

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WECHSELWIRKUNG
VON MIKROTUBULI MIT KINESINEN
UND COLCHICIN-DERIVATEN**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Diplom-Biologin
JANET ZAPKE
aus Aschersleben, Sachsen-Anhalt

Berlin, April 2011

Diese Arbeit wurde von Oktober 2006 bis April 2011 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) unter Anleitung von Prof. Dr. Hartmut Oschkinat angefertigt.

1. GUTACHTER: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)

2. GUTACHTER: Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz
Universität zu Köln, Institut für Organische Chemie

Disputation am: 18. August 2011

*In den Wissenschaften ist viel Gewisses,
sobald man sich von den Ausnahmen nicht irre machen lässt
und die Probleme zu ehren weiß.*

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>EINLEITUNG</i>	7
1.1.	Tubulin und Mikrotubuli	8
1.1.1.	Superfamilie und evolutionäre Aspekte	8
1.1.2.	Vielfalt der Mikrotubuli-Funktionen	9
1.1.3.	Allgemeiner Aufbau der Mikrotubuli	9
1.1.4.	GTP-abhängige Dynamik der Mikrotubuli	10
1.1.5.	Struktur des $\alpha\beta$ -Tubulins und der Mikrotubuli	11
1.1.6.	Regulationsmechanismen	14
1.2.	Mikrotubuli-assoziierte Wirkstoffe	15
1.2.1.	Mikrotubuli-stabilisierende Naturstoffe	15
1.2.2.	Mikrotubuli-destabilisierende Naturstoffe	17
1.2.3.	Die Kinetik der Colchicin-Bindung	19
1.2.4.	Entwicklung von Colchicin-Derivaten	20
1.3.	Kinesine und deren Motordomänen	21
1.3.1.	Kinesin-Superfamilie	21
1.3.2.	Funktionelle Aspekte und klinische Relevanz	21
1.3.3.	Genereller Aufbau eines konventionellen Kinesins	22
1.3.4.	Die Struktur der Kinesin-Motordomäne	23
1.3.5.	Dynamik des Kinesin-vermittelten Transports	24
1.3.6.	Strukturelle Grundlage der Fortbewegung	27
1.4.	Kinesin-Mikrotubuli-Interaktion	27
1.4.1.	Untersuchungen auf Seiten der Mikrotubuli	27
1.4.2.	Identifikation der Interaktionsfläche der Motordomänen	28
1.4.3.	Kryo-EM und 3D-Rekonstruktion	29
1.5.	Festkörper-NMR-Spektroskopie	31
1.5.1.	Prinzip und Entwicklungen	31
1.5.2.	Grundlegende Begrifflichkeiten	32
1.5.3.	Stand der Technik hinsichtlich NMR an Mikrotubuli	33
1.6.	Zielstellungen	34
1.6.1.	Festkörper-NMR-Untersuchungen zur Kinesin-Mikrotubuli-Interaktion	34
1.6.2.	Bindungsstudien an neuen Colchicinoiden	35
2.	<i>MATERIAL UND METHODEN</i>	36
2.1.	Chemikalien, Materialien und Geräte	36
2.2.	Molekularbiologische Arbeiten	36
2.2.1.	Oligonukleotide und Vektoren	36
2.2.2.	Polymerase-Kettenreaktion	38
2.2.3.	DNA-Gelelektrophorese	38
2.2.4.	Klonierung	38
2.2.5.	Verifizierung der Plasmide	39
2.3.	Biotechnologische Methoden	39
2.3.1.	<i>Escherichia coli</i> Stämme	39
2.3.2.	Anzuchtmedien für Bakterienkulturen	40
2.3.3.	^2H - ^{13}C - ^{15}N -Isotopenmarkierung rekombinanter Proteine	40
2.3.4.	Ermittlung optimaler Expressionsbedingungen	41
2.3.5.	Expression in Schüttelkultur	41
2.3.6.	Hochzelldichtefermentation	41
2.4.	Biochemische Analysemethoden	42
2.4.1.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	42

2.4.2.	Berechnung von Proteinkonzentrationen	43
2.4.3.	Massenspektrometrie	43
2.5.	Protein- und Komplexpräparationen	44
2.5.1.	Reinigung deuterierter Motordomänen	44
	• Zellaufschluss und Klärung	45
	• Erste immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie	45
	• Konzentrierung und Gelfiltration	45
	• Spaltung N-terminaler Fusionssequenzen	46
	• Zweite IMAC und abschließende Konzentrierung	46
2.5.2.	Tubulinextraktion aus natürlichen Quellen	46
	• Reinigung durch Polymerisationszyklen	47
	• Entfernung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen	47
2.5.3.	Komplexpräparation	48
	• Polymerisation der Mikrotubuli	48
	• Komplexbildung	48
	• Visualisierung durch Elektronenmikroskopie	49
2.6.	NMR-Spektroskopie	49
2.6.1.	Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie	49
	• Probenvorbereitung	50
	• Konventionelle MAS-NMR-Spektroskopie	51
	• DNP-MAS-NMR-Spektroskopie	51
2.6.2.	Lösungs-NMR-Spektroskopie	52
	• Titration an ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter KIF5C-Motordomäne	53
	• Sättigungstransfer-Differenz NMR-Spektroskopie	53
	• ^{19}F -NMR-Spektroskopie	53
2.6.3.	Datenanalyse	53
2.7.	Bindungsstudien und Wirkstoffanalysen	54
2.7.1.	Isotherme Titrationskalorimetrie	54
2.7.2.	Substanzbibliothek an Colchicinoiden	54
2.7.3.	Analyse der <i>in vitro</i> Tubulin-Polymerisation	57
2.7.4.	Untersuchung der Bindungsspezifität	57
2.7.5.	Morphologie der Mikrotubuli in Tumorzellen	58

RESULTATE UND DISKUSSION

3.	PROTEIN- UND KOMPLEXPRÄPARATION	59
3.1.	Präparation zweier Kinesin-Motordomänen	59
3.1.1.	Klonierung in expressionsstarke Vektoren	60
3.1.2.	Ermittlung optimaler Expressionsbedingungen	60
3.1.3.	Hochzelldichtefermentation zur rekombinanten Proteinexpression ^2H - ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkierter Motordomänen	62
3.1.4.	Reinigung der Kinesin-Motordomänen	64
3.1.5.	Bestimmung des Markierungsgrades durch Massenspektrometrie	65
3.2.	Tubulinpräparation	66
3.3.	Komplexpräparation	67
4.	FESTKÖRPER-MAS-NMR-SPEKTROSKOPIE AN KINESIN-MIKROTUBULI-KOMPLEXEN	69
4.1.	Heteronukleare Korrelationen	69
4.1.1.	^2H - ^{13}C -HETCOR bildet die Motordomäne ab	69
4.1.2.	^1H - ^{13}C -HETCOR eignet sich nicht für selektive Experimente	70
4.2.	Selektive Filterexperimente	72

4.2.1.	RFDR- und TEDOR-Experimente	72
4.2.2.	Vergleich mit direkter ¹³ C-Anregung	74
4.2.3.	Parallelen im Vergleich der Motordomänen	75
4.2.4.	Kontrollexperimente	75
4.3.	Dynamische Kernpolarisation	77
4.3.1.	Signalverstärkung und Messzeitverkürzung	77
4.3.2.	Vergleich mit konventionellen Festkörper-MAS-Spektren	77
4.3.3.	Übereinstimmungen in RFDR- und TEDOR-Spektren	80
4.3.4.	Signalauflösung durch Doppelquanten-Koherenz	81
4.3.5.	Tripleresonanzexperimente im Hinblick auf sequentielle Zuordnungen	81
4.4.	Einbettung in Strukturelle Betrachtungen	83
4.4.1.	Ausschluss eines Effekts der Nukleotidbindung	83
4.4.2.	Ausschluss von Pipes-Artefakten	85
	• Keine Bindung in STD-Experimenten	86
	• Kein Effekt in Titrationsexperimenten	88
	• Kein Nachweis durch isotherme Titrationskalorimetrie	89
4.4.3.	Illustration der Interaktionsfläche der Motordomänen	90
4.5.	Perspektiven weiterer Untersuchungen	93
4.5.1.	NMR-spektroskopische Erweiterungen	93
4.5.2.	Variationen in der Komplexpräparation	94
5.	<i>BIOLOGISCHE AKTIVITÄT NEUER COLCHICINOIDE</i>	96
5.1.	Bindungsnachweis mittels NMR-Spektroskopie	96
5.2.	Wirkung auf die Tubulin-Polymerisation	98
5.3.	Bindung an die Colchicin-Bindestelle	99
5.4.	Effekt auf die Mikrotubuli-Morphologie	101
5.5.	Einordnung der Untersuchungsergebnisse	102
5.5.1.	Vergleich mit zytotoxischen Eigenschaften	102
5.5.2.	Betrachtungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung	104
6.	<i>AUSBLICK AUF INNOVATIVE FORSCHUNGSANSÄTZE</i>	106
6.1.	Suche nach potenten Colchicin-Derivaten	106
6.2.	Überwindung von Arzneistoffresistenzen	107
6.3.	Nanotechnologische Anwendungen	107
6.4.	Ausweitung auf neue Zielobjekte	108
6.5.	Strukturanalysen als Teil der Systembiologie	110
	Zusammenfassung	111
	Summary	113
	Literaturverzeichnis	115
	Abkürzungsverzeichnis	126
	Danksagung	129
	Curriculum vitae	131

1. Einleitung

Filament-bildende Proteine in Eukaryoten stabilisieren die Zellform, sorgen für aktive Bewegung und sind am intrazellulären Transport beteiligt (Fletcher und Mullins, 2010). Das sogenannte Zytoskelett ist in Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli unterteilt. Aktin- und Intermediärfilamenten werden u.a. Stützfunktionen zugeschrieben. Transport und Bewegung werden über Aktinfilamente und Mikrotubuli vermittelt. Um ihre Funktionen zielgerichtet auszuüben, sind die Filamente dynamisch strukturierbar. Diese Eigenschaft ist z.B. in der Mitose von Relevanz, wenn die Mikrotubuli den Spindelapparat ausbilden und die Tochterchromatiden zu den Zellpolen gezogen werden (Sharp *et al.*, 2000).

Organismen sind auf intrazellulären Transport angewiesen, da viele Biomoleküle ihre Funktion nicht am Syntheseort ausüben. Im Laufe der Evolution hat sich ein komplexes System etabliert, mit dem der Transport in der Zelle gesteuert wird. Sogenannte Motorproteine sind mit dem Zytoskelett assoziiert und führen die gewünschte Bewegung unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) aus (van den Heuvel und Dekker, 2007). Sie bestehen in der Regel aus Motordomänen, die mit dem Zytoskelett interagieren, sowie Schwanzdomänen, die weitere Proteininteraktionen eingehen können und die zu transportierenden Lasten binden. Man unterscheidet drei Arten von Motorproteinen: Myosine, Dyneine und Kinesine. Myosine interagieren mit Aktinfilamenten und sind z.B. für die Kontraktion der Muskulatur verantwortlich (Sweeney und Houdusse, 2010). Dyneine und Kinesine bewegen sich entlang von Mikrotubuli. Über sie erfolgt ein wesentlicher Teil des intrazellulären Transports (Ross *et al.*, 2008). Beispielsweise wird in neuronalen Axonen entlang von Mikrotubuli einer der längsten und aufwendigsten Transportvorgänge durchgeführt. Der axonale Transport wird in einen dyneinvermittelten, retrograden Transport zum Zellkörper und einen kinesinvermittelten, anterograden Transport zu den Synapsen unterteilt (Vale, 2003).

In unkontrolliert proliferierenden Krebszellen oder bei neurodegenerativen Erkrankungen sind häufig Fehlfunktionen von Zytoskelettkomponenten beteiligt (Hall, 2009; De Vos *et al.*, 2008). Mit detaillierten Strukturinformationen können die zugrunde liegenden dynamischen Prozesse und Proteininteraktionen besser verstanden werden. Die strukturellen und funktionellen Informationen zu Proteinen und Proteinkomplexen bilden die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Nachfolgend ist der Stand der gegenwärtigen Forschung mit den Schwerpunkten Mikrotubuli und Kinesine umfassend dargestellt.

1.1. Tubulin und Mikrotubuli

1.1.1. Superfamilie und evolutionäre Aspekte

Sieben Familien umfasst die Tubulin-Superfamilie, die mit α , β , γ , δ , ϵ , ζ und η bezeichnet werden. Tubuline einer Familie sind untereinander mindestens 60% homolog, wobei die größten Unterschiede amino- und carboxyterminal auftreten (Burns, 1991). Die Mikrotubuli-bildenden α - und β -Tubuline sind etwa 55 kDa groß und umfassen ca. 450 Aminosäuren. Ihnen liegt eine hohe Diversität zugrunde. Die Primärsequenz von α - und β -Tubulin ist zu 40% identisch, wobei für beide Familien eine Reihe von Isotypen existieren. Beispielsweise wurden im humanen Genom 15 Gene für α -Tubuline und 21 Gene für β -Tubuline entdeckt. Die Isoformen werden entwicklungs- oder gewebespezifisch exprimiert. Kombiniert mit einer Vielzahl posttranslationaler Modifikationen bilden sie strukturell oder funktionell unterschiedliche Mikrotubuli. Innerhalb der Eukaryoten gehören α - und β -Tubulin zusammen mit Aktin und dem Elongationsfaktor EF1 α zu den am stärksten konservierten Proteinen. Mit diesen Proteinen wurde ein phylogenetischer Stammbaum entwickelt, der in der Gruppierung einzelner Taxa mit dem Stammbaum aus ribosomaler RNA vergleichbar ist (Baldauf *et al.*, 2000).

Die verbleibenden Tubulin-Familien sind homolog zu α - und β -Tubulin, besitzen aber andere Funktionen. Es wurden drei humane γ -Tubulingene identifiziert. Die Primärsequenz des γ -Tubulins ist jeweils zu etwa 30% identisch mit α - bzw. β -Tubulin (McKean *et al.*, 2001). γ -Tubulin bildet zusammen mit mindestens sechs akzessorischen Proteinen Ringkomplexe, welche die Mikrotubuli-Bildung induzieren. Diese Ringkomplexe sind im Zentrosom lokalisiert, das den Ursprung des mitotischen Spindelapparats bildet (Zheng *et al.*, 1995). Über die vor zehn Jahren entdeckten δ -, ϵ -, ζ - und η -Tubuline ist noch wenig bekannt. Sie sind an Zentriolen lokalisiert, die sich in Zentrosomen oder Basalkörpern der Geißeln von z.B. Prokaryoten und Spermatozoen befinden. Die gepaart auftretenden Zentriolen bestehen ihrerseits aus kurzen, stabilen Mikrotubuli. δ -, ϵ -, ζ - und η -Tubuline führen in deren Umfeld vermutlich strukturgebende Funktionen und Versorgungsaufgaben aus (Dutcher, 2003).

Prokaryoten verfügen über das zum Tubulin homologe FtsZ (*filamentous temperature-sensitive mutant Z*). Dieser evolutionäre Vorläufer ist in der bakteriellen Zellteilung an der Einschnürung der Zellmembran mit Hilfe eines kontraktilen Rings (Z-Ring) beteiligt (Erickson *et al.*, 2010). Mit hochauflösenden, mikroskopischen Methoden wurde die räumliche Anordnung im kontraktilen Ring und Struktur-Funktions-Beziehungen untersucht (Fu *et al.*, 2010). Aus evolutionsbiologischer Sicht stellt die Entdeckung von kernkodierten FtsZ-Varianten in Pflanzen ein Indiz für die Endosymbiontentheorie der Chloroplasten dar (Erickson, 1997). Die pflanzlichen FtsZ-Proteine besitzen Signalsequenzen, die den

Transport zu den Chloroplasten initiieren, wo sie bei deren Teilung eine Rolle spielen (Osteryoung und Nunnari, 2003). In Bakterien der Gattung *Prostheco bacter* existieren zusätzlich zu FtsZ weitere Tubulin-ähnliche Proteine. Sie werden als bakterielle Tubuline BtubA und BtubB bezeichnet und können Filamente ausbilden (Jenkins *et al.*, 2002). Phylogenetische und strukturelle Analysen deuten auf einen horizontalen Gentransfer aus einem Eukaryoten hin (Schlieper *et al.*, 2005).

1.1.2. Vielfalt der Mikrotubuli-Funktionen

Das Mikrotubuli-Netzwerk wird von den Motorproteinen Dynein und Kinesin für den intrazellulären Transport genutzt. Durch den speziellen Aufbau der Mikrotubuli und der Motorproteine selbst, können sie sich gerichtet fortbewegen. Die Aufgaben der Mikrotubuli gehen über die Bereitstellung von Pfaden für den intrazellulären Transport hinaus. Sie bilden während der Mitose den Spindelapparat, der die Tochterchromosomen trennt. Dies bedarf einer exakten Koordination und Regulation der Mikrotubuli-Dynamik. Wie der Begriff Zytoskelett schon vorgibt, besitzen Mikrotubuli auch formgebende Funktion. Außerdem sind sie wesentlicher Bestandteil von eukaryotischen Geißeln, über die sich z.B. Spermatozoen fortbewegen. Allen Geißeln ist eine charakteristische Anordnung der Mikrotubuli gemein, die als Axonem bezeichnet wird. Sie bilden im Querschnitt ein 9x2+2-Muster, wobei ein Ring aus neun doppelten Mikrotubuli zwei zentrale Mikrotubuli einschließt. Für die Bewegung interagieren Dyneine mit den Mikrotubuli und erzeugen durch ATP-Hydrolyse die nötige Kraft zur Formänderung des Axonems.

1.1.3. Allgemeiner Aufbau der Mikrotubuli

Je ein Tubulin α - und β -Monomer bilden ein $\alpha\beta$ -Tubulin-Dimer. Längs aneinandergereihte Dimere werden als Protofilament bezeichnet, wobei ein alternierendes Muster aus α - und β -Untereinheiten entsteht (*Abbildung 1.1*). Mikrotubuli wiederum sind aus mehreren parallel angeordneten Protofilamenten aufgebaut, die einen Hohlzylinder formen. Die Anzahl an Protofilamenten variiert zwischen neun und 16 und bestimmt den Durchmesser eines Mikrotubulus. Laterale Interaktionen zwischen den Protofilamenten bestehen zum selben Monomertyp ($\alpha\alpha$ und $\beta\beta$). Allerdings sind diese um etwa 0,9 nm versetzt, so dass eine spiralförmige Anordnung der Tubulin-Untereinheiten entsteht. Die Helix wird in den meisten Mikrotubuli, inklusive des typischsten aus 13 Protofilamenten, durch eine Längsnaht (*seam*) unterbrochen. Dabei treffen α - und β -Tubulin zweier benachbarter Protofilamente aufeinander. In wenigen Mikrotubuli (z.B. mit zwölf Protofilamenten) entsteht keine Längsnaht.

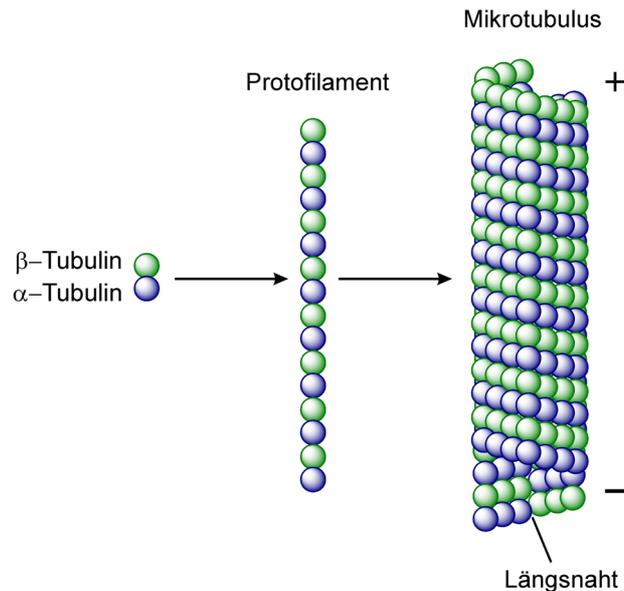


Abbildung 1.1: Aufbau der Mikrotubuli aus α - und β -Tubulinen. Der hier dargestellte Mikrotubulus besteht aus 13 Protofilamenten. Bei der spiralförmigen Anordnung entsteht an der Rückseite eine Längsnaht. Die intrinsische Polarität ist mit + und – gekennzeichnet (nach Downing, 2000).

Mikrotubuli besitzen eine Polarität. Sie weisen sogenannte Minus- und Plusenden auf. β -Tubulin schließt das Plusende, α -Tubulin das Minusende ab. Mit der Polarität gehen unterschiedliche Dynamiken der Enden einher, wobei das Plusende etwa zehnmals schneller wächst als das Minusende (Wade, 2007). Im Zytoplasma sind die Minusenden im Zentrosom nahe des Nukleus fixiert, in dem auch γ -Tubulin lokalisiert ist. Im Englischen wird der Begriff *microtubule-organizing center* (MTOC) verwendet, aus dem die Mikrotubuli radial in Richtung Zellperipherie wachsen.

1.1.4. GTP-abhängige Dynamik der Mikrotubuli

In natürlicher Umgebung interagieren α - und β -Tubulin mit derart großer Affinität, dass sie nahezu vollständig als Heterodimer vorliegen. Bei der Polymerisation aggregieren die Heterodimere zu Mikrotubuli. Die Mikrotubuli-Dynamik verläuft zyklisch, wobei zwischen Wachstum und Zerfall unterschieden wird. Es stellt sich kein Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation ein. Vielmehr spricht man von einer dynamischen Instabilität (Mitchison und Kirschner, 1984). Bei der sogenannten Katastrophe (*catastrophe*) kehrt sich Wachstum in Zerfall um. Dem Schrumpfen wird durch neuerliche Polymerisation bei der sogenannten Rettung (*rescue*) entgegengewirkt. Diese Dynamik ist vor allem in der Mitose relevant, da hier die Mikrotubuli koordiniert verlängert und verkürzt werden müssen. Mit den resultierenden Schub- und Zugkräften werden die Tochterchromatiden getrennt (Dogterom *et al.*, 2005).

Die Dynamik wird über Guanosin triphosphat (GTP) und -diphosphat (GDP) reguliert. α -Tubulin bindet GTP, das auch während der Polymerisation nicht hydrolysiert wird. β -Tubulin kommt GTP- oder GDP-gebunden vor. Es kann das Nukleotid hydrolysieren und austauschen. Das $\alpha\beta$ -Tubulin-Dimer wird je nach Art des an β -Tubulin gebundenen Nukleotids als GTP-Tubulin und GDP-Tubulin bezeichnet. An die freien β -Tubuline am Plusende assemblieren weitere GTP-Tubuline. Es folgt die GTP-Hydrolyse, so dass der Hauptteil des Mikrotubulus aus GDP-Tubulin besteht. Die Stabilität des Mikrotubulus wird durch den Nukleotid-Zustand reguliert. Am Plusende verbleibt eine GTP-Kappe noch nicht hydrolysiertes Dimere. Sie schützt das instabile GDP-Tubulin-Grundgerüst vor der Depolymerisation. Bei zu geringer Dimerkonzentration wird am Plusende GTP eher hydrolysiert, als dass neue Dimere assembliert werden. In diesem Fall verliert das Plusende die GTP-Kappe, was zur Depolymerisation führt (Drechsel und Kirschner, 1994). Im freien GDP-Tubulin wird GDP gegen GTP ausgetauscht, und so auf die nächste Polymerisation vorbereitet.

Die GTP-Hydrolyse ist für die Polymerisation nicht essentiell. Dies wurde mit dem GTP-Analogon GMPCPP (Guanosin-5'-[(α,β)-methylentriphosphat] gezeigt, das nur sehr langsam hydrolysiert wird (Hyman *et al.*, 1992). Die mit GMPCPP hergestellten Mikrotubuli sind zudem deutlich stabiler als die GDP-Varianten. Dieses Phänomen ist strukturell bedingt, da GTP-Tubulin eine gerade Struktur ausbildet, während GDP-Tubulin eine leicht gekrümmte Struktur besitzt. Bei depolymerisierenden Mikrotubuli ist dies an sich ablösenden, ringförmigen Protofilamenten zu erkennen (Mandelkow *et al.*, 1991).

Die Polymerisation verläuft zudem temperatur- und konzentrationsabhängig. Diese Eigenschaften werden für die Reinigung von Tubulin aus natürlichen Quellen genutzt. Die höchste Ausbeute erhält man aus Hirngewebe, da der Tubulinanteil dort 20% des Gesamtproteingehalts beträgt (Wade, 2007). Die *in vitro* Polymerisation erfolgt in Anwesenheit von GTP, Magnesium-Ionen und einer Temperatur von 37 °C. Verringert man die Temperatur auf 4 °C, werden die Mikrotubuli depolymerisiert. Kombiniert mit Ultrazentrifugation kann man durch Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation Tubulin effektiv reinigen (Shelanski *et al.*, 1973).

1.1.5. Struktur des $\alpha\beta$ -Tubulins und der Mikrotubuli

Die Struktur des Heterodimers wurde mittels Elektronen-Kristallographie aufgeklärt (Nogales *et al.*, 1998; Löwe *et al.*, 2001). Kristallstrukturanalysen am natürlichen Protofilament sind nicht möglich, da die sich bildenden polymorphen Aggregate nicht für Beugungsexperimente geeignet sind. Man kann allerdings mit Hilfe von Zinkionen zweidimensionale Kristalle erzeugen, in denen die Protofilamente antiparallel angeordnet sind. Es wurde in Gegenwart von Paclitaxel kristallisiert, einem Wirkstoff der Mikrotubuli

stabilisiert. Die Heterodimere wurden auch mittels Röntgen-Kristallstrukturanalyse untersucht (Gigant *et al.*, 2000; Dorléans *et al.*, 2009). Dabei wurde die helikale Domäne des stathmin-ähnlichen Proteins RB3 (RB3-SLD) genutzt, das zwei Heterodimere bindet und in einer leicht gekrümmten Konformation fixiert. Mit dieser Komplexierung war es auch möglich, die Bindestellen verschiedener Mikrotubuli-destabilisierender Wirkstoffe strukturell aufzuklären (Ravelli *et al.*, 2004; Gigant *et al.*, 2005; Dorléans *et al.*, 2009). In der Regel liegt die Auflösung für beide Methoden bei 3-4 Å (Angström). Vergleicht man beide Strukturen, steht der leicht gekrümmte Tubulin-Stathmin-Komplex einer geraden, zinkinduzierten Struktur gegenüber (*Abbildung 1.2*). In der gekrümmten Konformation rotieren beide Tubuline um 11° relativ zueinander (Ravelli *et al.*, 2004). Außerdem gibt es lokale Unterschiede in einigen Schleifen, die Kontakte innerhalb und zu benachbarten Protofilamenten ausbilden. Beide Zustände können mit der Mikrotubuli-Dynamik in Einklang gebracht werden. Während die zinkinduzierte Struktur eher der Anordnung im Mikrotubulus entspricht, beobachtet man die gekrümmte Struktur bei der Depolymerisation, wobei sich die Protofilamente ringförmig ablösen.

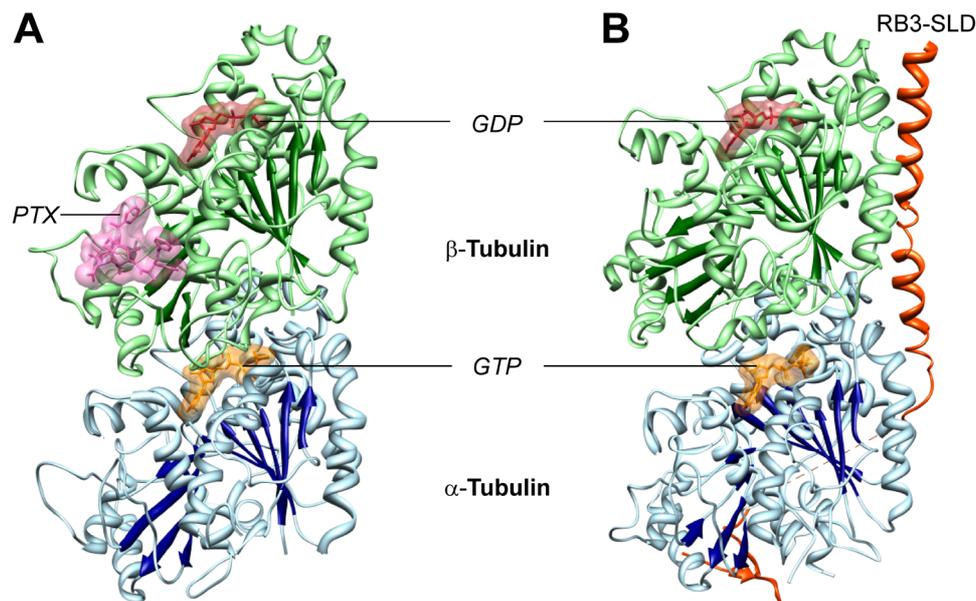


Abbildung 1.2: Vergleich zweier Tubulin-Heterodimer-Strukturen mit α -Tubulin in Blau und β -Tubulin in Grün. α -Tubulin liegt GTP-gebunden und β -Tubulin GDP-gebunden vor. A) Eine mit Paclitaxel (PTX) stabilisierte Struktur wurde mit einer Auflösung von 3,5 Å mittels Elektronen-Kristallographie bestimmt (Eintrag in Proteindatenbank (PDB): 1jff; Löwe *et al.*, 2001). B) Ein mit stathmin-ähnlicher Domäne RB3-SLD stabilisiertes Heterotetramer (hier nur zur Hälfte dargestellt) wurde mit Röntgen-Kristallographie untersucht. Die Struktur besitzt eine Auflösung von 3,7 Å (PDB: 3hkb, Dorléans *et al.*, 2009).

Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen α - und β -Tubulin ist ihre Struktur sehr ähnlich. Zwei zentrale β -Faltblattstrukturen werden von α -Helices umgeben, wobei drei Domänen unterschieden werden. Im aminoterminalen (N-terminalen) Bereich befindet sich die Nucleotid-bindende Domäne. Ein β -Faltblatt aus sechs Strängen, die über sechs α -

Helices und sieben Schleifen verbunden sind, bildet eine Rossmann-Faltung. Dieses Strukturmotiv ist typisch für Nukleotid-bindende Proteine wie Dehydrogenasen und Kinasen (Rossmann *et al.*, 1974). Das GTP im α -Tubulin ist in der Kontaktfläche beider Tubuline verborgen. Im Heterodimer ist die Nukleotiddomäne im β -Tubulin frei zugänglich, wodurch ein Nukleotidaustausch möglich ist. Mit der intermediären Domäne werden longitudinale Kontakte innerhalb des Protofilaments und laterale Kontakte zu benachbarten Protofilamenten ausgebildet. Außerdem bindet im β -Tubulin in dieser Region Paclitaxel, was diese Kontakte zusätzlich stabilisiert. Die carboxyterminale (C-terminale) Domäne umfasst zwei lange Helices (H11 und H12) sowie ein unstrukturiertes, flexibles Carboxylende aus 10-18 zumeist sauren Aminosäuren. Diese C-terminale Region bildet eine Oberfläche für Proteininteraktionen und wird über diverse Proteinmodifikationen reguliert. Im homologen FtsZ fehlt dieser negativ geladene C-Terminus (Nogales, 2000).

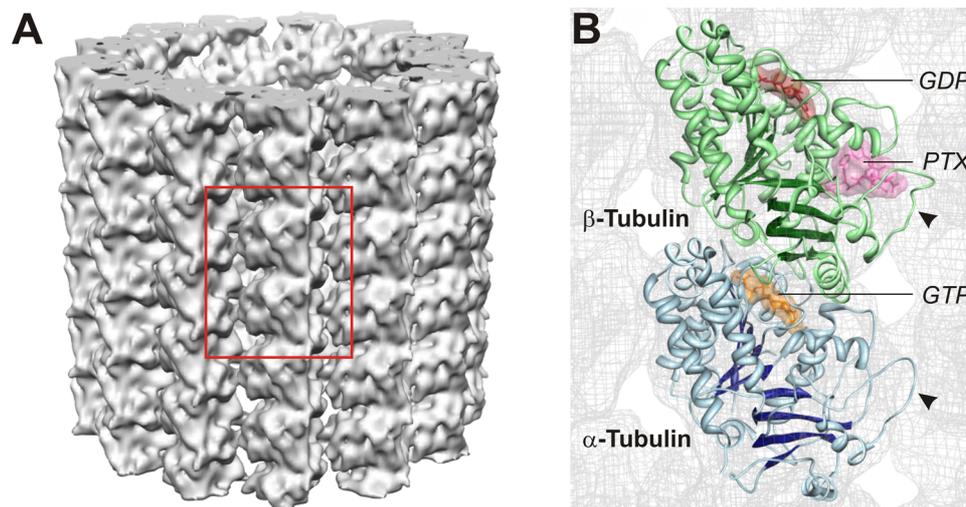


Abbildung 1.3: A) Eine mit Kryo-EM bestimmte 3D-Rekonstruktion zeigt einen aus 13 Protofilamenten bestehenden Mikrotubuliumausschnitt mit einer Auflösung von 9,8 Å (Eintrag in EM-Datenbank (EMDB): 5193; Sui und Downing, 2010). B) Die elektronenkristallographische Struktur des Heterodimers von Löwe *et al.*, 2001 (PDB: 1jff) wurde in die Rekonstruktion modelliert. Unterhalb des Paclitaxels (PTX) im β -Tubulin und analog im α -Tubulin bilden die M-Schleifen (►) laterale Kontakte zum benachbarten Protofilament aus.

Die Struktur ganzer Mikrotubuli wurde mit Hilfe dreidimensionaler (3D) Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) aufgelöst (Li *et al.*, 2002). In 3D-Rekonstruktionen konnte eine Auflösung von bis zu 8 Å erreicht werden, wobei man die kristallographisch ermittelten Dimerstrukturen einbindet (Abbildung 1.3). Mit diesen Rekonstruktionen wurden die lateral interagierenden Schleifen und Helices identifiziert (Sui und Downing, 2010). Die wichtigste Funktion erfüllt hier die sogenannte M-Schleife zwischen α -Helix H7 und β -Strang S9. Sie interagiert mit α -Helix H3 und den angrenzenden Schleifen des benachbarten Tubulins. Die lateralen Interaktionen halten das Grundgerüst aus GDP-Tubulin bis zur Depolymerisation zusammen. Durch bestimmte Mutationen im Bereich lateraler Interaktionen besitzen einige antarktische Fische Mikrotubuli, die besonders kältestabil sind (Detrich *et al.*, 2000). Die C-

terminalen Domänen sind an der Oberfläche des Mikrotubulus exponiert, was für die Interaktion mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) und Motorproteinen elementar ist.

1.1.6. Regulationsmechanismen

Eukaryotische Tubuline benötigen für ihre korrekte Faltung spezifische Chaperone. Das zytosolische Chaperonin CCT bindet zusammen mit Cofaktoren die ungefalteten Tubuline. Unter ATP-Verbrauch wird in mehreren Stufen die Faltung hin zur physiologischen Struktur unterstützt. Der Chaperoninkomplex führt α - und β -Tubulin zum Heterodimer zusammen und bewirkt die GTPase-Aktivierung im β -Tubulin (Lewis *et al.*, 1997). Interessanterweise falten sich die bakteriellen Homologe BtubA und BtubB in *Prostheco bacter* Chaperon-unabhängig, obwohl sie durch horizontalen Gentransfer aus einem Eukaryoten stammen (Schlieper *et al.*, 2005).

Die C-Termini der Tubuline sind hoch variabel und zeigen die größte Divergenz innerhalb der verschiedenen Tubulin-Isotypen. Sie sind flexibel und unstrukturiert. Ihre hohe Dichte an negativ geladenen Aminosäuren macht etwa 40% der Gesamtladung im Tubulin aus. Der C-Terminus umfasst im α -Tubulin etwa zehn, im β -Tubulin bis zu 20 Aminosäuren (Sullivan, 1988). Die C-Termini sind essentiell für Interaktionen mit diversen MAPs, von denen viele die Mikrotubuli-Dynamik direkt regulieren. Neutralisiert man den C-Terminus durch eingefügte, positive Aminosäuren, führt dies zu einer verstärkten Mikrotubuli-Bildung. Der gleiche Effekt wird erzielt, wenn der C-Terminus mit der Serinprotease Subtilisin geschnitten wird (Downing, 2000). Bestimmte MAPs neutralisieren den C-Terminus durch elektrostatische Wechselwirkungen und können so selektiv bestimmte Mikrotubuli stabilisieren (Conde und Cáceres, 2009). Eines dieser Proteine ist Tau, das in neuronalen Axonen die Mikrotubuli stützt. Tau wird über den Phosphorylierungsgrad reguliert, wobei es in hyperphosphorylierter Form zu Fibrillen aggregiert, die in neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer nachweisbar sind (Lippens *et al.*, 2007). Stathmin hingegen reguliert den Zellzyklus, indem es Mikrotubuli destabilisiert. Es bindet bevorzugt an das Plusende und verhindert die weitere Polymerisation. In Kombination mit der fortschreitenden GTP-Hydrolyse in der GTP-Kappe kommt es daraufhin zur Depolymerisation (Cassimeris, 2002).

Die jeweilige Funktion der Mikrotubuli wird durch posttranslationale Modifikationen kontrolliert. Der primäre Ort der meisten Modifikationen ist wiederum der C-Terminus. Sie wirken zum einen direkt auf die Stabilität und Struktur der Mikrotubuli. Zum anderen regulieren sie die Rekrutierung von MAPs und Motorproteinen (Hammond *et al.*, 2008). Die Modifikationen umfassen Detyrosinierung, Erzeugung von $\Delta 2$ -Tubulin, Polyglutamylierung, Polyglycylierung, Acetylierung, Palmitoylierung und Phosphorylierung (Westermann und Weber, 2003). Sie treten einzeln oder kombiniert auf und werden durch spezifische Enzyme

generiert (Verhey und Gaertig, 2007). Bei der reversiblen Detyrosinierung wird das C-terminale Tyrosin im α -Tubulin entfernt. Im $\Delta 2$ -Tubulin ist zusätzlich die benachbarte Glutaminsäure entfernt, wodurch sehr stabile Mikrotubuli entstehen (Janke und Kneussel, 2010). Polyglutamylierungen und Polyglycylierungen erfolgen an den C-Termini beider Tubuline. Dabei werden bis zu 20 Glutamate bzw. 30-40 Glycine angefügt (Westermann und Weber, 2003). Im α -Tubulin kann außerdem Lys40 acetyliert und Cys376 palmitoyliert werden. Unterschiedliche Positionen in beiden Tubulinen werden phosphoryliert. Die meisten Tubulin-Modifikationen sind reversibel. Die stabilen $\Delta 2$ -Tubuline stellen endgültig modifizierte Proteine dar (Etienne-Manneville, 2010).

1.2. Mikrotubuli-assoziierte Wirkstoffe

Eine Reihe natürlicher Wirkstoffe beeinflussen die Mikrotubuli-Dynamik. Paclitaxel und Epothilone stabilisieren Mikrotubuli, während Colchicin und Vinca-Alkaloide die Polymerisation hemmen. *In vivo* inhibieren sie das Zellwachstum, woraufhin die Zellen die Apoptose einleiten. Daher werden sie als Leitstrukturen in der Krebsforschung behandelt.

1.2.1. Mikrotubuli-stabilisierende Naturstoffe

Paclitaxel, das unter dem Markennamen Taxol® registriert ist, verhindert die Depolymerisation der Mikrotubuli. Es wurde aus der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert. Zunächst wurde eine antiproliferative Wirkung des Rindenextrakts auf murine Leukämiezellen nachgewiesen (Wani *et al.*, 1971). *In vitro* wurde dann ihre stabilisierende Wirkung auf Mikrotubuli gezeigt (Schiff *et al.*, 1979). Die komplexe, chemische Struktur enthält ein Taxangrundgerüst, das isoprenoiden Ursprungs ist (*Abbildung 1.4*). Paclitaxel wird u.a. semisynthetisch aus einem Produkt der Europäischen Eibe (*Taxus baccata*) hergestellt. Gleiches gilt für die verwandte Verbindung Docetaxel (Handelsname Taxotere®), welche eine höhere Affinität gegenüber Mikrotubuli besitzt. Beide Substanzen werden chemotherapeutisch eingesetzt (Kingston, 2009). Da sie aber auf alle sich teilenden Zellen wirken, verursachen sie u.a. neurotoxische Nebenwirkungen. Die Mikrotubuli-stabilisierende Funktion von Paclitaxel könnte auch auf einem ganz anderen Gebiet Anwendung finden. Kürzlich wurde eindrucksvoll erwiesen, dass es die Regeneration von Axonen ermöglicht (Hellal *et al.*, 2011). Bei Rückenmarksläsionen im Rattenmodell wurde bereits in geringen Konzentrationen ein Heilungsprozess gefördert. Inwieweit Paclitaxel künftig z.B. zur Behandlung humaner Querschnittslähmungen eingesetzt wird, bleibt abzuwarten.

Epothilone wirken in vergleichbarer Weise auf Tumorzellen und Mikrotubuli (Bollag *et al.*, 1995). Ihre chemische Struktur ist nicht mit Paclitaxel verwandt. Sie bilden Makrolide mit einer 16-gliedrigen Ringstruktur (*Abbildung 1.4*). Zwei natürliche Vertreter mit antifungizider

zudem eine Analyse von Mikrotubuli-gebundenem Epothilon B mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie veröffentlicht (Kumar *et al.*, 2010a). Darin wurden signifikante, chemische Verschiebungen zwischen ungebundenem und gebundenem Epothilon B ermittelt. In Kombination bieten die vorhandenen Strukturdaten eine gute Ausgangsbasis für weiterführende Entwicklungen der Epothilon-Leitstruktur.

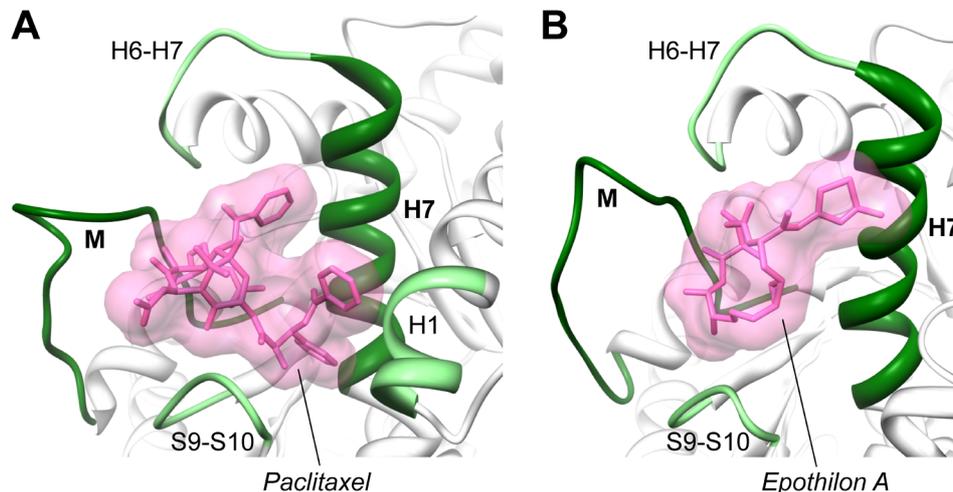


Abbildung 1.5: Struktureller Vergleich der Bindung von Paclitaxel und Epothilon A an β -Tubulin. Beide Strukturen wurden mit Elektronen-Kristallographie bestimmt. A) Die mit Paclitaxel stabilisierte Struktur besitzt eine Auflösung von 3,5 Å (PDB: 1jff, Löwe *et al.*, 2001). B) Eine Heterodimer-Struktur mit gebundenem Epothilon A wurde mit einer Auflösung von 2,9 Å beschrieben (PDB: 1tvk, Nettles *et al.*, 2004). Beide Naturstoffe bilden eine Brücke zwischen der M-Schleife und Helix H7. Außerdem sind die Schleifen H6-H7 und S9-S10 beteiligt. Paclitaxel interagiert zusätzlich mit Helix H1.

1.2.2. Mikrotubuli-destabilisierende Naturstoffe

Colchicin ist als Gift der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) bekannt. Es wird bereits seit der Antike gegen Gicht eingesetzt (Mayer und Marx, 2010). Colchicin kommt aufgrund seiner hohen Toxizität nicht für die Krebstherapie in Frage. In geringer Dosierung therapiert man heute nur noch akute Gichtanfälle und das Familiäre Mittelmeerfieber mit Colchicin (Niel und Scherrmann, 2006). In der Landwirtschaft werden u.a. mit Colchicin ertragreiche, polyploide Pflanzen erzeugt, indem man die Chromosomentrennung während der Mitose verhindert. Unter Verwendung von radioaktivem, Tritium-markiertem ^3H -Colchicin konnte man erstmals seine Wirkungsweise analysieren (Borisy und Taylor, 1967). Es bindet hochaffin an lösliches Tubulin, hemmt dadurch die Bildung von Mikrotubuli und kann in höheren Konzentrationen Mikrotubuli zerstören. Colchicin-gebundenes Tubulin ist sterisch nicht in der Lage, Mikrotubuli zu bilden (Hastie, 1991). Das Grundgerüst des Alkaloids besteht aus einem Trizyklus (Abbildung 1.6). Um ein Cycloheptenylacetamid (Ring B) sind ein Trimethoxybenzenring (Ring A) und ein Methoxytroponring (Ring C) angeordnet. Dieser Trizyklus wird als Leitstruktur für die Synthese von potenten, aber weniger toxischen Wirkstoffen genutzt. Es wurden weitere Substanzen entdeckt, die die gleiche Bindestelle

wie Colchicin nutzen und analog auf Tubulin wirken. Dazu zählt Combretastatin-A4, das die vaskuläre Versorgung von Tumoren hemmt und derzeit in klinischen Studien getestet wird (Dumontet und Jordan, 2010).

Eine dritte Bindestelle wird von Vinca-Alkaloiden wie Vinblastin (Handelsname Velbe®) und Vincristin (Handelsname Oncovin®) genutzt. Sie wurden aus dem Madagaskar-Immergrün (*Catharanthus roseus*) isoliert. Dessen Extrakt zeigt antileukämische Wirkung. Sie inhibieren ebenfalls die Polymerisation und verhindern den Nukleotidaustausch im β -Tubulin (Cormier *et al.*, 2010). Die Struktur der Vinca-Alkaloide besteht aus einem Catharanthin- und einem Vindol-Ringsystem (Abbildung 1.6). Sie werden seit 50 Jahren kombiniert mit anderen Wirkstoffen chemotherapeutisch eingesetzt (Kingston, 2009).

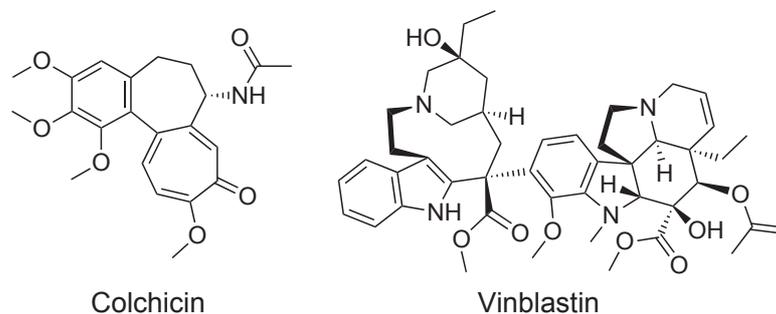


Abbildung 1.6: Strukturformeln von Colchicin und Vinblastin. Beide Naturstoffe behindern die Tubulinpolymerisation, wobei ihnen ein unterschiedlicher Wirkmechanismus zugrunde liegt.

Die Interaktion von mit stathmin-ähnlicher Domäne RB3-SLD stabilisierten Tubulinkomplexen mit Mikrotubuli-destabilisierenden Wirkstoffen wurde kristallographisch untersucht (Abbildung 1.7; Ravelli *et al.*, 2004; Dorléans *et al.*, 2009). Colchicin bindet an der Grenzfläche zwischen α - und β -Tubulin des selben Heterodimers, wobei die Bindetasche hauptsächlich vom β -Tubulin gestellt wird. Es arretiert das Heterodimer in einer leicht gekrümmten Konformation, wodurch die Polymerisation zu geradlinigen Protofilamenten verhindert wird. Die Schleife T7 wird dabei umgelagert und behindert die in der geraden Struktur ausgebildeten Kontakte zwischen α -Helix H7 und der Nukleotidbindestelle im α -Tubulin.

Vinblastin bildet eine Art Keil zwischen zwei Heterodimeren (Gigant *et al.*, 2005; Abbildung 1.7). Beide Ringsysteme interagieren zu etwa gleichen Teilen mit α - und β -Tubulin. Es werden longitudinale Interaktionen blockiert, welche zur Ausbildung einer geraden Struktur der Protofilamente benötigt werden. Dabei entstehen durch Vinblastin stabilisierte, spiralförmig gewundene Aggregate (Rendine *et al.*, 2010).

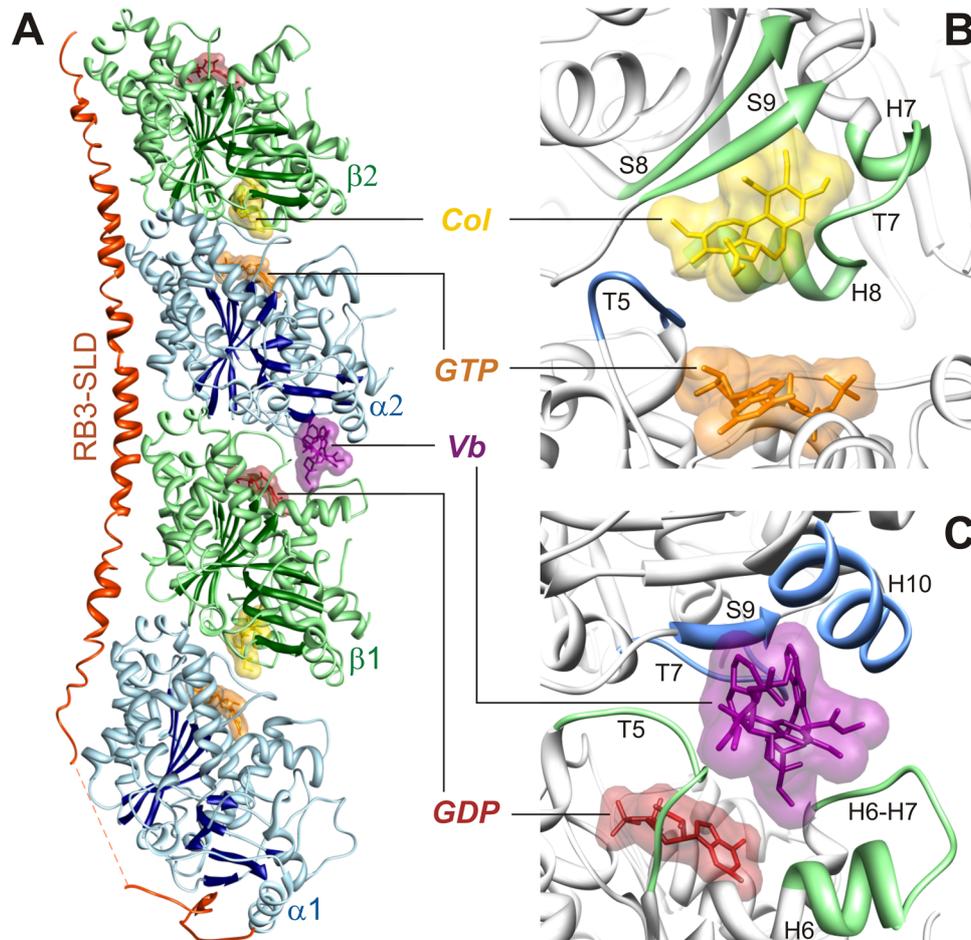


Abbildung 1.7: Vergleich der Bindestellen von Colchicin (Col) und Vinblastin (Vb). A) Ein Tubulin-Heterotetramer ($\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\alpha 2$ - $\beta 2$) stabilisiert mit RB3-SLD wurde mit beiden Inhibitoren kristallisiert. Die Röntgenstruktur besitzt eine Auflösung von 4,1 Å (PDB: 1z2b, Gigant *et al.*, 2005). Colchicin bindet an α - und β -Tubulin eines Heterodimers, während Vinblastin zwischen zwei Heterodimeren interkaliert. Beide Bindestellen sind in Nukleotidnähe. B) Colchicin bindet an β -Stränge S8, S9, Schleife T7, α -Helices H7, H8 im β -Tubulin sowie an Schleife T5 im α -Tubulin. C) Vinblastin interagiert mit Schleife T7, α -Helix H10, β -Strang S9 im α -Tubulin und mit α -Helix H6, Schleifen T5 sowie H6-H7 im β -Tubulin.

1.2.3. Die Kinetik der Colchicin-Bindung

Durch Fluoreszenzmessung wurde die Kinetik der Colchicin-Bindung detailliert analysiert. Colchicin existiert in zwei Konformationen. In Lösung sind die Ringe A und C um etwa 53° zueinander verdreht. Bindet Colchicin an Tubulin, wird eine nahezu planare Struktur ausgebildet. Die konjugierten Doppelbindungen werden dabei so zueinander ausgerichtet, dass der Colchicin-Tubulin-Komplex fluoresziert (Detrich *et al.*, 1981). Colchicin interagiert mit Tubulin in einer biphasischen Kinetik, wobei einer ersten, schnellen Phase eine zweite, langsame Phase folgt (Garland, 1978). Die biphasische Kinetik ist auf verschiedene Isoformen des β -Tubulins zurückzuführen (Banerjee und Luduena, 1992). Man kann die Isoformen mittels spezifischer Antikörper und Immun-Affinitätschromatographie isolieren. Im Vertebraten-Hirn werden vier Isoformen im folgenden Verhältnis exprimiert: 3%

β_I , 58% β_{II} , 25% β_{III} und 13% β_{IV} (Banerjee *et al.*, 1988). Colchicin bindet an die isolierten β -Isoformen mit monophasischer Kinetik. Dabei ergeben sich je nach Isoform unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten. An β_{III} bindet Colchicin deutlich langsamer als an β_{II} und β_{IV} . Eine monophasische Kinetik existiert zudem in renalem Tubulin, da in der Niere β_{III} nicht exprimiert wird (Banerjee und Luduena, 1987). In der Colchicin-Bindestelle sind in β_{III} drei Aminosäure ausgetauscht. L242, A317 und T353 sind durch S242, T317 und V353 ersetzt (Bhattacharyya *et al.*, 2008). Während Leucin und Alanin ein eher hydrophobes Milieu bilden, ist im β_{III} durch Serin und Threonin eine hydrophile Umgebung gegeben. Die Substitutionen scheinen letztlich ausschlaggebend für die unterschiedlichen Bindungseigenschaften von Colchicin an die verschiedenen Tubulin-Isoformen zu sein.

1.2.4. Entwicklung von Colchicin-Derivaten

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Colchicin-Derivaten generiert und deren Bindungseigenschaften analysiert. Variationen im Colchicin-Grundgerüst verändern die Bindungskinetik des Alkaloids. Im Isocolchicin sind die Positionen von Methoxy- und Carbonylgruppe im Methoxytroponring getauscht. Dieser Austausch inaktiviert die Substanz, wobei sie eine 500-fach geringere Affinität für die Colchicin-Bindestelle im Tubulin besitzt (Hastie *et al.*, 1989). Das sogenannte AC-Analogon besteht aus den Ringen A und C. Es stellt die minimal benötigte Struktur dar, die ähnlich dem Colchicin wirkt. Ohne Ring B können A und C frei rotieren, was die Aktivierungsenergie für die Tubulinbindung verringert (Bane *et al.*, 1984). B-Ring-Analoga, in denen die Acetamidgruppe substituiert wird, sind ebenfalls funktional (Chakrabarti *et al.*, 1996). Ring B kann zudem durch Cyclohexen ersetzt werden. Das Cyclohexen-Derivat bindet schnell und reversibel an Tubulin (Lincoln *et al.*, 1991). Analog kann auch der Tropolonring durch einen Phenylring substituiert werden. Das entstehende Allocolchicin ist aktiv (Hastie, 1989).

