

# Charakterisierung des Motorproteins KipA und der Einsatz von Kinesinen zur Entwicklung eines Transportsystem im Nano-Maßstab

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

vorgelegte

DISSERTATION

von

**Tobias Schunck**

aus

Homburg

Dekan: Prof. Dr. S. Bräse

Referent: Prof. Dr. R. Fischer

Korreferent: Prof. Dr. P. Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2011



---

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2007 bis Dezember 2010 im Laboratorium für Angewandete Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie des Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter der Leitung von Prof. Dr. R. Fischer durchgeführt.

---

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung des Motorproteins KipA und der Einsatz von Kinesinen zur Entwicklung eines Transportsystem im Nano-Maßstab“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Außerdem wurde die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Karlsruhe, 15. Dezember 2010

Tobias Schunck

---

## Veröffentlichungen

**Eggenberger, K., N. Frey, B. Zienicke, J. Siebenbrock, T. Schunck, R. Fischer, S. Bräse, E. Birtalan, T. Nann, and P. Nick (2010).** „Use of nanoparticle to study and manipulate plant cells“. Adv. Engin. Biomat. 12:(9) B406–B412.

**Schunck, T., J. Siebenbrock, S. Sekula-Neuner, N. Frey, B. Zienicke, S. Lenhart, P. Nick and R. Fischer (2011).** „Kinesin-Hydrohobin fusionsprotein to functionalise surfaces“ **in Vorbereitung.**

**Schunck, T. and R. Fischer (2011).** „Biochemical characteriation of the Kinesin-7 Motor KipA from *A. nidulans*“ **in Vorbereitung.**

## Tagungsbeiträge

**Schunck T., Siebenbrock J. und Fischer R.(2008).** „Molecular motors for Nanobiology“; Interdisciplinary Nanobiology Workshop im INT, FZK (Vortrag)

**Schunck T., Siebenbrock J., Bathe F., Sekula S., Lenhart S. und Fischer R. (2008).**„Characterisation of different kinesin constructs and their use in nanobiotechnology“ IITC-Symposium (Poster)  
**Posterpreis**

**Schunck T., Siebenbrock J., Sekula S., Lenhart S. und Fischer R. (2009).**„Characterisation of different kinesin constructs and their use in nanobiotechnology“ 9th VAAM Symposium Molecular Biology of Fungi (Poster)

**Schunck T., Siebenbrock J. und Fischer R. (2009)** „Application of biological motors for nanoscale transportation“ CFN Summer School on Nanobiology (Poster)

**Mitorganisator der CFN Summer School on Nanobiology 2009, Bad Herrenalb.**

---

„In der Natur ist die Bedeutung des unendlich Kleinen unendlich groß“

Louis Pasteur

---

## Zusammenfassung

Biomolekulare Motoren sind die Arbeitstiere der Zellen und sind an allen Bewegungen innerhalb der Zelle beteiligt. Es sind Mechanoenzyme, die die chemische Energie der ATP-Hydrolyse in gerichtete Bewegung umsetzen. Dabei bewegen sie sich oft entlang filamentöser Strukturen. Die Kinesine sind für den intrazellulären, anterograden Transport von Vesikeln und Proteinen entlang von Mikrotubuli verantwortlich. Die herausragendste Eigenschaft dieser Motoren ist ihre prozessive Fortbewegung. Es ist ihnen möglich, viele hundert, 8 nm weite Schritte, an einem Mikrotubulus entlang zu laufen, ohne sich dabei vom Filament abzulösen. Dabei werden Strecken von mehreren  $\mu\text{m}$  zurückgelegt. Während ihres Laufes erzeugen einzelne Kinesinmoleküle eine Kraft von bis zu 5 pN und erreichen Geschwindigkeiten von bis zu 2  $\mu\text{m/s}$ . Es wurden schon viele Versuche unternommen, sich das Kinesin-Mikrotubuli-System und seine einzigartigen Eigenschaften *in vitro* zu Nutze zu machen.

Durch den Einsatz von Kinesinen und Mikrotubuli wurde ein Transportsystem entwickelt. Dabei wurden die Mikrotubuli mit *rigor*-Mutanten auf Oberflächen fixiert und dienten dann als „Straßen“. Über diese wurden Latex-Kügelchen oder Nanopartikel mittels Kinesinen transportiert. Es wurden zwei Ansätze zur Anbringung der Mikrotubuli versucht. Einerseits wurde die Motordomäne des Kif5A, einem menschlichen Kinesin-1, mit dem pilzlichen Hydrophobin DewA fusioniert, welches bekannt dafür ist auf Oberflächen aller Art zu haften. Es wurde gezeigt, dass dieses Fusionsprotein auf vielen Oberflächen haftet und Mikrotubuli aktiv transportiert. In dieses Protein wurde danach ein *rigor*-Mutation eingeführt um die Mikrotubuli als „Straßen“ zu immobilisieren. In einem zweiten Ansatz wurde die Motordomäne des Kinesin-1 KinA über ihren His<sub>6</sub>-Tag an DOGS-Ni-NTA gekoppelt, die mittels DipPen auf eine Oberfläche aufgebracht wurden. Auch hierbei konnte gezeigt werden, dass die gebundenen Proteine aktiv waren. Es kann also geschlussfolgert werden, dass nach Einfügen einer *rigor*-Mutation, diese Proteine ebenfalls benutzt werden könnten, Mikrotubuli zu fixieren.

Nachdem die Transportwege fertig gestellt waren, wurden die Lasten darüber transportiert. Dazu wurden Latex-Kügelchen an die Kif5A Proteine gekoppelt und im Motilitätsassay getestet. Die Kügelchen bewegten sich entlang der Mikrotubuli. Da die verwendeten Kinesine aber auch in der Lage waren, auf anderen Oberflächen zu binden und somit die Mikrotubuli bewegen konnten, wurde ein anderes Konstrukt ausprobiert. In diesem zweiten Ansatz wurde die Motordomäne des Kif5A C-terminal mit der PH-Domäne des Kinesin-3, UncA, aus *A. nidulans* fusioniert. Unter Verwendung eines Lipid-Bindetests wurde gezeigt, dass dieses Fusionsprotein stark an Phosphatidylserin bindet. Nun konnten Nanopartikel mit den entsprechenden Lipiden beschichtet werden und durch Kif5APH über die Mikrotubuli transportiert werden. Diese vorläufigen Ergebnisse müssen jedoch nochmals wiederholt werden, um sie zu bestätigen.

In dieser Arbeit wurde das Kinesin-7 aus *Aspergillus nidulans*, KipA, biochemisch charakterisiert. Dazu wurde es bakteriell exprimiert und anschließend aufgereinigt. Dabei wurde entdeckt, dass es sich hierbei um ein funktionales Kinesin handelt, das an Mikrotubuli entlang läuft. Des Weiteren wurde die ATP-Umsatzrate bestimmt und Mant-ADP-Freisetzungsexperimente weisen darauf hin, dass es sich um ein dimeres Protein handelt. Diese Erkenntnisse sollten bei der Aufklärung helfen, warum KipA neben den Mikrotubuli der Mitosespindel auch die Spitzen wachsender Mikrotubuli dekoriert und wie es dort hingelangt.

---

## Abstract

Biomolecular motors are the „workhorses“ of the cells and are involved in all movements within the cell. They are mechanoenzymes, which convert the chemical energy from the ATP hydrolysis into directed motion. In this process they move along filamentous structures. Kinesins are responsible for intracellular, anterograde transport of vesicles and proteins along microtubules. The outstanding characteristic of these motors is the processive locomotion. It is possible for them to move hundreds of 8 nm wide steps along microtubules without losing contact to the filament. Thereby they cover a distance of several microns. During the run, single kinesin molecules create forces up to 5 pN and reach velocities up to 2 microns per second. Many attempts have already been made to use the kinesin-microtubule system and its unique features *in vitro*.

A nanoscale transport system using kinesins and microtubules has been developed. Microtubules were immobilized to surfaces via kinesin *rigor*-mutants and served as „nanotracks“. Latex-beads or nanoparticles were then to be transported by active kinesins over these tracks. The first step was to create immobilized microtubules. We used two appendages to fix the microtubules. In the first approach we used a fusion protein combining the motor domain of the human kinesin-1 Kif5A and the fungal hydrophobin DewA from *A. nidulans*. Which is known to bind to several surfaces. This fusion protein was able to attach to surfaces used in the experiments and actively transports microtubules. Since the microtubules were intended to be used as nanotracks they had to be fixed to the protein permanently. This was achieved by insertion of a *rigor*-mutation in the motor domain of Kif5A. In a second approach, we attached kinesin motors of KinA from *A. nidulans* via a His<sub>6</sub>-tag to lipids on the surfaces. These lipids were deposited by DipPen Nanolithography. It could be shown that these kinesins also bind microtubules. Finally it is shown that microtubules are fixed by kinesins on the lipid tracks.

After finishing with building the „nanotracks“, some cargoes were transported over these tracks. First we tested a kinesin fusion protein, where the Kif5A motor is fused to the PH-domain of the fungal kinesin-3, UncA. It was shown, that this fusion protein binds to Phosphatidylserin (PS) via the PH-domain. Then we tried to transport PS covered nanoparticles over microtubule tracks. The preliminary positive results have to be repeated. In a second approach, we tested the transport of latex beads coupled to the kinesin Kif5A. These cargoes could be transported along the microtubule tracks in a motility assay.

In addition to the development of a nanoscale transport system, the Kinesin-7 protein KipA from *A. nidulans* was biochemically characterized. In this work the protein was expressed in *E. coli* and was purified afterwards. We discovered that KipA is a functional, processive kinesin that moves along microtubules. Furthermore, the ATP consumption rate and mant-ADP release experiments suggested that KipA is a dimeric protein. These scientific findings could be able to help to understand why KipA decorates the mitotic spindle and the plus-ends of growing microtubules.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung . . . . .	V
Abstract . . . . .	VI
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Bewegung ist Leben . . . . .	1
1.2 Motorproteine generieren gerichtete Bewegungen . . . . .	1
1.3 Zytoskelett . . . . .	3
1.4 Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine . . . . .	4
1.5 Kinesine . . . . .	4
1.6 Das Bewegungsmodell konventioneller Kinesine . . . . .	6
1.7 Kinesin-7 . . . . .	8
1.8 Molekulare Motoren in der Nanotechnologie . . . . .	10
1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit . . . . .	13
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>15</b>
2.1 Transportsystem im Nanomaßstab . . . . .	15
2.1.1 Immobilisierung der Mikrotubuli . . . . .	17
2.1.2 Bindung und Transport der Ladung . . . . .	24
2.1.3 Transportsystem . . . . .	29
2.2 Charakterisierung des Kinesin-7 Proteins KipA . . . . .	32
2.2.1 GFP-KipA dekoriert die Plus-Enden wachsender Mikrotubuli . . . . .	32
2.2.2 Sequenzanalyse von KipA . . . . .	33
2.2.3 Enzymatische Aktivität von KipA . . . . .	34

2.2.4	Motilität von KipA . . . . .	37
2.2.5	Bestimmung des Oligomerisierungszustands . . . . .	40
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
3.1	Verwendung von Kinesinen in Transportsystemen . . . . .	45
3.2	Charakterisierung von KipA . . . . .	53
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>57</b>
4.1	Material . . . . .	57
4.1.1	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien . . . . .	57
4.1.2	Biologisches Material . . . . .	57
4.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	65
4.2.1	RNA Extraktion . . . . .	65
4.2.2	cDNA Synthese . . . . .	65
4.2.3	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	66
4.2.4	DNA Extraktion aus Agarosegelen . . . . .	66
4.2.5	Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration . . . . .	66
4.2.6	Präparation von Plasmid-DNA . . . . .	67
4.2.7	DNA-Verdau mit Restriktionsendonucleasen . . . . .	67
4.2.8	Ligation von DNA- Fragmenten . . . . .	68
4.2.9	Präparation von SEM kompetenten Zellen . . . . .	68
4.2.10	Hitzeschock-Transformation von <i>E.coli</i> . . . . .	68
4.2.11	Polymerase Kettenreaktion (PCR) . . . . .	69
4.2.12	Herstellung von <i>Taq</i> -Polymerase . . . . .	69
4.2.13	Generierung von Punktmutationen . . . . .	70
4.3	Biochemische Methoden . . . . .	71
4.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	71
4.3.2	Färbung von SDS Gelen . . . . .	71
4.3.3	Western Blotting . . . . .	71
4.3.4	PIP-Strips™ Assay . . . . .	72

4.3.5	Membran Flotationsassay . . . . .	72
4.3.6	Expression von Kinesin-Konstrukten . . . . .	73
4.3.7	Aufreinigung der Kinesine mit His-Taq . . . . .	73
4.3.8	Aufreinigung mittels Kationen-Austauscher-Chromatographie . . . . .	76
4.3.9	Aktivitätsaufreinigung von Kinesinen . . . . .	77
4.3.10	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford . . . . .	77
4.3.11	Aufreinigung von neuronalem Tubulin aus Schweinehirn . . . . .	78
4.3.12	Herstellung Taxol-stabilisierter Mikrotubuli . . . . .	80
4.3.13	Bestimmung der Mikrotubulikonzentration . . . . .	81
4.3.14	Herstellung von Fluoreszenz-markiertem Tubulin . . . . .	81
4.3.15	Bestimmung der Ausbeute und Markierungsstöchiometrie . . . . .	83
4.3.16	Motilitäts-Test . . . . .	84
4.3.17	Transport von Latex-Kügelchen durch Kinesine . . . . .	85
4.3.18	ATPase-Test . . . . .	85
4.3.19	MantADP Freisetzung Experimente . . . . .	88
4.3.20	Herstellung von G25 Spin Säulen . . . . .	90
4.3.21	Beschichtung der Glasoberflächen mit Silanen . . . . .	90
4.3.22	Kontaktwinkelmessung . . . . .	90
4.4	Mikrobiologische Methoden . . . . .	92
4.4.1	Mikroskopie von <i>A. nidulans</i> . . . . .	92
4.4.2	Dip-Pen Nanolithographie . . . . .	92
	<b>Literatur</b>	<b>95</b>
	<b>5 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>117</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>118</b>
	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>119</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Bewegung ist Leben

Das Diktum gilt als eine der ältesten und anschaulichsten Definitionen des Lebendigen:

„Das Leben besteht in der Bewegung“ (Aristoteles).

Ob bei einem ganzen Organismus oder bei Transportprozessen innerhalb einer einzelnen Zelle, gerichtete Bewegungen spielen in allen Bereichen des Lebens eine wichtige Rolle. Wo immer sich etwas anscheinend von alleine regt und rührt, jeder Schritt, jeder Atemzug, selbst jeder Wadenkrampf ist ein sicheres Zeichen unserer Vitalität. Nicht nur dass Bewegungen in allen Größenordnungen vorkommen, sie spielen auch bei einer Vielzahl verschiedenster Prozesse eine wichtige Rolle: bei der Aufnahme und dem Transport von Nährstoffen in Vesikeln genauso wie bei der Auftrennung der Schwesterchromatiden und der Zellteilung. Weiterhin beispielsweise bei der amoeboiden Bewegung von Einzellern und Makrophagen sowie bei der koordinierten Bewegung von Millionen Myosinmolekülen eines Muskels, die nötig sind, um diesem Text mit den Augen zu folgen oder Fahrrad zu fahren (Abb. 1.1).

## 1.2 Motorproteine generieren gerichtete Bewegungen

In allen Organismen übernimmt die gerichtete Bewegung wichtige Aufgaben. Sie wird durch sogenannte Motorproteine erzeugt, die den Stofftransport erheblich erleichtern. Ohne sie würde der Transport entlang eines 1 m langen Neurons durch passive Diffusion ungefähr 1000 Jahre dauern, während Kinesine diese Strecke innerhalb einer Woche überwinden (Howard, 2001). Dabei wandeln Motorproteine die Bindungsenergie, die bei der Hydrolyse von ATP zu

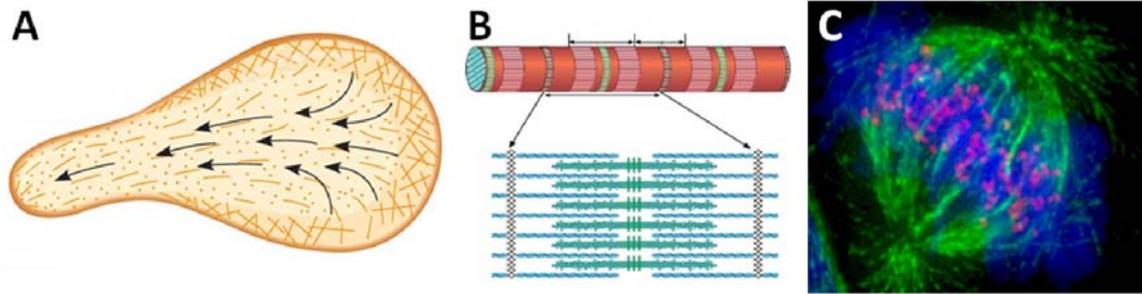


Abb. 1.1: **Bewegung in lebenden Systemen.** A) Amöboide Bewegung hervorgerufen durch Kontraktion und Verschiebung von Aktinomyosin; B) Schematischer Aufbau eines Muskelbündels aus Aktin und Myosin (Heinrich et al., 2006); C) HeLa-Zellen bei der Trennung der Schwesterchromatiden (Mitosespindel (grün), Chromosomen (blau), Kinetochor (rot)) (Stolz et al., 2010).

ADP frei wird, direkt in mechanische Arbeit um. ATP ist ein energiereiches Nukleotid und der universelle Energieträger in der Zelle (physiologische Energieausbeute der ATP-Hydrolyse: ca.  $\Delta G' = -50 \text{ kJ/mol ATP}$  (Koolman and Röhm, 1994)). Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der Kinesin-1 Familie pro Schritt ein ATP Molekül verbrauchen und dabei ungefähr  $40 \cdot 10^{-21}$  Arbeit verrichten. Der daraus berechnete Wirkungsgrad der molekularen Maschinen ist mit über 50 % sehr hoch und jedem von Menschenhand gebauten Motor (maximaler Wirkungsgrad 35 %) überlegen. Bei  $F_0F_1$ -ATPasen liegt der Wirkungsgrad sogar zwischen 80 % und 100 % (Soong et al., 2000). Ein Grund dafür ist, dass diese Proteine die Energie direkt umwandeln ohne dass dabei, wie es z. B. bei den Verbrennungsmotoren der Fall ist, der Prozess über Zwischenstufen abläuft (Howard, 2001). Diese Art von Proteinen wird in zwei Hauptgruppen unterteilt: die Rotationsmotoren und die linearen Motoren.

Rotationsmotoren sind in Membranen von Zellen und Organellen verankert. Das bekannteste Beispiel eines Rotationsmotors ist die Basis der prokaryotischen Flagelle, die dem Organismus Vorschub gibt und ihn somit zur Bewegung befähigt. Dabei wird durch ATP-Hydrolyse der Flagellenmotor in Drehung versetzt. Das Funktionsprinzip kann auch umgekehrt werden. Bei der  $F_0F_1$ -ATPase der Mitochondrien, die als ATP-Hauptlieferant in der Zelle fungiert, wird die Energie eines Ionengradienten dazu verwendet, um am  $F_0$ -Teil ATP aus ADP zu regenerieren (Masaike et al., 2002; Noji et al., 1997; Kinosita et al., 1998). Im Gegensatz dazu bewegen sich lineare Motoren, indem sie Kräfte auf Proteinfilamente des Zytoskeletts

ausüben und sich so vorwärts ziehen (Vale, 2003). Prokaryoten exprimieren homologe Proteinketten, die die Aufgaben des Zytoskelettes übernehmen (Møller-Jensen et al., 2002; van den Ent et al., 1999). Genau genommen müssen auch Helikasen, die DNA-Stränge entwinden, wie RNA- und DNA-Polymerasen und Ribosome zu den linearen Motoren gezählt werden (Lohman et al., 1998). Sieht man davon ab, dass diese Proteine Arbeit verrichten, und fokussiert man, dass sie keine gerichtete Bewegung erzeugen, liegt der Schluss nahe, sie besser nur als Maschinen zu titulieren. Im nächsten Abschnitt wird das Zytoskelett, das als Widerlager zur Fortbewegung der linearen Motoren benutzt wird, etwas genauer beschrieben.

### 1.3 Zytoskelett

Das eukaryotische Zytoskelett ist ein sehr dynamisches und komplexes Netzwerk aus Proteinketten. Neben den drei Hauptbestandteilen (Mikrotubuli, Aktinfilamente und Intermediärfilamente) sind noch eine Vielzahl von Hilfsproteinen an der Steuerung der Aktivität des Zytoskelettes beteiligt (Vale, 2001). Mikrotubuli und Aktinfilamente sind polare Strukturen. Mikrotubuli besitzen ein Plus-Ende und ein Minus-Ende. Analog werden sie bei Aktinfilamenten „*barbed end*“ und „*pointed end*“ genannt. Der Teil mit der größeren Dynamik und Wachstumsgeschwindigkeit ist als Plus-Ende, bzw. „*barbed end*“, definiert. Der Arp2/3-Komplex (*actin-related protein 2/3*) und Formine sind hoch konservierte Faktoren, die für die Bildung von Aktinfilamenten wichtig sind (Pollard, 2007). Mikrotubuli sind an MTOCs (microtubule organising center) in der Nähe des Nukleus verankert und wachsen immer in Richtung des Zellkortex, weshalb sie sich hervorragend für den Langstreckentransport eignen. Die Stoffverteilung an der Zellperipherie übernimmt dann das Akto-Myosin Netzwerk. Die molekularen Motorproteine können als eine Gruppe von Hilfsproteinen bezeichnet werden (Vale, 2001). Bisher sind über 100 verschiedene Motorproteine des Mikrotubuli- und Aktin-Netzwerks charakterisiert, jedoch ist bisher kein linearer Motor des Intermediärfilamentnetzwerks bekannt (Miki et al., 2003; Vale and Milligan, 2000; Vale, 2003). Diese drei Filamentfamilien arbeiten zusammen und koordinieren im Wesentlichen den Stofftransport der Zelle. Die Superfamilie der Myosine bindet an das Aktinnetzwerk, während Dyneine und Kinesine mit Mikrotubuli zusammenarbeiten.

## 1.4 Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine

Der erste Vertreter der Superfamilie der Dyneine wurde in den 1960er Jahren in Cilien des Protozoen *Tetrahymena thermophila* entdeckt (Gibbons and Rowe, 1965). Im Allgemeinen werden Dyneine als Minus-End-gerichtete Motorproteine bezeichnet, die am retrograden Transport beteiligt sind. Als zweite Superfamilie der Mikrotubuli-assoziierten Motorproteine sind die Kinesine zu betrachten (Vallee and Shpetner, 1990). Diese sind im Vergleich zu Dynein sehr einfach aufgebaut und bestehen aus wenigen Untereinheiten (Vale, 2001). In den nächsten Abschnitten werden der Aufbau und die Funktionsweise der Kinesine separat beschrieben.

## 1.5 Kinesine

Die in der Superfamilie der Kinesine zusammengefassten Proteine sind allgegenwärtig und in allen eukaryotischen Zellen zu finden. Sie sind in viele Zellprozesse wie Vesikel- und Organellentransport, Auftrennung der Chromosomen und Signaltransduktion integriert. Als erstes Mitglied dieser Familie wurde das Kinesin-1 (konventionelles Kinesin) aus den Neuronen eines Tintenfisches untersucht (Vale et al., 1985). Bis heute sind mehr als 150 Kinesine identifiziert. Als strukturelle Gemeinsamkeit besitzen alle Kinesine eine Motordomäne, die die Mikrotubuli-Bindestelle enthält und für die Hydrolyse von ATP, und somit für die Bewegung des Kinesins, verantwortlich ist. Man kann die Kinesine nach der Lage der Motordomäne in drei große Gruppen unterteilen: N-terminal, zentral und C-terminal. Dabei ist die Lage des Motors verantwortlich für die Bewegungsrichtung des Kinesins auf den Mikrotubuli. Die am häufigsten vorkommenden Kinesine mit N-terminalem Motor bewegen sich auf Mikrotubuli in Richtung Plus-Ende (Endow, 1999; Woehlke and Schliwa, 2000; Vale, 2001). Es gibt aber auch wenige Ausnahmen. Die Kinesine der Gruppe 14, bei denen der Motor am C-terminalen Ende liegt, bewegen sich auf Mikrotubuli zum Minus-Ende. Bei zentraler Motorlage binden die Proteine an Mikrotubuli und wirken als Depolymerase. Nach Lawrence *et al* wurden die Nomenklatur der Kinesingruppen 2004 erneuert und in 14 Gruppen eingeteilt.

Die Kinesin-1-Proteine (früher: konventionelle Kinesine) ist die am besten untersuchte und verstandene Gruppe der Kinesine (Abb. 1.2). Kinesin-1 sind tetramere Proteine, die aus zwei

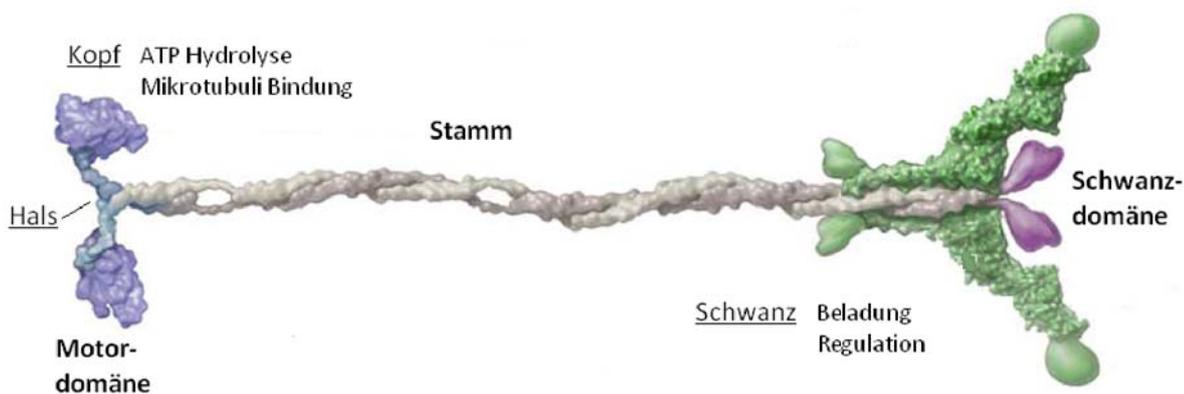


Abb. 1.2: Schematische Zeichnung eines Kinesin-1 Moleküls mit „schweren“ (grau) und „leichten“ (grün) Ketten. Man erkennt die katalytischen Motordomänen (blau), die Halsregion (hellblau) und die an der Ladungsbindung beteiligten Schwanzregion (violett) (verändert nach Vale (2003)).

gleichen, „schweren“ (100 - 120 kDa) und zwei „leichten“ (55 - 65 kDa) Ketten bestehen (Bloom et al., 1988; Scholey et al., 1989). Jede „schwere“ Kette besteht aus einer N-terminalen, globulären Motordomäne (Kopf), die die Bindestellen für Mikrotubuli enthält und Ort der ATPase-Aktivität ist. Diese ist über eine kurze Peptidsequenz („*neck-linker*“, ca. 15 AA) mit der „Hals“-Region verbunden (Kozielski et al., 1997). Die „schweren“ Ketten des Kinesin-1 bilden hier einen *coiled-coil*, über den sie dimerisieren (de Cuevas et al., 1992; Tripet et al., 1997). Weiter in Richtung C-Terminus der „schweren“ Ketten befindet sich eine bewegliche Region (Gelenkregion), ein „Stamm“ und ein globulärer „Schwanz“ (Yang et al., 1989). Der Stamm enthält zwei weitere *coiled-coils*, die durch flexible Bereiche unterbrochen sind. Diese flexiblen Bereiche dienen der Autoinhibition, bei der der globuläre Schwanz in Richtung der Kopfregion geklappt wird und dort bindet. In diesem Zustand befindet sich das Kinesin wenn es nicht beladen ist. Da unbeladene Kinesine nicht über die Mikrotubuli laufen, spart der Organismus somit ATP. Die „leichten“ Ketten binden am Schwanz und unterstützen die Bindung der Ladung an das Kinesin (Hackney, 1992; Hirokawa et al., 1989; Jiang and Sheetz, 1995; Verhey and Rapoport, 2001). Eine der wichtigsten Eigenschaften von Kinesinen ist die Fähigkeit sich prozessiv fortzubewegen und dabei große Strecken zurückzulegen.

## 1.6 Das Bewegungsmodell konventioneller Kinesine

Konventionelle Kinesine sind Dimere, die sich prozessiv bewegen. Dies bedeutet, dass sie mehrere Schritte machen können, ohne sich dabei vom Mikrotubulus zu lösen. Zur Veranschaulichung hat man sich auf das sogenannte asymmetrische „*hand-over-hand*“-Modell geeinigt, das in Abbildung 1.3 graphisch dargestellt ist (Asbury et al., 2003). Zunächst stand ein zweites Modell, das „*inchworm*“-Modell, zur Debatte, wurde aber aufgrund mehrerer Untersuchungen verworfen (Asbury et al., 2003; Yildiz et al., 2004).

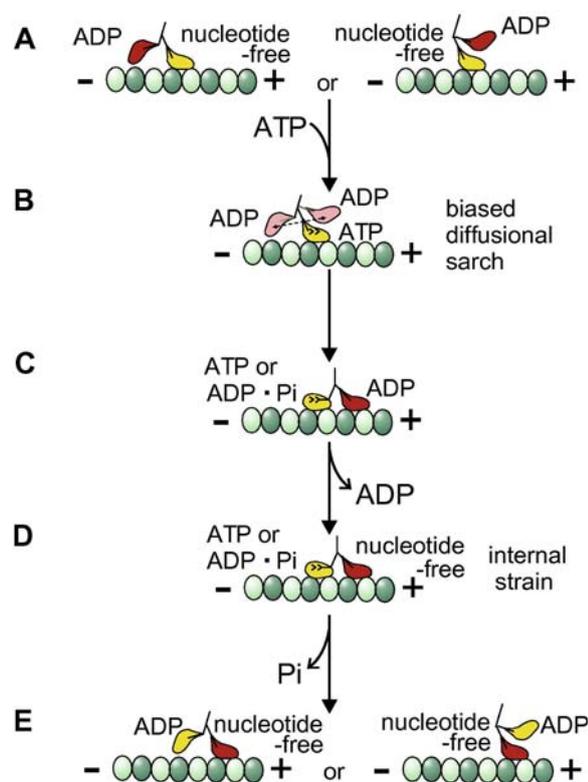


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des „*hand-over-hand*“-Bewegungsmodells konventioneller Kinesine (Kawaguchi and Ishiwata, 2001). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulinuntereinheiten sind als Kugeln dargestellt; weitere Erklärungen im Text.

Im „*hand-over-hand*“-Modell wird der Reaktionsablauf eines Kinesins wie folgt beschrieben: Freies Kinesin trägt in jedem seiner Köpfe ADP gebunden. Kommt es zum Kontakt eines Kopfes mit Mikrotubuli, bindet dieser an den Mikrotubulus und gibt sein gebundenes ADP

frei, wodurch es zu einer festen Bindung kommt (Arnal and Wade, 1998). Der zweite Kopf bleibt frei beweglich, wesshalb Berührungen zwischen dem zweiten Kopf und dem Mikrotubulus stattfinden können, jedoch kommt es nicht zu einer festen Bindung (A) (Thormählen et al., 1998). Aus der ATP Aufnahme am gebundenen Kopf resultiert eine Konformationsänderung am „*neck-linker*“ wodurch es dem ungebundenen Kopf ermöglicht wird, in Laufrichtung an das gleiche Protofilament zu binden (B) (Ray et al., 1993; Rice et al., 1999). Wenn dieser gebunden hat, kommt es ebenfalls zur Freigabe von ADP. Eine interne Spannung verhindert, dass ATP an den vorderen Kopf bindet (C + D) (Hoenger et al., 2000). Erst nach Hydrolyse des ATPs und Freigabe des Phosphats am hinteren Kopf verschwindet diese Spannung und der vordere Kopf kann ATP aufnehmen (E) (Hackney, 1994a). Das System ist nun wieder in seiner Ausgangslage (A) abgesehen davon, dass sich das Kinesin um einen 8 nm Schritt in Laufrichtung auf dem Mikrotubulus bewegt hat (Vale and Milligan, 2000; Mandelkow and Johnson, 1998).

Aufgrund dieser Arbeitsweise ist es dem Kinesin möglich, prozessiv über das Mikrotubuligerüst der Zelle zu laufen. Es durchläuft Hunderte dieser Zyklen und bewegt sich so mehrere  $\mu\text{m}$  ohne den Kontakt zum Mikrotubulus zu verlieren (Gilbert et al., 1995; Hackney, 1994b; Ma and Taylor, 1997a). In einem Motilitäts-Test wurde zum ersten Mal gezeigt, dass sich Mikrotubuli auch auf einzelnen Kinesindimeren bewegen können und, dass ein einzelner Dimer eine Latexkugel über Mikrotubuli ziehen kann. Die schrittweise Fortbewegung einzelner Kinesine wurde mittels einer in einem Laser festgehaltenen, mit Kinesinen beschichteten Latexkugel gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Kinesinmolekül bei jedem 8 nm Schritt eine Kraft von mehr als 5 pN erzeugen kann (Howard, 1996).

Im Gegensatz zu den dimeren, konventionellen Kinesinen beruht die Bewegung von monomeren Kinesinen wie dem humanen KIF1A auf Diffusion. Der durch ATP Bindung verursachte Kraftschlag bevorzugt eher die Diffusion zum Plus-Ende des Mikrotubulus als zum Minus-Ende. Elektrostatische Interaktionen zwischen dem *K-loop* von KIF1A und dem *E-hook* des Mikrotubulus unterstützten diese gerichtete Diffusion, ohne dass sich dabei das Kinesin vollständig vom Mikrotubulus löst (Okada and Hirokawa, 2000; Okada et al., 2003).

## 1.7 Kinesin-7

Die Mitglieder der früher als CENP-E (centromer binding protein - E) bekannten Gruppe der Kinesin-7 findet man in Organismen vieler Familien, von Amöben über Pilze bis hin zu den Vertebraten (Schoch et al., 2003; Weaver et al., 2003). *In vivo*-Studien haben gezeigt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Anordnung und Auftrennung der Chromosomen spielen (Brown et al., 1996; Antonio, 2000). Dabei lokalisieren sie im Kinetochor, einem Multiproteinkomplex, der sich am Zentromer der Chromosomen bildet (Cleveland et al., 2003; Cheeseman et al., 2004). Vergleicht man die Kinesin-7 verschiedener Organismen, finden sich teils erhebliche strukturelle und funktionelle Unterschiede. *Xenopus leavis* CENP-E zeigt eine Plus-end-gerichtete Motoraktivität, während zwei weitere Kinesin-7 aus höheren Eukaryoten keine oder Minus-end-gerichtete Aktivität zeigen (Thrower et al., 1995; Wood et al., 1997). So sind die Kinesin-7 der Vertebraten mit ungefähr 300 kDa erheblich größer als die der Pilze (Abb. 1.4).

Beim menschlichen Kinesin-7 (CENP-E) konnte die Regulation durch Phosphorylierung gezeigt werden (Kim et al., 2010). Die Schwanzdomäne beim unphosphorylierten Protein bindet an die Kopfdomäne und inhibiert so die Aktivität des Kinesins. Die Phosphorylierung der

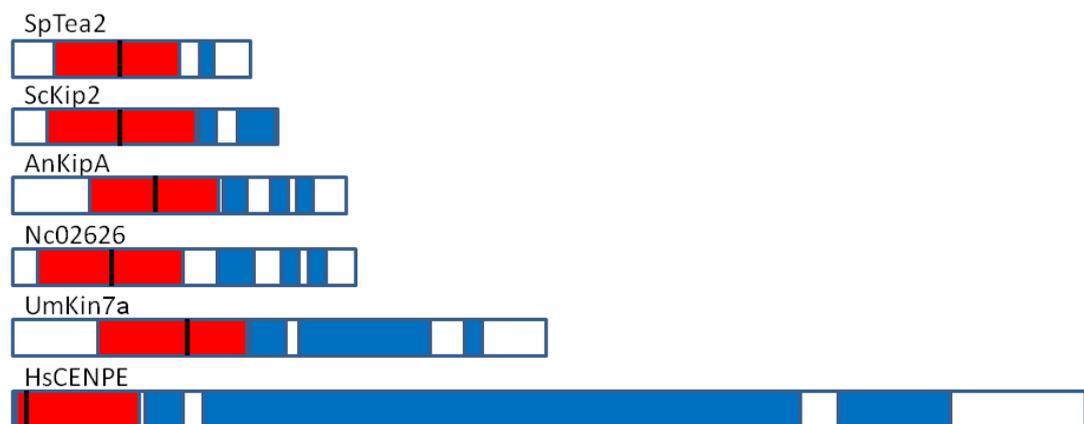


Abb. 1.4: Vergleich von Kinesin-7 aus verschiedenen Organismen mit den wichtigsten Merkmalen. (Rote Balken: Motordomäne; blaue Balken: Coils; schwarzer Strich: ATP Bindestelle): *S. pombe* Tea2 (NM001022541.1): 70 kDa; *S. cerevisiae* Kip2 (Z73511.1): 78,3 kDa; *A. nidulans* KipA (AJ622826.1): 97,6 kDa; *N.crassa* (AABX02000006.1): 101 kDa; *U.maydis* Kin7a (U92844.1): 156,9 kDa; *H.sapiens* CENP-E (NM001813.2): 316,4 kDa.

