsprechende Standardfehler (SEM). Kandidaten mit dem

Phänotyp „längere Neuriten“ weisen Durchschnittswerte  $>3$  SD auf, Kandidaten mit „kürzeren Neuriten“ haben negative Durchschnittswerte  $<-3$  SD.

Tabelle 6.4: **Neuritendurchmesser.** Der Neuritendurchmesser wurde anhand des Verhältnisses der Gesamtneuritenfläche zur Gesamtneuritenlänge bestimmt (Angaben vom primären Screen). Aufgelistet sind die spezifische Screen-Identifikationsnummer (ID) des entsprechenden Gens und die siRNA-Menge sowie der Durchschnittswert von allen drei Screenwiederholungen in Einheiten der Standardabweichung (SD) und der entsprechende Standardfehler (SEM). Kandidaten mit dem Phänotyp „erhöhter Neuritendurchmesser“ wiesen Durchschnittswerte  $>3$  SD auf.

Tabelle 6.5: **Informationen zu allen verwendeten siRNAs.**

# Literaturverzeichnis

- [1] Tim Mitchison and Marc Kirschner. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312:237–242, 1984.
- [2] Anna Akhmanova and Michel O Steinmetz. Microtubule + TIPs at a glance. *Journal of Cell Science*, 123:3414–3418, 2010.
- [3] S Inoué and E D Salmon. Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Molecular biology of the cell*, 6(12):1619–40, December 1995.
- [4] Liedewij Laan, Julien Husson, E Laura Munteanu, Jacob W J Kerssemakers, and Marileen Dogterom. Force-generation and dynamic instability of microtubule bundles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26):8920–5, July 2008.
- [5] R F Luduena. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev Cytol.*, 178:207–75, 1998.
- [6] T H MacRae. Tubulin post-translational modifications—enzymes and their mechanisms of action. *European journal of biochemistry / FEBS*, 244(2):265–78, 1997.
- [7] Stefan Westermann and Klaus Weber. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(12):938–47, December 2003.
- [8] Kristen J Verhey and Jacek Gaertig. The Tubulin Code. *Cell Cycle*, 6(17):2152–2160, 2007.

- [9] Jennetta Hammond, Dawen Cai, and Kirsten J Verhey. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol.*, 20(1):71–76, 2008.
- [10] H S Barra, C A Arce, and C E Arquana. Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol Neurobiol.*, 2(2):133–53, 1988.
- [11] K Ersfeld, J Wehland, U Plessmann, H Dodemont, V Gerke, and K Weber. Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *The Journal of cell biology*, 120(3):725–32, February 1993.
- [12] Christian Erck, Leticia Peris, Annie Andrieux, Claire Meissirel, Achim D Gruber, Muriel Vernet, Annie Schweitzer, Yasmina Saoudi, Hervé Pointu, Christophe Bosc, Paul a Salin, Didier Job, and Juergen Wehland. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *PNAS*, 102(22):7853–8, May 2005.
- [13] Nathan Reed, Dawen Cai, T Lynne Blasius, Gloria T Jih, Edgar Meyhofer, Jacek Gaertig, and Kristen J Verhey. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Current biology : CB*, 16(21):2166–72, November 2006.
- [14] Roberto Dominguez and Kenneth C Holmes. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys.*, 40:169–189, 2011.
- [15] Toshiro Oda, Mitsusada Iwasa, Tomoki Aihara, Yuichiro Maéda, and Akihiro Narita. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature*, 457(7228):441–5, January 2009.
- [16] I M Herman. Aktin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5(1):48–55, 1993.
- [17] A Wegner and G Isenberg. 12-Fold Difference Between the Critical Monomer Concentrations of the Two Ends of Actin Filaments in Physiological Salt Conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(16):4922–5, August 1983.

- [18] Thomas D Pollard and Gary G Borisy. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4):453–65, February 2003.
- [19] J V Small. Lamellipodia architecture: actin filament turnover and the lateral flow of actin filaments during motility. *Semin. Cell Biol.*, 5(3):157–63, 1994.
- [20] A K Lewis and P C Bridgman. Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *The Journal of cell biology*, 119(5):1219–43, December 1992.
- [21] Leif Dehmelt, Fiona M Smart, Rachel S Ozer, and Shelley Halpain. The Role of Microtubule-Associated Protein 2c in the Reorganization of Microtubules and Lamellipodia during Neurite Initiation. *The Journal of Neuroscience*, 23(29):9479–9490, 2003.
- [22] Leif Dehmelt and Shelley Halpain. Protein family review The MAP2 / Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*, 6(204):1–10, 2004.
- [23] Julia R Kardon and Ronald D Vale. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(12):854–65, December 2009.
- [24] Scott C Schuyler and David Pellman. Microtubule "Plus-End-Tracking proteins": The end is just beginning. *Cell*, 105:421–424, 2001.
- [25] Atsuko Kodama, Iakowos Karakesisoglou, Ellen Wong, Alec Vaezi, and Elaine Fuchs. ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell*, 115(3):343–54, October 2003.
- [26] James B Moseley, Francesca Bartolini, Kyoko Okada, Ying Wen, Gregg G Gundersen, and Bruce L Goode. Regulated binding of ade-