Ausgehend von diesen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen werden heutzutage neuartige Derivate rechnergestützt modelliert. Es werden z.B. zusätzliche funktionelle Gruppen eingefügt, mit denen die Colchicin-Bindestelle optimal ausgenutzt wird (Huzil *et al.*, 2009). Die resultierenden Verbindungen weisen eine bis zu 30-fach verbesserte Wirkung in Zellkulturversuchen auf (Huzil *et al.*, 2010).

Die Modifikationen zielen dahin, neue, potente, aber weniger toxische Wirkstoffe zu entwickeln. Dies ist bis heute mit Colchicin-Derivaten nicht gelungen. Man ist daher auf der Suche nach neuen Angriffspunkten, um den Zellzyklus zu beeinflussen. Es ist naheliegend zunächst Mikrotubuli-bindende Proteine in den Fokus zu rücken. Deren Interaktionen und Dynamiken aufzuklären, ist Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe. Ein wesentlicher Vertreter ist die Superfamilie der Kinesine. Die Wechselwirkung von Kinesinen und Mikrotubuli ist komplex und strukturell noch nicht im Detail verstanden.

1.3. Kinesine und deren Motordomänen

1.3.1. Kinesin-Superfamilie

Als man die Kinesine entdeckte, wurden sie nach dem griechischem Wort für bewegen ($\kappaινειν$, *kinein*) benannt (Vale *et al.*, 1985). Die Kinesin-Superfamilie ist in 14 Familien unterteilt, die als Kinesin-1 bis Kinesin-14 bezeichnet werden (Lawrence *et al.*, 2004). Als Akronym für die Mitglieder einer Kinesin-Familie wird i.d.R. KIF verwendet. Insgesamt wurden jeweils 45 humane und murine *kif* Gene identifiziert (Miki *et al.*, 2001). Niedere Eukaryoten besitzen deutlich weniger Kinesine. So wurden durch Mutationsanalysen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* insgesamt sechs Kinesine ermittelt. Die Klassifizierung in 14 Familien basiert auf einem Homologievergleich der hoch konservierten, katalytischen Domäne, die als Motordomäne bezeichnet wird. Außerdem wird die Position der Motordomäne und die daraus resultierende Funktionalität einbezogen (Hirokawa *et al.*, 2009). Kinesine der Familien 1 bis 12 verfügen über N-terminale Motordomänen und bewegen sich zum Plusende der Mikrotubuli. In Kinesin-13 sind alle Kinesine vereint, deren Motordomänen zentral im Protein lokalisiert sind. Sie sind in der Lage, Mikrotubuli zu depolymerisieren. Kinesin-14 umfasst alle Kinesine mit C-terminalen Motordomänen, die entlang der Mikrotubuli zum Minusende laufen.

1.3.2. Funktionelle Aspekte und klinische Relevanz

Kinesine besitzen zwei zentrale Funktionen. Zum einen transportieren sie eine Vielzahl zytosolischer Komponenten entlang der Mikrotubuli, zum anderen regulieren sie die Mikrotubuli-Dynamik während der Mitose. Transportprozesse sind vor allem dort unerlässlich, wo lange Wegstrecken vom Synthese- zum Funktionsort überwunden werden müssen. In den neuronalen Axonen findet man die höchste Mikrotubulidichte und gleichzeitig die höchsten Transportraten. Kinesine transportieren z.B. Zellorganelle, Vesikel, mRNA, Proteinkomplexe, und membranassoziierte Komplexe (Mandelkow und Mandelkow, 2002).

Kinesine können mit verschiedenen pathologischen Prozessen in Zusammenhang gebracht werden. Defekte im kinesinabhängigen Transport wirken sich dabei häufig auf neuronaler Ebene aus. Eine Punktmutation in der Motordomäne von KIF1B β wird mit der Ausbildung von Morbus Charcot-Marie-Tooth Typ 2A in Verbindung gebracht (Zhao *et al.*, 2001). Bei dieser neuralen Muskelatrophie schwinden zuvor normal ausgebildete Muskeln. Es sind einige neurotoxische Chemikalien bekannt, die die Funktion der Kinesine inhibieren. Beispielsweise stehen das krebserzeugende, erbgutverändernde Acrylamid und dessen hepatisches Umwandlungsprodukt Glycidamid im Verdacht, zusätzlich zur DNA-Interaktion auch an Kinesine zu binden und den axonalen Transport zu unterbrechen (Sickles *et al.*, 2007).

Viele Kinesine werden mit der Entstehung von Tumoren in Zusammenhang gebracht. Das mitotische Centromer-assoziierte Kinesin (MCAK) wird in Formen von Darm- und Magenkrebs überexprimiert. Da man MCAK im Blut der Patienten nachweisen kann, könnte es in Zukunft als effektiver Tumormarker in der Diagnostik eingesetzt werden (Yu und Feng, 2010). Kinesine der Familie 5 werden als Kinesin-Spindel-Proteine (KSP) bezeichnet. Der prominenteste Vertreter ist KIF11 (auch Eg5 genannt). Er spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung der Mitosespindeln und der Chromosomentrennung. KIF11/Eg5 wird nur in proliferierenden Zellen exprimiert, wobei in diversen Tumorzellen eine Überexpression nachgewiesen wurde (Castillo *et al.*, 2007). Daher ist KIF11/Eg5 ein vielversprechendes Ziel für krebstherapeutische Ansätze. Mehrere Eg5-spezifische Inhibitoren wie z.B. Ispinesib werden derzeit erfolgreich in klinischen Studien getestet (Huszar *et al.*, 2009).

Pathogene wie z.B. Viren können sich Motorproteine zu Nutze machen, sowohl für den Transport zum Zellkern als auch zur Zellmembran. Die Viren können dabei in endo- bzw. exozytotischen Vesikeln transportiert werden. Es existieren allerdings auch Viren, die direkt mit Kinesinen und auch Dyneinen interagieren (Döhner *et al.*, 2005). Das Herpes simplex Virus infiziert neuronale Zellen und kann für den axonalen Transport über das virale Kapsidprotein US11 an Kinesin-1/KHC (*kinesin heavy chain*) binden (Diefenbach *et al.*, 2002). Diese Interaktion stellt für die Zukunft ein sinnvolles Ziel für die Entwicklung antiviraler Therapien dar.

1.3.3. Genereller Aufbau eines konventionellen Kinesins

Kinesine der Familie 1 werden konventionelle Kinesine genannt und bestehen aus zwei schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von je 110 kDa sowie zwei leichten Ketten von je 65-70 kDa (*Abbildung 1.8*; Woehlke und Schliwa, 2000). Die schweren Ketten dimerisieren über eine Superhelix (*coiled-coil*) und bilden so eine gemeinsame Stabregion aus. Am N-Terminus jeder schweren Kette befindet sich eine globuläre Domäne, die als Kopf- oder Motordomäne bezeichnet wird. Sie vereint Strukturen zur Mikrotubuli-Bindung und ATP-Hydrolyse, die für die Bewegung entlang des Mikrotubulus benötigt werden. Die Motordomäne endet in einem sogenannten Halsverbindungsstück (*neck linker*), das für die Ausführung der Translokation und dessen Direktionalität von wesentlicher Bedeutung ist. Darauf folgt eine als Hals (*neck*) bezeichnete helikale Struktur, die mit der Superhelix verknüpft ist. Am C-terminalen Ende schließen die schweren Ketten mit globulären Schwanzdomänen (*tail*) ab. Diese sind zusammen mit den leichten Ketten an der Bindung der zu transportierenden Last beteiligt. Jede leichte Kette besitzt eine typische Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die aus sechs TPR-Motiven (*tetratricopeptide repeats*) besteht (Gindhart und Goldstein, 1996). Diese Motive findet man auch in Co-Chaperonen, die mit den Hitzeschockproteinen Hsp70 und Hsp90 interagieren.

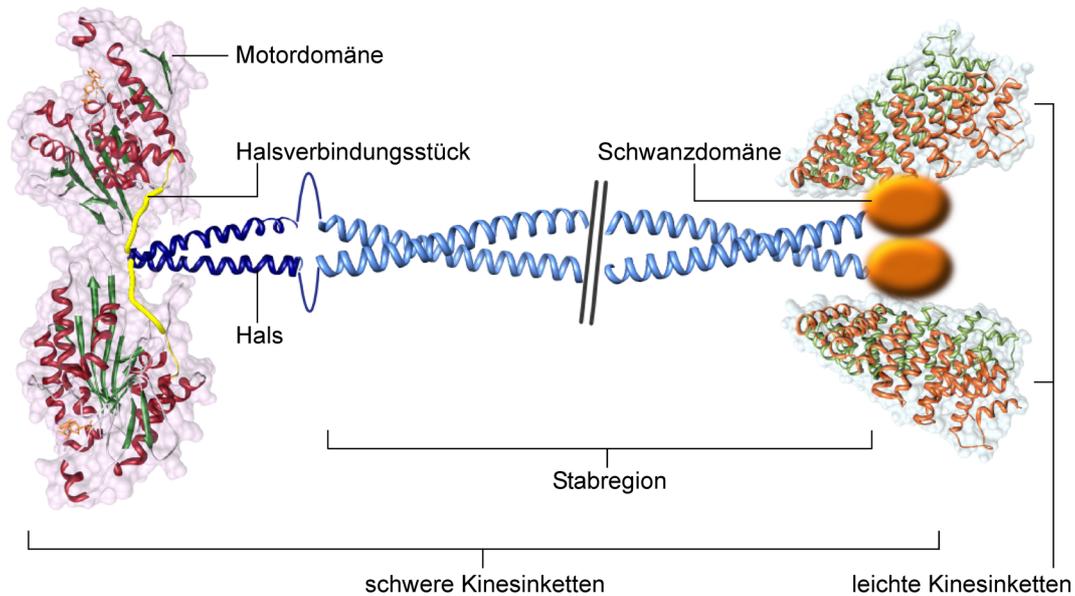


Abbildung 1.8: Aufbau eines konventionellen, heterotetrameren Kinesins (nach Mandelkow und Mandelkow, 2002). Es besteht aus je zwei schweren und leichten Ketten. Bekannte Strukturen wurden aus der Proteindatenbank zu einer Gesamtstruktur zusammengeführt. Zwei Motordomänen binden an Mikrotubuli und hydrolysieren ATP (PDB: 3kin, Kozielski *et al.*, 1997a). Das Halsverbindungsstück ist für die Fortbewegung am Mikrotubulus essentiell. Über Hals und Stabregion dimerisieren zwei schwere Ketten, wobei eine Superhelix ausgebildet wird (hier im Ausschnitt dargestellt). Die Struktur der globulären Schwanzdomänen ist noch unbekannt. Sie binden zusammen mit den leichten Ketten die zu transportierende Ladung. Die TPR-Motive der leichten Ketten bilden die Grundlage für Protein-Protein-Interaktionen (PDB: 3ceq, Zhu *et al.*, 2008).

Nicht-konventionelle Kinesine können sehr individuell aufgebaut und zusammengesetzt sein (Hirokawa und Noda, 2008). Sie kommen z.B. als Monomere, Homo- sowie Heterodimere vor. Während die Motordomäne stark konserviert ist, können Stab- und Schwanzdomäne sehr divergent ausgebildet sein. Manche Kinesine besitzen anstelle von leichten Ketten andere assoziierte Proteine oder üben ihre Aufgabe eigenständig aus. Diese Diversität ist die Grundlage für die verschiedenen Funktionen, die Kinesine in der Zelle ausüben.

1.3.4. Die Struktur der Kinesin-Motordomäne

Kinesin-Motordomänen werden seit 1996 intensiv mittels Röntgen-Kristallographie untersucht (Kull *et al.*, 1996). In der Proteindatenbank sind derzeit von 23 verschiedenen Kinesinen 75 Motordomänen-Strukturen hinterlegt (Stand: April 2011). Die Motordomänen sind hoch konserviert, globulär und etwa 40 kDa groß. Eine zentrale, β -Faltblattstruktur aus acht β -Strängen ist von sechs α -Helices eingefasst (Abbildung 1.9A). Die hier dargestellte N-terminale Motordomäne aus dem konventionellen Kinesin KIF5C aus *Rattus norvegicus* endet C-terminal mit dem Halsverbindungsstück (Sack *et al.*, 1997). Eine um 25 Aminosäuren C-terminal längere Variante ergibt eine Dimer-Struktur (Vergleich Abbildung 1.8; Kozielski *et al.*, 1997a). Motordomänen wandeln die chemische Energie aus der ATP-

Hydrolyse in mechanische Bewegung um. Dabei laufen ATP-Hydrolyse, Mikrotubuli-Bindung und Konformationsänderungen im Halsverbindungsstück koordiniert ab.

Die Nukleotidbindestelle besitzt vier konservierte Sequenzmotive N1-N4, die analog auch in Myosinen und G-Proteinen existieren (Abbildung 1.9B; Vale, 1996). Trotz gemeinsamer Strukturelemente besitzen die drei Proteinklassen nur geringe Sequenzidentität. Vermutlich haben sie sich divergent aus einem evolutionären Vorläufer entwickelt. Die Konsensussequenz N4 (Motiv RxRP; Sequenz im Einbuchstabencode, x bezeichnet eine beliebige Aminosäure) interagiert mit der Purinbase. N1 bildet die sogenannte P-Schleife, die mit einem Walker A Motiv (GQTxxGKS/T) die $\alpha\beta$ -Diphosphatgruppe des Nukleotids bindet. Der als N2 bezeichnete Schalter I (Motiv NxxSSR) erfasst die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von γ -Phosphat. Diese Information wird durch Konformationsänderungen auf Schalter II übertragen, der u.a. die Konsensussequenz N3 (Motiv DxxGxE) besitzt. Die zu Schalter II gehörende Helix $\alpha 4$ ist wiederum an der Mikrotubuli-Bindung beteiligt. Die Schalter sind essentiell für die Konformationsänderungen, die zur Bewegung des Kinesins führen (Abbildung 1.9C).

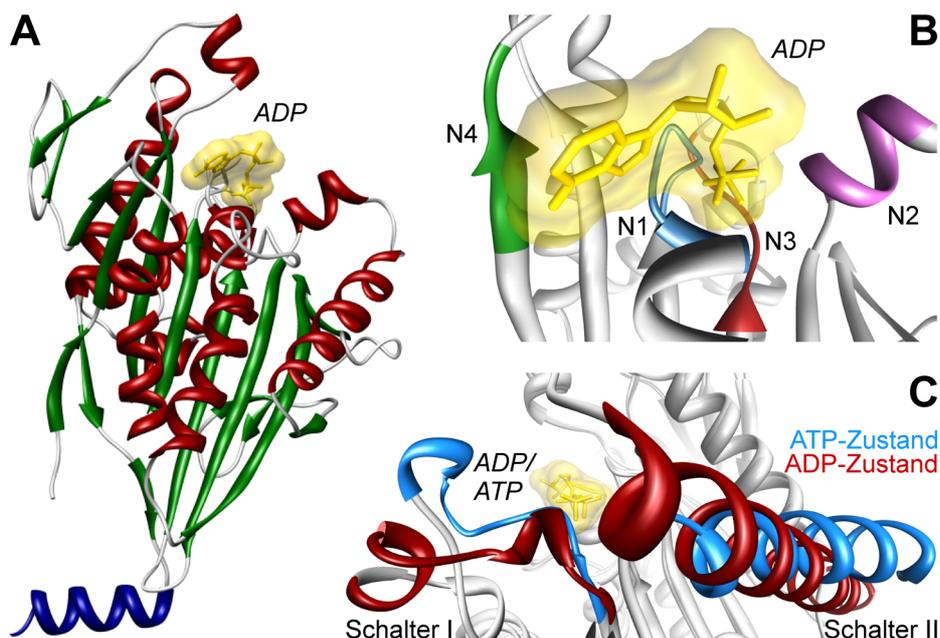


Abbildung 1.9: A) Struktur der ADP-gebundenen, N-terminalen Motordomäne von KIF5C (PDB: 2kin, Sack *et al.*, 1997). Ein zentrales β -Faltblatt (grün) ist von α -Helices umgeben (rot). Die blaue, C-terminale Helix stellt das Halsverbindungsstück dar. B) Die Nukleotidbindestasche wird von den konservierten Motiven N1-N4 gebildet. C) Schalter I und Schalter II ändern ihre Konformation während der ATP-Hydrolyse. Kinesin KIF1A wurde im ADP- (rot) und ATP-Zustand (blau) überlagert (PDB: 1i5s und 1i6i, Kikkawa *et al.*, 2001).

1.3.5. Dynamik des Kinesin-vermittelten Transports

Für den intrazellulären Transport verfügen konventionelle Kinesine über einen Mechanismus, mit dem sie sich zielgerichtet und stetig am Mikrotubulus entlang bewegen.

Die beteiligten, dynamischen Prozesse sind effektiv koordiniert und ermöglichen eine hohe Prozessivität. Als Prozessivität wird die Länge bezeichnet, die ein Kinesin am Mikrotubulus zurücklegt, ohne sich zu lösen. So erfolgt die Dissoziation der einen Motordomäne erst, wenn die zweite gebunden ist. Es existieren mehrere Modelle, wie die Bewegung der Motordomänen im Detail funktioniert. Diese Modelle können mit Einzelmolekül-Techniken verifiziert werden, bei denen das Gleiten entlang der Mikrotubuli räumlich und zeitlich aufgelöst wird. U.a. werden einzelne Kinesine mit der sogenannten optischen Pinzette (*single beam optical trap*) in einem Laserstrahl fixiert. Die eingefangenen Partikel können gezielt bewegt werden, wodurch die resultierende Kraft der Bewegung ermittelt wird (Svoboda *et al.*, 1993). Die experimentellen Daten deuten auf eine Bewegung ähnlich dem bipedalen Gang hin, der im Englischen als *hand-over-hand* Mechanismus bezeichnet wird (Abbildung 1.10, Vale und Milligan, 2000).

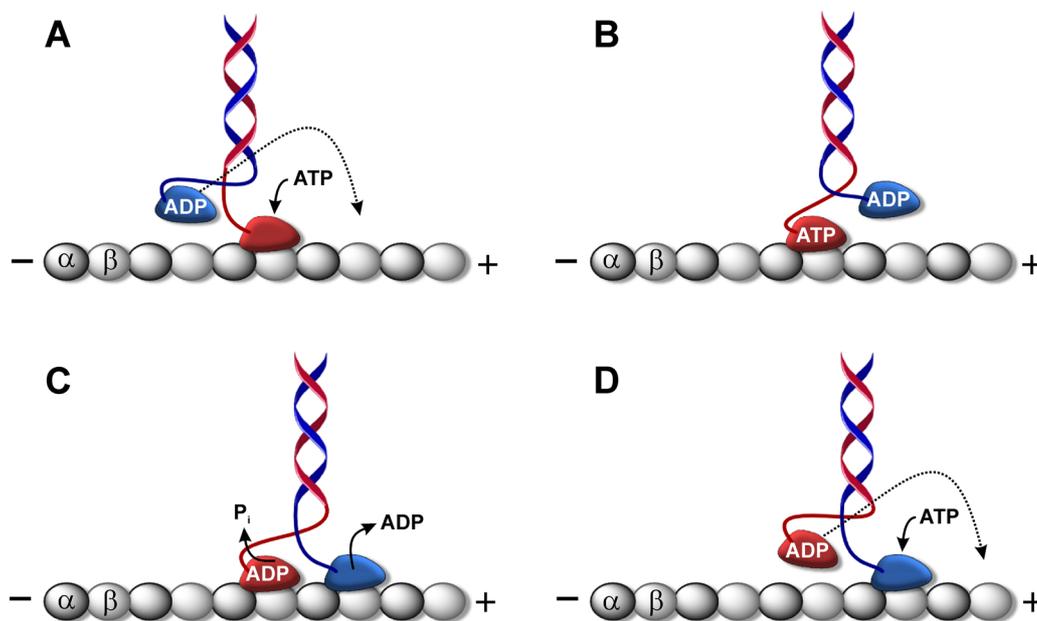


Abbildung 1.10: Zyklus der Bewegung eines konventionellen Kinesins. Zwei Motordomänen sind über eine Superhelix dimerisiert. Die Motordomänen binden entlang der Mikrotubuli-Protofilamente bestehend aus alternierendem α - und β -Tubulin. Die Bewegung erfolgt in Richtung Plusende. A) Die führende, assoziierte Motordomäne (rot) bindet ATP. Dies löst Konformationsänderungen aus. B) Das Halsverbindungsstück lagert sich an diese Motordomäne an, wodurch ein Kraftschub entsteht. Daraus resultiert die Umlagerung der vormals hinteren, ADP-gebundenen Motordomäne (blau) vorbei an der Superhelix. C) Diese Motordomäne gibt ADP ab und assoziiert mit dem Mikrotubulus. Parallel hydrolysiert die nun zurückliegende Motordomäne ATP zu ADP und Phosphat. D) In diesem Zustand dissoziiert sie vom Mikrotubulus. Der Zyklus wiederholt sich, indem an die gebundene Motordomäne erneut ATP bindet (nach Vale und Milligan, 2000; Gennerich und Vale, 2009).

Die Motordomänen binden hauptsächlich auf Höhe der β -Tubulinuntereinheiten des Mikrotubulus. Die führende Motordomäne ist zunächst ohne Nukleotid mit dem Mikrotubulus assoziiert. Bindet ATP an diese Motordomäne, wird die hintere Motordomäne in Richtung Plusende gezogen. Die dafür benötigte Kraft entstammt einer Konformationsänderung im

führenden Motor, dessen Halsverbindungsstück bei ATP-Bindung eng an die Motordomäne angelagert wird. Der resultierende Kraftschub (*power stroke*) führt zur Neupositionierung der vormals hinteren Motordomäne vorbei an der Superhelix. Diese Adenosindiphosphat (ADP) -gebundene Motordomäne lagert sich an den Mikrotubulus an und gibt das Nukleotid frei. Sind beide Motordomänen gebunden, wird in der vormals führenden Motordomäne das ATP zu ADP und Phosphat hydrolysiert. Im ADP-Zustand besitzt die Motordomäne eine deutlich niedrigere Affinität zum Tubulin und dissoziiert (Cross, 2004). Daraufhin beginnt der Zyklus von vorn.

Mit jedem Schritt wird eine Strecke von 8,3 nm überwunden, was der Entfernung von einem β -Tubulin zum nächsten β -Tubulin entspricht. Betrachtet man die Bewegung genauer, erzielt die tatsächlich ausgeführte Bewegung eine Schrittlänge von etwa 17 nm, wobei die stationäre Motordomäne nach halber Strecke passiert wird (Yildiz *et al.*, 2004). Bei einer Geschwindigkeit von etwa 800 nm/s werden rund 100 ATP pro Sekunde verbraucht (Yildiz und Selvin, 2005). Die parallel in beiden Motordomänen ablaufenden Prozesse wie Assoziation, Dissoziation, ATP-Bindung und -Hydrolyse besitzen unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten. Nach etwa 100 Zyklen wird in beiden Motordomänen ATP gleichzeitig hydrolysiert, woraufhin das Kinesin vollständig dissoziiert.

Durch den enormen ATP-Verbrauch liegt es nahe, dass es spezieller Regulationsmechanismen bedarf, mit denen die Motordomänen nur aktiviert werden, wenn eine zu transportierende Ladung gebunden ist. Im ungebundenen Zustand erfolgt eine intramolekulare Repression, die durch die Schwanzdomänen und leichten Ketten vermittelt wird (Friedman und Vale, 1999; Wong und Rice, 2010). Die Stabregion ist flexibel aufgebaut und lässt eine gewisse Krümmung zu, wodurch die Schwanzdomänen mit den Motordomänen interagieren können. Wenn eine Last gebunden ist, wird die Motordomäne freigegeben und aktiviert. Zudem stimuliert erst die Bindung an den Mikrotubulus die ATPase-Aktivität der Motordomäne (Hackney, 1988). Durch diesen Mechanismus wird einem unproduktiven ATP-Verbrauch vorgebeugt.

Bei einem starren Gebilde müsste die Stabregion und die gebundene Ladung rotieren. Fixiert man die Schwanzregion des Kinesins und belädt die Motordomänen mit Mikrotubuli, bleiben die Mikrotubuli allerdings in ihrer Position (Hua *et al.*, 2002). Die Drehung wird also nicht über das gesamte Kinesin vermittelt. In einem anschaulichen Modell wird die Rotation bereits innerhalb der Superhelixdomäne ausgeglichen. Die Stabregion wird im ersten Schritt um eine halbe Drehung entwunden und im nächsten Schritt zurück gewunden (Yildiz und Selvin, 2005). Dadurch wird keine Torsionsbarriere aufgebaut, die bei einer stetigen Rotation entstehen würde.

1.3.6. Strukturelle Grundlage der Fortbewegung

Um zu verstehen, wie die ATP-Hydrolyse in Konformationsänderungen und Kraftentwicklung übersetzt wird, vergleicht man zunächst die Strukturen verschiedener Nukleotidzustände (Kikkawa *et al.*, 2001). Je nach gebundenem Nukleotid besitzt Schalter II im Kinesin verschiedene Konformationen hinsichtlich der Helix α_4 (Vergleich *Abbildung 1.9C*, Kapitel 1.3.4., Seite 24). In ihrer Funktion als Schalter wird α_4 auch als Relais-Helix bezeichnet. Je nach Orientierung dieser Helix werden die Kristallstrukturen in ATP- und ADP-Formen unterschieden. In ADP-gebundenen oder nukleotidfreien Motordomänen ist α_4 in der Regel vom Nukleotid abgewandt. Im ATP-gebundenen Zustand ist die Helix meist zum Nukleotid ausgerichtet. Der Sachverhalt ist komplex, so dass manche ATP-gebundene Strukturen in ADP-Konformation auftreten und umgekehrt. Danach sind Nukleotidzustand und Konformation nicht streng gekoppelt. Die vorhandenen Kristallstrukturen wurden mit einer Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*) ausgewertet, bei der die divergenten Strukturmerkmale beider Hauptkonformationen verglichen wurden (Grant *et al.*, 2007). Es wurden damit zwei variable Subdomänen identifiziert, die Schalter I und II umfassen. Welchen Einfluss die Mikrotubuli auf die Konformationsänderungen der Motordomäne ausüben, wird strukturell vor allem mittels Kryo-EM analysiert.

1.4. Kinesin-Mikrotubuli-Interaktion

Im nukleotidfreien und ATP-gebundenen Zustand bilden Kinesin-Motordomänen eine hohe Affinität zu Mikrotubuli aus. ADP-gebundene Motordomänen besitzen eine deutlich niedrigere Affinität und dissoziieren vom Mikrotubulus (Cross, 2004). Die strukturellen Änderungen, die mit der Mikrotubuli-Bindung einhergehen, wurden mit Elektronenspinresonanz (EPR, *electron paramagnetic resonance*) untersucht (Naber *et al.*, 2003; Naber *et al.*, 2011). Die Nukleotid-Bindestelle bleibt danach bis zur Mikrotubuli-Bindung geöffnet. Der geschlossene Zustand begünstigt dann die ATP-Hydrolyse, die im offenen Zustand nicht möglich ist.

Die Kinesin-Mikrotubuli-Interaktion konnte bislang nicht mittels Röntgen-Kristallographie untersucht werden, da es nicht gelingt Komplexe aus Motordomäne und Mikrotubuli zu kristallisieren. Daher werden alternative Methoden genutzt, um die Wechselwirkungsfläche zu analysieren. Proteolyse- und Mutagenesestudien sowie Konsensussequenzvergleiche ermöglichen, die Interaktion auf relevante Bereiche einzugrenzen. Umfangreiche Analysen mittels Kryo-EM dienen der Strukturaufklärung von Motordomänen-Mikrotubuli-Komplexen.

1.4.1. Untersuchungen auf Seiten der Mikrotubuli

Kinesin-Motordomänen binden auf der Mikrotubuli-Oberfläche mit Kontakten zu α - und β -Tubulin. Nach außen sind Mikrotubuli extrem negativ geladen, da sowohl die flexiblen C-

Termini als auch die angrenzenden Helices H11 und H12 über viele saure, zum Teil hoch konservierte Aminosäurereste verfügen. Dass die Motordomänen mit diesen Bereichen interagieren, wurde durch limitierte Proteolyse und Mutagenese nachgewiesen.

Die C-Termini der Tubulin-Untereinheiten können gezielt mit der Protease Subtilisin geschnitten werden (Serrano *et al.*, 1984). An Mikrotubuli ohne C-Termini binden Motordomänen deutlich stärker, was mit einer reduzierten Prozessivität einher geht (Wang und Sheetz, 2000; Skiniotis *et al.*, 2004). Dennoch binden auch Peptide der flexiblen C-Termini an die Motordomänen (Tucker und Goldstein, 1997). Im Translokationsprozess scheinen daher die C-Termini eine initiale, noch relativ schwache Kinesin-Bindung zu begünstigen. Eine starke Bindung wird anschließend über H11 und H12 vermittelt. Die maßgebenden Aminosäurereste in diesen Helices wurden durch Alanin-Mutagenese-Studien in *Saccharomyces cerevisiae* erfasst (Uchimura *et al.*, 2006; Uchimura *et al.*, 2010). Dabei zeigen die α -Tubulin-Mutante E415A und die β -Tubulin-Mutanten E410A, D417A sowie E421A signifikant verringerte Affinitäten zum Kinesin. Zudem wurde gezeigt, dass Mutationen dieser Reste die ADP-Freigabe aus der Motordomäne verhindert.

1.4.2. Identifikation der Interaktionsfläche der Motordomänen

Die Kinesin-Motordomänen binden mit der Nukleotid-abgewandten Seite an die Mikrotubuli. Durch limitierte Proteolyse wurden die beteiligten Regionen eingegrenzt. Deletiert man N-terminal 130 Aminosäuren, kann die verkürzte, schwere Kinesinkette immer noch binden (Yang *et al.*, 1989). Daher müssen die relevanten Binderegionen der Motordomäne C-terminal davon liegen. Eine systematische Proteolyse in Abwesenheit und Gegenwart von Mikrotubuli erfasste die Schleifen L8, L11 und L12 als relevante Interaktionselemente (Alonso *et al.*, 1998).

Um die Mikrotubuli-bindenden Regionen der Motordomäne genauer abzubilden, wurde im gleichen Zeitraum eine Alanin-Mutagenese-Studie durchgeführt (Woehlke *et al.*, 1997). Die oberflächlich exponierten Reste wurden ortsspezifisch zu Alanin mutiert. Kritische Reste wurden anhand abweichender ATPase-Aktivität und Mikrotubuli-Affinität bestimmt (*Abbildung 1.11*). Diese Reste sind auf einer relativ flachen, hydrophilen Oberflächenseite angereichert und in zwei Sequenzmotiven (L11- α 4-L12- α 5 und L7- β 5-L8a- β 5a-L8b- β 5b) konzentriert. Für positiv geladene und hydrophobe Reste wurde eine geringere Mikrotubulus-Affinität ermittelt, während für negativ geladene Reste bei Austausch gegen Alanin eine höhere Affinität erzielt wurde. Mit einer mehr als 15-fach höheren ATPase-Aktivität ragt die Mutante R278A außerordentlich hervor. Eine systematische Analyse ergab eine 100%ige Konservierung dieses Arginins (Grant *et al.*, 2007). Die Ergebnisse der Mutagenese-Studie sind im Einklang mit einer elektrostatischen Interaktion, die zwischen der Motordomäne und der negativ geladenen Mikrotubuli-Oberfläche entsteht (Lakämper und Meyhöfer, 2006).

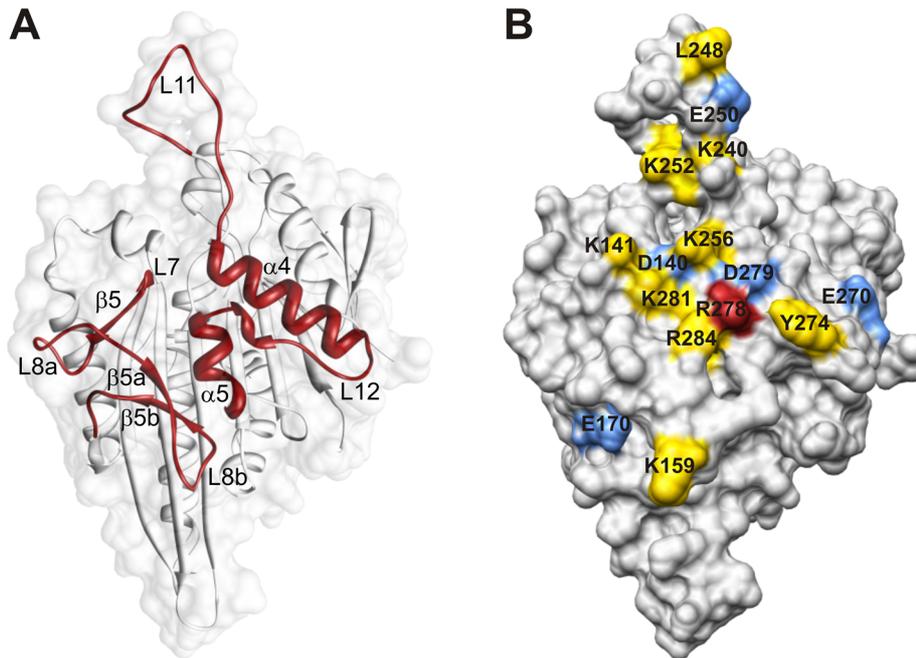


Abbildung 1.11: A) Mikrotubuli-bindende Regionen der Motordomäne von humanem Kinesin (PDB: 1bg2, Kull *et al.*, 1996). Die Regionen umfassen L11- α 4-L12- α 5 und L7- β 5-L8a- β 5a-L8b- β 5b (Rot). Die sogenannte Relais-Helix α 4 sowie die Schleifen L11 und L12 bilden den Schalter II, der für die Kommunikation wichtig ist. B) In analoger Projektion wurden die Reste markiert, die mutiert zu Alanin Auswirkungen auf die Mikrotubuli-stimulierte ATPase-Aktivität zeigen. Für blau markierte Reste wurde eine geringere, für gelb markierte Reste eine höhere ATPase-Aktivität gemessen. Die Mutation des hochkonservierten R278 (rot) führte zur höchsten ATPase-Aktivität (nach Woehlke *et al.*, 1997).

1.4.3. Kryo-EM und 3D-Rekonstruktion

Der technische Entwicklungsstand der Kryo-EM erlaubt die Bestimmung relativ hoch aufgelöster Strukturen. Mit einer Auflösung von bis zu 8 Å kann man die entsprechenden Sekundärstrukturelemente ermitteln. In 3D-Rekonstruktionen werden zudem bekannte Kristallstrukturen in die Kryo-EM-Daten eingepasst. Beispielhaft ist dies an einem Komplex aus Mikrotubuli und humaner Kinesin-Motordomäne gezeigt, wobei die Kontaktfläche zwischen den Interaktionspartnern bestimmt werden kann (*Abbildung 1.12*). In der Interaktionsfläche ist Helix α 4 ein zentrales Element. Sie ist an der Grenzfläche zwischen α - und β -Tubulin positioniert.

Um den ATP-Hydrolysezyklus abzubilden, wurden Mikrotubuli-gebundene Motordomänen in verschiedenen Nukleotidzuständen mittels Kryo-EM untersucht (Kikkawa und Hirokawa, 2006; Sindelar und Downing, 2010). Die strukturellen Änderungen erklären, wie sich Kinesine mit Hilfe der Motordomänen koordiniert fortbewegen. Im gebundenen Zustand wird Helix α 4 verlängert und dessen angrenzende Schleife L11 stabilisiert. L11 ist in freier Form flexibel und fehlt in den meisten Kristallstrukturen. Durch ATP-Bindung wird die Motordomäne relativ zu α 4 gedreht, wodurch eine Region exponiert wird, an die das

Halsverbindungsstück angelagert wird. Diese Umlagerung erzeugt wiederum die nötige Zugkraft, um die hintere Motordomäne in die führende Position zu verlagern (Downing und Nogales, 2010).

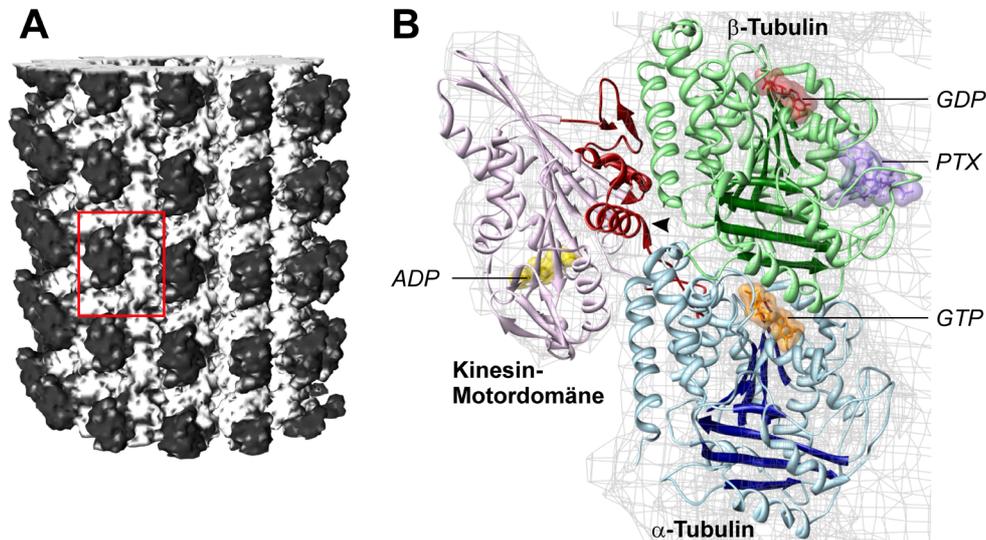


Abbildung 1.12: A) Mittels Kryo-EM und 3D-Rekonstruktion wurde ein Komplex aus Mikrotubuli (grau) und der Motordomäne von humanem Kinesin (schwarz) strukturell analysiert. Der Mikrotubulus ist vollständig dekoriert und es wurde eine Auflösung von 9,0 Å erzielt (EMDB: 1340, Sindelar und Downing, 2007). B) Die Strukturen vom Tubulin-Dimer (PDB: 1jff, Löwe *et al.*, 2001) und der humanen Kinesin-Motordomäne (PDB: 1bg2, Kull *et al.*, 1996) wurden in die Rekonstruktion modelliert und in der Proteindatenbank hinterlegt (PDB: 2p4n, Sindelar und Downing, 2007). Das mit Paclitaxel (PTX) kristallisierte Tubulin-Dimer besteht aus GTP-gebundenem α -Tubulin (blau) und GDP-gebundenem β -Tubulin (grün). Die ADP-gebundene Kinesin-Motordomäne (rosé) bindet mit der ADP-abgewandten Seite (rot) an beide Tubulin-Untereinheiten. Helix $\alpha 4$ (►) fügt sich in eine Aussparung zwischen den Tubulin-Untereinheiten ein.

In den EM-Strukturen der Mikrotubuli-gebundenen Motordomäne von Kar3, einem Kinesin mit C-terminaler Motordomäne, ist ein zuvor nicht beschriebenes Phänomen beobachtet worden (Hirose *et al.*, 2006). Der Raum, den Helix $\alpha 4$ in der Regel einnimmt, ist im nukleotidfreien Zustand leer. Die Relais-Helix scheint zu schmelzen und Schleife L12 zu verlängern. Dieser Effekt steht im Widerspruch zur Orientierungsänderung der Helix in Abhängigkeit vom Nukleotid-Zustand. Ein derartiges Schmelzen wurde bisher in keiner der veröffentlichten Kristallstrukturen nachgewiesen.

Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll, dass die starren Kristallstrukturen nicht der Proteinstruktur in einer natürlichen Umgebung entsprechen müssen. Es ist daher sinnvoll einen komplementären Ansatz zu verfolgen, und derartige Problemstellungen mit mehreren strukturgebenden Verfahren zu analysieren. Kryo-EM ist durch eine vergleichsweise geringe Auflösung limitiert. Man kann die beteiligten Sekundärstrukturelemente bestimmen, nicht aber bis auf atomarer Ebene die an der Interaktion beteiligten Reste identifizieren. Die NMR-Spektroskopie kann in diesem Punkt ergänzende Informationen liefern.

1.5. Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Festkörper-NMR-Spektroskopie hat sich zu einer aussagekräftigen Methode etabliert, mit der man z.B. Membranproteine und große Makromoleküle wie Amyloid-Fibrillen analysiert (McDermott, 2009; Heise, 2008). Sie hat den Vorteil, dass schlecht kristallisierbare Proteine und Proteinkomplexe wie etwa Motordomänen-dekorierte Mikrotubuli untersucht werden können. Außerdem eignet sich die NMR-Spektroskopie für dynamische Untersuchungen.

1.5.1. Prinzip und Entwicklungen

In der NMR-Spektroskopie werden Kernspins in einem homogenen Magnetfeld angeregt. Die charakteristischen Resonanzfrequenzen werden als chemische Verschiebung angegeben und können mit geeigneten Experimenten spezifisch zugeordnet werden. Allerdings entstehen mit steigender Proteingröße Überlagerungen, die eine eindeutige Zuordnung erschweren.

Generell verwendet man für NMR-Untersuchungen isotopenmarkierte Proteine, deren Atome einen NMR-aktiven Kernspin aufweisen. Diese können durch rekombinante Expression z.B. in *Escherichia coli* (*E. coli*) erzeugt werden, indem man schweren Stickstoff (^{15}N) und Kohlenstoff (^{13}C) als einzige Nährstoffquelle anbietet. Es wurden eine Vielzahl von Markierungsvarianten entwickelt, mit denen man die Signaldichte größerer Proteine und Proteinkomplexe verringern kann (Lian und Middleton, 2001). Dabei kann es angebracht sein, bestimmte Aminosäuren oder Seitenkettengruppen selektiv zu markieren, um eine vollständige Signalzuordnung zu ermöglichen (Higman *et al.*, 2009). Außerdem ist es zur Signalreduktion sinnvoll große Protein zu deuterieren, wobei Protonen (^1H) gegen Deuteronen (^2H) ersetzt werden (Akbej *et al.*, 2010b; Chevelkov *et al.*, 2006).

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl selektiver Experimente entwickelt, mit denen auch Proteine über 30 kDa zugeordnet werden können. Beispielsweise können mit höherdimensionalen (3D, 4D etc.) Experimenten Signalüberlagerungen aufgelöst werden. Auf technischer Seite werden immer leistungsstärkere Magnete entwickelt, die mit Feldstärken bis zu 23,5 Tesla (entspricht einer Protonenresonanzfrequenz von 1000 MHz) für hochauflösende Experimente konzipiert sind. Zur Verbesserung der Empfindlichkeit etabliert sich gegenwärtig die dynamische Kernpolarisation (DNP, *dynamic nuclear polarization*). Dazu werden bei tiefen Temperaturen (etwa 95 K) Mikrowellen auf Radikale eingestrahlt und deren Polarisation auf die Kernspins übertragen (Hall *et al.*, 1997). Mit DNP werden Signalverstärkungen im Bereich von 10 bis theoretisch 660 erzielt und die Messzeit extrem verkürzt.

1.5.2. Grundlegende Begrifflichkeiten

Im Vergleich zur Lösungs-NMR-Spektroskopie erzeugen bestimmte Wechselwirkungen in der Festkörper-NMR-Spektroskopie eine extreme Verbreiterung der Signale. Dazu zählen dipolare Kopplungen benachbarter Kernspins, die in der Lösungs-NMR-Spektroskopie durch zufallsbedingte Molekülbewegung gegen Null konvergieren. Außerdem bewirken anisotrope Effekte, dass die chemische Verschiebung auch von der räumlichen Orientierung des Kernspins abhängt. Nur wenn man diese Wechselwirkungen unterdrückt, kann man die Linienbreite so verringern, dass man interpretierbare Signalsätze erhält (Laws *et al.*, 2002). Dazu wird die Proteinprobe in einem Winkel von $54,7^\circ$ relativ zum Magnetfeld rotiert, was im Englischen als *magic angle spinning* (MAS) bezeichnet wird. Dieser Winkel bildet die Raumdiagonale eines Würfels. Die Rotationsfrequenz für MAS-Experimente beträgt je nach Rotor typischerweise 10-60 kHz. Bei geringen Frequenzen entstehen zusätzliche Signale, die als Rotations-Seitenbanden (*spinning side bands*) bezeichnet werden und einem Vielfachen der Rotationsfrequenz entsprechen.

In der Regel werden in der Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie ^{13}C -Signale detektiert. Man nutzt zunächst die dipolare Kopplung zwischen Protonen und ^{13}C , um die Magnetisierung von ^1H auf ^{13}C zu übertragen. Dabei werden durch Kreuzpolarisation (CP, *cross polarization*) beider Spins die ^{13}C -Signale verstärkt und ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erzeugt. Außerdem wird die Auflösung der Kohlenstoffdimension durch Entkopplung (*decoupling*) der Protonen verbessert. Die Magnetisierung kann durch Spindiffusion auf benachbarte ^{13}C -Atome übertragen werden. Um homonukleare ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen zu messen, nutzt man z.B. für protonierte Proteine PDSD (*proton-driven spin diffusion*) Experimente (Szeverenyi *et al.*, 1982). Obwohl durch MAS Informationen über dipolare Kopplungen eliminiert werden, gibt es Verfahren zur Rückgewinnung dieser Informationen. Dies gelingt durch Wiedereinkopplung (*recoupling*), indem man mit bestimmten Pulsfolgen die Magnetisierung kontinuierlich alternieren lässt (Griffin, 1998). Mit geeigneten Experimenten werden so u.a. homonukleare ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen (z.B. RFDR, *radio-frequency driven recoupling*) und heteronukleare ^{15}N - ^{13}C -Korrelationen (z.B. TEDOR/REDOR, *transferred/rotational-echo double-resonance*) aufgenommen (Bennett *et al.*, 1992; Hing *et al.*, 1992).

Die Informationen aus Stickstoff- und Kohlenstoffkorrelationen werden genutzt, um eine Zuordnung der entsprechenden Aminosäuren durchzuführen. Mit sequentiellen Experimenten verknüpft man dazu die Signale benachbarter Aminosäuren. In der Festkörper-NMR-Spektroskopie werden z.B. 2D und 3D NCACX- sowie NCOCX-Experimente verwendet, um entsprechende Spinsysteme zu identifizieren (Baldus *et al.*, 1998; Pauli *et al.*, 2001).

1.5.3. Stand der Technik hinsichtlich NMR an Mikrotubuli

Durch die stetige Weiterentwicklung der Geräte und Experimente vergrößert sich das Einsatzfeld der NMR-Spektroskopie kontinuierlich. Die Festkörper-NMR-Spektroskopie entwickelt sich gegenwärtig zu einer geeigneten Methode, Mikrotubuli-Interaktionen mit Proteinen und auch chemischen Verbindungen zu analysieren. Außerdem werden Lösungs-NMR-spektroskopische Analysen im Rahmen des Möglichen durchgeführt. Direkte Strukturuntersuchungen an Tubulin und Mikrotubuli erweisen sich als schwierig, da die 55 kDa großen Tubulin-Untereinheiten das Größenlimit für gut aufgelöste Signalsätze überschreiten. Zudem kann Tubulin höherer Eukaryoten nicht rekombinant isotoopenmarkiert werden, da es aufgrund fehlender Chaperone nicht korrekt in *E. coli* gefaltet wird (Shah *et al.*, 2001). Einige Mikrotubuli-bindende Proteine wie Tau, Stathmin und die Kinesin-Motordomänen sind hingegen gut rekombinant exprimierbar. Die markierten Interaktionspartner können wiederum gebunden an Mikrotubuli untersucht werden.

Erste Interaktionsstudien mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie wurden in der Arbeitsgruppe um Guy Lippens durchgeführt. Mit ^1H - ^{15}N -Korrelationen an freiem, ^{15}N -markiertem Tau und dem Tau-Mikrotubuli-Komplex wurde die Interaktionsfläche des Tau-Proteins abgebildet (Sillen *et al.*, 2007). Die Signalintensität der interagierenden Reste nahm signifikant ab, bis hin zu einem vollständigen Signalverlust für Reste, die an der Mikrotubuli-Oberfläche fixiert wurden. Die Interaktion der Glycin-reichen, ^{15}N - ^{13}C -markierten CAP-Gly-Domäne von Dynactin mit Mikrotubuli wurde kürzlich in einem kombinatorischen Ansatz aus Lösungs- und Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht (Sun *et al.*, 2009). In Lösungsspektren wurde eine Signalverbreiterung nach Mikrotubuli-Bindung beobachtet. Die Festkörperspektren ermöglichten eine Aminosäure-spezifische Zuordnung.

Die NMR-Spektroskopie kann auch dazu genutzt werden, dynamische Prozesse abzubilden. Daher ist die Methode z.B. zur Untersuchung von Mikrotubuli-bindenden Substanzen vielversprechend. Mit Lösungs-NMR-Spektroskopie wurden z.B. Konformationsänderungen von Epothilon A im Verlauf der Bindung an Mikrotubuli analysiert (Reese *et al.*, 2007). Auch auf diesem Feld gewinnt die Festkörper-NMR-Spektroskopie an Bedeutung. Im Fall von Epothilon B gelang eine isotoopenmarkierte Naturstoffherstellung im Myxobakterium. Durch die Analyse von ^{13}C -markiertem Epothilon B in gebundener und ungebundener Form wurden weitere Strukturinformationen gewonnen (Kumar *et al.*, 2010a).

1.6. Zielstellungen

Der Begriff „gezielte Krebstherapie“ hat sich für das Design von spezifischen Wirkstoffen gegen krebserlevante Zielmoleküle entwickelt. Beispielsweise werden essentielle, zellbiologische Funktionen mit Mikrotubuli-Filamenten verknüpft, was für antiproliferative Therapieansätze ausgenutzt wird (Jackson *et al.*, 2007). Es werden im wesentlichen zwei Ausgangspunkte verfolgt. Zum einen wird direkt die Mikrotubuli-Dynamik beeinflusst, zum anderen wird das Angriffsziel auf Mikrotubuli-interagierende Proteine ausgeweitet.

Die vorliegende Dissertation verbindet diese Aspekte in zwei Teilprojekten mit pharmakologischen Perspektiven. Eine detaillierte Aufklärung der Kinesin-Mikrotubuli-Interaktion ist wegberaubend für die Entwicklung effektiver Inhibitoren dieser Wechselwirkung. Ausgehend von klassischen Mikrotubuli-Inhibitoren wie Taxanen, Vinca-Alkaloiden und Colchicin ist die gegenwärtige Forschung zudem permanent auf der Suche nach neuen, potenten Polymerisations-Inhibitoren bzw. -Promotoren. Hier sollten neue Modulatoren auf Colchicin-Basis untersucht werden. Beide Projekte sind sowohl für die Grundlagenforschung als auch für den Ausbau neuer Konzepte zur Krebstherapie relevant.

1.6.1. Festkörper-NMR-Untersuchungen zur Kinesin-Mikrotubuli-Interaktion

Im ersten Teilprojekt sollte der Kinesin-Mikrotubuli-Komplex als neues Modellsystem für Festkörper-MAS-NMR-Messungen etabliert werden. Eine atomare Auflösung der Interaktionsfläche würde ergänzende Informationen zu vorhandenen Kryo-EM-Rekonstruktionen liefern. Protein-Protein-Interaktionen können mittels Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie untersucht werden, wenn die Interaktionspartner unterschiedlich isotopenmarkiert werden. Mit geeigneten Experimenten können dadurch selektiv intermolekulare Kontakte dargestellt werden (Etzorn *et al.*, 2004).

Für die Untersuchung der Kinesin-Mikrotubuli-Interaktion wurde ein neues Markierungsschema erprobt. Dabei wurden die Mikrotubuli in nativer Form mit natürlicher Isotopenverteilung eingesetzt. Die untersuchten Interaktionspartner, zwei unterschiedliche Kinesin-Motordomänen, sollten im Umkehrschluss so effizient wie technisch möglich isotopenmarkiert werden. Insbesondere eine möglichst vollständige Deuterierung musste gewährleistet werden.

Der präparative Teil diente als Grundlage für eine Reihe von selektiven Festkörper-MAS-NMR-Experimenten an deuterierten Kinesin-Mikrotubuli-Komplexen. Neben der konventionellen Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie wurde auch die dynamische Kernpolarisation (DNP) herangezogen. Mit entsprechenden Experimenten sollte gezeigt werden, ob man die für die Interaktion relevanten Reste der Motordomänen abbilden kann.

Zudem wurde mit geeigneten Kontrollexperimenten untersucht, ob z.B. bestimmte Additive (Nukleotide oder Puffersubstanzen) die Ergebnisse bedingen könnten.

1.6.2. Bindungsstudien an neuen Colchicinoiden

Das zweite Teilprojekt umfasste Bindungsstudien zu neuen Colchicin-Analoga. Colchicin verhindert durch Bindung an das $\alpha\beta$ -Tubulin-Dimer deren Polymerisation. Die medizinische Indikation ist aufgrund einer hohen Toxizität limitiert. Colchicin wird daher nicht chemotherapeutisch eingesetzt. Mit dem Colchicin-Grundgerüst als Leitstruktur wurden bereits vielfach Bestrebungen initiiert, Colchicinoide mit therapeutisch verbesserten Eigenschaften zu generieren (Bhattacharyya *et al.*, 2008). Dabei soll eine Balance zwischen verminderter Toxizität und hoher, biologischer Aktivität erzielt werden.

Im Rahmen eines durch die Volkswagen-Stiftung finanzierten Kooperationsprojekts mit dem Titel "*Understanding and exploiting conformational effects on interaction of binding small molecules to the colchicine binding site of tubulin*" wurde die biologische Aktivität neuartiger Colchicinoide evaluiert. Die Colchicin-Analoga wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz (Universität Köln) über neue Synthesewege hergestellt. Die zellbiologische Wirkungsweise der Verbindungen wurde von der Arbeitsgruppe um Dr. Dr. Aram Prokop (vormals Charité Berlin, heute Kliniken der Stadt Köln) untersucht.

Parallel sollten von mir die Bindungseigenschaften der Substanzen charakterisiert werden. Dazu wurden geeignete *in vitro* Experimente an gereinigtem Tubulin entwickelt. Es sollte der Einfluss auf die Polymerisation untersucht sowie die Bindung an die Colchicin-Bindestelle verifiziert werden. Zudem galt es im Zellkulturmodell die Morphologie der Mikrotubuli in Gegenwart der Colchicinoide zu beurteilen.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Materialien und Geräte

Nachfolgende Chemikalien, bei denen die Herkunft nicht vermerkt ist, wurden bei Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) erworben.

Salze und Spurenelemente für deuterierte Anzuchten wurden mit der Gefiertrocknungsanlage Christ® alpha2-4 (Sartorius, B. Braun Biotech International, Göttingen) lyophilisiert. Für Bakterienzellkulturen wurden die Schüttelinkubatoren Multitron2 (Infors HT, Bottmingen, Schweiz), Innova™4000 und Innova™4230 (Eppendorf, New Brunswick Scientific, Edison NJ, USA) eingesetzt.

Es wurden folgende Zentrifugen und Ultrazentrifugen (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) für Zellernten, Reinigungsschritte oder Komplexpräparationen genutzt:

- Zentrifugen (Rotoren): Avanti® J25 (JA25.50, JLA10.500), Allegra® 21R (S4180) und Allegra® X-22R (SX4250);
- Ultrazentrifugen (Rotoren): Optima™ TLX (TLA45) und Optima™ LE80K (45Ti, 70Ti, 70.1Ti).

Für Wirkstoffanalysen wurden mit folgenden Mikrotiterplatten (Corning Incorporated, New York City, NY, USA) gearbeitet:

- Mikrotiterplatte #3694: 96 Kavitäten mit halber Oberfläche, Polystyrol, schwarz, mit Flachboden;
- Mikrotiterplatte *Special Optics* #3615: 96 Kavitäten, Polystyrol, schwarz, mit ultradünnem Klarboden.

Weitere verwendete Materialien und Geräte sind in den entsprechenden Methodenbeschreibungen notiert.

2.2. Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1. Oligonukleotide und Vektoren

In *Tabelle* 2.1 sind die verwendeten Oligonukleotide gelistet. Diese wurden von der Firma BioTeZ (Berlin) synthetisiert.

Tabelle 2.1: Oligonukleotide zur Klonierung (fw - vorwärts, rev - rückwärts) und Sequenzierung*.