Schwanzdomäne durch MSP1 (monopolar spindle protein 1) oder CDK1-cyclinB führt hier zur Entfaltung und somit Aktivierung. Das Protein MSP1 ist Teil der Ladung des CENP-E, während CDK-cyclinB nur in der Mitose aktiv ist (Espeut et al., 2008; Brown et al., 1994). Durch koordinierte Phosphorylierung der beiden Kinasen kann die Aktivierung genau gesteuert werden. Zusätzlich gibt es eine weitere Stelle, an der das Kinesin-7 phosphoryliert wird. Bei HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Kinasen Aurora A und B ein stark konserviertes Threonin phosphorylieren. Die phosphorylierten CENP-E reichern sich an den Spindelapparaten an und verdrängen die dort gebundene Protein-Phosphatase-1 (PP1), während sie eine verringerte Spezifität für einzelne Mikrotubuli besitzen. Dieser Zustand ist wichtig, um die Chromosomen im Zellmittelpunkt aufzureihen. Nach erfolgter Ausrichtung bindet das durch PP1 dephosphorylierte CENP-E fest an die Mikrotubuli und stabilisiert die Kinetochor-Mikrotubuli Interaktion (Kim et al., 2010; Liu et al., 2007; Sampath et al., 2004; Tulu et al., 2006; Lan et al., 2004). Die Funktion des Kinesin-7 wird aber nicht nur durch Phosphorylierung reguliert, sondern auch durch oszillierende Proteinlevel gesteuert (Funabiki, 2000; Mayr et al., 2007; Levesque and Compton, 2001). Bei *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass bei  $\Delta$ Kip2p-Mutanten die Anzahl der zytoplasmatischen Mikrotubuli verringert ist, während eine Überexpression zu längeren Mikrotubuli führt (Hunter and Wordeman, 2000). Es wurde gezeigt, dass Kip2p das CLIP-170-Homolog Bik1p zum Plus-Ende der Mikrotubuli transportiert, wo dieses die Filamente stabilisiert (Carvalho et al., 2004; Wolyniak et al., 2006). Außerdem verankert Bik1p den möglichen Dynein-Aktivator Pac1p am Plus-Ende. In *A. nidulans* wird der Transport von Dynein zum Plus-Ende der Mikrotubuli durch das Kinesin-1 KinA vermittelt (Zhang et al., 2010; Sheeman et al., 2003; Lee et al., 2003). Das *S. pombe* Kinesin-7 Tea2 transportiert Tea1 und das CLIP-170 Homolog Tip1p zum Mikrotubuli Plus-Ende. Tip1p und Mal3 verlängern die Mikrotubuli ständig. Dies ist zur Ausbildung der Polarität der Zelle notwendig (Abb. 1.5) (Browning et al., 2003; Busch and Brunner, 2004; Busch et al., 2004; Brunner, 2000).

Im Gegensatz zu den Hefen übernimmt das Kinesin-7 KipA bei *A. nidulans* andere Aufgaben (Lenz et al., 2006). Es ist nicht verantwortlich für die Positionierung des CLIP-170 Homolog CLIPA.  $\Delta$ KipA-Mutanten zeigen eine Störung in der Wachstumsrichtung und ein kurvig Wachstum auf (Konzack et al., 2005). Bei *U. maydis*, der zwei Kinesin-7 Mitglieder (Kip7a

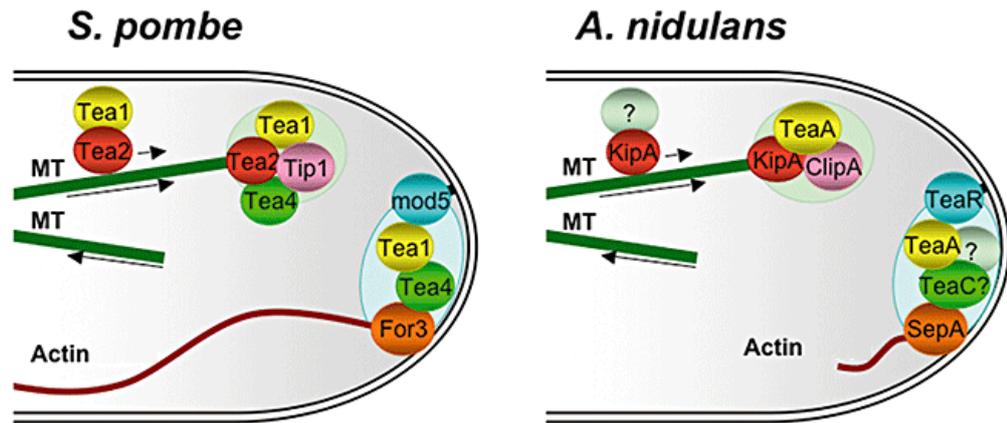


Abb. 1.5: **Transport und Positionierung von Zellendmarkern in *S. pombe* und *A. nidulans*.** In *S. pombe* wird Tea1 von Tea2 an die Spitze der Mikrotubuli transportiert und akkumuliert dort. Tip1 verlängert die Mikrotubuli bis sie den Zellkortex erreichen wo es für die Ausbildung der Zellpolarität wichtig ist. In *A. nidulans* hat es eine ähnliche Funktion, mit dem Unterschied, dass TeaA anscheinend nicht durch KipA transportiert wird, da es auch in  $\Delta kipA$  Umgebung im Spitzenkörper lokalisiert. Homologe sind gleich eingefärbt; weitere Informationen im Text. (Verändert nach Fischer et al. (2008))

und Kip7b) besitzt, zeigen weder Einzel- noch Doppelmutanten Störungen in Hyphenwachstum oder Zellpolarität (Schuchardt et al., 2005).

## 1.8 Molekulare Motoren in der Nanotechnologie

Der hohe Wirkungsgrad ist nur eines der Merkmale, die molekulare Motoren für die Nanotechnologie interessant machen. Ein weiterer Vorteil in der Anwendung ist ihre geringe Größe, sodass viele Motoren auf kleinstem Raum arbeiten können. Außerdem sind sie durch Expression in Bakterien einfach und kostengünstig herzustellen und können mit einer Vielzahl biochemischer Werkzeuge an eine bestimmte Aufgabe angepasst werden (Diez et al., 2004).

So wurde ein Aktinfilament an den Propeller einer  $F_0F_1$ -ATPase über Biotin-Streptavidin-Bindung gekoppelt. Anschließend konnte der so aufgebaute Rotationsmotor durch 2 mM ATP gestartet und durch Natriumazid wieder gestoppt werden. Dabei entwickelt der  $8 \cdot 14$  nm große, molekulare Motor ein Drehmoment von bis zu 100 pN·nm (Soong et al., 2000). Als Energielieferanten könnten Polymervesikel dienen, die Bakteriorhodopsin, einer, durch Licht

induzierbaren Protonenpumpe, und eine  $F_0F_1$ -ATP-Synthase enthalten (Choi and Montemagno, 2005) (Abb. 1.6). In Zukunft könnte dieser Aufbau als Antrieb für Nanoroboter verwendet werden.

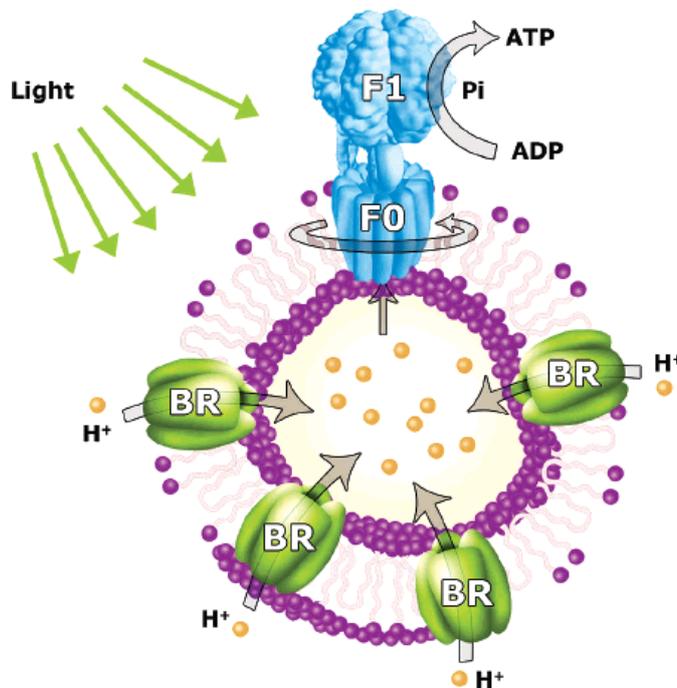


Abb. 1.6: **Schema eines ATP-Lieferanten aus Licht.** Bakteriorhodopsin pumpt durch Lichteinfluss Protonen in das Vesikel. Der dadurch entstandene Gradient nutzt die  $F_0F_1$ -ATP Synthase zur ATP Herstellung. Es könnte als treibende Kraft für Motorproteine dienen. (Verändert nach Choi and Montemagno (2005))

Auch Kinesine können außerhalb der Zelle verwendet und untersucht werden. Dafür heftet man die Motoren an eine Oberfläche, worüber die Mikrotubuli hinweggleiten können. Dieses als Motilitäts-Test bekannte Experiment gibt Aufschluss über die Direktionalität, Geschwindigkeit und Kraft der Proteine (Chandra et al., 1993). Das ganze Experiment lässt sich auch umgekehrt aufbauen, sodass die Kinesine über die Mikrotubuli laufen. Hiermit gewinnt man Informationen über einzelne Kinesinmoleküle, kann diese genau verfolgen und die Laufdauer bestimmen.

Die selektive Bindung der Mikrotubuli an Oberflächen über Kinesine kann durch Einsatz von PNIPAM (poly(N-isopropylacrylamide)) gesteuert werden. Dieses Polymer zieht sich bei Er-

höhung der Temperatur von 27 °C auf 35 °C zusammen und ermöglicht so erst die Kinesin-Mikrotubuli-Bindung (Ionov et al., 2006). Man kann den Lauf von Mikrotubuli in einem Motilitäts-Test mit verschiedenen Ansätzen in Raum und Zeit kontrollieren. Räumliche Kontrolle wird durch topografische und chemische Veränderung der Oberfläche erreicht (Clemmens et al., 2003; Hess et al., 2002; Dennis et al., 1999). Ein weiteres, zu lösendes Problem in der Anwendung von Kinesinen ist die Kontrolle der Laufrichtung der Mikrotubuli. Die Orientierung der auf der Oberfläche gebundenen Kinesine ist nicht festgelegt, da die Kopffregion durch den flexiblen Stamm sehr beweglich ist. Hier müssen durch aufwendige Topographien die Filamente in eine Richtung gelenkt werden. Eine weitere Möglichkeit, die Mikrotubuli zu lenken, ist die Ablenkung durch hydrodynamischen Fluss oder elektrische Felder (Stracke et al., 2000, 2002; van den Heuvel et al., 2006).

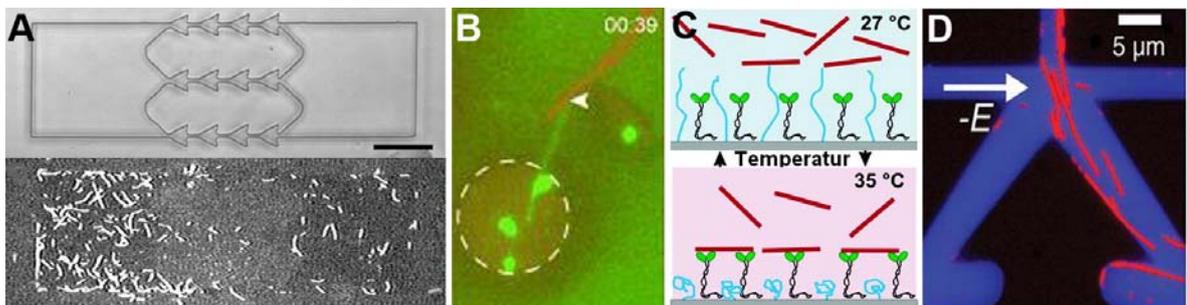


Abb. 1.7: **Transport mittels molekularer Motoren.** A) Topographie in Pfeilform führt zu Anreicherung auf der linken Seite, bei Gleichverteilung am Anfang des Laufs (Hiratsuka et al., 2001). B) Auseinanderziehen von an Mikrotubuli gebundene DNA durch Kinesine (Dinu et al., 2006). C) Ein thermosensitives Polymer (PNIPAM) kann verwendet werden, um den Mikrotubulitransport an- oder abzuschalten (Ionov et al., 2006). D) Lenkung von Mikrotubuli durch Anlegen eines elektrischen Feldes (van den Heuvel et al., 2006).

Der Effekt hierbei beruht auf der negativen Nettoladung, die an Mikrotubuli und Aktinfilamenten in einem inhomogenen, elektrischen Feld (Dielektrophorese) induziert wird (Asokan et al., 2003). Durch Verwendung verschieden modifizierter ATP-Moleküle kann man den Lauf der Mikrotubuli starten oder stoppen. Photosensitives caged-ATP kann erst biologisch aktiv werden, wenn durch UV-Bestrahlung ATP freigesetzt wird (Hess et al., 2001).

Das nicht hydrolysierbare ATP-Homolog AMP-PNP kann die Arbeit der Kinesine stoppen. Es kann anschließend durch Zugabe hoher ATP-Konzentrationen wieder von der ATP-Bindestelle

verdrängt werden. Des Weiteren kann man Tubulin modifizieren und es wurde gezeigt, dass sich Moleküle daran koppeln und transportieren lassen (Hess et al., 2001; Diez et al., 2003). In Zukunft können molekulare Motoren entlang vorbestimmter Strecken auf Oberflächen laufen. Eine Möglichkeit könnte der Transport von Stoffen, wie DNA oder Proteine, aus einem Reservoir in eine Reaktionskammer sein, in der die Analyse in einem abgeschlossenen Raum im Nanomaßstab stattfinden kann.

## 1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit

Kinesine sind ein Forschungsgebiet, das immer mehr an Wichtigkeit gewinnt. Fehlerhafte Proteine können zu diversen Krankheiten wie z. B. Chorea Huntington führen, bei denen meistens der Stofftransport in einer Zelle betroffen ist (Colin et al., 2008). Da Kinesin-7 Proteine wichtig zur Aufreihung der Chromosomen sind und sie die „Check“-Punkte während der Mitose steuern, werden diese Proteine als Ansatzpunkt zur Bekämpfung schnell wachsender Tumorzellen untersucht (Mao et al., 2003). Die Analyse dieser Proteine, sei es im Menschen oder in anderen Organismen ist wichtig um zu verstehen, wie Kinesine funktionieren. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Konstrukte des Kinesine-7 KipA aus *Aspergillus nidulans* bakteriell in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Anschließend wurden diese biochemisch charakterisiert, ihre Motilität und der ATP-Umsatz gemessen. Vergleichbare Untersuchungen wurden schon bei humanen Kinesin-7 durchgeführt, die sich jedoch strukturell wesentlich von pilzlichen Kinesin-7-Proteinen unterscheiden.

Besonders wichtig sind die Anwendungen dieser Nanomotoren. Aufgrund ihrer einmaligen Eigenschaften könnten Kinesine in Zukunft bei *lap-on-a-chip* zur Anwendung kommen, wozu verschiedene chimäre Konstrukte hergestellt wurden. Einerseits um die Kinesine auf Oberflächen zu heften, wurde ein Kinesin-Hydrophobin Fusionsprotein hergestellt. Hydrophobine sind kleine, amphiphile Proteine, die auf Oberflächen eine Einzelschicht bilden. Es ist bekannt, dass Hydrophobine sehr gut und dauerhaft auf nahezu allen Oberflächen haften (Wösten, 2001). Andererseits wurde an die Motordomäne des Kinesins eine PH-Domäne fusioniert, um den Transport von bestimmten Lipidvesikeln zu ermöglichen. Diese Vesikel könnten als

Transporthülle für diverse Stoffe dienen, wie sie in ähnlicher Form vielfach in der Zelle vorkommen.

In Zukunft könnte ein solches Transportsystem für den vielseitigen Stofftransport bei „*lab-on-a-chip*“-Anwendungen verwendet werden. So könnten mit Antikörpern gekoppelte Kinesine eine gewünschte Substanz aus einer Stoffmischung herausfangen und diese zum Nachweis in einen separaten Reaktionsraum transportieren.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Transportsystem im Nanomaßstab

Die herausragenden Eigenschaften der molekularen Motoren wurden schon kurz nach ihrer Entdeckung durch Vale et al. (1985) untersucht. Yang et al. (1989) versuchten als Erste die Proteine bei *in vitro* Anwendungen einzusetzen. Bakteriell exprimierte Kinesine wurden bevorzugt verwendet, da sie viel einfacher aufgebaut sind als die hochmolekularen Dynein-Komplexe. Bisher wurden diese Motoren *in vitro* eingesetzt, indem sie durch diverse Methoden auf Oberflächen fixiert und Mikrotubuli darüber transportiert wurden. Die bewegten Filamente wurden dabei mit verschiedenen Ladungen bestückt und dienten so als Lastenträger (Brunner et al., 2007).

In dieser Arbeit soll ein *in vitro* Transportsystem entwickelt werden, das aus den Kinesin-Mikrotubuli-Komplexen besteht, aber eher die natürliche Situation des Transports in der Zelle nachstellt. Dabei sollen die Mikrotubuli als Transportwege dienen, über die Kinesin-beladene Vesikel transportiert werden.

Als Vorbild dieses Transportsystems dient der Langstreckentransport, wie er in jeder eukaryontischen Zelle stattfindet. Dabei werden Lasten durch Kinesine auf dem Mikrotubuliskelett über weite Strecken transportiert. Ein Beispiel hierfür findet man in Pilzen, bei denen Stoffe über mehrere  $\mu\text{m}$  transportiert zur Hyphenspitze, dem Ort des größten Wachstums, werden müssen (Schuchardt et al., 2005). Bei bisherigen *in vitro*-Experimenten wurden die Mikrotubuli mit  $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern auf einem Untergrund fixiert und konnten dann als „Straßen“ eingesetzt werden (Varga et al., 2009). Auch die Fixierung durch Kinesinkonstrukte ist möglich, die über bestimmte Domänen auf der Oberfläche fixiert sind. Zusätzlich wurde in der

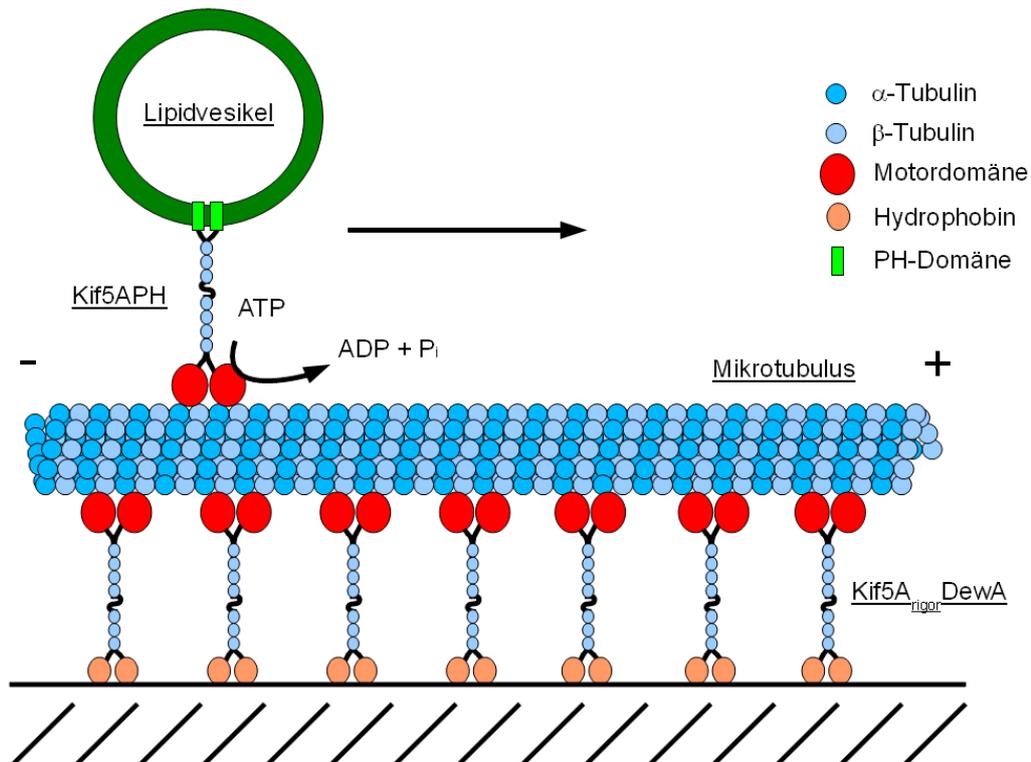


Abb. 2.1: **Modell eines Transportsystems aus Bestandteilen einer Zelle.** Dabei werden *rigor*-Mutantanten der Motordomäne des humanen Kinesins Kif5A über daran fusionierte, pilzliche Hydrophobine (DewA) auf Oberflächen geheftet (Kif5A<sub>rigor</sub>DewA). Die Fusionsproteine halten Mikrotubuli selbst bei einem Überschuss an ATP fest. Über die fixierten Mikrotubuli transportieren Fusionsproteine aus der Motordomäne des Kif5A und einer *pleckstrin homology* (PH)-Domäne die daran gebundenen Lipidvesikel.

ATP-Bindestelle der Kinesine eine *rigor*-Mutation eingefügt, die die ATP-Hydrolyse verhindert und es so zu einer festen Kinesin-Mikrotubuli-Bindung kommt (Nakata and Hirokawa, 1995). Über diese „Straßen“ sollen nun Vesikel transportiert werden. Dieser Transport wird durch aktive Kinesine vermittelt, an deren C-Terminus das Lipidvesikel gebunden ist (Abb. 2.1).

Für den Aufbau dieses Transportsystems waren mehrere Schritte notwendig: Zuerst mussten Mikrotubuli fixiert werden. Dafür wurden Ansätze mit unterschiedlichen *rigor*-Kinesin-Konstrukten gewählt. Durch die Fusionierung der Motordomäne des Kinesins Kif5A mit dem pilzlichen Hydrophobin DewA, das auf diversen Oberflächen haftet (Wösten, 2001). Anderer-

seits wurden die Motordomänen der Kinesin-*rigor*-Mutanten über ihren Polyhistidin-Tag mit Lipiden auf der Oberfläche chelatiert, die ein Ni-Ion in der Kopfgruppe tragen (Sekula et al., 2008).

Um Lasten über die so immobilisierten Mikrotubuli zu transportieren ist eine Verbindung zwischen Kinesin und Ladung notwendig. Dies wurde zum einen durch Verwendung eines Proteins verwirklicht, das direkt auf der Oberfläche eines Latexkügelchens haftet (Kif5A). Zum anderen wurde der Kinesinmotor mit einer PH-Domäne, einer Membranbindedomäne, fusioniert (Kif5APH). Dieses Fusionsprotein konnte an lipidbeschichtete Nanopartikel binden.

### 2.1.1 Immobilisierung der Mikrotubuli

Zur Entwicklung eines Transportsystems im Nanomaßstab wurde zuerst das Fusionsprotein aus der Motordomäne des Kif5A und aus dem Hydrophobin DewA (Kif5A<sub>rigor</sub>DewA), zur Immobilisierung der Mikrotubuli hergestellt. Als Basis für die Klonierung der Konstrukte diente ein Plasmid, das freundlicherweise von Günther Woehlke von der LMU München zur Verfügung gestellt wurde (Ebbing et al., 2008). In *E. coli* exprimiert dieses Plasmid ein Fusionsprotein aus der Motordomäne des humanem Kif5A und der C-terminalen Schwanzdomäne des Kif5B (Kif5A). Mit Hilfe phosphorylierter Primer wurde die Schwanzdomäne deletiert, um die Motordomäne alleine zu erhalten (Kif5A-tail). Über geeignete Primer wurden zusätzlich Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI und *Pst*I) eingefügt und das PCR-Produkt durch *blunt-end*-Ligation zu einem zirkulären Plasmid geschlossen (pTS25). Über die Schnittstellen konnte die Motordomäne des humanen Kinesin-1 Kif5A mit dem pilzlichen Hydrophobin DewA (115 aa) aus *A. nidulans* C-terminal fusioniert werden (pTS26) (Stringer and Timberlake, 1995). Zur Klonierung musste cDNA verwendet werden, da *dewA* zwei Introns (bp 290 - 380 und bp 455 - 507) enthält. So entstand das Fusionsprotein Kif5ADewA (Abb. 2.2).

Die amphiphilen Eigenschaften des Hydrophobins ermöglichten die Fixierung des Fusionsproteins auf verschiedenen Oberflächen (Wösten, 2001). Zum Nachweis der Funktionalität des Konstrukts wurden zuerst Motilitäts-Test auf verschiedenen Oberflächen durchgeführt.

Die Transportgeschwindigkeiten von Kif5ADewA wurden mit der von Kif5A und einem weiteren Fusionsprotein, KinA441DewA, verglichen. Bei diesem Konstrukt ist statt der Motordo-

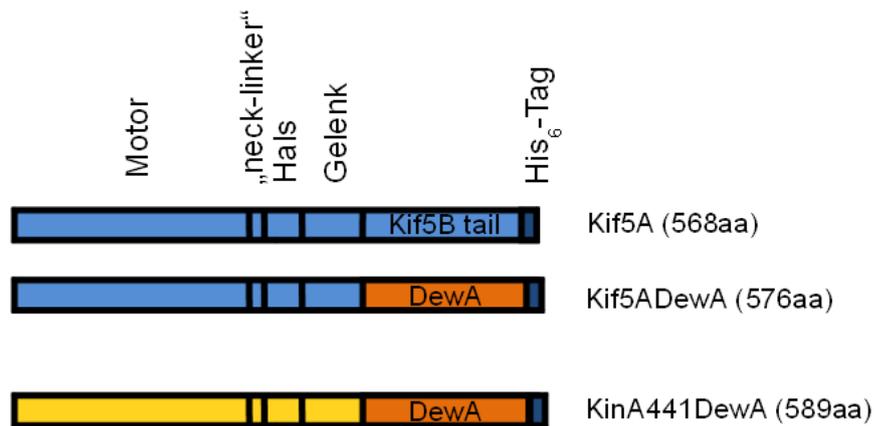


Abb. 2.2: **Schema dreier Konstrukte zur Mikrotubulibindung.** Bei dem ursprünglichen Konstrukt Kif5A wurde der C-terminale Teil (Kif5B tail) deletiert und durch das Hydrophobin DewA ersetzt. Beim anderen Fusionsprotein wurde die Motordomäne des *A. nidulans* Kinesin-1, KinA, mit dem Hydrophobin fusioniert (KinA441DewA). Zur Immobilisierung der Mikrotubuli wurde anschließend bei den Konstrukten eine *rigor*-Mutation eingeführt.

mäne des Kif5A, die des konventionellen Kinesins aus *A. nidulans* (441aa), KinA, mit DewA fusioniert (pTS10). Dazu wurde die Aminosäuresequenz von KinA441DewA aus dem Plasmid pPS12 mit den Primern KinA441 for und KinA441 rev amplifiziert und in den pET21b-Vektor kloniert. Auch die Motilität dieses Proteins wurde auf verschiedenen Oberflächen analysiert. Um zu testen, ob sich die Konstrukte zur Immobilisierung der Mikrotubuli eignen, wurde zunächst die Motilität und damit die Funktionalität der verschiedenen Fusionsproteine getestet.

### Motilität der Konstrukte

Nach bakterieller Expression des Kif5ADewA-Konstrukts konnte die Aktivität des Fusionsproteins gemessen werden. Die enzymatische Aktivität der Kinesinproteine wurde in einem gekoppelten, enzymatischen ATPase-Test bestimmt, indem die ATP-Umsatzrate gemessen wurde. Zur Durchführung dieses Tests mussten zuerst die aktiven Proteine von den inaktiven getrennt. Nach der Affinitätsaufreinigung über eine Ni-NTA-Säule wurde eine Aktivitätsaufreinigung durchgeführt. Die Messungen der ATPase-Aktivitäten der Konstrukte ergaben beim anschließenden Vergleich, dass sich die Aktivitäten nicht wesentlich unterschieden (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: ATPase-Aktivität der Konstrukte Kif5A und Kif5ADewA

Konstrukt	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_{0,5;\text{Mt}}$ [ $\mu\text{M}$ ]
Kif5A	$15,5 \pm 1,6$	$0,86 \pm 0,20$
Kif5ADewA	$11,4 \pm 0,4$	$0,79 \pm 0,09$

Die ATPase-Aktivitäten der Proteine Kif5A und Kif5ADewA wurden aus zwei unabhängigen Aufreinigungs- und Versuchsdurchführungen bestimmt. Mit  $15,5 \pm 1,6 \text{ s}^{-1}$  liegt die enzymatische Aktivität von Kif5A etwas über der von Kif5ADewA ( $11,4 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ ).

Die Prüfung der Einsatzfähigkeit des Kinesin-Hydrophobin-Fusionsprotein erfolgte auf verschiedenen Oberflächen. Dazu wurde das Konstrukt über sein His<sub>6</sub>-Tag aufgereinigt und im Motilitäts-Test, im ATP-Überschuss, auf verschiedenen beschichteten Glasoberflächen eingesetzt. Die Beschichtung erfolgte zusammen mit dem Institut für Nanotechnologie (INT) des KIT indem verschiedene Silanen (PFMS, APTMS und OTS) und Plexiglas (PMMA) aufgebracht wurden. Des Weiteren wurden Motilitäts-Tests der Konstrukte auf verschieden gereinigten Gläser (mit Plasma (10 Scm O<sub>2</sub>; 100 mTor; 30 WRF; 5 min) und Detergenz (Helix I (Braum); 30 min; mit H<sub>2</sub>O abgespült)) durchgeführt. Die Geschwindigkeiten unterschieden sich auf verschiedenen Oberflächen teils erheblich. Auf PFMS-beschichteten Gläsern wurden die Mikrotubuli mit  $17,4 \mu\text{m}/\text{min}$  mehr als doppelt so schnell transportiert wie auf APTMS-Oberflächen ( $6 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Ähnliche Unterschiede ergaben sich auch bei Geschwindigkeitsmessungen mit Kif5A auf den gleichen Oberflächen (Abb. 2.3).

Somit schien die Art der Oberfläche die Aktivität des Kinesin-Mikrotubuli-Komplexes zu beeinflussen. Wie das geschieht, muss noch genauer untersucht werden.

Das pilzliche Hydrophobin DewA bindet bekanntlich auch fest an Teflon (Schmoll et al., 2010). Bei dem Fusionsprotein Kif5ADewA konnte aber weder eine Bindung noch ein Transport von Mikrotubuli beobachtet werden.

Weiterhin fällt auf, dass die durch Kif5ADewA angetrieben Mikrotubuli im Vergleich zu denen von Kif5A immer etwas langsamer sind (Abb. 2.3). Da Kinesin bei jedem Schritt ein ATP-Molekül verbraucht, würde man bei einer ATP-Umsatzrate bei Kif5A von  $15,5 \pm 1,6 \text{ s}^{-1}$  eine Geschwindigkeit von  $(15,5 \pm 1,6 \text{ s}^{-1} \cdot 8 \text{ nm}) = 7,68 \pm 0,53 \mu\text{m}/\text{min}$  erwarten. Bei Kif5ADewA

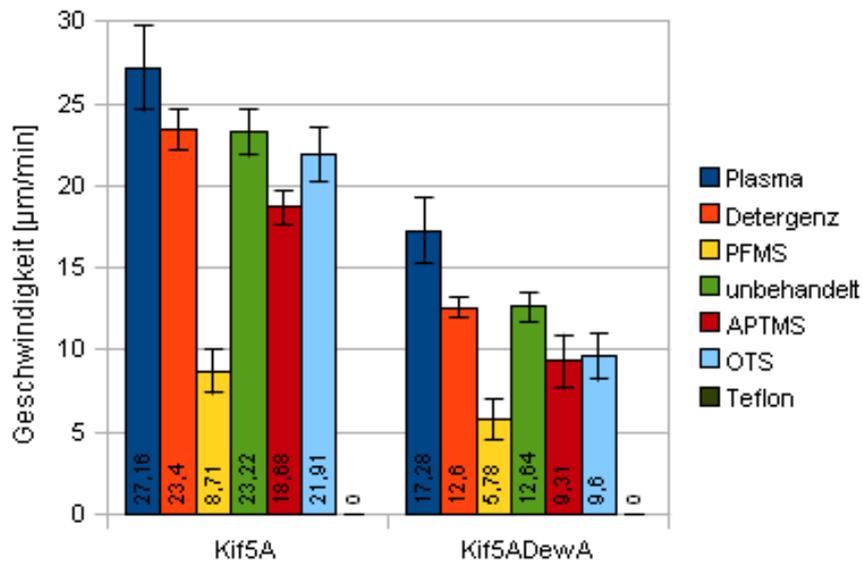


Abb. 2.3: Motilität von Kif5A und Kif5ADewA auf verschiedenen Oberflächen [in  $\mu\text{m}/\text{min}$ ]. Es ist gut zu erkennen, dass die Mikrotubuli auf unterschiedlichen Oberflächen mit verschiedenen Geschwindigkeiten transportiert werden.

Tab. 2.2: Gleitgeschwindigkeiten von Mikrotubuli auf den Konstrukten Kif5ADewA, Kif5A und KinA441DewA [in  $\mu\text{m}/\text{min}$ ] (n.a.: nicht analysiert)

Behandlung	Kontaktwinkel	Kif5ADewA		Kif5A		KinA441DewA	
		Mittelwert	n	Mittelwert	n	Mittelwert	n
Plasma	$9 \pm 1,0^\circ$	$17,28 \pm 2,0$	107	$27,16 \pm 2,6$	117	$25,74 \pm 5,5$	100
Detergenz	$12 \pm 1,0^\circ$	$12,60 \pm 0,6$	117	$23,40 \pm 1,2$	107	n.a.	n.a.
PFMS	$50 \pm 1,0^\circ$	$5,78 \pm 1,2$	112	$8,71 \pm 1,3$	102	n.a.	n.a.
unbehandelt	$56 \pm 3,0^\circ$	$12,64 \pm 0,9$	132	$23,22 \pm 1,4$	129	$17,10 \pm 5,0$	117
PMMA	$73 \pm 0,7^\circ$	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	$29,94 \pm 4,5$	117
APTMS	$83 \pm 4,0^\circ$	$9,31 \pm 1,6$	123	$18,68 \pm 1,0$	121	n.a.	n.a.
OTS	$106 \pm 0,3^\circ$	$9,60 \pm 1,4$	130	$21,91 \pm 1,6$	100	n.a.	n.a.
Teflon	$140 \pm 1,2^\circ$	0	n.a.	0	n.a.	n.a.	n.a.

ergibt sich bei dieser Rechnung eine erwartete Geschwindigkeit von  $5,47 \pm 0,19 \mu\text{m}/\text{min}$ . Die im Motilitäts-Test gemessenen Geschwindigkeiten überschreiten diese Werte teilweise erheblich.

Motilitäts-Tests mit Kif5A-tail auf jeder dieser Oberflächenarten zeigten dabei keine Bindung der Mikrotubuli. Die Haftung des Kif5ADewA-Proteins und somit die der Mikrotubuli hängt demnach von der Fusion mit dem Hydrophobin ab.

Um den Einfluss der Oberfläche auf die Aktivität von Kinesinen zu bestätigen wurde noch ein weiteres Kinesin-Hydrophobin-Fusionsprotein exprimiert, das KinA441DewA. Es enthält im Vergleich zu Kif5ADewA den Motor von Kinesin-1, KinA, aus *A. nidulans* statt der humanen Motordomäne. Das Protein transportiert Mikrotubuli auf Glas mit einer Geschwindigkeit von  $17,1 \pm 5 \mu\text{m}/\text{min}$ . Bei diesem Konstrukt unterscheidet sich die Geschwindigkeit auf Glas ebenfalls von der auf PMMA oder mit Plasma gereinigtem Glas (Tab. 2.2).

Da Kif5ADewA an allen möglichen Oberflächen gebunden hatte und funktionell war, wurde entschieden, die Fixierung der Mikrotubuli durch die *rigor*-Mutante von Kif5ADewA (Kif5A<sub>rigor</sub>DewA) zu vermitteln. Die Mikrotubuli waren an den Oberflächen fest fixiert und lösten sich trotz mehrmaligem Waschen mit Puffer nicht ab. Selbst bei hohen ATP-Konzentrationen waren keine Mikrotubulibewegungen zu beobachten. Das Konstrukt kann auf allen getesteten Oberflächen für das *in vitro*-Transportsystem verwendet werden.