- nomatous polyposis coli protein to actin. *The Journal of biological chemistry*, 282(17):12661–8, April 2007.
- [27] Andrey S Tsvetkov, Andrey Samsonov, Anna Akhmanova, Niels Galjart, and Sergey V Popov. Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. *Cell motility and the cytoskeleton*, 64(7):519–30, July 2007.
- [28] Anna Akhmanova and Michel O Steinmetz. Tracking the ends : a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature*, 9(April):309–322, 2008.
- [29] Peter Bieling, Liedewij Laan, Henry Schek, E Laura Munteanu, Linda Sandblad, Marileen Dogterom, Damian Brunner, and Thomas Surrey. Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature*, 450(7172):1100–5, December 2007.
- [30] Ram Dixit, Brian Barnett, Jacob E Lazarus, Mariko Tokito, Yale E Goldman, and Erika L F Holzbaur. Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(2):492–7, January 2009.
- [31] Srinivas Honnappa, Susana Montenegro Gouveia, Anke Weisbrich, Fred F Damberger, Neel S Bhavesh, Hatim Jawhari, Ilya Grigoriev, Frederik J van Rijssel, Ruben M Buey, Aleksandra Lawera, Ilian Jellesarov, Fritz K Winkler, Kurt Wüthrich, Anna Akhmanova, and Michel O Steinmetz. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell*, 138(2):366–76, July 2009.
- [32] Katharina Dragestein, Wiggert van Cappellen, Jeffrey van Haren, George D Tsibidis, Anna Akhmanova, Tobias Knoch, Frank Grosveld, and Niels Galjart. Dynamic behavior of GFP-CLIP-170 reveals fast protein turnover on microtubule plus ends. *The Journal of cell biology*, 180(4):729–37, February 2008.

- [33] D Chrétien, S D Fuller, and E Karsenti. Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *The Journal of cell biology*, 129(5):1311–28, June 1995.
- [34] Benjamin Vitre, Frédéric M Coquelle, Claire Heichette, Cyrille Garnier, and Isabelle Arnal. EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nature Cell Biology*, 10(4):415–421, 2008.
- [35] Linda Sandblad, Karl Emanuel Busch, Peter Tittmann, Heinz Gross, Damian Brunner, and Andreas Hoenger. The Schizosaccharomyces pombe EB1 Homolog Mal3p Binds and Stabilizes the Microtubule Lattice Seam. *Cell*, 127:1415–1424, 2006.
- [36] Amédée des Georges, Miho Katsuki, Douglas R Drummond, Michael Osei, Robert A, and Linda A Amos. Mal3, the Schizosaccharomyces pombe homolog of EB1, changes the microtubule lattice. *Nat Struct Mol Biol.*, 15(10):1102–1108, 2008.
- [37] Marija Zanic, Jeffrey H Stear, Anthony A Hyman, and Jonathon Howard. EB1 Recognizes the Nucleotide State of Tubulin in the Microtubule Lattice. *PLoS ONE*, 4(10):1–5, 2009.
- [38] Peter Bieling, Stefanie Kandels-Lewis, Ivo Telley, Juliette van Dijk, Carsten Janke, and Thomas Surrey. CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *The Journal of cell biology*, 183(7):1223–33, December 2008.
- [39] E. Korenbaum and F. Rivero. Calponin homology domains at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(18):3543, September 2002.
- [40] Ikuko Hayashi and Mitsuhiko Ikura. Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *The Journal of biological chemistry*, 278(38):36430–4, September 2003.

- [41] Srinivas Honnappa, C M John, Dirk Kostrewa, F K Winkler, and Michel O Steinmetz. Structural insights into the EB1-APC interaction. *The EMBO journal*, 24(2):261–269, January 2005.
- [42] Kevin C Slep, Stephen L Rogers, Sarah L Elliott, Hiroyuki Ohkura, Peter a Kolodziej, and Ronald D Vale. Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. *The Journal of cell biology*, 168(4):587–98, February 2005.
- [43] K E Busch and Damian Brunner. The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Current biology*, 14(7):548–559, 2004.
- [44] Yulia Komarova, Christian O De Groot, Ilya Grigoriev, Susana Montenegro Gouveia, E Laura Munteanu, Joseph M Schober, Srinivas Honnappa, Rubén M Buey, Casper C Hoogenraad, Marileen Dogterom, Gary G Borisy, Michel O Steinmetz, and Anna Akhmanova. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *The Journal of Cell Biology*, 184(5):691, March 2009.
- [45] J S Tirnauer, Sonia Grego, E D Salmon, and T J Mitchison. EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Molecular biology of the cell*, 13(10):3614, 2002.
- [46] Miho Katsuki, Douglas R Drummond, Michael Osei, and Robert Cross. Mal3 masks catastrophe events in *Schizosaccharomyces pombe* microtubules by inhibiting shrinkage and promoting rescue. *The Journal of biological chemistry*, 284(43):29246–50, October 2009.
- [47] Tapas Manna, Srinivas Honnappa, Michel O Steinmetz, and Leslie Wilson. Suppression of microtubule dynamic instability by the +TIP protein EB1 and its modulation by the CAP-Gly domain of p150glued. *Biochemistry*, 47(2):779–86, January 2008.