Oligonukleotid	Sequenz
KIF5C MD Ek/LIC fw	5' GAC GAC GAC AAG ATG GCG GAT CCA GCC GAA TGC 3'
KIF5C MD TEV fw	5' AAC CTG TAT TTC CAG GGA ATG GCG GAT CCA GCC GAA TGC 3'
KIF5C MD Tb fw	5' CTG GTG CCA CGC GGT TCT ATG GCG GAT CCA GCC GAA TGC 3'
KIF5C MD Ek/LIC rev	5' GAG GAG AAG CCC GGT TTA CTT ATT CTT CTC TTT CTC 3'
Kar3 MD Ek/LIC fw	5' GAC GAC GAC AAG AGA GGA AAT ATA CGA G 3'
Kar3 MD TEV fw	5' AAC CTG TAT TTC CAG GGA AGA GGA AAT ATA CGA G 3'
Kar3 MD Tb fw	5' CTG GTG CCA CGC GGT TCT AGA GGA AAT ATA CGA G 3'
Kar3 MD Ek/LIC rev	5' GAG GAG AAG CCC GGT TTA TTT TCT ACT AAC CAA TC 3'
Ek-TEV/LIC fw	5' GAC GAC GAC AAG ATG GAA AAC CTG TAT TTC CAG 3'
Ek-Tb/LIC fw	5' GAC GAC GAC AAG ATG CTG GTG CCA CGC GGT TC 3'
pET Upstream*	5' ATG CGT CCG GCG TAG A 3'
T7 Promoter*	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
T7 Terminator*	5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3'

Die Plasmide pRK354 bzw. pMW/Kar3 dienen als DNA-Matrizen, um die Motordomänen der Kinesine KIF5C bzw. Kar3 in die pET-Vektoren pET30 Ek/LIC und pET46 Ek/LIC (Merck, Novagen®, Darmstadt) zu klonieren. Mit pET werden Plasmide bezeichnet, die zur rekombinanten Expression die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 nutzen (Rosenberg *et al.*, 1987). Die Eigenschaften der verwendeten Vektoren können *Tabelle 2.2* entnommen werden.

Tabelle 2.2: Eigenschaften der verwendeten Vektoren. (His)₆ entspricht einem 6x-Polyhistidin-Anhang. Hinter S-Anhang verbirgt sich die Sequenz eines S-Peptids, das zum sensitiven Nachweis einer Nukleaseaktivität im Komplex mit dem S-Protein der Ribonuklease A dient. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Eigenschaft nicht verwendet.

Vektor	Eigenschaften	Quelle / Anbieter
pET30 Ek/LIC	Klonierungs- und Expressionsvektor, T7 Promoter, Kanamycin-Resistenz, kodiert N-terminal (His) ₆ -S-Anhang und C-terminal (His) ₆ -Anhang	Merck, Novagen®
pET46 Ek/LIC	Klonierungs- und Expressionsvektor, T7 Promoter, Ampicillin-Resistenz, kodiert N-terminal (His) ₆ -Anhang und C-terminal S-Anhang	Merck, Novagen®
pRK354	Vorlage für KIF5C-Klonierung, modifizierter pET3a-Vektor, T7 Promoter, Ampicillin-Resistenz, ohne C- und N-terminale Anhänge	Prof. Eva-Maria Mandelkow, MPASMB Hamburg (Kozielski <i>et al.</i> , 1997b)
pMW/Kar3	Vorlage für Kar3-Klonierung, modifizierter pET-Vektor, T7 Promoter, Ampicillin-Resistenz, ohne C- und N-terminale Anhänge	Dr. Sharyn Endow, Duke University Durham, NC (Song und Endow, 1996)

Plasmidpräparationen erfolgten mit dem Reagenziensatz *NucleoSpin® Plasmid QuickPure* (Macherey-Nagel, Düren) entsprechend der Angaben des Herstellers.

2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Fragmente wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) amplifiziert. In parallelen Ansätzen wurden die Oligonukleotide mittels Temperaturgradienten bei 55, 60 oder 65 °C an die DNA angelagert. Die Reaktionen wurden in 200 µL Reaktionsgefäßen in einem *Mastercycler® ep gradient S* (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. PCR-Reaktionen erfolgten entsprechend der dargestellten Vorschrift. Die verwendete KOD DNA-Polymerase (Merck, Novagen®) aus *Thermococcus kodakaraensis* ist thermostabil und verfügt über eine hohe Lesegenauigkeit.

PCR-Ansatz	PCR-Profil	
0,5 µL DNA-Matrize	94 °C 5 min	
0,8 µL KOD DNA-Polymerase (1 U/µL)	94 °C 30 sec	
2 µL 10x KOD-Puffer	55 °C 30 sec	} 5x
0,8 µL 25 mmol/L MgSO ₄ (Endk. 1 mmol/L)	72 °C 1 min	
2 µL 2 mmol/L dNTPs (Endk. 0,2 mmol/L)	94 °C 30 sec	} 25x
1 µL 10 µmol/L Oligonukleotid fw (Endk. 0,5 µmol/L)	55-65 °C 30 sec	
1 µL 10 µmol/L Oligonukleotid rev (Endk. 0,5 µmol/L)	72 °C 1 min	
ad 20 µL H ₂ O	72 °C 7 min	
	∞ 4 °C	

2.2.3. DNA-Gelelektrophorese

Die durch PCR gewonnene DNA sowie geschnittene Plasmid-DNA wurden mittels Gelelektrophorese analysiert. 1% Agarosegele wurden mit 1xTAE-Puffer und 0,5 µg/mL Ethidiumbromid hergestellt. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Vol. 6x-Probenpuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und bei 100 V in Hoefer *HE33 Mini Horizontal Submarine Units* (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandards wurden *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder #SM0311* und *FastRuler™ Middle Range DNA Ladder #SM1113* (Fermentas) verwendet. Für präparative Zwecke wurde die DNA mittels *Montage™ DNA Gel Extraction Kit* (Merck, Millipore, Billerica, MA, USA) aus dem Gel eluiert.

2.2.4. Klonierung

Es wurden ligationsunabhängige Klonierungen (LIC, *ligation-independent cloning*) (Merck, Novagen®) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Kodierungssequenzen der Motordomänen von Kar3 und KIF5C wurden in die Vektoren pET30 Ek/LIC und pET46 Ek/LIC kloniert. Es erfolgte eine zweistufige PCR, mit der Erkennungssequenzen für zusätzliche Proteasen eingefügt wurden. Im Anschluss an die vektorspezifische Erkennungssequenz der Enterokinase (Ek) wurden so Erkennungssequenzen für TEV-Protease (TEV, *tobacco etch virus*) oder Thrombin (Tb) erzeugt. Die PCR-Produkte wurden mit dem Reagenziensatz *SureClean Plus* (Bioline, London, UK) gereinigt.

2.2.5. Verifizierung der Plasmide

Die isolierten Plasmide wurden zunächst mittels Restriktionsverdau analysiert. Die Behandlung mit den Restriktionsenzymen XhoI, XbaI und HindIII (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) lieferte erste Hinweise für den korrekten Einbau der PCR-Produkte.

Die fehlerfreie Insertion der Kodierungssequenzen in die pET-Vektoren wurde durch DNA-Sequenzierung kontrolliert. Diese wurde mit den vektorspezifischen Oligonukleotiden pET Upstream bzw. T7 Promoter und T7 Terminator (Merck, Novagen®) von der Firma Invitex (Berlin) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Vector NTI Advance*® 11.0 (Invitrogen, Paisley, UK).

2.3. Biotechnologische Methoden

2.3.1. Escherichia coli Stämme

E. coli diente als Wirt für die Klonierung und Expression rekombinanter Proteine. Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock in chemisch kompetente Expressionswirte transformiert. *NovaBlue GigaSingles*™ kompetente Zellen (Merck, Novagen®) wurden für ligationsunabhängige Klonierungen verwendet. Der optimale Expressionswirt wurde aus BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, Rosetta™2(DE3) und Rosetta™2(DE3)pLysS (Merck, Novagen®) sowie T7 Express (New England Biolabs) selektiert. Beide Motordomänen wurde für präparative Zwecke in BL21 (DE3) exprimiert. In *Tabelle 2.3* sind die Genotypen der genutzten *E. coli* Wirte aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verwendete *E. coli* Klonierungs- und Expressionswirte. Stämme mit dem Zusatz DE3 verfügen über eine im Genom integrierte Kopie des T7 RNA-Polymerase-Gens. Mit pLysS wird ein Lysozym-kodierendes Zusatzplasmid bezeichnet, mit dem die Basalexpression der T7 RNA-Polymerase unterdrückt wird. Rosetta-Stämme kodieren auf einem Zusatzplasmid tRNAs für in *E. coli* selten genutzte Triplets.

Bezeichnung	<i>E. coli</i>	Genotyp	Anbieter
NovaBlue	K-12	<i>endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F⁺[proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15 ::Tn10(Tc^R)]</i>	Merck, Novagen®
BL21(DE3)	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)</i>	Merck, Novagen®
BL21(DE3)pLysS	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R)</i>	Merck, Novagen®
Rosetta™2(DE3)	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam^R)</i>	Merck, Novagen®
Rosetta™2(DE3)pLysS	B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE2 (Cam^R)</i>	Merck, Novagen®
T7 Express	B	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene 1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210 ::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	New England Biolabs

2.3.2. Anzuchtmedien für Bakterienkulturen

Als Vollmedium wurde LB-Medium aus 0,5% Hefeextrakt, 1% Pepton, 1% NaCl (pH 7,2-7,5) verwendet. Der Zusatz von 1,5% Agar erfolgte für die Herstellung von LB-Agar-Platten. Um die rekombinant zu exprimierenden Proteine mit Isotopen zu markieren, wurde M9-Minimalmedium verwendet (Sambrook und Russell, 2001). 10x M9-Salz entsprach 450 mmol/L Na_2HPO_4 , 150 mmol/L KH_2PO_4 , 85 mmol/L NaCl (pH 7,2-7,3). 100x Spurenelementlösung enthielt 17 mmol/L EDTA, 3 mmol/L FeSO_4 , 300 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 , 30 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 (pH 7,5-7,7). M9-Minimalmedium für Schüttelkultur und Fermentation setzte sich wie folgt zusammen. Für Fermentationen wurden alle Komponenten bis auf CaCl_2 in doppelter Menge zugesetzt.

Zusammensetzung von 1 L M9-Minimalmedium

Stammlösungen	Schüttelkultur	Fermentation
100x Spurenelemente	10 mL 1x	20 mL 2x
1 mol/L MgSO_4	1 mL 1 mmol/L	2 mL 2 mmol/L
1 mol/L CaCl_2	0,3 mL 300 $\mu\text{mol/L}$	0,3 mL 300 $\mu\text{mol/L}$
10x M9-Salz	100 mL 1x	200 mL 2x
1 mg/mL Thiamin	1,5 mL 4,5 $\mu\text{mol/L}$	3 mL 9 $\mu\text{mol/L}$
0,1 mg/mL Biotin	15 mL 6 $\mu\text{mol/L}$	30 mL 12 $\mu\text{mol/L}$
25% Glukose	16 mL 4 g/L	32 mL 8 g/L
25% NH_4Cl	4 mL 1 g/L	8 mL 2 g/L
ad 1 L H_2O	(Vol.) (Endk.)	(Vol.) (Endk.)

Zur Selektion wurden je nach Plasmid und Expressionswirt Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen (Endk.) zugesetzt: 60 $\mu\text{g/mL}$ Carbenicillin, 40 $\mu\text{g/mL}$ Kanamycin (100 $\mu\text{g/mL}$ für Fermentationen), 34 $\mu\text{g/mL}$ Chloramphenicol. Die Expression wurde mit 1 mmol/L Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Im Folgenden werden Minimalmedien auf Wasserbasis als M9/ H_2O und mit Deuteriumoxid (D_2O) angesetzte Minimalmedien als M9/ D_2O bezeichnet.

2.3.3. ^2H - ^{13}C - ^{15}N -Isotopenmarkierung rekombinanter Proteine

Für die angestrebten Festkörper-MAS-NMR-Experimente sollten die Motordomänen möglichst maximal deuteriert hergestellt werden. Dazu wurden die Salze und Spurenelemente des M9-Minimalmediums lyophilisiert und in 99,90% D_2O (Eurisotop, Gif-sur-Yvette, Frankreich) gelöst. Vitamine, Antibiotika und IPTG wurden direkt in 99,90% D_2O aufgenommen. Für deuterierte ^{13}C -Markierungen wurde uniform-markierte $^{13}\text{C}_6\text{-D}_7$ -Glukose (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) als einzige Kohlenstoffquelle verwendet. Diese wurde zweimal in 99,90% D_2O gelöst und lyophilisiert, um maximal deuterierte $^{13}\text{C}_6\text{-D}_{12}$ -Glukose zu erhalten. Für ^{15}N -Markierungen wurde $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Cambridge Isotope Laboratories) als einzige Stickstoffquelle eingesetzt.

2.3.4. Ermittlung optimaler Expressionsbedingungen

Durch geeignete, breit gefächerte Voruntersuchungen wurden die optimalen Expressionsbedingungen selektiert. Von Einzelkolonien verschiedener Expressionswirte, transfiziert mit einem der Plasmidkonstrukte, wurden Expressionsprofile analysiert. Die optische Dichte (OD_{600nm}) wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem *Ultrospec™* 10 *Cell Density Meter* (GE Healthcare, Amersham Biosciences) kontrolliert. Die Kulturen wurden bei OD_{600nm} von 0,8-1,0 mit 1 mmol/L IPTG induziert. Zusätzlich wurden Expressionstemperatur und -zeit variiert, so dass in parallelen Ansätzen für 4 h bei 37 °C oder für maximal 18 h bei 25 °C inkubiert wurde.

Für die Expression in M9/D₂O-Minimalmedium wurden zudem verschiedene Anzuchtbedingungen der Vorkultur untersucht. Dabei wurden parallel Vorkulturen in LB-Medium, M9-Minimalmedium auf H₂O- sowie D₂O-Basis jeweils bei 25 °C und 37 °C angezogen. Deren Wachstumsverhalten und Expressionsprofil in M9/D₂O-Minimalmedium wurde verglichen. Die kräftigste Einzelkolonie wurde zur Anzucht quantitativer Zellmassen herangezogen.

2.3.5. Expression in Schüttelkultur

Unmarkierte Motordomänen wurden durch rekombinante Expression im transformiertem BL21(DE3)-Stamm hergestellt. Eine Übernachtskultur einer Einzelkolonie wurde bei 37 °C in LB-Medium angezogen. LB-Medium wurde mit der Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,7-0,9 wurde die Temperatur auf 25 °C gesenkt und mit 1 mmol/L IPTG induziert. Nach 16-18 h Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

Für ²H-¹³C-¹⁵N-markierte Anzuchten im Schüttelkolben wurde eine Einzelkolonie zunächst auf LB-Medium (Übernachtskultur) und M9/H₂O-Minimalmedium (Übertagkultur) angezogen. Mit letzterer wurde eine Vorkultur auf M9/D₂O-Minimalmedium inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mindestens 1 L M9/D₂O-Minimalmedium mit 2 g/L ¹³C₆-D₁₂-Glukose und 0,5 g/L ¹⁵NH₄Cl wurde mit der Vorkultur auf OD_{600nm} 0,3 inokuliert und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,7 wurde die Temperatur auf 25 °C gesenkt und nach 30 min mit 1 mmol/L IPTG induziert. Nach 17 h Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Zellsedimente wurde mit 1x M9/D₂O-Salz gewaschen und in 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

2.3.6. Hochzelldichtefermentation (HZDF)

Um hohe Ausbeuten an deuterierten Motordomänen zu erzielen, wurde *E. coli* im Bioreaktorsystem *feedbatch-pro* (DASGIP, Jülich) fermentiert (Fiedler *et al.*, 2007). Mit diesem System wurden Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Zufütterung

rechnergestützt angepasst. Es wurden vier separat gesteuerte Reaktoren mit einem Fassungsvermögen von je 250 mL genutzt. Für einen maximalen Deuterierungsgrad wurde jeder vermeidbare Eintrag von Wasser und damit Protonen verhindert. Dazu wurde der Fermenter mit einer Belüftungseinheit inkl. eines Luftfeuchtigkeits-absorbierenden Filters versehen.

Vorbereitend wurde eine Vorkultur schrittweise an das Wachstum in M9/D₂O-Minimalmedium gewöhnt. Einer Übernachtskultur in LB-Medium folgte eine Übertagkultur in M9/H₂O-Minimalmedium. Nach diesen Passagen wurde die eigentliche Vorkultur in M9/D₂O-Minimalmedium bei 37 °C angezogen. Die Zellen wurden niedertourig bei RT zentrifugiert und das Sediment zur Inokulation in 40 mL M9/D₂O-Minimalmedium gelöst. 240 mL M9/D₂O-Minimalmedium wurden pro Reaktor auf 37 °C temperiert und mit ca. 10 mL Vorkultur auf eine Start-*OD*_{600nm} von 1,0 eingestellt. Bereits an dieser Stelle wurden 8 g/L ¹³C₆-D₁₂-Glukose und 2 g/L ¹⁵NH₄Cl als Substrate verwendet.

Deren Verbrauch wurde durch Messung des Sauerstoffpartialdrucks (pO₂) überwacht. Ein durch Nährstoffmangel hervorgerufener pO₂-Anstieg wurde zunächst über eine erhöhte Rührgeschwindigkeit (Standard 500 rpm, maximal 1100 rpm) und damit eine höhere Sauerstoffzufuhr ausgeglichen. Über einem bestimmten Schwellenwert (hier 60%) wurde eine kontinuierliche Zufütterung markierter Substrate aktiviert. Dabei wurden pro Reaktor 30 mL konzentrierte Nährstofflösung (12,5% ¹³C₆-D₁₂-Glukose, 3,125% ¹⁵NH₄Cl, 2,5x M9-Salz, 6,25x Spurenelemente, 11 µmol/L Thiamin, 15 µmol/L Biotin, 200 µg/mL Kanamycin) mit einer Geschwindigkeit von 2 mL/h zugeführt. Außerdem wurde die Temperatur auf 25 °C reduziert. Nach 30 min wurde durch die Zugabe von 1 mmol/L IPTG die Expression induziert. Dem Ansäuern des Mediums durch azide Stoffwechselprodukte von *E. coli* wurde durch kontrollierte Zugabe von 2 mol/L Natriumdeuteriooxid (NaOD) entgegengewirkt. Die Zellen wurden nach 15 h Expression durch Zentrifugation geerntet. Zellsedimente wurden mit 1x M9/D₂O-Salz gewaschen und in 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

2.4. Biochemische Analysemethoden

2.4.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurden Hoefer SE250 *Mini-Vertical Gelelectrophoresis Units* (GE Healthcare, Amersham Biosciences) genutzt. 15% bzw. 10% SDS-Polyacrylamidgele setzten sich aus Trenngel (15% bzw. 10% Acrylamid/Bisacrylamid, 370 mmol/L Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,07% APS, 0,05% TEMED) und Sammelgel (5% Acrylamid/Bisacrylamid, 80 mmol/L Tris-HCl pH 6,8, 0,1%

SDS, 0,05% APS, 0,1% TEMED) zusammen. Die Elektrophorese erfolgte in 25 mmol/L Tris, 190 mmol/L Glycin, 0,01% SDS. Die Proteinproben wurden mit 1 Vol. 2x-Probenpuffer (125 mmol/L Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau, 5% 2-Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde der *Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431* (Fermentas) mitgeführt.

Die Färbung der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte nach Schägger und von Jagow (1988). Es wurde in 10% Essigsäure, 50% Ethanol fixiert, mit 0,025% *Coomassie Brilliant Blue G250* (Carl Roth) in 10% Essigsäure gefärbt und abschließend in 10% Essigsäure entfärbt.

2.4.2. Berechnung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration der gereinigten Proteine wurde durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm am UV/VIS-Spektralphotometer *NanoDrop ND1000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Es wurde das Lambert-Beersche Gesetz angewendet. Die bei 280 nm gemessene Extinktion E_{280} entspricht dem Produkt aus molarem Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} [$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$], molarer Konzentration c [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] und Schichtdicke d (hier: 1 cm).

$$E_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d$$

Molare Extinktionskoeffizienten wurden entsprechend der Primärsequenz der Proteine mit dem Programm *ProtParam* (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) ermittelt. *Tabelle 2.4* fasst die Extinktionskoeffizienten der rekombinant hergestellten Kinesin-Motordomänen zusammen.

Tabelle 2.4: Molekulargewichte (*MW*) und molare Extinktionskoeffizienten (ϵ_{280}) der rekombinant hergestellten, zunächst (His)₆-gekoppelten Motordomänen der Kinesine KIF5C und Kar3. Der 50 Aminosäuren umfassende N-terminale Anhang wurde durch Protease-Behandlung entfernt.

Motor-domäne	N-terminaler (His) ₆ -Anhang	Anzahl an Aminosäuren	MW (Da)	ϵ_{280} ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
KIF5C	mit	405	45597,7	23380
	ohne	355	39885,4	21890
Kar3	mit	397	44550,7	24660
	ohne	347	38838,5	23170

2.4.3. Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Analysen wurden von Dr. Sebastian Beck und Rajko Winkler (Humboldt-Universität zu Berlin, Arbeitsgruppe Linscheid) durchgeführt. Es wurden die Molekulargewichte der ²H-¹³C-¹⁵N-isotopenmarkierten Motordomänen von KIF5C und Kar3 sowie der Proteine mit natürlicher Isotopenverteilung bestimmt. Die Proteine wurden in Phosphatpuffer (50 mmol/L Natriumphosphat pH 8,0, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂)

gereinigt. Bei einer Konzentration von mindestens 0,1 mmol/L (4 mg/mL) Protein wurde der Phosphatpuffer zunächst gegen 0,1% Ameisensäure (FA, in H₂O) für Proteine mit natürlicher Isotopenverteilung bzw. 0,1% deuterierte Trifluoressigsäure (TFA, in D₂O) für ²H-¹³C-¹⁵N-isotopenmarkierte Motordomänen ersetzt. Der Austausch erfolgte unter Verwendung von Amicon® Ultra Zentrifugalfiltern (Merck, Millipore) mit einer Ausschlussgröße von 30.000 Da. Mittels Zentrifugationen von je 15 min bei RT und 14.000 g wurde der Phosphatpuffer entfernt und dreimal mit 0,1% FA bzw. TFA gewaschen. Die Proteine wurden im gleichen Endvolumen aufgenommen, das ursprünglich eingesetzt wurde. Final wurden die unmarkierten Motordomänen mit 50% H₂O, 50% Methanol, 0,1% FA um den Faktor 3-4 verdünnt. Die ²H-¹³C-¹⁵N-markierten Proteine wurden mit 3 Vol. 50% D₂O, 50% deuteriertem Acetonitril, 0,1% deuteriertem TFA versetzt.

Es erfolgte eine Elektrospray-Ionisation (ESI), wobei mit einem TriVersa NanoMate® (Advion, Ithaca, NY, USA) injiziert wurde. Im verwendeten Massenspektrometer LTQ FT Ultra™ (Thermo Fischer Scientific) sind eine Ionenfalle (LTQ, *linear ion trap quadrupole*) und eine Fouriertransformations-Ionenzyklotron-Resonanzeinheit (FT-ICR, *fourier transform ion cyclotron resonance*) gekoppelt. Das Verhältnis von Masse zu Ladung (*m/z*) wurde im Bereich von 500-2000 *m/z* detektiert. Es wurde bei einer Auflösung von *R*=100.000 gemessen.

Aus dem Abstand von zwei aufeinanderfolgenden *m/z*-Verhältnissen wurde die Ladungszahl *n* bestimmt. Im verwendeten positiven Modus wurden Kationen detektiert, so dass zur Berechnung ein Proton subtrahiert wurde (*X*=1). Aus den Angaben zu *m/z*-Verhältnis und Ladung wurde für mindestens 15 Werte das Proteinmolekulargewicht *MW* (in Da) bestimmt und gemittelt.

$$(m/z)_2 > (m/z)_1 \rightarrow n_1 = \frac{(m/z)_2 - X}{(m/z)_2 - (m/z)_1} ; \quad MW = n \cdot [(m/z) - X]$$

Ein Vergleich der theoretischen und ermittelten Masseunterschiede zwischen Motordomänen mit natürlicher Isotopenverteilung und ²H-¹³C-¹⁵N-isotopenmarkierten Proteinen wurde zur Berechnung des erzielten Markierungsgrades herangezogen.

2.5. Protein- und Komplexpräparationen

2.5.1. Reinigung deuterierter Motordomänen

Die Reinigung ²H-¹³C-¹⁵N-isotopenmarkierter Motordomänen erfolgte unter deuterierten Bedingungen mit 99,90% D₂O. Die Motordomänen wurden in Phosphatpuffer (50 mmol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8,0, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂) gereinigt. Stammlösungen (0,5 mol/L Na₂HPO₄, 1 mol/L NaH₂PO₄, 1 mol/L NaCl, 1 mol/L MgCl₂, 1 mol/L Imidazol) wurden aus den wasserfreien Komponenten hergestellt und die benötigten Puffervolumina

direkt vor dem Gebrauch angesetzt. Der Gesamtverbrauch an D₂O belief sich auf etwa 500 mL D₂O pro Reinigung. Motordomänen mit natürlicher Isotopenverteilung, die nicht für Festkörper-MAS-NMR-Messungen verwendet wurden, wurden nach analogem Protokoll in H₂O gereinigt.

- **Zellaufschluss und Klärung**

Vor dem Zellaufschluss wurden die Bakterienzellen in Phosphatpuffer, versetzt mit 5 mmol/L Imidazol, 1,25 U/mL Benzonase® Endonuklease (Merck, Novagen®) und 1x konzentriertem, EDTA-freiem *Complete*[™] Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Basel, Schweiz) aufgenommen. Die Zellen wurden mit dem Homogenisator EmulsiFlex-C3 (Avestin, Ottawa, Kanada) durch mindestens zehn Passagen bei einem Druck von 1000 bar aufgeschlossen. Zur Klärung wurde für 30 min bei 4 °C und 58.000 g (22.000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Dieser Rohextrakt wurde einem ersten Chromatographieschritt unterzogen.

- **Erste immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie**

Durch die Expression in pET-Vektoren (Merck, Novagen®) verfügen die Motordomänen über einen N-terminalen (His)₆-Anhang. Dies ermöglicht eine Reinigung mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC). Das verwendete Säulenmaterial TALON[™] (BD Biosciences, Clontech, Franklin Lakes, NJ, USA) ist dabei mit Co²⁺-Ionen beladen, die mit dem Imidazolrest im Histidin Chelatkomplexe bilden. Durch Erhöhung der Imidazolkonzentration werden gebundene Proteine verdrängt und eluiert.

Vorbereitend wurde das Säulenmaterial (5 mL Bettvolumen) jeweils mit fünf Bettvolumina D₂O und 5 mmol/L Imidazol in Phosphatpuffer äquilibriert. Der Rohextrakt wurde 1 h bei 4 °C mit dem Säulenmaterial rotierend inkubiert. Anschließend wurde der Durchfluss aufgefangen und mit 20 Bettvolumina 5 mmol/L Imidazol in Phosphatpuffer gewaschen. Es wurde mit 150 mmol/L Imidazol in Phosphatpuffer eluiert, wobei insgesamt acht Bettvolumina in 2 mL Fraktionen gesammelt wurden. Das Säulenmaterial wurde nach Herstellerangaben regeneriert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und vereint.

- **Konzentrierung und Gelfiltration**

Für Konzentrierungen wurden Amicon® Ultra Zentrifugalfilter (Merck, Millipore) mit einer Ausschlussgröße von 10.000 Da verwendet. Es wurde bei 8 °C und 4.000 g zentrifugiert und das Volumen auf 2 mL eingengt. Der Zentrifugalfilter wurde anschließend mit 500 µL Phosphatpuffer gespült. Die konzentrierte Proteinlösung mit einem Gesamtvolumen von 2,5 mL wurde durch Gelfiltration vom Imidazol befreit. Eine PD10-Entsalzungssäule (GE Healthcare, 8,3 mL Bettvolumen) wurde mit 30 mL Phosphatpuffer äquilibriert. Die

Proteinlösung wurde aufgetragen und der Durchfluss aufgefangen. Das Zielprotein wurde in neun Fraktionen à 500 µL eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und vereint.

- **Spaltung N-terminaler Fusionssequenzen**

Mittels TEV-Protease wurden N-terminale (His)₆-Anhänge geschnitten. Die ebenfalls (His)₆-gekoppelte Protease kann rekombinant in BL21(DE3)pLysS hergestellt und mittels IMAC gereinigt werden. Pro 15 mg Fusionsprotein wurde 1 mL TEV-Protease zugesetzt. Mit Phosphatpuffer wurde ein Gesamtvolumen von 20 mL eingestellt. Zudem wurde 1 mmol/L 2-Mercaptoethanol zugesetzt, welches für die Aktivität der TEV-Protease essentiell ist. Die Spaltung erfolgte mindestens 16 h bei 20 °C. Der Erfolg der Spaltung wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die Spaltung wurde durch den Zusatz von 2,5x konzentriertem, EDTA-freiem *Complete*[™] Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche) gestoppt.

- **Zweite IMAC und abschließende Konzentrierung**

Das Zielprotein wurde mit einer zweiten IMAC vom gespaltenen (His)₆-Anhang und der (His)₆-gekoppelten TEV-Protease getrennt. 5 mL TALON[™] Säulenmaterial (BD Biosciences) wurde jeweils mit fünf Bettvolumina D₂O und Phosphatpuffer äquilibriert. Der Spaltungsansatz wurde 1 h bei 4 °C mit dem Säulenmaterial rotierend inkubiert. Anschließend wurde der Durchfluss aufgefangen und mit Phosphatpuffer gewaschen. Es wurden 20 Bettvolumina in 10 ml Fraktionen gesammelt. Mit acht Bettvolumina 150 mmol/L Imidazol in Phosphatpuffer wurde in 5 mL Fraktionen eluiert. Das Säulenmaterial wurde nach Herstellerangaben regeneriert. Das Zielprotein im Durchfluss und in den Waschfraktionen wurde mittels SDS-PAGE identifiziert und die proteinhaltigen Fraktionen vereint. Es wurde bei 8 °C und 4.000 g mit Amicon® Ultra Zentrifugalfiltern (Merck, Millipore) mit einer Ausschlussgröße von 10.000 Da auf ein Volumen von 2 mL konzentriert. Um den Protonengehalt in der finalen Proteinlösung zu minimieren, wurde mindestens fünfmal 6 Vol. frischer Phosphatpuffer zugesetzt und erneut konzentriert. Die Proteinlösung wurde abschließend auf die gewünschte Proteinkonzentration eingeeengt, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

2.5.2. Tubulinextraktion aus natürlichen Quellen

Die ertragreichste Quelle für Tubulinpräparationen ist Hirngewebe. Frisches Schweinehirn wurde von der Firma VION Lausitz GmbH (Kasel-Golzig) bezogen, in eiskaltem PBS (10 mmol/L Na₂HPO₄, 1,8 mmol/L KH₂PO₄, 137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, pH 7,4) transportiert und spätestens 2 h nach der Schlachtung verarbeitet. Alle Arbeiten zur Gewinnung von Tubulin wurden im Kühlraum sowie mit gekühlten Puffern und Equipment durchgeführt. Die Polymerisationsschritte erfolgten in einem Wasserbad bei 37

°C. Die Reinigung erfolgte in PEM-Puffer (100 mmol/L Pipes pH 6,9, 2 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L DTT) unter Zusatz der angegebenen Konzentrationen an Glycerin, 2-Mercaptoethanol und Protease-Inhibitoren (25 mg/mL PMSF, 15 mg/mL Benzamidin, 10 mg/mL Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, 1 mg/mL Aprotinin).

- **Reinigung durch Polymerisationszyklen**

Tubulin wurde durch wiederholte Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation gereinigt (Williams und Lee, 1982). Zunächst wurden Meningen und geronnenes Blut mit einer Pinzette entfernt. Das Hirngewebe wurde gewogen, mit 1 Vol. (w/v) PEM-Puffer (inkl. 4 mol/L = 33% Glycerin, 0,2% 2-Mercaptoethanol, 0,1% Protease-Inhibitoren) versetzt und mit einem handelsüblichen Stabmixer auf Eis homogenisiert. Zur Klärung wurde zunächst 30 min mit 18.500 g bei 4 °C zentrifugiert, gefolgt von einer Ultrazentrifugation für 30 min bei 4 °C und 100.000 g. Der Überstand wurde dekantiert. Zur Polymerisation wurde 0,5 mmol/L GTP und 1,5 mmol/L ATP zugesetzt und 45 min im 37 °C Wasserbad inkubiert. Durch Ultrazentrifugation für 45 min bei 35 °C und 100.000 g wurden die polymerisierten Mikrotubuli sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 1/4 Vol. PEM-Puffer (inkl. 0,1% 2-Mercaptoethanol, 0,1% Protease-Inhibitoren) homogenisiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde für 45 min bei 4 °C und 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und mit 1 Vol. (v/v) PEM-Puffer (inkl. 8 mol/L = 66% Glycerin, 0,3% 2-Mercaptoethanol, 0,1% Protease-Inhibitoren) versetzt. Zur Polymerisation wurde erneut 0,5 mmol/L GTP und 1,5 mmol/L ATP zugefügt und 45 min bei 37 °C inkubiert. Mikrotubuli wurden durch Ultrazentrifugation für 45 min bei 35 °C und 100.000 g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und für die Weiterverarbeitung am Folgetag bei -80 °C gelagert.

- **Entfernung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen**

Die Sedimente wurden in PEM-Puffer entsprechend 1/10 Vol. des Überstandes nach der ersten Ultrazentrifugation aufgenommen und auf Eis homogenisiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde für 45 min bei 4 °C und 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und in einem letzten Polymerisationszyklus durch Inkubation mit hochmolarem hPEM-Puffer von Mikrotubuli-assoziierte Proteinen (MAPs) befreit (Castoldi und Popov, 2003). Der Zusatz von 2,6 Vol. (v/v) hPEM-Puffer (1 mol/L Pipes pH 6,9, 2 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L DTT, 0,4% 2-Mercaptoethanol) und 1,8 Vol. (v/v) Glycerin ergab Endkonzentrationen von 0,5 mol/L Pipes und 4 mol/L (33%) Glycerin. Mit 0,5 mmol/L GTP und 1,5 mmol/L ATP wurde die Polymerisation initiiert und 45 min bei 37 °C inkubiert. Durch Ultrazentrifugation für 45 min bei 35 °C und 100.000 g wurden die Mikrotubuli sedimentiert. Sie wurden in PEM-Puffer entsprechend 1/4 Vol. des Überstandes der vorherigen Ultrazentrifugation aufgenommen und auf Eis homogenisiert. Nach 30 min

Inkubation auf Eis wurde abschließend für 45 min bei 4 °C und 100.000 g zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mit einem Extinktionskoeffizienten von 115.000 L·mol⁻¹·cm⁻¹ und einem Molekulargewicht von 110 kDa für das αβ-Tubulindimer bestimmt. Die hochkonzentrierte Proteinlösung wurde aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Das bei -80 °C gelagerte Tubulin war mindestens ein Jahr assemblierfähig.

2.5.3. Komplexpräparation

Für die Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie wurden Komplexe aus Mikrotubuli mit natürlicher Isotopenverteilung und ²H-¹³C-¹⁵N-isotopenmarkierten Kinesin-Motordomänen unter vollständig deuterierten Bedingungen hergestellt. Stammlösungen (1 mol/L Pipes pH 6,9, 1 mol/L EGTA pH 8,0, 1 mol/L DTT, 1 mol/L MgSO₄, 1 mol/L NaN₃) wurden aus den wasserfreien Komponenten mit 99,90% D₂O hergestellt. Die pH-Werte wurden mit 40% NaOD eingestellt. Die Präparation erfolgte in deuteriertem PEM-Puffer (100 mmol/L Pipes pH 6,9, 2 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L DTT in 99,90% D₂O) inkl. 3 mmol/L NaN₃, um mikrobieller Kontamination vorzubeugen. Außerdem wurden Stammlösungen von 100 mmol/L GTP, 100 mmol/L Adenosin-5'-[(β,γ)-methylentriphosphat (AMPPCP), 500 mmol/L EDTA (pH 8,0) in 99,90% D₂O sowie 2 mmol/L Paclitaxel in DMSO vorbereitet. Pro NMR-Probe wurden 20 mg Tubulin (190 nmol bei 110 kDa) und die doppelte molare Menge ²H-¹³C-¹⁵N-isotopenmarkierter Motordomäne (380 nmol bei 44 kDa, etwa 14 mg) eingesetzt.

- **Polymerisation der Mikrotubuli**

Tubulin wurde auf eine Konzentration von 19 µmol/L (entspricht 2 mg/mL) mit deuteriertem PEM-Puffer eingestellt. Es wurden 1 mmol/L GTP und 20 µmol/L Paclitaxel zugesetzt und bei 37 °C im Wasserbad für 30 min polymerisiert. Die Mikrotubuli wurden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 25 °C für 45 min sedimentiert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde im gleichen Volumen deuterierten PEM-Puffers aufgenommen. Es erfolgte eine zweite Inkubation für 30 min bei 37 °C, erneut unter Zusatz von 1 mmol/L GTP und 20 µmol/L Paclitaxel. Die Mikrotubuli wurden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 25 °C für 45 min sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert.

- **Komplexbildung**

Die ²H-¹³C-¹⁵N-markierten Motordomänen wurden mit deuteriertem PEM-Puffers auf eine Konzentration von 38 µmol/L verdünnt. Außerdem wurden 1 mmol/L GTP, 20 µmol/L Paclitaxel und 1 mmol/L AMPPCP bzw. 10 mmol/L EDTA zugesetzt. Das Mikrotubuli-Sediment wurde in diesem Ansatz aufgenommen. Zur Komplexbildung wurde 15 min bei RT rotierend inkubiert. Der Komplex wurde durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 25 °C für 45 min geerntet. Der Überstand wurde dekantiert. Das Sediment wurde in einem

kleinen Volumen des Überstandes aufgenommen und in zur Ultrazentrifugation geeignete 1,5 ml Reaktionsgefäße (Beckman Coulter) überführt. Es folgten mindestens drei Ultrazentrifugationen à 30 min bei 100.000 g und 25 °C. Zwischen den einzelnen Zentrifugationen wurde der Überstand abgenommen. Mit einer abschließenden Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 25 °C für 16 h wurde dem Sediment Restfeuchte entzogen. Der Erfolg der Komplexpräparation wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert.

- **Visualisierung durch Elektronenmikroskopie**

Im Anschluss an die Festkörper-MAS-NMR-Messungen wurde der Komplex aus Mikrotubuli und KIF5C-Motordomäne mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Eine Probe des Komplexansatzes wurde in PEM-Puffer aufgenommen und je 4,5 µL auf Gitternetzchen mit 400 Maschen und Kohle-Trägerfilm (PLANO, Wetzlar) aufgetragen. Nach 30 sec Inkubation wurde dreimal mit H₂O gewaschen. Überschüssige Flüssigkeiten wurden mit Filterpapier abgezogen. Zur Negativkontrastierung wurden die Gitternetzchen zweimal mit 4,5 µL 2% Uranylacetat behandelt und getrocknet.

Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen erfolgten an einem EM 902A (Carl Zeiss, Jena) mit einer maximalen Beschleunigungsspannung von 80 kV. Die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden von Dr. Dorothea Lorenz und Martina Ringling durchgeführt.

2.6. NMR-Spektroskopie

2.6.1. Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie

MAS-NMR-Experimente wurden an Bruker AVANCE™ 900, 700 und 600 MHz Spektrometern (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) durchgeführt. Die angegebenen Protonenfrequenzen entsprechen in gleicher Reihenfolge Magnetfeldstärken von 21,1, 16,4 und 14,1 Tesla. Es wurden 3,2 mm oder 4 mm Dreifachresonanz-MAS-Probenköpfe genutzt. Bei einer Temperatur von 285 K wurden MAS-Rotationsfrequenzen von 12.000 Hz bzw. 10.000 Hz verwendet. Die Messungen wurden von Dr. Barth-Jan van Rossum und Stefan Markovic durchgeführt.

Für DNP-MAS-NMR-Versuche wurde ein Bruker AVANCE™ 400 MHz Spektrometer mit 9,7 Tesla Gyrotronmagnet und 3,2 mm Dreifachresonanz-MAS-Probenkopf für Tieftemperaturmessungen genutzt. Es wurden eine Temperatur von 95 K und eine MAS-Rotationsfrequenz von 8.889 Hz verwendet. Die Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. W. Trent Franks, Stefan Markovic und Arne Linden.

• **Probenvorbereitung**

Die mittels Ultrazentrifugation sedimentierten Proteinkomplexe wurden in Zirkoniumdioxid-MAS-Rotoren (Bruker Corporation) mit Durchmessern von 3,2 mm bzw. 4 mm gefüllt. Letztere wurden mit Platzhaltern verwendet, um die Probe zentral zu fixieren. Vor und nach den Messungen wurden die befüllten Rotoren bei RT gelagert.

DNP-MAS-Messungen wurden an einer zuvor bereits mit konventioneller Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie gemessenen Probe durchgeführt. In Vorbereitung auf die DNP-MAS-Messungen wurde die Probe aus einem 4 mm Zirkoniumdioxid-MAS-Rotor extrahiert. Das Proteinmaterial wurde mit einem Skalpell zerkleinert. Dieses wurde mit 20 mmol/L TOTAPOL™ (*Abbildung 2.1*) in 99,90% D₂O / D₈-Glycerin (3:10 Vol.-%) versetzt. Da es sich bei TOTAPOL™ um ein Diradikal handelt, ergab sich eine Endkonzentration von 40 mmol/L freier Elektronen. Das vollständig deuterierte Glycerin diente als Gefrierschutz. Die hyaline, gelartige Dispersion wurde in zwei 3,2 mm Zirkoniumdioxid-MAS-Rotoren überführt und mit einem Dichtungsring als Platzhalter versehen. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

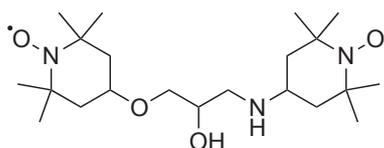


Abbildung 2.1: Darstellung des Diradikals TOTAPOL™. Die Synthese erfolgte nach Vorschrift durch Dr. Edgar Specker (Song *et al.*, 2006).

Tabelle 2.5 fasst die verwendeten Proben hinsichtlich der genutzten Spektrometer und Rotoren zusammen. Zudem sind Informationen zur Rotationsfrequenz und Temperatur vermerkt.

Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Festkörper-MAS-NMR-Proben sortiert nach den Charakteristika der an Mikrotubuli-gebundenen Motordomäne. *Es wurden zwei Kontrollproben betrachtet. *An Probe 4c wurden DNP-MAS-Messungen durchgeführt. (n.H.: natürliche Häufigkeit)

Probe: Mikrotubuli (n.H.) + (Motordomäne / Isotopen- markierung / Nukleotid)	Spektrometer (¹ H-Frequenz)	MAS-Rotations- frequenz	Rotor (∅)	Temp.
1* keine Motordomäne	900 MHz	12.000 Hz	3,2 mm	285 K
2* KIF5C / n.H. / AMPPCP	700 MHz	10.000 Hz	3,2 mm	285 K
3 KIF5C / ² H- ¹³ C- ¹⁵ N / AMPPCP	900 MHz	12.000 Hz	3,2 mm	285 K
4a Kar3 / ² H- ¹³ C- ¹⁵ N / AMPPCP	900 MHz	12.000 Hz	4 mm	285 K
4b Kar3 / ² H- ¹³ C- ¹⁵ N / AMPPCP	600 MHz	10.000 Hz	4 mm	285 K
4c* Kar3 / ² H- ¹³ C- ¹⁵ N / AMPPCP	400 MHz	8.889 Hz	3,2 mm	95 K
5 Kar3 / ² H- ¹³ C- ¹⁵ N / NT-frei	900 MHz	12.000 Hz	3,2 mm	285 K

- **Konventionelle MAS-NMR-Spektroskopie**

Mittels klassischer MAS-NMR-Spektroskopie wurden verschiedene homo- und heteronukleare 2D-Experimente an unterschiedlichen Komplexproben durchgeführt. Als heteronukleare Korrelationen (HETCOR) wurden Messungen mit einfachem Polarisationstransfer von Protonen bzw. Deuteronen auf ^{13}C -Kohlenstoff ausgeführt. Für ^1H - ^{13}C -Korrelationen wurde mittels FSLG (*frequency-switched Lee Goldberg*) während der Protonenevolution entkoppelt (Rossum *et al.*, 1997). Die ^2H - ^{13}C -Korrelation erfolgte mit WALTZ-16 Entkopplung (Shaka *et al.*, 1983).

Homonukleare ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen umfassten Experimente mit Kreuzpolarisation (CP, *cross polarization*) oder direkter ^{13}C -Anregung (DX, *direct excitation*). Im PDS (*proton driven spin diffusion*) wurde mittels CP die Magnetisierung von Protonen auf ^{13}C -Kohlenstoff übertragen. Es wurde mit einer DARR-Sequenz (*dipolar-assisted rotational resonance*) gemischt (Szeverenyi *et al.*, 1982; Takegoshi *et al.*, 2001). Mittels RFDR (*radio-frequency driven recoupling*) wurden ^{13}C - ^{13}C -dipolare Kopplungen detektiert, indem die Magnetisierung von Protonen auf ^{13}C -Kohlenstoff transferiert und über eine RFDR-Mischsequenz longitudinal auf umliegende ^{13}C -Kohlenstoffatome geleitet wurde (Bennett *et al.*, 1992). Auch für die direkte ^{13}C -Anregung wurde eine RFDR-Mischsequenz verwendet (als DX-RFDR bezeichnet). Unter Berücksichtigung der langen Relaxationszeit des ^{13}C -Kohlenstoffs wurde eine Wartezeit von 25 s zwischen den Experimenten angesetzt.

TEDOR (*transferred-echo double-resonance*) wurde für ^{15}N - ^{13}C -Korrelationen verwendet (Hing *et al.*, 1992). Dabei wurde zunächst ^{13}C -Kohlenstoff durch Kreuzpolarisation von Protonen angeregt. Die ^{13}C -Magnetisierung wurde auf ^{15}N -Stickstoff übertragen, wobei mit einer REDOR-Pulssequenz (*rotational-echo double-resonance*) gemischt wurde (Gullion und Schaefer, 1989). Anschließend wurde sie zurück auf ^{13}C -Kohlenstoff transferiert.

- **DNP-MAS-NMR-Spektroskopie**

Für Kar3-Motordomänen-dekorierte Mikrotubuli wurden zudem 2D und 3D Korrelationen mittels DNP erfasst. Homonukleare ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen beinhalteten RFDR und PDS. Zusätzlich wurde eine Post-C7-Pulssequenz zur dipolaren Wiedereinkopplung genutzt (Hohwy *et al.*, 1998). Dabei wurden zwei Spins durch homonukleare Doppelquanten-Koherenz gekoppelt. Als heteronukleare ^{15}N - ^{13}C -Korrelation wurde TEDOR verwendet.

2D und 3D Tripleresonanzexperimente umfassten NCACX- und NCOCX-Pulssequenzen (Baldus *et al.*, 1998; Pauli *et al.*, 2001). Eine erste Kreuzpolarisation wurde von Protonen auf ^{15}N -Stickstoff ausgeführt. Ausgehend vom ^{15}N -Stickstoff erfolgte eine selektive Kreuzpolarisation auf C_α -Kohlenstoff (CA) bzw. Carbonyl-Kohlenstoff (CO). Durch eine RFDR-Mischschritt wurde der anschließende homonukleare ^{13}C - ^{13}C -Transfer erzeugt, wobei CX für ein beliebiges Kohlenstoffatom steht.

In *Tabelle 2.6* sind die durchgeführten Experimente inklusive der Parameter zur Kreuzpolarisation, Mischzeit und Transientenzahl jeweils im Zusammenhang mit der zugehörigen Komplexprobe dargestellt.

Tabelle 2.6: Übersicht der in Kapitel 4 (Seiten 69-95) diskutierten Festkörper-MAS-NMR-Experimente sortiert nach der Art der Korrelation. Die verwendeten Parameter zur Kreuzpolarisation (CP, *cross polarization*), Mischzeit (t_{mix} , *mixing time*) und Anzahl an Transienten (ns , *number of scans*) sind angegeben. *Es wurden zwei Kontrollproben betrachtet. *Die an Probe 4c durchgeführten Experimente erfolgten unter DNP-Bedingungen. (n.H.: natürliche Häufigkeit)

Korre- lation	Experiment	Probe: Mikrotubuli (n.H.) + (Motordomäne / Isotopen- markierung / Nukleotid)	CP	t_{mix}	ns
HETCOR	^1H - ^{13}C (FSLG)	1* keine Motordomäne	2 ms	-	448
		2* KIF5C / n.H. / AMPPCP	2 ms	-	288
		3 KIF5C / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	2 ms	-	384
	^2H - ^{13}C (DC-CP)	4b Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	2 ms	-	2048
2D ^{13}C - ^{13}C	CP-PDSD	2* KIF5C / n.H. / AMPPCP	3 ms	15 ms	256
		4c* Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	2 ms	11,25 ms	16
	CP-RFDR	1* keine Motordomäne	3 ms	4 ms	384
		3 KIF5C / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	3 ms	4 ms	384
		4a Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	3 ms	4 ms	384
		4c* Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	2 ms	1,8 ms	16
		4c* Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	2 ms	7,2 ms	72
		5 Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / NT-frei	3 ms	4 ms	512
	DX-RFDR	4a Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	-	4 ms	32
	Post-C7	4c* Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	3 ms	1 ms (C7)	128
2D ^{15}N - ^{13}C	TEDOR	4c* Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	1,5 ms	0,9 ms	512
		5 Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / NT-frei	3 ms	4 ms	6144
	N(CA)CX	4c* Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	1 ms, 4 ms (HN, NCA)	3,6 ms	256
	N(CO)CX	4c* Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	1 ms, 3 ms (HN, NCO)	3,6 ms	256
3D ^{15}N - ^{13}C - ^{13}C	NCACX	4c* Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	1 ms, 4 ms (HN, NCA)	1,8 ms	224
		4c* Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	1 ms, 4 ms (HN, NCA)	3,6 ms	144
	NCOCX	4c* Kar3 / ^2H - ^{13}C - ^{15}N / AMPPCP	1 ms, 4 ms (HN, NCO)	2,7 ms	288

2.6.2. Lösungs-NMR-Spektroskopie

Ein Bruker AVANCE™ 600 MHz Spektrometer (Magnetfeldstärke: 14,1 Tesla) wurde für Lösungs-NMR-Experimente verwendet. Es wurden 5 mm NMR-Röhrchen (NORELL®,

Landisville, NJ, USA) mit je 550-600 μL Probe befüllt und i.d.R. mit einem TXI-Dreifachresonanz-Kryoprobenkopf bei 293 K gemessen. Die NMR-Messungen wurden von Dr. Peter Schmieder und Monika Beerbaum begleitet. Mittels Titration und Sättigungstransfer-Differenz-Experimenten wurde überprüft, ob das Puffermolekül Pipes an Kinesin-Motordomänen bindet. Außerdem erfolgte die ^{19}F -Detektion eines fluorierten Colchicinoids mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie.

- **Titration an ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter KIF5C-Motordomäne**

Titrationsexperimente wurden mittels 2D ^{15}N - ^1H -TROSY (*transverse relaxation-optimized spectroscopy*) durchgeführt (Pervushin *et al.*, 1997). Im Vorfeld wurde die ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierte KIF5C-Motordomäne in 90% H_2O / 10% D_2O Phosphatpuffer (50 mmol/L Natriumphosphat pH 6,8, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl_2) auf eine Endkonzentration von 290 $\mu\text{mol/L}$ eingengt. Pipes pH 6,8 wurde in sechs Konzentrationsstufen (Endk. 0, 0,3, 3, 20, 50 und 100 mmol/L) titriert.

- **Sättigungstransfer-Differenz NMR-Spektroskopie**

Außerdem wurden Sättigungstransfer-Differenz-Experimente (STD, *saturation transfer difference*) durchgeführt (Mayer und Meyer, 1999; Mayer und Meyer, 2001). 5 mmol/L Pipes pH 6,8 wurden in deuteriertem Phosphatpuffer pH 6,8 (50 mmol/L Natriumphosphat pH 6,8, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl_2) in Abwesenheit und Gegenwart von 50 $\mu\text{mol/L}$ KIF5C- bzw. Kar3-Motordomäne mit natürlicher Isotopenverteilung untersucht. Um Proteinsignale zu unterdrücken, wurden Einstrahlfrequenzen von -1000 Hz bzw. -3500 Hz verwendet. Es wurde ein T_1 -Filter genutzt und das Wassersignal mittels *WATERGATE* unterbunden. Zur direkten Vergleichbarkeit wurde pro Experiment über 256 Messungen gemittelt.

- **^{19}F -NMR-Spektroskopie**

Ein HF-Dualprobenkopf zur ^{19}F -Detektion wurde für 1D ^{19}F -Experimente bei 300 K genutzt. Ein fluoriertes Colchicinoid (Verbindung **A10**; siehe *Abbildung* 2.3, Kapitel 2.7.2., Seite 56) wurde zunächst in DMSO (Endk. 1 mmol/L) und PEM-Puffer pH 6,8 (Endk. 0,4 mmol/L) untersucht. An einem Ansatz aus 0,4 mmol/L **A10** und 0,2 mmol/L (20 mg/mL) Tubulin in PEM-Puffer pH 6,8 wurde eine mögliche Interaktion erprobt.

2.6.3. Datenanalyse

NMR-Spektren wurden mit dem Software-Programm Topspin 2.1 (Bruker) prozessiert. Die Spektren wurden einheitlich in der direkten Dimension nach Adamantan referenziert. Das jeweilige gyromagnetische Verhältnis wurde zur Referenzierung der indirekten Dimension genutzt. Dargestellte Spektren wurden mit Sparky 3.1 (T.D. Goddard und D.G. Kneller, Universität von Kalifornien, San Francisco, USA), Xwinplot (Bruker Corporation)

und CorelDRAW® 10 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario) erstellt. Für Zuordnungen von chemischen Verschiebungen wurde die BMRB-Statistik (*biological magnetic resonance data bank*, <http://www.bmrwisc.edu/>) herangezogen.

Die dargestellten Abbildungen von Proteinstrukturen wurden unter Verwendung der in der PDB und EMDB hinterlegten Dateien mit Chimera angefertigt (Pettersen *et al.*, 2004). Die Komplexstrukturen aus Mikrotubuli und den hier verwendeten Motordomänen wurden von Dr. Benjamin Bardiaux anhand vorhandener Kryo-EM-Daten modelliert.

2.7. Bindungsstudien und Wirkstoffanalysen

2.7.1. Isotherme Titrationskalorimetrie

Eine mögliche Bindung des Puffermoleküls Pipes an Kinesin-Motordomänen wurde mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Die KIF5C-Motordomäne wurde zum Angleichen des pH-Wertes zunächst gegen Phosphatpuffer (50 mmol/L Natriumphosphat pH 6,8, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂) dialysiert. Im Anschluss wurde mit Amicon® Ultra Zentrifugalfiltern (Merck, Millipore) mit einer Ausschlussgröße von 10.000 Da eine Endkonzentration von 200 µmol/L eingestellt. Eine 1 mol/L Stammlösung an Pipes (pH 6,8) wurde mit Phosphatpuffer (pH 6,8) auf eine Endkonzentration von 2 mmol/L verdünnt. Es wurde das Mikrokalorimeter ITC₂₀₀[™] (GE Healthcare, MicroCal®, Northampton, MA, USA) genutzt. 300 µL Proteinlösung (200 µmol/L KIF5C-Motordomäne) wurde in der Probenzelle vorgelegt. Eine Injektionsspritze wurde mit 40 µL Injektionslösung (2 mmol/L Pipes, pH 6,8) befüllt. Die rotierbare Spritze wurde mit 1.000 rpm gedreht. Pro Injektion wurden 2 µL zugesetzt und ein Zeitfenster von 180-240 s für den Temperatenausgleich verwendet. Ein Verdünnungsexperiment diente als Kontrolle jeglicher Effekte, die Pipes verursachen könnte. Dazu wurde in der Probenzelle Phosphatpuffer (pH 6,8) vorgelegt und die Injektionsspritze mit 2 mmol/L Pipes (pH 6,8) befüllt.