Da das Kinesin-Hydrophobin-Fusionsprotein Kif5ADewA im Transportsystem zur Fixierung der Mikrotubuli dienen sollte, wurde noch eine *rigor*-Mutation eingeführt (Kif5A<sub>rigor</sub>DewA; pTS29). Dieses Konstrukt bindet nur an Mikrotubuli, da ihm die Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse fehlt. Es wurde auf allen Oberflächen, auf denen eine Motilität beobachtet wurde, zudem eine feste Immobilisierung der Mikrotubuli durch die *rigor*-Mutanten beobachtet

Um das Konstrukt weiter zu vereinfachen und eine Dimerisierung mit nicht-*rigor*-Konstrukten zu verhindern, welche nach Thoresen and Gelles (2008) die Beweglichkeit abschwächt, wurde bei Kif5ADewA und Kif5A<sub>rigor</sub>DewA verkürzt. Dazu wurde die erste *coiled-coil*-Domäne deletiert (pTS32 und pTS33). Dabei zeigten weder die verkürzte *rigor*-Mutante noch der verkürzte Ursprungstyp dieses Konstrukts Bindung an Mikrotubuli. Anscheinend dient der erste *coiled-coil* nicht nur der Dimerisierung (Bathe et al., 2005), sondern erscheint dessen Deleti-

on sogar hinderlich für die Mikrotubuli-Bindung. Deshalb konnten die verkürzten Konstrukte nicht zur Fixierung von Mikrotubuli verwendet werden.

Alternativ wurden in dieser Arbeit die Proteine zur Immobilisierung über ihren His<sub>6</sub>-Tag an Lipide gekoppelt, die vorher auf eine Oberfläche aufgebracht wurden.

In unserem Ansatz wurde eine Mischung aus DOPC mit unterschiedlichen Konzentrationen aus DOGS-NI-NTA (Avanti lipids, USA) verwendet. Dabei handelt es sich um Lipide, die in ihrer Kopfgruppe durch Nitrilotriessigsäure ein Ni-Ion tragen, das als Chelatligand zur Bindung von Histidin-getaggtten Proteinen eingesetzt wird. Diese unmarkierten Lipide wurden mit Hilfe der Dip-Pen-Nanolithographie in weniger als 100 nm breiten Linien auf einer Glasoberfläche aufgebracht. Nach Ausbildung einer Lipiddoppelschicht wurde das gewünschte Protein zugegeben, das anschließend über seinen His<sub>6</sub>-Tag an die Ni-Ionen der Kopfgruppe binden konnte. Um diese Bindung zu visualisieren, wurde ein Konstrukt erstellt, bei dem die Motordomäne des konventionellen Kinesins KinA aus *A.nidulans* C-terminal mit GFP fusioniert wurde (pTS12). Dafür wurde zuerst die DNA-Sequenz für die ersten 441 Aminosäuren von KinA aus dem Vektor pPS03 mit den Primern KinA441 for und His<sub>6</sub> rev amplifiziert, und in den Expressionsvektor pET21b kloniert (pTS11). Nachdem die Expression dieses Konstruktes positiv getestet wurde, konnte über die *Bam*HI Restriktionsschnittstelle zwischen der Sequenz für KinA441 und dem His<sub>6</sub>-Tag die DNA für GFP eingefügt werden. Anschließend wurde auch dieses Konstrukt exprimiert und die Bindung an Lipide getestet. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle der Bindung wurden Mikrotubuli und die Puffer zur Durchführung eines Motilitäts-Tests zugegeben. Es wurde neben der Bindung der Fusionsproteine auch die Anheftung einiger Mikrotubuli beobachtet (Abb. 2.4). Leider konnte in diesem Fall keine Bewegung der Mikrotubuli gezeigt werden, was an der Fusion der Motordomäne mit GFP, aber auch an der sterischen Behinderung durch das GFP-Molekül gelegen haben kann. Der Vorteil dieses Ansatzes ist die Möglichkeit, sehr filigrane Muster und Wege vorzugeben, an die Kinesine und so auch die Mikrotubuli binden können. Es ist möglich, Linien aus Phospholipiden herzustellen, die mit bis zu 20 nm Größe extrem klein sind.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die Motordomäne des KinA-Proteins ohne GFP exprimiert (pTS11) und die Bindung getestet. Wie im vorangegangenen Versuch, wurden die

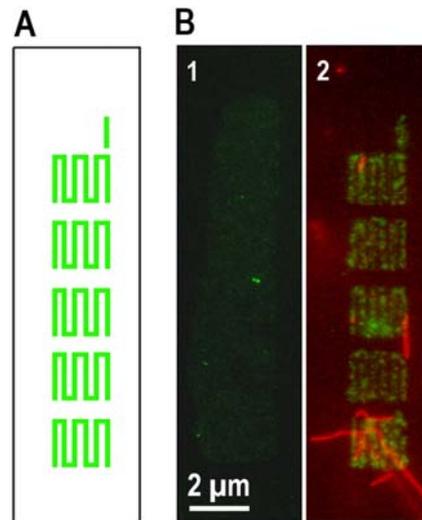


Abb. 2.4: **Lipidbindung von KinA441GFP via His<sub>6</sub>-Tag.** **A)** Muster der mittels Dip-Pen-Nanolithographie aufgetragenen Lipidmischungen. **B)** Es wurde eine Kontrolle aus reinem DOPC (**1**) und eine Mischung mit 50 mol% DOGS-Ni-NTA in DOPC (**2**) aufgetragen. An die Kontrolle binden im Gegensatz zur Mischung keine KinA441GFP Moleküle, wie auch die Bindung der Mikrotubuli (rot) an die Kinesinpotene zeigt. Die Breite der Lipimuster betrug ca. 100 nm.

Kinesine an die aufgetragenen Lipide gebunden. Dieses Mal enthielt die verwendete Lipidmischung neben 50 mol% DOGS-Ni-NTA und DOPC noch 2 mol% FITC-gekoppelte PE-Lipide um die Lipidmuster sichtbar zu machen. Bei diesem Ansatz bewegten sich die Mikrotubuli mit einer Geschwindigkeit von  $8 \pm 1 \mu\text{m}/\text{min}$  vorwärts (Abb. 2.5). Auch hierbei war die Transportgeschwindigkeit von Mikrotubuli im Vergleich zu der bei KinA441DewA ( $17,1 \pm 5 \mu\text{m}$ ) erheblich kleiner. Dies könnte an der Fluidität der Lipide liegen.

Auf reinen DOPC-Mustern konnten keine Mikrotubulibindung beobachtet werden. Bei Weiterführung dieses Versuchs immobilisiert man durch Einbringen einer *rigor*-Mutation, die Mikrotubuli. Der Vorteil dieses Ansatzes ist die Möglichkeit, die Lipide in geordneten Mustern aufzutragen und somit die genaue Fixierung der Mikrotubuli an einem beliebigen Ort vornehmen zu können.

Die in den vorherigen Versuchen aufgezeigten Wege sind Möglichkeiten, Mikrotubuli auf Oberflächen zu fixieren. Die so immobilisierten Filamente können nun als „Straßen“ für den Transport von Lasten im *in vitro* Transportsystem dienen (Kap. 2.1.3).

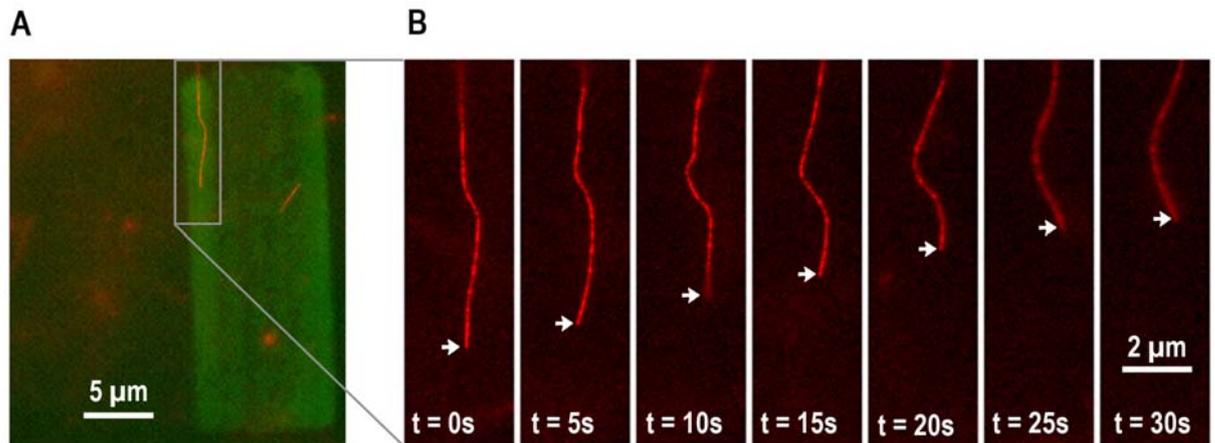


Abb. 2.5: **Transport von Mikrotubuli über an Lipide gebundenen KinA441 Proteine.** A) An die in Linien von oben nach unten aufgetragenen Lipide (grün) binden Mikrotubuli über die fixierten Konstrukte KinA441. B) Die Filamente bewegten sich mit  $8 \pm 1 \mu\text{m}/\text{min}$  vorwärts ( $n = 19$ ).

### 2.1.2 Bindung und Transport der Ladung

Als Ladungsbehälter für das Transportsystem dienten Vesikel. Es wurden native Vesikel aus *A. nidulans* oder artifizielle Lipidvesikel und Latexkügelchen getestet. Native Lipidvesikel, wie sie in *A. nidulans* vorkommen, sind mit verschiedenen Stoffen, z.B. Enzymen gefüllt und werden zur Hyphenspitze, dem Ort des Spitzenwachstums, transportiert (Abb. 1.5). Der Vorteil nativer Vesikel liegt neben dem vorhandenen Inhalt auch in der Tatsache, dass sie schon an Motorproteine gekoppelt sind. Diese bleiben auch während der Aufreinigung daran haften und die Vesikel können direkt *in vitro* transportiert werden (Bananis et al., 2004). Die artifiziellen Vesikel und Latexkügelchen müssen dagegen noch mit Kinesinen bestückt werden. Ein großer Vorteil der artifiziellen Vesikel ist, dass die Lipidkomposition definiert zusammengesetzt, und die Art des Motorproteins frei gewählt werden kann. Es muss lediglich eine Verbindung zwischen den Lipiden und dem Kinesin hergestellt werden. Dafür wurde ein Fusionsprotein aus der Motordomäne des humanen Kinesin-1, Kif5A, und der lipidbindenden PH-Domäne hergestellt (Kif5APH). Für die Klonierung des Kif5APH-Konstruktes wurde die PH-Domäne des Kinesin-3 UncA (125 aa) aus *A. nidulans* mit der Motordomäne von Kif5A fusioniert (pTS27). Dies geschah ebenfalls über die eingefügten Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI und *Pst*I) des

Konstrukts, bei dem die Schwanzdomäne des Kif5B deletiert wurde (pTS25). Die *pleckstrin-homology* (PH)-Domäne ist bekannt dafür, an verschiedene Lipide, besonders aus der Klasse der Phospholipide, zu binden (Haslam et al., 1993; Yao et al., 1994; Wang and Shaw, 1995). Die Proteine der Kinesin-3 Familie sind in den Langstreckentransport involviert (Zekert and Fischer, 2009). Dabei dient die PH-Domäne wahrscheinlich der Bindung der zu transportierenden Lipidvesikel. Diese Eigenschaft wurde auch im Transportsystem zur Ladungsbindung genutzt. Der Vesikeltransport erfolgte über die vorher immobilisierten Mikrotubuli.

### Motilität der Konstrukte

Auch für das Konstrukt Kif5APH wurde nach Expression und Aufreinigung die Aktivität gemessen. Dazu wurde als Erstes die ATPase-Aktivität getestet, und die ATP-Umsatzrate des Proteins bestimmt. Zur Durchführung dieses Tests wurden zuerst die aktiven Proteine von den inaktiven getrennt. Es wurde nach der Affinitätsaufreinigung über eine Ni-NTA-Säule eine Aktivitätsaufreinigung durchgeführt. Die ATPase-Aktivität des Fusionsproteins wurde gemessen und anschließend mit dem Ausgangskonstrukt verglichen.

Die gemessenen Aktivitäten unterschieden sich nicht wesentlich (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: ATPase-Aktivität der Konstrukte Kif5A und Kif5APH

Konstrukt	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_{0,5;\text{Mt}}$ [ $\mu\text{M}$ ]
Kif5A	$15,5 \pm 1,6$	$0,86 \pm 0,20$
Kif5APH	13,9	0,82

Die ATPase-Aktivitäten von Kif5A wurden aus zwei unabhängigen Aufreinigungen und Versuchsdurchführungen bestimmt. Die Resultate von Kif5APH stammen aus einem einzigen Experiment. Die Aktivität von Kif5A wurde mit  $15,5 \pm 1,6 \text{ s}^{-1}$  gemessen und liegt geringfügig über der von Kif5APH ( $13,9 \text{ s}^{-1}$ ).

Anschließend wurde ein Motilitäts-Test durchgeführt wozu das Fusionsprotein auf einer Oberfläche fixiert werden muss. Zuerst wurde die Bindung des Fusionsproteins direkt auf verschiedenen Oberflächen getestet und gezeigt, dass es zu keiner der getesteten Oberflächen eine

Bindung eingeht. Um das Protein zu fixieren wurde es an Lipide gekoppelt, die zuvor auf die Oberfläche aufgebracht wurden. Die PH-Domänen sind dafür bekannt, an Phospholipide, besonders an Phosphatidylinositole zu binden (Wang and Shaw, 1995). Da jedoch von der Struktur einer PH-Domäne nicht auf die Art der Lipide geschlossen werden kann, an die sie bindet, wurde ein Lipid-Bindetest durchgeführt. Dazu wurde eine Proteinlösung (0,25 mg/ml 1:4 in TBS-T/4 % Milchpulver) mit PIP-Strips (Echelon, USA) inkubiert und die Bindung des Proteins mittels  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-Antikörpern nachgewiesen. Dabei band das Fusionsprotein am stärksten an Phosphatidylserine (DPPS) bindet. Ein weiteres, viel schwächeres Signal wurde bei Phosphatidylinositol-5-Phosphat detektiert. Als Negativkontrolle wurde der Lipidbindeassay mit der gleichen Menge des Proteins Kif5A-tail durchgeführt. Dabei konnten einige Signale erfasst werden. Diese waren jedoch sehr schwach, sodass sie sich fast nicht vom Hintergrundrauschen unterschieden und eher als unspezifische Bindungen zu deuten sind (Abb.2.6 A) und B)).

### **Kif5APH bindet DPPS-Lipide**

Um die Bindung des Kif5APH an DPPS zu verifizieren, wurde ein Membran-Flotationsassay durchgeführt. Dabei wurden die Proteine mit Lipidvesikeln inkubiert und die Protein-Lipid-Komplexe im Saccharosegradienten von ungebundenem Protein unter Ausnutzung von Dichtunterschieden getrennt, da die Lipide eine geringere Dichte als die Proteine haben. Es wurde eine Mischung aus 20 mol% DPPS und 80 mol% DOPC gewählt, weil sich reines DPPS aufgrund seiner Struktur nicht gut zur Herstellung von Vesikeln eignet. In den meisten Organellen der Hefen wie *S. cerevisiae* ist Phosphatidylserin ein Nebenbestandteil, während es in der Plasmamembran bis zu 30 mol% der Lipide ausmacht (Leventis and Grinstein, 2010). Die Membran-Flotationsassays wurden außer mit der DPPS/DOPC Mischung noch mit Phosphatidylcholin (DOPC) und Puffer durchgeführt. Bei diesem Test band Kif5APH an DPPS/DOPC was im SDS-Gel und beim WesternBlot zu beobachten war. Aber weder bei DOPC noch bei Puffer konnte das Kif5APH Protein in der oberen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 2.6 C) und D)).

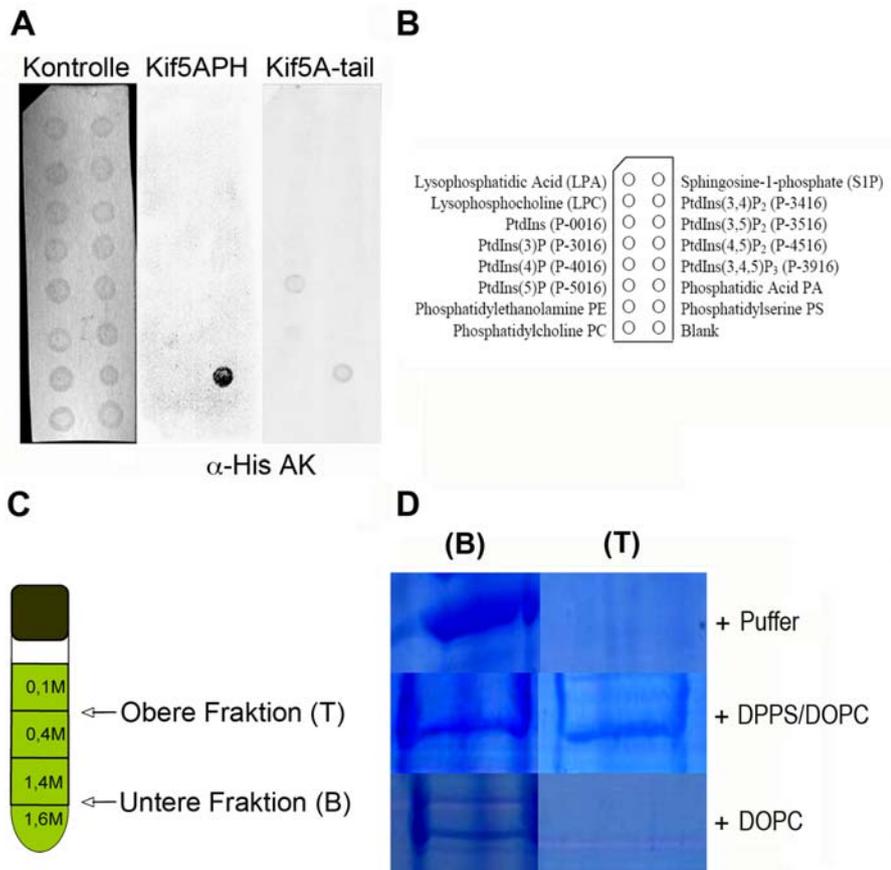


Abb. 2.6: **Lipidbindefähigkeit von Kif5APH.** **A)** Es wurde ein PIP-Strip-Assay durchgeführt, um die Lipidspezifität von Kif5APH und Kif5A-tail zu testen. Kif5APH bindet hauptsächlich an PS, wie man in der Auftragekontrolle (**B**) ablesen kann. **C)** Schema eines Membran-Flotationsassay. Ungebundenes Protein sammelt sich zwischen 1,6 und 1,4 M Saccharose an, während die Lipide sich an der 0,4/0,1 M Grenzen sammeln. Dieser Versuch wurde mit DPPS/DOPC- bzw. DOPC-Lipiden und Puffer durchgeführt und jeweils beide Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen (**D**)).

Da das Fusionsprotein zum Transport von Vesikeln verwendet werden sollte, musste weiterhin bewiesen werden, dass das Protein auch bei Lipidbindung aktiv arbeiten kann. Dazu wurde die DPPS/DOPC-Mischung auf einen kleinen Bereich einer Glasoberfläche aufgebracht und nach dreimaligem Waschen mit BRB80 mit dem Kif5APH-Protein inkubiert. Die Aktivität wurde anschließend in einem Motilitäts-Test getestet. Die Mikrotubuli waren nur auf den Lipiden gebunden und nicht auf der freien Glasoberfläche (Abb. 2.7 A)).

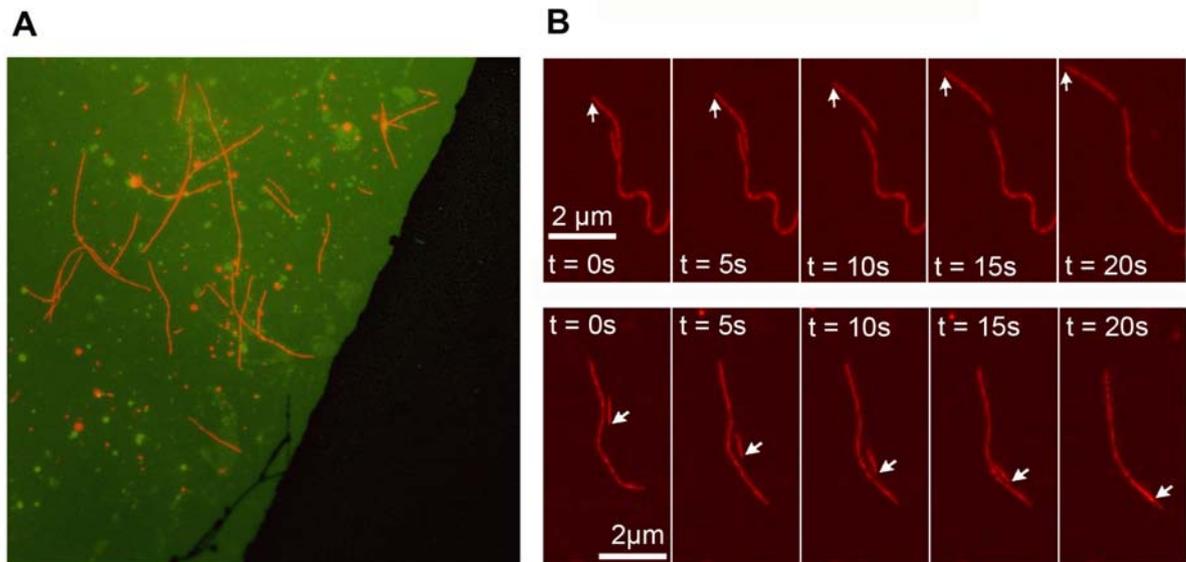


Abb. 2.7: **Motilitäts-Test mit Kif5APH auf Phosphatidylserin.** **A)** Nach Inkubation des Kif5APH auf Lipid-beschichteter (80 % DOPC / 20 % DPPS) Oberfläche, binden Mikrotubuli und werden mit  $6 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 37$ ) transportiert. **B)** Bildfolge des Transports einzelner Mikrotubuli durch Kif5APH auf Phosphatidylserin.

Damit man die Lipide in der Fluoreszenzmikroskopie erkennen konnte, waren diese mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelten PE-Lipiden (Avanti, USA) gemischt. Die Mikrotubuli bewegten sich über die Lipide auf der Oberfläche. Dabei wurde eine durchschnittliche Geschwindigkeit von  $6 \mu\text{m}/\text{min}$  gemessen (Abb. 2.7 B)). Diese Geschwindigkeit ist etwas kleiner als die von Kif5A und Kif5ADewA (Abb. 2.3). Eventuell beeinflusst die PH-Domäne die Aktivität des Kinesins oder die Lipide wirken sich negativ auf die Geschwindigkeit aus. Doppelschichten aus PS sind kein starres Gebilde, sondern eher ein zähflüssiger Film („Fluid-Mosaik-Modell“ aus Singer and Nicolson (1972)). Daher ist es möglich, dass sich die Kinesinkonstrukte bei jedem Schritt, den sie nach vorne machen, sich gleichzeitig etwas nach hinten schieben. Das hätte zum Ergebnis, dass sich die Mikrotubuli relativ zur Oberfläche langsamer fortbewegen. Durch verschiedene Lipidzusammensetzungen könnte dieser Effekt verringert oder ganz unterbunden werden. Durch Beimischung von Phosphatidylethanolamin (PE) könnten sich die Lipide durch den Einsatz von Dimethyl Suberimidate (DMS) miteinander vernetzen und somit ein steiferes Netzwerk ausbilden (Roth et al., 1989). Zusätze von

Cholesterin oder Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren senken die Membranfluidität ebenfalls (Sherban et al., 1982). Für den Transport sind ebenso steifere Lipidvesikel von Vorteil, da sie sich bei Bewegung nicht so schnell deformieren oder sogar zerreißen.

Somit wurde auch das zweite Hauptziel erreicht, bei dem zwei Möglichkeiten untersucht wurden die Verbindung der Ladung zu den Mikrotubuli-„Strassen“ und der Ladungstransport zu verwirklichen. Es konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein aus der Motordomäne des Kinesins und der lipidbindenden PH-Domäne (Kif5APH) aktiv arbeiten kann und selbst die Lipidbindung dieses nicht verhindert. Desweiteren ist es möglich, das Kinesinkonstrukt Kif5A direkt an Oberfläche der Latexkügelchen zu binden. Anschließend können die Kügelchen über Mikrotubuli transportiert werden. Im nächsten Kapitel wurden beide Möglichkeiten durch Einsatz in einem *in vitro* Transportsystem getestet.

### 2.1.3 Transportsystem

Die feste Bindung und Immobilisierung der Mikrotubuli an Oberflächen wurde durch das Fusionsprotein Kif5A<sub>rigor</sub>-DewA vermittelt. Somit standen die „Straßen“ als Transportwege bereit. Im darauf folgenden Teil führte das Konstrukt Kif5APH die Bindung an die Lipide der Vesikel und zeigte dabei aktiven Transport von Mikrotubuli. Nun wurden die einzelnen Experimente zusammengeführt. Dazu wurden zuerst die Kif5A<sub>rigor</sub>-DewA-Proteine auf der Oberfläche aufgebracht und nach der Inkubationszeit alle überschüssigen Kinesine abgewaschen. Anschließend wurden sie mit Mikrotubuli inkubiert was zu einer festen Kinesin-Mikrotubuli-Bindung führte. Die fixierten Mikrotubuli dienten nun als Transportwege für die Vesikeln.

Der Vesikeltransport wurde durch zwei verschiedene Ansätze verwirklicht. Die Ladungsbindung wurde durch ein weiteres Kinesinkonstrukt, Kif5APH, vermittelt, das an Phosphatidylserin bindet (Abb. 2.6). Zur Sichtbarmachung wurden die Lipidmischung 80 mol% DOPC / 20 mol% DPPS mit 2 mol% Fluorescein-PE gemischt. Die so fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemachten PS-Vesikel blieben sehr schnell aus, sodass es nicht möglich war, eine Bilderreihe aufzunehmen. Um die Vesikel dauerhaft sichtbar zu machen, wurden deshalb Nanopartikel mit PS inkubiert und mehrfach sonifiziert um einen Lipidfilm auf den Partikel zu erzeugen. Die verwendeten Nanopartikel wurden durch eine BSA-Beschichtung wasser-

löslich gemacht wie von Eggenberger et al. (2007) beschrieben. Sie sind im grünen und roten Fluoreszenzkanal (FITC und TexasRed) zu erkennen. Die so vorbereiteten Partikel wurden 30 min bei Raumtemperatur mit den Kinesinen Kif5APH inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch aus Partikeln und Kinesinen in einem Motilitäts-Test auf den fixierten Mikrotubuli eingesetzt.

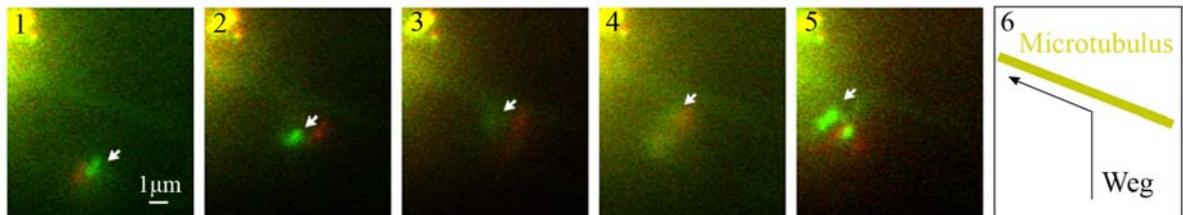


Abb. 2.8: **Transport von Nanopartikeln durch Kif5APH über Kif5A<sub>rigor</sub>DewA fixierte Mikrotubuli.** 1-5) Bilderreihe eines Nanopartikels, das nach Auftreffen auf einen Mikrotubulus an diesem mit 3  $\mu\text{m}/\text{min}$ . entlang wandert. 6) Skizze des Laufs

Im Motilitäts-Test wurden wenige sich bewegende Partikel festgestellt. Die Abbildung 2.8 zeigt einen der wenigen Fälle, in denen sich ein lipidbeschichteter Nanopartikel entlang eines Mikrotubulus bewegt. Bei diesem wurde eine Geschwindigkeit von 3  $\mu\text{m}/\text{min}$  gemessen. Der Versatz zwischen dem roten und dem grünen Bild kommt durch die zeitliche Verzögerung bei der Aufnahme der Fluoreszenzbilder zustande.

Im zweite Versuchsaufbau zum Transport wurden 1  $\mu\text{m}$  große Latexkügelchen mit dem Kinesinkonstrukt Kif5A für 10 min inkubiert, wobei die Schwanzdomäne des Kif5A auch an die Oberfläche der Latexkügelchen band. Danach wurde die Mischung zu den Mikrotubuli gegeben, die zuvor über Kif5A<sub>rigor</sub>DewA- Proteine auf einer Glasoberfläche immobilisiert wurden. Es wurde die Bewegung der Latexkügelchen im roten Fluoreszenzkanal (TexasRed) dokumentiert und die Geschwindigkeit der Kügelchen im Motilitäts-Test mit  $10 \pm 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$  gemessen (Abb. 2.9).

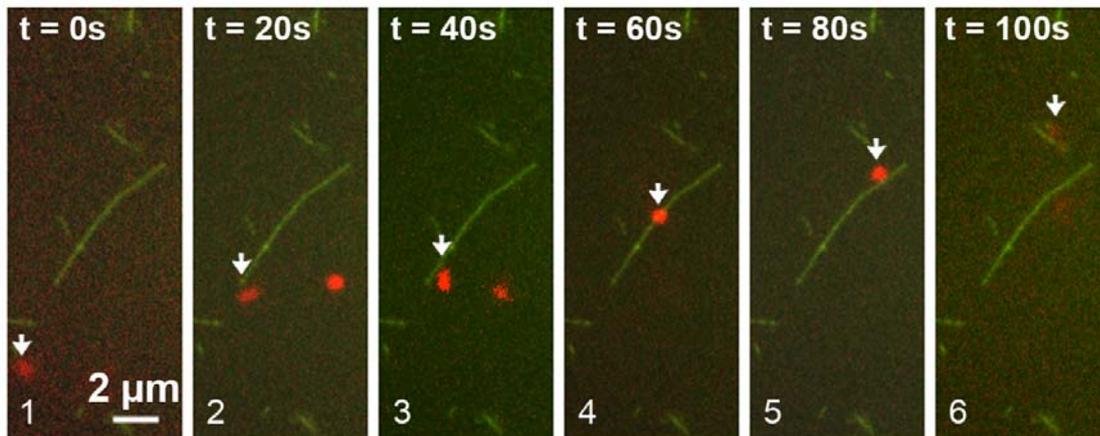


Abb. 2.9: **Transport von Latexkügelchen durch Kif5A über Kif5A<sub>rigor</sub>DewA-fixierte Mikrotubuli.** Die Bilderreihe zeigt den Transport eines Latexkügelchens (rot), das nach Auftreffen (1, 2) auf einen Mikrotubulus (grün) an diesem entlang wandert (3 - 5) und sich danach wieder ablöst (6). Die durchschnittliche gemessene Laufgeschwindigkeit der Kügelchen betrug  $10 \pm 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 8$ ).

In beiden Ansätzen zum Ladungstransport waren die meisten der beobachteten Partikel fest an die fixierten Mikrotubuli gebunden. Die Grundlagen für ein solches Transportsystem im Nanomaßstab sind damit erfüllt. Um das System weiter zu optimieren, müssen die Proteinkonzentrationen besser angepasst werden und nur die geringste Konzentration der verschiedenen Proteine verwendet werden. Dann sollte es weniger zu Störungen und Immobilisierungen kommen.

## 2.2 Charakterisierung des Kinesin-7 Proteins KipA

Bei dem Protein KipA aus *A. nidulans* handelt es sich um ein Kinesin der Klasse 7. Diese spielen in der Mitose eine wichtige Rolle bei der Aufreihung und -trennung der Chromosomen (Wood et al., 1997). In *S. pombe* transportiert das Kinesin-7 Tea2 zusätzlich Proteine in Richtung des Zellpols (Browning et al., 2000). Da bei *A. nidulans* solch ein Transport *in vivo* noch nicht nachgewiesen wurde, soll durch biochemische Analysen die Funktionalität von KipA als prozessiver Motor untersucht werden.

### 2.2.1 GFP-KipA dekoriert die Plus-Enden wachsender Mikrotubuli

Die Lokalisierung von GFP-markiertem KipA wurde erstmals durch Konzack et al. (2005) beschrieben. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit wiederholt und bestätigt. Dabei wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikrotubuli bestimmt. Beim Wachstum der jungen Hyphen konnte eine Lokalisation an den Spitzen der polymerisierenden Mikrotubuli gezeigt werden. Bei dem untersuchten Stamm wurden neben der GFP-Fusion des KipA noch die gesamten Mikrotubuli mit Hilfe des Fusionsproteins aus mRFP1 und der Motordomäne des Kinesin-ähnlichen KipB markiert (SSK100). Das Fusionsprotein GFP-KipA akkumuliert sich unter induzierten Bedingungen an den Spitzen der Mikrotubuli. Wahrscheinlich werden die Kinesine mit den wachsenden Plus-Enden der Mikrotubuli transportiert. Ob es sich dabei um eine aktive Bewegung entlang der Mikrotubuli, um einen passiven Transport zur Spitze der Mikrotubuli oder um einer Kombination aus beidem handelt, ist unklar.

Um zu testen, ob die KipA-Moleküle das Plus-Ende eines wachsenden Mikrotubulus durch eigene Bewegung erreichen können, wurden die Filamente fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Die Wachstumsgeschwindigkeit der dekorierten Mikrotubulienden beträgt durchschnittlich  $8,93 \pm 1,1 \mu\text{m}/\text{min}$ . (Abb. 2.10)

Es wurde untersucht, ob es sich bei KipA um einen prozessiven Motor handelt, der aktiv an Mikrotubuli entlang läuft. Um an deren Plus-Enden akkumulieren zu können, müsste der Motor die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikrotubuli übertreffen.

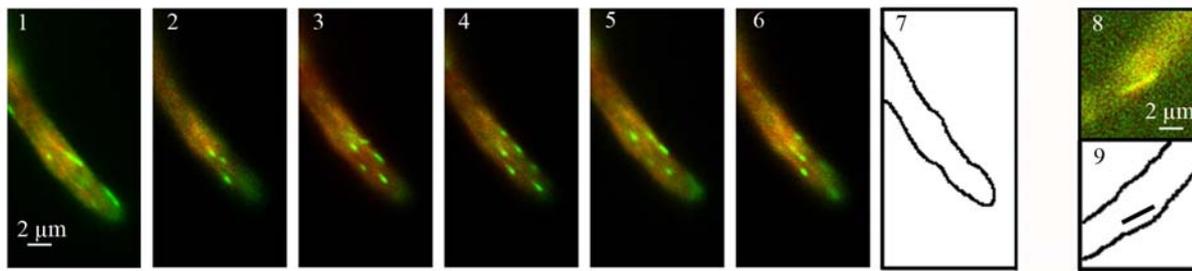


Abb. 2.10: **GFP-KipA markiert die Plus-Enden wachsender Mikrotubuli und die Mitosespindel *in vivo*.** **1 - 6** GFP-KipA lokalisiert an den Plus-Enden wachsender Mikrotubuli. Die Mikrotubuli wachsen *in vivo* mit einer Geschwindigkeit von  $8,93 \pm 1,1 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 53$ ). Die zeitlichen Abstände der einzelnen Aufnahmen der Bilderreihe beträgt 0,25 s. In Bild **7** ist die Umrandung der Hyphe skizziert. **8**) Während der Mitose lokalisiert GFP-KipA an den Spindelpolen und im Zentrum der Teilungsspindel; auch hier ist die Umrandung skizziert (**9**).

## 2.2.2 Sequenzanalyse von KipA

Um das Protein KipA aus *A. nidulans* (KipA) weiter zu charakterisieren, wurden zunächst die Domänen der Proteinsequenz identifiziert und die wichtigsten mit denen anderer Kinesin-7-Proteine verglichen.