- [48] Gary J Brouhard, Jeffrey H Stear, Tim L Noetzel, Jawdat Al-Bassam, Kazuhisa Kinoshita, Stephen C Harrison, Jonathon Howard, and Anthony a Hyman. XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell*, 132(1):79–88, January 2008.
- [49] S L Kline-Smith and C E Walczak. The microtubule-destabilizing kinesin XKCM1 regulates microtubule dynamic instability in cells. *Molecular biology of the cell*, 13(8):2718, 2002.
- [50] Yulia Komarova, Anna S Akhmanova, Shin-Ichiro Kojima, Niels Galjart, and Gary G Borisy. Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *The Journal of cell biology*, 159(4):589–99, November 2002.
- [51] Yuko Mimori-Kiyosue, Ilya Grigoriev, Gideon Lansbergen, Hiroyuki Sasaki, Chiyuki Matsui, Fedor Severin, Niels Galjart, Frank Grosveld, Ivan Vorobjev, Shoichiro Tsukita, and Anna Akhmanova. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *The Journal of cell biology*, 168(1):141–53, 2005.
- [52] Ying Wen, Christina H Eng, Jan Schmoranzer, Noemi Cabrera-Poch, Edward J S Morris, Michael Chen, Bradley J Wallar, Arthur S Alberts, and Gregg G Gundersen. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nature cell biology*, 6(9):820–30, September 2004.
- [53] Arnoud Sonnenberg and Ronald K H Liem. Plakins in development and disease. *Experimental cell research*, 313(10):2189–203, June 2007.
- [54] Seungbok Lee and Peter Kolodziej. Short Stop provides an essential link between F-actin and microtubules during axon extension. *Development (Cambridge, England)*, 129(5):1195–204, March 2002.
- [55] C L Leung, D Sun, M Zheng, D R Knowles, and R K Liem. Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and

- dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. *The Journal of cell biology*, 147(6):1275–86, December 1999.
- [56] Julius J Jefferson, Conrad L Leung, and Ronald K H Liem. Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(7):542–53, July 2004.
- [57] K. Roper. The ‘Spectraplakins’: cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families. *Journal of Cell Science*, 115(22):4215–4225, November 2002.
- [58] N Hirokawa. Organelle transport along microtubules - the role of KIFs. *Trends in cell biology*, 6(4):135–41, April 1996.
- [59] Nobutaka Hirokawa, Shinsuke Niwa, and Yosuke Tanaka. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*, 68(4):610–38, November 2010.
- [60] Peter Höök. The mechanical components of the dynein motor. *TheScientificWorldJournal*, 10:857–64, January 2010.
- [61] Andrew F Neuwald, L Aravind, John L Spouge, and Eugene V Koonin. Assembly , Operation , and Disassembly of Protein Complexes AAA + : A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly , Operation , and Disassembly of Protein Complexes. *Genome Research*, 9:27–43, 1999.
- [62] Anthony J Roberts, Naoki Numata, Matt L Walker, Yusuke S Kato, Bara Malkova, Takahide Kon, Reiko Ohkura, Fumio Arisaka, Peter J Knight, Kazuo Sutoh, and Stan a Burgess. AAA+ Ring and linker swing mechanism in the dynein motor. *Cell*, 136(3):485–95, February 2009.
- [63] Stan Burgess, Matt L Walker, Hitoshi Sakakibara, Peter J Knight, and Kazuhiro Oiwa. Dynein structure and power stroke. *Nature*, 421(6924):715–8, February 2003.

- [64] Takahide Kon, Toshifumi Mogami, Reiko Ohkura, Masaya Nishiura, and Kazuo Sutoh. ATP hydrolysis cycle-dependent tail motions in cytoplasmic dynein. *Nature structural & molecular biology*, 12(6):513–9, June 2005.
- [65] M Gee, J E Heuser, and R B Vallee. An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature*, 390(6660):636–9, December 1997.
- [66] AP Carter, JE Garbarino, and EM Wilson-Kubalek. Structure and functional role of dynein’s microtubule-binding domain. *Science*, 322(December):1691–1695, 2008.
- [67] K T Vaughan and R B Vallee. Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *The Journal of cell biology*, 131(6):1507, December 1995.
- [68] Trina Schroer. Dynactin. *Annual review of cell and developmental biology*, 20:759–79, January 2004.
- [69] Andrew W Tai, Jen-Zen Chuang, Christian Bode, Uwe Wolfrum, and Ching-Hwa Sung. Rhodopsin s Carboxy-Terminal Cytoplasmic Tail Acts as a Membrane Receptor for Cytoplasmic Dynein by Binding to the Dynein Light Chain Tctex1. *Cell*, 97:877–887, 1999.
- [70] Serena C Tan, Julian Scherer, and Richard B Vallee. Recruitment of dynein to late endosomes and lysosomes through light intermediate chains. *Molecular biology of the cell*, 22(4):467–77, February 2011.
- [71] D Schafer, S R Gill, J Cooper, J E Heuser, and T Schroer. Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *The Journal of cell biology*, 126(2):403–12, July 1994.
- [72] D M Eckley, S R Gill, K Melkonian, J B Bingham, H V Goodson, J E Heuser, and T Schroer. Analysis of dynactin subcomplexes reveals