Die Datenauswertung erfolgte mittels der Software Origin® 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) mit eingebundenem Zusatzprogramm zur ITC-Analyse. Dabei wurde die gemessene Heizleistung (in µcal/sec) zeitabhängig integriert. Die Wärme wurde gegen das molare Verhältnis der Interaktionspartner aufgetragen. Nach Kurvenanpassung können Parameter zur Stöchiometrie, Bindungsaffinität und Reaktionsenthalpie bestimmt werden (Freyer und Lewis, 2008).

2.7.2. Sortiment an untersuchten Colchicinoiden

Wirkstoffanalysen wurden für ein Kooperationsprojekt mit Prof. Hans-Günther Schmalz (Universität Köln) durchgeführt. Dr. Norman Nicolaus und Dr. Stefanie Ritter synthetisierten während ihrer jeweiligen Promotion ein Sortiment an Colchicin-Derivate.

Ausgehend von einem Colchicin-Azid (**A1**) wurden Triazol-Derivate mittels Cu(I)-katalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition (Klick-Chemie) hergestellt (*Abbildung 2.2*; Nicolaus *et al.*, 2010). Mit dieser Reaktion wurde eine Serie an Verbindungen generiert, in der Vertreter diverser Naturstoffklassen über einen Triazolring mit dem Colchicin-Grundgerüst verknüpft wurden (*Abbildung 2.3*). Die variablen Konjugate umfassten Fettsäuren (Laurinsäure in **A2**) Aminosäuren (*t*-Butyloxycarbonyl (Boc)-geschütztes Serin in **A3** und Glycin in **A7**), Coumarin (**A4**), Salizylsäure (**A5**), Ferrocen (**A6**), Alkohole (Propanol in **A8**), Sulfonamide (**A9**), Fluorobenzen (**A10**), Nukleinsäuren (Uracil in **A11**), Triazol-Colchicin selbst (**A12**), Zucker (O-acetyliertes Glucopyranosid in **A13**) und Steroide (Estradiol-3-methylether in **A14**).

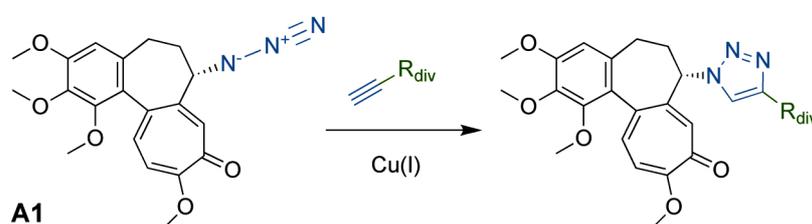


Abbildung 2.2: Darstellung zur Synthese von Triazol-haltigen Colchicinen aus dem Azidderivat des Colchicins (**A1**). Mittels Cu(I)-katalysierter Klick-Reaktion wurden diverse Reste (R_{div}) an Colchicin konjugiert.

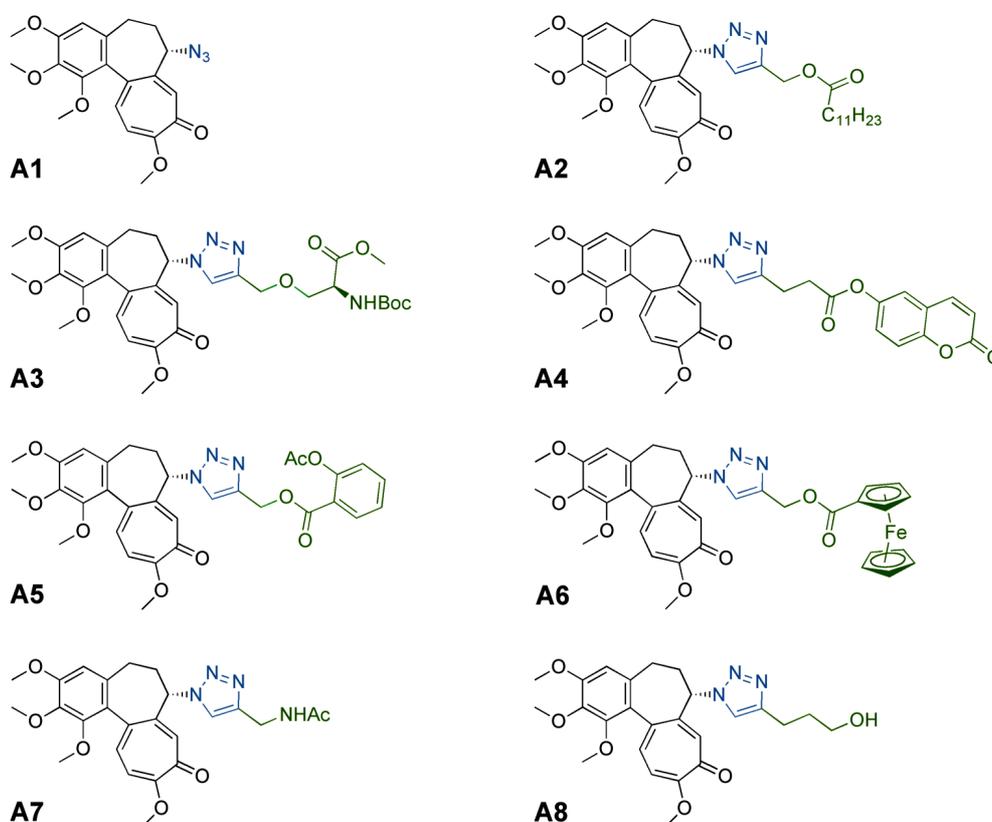
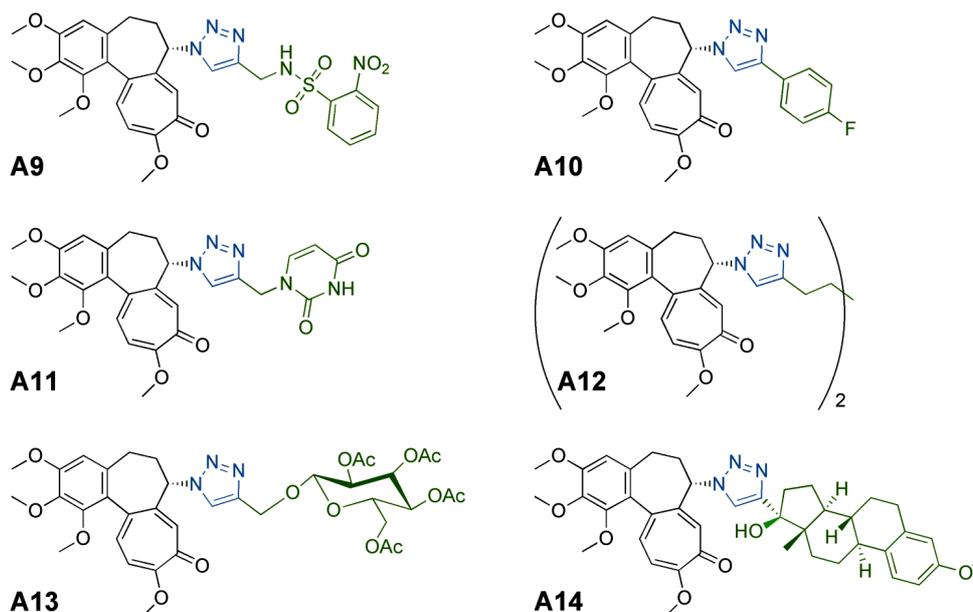


Abbildung 2.3: Colchicinoide, die mittels Klick-Chemie aus dem Azidderivat **A1** hergestellt wurden.



Fortsetzung Abbildung 2.3: Colchicinoide, die mittels Klick-Chemie aus dem Azidderivat **A1** hergestellt wurden.

Aus dem Azidderivat **A1** wurde das entsprechende Alcolchicin (**B1**) generiert. Aus **B1** wurden zwei weitere Alcolchicin-Analoga (Propanol-konjugiertes **B2** und Salizylsäuregekoppeltes **B3**; *Abbildung 2.4*) synthetisiert. Neben den Triazol-haltigen Colchicinoiden wurden weitere Substanzklassen untersucht, von denen in dieser Arbeit exemplarisch zwei Derivate vorgestellt werden (*Abbildung 2.5*).

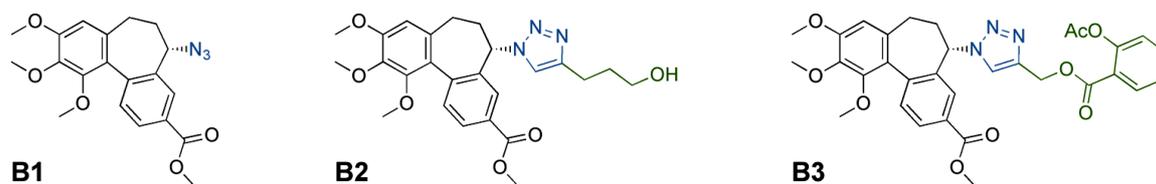


Abbildung 2.4: Erweiterung um Alcolchicin-Derivate, die anstelle des Tropolonrings einen Phenylring besitzen.

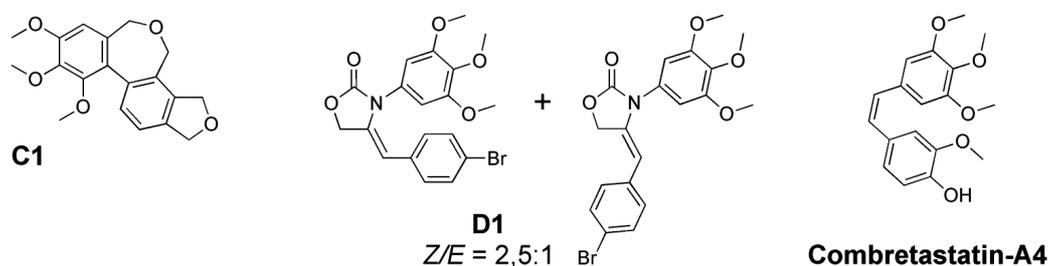


Abbildung 2.5: Darstellung weiterer Colchicin-Analoga: Oxa-Alcolchicinoid **C1** und zwei Konformationen des Oxazolidinone-Derivats **D1**, das in Z-Konfiguration Combretastatin-A4 ähnelt.

Im Oxa-Alcolchicin-Derivat (**C1**) wurde mit Tetrahydrofuran ein vierter Ring eingeführt. Das Oxazolidinon-Analogon (**D1**) hat mit Colchicin den Trimethoxybenzenring gemein. Der

Oxazolidinon-Ring erweitert eine Struktur, die an Combretastatin-A4, einem weiteren potenten Polymerisations-Inhibitor, erinnert. Für das bromhaltige **D1** wurde eine Z/E-Isomerisierung im Verhältnis 2,5:1 festgestellt. Sowohl das Racemat als auch die chromatographisch getrennten Diastereomere wurden untersucht.

Es wurden Stammlösungen der Substanzen von 25 mmol/L in DMSO angesetzt und bei -20 °C gelagert. Verdünnungen erfolgten im entsprechenden Puffer der einzelnen Versuche. Zur Analyse der Bindungseigenschaften wurden drei Experimente etabliert. Es wurde zunächst der Einfluss auf die Tubulin-Polymerisation untersucht. Die spezifische Bindung der Substanzen an die Colchicin-Bindestelle wurde mit einem Verdrängungsversuch analysiert. Zudem wurde der Effekt auf die Mikrotubuli-Morphologie in HeLa-Zervixkarzinom-Zellen ermittelt.

2.7.3. Analyse der *in vitro* Tubulin-Polymerisation

Die *in vitro* Tubulin-Polymerisation wurde mit einem Fluoreszenz-basierten Reagensatz (#BK011, Cytoskeleton, Denver, CO, USA) analysiert. Die Methode verwendet als Fluorophor 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), das in sich bildende Mikrotubuli eingebaut wird (Bonne *et al.*, 1985). Die Messung erfolgte in vorgewärmten Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (#3694, Corning Incorporated). Die zu testenden Substanzen wurden in zehnfacher Konzentration (Endk. 3, 10 und 40 µmol/L) à 5 µL vorgelegt und 1 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde je 100 µg Tubulin in 50 µL GPEM-Puffer (80 mmol/L Pipes pH 6,9, 0,5 mmol/L EGTA, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L GTP, 20% Glycerin, 6,6 µmol/L DAPI) zugesetzt. Die Fluoreszenzintensität wurde an einem Safire™ Mikroplatten-Lesegerät (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 37 °C verfolgt. Dabei wurde mit einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und bei 450 nm emittiert. Über einen Zeitraum von 1 h erfolgte eine Messung pro Minute. Es wurden mehrere Kontrollen mitgeführt, darunter 3 µmol/L Colchicin als Inhibitor, 3 µmol/L Paclitaxel als Stabilisator sowie die maximal eingesetzte DMSO-Konzentration von 0,16%.

2.7.4. Untersuchung der Bindungsspezifität

Ob die zu testenden Substanzen kompetitiv an die Colchicin-Bindestelle binden, wurde mit Hilfe eines Verdrängungsversuchs analysiert. Fluorescein-gekoppeltes Colchicin wurde von Dr. Norman Nicolaus synthetisiert (Clark und Garland, 1978). Ansätze mit variierender Substanzkonzentration (Endk. 0, 50 und 100 µmol/L) wurden parallel untersucht. Jeder Ansatz enthielt 5 µmol/L Fluorescein-gekoppeltes Colchicin und 100 µg Tubulin in 100 µL GPEM-Puffer (100 mmol/L Pipes pH 6,9, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L DTT, 0,1 mmol/L GTP). Die Proben wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden parallel Gelfiltrationen mit Sephadex® G-25 Medium (GE Healthcare, Amersham Biosciences) durchgeführt (Wilson *et al.* 1975). Die jeweils gesammelten 24 Fraktionen à

200 µL wurden auf die Anwesenheit von Fluoreszenz und Protein untersucht. Dies erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (#3615, Corning Incorporated), die am Safire™ Mikroplatten-Lesegerät (Tecan) vermessen wurden. Die Fluoreszenzintensität wurde durch Anregung bei 492 nm und Emission bei 514 nm gemessen. Der Proteinanteil wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm ermittelt. Die Fluoreszenzintensität der proteinhaltigen Fraktionen der parallelen Ansätze wurde in Relation zur Proteinkonzentration bestimmt. Zur Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität wurde die Fluoreszenzintensität der Kontrolle (0 µmol/L Substanz) auf 100% gesetzt.

2.7.5. Morphologie der Mikrotubuli in Tumorzellen

Die Wirkung der Substanzen auf die Mikrotubuli in HeLa-Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Vorbereitend wurden Zellkulturplatten mit 24 Kavitäten (TPP, Trasadingen, Schweiz) mit Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern bestückt. Je Deckglas wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen in je 1 mL GIBCO® *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Invitrogen) ausgesät und 24 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen weitere 24 h bei 37 °C mit den Substanzen (Endk. 100 nmol/L, 500 nmol/L und 1 µmol/L) inkubiert. Parallel wurden Colchicin, Paclitaxel und DMSO als Kontrollen mitgeführt.

Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung der Mikrotubuli wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und 15 min bei RT mit Fixierpuffer (100 mmol/L Natriumkakodylat, 100 mmol/L Saccharose, 10% Paraformaldehyd pH 7,4) auf den Deckgläsern immobilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min bei RT mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläser in Deckglasständer überführt. Um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen, wurde für 1 h bei 37 °C mit 0,1% Fischhautgelatine in PBS inkubiert. In einer feuchten Kammer wurden die Zellen mit dem Primärantikörper Maus-anti- α -Tubulin (Merck, Calbiochem), 1:200 verdünnt in PBS, inkubiert. Nach 45 min bei 37 °C wurde dreimal à 10 min im Deckglasständer mit PBS gewaschen. Als fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurden Cy5- oder Cy3-konjugierte Anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:300 verdünnt mit PBS, verwendet. Dies erfolgte erneut für 45 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Nach abschließendem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser auf Objektträger überführt und mit Shandon *Immu-Mount* (Thermo Fisher Scientific) eingebettet.

Die Zellmorphologie und die Mikrotubuli-Struktur wurden mittels konfokaler *Laser-Scanning* Mikroskopie (LSM) an einem LSM510-META (Carl Zeiss) analysiert. Es wurden Helium-Neon-Laser mit Anregungswellenlängen von 633 nm (für Cy5) oder 543 nm (für Cy3) verwendet. Als Objektiv wurde ein Plan-Neofluar 100x / 1,3 Öl genutzt. Die dargestellten Bilder wurden mit dem Software-Programm LSM Image Browser 3.5 (Carl Zeiss) erstellt.

Resultate und Diskussion

3. Protein- und Komplexpräparation

Die Herstellung ausreichender Mengen an isotoopenmarkiertem Protein ist Voraussetzung für NMR-spektroskopische Untersuchungen. Zwei Kinesin-Motordomänen wurden durch rekombinante Expression in *E. coli* produziert. Ziel war es, möglichst vollständig ^2H - ^{13}C - ^{15}N -isotoopenmarkierte Kinesin-Motordomänen zu erzeugen. Der Markierungsgrad der gereinigten Motordomänen wurde massenspektrometrisch untersucht. Zur Komplexpräparation wurde natives Tubulin genutzt, welches aus Schweinehirn extrahiert wurde. Durch Ultrazentrifugation wurden Motordomänen-gebundene Mikrotubuli sedimentiert, die mittels Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie untersucht wurden.

3.1. Präparation zweier Kinesin-Motordomänen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Motordomänen der Kinesine KIF5C und Kar3 betrachtet. *Tabelle 3.1* fasst die Eckdaten zu beiden Kinesinen zusammen.

Tabelle 3.1: Steckbriefe der Kinesine KIF5C und Kar3.
(CDS: Kodierungssequenz, AS: Aminosäuren, bp: Basenpaare)

		KIF5C	Kar3
Allgemeines	Bezeichnung	<i>Kinesin heavy chain isoform 5C</i>	benannt nach Funktion in Karyogamie
	Organismus	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Kinesin-Familie	Familie 1	Familie 14
Protein	Zugangsnummer	NP_001101200	NP_015467
	Länge	955 AS	729 AS
DNA (CDS)	Zugangsnummer	NM_001107730	NM_001184238
	Länge	2868 bp	2190 bp
Motordomäne	Lokalisation	N-terminal	C-terminal
	Protein	AS 1-354	AS 384-729
	DNA (CDS)	bp 1-1069	bp 1150-2190
	Kristallstrukturen (PDB)	2kin 3kin (+25 AS, C-terminal)	3kar 1f9t (+ 11 AS, N-terminal)

Als konventionelles Kinesin mit N-terminaler Motordomäne wurde KIF5C aus *Rattus norvegicus* (Wanderratte) gewählt. Das Kinesin Kar3 stammt aus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) und verfügt über eine C-terminale Motordomäne. Beide Kinesine unterscheiden sich aufgrund der Lage der Motordomäne in ihrer Laufrichtung. KIF5C bewegt sich zum Plusende, Kar3 ist am Minusende der Mikrotubuli lokalisiert.

3.1.1. Klonierung in expressionsstarke Vektoren

Da im letzten Jahrzehnt deutlich verbesserte Expressionsvektoren entwickelt wurden, erschien es sinnvoll, die zur Erzeugung der Kristallstrukturen verwendeten Vektoren zu ersetzen. Der Vektor pRK354 aus dem Mandelkow-Arbeitskreis (MPASMB, Hamburg) diente als Vorlage für die Klonierung der KIF5C-Motordomäne (Kozielski *et al.*, 1997b). Als Matrize der Kar3-Motordomäne wurde der von Dr. Sharyn Endow (Duke University, Durham, NC, USA) zur Verfügung gestellte Vektor pMW/Kar3 genutzt (Song und Endow, 1996). Die DNA-Sequenzen der Motordomänen wurden mit Hilfe von ligationsunabhängiger Klonierung (Merck, Novagen®) in die Vektoren pET30 Ek/LIC und pET46 Ek/LIC eingefügt. Dabei wurden mittels zweistufigen PCR je drei Konstrukte mit Erkennungssequenzen für diverse Proteasen erzeugt. Alle Vektoren besaßen ursprünglich die Erkennungssequenz für Enterokinase (Ek). Auf Proteinebene spaltet die Enterokinase nach der Sequenz DDDDK↓ (Sequenz im Einbuchstabencode). Angrenzend wurde in 3'-Richtung zusätzlich je eine Schnittstelle für TEV-Protease (TEV, ENLYFQ↓G) oder Thrombin (Tb, MLVPR↓GS) erzeugt. Die Bezeichnung der Vektoren wurde entsprechend der Schnittstellen gewählt: z.B. pET30 Ek/LIC, pET30 Ek/TEV und pET30 Ek/Tb. Der korrekte Einbau der DNA-Sequenzen der Motordomänen und zusätzlicher Schnittstellen wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Die Sequenzen entsprachen den geplanten Konstrukten.

3.1.2. Ermittlung optimaler Expressionsbedingungen

Die rekombinante Expression der Motordomänen in je sechs Vektorkonstrukten wurde zunächst analytisch unter variablen Bedingungen durchgeführt. Es wurden die Expressionswirte BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, Rosetta™ 2(DE3), Rosetta™ 2(DE3)pLysS und T7 Express parallel verglichen. Die Expression von je sechs Einzelkolonien erfolgte in LB-Vollmedium und wurde durch Zugabe von 1 mmol/L IPTG induziert. Dabei wurden zwei Kombinationen an Expressionstemperatur und -zeit geprüft: Expression für 4 h bei 37 °C und für maximal 18 h bei 25 °C.

Als Beispiel ist die Expression bei 25 °C in BL21 (DE3) für beide Motordomänen gezeigt (*Abbildung 3.1*). Die Fusionsproteine wurden unter Verwendung von pET30-Vektorkonstrukten stärker als in den Ursprungsvektoren pRK354 und pMW/Kar3 exprimiert. Von den untersuchten Stämmen wurde das beste Resultat in BL21(DE3) erzeugt. Eine

Expression bei 25 °C war der bei 37 °C vorzuziehen, da bei gleichem Expressionsprofil höhere optische Dichten erzielt wurden. Kaum bis keine Expression wurde in Stämmen mit dem Zusatzplasmid pLysS beobachtet, welche eine basale Expression des Zielproteins vor der Induktion verhindert. Die Einzelkolonien jedes Vektorkonstrukts zeigten vergleichbare Expressionsprofile. Diese Beobachtung wurde bei der Expression in M9-Minimalmedium reproduziert.

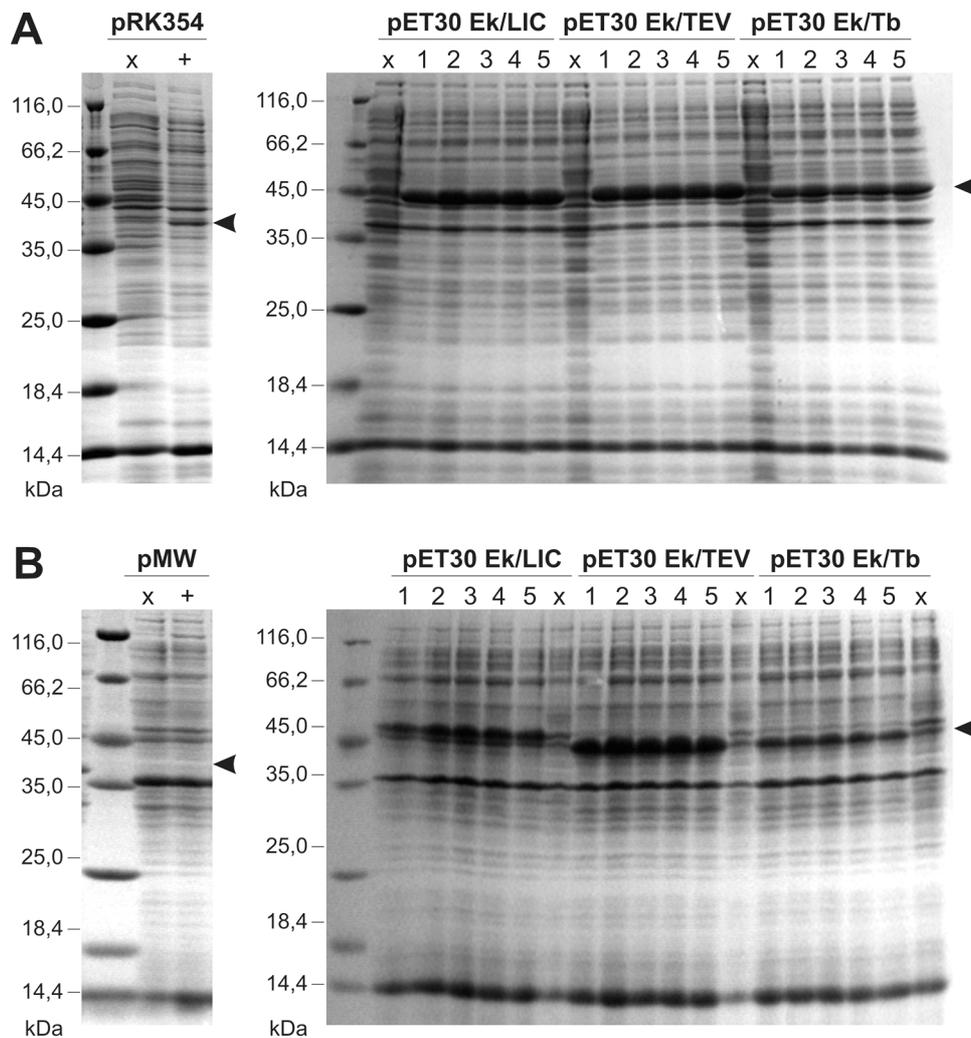


Abbildung 3.1: Beispiel zur Ermittlung optimaler Expressionsbedingungen, um die Kinesin-Motordomänen rekombinant in *E. coli* zu produzieren. Die Expression erfolgte in BL21(DE3) für maximal 18 h bei 25 °C. Mit x gekennzeichnete Spuren entsprachen Einzelkolonien, die nicht induziert wurden. Bei + und 1-5 markierten Spuren wurde die Proteinexpression mit 1 mmol/L IPTG induziert. Proben der Zellysate wurden mittels 15% SDS-PAGE analysiert. Auf Höhe des korrekten Molekulargewichts wurde das Zielprotein markiert (▶). A) Rekombinante Expression der KIF5C-Motordomäne. Vergleich des Expressionsprofils im Ursprungsvektor pRK354 und in pET30Ek/LIC, pET30Ek/TEV sowie pET30Ek/Tb. B) Rekombinante Expression der Kar3-Motordomäne. Es wurde keine Expression im Ursprungsvektor pMW/Kar3 nachgewiesen. Mit den Vektoren pET30Ek/LIC, pET30Ek/TEV und pET30Ek/Tb wurde die Motordomäne exprimiert.

Zur weiteren Optimierung mit dem Ziel der Isotopenmarkierung in M9/D₂O-Minimalmedium wurde sich auf die Expression beider Motordomänen in BL21(DE3)

fokussiert. Die Wahl des Vektorkonstrukts viel aus drei Gründen auf pET30 Ek/TEV. 1) Die Expressionsprofile beider Fusionsproteine zeigten eine hohe Überexpression des Zielproteins. 2) Aus finanzieller Sicht war das Schneiden mit TEV-Protease zu bevorzugen, da diese Protease leicht rekombinant hergestellt werden kann. 3) pET30-Vektoren kodieren eine Kanamycin-Resistenz, die von den Stämmen kaum spontan erworben wird. Während der Etablierung der Hochzell-dichtefermentation durch Sebastian Fiedler und Natalja Erdman hat sich gezeigt, dass Stämme, die auf Ampicillin bzw. Carbenicillin selektiert werden (z.B. mit pET46-Vektoren), in hoher Zelldichte leicht Resistenzen ausbilden. Der transformierte Vektor wird vermutlich abgestoßen und entsprechend das Zielprotein nicht exprimiert.

3.1.3. Hochzell-dichtefermentation zur rekombinanten Protein-expression ^2H - ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkierter Motordomänen

Die Hochzell-dichtefermentation (HZDF) stellte sich als geeignete Methode heraus, um die Kinesin-Motordomänen in M9/D₂O-Minimalmedium ^2H - ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkiert herzustellen. Im M9/D₂O-Minimalmedium waren deuterierte, ^{13}C -markierte Glukose und ^{15}N -markiertes Ammoniumchlorid die einzigen Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen. Um eine maximale Deuterierung der Motordomänen zu erreichen, musste der Eintrag von Protonen so gering wie möglich gehalten werden. Zu diesem Zweck wurde bereits die Vorkultur in M9/D₂O-Minimalmedium inkubiert. Dies hatte zusätzlich den Effekt, dass die Bakterienzellen bereits an das Wachstum unter deuterierten Bedingungen gewöhnt wurden.

Mittels HZDF wurde *E. coli* kontrolliert kultiviert (*Abbildung 3.2*). Aus dem Sauerstoffgehalt im Medium konnte auf die Stoffwechselaktivität von *E. coli* geschlossen werden. Mit Beginn der Fermentation wurde ein kontinuierlich sinkender Sauerstoffgehalt und eine exponentiell steigende, optische Dichte gemessen. Die Zellen waren ohne Verzögerungsphase in der Lage, die vorgelegten, isotopenmarkierten Nährstoffe umzusetzen. Waren diese verbraucht, stieg der Sauerstoffgehalt rapide an. Rechnergestützt wurde die Temperatur auf 25 °C gesenkt und konzentrierte, ^2H - ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkierte Nährstofflösung kontinuierlich zugeführt. Mit einer Flussrate von 2 ml/h wurden pro Stunde 1 g/L $^{13}\text{C}_6$ -D₁₂-Glukose und 250 mg/L ^{15}N -Ammoniumchlorid zugeführt. Nach 30 min wurde die Expression des Zielproteins durch Zugabe von 1 mmol/L IPTG induziert. Einer etwaigen Ansäuerung durch azide Stoffwechselprodukte wurde mittels pH-Wert-Kontrolle und Zugabe von Natriumdeuteroxid reguliert. Die Sauerstoffzufuhr wurde durch die Rührgeschwindigkeit und einer zuschaltbaren Belüftungseinheit angepasst.

Die Expression wurde mittels 15% SDS-PAGE überprüft und mit einer 4 ml Schüttelkultur verglichen, die zu Beginn der Fermentation abgezweigt und manuell induziert wurde (*Abbildung 3.2*). Der Expressionsgrad der Schüttelkultur und Fermentation waren

bezogen auf die selbe optische Dichte vergleichbar. In der Fermentation wurde eine mind. 4-fach höhere optische Dichte erzielt.

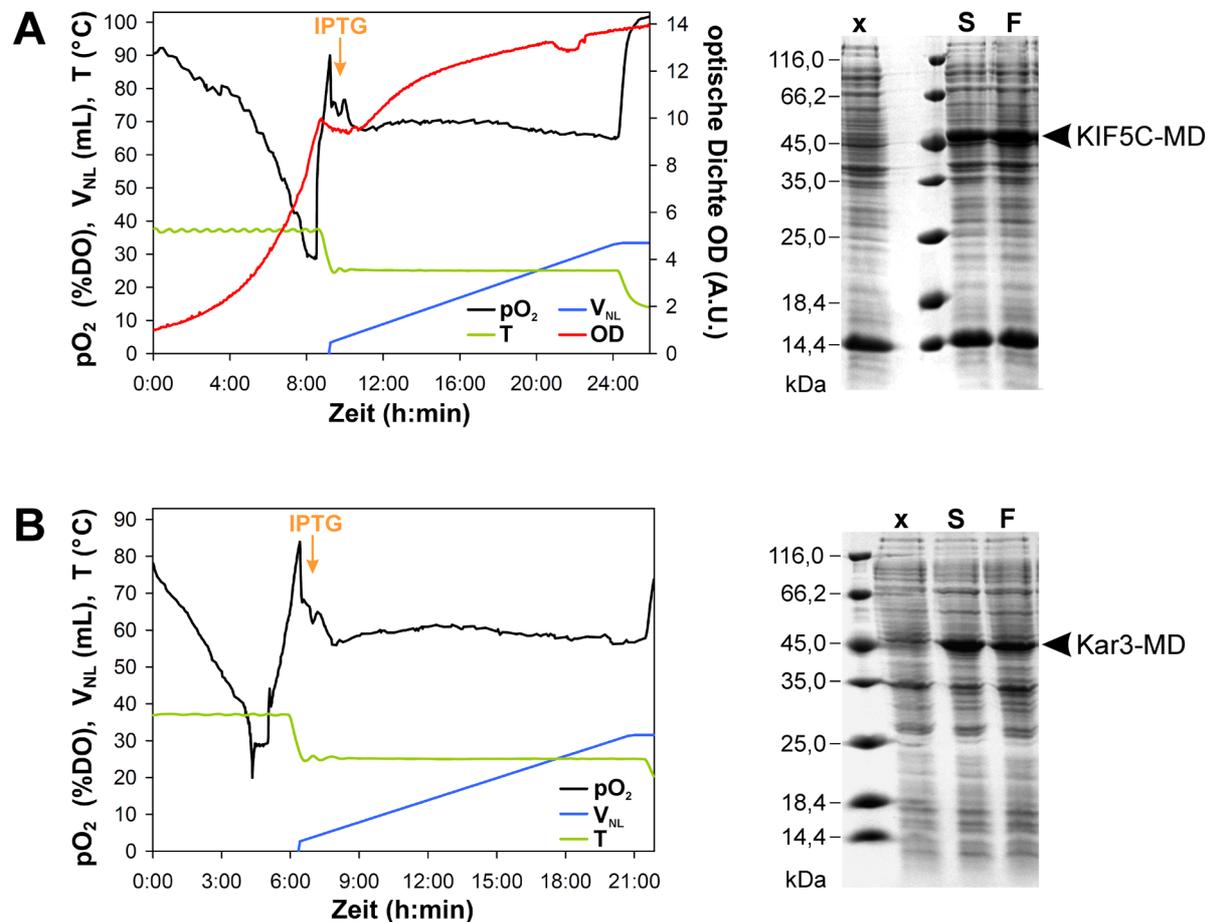


Abbildung 3.2: HZDF zur ²H-¹³C-¹⁵N-isotopenmarkierten Expression der A) KIF5C-Motordomäne und B) Kar3-Motordomäne in *E. coli* BL21(DE3). Unter kontrollierten Bedingungen wurde abhängig vom Sauerstoffpartialdruck (pO₂) die Temperatur (T), die Induktion mit IPTG und die Versorgung mit konzentrierter, isotopenmarkierter Nährstofflösung (V_{NL}) gesteuert. Bei der Expression der KIF5C-Motordomäne wurde zudem kontinuierlich die optische Dichte (OD) verfolgt. Mittels 15% SDS-PAGE wurde das Expressionsprofil ausgewertet. Einer vor der Induktion entnommenen Probe (x) wurden Proben der geernteten Zellen gegenübergestellt. Eine parallel angezogene 4 ml Schüttelkultur (S) wurde mit der Expression in der Fermentation (F) verglichen. Die Proben wurden normiert auf die gleiche optische Dichte aufgetragen.

Die Expressionen beider Motordomänen erzielten pro Liter Kultur ähnliche optische Dichten (OD) und Biofeuchtmassen (BFM). Bei der Expression der KIF5C-Motordomäne wurde 34 g BFM bei einer finalen OD von 14,0 gewonnen. Mit einer OD von 14,9 wurden für die Expression der Kar3-Motordomäne 35 g Zellen geerntet. Im Fall der KIF5C-Motordomäne wurde ein Vergleich zur ²H-¹³C-¹⁵N-isotopenmarkierten Expression in einem Liter Schüttelkultur angestellt (Tabelle 3.2). Sowohl die Biofeuchtmasse als auch die Proteinausbeute pro Liter Kultur wurden mittels HZDF um eine Potenz gesteigert. Trotz der hohen Kosten einer ²H-¹³C-¹⁵N-isotopenmarkierten Fermentation konnte der Preis pro mg KIF5C-Motordomäne um die Hälfte gesenkt werden.

Tabelle 3.2: Vergleich der Ausbeute und Kosten zwischen Schüttelkultur und Fermentation am Beispiel der ^2H - ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkierten Expression der KIF5C-Motordomäne in BL21(DE3).

	Schüttelkultur	Fermentation	Faktor
finale optische Dichte	1,5	14,0	9
Biofeuchtmasse pro Liter	3 g	34 g	11
Proteinausbeute pro Liter	7 mg (0,2 mmol)	75 mg (1,7 mmol)	11
Kosten pro mg Protein	€ 80	€ 37,50	0,5

3.1.4. Reinigung der Kinesin-Motordomänen

Die ^2H - ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkierten Kinesin-Motordomänen wurden unter deuterierten Bedingungen gereinigt (Abbildung 3.3). Auf diesem Wege sollte eine stabile Deuterierung auch an austauschbaren Positionen gewährleistet werden.

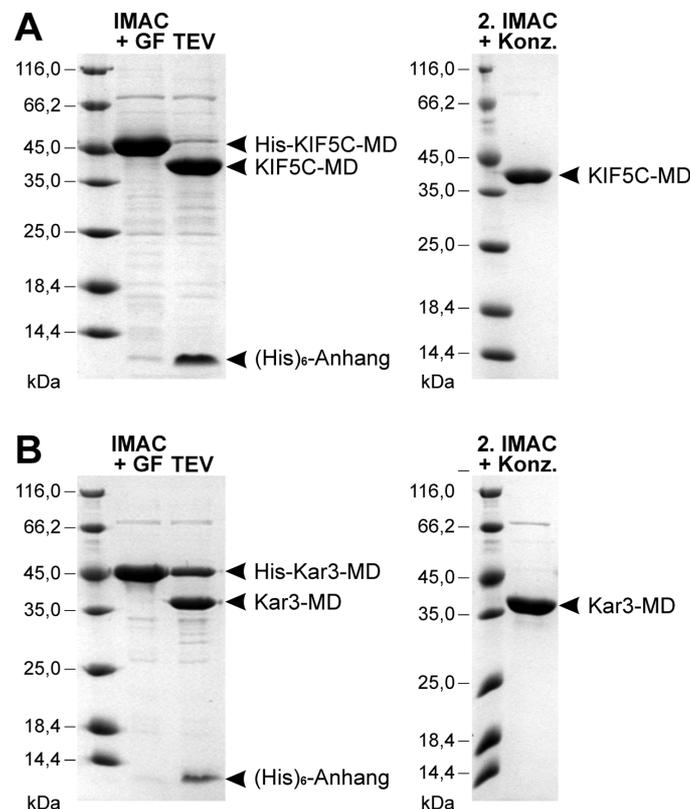


Abbildung 3.3: Auszug aus Reinigungsprofilen der ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierten A) KIF5C-Motordomäne (KIF5C-MD) und B) Kar3-Motordomäne (Kar3-MD). Die Reinigung wurde mittels 15% SDS-PAGE verfolgt. Nach immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) und Gelfiltration (GF) wurden die $(\text{His})_6$ -gekoppelten Fusionsproteine mit TEV-Protease geschnitten. $(\text{His})_6$ -Anhänge und verbleibende Fusionsproteine wurden durch eine zweite IMAC entfernt. Die Zielproteine wurden abschließend konzentriert.

Mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) wurden die $(\text{His})_6$ -gekoppelten Kinesin-Motordomänen angereichert. Das zur Elution verwendete Imidazol wurde durch Gelfiltration entfernt. Der 50 Aminosäuren lange N-terminale $(\text{His})_6$ -Anhang

wurde unter Verwendung von TEV-Protease abgespalten. Die während der Klonierung eingefügte Erkennungssequenz dieser Protease (ENLYFQ↓G) bedingte im Endprodukt ein zusätzliches, N-terminales Glycin. Im Vergleich beider Motordomänen wurde die KIF5C-Motordomäne nahezu vollständig umgesetzt, während für die Kar3-Motordomäne ein hoher Anteil an Fusionsprotein nicht geschnitten wurde. Vermutlich war in diesem Protein die Erkennungssequenz schlechter zugänglich. Dieser Umstand bedingte eine geringere Ausbeute der Kar3-Motordomäne (1,0 mmol bzw. 45 mg pro Liter Kultur) im Vergleich zur KIF5C-Motordomäne (1,7 mmol bzw. 75 mg pro Liter Kultur). Verbliebene (His)₆-gekoppelte Proteine wie auch geschnittene (His)₆-Anhänge und TEV-Protease wurden durch eine zweite IMAC entfernt. Die im Durchfluss verbliebenen Motordomänen wurden auf mind. 0,25 mmol/L konzentriert. Die Reinheit beider Motordomänen entsprach mindestens 99%.

3.1.5. Bestimmung des Markierungsgrades durch Massenspektrometrie

Mittels Massenspektrometrie wurden die Molekulargewichte der Motordomänen in isotopenmarkierter Form sowie mit natürlicher Isotopenverteilung bestimmt (Tabelle 3.3). Die notwendige Auflösung für Proteine bis 45 kDa wurde mittels LTQ-FT-Massenspektrometrie erreicht.

Tabelle 3.3: Bestimmung des Markierungsgrades der ²H-¹³C-¹⁵N-markierten Motordomänen mittels Massenspektrometrie (MS). Vergleich der Molekulargewichte (MW) bei natürlicher Isotopenverteilung (¹H-¹²C-¹⁴N) und Isotopenmarkierung (²H-¹³C-¹⁵N, das theoretische Molekulargewicht bezieht sich auf 100% Markierung). Aus den Differenzen (Δ) der theoretischen und ermittelten Molekulargewichte wurde der erzielte Markierungsgrad berechnet.

	KIF5C-Motordomäne (355 AS)			Kar3-Motordomäne (347 AS)		
	¹ H- ¹² C- ¹⁴ N	² H- ¹³ C- ¹⁵ N	Δ	¹ H- ¹² C- ¹⁴ N	² H- ¹³ C- ¹⁵ N	Δ
betrachtete Ladungszustände	21	23		15	20	
ermitteltes MW (Da)	39.883,3	44.776,0	4.892,7	38.838,2	43.539,4	4.703,5
theoretisches MW (Da)	39.885,4	44.938,2	5.052,8	38.838,5	43.730,1	4.891,6
Markierungsgrad			96,8%			96,1%

Für Motordomänen mit natürlicher Isotopenverteilung wurde eine hohe Genauigkeit festgestellt. Entsprechend wurden die ermittelten Molekulargewichte der ²H-¹³C-¹⁵N-isotopenmarkierten Motordomänen als zuverlässig eingestuft. Aus den Differenzen zwischen ermitteltem und theoretischem Molekulargewicht wurde ein Markierungsgrad von mindestens 96% bestimmt. Die verwendete Glukose besaß laut Hersteller (Cambridge Isotope Laboratories) mindestens 99% ¹³C-Kohlenstoffatome und 97-98% Deuteronen an nicht austauschbaren Positionen. Die maximale erreichbare Markierung war

dementsprechend limitiert. Es wurde auf einen Restgehalt von 1% ^{12}C -Kohlenstoff und 1-3% Protonen geschlossen.

Mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie wurde die technisch bedingte Restprotonierung bestätigt. Es wurden ^1H -Spektren an den gereinigten ^2H - ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkierten Motordomänen aufgenommen. In Regionen der austauschbaren Amidprotonen wurden keine proteinspezifischen Signale detektiert. Im aliphatischen Bereich wurde eine geringe Protonierung festgestellt.

3.2. Tubulinpräparation

Natives Tubulin wurde aus Schweinehirn extrahiert. Es wurde durch Polymerisation bei 37 °C und Depolymerisation bei 4 °C in insgesamt drei Zyklen gereinigt. Je Zyklus wurden zwei Ultrazentrifugationen durchgeführt (Abbildung 3.4). Polymerisierte Mikrotubuli wurden in der 1., 3. und 5. Ultrazentrifugation sedimentiert. Nach der Depolymerisation fand sich Tubulin im Überstand der 2., 4. und 6. Ultrazentrifugation.

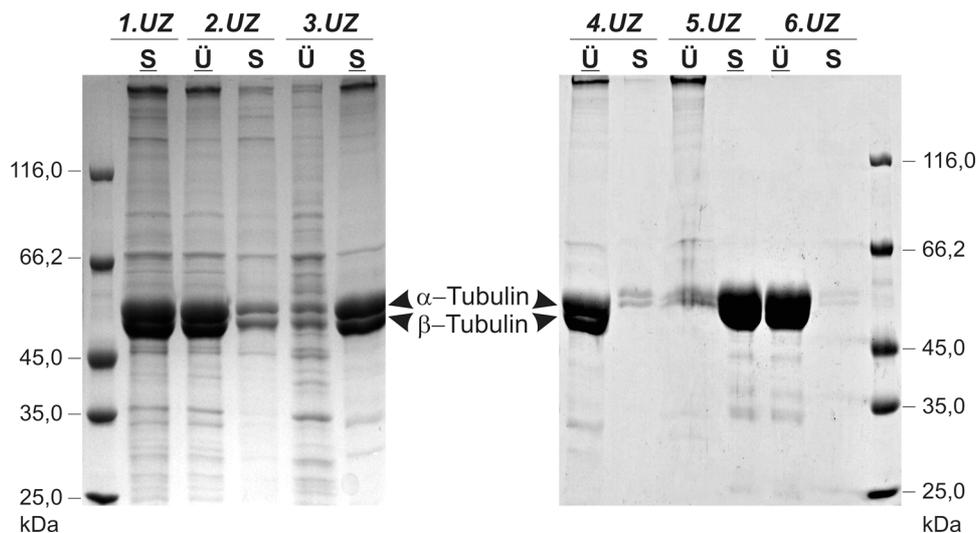


Abbildung 3.4: Die Tubulin-Reinigung wurde mittels 10% SDS-PAGE verfolgt. Es wurden insgesamt sechs Ultrazentrifugationen (UZ) durchgeführt. Sediment (S) und Überstand (Ü) wurden jeweils normiert auf ein vergleichbares Volumen aufgetragen. Unterstrichene Fraktionen entsprechen den Tubulin-haltigen Anteilen, die im Folgeschritt weiterverarbeitet wurden.

Die Polymerisation wurde jeweils durch Verwendung von 33% (4 mmol/L) Glycerin und 0,5 mmol/L GTP unterstützt. Der dritte Zyklus wurde in Gegenwart von 500 mmol/L Pipes durchgeführt. In dieser hochmolaren Konzentration wurden gebundene MAPs entfernt, die zuvor nicht abgetrennt werden konnten. Mittels 10% SDS-PAGE war eine Differenzierung in α - und β -Tubulin möglich. Mit einer Reinheit von mindestens 99% wurde aus 700 g Schweinehirn ca. 430 mg Tubulin präpariert. Es wurde eine Konzentration von 0,19 mmol/L (20 mg/ml) für das $\alpha\beta$ -Dimer von 110 kDa eingestellt.

3.3. Komplexpräparation

Komplexe aus Mikrotubuli und ^2H - ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkierter Motordomäne wurden in Gegenwart von 99,90% D_2O präpariert. Zunächst wurden Tubulin, das zuvor wässrig präpariert wurde, in deuteriertem PEM-Puffer polymerisiert. Die Mikrotubuli wurden durch Ultrazentrifugation sedimentiert und ein weiteres Mal mit deuteriertem Puffer gewaschen. Die Komplexpräparation erfolgte unter Zugabe diverser Additive. Mit 1 mmol/L GTP wurde die Polymerisation initiiert. Zur Stabilisierung der Mikrotubuli wurde 20 $\mu\text{mol/L}$ Paclitaxel verwendet. Die Kinesin-Motordomänen wurden in zwei Nukleotidzuständen verwendet. Eine Nukleotid-freie Variante wurde mit 10 mmol/L EDTA erzeugt. Das ATP-Analogon AMPPCP (Endk. 1 mmol/L) verhinderte das Dissoziieren der Motordomäne. Es wurde sich für AMPPCP anstelle des häufig im Zusammenhang mit Kinesin-Motordomänen verwendeten AMPPNP entschieden. Von den Kinesin-Motordomänen Ncd aus *Drosophila melanogaster* und KIF5C ist bekannt, dass sie sehr langsam AMPPNP hydrolysieren (Suzuki *et al.*, 1997). Die gemessene Hydrolyserate von $0,00004 \text{ s}^{-1}$ entsprach etwa 1% des normalen ATP-Umsatzes. Für AMPPCP wurde in dieser Studie keine Hydrolyse detektiert. Angesichts der durchgeführten Langzeit-NMR-Experimente wurde daher AMPPCP eingesetzt.

Die Motordomänen wurden im einem molaren Verhältnis von 2:1 im Vergleich zum $\alpha\beta$ -Tubulin-Dimer eingesetzt. Der Komplex wurde durch Ultrazentrifugation sedimentiert und mittels 15% SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.5).

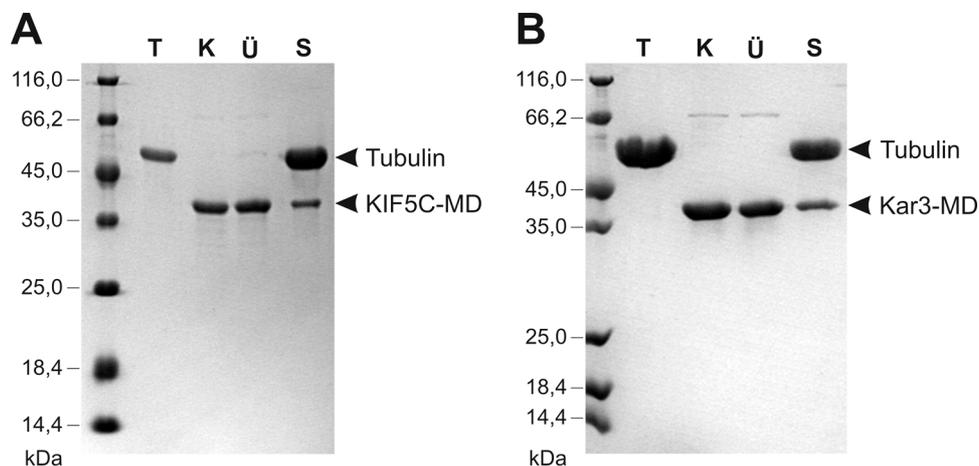


Abbildung 3.5: Komplexpräparationen von Mikrotubuli mit A) KIF5C-Motordomäne und B) Kar3-Motordomäne, überprüft durch 15% SDS-PAGE. Tubulin (T) wurde zu Mikrotubuli polymerisiert und anschließend mit der jeweiligen Kinesin-Motordomäne (K) inkubiert. Der Komplex wurde durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Der Überstand (Ü) enthielt ungebundene Kinesin-Motordomänen. Das Sediment (S) wurde zur Festkörper-NMR-Probe verarbeitet.

Trotz einer theoretisch möglichen Dekoration von einer Motordomäne pro Tubulin-Dimer konnte lediglich eine Inkorporation von maximal 20% erzielt werden. Eine vollständige Dekoration wäre unter Verwendung einer höheren Ausgangskonzentration der

Motordomänen möglich (z.B. ein molares Verhältnis von 10:1). Dieser Überschuss war in Anbetracht der hohen Kosten der isotonenmarkierten Proteine nicht praktikabel.

Es war bekannt, dass die *in vitro* Tubulin-Polymerisationsrate in Gegenwart von D₂O drastisch gesteigert werden kann (Itoh und Sato, 1984). D₂O scheint hydrophobe Interaktionen innerhalb der Mikrotubuli zu stärken und unterdrückt so die dynamische Instabilität der Mikrotubuli (Panda *et al.*, 2000). Darüber hinaus bleibt das relativ instabile Tubulin länger polymerisationsaktiv (Chakrabarti *et al.*, 1999). Im Hinblick auf Langzeit-NMR-Experimente ist diese Beobachtung von besonderem Interesse.

Im Anschluss an eine vierwöchige Messperiode wurde eine Probe des Komplexes aus KIF5C-Motorprotein und Mikrotubuli elektronenmikroskopisch untersucht (*Abbildung 3.6*). Es wurden für Mikrotubuli typische filamentöse Strukturen beobachtet. Präparationen in Gegenwart von D₂O und Paclitaxel waren somit geeignet, um langlebige Komplexproben für Festkörper-MAS-NMR-spektroskopische Untersuchungen zu erzeugen.

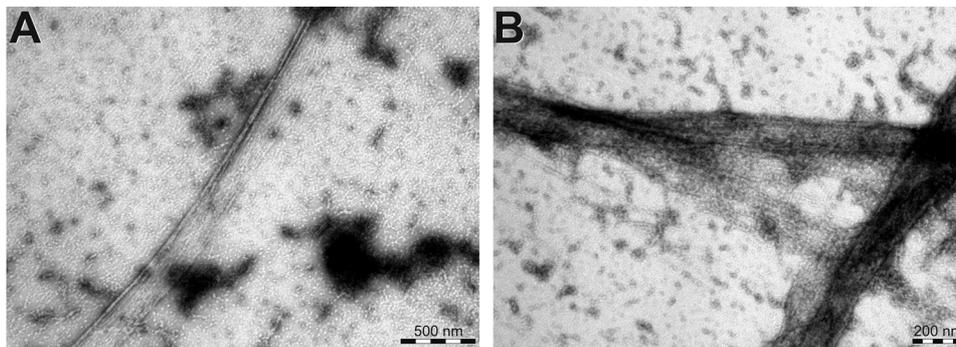


Abbildung 3.6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Komplexprobe von Mikrotubuli mit ²H-¹³C-¹⁵N-isotopenmarkierter KIF5C-Motordomäne nach vier Wochen Messzeit.

4. Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie an Kinesin-Mikrotubuli-Komplexen

Um hochkomplexe Proben wie die hier verwendeten Kinesin-dekorierten Mikrotubuli mittels Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie zu untersuchen, wurden spezifische Experimente benötigt, mit denen Signale selektiv gefiltert und verstärkt werden konnten. Mit dem Ziel die intermolekulare Kontaktfläche der Kinesin-Motordomäne abzubilden, wurden sowohl konventionelle als auch DNP-unterstützte MAS-Methoden genutzt. Unter deuterierten Bedingungen sollte ausgehend von natürlichen, nicht isotopenmarkierten Mikrotubuli und isotopenangereicherten Kinesin-Motordomänen ein selektiver Transfer erzeugt werden.

4.1. Heteronukleare Korrelationen

Eine erste Charakterisierung wurde anhand von heteronuklearen Korrelationen (HETCOR) vorgenommen. Es wurden sowohl ^2H - ^{13}C - als auch ^1H - ^{13}C -Korrelationen untersucht. Im Vergleich zu analogen Experimenten in der Lösungs-NMR-Spektroskopie (z.B. HSQC, *heteronuclear single quantum coherence*) werden nicht nur gebundene Kerne korreliert. Vielmehr kann in HETCOR-Experimenten auch ein Magnetisierungstransfer auf räumlich nahe Kerne erfolgen (Laws *et al.*, 2002). Es galt zu zeigen, ob mittels ^1H - ^{13}C -HETCOR-Experimenten intermolekulare Kontakte dargestellt werden könnten.

4.1.1. ^2H - ^{13}C -HETCOR bildet die Motordomäne ab

Die deuterierte Kar3-Motordomäne gebunden an Mikrotubuli wurde mittels ^2H - ^{13}C -HETCOR durch Kreuzpolarisation von Deuterium auf ^{13}C -Kohlenstoff untersucht (*Abbildung 4.1*). Eine Selektion bestimmter Signale ist mit dieser Art von Experiment nicht möglich. Es dominierten spektrale Überlagerungen, wie sie von einem Protein mit 347 Aminosäureresten zu erwarten waren. Die ^2H -Linienbreite war zudem erwartungsgemäß groß.