Hier wurden die Kinesine der Klasse 7 aus zwei Hefen (*S. pombe* und *S. cerevisiae*), zwei filamentösen Pilzen (*A. nidulans* und *U. maydis*) und dem Menschen (*H. sapiens*) verglichen (Abb. 2.11). Die Proteinsequenzen im Bereich der ATP-Bindestelle (Walker Motiv) selbst über die Grenzen des Pilzereichs hinweg sehr ähnlich (Walker et al., 1982). Dieses Ergebnis war auch zu erwarten, da es sich bei der Motordomäne um einen hoch konservierten Bereich handelt und kleinste Veränderungen, besonders im Walker Motiv, zu einem Verlust der Funktion führen können (Nakata and Hirokawa, 1995). Die einzige weitere Sequenzähnlichkeit ist bei der ersten *coiled-coil* Domäne zu erkennen. Diese ist aber weniger stark konserviert und nur zwischen den Mitgliedern der Kinesin-7 Familie verschiedener filamentöser Pilze ähnlich. Die N-terminale Verlängerung von ungefähr 200 Aminosäuren ist in diesem Ausmaß ebenfalls nur bei den Kinesin-7 filamentöser Pilze zu erkennen (Abb. 1.4). Ansonsten sind die Protein-

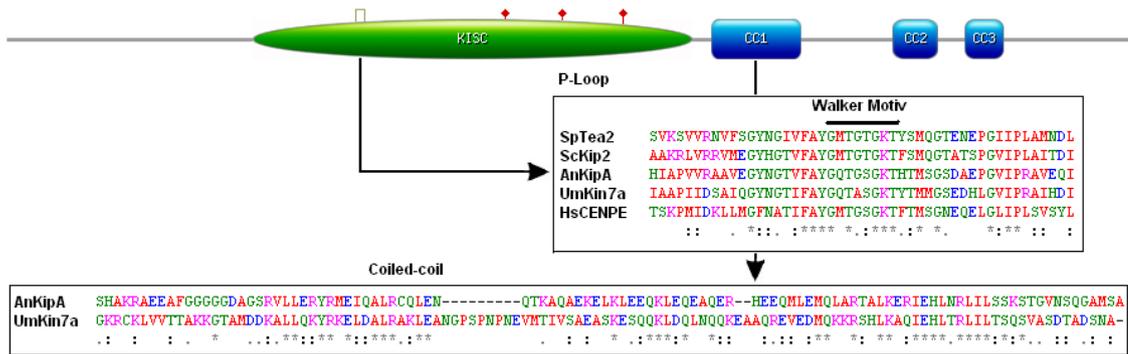


Abb. 2.11: Sequenzvergleich der wichtigsten Domänen von KipA mit denen anderer Kinesin-7 aus verschiedenen Organismen. Die größte Ähnlichkeit ist im Bereich der Motordomäne, speziell um das Walker Motiv (GXXXXTKT/S) zu erkennen. *S. pombe* Tea2; *S. cerevisiae* Kip2; *A. nidulans* KipA; *U. maydis* Kin7a; *H. sapiens* CENP-E. (grüner Bereich: Motor-domäne (KISC) mit ATP-Bindestelle (grüne Klammer) und Mikrotubuli-Bindestellen (rote Striche); blaue Bereiche: coiled-coil Domänen; Asterisk: konservierte Aminosäuren)

sequenzen der Kinesine im Allgemeinen sehr unterschiedlich und nicht direkt vergleichbar. Bei Kinesinen der Klasse 7 sind die Motordomänen stark konserviert. Damit sich ein Motorprotein prozessiv bewegen kann, sind aber auch andere Bereiche wichtig. Der erste coiled-coil nach der Motordomäne dient der Dimerisierung, sodass das Kinesin sich im hand-over-hand-Modell bewegen kann (Bathe et al., 2005). Aus der Sequenz alleine kann nicht auf die Aktivität und Prozessivität des Proteins geschlossen werden. Um das Kinesin KipA biochemisch zu untersuchen, wurde das Protein in *E. coli* exprimiert und durch verschiedene Methoden aufgereinigt.

### 2.2.3 Enzymatische Aktivität von KipA

Um KipA genauer charakterisieren zu können, wurde es in *E. coli* exprimiert. Von diesem Protein wurde die enzymatische ATPase-Aktivität bestimmt und anschließend die Motilität in einem Motilitäts-Test gemessen.

Um das *kipA*-Gen in einen Expressionsvektor zu klonieren, wurde die Gesamt-RNA einer über Nacht gewachsenen *A. nidulans* GR5 Kolonie extrahiert. Diese wurde mittels RT-PCR in cDNA umgewandelt. Zur Amplifikation des *kipA*-Gens wurde eine PCR mit den passenden Primern durchgeführt. Über die somit zusätzlich angefügten Restriktionsschnittstellen *NdeI*

und *Hind*III wurde das Amplifikat in den pET21b-Expressionsvektor kloniert (pTS13). Genomische DNA konnte nicht verwendet werden, da das *kipA*-Gen ein 49 bp langes Intron (bp 722 - 771) enthält.

Um das Kinesin-7 Protein KipA zu exprimieren, wurde das Plasmid pTS13 in *E.coli* BL21 (DE3) RIL Zellen transformiert. Anschließend wurde das Konstrukt bakteriell exprimiert und in einem ersten Schritt über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dabei zeigte sich, dass es in den Elutionen zu einer starken Anreicherung des gewünschten Proteins kam. Für eine Aufreinigung waren aber noch zu viele andere Proteine darin enthalten (Abb. 2.12). Entweder enthalten diese Proteine einige Histidine, sodass sie ebenfalls an das Säulenmaterial binden, oder aber sie binden unspezifisch an die Matrix. Diese unspezifische Bindung wurde durch den hohen Salzgehalt der Puffer schon stark reduziert.

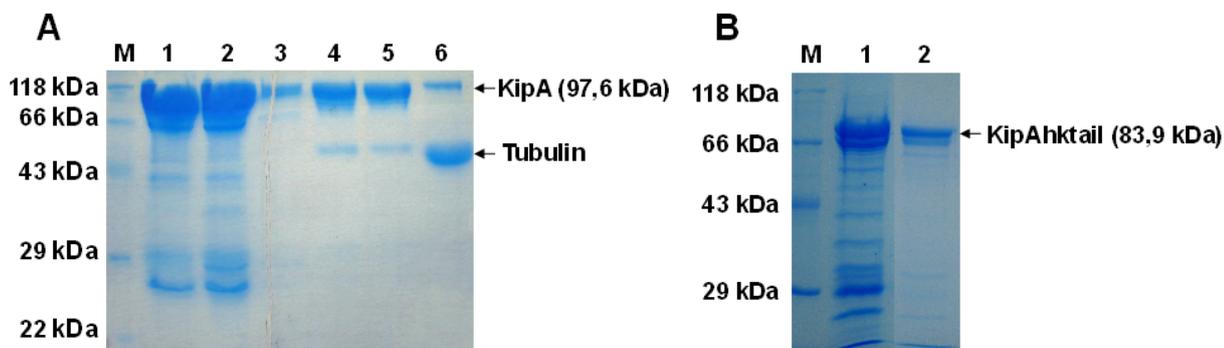


Abb. 2.12: **Aufreinigung der Proteine KipA und KipAhktail.** **A)** Ein mit Coomassie gefärbtes, 10%iges SDS-Gel der KipA-Aufreinigung. Darauf sind die Elutionen der Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung (1-3), die Ablösefraktionen (4, 5) und die Pelletfraktion (6) der Aktivitätsaufreinigung aufgetragen. **B)** Aufreinigung von KipAhktail auf einem mit Coomassie gefärbten, 10%igen SDS-Gel. Die Elution der Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung (1) und die *peak*-Fraktion der Kationen-Austauscher-Chromatographie (2).

Um für den ATPase-Test nur funktionelle Motoren zu erhalten, wurde bei KipA eine Aktivitätsaufreinigung durchgeführt. In Anwesenheit von AMP-PNP, einem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon, binden die funktionellen Motoren sehr fest an die Mikrotubuli. Nach anschließender Zentrifugation wurden die aktiven Proteine durch Inkubation in Puffer mit hohen ATP-Konzentrationen wieder von den Mikrotubuli abgelöst. Diese konnten dann in ATPase-Tests eingesetzt werden. Da es dabei auch zu einer leichten Depolymerisierung von Mikrotubuli

kommt, ist stets ein wenig Tubulin in der Ablösefraktion zu finden (Abb. 2.12, A) Spur 4 und 5). Das so aufgereinigte KipA-Protein wurde in einem ATPase-Test eingesetzt, aus dem die ATP-Umsatzrate berechnet wurden.

Zur Bestimmung der maximalen ATP-Umsatzrate des KipA-Proteins, wurde ein gekoppelter, enzymatischer ATPase-Test durchgeführt. Da ein Kinesin eine durch Mikrotubuli aktivierbare ATPase ist, werden in diesem Test die ATP-Umsätze bei verschiedenen Mikrotubulikonzentrationen gemessen. Anschließend werden die hyperbolen Graphen mittels Michaelis-Menten-Gleichungen analysiert, sodass man als Resultat den  $k_{\text{cat}}$ -Wert, die maximale ATP-Umsatzrate, einer Kopfdomäne erhält. Der  $K_{0,5,\text{MT}}$ -Wert gibt die Mikrotubulikonkonzentration an, bei der das Enzym mit der halbmaximalen Aktivität arbeitet. Der  $K_{0,5,\text{MT}}$ -Wert wird durch zwei Effekte, die Prozessivität und die Affinität des Proteins zu Mikrotubuli beeinflusst.

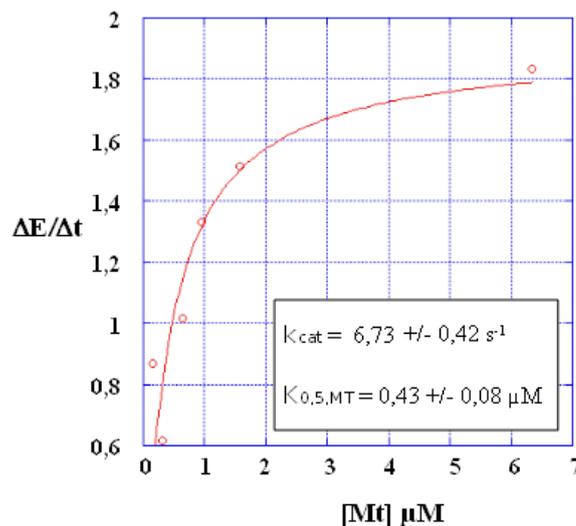


Abb. 2.13: **Messung der durch Mikrotubuli in Gang gesetzten ATPase-Aktivität von KipA.** Der durch ATP-Verbrauch hervorgerufene Abfall der Steigung wurde gegen die eingesetzte Mikrotubulikonkonzentration aufgetragen. Aus der hyperbolen Regression der Punkte ergibt sich die maximale Umsatzrate  $k_{\text{cat}}$  und der  $K_{0,5,\text{MT}}$ -Wert. Die Regressionsformel lautet:  

$$y = (B + V_{\text{max}} \cdot [\text{MT}]) / ([\text{MT}] + K_{0,5;\text{MT}})$$
 Aus  $V_{\text{max}}$  lässt sich  $k_{\text{cat}}$  berechnen.

Die Resultate wurden mit den Werten eines anderen Protein der Kinesin-7 Familie, dem CENP-E aus *Xenopus leavis*, verglichen. Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert von KipA betrug  $6,73 \pm 0,42 \text{ s}^{-1}$

(Abb. 2.13). Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der des CENP-E aus *Xenopus leavis* ( $13,2 \text{ s}^{-1}$ ; Wood et al. (1997)). Ebenso ist der  $K_{0,5,MT}$ -Wert von  $0,43 \pm 0,08 \mu\text{M}$  mit den Werten anderer prozessiver, dimerer Motoren vergleichbar. Dieser Wert liegt bei dimeren Kinesinen bei ungefähr  $0,5 \mu\text{M}$ , während er bei monomeren Proteinen weit über  $1 \mu\text{M}$  liegt (Moyer et al., 1996).

Da sich aber ein Kinesin, das eine ATPase-Aktivität besitzt, nicht zwangsläufig prozessiv an Mikrotubulifilamenten entlang bewegt, wurde anschließend noch die Motilität des Proteins bestimmt.

## 2.2.4 Motilität von KipA

Um herauszufinden, ob KipA ein Mikrotubuli-assoziiertes, molekulares Motor ist, wurde ein Motilitäts-Test durchgeführt. Bei diesem Test muss das Kinesinprotein auf der Oberfläche immobilisiert werden. Die Kinesine transportieren die zugegebenen, fluoreszenzmarkierten Mikrotubuli unter ATP-Hydrolyse. Zur Herstellung des KipAhtail-Konstruktes wurde das KipA verkürzt und der Schwanz des humanen Kif5B zur Oberflächenhaftung angehängt. Die Verkürzung des KipA-Proteins und das Anhängen des Schwanzes von Kif5B wirkt sich nicht negativ auf die Motilität aus, wie schon bei anderen Kinesinen getestet wurde. Bei dem im ersten Teil der Arbeit verwendeten Konstrukt, das aus der Motordomäne des Kif5A und der Schwanzdomäne des Kif5B besteht, gab es keine nennenswerten Unterschiede zum nativen Protein. Die Transportgeschwindigkeit des Kif5A-Konstruktes wurde mit  $52,8 \mu\text{m}/\text{min}$  gemessen (Ebbing et al., 2008). Das native Protein ist am langsamen, anterograden, neuronalen Transport beteiligt, und transportiert *in vivo* Neurofilamente während der Transportphase durchschnittlich mit  $44,4 \mu\text{m}/\text{min}$  (Wang et al., 2000; Xia et al., 2003). Zum Vergleich wurde neben Glas noch die Motilität auf einem Plexiglas (PMMA)-beschichteten Objektträger getestet. Dazu wurde ein verkürztes KipA verwendet, bei dem die hinteren beiden *coiled-coil*-Domänen entfernt wurden. Diese dienen wahrscheinlich der Ladungsbindung und Regulation der Aktivität. Die erste *coiled-coil*-Domäne ist für die Dimerisierung wichtig (bei Kinesin-1 (Bathe et al., 2005)). Es wurde mit phosphorylierten Primern das Plasmid pTS13 amplifiziert und nach *DpnI* Verdau ligiert. Dadurch wurden die letzten 750 Basenpaare des *kipA*-Gens entfernt (pTS36). Über

die eingebrachten Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI und *Eco*RI) wurde das 3'-Ende des *kif5B* eingesetzt. Mit diesem Konstrukt (KipAhktail; pTS37) wurden Motilitäts-Tests durchgeführt. Der C-Terminus des Kif5B ist dafür bekannt, auf Glasoberflächen zu haften (Jaud et al., 2006) und wird aus diesem Grund häufig zur Anheftung von Fusionsproteinen verwendet (Kallipolitou et al., 2001). Um die KipA Proteine herzustellen, wurde auch das Plasmid pTS37 in *E. coli* BL21 (DE3) RIL-Zellen transformiert. Anschließend wurden die Konstrukte bakteriell exprimiert und in einem ersten Schritt über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dadurch wurde das gewünschte Protein stark angereichert, war jedoch noch durch andere Proteine verunreinigt (Abb. 2.12).

Zur weiteren Aufreinigung wurden die exprimierten und über eine Ni-NTA-Matrix aufgereinigten KipAhktail-Proteine über eine Ionenaustausch-Chromatographie geführt. Dabei wurden die Proteine nach ihrer Ladung bei bestimmten pH-Werten getrennt. Da der isoelektrische Punkt (pI) dieses Proteins bei 9,99 liegt, wurde mit einer HiTrap SP HP-Säule, d.h. einem Kationenaustauscher gearbeitet. Die pH-Werte der Puffer lagen bei 7,4, sodass die Proteine positiv geladen sind und an die Matrix binden. Die gebundenen Proteine wurden über verschiedene Salzkonzentrationen wieder eluiert, wobei das KipAhktail-Protein zwischen 250 und 300 mM NaCl eluiert (Abb. 2.12).

Im Motilitäts-Test wurde das Protein KipAhktail eingesetzt, da sich der C-terminale Teil des Kif5B gut dazu eignet, das Protein auf der Glasoberfläche zu befestigen. Das Kinesinkonstrukt KipAhktail wurde in hoher Konzentration auf die Oberfläche aufgebracht und die Geschwindigkeit der sich bewegenden Mikrotubuli gemessen, wobei viele Motoren einen Mikrotubulus antreiben. Das Protein KipAhktail transportierte Mikrotubuli mit einer Geschwindigkeit von  $9,48 \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$  (Abb. 2.14) und ist etwas schneller als die gemessene Wachstumsgeschwindigkeit der Mikrotubuli ( $8,93 \pm 1,1 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Deshalb ist es den KipA-Molekülen, möglich sich auf den Mikrotubuli bis zu deren Spitze zu bewegen und dort zu akkumulieren. Auch für die Anordnung der Chromosomen in der Metaphasenplatte während der Mitose, eine der Hauptaufgaben der Kinesin-7, reicht die Geschwindigkeit aus. Die Mitose dauert bei *A. nidulans* ungefähr 5 Minuten und die Größe der Spindel beträgt ca.  $2 \mu\text{m}$  (Bergen and Morris, 1983). Da ein Chromosom aber nur in die Äquatorialplatte transportiert wird, bewerk-

stelligen KipA-Proteine nur  $1 \mu\text{m}$ . Bei einer gemessenen Geschwindigkeit von  $9,48 \mu\text{m}/\text{min}$  reicht ein 47ster Teil der Mitosedauer aus, um die Chromosomen einzufangen und in der Äquatorialplatte zu platzieren.

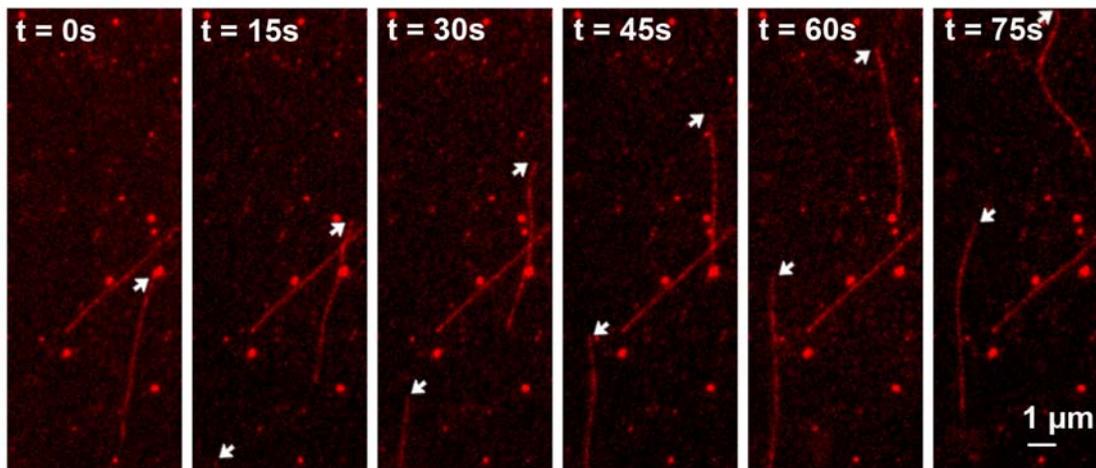


Abb. 2.14: **Motilität von KipAhktail auf Glas.** Diese Bilderreihe zeigt den Lauf zweier Mikrotubuli auf einer mit KipAhktail beschichteten Glasoberfläche. Die Mikrotubuli bewegen sich mit  $9,48 \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$ .

Tab. 2.4: **Gleitgeschwindigkeiten von Mikrotubuli auf KipAhktail [in  $\mu\text{m}/\text{min}$ ]**

Behandlung	Kontakt- winkel	Geschwindigkeit	
		Mittelwert	n
unbehandelt	$56 \pm 3^\circ$	$9,48 \pm 1,8$	114
PMMA	$73 \pm 0,7^\circ$	$9,24 \pm 2,4$	102

Zum Vergleich mit anderen Kinesinen aus *A. nidulans* wurde ein weiteres Fusionsprotein exprimiert. Dieses besteht aus der Motordomäne des Kinesin-1, KinA, aus *A. nidulans* und dem Hydrophobin DewA (KinA441DewA). Das Hydrophobin ist ein kleines, amphiphiles Protein, das sehr gut auf nahezu allen Oberflächen haftet (Wösten, 2001). In diesem Fall dient es dazu, die Motordomäne des Kinesins KinA an die Glasoberfläche zu heften. Die DNA-Sequenz des Proteins DewA stammt ebenfalls aus *A. nidulans*. Auch bei diesem Fusionsprotein wurde die

Motilität gemessen. Man erkennt, dass KinA441DewA die Mikrotubuli im Motilitäts-Test mit  $17,28 \mu\text{m}/\text{min}$  wesentlich schneller bewegt als KipAhktail (Tab. 2.4). Dies ist aber auch von der Funktion des einzelnen Proteins abhängig. KinA wird im Langstreckentransport benötigt, während KipA nur an Mikrotubuli Plus-Enden und in der Mitosespindel lokalisiert. Dort sind keine hohen Geschwindigkeiten von Nöten. Im Vergleich zu anderen Kinesin-7 Proteinen wie dem CENP-E aus *X. laevis* zeigte KipA eine vergleichbare Transportgeschwindigkeit der Mikrotubuli ( $5,1 \mu\text{m}/\text{min}$ ; Wood et al. (1997)).

Damit wurde gezeigt, dass es sich bei KipA um ein Kinesin handelt, das sich entlang von Mikrotubuli bewegen kann. Als Nächstes wurde der Oligomerisierungszustand von KipA untersucht. Dabei wurden Mant-ATP-Freisetzungsexperimente durchgeführt um zu sehen, ob es sich bei KipA um ein Monomer oder Dimer handelt. Beide Oligomerisierungszustände können sich prozessiv fortbewegen, sie arbeiten aber nach unterschiedlichen Modellen (Okada and Hirokawa, 2000; Asbury et al., 2003). Ein Monomer arbeitet nach dem „Brownian ratchet“-Modell und ein Dimer nach dem „hand-over-hand“-Modell (Xie, 2010).

### **2.2.5 Bestimmung des Oligomerisierungszustands**

Bei Kinesinen ist die ADP-Freisetzung von der Bindung an Mikrotubuli abhängig. Indem man ein fluoreszierendes N-methylanthranoyl-ATP (Mant-ATP) einsetzt, kann man sich diesen Effekt zu Nutze machen, um etwas über den Oligomerisierungszustand herauszufinden. Die Fluoreszenz des Mant-ATP ist im Protein-gebundenen Zustand größer als in Lösung. Bei diesem Experiment wurden ebenfalls die über Kationenaustauscher aufgereinigten KipAhktail verwendet (Kap: 2.2.4), da die so gereinigten Proteine, im Gegensatz zur Aktivitätsaufreinigung, keine Mikrotubuli enthielten. Die KipAhktail-Proteine wurden mit Mant-ATP inkubiert, worauf sich ein Mant-ATP-Kinesin-Komplex bildete, in dem das ATP auch in Abwesenheit von Mikrotubuli zu ADP hydrolysiert wurde. Danach wurde das überschüssige Mant-ATP mittels Gelfiltrationschromatografie über G25-Sepharose entfernt (Ma and Taylor, 1997a,b).

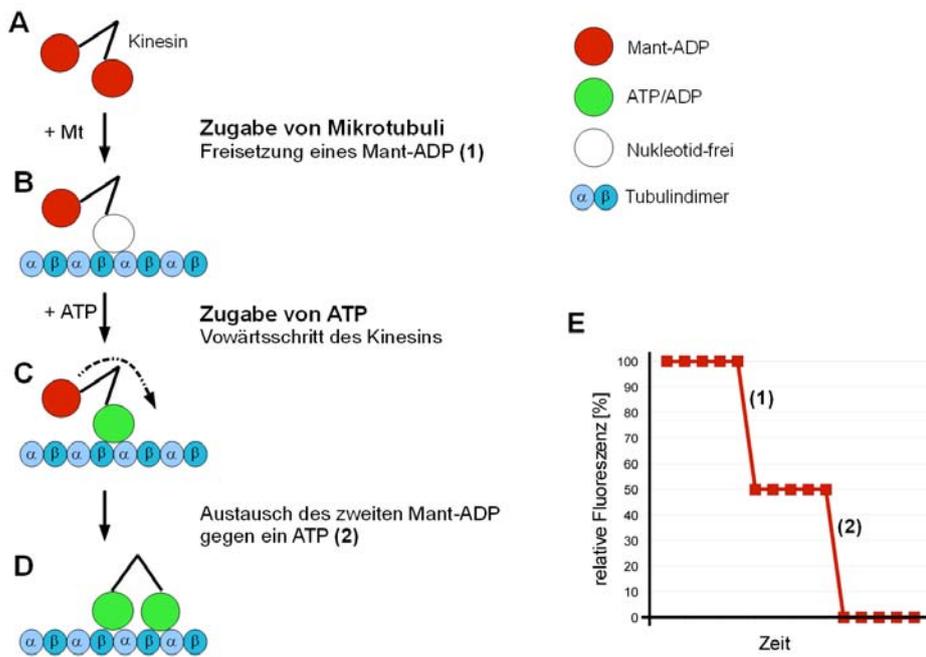


Abb. 2.15: **Schema der Mant-ADP-Freisetzungsexperimente.** A) Freie Kinesindimere, die mit Mant-ADP beladen wurden. B) Nach Zugabe der äquimolaren Menge an Mikrotubuli bindet einer der Kinesinköpfe und gibt sein Mant-ADP ab. Dadurch sinkt die relative Fluoreszenz auf 50 % ab (1). C) Nach Beendigung der Fluoreszenzabnahme und Erreichen eines Plateaus, wird durch die Zugabe von 1 mM ATP das Kinesin zu einem Vorwärtsschritt bewegt. D) Dabei bindet auch der zweite Kopf an den Mikrotubulus und gibt auch ein Mant-ADP frei. Die relative Fluoreszenz sinkt nun auf ihren Nullwert (2). E) Hier ist der zeitliche Verlauf der relativen Fluoreszenz eines Mant-ADP-Freisetzungsexperiments schematisch dargestellt.

Die Mant-ADP-KipAhktail-Komplexe wurden erst mit Mikrotubuli und anschließend mit ATP inkubiert. Dabei wurde in einem Spektrofluorometer die Fluoreszenz der Lösung bestimmt, wobei die relative Fluoreszenz vor der Zugabe von Mikrotubuli auf 100 % und nach ATP Zugabe auf 0 % gesetzt wurde. Falls die KipAhktail-Proteine dimerisieren und perfekt miteinander arbeiten, sollte nach der Zugabe von Mikrotubuli die relative Fluoreszenz auf 50 % abfallen, weil einer der Köpfe an einen Mikrotubulus bindet und sein ADP freigibt, während der zweite Kopf ungebinden bleibt. Erst nach ATP-Zugabe und dem daraus resultierenden Vorwärtsschritt bindet auch der zweite Kopf und gibt ebenfalls sein ADP frei, wodurch die relative Fluoreszenz auf 0 % absinkt (Abb. 2.15). Bei Monomeren, bei denen die einzelnen

Proteinketten sich nicht gegenseitig beeinflussen, müsste die Fluoreszenz nach Mikrotubuli-Zugabe direkt auf 0 % fallen.

Man erkennt, dass die relative Fluoreszenz nach Zugabe von Mikrotubuli auf 30,3 % statt wie erwartet auf 50 % abnimmt (Abb. 2.16). Erst nach ATP-Zugabe fällt die Fluoreszenz auf 0 % ab. Dieses Ergebnis kann durch mehrere Effekte erklärt werden. Einerseits wurde in früheren Studien gezeigt, dass die Abnahme der Fluoreszenz um mehr als 50 % auf eine leichte Dissoziation des MantADP vom zweiten, ungebundenen Kopf zurückzuführen ist (Hackney, 2002). Andererseits könnte ein kleiner Teil der KipAhtail-Proteine nicht dimerisieren und wie Monomere ihr MantADP komplett freigeben.

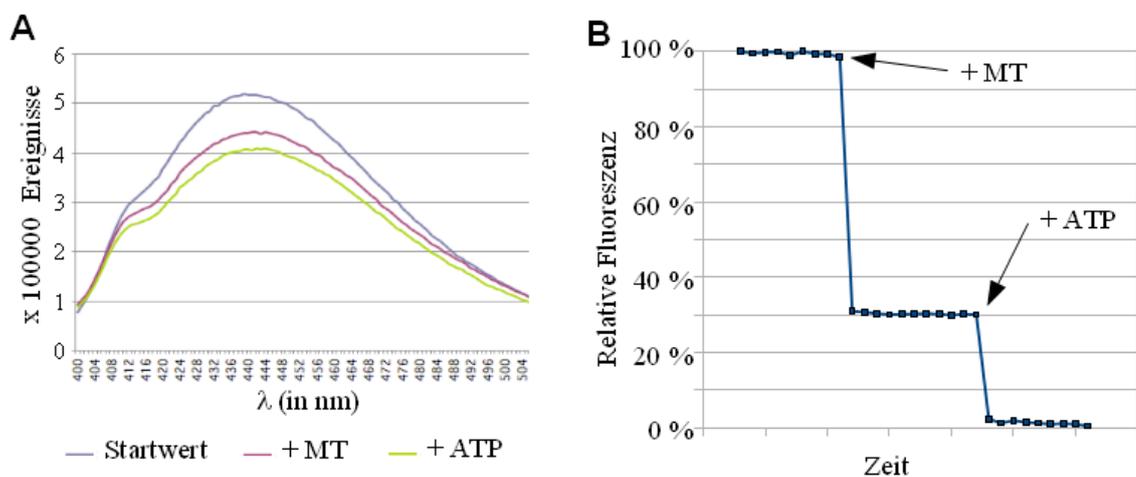


Abb. 2.16: **MantADP Freisetzungsexperimente an KipA.** **A)** Es wurde die Anzahl der gemessenen Ereignisse über das volle Emissionsspektrum bei den drei Zuständen (zum Startwert, nach MT-Zugabe und nach ATP-Zugabe) aufgenommen. **B)** Nach Zugabe der äquimolaren Menge an Mikrotubuli sank die Fluoreszenz auf 30 %, was einer Freisetzung von 70 % des Mant-ATPs entspricht. Nach anschließender Zugabe von 1 mM ATP nahm die Fluoreszenz bis auf das Hintergrundlevel ab.

Die MantADP-Freisetzungsexperimente zeigen, dass es sich bei dem Kinesin-7 Protein KipA um einen dimeren Motor handelt.

Im ATPase- und im Motilitäts-Tests konnte gezeigt werden, dass KipA aktiv ist und sich unter ATP-Verbrauch entlang von Mikrotubuli bewegt. Die gemessene Geschwindigkeit, mit der das

Protein an Mikrotubuli entlang läuft, reicht auch *in vivo* aus, um die Plus-Enden der wachsenden Mikrotubuli zu erreichen.

Das Protein KipA aus *A. nidulans* ist charakterisiert und kann außerdem bei *in vitro* Anwendungen wie dem Transportsystem zum Einsatz kommen. Bisher beschränkt sich die Auswahl an Kinesinproteinen aus *A. nidulans* auf das Kinesin-1, KinA und somit konnte durch KipA das Auswahlpektrum vergrößert werden.



## 3 Diskussion

Molekulare Kinesinmotoren sind zu erstaunlichen Leistungen fähig und an allen wichtigen Transportprozessen der Zelle beteiligt, sei es im Stofftransport in Vesikeln oder bei der Verteilung der Chromosomen. Eine Fehlfunktion kann deshalb zu diversen, schwerwiegenden Krankheiten, wie z. B. Chorea Huntington führen (Colin et al., 2008). Das Verständnis von kinesin-vermittelten Prozessen kann somit helfen, derartige Krankheiten zu bekämpfen, oder aber auch die Einsatzmöglichkeit dieses Kinesin-vermittelten Transports in „*lab-on-a-chip*“-Anwendungen ermöglichen (Diez et al., 2004). Diese Arbeit zeigt einen Ansatz zur Verwendung von Kinesinen in einem Transportsystem im Nanobereich und befasst sich mit der biochemischen Charakterisierung des Kinesin-7 Proteins KipA aus *A. nidulans*.

### 3.1 Verwendung von Kinesinen in Transportsystemen

Kinesine sind als biomolekulare Motoren die „Arbeitstiere“ der Zellen. Es sind Komplexe aus zwei oder mehreren Proteinen, die chemische Energie meist aus der Hydrolyse der energiereichen Phosphatbindung des ATP direkt in gerichtete Bewegung umwandeln (Hua et al., 1997). Diese und viele weitere Besonderheiten machen die Motorproteine auch für die Nanotechnologie interessant. Als Voraussetzung dafür ist es notwendig, die Proteine kontrollieren zu können. Durch verschiedene molekularbiologische Methoden ist dies auch in Ansätzen schon gelungen (Kapitel 1.8). In bisher beschriebenen Experimenten wurden Mikrotubuli meist nicht als „Straßen“ fixiert, sondern über einen „Kinesinrasen“ transportiert (Hiratsuka et al., 2001; Diez et al., 2004; van den Heuvel et al., 2006). Um diesen Transport gerichtet auszuführen, wurden topographische Hindernisse verwendet. Dabei wurden die Mikrotubuli durch Kanäle

geleitet und mithilfe bestimmter Formen auch in eine bestimmte Richtung geleitet (Hiratsuka et al., 2001). Um mit diesem System etwas transportieren zu können, wurden an die Filamente mittels Biotin-Streptavidin- bzw. Antikörper-Antigen-Bindung eine Ladung gekoppelt (Rios and Bachand, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Möglichkeiten getestet, Kinesine auf Oberflächen zu heften sowie Mikrotubuli zu bewegen oder diese als „Straßen“ für den Transport von Lasten mittels anderer Kinesine zu immobilisieren (Abb. 2.1). Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt die Kinesinproteine auf Oberflächen aufzubringen. Zum einen wurde eine Fusion von verschiedenen Motordomänen jeweils mit dem Hydrophobin DewA aus *A. nidulans*, zum anderen die direkte Kopplung einer Motordomäne an aufgetragene Lipide verwendet. Die beiden Ansätze wurden miteinander verglichen. Dazu wurde die ATP-Umatzrate und die Transportgeschwindigkeit gemessen. Im ATPase-Test wurden die Unterschiede der biochemischen Charakteristika der verschiedenen Kinesinkonstrukte aufgezeigt. Außerdem stellte dieser Test sicher, dass es sich bei den bakteriell exprimierten Proteinen um funktionale Enzyme handelte. Im Motilitäts-Test zeigten sich Unterschiede der Transportgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Oberfläche.

## **Immobilisierung der Mikrotubuli-“Straßen“**

### **A) Kinsein-Hydrophobin-Fusion**

Zur Immobilisierung der Mikrotubuli wurden die Motordomänen zweier Kinesine (Kif5A und KinA) mit einem Hydrophobin aus *A. nidulans* (DewA) fusioniert und anschließend *rigor*-Mutationen eingefügt. Dieser Weg wurde gewählt um einerseits die Immobilisierung der Kinesine auf unterschiedlichen Oberflächen zu verwirklichen. Linder et al. (2002) beschreiben die Fusion des HFBI, einem Hydrophobin der Klasse II aus *Trichoderma reesei*, mit der katalytischen Domäne einer Endoglukanase I aus *T. reesei*. Die aufgereinigten Proteine hefteten sich auf hydrophoben Oberflächen und waren dort noch enzymatisch aktiv.

Andererseits wurde die Fusion gewählt um die Stabilität des Kinesin-Hydrophobin-Proteins zu erhöhen, da die verwendeten Kinesin-Proteine alleine bei Raumtemperatur ungefähr eine Stunde aktiv bleiben. Es wurde schon über die hohe Resistenz und Stabilität der Hydrophobin-

schicht, gegen chemische und mechanische Belastungen auf Oberflächen berichtet (Wösten and de Vocht, 2000; Stefano et al., 2007).

Die im Motilitäts-Tests gemessenen Geschwindigkeiten der verschiedenen Kinesinkonstrukte unterschieden sich teils sehr unterschiedlich. Sowohl die beiden Umgebungsfaktoren Temperatur und Luftfeuchte, als auch die beiden internen Faktoren Protein- und ATPase-Gehalt, die nach Adio et al. (2006) wesentlichen Einfluss auf die Geschwindigkeit haben, wurden während aller Durchläufe beibehalten, und können somit als Ursachen für die Geschwindigkeitsunterschiede ausgeschlossen werden. Dagegen wurde in der vorliegenden Arbeit durch unterschiedliche Oberflächenbehandlung verschiedene Kontaktwinkel realisiert und zwecks Vergleich der Hydrophobizität vermessen. Dabei wurden Bereiche von  $9^\circ$  (plasma-gereinigtes Glas) bis  $140^\circ$  (Teflon) überspannt. Das erstmals untersuchte Kif5ADewA zeigt exakt dasselbe Verhalten bezüglich der Testoberflächen wie das bekannte Kif5A. Dieses durch Jaud et al. (2006) beschriebene Protein haftet durch die Fusion mit dem C-terminalen Teil des Kif5B an Oberflächen. Die gemessenen Geschwindigkeiten der transportierten Mikrotubuli waren jedoch beim Kif5A-Protein auf allen Oberflächen durchschnittlich um 83.5 % größer als die für Kif5ADewA beobachteten (Abb. 2.3). Im Vergleich der ATPase-Aktivitäten konnte gezeigt werden, dass Kif5A mit  $15,5 \pm 1,6 \text{ s}^{-1}$  136 % der Aktivität von Kif5ADewA ( $11,4 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ , Tab. 2.1). Die Ergebnisse der beiden Experimente lassen vermuten, dass das Hydrophobin DewA im Fusionsprotein die Aktivität negativ beeinflusst. Möglicherweise kommt es dabei zu Behinderung der Dimerisierung der Kinesine durch das Hydrophobin, indem z. B. sterische Effekte den Bewegungsmechanismus des Kinesins stören Asakawa et al. (2009).