- a novel actin-related protein associated with the arp1 minifilament pointed end. *The Journal of cell biology*, 147(2):307–20, October 1999.
- [73] E Holleran, M K Tokito, S Karki, and E L Holzbaur. Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. *The Journal of cell biology*, 135(6 Pt 2):1815–29, December 1996.
- [74] I H Lee, S Kumar, and M Plamann. Null mutants of the neurospora actin-related protein 1 pointed-end complex show distinct phenotypes. *Molecular biology of the cell*, 12(7):2195–206, July 2001.
- [75] J Garces, I B Clark, D I Meyer, and R B Vallee. Interaction of the p62 subunit of dynactin with Arp1 and the cortical actin cytoskeleton. *Current Biology*, 9(24):1497–1500, 1999.
- [76] Hiroshi Imai, Akihiro Narita, Trina Schroer, and Yuichiro Maéda. Two-dimensional averaged images of the dynactin complex revealed by single particle analysis. *Journal of molecular biology*, 359(4):833–9, June 2006.
- [77] S R Gill, T Schroer, I Szilak, E R Steuer, M P Sheetz, and D W Cleveland. Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *The Journal of cell biology*, 115(6):1639–50, December 1991.
- [78] N Hirokawa and Y Noda. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Current opinion in cell biology*, 10:60–73, 1998.
- [79] Robert P Brendza, Laura R Serbus, Joseph B Duffy, and William M Saxton. A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Stauf protein. *Science*, 289(5487):2120–2122, July 2000.
- [80] N Hirokawa. Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport. *Science*, 279(5350):519–526, January 1998.

- [81] R D Vale and R J Fletterick. The design plan of kinesin motors. *Annual review of cell and developmental biology*, 13:745–77, January 1997.
- [82] D J Sharp, G C Rogers, and J M Scholey. Microtubule motors in mitosis. *Nature*, 407(6800):41–7, September 2000.
- [83] N Hirokawa and Y Noda. Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiological reviews*, 88(3):1089–1118, 2008.
- [84] N Hirokawa, K K Pfister, H Yorifuji, M C Wagner, S T Brady, and G S Bloom. Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell*, 56(5):867–78, March 1989.
- [85] H Miki, M Setou, K Kaneshiro, and N Hirokawa. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13):7004–11, June 2001.
- [86] L Wordeman and T J Mitchison. Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *The Journal of cell biology*, 128(1-2):95–104, January 1995.
- [87] Lesley N Weaver, Stephanie C Ems-McClung, Jane R Stout, Chantal Leblanc, Sidney L Shaw, Melissa K Gardner, and Claire E Walczak. Kif18A Uses a Microtubule Binding Site in the Tail for Plus-End Localization and Spindle Length Regulation. *Current biology : CB*, 21(17):1500–1506, August 2011.
- [88] N Saito, Y Okada, Y Noda, Y Kinoshita, S Kondo, and N Hirokawa. KIFC2 is a novel neuron-specific C-terminal type kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles. *Neuron*, 18(3):425–38, March 1997.



- [89] Carolyn J Lawrence, R Kelly Dawe, Karen R Christie, Don W Cleveland, Scott C Dawson, Sharyn A Endow, Lawrence S B Goldstein, Holly V Goodson, Nobutaka Hirokawa, Jonathon Howard, Russell L Malmberg, J Richard McIntosh, Harukata Miki, Timothy J Mitchison, Yasushi Okada, Anireddy S N Reddy, William M Saxton, Manfred Schliwa, Jonathan M Scholey, Ronald D Vale, Claire E Walczak, and Linda Wordeman. A standardized kinesin nomenclature. *The Journal of cell biology*, 167(1):19–22, October 2004.
- [90] M W McBurney and B J Rogers. Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Developmental biology*, 89(2):503–8, February 1982.
- [91] Elizabeth M V Jones-Villeneuve, Michael W McBurney, Kem A Rogers, and Vitauts I Kalnins. Retinoic Acid Induces Embryonal Carcinoma Cells to Differentiate into Neurons and Glial Cells. *The Journal of Cell Biology*, 94:253–262, 1982.
- [92] M W McBurney, E M Jones-Villeneuve, M K Edwards, and P J Anderson. Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature.*, 299(5879):165–7, 1982.
- [93] Elizabeth M V Jones-Villeneuve, Michael A Rudnicki, John F Harris, and Michael W McBurney. Retinoic Acid-Induced Neural Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 3(12):2271–2279, 1983.
- [94] Michael W McBurney, Kenneth R Reuhl, Ariff I Ally, Soma Nasipuri, John C Bell, and Jane Craig. Differentiation and Maturation Neurons in Cell Culture of Embryonal Carcinoma-Derived. *The Journal of Neuroscience*, 8(3):1063–1073, 1988.
- [95] V E Papaioannou, McBurney M W, R L Gardner, and M J Evans. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature.*, 258:70–73, November 1975.