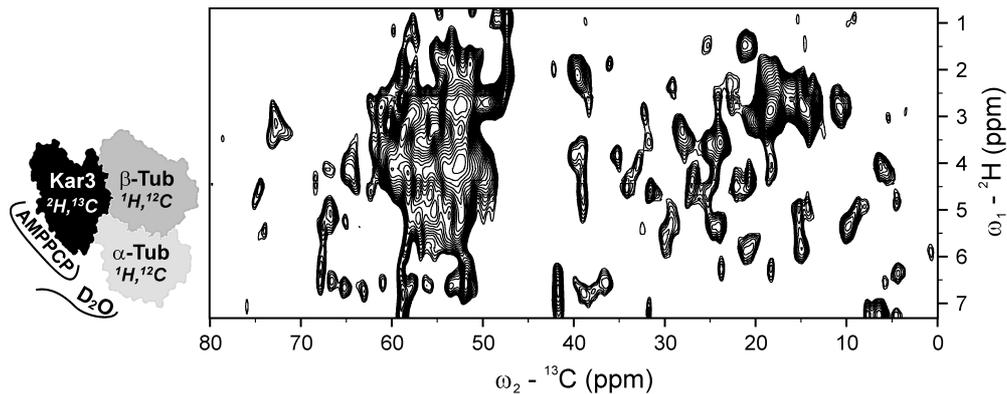


Abbildung 4.1: ^2H - ^{13}C -HETCOR am Komplex aus ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter, AMPPCP-gebundener Kar3-Motordomäne und Mikrotubuli mit natürlicher Isotopenverteilung. Austauschbare Protonen wurden gegen Deuteronen ersetzt. Das Spektrum wurde mit einer CP-Kontaktzeit von 2 ms bei 600 MHz aufgenommen.

4.1.2. ^1H - ^{13}C -HETCOR eignet sich nicht für selektive Experimente

^1H - ^{13}C -HETCOR-Experimente wurden verwendet, um in räumlicher Nähe zu Protonen befindliche ^{13}C -Kerne zu detektieren. Homonukleare, dipolare ^1H - ^1H -Kopplungen wurden mit einer *Frequency-switched Lee-Goldburg* (FSLG) Sequenz unterdrückt. FSLG-HETCOR wurde für drei verschiedene Komplexproben verglichen (*Abbildung 4.2*). Ein deuterierter Komplex aus uniform ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter, AMPPCP-gebundener KIF5C-Motordomäne und Mikrotubuli mit natürlicher Isotopenverteilung ergab im Carbonyl- und aliphatischen Bereich proteinspezifische Kreuzsignale (*Abbildung 4.2A*). In der ^{13}C -Dimension erschienen Methyl- und Methylengruppen bei chemischen Verschiebungen von 10 bis 30 ppm. Zwischen 50 und 60 ppm wurden Korrelationen zwischen C_α -Kohlenstoffatomen und H_α -Protonen identifiziert. Zudem wurden im Bereich von 170 bis 180 ppm Kontakte zwischen C_α -gebundenen Protonen und Carbonyl-Kohlenstoffatomen detektiert. Korrelationen von Amidprotonen zu Carbonyl- und C_α -Kohlenstoffatomen fehlten. Dieser Umstand wies auf eine vollständige Substitution der austauschbaren Protonen gegen Deuteronen hin. Die Auflösung der Protonendimension wurde durch FSLG-Entkopplung verbessert. Dennoch konnten spektrale Überlagerungen im aliphatischen Bereich nicht verhindert werden.

Ein sehr ähnliches Bild ergab sich mit einer Komplexprobe aus KIF5C-Motordomäne und Mikrotubuli, in der beide Interaktionspartner mit natürlicher Isotopenverteilung eingesetzt wurden (*Abbildung 4.2B*). Der Komplex wurde in D_2O präpariert, wodurch austauschbare Amidprotonen gegen Deuteronen substituiert wurden. Die vorhandenen Signale wurden auf die natürliche Gegenwart von 1% ^{13}C -Kohlenstoff zurückgeführt. Für Mikrotubuli mit natürlicher Isotopenverteilung, die in D_2O polymerisiert wurden, wurden im FSLG-HETCOR Mikrotubuli-spezifische Signale detektiert (*Abbildung 4.2C*).

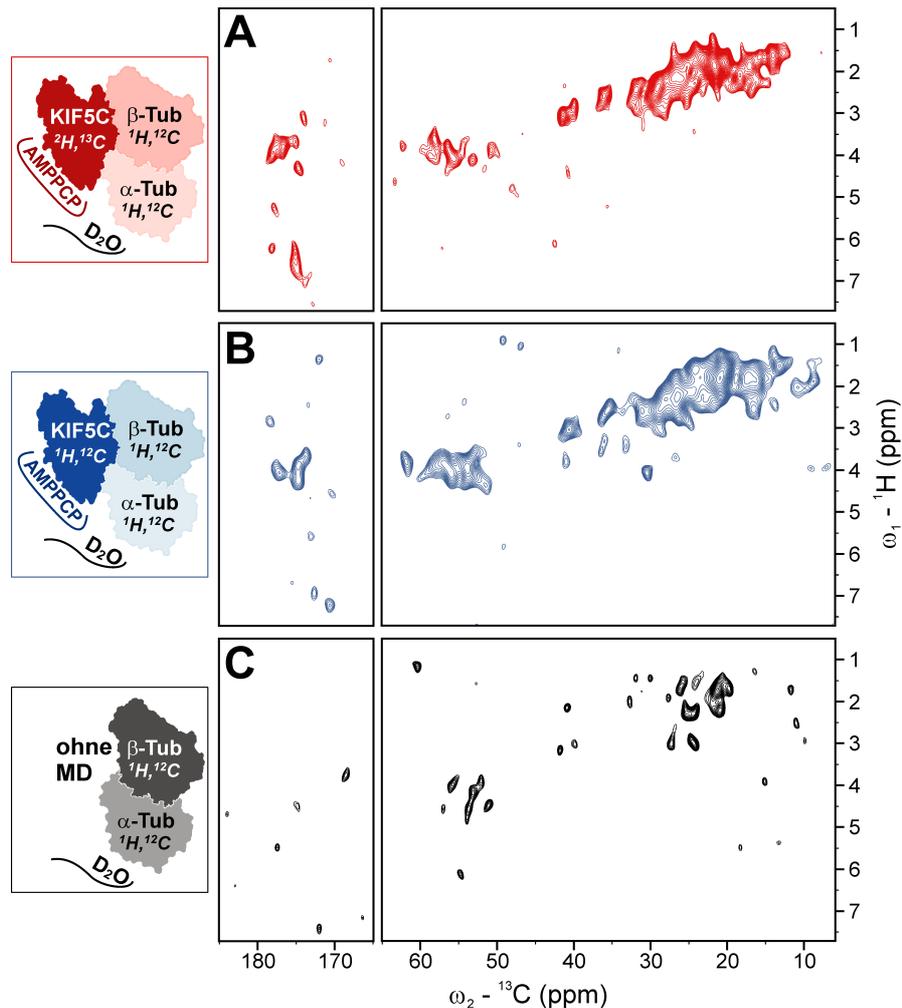


Abbildung 4.2: Vergleich von ^1H - ^{13}C -Korrelationen, die mittels FSLG entkoppelt wurden (FSLG-HETCOR). Es sind jeweils Carbonyl- und aliphatischer Bereich dargestellt. A) Ein Komplex aus Mikrotubuli und ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter KIF5C-Motordomäne ergab ein ähnliches Profil wie ein B) KIF5C-Motordomänen-Mikrotubuli-Komplex mit natürlicher Isotopenverteilung für beide Interaktionspartner. C) Mit einer Kontrollprobe ohne Motordomäne ließen sich Signale ableiten, die durch Protonentransfer im Mikrotubulus entstanden. In allen Proben wurden austauschbare Protonen gegen Deuterone ersetzt. Die Spektren wurden bei 900 MHz (A, C) bzw. 700 MHz (B) mit einer CP-Kontaktzeit von 2 ms aufgenommen. Die Piktogramme zeigen farbkodiert den Komplexstatus inklusive Markierungsmuster und Nukleotidzustand der Motordomäne.

Das Experiment sollte einen intermolekularen Transfer von Protonen der Mikrotubuli zu ^{13}C -Kernen der Kinesin-Motordomäne erzeugen (Abbildung 4.3). Ausgehend von 1% natürlich vorkommenden ^{13}C -Atomen in den Mikrotubuli und 1-3% präparativ bedingter Restprotonierung in der Motordomäne fanden allerdings auch intramolekulare Transferprozesse statt. Dieser Anteil erzeugte einen natürlichen Hintergrund, der etwaige intermolekulare Signale überdeckte. HETCOR-Experimente eigneten sich aus diesem Grund nicht, um Aussagen über intermolekulare Kontakte zu treffen. Darüber hinaus war die Identifizierung von Spinsystemen aufgrund von Signalüberlagerungen und Mehrdeutigkeit nicht möglich.

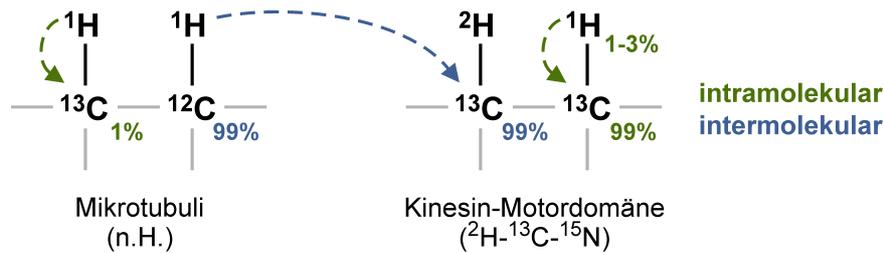


Abbildung 4.3: Schema zum FSLG-HETCOR. Die Magnetisierung wurde intermolekular von Protonen der Mikrotubuli auf ^{13}C -Atome der deuterierten Motordomäne übertragen (blauer Pfeil). Die natürliche Häufigkeit (n.H.) von 1% ^{13}C im Mikrotubulus und die verbliebenen 1-3% Protonen in der deuterierten Motordomäne führten zusätzlich zu intramolekularem Transfer (grüne Pfeile).

4.2. Selektive Filterexperimente

4.2.1. RFDR- und TEDOR-Experimente

Mit ^{13}C - ^{13}C - und ^{15}N - ^{13}C -Korrelationen (RFDR und TEDOR) sollte es durch Kreuzpolarisation möglich sein, nur intermolekulare Kontakte darzustellen (*Abbildung 4.4*). Ausgehend von den Mikrotubuli-Protonen wurde die Magnetisierung mittels Kreuzpolarisation auf angrenzende ^{13}C -Atome in der Interaktionsfläche der Kinesin-Motordomäne transferiert. Um nun eine selektive Korrelationen zu generieren, wurde in einem RFDR- bzw. TEDOR-Mischschritt der nächstgebundene ^{13}C - bzw. ^{15}N -Kern erreicht. Im TEDOR-Experiment wurde die Magnetisierung zur Detektion zurück auf ^{13}C -Kohlenstoff übertragen. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer natürlichen Häufigkeit von 1% ^{13}C -Isotopen zwei ^{13}C -Kerne nebeneinander anzutreffen sind, liegt bei 0,01%. Durch die zweistufige Übertragung im RFDR sollte somit ein selektiver Transfer erreicht werden können. Mit 0,37% natürlich vorkommenden ^{15}N -Kernen wird im dreistufigen TEDOR-Experiment die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Transfers irrelevant.

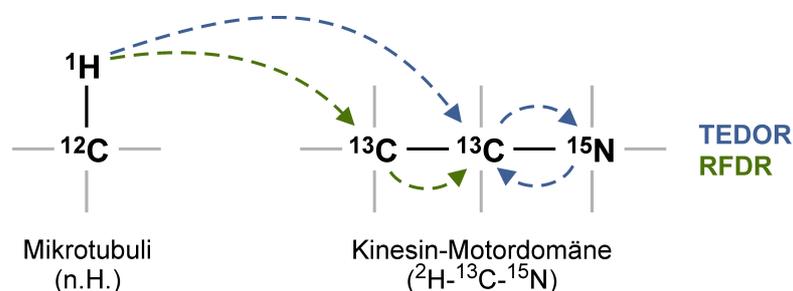


Abbildung 4.4: Darstellung des Transfers in RFDR- und TEDOR-Experimenten. Im RFDR (grüne Pfeile) wurde die Magnetisierung protonenvermittelt sequentiell auf zwei benachbarte ^{13}C -Atome der deuterierten Motordomäne übertragen. Im TEDOR (blaue Pfeile) wurde die Magnetisierung der Protonen über ^{13}C -Atome auf ^{15}N -Kernspins und anschließend zurück auf ^{13}C -Kohlenstoff transferiert.

2D RFDR- und TEDOR-Spektren des deuterierten Komplexes aus uniform ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter, Nukleotid-freier Kar3-Motordomäne und Mikrotubuli zeigten, dass eine effektive Filterung durch intermolekulare Kreuzpolarisation möglich war (Abbildung 4.5). Trotz einer Linienbreiten von 300-400 Hz in der ^{13}C -Dimension wurden selektive, distinguierte Kreuzsignale detektiert. Diese korrelierten im RFDR- und TEDOR-Spektrum und wiesen eine ähnliche Dispersion auf. Anhand der charakteristischen, chemischen Verschiebungen und der Identifizierung von Spinsystemen wurde der entsprechende Aminosäuretyp zugeordnet. Signale für die Aminosäuren Lysin, Arginin, Isoleucin, Serin, Threonin, Valin, Glutaminsäure und Glutamin (im Einbuchstabenkode: KRISTVEQ) stachen hervor. Das im TEDOR sehr dominante Lysin-Signal wurde in der indirekten Dimension hineingefaltet. Die tatsächliche chemische Verschiebung für Lysin $\text{N}\zeta$ wurde auf ca. 35 ppm bestimmt, was klassisch für Seitenketten-Stickstoffe der Lysine ist. Die Restprotonen in der Kar3-Motordomäne fielen nicht ins Gewicht, da ausgehend von einer Normalverteilung über das gesamte Protein kein derart selektives Spektrum zu erwarten war.

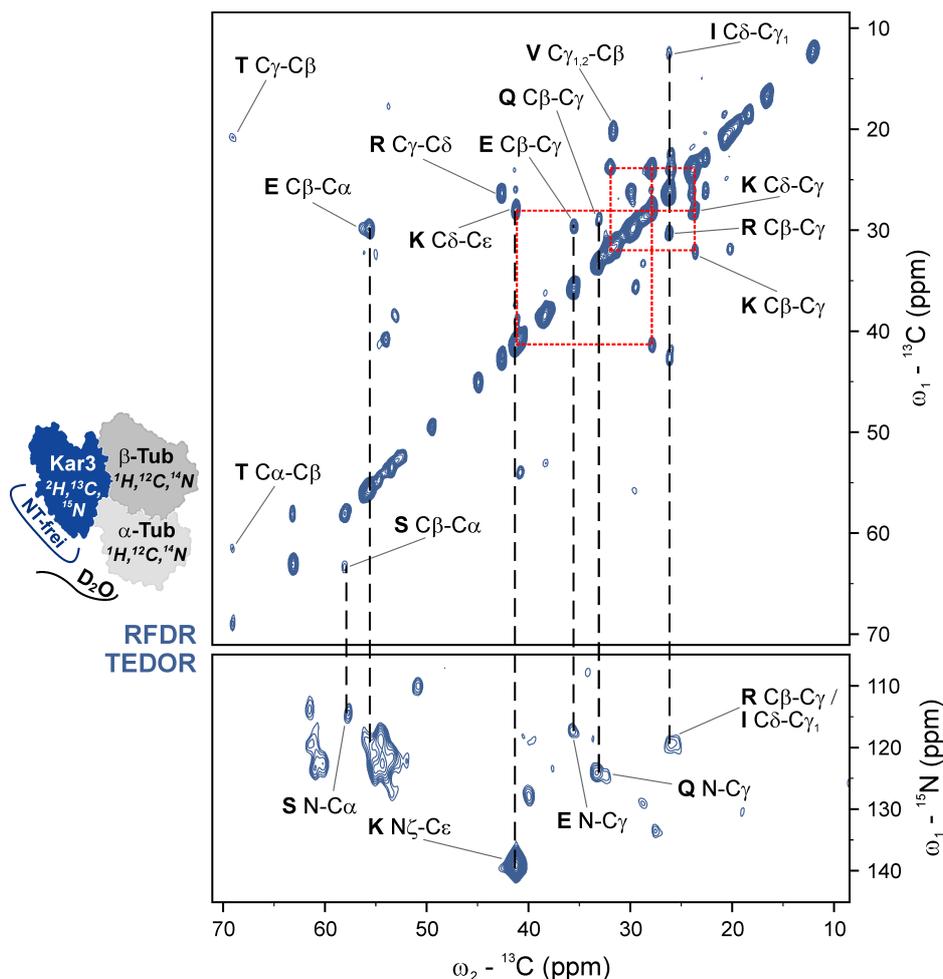


Abbildung 4.5: Selektive Filterung durch RFDR und TEDOR. Die Kreuzsignale des RFDR-Spektrums (oben) korrelierten mit Signalen im TEDOR-Spektrum (unten). Es wurde am Komplex aus Mikrotubuli und ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter Kar3-Motordomäne ohne Nukleotid-Zusatz in D_2O gemessen. Die Spektren wurden mit einer RFDR- bzw. TEDOR-Mischzeit von je 4 ms und einer CP-Kontaktzeit von 3 ms bei 900 MHz aufgenommen.

4.2.2. Vergleich mit direkter ^{13}C -Anregung

An einem deuterierten Komplex aus isotopenmarkierter, AMPPCP-gebundener Kar3-Motordomäne und Mikrotubuli wurden ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen mit ^1H - ^{13}C -Kreuzpolarisation (CP-RFDR) und direkter ^{13}C -Anregung (DX-RFDR) verglichen. Es standen sich also ein gefiltertes Experiment und ein Experiment zur Abbildung der kompletten Motordomäne gegenüber. Bei direkter Anregung des Kohlenstoffs sollen lange Wartezeiten zwischen den Transienten eine ausreichende Relaxation in den Grundzustand gewährleisten. Für das DX-RFDR wurde die optimale Wartezeit durch eine Serie an 1D Experimenten im Bereich von 5 und 45 s bestimmt. Eine Wartezeit von 25 s wurde im 2D Experiment verwendet.

Das erhaltene Spektrum zeigte sowohl die mittels CP-RFDR erhaltenen Signale als auch neue, mit unter überlappende Signalsätze (Abbildung 4.6). Allerdings wurden die insgesamt 347 Aminosäurereste der Kar3-Motordomäne mittels DX-RFDR nicht vollständig abgebildet. Für ein derart großes Protein wäre eine höhere Signaldichte zu erwarten. Trotz der langen Wartezeit schienen Kohlenstoffe, die in einer rein deuterierten Umgebung vorlagen, nicht ausreichend zu relaxieren. Die abgebildeten Reste könnten eine schwache dipolare Kopplung zu Protonen der Mikrotubuli erfahren haben. Vermutlich wurde die T_1 -Relaxation eher in einer protonierten Umgebung wie der Interaktionsfläche zum Tubulin unterstützt. Es ist also anzunehmen, dass man durch direkte ^{13}C -Anregung ausgehend von der abzubildenden Interaktionsfläche zumindest angrenzende Bereiche erfassen kann.

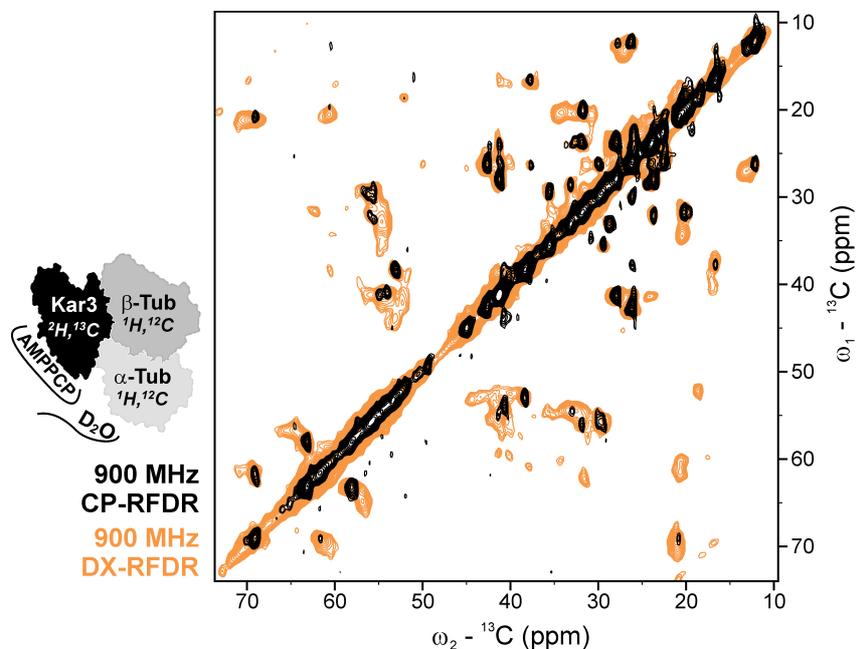


Abbildung 4.6: Überlagerung zweier ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen (CP-RFDR und DX-RFDR) vom Komplex aus Mikrotubuli und uniform $^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markierter, AMPPCP-gebundener Kar3-Motordomäne. Austauschbare Protonen wurden gegen Deuteronen ersetzt. Im CP-RFDR (schwarz) erfolgte ein Protonentransfer mit einer CP-Kontaktzeit von 3 ms. Für das DX-RFDR (orange) wurde eine Wartezeit von 25 s verwendet. Beide Spektren wurden bei 900 MHz mit einer RFDR-Mischzeit von 4 ms aufgenommen.

4.2.3. Parallelen im Vergleich der Motordomänen

Ein Vergleich der Motordomänen von Kar3 und KIF5C wurde herangezogen, um ein differenzierteres Bild der Mikrotubuli-Interaktion zu gewinnen. Beide Komplexpräparationen erfolgten analog mit der jeweiligen isotonenmarkierten Motordomäne im AMPPCP-gebundenen Zustand und unter deuterierten Bedingungen. Es wurden CP-RFDR-Spektren unter Verwendung der gleichen Parameter aufgenommen (*Abbildung 4.7*). Die Spektren zeigten eine beschränkte Anzahl definierter Kreuzsignale. In beiden Spektren fanden sich Signale, die zu Lysin-, Valin- und Glutamatresten passen. Andere Signale wurden nur im Kar3-gebundenen Komplex detektiert. Sie spiegelten vor allem die Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Serin und Threonin wieder.

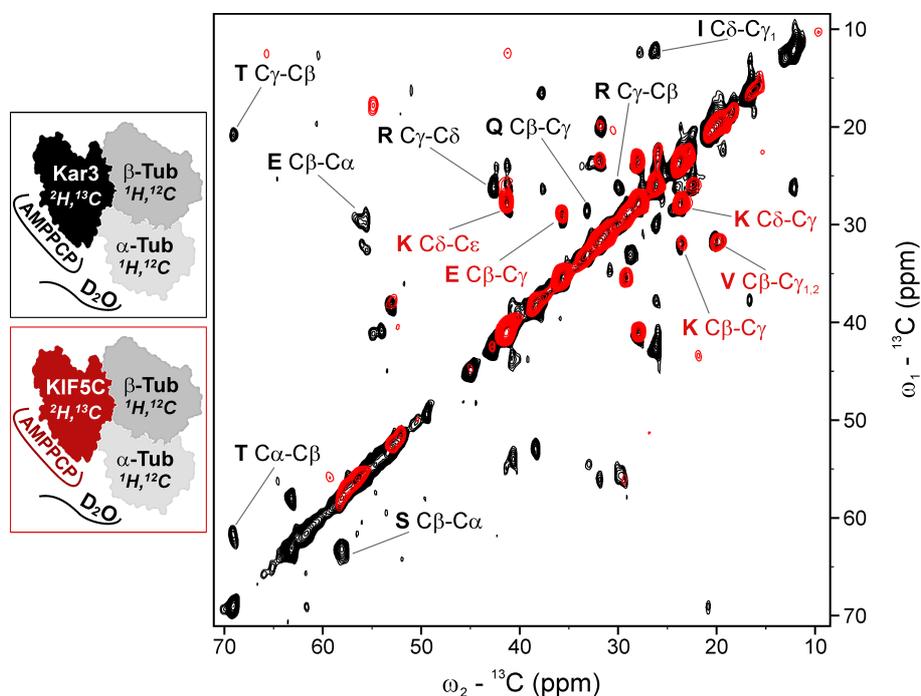


Abbildung 4.7: Überlagerung der CP-RFDR-Spektren zweier Komplexe aus Mikrotubuli und ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter, AMPPCP-gebundener Kinesin-Motordomäne in D_2O . Motordomänen der Kinesine Kar3 (schwarz) und KIF5C (rot) wurden verwendet. Die Spektren wurden bei 900 MHz mit einer RFDR-Mischzeit von 4 ms und einer CP-Kontaktzeit von 3 ms gemessen.

4.2.4. Kontrolleexperimente

Die Komplexkomposition, insbesondere die vergleichsweise geringe Inkorporation der isotonenmarkierten Motordomänen bedingten ein eher schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis. Dennoch konnten mittels RFDR distinguierte Kreuzsignale detektiert werden. In der Regel wurden pro RFDR-Experiment vier Tage Messzeit benötigt. Die Stabilität der Komplexproben wurde anhand von 1D ^{13}C -Spektren vor und nach den 2D-Experimenten kontrolliert. Die erhaltenen, nahezu identischen Signalsätze sprachen für durchaus beständige Proben.

Den Nachweis eines hohen Deuterierungsgrades der Motordomänen lieferten PDSD-Experimente. Die isotope markierte KIF5C-Motordomäne wurde im Komplex mit Mikrotubuli mittels klassischer Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie untersucht (Abbildung 4.8A). Aufgrund der deuterierten Umgebung wurde keine Protonen-induzierte Spindiffusion nachgewiesen. Im 2D ^{13}C - ^{13}C -PDSD-Spektrum wurde erwartungsgemäß eine Diagonale ohne entsprechende Kreuzsignale detektiert. Ein 2D ^{13}C - ^{13}C -PDSD-Spektrum des Komplexes aus isotope markierter Kar3-Motordomäne und Mikrotubuli wurde mittels dynamischer Kernpolarisation (DNP) bestimmt (Abbildung 4.8B). Ausführungen zur DNP-Thematik finden sich im Folgekapitel. Hier sei ausschließlich erwähnt, dass auch unter DNP-Bedingungen keine Spindiffusion erfolgte. Die breitere Diagonale ist einem Tieftemperatureffekt geschuldet.

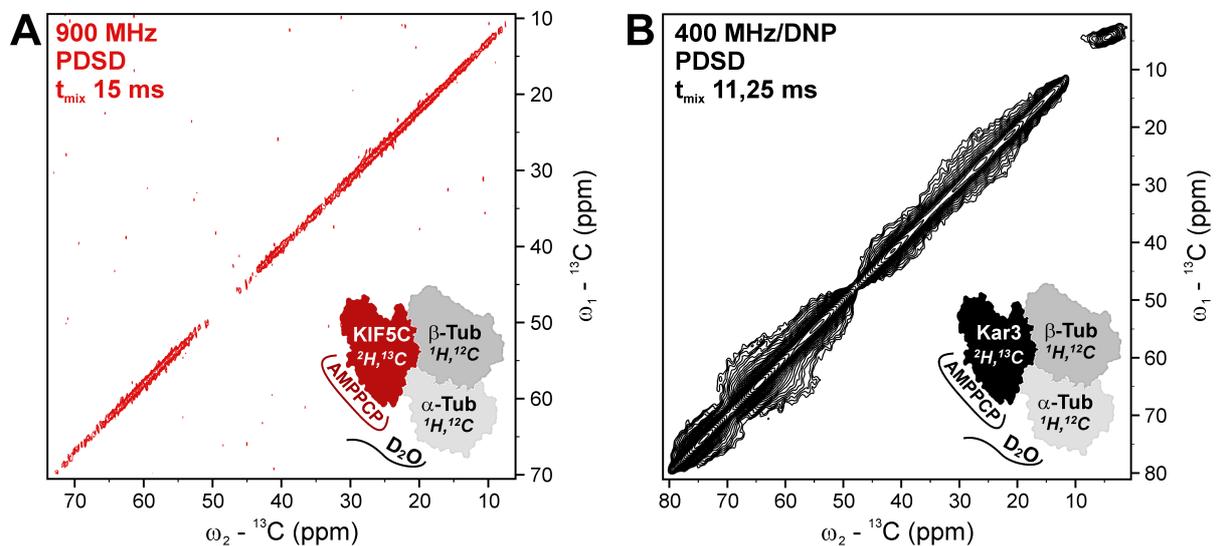


Abbildung 4.8: PDSD-Experimente ergaben eine Diagonale, jedoch keine Kreuzsignale. A) Am Komplex aus ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter KIF5C-Motordomäne und Mikrotubuli wurde bei 900 MHz und RT gemessen. B) Mittels DNP wurde der Komplex aus ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter Kar3-Motordomäne und Mikrotubuli untersucht. Die Linienverbreiterung unter DNP-Bedingungen ist der Messung bei 95 K zuzuschreiben.

Als Kontrollproben wurden zum einen die Mikrotubuli allein betrachtet. Zum anderen wurden beide Interaktionspartner (KIF5C-Motordomäne und Mikrotubuli) mit natürlicher Isotopenverteilung unter deuterierten Bedingungen komplexiert. Kontrollexperimente umfassten RFDR- bzw. PDSD-Aufnahmen, wobei keine Kreuzsignale detektiert wurden.

Über welche Entfernung ein Magnetisierungstransfer möglich ist, wird durch die Länge der Kreuzpolarisation bestimmt. Nur mit langen CP-Zeiten (z.B. 3 ms im RFDR) sollte ein intermolekularer Transfer stattfinden. Umgekehrt sollten mit kurzen CP-Zeiten (z.B. 100 μs) keine Kreuzsignale zu erwarten sein. Unter DNP-Bedingungen konnte ebendiese Theorie untermauert werden. Es ergab sich lediglich eine relativ breite Diagonale ohne definierte Kreuzsignale. Bei Raumtemperatur hingegen wurden auch bei einem CP von 100 μs Kreuzsignale registriert. Die Ursache muss im Rahmen dieser Arbeit ungeklärt bleiben und

muss z.B. mit CP-Aufbaukurven weiter untersucht werden. Unter Umständen könnte auch ein unvollständiger Phasenzyklus unabhängig von der CP-Kontaktzeit zu Kreuzsignalen geführt haben.

4.3. Dynamische Kernpolarisation

Derzeit etablieren sich DNP-Methoden auf dem Feld der Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie. Durch Elektronenpolarisationstransfer ausgehend von einem Radikal ist es möglich, eine extreme Signalverstärkung zu erzeugen. Hier wurde die Methode auf eine deuterierte Komplexprobe aus ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter, AMPPCP-gebundener Kar3-Motordomäne und Mikrotubuli mit natürlicher Isotopenverteilung angewendet.

4.3.1. Signalverstärkung und Messzeitverkürzung

Ein einfacher Vergleich von 1D ^{13}C -Spektren zeigte die Leistungsfähigkeit der DNP-Methode (Abbildung 4.9). Ohne Mikrowelleneinstrahlung durch einen Gyrotronmagneten hoben sich die Signale kaum vom Rauschen ab. Mit oszillierender Mikrowelleneinstrahlung wurde das Signal/Rausch-Verhältnis extrem verbessert. Im Vergleich zur konventionellen Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie ermöglichte eine etwa 10-fache Signalverstärkung eine Messzeitverkürzung um den Faktor 100.

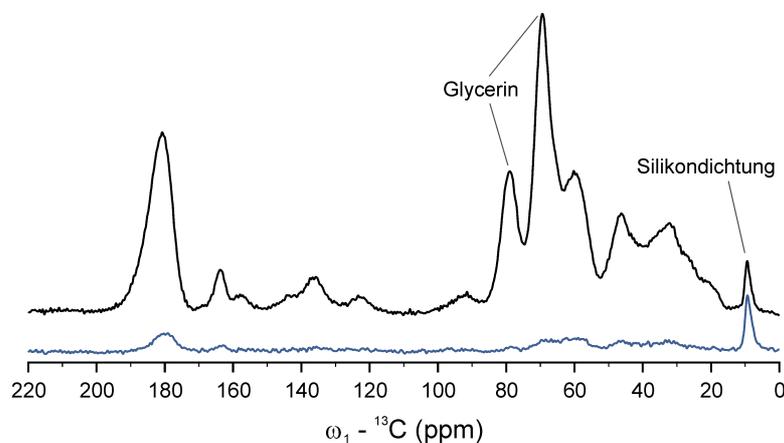


Abbildung 4.9: DNP-Signalverstärkung in 1D ^{13}C -Spektren. Aufnahmen mit (schwarz) und ohne (blau) Mikrowelleneinstrahlung wurden verglichen. Es wurde bei 400 MHz mit einem 9,7 Tesla Gyrotronmagneten gemessen. Zur Messung bei 95 K wurde deuteriertes D_8 -Glycerin als Gefrierschutz eingesetzt. Eine Silikondichtung wurde als Platzhalter im Rotor verwendet. Es wurde jeweils mit einer CP-Kontaktzeit von 2 ms über 128 Messungen gemittelt.

4.3.2. Vergleich mit konventionellen Festkörper-MAS-Spektren

Mittels Kreuzpolarisation wurden unter DNP-Bedingungen CP-RFDR-Spektren mit unterschiedlichen RFDR-Mischzeiten aufgenommen (Abbildung 4.10). Die mittels DNP erzeugten Spektren besaßen eine schlechtere Auslösung als das CP-RFDR-Spektrum, das unter konventionellen Bedingungen aufgenommen wurde. Die Signalüberlagerungen waren

zum Teil durch Tieftemperaturmessung und die Heterogenität der Probe bedingt. Die selektiv gefilterten Signale fanden sich in den DNP-Spektren wieder. Mit kurzer RFDR-Mischzeit konnte ein vergleichsweise selektiver Transfer erzielt werden.

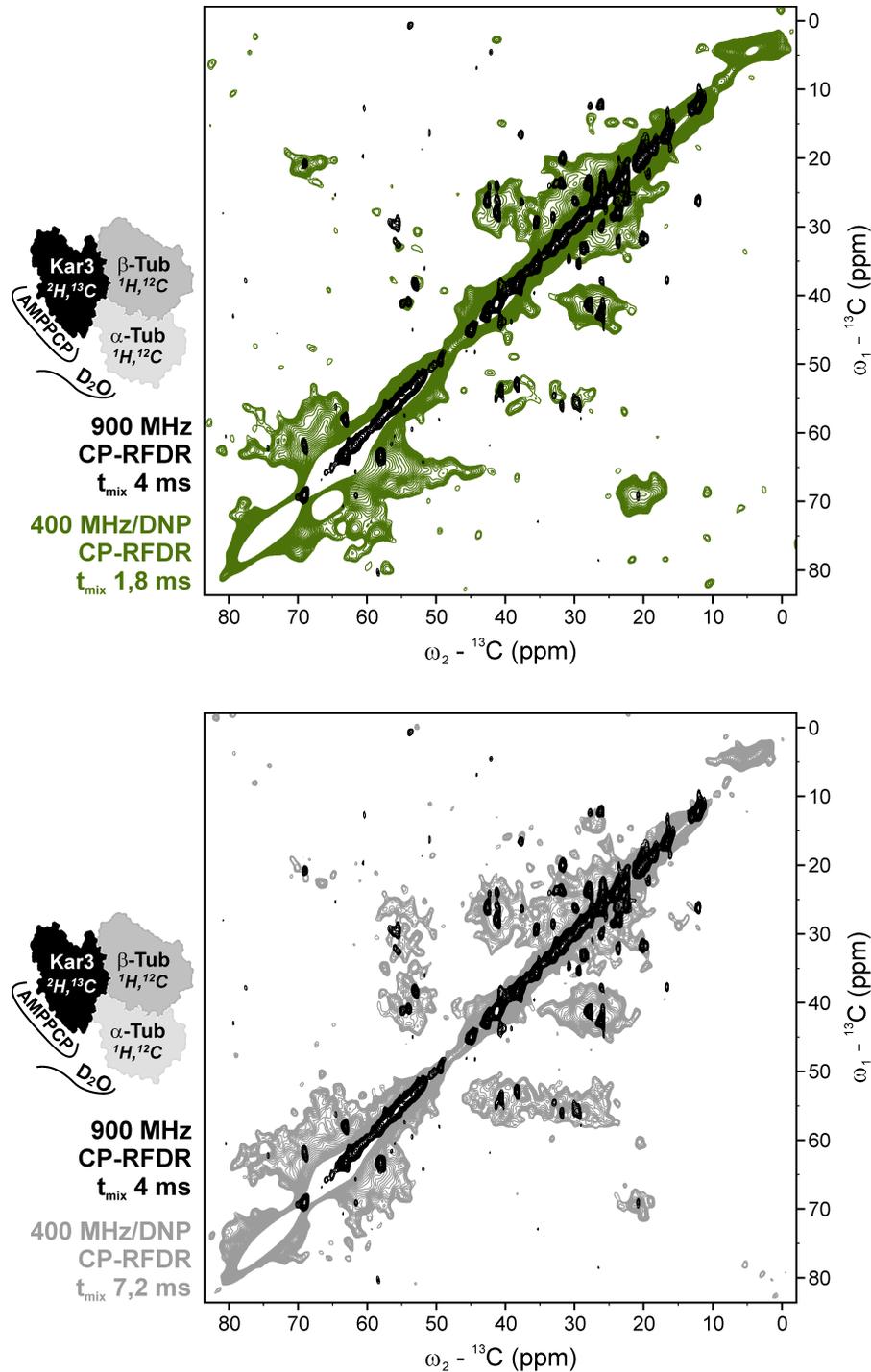


Abbildung 4.10: Überlagerungen des konventionellen CP-RFDR-Spektrums (schwarz) mit CP-RFDR-Spektren unter DNP-Bedingungen. Die DNP-Spektren wurden bei 400 MHz und 95 K aufgenommen. Es wurden unterschiedlicher RFDR-Mischzeiten betrachtet: 1,8 ms (grün, oben) und 7,2 ms (grau, unten). Das CP-RFDR-Spektrum bei 285 K wurde bei 900 MHz mit einer RFDR-Mischzeit von 4 ms gemessen. Die Messungen erfolgten am deuterierten Komplex aus ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter, AMPPCP-gebundener Kar3-Motordomäne und Mikrotubuli.

Insbesondere im C_{α} -Bereich ergaben sich isolierte Kreuzsignale von z.B. sauren Aminosäuren. Dagegen wurden Bereiche um Serin- und Threoninsignale deutlich schlechter aufgelöst, da dort für Glycerin zwei breite Diagonalsignale aufgrund der natürlichen ^{13}C -Häufigkeit detektiert wurden.

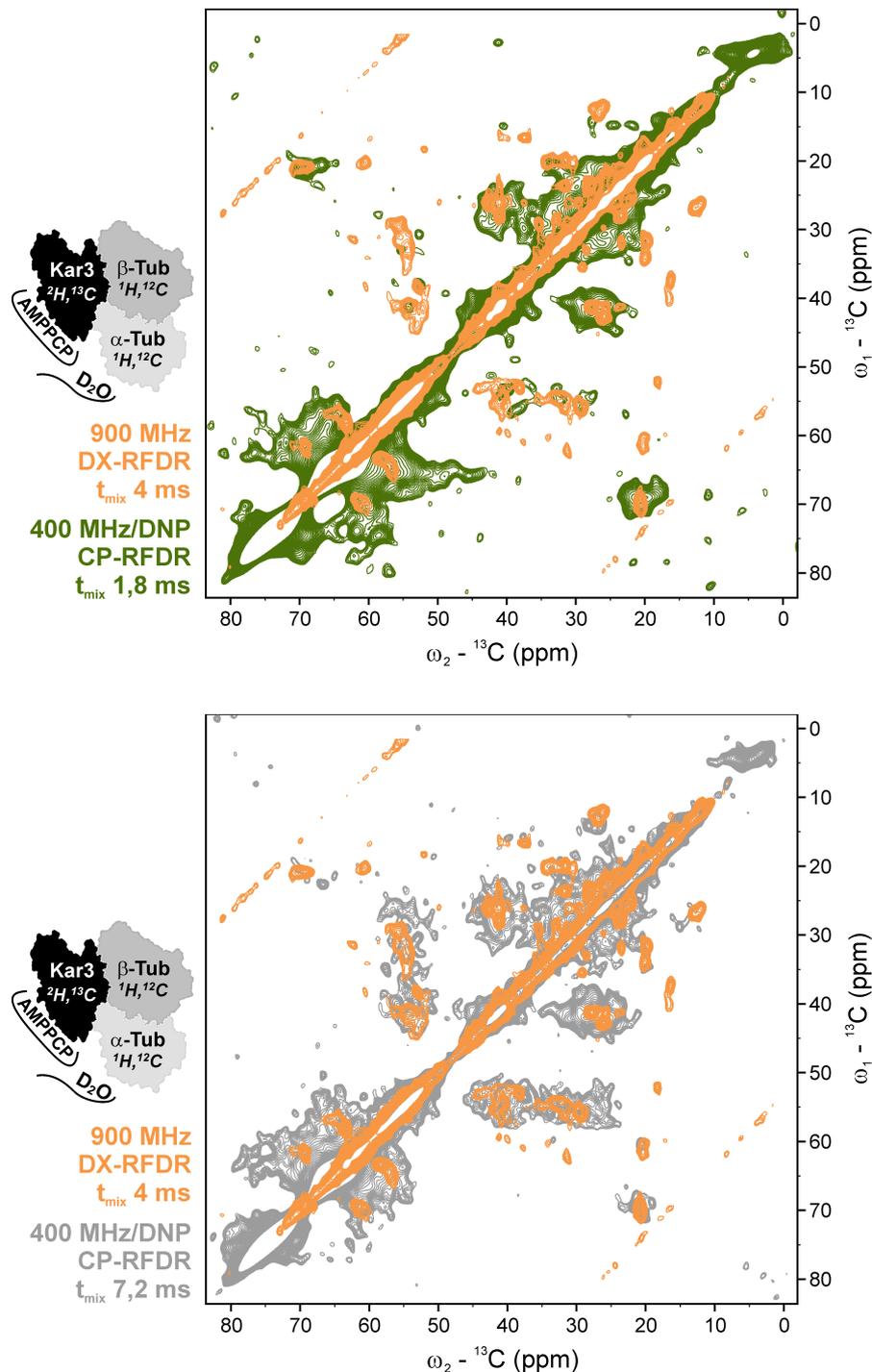


Abbildung 4.11: Überlagerungen des DX-RFDR-Spektrums (orange) mit CP-RFDR-Spektren unter DNP-Bedingungen. Die DNP-Spektren wurden bei 400 MHz und 95 K gemessen. Es wurden Mischzeiten von 1,8 ms (grün, oben) und 7,2 ms (grau, unten) verwendet. Das DX-RFDR-Spektrum bei 285 K wurde bei 900 MHz mit einer Mischzeit von 4 ms und einer Wartezeit von 25 s aufgenommen. Es wurde der deuterierte Komplex aus ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter, AMPPCP-gebundener Kar3-Motordomäne und Mikrotubuli betrachtet.

Das CP-RFDR-Spektrum mit langer RFDR-Mischzeit korrelierte wiederum mit dem konventionellen DX-RFDR-Spektrum (Abbildung 4.11). Die selektiveren Signale bei kurzer RFDR-Mischzeit überlagerten ebenfalls vergleichsweise gut.

4.3.3. Übereinstimmungen in RFDR- und TEDOR-Spektren

Das CP-RFDR-Spektrum mit langer Mischzeit zeigte eine hohe Anzahl überlappender Kreuzsignale. In Kombination mit einem TEDOR-Experiment konnten jedoch Kreuzsignale für Argininseitenketten identifiziert werden (Abbildung 4.12). Im RFDR-Spektrum erschienen im Carbonylbereich Kreuzsignale für C ζ -Atome von Argininen. Diese korrelierten mit Seitenketten-Stickstoffen der Arginine im TEDOR-Spektrum.

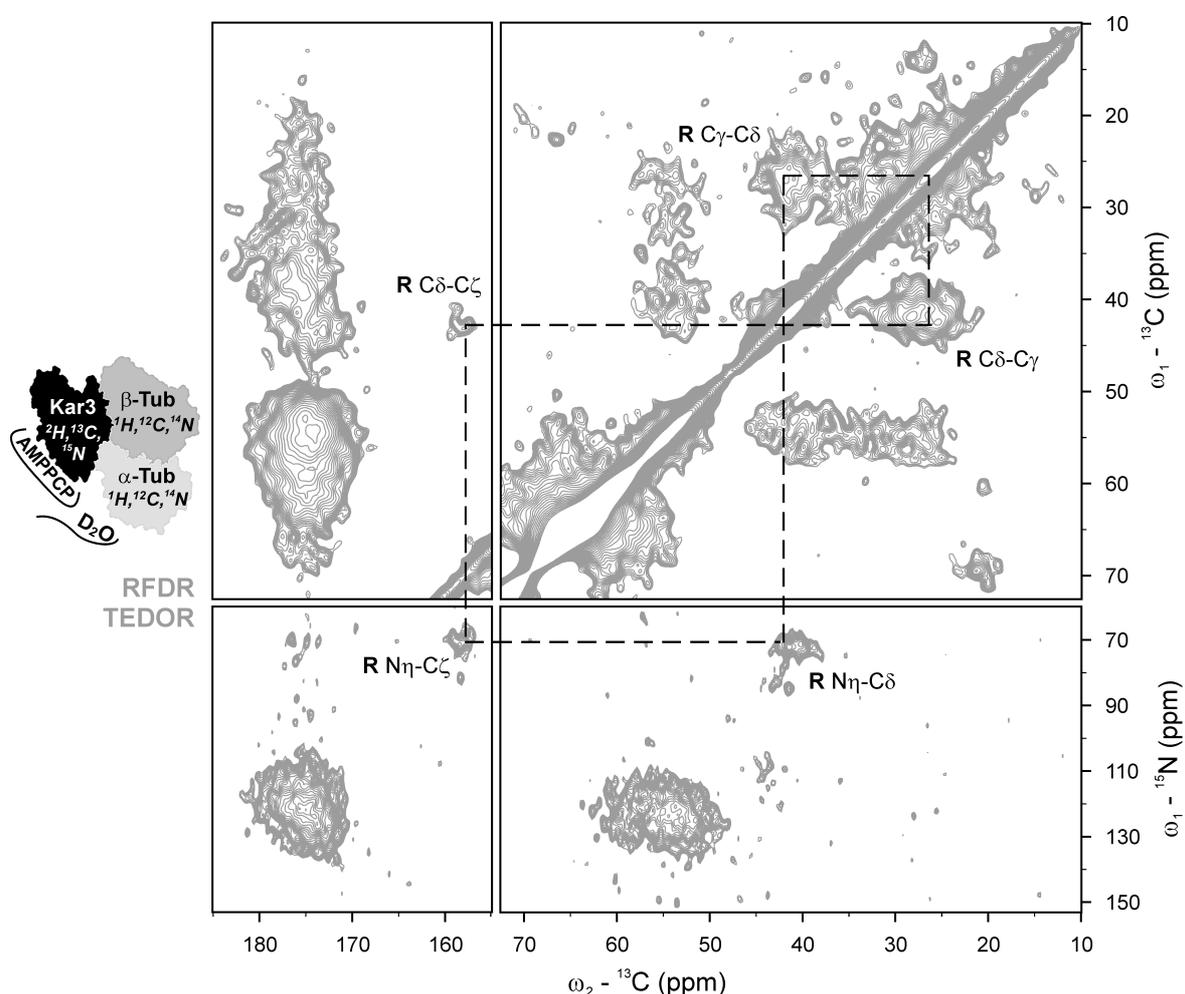


Abbildung 4.12: Mittels DNP erzeugte RFDR- (oben) und TEDOR-Spektren (unten) am deuterierten Komplex aus ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter, AMPPCP-gebundener Kar3-Motordomäne und Mikrotubuli. Es sind jeweils der Carbonylbereich und die aliphatische Region dargestellt. Die Kreuzsignale von mehreren Argininresten korrelieren in beiden Spektren. Die Spektren wurden bei 400 MHz und 95 K aufgenommen. Für das RFDR-Spektrum wurde eine CP-Kontaktzeit von 2 ms und eine Mischzeit von 7,2 ms verwendet. Das TEDOR-Spektrum wurde mit einer CP-Kontaktzeit von 1,5 ms und einer Mischzeit von 0,9 ms erzeugt.

4.3.4. Signalauflösung durch Doppelquanten-Koherenz

Um die technisch bedingte, schlechte Auflösung der Serine und Threonine zu umgehen, eignete sich ein Doppelquanten-Koherenzexperiment, das mit einer Post-C7-Sequenz aufgenommen wurde (Abbildung 4.13). Zwei Spins, die transversal zueinander angeordnet waren, wurden miteinander korreliert und ihre jeweiligen chemischen Verschiebungen addiert. Insbesondere für Isoleucin- und Threoninreste wurden beschränkte Signalsätze detektiert. Es wurden Signale für drei bis vier Isoleucine und mindestens fünf Threonine registriert. Überlagerungen im Bereich der Serinsignale konnte im Vergleich zu den RFDR-Spektren verbessert aber nicht aufgelöst werden.

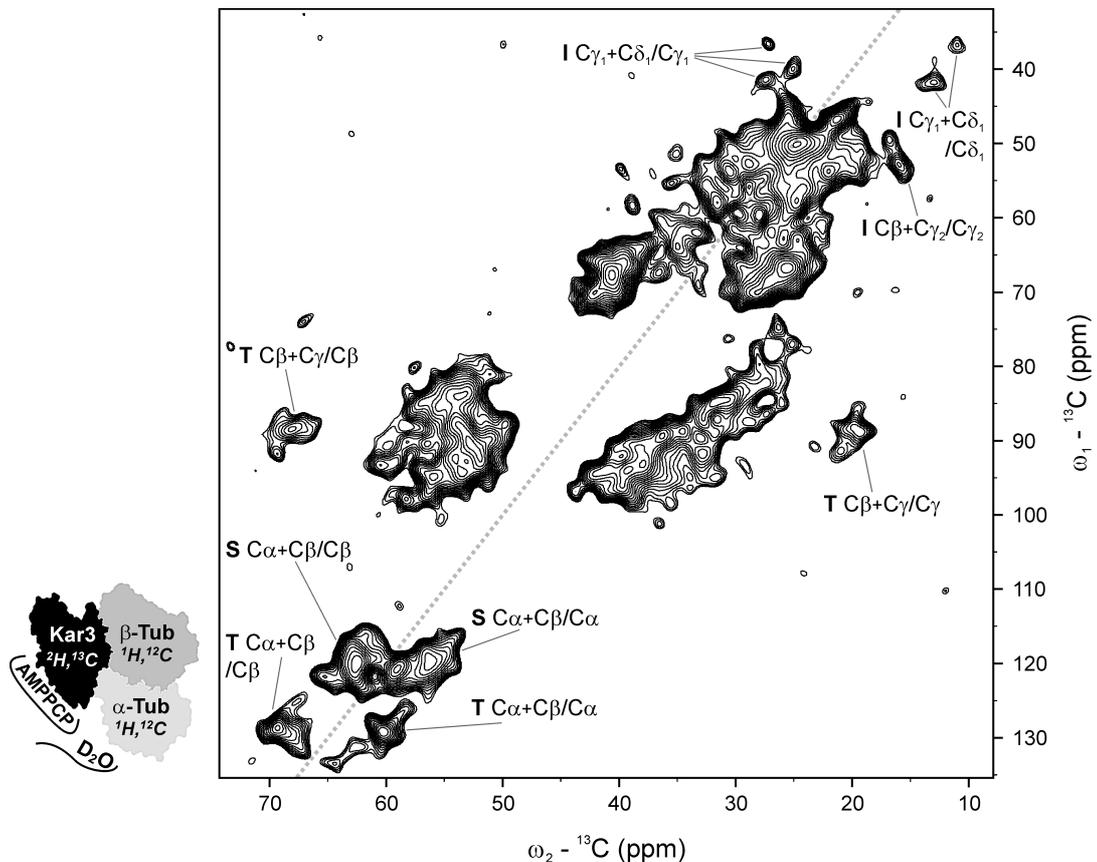


Abbildung 4.13: Post-C7-Spektrum der ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierten Kar3-Motordomäne im Komplex mit Mikrotubuli. Die chemische Verschiebung in der indirekten Dimension ω_1 stellt die Summe zweier gekoppelter Spins dar. Eine Diagonale wurde zur Orientierung eingefügt. Das Spektrum wurde unter DNP-Bedingungen bei 400 MHz, 95 K, einer CP-Kontaktzeit von 3 ms und einer Post-C7-Mischzeit von 1 ms aufgenommen.

4.3.5. Tripleresonanzexperimente im Hinblick auf sequentielle Zuordnungen

Die Signalverstärkung mittels DNP und die damit verbundene Messzeitverkürzung ermöglichten darüber hinaus zwei- und dreidimensionale Tripleresonanzexperimente. Speziell die 3D-Spektren hätten unter konventionellen Bedingungen hypothetisch 200 Tage

Messzeit beansprucht. Der Magnetisierungstransfer wurde durch Protonenanregung erzeugt. Somit sollten auch hier selektiv Kerne in protonierter Umgebung magnetisiert worden sein.

In 2D N(CA)CX und N(CO)CX-Experimenten wurde die Magnetisierung ohne CA- bzw. CO-Evolution auf Seitenketten-Kohlenstoffatome übertragen. Die 2D Spektren zeigten wiederum erhebliche, tiefentemperaturbedingte Signalüberlagerungen (*Abbildung 4.14*). Der N(CA)CX-Transfer erfolgte effektiver, wobei aliphatische Seitenketten bis hin zu Methylgruppensignalen detektiert wurden. Zudem wurden Signale identifiziert, die innerhalb von Lysin- und Argininseitenketten transferiert wurden. Der Transfer im N(CO)CX-Experiment erfolgte hingegen weniger effizient, da Carbonyl-Kohlenstoffatome im Vergleich zu C_{α} -Atomen weiter von den Seitenketten entfernt liegen. Die Abbildung aliphatischer Seitenketten beschränkte sich auf C_{β} -Kontakte. Es wurden Signale für Argininseitenketten und erwartungsgemäß keine Lysin signale beobachtet.

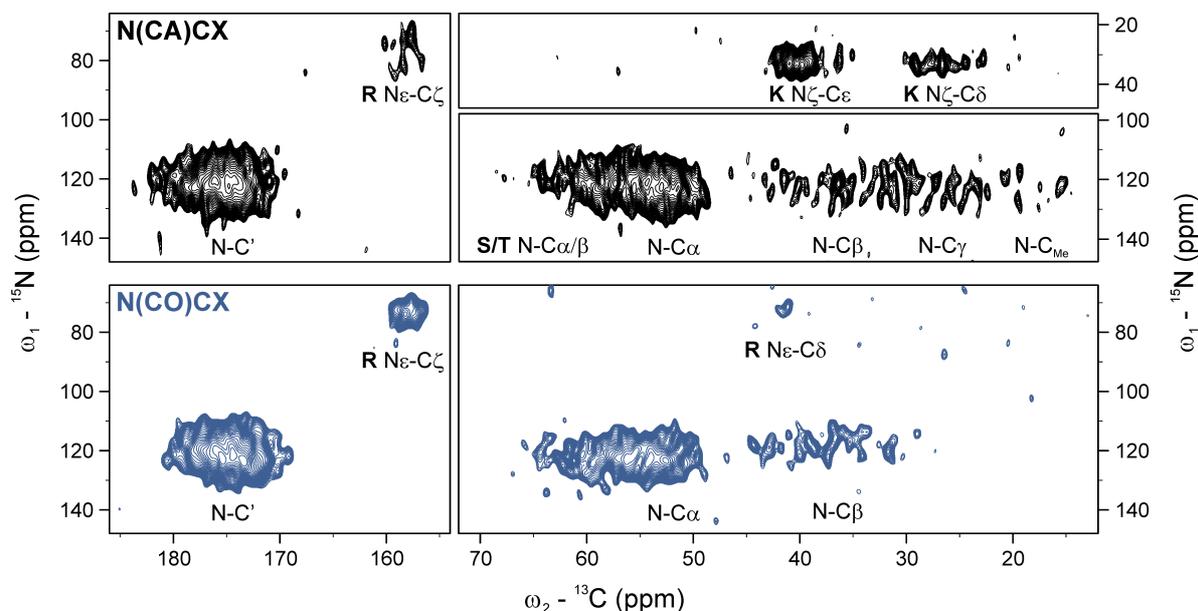


Abbildung 4.14: 2D N(CA)CX- (schwarz) und N(CO)CX-Spektren (blau), die unter DNP-Bedingungen generiert wurden. Es wurde ein deuterierter Komplex aus ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter, AMPPCP-gebundener Kar3-Motordomäne und Mikrotubuli verwendet. Beide Spektren wurden mit einer RFDR-Mischzeit von 3,6 ms bei 400 MHz und 95 K aufgenommen. Der HN-Transfer wurde jeweils mit einer CP-Kontaktzeit von 1 ms erzeugt. NCA- bzw. NCO-Übergänge erfolgten mit 4 ms bzw. 3 ms spezifischem CP.