Weiterhin fällt auf, dass bei jedem einzelnen Protein die Geschwindigkeiten mit steigender Hydrophobizität tendenziell abnehmen (Abb. 2.3). Dies kann von sehr vielen Faktoren abhängen, da die Oberflächen unterschiedlich behandelt wurden. Man erkennt auch, dass die Mikrotubuli sich auf silanen-beschichteten Oberflächen, besonders bei PFMS am langsamsten bewegen. Eine solche Abhängigkeit der Transportgeschwindigkeit von der Oberfläche wurde bisher noch nie beschrieben. Dies könnte von der Beschichtung mit Silanen herrühren, aber auch in der Vorbereitung für die Beschichtung begründet sein. Nur auf der Teflonoberfläche haftet keines der Kinesinkonstrukte. Zumindest bei Kif5ADewA ist das überraschend, da das

Hydrophobin DewA bekannt dafür ist, selbst auf Teflon eine feste Einzelschicht zu bilden (Wösten, 2001). Diese Bindung ist aber bei dem Fusionsprotein nicht zu beobachten. Auch hier könnte die Fusion mit einem anderen Protein die Ursache für dieses Verhalten sein. Eine mögliche Lösung der beiden Probleme wäre die Einbringung eines Abstandshalters zwischen den beiden Proteinen (Paulmurugan and Gambhir, 2005). Dadurch hätten die Proteine die Möglichkeit sich unabhängiger voneinander in die richtige Position zu bewegen da es nicht mehr zu sterischen Hinderungen käme (Asakawa et al., 2009). Desweiteren zeigten Asakawa et al. (2009), dass Hydrophobin-Fusionsproteine mit Hydrophobin-Molekülen gemischt werden sollten. Die Hydrophobine dienen so als Abstandshalter zwischen den Fusionsproteinen um sterischer Behinderungen in horizontaler Richtung zu verhindern.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte eignet sich das Fusionsprotein Kif5A<sub>rigor</sub>DewA gut zur Fixierung von Mikrotubuli auf vielen Oberflächen, außer auf Teflon. Um die Kinesine in einem gewünschten Muster zu binden, können diese durch „electron beam“ Lithographie in Teflon-beschichtete Oberflächen gebrannt werden (Karre et al., 2009). So entstehen Stellen, an denen das Teflon entfernt und die Oberfläche freigegeben wurde. An diesen Stellen könnten die Kinesine letztendlich binden und Mikrotubuli immobilisieren.

Als vielversprechende Besonderheit ist zu erwähnen, dass Kif5ADewA in löslicher Form in *E. coli* exprimiert werden kann. Bisher sind alle exprimierten Hydrophobine, auch mit Fusionsprotein, unlöslich und liegen in Einschlusskörperchen vor (Kirkland and Keyhani, 2010). Die Löslichkeit wird vermutlich durch den vergleichsweise großen Fusionspartner Kif5A bewirkt. Betrachtet man also – in umgekehrter Sichtweise zum ursprünglichen Experimententwurf – nicht das Hydrophobin, sondern Kif5A als Fusionsprotein, folgt aus den vorliegenden Untersuchungen, dass durch den Einsatz von Kif5A als Fusionsprotein die Gewinnung löslicher Hydrophobine erheblich vereinfacht werden könnte. Ein nächster Schritt zur Aufreinigung des Hydrophobins DewA wäre die Einführung einer Proteaseschnittstelle zwischen die Motordomäne des Kif5A und DewA. Somit ließe sich das Protein an die Ni-NTA-Säule binden und direkt daran verdauen. Nach der Elution mit Imidazol würde man ein Hydrophobin in löslicher Form erhalten, das nur noch einen kleinen His<sub>6</sub>-Tag trägt.

Analoge Untersuchungen wurden für ein Fusion der Motordomäne des pilzlichen Kinesin-1

aus *A. nidulans*, KinA, mit dem Hydrophobin DewA durchgeführt. Exemplarisch wurde der Einfluss dreier Oberflächen auf die Transportgeschwindigkeiten der Mikrotubuli gezeigt (Tab. 2.2). Zur Vervollständigung dieses Experiments könnten die Transportgeschwindigkeiten durch KinA441DewA noch auf den anderen Oberflächen getestet werden.

#### **B) Direkte Kinesin-Lipid-Kopplung**

Alternativ zur Fusionsmethode wurden im zweiten Teil dieser Arbeit Kinesinproteine auf Oberflächen fixiert, indem mittels DipPen Nanolithographie gewünschte Muster einer Lipidmischung, die 50 mol% DOGS-Ni-NTA enthielt, auf eine Oberfläche aufgebracht wurde. Unter Ausnutzung der Chelatierung von His<sub>6</sub>-getaggtten Proteinen an das in der Lipid-Kopfgruppe gebundene Ni-Ion konnte das Protein gebunden werden. In früheren Studien konnte die Bindung von His<sub>6</sub>-getaggtten GFP und Streptavidin an die Phospholipide gezeigt werden (Sekula et al., 2008). In dieser Arbeit wurde die positive Protein-Lipid-Bindung durch GFP-Fusion eines Kinesins fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden. Nach Zugabe von Mikrotubuli kam es zu deren Bindung auf den Mustern, es konnte jedoch keine Bewegungen beobachtet werden (Abb. 2.4). Dies könnte mit der Fusion der Kinesinmotordomäne KinA441 mit GFP zusammenhängen. Markierungsproteine wie GFP führen in einigen Fällen aufgrund ihrer Größe zu sterischer Hinderung der zu untersuchenden Proteine. Die Einführung eines Abstandshalters könnte dieses Problem lösen (Paulmurugan and Gambhir, 2005). Bekanntlicherweise tritt bei einigen mit dem zylindrischen GFP markierten Proteinen Inaktivität aufgrund einer durch die Markierung verursachten Änderung der Quartärstruktur aufgrund unkorrekter Faltung auf (Gadella et al., 1999).

Aufgrund der Vermutung wurde die Motordomäne des KinA ohne GFP-Fusionspartner exprimiert und an die Lipide gebunden. Im anschließenden Motilitäts-Test wurde eine Geschwindigkeit der Mikrotubuli von  $8 \pm 1 \mu\text{m}/\text{min}$  gemessen (Abb. 2.5). Diese liegt jedoch weit unter dem gemessenen Wert des Motilitäts-Tests, bei dem das KinA über das Hydrophobin DewA direkt auf der Oberfläche haftete ( $17,1 \pm 5 \mu\text{m}$ ). Möglicherweise ist der Grund hierfür bei den Lipiden zu suchen, denn diese bilden kein starres Netzwerk, sondern eine flüssige Schicht (Singer and Nicolson, 1972). Aufgrund der, im Vergleich zu den Kinesinen, relativ großen Masse und dem Reibungswiderstand der Mikrotubuli in flüssiger Umgebung ist es

möglich, dass sich die lipidgebundenen Kinesine bei jedem Schritt, den sie nach vorne machen, sich gleichzeitig etwas nach hinten schieben, d. h., dass sich die Mikrotubuli relativ zur Oberfläche langsamer fortbewegen. Durch verschiedene Lipidzusammensetzungen könnte dies möglicherweise verringert oder ganz unterbunden werden. Durch Beimischung von Phosphatidylethanolamin (PE) und den Einsatz von Dimethyl Suberimidate (DMS) würden die Lipide miteinander vernetzt und somit die Ausbildung eines steiferen Netzwerks gefördert werden (Roth et al., 1989). Eine weitere Möglichkeit bietet der Zusatz von Cholesterin oder Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren, welche die Membranfluidität senken (Sherban et al., 1982).

### **Bindung der Ladungen für ein Transportsystem**

Um den Ladungstransport durch Kinesine zu optimieren, wurden ebenfalls zwei Ansätze getestet. Einerseits wurden die zu transportierenden Nanopartikel mit einer Lipidmischung beschichtet und das Kinesinkonstrukt Kif5APH über seine „Pleckstrin homology“-Domäne an diese Lipide gekoppelt. Die dazu verwendete PH-Domäne stammt von UncA, einem Kinesin-3 aus *A. nidulans* welches in Zekert and Fischer (2009) beschrieben wurde. Da man von der Struktur einer PH-Domäne nicht auf die Lipidsorte schließen kann, an die sie bindet, wurde als erstes ein Lipid-Bindeassay durchgeführt (Haslam et al., 1993). Bei diesem Test konnte gezeigt werden, dass das Protein Kif5APH bevorzugt an Phosphatidylserin bindet. Dies wurde durch einen Flotationsassay bestätigt (Abb. 2.6). Dieses Ergebnis ist überraschend, da PH-Domänen bekannt dafür sind an PIP-Lipide zu binden (Wang and Shaw, 1995; Hamman et al., 2002). Die PH-Domäne von UncA wäre somit die erste bekannte Domäne dieser Art, die bevorzugt an PS bindet. PS sitzt in den Membranen lebender, eukariontischer Zellen in der cytosolischen Seite, sodass die PH-Domäne direkt mit diesen Lipiden interagieren könnte (Leventis and Grinstein, 2010). Zur Überprüfung dieser Ergebnisse sollte die PH-Domäne jedoch noch alleine oder mit einem anderen Fusionspartner exprimiert werden, um auszuschließen, dass die Fusion mit dem vergleichsweise großen Kinesinmotor keinen Einfluss auf die Lipid-Bindesepezifität hat.

In Kap. 2.1.2 wurde durch einen Motilitäts-Test nachgewiesen, dass Kif5APH trotz Lipidbin-

derung aktiv, und demnach als Motor im Transportsystem geeignet ist (Abb. 2.7). Die Transportgeschwindigkeit der Mikrotubuli wurde mit  $6 \mu\text{m}/\text{min}$  gemessen und ist somit deutlich langsamer als die Geschwindigkeit durch Kif5A ( $23,22 \pm 1,4 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Auch hierbei könnte der große Geschwindigkeitsunterschied auf der Zähflüssigkeit der Lipide begründet sein.

Im zweiten Versuchsaufbau wurde die Bindung der Kif5A-Proteine an zu transportierende Latexkügelchen getestet. Dabei ist die Schwanzdomäne des Kinesins für die Bindung direkt verantwortlich (Jaud et al., 2006). Im Motilitäts-Test konnte die Bewegung der Kügelchen über Mikrotubuli beobachtet werden (Geschwindigkeit:  $10 \pm 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$ , Abb. 2.9).

In beiden Ansätzen war ein wesentlicher Teil der eingebrachten Lasten jedoch auf Mikrotubuli immobilisiert und bewegten sich nicht. Eine Inaktivierung der Kinesinproteine während des Inkubationsprozesses erscheint bei einer Beobachtungsdauer im Motilitäts-Test von bis zu einer Stunde wenig wahrscheinlich. Die Behinderung des Laufes aufgrund der vollständigen Bedeckung der Mikrotubuli durch die *rigor*-Konstrukte kann dagegen nicht ausgeschlossen werden. Wenn die Filamente an die, auf der Oberfläche gehefteten Motoren fixiert sind, kann es sein, dass noch frei schwimmende Kinesin *rigor*-Mutanten die Mikrotubuli von allen Seiten bedecken. Somit ist es dem aktiven Kinesin, das die Ladung transportieren sollte, nicht möglich loszulaufen, oder die Bewegung ist stark behindert (Telley et al., 2009). Dies würde auch die kleinere Bewegungsgeschwindigkeit der Lasten in beiden Ansätzen im Vergleich zur Transportgeschwindigkeit von Mikrotubuli im Motilitäts-Test auf Glas ( $23,22 \pm 1,4 \mu\text{m}/\text{min}$ ) erklären (Abb. 2.3). Daneben könnten sich infolge der identischen Dimerisierungsdomänen von Kif5A und Kif5A<sub>rigor</sub>DewA Heterodimeren ausgebildet haben. Bei einem solchen Prozess kommt es zum Austausch der einzelnen Proteinketten zwischen denen mit und ohne *rigor*-Mutation. Diese Theorie bestätigend berichteten Thoresen and Gelles (2008), dass Heterodimere mit Mutation in einem Kopf trotzdem aktiv sind und prozessive Bewegungen zeigen, aber die Transportgeschwindigkeit verringert ist. Auch von anderer Seite wurde diese Behinderung der Bewegung beobachtet (persönliche Unterhaltung mit Dr. Wöhlke).

Zur Lösung dieses Problems können zur Immobilisierung der Mikrotubuli andere Kinesin *rigor*-Konstrukte, wie z. B. KinA441<sub>rigor</sub>DewA, verwendet werden.

## Transportsystem

Zur Etablierung eines funktionellen Transportsystems wurden die Erkenntnisse der beiden vorangegangenen Versuchsteile zusammengeführt. Zum endgültigen Aufbau des Transportsystems wurden die Mikrotubuli mit rigor-Kinesinen immobilisiert. Anschließend wurden Lasten, ebenfalls mit Kinesinen, über die Mikrotubuli-„Straßen“ transportiert. Es wurden Latexkügelchen durch Kif5A (Abb. 2.9) und lipidbeschichtete Nanopartikel durch Kif5APH (Abb. 2.8) transportiert. Mit beiden Ansätzen konnte ein funktionierendes Transportsystem im Nano-Maßstab etabliert werden. Noch auftretende Probleme sollten durch Änderungen der Proteinkonzentrationen zu beseitigen sein.

Eine weitere Weiterentwicklung des *in vitro*-Systems wäre die spezifische Ausrichtung der Mikrotubulifilamente. Dies kann durch Anlegen eines elektrischen Feldes erreicht werden. Uppalapati et al. (2010) konnten durch Befestigung von Mikrotubuli an Elektroden und anlegen eines Gleichstroms die Plus-Enden von Mikrotubuli aufeinander richten. Die durch diesen Ansatz ausgerichteten Mikrotubuli könnten nun durch *rigor*-Mutanten von Kinesin auf Oberflächen fixiert werden. Zur Verwendung in wirtschaftlichen *in vitro*-Systemen muss die Stabilität der Proteine erhöht werden, und es muss Möglichkeiten geben diese zu lagern. Dafür zeigten Uppalapati et al. (2008a) mehrere Ansätze auf, wie die Proteine durch Gefrier-trocknung mehrere Wochen ohne signifikante Verschlechterung der Qualität gelagert werden konnten.

## 3.2 Charakterisierung von KipA

Die Mitglieder der Familie der Kinesin-7 Proteine sind dafür bekannt, während der Mitose eine wichtige Rolle in der Positionierung und Verteilung der Chromosomen in der Metaphase zu spielen (Brown et al., 1996). Dies trifft auch auf das Kinesin-7 aus *A. niulans* KipA zu. Wie in Konzack et al. (2005) beschrieben, lokalisiert KipA im Zentrum und an den Polen der Mitose-spindel. Dies spricht dafür, dass sich das Protein genauso verhält wie in anderen Organismen. Das am besten untersuchte Kinesin-7 ist das menschliche CENP-E (Kim et al., 2008). Auch dieses ist an den gleichen Positionen zu finden wie KipA. Die Besonderheit des pilzlichen KipA ist, dass es außerhalb der Mitose noch weitere Aufgaben übernimmt. Es wurde ebenfalls in Konzack et al. (2005) beschrieben, dass KipA an den Spitzen wachsender Mikrotubuli lokalisiert und diese dekoriert. Diese Ergebnisse konnten durch mikroskopische Kontrolle bestätigt werden (Abb. 2.10).

Nun sagen diese *in vivo*-Untersuchungen nichts darüber aus, wie KipA an die Spitze der Mikrotubuli gelangt. *In vitro*-Studien im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass es sich bei KipA um ein aktives Protein handelt. Dazu wurde die enzymatische Aktivität des Proteins bestimmt und dabei wurde eine ATP-Umsatzrate von  $6,73 \pm 0,42$  /s gemessen (Abb. 2.13). Dieser Wert ist vergleichbar der Umsatzrate des CENP-E aus *Xenopus laevis* ( $13,2$  /s) (Wood et al., 1997). Auch der  $K_{0,5,MT}$ -Wert ist mit  $0,43 \pm 0,08$   $\mu$ M ähnelt dem anderer Motoren, und weist darauf hin, dass es sich bei KipA um einen Dimer handelt. Der  $K_{0,5,MT}$ -Wert liegt bei dimeren Kinesinen bei ungefähr  $0,5$   $\mu$ M, während er bei monomeren Proteinen mit weit über  $1$   $\mu$ M erheblich größer ist (Rogers et al., 2001).

Ein weiterer Hinweis dafür, dass KipA ein dimeres Motorprotein ist, ergab sich auch den Mant-ADP-Freisetzungsexperimenten. Bei diesen Versuchen reduzierte sich die relative Fluoreszenz nach Zugabe einer äquimolaren Menge an Mikrotubuli zu Mant-ADP-KipA-Komplexen, auf ungefähr  $0,3$ , was einer Abnahme um  $70\%$  entspricht. Nach Beimischung von  $1$  mM ATP sank die Fluoreszenz auf den Wert des Hintergrundsignals ab (Abb. 2.16). Bei perfekt koordinierten Dimeren müsste nach Mikrotubuli-Zugabe die Hälfte des gebundenen Mant-ADPs freigesetzt werden und die relative Fluoreszenz um die Hälfte absinken, da ein Kinesinkopf sein ADP nach der Bindung an Mikrotubuli schnell freigibt. Die Zugabe von  $1$  mM ATP

führt dazu, dass es im gebundenen Kopf des Kinesindimers zu einem Kraftschlag kommt, so dass nun der zweite Kopf an Mikrotubuli bindet und ebenfalls sein Mant-ADP freigeben kann (Adio et al., 2006). Somit ist die Fluoreszenz auf dem Level des Hintergrundsignals angekommen. Die stufenweise Abnahme der Fluoreszenz deutet eher auf ein dimeres Kinesin hin, da bei Monomeren die relative Fluoreszenz ohne Zwischenschritt auf 0 % absinkt (Ma and Taylor, 1997a; Moyer et al., 1998). Dies ist der Fall, da Monomere bei Mikrotubuli-Zugabe alle zur selben Zeit binden können und somit das komplette gebundene Mant-ADP freigesetzt wird. Die nach Zugabe von Mikrotubuli beobachtete Abnahme, um 70 % anstelle der erwarteten 50 %, kann unterschiedlich gedeutet werden. Entweder arbeiten die Dimere nicht perfekt koordiniert zusammen, oder es haben sich nicht alle Proteinketten zu Dimeren zusammengeslossen. Eine Erklärung für letztere Vermutung wäre, dass die Proteine bakteriell in *E. coli* exprimiert wurden und es im Bereich des ersten *coiled-coils* nicht immer zu einer perfekten Faltung des Proteins kam (Baneyx and Mujacic, 2004). Somit sind einige nicht zur Dimerisierung fähig und bleiben als Monomere vorliegen.

Im *in vitro*-Motilitäts-Test konnte gezeigt werden, dass sich die Mikrotubuli mit Geschwindigkeiten von  $9,48 \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$  vorwärts bewegen (Abb. 2.14). Da diese Geschwindigkeit sich auf ein Vorwärtskommen in 8 nm Schritten bezieht (Yildiz et al., 2008), würde man einen größeren ATP-Umsatz erwarten ( $158/8 \text{ nm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = 19,75 \text{ s}^{-1}$ ). Wenn man hingegen die Geschwindigkeiten der wachsenden Mikrotubulifilamente misst, erkennt man, dass diese sich mit  $8,93 \pm 1,1 \mu\text{m}/\text{min}$  verlängern (Abb. 2.10). Somit wandern die Motorproteine mit geringfügig höherer Geschwindigkeit. Folglich ist es den Kinesinproteinen möglich an den Mikrotubuli entlang zu wandern und dessen Spitze zu erreichen. Das bringt im Gegensatz zur direkten Lokalisierung am Plus-Ende den Vorteil mit sich, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Motorprotein auf ein Filament trifft und bis zu dessen Spitze läuft wesentlich größer ist, als die einer direkten Kollokalisierung. Außerdem können so die Kinesine den wachsenden Mikrotubuli folgen können. Im Vergleich zum CENP-E aus *X. laevis* ( $5,1 \mu\text{m}/\text{min}$ ) bewegt sich KipA fast doppelt so schnell (Wood et al., 1997). Dies kann mit der Wachstumsgeschwindigkeit des Ursprungsorganismus zusammenhängen. Der Schimmelpilz *A. nidulans* versucht so schnell wie möglich einen großen Bereich zu bewachen. Dafür ist nicht nur ein schnelles Spitzenwachs-

tum notwendig, sondern alle Prozesse der Zelle müssen sehr rasch ablaufen. Dies spiegelt sich auch in der Dauer der Mitose wieder. Bei HeLa-Zellen benötigt die Mitose ca. 40 min., während sie bei *A. nidulans* in 5 min. beendet ist (Rao and Engelberg, 1968; Bergen and Morris, 1983).

Der physiologische Vorteil für den Pilz, dass KipA zum wachsenden Pol der Mikrotubuli läuft und sich dort festsetzt ist nicht genau geklärt. In der Spaltheife *S. pombe* wurde jedoch gezeigt, dass das KipA Homolog Tea2 ebenfalls an der Mikrotubulispitze lokalisiert und den Zellendmarker Tea1 transportiert (Browning et al., 2000, 2003). Wenn das Plus-Ende den Zellkortex erreicht, wird Tea1 am Zellpol fixiert. Das Tea1 Homolog aus *A. nidulans* TeaA lokalisiert aber unabhängig von KipA an der Spitze der Filamente (Fischer et al., 2008). Es könnte sein, dass die Akkumulation von KipA am Mikrotubuli Plus-Ende ein evolutionäres Überbleibsel ist, da die filamentösen Pilze jünger sind als die Hefen. Es könnte aber auch mehrere Wege geben, den Zellendmarker zum Spitzenkörper zu transportieren, sodass im  $\Delta kipA$  Hintergrund der Transport von TeaA gesichert ist. Gegen diese Tatsachen spricht, dass diese Möglichkeiten eine Verschwendung von Ressourcen darstellen und keinen Vorteil bringen. Es ist daher wahrscheinlicher, dass KipA andere Aufgaben übernimmt, die bisher noch nicht untersucht wurden. Ein Effekt des Fehlens von KipA ist, dass bei *kipA* Deletionsmutanten die Positionierung des Spitzenkörpers nicht immer im Zentrum der Hyphenspitze stattfindet und die Hyphe somit kurvig wächst (Konzack et al., 2005). Diese Beobachtung lässt Rückschlüsse auf eine Rolle im polaren Wachstum des Pilzes zu. Weiterhin müsste noch untersucht werden, wie die Aktivität des KipA reguliert wird. Bei humanem CENP-E wurde gezeigt, dass es nach der Aufreihung der Chromosomen durch Phosphorylierung eines Threonins einer bei den Tieren konservierten Sequenz (R R V/R T W) zu einer festen Bindung zwischen Mikrotubuli und Chromosom kommt (Kim et al., 2010). Nach eigener Untersuchung findet sich diese Sequenz aber weder bei Kinesin-7 Proteinen von *A. nidulans* noch bei *U. maydis*, somit muss die Regulation dieser pilzlichen Proteine anders ablaufen. Des Weiteren könnte man die natürlichen Lasten von KipA untersuchen. Es ist bisher unklar was KipA transportiert. Es gibt einen großen Unterschied zu dem Homolog in *S. pombe*, Tea2. Dieses transportiert Tea1 und das CLIP-170 Homolog Tip1p zum Mikrotubuli Plus-Ende (Busch et al., 2004). In

*A. nidulans* lokalisiert das Tea1 Homolog TeaA auch ohne KipA an der Hyphenspitze (Browning et al., 2003). Wie es dort hingelangt ist noch unklar. Eine weitere interessante Aufgabe für zukünftige Untersuchungen ist die Identifikation der Interaktionspartner, über die KipA an das Kinetochor lokalisiert sowie die experimentelle Charakterisierung dieses Bindungsprozesses. Beim CENP-E aus *X. laevis* wurde gezeigt, dass das Protein direkt mit dem Kinetochor der Chromosomen interagiert und diese so, nach der Aufreihung in der Metaphasenplatte, an der Kinetochorfaser fixiert (Kim et al., 2008). KipA aus *A. nidulans* ist sehr viel kleiner als das CENP-E (Abb. 1.4). Deshalb ist in *A. nidulans* das Homolog zum humanen CENP-H, KatA, als *linker* zur Verbindung zwischen Kinesin und Kinetochor notwendig (nicht veröffentlichte Daten).

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei KipA um einen prozessiven Motor handelt, der aktiv an Mikrotubuli entlang läuft. Dieser wäre auch eine Alternative für andere Kinesine bei *in vitro*-Anwendungen. Durch KipA ist die Palette an in Transportsystemen einsetzbaren Motorproteinen erweitert worden.

# 4 Material und Methoden

## 4.1 Material

### 4.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den folgenden Firmen bezogen: Invitrogen (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Biorad (München), Merck (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Roche Diagnostics (Penzberg). Das Verbrauchsmaterial wurde überwiegend von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), VWR (Darmstadt) und Greiner (Frickenhäusen) geliefert. Die Restriktionsenzyme und Polymerasen stammten von New England Biolabs (Schwalbach).

### 4.1.2 Biologisches Material

#### Organismen und Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende Organismen verwendet:

Tab. 4.1: Verwendete *Aspergillus nidulans*-Stämme

<i>A.nidulans</i>	Genotyp	Herkunft
GR5	pyrG89; wA3; pyroA4; veA1	(Waring et al., 1989)
SSK100	pyrG89; wA3; alcA(p)::mRFP1::kipB; alcA(p)::gfp::kipA::pyr4; veA1 GFP-KipA und mRFP1-Microtubuli	(Konzack et al., 2005)

Tab. 4.2: Verwendete *Escherichia coli*-Stämme

<i>E.coli</i>	Genotyp	Herkunft
XL1-Blue	endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)	Stratagene
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-	Invitrogen
GM2163	F-ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2	Fermentas
BL21 (DE3) RIL	F- ompT hsdS(rB- mB-)dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]	Stratagene

Tab. 4.3: Erstellte Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Konstruktion</b>	<b>Herkunft</b>
pCR2.1-TOPO	TA-Klonierungsvektor für PCR Fragmente	Invitrogen
pCMB17apx	alcA(p)::GFP, pyr4; Zur N-terminalen GFP-Fusion	V.Efimov, (USA)
pQE60	Expressionsvektor mit c-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	Quiagen
pET21b	Expressionsvektor mit c-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	Novagen
pET24a	Expressionsvektor mit c-terminalem His <sub>6</sub> -Tag	Novagen
pPS03	Motordomäne von AnKinA (441 aa) in pQE60	P.Seibold
pPS12	Motordomäne von AnKinA (441 aa) mit Hydrophobin DewA (136 aa) in pQE60	P.Seibold
pET24aKif5A	Kif5A-Motor (436 aa) mit Kif5B-Schwanz (107 aa) in pET24a	(Ebbing et al., 2008)
pTS10	Motordomäne von AnKinA (441 aa) mit DewA (115 aa) in pET21b	Diese Arbeit
pTS11	Motordomäne von AnKinA (441 aa) in pET21b	Diese Arbeit
pTS12	Motordomäne von AnKinA (441 aa) mit GFP(242 aa) in pET21b	Diese Arbeit
pTS13	AnKipA (889 aa) in pET21b	Diese Arbeit
pTS25	Kif5A-Motor (436 aa) in pET24a	Diese Arbeit
pTS26	Kif5A-Motor mit DewA (115 aa) in pET24a	Diese Arbeit
pTS27	Kif5A-Motor mit UncA PH Domäne (121 aa) in pET24a	Diese Arbeit
pTS29	pTS26 mit rigor-Mutation T93N	Diese Arbeit
pTS32	pTS26 coiledcoil Deletion (aa 339 - 436)	Diese Arbeit
pTS33	pTS29 coiledcoil Deletion (aa 339 - 436)	Diese Arbeit
pTS36	pTS13 Schwanzdeletion (aa 640 - 889)	Diese Arbeit
pTS37	pTS36 mit Kif5B-Schwanz (107 aa)	Diese Arbeit

**Anzucht und Lagerung von *E.coli***

Die Anzucht der Bakterien erfolgte nach Standardmethoden (Sambrook and Russel, 2000) auf Agarplatte oder in Flüssigkultur (200 rpm). Die Temperatur bei der Aufzucht betrug in der Regel 37 °C, wurde aber zur Expression auf 23 °C erniedrigt. Zur langfristigen Lagerung wurden 500  $\mu$ l der Kultur mit 500  $\mu$ l 50% Glycerin gemischt, bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Tab. 4.4: Medien für *E.coli*

Medium	Zusammensetzung (je l)
LB-Medium	5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 5 g NaCl
SOB	0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub>
SOC	SOB Medium mit 20 mM Glukose

### Wachstum von *Aspergillus nidulans*

Die *A. nidulans* Medien wurden wie bei (Pontecorvo et al., 1953) beschrieben, hergestellt. *A. nidulans* Voll- und Minimalmedien wurden je nach Stamm und Versuch mit Vitaminen, Aminosäuren, Nukleotiden und für Transformationsexperimente mit osmoprotektiven Substanzen (Tab. 4.5 und 4.6) komplementiert. Bei Festmedien wurde zusätzlich 1,5% Agar eingewogen.

Tab. 4.5: Medien für *A.nidulans*

Medium	Zusammensetzung (je l)
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stamm; 20 g Glucose; 2 g Pepton; 1 g Hefeextrakt; 1 ml Vitaminlsg.; 1 ml Spurenelementlsg.; mit 10 M NaOH auf pH 6.5
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stamm; 1 ml Spurenelementlsg.; 2% Glucose, Glycerin, Threonin oder Ethanol; mit 10 M NaOH auf pH 6.5, zur Regeneration von Protoplasten mit 0.6 M KCl supplementiert
Salzstamm (20x)	120 g NaNO <sub>3</sub> ; 10.4 g KCl; 10.4 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O; 30.4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Spurenelementlösung (1000x)	22 g ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O; 11 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 5 g MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O; 5 g FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O; 1,6 g CoCl <sub>2</sub> x 5H <sub>2</sub> O; 1,6 g CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O; 1,1 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O; 50 g Na <sub>4</sub> EDTA; mit Kaliumhydroxidplättchen auf pH 6,5-6,8
Vitaminlösung (1000x)	0.1 g D-Biotin; 0.1 g Pyridoxin-HCl; 0.1 g Thiamin-HCl; 0.1 g Riboflavin; 0.1 g p-Aminobenzoesäure; 0.1 g Niacinsäure

Tab. 4.6: Zusätze für *A.nidulans* Medien

Substanz	Konzentration der Stammlösung	eingesetzte Menge pro 1 l
Uracil	-	1 g
Uridin	-	1 g
Pyridoxin-HCl	0,05 %	1 ml

## Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurde bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geordert und sind nachfolgend von 5' nach 3' aufgelistet. In Klammern stehen die angefügten Restriktionsschnittstellen:

### Klonierung von *kipA* aus *A.nidulans* in pET21b

KipA for: (*NdeI*)

GATCATATGTCTACACTGCCGCAGCC

KipA rev: (*HindIII*)

CGAAGCTTTGCACTTGGACGACTGTTTAG

Herstellung von *kipA* in pET21b zu Expression von KipA

### Deletion des 3' Endes (letzten 789 bp) von *kipA*

KipA tail del for: (*EcoRI*)

GTGAATTCAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGC (5' Phosphat)

KipA tail del rev: (*BamHI*)

CGGATCCTCCTTGTGAGTTGACGCCTGTGG (5' Phosphat)

Herstellung von *kipA*-tail aus *kipA* in pET21b zu Expression von KipA-tail

### 3' Endes von *kif5B* zur Fusion an *kipA*-tail

Kif5B tail for: (*BamHI*)

TGGATCCGATGACAAGGATGAAGAAATTAAC

Kif5B tail rev: (*EcoRI*)

TGAATTCGTGGTTGGTCATTCCTTAAG

Herstellung von *kipA*-tail mit *kif5B*tail in pET21b zur Expression von KipAhktail

**Deletion des 3'Endes (letzten 321 bp) von *kif5A* aus *H.sapiens***

Kif5A tail del for: (*Pst*I)

GCCTGCAGGTCATCAAGCTGTTTGTATAA (5'Phosphat)

Kif5A tail del rev: (*Bam*HI)

TGGATCCGCGAATTCGAGCTCCGTCGAC (5'Phosphat)

Herstellung von *kif5A*-tail in pET24a zur Expression von Kif5A-tail

**Hydrophobin *dewA* zur Fusion an *kif5A*-tail**

DewA for: (*Pst*I)

GCCTGCAGCCGGCCTCTGCCGCAAAG

DewA rev: (*Bam*HI)

TGGATCCCTCAGCCTTGGTACCAGCGCC

Herstellung von *kif5A*-tail mit *dewA* in pET24a zur Expression von Kif5A\_DewA

**PH Domäne von *uncA* zur Fusion an *kif5A*-tail**

PH for: (*Pst*I)

GCCTGCAGTCTAAAACCTGGGTATCTGTAATGC

PH rev: (*Bam*HI)

TGGATCCTCTCCCGGACCTGTTGGTTCG

Herstellung von *kif5A*-tail mit *PH* in pET24a zur Expression von Kif5A\_PH

**Rigormutation von *kif5A*- tail mit *dewA***

Kif5A T92N for:

GCATCAGGCCAAACATCCTCTGGGAAGAACCACACAATGGAGGG

Kif5A T92N rev:

CCCTCCATTGTGTGGTTCTTCCCAGAGGATGTTTGGCCGTATGC

Herstellung der Rigormutante von Kif5A und Kif5A\_DewA in pET24a

### **Deletion der *coiled-coil* Domäne von *kif5A***

Kif5A coil del for:

GACCTGCAGCCGGCCTCTG (5'Phosphat)

Kif5A coil del rev:

TGTTAACTCAAGATTAACGCTAGCAGTG (5'Phosphat)

Herstellung von *coiled-coil* Deletionen in pET24a zur Expression von Kif5A\_coidel und Kif5A\_coidel\_DewA

### **Umklonierung von *kinA441dewA* aus pQE60 in pET21b**

KinA441 for: (*NdeI*)

GATCATATGGCGTCCTCTACCTCTAACCCC

6His rev: (*NotI*)

TGCGGCCGCGTGATGGTGATGGTGATGAGATCT

Herstellung von *kinA441dewA* in pET21b zu besseren Expression

### **Umklonierung von *kinA441* aus pQE60 in pET21b**

KinA441 for: (*NdeI*)

GATCATATGGCGTCCTCTACCTCTAACCCC

His<sub>6</sub> rev: (*NotI*)

TGCGGCCGCGTGATGGTGATGGTGATGAGATCT

Herstellung von *kinA441* in pET21b zu besseren Expression

### **C-terminale Fusion von GFP an *KinA441***

GFP for: (*BamHI*)

TGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTC

GFP rev: (*BamHI*)

GATGGATCCTTTGTATAGTTCATCCATGC

Fusion von *GFP* an *KinA441* in pET21b

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 RNA Extraktion

Das Mycel eines über Nacht in flüssigem CM-Medium gewachsenen Pilzes wurde in flüssigem Stickstoff in vorgekühlten Mörsern gemörsert. 1 g des Pulvers wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) bis zur Homogenität gemischt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (13.000 rpm; 10 min; 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurden 200  $\mu$ l Chloroform zugegeben, für 15 s gevortext und für 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zentrifugation (13.000 rpm; 15 min; 4 °C) wurde die ober Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von Isopropanol (500  $\mu$ l), Inkubation (10 min; RT) und anschließender Zentrifugation (13.000 rpm; 10 min; 4 °C) präzipitiert. Anschließend wurde das RNA Pellet mit 70 % EtOH gewaschen (9.000 rpm; 5 min; 4 °C) und bei Raumtemperatur getrocknet. Auf Eis wurde 30  $\mu$ l RNase-freies Wasser und 0,3  $\mu$ l RNase Out (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben, die RNA gelöst (2 min; 80 °C) und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt und die Qualität der RNA auf einem 1,2 %igen Agarosegel überprüft.