- [96] R Watanabe, S Takase-Yoden, T Ikeda, and T Atsumi. Gene transfer through implantation of embryonal carcinoma cells in the brain. *Cell Transplant.*, 5:S9–12, September 1996.
- [97] Mohamed H Farah, James M Olson, Holly B Sucic, Richard I Hume, Stephen J Tapscott, and David L Turner. Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development*, 127:693–702, 2000.
- [98] Leif Dehmelt, Gunnar Poplawski, Eric Hwang, and Shelley Halpain. NeuriteQuant: An Open Source Toolkit for High Content Screens of Neuronal Morphogenesis. *BMC neuroscience*, 12(1):100, October 2011.
- [99] Takahiko Matsuda and Constance L Cepko. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1):16–22, January 2004.
- [100] Verena Hannak. Analyse der Dynamik des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts während der neuronalen Differenzierung von P19 Zellen., 2009.
- [101] L Dehmelt, P Nalbant, W Steffen, and S Halpain. A microtubule-based, dynein-dependent force induces local cell protrusions: Implications for neurite initiation. *Brain cell biology*, 35(1):39–56, February 2006.
- [102] Kary B Mullis and Faloona F A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335–50, 1987.
- [103] R K Saiki, D H Gelfand, S Stoffel, S J Scharf, R Higuchi, G T Horn, K B Mullis, and H a Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839):487–91, January 1988.

- [104] Sanger F, Nicklen S, and Coulsen A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*, 24:104–8, 1992.
- [105] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 7:248–54, 1976.
- [106] S Morita, T Kojima, and T Kitamura. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene therapy*, 7(12):1063–6, June 2000.
- [107] Daniela Meilinger, Karin Fellingner, Sebastian Bultmann, Ulrich Rothbauer, Ian Marc Bonapace, Wolfgang E F Klinkert, Fabio Spada, and Heinrich Leonhardt. Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. *EMBO reports*, 10(11):1259–64, November 2009.
- [108] S Tugendreich, J Tomkiel, W Earnshaw, and P Hieter. CDC27Hs co-localizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell*, 81(2):261–8, April 1995.
- [109] Sarah W Chan, Kerry J Fowler, K H Andy Choo, and Paul Kalitsis. Spefl1, a conserved novel testis protein found in mouse sperm flagella. *Gene*, 353(2):189–99, July 2005.
- [110] S Balaji, Lakshminarayan M Iyer, and L Aravind. HPC2 and ubiquitin define a novel family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes. *Molecular bioSystems*, 5(3):269–75, March 2009.
- [111] Fridoon J Ahmad, Yan He, Kenneth a Myers, Thomas P Hasaka, Franto Francis, Mark M Black, and Peter W Baas. Effects of dynactin disruption and dynein depletion on axonal microtubules. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7(5):524–37, May 2006.

- [112] F J Ahmad, J Hughey, T Wittmann, A Hyman, M Greaser, and P W Baas. Motor proteins regulate force interactions between microtubules and microfilaments in the axon. *Nature cell biology*, 2(5):276–80, May 2000.
- [113] H Bito, T Furuyashiki, H Ishihara, Y Shibasaki, K Ohashi, K Mizuno, M Maekawa, T Ishizaki, and S Narumiya. A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron*, 26(2):431–41, May 2000.
- [114] Yulia Komarova, Gideon Lansbergen, Niels Galjart, Frank Grosveld, G.G. Borisy, and Anna Akhmanova. EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Molecular biology of the cell*, 16(11):5334, 2005.
- [115] Gerard W Dougherty, Henry J Adler, Agnieszka Rzadzinska, Mario Gimona, York Tomita, M Claudia Lattig, Raymond C Merritt, and Bechara Kachar. CLAMP, a novel microtubule-associated protein with EB-type calponin homology. *Cell motility and the cytoskeleton*, 62(3):141–56, November 2005.
- [116] Tae Joo Park, Brian J Mitchell, Philip B Abitua, Chris Kintner, and John B Wallingford. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat Genet.*, 40(7):871–879, 2008.
- [117] Ryan S Gray, Philip B Abitua, Bogdan J Wlodarczyk, Heather L Szabo-rogers, Insuk Lee, Greg S Weiss, Karen J Liu, Edward M Marcotte, B John, and Richard H Finnell. The planar cell polarity effector Fuz is essential for targeted membrane trafficking, ciliogenesis and mouse embryonic development. *Nature Cell Biology*, 11:1225 – 1232, 2009.
- [118] C L Leung, M Zheng, S M Prater, and R K Liem. The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neu-