Am Beispiel eines 3D NCACX-Experiments erfolgte eine erste Zuordnung spezifischer Aminosäurereste (*Abbildung 4.15*). In den zwei dargestellten ^{15}N -Schnitten wurden individuelle Spinsysteme identifiziert. Es wurden Signale der Aminosäuren Lysin, Arginin, Isoleucin, Serin, Threonin und Aspartat (KRISTD) nachgewiesen. Die relativ breite Diagonale überlagerte vorhandene Serin-Signale. Im aliphatischen Bereich wurden hingegen distinktierte Signale aufgelöst, die anhand charakteristischer, chemischer Verschiebungen zugeordnet wurden. Die Tieftemperaturmessung führte insbesondere für

die ^{15}N -Dimension zu stark verbreiterten Linien, so dass in dieser Dimension nur eine geringe Auflösung erzielt wurde. Das analoge 3D NCOCX-Experiment war informationsärmer, wobei keine annehmbare Auflösung in den ^{15}N - und ^{13}C -Dimensionen erreicht wurde. Auf eine Darstellung wurde hier verzichtet. Weiterführend müssten optimale Parameter zur Mischzeit und zu CP-Kontaktzeiten bestimmt werden.

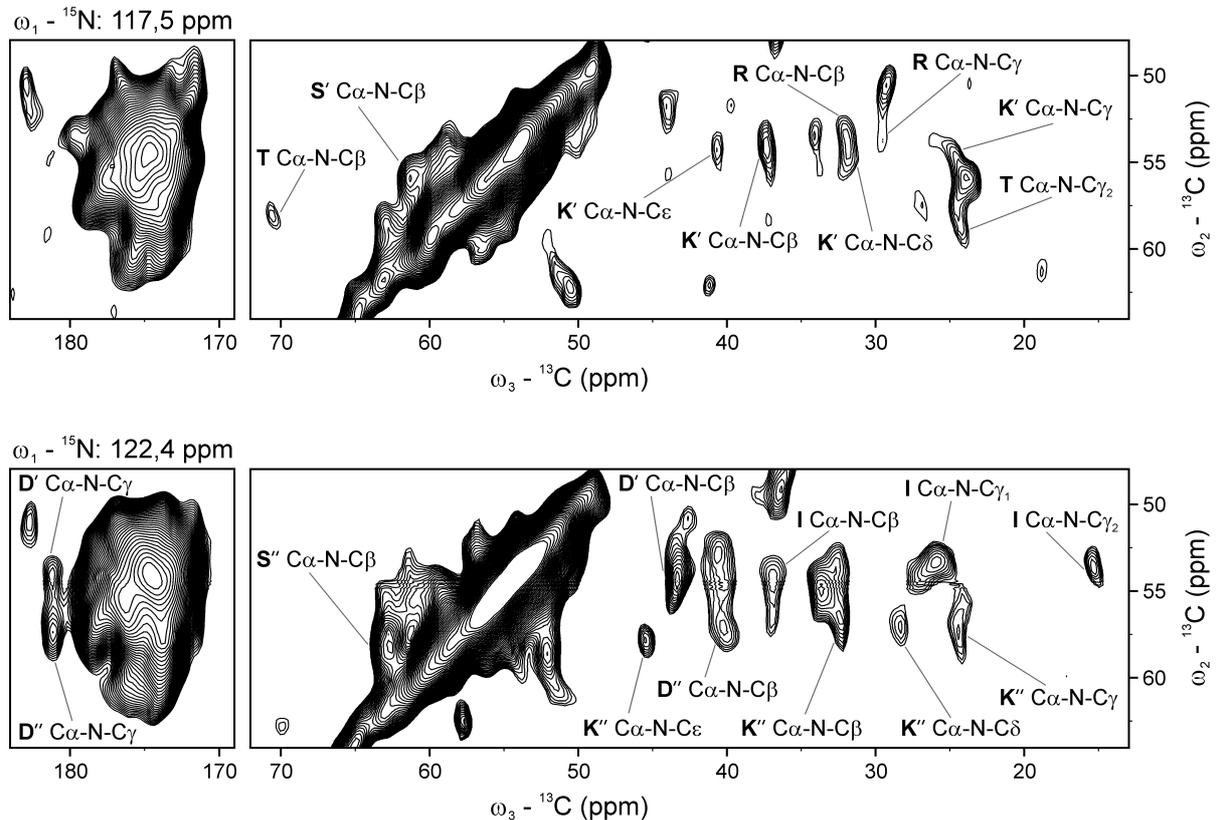


Abbildung 4.15: Ausschnitte eines unter DNP-Bedingungen aufgenommenen 3D NCACX. Es sind für zwei ^{15}N -Verschiebungen Carbonyl- und aliphatische Bereiche der ^{13}C - ^{13}C -Ebene dargestellt. Die individuellen Signale konnten bestimmten Aminosäuretypen zugeordnet werden. Die Messung erfolgte bei 95 K und 400 MHz. Der HN-Transfer wurde mit 1 ms CP-Kontaktzeit, der NCA-Transfer mit 4 ms spezifischem CP durchgeführt. Es wurde eine RFDR-Mischzeit von 3,6 ms verwendet. Es wurde ein deuterierter Komplex aus ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter, AMPPCP-gebundener Kar3-Motordomäne und Mikrotubuli betrachtet.

4.4. Einbettung in Strukturelle Betrachtungen

Ausgehend von veröffentlichten Kristallstrukturen der Kinesin-Motordomänen und Kryo-EM-Rekonstruktionen von Motordomänen-Mikrotubuli-Komplexen wurden die NMR-Resultate eingeordnet. Zwei artifizielle Effekte, die der Komplexorganisation geschuldet sind, galt es auszuschließen. Außerdem wurde die Interaktionsfläche näher untersucht.

4.4.1. Ausschluss eines Effekts der Nukleotidbindung

Die Nukleotidbindung im Kinesin erfolgt zum Teil über Aminosäuretypen, die in den gefilterten NMR-Experimenten nachgewiesen worden sind. Für die verwendeten Kinesine

KIF5C und Kar3 wurde die Interaktion mit ADP in den jeweiligen Kristallstrukturen der Motordomänen dargestellt (Abbildung 4.16). Das Nukleotid interagiert insgesamt mit vier konservierten Sequenzmotiven (N1-N4). Die in den Schaltern I und II enthaltenen Motive N2 (NEHSSR; konservierte Reste sind unterstrichen) bzw. N3 (DLAGSE) registrieren die γ -Phosphat-Präsenz und sind in der strukturellen Darstellung nicht enthalten. N1 (GQTS/GSGKT) erstreckt sich über Schleife L4 sowie die angrenzende Helix $\alpha 2$ und bindet das $\alpha\beta$ -Diphosphat. Der Übergang von Strang $\beta 1$ zu Schleife L1 umfasst Motiv N4 (RF/IRP), welches Kontakte zum Adenin ausbildet. Außerdem besteht eine Verbindung zwischen der Purinbase und einer aromatischen Aminosäure wie Histidin bzw. Phenylalanin, die in Helix $\alpha 2$ auf Motiv N1 folgt.

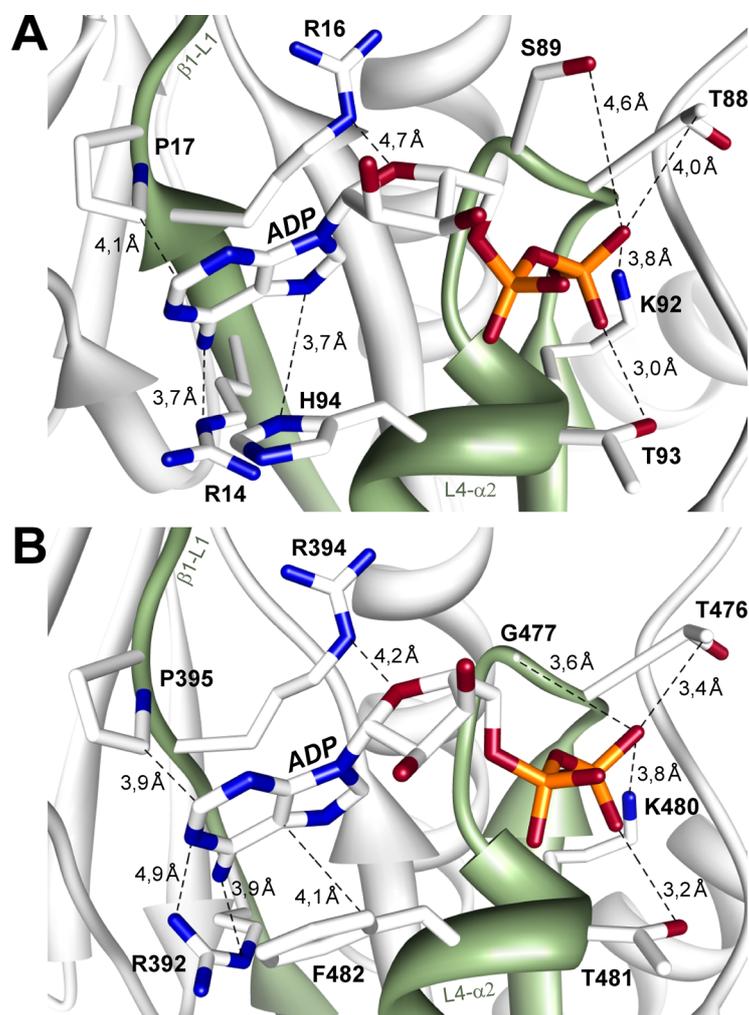


Abbildung 4.16: Nukleotidbindetaschen der Motordomänen von A) KIF5C (PDB 2kin; Sack *et al.*, 1997) und B) Kar3 (PDB 3kar; Gulick *et al.*, 1998). Es sind exemplarisch diverse Abstände zwischen dem gebundenen ADP und Resten der Strukturelemente $\beta 1$ -L1 und L4- $\alpha 2$ (grün) dargestellt.

Die hoch konservierten Aminosäuren Arginin, Lysin, Threonin und Serin finden sich in allen Kinesin-Nukleotidbindetaschen in räumlicher Nähe zum Nukleotid. Signale für ebendiese Reste fanden sich in den gefilterten Experimenten des Kar3-Motordomänen-

Mikrotubuli-Komplexes. Im KIF5C-Motordomänen-Mikrotubuli-Komplex wurden Signale für Lysin jedoch nicht für Arginin, Threonin und Serin nachgewiesen. Weitere konservierte Reste wie Glycin und Prolin wurden hingegen in den NMR-Experimenten nicht detektiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Komplexe mit zwei verschiedenen Nukleotidzuständen der Kar3-Motordomäne untersucht (Vergleich: *Abbildungen* 4.5 und 4.6, Kapitel 4.2., Seiten 73 und 74). Nukleotid-freie wie auch AMPPCP-gebundene Motordomänen besitzen eine hohe Affinität zu Mikrotubuli. Der Nukleotid-freie Zustand wurde durch die Zugabe von EDTA erzeugt. In beiden Nukleotidzuständen wurde mittels CP-RFDR die gleiche Anordnung an Kreuzsignalen detektiert (*Abbildung* 4.17). Eventuell intrinsisch gebundene Nukleotide, die noch aus der Expression in *E. coli* stammen würden, wären ebenfalls isopenmarkiert und würden keinen Magnetisierungstransfer erzeugen. In Summe wird also davon ausgegangen, dass die gefilterten Kreuzsignale, nicht durch die Nukleotidbindung verursacht wurden.

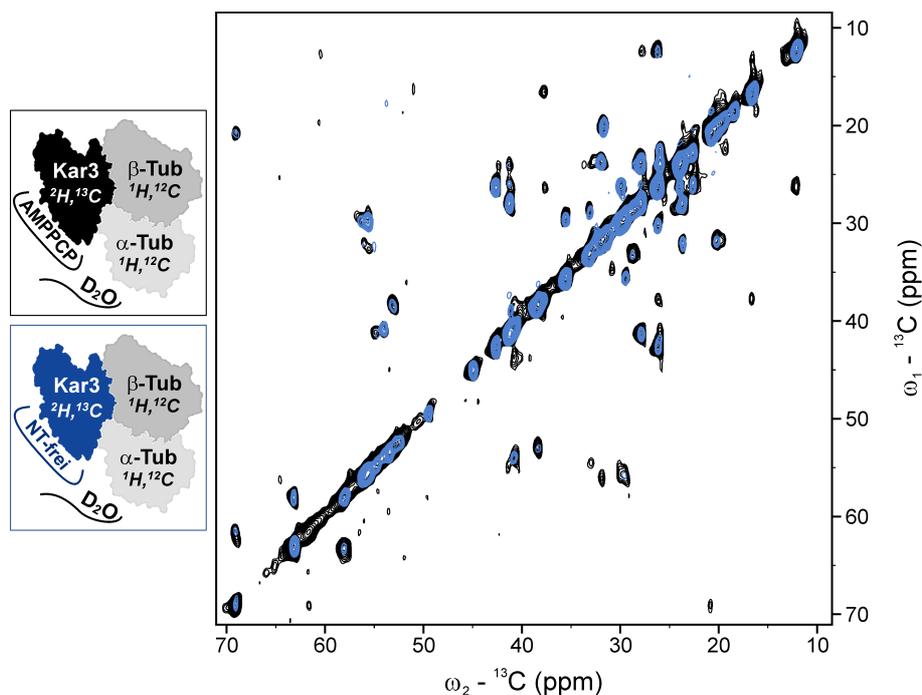


Abbildung 4.17: CP-RFDR-Spektren von Komplexen aus Mikrotubuli und ${}^2\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$ - ${}^{15}\text{N}$ -markierten Kar3-Motordomänen in verschiedenen Nukleotidzuständen. Es wurden AMPPCP-gebundener (schwarz) und Nukleotid-freier (blau) Zustand verglichen. Beide Spektren wurden bei 900 MHz mit einem CP von 3 ms und einer Mischzeit von 4 ms aufgenommen.

4.4.2. Ausschluss von Pipes-Artefakten

Die Komplexpräparationen erfolgten in PEM-Puffer (pH 6,8), dessen Hauptbestandteil 100 mmol/L Pipes (Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)) war. In einer Kristallstruktur der Motordomäne des Centromer-assoziierten Proteins E (CENP-E) wurde eine Dichte identifiziert, die anhand der verwendeten Kristallisationszusätze mit Pipes gefüllt wurde

(Garcia-Saez *et al.*, 2004). Pipes wurde in räumlicher Nähe zu N259, S262 und R260 in Helix α_4 , I134 und E137 in Schleife L7 sowie K287 in Helix α_5 orientiert (Abbildung 4.18).

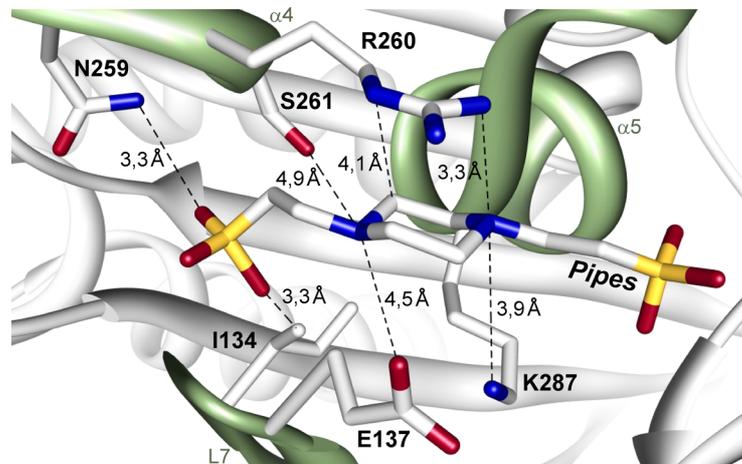


Abbildung 4.18: Bindung des Puffermoleküls Pipes an die Motordomäne von CENP-E (PDB 1t5c; Garcia-Saez *et al.*, 2004). Es sind exemplarisch diverse Abstände zwischen dem gebundenen Pipes und Resten der Strukturelemente α_4 , α_5 und L7 (grün) dargestellt.

Von den bisher veröffentlichten 75 Kristallstrukturen (Stand: April 2011) wurden fünf Strukturen mit Pipes kristallisiert. Nur in der Struktur der CENP-E Motordomäne wurde Pipes gebunden. In einer KIF11/Eg5-Kristallisation wurde ebenfalls eine Dichte in der gleichen Region festgestellt (PDB 1ii6; Turner *et al.*, 2001). Hier wurden zwei Moleküle Nitrat eingepasst, da dem Kristallisationspuffer auch Natriumnitrat zugesetzt wurde. In den Monomer- und Dimerstrukturen der KIF5C-Motordomäne (PDB 2kin, 3kin) wurde keine zusätzliche Dichte identifiziert. Ebenso wurde für die Ncd-Motordomäne keine Pipes-Bindung während der Kristallisation beobachtet (Sablin *et al.*, 1996). In einer kürzlich publizierten Modellierungsstudie wurde eine Pipes-Bindung erneut thematisiert (Zhang, 2010). Es wurden für die Motordomäne von KIF11/Eg5 vier Bindetaschen postuliert, an die u.U. neue spezifische Inhibitoren binden könnten. Eine der Bindetaschen entsprach der Pipes-Bindestelle in der CENP-E Kristallstruktur.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine eventuelle Pipes-Bindung an die Motordomänen von KIF5C und Kar3 untersucht. Mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie wurden Sättigungstransfer-Differenz (STD)-Experimente durchgeführt und eine Titration mit ^{15}N - ^1H -TROSY-Spektren analysiert. Zudem wurde die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) genutzt.

- **Keine Bindung in STD-Experimenten**

In STD-Experimenten werden selektiv Proteinsignale angeregt. Liganden, die an derart gesättigte Proteine gebunden sind, werden ebenfalls gesättigt. Dissoziiert der Ligand kann dessen Sättigung im NMR-Spektrum detektiert werden. Bildet man die Differenz aus Spektren mit und ohne Proteinsättigung, erhält man nur Signale von zuvor

proteingebundenen Liganden. Nicht bindende Substanzen zeigen keine Signale im Differenzspektrum (Meyer und Peters, 2003).

Es wurde eine potenzielle Pipes-Assoziation an die Motordomänen von KIF5C und Kar3 untersucht (Abbildung 4.19). Pipes wurde in einem 100-fachen molaren Überschuss im Vergleich zur Kinesin-Motordomäne eingesetzt. Es wurde unmarkiertes Protein verwendet und unter deuterierten Bedingungen gearbeitet. Die Ergebnisse wurden mit Spektren einer analogen, aber proteinfreien Pipes-Probe verglichen. In ^1H -Spektren erzeugte Pipes Multipletts bei drei verschiedenen chemischen Verschiebungen (Abbildung 4.19A). Ein relativ breites Signal um 2,70-2,90 ppm entsprach den Protonen des Piperazinrings. Die angrenzenden Methylengruppen-Protonen erschienen bei 2,92-2,95 ppm und 3,05-3,09 ppm. STD-Spektren wurden bei Einstrahlfrequenzen von -3500 Hz und -1000 Hz gemessen (Abbildung 4.19B,C). Die verbliebenen Signale waren zumeist Subtraktionsartefakte, die bei 2,93 ppm und 3,06 ppm erzeugt wurden. Die proteinfreie Kontrolle und die proteinhaltigen Pipes-Proben ergaben je nach Einstrahlfrequenz durchaus vergleichbare Differenzspektren. Es konnte also mittels STD keine Bindung von Pipes an die Motordomänen von KIF5C und Kar3 festgestellt werden.

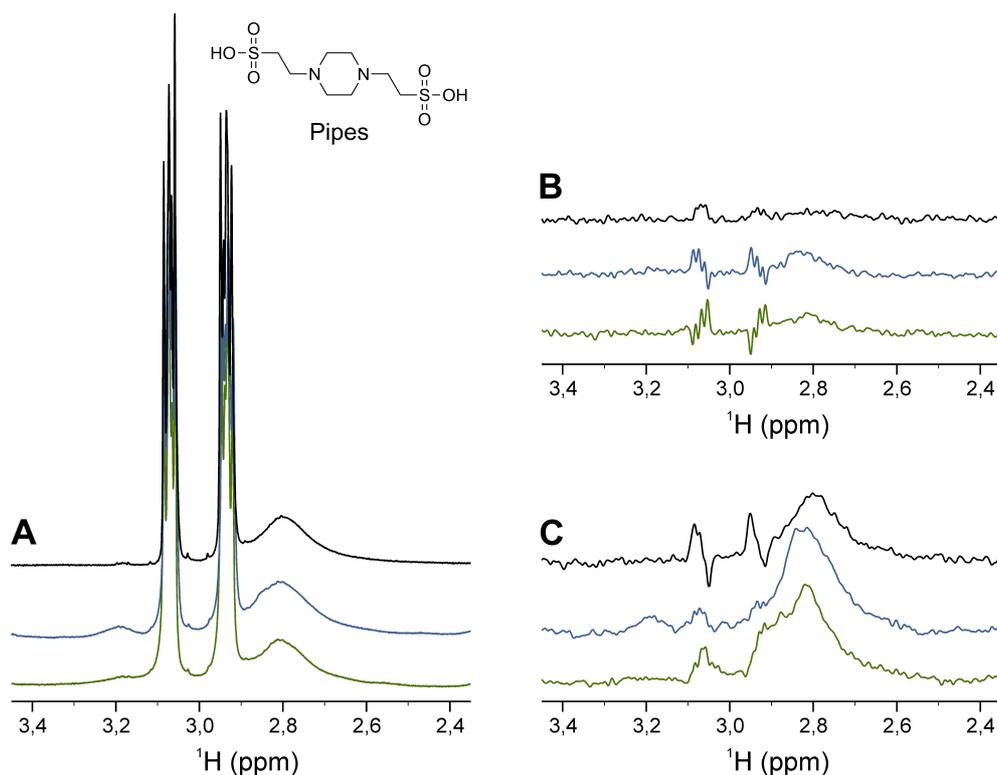


Abbildung 4.19: Bindungsuntersuchung mittels STD-NMR-Spektroskopie. Die ^1H -Spektren von drei verschiedenen Proben wurden untersucht: Pipes (schwarz), Pipes und KIF5C-Motordomäne (blau) sowie Pipes und Kar3-Motordomäne (grün). Eine Proteinkonzentration von 50 $\mu\text{mol/L}$ und je 5 mmol/L Pipes wurden eingesetzt. A) Wasserunterdrückung mittels WATERGATE ohne STD. B) STD mit einer Einstrahlfrequenz von -3500 Hz. C) STD mit einer Einstrahlfrequenz von -1000 Hz. Die Kurven in B und C sind im Vergleich zu A 10-fach vergrößert dargestellt. Es wurde bei 293 K und einer Protonenfrequenz von 600 MHz gemessen.

- **Kein Effekt in Titrationsexperimenten**

Für Titrationsexperimente wurde eine uniform ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierte KIF5C-Motordomäne in 90% H_2O / 10% D_2O -Umgebung verwendet. Auf diese Weise wurden in den austauschbaren Positionen Deuterone gegen Protonen ersetzt. In ^{15}N - ^1H -TROSY-Spektren wurden die Amidprotonen der KIF5C-Motordomäne zweidimensional dargestellt (Abbildung 4.20).

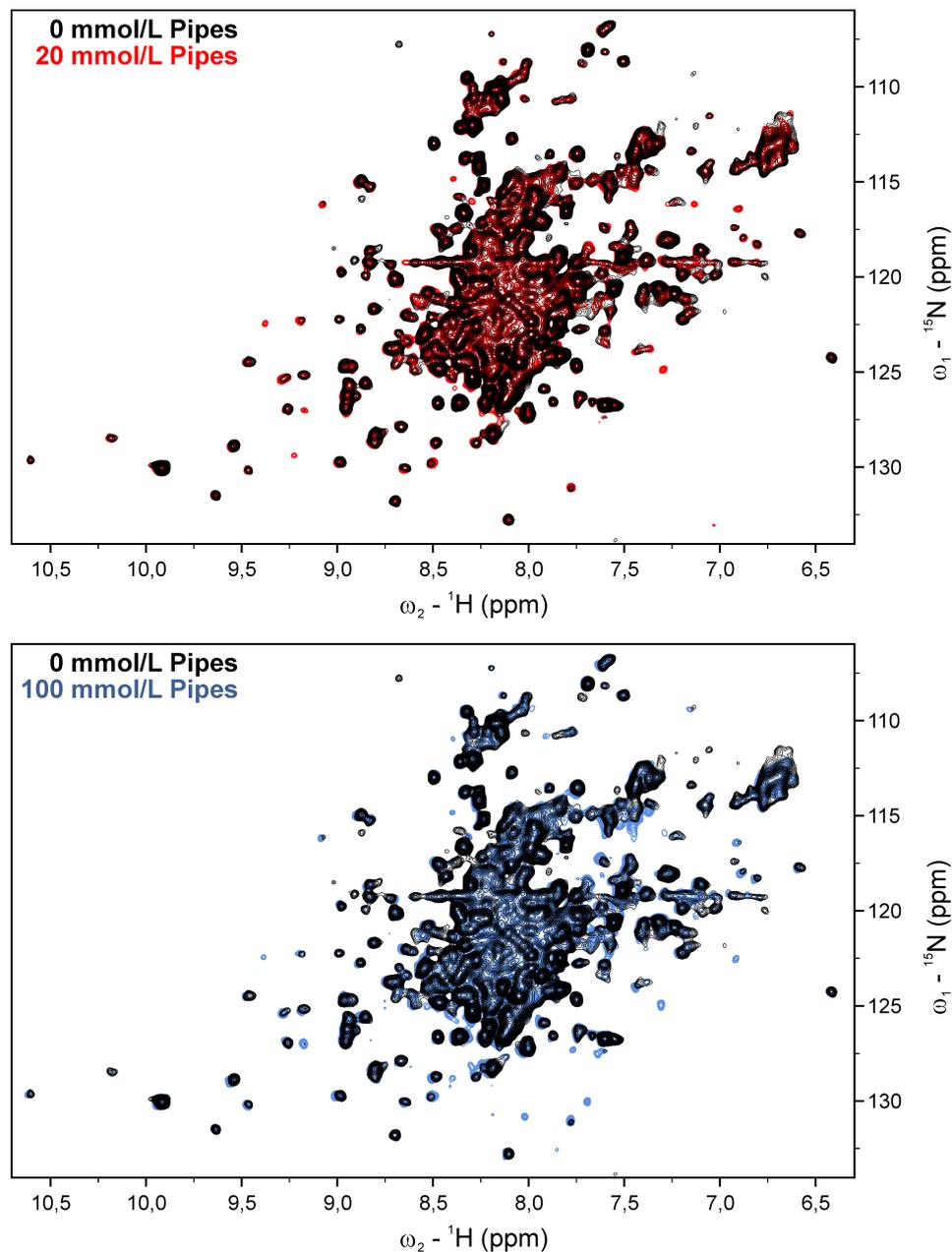


Abbildung 4.20: ^{15}N - ^1H -TROSY-Spektren der ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierten KIF5C-Motordomäne in Phosphatpuffer (90% H_2O / 10% D_2O , Proteinkonzentration 290 $\mu\text{mol/L}$). Eine mögliche Bindung von Pipes wurde mittels Titration untersucht: 0 mmol/L (schwarz), 20 mmol/L (rot), 100 mmol/L (blau). Es wurde bei 293 K und einer Protonenfrequenz von 600 MHz gemessen.

Sowohl mit 70-fachem (20 mmol/L Pipes) als auch mit 350-fachem Überschuss (100 mmol/L Pipes) konnten im Vergleich zum Pipes-freien Experiment keine signifikanten

Verschiebungen einzelner Signale beobachtet werden. Auch mit dieser Methode wurde eine eventuelle Pipes-Bindung nicht nachgewiesen.

- **Kein Nachweis durch isotherme Titrationskalorimetrie**

Bei einer Protein-Liganden-Interaktion wird Wärme aufgenommen oder abgegeben. Mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) wird die Leistung registriert, die für den Temperatursausgleich zu einer Referenzzelle benötigt wird. Durch Integration kann die Reaktionswärme der Interaktion bestimmt werden.

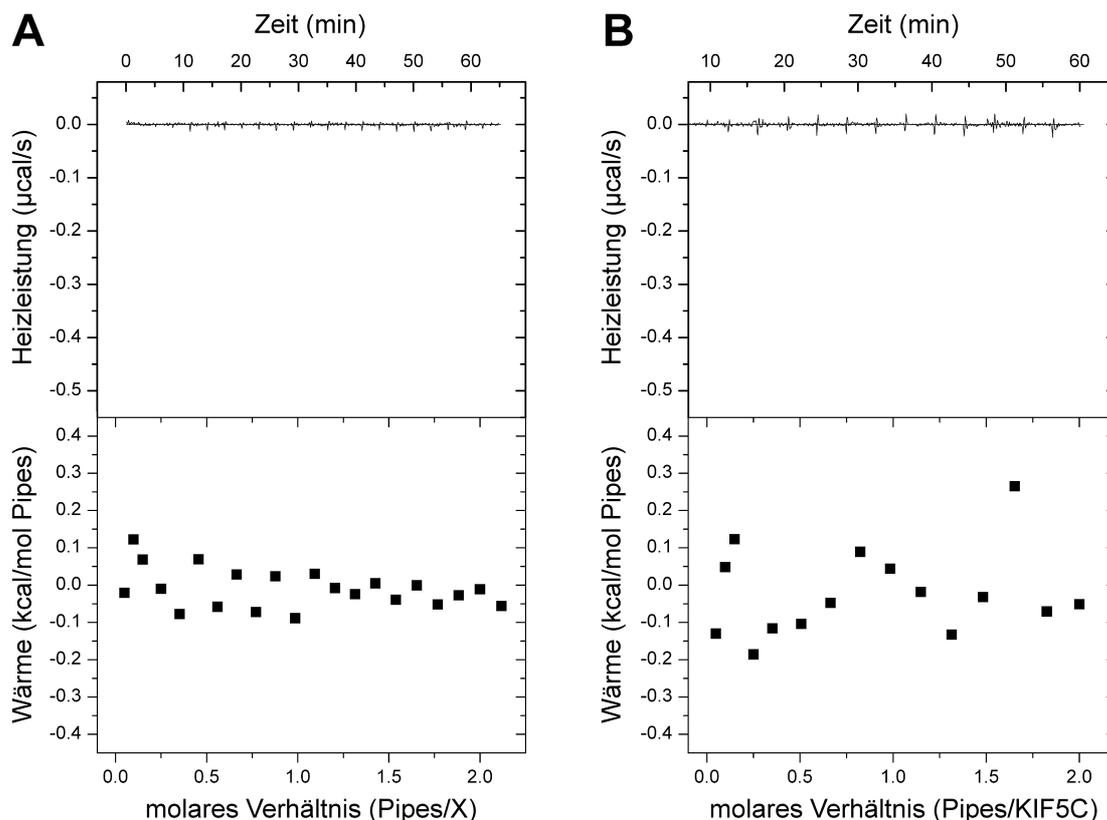


Abbildung 4.21: Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Bindungsuntersuchung zwischen Pipes und KIF5C-Motordomäne. A) Verdünnungsexperiment mit Pipes (2 mmol/L). B) Titration von Pipes (2 mmol/L) zu 200 µmol/L KIF5C-Motordomäne. Die pro Injektion aufgebrauchte Heizleistung wurde zeitabhängig registriert (oben). Die von der Pipes-Konzentration abhängige Reaktionswärme wurde durch Flächenintegration berechnet (unten).

Es wurde eine mögliche Interaktion von Pipes und der KIF5C-Motordomäne mittels ITC untersucht (Abbildung 4.21). Proteinlösung bzw. reiner Puffer wurde in der Messkammer vorgelegt. Pipes in 10-fach molarem Überschuss wurde in Intervallen aus einer Injektionsspritze zugesetzt. Im initialen Verdünnungsexperiment wurde Pipes zum proteinfreien Puffer titriert (Abbildung 4.21A). Dabei konnte eine minimale Verdünnungswärme registriert werden, die 0,1 kcal/mol Pipes nicht überstieg. Bei der Titration von Pipes zur Proteinlösung wurden ebenfalls nur geringe Heizleistungen aufgezeichnet (Abbildung 4.21B). Die berechnete Reaktionswärme schwankte im Mittel um

0,2 bis -0,2 kcal/mol Pipes. Ein typischer sigmoidaler Verlauf, z.B. mit einem Wendepunkt bei einem äquimolaren Verhältnis von Pipes und KIF5C-Motordomäne, war nicht nachweisbar. Dementsprechend konnte keine Bindung von Pipes an die Motordomäne festgestellt werden. Auf Berechnungen zur Reaktionsenthalpie und Bindungsaffinität wurde unter diesen Umständen verzichtet.

In Summe konnte mit drei verschiedenen Methoden keine Bindung von Pipes an die Kinesin-Motordomäne von KIF5C nachgewiesen werden. STD-Experimente zeigten zudem keine Assoziation mit der Kar3-Motordomäne.

4.4.3. Illustration der Interaktionsfläche der Motordomänen

Zwei mögliche Artefakte wurden als Erklärung der NMR-Resultate ausgeschlossen. Nun galt zu belegen, ob mit den NMR-Experimenten die Mikrotubuli-Interaktionsflächen der Kinesin-Motordomänen gefiltert werden konnten. Für strukturelle Betrachtungen wurde auf vorhandene Kryo-EM-Daten zurückgegriffen. Um den Fokus auf die hier verwendeten Motordomänen zu legen, wurden die Kristallstrukturen von KIF5C (PDB 2kin) und Kar3 (PDB 3kar) genutzt, um die Mikrotubuli-Interaktion abzubilden. Die KIF5C-Motordomäne wurde in die Kryo-EM-Struktur des Komplexes der homologen, humanen KIF5B-Motordomäne und Mikrotubuli (PDB 2p4n, EMDB 1340) modelliert. Von Kar3-Motordomänen-dekorierten Mikrotubuli existieren Kryo-EM-Daten in diversen Nukleotidzuständen, die von Dr. Keiko Hirose zur Verfügung gestellt wurden (Hirose *et al.*, 2006).

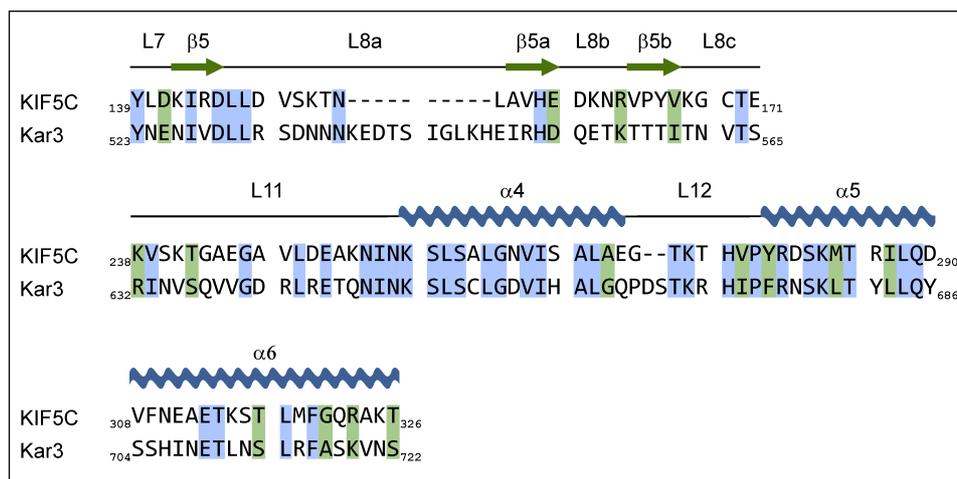


Abbildung 4.22: Homologievergleich der Mikrotubuli-bindenden Regionen der Kinesine KIF5C und Kar3. Die Strukturelemente L7-β5-L8 bilden Kontakte zu β-Tubulin aus. In L11-α4-L12-α5 ist Schalter II inklusive der Relais-Helix α4 enthalten. Dieser Bereich interagiert mit beiden Tubulin-Untereinheiten, wobei die Relais-Helix zwischen α- und β-Tubulin orientiert ist. Helix α6 ist in räumlicher Nähe zu α-Tubulin orientiert. Identische (blau) und ähnliche Reste (grün) wurden hervorgehoben.

Die Kinesin-Motordomänen von KIF5C und Kar3 sind zu 30% identisch. Betrachtet man nur die Mikrotubuli-bindenden Sequenzen, ergibt sich ein Anteil identischer Aminosäurepositionen von 33% (*Abbildung 4.22*). Die Mikrotubuli-Bindung erfolgt in den Kryo-EM-Rekonstruktion jeweils über drei Sequenzabschnitte. Es sind die Aminosäurereste der Interaktionsfläche von Interesse, die sich in räumlicher Nähe zu α - und β -Tubulin befinden. Mit Hilfe von Chimera wurden die Aminosäurereste der modellierten Komplexe bestimmt, die in der jeweiligen Motordomäne Kontakte zum Mikrotubulus ausbilden (*Abbildung 4.23*).

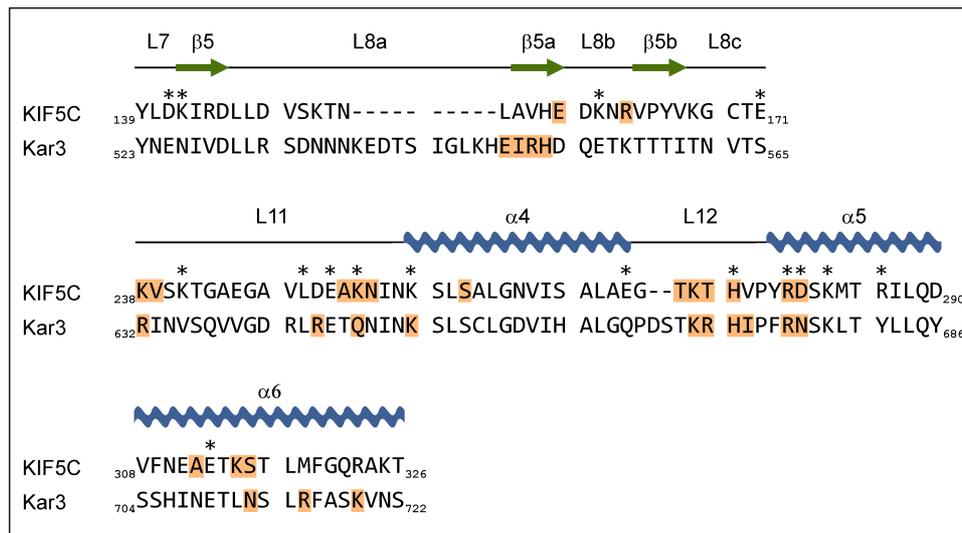


Abbildung 4.23: Sequenzvergleich der Mikrotubuli-bindenden Regionen der Kinesine KIF5C und Kar3. Darstellung der Aminosäuren (orange), die anhand von Kryo-EM-Daten und Modellierungen mit α - und β -Tubulin interagieren. Zudem sind die Reste markiert (*), die in einer Alanin-Mutagenese-Studie der humanen KIF5B-Motordomäne, veränderte ATPase-Aktivitäten verursachten (Woehlke *et al.*, 1997).

Der Anteil basischer Aminosäuren ist speziell für die Kar3-Motordomäne hoch. Es wurden drei Lysine und sechs Arginine mit Orientierung zum Tubulin festgestellt. Im Vergleich dazu sind in der KIF5C-Motordomäne vier Lysine sowie zwei Arginine zum Tubulin gerichtet. Dieser Aspekt könnte die deckungsgleichen Lysinsignale und Kar3-spezifischen Argininsignale im CP-RFDR-Spektrum erklären (Vergleich *Abbildung 4.7*). Als weitere Übereinstimmungen wurden mindestens ein Glutamat in beiden Kristallstrukturen sowie zwei, auf Kar3 beschränkte Isoleucine identifiziert, die Kontakte zum Tubulin ausbilden. Abweichend sind hingegen diverse Valine, Serine und Threonine nur in der KIF5C-Kristallstruktur in räumlicher Nähe zum Tubulin orientiert. Ob in den gefilterten NMR-Spektren tatsächlich interagierende Reste abgebildet wurden, kann allerdings erst eine sequentielle Zuordnung zweifelsfrei belegen.

Aminosäuren, die in einer Alanin-Mutagenese-Studie der humanen KIF5B-Motordomäne hervorstachen, sind besonders auf Schleife L11 und Helix α 5 konzentriert (Woehlke *et al.*, 1997). Vier der 16 Reste bilden in den Komplexmodellen Kontakte zu Resten der Tubulin-

Untereinheiten. Ein zu 100% konservierte Arginin, das in der Mutagenese-Studie den größten Effekt erzielte, ist in beiden Komplexmodellen zum β -Tubulin gerichtet (*Abbildung 4.24*). R280 (KIF5C) und R676 (Kar3) der Helix $\alpha 5$ befinden sich dabei in räumlicher Nähe zu sauren Aminosäuren (E196 bzw. D427). Eine elektrostatische Wechselwirkung ist wahrscheinlich. Umgekehrt könnten positive Ladungen in der selben Umgebung einen gegenteiligen Effekt bedingen. Der Translokationsprozess der Kinesin-Motordomänen ließe sich mit einem dynamischen Wechselspiel aus Anziehung und Abstoßung anschaulich erklären.

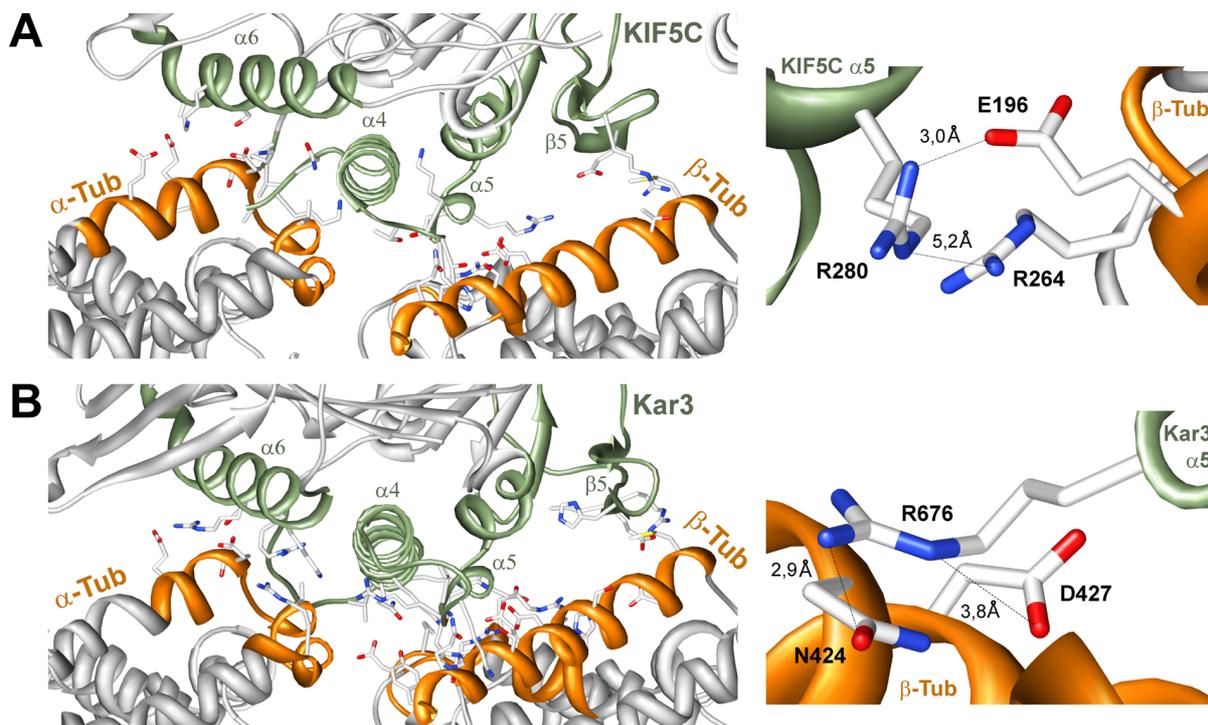


Abbildung 4.24: Interaktion der Mikrotubuli (Kinesin-interagierende Bereiche in Orange) und der Kinesin-Motordomänen von A) KIF5C und B) Kar3 (Mikrotubuli-bindende Regionen in Grün). Beide Motordomänen sind im Vergleich zum Tubulin unterschiedlich orientiert. Für das hochkonservierte Arginin R280 (KIF5C) bzw. R676 (Kar3) wurden Detaildarstellungen angefertigt.

Im Strukturvergleich der zwei Modelle wird deutlich, dass die Motordomänen verschieden orientiert sind (*Abbildung 4.24*). Speziell Relais-Helix $\alpha 4$ sowie $\alpha 6$ sind unterschiedlich ausgerichtet. Unter Umständen könnte es sich um eine Divergenz zwischen N- und C-terminalen Motordomänen handeln. Zudem müssen die vorgestellten Modelle kritisch betrachtet werden. Ausgehend von den bekannten Kristallstrukturen sind der Modellierung Grenzen gesetzt. Im Interaktionsbereich wird vermutlich eine gewisse Flexibilität weitere Kontakte entstehen lassen sowie vorhandene, teils kollidierende Interaktionsreste optimaler ausrichten. Für die Tubulin-Untereinheiten fehlen in den Kristallstrukturen die flexiblen, stark negativ geladenen C-Termini, die die Interaktion wiederum beeinflussen werden. Ein genaues, strukturelles Abbild der Wechselwirkung und

der dynamischen Prozesse wird in den kommenden Jahren durch die Weiterentwicklung strukturgebender Verfahren sicherlich möglich sein. Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein Schritt in diese Richtung unternommen.

4.5. Perspektiven weiterer Untersuchungen

4.5.1. NMR-spektroskopische Erweiterungen

Welche Aminosäurereste selektiv abgebildet wurden, könnte eine zumindest partielle Zuordnung der jeweiligen Motordomäne aufklären. Für 40 kDa große Proteine wie die Kinesin-Motordomänen, sollte dies durch Entwicklung leistungsstarker Methoden zukünftig möglich sein. Eine Kombination aus Festkörper-MAS- und Lösungs-NMR-Spektroskopie könnte zum Ziel führen. Generell besteht eine gute Deckungsgleiche der chemischen Verschiebungen, die mittels Lösungs- und Festkörper-NMR-Spektroskopie detektiert werden. Die chemischen Verschiebungen für ^{13}C -Kerne weichen bis zu 1 ppm ab, die für ^{15}N -Kerne variieren um etwa 2 ppm (Werner *et al.*, 2007). Schon heute liefern geeignete Lösungs-NMR-Experimente wie z.B. 3D HNCACB und 3D HN(CO)CACB ein Abbild des Peptidrückgrats (Grzesiek und Bax, 1992a,b). Entsprechende Lösungs-NMR-Experimente sollten für die Zuordnung der Festkörper-NMR-Daten in Betracht gezogen werden. Wie die TROSY-Spektren an uniform ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierter KIF5C-Motordomäne zeigten, wurden bereits zweidimensional bestimmte Regionen relativ gut ausgelöst (Vergleich: *Abbildung* 4.20, Kapitel 4.4.2., Seite 88).

Für Festkörper-MAS-NMR-Untersuchungen bedarf es neuer Pulsprogramme und technischer Entwicklungen, mit denen schmalere Linienbreiten erzeugt werden können. Ziel ist es, Signalüberlagerungen aufzulösen und sequentielle Zuordnungen zu ermöglichen. Die Linienbreite in ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen kann z.B. mit optimierten Kontrollsequenzen verringert werden (Kehlet *et al.*, 2011). Durch Realisierung weiterer sequentieller Experimente wie z.B. 4D CANCECOX-Pulssequenzen könnte man eventuell benachbarte Spinsysteme identifizieren und zumindest eine partielle Zuordnung durchführen (Franks *et al.*, 2007). Eine bessere Signalauflösung in ^2H - ^{13}C -Korrelationen könnte mit Pulsprogrammen erfolgen, in denen Deuterium durch Doppelquanten-Koherenz angeregt wird (Agarwal *et al.*, 2009). Mit einer zusätzlichen ^{13}C - ^{13}C -Mischsequenz können 3D-Spektren aufgenommen werden, die eine Zuordnung ermöglichen würden (Lalli *et al.*, 2011). Außerdem kann mit höheren Entkopplungsstärken oder ultraschnellen MAS-Rotationsfrequenzen (>50 kHz) eine bessere Auflösung erreicht werden (Ernst *et al.*, 2004). Unter DNP-Bedingungen kommt ein Tieftemperatureffekt hinzu. DNP-Messungen bei höheren Temperaturen würden jedoch eine geringere Signalverstärkung bewirken. Es

müsste eine optimale Temperatur für eine hohe Auflösung gefunden werden, bei der noch ausreichend Signalverstärkung erreicht wird (Akbej *et al.*, 2010a).

4.5.2. Variationen in der Komplexpräparation

Ausgehend von den vorgestellten Resultaten werden gegenwärtig von Florian Seiter, der das Projekt weiterführt, drei Arginin-Mutanten der Kar3-Motordomäne hergestellt. Einer der Kandidaten ist das zu 100% konservierte R676 aus Schleife L12, welches auch den größten Effekt in einer Alanin-Mutagenese-Studie zeigte (Woehlke *et al.*, 1997). Außerdem wird das zu Schalter II gehörende, zu 95% konservierte R632 untersucht. Es bildet eine Verbindungen zwischen Mikrotubuli-Bindung und ATPase-Aktivität. Als dritter Kandidat wurde R715 gewählt. Über Wasserstoffbrückenbindung interagiert R715 mit E415 im α -Tubulin. Alanin-Substitution anstelle dieses Glutamatrestes bewirkte eine schwächere ADP-Freigabe im Kinesin (Uchimura *et al.*, 2010).

Bisher wurde mit monomeren Motordomänen gearbeitet. Es sind aber durchaus analoge Experimente mit dimerisierten Motordomänen von Interesse. Als Beispiel sei hier die dimerisierte Form zweier KIF5C-Motordomänen genannt, die durch eine C-terminale Verlängerung um 25 Aminosäuren erzeugt werden kann (Kozielski *et al.*, 1997a). Mit derartigen Proben könnten dynamische Prozesse in den Vordergrund gerückt werden. Außerdem stehen weitere Betrachtungen verschiedener Nukleotidzustände zur Diskussion.

Prinzipiell ist im Hinblick auf Mikrotubuli eine maßgebliche Modifikation von Interesse. Die flexiblen, negativ geladenen C-Termini beider Tubulin-Untereinheiten können mit der Protease Subtilisin geschnitten werden. Kinesin-Motordomänen bilden eine starke Affinität zu Subtilisin-behandelten Mikrotubuli aus (Skinotis *et al.*, 2004). Die Interaktion erfolgt dann hauptsächlich über die Helizes H11 und H12. Filterexperimente zur Interaktion von Kinesin-Motordomänen mit derart gekürzten Mikrotubuli könnten neue, strukturelle Einblicke in die Funktion der C-Termini liefern. Strukturelle NMR-Untersuchungen zum Einfluss der flexiblen C-Termini sind bisher rar. Kürzlich wurde ein 42 Aminosäuren umfassendes, C-terminales α -Tubulin-Fragment mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie betrachtet (Lefèvre *et al.*, 2011). U.a. wurde die Interaktion des ungefalteten Peptids mit Tau untersucht. Da das C-terminale Peptid rekombinant in *E. coli* produziert wird, sind anders als bei Tubulin eine Vielzahl an NMR-Experimenten mit unterschiedlichsten Isotopenmarkierungen vorstellbar. Z.B. könnten Interaktionsstudien an ^{15}N -markiertem Peptid und ^{13}C -markierter Motordomäne und umgekehrt erfolgen.

Weiterführend könnten die vorgestellten Filterexperimente auch für andere Zytoskelettkomplexe genutzt werden. Beispielsweise wären Mikrotubuli-Interaktionspartner wie Tau und diverse Kinetochor-Proteine lohnende Versuchsobjekte. Im Kinetochor sind Mitose-unterstützende Proteine vereint, die für die Verankerung der Chromosomen an den Mikrotubuliden sorgen. Kürzlich wurden zwei Kryo-EM-Strukturen von Kinetochor-

Proteinen im Komplex mit Mikrotubuli veröffentlicht. Der Ndc80-Komplex assoziiert longitudinal entlang eines Protofilaments der Mikrotubuli (Alushin *et al.*, 2010). Der heterodekamere Dam1-Komplex bildet einen Ring um den Mikrotubulus (Ramey *et al.*, 2011). In beiden Modellen unterstützen die flexiblen C-Termini der Tubulin-Untereinheiten die Bindung.

Analog könnte auch die Wechselwirkung von Aktinfilamenten mit z.B. Myosin untersucht werden. Ähnlich wie für Kinesin-Motordomänen und Mikrotubuli existieren diverse Kristallstrukturen von Myosinen sowie von Aktin. Da der Aktomyosinkomplex bisher nicht kristallisiert werden konnte, wurde auch hier der Komplex anhand von Kryo-EM-Daten rekonstruiert (Rayment *et al.*, 1993). Modellierungen der Interaktion geben einen Einblick, wie der zur Muskelbewegung nötige Kraftschub erzeugt wird (Holmes *et al.*, 2004). Um strukturelle Komplexdaten mit atomarer Auflösung zu erhalten, könnte es durchaus sinnvoll sein, weitere Methoden wie die NMR-Spektroskopie heranzuziehen.

Resultate und Diskussion

5. Biologische Aktivität neuer Colchicinoide

Die Aktivität von Triazolderivaten des Colchicins, Oxa-Allocolchicinoiden und Oxazolidinon-Derivaten wurde evaluiert. Die untersuchten biologischen Eigenschaften beinhalteten die Wirkung auf die Tubulin-Polymerisation, die Bindung an die Colchicin-Bindestelle des Tubulins und den Einfluss auf die Mikrotubuli-Morphologie im Zellmodell. Darüber hinaus wurde das Bindungsverhalten eines fluorierten Colchicinoids mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie analysiert.

5.1. Bindungsnachweis mittels NMR-Spektroskopie

Um NMR-Untersuchungen an Tubulin durchzuführen, muss man sich dem Umstand anpassen, dass Tubulin nicht rekombinant isotope markiert werden kann. Aufgrund der Größe von 55 kDa pro Untereinheit können mit ^1H -NMR-Spektroskopie keine aussagekräftigen, gut aufgelösten Signalsätze erzeugt werden. Für NMR-Analysen z.B. der Interaktion von Tubulin mit Tubulin-bindenden Substanzen verbleiben für Isotopenbetrachtungen die zu untersuchenden Verbindungen. Sie benötigen mindestens einen von ^1H verschiedenen NMR-aktiven Kernspin. Eine Isotopenanreicherung mit ^{13}C und ^{15}N durch chemische Synthese ist sehr kostenintensiv. Man kann allerdings auf weitere Isotope mit einem Kernspin von 1/2 zurückgreifen. Neben ^{31}P , das z.B. bei Nukleotid-untersuchungen genutzt wird, eignet sich auch ^{19}F für NMR-Analysen (Martino *et al.*, 2005). Beide Isotope können schmale Linien ergeben und treten mit einer natürlichen Häufigkeit von 100% auf.

Hier wurde das fluorierte Colchicinoid **A10** untersucht (*Abbildung 5.1*). Über den Triazolring war in **A10** ein Fluorobenzylring an das Colchicin-Grundgerüst gebunden. Es wurden 1D ^{19}F -NMR-Spektren von **A10** gelöst in DMSO oder PEM-Puffer pH 6,8 verglichen. In DMSO wurde ein dominantes ^{19}F -Signal mit einer chemischen Verschiebung von -110,0 ppm detektiert. In wässrigem Milieu wurde eine Aufspaltung in zwei Tieffeld-verschobene Signale (bei -109,2 und -109,4 ppm) und ein Hochfeld-verschobenes Signal (bei -115,5 ppm) beobachtet. In Gegenwart von Tubulin, wobei **A10** in doppelter molarer Konzentration im Vergleich zum Heterodimer verwendet wurde, ergab sich eine Signal-

verbreiterung der nunmehr überlappenden, Tieffeld-verschobenen Signale. Die Linienbreite des Multipletts betrug 393 Hz. Das dritte Signal wurde auf -115,7 ppm verschoben.