### 4.2.2 cDNA Synthese

Zur Synthese der cDNA erfolgte mit dem „Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit“ (Invitrogen). Dabei wurde 1  $\mu$ g RNA in einem Volumen von 8  $\mu$ l verdünnt und mit 1  $\mu$ l 10x DNase Puffer und 1  $\mu$ l *DNaseI* vermischt, verdaut (15 min, 25 °C) und durch Zugabe von 1  $\mu$ l mM EDTA (10 min; 65 °C) wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden je 1  $\mu$ l 10 mM dNTPs und Oligo dT Primer zugegeben und inkubiert (5 min; 65 °C). Der Mixtur wurde nach Abkühlung (1 min; Eis) die restlichen Zutaten beigefügt (4  $\mu$ l 5x First Strand Puffer; 1  $\mu$ l 100 mM DTT; 1  $\mu$ l RNase Out; 1  $\mu$ l Superscript II Reverse Transkriptase) und die cDNA synthetisiert (60 min; 42 °C). Als letzter Schritt wurde die Reaktion durch Erhitzen gestoppt (10 min; 70 °C) und die cDNA bei -20 °C eingefroren.

### 4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA Fragmente nach ihrer Größe zu trennen wurden 1 bis 2% (w/v) Agarose in 0,5x TAE Puffer verwendet. Zur Detektion der DNA Fragmenten wurde der flüssigen Agarose 0,05  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid hinzugefügt. Die mit 6x Ladepuffer vermischten DNA Proben wurden im Agrose-Gel bei konstanter Spannung (5 V/cm) bis zum gewünschten Grad aufgetrennt. Die Banden wurden durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid unter UV Bestrahlung visualisiert und mittels einer CCD Kamera aufgenommen.

50x TAE:            2 M Tris/HCl pH 8,5  
                         1 M Eisessig  
                         50 mM EDTA

6x Ladepuffer:    30 % (v/v) Glycerin  
                         0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
                         0,25 % (w/v) Xylencyanol

### 4.2.4 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, in ein 2 ml Eppendorf-Reaktiongefäß überführt und unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Quiagen, Hilden) aufgereinigt. Die DNA wurde in 30  $\mu\text{l}$  TE Puffer oder  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

1x TE Puffer:    10 mM Tris pH 8  
                         1 mM EDTA

### 4.2.5 Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

Die DNA Konzentration in Lösungen wurde fotometrisch bei 260 nm bestimmt ( $E_{260}$ ). Dabei entspricht bei doppelsträngiger DNA eine Absorption  $E_{260}$  von 1,0 einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ . Bei RNA entspricht dies einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  (Sambrook and Russel, 2000).

## 4.2.6 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde mittels „*Quick and dirty*“-Methode aus Bakterien isoliert. Dafür wurden 2 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur abzentrifugiert (1 min; 10.000 rpm; 4 °C) und das entstandene Pellet in 200  $\mu$ l *Cell-Suspension* Puffer resuspendiert. Durch Zumischung von 200  $\mu$ l *Cell-Lysis* Puffer und anschließend 200  $\mu$ l KAc Puffer wurden die Bakterien lysiert und die Zelltrümmer abzentrifugiert (8 min; 13.000 rpm; 4 °C). Der Überstand wurde zu 500  $\mu$ l Isopropanol gegeben und die so gefällte DNA sedimentiert (15 min, 13.000 rpm; 4 °C). Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30  $\mu$ l TE-Puffer gelöst. Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mittels NucleoBond PC 100 (Macherey-Nagel, Düren) gewonnen. Für sehr saubere DNA, wie z.B. für Sequenzierungen benötigt, wurde das Quiagen Plasmid Kit (Quiagen, Hilden) verwendet.

Cell-Suspension Puffer: 50 mM Tris pH 7,5

10 mM EDTA

10 mg RNaseA

Cell-Lysis Puffer: 1 % (w/v) SDS

0,2 M NaOH

KAc Puffer: 1,5 M KAc pH 4,8

## 4.2.7 DNA-Verdau mit Restriktionsendonucleasen

Die Verifizierung der DNA-Sequenzen der verwendeten Plasmide erfolgte durch einen Restriktionsverdau. Je nach Restriktionsenzym (New England Biolabs, Frankfurt) wurden 1-5 U/ $\mu$ g DNA eingesetzt. Der Verdau wurde in dem vom Hersteller angegebenen Puffer angesetzt und je nach Enzym bei der passenden Temperatur für 1-4 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung bei der für das Enzym angegebene Temperatur gestoppt. Die entstandenen Fragmente konnten durch Auftrennung in einem Agarosegel analysiert werden.

### 4.2.8 Ligation von DNA- Fragmenten

Verdaute DNA-Fragmente, welche aus Agarosegelen extrahiert wurden, wurden mittels T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt) in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  bei 16 °C für mindestens 4 h ligiert. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Phosphate vorher mittels Antarctic Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt) entfernt.

### 4.2.9 Präparation von SEM kompetenten Zellen

Es wurde eine 20 ml Übernacht-Kultur des gewünschten *E.coli* Stammes in 500 ml SOB Medium auf eine  $\text{OD}_{600} = 0,2$  verdünnt. Diese wurde bei 18 °C und 200 rpm mehrere Stunden geschüttelt. Bei  $\text{OD}_{600} = 0,6$  wurde die Kultur 10 min auf Eis inubiert und dann bei 1000 g für 10 min sedimentiert. Das Pellet wurde in eiskaltem TB aufgenommen und wieder 10 min auf Eis gestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 20 ml TB aufgenommen und 7 % DMSO (v/v) hinzugegeben. Die Suspension wurde aliquotiert (100  $\mu\text{l}$ ) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

TB Lösung: 10 mM PIPES/KOH pH 6,7  
55 mM  $\text{MnCl}_2$   
15 mM  $\text{CaCl}_2$   
250 mM KCl

### 4.2.10 Hitzeschock-Transformation von *E.coli*

Ein Aliquot der kompetenten *E.coli* wurde auf Eis aufgetaut. Zu 100  $\mu\text{l}$  kompetenten Zellen wurden 1-10 ng Plasmid-DNA bzw. 5-10  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 1 min bei 42 °C, gefolgt von einer zweiminütigen Inkubation auf Eis. Nach der Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  SOC-Medium folgte eine 1-stündige Erholungsphase der Zellen bei 37 °C und leichtem Schütteln (200 rpm). Die Zellen wurden abschließend auf Antibiotika-haltigem Medium ausplattiert und über Nacht inkubiert (37 °C).

### 4.2.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der „*Polymerase Chain Reaction*“ (PCR). Für Standard-PCR-Reaktionen wurde die „*Phusion High Fidelity DNA Polymerase*“ (NEB) mit dem zugehörigen Puffer verwendet. Die Reaktionsansätze enthielten 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 0,5  $\mu\text{M}$  von jedem Primer und 0.02 U/50  $\mu\text{l}$  Polymerase im Reaktionspuffer. Als Vorlage wurden verschiedene DNA (cDNA, Plasmid-DNA) verwendet. Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde die DNA für 30 s bei 98 °C denaturiert. Dann folgten 35 Zyklen: 98 °C, 10 s; 55-68 °C (je nach Primer unterschiedliche Schmelztemperaturen) 30 s; 72 °C, 30 s/kb. Das PCR Produkt wurde nach dem „Qiaquick PCR Purification Kit“ Protokoll von Nucleotiden und Enzym getrennt. Wenn eine PCR zur Kontrolle eines DNA-Fragments durchgeführt wurde, wurde eine in *E.coli* exprimierte *Taq*-Polymerase verwendet. Bei dieser Reaktion wurde die DNA zu 250  $\mu\text{M}$  dNTPs, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{M}$  von jedem Primer und 1  $\mu\text{l}$  *Taq*-Polymerase gegeben. Nach der Denaturierung (2 min, 95 °C) folgten 40 Amplifikationszyklen (95 °C 20 s, 55-68 °C (je nach Primer unterschiedliche Schmelztemperaturen) 20 s, 72 °C 1 min/kb). Zur Kontrolle wurden die Amplifikate auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 4.2.12 Herstellung von *Taq*-Polymerase

Die eigens hergestellte *Taq*-Polymerase wurde in *E.coli* exprimiert. Dazu wurde eine Übernachtskultur von *E.coli* Zellen, welche das Expressionsplasmid trugen, in 100 ml LB (Amp) auf eine  $\text{OD}_{600} = 0,1$  verdünnt und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Bei  $\text{OD}_{600} = 0,3$  wurde durch Zugabe von 0,5 M IPTG die Expression gestartet und für weitere 24 h geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Suspension abzentrifugiert und das Pellet in 6 ml Puffer A aufgenommen. Zur Lyse der Bakterien wurden 12 mg Lysozym zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml Puffer B wurde die Suspension auf 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 1 h bei 75 °C leicht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden abzentrifugiert (13000 rpm, 10 min, RT) und der Überstand in einen vorbereiteten Dialyseschlauch eingefüllt. Die Dialyse erfolgte für mindestens 12 h gegen 500 ml Lagerpuffer. Danach wurde der Lagerpuffer gewechselt und erneut 12 h inkubiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal

wiederholt. Nun wurde die Lösung aus dem Schlauch entnommen und 1:10 mit DNase Storage Puffer verdünnt. Zum Verdau der noch vorhandenen DNA wurde mit DNase I Lösung für 30 min inkubiert. Jetzt wurde die Lösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Puffer A:	50 mM Tris pH 7,5
	20 mM Glukose
	1 mM EDTA
Puffer B:	10 mM Tris
	50 mM KCl
	1 mM EDTA
	0,5 % Tween 20
Lagerpuffer:	50 mM Tris
	100 mM NaCl
	0,1 mM EDTA
	0,5 mM DTT
	1 % Triton X100
10x DNase Storage Puffer:	150 mM Tris/HCl pH 7,5
	100 mM CaCl <sub>2</sub>
	80 mM MgCl <sub>2</sub>
	50 % Glycerin

#### 4.2.13 Generierung von Punktmutationen

Die gezielte Einführung von Mutationen (ortsgerichtete Mutagenese) erfolgt, entsprechend der Methode des „*QuikChange Kits*“ (Stratagene), durch Verwendung von Punktmutationsprimern. Diese sind bis 45 Basen lang und zueinander komplementär. Sie tragen mittig das neue, vom Template abweichende, Codon. Ihre Schmelztemperaturen wurden zwischen 65 und 70 °C gewählt. Nach Abschluss der PCR wurden der Reaktionsmischung 2 µl *DpnI* zugegeben und 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgtem Verdau der Template DNA wurde 3 µl des Ansatzes in *E.coli* XL1 blue Zellen transformiert.

## 4.3 Biochemische Methoden

### 4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Die zu untersuchenden Proben wurden mit 4x Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Dann wurden die Proben sowie ein Proteinmarker im Gel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur bis zum Probeneinlauf in das Trenngel mit 8 V/cm, anschließend mit 15 V/cm in einem Mini Protean II System (BioRad, München) durchgeführt.

### 4.3.2 Färbung von SDS Gelen

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für 30 min in der Färbelösung und anschließend bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Entfärber unter leichtem Schütteln inkubiert.

Färbelösung: 100 mg Coomassie-Brillant-Blue G250 in 50 ml 90 % Ethanol  
50 ml 20 % Essigsäure

Entfärber: 20 % Ethanol  
10 % Eisessig

### 4.3.3 Western Blotting

Durch *Western Blotting* wurden die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Protean® Nitrocellulosemembran (Whatman, Dassel) transferiert. Vor dem Aufbau des *Blots* wurden die Bestandteile in Transferpuffer getränkt und wie folgt aufgebaut: Anode - Saugpad - Whatman Papier - Membran - Gel - Whatman Papier - Saugpad - Kathode. Das *Blotting* erfolgte ebenfalls mittels Mini Protean II System (BioRad, München) für 2 h bei RT und 100 V bzw. über Nacht bei 4 °C und 30 V. Nach dem *Blotten* wurde die Membran mit Ponceaurot gefärbt, die Markerbanden markiert und mit Wasser entfärbt. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT in *Blocking Reagenz* geblockt. Danach wurde der erste Antikörper in *Blocking Reagenz* zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert und anschließend dreimal 15 min in TBS-T gewaschen. Danach wurde der zweite Antikörper in TBS-T für 1 h bei RT zugegeben. Anschließend wur-

de wieder mehrfach mit TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels eines ECL Western Blotting Kits (Prod. # 32209, Pierce, Rockford, USA) in einem Chemi-Smart (Peqlab, Elan-gen).

Transferpuffer:	50 mM Tris pH 7,5
	20 mM Glukose
	1 mM EDTA
Ponceaurot Lösung:	10 mM Tris
	50 mM KCl
	1 mM EDTA
	0,5 % Tween 20
TBS-T:	50 mM Tris
	100 mM NaCl
	0,1 mM EDTA
	0,5 mM DTT
	1 % Triton X100
Blocking Reagenz:	TBS-T + 5% Milchpulver

#### 4.3.4 PIP-Strips™ Assay

Dieser wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt (Cat.# P-6001, Echelon, Salt Lake City, USA).

#### 4.3.5 Membran Flotationsassay

Dazu wurde das Lösungsmittel, in dem die Lipide aufgenommen wurden, verdampft und die Lipide in LBN-Puffer wieder rehydriert. Dies geschieht durch 45 minütige Beschallung mit Ultraschall und anschließend 10 Einfrier- und Auftauschritte bei -20 °C. Die so entstandenen Lipidvesikel wurden mit Kif5APH bei 4 °C über Nacht auf einem Rolltisch inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe mit LB-Puffer (mit 2 M Saccharose) bis zu einer Saccharose-Endkonzentration von 1,6 M vermischt. Darüber wurde LB-Puffer mit verschiedenen Sac-

charosekonzentrationen (1,4 M, 0,4 M und 0,1 M) überschichtet. Nach Ultrazentrifugation (201.000 g, 1 h, 4°C) wurde der gesamte Stufengradient fraktioniert. Die wichtigsten Fraktionen lagen an den Grenzen 1,6 M / 1,4 M und 0,4 M / 0,1 M. Zwischen 1,6 M und 1,4 M sammeln sich die ungebundenen Proteine während solche, an Lipidvesikel gebundene Proteine mit diesen aufschwimmen und sich an der 0,4 M / 0,1 M Grenze anreichern. Diese Fraktionen wurden auf einer SDS-PAGE oder einem *Western Blot* analysiert.

LB-Puffer: 30 mM Tris; pH = 8,0

4 mM EGTA

LBN-Puffer: LB-Puffer mit 150 mM NaCl

### 4.3.6 Expression von Kinesin-Konstrukten

Eine Übernachtskultur wurde mit einer frisch transformierten *E.coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene Inc.) Kolonie inokuliert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur in TPM Medium auf eine  $OD_{600} = 0,2$  verdünnt und anschließend bei 22 °C schüttelnd inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 0,1 mM IPTG bei einer  $OD_{600} = 0,5$  und anschließend wurden die Zellen weiterhin bei 22 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen geerntet (10.000 rpm, 15 min, 4 °C), in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TPM-Medium: 2 % Trypton

1,5 % Hefeextrakt

0,8 % NaCl

0,2 %  $Na_2HPO_4$

0,1 %  $KH_2PO_4$

0,2 % Glukose

### 4.3.7 Aufreinigung der Kinesine mit His-Taq

Die Zellen der Expression wurde im vierfachen Volumen Lysepuffer gelöst. Die Zellen wurden mittels einer *French Press* (AMINCO, USA) lysiert und anschließend die Zelltrümmer

durch Zentrifugation (136.000 g, 45 min, 4 °C) entfernt. Währenddessen wurde das Ni-NTA Säulenmaterial (Ni Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare, Chalfont St Giles) dreimal sedimentiert (500 rpm, 2 min, 4 °C) und mit Lysepuffer gewaschen. Nun wurde das äquilibrierte Säulenmaterial mit dem Überstand der Zentrifugation vermischt und 1 h bei 4 °C rollend inkubiert. Die Mischung wurde auf eine Leersäule geladen und je zweimal mit Waschpuffer I und II gewaschen. Die Proteine wurden danach mit Elutionspuffer eluiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

- Lysispuffer: 50 mM Na-Phosphat pH 8.0  
250 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM ATP  
20 mM Imidazol  
10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol  
1 mM PMSF
- Waschpuffer I: 50 mM Na-Phosphat pH 6.0  
250 mM NaCl  
2mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1mM ATP  
50 mM Imidazol  
10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol
- Waschpuffer II: 50 mM Na-Phosphat pH 6.0  
250 mM NaCl  
2mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1mM ATP  
100 mM Imidazol  
10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol
- Elutionspuffer: 50 mM Na-Phosphat pH 7.4  
250 mM NaCl  
2mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1mM ATP  
300 mM Imidazol  
10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol  
15 % Glycerin

### 4.3.8 Aufreinigung mittels

#### Kationen-Austauscher-Chromatographie

Zur weiteren Reinigung der AnKipA Konstrukte wurde eine Kationen-Austauscher-Chromatographie durchgeführt. Zuerst wurde eine 1 ml HiTrap SP HP Sepharose-Säule (GE Healthcare, Uppsala) an die FPLC-Anlage (Amersham) angeschlossen. Die Säule wurde zuerst mit destillem Wasser gewaschen und nach Vorschrift des Herstellers vorbereitet. Zur Eichung des an die FPLC angeschlossenen Leitfähigkeitsmessers wurde die Säule zuerst mit mindestens 5 Säulenvolumen Puffer B gewaschen, bis die Ionenstärke konstant blieb. Dieser Wert wurde auf 100 % B gesetzt. Dann wurde die Säule mit mindestens 5 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert und auf Ionenstärke 0 % B kalibriert. Die Ni-NTA Elutionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden gepoolt und 4 fach mit Puffer A mit 1 mM DTT verdünnt, um die Bindung des Kinesins an das Ionentauscher-Material zu ermöglichen. Mit Hilfe der Peristaltikpumpe wurden die verdünnten NI-NTA direkt auf die Säule geladen. Nach dem Beladen wurde die Säule mit Puffer A weiter gewaschen bis die Absorption  $E_{280}$  ein Plateau erreichte. Dann wurde die Elution des Proteins gestartet mit einem manuell erzeugten Stufengradient von 50 mM bis 1 M NaCl (5 bis 100 % B, durch Mischen von Puffer A und Puffer B). Der Gradient wurde in 1,5 ml Fraktionen aufgesammelt. Die Identifizierung und Reinheit der Hauptfraktionen wurden in einem 10 % igen SDS-Gel und deren Aktivität im schnellen ATPase-Test getestet (s. 2.5.1). AnKipA eluiert je nach Konstrukt zwischen 250 und 300 mM. Die Fraktionen wurden vereinigt und mit 15 % Glycerin zugesetzt und 100  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Puffer A: 20 mM Na/Phosphat pH 7,4  
2 mM  $\text{MgCl}_2$

Puffer B: Puffer A mit 1 M NaCl

Die Puffer wurden entgast und kurz vor der Aufreinigung mit 10  $\mu$ M ATP versetzt

### 4.3.9 Aktivitätsaufreinigung von Kinesinen

Um reine Fraktionen von aktiven Motoren zu erhalten wurden die Proteine nach der Ni-NTA Aufreinigung über einen Mikrotubuli Binde- und Ablöseschritt weiter aufgereinigt. Dazu wurden die Elution aus der Ni-NTA Aufreinigung mit der 3 - 4-fachen Menge an Taxol-stabilisierten Mikrotubuli, 20  $\mu\text{M}$  Taxol und 0,2 mM AMP-PNP (Sigma-Aldrich, St.Louis) vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kinesin-Mikrotubuli-Komplexe wurden durch ein Saccharosekissen (40 % in BRB80) sedimentiert (200.000 g, 10 min, 25 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde einmal mit BRB80/20  $\mu\text{M}$  Taxol gewaschen und in 100  $\mu\text{l}$  Ablösepuffer resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert (200.000 g, 10 min, 25 °C) um die abgelösten, aktiven Motoren von den Mikrotubuli zu trennen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt um möglichst alle Motoren abzulösen. Die Ablösefraktionen wurden mit 15 % Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

BRB80: 80 mM Pipes/KOH pH 6,8

1 mM  $\text{MgCl}_2$

1 mM EGTA

### 4.3.10 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen wurden mittels eines Bradford Tests durchgeführt (Bradford, 1976). Um die Farbreaktion zu starten, wurde 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz mit 10  $\mu\text{l}$  Probe und 790  $\mu\text{l}$  Wasser vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde mit einem Fotometer gemessen. Zu jeder Messung wurde eine Eichgerade mit BSA parallel gemessen und daraus die Konzentration der Probe berechnet. Bei manchen Aufreinigungen war die Verunreinigung bakterieller Proteine recht hoch. Deshalb war die Proteinbestimmung mit dem Bradford-Reagenz nicht aussagekräftig. In diesen Fällen wurde für genauere Proteinbestimmung SDS-PAGE mit verschiedenen Mengen an Protein (3, 5 und 10  $\mu\text{l}$ ) durchgeführt. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt und im feuchten Zustand dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms „ImageJ“ (National Institutes of Health).

Dabei wurde zunächst die Dichte der verschiedenen Protein-Banden jeder Spur notiert und daraus der Prozentsatz der Kinesin Bande ausgerechnet. Die aus dem Bradford-Test abgeleitete Konzentration wurde um diesen Faktor korrigiert.

Bradford-Reagenz: 0,125 g Coomassie Blue G250  
60 ml 99,8 % Ethanol  
125 ml 85 % Phosphorsäure ad 250 ml H<sub>2</sub>O

#### **4.3.11 Aufreinigung von neuronalem Tubulin aus Schweinehirn**

Tubulin wurde über drei Polymerisations- und Depolymerisationszyklen und anschließende Ionenaustausch-Chromatografie gereinigt (in Anlehnung an Mandelkow et al. (1985)). Unmittelbar nach der Schlachtung entnommene Schweinehirnhälften wurden einzeln in Eis eingebettet. Im Kühlraum wurden Bindegewebe und Blutgefäße entfernt. 700 g Hirn wurde nach Zugabe von 700 ml Puffer A in einem Zerkleinerer (Braun) homogenisiert und anschließend zentrifugiert (27.500 g, 4 °C, 70 min). Der Überstand wurde unter Rühren mit 25 % Glycerin (v/v) und 2 mM ATP versetzt. Danach wurde im Wasserbad bei 35 °C unter leichtem Schütteln für 30 min inkubiert, um das Tubulin zu polymerisieren. Die Mikrotubuli wurden anschließend bei 32 °C sedimentiert (138.000 g, 45 min). Die Sedimente wurden mit 50 ml Puffer B in einem 50 ml Glashomogenisatoren (Wheaton) aus Eis resuspendiert. Anschließend wurden die Mikrotubuli für 25 min unter mehrmaligem Homogenisieren auf Eis depolymerisiert und die Lösung zentrifugiert (100.000 g, 4 °C, 30 min). Der Überstand wurde mit 2 mM ATP versetzt und erneut im Wasserbad bei 35 °C für 20 min unter leichtem schütteln polymerisiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 32 °C (85.000 g, 60 min). Die sedimentierten Mikrotubuli wurden vereinigt, gewogen, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Für die weitere Reinigung des Tubulins wurde Phosphocellulose (P-11, Whatman) nach Herstellerangaben aktiviert. Etwa 25 ml P11 Material (entspricht 75 ml Totalvolumen) wurden in eine Säule (XK 26, Pharmacia) gepackt. Zum Äquilibrieren des Ionenaustauschers wurde die Säule an die FPLC-Anlage angeschlossen. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurden etwa 3 Säulenvolumen Puffer D durchflossen. Parallel dazu wurden 10 - 20 g Mikrotubuli aufgetaut und in einem Glashomogenisator in 50 ml Puffer C

für 25 min auf Eis depolymerisiert. Nach der Zentrifugation (100.000 g, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand mit 10 % DMSO und 2 mM ATP versetzt und das Tubulin bei 35 °C für 20 min polymerisiert. Daraufhin wurden die Mikrotubuli sedimentiert (85.000 g, 32 °C, 60 min), die Sedimente mit 5 ml Puffer D auf Eis in einem 10 ml Homogenisator resuspendiert und anschließend für 30 min depolymerisiert. Die Tubulin-Lösung wurde zentrifugiert (80.000 g, 4 °C, 30 min) und der Überstand mittels einer Peristaltikpumpe (Pharmacia, Amersham) auf die Phosphocellulose-Säule aufgetragen. Nachdem die Probe in das Ionenaustauschermaterial eingezogen war, wurde mit Puffer D bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Im Gegensatz zu Mikrotubuli-assoziierten Proteinen bindet Tubulin unter diesen Pufferbedingungen nicht. Mit einem Fraktionssammler wurden 1 ml-Fraktionen aufgefangen. Die Identifikation der Hauptfraktionen erfolgte über einen Bradford-Test. Die am stärksten gefärbten Fraktionen wurden vereinigt und nach Zugabe von 0,1 mM GTP in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Puffer A: 100 mM PIPES/NaOH pH 6,9

1 mM MgSO<sub>4</sub>

2 mM EGTA

0,1 mM ATP

1 mM DTT

Puffer B: 100 mM PIPES/NaOH pH 6,9

1 mM MgSO<sub>4</sub>

1 mM EGTA

1 mM ATP

1 mM DTT

Puffer C: 500 mM PIPES/NaOH pH 6,9

1 mM MgSO<sub>4</sub>

1 mM EGTA

1 mM ATP

1 mM DTT

Puffer D: 100 mM PIPES/NaOH pH 6,9

1 mM MgSO<sub>4</sub>

1 mM EGTA

0,05 mM ATP

1 mM DTT

Alle Puffer wurden auf pH 6,9 bei 4 °C eingestellt

### 4.3.12 Herstellung Taxol-stabilisierter Mikrotubuli

Eingefrorenes Tubulin wurde aufgetaut und zentrifugiert, um denaturiertes Material zu entfernen (270.000 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde 1 mM GTP zugesetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 20 μM Taxol (Paclitaxel, Invitrogen) wurde für wei-

tere 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde durch 40 % Saccharose in ATPase-Puffer (s. 2.5.2) mit 10  $\mu\text{M}$  Taxol zentrifugiert (270.000 g, 10 min, 22 °C). Das Saccharose-Kissen wurde einmal mit ATPase-Puffer gewaschen, dann wurde das Pellet mit ATPase-Puffer mit 20  $\mu\text{M}$  Taxol gewaschen und schließlich darin resuspendiert. Das Endvolumen wurde so eingestellt, dass die Mikrotubuli eine Endkonzentration von etwa 100  $\mu\text{M}$  Tubulin-Dimer aufwiesen. Für ATPase-Tests, bei denen keine genaue Kenntnis der Mikrotubuli-Konzentration erforderlich war, wurde die zusätzliche Reinigung der Mikrotubuli über das Saccharose-Kissen ausgelassen. In manchen Fällen war die genaue Konzentration der Mikrotubuli nicht wichtig und deshalb wurden sie ungereinigt polymerisiert. Dafür würde 1mM GTP zugegeben und 25 min bei 37 °C polymerisiert und nach 10 min durch Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  Taxol stabilisiert.

### 4.3.13 Bestimmung der Mikrotubulikonkonzentration

Die Mikrotubuli-Konzentration wurde nach Denaturierung in Guanidinium-HCl im Fotometer bei OD<sub>280</sub> bestimmt:

90  $\mu\text{l}$  6,6 M Guanidinium-HCl, 10  $\mu\text{l}$  Mikrotubuli (1:10 bzw. 1:5 in ATPase-Puffer mit 20  $\mu\text{M}$  Taxol verdünnt)

90  $\mu\text{l}$  6,6 Guanidinium-HCl, 10  $\mu\text{l}$  ATPase-Puffer mit Taxol, als Nullwert

Die Mikrotubuli-Konzentration berechnet sich bei einer 1:10 Verdünnung der Mikrotubuli nach folgender Formel (Huang und Hackney, 1994):

$$(\text{OD}_{280}/1,03) \cdot 10 \cdot \text{Verdünnung} = \text{mg/ml Mikrotubuli}$$

Die molare Mikrotubuli-Konzentration errechnet sich über das Molekulargewicht eines Tubulin-Dimers (etwa 100.000 g/mol).

### 4.3.14 Herstellung von Fluoreszenz-markiertem Tubulin

Um Mikrotubuli unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wurde gereinigtes Tubulin aus Schweinehirn mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA (rot, C-1171, Invitrogen) oder Atto488 NHS-ester (gelb, ATTO-TEC, Siegen) markiert. Der Markierungsvorgang erfolgt durch Bindung der reaktiven Farbstoff-succinimidyl Ester an polymerisierte Mikrotubuli. Um die Effi-

zienz der Reaktion zu optimieren wurde diese bei hohem pH-Wert durchgeführt und das noch funktionelle Tubulin durch einige De- und Polymerisationsschritte separiert. 3 - 5 ml gereinigtest Tubulin wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 mM GTP und 10 % DMSO versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 30 min (37 °C) polymerisiert. Das polymerisierte Tubulin wurde auf ein 4 ml High-pH Pufferkissen gegeben und zentrifugiert (270.000 g, 15 min, 25 °C). Währenddessen wurde der Farbstoff in wasserfreiem DMSO gelöst. Nach der Zentrifugation wurde das Pufferkissen vorsichtig entfernt, das Pellet mit warmem BRB80/20  $\mu$ M Taxol gewaschen und in 1 - 2 ml Markierungspuffer resuspendiert. Bei diesem Schritt ist es wichtig bei 37 °C zu arbeiten, um die Depolymerisation zu minimieren. Die resuspendierten Mikrotubuli wurden vorsichtig mit der 10-fachen molaren Menge an Farbstoff vermischt und unter mehrmaligem leichtem Mischen für 30 - 40 min bei 37 °C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde das gleiche Volumen an Quencherpuffer zugegeben, gut vermischt und weitere 5 min inkubiert. Dann wurde die Mischung auf ein 3 ml Low pH Pufferkissen gegeben und zentrifugiert (270.000 g, 15 min, 25 °C). Anschließend wurde auch dieses Kissen vorsichtig entfernt, das Pellet mit warmem BRB80/20  $\mu$ M Taxol gewaschen und in einem vorgekühlten Homogenisator in 1 ml eiskaltem 1 x IB Puffer im Eiswasserbad resuspendiert. Die Lösung wurde so lange homogenisiert bis es eine einheitliche Suspension entstanden ist, welche dann weitere 30 min auf Eis depolymerisiert wurde. Die Tubulin Lösung wurde erneut zentrifugiert (270.000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand auf 1x BRB80 (aus einer 5x Stocklösung) eingestellt, mit 1 mM GTP ergänzt und 3 min auf Eis inkubiert. Nachdem die Mischung 2 min bei 37 °C vorgewärmt wurde, wurde 33 % Glycerin (v/v) zugegeben und die Mikrotubuli 30 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C polymerisiert. Nun wurde ein 1 ml Low pH Pufferkissen mit den polymerisierten Mikrotubuli überschichtet und zentrifugiert (270.000 g, 15 min 25 °C). Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und das Pellet mit 1 ml warmem IB Puffer gewaschen. Die Mikrotubuli wurden in 0,2 - 0,4 ml kaltem IB Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis depolymerisiert. In einem letzten Zentrifugationsschritt (270.000 g, 10 min 4 °C) wurde das funktionelle Tubulin von den letzten Aggregaten getrennt. Der Überstand wurde in 5  $\mu$ l Aliquots in flüssigen Stickstoff eingefroren und lichtgeschützt bei -80 °C gelagert.

High pH Pufferkissen:	100 mM Na-HEPES pH 8,6 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 60 % Glycerin
Markierungspuffer:	100 mM Na-HEPES pH 8,6 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 40 % Glycerin
5x BRB80:	400 mM PIPES pH 6,8 25 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM EGTA
Quenchpuffer:	2x BR80 100mM Kaliumglutamat 40 % Glycerin
Low pH Pufferkissen:	1x BRB80 mit 60 % Glycerin
10x IB Puffer:	500 mM Kaliumglutamat pH 7,0 5 mM MgCl <sub>2</sub>

### 4.3.15 Bestimmung der Ausbeute und Markierungsstöchiometrie

Zur Bestimmung der Konzentration und Markierungsstöchiometrie wurde markiertes Tubulin 1:100 in IB Puffer verdünnt und die Absorptionen bei 280 nm (Absorption von Proteinen) und 555 nm (TAMRA) bzw. 523 nm (ATTO 488) gemessen. Unter Verwendung der Exinktionskoeffizienten für Tubulindimere ( $104.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) und TAMRA ( $65.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) bzw. ATTO 488 ( $90.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) konnte die molare Konzentration von Tubulin und Fluoreszenzfarbstoffen berechnet werden. Normale Konzentrationen von Tubulin waren 300 - 400  $\mu\text{M}$  in einem Volumen von 200 - 500  $\mu\text{l}$ . Das molare Verhältnis von Tubulin zu Farbstoff konnte wie folgt berechnet werden:

$$\text{Proteinkonzentration} = (E_{280, \text{Protein}} - E_{\text{max, Farbstoff}}) \cdot \text{CF} \cdot \text{Verdünnung} / \varepsilon_{\text{Tubulin}}$$

$$\text{Farbstoffkonzentration} = E_{\text{max, Farbstoff}} \cdot \text{Verdünnung} / \varepsilon_{\text{Farbstoff}}$$

Molare Markierungsverhältnis = Farbstoffkonzentration / Proteinkonzentration

Es betrug normalerweise zwischen 30 und 140 %.

### 4.3.16 Motilitäts-Test

Die Bewegungsgeschwindigkeit der verschiedenen Kinesin-Konstrukte wurde im in vitro Motilitätstest untersucht. Für die hierfür benötigten Mikrotubuli wurde markiertes und unmarkiertes Tubulin (5 mg/ml) 1:50 gemischt und polymerisiert. Anschließend wurden die Mikrotubuli 1:50 in BRB80 verdünnt und 20  $\mu$ M Taxol zugegeben. Für den konventionellen Multi-Motor-Gleit-Test (Paschal and Vallee, 1993) wurden 3  $\mu$ l Enzymlösung auf der Mitte eines Deckglases ausgestrichen. Zur Anheftung der Motormoleküle an das Glas wurde das Deckglas 3 bis 5 min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurden 4  $\mu$ l Caseinpuffer, 2  $\mu$ l Motilitypuffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP und 1 bis 2  $\mu$ M Mikrotubuli zugegeben. Die Probenkammer wurde mit Silikonpaste versiegelt. Die Bewegung von Mikrotubuli wurde bei Phasenkontrast-Einstellung durch ein Nikon Eclipse TE2000-E mit „Intenselight C-HGFIE“ und der Software „NIS-Elements AR 3.1“ (Nikon) betrachtet. Zur quantitativen Auswertung wurden die Aufnahmen kallibriert. Um Geschwindigkeiten zu messen, wurde an dem mit einem Objektmikrometer geeichten Bildschirm manuell die Distanz gemessen, die ein Objekt für die Bewegung zwischen zwei bestimmten Zeitpunkten benötigte. Aus den daraus errechneten Geschwindigkeiten von mindestens 100 Mikrotubuli wurde die Standardabweichung errechnet.