- rons and muscles. *The Journal of cell biology*, 154(4):691–7, August 2001.
- [119] D Sun, C L Leung, and R K Liem. Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *Journal of cell science*, 114(Pt 1):161–172, January 2001.
- [120] Natalia Sanchez-Soriano, Mark Travis, Federico Dajas-Bailador, Catarina Gonçalves-Pimentel, Alan J Whitmarsh, and Andreas Prokop. Mouse ACF7 and drosophila short stop modulate filopodia formation and microtubule organisation during neuronal growth. *Journal of cell science*, 122(Pt 14):2534–42, July 2009.
- [121] Magali Irla, Murielle Saade, Carla Fernandez, Lionel Chasson, Geneviève Victorero, Nadia Dahmane, Geneviève Chazal, and Catherine Nguyen. Neuronal distribution of spatial in the developing cerebellum and hippocampus and its somatodendritic association with the kinesin motor KIF17. *Experimental cell research*, 313(20):4107–19, December 2007.
- [122] Murielle Saade, Magali Irla, Jérôme Govin, Genevieve Victorero, Michel Samson, and Catherine Nguyen. Dynamic distribution of Spatial during mouse spermatogenesis and its interaction with the kinesin KIF17b. *Experimental cell research*, 313(3):614–26, February 2007.
- [123] Murielle Saade, Magali Irla, Miriam Yammine, Nicolas Boulanger, Geneviève Victorero, Renaud Vincentelli, Josef M Penninger, Georg a Holländer, Sophie Chauvet, and Catherine Nguyen. Spatial (Tbata) expression in mature medullary thymic epithelial cells. *European journal of immunology*, 40(2):530–8, February 2010.
- [124] I L Schurov, E J Handford, N J Brandon, and P J Whiting. Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment. *Molecular psychiatry*, 9(12):1100–10, December 2004.

- [125] Yingwei Mao, Xuecai Ge, Christopher L Frank, Jon M Madison, Angela N Koehler, Mary Kathryn Doud, Carlos Tassa, Erin M Berry, Takahiro Soda, Karun K Singh, Travis Biechele, Tracey L Petryshen, Randall T Moon, Stephen J Haggarty, and Li-Huei Tsai. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell*, 136(6):1017–31, March 2009.
- [126] K E Sawin, K LeGuelleck, M Philippe, and T J Mitchison. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature*, 359(6395):540–3, 1992.
- [127] T Wittmann, H Boleti, C Antony, E Karsenti, and I Vernos. Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *The Journal of cell biology*, 143(3):673–85, November 1998.
- [128] Nan Ma, Janel Titus, Alyssa Gable, Jennifer L Ross, and Patricia Wadsworth. TPX2 regulates the localization and activity of Eg5 in the mammalian mitotic spindle. *The Journal of cell biology*, 195(1):87–98, October 2011.
- [129] W B Raich, A N Moran, J H Rothman, and J Hardin. Cytokinesis and midzone microtubule organization in *Caenorhabditis elegans* require the kinesin-like protein ZEN-4. *Molecular biology of the cell*, 9(8):2037–49, August 1998.
- [130] a M Mackay, a M Ainsztein, D M Eckley, and W C Earnshaw. A dominant mutant of inner centromere protein (INCENP), a chromosomal protein, disrupts prometaphase congression and cytokinesis. *The Journal of cell biology*, 140(5):991–1002, March 1998.
- [131] Sandrine Ruchaud, Mar Carmena, and William C Earnshaw. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10):798–812, October 2007.

- [132] Stephanie Stehman, Yu Chen, Richard J McKenney, and Richard B Vallee. NudE and NudEL are required for mitotic progression and are involved in dynein recruitment to kinetochores. *The Journal of cell biology*, 178(4):583–94, August 2007.
- [133] Caryn Navarro, Hamsa Puthalakath, Jerry M Adams, Andreas Stras-ser, and Ruth Lehmann. Egalitarian binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate. *Nature cell biology*, 6(5):427–35, May 2004.
- [134] C C Hoogenraad, A Akhmanova, S Howell, B R Dortland, C I De Zeeuw, R Willemsen, P Visser, F Grosveld, and N Galjart. Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *The EMBO journal*, 20(15):4041–54, August 2001.
- [135] Guillaume Jacquot, Priscilla Maidou-Peindara, and Serge Benichou. Molecular and functional basis for the scaffolding role of the p50/dynamitin subunit of the microtubule-associated dynactin complex. *The Journal of biological chemistry*, 285(30):23019–31, July 2010.
- [136] Masahiro Terasawa, Mika Toya, Fumio Motegi, Miyeko Mana, Kuniaki Nakamura, and Asako Sugimoto. *Caenorhabditis elegans* ortholog of the p24/p22 subunit, DNC-3, is essential for the formation of the dynactin complex by bridging DNC-1/p150(Glued) and DNC-2/dynamitin. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 15(11):1145–57, November 2010.
- [137] Olga Müller. Untersuchung der Rolle von Motorproteinen bei der MAP2c-induzierten Reorganisation von Mikrotubuli., 2010.
- [138] M P Koonce, J Köhler, R Neujahr, J M Schwartz, I Tikhonenko, and G Gerisch. Dynein motor regulation stabilizes interphase microtubule arrays and determines centrosome position. *The EMBO journal*, 18(23):6786–92, December 1999.