Die Signalverbreiterung ging mit einer abnehmenden Signalintensität einher. Beides wurde durch eine veränderte, magnetische Umgebung des Fluors bedingt, wie sie bei der Bindung von **A10** an Tubulin entsteht. Die in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlichen ^{19}F -NMR-Spektren lassen sich ebenfalls mit einer Umgebungsveränderung des Fluors erklären. Die polare Verbindung wurde in wässrigem Milieu vermutlich protoniert. Der Triazolring würde z.B. einen geeigneten Protonenakzeptor darstellen. Das Hochfeld-verschobene Signal scheint zudem einer Spezies anzugehören, die nicht in der Lage ist, an Tubulin zu binden. Diese Beobachtung spricht für eine Entstehung unterschiedlicher Isoformen im wässrigen Lösungsmittel. Bei Verwendung des Lösungsmittels DMSO lag im ^{19}F -NMR-Spektrum sowie in den von Dr. Norman Nicolaus durchgeführten ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren übereinstimmend eine Konformation vor (Nicolaus *et al.*, 2010; *supporting information*).

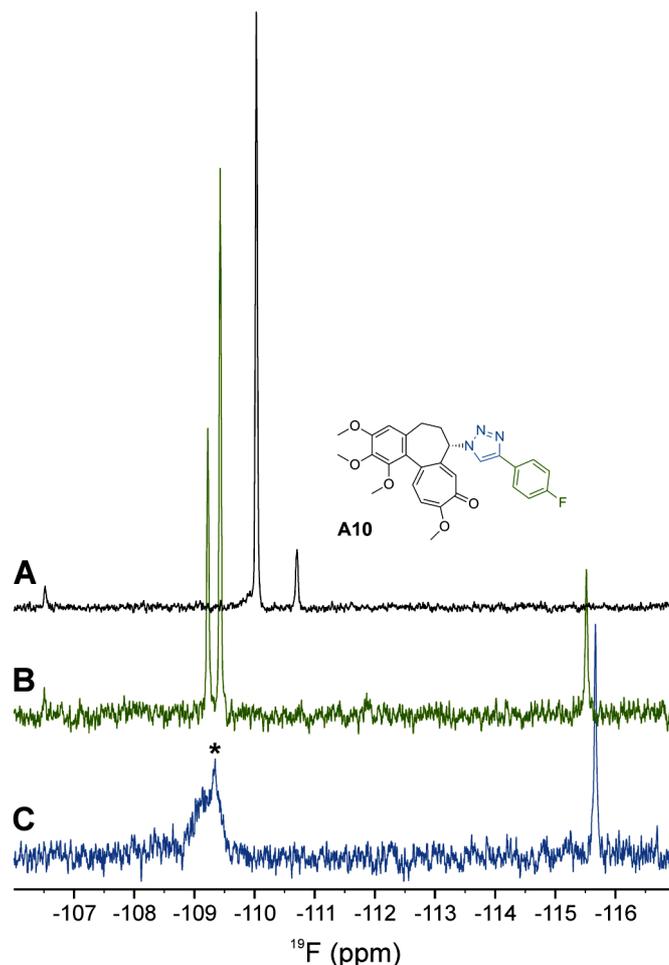


Abbildung 5.1: ^{19}F -NMR-Spektroskopie als Bindungsnachweis des fluorierten Colchicinoids **A10** an Tubulin. A) **A10** im Lösungsmittel DMSO (Endk. 1 mmol/L). B) Signalaufspaltung für **A10** (Endk. 0,4 mmol/L) gelöst in PEM-Puffer pH 6,8. C) Signalverbreiterung (*) durch Bindung des Colchicinoids (Endk. 0,4 mmol/L) an Tubulin (Endk. 0,2 mmol/L, in PEM-Puffer pH 6,8). ^{19}F -NMR-Spektren wurden bei 564 MHz und 300 K an einem 600 MHz Spektrometer gemessen.

5.2. Wirkung auf die Tubulin-Polymerisation

Das Tubulin-Polymerisationsverhalten in Gegenwart der Colchicinoide wurde mittels Fluoreszenz untersucht. Dafür wurde das Fluorophor DAPI in sich bildende Mikrotubuli eingebaut (Bonne *et al.*, 1985). Mit der Polymerisation war ein Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Die Versuche wurden in Gegenwart von 20% Glycerin durchgeführt, das in dieser hohen Konzentration die Polymerisation zusätzlich förderte. Auf diesem Weg wurden effektive Inhibitoren der Tubulin-Polymerisation ermittelt.

Die Naturstoffe Paclitaxel und Colchicin (Endk. je 3 $\mu\text{mol/L}$) wurden als Kontrollen eingesetzt (Abbildung 5.2A). Während Paclitaxel die Polymerisation verstärkt und die Mikrotubuli stabilisiert, inhibiert Colchicin die Polymerisation vollständig. Eine absolute Hemmung wurde auch mit 10 $\mu\text{mol/L}$ des Azidderivats **A1** erreicht. Es sind exemplarisch Messergebnisse von drei Verbindungen dargestellt, die unterschiedlich stark auf die Polymerisation wirkten (Abbildung 5.2B-D). Das Propanol-konjugierte Triazolderivat **A8** hemmte effektiv in einer Konzentration von 10 und 40 $\mu\text{mol/L}$. Das Zucker-konjugierte Colchicinoid **A13** bewirkte bei 40 $\mu\text{mol/L}$ eine vollständige Inhibition. Das Alcolchicinoid **B3** konnte in den untersuchten Konzentrationen die Polymerisation nicht verhindern.

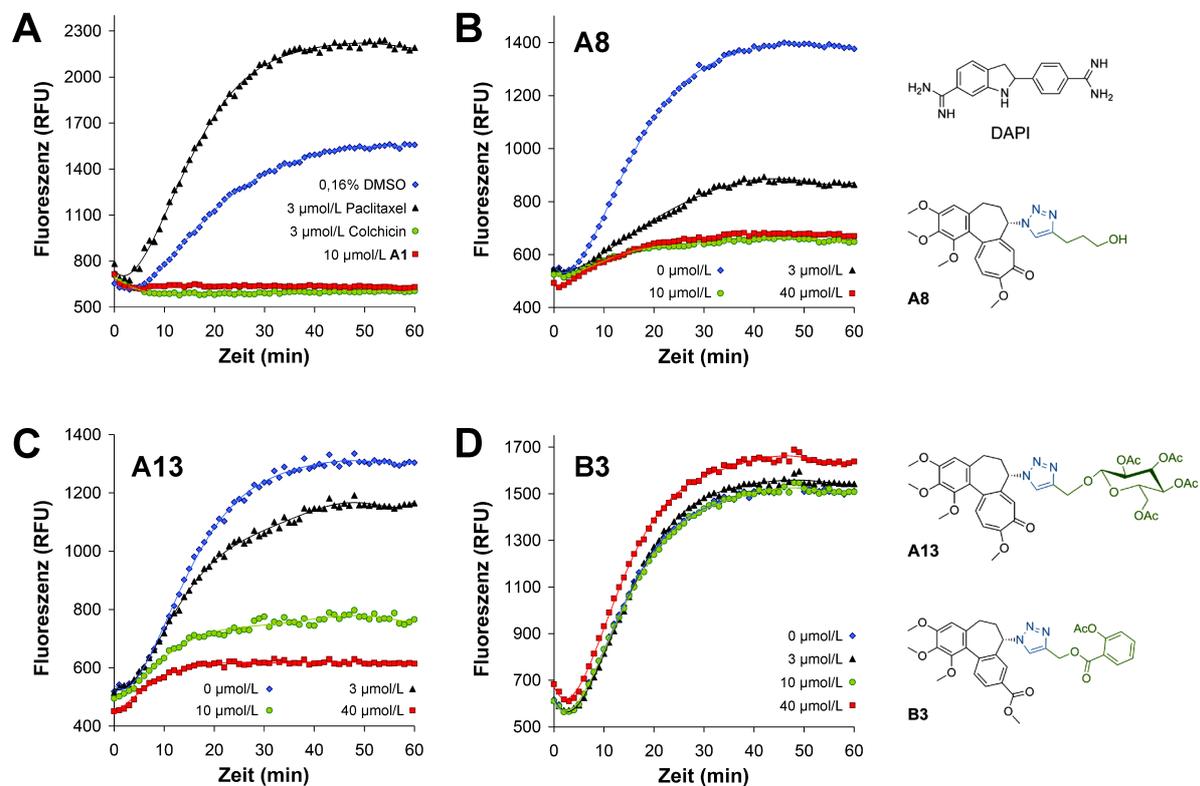


Abbildung 5.2: Einfluss auf die Tubulin-Polymerisation in Anwesenheit von 20% Glycerin unter Verwendung eines Fluoreszenz-basierten Tubulin-Polymerisations-Reagenziensatzes (Cytoskeletton). A) Zeitabhängiges Profil verschiedener Kontrollen: 0,16% DMSO, 3 $\mu\text{mol/L}$ Paclitaxel, 3 $\mu\text{mol/L}$ Colchicin sowie 10 $\mu\text{mol/L}$ Azidderivat **A1**. B-D) Polymerisationskurven unter dem Einfluss der Verbindungen **A8**, **A13** bzw. **B3**. Es wurden Endkonzentrationen von 0, 3, 10, und 40 $\mu\text{mol/L}$ mit einer maximalen DMSO-Konzentration von 0,16% untersucht.

Pro $\alpha\beta$ -Tubulin konnte eine Colchicin-Bindestelle besetzt werden. Die maximal untersuchte Konzentration von 40 $\mu\text{mol/L}$ entsprach der doppelten molaren Konzentration an Heterodimer. Endkonzentrationen, die halbmaximale und vollständige Inhibition erzielten, fasst *Tabelle 5.1* zusammen. Alle Naturstoff-konjugierten Triazolverbindungen bis auf **B3** konnten die Polymerisation beeinflussen. Eine vollständige Inhibition wurde von den Azidderivaten des Colchicins (**A1**) und Alcolcolchicins (**B1**) sowie von neun konjugierten Verbindungen in verschiedenen Endkonzentrationen erreicht. Fünf Verbindungen verringerten die Polymerisationsrate, bewirkten aber keine volle Hemmung. 40 $\mu\text{mol/L}$ Oxa-Alcolcolchicinoid **C1** verringerte in Gegenwart von 20% Glycerin die Polymerisationsrate nur schwach. Eine halbmaximale Inhibition wurde mit 40 $\mu\text{mol/L}$ bei Verwendung von 10% Glycerin erreicht. Das Oxazolidinon-Derivat **D1** und dessen reine Enantiomere zeigten bis 40 $\mu\text{mol/L}$ keinen Effekt auf die Polymerisation.

Tabelle 5.1: Naturstoff-konjugierte Colchicinoide (**A2-14**) und Alcolcolchicinoide (**B2, B3**) inklusive ihrer Azidderivate (**A1, B1**) sowie exemplarisch das Oxa-Alcolcolchicinoid **C1** und Oxazolidinon-Derivat **D1** sortiert nach ihrem Effekt auf die Tubulin-Polymerisation. Strukturformeln können den *Abbildungen 2.3-2.5* (Kapitel 2.7.2., Seiten 55-56) entnommen werden.

Verbindung	100% Inhibition ($\mu\text{mol/L}$)	50% Inhibition ($\mu\text{mol/L}$)	Verbindung	100% Inhibition ($\mu\text{mol/L}$)	50% Inhibition ($\mu\text{mol/L}$)
A1	5	1	A2	n.e.	10
A8	10	3	A3	n.e.	10
A11	10	3	A7	n.e.	10
A12	10	3	A9	n.e.	10
A4	40	3	A14	n.e.	40
A5	40	10	B1	40	10
A6	40	10	B2	40	10
A10	40	10	B3	n.e.	n.e.
A13	40	10	C1	n.e.	n.e.
			D1	n.e.	n.e.

(n.e.: Der Grad der Inhibition wurde in Gegenwart von 20% Glycerin nicht erreicht.)

5.3. Bindung an die Colchicin-Bindestelle

In Verdrängungsversuchen wurde analysiert, ob die untersuchten Colchicinoide an die Colchicin-Bindestelle binden. Dazu wurde Fluorescein-gekoppeltes Colchicin verwendet, das durch einen Überschuss an Colchicinoid kompetitiv aus der Colchicin-Bindestelle im Tubulin verdrängt werden sollte. Ungebundene Liganden wurden durch Gelfiltration abgetrennt und die proteinhaltigen Fraktionen auf die Anwesenheit von Fluoreszenz untersucht. Eine Verringerung der relativen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Colchicinoid-Konzentration spiegelte eine effektive Verdrängung wieder (*Abbildung 5.3A*).

Colchicin und das Azidderivat **A1** ersetzen in 10- und 20-fachem Überschuss (Endk. 50 und 100 $\mu\text{mol/L}$) das Fluorescein-gekoppelte Colchicin (Endk. 5 $\mu\text{mol/L}$) nahezu vollständig. Eine signifikante Verdrängung wurde für Colchicin, **A1** und Coumarin-konjugiertes **A4** bereits in 5-fachem Überschuss (Endk. 25 $\mu\text{mol/L}$) erzielt.

Das Salizylsäure-konjugierte Colchicinoid **A5** band schwächer an die Colchicin-Bindestelle und verdrängte in 20-fachem Überschuss etwa die Hälfte des Fluorescein-gekoppelten Colchicins (*Abbildung 5.3B*). Im Vergleich dazu besaß das analoge Allocolchicinoid **B3** keine Affinität für die Colchicin-Bindestelle. Auch das Oxa-Allocolchicinoid **C1** und das Oxazolidinon-Derivat **D1** verdrängten Fluorescein-gekoppeltes Colchicin nicht bzw. kaum. Die Ergebnisse zu den Verdrängungsversuchen aller vorgestellten Verbindungen können der zusammenfassenden *Tabelle 5.2* entnommen werden (siehe Kapitel 5.5.1., Seite 103). Insgesamt konnten sieben Colchicinoide in 20-fachem Überschuss mindestens zwei Drittel des Fluorescein-Colchicins verdrängen.

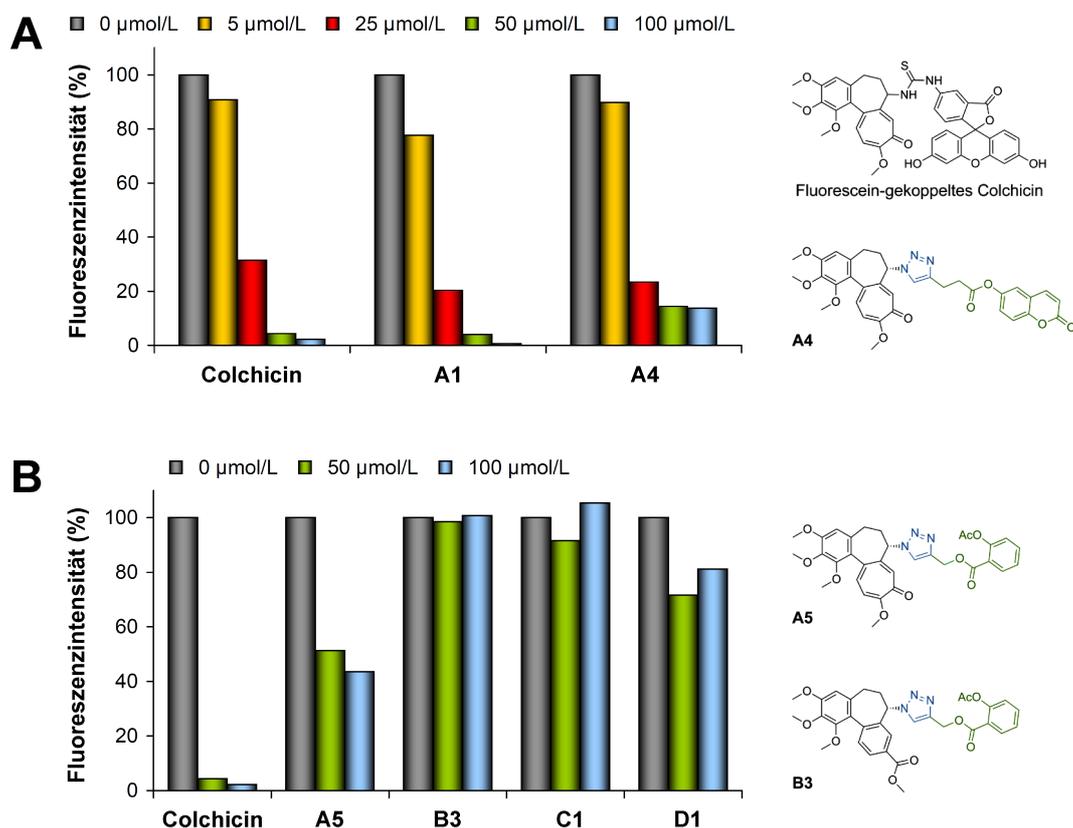


Abbildung 5.3: Nachweis zur Bindung der Colchicinoide an die Colchicin-Bindestelle im Tubulin. Die relative Fluoreszenzintensität (in %) wurde zu einer parallel mitgeführten Kontrolle (0 $\mu\text{mol/L}$ der zu testenden Verbindung) ins Verhältnis gesetzt. A) Colchicin, **A1** und **A4** verdrängten das Fluorescein-gekoppelte Colchicin (Endk. 5 $\mu\text{mol/L}$) konzentrationsabhängig. B) Es ergaben sich unterschiedliche Aktivitäten für das Colchicinoid **A5** und das analoge Allocolchicinoid **B3**. Das Oxa-Allocolchicinoid **C1** wirkte nicht, das Oxazolidinon-Derivat **D1** wirkte schwach verdrängend.

5.4. Effekt auf die Mikrotubuli-Morphologie

Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die Mikrotubuli visualisiert. Dazu wurden HeLa-Zellen 24 h mit den Colchicinoiden inkubiert und anschließend α -Tubulin durch Antikörper detektiert. Typischerweise bilden Mikrotubuli wie in der DMSO-Kontrolle ein Netzwerk innerhalb des Zytoplasmas (*Abbildung 5.4A*). In Anwesenheit von 100 nmol/L Paclitaxel formten sich dichte Aggregate (*Abbildung 5.4B*). 100 nmol/L Colchicin und 100 nmol/L Azidderivat **A1** führten zu einer diffusen Verteilung von Mikrotubuli-Fragmenten und Tubulin im Zytoplasma (*Abbildung 5.4C,D*).

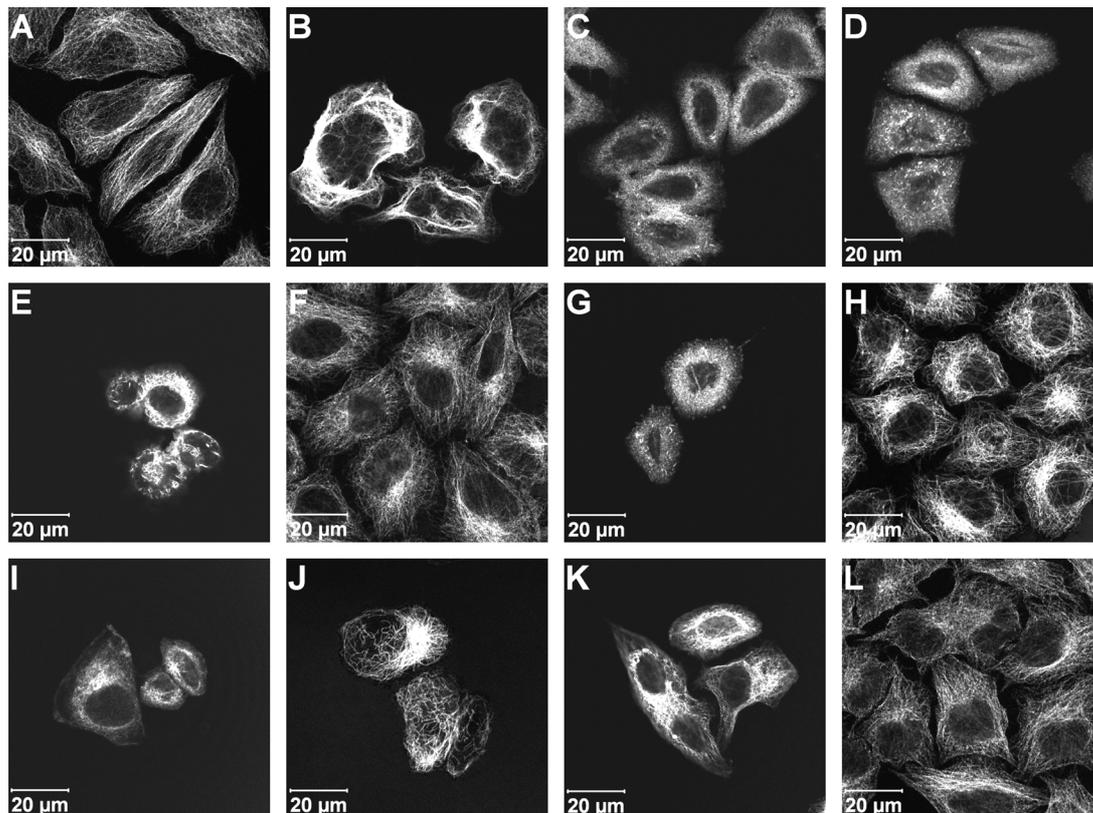


Abbildung 5.4: Morphologie der Mikrotubuli in HeLa-Zellen, die 24 h mit Colchicin-Analoga behandelt wurden. Die Mikrotubuli wurden mittels Immunfluoreszenz am konfokalen *Laser-Scanning* Mikroskop detektiert. Kontrollen und Azidderivat: A) 0,25% DMSO, B) 100 nmol/L Paclitaxel, C) 100 nmol/L Colchicin und D) 100 nmol/L **A1**. Vergleich zwischen Colchicinoiden und Alcolchicinoiden: E) 500 nmol/L **A5** und F) 1 µmol/L **B3**, G) 500 nmol/L **A8** und H) 1 µmol/L **B2**. Je nach konjugiertem Naturstoff waren die Colchicinoide unterschiedlich aktiv: I) 100 nmol/L **A2**, J) 500 nmol/L **A4**, K) 1 µmol/L **A7** und L) 1 µmol/L **A13**. Die Strukturformeln der Verbindungen können den *Abbildungen 2.3* und *2.4* (Kapitel 2.7.1., Seiten 55-56) entnommen werden.

Im Vergleich zwischen den Colchicinoiden und deren Alcolchicinoiden (Salizylsäure-konjugierten **A5** und **B3** sowie Propanol-konjugierten **A8** und **B2**) waren Erstere ab 500 nmol/L wirksam und Letztere bis 1 µmol/L inaktiv (*Abbildung 5.4E-H*). Zwei Colchicinoide führten ab 100 nmol/L zu einer diffusen Verteilung, wie hier am Beispiel von Laurinsäure-konjugiertem **A2** dargestellt ist (*Abbildung 5.4I*). Für vier Colchicin-Analoga wie das

Coumarin-konjugierte **A4** wurde eine diffuse Verteilung ab 500 nmol/L detektiert (*Abbildung 5.4J*). Weitere vier Substanzen zeigten einen Effekt ab 1 $\mu\text{mol/L}$, z.B. das Glycin-konjugierte **A7** (*Abbildung 5.4K*). Sechs Verbindungen wie das Zucker-konjugierte **A13** konnten in der höchsten getesteten Konzentration (1 $\mu\text{mol/L}$) das Mikrotubuli-Netzwerk nicht zerstören (*Abbildung 5.4L*). Das Oxa-Allocolchicinoid **C1** und das Oxazolidinon-Derivat **D1** waren ebenfalls bis 1 $\mu\text{mol/L}$ unwirksam. Die Ergebnisse zur Mikrotubuli-Morphologie aller Verbindungen sind in *Tabelle 5.2* (siehe Kapitel 5.5.1., Seite 103) zusammengefasst.

5.5. Einordnung der Untersuchungsergebnisse

5.5.1. Vergleich mit zytotoxischen Eigenschaften

In der Arbeitsgruppe Prokop wurde u.a. der Einfluss der Substanzen auf BJAB-Lymphomzellen untersucht. Antiproliferative Eigenschaften und die Fähigkeit zur Apoptose-Induktion wurden als IC_{50} - bzw. AC_{50} -Werte quantifiziert. Die Ergebnisse der zytotoxischen Analysen stehen im Einklang mit den hier dargestellten biologischen Aktivitäten der untersuchten Colchicinoide (*Tabelle 5.2*). Es wurde eine Unterteilung in potente Verbindungen und schwächer bis nicht aktive Substanzen vorgenommen.

Das Azidderivat **A1** zeigte im Vergleich zu Colchicin ähnliche zytotoxische und bindungsspezifische Aktivitäten. Elf Analoga (**A2-A12**) hemmten die Polymerisation, wobei eine Bindung an die Colchicin-Bindestelle nachgewiesen werden konnte. Die Verbindungen **A2-A6** wirkten im Zellmodell effektiver (IC_{50} - und AC_{50} -Werten $\leq 0,1 \mu\text{mol/L}$) als die Substanzen **A7-A12** (IC_{50} - und AC_{50} -Werten $\geq 0,1 \mu\text{mol/L}$). Als aktivste Verbindung hob sich das Lipid-konjugierte Colchicinoid **A2** mit IC_{50} - und AC_{50} -Werten unter 10 nmol/L hervor. Auf Proteinebene hingegen wirkte die Verbindung deutlich schwächer. Ein ähnlicher Effekt trat für die Substanzen **A4**, **A5** und **A6** auf. Diese vier Colchicinoide verfügten über hydrolysierbare Estergruppen. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Verbindungen intrazellulär zu aktiveren Hydrolyseprodukten metabolisiert wurden (Dissertation Nicolaus, 2010). Außerdem könnten Faktoren wie eine verbesserte Membranpermeabilität (z.B. für **A2**) die zellbiologische Aktivität erhöht haben. Umgekehrt waren u.a. die Colchicinoide **A11** und **A12** in der Lage, die Polymerisation vollständig zu inhibieren und an die Colchicin-Bindestelle zu binden. Die zytotoxische Wirkung war im Vergleich aber deutlich schwächer, wobei die Morphologie der Mikrotubuli nicht beeinflusst wurde. Im Fall des relativ großen Colchicin-Dimers (**A12**) könnte z.B. eine schlechtere Zellaufnahme die geringere zytotoxische Aktivität bedingt haben.

Die Colchicinoide **A13** und **A14** sowie die Allocolchicinoide **B1** und **B2** inhibierten die Polymerisation nicht vollständig und konnten Fluorescein-gekoppeltes Colchicin nicht bzw.

kaum verdrängen. Diese Ergebnisse stimmten wiederum mit den zellbasierten Versuchen überein, wobei IC₅₀- und AC₅₀-Werte von ≥ 1 $\mu\text{mol/L}$ bestimmt wurden. In den untersuchten Konzentrationen wurden für das Allocolchicinoid **B3**, das Oxa-Allocolchicinoid **C1** und das Oxazolidinon-Racemat **D1** keine Polymerisations-Inhibition und Tubulin-Bindung nachgewiesen. Dementsprechend wurden IC₅₀- und AC₅₀-Werte von ≥ 5 $\mu\text{mol/L}$ registriert.

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der erfassten Daten zur biologischen Aktivität der Colchicinoide. Die Ergebnisse zu den Bindungseigenschaften (Polymerisations-Inhibition, Colchicin-Verdrängung und Effekt auf die Mikrotubuli-Morphologie) werden ergänzt durch IC₅₀- und AC₅₀-Werte, die von der Arbeitsgruppe Prokop in *in vitro* Versuchen ermittelt wurden. Die angeführten Daten zu **Ax**, **Bx** und **C1** wurden in zwei Publikationen veröffentlicht (Nicolaus *et al.*, 2010, Nicolaus *et al.*, 2009). IC₅₀- und AC₅₀-Werte zu **D1** entstammen der Dissertation von Dr. Stefanie Ritter (Ritter, 2009). Strukturformeln der Verbindungen sind in den *Abbildungen* 2.3-2.5 (Kapitel 2.7.2., Seiten 55-56) enthalten.

Verbindung	Polymerisations-Inhibition ¹⁾	Colchicin-Verdrängung (%) ²⁾	Effekt auf Mikrotubuli-Morphologie ³⁾	Proliferation IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$) ⁴⁾	Apoptose AC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$) ⁵⁾
Colchicin	+++	100	+++	0,02	0,03
A1	+++	100	+++	0,09	0,01
A2	++	60	+++	<0,01	<0,01
A3	++	78	+++	0,05	0,05
A4	++	86	++	0,06	0,05
A5	++	54	++	0,03	0,11
A6	++	90	++	0,06	0,06
A7	++	78	+	0,32	0,14
A8	+++	74	++	n.e.	0,5
A9	++	70	-	0,3	0,5
A10	++	53	+	0,5	n.e.
A11	+++	86	-	n.e.	0,61
A12	+++	78	-	0,74	2,2
A13	++	20	-	n.e.	1,08
A14	+	0	+	30	1,02
B1	++	29	+	1,0	1,05
B2	++	26	-	n.e.	5,3
B3	-	0	-	8,7	17,3
C1	-	0	-	5,0	10,0
D1	-	16	-	10,0	5,0

- 1) Qualitative Auswertung des Effekts der Verbindungen (Endk. 10 $\mu\text{mol/L}$) auf die Tubulin-Polymerisation in Anwesenheit von 20% Glycerin: +++ vollständige Inhibition, ++ halbmaximale Inhibition, + schwache Inhibition, - keine Inhibition.
- 2) Verdrängung von Fluorescein-gekoppeltem Colchicin (Endk. 5 $\mu\text{mol/L}$) aus der Colchicin-Bindestelle des Tubulins bei 20-fachem Überschuss der Verbindung (Endk. 100 $\mu\text{mol/L}$): 100% vollständige Verdrängung, 0% keine Verdrängung.
- 3) Immunfluoreszenzmikroskopische Auswertung der Mikrotubuli-Morphologie in HeLa-Zellen in Anwesenheit der Verbindungen: +++ Effekt ab 100 nmol/L, ++ Effekt ab 500 nmol/L, + Effekt ab 1 $\mu\text{mol/L}$, - kein Effekt bis 1 $\mu\text{mol/L}$.
- 4) IC₅₀-Werte geben die Verbindungskonzentration an, bei der die Proliferation zu 50% inhibiert wurde. BJAB-Lymphomzellen wurden 24 h mit den Verbindungen (Endk. 0,01-100 $\mu\text{mol/L}$) inkubiert. Die Zellzahl wurde mit einem CASY® Cell Counter bestimmt. (n.e.: 50% Inhibition nicht erreicht)
- 5) AC₅₀-Werte geben die Verbindungskonzentration an, bei der in 50% der Zellen Apoptose induziert wurde. Dazu wurde nach 72 h Inkubation (Endk. 0,01-100 $\mu\text{mol/L}$) die DNA-Fragmentierung in BJAB-Lymphomzellen durch Propidiumiodid-Färbung nachgewiesen und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. (n.e.: 50%ige Apoptose-Induktion nicht erreicht)

Die Verbindungen **B3**, **C1** und **D1** schienen, wenn auch in relativer hoher Konzentration, antiproliferativ zu wirken. Bindung an Tubulin mit Bindungsaffinitäten, die über die hier getestete Maximalkonzentration hinausgehen, wäre unter Umständen möglich. Es muss aber auch ein bisher unbekannter Wirkmechanismus in Betracht gezogen werden.

5.5.2. Betrachtungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung

Die untersuchten Naturstoff-gekoppelten Colchicinoide besaßen anstelle der Acetamid-Gruppe des Colchicins einen 1,2,3-Triazolring, der als Verknüpfung für eine Vielzahl von Substituenten diente. Die biologischen Daten zeigen, dass sich die Triazolverknüpfung durchaus eignet, um neue, antiproliferative, Tubulin-bindende Wirkstoffe zu generieren. Es war bereits bekannt, dass Substitutionen anstelle der Acetamid-Gruppe ohne Aktivitätsverlust toleriert werden (Chakrabarti *et al.*, 1996). Wie das Fluorescein-gekoppelte Colchicin beweist, sind auch größere Substitutionen möglich. Bis *dato* wurden Substitutionen an dieser Position über eine Amidbindung eingeführt. Triazol-verknüpfte Colchicin-Analoga wurden zuvor nicht beschrieben (Nicolaus *et al.*, 2010).

Die untersuchte Substanzbibliothek ließ sich ausgehend vom Azidderivat des Colchicins (**A1**) extrem variabel gestalten. Sie kann als Prototyp für zukünftige, rationale Diversifizierungen genutzt werden. Die Colchicinoide wirkten einheitlich deutlich besser als ihre analogen Allocolchicin-Derivate (Vergleich: **A1** zu **B1**, **A8** zu **B2** und **A5** zu **B3**). Die Substitution des Tropolonrings durch einen Phenylring bedingte verringerte Bindungsaffinitäten und damit einhergehend verminderte zytotoxische Aktivitäten. Kinetische Studien zeigten für klassisches Allocolchicin eine mit Colchicin vergleichbare Tubulin-Bindung (Hastie, 1989). Der Aktivitätsverlust der hier untersuchten Allocolchicinoide scheint strukturell begründet. Vermutlich war die Kombination von Triazolsubstituent und Methoxytroponring gerade auch im Hinblick auf eine gewisse konformationelle Flexibilität essentiell für die Funktion. Auch im exemplarisch vorgestellten Oxa-Allocolchicinoid **C1** könnte eine eher rigide Konformation des Benzyl- und Furanylrings, die geringe Wirkung erklären. Kürzlich wurden zudem weitere Allocolchicin-Modifikationen vorgestellt, die ebenfalls schwächere Aktivitäten aufwiesen (Boyer *et al.*, 2010).

Das Oxazolidinon-Derivat **D1** musste trotz Strukturverwandtheit zu Combretastatin-A4 als weniger effektive Verbindung eingestuft werden. Unter Umständen muss ein Zusammenhang zwischen der Konfiguration der Diastereomere und des Oxazolidinonrings für die schwache Wirkung in Betracht gezogen werden. Etwa zeitgleich wurden diverse Triazol-integrierte Combretastatin-Analoga als potentielle Polymerisations-Inhibitoren entwickelt (Romagnoli *et al.*, 2010; Odlo *et al.*, 2010). Nach diesen Studien sind Heterozyklen an dieser Position durchaus tolerierbar.

Triazol gilt als klassisches Pharmakophor, dessen Inkorporation auf verbesserte, pharmakologische Eigenschaften abzielt (Breen und Walsh, 2010). Es ist vor allem aus

Fungiziden und Antimykotika bekannt, wo Triazol den Ergosterol-Syntheseweg blockiert. Darüber hinaus interagiert Triazol mit Cytochrom P450-3A4, das die vielfältigsten Arzneistoffe (z.B. auch Colchicin) durch Metabolisierung inaktiviert. Inhibiert man dieses Enzym, könnte man die effektive, intrazelluläre Wirkstoffkonzentration erhöhen (Bracher, 2003). Dies stellt einen der Wege dar, Arzneistoffresistenzen entgegenzuwirken. Dieses Thema und weitere Aspekte werden im abschließenden Ausblick thematisiert.

6. Ausblick auf innovative Forschungsansätze

Die Relevanz der vorgestellten Projekte lässt sich am deutlichsten durch eine Betrachtung innovativer Ansätze mit dem gemeinsamen Nenner Mikrotubuli darstellen. Trotz pharmazeutischer Hochdurchsatzverfahren zur Entdeckung von Leitstrukturen bleibt die Orientierung an Naturstoffen wie Colchicin weiterhin attraktiv für neue Entwicklungen. Detaillierte Kenntnisse der zellbiologischen Abläufe sind u.a. zum Verständnis von Wirkstoffresistenzen und für nanotechnologische Umsetzungen notwendig. Außerdem lassen sich auf diesem Weg neue pharmakologische Angriffspunkte definieren. Schließlich erweitern strukturelle Einblicke z.B. auf intermolekulare Wechselwirkungen und Konformationsänderungen die Perspektiven der rationalen Wirkstoffentwicklung.

6.1. Suche nach potenten Colchicin-Derivaten

Eine Vielzahl an Modifizierungen sind ausgehend vom Naturstoff Colchicin denkbar. Drei aktuelle Beispiele sollen hier im Fokus stehen. Z.B. kann aus zwei antiproliferativen Substanzen durch Kombination der pharmakologisch relevanten Kernelemente eine Chimäre gebildet werden. Dies ist am Beispiel von 2-Methoxyestradiol und Colchicin gezeigt worden, für deren Chimäre eine gesteigerte Bioverfügbarkeit nachgewiesen wurde (Leese *et al.*, 2010).

In einem weiteren pharmakologisch interessanten Ansatz wurde um Colchicin ein Dendrimer aus Glykopeptiden synthetisiert (Johansson *et al.*, 2010). Die vergleichsweise komplexe Substanz konnte *in vitro* nicht an Mikrotubuli binden. Intrazellulär wirkte sie hingegen antiproliferativ, wobei das Dendrimer vermutlich degradiert wurde und aktive, colchicinhalte Fragmente gebildet wurden.

Die *in vivo* Umwandlung einer inaktiven Vorstufe ist mit dem Colchicin-Derivat ZD6126 gelungen. Die in klinischer Studie befindliche Verbindung wirkt in therapeutisch verträglicher Dosierung (LoRusso *et al.*, 2008). In ZD6126 ersetzt ein Phenolring den Methoxytroponrings. Die Hydroxylgruppe ist zudem phosphoryliert (Davis *et al.*, 2002). Diese wasserlösliche Vorstufe wird erst *in vivo* durch Dephosphorylierung aktiviert (Micheletti *et al.*, 2003). Das entstehende N-Acetylcolchinol bewirkt massive Tumornekrosen, indem das versorgende Blutgefäßsystem zerstört wird.

6.2. Überwindung von Arzneistoffresistenzen

Der stetige Einsatz gängiger Arzneistoffe führt vielfach zu Resistenzbildungen. Die Nachfrage nach neuen Wirkstoffe, die die Resistenzmechanismen umgehen, treibt die wissenschaftliche Entwicklung auf diesem Gebiet voran.

Es haben sich diverse Effluxmechanismen entwickelt, die Wirkstoffe aus der Zelle exportieren. Daran ist z.B. der ATP-Bindekassetten-Transporter P-Glykoprotein beteiligt, welcher neben einer Vielzahl anderer Substrate auch Colchicin und Paclitaxel ausschleust. Krebszellen erwerben nachweislich Wirkstoffresistenzen durch Überexpression des P-Glykoproteins (Yue *et al.*, 2010). In Kombinationstherapien kann P-Glykoprotein gezielt inhibiert werden, um den Efflux des eigentlichen Wirkstoffs zu verhindern. Im Fall von Paclitaxel führt z.B. die gleichzeitige Gabe von Cyclosporin A zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit und Gewebeaufnahme (Marchetti *et al.*, 2007). Andere Wirkstoffe wie z.B. Combretastatin-A4 werden nicht vom P-Glykoprotein erkannt (Simoni *et al.*, 2005).

Auch durch veränderte Expressionsprofile der verschiedenen Tubulin-Isoformen werden Resistenzen u.a. gegen Paclitaxel und Vinca-Alkaloide ausgebildet. Eine Überexpression von Tubulin β_{III} wurde für diverse Krebsformen beschrieben (Kavallaris, 2010). Es wird keine veränderte Polymerisationsdynamik beobachtet. Die verringerte Affinität zu Paclitaxel wird einer Substitution von Serin-277 zu Alanin zugeschrieben, die eine veränderte Anordnung der M-Schleife in der Paclitaxel-Bindetasche bewirkt (Mangani *et al.*, 2006). Epothilon B dagegen wirkt antiproliferativ auf Tubulin β_{III} -überexprimierende Tumorzelllinien (Dumontet *et al.*, 2009). Die Bindung von Epothilon A an verschiedene Tubulin-Isoformen wurde modelliert, wobei im Vergleich zu Paclitaxel eine effektivere Bindung an Tubulin β_{III} nachgewiesen werden konnte (Mangani *et al.*, 2006).

In einem weiteren, bereits erwähnten Mechanismus der Resistenzbildung werden die Wirkstoffe metabolisiert. Epothilone, Paclitaxel, Colchicin und die Vinca-Alkaloide werden in der Leber durch das Cytochrom P450 System verstoffwechselt. Die Isoform P450-3A4 demethyliert z.B. die Methoxygruppen des Colchicins (Niel und Scherrmann, 2006). Um eine Metabolisierung zu umgehen, wird wie im Fall des P-Glykoproteins an einer kombinierten Inhibition des Cytochroms P450 gearbeitet (Katragadda *et al.*, 2005).

6.3. Nanotechnologische Anwendungen

Zwei Zytoskelett-orientierte Anwendungsgebiete können im Feld der Nanotechnologie definiert werden. Zum einen werden antiproliferative Substanzen in Nanopartikel verpackt. Zum anderen werden ausgehend vom biologischen Vorbild künstliche, nanotechnologische Anwendungen entwickelt.

Durch die Verwendung von Nanopartikeln könnten zukünftig Tumorresistenzen überwunden werden. Paclitaxel wurde zusammen mit einem P-Glykoprotein-Inhibitor eingekapselt. Die Nanopartikel konnten effektiv intrazellulär akkumuliert werden, wobei die Proliferation von resistenten Tumorzelllinien hemmt wurde (Patil *et al.*, 2009). Colchicin wiederum wurde in Lipid-Silica-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 50 nm verpackt (Cauda *et al.*, 2010). Im Zellmodell wurde die Aufnahme der Partikel und eine Depolymerisation der Mikrotubuli nachgewiesen. In klinischen Studien wird derzeit ABI-007 (Abraxane™) untersucht, das u.a. effektiv gegen metastasierenden Brustkrebs wirkt (Ibrahim *et al.*, 2002). Hinter der Bezeichnung verbirgt sich Paclitaxel, welches in Albumin-stabilisierte Nanopartikel eingeschlossen ist. Die Löslichkeit von Paclitaxel konnte auf diesem Weg deutlich verbessert werden. Verknüpft mit gewebespezifischen Antikörpern könnte zukünftig eine selektive Anreicherung im Zielgewebe erfolgen (Calligaris *et al.*, 2010).

Aus nanotechnologischer Sicht versucht man die gleitende Motorprotein-Bewegung entlang der Mikrotubuli nachzubilden und zu kontrollieren. Ziel ist es, bestimmte Ladungen gerichtet und zeitlich koordiniert zu bewegen. Mikrotubuli können z.B. durch topologische und chemische Modifikationen der zu besetzenden Oberfläche ausgerichtet werden (Diez und Howard, 2009). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wird darüber hinaus die Laufrichtung festgelegt. Nutzt man außerdem z.B. photoaktivierbares ATP, kann die Kinesin-Aktivität reguliert werden (Tucker *et al.*, 2008). Die Überlegungen führen hin zu biosensorischen Halbleitern, wobei mit ersten Prototypen Machbarkeitsstudien unternommen werden (Bachand *et al.*, 2009). Ein anderer Ansatz nutzt Polystyren-Mikrokapseln, die oberflächlich mit Kinesinen beladen werden. Diese nanotechnologischen Hybride bewegen sich entlang von Mikrotubuli, so dass intrazelluläre Transportprozesse imitiert werden könnten (Song *et al.*, 2009). Parallel werden artifizielle Systeme vollständig synthetisch nachgebildet. Unter Einbezug der biologischen Eigenschaften von Mikrotubuli wurden Nanofilamente aus Glykolipiden hergestellt. Nanokügelchen konnten entlang dieser synthetischen Filamente durch die Fluidität des Lipidgerüsts transportiert werden (Tamaru *et al.*, 2010).

6.4. Ausweitung auf neue Zielobjekte

Neben Mikrotubuli-Inhibitoren werden auch spezifische Inhibitoren des bakteriellen Homologs FtsZ entdeckt. Es wurde eine antibakterielle Leitstruktur gegen das multiresistente Bakterium *Staphylococcus aureus* vorgestellt (Haydon *et al.*, 2008). Auch gegen das Tuberkulose verursachende *Mycobacterium tuberculosis* wurden FtsZ-Inhibitoren beschrieben (Kumar *et al.*, 2010b). Die Wirkstoffe greifen in die Ausbildung des Z-Rings ein und verhindern so die bakterielle Zellteilung.

Bei der Forschung nach neuen Mikrotubuli-Inhibitoren ist man auf eine Naturstoffklasse gestoßen, die Mikrotubuli intrazellulär stabilisiert, ohne direkt an diese zu binden. Die Taccalonolide besitzen ein 5-gliedriges Steroidgerüst und werden aus *Tacca chantrieri* (Fledermausblume) gewonnen (Risinger und Mooberry, 2010). Über den Wirkmechanismus wird gegenwärtig noch spekuliert. Unter Umständen werden die Steroide intrazellulär metabolisiert und die entstehenden Umwandlungsprodukte sind in der Lage an Mikrotubuli zu binden. Es könnte allerdings auch eine Interaktion mit Mikrotubuli-assoziierten Bindungspartnern (z.B. MAPs) erfolgen.

Dieses Beispiel deutet bereits an, dass der nächstfolgende Schritt bei der Suche nach neuen antiproliferativen Substanzen eine Ausweitung auf Mikrotubuli-interagierende Proteine ist. Die vielfältigsten Mitose-relevanten Zielproteine gelten als hoffnungsvolle Kandidaten für chemotherapeutische Anwendungen. Naheliegende Angriffspunkte sind z.B. Kinesine, Aurora-Kinasen und Proteine im Kinetochorkomplex, die an der Chromatidentrennung beteiligt sind. Untersuchungen an Aurora-Kinasen, denen eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Mitose zugeschrieben wird, haben mehrere Inhibitoren in laufenden klinischen Studien hervorgebracht (Schmidt und Bastians, 2007). Mit geeigneten Hochdurchsatzverfahren hofft man in Substanzbibliotheken Kinetochorspezifische Inhibitoren zu finden (Screpanti *et al.*, 2010).

Hinsichtlich Kinesin-Inhibitoren steht vor allem das Kinesin-Spindel-Protein KIF11/Eg5 im Vordergrund. Mit Monastrol wurde der erste Mitose-Inhibitor entdeckt, der nicht auf Mikrotubuli zielt (Mayer *et al.*, 1999). Namensgebend war die Ausbildung von sternförmig auseinanderlaufenden Mikrotubuli in Zellen, die mit Monastrol behandelt wurden. Es bindet allosterisch in eine Bindetasche der KIF11-Motordomäne, wobei die beteiligten Helizes α_2 , α_3 und Schleife L5 strukturell angepasst werden (Yan *et al.*, 2004). Schleife L5 ist je nach Kinesin variabel und in KIF11 am längsten ausgebildet. Kontinuierlich werden neue spezifische KIF11-Inhibitoren veröffentlicht, die an die Monastrol-Bindetasche binden. Mehrere Verbindungen befinden sich derzeit in klinischen Studien. Es wurden diverse, dosis-abhängige Toxizitäten (allerdings keine Neurotoxizität) registriert. U.a. nimmt die Zahl neutrophiler Granulozyten, zu denen die weißen Blutkörperchen gehören, ab (Huszar *et al.*, 2009). In einer bereits erwähnten Modellsimulation der KIF11-Motordomäne wurden neben der Monastrol-Bindetasche vier weitere, potentielle Bindetaschen vorgeschlagen, die als neue Angriffspunkte evaluiert werden müssen (Zhang, 2011). Eine der postulierten Taschen könnte die Bindungsstelle für ein Heteropolyoxometalat ($K_6Mo_{18}O_{62}P_2$) sein. Die Verbindung inhibiert u.a. humanes KIF11 und *Drosophila* KHC, indem es an Mikrotubuli-interagierende Regionen der Kinesin-Motordomänen bindet (Learman *et al.*, 2009). Diese Art von Inhibition ist bisher einzigartig und bedarf weiterer vor allem struktureller Untersuchungen zum Wirkmechanismus.

6.5. Strukturanalysen als Teil der Systembiologie

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Motorprotein-Zytoskelett-Komplex mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie erfasst. Darüber hinaus wurden zum Teil kombinierte Lösungs- und Festkörper-MAS-NMR-spektroskopische Untersuchungen an diversen Zytoskelettproteinen vorgenommen (z.B. Sun *et al.*, 2009). Aufbauend sind vielfältigste Studien zu intermolekularen Interaktionen und Konformationsänderungen für diverse Zytoskelettproteine denkbar. Durch den stetigen Methodenfortschritt werden immer komplexere, makromolekulare Systeme mittels Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie zugänglich werden (Renault *et al.*, 2010). Es kann aber durchaus von Vorteil sein, die verschiedensten Strukturmethoden miteinander zu verknüpfen (Steven und Baumeister, 2008). Kryo-EM und 3D-Rekonstruktionen sind derzeit die Methoden der Wahl, wenn es um die strukturelle Untersuchung von Zytoskelett-gebundenen Proteinen geht. Mit einer Auflösung von 8-9 Å werden so z.B. Mechanismen zur Translokation der Motorproteine postuliert (Sindelar und Downing, 2010). Die Strukturanalyse der Einzelkomponenten beispielsweise durch Kristallstrukturanalyse geht in entsprechende Modellierungen ein. Da die Kryo-EM-Auflösung sich kontinuierlich verbessert, entstehen häufiger Diskrepanzen bei der Einpassung der Kristallstrukturen. Rechnergestützte Analysen erlauben hier eine flexible Anpassung ausgehend von den Kristallstrukturen (Grubisic *et al.*, 2010).

Im Bereich der Kristallstrukturanalyse werden zusehends technisch bedingte Hindernisse überwunden. Die im Vergleich zur Kinesin-Motordomäne deutlich komplexere Dynein-Motordomäne konnte erstmals röntgenkristallographisch untersucht werden (Carter *et al.*, 2011). Mit einer Auflösung von 6 Å wurde eine Dimerstruktur von insgesamt 300 kDa analysiert, wobei pro Monomer sechs ATPase-Domänen ringförmig angeordnet sind. Derart komplexe Strukturen aufzuklären, scheitert zumeist an der Ausbildung ausreichend großer Proteinkristalle. Jüngst wurde die Methode der Femtosekunden-Röntgen-Nanokristallographie an einer Struktur des Photosystems I vorgestellt (Chapman *et al.*, 2011). Für diese Methode genügen bereits Nanokristalle mit einem Durchmesser von 0,2-2 µm. Für diverse Makromoleküle und Proteinkomplexe, die lediglich kleine Kristalle ausbilden, bietet sich nun eine Möglichkeit hochauflösende Strukturen zu generieren.

Die Bioinformatik ermöglicht die umfangreichen Strukturdaten durch entsprechende Simulationen zu bündeln. Ein anschauliches Beispiel ist die Animation "*The Inner Life of a Cell*", in der vorhandene Strukturen im zellulären Kontext dargestellt wurden (<http://multimedia.mcb.harvard.edu/>). Ziel ist es, anhand detaillierter, struktureller Daten die Proteom-Organisation, das Zusammenspiel der Proteinkomplexe auf zellulärer Ebene, zu verstehen (Kühner *et al.*, 2009). Ein Netzwerke der Protein-Protein-Interaktionen wie auch deren Bezug zu humanen Krankheiten abzubilden, könnte schließlich neue Zusammenhänge für gezielte Therapieansätze aufzeigen (Vidal *et al.*, 2011).

Zusammenfassung

An vielen zellbiologischen Funktionen sind Filament-bildende Proteine beteiligt. Mikrotubuli z.B. sind essentiell für die Zellteilung und intrazelluläre Transportprozesse. Für Letztere stellen sie die Pfade, entlang derer Zellbestandteile zu ihrem Bestimmungsort transportieren werden. Dieser Transport wird u.a. von Kinesinen vermittelt, wobei sogenannte Motordomänen an die Mikrotubuli binden und unter ATP-Verbrauch eine Fortbewegung ausgeführt wird. Separate Kristallstrukturen existieren sowohl für Kinesin-Motordomänen als auch für $\alpha\beta$ -Tubulin, aus denen die Mikrotubuli aufgebaut sind. Komplexe aus Kinesin-Motordomänen und Mikrotubuli können bis heute nicht kristallographisch untersucht werden. Kryo-Elektronenmikroskopie und dreidimensionale Rekonstruktion werden genutzt, um die an der Wechselwirkung beteiligten Sekundärstrukturelemente zu bestimmen und Nukleotid-abhängige Konformationsänderungen zu ermitteln. Die Auflösung dieser Methode ist limitiert, so dass die interagierenden Aminosäurereste nicht identifiziert werden können. Zudem werden dynamische Konformationsanpassungen beobachtet, die zu Abweichungen von vorhandenen Kristallstrukturen führen. Berechnungsmodelle und Alanin-Mutagenese-Studien erweitern die Vorstellungen, wie die Mikrotubuli-abhängige ATP-Hydrolyse und Konformationsänderungen in der Motordomäne im Detail koordiniert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals mittels Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie die Wechselwirkung zwischen Kinesin-Motordomänen und Mikrotubuli auf atomarer Ebene untersucht. Als notwendige Voraussetzung für NMR-Messungen wurden reproduzierbare Methoden zur Herstellung isotopenmarkierter Proteine und Proteinkomplexe etabliert. Es wurden native Mikrotubuli mit natürlicher Isotopenverteilung genutzt. Demgegenüber wurden die Kinesin-Motordomänen durch rekombinante Expression uniform ^2H - ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkiert, wobei insbesondere auf eine möglichst vollständige Deuterierung Wert gelegt wurde.

Mittels Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie wurden Magnetisierungstransfers von Protonen der Mikrotubuli zu ^{13}C - und ^{15}N -Kernspins der Kinesin-Motordomänen durchgeführt. In dipolaren Wiedereinkopplungssequenzen wie RFDR und TEDOR wurden durch den Magnetisierungstransfer selektiv interagierende Reste auf Seiten der Motordomänen gefiltert. Es wurde eine begrenzte Anzahl an Kreuzsignalen detektiert, deren chemische Verschiebungen charakteristisch für bestimmte Aminosäuretypen waren. Die Signale von geladenen Aminosäureresten der Kinesin-Motordomänen deuten auf eine elektrostatische Wechselwirkung mit der negativ geladenen Oberfläche der Mikrotubuli hin. Eine etwaige Darstellung der Nukleotid-Bindetasche wurde mit einer nukleotidfreien Komplexprobe widerlegt. Ein möglicher Effekt des Puffermoleküls Pipes wurde mit

Lösungs-NMR-Methoden und isothermer Titrationskalorimetrie ausgeschlossen. In Hinblick auf sequenzielle Zuordnungen wurde die signalverstärkende Methode der dynamischen Kernpolarisation (MAS-DNP-NMR-Spektroskopie) angewendet.

Mit der vorgestellten Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde die Grundlage für weiterführende Strukturanalysen geschaffen. Mit weiteren Experimenten könnten die relevanten Reste der Kinesin-Motordomänen präzise benannt und dynamische Prozesse untersucht werden. Darüber hinaus sind analoge Experimente für weitere Filament-bindende Proteine wie z.B. Tau denkbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem neue Colchicin-Analoga auf ihre biologische Aktivität untersucht. Colchicin ist ein Naturstoff der die Tubulin-Polymerisation und dadurch die Bildung von Mikrotubuli unterdrückt. Aufgrund seiner hohen Toxizität wird es allerdings nicht für antiproliferative Therapien eingesetzt. Folglich ist es notwendig neue Colchicinoide mit verbesserten therapeutischen Eigenschaften zu entwickeln. Die hier betrachteten Colchicinoide waren zumeist in schwächerer Form in der Lage die Tubulin-Polymerisation *in vitro* zu hemmen und an die Colchicin-Bindestelle zu binden. Außerdem wurde von einigen Verbindungen die intrazelluläre Morphologie der Mikrotubuli beeinflusst. Die Tubulin-Bindung eines fluorierten Colchicinoids wurde mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Die Ergebnisse waren im Einklang mit Zellkultur-Untersuchungen zur Proliferations-Hemmung und Apoptose-Induktion. Insgesamt wurden zwölf potente Substanzen identifiziert, auf deren Basis rationale Diversifizierungen durchgeführt werden könnten.