BRB80: 80 mM Pipes-KOH pH 6,8

1 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM EGTA

Caseinpuffer: 2,6 mg/ml Casein in BRB80 mit 1 mg/ml Glukose

Motilitypuffer: 200mM KCl in BRB80

### 4.3.17 Transport von Latex-Kügelchen durch Kinesine

Das Kinesinkonstrukt Kif5A wurde unspezifisch an carboxylierte Latex-Kügelchen (Fluoresbrite® BB Carboxylate Microspheres 1.00  $\mu\text{m}$ , Polysciences, Warrington, USA) gebunden. Aufgereinigte Kinesinkonstrukte wurden verdünnt und mit der gleichen Menge Kügelchen (1:25 verdünnt in BRB80) gemischt. Diese Lösung wurde mindestens 10 min inkubiert, damit die Kinesine an die Kügelchen binden konnten. Um Mikrotubuli zu immobilisieren, wurde der Objektträger mit dem Konstrukt Kif5ArigorDewA beschichtet und für mindestens 10 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann wurde die ungebundenen Proteine durch dreimaliges Waschen mit dem gleichen Volumen BRB80 weggespült. Anschließend wurde eine 1:50 Verdünnung von Fluoreszenz-markierten Mikrotubuli eingespült. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden ungebundene Mikrotubuli ebenfalls durch Spülen mit drei Volumen BRB80 mit 1 mg/ml Casein entfernt. Bevor die Kammer mit den Kinesin-Kügelchen gefüllt wurde, wurde das Binden der Mikrotubuli an den Objektträger mikroskopisch kontrolliert. Nun konnte 2  $\mu\text{l}$  der Kinesin-Kügelchen-Mischung und die restlichen Zutaten des Motilitätsassays zugegeben werden. Der Lauf der Latex-Kügelchen wurde unter der Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

### 4.3.18 ATPase-Test

#### Gekoppelter enzymatischer ATPase-Test

In diesem Test wird der ATP-Umsatz der Kinesin-Konstrukte im Gleichgewicht („steady-state“) gemessen. Hier ist die ATP-Hydrolyse durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH) und die Pyruvat-Kinase (PK) an die Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> geknüpft, was im Fotometer bei 340 nm verfolgt werden kann (Huang and Hackney, 1994) (Abb. 4.1). Die eingesetzten Mikrotubuli wurden wie im Kapitel 4.3.11 präpariert. Der Reaktionsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

4  $\mu\text{l}$  ATP (4°C)  
 4  $\mu\text{l}$  PEP  
 4  $\mu\text{l}$  NADH  
 2  $\mu\text{l}$  Hilfsenzyme (PK, LDH)  
 x  $\mu\text{l}$  Mikrotubuli  
 auf 79  $\mu\text{l}$  ATPase-Puffer auffüllen  
 1  $\mu\text{l}$  Kinesin (1:1-1:50 verdünnt) zum Starten der Reaktion

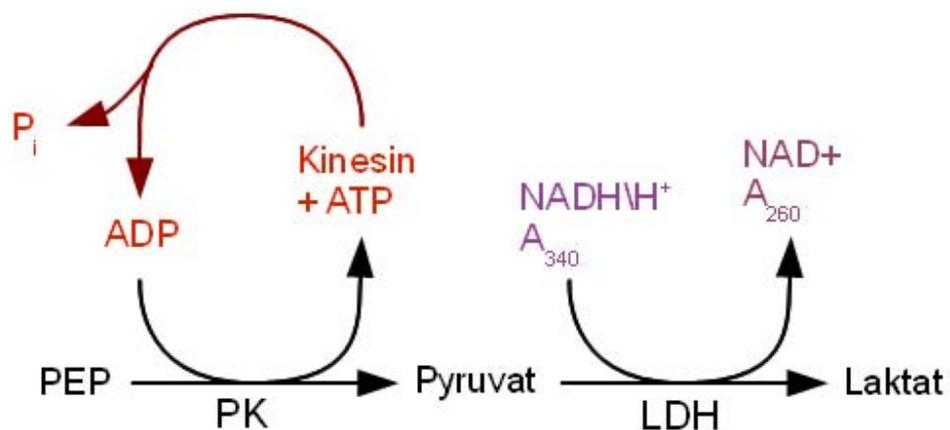


Abb. 4.1: **Skizze eines gekoppelten, enzymatischen ATPase-Tests.** An der Pyruvat Kinase (PK) wird das im Überschuss vorkommende Phosphoenolpyruvat (PEP) in Pyruvat umgewandelt. Dieses wiederum wird durch die Laktat Dehydrogenase (LDH) unter Umsetzung von NADH/H<sup>+</sup> in NAD<sup>+</sup> in Laktat umgewandelt. Die Oxidation von NADH/H<sup>+</sup> wird bei 340 nm photometrisch gemessen.

Der Reaktionsansatz wurde in eine 50  $\mu\text{l}$  UVvette (Eppendorf) überführt und über 2 min bei 340 nm im Fotometer (Uvicon 930, Lohhof) verfolgt. Die Steigung im anfänglichen, steilsten Bereich der Kurve wurde bestimmt und notiert. Es wurden Messreihen durchgeführt, bei denen die Mikrotubuli-Konzentration bei sättigender ATP-Konzentration variiert wurde. Die resultierenden Extinktionsabnahmeraten wurden gegen die jeweiligen Mikrotubuli-Konzentrationen aufgetragen und an die Michaelis-Menten Gleichung angepasst (Kaleidagraph Software, Macintosh):  $y = (B + V_{\max} \cdot [\text{MT}]) / ([\text{MT}] + K_{0,5;\text{MT}})$ . Das Programm extrapoliert die

maximale Extinktionsabnahmerate [ $V_{\max} = \Delta E/\text{min}$ ] und die halbmaximale Aktivierungskonstante  $K_{0,5\text{MT}}$  [ $\mu\text{M}$  Tubulin].

ATPase-Puffer:	12 mM ACES/KOH pH 6,8 25 mM K-Acetat 2 mM Mg-Acetat 3 mM $\text{MgCl}_2$ 0,5 mM EGTA
ATP :	20 mM ATP in ATPase-Puffer pH 7,0
Enzym-Mix :	40 $\mu\text{l}$ LDH (0,95 U/ $\mu\text{l}$ )/PK (0,75 U/ $\mu\text{l}$ ) Mix (Sigma) 60 $\mu\text{l}$ ATPase-Puffer
PEP:	4 mg/ml Phosphoenolpyruvate/KOH pH 7,0(Sigma)
NADH:	4 mM in ATPase-Puffer (2 mg in 640 $\mu\text{l}$ ATPase-Puffer)
Mt-Verdünnungspuffer:	BRB80 mit 20 $\mu\text{M}$ Taxol
Kinesin-Verdünnungspuffer:	100 mM PIPES/NaOH pH 6,8 2 mM $\text{MgCl}_2$ 1 mM EGTA 1mM EDTA 150 mM NaCl 1 mg/ml BSA

### Berechnungen zum ATPase-Test

Die Umrechnung der Extinktionsabnahme in die ATP-Konzentration erfolgt über das Lambert-Beersche Gesetz:

$$\Delta E/t = \varepsilon_{\text{NADH}} \cdot \Delta c_{\text{NADH}} \cdot d/t$$

wobei:

$\Delta E/t$ : Extinktionsänderung pro Zeit

$d$ : Schichtdicke (1 cm)

$\epsilon_{\text{NADH}}$ : Extinktionskoeffizient für NADH ( $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

Da NADH-Oxidation und ATP-Verbrauch im Test 1:1 aneinander gekoppelt sind, ergab sich durch Einsetzen von  $V_{\text{max}}$  für  $\Delta E / t$  nach Umformung die Gleichung:

$$\Delta c_{\text{ATP}} \text{ s}^{-1} = V_{\text{max}} / 6,22 \cdot 60 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$$

Berechnung des ATP-Umsatzes ( $k_{\text{cat}}$ ): Der  $k_{\text{cat}}$  ist der maximale Substratumsatz eines Enzyms unter Verwendung der Proteinkonzentration kann der  $k_{\text{cat}}$  des jeweiligen Kinesin- Konstrukts aus der maximalen Änderung der ATP-Konzentration  $\Delta c_{\text{ATP}} \text{ s}^{-1}$  bezogen auf die Kinesin-Monomer-Konzentration bestimmt werden:

$$k_{\text{cat}} = \Delta c_{\text{ATP}} / (\text{s} \cdot [\text{Kinesin}])$$

Daraus ergibt sich die maximale Menge an ATP pro Sekunde, die von einem Kinesin-Kopf hydrolysiert wird.

### 4.3.19 MantADP Freisetzung Experimente

#### Herstellung von Kinesin-MantADP Komplexen

Damit das an Kinesin gebundene ADP gegen MantADP ersetzt wurde, wurde aufgereinigtes Kinesin mit einem vierfachen Überschuss fluoreszierenden MantATP (Invitrogen) inkubiert (30 min bei 25 °C). Während der Inkubation wurden mehrere Sephadex G25 Spin Säulen hergestellt (x.x.x.x) und das Material einmal mit ATPase-Puffer (x.x.x.x) gewaschen und dreimal mit 1 mg/ml BSA in ATPase-Puffer abgesättigt. Die BSA-Lösung wurde per Schwerkraft langsam durchfließen gelassen, bevor sie endgültig kurz abzentrifugiert wurde (2.000 rpm, 2 min). Um das überschüssige BSA zu entfernen, wurden die Säulchen sechsmal mit ATPase-Puffer mit 200-mM KCl gewaschen. Um den Kinesin-MantADP Komplex von dem überschüssigen MantATP zu trennen, wurden je 100  $\mu\text{l}$  der Probe auf die Säulchen aufgetropft und in frische

Reaktionsgefäße abzentrifugiert. Die Fraktionen wurden vereinigt und die Konzentration des Kinesin- MantADP Komplexes wurde mit dem Bradford Reagenz bestimmt.

### **Konzentration der Kinesin-MantADP Komplexe**

Um die Konzentration der Kinesin-MantADP Komplexe und die Effizienz der MantADP Bindung zu bestimmen wurde ein Absorptionsspektrum von 200 nm bis 500 nm in einem Spektrofotometer gemessen. Proteine haben ihre Absorptionsmaximum bei 280 nm und die Methylanthraniloylgruppe (Mant) bei 356 nm. Deshalb konnten die Proteinkonzentration und die Konzentration des MantADP aus den Absorptionen bei den jeweiligen Maxima und den dazugehörigen Extinktionskoeffizienten berechnet werden. Die Extinktionskoeffizienten der Kinesinkonstrukte wurden mit dem Programm „ProtParam“ (ExpASy) berechnet und der Extinktionskoeffizient von MantATP ( $\epsilon_{\max} = 5800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) wurde der Beschreibung des Herstellers entnommen.

### **Stöchiometrie der MantADP Freisetzung**

Die basale ADP Freisetzung von Kinesinen ist sehr langsam, kann aber durch Bindung an Mikrotubuli stark aktiviert werden (Ma and Taylor, 1995). Da der Mant-Fluorofor bei Bindung an ein Protein eine stärkere Fluoreszenz besitzt als in Lösung, konnte die Freisetzung des MantADP vom Kinesin im Spectrofluorimeter beobachtet werden (Ma and Taylor, 1997a).

Der Assay wurde in einem FluoroMax2 (Jobin Yvon,) Spectrofluorimeter bei 23 °C in 1 ml Kunststoffküvetten durchgeführt und dabei wurde der ATPase Puffer (x.x.x.x) verwendet. Die Anregungswellenlänge betrug 360 nm und die emittierte Fluoreszenz wurde bei 443 nm gemessen. Zuerst wurde die Emission eines 100-250 nM Kinesin\*MantADP Komplexes gemessen. Nach Zugabe einer mindestens äquimolaren Menge an Mikrotubuli (0,1 - 1  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) wurde erneut gemessen da dies zu einer Freisetzung des MantADP von einem Kopf des Kinesindimers führte. Um zu verhindern, dass auch der zweite Kopf schon sein ADP freigibt, wurde zu den Mikrotubuli 2 U/ml Apyrase hinzugegeben um Spuren von ATP oder GTP zu entfernen. Das zweite MantADP wurde danach durch Zugabe von 1 mM ATP freigegeben.

### 4.3.20 Herstellung von G25 Spin Säulen

Die „Sephadex G25 Spin“ Säulen wurden selbst angefertigt. Die Spitze einer 1 ml Pipettenspitze (Sarstedt) wurde mit etwas Glaswolle gefüllt und anschließend mit 500  $\mu$ l Sephadex G25 fine (Pharmacia) gefüllt. Anschließend wurde die Säule mit dem fünffachen Säulenbettvolumen dH<sub>2</sub>O äquilibriert und zentrifugiert (2.000 rpm, 2 min, 4 °C). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Dann wurde die gleiche Prozedur mit Na-Phosphat Puffer durchgeführt. Nun waren die Säulen zur Weiterverwendung bereit.

Präparation des Sephadex G25 fine (Pharmacia, Freiburg):

5 g Sephadex G25 fine in 40 ml Na-Phosphat Puffer über Nacht langsam rührend rehydrieren. Der Überstand wurde entfernt und erneut mit Na-Phosphat Puffer aufgefüllt. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Zur Lagerung wurde 20 % Ethanol zugegeben und die Lösung bei 4 °C aufbewahrt.

Na-Phosphat Puffer: 50 mM Na-Phosphat pH 7,4  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
250 mM NaCl

### 4.3.21 Beschichtung der Glasoberflächen mit Silanen

Im ersten Schritt wurde das Deckglas 30 min in Detergenz gereinigt und anschließend mit ausreichend Wasser gereinigt. Um eine hydroxylreiche Oberfläche zu erreichen wurde das Glas anschließend 30 min in Piranha (3:1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gekocht und wieder mit Wasser abgespült. Das so aktivierte Glas wurde in einen Exikator zusammen mit ein Tropfen des gewünschten Silanes im Vakuum über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe mit Ethanol abgespült und im Stickstoffstrahl getrocknet.

### 4.3.22 Kontaktwinkelmessung

Verwendet wurde hierfür ein „contact angle system OCA20“ (Dataphysics, Filderstadt) zusammen mit der Software „SCA20“. Es wurden drei Wassertropfen auf verschiedene Stellen des Deckglases aufgebracht und analysiert. Dazu wird der Tropfen von der Seite mit einer Kamera

aufgenommen und der Innenwinkel an der Kontaktfläche zwischen Glas und Tropfen gemessen. Dieser Wert gibt Auskunft über die Hydrophobizität der Oberfläche.

## 4.4 Mikrobiologische Methoden

### 4.4.1 Mikroskopie von *A. nidulans*

Epifluoreszenzaufnahme und –beobachtungen wurden an dem Zeiss Mikroskop, dem AxioImager Z1 (Software: AxioVision V4.8), durchgeführt. Das Mikroskop war mit einem 63er oder 100er Zeiss Plan-ApoChromat Objektiv bestückt und zur Bildaufnahme diente die Zeiss AxioCam. Als Quelle für Fluoreszenzlicht diente eine HBO103 Quecksilberdampflampe (Osram). Alternativ wurde das Zeiss Mikroskop „Axio Imager Z.1“, das ebenfalls mit einem 63er oder 100er Zeiss Plan-ApoChromat Objektiv bestückt war, benutzt. Zur Bildaufnahme diente eine zeitlich und räumlich hochauflösende CCD Kamera von Zeiss (AxioCam HRm (Software: Axiovision)). Als UV-Lampe wurde eine Osram HBO50 Quecksilberdampflampe verwendet. Zur Überprüfung der Kolonien von transformierten Stämmen, wurden Sporensuspensionen durch Auftropfen von sterilem Wasser auf eine sporulierte Kolonie und sanftes Abkratzen der Sporen hergestellt. Deckgläser (18 mm x 18 mm) wurden kurz vor der Benutzung mit Hilfe des Bunsenbrennes beidseitig abgeflammt, um die störende Silikonölschicht zu zerstören, wodurch die Haftung der Sporen an der Glasoberfläche erhöht wurde. Danach wurden bis zu vier der Deckgläser in eine Petrischale gelegt und mit dem jeweiligen Medium (0,5 ml pro Deckglas) beschichtet, und anschließend mit Sporen beimpft. Die Kulturen wurden je nach Anforderung bei den entsprechenden Temperaturen für 6 Stunden bis drei Tage inkubiert. Zur Untersuchung wurde das Deckglas mit den anhaftenden Hyphen kurz abgetropft, auf einen Objektträger gelegt (Hyphen zwischen Deckglas und Objektträger), mit Immersionsöl beschichtet und unter dem Mikroskop betrachtet.

### 4.4.2 Dip-Pen Nanolithographie

Die Beschichtung von Oberflächen mit unterschiedlichen Lipiden wurde mittels Dip-Pen Nanolithographie am Institut für Nanotechnologie (INT) des KIT zusammen mit Fr. Dr. Sylwia Sekula-Neuner durchgeführt. Dabei wird die Spitze eines Rasterkraftmikroskops dazu verwendet Lipide als molekulare Tinten auf einer Oberfläche auszubringen. Die verwendeten Phospholipidlösungen bilden nach dem Auftragen eine Doppelschicht aus. Bei Verwendung

von Mischungen mit DOGS-Ni-NTA können Proteine über ihren His<sub>6</sub>-Tag an die Ni-Ionen in der Lipidkopfgruppe binden und somit an die Oberfläche fixiert werden (Sekula et al., 2008).



# Literatur

- Abraham, R. T. and R. S. Tibbetts (2005). Cell biology: Guiding ATM to broken DNA. *Science* 308, 510–511.
- Adio, S., M. Bloemink, M. Hartel, S. Leier, M. A. Geeves, and G. Woehlke (2006, December). Kinetic and mechanistic basis of the nonprocessive kinesin-3 motor NcKin3. *The Journal of Biological Chemistry* 281(49), 37782–37793. PMID: 17012747.
- Alberti, P. and J. L. Mergny (2003). DNA duplex-quadruplex exchange as the basis for a nanomolecular machine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 1569–1573.
- Alteri, A. (2003). Electrochemically switchable hydrogen-bonded molecular shuttles. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8644–8654.
- Amendola, V., L. Fabbrizzi, C. Mangano, and P. Pallavicini (2001). Molecular machines based on metal ion translocation. *Acc. Chem. Res.* 34, 488–493.
- Antonio, C. (2000). Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. *Cell* 102(4), 425–435.
- Arnal, I. and R. H. Wade (1998). Nucleotide-dependent conformations of the kinesin dimer interacting with microtubules. *Structure (London, England: 1993)* 6(1), 33–38. PMID: 9493265.
- Asakawa, H., S. Tahara, M. Nakamichi, K. Takehara, S. Ikeno, M. B. Linder, and T. Haruyama (2009, August). The amphiphilic protein HFBII as a genetically taggable molecular carrier for the formation of a self-organized functional protein layer on a solid surface. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 25(16), 8841–8844. PMID: 19610665.
- Asbury, C. L., A. N. Fehr, and S. M. Block (2003). Kinesin moves by an asymmetric Hand-Over-Hand mechanism. *Science* 302(5653), 2130–2134.
- Asokan, S. B., L. Jawerth, R. L. Carroll, R. E. Cheney, S. Washburn, and R. Superfine (2003). Two-Dimensional manipulation and orientation of Actin-Myosin systems with dielectrophoresis. *Nano Letters* 3(4), 431–437.

- Astumian, R. D. (1997). Thermodynamics and kinetics of a brownian motor. *Science* 276, 917–922.
- Astumian, R. D. (2001). Making molecules into motors. *Sci. Am.* 285, 45–51.
- Astumian, R. D. (2010). Thermodynamics and kinetics of molecular motors. *Biophysical Journal* 98(11), 2401–2409. PMID: 20513383.
- Bachand, G. D., H. Hess, B. Ratna, P. Satir, and V. Vogel (2009). "Smart dust" biosensors powered by biomolecular motors. *Lab on a Chip* 9(12), 1661–1666.
- Badjic, J. D. (2006). Operating molecular elevators. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 1489–1499.
- Badjic, J. D., V. Balzani, A. Credi, S. Silvi, and J. F. Stoddart (2004). A molecular elevator. *Science* 303, 1845–1849.
- Ballardini, R., V. Balzani, A. Credi, M. T. Gandolfi, and M. Venturi (2001). Artificial molecular-level machines: Which energy to make them work? *Acc. Chem. Res.* 34, 445–455.
- Balzani, V. (2006). Autonomous artificial nanomotor powered by sunlight. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 1178–1183.
- Bananis, E., S. Nath, K. Gordon, P. Satir, R. J. Stockert, J. W. Murray, and A. W. Wolkoff (2004, August). Microtubule-dependent movement of late endocytic vesicles in vitro: requirements for dynein and kinesin. *Molecular Biology of the Cell* 15(8), 3688–3697. PMID: 15181154.
- Baneyx, F. and M. Mujacic (2004). Recombinant protein folding and misfolding in escherichia coli. *Nature Biotechnology* 22(11), 1399–1408. PMID: 15529165.
- Bath, J., S. J. Green, and A. J. Turberfield (2005). A free-running DNA motor powered by a nicking enzyme. *Angew. Chem. Int. Edn* 44, 4358–4361.
- Bathe, F., K. Hahlen, R. Dombi, L. Driller, M. Schliwa, and G. Woehlke (2005, August). The complex interplay between the neck and hinge domains in kinesin-1 dimerization and motor activity. *Molecular Biology of the Cell* 16(8), 3529–3537. PMID: 15901834 PMCID: 1182295.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer (2006). *Biochemistry*.
- Bergen, L. G. and N. R. Morris (1983, October). Kinetics of the nuclear division cycle of aspergillus nidulans. *Journal of Bacteriology* 156(1), 155–160. PMID: 6352675.
- Bissell, R. A., E. Cordova, A. E. Kaifer, and J. F. Stoddart (1994). A chemically and electrochemically switchable molecular shuttle. *Nature* 369, 133–137.
- Bloom, G. S., M. C. Wagner, K. K. Pfister, and S. T. Brady (1988). Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. *Biochemistry* 27(9), 3409–3416. PMID: 3134048.
- Boal, A. K., H. Tellez, S. Rivera, N. Miller, G. Bachand, and B. Bunker (2006). The stability and functionality of chemically crosslinked microtubules. *Small* 2(6), 793–803.

- Boyer, P. D. (1999). Molecular motors: What makes ATP synthase spin? *Nature* 402, 247–249.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2), 248–254.
- Bray, D. (1992). Cell movements: From molecules to motility.
- Brouwer, A. M. (2001). Photoinduction of fast, reversible translational motion in a hydrogen-bonded molecular shuttle. *Science* 291, 2124–2128.
- Brown, K., R. Coulson, T. Yen, and D. Cleveland (1994). Cyclin-like accumulation and loss of the putative kinetochore motor CENP-E results from coupling continuous synthesis with specific degradation at the end of mitosis. *The Journal of Cell Biology* 125(6), 1303–1312. PMID: 8207059 PMCID: 2290920.
- Brown, K., K. Wood, and D. Cleveland (1996). The kinesin-like protein CENP-E is kinetochore-associated throughout poleward chromosome segregation during anaphase-A. *J Cell Sci* 109(5), 961–969.
- Browne, W. R. and B. L. Feringa (2006). Making molecular machines work. *Nat Nano* 1(1), 25–35.
- Browning, H., D. D. Hackney, and P. Nurse (2003). Targeted movement of cell end factors in fission yeast. *Nat Cell Biol* 5(9), 812–818.
- Browning, H., J. Hayles, J. Mata, L. Aveline, P. Nurse, and J. R. McIntosh (2000). Tea2p is a kinesin-like protein required to generate polarized growth in fission yeast. *The Journal of Cell Biology* 151(1), 15–28. PMID: 11018050.
- Brunner, C., C. Wahnes, and V. Vogel (2007). Cargo pick-up from engineered loading stations by kinesin driven molecular shuttles. *Lab on a Chip* 7(10), 1263–1271.
- Brunner, D. (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* 102(5), 695–704.
- Busch, K. E. and D. Brunner (2004). The microtubule plus End-Tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for Cell-End targeting of interphase microtubules. *Current Biology* 14(7), 548–559.
- Busch, K. E., J. Hayles, P. Nurse, and D. Brunner (2004). Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Developmental Cell* 6(6), 831–843.
- Carvalho, P., M. L. G. Jr., M. Hoyt, and D. Pellman (2004). Cell cycle control of Kinesin-Mediated transport of bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Developmental Cell* 6(6), 815–829.
- Caskey, D. C. and J. Michl (2005). Toward self-assembled surface-mounted prismatic altitudinal rotors. a test case: trigonal and tetragonal prisms. *J. Org. Chem.* 70, 5442–5448.

- Chandra, R., S. A. Endow, and J. M. Scholey (1993). Chapter 8 expression of microtubule motor proteins in bacteria for characterization in in vitro motility assays. In *Motility Assays for Motor Proteins*, Volume Volume 39, pp. 115–127. Academic Press.
- Chatterjee, M. N., E. R. Kay, and D. A. Leigh (2006). Beyond switches: Ratcheting a particle energetically uphill with a compartmentalized molecular machine. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 4058–4073.
- Cheeseman, I. M., J. S. Chappie, E. M. Wilson-Kubalek, and A. Desai (2006). The conserved KMN network constitutes the core Microtubule-Binding site of the kinetochore. *Cell* 127(5), 983–997.
- Cheeseman, I. M., S. Niessen, S. Anderson, F. Hyndman, J. R. Yates, K. Oegema, and A. Desai (2004). A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension. *Genes & Development* 18(18), 2255–2268. PMID: 15371340 PMID: 517519.
- Choi, H. and C. D. Montemagno (2005). Artificial organelle: Atp synthesis from cellular mimetic polymersomes. *Nano Letters* 5(12), 2538–2542.
- Clemmens, J., H. Hess, R. Doot, C. M. Matzke, G. D. Bachand, and V. Vogel (2004). Motor-protein "roundabouts": Microtubules moving on kinesin-coated tracks through engineered networks. *Lab on a Chip* 4(2), 83–86.
- Clemmens, J., H. Hess, J. Howard, and V. Vogel (2003). Analysis of microtubule guidance in open microfabricated channels coated with the motor protein kinesin . *Langmuir* 19(5), 1738–1744.
- Cleveland, D. W., Y. Mao, and K. F. Sullivan (2003). Centromeres and kinetochores: From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112(4), 407–421.
- Colin, E., D. Zala, G. Liot, H. Rangone, M. Borrell-Pages, X. Li, F. Saudou, and S. Humbert (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J* 27(15), 2124–2134.
- Collin, J., C. Dietrich-Buchecker, P. Gavina, M. C. Jimenez-Molero, and J. Sauvage.
- Davis, A. P. (1999). Synthetic molecular motors. *Nature* 401, 120–121.
- de Cuevas, M., T. Tao, and L. S. Goldstein (1992). Evidence that the stalk of drosophila kinesin heavy chain is an alpha-helical coiled coil. *The Journal of Cell Biology* 116(4), 957–965. PMID: 1734025.
- Dennis, J., J. Howard, and V. Vogel (1999). molecular shuttles: directed motion of microtubules along nanoscale kinesin tracks. *Nanotechnology* 10, 232–236.
- Diez, S., J. H. Helenius, and J. Howard (2004). *Nanobiotechnology*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Diez, S., C. Reuther, C. Dinu, R. Seidel, M. Mertig, W. Pompe, and J. Howard (2003). Stretching and transporting DNA molecules using motor proteins. *Nano Letters* 3(9), 1251–1254.

- Diez, S., W. R. Schief, and J. Howard (2002). Molecular motors: Single-Molecule recordings made easy. *Current Biology* 12(6), R203–R205.
- Dinu, C., J. Opitz, W. Pompe, J. Howard, M. Mertig, and S. Diez (2006). Parallel manipulation of bifunctional DNA molecules on structured surfaces using Kinesin-Driven microtubules. *Small* 2(8-9), 1090–1098.
- Easton, C. J., S. F. Lincoln, L. Barr, and H. Onagi (2004). Molecular reactors and machines: How useful are molecular mechanical devices? *Chem. Eur. J.* 10, 3120–3128.
- Ebbing, B., K. Mann, A. Starosta, J. Jaud, L. Schöls, R. Schüle, and G. Woehlke (2008). Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity. *Human Molecular Genetics* 17(9), 1245–1252.
- Efimov, V. P., J. Zhang, and X. Xiang (2006). CLIP-170 homologue and NUDE play overlapping roles in NUDF localization in aspergillus nidulans. *Mol. Biol. Cell* 17(4), 2021–2034.
- Eggenberger, K., N. Frey, B. Zienicke, J. Siebenbrock, T. Schunck, R. Fischer, S. Bräse, E. Birtalan, T. Nann, and P. Nick (2010). Use of nanoparticle to study and manipulate plant cells. *Adv. Engin. Biomat.* xx, 9999.
- Eggenberger, K., A. Merkulov, M. Darbandi, T. Nann, and P. Nick (2007). Direct immunofluorescence of plant microtubules based on semiconductor nanocrystals. *Bioconjugate Chemistry* 18(6), 1879–1886. PMID: 17883252.
- Endow, S. A. (1999). Microtubule motors in spindle and chromosome motility. *European Journal of Biochemistry* 262(1), 12–18.
- Espeut, J., A. Gaussen, P. Bieling, V. Morin, S. Prieto, D. Fesquet, T. Surrey, and A. Abrieu (2008). Phosphorylation relieves autoinhibition of the kinetochore motor Cenp-E. *Molecular Cell* 29(5), 637–643.
- Feine, O., A. Zur, H. Mahbubani, and M. Brandeis (2007). Human kid is degraded by the APC/C(Cdh1) but not by the APC/C(Cdc20). *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6(20), 2516–2523. PMID: 17726374.
- Feringa, B. L. (2001a). In control of motion: from molecular switches to molecular motors. *Acc. Chem. Res.* 34, 504–513.
- Feringa, B. L. (2001b). Molecular switches.
- Feringa, B. L., R. A. van Delden, N. Koumura, and E. M. Geertsema (2001). Chiroptical molecular switches. *Chem. Rev.* 100, 1789–1816.
- Feringa, B. L., R. A. van Delden, and M. K. J. ter Wiel (2003). In control of switching, motion, and organization. *Pure Appl. Chem.* 75, 563–575.
- Feynman, R. P. The pleasure of finding things OutThere's plenty of room at the bottom.
- Fink, G., L. Hajdo, K. J. Skowronek, C. Reuther, A. A. Kasprzak, and S. Diez (2009). The mitotic kinesin-14 ncd drives directional microtubule-microtubule sliding. *Nat Cell Biol* 11(6), 717–723.

- Fischer, R., N. Zekert, and N. Takeshita (2008). Polarized growth in fungi—interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Molecular Microbiology* 68(4), 813–826. PMID: 18399939.
- Fletcher, S. P., F. Dumur, M. M. Pollard, and B. L. Feringa (2005). A reversible, unidirectional molecular rotary motor driven by chemical energy. *Science* 310, 80–82.
- Fontijn, R. D., B. Goud, A. Echard, F. Jollivet, J. van Marle, H. Pannekoek, and A. J. G. Horrevoets (2001). The human Kinesin-Like protein RB6K is under tight cell cycle control and is essential for cytokinesis. *Mol. Cell. Biol.* 21(8), 2944–2955.
- Fournier-Bidoz, S., A. C. Arsenault, I. Manners, and G. A. Ozin (2005). Synthetic self-propelled nanorotors. *Chem. Commun.*, 441–443.
- Funabiki, H. (2000). The xenopus chromokinesin xkid is essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow anaphase chromosome movement. *Cell* 102(4), 411–424.
- Gadella, van der Krogt GN, and Bisseling (1999, July). GFP-based FRET microscopy in living plant cells. *Trends in Plant Science* 4(7), 287–291. PMID: 10407445.
- Ganguly, A., R. Bhattacharya, and F. Cabral (2008). Cell cycle dependent degradation of MCAK: evidence against a role in anaphase chromosome movement. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 7(20), 3187–3193. PMID: 18843200 PMCID: 2677962.
- Gibbons, I. R. and A. J. Rowe (1965). Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science (New York, N.Y.)* 149(3682), 424–426. PMID: 17809406.
- Gilbert, S. P., M. R. Webb, M. Brune, and K. A. Johnson (1995). Pathway of processive ATP hydrolysis by kinesin. *Nature* 373(6516), 671–676. PMID: 7854446.
- Goel, A. and V. Vogel (2008). Harnessing biological motors to engineer systems for nanoscale transport and assembly. *Nat Nano* 3(8), 465–475.
- Gracheva, E. O., N. T. Ingolia, Y. M. Kelly, J. F. Cordero-Morales, G. Hollopeter, A. T. Chesler, E. E. Sanchez, J. C. Perez, J. S. Weissman, and D. Julius (2010). Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature advance online publication*.
- Hackney, D. D. (1992). Kinesin and myosin ATPases: variations on a theme. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 336(1276), 13–17; discussion 17–18. PMID: 1351290.
- Hackney, D. D. (1994a). Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(15), 6865–6869. PMID: 8041710.
- Hackney, D. D. (1994b). The rate-limiting step in microtubule-stimulated ATP hydrolysis by dimeric kinesin head domains occurs while bound to the microtubule. *The Journal of Biological Chemistry* 269(23), 16508–16511. PMID: 8206961.
- Hackney, D. D. (2002). Pathway of ADP-stimulated ADP release and dissociation of tethered kinesin from microtubules. implications for the extent of processivity. *Biochemistry* 41(13), 4437–4446. PMID: 11914091.

- Hamman, B. D., B. A. Pollok, T. Bennett, J. Allen, and R. Heim (2002). Binding of a pleckstrin homology domain protein to phosphoinositide in membranes: a miniaturized FRET-based assay for drug screening. *Journal of Biomolecular Screening: The Official Journal of the Society for Biomolecular Screening* 7(1), 45–55. PMID: 11897055.
- Harada, A. (2001). Cyclodextrin-based molecular machines. *Acc. Chem. Res.* 34, 456–464.
- Haslam, R. J., H. B. Koide, and B. A. Hemmings (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature* 363(6427), 309–310. PMID: 8497315.
- Hawthorne, M. F. (2004). Electrical or photocontrol of the rotary motion of a metallocarborane. *Science* 303, 1849–1851.
- Heinrich, P. C., P. E. Petrides, and G. Löffler (2006). *Biochemie und Pathobiochemie*. Boston: Springer-Verlag.
- Hernandez, J. V., E. R. Kay, and D. A. Leigh (2004). A reversible synthetic rotary molecular motor. *Science* 306, 1532–1537.
- Hess, H. (2006). MATERIALS SCIENCE: enhanced: Toward devices powered by biomolecular motors. *Science* 312(5775), 860–861.
- Hess, H. (2009). Reassembling biological machinery in vitro. *Chemistry & Biology* 16(9), 917–918.
- Hess, H. and G. D. Bachand (2005). Biomolecular motors. *Nanotoday* 8, 22–29.
- Hess, H., G. D. Bachand, and V. Vogel (2004). Powering nanodevices with biomolecular motors. *Chemistry - A European Journal* 10(9), 2110–2116.
- Hess, H., J. Clemmens, C. Brunner, R. Doot, S. Luna, K. Ernst, and V. Vogel (2005). Molecular Self-Assembly of „nanowires“ and „nanospools“ using active transport. *Nano Letters* 5(4), 629–633.
- Hess, H., J. Clemmens, C. Matzke, G. Bachand, B. Bunker, and V. Vogel (2002). Ratchet patterns sort molecular shuttles. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 75(2), 309–313.
- Hess, H., J. Clemmens, D. Qin, J. Howard, and V. Vogel (2001). Light-Controlled molecular shuttles made from motor proteins carrying cargo on engineered surfaces. *Nano Letters* 1(5), 235–239.
- Hess, H. and V. Vogel (2001). Molecular shuttles based on motor proteins: active transport in synthetic environments. *Rev. Mol. Biotechnol.* 82, 67–85.
- Hiratsuka, Y., T. Tada, K. Oiwa, T. Kanayama, and T. Q. Uyeda (2001). Controlling the direction of kinesin-driven microtubule movements along microlithographic tracks. *Biophysical Journal* 81(3), 1555–1561. PMID: 11509368 PMCID: 1301633.
- Hirokawa, N., K. K. Pfister, H. Yorifuji, M. C. Wagner, S. T. Brady, and G. S. Bloom (1989). Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell* 56(5), 867–878. PMID: 2522351.

- Hirose, K., J. Löwe, M. Alonso, R. A. Cross, and L. A. Amos (1999). Congruent docking of dimeric kinesin and *ncd* into three-dimensional electron cryomicroscopy maps of microtubule-motor ADP complexes. *Molecular Biology of the Cell* 10(6), 2063–2074. PMID: 10359615.
- Hoenger, A., M. Thormählen, R. Diaz-Avalos, M. Doerhoefer, K. N. Goldie, J. Müller, and E. Mandelkow (2000). A new look at the microtubule binding patterns of dimeric kinesins. *Journal of Molecular Biology* 297(5), 1087–1103. PMID: 10764575.
- Horinek, D. and J. Michl (2005). Surface-mounted altitudinal molecular rotors in alternating electric field: single-molecule parametric oscillator molecular dynamics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 14175–14180.
- Howard, J. (1996). The movement of kinesin along microtubules. *Annual Review of Physiology* 58, 703–729. PMID: 8815816.
- Howard, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Hua, W., E. C. Young, M. L. Fleming, and J. Gelles (1997, July). Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis. *Nature* 388(6640), 390–393. PMID: 9237758.
- Huang, T. G. and D. D. Hackney (1994). Drosophila kinesin minimal motor domain expressed in escherichia coli. purification and kinetic characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 269(23), 16493–16501. PMID: 8206959.
- Hunter, A. W. and L. Wordeman (2000). How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *Journal of Cell Science* 113 Pt 24, 4379–4389. PMID: 11082031.
- Ionov, L., M. Stamm, and S. Diez (2006). Reversible switching of microtubule motility using thermoresponsive polymer surfaces. *Nano Letters* 6(9), 1982–1987.
- Jaud, J., F. Bathe, M. Schliwa, M. Rief, and G. Woehlke (2006). Flexibility of the neck domain enhances kinesin-1 motility under load. *Biophysical Journal* 91(4), 1407–1412. PMID: 16714343 PMID: 1518645.
- Jiang, M. Y. and M. P. Sheetz (1995). Cargo-activated ATPase activity of kinesin. *Biophysical Journal* 68(4 Suppl), 283S–284S; discussion 285S. PMID: 7787091.
- Jimenez-Molero, C. M., C. Dietrich-Buchecker, and J. P. Sauvage (2003). Towards artificial muscles at the nanometric level. *Chem. Commun.*, 1613–1616.
- Kallipolitou, A., D. Deluca, U. Majdic, S. Lakamper, R. Cross, E. Meyhofer, L. Moroder, M. Schliwa, and G. Woehlke (2001). Unusual properties of the fungal conventional kinesin neck domain from *neurospora crassa*. *EMBO J* 20(22), 6226–6235.
- Karre, V., P. Keathley, J. Guo, and J. Hastings (2009). Direct Electron-Beam patterning of teflon AF. *Nanotechnology, IEEE Transactions on* 8(2), 139–141.
- Kawaguchi, K. and S. Ishiwata (2001). Nucleotide-Dependent single- to Double-Headed binding of kinesin. *Science* 291(5504), 667–669.
- Kay, E. R. and D. A. Leigh (2006). Photochemistry: lighting up nanomachines. *Nature* 440, 286–287.