- [139] D.A. Brito, Joshua Strauss, Valentin Magidson, Irina Tikhonenko, Alexey Khodjakov, and M.P. Koonce. Pushing forces drive the comet-like motility of microtubule arrays in *Dictyostelium*. *Molecular biology of the cell*, 16(7):3334–3340, 2005.
- [140] Nick P Ferenz, Raja Paul, Carey Fagerstrom, Alex Mogilner, and Patricia Wadsworth. Dynein antagonizes eg5 by crosslinking and sliding antiparallel microtubules. *Current biology : CB*, 19(21):1833–8, 2009.
- [141] Sandrine Etienne-Manneville and Alan Hall. Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*, 421(6924):753–6, February 2003.
- [142] Anna Akhmanova, C C Hoogenraad, K Drabek, T Stepanova, B Dortland, T Verkerk, W Vermeulen, B M Burgering, C I De Zeeuw, F Grosveld, and N Galjart. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell*, 104(6):923–35, March 2001.
- [143] Masaki Fukata, Takashi Watanabe, Jun Noritake, Masato Nakagawa, Masaki Yamaga, Shinya Kuroda, Yoshiharu Matsuura, Akihiro Iwamatsu, Franck Perez, and Kozo Kaibuchi. Cdc42 regulates GSK-3 $\beta$  and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Cell*, 109(7):873–85, June 2002.
- [144] Christophe Leterrier, Hélène Vacher, Marie-Pierre Fache, Stéphanie Angles D’Ortoli, Francis Castets, Amapola Autillo-Touati, and Bénédicte Dargent. End-binding proteins EB3 and EB1 link microtubules to ankyrin G in the axon initial segment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21):8826–31, May 2011.
- [145] Sara Geraldo, Umme K Khanzada, Maddy Parsons, John K Chilton, and Phillip R Gordon-Weeks. Targeting of the F-actin-binding pro-



- tein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis. *Nature cell biology*, 10(10):1181–9, October 2008.
- [146] Changjun Zhu, Ella Bossy-Wetzel, and Wei Jiang. Recruitment of MKLP1 to the spindle midzone/midbody by INCENP is essential for midbody formation and completion of cytokinesis in human cells. *The Biochemical journal*, 389(Pt 2):373–81, July 2005.
- [147] J Powers, O Bossinger, D Rose, S Strome, and W Saxton. A nematode kinesin required for cleavage furrow advancement. *Current biology : CB*, 8(20):1133–6, October 1998.
- [148] Ozlem Yüce, Alisa Piekny, and Michael Glotzer. An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *The Journal of cell biology*, 170(4):571–82, August 2005.
- [149] O J Gruss, R E Carazo-Salas, C a Schatz, G Guarguaglini, J Kast, M Wilm, N Le Bot, I Vernos, E Karsenti, and I W Mattaj. Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*, 104(1):83–93, January 2001.
- [150] Beate Neumann, Thomas Walter, Jean-Karim Hériché, Jutta Bulkescher, Holger Erfle, Christian Conrad, Phill Rogers, Ina Poser, Michael Held, Urban Liebel, Cihan Cetin, Frank Sieckmann, Gregoire Pau, Rolf Kabbe, Annelie Wünsche, Venkata Satagopam, Michael H Schmitz, Catherine Chapuis, Daniel W Gerlich, Reinhard Schneider, Roland Eils, Wolfgang Huber, Jan-Michael Peters, Anthony Hyman, Richard Durbin, Rainer Pepperkok, and Jan Ellenberg. Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature*, 464(7289):721–7, April 2010.
- [151] Kenneth A Myers and Peter W Baas. Kinesin-5 regulates the growth of the axon by acting as a brake on its microtubule array. *The Journal of Cell Biology*, 178(6):1081–1091, 2007.