- Kelly, T. R., H. D. Silva, and R. A. Silva (1999). Undirectional rotary motion in a molecular system. *Nature* 401, 150–152.
- Kerssemakers, J., J. Howard, H. Hess, and S. Diez (2006). The distance that kinesin-1 holds its cargo from the microtubule surface measured by fluorescence interference contrast microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(43), 15812–15817. PMID: 17035506 PMCID: 1595308.
- Kerssemakers, J., L. Ionov, U. Queitsch, S. Luna, H. Hess, and S. Diez (2009). 3D nanometer tracking of motile microtubules on reflective surfaces. *Small* 5(15), 1732–1737.
- Khuong, T. V., J. E. Nunez, C. E. Godinez, and M. A. Garcia-Garibay (2006). Crystalline molecular machines: A quest toward solid-state dynamics and function. *Acc. Chem. Res.* 39, 413–422.
- Khuong, T. V., G. Zepeda, R. Ruiz, S. I. Khan, and M. A. Garcia-Garibay (2004). Molecular compasses and gyroscopes: Engineering molecular crystals with fast internal rotation. *Cryst. Growth Des.* 4, 15–18.
- Kim, Y., J. E. Heuser, C. M. Waterman, and D. W. Cleveland (2008). CENP-E combines a slow, processive motor and a flexible coiled coil to produce an essential motile kinetochore tether. *The Journal of Cell Biology* 181(3), 411–419.
- Kim, Y., A. J. Holland, W. Lan, and D. W. Cleveland (2010). Aurora kinases and protein phosphatase 1 mediate chromosome congression through regulation of CENP-E. *Cell* 142(3), 444–455.
- Kinbara, K. and T. Aida (2005). Toward intelligent molecular machines: directed motions of biological and artificial molecules and assemblies. *Chem. Rev.* 105, 1377–1400.
- Kinosita, K., R. Yasuda, H. Noji, S. Ishiwata, and M. Yoshida (1998). F1-ATPase: a rotary motor made of a single molecule. *Cell* 93(1), 21–24.
- Kirkland, B. H. and N. O. Keyhani (2010, July). Expression and purification of a functionally active class I fungal hydrophobin from the entomopathogenic fungus *beauveria bassiana* in *e. coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. PMID: 20640587.
- Kline, T. R., W. F. Paxton, T. E. Mallouk, and A. Sen (2005). Catalytic nanomotors: remote-controlled autonomous movement of striped metallic nanorods. *Angew. Chem. Int. Edn* 44, 744–746.
- Konzack, S., P. E. Rischitor, C. Enke, and R. Fischer (2005). The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 16(2), 497–506.
- Koolman, J. and K. Röhm (1994). *Taschenatlas der Biochemie*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Korten, T. and S. Diez (2008). Setting up roadblocks for kinesin-1: mechanism for the selective speed control of cargo carrying microtubules. *Lab on a Chip* 8(9), 1441–1447.
- Korten, T., A. Mansson, and S. Diez (2010). Towards the application of cytoskeletal motor proteins in molecular detection and diagnostic devices. *Current Opinion in Biotechnology* 21(4), 477–488.

- Kottas, G. S., L. I. Clarke, D. Horinek, and J. Michl (2005). Artificial molecular rotors. *Chem. Rev.* 105, 1281–1376.
- Koumura, N., E. M. Geertsema, M. B. van Gelder, A. Meetsma, and B. L. Feringa (2002). Second generation light-driven molecular motors. unidirectional rotation controlled by a single stereogenic center with near-perfect photoequilibria and acceleration of the speed of rotation by structural modification. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 5037–5051.
- Koumura, N., R. W. J. Zijlstra, R. A. van Delden, N. Harada, and B. L. Feringa (1999). Light-driven molecular rotor. *Nature* 401, 152–155.
- Kozielski, F., E. Schönbrunn, S. Sack, J. Müller, S. T. Brady, and E. Mandelkow (1997). Crystallization and preliminary x-ray analysis of the single-headed and double-headed motor protein kinesin. *Journal of Structural Biology* 119(1), 28–34. PMID: 9216086.
- Kwok, W. M. (2003). Time-resolved resonance raman study of s-1 cis-stilbene and its deuterated isotopomers. *J. Raman Spec.* 34, 886–891.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227(5259), 680–685. PMID: 5432063.
- Lan, W., X. Zhang, S. L. Kline-Smith, S. E. Rosasco, G. A. Barrett-Wilt, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, C. E. Walczak, and P. Stukenberg (2004). Aurora b phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Current Biology* 14(4), 273–286.
- Lawrence, C. J., R. K. Dawe, K. R. Christie, D. W. Cleveland, S. C. Dawson, S. A. Endow, L. S. B. Goldstein, H. V. Goodson, N. Hirokawa, J. Howard, R. L. Malmberg, J. R. McIntosh, H. Miki, T. J. Mitchison, Y. Okada, A. S. N. Reddy, W. M. Saxton, M. Schliwa, J. M. Scholey, R. D. Vale, C. E. Walczak, and L. Wordeman (2004). A standardized kinesin nomenclature. *The Journal of Cell Biology* 167(1), 19–22. PMID: 15479732.
- Lee, W., J. R. Oberle, and J. A. Cooper (2003). The role of the lissencephaly protein pac1 during nuclear migration in budding yeast. *The Journal of Cell Biology* 160(3), 355–364. PMID: 12566428.
- Leigh, D. A., J. K. Y. Wong, F. Dehez, and F. Zerbetto (2003). Unidirectional rotation in a mechanically interlocked molecular rotor. *Nature* 424, 174–179.
- Lenz, J. H., I. Schuchardt, A. Straube, and G. Steinberg (2006). A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* 25(11), 2275–2286.
- Leventis, P. A. and S. Grinstein (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annual Review of Biophysics* 39(1), 407–427.
- Levesque, A. A. and D. A. Compton (2001). The chromokinesin kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. *The Journal of Cell Biology* 154(6), 1135–1146. PMID: 11564754 PMCID: 2150818.
- Linder, M., G. R. Szilvay, T. Nakari-Setälä, H. Söderlund, and M. Penttilä (2002). Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins HFBI and HFBI from *trichoderma reesei*. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 11(9), 2257–2266. PMID: 12192081 PMCID: 2373586.

- Liu, D., X. Ding, J. Du, X. Cai, Y. Huang, T. Ward, A. Shaw, Y. Yang, R. Hu, C. Jin, and X. Yao (2007). Human NUF2 interacts with centromere-associated protein e and is essential for a stable spindle Microtubule-Kinetochore attachment. *Journal of Biological Chemistry* 282(29), 21415–21424.
- Lohman, T. M., K. Thorn, and R. D. Vale (1998). Staying on track: Common features of DNA helicases and microtubule motors. *Cell* 93(1), 9–12.
- Lowe, J. N., S. Silvi, J. F. Stoddart, J. D. Badjic, and A. Credi (2004). A mechanically interlocked bundle. *Chem. Eur. J.* 10, 1926–1935.
- Lubig, R., P. Kusch, K. Röper, and H. Zahn (1981). Zum reaktionsmechanismus von glutaraldehyd mit proteinen. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* 112(11), 1313–1323.
- Ma, Y. Z. and E. W. Taylor (1995). Kinetic mechanism of kinesin motor domain. *Biochemistry* 34(40), 13233–13241. PMID: 7548087.
- Ma, Y. Z. and E. W. Taylor (1997a). Interacting head mechanism of microtubule-kinesin ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 272(2), 724–730. PMID: 8995356.
- Ma, Y. Z. and E. W. Taylor (1997b). Kinetic mechanism of a monomeric kinesin construct. *The Journal of Biological Chemistry* 272(2), 717–723. PMID: 8995355.
- Mandelkow, E. and K. A. Johnson (1998). The structural and mechanochemical cycle of kinesin. *Trends in Biochemical Sciences* 23(11), 429–433. PMID: 9852761.
- Mandelkow, E. M., M. Herrmann, and U. Rühl (1985). Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies. *Journal of Molecular Biology* 185(2), 311–327. PMID: 4057249.
- Mao, Y., A. Abrieu, and D. W. Cleveland (2003). Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* 114(1), 87–98. PMID: 12859900.
- Masaike, T., E. Muneyuki, H. Noji, K. Kinoshita, and M. Yoshida (2002). F1-ATPase changes its conformations upon phosphate release. *Journal of Biological Chemistry* 277(24), 21643–21649.
- Mayr, M. I., S. Hümmer, J. Bormann, T. Grüner, S. Adio, G. Woehlke, and T. U. Mayer (2007). The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Current Biology* 17(6), 488–498.
- Miki, H., M. Setou, and N. Hirokawa (2003). Kinesin superfamily proteins (KIFs) in the mouse transcriptome. *Genome Research* 13(6b), 1455–1465. PMID: 12819144 PMID: 403687.
- Møller-Jensen, J., R. B. Jensen, J. Löwe, and K. Gerdes (2002). Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *The EMBO Journal* 21(12), 3119–3127. PMID: 12065424.
- Morin, J., Y. Shirai, and J. M. Tour (2006). En route to a motorized nanocar. *Org. Lett.* 8, 1713–1716.

- Moyer, M. L., S. P. Gilbert, and K. A. Johnson (1996, May). Purification and characterization of two monomeric kinesin constructs. *Biochemistry* 35(20), 6321–6329. PMID: 8639576.
- Moyer, M. L., S. P. Gilbert, and K. A. Johnson (1998). Pathway of ATP hydrolysis by monomeric and dimeric kinesin. *Biochemistry* 37(3), 800–813. PMID: 9454569.
- Muraoka, T., K. Kinbara, and T. Aida (2006). Mechanical twisting of a guest by a photoreponsive host. *Nature* 440, 512–515.
- Muraoka, T., K. Kinbara, Y. Kobayashi, and T. Aida (2003). Light-driven open-close motion of chiral molecular scissors. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 5612–5613.
- Nakata, T. and N. Hirokawa (1995). Point mutation of adenosine triphosphate-binding motif generated rigor kinesin that selectively blocks anterograde lysosome membrane transport. *The Journal of Cell Biology* 131(4), 1039–1053. PMID: 7490281 PMID: 2200001.
- Nawara, A. J., T. Shima, F. Hampel, and J. A. Gladysz (2006). Gyroscope-like molecules consisting of PdX2/PtX2 rotators encased in three-spoke stators: synthesis via alkene metathesis, and facile substitution and demetalation. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 4962–4963.
- Nitta, T., A. Tanahashi, Y. Obara, M. Hirano, M. Razumova, M. Regnier, and H. Hess (2008). Comparing guiding track requirements for myosin- and Kinesin-Powered molecular shuttles. *Nano Letters* 8(8), 2305–2309.
- Nitzsche, B., V. Bormuth, C. Bräuer, J. Howard, L. Ionov, J. Kerssemakers, T. Korten, C. Leduc, F. Ruhnnow, S. Diez, L. Wilson, and J. J. Correia (2010). Studying kinesin motors by optical 3D-Nanometry in gliding motility assays. In *Microtubules, in vitro*, Volume Volume 95, pp. 247–271. Academic Press.
- Nitzsche, B., F. Ruhnnow, and S. Diez (2008). Quantum-dot-assisted characterization of microtubule rotations during cargo transport. *Nat Nano* 3(9), 552–556.
- Noji, H., R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinosita (1997). Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* 386(6622), 299–302.
- Nousiainen, M., H. H. W. Silljé, G. Sauer, E. A. Nigg, and R. Körner (2006). Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(14), 5391–5396.
- Nygaard, S. (2006). Quantifying the working stroke of tetrathiafulvalene-based electrochemically-driven linear motor-molecules. *Chem. Commun.*, 144–146.
- Okada, Y., H. Higuchi, and N. Hirokawa (2003). Processivity of the single-headed kinesin KIF1A through biased binding to tubulin. *Nature* 424(6948), 574–577. PMID: 12891363.
- Okada, Y. and N. Hirokawa (2000, January). Mechanism of the single-headed processivity: diffusional anchoring between the k-loop of kinesin and the c terminus of tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(2), 640–645. PMID: 10639132.

- Ozin, G. A., I. Manners, S. Fournier-Bidoz, and A. Arsenault (2005). Dream machines. *Adv. Mater.* 17, 3011–3018.
- Paschal, B. M. and R. B. Vallee (1993). Microtubule and axoneme gliding assays for force production by microtubule motor proteins. *Methods in Cell Biology* 39, 65–74. PMID: 8246806.
- Paulmurugan, R. and S. S. Gambhir (2005). Novel fusion protein approach for efficient High-Throughput screening of small Molecule-Mediating Protein-Protein interactions in cells and living animals. *Cancer Research* 65(16), 7413–7420.
- Paxton, W. F. (2004). Catalytic nanomotors: Autonomous movement of striped nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 13424–13431.
- Perez, E. M., D. T. F. Dryden, D. A. Leigh, G. Teobaldi, and F. Zerbetto (2004). A generic basis for some simple light-operated mechanical molecular machines. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 12210–12211.
- Perkins, T. T., H. Li, R. V. Dalal, J. Gelles, and S. M. Block (2001). Forward and reverse motion of single RecBCD molecules on DNA. *Biophys. J.* 86, 1640–1648.
- Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by arp2/3 complex and formins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 36, 451–477. PMID: 17477841.
- Pontecorvo, G., J. A. Roper, L. M. Hemmons, K. D. MacDonalds, and A. W. J. Buton (1953). The genetics of aspergillus nidulans. *Advances in Genetics* 5, 141–238. PMID: 13040135.
- Porter, M. E., J. M. Scholey, D. L. Stemple, G. P. Vigers, R. D. Vale, M. P. Sheetz, and J. R. McIntosh (1987). Characterization of the microtubule movement produced by sea urchin egg kinesin. *Journal of Biological Chemistry* 262(6), 2794–2802.
- Ramachandran, S., K. Ernst, G. Bachand, V. Vogel, and H. Hess (2006). Selective loading of Kinesin-Powered molecular shuttles with protein cargo and its application to biosensing. *Small* 2(3), 330–334.
- Rao, P. N. and J. Engelberg (1968). Mitotic duration and its variability in relation to temperature in HeLa cells. *Experimental Cell Research* 52(1), 198–208.
- Rapenne, G. (2005). Synthesis of technomimetic molecules: towards rotation control in single molecular machines and motors. *Org. Biomol. Chem.* 3, 1165–1169.
- Ray, S., E. Meyhöfer, R. A. Milligan, and J. Howard (1993). Kinesin follows the microtubule's protofilament axis. *The Journal of Cell Biology* 121(5), 1083–1093. PMID: 8099076.
- Requena, N., C. Alberti-Segui, E. Winzenburg, C. Horn, M. Schliwa, P. Philippsen, R. Liese, and R. Fischer (2001, October). Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in aspergillus nidulans. *Molecular Microbiology* 42(1), 121–132. PMID: 11679072.

- Rice, S., A. W. Lin, D. Safer, C. L. Hart, N. Naber, B. O. Carragher, S. M. Cain, E. Pechatnikova, E. M. Wilson-Kubalek, M. Whittaker, E. Pate, R. Cooke, E. W. Taylor, R. A. Milligan, and R. D. Vale (1999). A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402(6763), 778–784. PMID: 10617199.
- Rios, L. and G. D. Bachand (2009, April). Multiplex transport and detection of cytokines using kinesin-driven molecular shuttles. *Lab on a Chip* 9(7), 1005–1010. PMID: 19294315.
- Rogers, K. R., S. Weiss, I. Crevel, P. J. Brophy, M. Geeves, and R. Cross (2001). KIF1D is a fast non-processive kinesin that demonstrates novel k-loop-dependent mechanochemistry. *EMBO J* 20(18), 5101–5113.
- Roth, M. R., R. B. Avery, and R. Welte (1989). Cross-linking of phosphatidylethanolamine neighbors with dimethylsuberimidate is sensitive to the lipid phase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 986(2), 217–224.
- Rozenbaum, V. M., D. Yang, S. H. Lin, and T. Y. Tsong (2004). Catalytic wheel as a brownian motor. *J. Phys. Chem. B* 108, 15880–15889.
- Rustem, F., A. S. Ismagilov, N. Bowden, and G. M. Whitesides (2002). Autonomous movement and self-assembly. *Angew. Chem. Int. Edn* 41, 652–654.
- Saltel, F., E. Mortier, V. P. Hytonen, M. Jacquier, P. Zimmermann, V. Vogel, W. Liu, and B. Wehrle-Haller (2009). New PI(4,5)P<sub>2</sub>- and membrane proximal integrin-binding motifs in the talin head control beta3-integrin clustering. *J. Cell Biol.* 187(5), 715–731.
- Sambrook, J. and D. Russel (2000). *Molecular cloning (third edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sampath, S. C., R. Ohi, O. Leismann, A. Salic, A. Pozniakovski, and H. Funabiki (2004). The chromosomal passenger complex is required for Chromatin-Induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* 118(2), 187–202.
- Sauvage, J. (2006). *Molecular Machines and Motors*. Berlin: Springer-Verlag.
- Schalley, C. A., K. Beizai, and F. Vogtle (2001). On the way to rotaxane-based molecular motors: Studies in molecular mobility and topological chirality. *Acc. Chem. Res.* 34, 465–476.
- Schliwa, M. and G. Wöhlke (2003). Molecular motors. *Nature* 422(6933), 741–745.
- Schmidt, C. and V. Vogel (2010). Molecular shuttles powered by motor proteins: loading and unloading stations for nanocargo integrated into one device. *Lab on a Chip* 10(17), 2195.
- Schmoll, M., C. Seibel, C. Kotlowski, F. W. G. Vendt, B. Liebmann, and C. P. Kubicek (2010). Recombinant production of an aspergillus nidulans class i hydrophobin (DewA) in hypocrea jecorina (*Trichoderma reesei*) is promoter-dependent. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(1), 95–103.
- Schoch, C. L., J. R. Aist, O. C. Yoder, and B. G. Turgeon (2003). A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 39(1), 1–15.

- Scholey, J. M., J. Heuser, J. T. Yang, and L. S. Goldstein (1989). Identification of globular mechanochemical heads of kinesin. *Nature* 338(6213), 355–357. PMID: 2493586.
- Schuchardt, I., D. Assmann, E. Thines, C. Schuberth, and G. Steinberg (2005). Myosin-V, kinesin-1, and kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Biol. Cell* 16(11), 5191–5201.
- Seetharam, R., Y. Wada, S. Ramachandran, H. Hess, and P. Satir (2006). Long-term storage of bionanodevices by freezing and lyophilization. *Lab on a Chip* 6(9), 1239–1242.
- Seguin, L., C. Liot, R. Mzali, R. Harada, A. Siret, A. Nepveu, and J. Bertoglio (2009). CUX1 and E2F1 regulate coordinated expression of the mitotic complex genes *ect2*, *MgcRacGAP*, and *MKLP1* in S phase. *Molecular and Cellular Biology* 29(2), 570–581. PMID: 19015243 PMCID: 2612504.
- Sekula, S., J. Fuchs, S. Weg-Remers, P. Nagel, S. Schuppler, J. Fragala, N. Theilacker, M. Franzreb, C. Wingren, P. Ellmark, C. A. K. Borrebaeck, C. A. Mirkin, H. Fuchs, and S. Lenhert (2008, October). Multiplexed lipid dip-pen nanolithography on subcellular scales for the templating of functional proteins and cell culture. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 4(10), 1785–1793. PMID: 18814174.
- Sheeman, B., P. Carvalho, I. Sagot, J. Geiser, D. Kho, M. Hoyt, and D. Pellman (2003). Determinants of *S. cerevisiae* dynein localization and activation: Implications for the mechanism of spindle positioning. *Current Biology* 13(5), 364–372.
- Sherban, S. D., M. I. Danko, B. D. Monastyrskaya, V. I. Morgun, and E. A. BagleÄ (1982). [Fatty-acid composition of lipids and physicochemical characteristics of membrane fractions and the membrane of endoplasmic reticulum of thymus and pliss' lymphosarcoma]. *UkrainskiÄ BiokhimicheskiÄ Zhurnal* 54(3), 298–306. PMID: 6896591.
- Siegel, J. (2005). Inventing the nanomolecular wheel. *Science* 310, 63–64.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972, February). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)* 175(23), 720–731. PMID: 4333397.
- Soanes, C. and A. Stevenson (2005). Oxford dictionary of english.
- Song, W., Q. He, Y. Cui, H. Möhwald, S. Diez, and J. Li (2009). Assembled capsules transportation driven by motor proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379(2), 175–178.
- Soong, R. K., G. D. Bachand, H. P. Neves, A. G. Olkhovets, H. G. Craighead, and C. D. Montemagno (2000). Powering an inorganic nanodevice with a biomolecular motor. *Science* 290(5496), 1555–1558.
- Stefano, L. D., I. Rea, A. Armenante, P. Giardina, M. Giocondo, and I. Rendina (2007). Self-Assembled biofilm of hydrophobins protects the silicon surface in the KOH wet etch process. *Langmuir* 23(15), 7920–7922.
- Stoddart, J. F. (2001). Molecular machines. *Acc. Chem. Res.* 34, 410–411.

- Stolz, A., N. Ertych, A. Kienitz, C. Vogel, V. Schneider, B. Fritz, R. Jacob, G. Dittmar, W. Weichert, I. Petersen, and H. Bastians (2010). The CHK2-BRCA1 tumour suppressor pathway ensures chromosomal stability in human somatic cells. *Nat Cell Biol* 12(5), 492–499.
- Stracke, R., K. Böhm, J. Burgold, H. Schacht, and E. Unger (2000). Physical and technical parameters determining the functioning of a kinesin-based cell-free motor system. *Nanotechnology* 11, 52–56.
- Stracke, R., K. J. Böhm, L. Wollweber, J. A. Tuszynski, and E. Unger (2002). Analysis of the migration behaviour of single microtubules in electric fields. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293(1), 602–609.
- Stringer, M. A. and W. E. Timberlake (1995). *dewA* encodes a fungal component of the aspergillus spore wall. *Molecular Microbiology* 16(1), 33–44. PMID: 7651135.
- Sugita, S., T. Murase, N. Sakamoto, T. Ohashi, and M. Sato (2010). Size sorting of kinesin-driven microtubules with topographical grooves on a chip. *Lab on a Chip* 10(6), 755–761.
- Telley, I. A., P. Bieling, and T. Surrey (2009). Obstacles on the microtubule reduce the processivity of kinesin-1 in a minimal in vitro system and in cell extract. *Biophysical Journal* 96(8), 3341–3353. PMID: 19383477.
- Thordarson, P., E. J. A. Bijsterveld, A. E. Rowan, and R. J. M. Nolte (2003). Epoxidation of polybutadiene by a topologically linked catalyst. *Nature* 424, 915–918.
- Thoresen, T. and J. Gelles (2008). Processive movement by a kinesin heterodimer with an inactivating mutation in one head. *Biochemistry* 47(36), 9514–9521. PMID: 18702529 PMID: 2586147.
- Thormählen, M., A. Marx, S. A. Müller, Y. Song, E. M. Mandelkow, U. Aebi, and E. Mandelkow (1998). Interaction of monomeric and dimeric kinesin with microtubules. *Journal of Molecular Biology* 275(5), 795–809. PMID: 9480770.
- Thrower, D. A., M. A. Jordan, B. T. Schaar, T. J. Yen, and L. Wilson (1995). Mitotic HeLa cells contain a CENP-E-associated minus end-directed microtubule motor. *The EMBO Journal* 14(5), 918–926. PMID: 7889940 PMID: 398164.
- Tripet, B., R. D. Vale, and R. S. Hodges (1997). Demonstration of coiled-coil interactions within the kinesin neck region using synthetic peptides. implications for motor activity. *The Journal of Biological Chemistry* 272(14), 8946–8956. PMID: 9083016.
- Tucker, R., A. K. Saha, P. Katira, M. Bachand, G. D. Bachand, and H. Hess (2009). Temperature compensation for hybrid devices: Kinesin's  $k_m$  is temperature independent. *Small* 5(11), 1279–1282.
- Tulu, U. S., C. Fagerstrom, N. P. Ferenz, and P. Wadsworth (2006). Molecular requirements for Kinetochores-Associated microtubule formation in mammalian cells. *Current biology : CB* 16(5), 536–541. PMID: 16527751 PMID: 1500889.

- Uchimura, S., Y. Oguchi, Y. Hachikubo, S. Ishiwata, and E. Muto (2010). Key residues on microtubule responsible for activation of kinesin ATPase. *EMBO J advance online publication*.
- Uppalapati, M., Y. Huang, V. Aravamuthan, T. N. Jackson, and W. O. Hancock (2010). "Artificial mitotic spindle" generated by dielectrophoresis and protein micropatterning supports bidirectional transport of kinesin-coated beads. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*. PMID: 21031221.
- Uppalapati, M., Y. Huang, T. N. Jackson, and W. O. Hancock (2008a). Enhancing the stability of kinesin motors for microscale transport applications. *Lab on a Chip* 8(2), 358–361. PMID: 18231678.
- Uppalapati, M., Y.-M. Huang, T. Jackson, and W. Hancock (2008b). Microtubule alignment and manipulation using ac electrokinetics. *Small* 9, 1371–81.
- Vale, R. D. (2001). *Guidebook to Cytoskeletal and Motor Proteins*. Oxford University Press.
- Vale, R. D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112(4), 467–480.
- Vale, R. D. and R. A. Milligan (2000). The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288(5463), 88–95.
- Vale, R. D., T. S. Reese, and M. P. Sheetz (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42(1), 39–50. PMID: 3926325.
- Vale, R. D., B. J. Schnapp, T. Mitchison, E. Steuer, T. S. Reese, and M. P. Sheetz (1985). Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell* 43(3, Part 2), 623–632.
- Vallee, R. B. and H. S. Shpetner (1990). Motor proteins of cytoplasmic microtubules. *Annual Review of Biochemistry* 59(1), 909–932.
- van Delden, R. A. (2005). Unidirectional molecular motor on a gold surface. *Nature* 437, 1337–1340.
- van den Ent, F., A. Lockhart, J. Kendrick-Jones, and J. Löwe (1999). Crystal structure of the n-terminal domain of MukB: a protein involved in chromosome partitioning. *Structure* 7(10), 1181–1187.
- van den Heuvel, M. G. L., M. P. de Graaff, and C. Dekker (2006). Molecular sorting by electrical steering of microtubules in Kinesin-Coated channels. *Science* 312(5775), 910–914.
- van den Heuvel, M. G. L. and C. Dekker (2007). Motor proteins at work for nanotechnology. *Science* 317(5836), 333–336.
- Varga, V., C. Leduc, V. Bormuth, S. Diez, and J. Howard (2009). Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate Length-Dependent microtubule depolymerization. *Cell* 138(6), 1174–1183.

- Verhey, K. J. and T. A. Rapoport (2001). Kinesin carries the signal. *Trends in Biochemical Sciences* 26(9), 545–550. PMID: 11551791.
- Vicario, J. (2005). Catalytic molecular motors: Fueling autonomous movement by surface bond synthetic manganese catalases. *Chem. Commun.*, 3936–3938.
- Vicario, J., M. Walko, A. Meetsma, and B. L. Feringa (2006). Fine tuning of the rotary motion by structural modification in light-driven unidirectional molecular motors. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 5127–5135.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal* 1(8), 945–951. PMID: 6329717.
- Wang, D. S. and G. Shaw (1995). The association of the c-terminal region of beta i sigma II spectrin to brain membranes is mediated by a PH domain, does not require membrane proteins, and coincides with a inositol-1,4,5 triphosphate binding site. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 217(2), 608–615. PMID: 7503742.
- Wang, L., C. liang Ho, D. Sun, R. K. Liem, and A. Brown (2000, March). Rapid movement of axonal neurofilaments interrupted by prolonged pauses. *Nat Cell Biol* 2(3), 137–141.
- Waring, R. B., G. S. May, and N. R. Morris (1989). Characterization of an inducible expression system in aspergillus nidulans using alcA and tubulin-coding genes. *Gene* 79(1), 119–130. PMID: 2673931.
- Weaver, B. A., Z. Q. Bonday, F. R. Putkey, G. J. Kops, A. D. Silk, and D. W. Cleveland (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *The Journal of Cell Biology* 162(4), 551–563. PMID: 12925705 PMCID: 2173788.
- Whitesides, G. M. (2001). The once and future nanomachine. biology outmatches futurists' most elaborate fantasies for molecular robots. *Sci. Am.* 285, 78–84.
- Woehlke, G. and M. Schliwa (2000). Directional motility of kinesin motor proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1496(1), 117–127. PMID: 10722881.
- Wolyniak, M. J., K. Blake-Hodek, K. Kosco, E. Hwang, L. You, and T. C. Huffaker (2006, June). The regulation of microtubule dynamics in saccharomyces cerevisiae by three interacting plus-end tracking proteins. *Molecular Biology of the Cell* 17(6), 2789–2798. PMID: 16571681.
- Wood, K. W., R. Sakowicz, L. S. Goldstein, and D. W. Cleveland (1997). CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell* 91(3), 357–366. PMID: 9363944.
- Wösten, H. A. (2001). Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology* 55, 625–646. PMID: 11544369.
- Wösten, H. A. and M. L. de Vocht (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1469(2), 79–86. PMID: 10998570.

- Xia, C., E. A. Roberts, L. Her, X. Liu, D. S. Williams, D. W. Cleveland, and L. S. Goldstein (2003, April). Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *The Journal of Cell Biology* 161(1), 55–66. PMID: 12682084 PMCID: 2172877.
- Xie, P. (2010). Mechanism of processive movement of monomeric and dimeric kinesin molecules. *International Journal of Biological Sciences* 6(7), 665–674. PMID: 21060728.
- Yan, H., X. P. Zhang, Z. Y. Shen, and N. C. Seeman (2002). A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. *Nature* 415, 62–65.
- Yang, J. T., R. A. Laymon, and L. S. Goldstein (1989). A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. *Cell* 56(5), 879–889. PMID: 2522352.
- Yao, L., Y. Kawakami, and T. Kawakami (1994). The pleckstrin homology domain of bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(19), 9175–9179. PMID: 7522330.
- Yildiz, A., M. Tomishige, A. Gennerich, and R. D. Vale (2008). Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. *Cell* 134(6), 1030–1041. PMID: 18805095.
- Yildiz, A., M. Tomishige, R. D. Vale, and P. R. Selvin (2004). Kinesin walks Hand-Over-Hand. *Science* 303(5658), 676–678.
- Zekert, N. and R. Fischer (2009). The aspergillus nidulans kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Molecular Biology of the Cell* 20(2), 673–684. PMID: 19037104.
- Zhang, J., S. Li, R. Fischer, and X. Xiang (2003). Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in aspergillus nidulans is kinesin dependent. *Mol. Biol. Cell* 14(4), 1479–1488.
- Zhang, J., L. Zhuang, Y. Lee, J. F. Abenza, M. A. Penalva, and X. Xiang (2010). The microtubule plus-end localization of aspergillus dynein is important for dynein-early-endosome interaction but not for dynein ATPase activation. *Journal of Cell Science* 123(Pt 20), 3596–3604. PMID: 20876661.
- Zheng, X. (2004). Dipolar and nonpolar altitudinal molecular rotors mounted on a au(111) surface. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 4540–4542.

# Tabellenverzeichnis

2.1	ATPase-Aktivität von Kif5A und Kif5ADewA . . . . .	18
2.2	Gleitgeschwindigkeiten von Kif5ADewA, Kif5A und KinA441DewA . . . . .	19
2.3	ATPase-Aktivität von Kif5A und Kif5APH . . . . .	25
2.4	Gleitgeschwindigkeiten von Mikrotubuli auf KipAhktail . . . . .	39
4.1	Verwendete <i>Aspergillus nidulans</i> -Stämme . . . . .	57
4.2	Verwendete <i>Escherichia coli</i> -Stämme . . . . .	57
4.3	Erstellte Plasmide . . . . .	59
4.4	Medien für <i>E.coli</i> . . . . .	60
4.5	Medien für <i>A.nidulans</i> . . . . .	61
4.6	Zusätze für <i>A.nidulans</i> . . . . .	61

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Bewegung in lebenden Systemen . . . . .	2
1.2	Schematische Zeichnung eines Kinesin-1 . . . . .	5
1.3	Bewegungsmodell konventioneller Kinesine . . . . .	6
1.4	Vergleich von Kinesin-7 aus verschiedenen Organismen . . . . .	8
1.5	Zellendmarker in <i>S. pombe</i> und <i>A. nidulans</i> . . . . .	10
1.6	Schema eines ATP-Lieferanten aus Licht . . . . .	11
1.7	Transport mittels molekularer Motoren . . . . .	12
2.1	Modell eines Transportsystems im Nanomaßstab . . . . .	16
2.2	Konstrukte zur Mikrotubulibindung . . . . .	18
2.3	Kif5A und Kif5ADewA Motilität . . . . .	20
2.4	Lipidbindung von KinA441GFP via His <sub>6</sub> -Tag . . . . .	23
2.5	Motilität der an Lipide gebundenen KinA441 Proteine . . . . .	24
2.6	Lipidbindeassay mit Kif5aPH . . . . .	27
2.7	Motilitäts-Test mit Kif5APH . . . . .	28
2.8	Transport von Nanopartikeln durch Kif5APH . . . . .	30
2.9	Transport von Latexkügelchen durch Kif5A . . . . .	31
2.10	GFP-KipA <i>in vivo</i> . . . . .	33
2.11	Sequenzvergleich der wichtigsten Domänen von KipA . . . . .	34
2.12	Aufreinigung der KipA Konstrukte . . . . .	35
2.13	ATPase-Test von KipA . . . . .	36
2.14	Motilität von KipAhktail . . . . .	39

2.15	Schema der Mant-ADP-Freisetzungsexperimente . . . . .	41
2.16	MantADP-Freisetzungsexperimente an KipA . . . . .	42
4.1	Skizze eines ATPase-Tests . . . . .	86

## 5 Abkürzungsverzeichnis

---

APTMS	3-Aminopropyltriethoxysilane
DOGS-Ni-NTA	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl]-Ni-NTA
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPPS	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoserine
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Ni-NTA	Nitrilotriessigsäure
OTS	n-Octyltrichlorosilane
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PFMS	Perfluorodecyldimethylchlorosilane
PIP	Phosphatidylinositolphosphate
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Phosphatidylserine

---

# Danksagung

Ich möchte mich hiermit ganz herzlich bei Hr. Prof. Dr. Reinhard Fischer für die interessante Aufgabenstellung bedanken und für die Möglichkeit, in der Abteilung Mikrobiologie am Institut für Angewandte Biowissenschaften meine Dissertation anzufertigen. Auch danke ich Ihm für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Möglichkeit zum selbstständigen Arbeiten.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich Hr. Prof. Peter Nick.

Besonders möchte ich mich aber bei der gesamten „Außenstelle Fischer“ für die schöne Zeit und deren Motivation bedanken. Besonders zu erwähnen wäre dabei mein langjähriger Tischnachbar Jan mit dem ich viel Spaß hatte. Auch Tanja und unserer guten Seele Elisabeth möchte ich einen besonderen Dank aussprechen.

Durch die letzten Jahre mit dieser Gruppe hat sich ein gute Freundschaft entwickelt und mir über diverse „Motivationstiefs“ hinweg geholfen und vorangebracht. Auch diverse Feierabendbeschäftigungen waren in dieser Runde immer wieder gern gesehen.

Für Ideen, Diskussionen und diverse Blicke über die Schulter möchte ich mich ganz herzlich bei Maren bedanken.

Weiterhin zu erwähnen ist Sylwia vom INT, der Fachfrau für Lipide, mit der ich viel Zeit am Mikroskop verbracht habe und mit der ich viele anregende, wissenschaftliche Diskussionen hatte.

Ich möchte an dieser Stelle allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Requena, besonders Hannah, danken, die stets sehr hilfsbereit und kooperativ waren.

Einen ganz besonderen Dank gilt meiner Familie. Ich möchte mich für ihre langjährige, bedingungslose Unterstützung und Hilfe in allen Belangen ganz herzlich bedanken!

# Curriculum Vitae

---

Tobias Schunck

Schützenstrasse 59  
76137 Karlsruhe

mobil: 01762291784

Email: tobias\_schunck@yahoo.de

Dezember 2010

Name: Tobias Christian Schunck  
Datum und Geburtsort: 28. März.1980 in Homburg  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## Universitätsausbildung

Doktorand	seit März 2007	KIT
Diplom	Februar 2007	Universität Karlsruhe (TH)
Hauptstudium der Biologie	April 2003	Universität Karlsruhe (TH) Mikrobiologie, Zoologie, Biochemie, Physik
Grundstudium der Biologie	Oktober 2000	Universität Rostock

## Schulbildung

Gymnasium	1990 - 1999
Abiur	1999

## Mitgliedschaften

Verband Deutscher Biologen (vdbiol)