- [152] Vidya C Nadar, Andrea Ketschek, Kenneth Myers, Gianluca Gallo, and Peter W Baas. Kinesin-5 is essential for growth-cone turning. *Current biology : CB*, 18(24):1972–7, December 2008.
- [153] Aditi Falnikar, Shubha Tole, and Peter W Baas. Kinesin-5 , a mitotic microtubule-associated motor protein , modulates neuronal migration. *Molecular Biology of the Cell*, 22:1561–1574, 2011.
- [154] D G Cole, W M Saxton, K B Sheehan, and J M Scholey. A ßlow"homotetrameric kinesin-related motor protein purified from *Drosophila* embryos. *The Journal of biological chemistry*, 269(37):22913–6, September 1994.
- [155] A S Kashina, R J Baskin, D G Cole, K P Wedaman, W M Saxton, and J M Scholey. A bipolar kinesin. *Nature*, 379:270–272, 1996.
- [156] Lukas C Kapitein, Erwin J G Peterman, and Benjamin H Kwok. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it cross-links. *Nature*, 435(May), 2005.
- [157] Nick P Ferenz, Alyssa Gable, and Pat Wadsworth. Mitotic functions of kinesin-5. *Seminars in cell & developmental biology*, 21(3):255–9, May 2010.
- [158] Jean Livet, Tamily Weissman, Hyuno Kang, Ryan W Draft, Ju Lu, Robyn Bennis, Joshua R Sanes, and Jeff W Lichtman. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 450(7166):56–62, November 2007.
- [159] Melanie Grässl. Entwicklung und Applikation von Reporterzelllinien zur Untersuchung der neuronalen Differenzierung., 2010.

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
dNTPs	Desoxynukleotid-Triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärktes grün-floureszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
<i>et al.</i>	und andere
FBS	ötales Rinderserum ( <i>Fetal Bovine Serum</i> F)
g	Gramm
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFP	grün-floureszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo-Dalton
KIF	Kinesin-Familienmitglied( <i>kinesin family member</i> )
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LFA	Lipofectamine2000
M	Molar; mol pro Liter

MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein ( <i>Microtubule associated protein</i> )
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MT	Mikrotubulus
MW	Molekulargewicht ( <i>Molecular weight</i> )
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
RNase	Ribonuklease
RFP	rot-fluoreszierendes Protein ( <i>Red fluorescent protein</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>Revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SEM	Standardfehler ( <i>Standard error of the mean</i> )
siRNA	kleine eingreifende RNA ( <i>small interfering RNA</i> )
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TIRF	Totale interne Reflexion Fluoreszenz ( <i>Total internal reflection fluorescence</i> )

TIRF-M	Totale interne Reflexion Fluoreszenz-Mikroskopie ( <i>Total internal reflection fluorescence microscopy</i> )
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
u.a.	unter anderem
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Julia Arens  
Geburtstag 23.04.1982  
Adresse Zum Sonnenberg 16  
57439 Attendorn  
Deutschland

Jan 2008 - Feb 2012 Dissertation am Max-Planck Institut für molekulare  
Physiologie in Dortmund  
Abteilung für Systemische Zellbiologie  
Technische Universität Dortmund  
Fakultät Chemie  
Prof. Dr. Philippe Bastiaens  
Arbeitsgruppe: Dr. Leif Dehmelt

Mai 2007 - Dez 2007 Hilfwissenschaftlerin  
Max-Planck Institut für molekulare Physiologie  
Abteilung für Strukturbiologie  
Arbeitsgruppe: PD Dr. Eva Wolf

Juni 2006 - April 2007 Diplomarbeit am Max-Planck Institut für molekulare  
Physiologie in Dortmund  
Abteilung für Strukturbiologie  
Westfälische Wilhelms Universität Münster  
Fachbereich Biologie  
Prof. Dr. Alfred Wittinghofer  
Arbeitsgruppe: PD Dr. Eva Wolf  
Titel: Biochemische Charakterisierung von Uhren-  
proteinen aus *Mus musculus*

Sept 2001 - April 2007 Studium der Biologie an der Westfälischen  
Wilhelms Universität in Münster  
Abschluss: Diplom

1992 - 2001 St.-Ursula Gymnasium, Attendorn  
Schulabschluss: Abitur



# Danksagung

Abschließend möchte ich noch all denjenigen meinen Dank aussprechen, die an meiner Dissertation durch ihre Hilfe, ihr Interesse und ihre motivierenden Worte Anteil hatten:

- Prof. Dr. Philippe Bastiaens, für die Übernahme des Erstgutachtens und die Möglichkeit, meine Dissertation in der Abteilung für Systemische Zellbiologie anfertigen zu können.
- Prof. Dr. Frank Wehner, für die Übernahme des Zweitgutachtens.
- Dr. Leif Dehmelt, für die interessante Themenstellung, die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit in seiner Arbeitsgruppe.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Masterstudentinnen Verena Hannak und Melanie Gräßl, die erfolgreich an diesem Projekt mitgearbeitet haben.

Natürlich möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meinen Arbeitskollegen Silke Gandor, Dr. Tomas Mazel, Magda Krejczy, Olga Müller und allen ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dehmelt bedanken, die für mich immer hilfsbereite und aufmunternde Ansprechpartner waren.

Auch den anderen Mitarbeitern der Abteilung 2, die mir bei der Anfertigung meiner Arbeit geholfen haben, möchte ich meinen Dank aussprechen. Besonders möchte ich mich bei Dina Truxius und Dr. Sven Müller bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, die lieben, aufmunternden Worte und dafür, dass ihr immer für mich da seid, bedanken.



# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich am Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den