Summary

Filament-forming proteins are involved in many cell functions. Microtubules, for example, are essential in cell division and intracellular transport, as they supply paths along which cellular components are transported to their site of action. This transport is mediated by kinesins as well as other proteins. In the case of kinesins, the so-called motor domains bind to microtubules and movement is achieved by ATP turnover. Although crystal structures exist for kinesin motor domains as well as for $\alpha\beta$ -tubulin (the building block of microtubules) complexes of kinesin motor domains and microtubules have eluded a study by crystallography. Cryo-electron microscopy with three-dimensional reconstruction has been used to study the interaction of kinesins and microtubules, allowing secondary structural elements and nucleotide-dependent conformational changes to be determined. However, the limited resolution of this method means that it is not possible to identify interacting amino acid residues. In addition, dynamic conformational changes are observed that deviate from existing crystal structures. Computational models and alanine mutagenesis studies have provided details about how microtubule-dependent ATP-hydrolysis and conformational changes in the motor domain are coordinated.

In this thesis, solid-state MAS NMR spectroscopy was applied for the first time to investigate the interaction of kinesin motor domains and microtubules at the atomic level. As a necessary prerequisite for NMR measurements, reproducible methods for preparing isotopically labelled proteins and protein complexes were established. Native microtubules were used with natural abundance isotope distributions whereas kinesin motor domains were labelled with ^2H -, ^{13}C -, ^{15}N -isotopes by recombinant expression. In particular, it was important to achieve a maximum deuteration level for the kinesin motor domains.

Using solid-state MAS NMR spectroscopy magnetisation transfer from protons in the microtubule to ^{13}C and ^{15}N nuclear spins in the kinesin motor domains was achieved. In dipolar recoupling sequences like RFDR and TEDOR this magnetisation transfer filtered selectively the interacting residues on the kinesin side. It resulted in the detection of a limited number of cross peaks with chemical shifts characteristic for certain amino acid types. In particular, signals observed from charged amino acids of the kinesin motor domain suggest an electrostatic interaction with the highly negatively charged surface of the microtubules. The possibility of signals from nucleotide-binding pocket was excluded by preparing a nucleotide-free complex sample. A possible effect due to the buffer component Pipes was excluded with solution NMR methods and isothermal titration calorimetry. For sequential assignment experiments, dynamic nuclear polarization (DNP-MAS-NMR spectroscopy) was used for signal enhancement.

The proposed method for studying protein-protein interactions is fundamental for further structural analysis. By using follow-up experiments it could be possible to assign the relevant residues from the kinesin motor domains. Moreover, dynamic processes could be investigated. In addition, analogous experiments for other filament-binding proteins like Tau could be implemented.

In a second project new colchicine analogues were investigated for their biological activity. Colchicine is a natural compound that inhibits the polymerisation of tubulin thereby preventing the formation of microtubules. Due to its high toxicity it is not used for antiproliferative therapy. Consequently, there is a need to develop colchicine derivatives with improved therapeutic properties. Most of the colchicinoids analysed in this thesis were capable of inhibiting tubulin polymerisation *in vitro* and bound to the colchicine-binding site on tubulin. In addition, some of the compounds could affect the intracellular morphology of the microtubules. The tubulin binding of a fluorinated colchicinoid was detected by ^{19}F NMR spectroscopy. The results were consistent with cell culture studies of proliferation inhibition and apoptosis induction. In all, twelve potent compounds were identified. On their basis rational diversification could be carried out.

Literaturverzeichnis

- Agarwal, V., Faelber, K., Schmieder, P. und Reif, B. (2009). High-resolution double-quantum deuterium magic angle spinning solid-state NMR spectroscopy of perdeuterated proteins. *J Am Chem Soc* **131**, 2-3.
- Akbey, Ü., Franks, W.T., Linden, A., Lange, S., Griffin, R.G., van Rossum, B.-J. und Oschkinat, H. (2010a). Dynamic nuclear polarization of deuterated proteins. *Angew Chem Int Ed* **49**, 7803-7806.
- Akbey, Ü., Lange, S., Franks, W.T., Linser, R., Rehbein, K., Diehl, A., van Rossum, B.-J., Reif, B. und Oschkinat, H. (2010b). Optimum levels of exchangeable protons in perdeuterated proteins for proton detection in MAS solid-state NMR spectroscopy. *J Biomol NMR* **46**, 67-73.
- Alonso, M.C., van Damme, J., Vandekerckhove, J. und Cross, R.A. (1998). Proteolytic mapping of kinesin/ncd-microtubule interface: nucleotide-dependent conformational changes in the loops L8 and L12. *The EMBO Journal* **17**, 945-951.
- Alushin, G.M., Ramey, V.H., Pasqualato, S., Ball, D.A., Grigorieff, N., Musacchio, A. und Nogales, E. (2010). The Ndc80 kinetochore complex forms oligomeric arrays along microtubules. *Nature* **467**, 805-810.
- Bachand, G.D., Hess, H., Ratna, B., Satir, P. und Vogel, V. (2009). "Smart dust" biosensors powered by biomolecular motors. *Lab Chip* **9**, 1661-1666.
- Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I. und Doolittle, W.F. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**, 972-977.
- Baldus, M., Petkova, A.T., Herzfeld, J. und Griffin, R.G. (1998). Cross polarization in the tilted frame: assignment and spectral simplification in heteronuclear spin systems. *Mol Phys* **95**, 1197-1207.
- Bane, S., Puett, D., Macdonald, T.L. und Williams, R.C. (1984). Binding to tubulin of the colchicine analog 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)troponone. Thermodynamic and kinetic aspects. *J Biol Chem* **259**, 7391-7398.
- Banerjee, A. und Luduena, R.F. (1987). Kinetics of association and dissociation of colchicine-tubulin complex from brain and renal tubulin. Evidence for the existence of multiple isotypes of tubulin in brain with differential affinity to colchicine. *FEBS Lett* **219**, 103-107.
- Banerjee, A. und Luduena, R.F. (1992). Kinetics of colchicine binding to purified β -tubulin isotypes from bovine brain. *J Biol Chem* **267**, 13335-13339.
- Banerjee, A., Roach, M.C., Trcka, P. und Luduena, R.F. (1992). Preparation of a monoclonal antibody specific for the class IV isotype of β -tubulin. Purification and assembly of $\alpha\beta_{II}$, $\alpha\beta_{III}$, and $\alpha\beta_{IV}$ tubulin dimers from bovine brain. *J Biol Chem* **267**, 5625-5630.
- Banerjee, A., Roach, M.C., Wall, K.A., Lopata, M.A., Cleveland, D.W. und Ludueña, R.F. (1988). A monoclonal antibody against the type II isotype of β -tubulin. Preparation of isotypically altered tubulin. *J Biol Chem* **263**, 3029-3034.
- Bennett, A.E., Ok, J.H., Griffin, R.G. und Vega, S. (1992). Chemical shift correlation spectroscopy in rotating solids: Radio frequency-driven dipolar recoupling and longitudinal exchange. *J Chem Phys* **96**, 8624-8627.
- Bhattacharyya, B., Panda, D., Gupta, S. und Banerjee, M. (2008). Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med Res Rev* **28**, 155-183.
- Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E. und Woods, C.M. (1995). Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res* **55**, 2325-2333.
- Bonne, D., Heuséle, C., Simon, C. und Pantaloni, D. (1985). 4',6-Diamidino-2-phenylindole, a fluorescent probe for tubulin and microtubules. *J Biol Chem* **260**, 2819-2825.
- Borisy, G.G. und Taylor, E.W. (1967). The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. *J Cell Biol* **34**, 535-548.
- Boyer, F.-D., Dubois, J., Thoret, S., Dau, M.-E.T.H. und Hanna, I. (2010). Synthesis and tubulin-binding properties of new allocolchicinoids. *Bioorg Chem* **38**, 149-158.
- Bracher, F. (2003). Angriffspunkt Ergosterolbiosynthese: Wirkstoffe und Wirkprinzipien. *Pharm Unserer Zeit* **32**, 118-123.

- Breen, E.C. und Walsh, J.J. (2010). Tubulin-targeting agents in hybrid drugs. *Curr Med Chem* 17, 609-639.
- Burns, R.G. (1991). α -, β -, and γ -tubulins: sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motil. Cytoskeleton* 20, 181-189.
- Calligaris, D., Verdier-Pinard, P., Devred, F., Villard, C., Braguer, D. und Lafitte, D. (2010). Microtubule targeting agents: from biophysics to proteomics. *Cell Mol Life Sci* 67, 1089-1104.
- Carlomagno, T., Blommers, M.J.J., Meiler, J., Jahnke, W., Schupp, T., Petersen, F., Schinzer, D., Altmann, K.-H. und Griesinger, C. (2003). The high-resolution solution structure of epothilone A bound to tubulin: an understanding of the structure-activity relationships for a powerful class of antitumor agents. *Angew Chem Int Ed* 42, 2511-2515.
- Carter, A.P., Cho, C., Jin, L. und Vale, R.D. (2011). Crystal structure of the dynein motor domain. *Science* 331, 1159-1165.
- Cassimeris, L. (2002). The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol* 14, 18-24.
- Castillo, A., Morse, H.C., Godfrey, V.L., Naeem, R. und Justice, M.J. (2007). Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. *Cancer Res* 67, 10138-10147.
- Castoldi, M. und Popov, A.V. (2003). Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr Purif* 32, 83-88.
- Cauda, V., Engelke, H., Sauer, A., Arcizet, D., Bräuchle, C., Rädler, J. und Bein, T. (2010). Colchicine-loaded lipid bilayer-coated 50 nm mesoporous nanoparticles efficiently induce microtubule depolymerization upon cell uptake. *Nano Lett* 10, 2484-2492.
- Chakrabarti, G., Kim, S., Gupta, M.L., Barton, J.S. und Himes, R.H. (1999). Stabilization of tubulin by deuterium oxide. *Biochemistry* 38, 3067-3072.
- Chakrabarti, G., Sengupta, S. und Bhattacharyya, B. (1996). Thermodynamics of colchicinoid-tubulin interactions. Role of B-ring and C-7 substituent. *J Biol Chem* 271, 2897-2901.
- Chapman, H.N., Fromme, P., Barty, A., White, T.A., Kirian, R.A., Aquila, A., Hunter, M.S., Schulz, J., DePonte, D.P., Weierstall, U., Doak, R.B., Maia, F.R.N.C., Martin, A.V., Schlichting, I., Lomb, L., Coppola, N., Shoeman, R.L., Epp, S.W., Hartmann, R., Rolles, D. *et al.* (2011). Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature* 470, 73-77.
- Cheng, K.L., Bradley, T. und Budman, D.R. (2008). Novel microtubule-targeting agents - the epothilones. *Biologics* 2, 789-811.
- Chevelkov, V., Rehbein, K., Diehl, A. und Reif, B. (2006). Ultrahigh resolution in proton solid-state NMR spectroscopy at high levels of deuteration. *Angew Chem Int Ed* 45, 3878-3881.
- Clark, J.I. und Garland, D. (1978). Fluorescein colchicine. Synthesis, purification, and biological activity. *J Cell Biol* 76, 619-627.
- Conde, C. und Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10, 319-332.
- Cormier, A., Knossow, M., Wang, C. und Gigant, B. (2010). The binding of vinca domain agents to tubulin: structural and biochemical studies. *Methods Cell Biol* 95, 373-390.
- Cross, R.A. (2004). The kinetic mechanism of kinesin. *Trends Biochem Sci* 29, 301-309.
- Davis, P.D., Dougherty, G.J., Blakey, D.C., Galbraith, S.M., Tozer, G.M., Holder, A.L., Naylor, M.A., Nolan, J., Stratford, M.R.L., Chaplin, D.J. und Hill, S.A. (2002). ZD6126: a novel vascular-targeting agent that causes selective destruction of tumor vasculature. *Cancer Res* 62, 7247-7253.
- De Vos, K.J., Grierson, A.J., Ackerley, S. und Miller, C.C.J. (2008). Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 31, 151-173.
- Detrich, H.W., Parker, S.K., Williams, R.C., Nogales, E. und Downing, K.H. (2000). Cold adaptation of microtubule assembly and dynamics. Structural interpretation of primary sequence changes present in the α - and β -tubulins of Antarctic fishes. *J Biol Chem* 275, 37038-37047.
- Detrich, H.W., Williams, R.C., Macdonald, T.L., Wilson, L. und Puett, D. (1981). Changes in the circular dichroic spectrum of colchicine associated with its binding to tubulin. *Biochemistry* 20, 5999-6005.

- Diefenbach, R.J., Miranda-Saksena, M., Diefenbach, E., Holland, D.J., Boadle, R.A., Armati, P.J. und Cunningham, A.L. (2002). Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J Virol* **76**, 3282-3291.
- Diez, S. und Howard, J. (2009). Nanotechnological applications of biomolecular motor systems. *Phys Canada* **65**, 7-12.
- Dogterom, M., Kerssemakers, J.W.J., Romet-Lemonne, G. und Janson, M.E. (2005). Force generation by dynamic microtubules. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 67-74.
- Döhner, K., Nagel, C.-H. und Sodeik, B. (2005). Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol* **13**, 320-327.
- Dorléans, A., Gigant, B., Ravelli, R.B.G., Mailliet, P., Mikol, V. und Knossow, M. (2009). Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 13775-13779.
- Downing, K.H. (2000). Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 89-111.
- Downing, K.H. und Nogales, E. (2010). Cryoelectron microscopy applications in the study of tubulin structure, microtubule architecture, dynamics and assemblies, and interaction of microtubules with motors. *Meth Enzymol* **483**, 121-142.
- Drechsel, D.N. und Kirschner, M.W. (1994). The minimum GTP cap required to stabilize microtubules. *Curr Biol* **4**, 1053-1061.
- Dumontet, C. und Jordan, M.A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 790-803.
- Dumontet, C., Jordan, M.A. und Lee, F.F.Y. (2009). Ixabepilone: targeting β III-tubulin expression in taxane-resistant malignancies. *Mol Cancer Ther* **8**, 17-25.
- Dutcher, S.K. (2003). Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr Opin Microbiol* **6**, 634-640.
- Erickson, H.P. (1997). FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trends Cell Biol* **7**, 362-367.
- Erickson, H.P., Anderson, D.E. und Osawa, M. (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 504-528.
- Etienne-Manneville, S. (2010). From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 104-111.
- Etzkorn, M., Böckmann, A., Lange, A. und Baldus, M. (2004). Probing molecular interfaces using 2D magic-angle-spinning NMR on protein mixtures with different uniform labeling. *J Am Chem Soc* **126**, 14746-14751.
- Fiedler, S., Knocke, C., Vogt, J., Oschkinat, H. und Diehl, A. (2007). HCDF as a protein-labeling methodology. *Genetic Engineering & Biotechnology News* **27**.
- Fletcher, D.A. und Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485-492.
- Franks, W.T., Kloepper, K.D., Wylie, B.J. und Rienstra, C.M. (2007). Four-dimensional heteronuclear correlation experiments for chemical shift assignment of solid proteins. *J Biomol NMR* **39**, 107-131.
- Freyer, M.W. und Lewis, E.A. (2008). Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods Cell Biol* **84**, 79-113.
- Friedman, D.S. und Vale, R.D. (1999). Single-molecule analysis of kinesin motility reveals regulation by the cargo-binding tail domain. *Nat Cell Biol* **1**, 293-297.
- Fu, G., Huang, T., Buss, J., Coltharp, C., Hensel, Z. und Xiao, J. (2010). *In vivo* structure of the *E. coli* FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM). *PLoS ONE* **5**, e12680.
- Garcia-Saez, I., Yen, T., Wade, R.H. und Kozielski, F. (2004). Crystal structure of the motor domain of the human kinetochore protein CENP-E. *J Mol Biol* **340**, 1107-1116.
- Garland, D.L. (1978). Kinetics and mechanism of colchicine binding to tubulin: evidence for ligand-induced conformational change. *Biochemistry* **17**, 4266-4272.
- Gennerich, A. und Vale, R.D. (2009). Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 59-67.

- Gerth, K., Bedorf, N., Höfle, G., Irschik, H. und Reichenbach, H. (1996). Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* **49**, 560-563.
- Giannakakou, P., Gussio, R., Nogales, E., Downing, K.H., Zaharevitz, D., Bollbuck, B., Poy, G., Sackett, D., Nicolaou, K.C. und Fojo, T. (2000). A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2904-2909.
- Gigant, B., Curmi, P.A., Martin-Barbey, C., Charbaut, E., Lachkar, S., Lebeau, L., Siavoshian, S., Sobel, A. und Knossow, M. (2000). The 4 Å X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex. *Cell* **102**, 809-816.
- Gigant, B., Wang, C., Ravelli, R.B.G., Roussi, F., Steinmetz, M.O., Curmi, P.A., Sobel, A. und Knossow, M. (2005). Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* **435**, 519-522.
- Gindhart, J.G. und Goldstein, L.S. (1996). Tetra-trico peptide repeats are present in the kinesin light chain. *Trends Biochem Sci* **21**, 52-53.
- Grant, B.J., McCammon, J.A., Caves, L.S.D. und Cross, R.A. (2007). Multivariate analysis of conserved sequence-structure relationships in kinesins: coupling of the active site and a tubulin-binding sub-domain. *J Mol Biol* **368**, 1231-1248.
- Griffin, R.G. (1998). Dipolar recoupling in MAS spectra of biological solids. *Nat Struct Biol* **5 Suppl**, 508-512.
- Griffin, R.G., Bodenhausen, G., Haberkorn, R.A., Huang, T.H., Munowitz, M., Osredkar, R., Ruben, D.J., Stark, R.E. und Van Willigen, H. (1981). High-resolution dipolar n.m.r. spectra of solids. *Phil Trans R Soc Lond A* **299**, 547-563.
- Grubisic, I., Shokhirev, M.N., Orzechowski, M., Miyashita, O. und Tama, F. (2010). Biased coarse-grained molecular dynamics simulation approach for flexible fitting of X-ray structure into cryo electron microscopy maps. *J Struct Biol* **169**, 95-105.
- Grzesiek, S. und Bax, A. (1992a). Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J Am Chem Soc* **114**, 6291-6293.
- Grzesiek, S. und Bax, A. (1992b). An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. *J Mag Res* **99**, 201-207.
- Gulick, A.M., Song, H., Endow, S.A. und Rayment, I. (1998). X-ray crystal structure of the yeast Kar3 motor domain complexed with Mg·ADP to 2.3 Å resolution. *Biochemistry* **37**, 1769-1776.
- Gullion, T. und Schaefer, J. (1989). Rotational-echo double-resonance NMR. *J Mag Res* **81**, 196-200.
- Hackney, D.D. (1988). Kinesin ATPase: rate-limiting ADP release. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 6314-6318.
- Hall, A. (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 5-14.
- Hall, D.A., Maus, D.C., Gerfen, G.J., Inati, S.J., Becerra, L.R., Dahlquist, F.W. und Griffin, R.G. (1997). Polarization-enhanced NMR spectroscopy of biomolecules in frozen solution. *Science* **276**, 930-932.
- Hammond, J.W., Cai, D. und Verhey, K.J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Current Opinion in Cell Biology* **20**, 71-76.
- Hastie, S.B. (1989). Spectroscopic and kinetic features of allicolchicine binding to tubulin. *Biochemistry* **28**, 7753-7760.
- Hastie, S.B. (1991). Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacol Ther* **51**, 377-401.
- Hastie, S.B., Williams, R.C., Puett, D. und Macdonald, T.L. (1989). The binding of isocolchicine to tubulin. Mechanisms of ligand association with tubulin. *J Biol Chem* **264**, 6682-6688.
- Haydon, D.J., Stokes, N.R., Ure, R., Galbraith, G., Bennett, J.M., Brown, D.R., Baker, P.J., Barynin, V.V., Rice, D.W., Sedelnikova, S.E., Heal, J.R., Sheridan, J.M., Aiwale, S.T., Chauhan, P.K., Srivastava, A., Taneja, A., Collins, I., Errington, J. und Czaplewski, L.G. (2008). An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science* **321**, 1673-1675.
- Heise, H. (2008). Solid-state NMR spectroscopy of amyloid proteins. *ChemBioChem* **9**, 179-189.

- Higman, V.A., Flinders, J., Hiller, M., Jehle, S., Markovic, S., Fiedler, S., van Rossum, B.-J. und Oschkinat, H. (2009). Assigning large proteins in the solid state: a MAS NMR resonance assignment strategy using selectively and extensively ^{13}C -labelled proteins. *J Biomol NMR* 44, 245-260.
- Hing, A.W., Vega, S. und Schaefer, J. (1992). Transferred-echo double-resonance NMR. *J Mag Res* 92, 205-209.
- Hirokawa, N. und Noda, Y. (2008). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* 88, 1089-1118.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. und Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 682-696.
- Hirose, K., Akimaru, E., Akiba, T., Endow, S.A. und Amos, L.A. (2006). Large conformational changes in a kinesin motor catalyzed by interaction with microtubules. *Mol Cell* 23, 913-923.
- Hohwy, M., Jakobsen, H.J., Edén, M., Levitt, M.H. und Nielsen, N.C. (1998). Broadband dipolar recoupling in the nuclear magnetic resonance of rotating solids: A compensated C7 pulse sequence *J Chem Phys* 108, 2686-2694.
- Hua, W., Chung, J. und Gelles, J. (2002). Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements. *Science* 295, 844-848.
- Huszar, D., Theoclitou, M.-E., Skolnik, J. und Herbst, R. (2009). Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 28, 197-208.
- Huzil, J.T., Barakat, K. und Tuszynski, J.A. (2009). Electrostatic Contributions to Colchicine Binding within Tubulin Isoforms. *Electromagn Biol Med* 28, 355-364.
- Huzil, J.T., Mane, J. und Tuszynski, J.A. (2010). Computer assisted design of second-generation colchicine derivatives. *Interdiscip Sci* 2, 169-174.
- Hyman, A.A., Salsler, S., Drechsel, D.N., Unwin, N. und Mitchison, T.J. (1992). Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell* 3, 1155-1167.
- Ibrahim, N.K., Desai, N., Legha, S., Soon-Shiong, P., Theriault, R.L., Rivera, E., Esmali, B., Ring, S.E., Bedikian, A., Hortobagyi, G.N. und Ellerhorst, J.A. (2002). Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin Cancer Res* 8, 1038-1044.
- Itoh, T.J. und Sato, H. (1984). The effects of deuterium oxide ($^2\text{H}_2\text{O}$) on the polymerization of tubulin *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 800, 21-27.
- Jackson, J.R., Patrick, D.R., Dar, M.M. und Huang, P.S. (2007). Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer* 7, 107-117.
- Janke, C. und Kneussel, M. (2010). Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* 33, 362-372.
- Jenkins, C., Samudrala, R., Anderson, I., Hedlund, B.P., Petroni, G., Michailova, N., Pinel, N., Overbeek, R., Rosati, G. und Staley, J.T. (2002). Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 17049-17054.
- Johansson, E.M.V., Dubois, J., Darbre, T. und Reymond, J.-L. (2010). Glycopeptide dendrimer colchicine conjugates targeting cancer cells. *Bioorg Med Chem* 18, 6589-6597.
- Katragadda, S., Budda, B., Anand, B.S. und Mitra, A.K. (2005). Role of efflux pumps and metabolising enzymes in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2, 683-705.
- Kavallaris, M. (2010). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer* 10, 194-204.
- Kehlet, C., Nielsen, J.T., Tosner, Z. und Nielsen, N.C. (2011). Resolution-enhanced solid-state NMR ^{13}C - ^{13}C correlation spectroscopy by optimal control dipolar-driven spin-state-selective coherence transfer *J Phys Chem Lett* 2, 543-547.
- Kikkawa, M. und Hirokawa, N. (2006). High-resolution cryo-EM maps show the nucleotide binding pocket of KIF1A in open and closed conformations. *EMBO J* 25, 4187-4194.
- Kikkawa, M., Sablin, E.P., Okada, Y., Yajima, H., Fletterick, R.J. und Hirokawa, N. (2001). Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature* 411, 439-445.
- Kingston, D.G.I. (2009). Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *J. Nat. Prod.* 72, 507-515.

- Kozielski, F., Sack, S., Marx, A., Thormählen, M., Schönbrunn, E., Biou, V., Thompson, A., Mandelkow, E.M. und Mandelkow, E. (1997a). The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell* **91**, 985-994.
- Kozielski, F., Schönbrunn, E., Sack, S., Müller, J., Brady, S.T. und Mandelkow, E. (1997b). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the single-headed and double-headed motor protein kinesin. *J Struct Biol* **119**, 28-34.
- Kühner, S., van Noort, V., Betts, M.J., Leo-Macias, A., Batisse, C., Rode, M., Yamada, T., Maier, T., Bader, S., Beltran-Alvarez, P., Castaño-Diez, D., Chen, W.-H., Devos, D., Güell, M., Norambuena, T., Racke, I., Rybin, V., Schmidt, A., Yus, E., Aebersold, R. *et al.* (2009). Proteome organization in a genome-reduced bacterium. *Science* **326**, 1235-1240.
- Kull, F.J., Sablin, E.P., Lau, R., Fletterick, R.J. und Vale, R.D. (1996). Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* **380**, 550-555.
- Kull, F.J., Vale, R.D. und Fletterick, R.J. (1998). The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins. *J Muscle Res Cell Motil* **19**, 877-886.
- Kumar, A., Heise, H., Blommers, M.J.J., Krastel, P., Schmitt, E., Petersen, F., Jeganathan, S., Mandelkow, E.-M., Carlomagno, T., Griesinger, C. und Baldus, M. (2010a). Interaction of epothilone B (patupilone) with microtubules as detected by two-dimensional solid-state NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed* **49**, 7504-7507.
- Kumar, K., Awasthi, D., Berger, W.T., Tonge, P.J., Slayden, R.A. und Ojima, I. (2010b). Discovery of anti-TB agents that target the cell-division protein FtsZ. *Future Med Chem* **2**, 1305-1323.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lakämper, S. und Meyhöfer, E. (2006). Back on track - on the role of the microtubule for kinesin motility and cellular function. *J Muscle Res Cell Motil* **27**, 161-171.
- Lalli, D., Schanda, P., Chowdhury, A., Retel, J., Hiller, M., Higman, V.A., Handel, L., Agarwal, V., Reif, B., van Rossum, B., Akbey, Ü. und Oschkinat, H. (2011). Three-dimensional deuterium-carbon correlation experiments for high-resolution solid-state MAS NMR spectroscopy of large proteins. *submitted*
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S.B., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R.L., McIntosh, J.R., Miki, H., Mitchison, T.J., Okada, Y., Reddy, A.S.N., Saxton, W.M., Schliwa, M., Scholey, J.M., Vale, R.D., Walczak, C.E. und Wordeman, L. (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* **167**, 19-22.
- Laws, D., Bitter, H.-M.L. und Jerschow, B. (2002). Solid-state NMR spectroscopic methods in chemistry. *Angew Chem Int Ed* **41**, 3096-3129.
- Learman, S.S., Kim, C.D., Stevens, N.S., Kim, S., Wojcik, E.J. und Walker, R.A. (2009). NSC 622124 inhibits human Eg5 and other kinesins via interaction with the conserved microtubule-binding site. *Biochemistry* **48**, 1754-1762.
- Leese, M.P., Jourdan, F., Kimberley, M.R., Cozier, G.E., Thiyagarajan, N., Stengel, C., Regis-Lydi, S., Foster, P.A., Newman, S.P., Acharya, K.R., Ferrandis, E., Purohit, A., Reed, M.J. und Potter, B.V.L. (2010). Chimeric microtubule disruptors. *ChemComm* **46**, 2907-2909.
- Lefèvre, J., Chernov, K., Joshi, V., Delga, S., Toma, F., Pastré, D., Curmi, P.A. und Savarin, P. (2011). The carboxy terminal of tubulin: a versatile cationic-partner. Binding of tau, polyamines, and calcium. *J Biol Chem* **286**, 3065-3078.
- Lewis, S.A., Tian, G. und Cowan, N.J. (1997). The α - and β -tubulin folding pathways. *Trends Cell Biol* **7**, 479-484.
- Li, H., DeRosier, D.J., Nicholson, W.V., Nogales, E. und Downing, K.H. (2002). Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure* **10**, 1317-1328.
- Lian, L.-Y. und Middleton, D. (2001). Labelling approaches for protein structural studies by solution-state and solid-state NMR. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **29**, 171-190.
- Lincoln, P., Nordh, J., Deinum, J., Angström, J. und Nordén, B. (1991). Conformation of thicolchicine and two B-ring-modified analogues bound to tubulin studied with optical spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 1179-1187.

- Lippens, G., Sillen, A., Landrieu, I., Amniai, L., Sibille, N., Barbier, P., Leroy, A., Hanouille, X. und Wieruszeski, J.-M. (2007). Tau aggregation in Alzheimer's disease: what role for phosphorylation? *Prion* 1, 21-25.
- LoRusso, P.M., Gadgeel, S.M., Wozniak, A., Barge, A.J., Jones, H.K., DelProposto, Z.S., DeLuca, P.A., Evelhoch, J.L., Boerner, S.A. und Wheeler, C. (2008). Phase I clinical evaluation of ZD6126, a novel vascular-targeting agent, in patients with solid tumors. *Invest New Drugs* 26, 159-167.
- Löwe, J., Li, H., Downing, K.H. und Nogales, E. (2001). Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol* 313, 1045-1057.
- Magnani, M., Ortuso, F., Soro, S., Alcaro, S., Tramontano, A. und Botta, M. (2006). The β I/ β III-tubulin isoforms and their complexes with antimetabolic agents. Docking and molecular dynamics studies. *FEBS J* 273, 3301-3310.
- Mandelkow, E. und Mandelkow, E.-M. (2002). Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol* 12, 585-591.
- Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. und Milligan, R.A. (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol* 114, 977-991.
- Marchetti, S., Mazzanti, R., Beijnen, J.H. und Schellens, J.H.M. (2007). Concise review: Clinical relevance of drug-drug and herb-drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Oncologist* 12, 927-941.
- Martino, R., Gilard, V., Desmoulin, F. und Malet-Martino, M. (2005). Fluorine-19 or phosphorus-31 NMR spectroscopy: a suitable analytical technique for quantitative *in vitro* metabolic studies of fluorinated or phosphorylated drugs. *J Pharm Biomed Anal* 38, 871-891.
- Marx, A., Müller, J. und Mandelkow, E. (2005). The structure of microtubule motor proteins. *Adv Protein Chem* 71, 299-344.
- Mayer, M. und Meyer, B. (1999). Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed* 38, 1784-1788.
- Mayer, M. und Meyer, B. (2001). Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* 123, 6108-6117.
- Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L. und Mitchison, T.J. (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 286, 971-974.
- Mayer, T.U. und Marx, A. (2010). Five molecules we would take to a remote island. *Chem Biol* 17, 556-560.
- McDermott, A. (2009). Structure and dynamics of membrane proteins by magic angle spinning solid-state NMR. *Annu Rev Biophys* 38, 385-403.
- McKean, P.G., Vaughan, S. und Gull, K. (2001). The extended tubulin superfamily. *Journal of Cell Science* 114, 2723-2733.
- Micheletti, G., Poli, M., Borsotti, P., Martinelli, M., Imberti, B., Taraboletti, G. und Giavazzi, R. (2003). Vascular-targeting activity of ZD6126, a novel tubulin-binding agent. *Cancer Res* 63, 1534-1537.
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K. und Hirokawa, N. (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7004-7011.
- Mitchison, T. und Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.
- Naber, N., Larson, A., Rice, S., Cooke, R. und Pate, E. (2011). Multiple conformations of the nucleotide site of kinesin family motors in the triphosphate state. *J Mol Biol*.
- Naber, N., Minehardt, T.J., Rice, S., Chen, X., Grammer, J., Matuska, M., Vale, R.D., Kollman, P.A., Car, R., Yount, R.G., Cooke, R. und Pate, E. (2003). Closing of the nucleotide pocket of kinesin-family motors upon binding to microtubules. *Science* 300, 798-801.
- Nettles, J.H., Li, H., Cornett, B., Krahn, J.M., Snyder, J.P. und Downing, K.H. (2004). The binding mode of epothilone A on $\alpha\beta$ -tubulin by electron crystallography. *Science* 305, 866-869.
- Nicolaus, N., Strauss, S., Neudörfl, J.-M., Prokop, A. und Schmalz, H.-G. (2009). A [2+2+2]-cycloaddition approach toward 6-oxa-allocolchicinoids with apoptosis-inducing activity. *Org Lett* 11, 341-344.

- Nicolaus, N. (2010). Diversitätsorientierte Synthese bioaktiver Allocolchicinoide und Colchicinoide unter Verwendung Übergangsmetall-katalysierter Cycloaddition (Dissertationsschrift). Verlag Dr. Hut, München.
- Nicolaus, N., Zapke, J., Riesterer, P., Neudörfl, J.-M., Prokop, A., Oschkinat, H. und Schmalz, H.-G. (2010). Azides derived from colchicine and their use in library synthesis: a practical entry to new bioactive derivatives of an old natural drug. *ChemMedChem* 5, 661-665.
- Niel, E. und Scherrmann, J.-M. (2006). Colchicine today. *Joint Bone Spine* 73, 672-678.
- Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69, 277-302.
- Nogales, E., Wolf, S.G. und Downing, K.H. (1998). Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199-203.
- Odlo, K., Fournier-Dit-Chabert, J., Ducki, S., Gani, O.A.B.S.M., Sylte, I. und Hansen, T.V. (2010). 1,2,3-Triazole analogs of combretastatin A-4 as potential microtubule-binding agents. *Bioorg Med Chem* 18, 6874-6885.
- Osteryoung, K.W. und Nunnari, J. (2003). The division of endosymbiotic organelles. *Science* 302, 1698-1704.
- Panda, D., Chakrabarti, G., Hudson, J., Pigg, K., Miller, H.P., Wilson, L. und Himes, R.H. (2000). Suppression of microtubule dynamic instability and treadmilling by deuterium oxide. *Biochemistry* 39, 5075-5081.
- Patil, Y., Sadhukha, T., Ma, L. und Panyam, J. (2009). Nanoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance. *J Control Release* 136, 21-29.
- Pauli, J., Baldus, M., van Rossum, B., de Groot, H. und Oschkinat, H. (2001). Backbone and side-chain ^{13}C and ^{15}N signal assignments of the α -spectrin SH3 domain by magic angle spinning solid-state NMR at 17.6 Tesla. *ChemBioChem* 2, 272-281.
- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. und Wüthrich, K. (1997). Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12366-12371.
- Petterson, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. und Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.
- Ramey, V.H., Wang, H.-W., Nakajima, Y., Wong, A., Liu, J., Drubin, D., Barnes, G. und Nogales, E. (2011). The Dam1 ring binds to the E-hook of tubulin and diffuses along the microtubule. *Mol Biol Cell* 22, 457-466.
- Ravelli, R.B.G., Gigant, B., Curmi, P.A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A. und Knossow, M. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* 428, 198-202.
- Reese, M., Sánchez-Pedregal, V.M., Kubicek, K., Meiler, J., Blommers, M.J.J., Griesinger, C. und Carlomagno, T. (2007). Structural basis of the activity of the microtubule-stabilizing agent epothilone a studied by NMR spectroscopy in solution. *Angew Chem Int Ed* 46, 1864-1868.
- Renault, M., Cukkemane, A. und Baldus, M. (2010). Solid-state NMR spectroscopy on complex biomolecules. *Angew Chem Int Ed* 49, 8346-8357.
- Rendine, S., Pieraccini, S. und Sironi, M. (2010). Vinblastine perturbation of tubulin protofilament structure: a computational insight. *Phys Chem Chem Phys* 12, 15530-15536.
- Risinger, A.L. und Mooberry, S.L. (2010). Taccalonolides: Novel microtubule stabilizers with clinical potential. *Cancer Lett* 291, 14-19.
- Ritter, S. (2009). Rhodium- und Gold-katalysierte Cyclisierungsreaktionen zur Synthese B-Ring modifizierter Colchicinderivate und strukturell verwandter Verbindungen (Dissertationsschrift). Verlag Dr. Hut, München.
- Romagnoli, R., Baraldi, P.G., Cruz-Lopez, O., Lopez Cara, C., Carrion, M.D., Brancale, A., Hamel, E., Chen, L., Bortolozzi, R., Basso, G. und Viola, G. (2010). Synthesis and antitumor activity of 1,5-disubstituted 1,2,4-triazoles as cis-restricted combretastatin analogues. *J Med Chem* 53, 4248-4258.

- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J. und Studier, F.W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56, 125-135.
- Ross, J.L., Ali, M.Y. und Warshaw, D.M. (2008). Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 20, 41-47.
- Rossmann, M.G., Moras, D. und Olsen, K.W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* 250, 194-199.
- Rossum, B.J.v., Förster, H. und Groot, H.J.M.d. (1997). High-field and high-speed CP-MAS ¹³C NMR heteronuclear dipolar-correlation spectroscopy of solids with frequency-switched Lee-Goldburg homonuclear decoupling. *J Magn Reson* 124, 516-519.
- Sablin, E.P., Kull, F.J., Cooke, R., Vale, R.D. und Fletterick, R.J. (1996). Crystal structure of the motor domain of the kinesin-related motor ncd. *Nature* 380, 555-559.
- Sack, S., Müller, J., Marx, A., Thormählen, M., Mandelkow, E.M., Brady, S.T. und Mandelkow, E. (1997). X-ray structure of motor and neck domains from rat brain kinesin. *Biochemistry* 36, 16155-16165.
- Sambrook, J. und Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schägger, H., Aquila, H. und Von Jagow, G. (1988). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem* 173, 201-205.
- Schiff, P.B., Fant, J. und Horwitz, S.B. (1979). Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* 277, 665-667.
- Schlieper, D., Oliva, M.A., Andreu, J.M. und Löwe, J. (2005). Structure of bacterial tubulin BtubA/B: evidence for horizontal gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 9170-9175.
- Schmidt, M. und Bastians, H. (2007). Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resist Updat* 10, 162-181.
- Screpanti, E., Santaguida, S., Nguyen, T., Silvestri, R., Gussio, R., Musacchio, A., Hamel, E. und De Wulf, P. (2010). A screen for kinetochore-microtubule interaction inhibitors identifies novel antitubulin compounds. *PLoS ONE* 5, e11603.
- Serrano, L., de la Torre, J., Maccioni, R.B. und Avila, J. (1984). Involvement of the carboxyl-terminal domain of tubulin in the regulation of its assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 5989-5993.
- Shah, C., Xu, C.Z., Vickers, J. und Williams, R. (2001). Properties of microtubules assembled from mammalian tubulin synthesized in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 40, 4844-4852.
- Shaka, A.J., Keeler, J., Frenkiel, T. und Freeman, R. (1983). An improved sequence for broadband decoupling: WALTZ-16. *J Mag Res* 52, 335-338.
- Sharp, D.J., Rogers, G.C. und Scholey, J.M. (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature* 407, 41-47.
- Shelanski, M.L., Gaskin, F. und Cantor, C.R. (1973). Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 765-768.
- Sickles, D.W., Sperry, A.O., Testino, A. und Friedman, M. (2007). Acrylamide effects on kinesin-related proteins of the mitotic/meiotic spindle. *Toxicol Appl Pharmacol* 222, 111-121.
- Sillen, A., Barbier, P., Landrieu, I., Lefebvre, S., Wieruszeski, J.-M., Leroy, A., Peyrot, V. und Lippens, G. (2007). NMR investigation of the interaction between the neuronal protein tau and the microtubules. *Biochemistry* 46, 3055-3064.
- Simoni, D., Grisolia, G., Giannini, G., Roberti, M., Rondanin, R., Piccagli, L., Baruchello, R., Rossi, M., Romagnoli, R., Invidiata, F.P., Grimaudo, S., Jung, M.K., Hamel, E., Gebbia, N., Crosta, L., Abbadessa, V., Di Cristina, A., Dusonchet, L., Meli, M. und Tolomeo, M. (2005). Heterocyclic and phenyl double-bond-locked combretastatin analogues possessing potent apoptosis-inducing activity in HL60 and in MDR cell lines. *J Med Chem* 48, 723-736.
- Sindelar, C. und Downing, K. (2007). The beginning of kinesin's force-generating cycle visualized at 9-Å resolution. *J Cell Biol* 177, 377-385.
- Sindelar, C.V. und Downing, K.H. (2010). An atomic-level mechanism for activation of the kinesin molecular motors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 4111-4116.

- Skiniotis, G., Cochran, J.C., Müller, J., Mandelkow, E., Gilbert, S.P. und Hoenger, A. (2004). Modulation of kinesin binding by the C-termini of tubulin. *EMBO J* 23, 989-999.
- Snyder, J.P., Nettles, J.H., Cornett, B., Downing, K.H. und Nogales, E. (2001). The binding conformation of Taxol in β -tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5312-5316.
- Song, C., Hu, K.-N., Joo, C.-G., Swager, T.M. und Griffin, R.G. (2006). TOTAPOL: a biradical polarizing agent for dynamic nuclear polarization experiments in aqueous media. *J Am Chem Soc* 128, 11385-11390.
- Song, H. und Endow, S.A. (1996). Binding Sites on Microtubules of Kinesin Motors of the Same or Opposite Polarity. *Biochemistry* 35, 11203-11209.
- Song, W., He, Q., Cui, Y., Möhwald, H., Diez, S. und Li, J. (2009). Assembled capsules transportation driven by motor proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 175-178.
- Steven, A.C. und Baumeister, W. (2008). The future is hybrid. *J Struct Biol* 163, 186-195.
- Sui, H. und Downing, K.H. (2010). Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. *Structure* 18, 1022-1031.
- Sullivan, K.F. (1988). Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu Rev Cell Biol* 4, 687-716.
- Sun, S., Siglin, A., Williams, J.C. und Polenova, T. (2009). Solid-state and solution NMR studies of the CAP-Gly domain of mammalian dynactin and its interaction with microtubules. *J Am Chem Soc* 131, 10113-10126.
- Suzuki, Y., Shimizu, T., Morii, H. und Tanokura, M. (1997). Hydrolysis of AMPPNP by the motor domain of ncd, a kinesin-related protein. *FEBS Lett* 409, 29-32.
- Svoboda, K., Schmidt, C.F., Schnapp, B.J. und Block, S.M. (1993). Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 365, 721-727.
- Sweeney, H.L. und Houdusse, A. (2010). Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annu Rev Biophys* 39, 539-557.
- Szeverenyi, N., Sullivan, M. und Maciel, G. (1982). Observation of spin exchange by two-dimensional fourier transform ^{13}C cross polarization-magic-angle spinning. *J Mag Res* 47, 462-475.
- Takegoshi, K., Nakamura, S. und Terao, T. (2001). ^{13}C - ^1H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chem Phys Lett* 344, 631-637.
- Tamaru, S.-I., Ikeda, M., Shimidzu, Y., Matsumoto, S., Takeuchi, S. und Hamachi, I. (2010). Fluidic supramolecular nano- and microfibrils as molecular rails for regulated movement of nanosubstances. *Nat Commun* 1, 1-7.
- Tucker, C. und Goldstein, L.S. (1997). Probing the kinesin-microtubule interaction. *J Biol Chem* 272, 9481-9488.
- Tucker, R., Katira, P. und Hess, H. (2008). Herding nanotransporters: localized activation via release and sequestration of control molecules. *Nano Lett* 8, 221-226.
- Turner, J., Anderson, R., Guo, J., Beraud, C., Fletterick, R. und Sakowicz, R. (2001). Crystal structure of the mitotic spindle kinesin Eg5 reveals a novel conformation of the neck-linker. *J Biol Chem* 276, 25496-25502.
- Uchimura, S., Oguchi, Y., Hachikubo, Y., Ishiwata, S.i. und Muto, E. (2010). Key residues on microtubule responsible for activation of kinesin ATPase. *EMBO J* 29, 1167-1175.
- Uchimura, S., Oguchi, Y., Katsuki, M., Usui, T., Osada, H., Nikawa, J.-i., Ishiwata, S.i. und Muto, E. (2006). Identification of a strong binding site for kinesin on the microtubule using mutant analysis of tubulin. *EMBO J* 25, 5932-5941.
- Vale, R.D. (1996). Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors. *J Cell Biol* 135, 291-302.
- Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112, 467-480.
- Vale, R.D. und Milligan, R.A. (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288, 88-95.
- Vale, R.D., Reese, T.S. und Sheetz, M.P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39-50.

- van den Heuvel, M.G.L. und Dekker, C. (2007). Motor proteins at work for nanotechnology. *Science* **317**, 333-336.
- Verhey, K.J. und Gaertig, J. (2007). The tubulin code. *Cell Cycle* **6**, 2152-2160.
- Vidal, M., Cusick, M.E. und Barabási, A.-L. (2011). Interactome networks and human disease. *Cell* **144**, 986-998.
- Wade, R.H. (2007). Microtubules: an overview. *Methods Mol Med* **137**, 1-16.
- Wang, Z. und Sheetz, M.P. (2000). The C-terminus of tubulin increases cytoplasmic dynein and kinesin processivity. *Biophys J* **78**, 1955-1964.
- Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P. und McPhail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* **93**, 2325-2327.
- Werner, K., Lehner, I., Dhiman, H.K., Richter, C., Glaubitz, C., Schwalbe, H., Klein-Seetharaman, J. und Khorana, H.G. (2007). Combined solid state and solution NMR studies of α, ϵ - ^{15}N labeled bovine rhodopsin. *J Biomol NMR* **37**, 303-312.
- Westermann, S. und Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 938-947.
- Williams, R.C. und Lee, J.C. (1982). Preparation of tubulin from brain. *Meth Enzymol* **85**, 376-385.
- Wilson, L., Creswell, K.M. und Chin, D. (1975). The mechanism of action of vinblastine. Binding of [acetyl- ^3H]vinblastine to embryonic chick brain tubulin and tubulin from sea urchin sperm tail outer doublet microtubules. *Biochemistry* **14**, 5586-5592.
- Woehlke, G., Ruby, A.K., Hart, C.L., Ly, B., Hom-Booher, N. und Vale, R.D. (1997). Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell* **90**, 207-216.
- Woehlke, G. und Schliwa, M. (2000). Walking on two heads: the many talents of kinesin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 50-58.
- Wong, Y.L. und Rice, S.E. (2010). Kinesin's light chains inhibit the head- and microtubule-binding activity of its tail. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 11781-11786.
- Xiao, H., Verdier-Pinard, P., Fernandez-Fuentes, N., Burd, B., Angeletti, R., Fiser, A., Horwitz, S.B. und Orr, G.A. (2006). Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 10166-10173.
- Yan, Y., Sardana, V., Xu, B., Homnick, C., Halczenko, W., Buser, C.A., Schaber, M., Hartman, G.D., Huber, H.E. und Kuo, L.C. (2004). Inhibition of a mitotic motor protein: where, how, and conformational consequences. *J Mol Biol* **335**, 547-554.
- Yang, J.T., Laymon, R.A. und Goldstein, L.S. (1989). A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. *Cell* **56**, 879-889.
- Yildiz, A. und Selvin, P.R. (2005). Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends Cell Biol* **15**, 112-120.
- Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R.D. und Selvin, P.R. (2004). Kinesin walks hand-over-hand. *Science* **303**, 676-678.
- Yu, Y. und Feng, Y.-M. (2010). The role of kinesin family proteins in tumorigenesis and progression: potential biomarkers and molecular targets for cancer therapy. *Cancer* **116**, 5150-5160.
- Yue, Q.-X., Liu, X. und Guo, D.-A. (2010). Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med* **76**, 1037-1043.
- Zhang, W. (2011). Exploring the intermediate states of ADP-ATP exchange: A simulation study on Eg5. *J Phys Chem B* **115**, 784-795.
- Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H.W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., Saito, M., Tsuji, S., Hayashi, Y. und Hirokawa, N. (2001). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1B β . *Cell* **105**, 587-597.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B. und Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature* **378**, 578-583.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (1 Å = 0,1 nm)
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMPPCP	Adenosin-5'-[(β,γ)-methylen]triphosphat
AMPPNP	Adenosin-5'-[(β,γ)-imido]triphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BJAB	<i>Burkitt-like</i> Lymphom-Zelllinie
BMRB	<i>Biological Magnetic Resonance Data Bank</i> (http://www.bmrb.wisc.edu/)
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C-Terminus	Carboxyterminus
CAP-Gly	glycinreiche Domäne des Zytoskelett-assoziierten Proteins
CDS	Kodierungssequenz (<i>coding sequence</i>)
CP	Kreuzpolarisation (<i>cross polarization</i>)
D ₂ O	Deuteriumoxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DARR	<i>dipolar-assisted rotational resonance</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	dynamische Kernpolarisation (<i>dynamic nuclear polarization</i>)
DTT	Dithiothreitol
DX	direkte Anregung (<i>direct excitation</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
Ek	Enterokinase
EM	Elektronenmikroskopie
EMDB	<i>Electron Microscopy Data Bank</i> (http://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/)
Endk.	Endkonzentration
ESI	Elektrospray-Ionisation
FA	Ameisensäure (<i>formic acid</i>)
FSLG	<i>frequency-switched</i> Lee-Goldburg
FT-ICR	Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz (<i>fourier transform ion cyclotron resonance</i>)
FtsZ	bakterielles Tubulinhomolog (<i>filamentous temperature-sensitive mutant Z</i>)
fw	vorwärts (<i>forward</i>)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat

GMPCPP	Guanosin-5'-[(α,β)-methylen]triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HeLa	Zervixkarzinom-Zelllinie (nach Spenderin Henrietta Lacks benannt)
HETCOR	heteronukleare Korrelation
(His) ₆	6x-Polyhistidin-Anhang
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HZDF	Hochzelldichtefermentation
IMAC	immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (<i>immobilized metal affinity chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
kb	Kilobasen
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KIF	<i>kinesin family member</i>
LB	<i>lysogeny broth</i> (von Luria und Bertani beschriebenes Vollmedium)
LIC	ligationsunabhängige Klonierung (<i>ligation-independent cloning</i>)
LSM	<i>Laser-Scanning</i> Mikroskopie
LTQ	Lineare Ionenfalle (<i>linear ion trap quadrupole</i>)
MAS	<i>magic angle spinning</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
N-Terminus	Aminoterminus
n.H.	natürliche Häufigkeit / Isotopenverteilung
NMR	Kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
<i>ns</i>	Anzahl an Transienten (<i>number of scans</i>)
OD _{600nm}	optische Dichte (bei 600 nm)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphat buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (http://www.pdb.org)
PDSF	<i>proton driven spin diffusion</i>
PEM	Pufferzusammensetzung aus Pipes, EGTA und MgSO ₄
pET	Plasmid zur Expression, vermittelt durch die T7 RNA-Polymerase
Pipes	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ppm	Teile pro Millionen (<i>parts per million</i>)
®	eingetragene Marke (<i>registered trade mark</i>)
RB3-SLD	<i>stathmin-like domain of rat brain 3 protein</i>
REDOR	<i>rotational-echo double-resonance</i>
rev	rückwärts (<i>reverse</i>)

RFDR	<i>radio frequency driven recoupling</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
STD	<i>saturation transfer difference</i>
Tb	Thrombin
TEDOR	<i>transferred-echo double-resonance</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylamin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEV	Tabakätzvirus (<i>tobacco etch virus</i>)
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
TM	nichteingetragene Marke (<i>unregistered trade mark</i>)
t_{mix}	Mischzeit (<i>mixing time</i>)
TOTAPOL	1-(TEMPO-4-oxy)-3-(TEMPO-4-amino)propan-2-ol
TROSY	<i>transverse relaxation-optimized spectroscopy</i>
UV/VIS	ultraviolett / sichtbar (<i>ultraviolet / visible</i>)
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
4D	vierdimensional

Danksagung

Ich möchte mich zu allererst bei meinem Betreuer und Mentor Prof. Hartmut Oschkinat bedanken. Hartmut, du hast mir die Freiheit gegeben, mit der ich meine Promotion unter den besten Voraussetzungen, die ich mir vorstellen kann, durchführen konnte. Ich schätze dein Vertrauen in mich, deine Unterstützung und deine Menschlichkeit. Außerdem danke ich dir, dass du mir die Teilnahme an Tagungen und Weiterbildungen ermöglicht hast.

Eine gute Zusammenarbeit mit Mitarbeitern von Prof. Hans-Günther Schmalz (Universität Köln) und Dr. Dr. Aram Prokop (vormals Charité, heute Kliniken der Stadt Köln) erfolgte im Rahmen des von der Volkswagen-Stiftung geförderten Colchicin-Projekts. Ich danke Dr. Stefanie Ritter, Dr. Norman Nicolaus für die zahlreich synthetisierten Verbindungen inklusive dem Fluorescein-gekoppeltem Colchicin. Dr. Susanne Strauß und Philipp Riesterer führten die zytotoxischen Analysen durch.

Für die Unterstützung bei den Festkörper-MAS-NMR-Messungen möchte ich mich bei Dr. Barth-Jan van Rossum, Dr. W. Trent Franks, Stefan Markovic und Arne Linden bedanken. Barth, ich liebe deinen Humor. Und Stefan, was hätte ich nur ohne dich getan? Mit einer Engelsgeduld hast du mir die NMR-Welt erklärt und dein unbändiges Interesse an diesem Projekt ist einfach unglaublich. Dr. Peter Schmieder, Monika Beerbaum und Brigitte Schlegel danke ich für die unermüdliche Hilfe bei Lösungs-NMR-Messungen.

Innerhalb des FMP war es jederzeit möglich, das Know-how und die Geräte anderer Arbeitsgruppen zu nutzen. Daher danke ich Dr. Oksana Krylova und Nadin Jahnke, mit denen ich ITC-Messungen durchführen und diskutieren konnte. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. Dorothea Lorenz und Martina Ringling durchgeführt. Bei Jana Bogum und Jenny Eichhorst möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Handhabung der HeLa-Zellen bedanken. Jenny, danke auch für die Hilfe bei Problemen am LSM. Die Verbindung Totapol™ wurde von Dr. Edgar Specker synthetisiert.

Dr. Ronald Kühne und Dr. Gerd Krause haben mir Proteinstrukturen von Kinesinen und Tubulin dreidimensional näher gebracht haben. Ich danke Dr. Benjamin Bardiaux, der mich bei der Modellierung von Kinesin-Mikrotubuli-Komplexen unterstützte und mir so einige Tricks beigebracht hat.

Dr. Sebastian Beck und Rajko Winkler (Humboldt-Universität zu Berlin), ihr habt mit viel Zeitaufwand und Engagement etwas geschafft, an das ich überhaupt nicht mehr geglaubt habe. Es ist beeindruckend, was ihr mit euren MS-Maschinen leistet.

Von Dr. Tim Scholz und Petra Uta (Medizinische Hochschule Hannover) habe ich die Tubulin-Präparation gelernt. Die vielen Tricks und Kniffe haben es mir deutlich einfacher

gemacht, das Protokoll in einem neuen Labor zu etablieren. Das benötigte Schweinehirn wurde mir freundlicherweise von Herrn Breitenfels der Firma VION Lausitz zur Verfügung gestellt.

Dr. Anne Diehl danke ich für ihre Kompetenz in der Lösung jeglicher Laborprobleme. Und natürlich Dr. Katja Fälber (MDC Berlin), deine Ratschläge sind Gold wert. Die technischen Angestellten Natalja Erdman, Kristina Rehbein, Lilo Handel, Martina Leidert, Thi-Bich Thao Nguyen und Nils Cremer standen mir immer wieder mit Rat und Tat zur Seite. Natalja, danke für deine Hilfe und Ratschläge bei den Fermentationen.

Bei meinen lieben Laborkollegen insbesondere Dr. Vivien Lange, Dr. Janina Hahn, Dr. Johanna Becker-Baldus, Dr. Tobias Werther, Dr. Matthias Hiller, Jana Bröcker, Britta Kunert, Anne Wartenberg, Anja Voreck, Matthias Dorn, Marco Röben, Sebastian Fiedler und Marcel Jurk möchte ich mich für die wunderbare Laboratmosphäre und für schöne Ablenkungen vom Laboralltag bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Prof. Andreas Hoenger (University of Colorado), der mit seinen Ideen den Anstoß zur Betrachtung der Kinesin-Mikrotubuli-Interaktion gab. Prof. Eva-Maria Mandelkow (MPASMB, Hamburg) hat mich anfänglich mit Tubulin versorgt und mir die cDNA der KIF5C-Motordomäne angeboten. Die cDNA der Kar3-Motordomäne wurde freundlicherweise von Dr. Sharyn A. Endow (Duke University, Durham) zur Verfügung gestellt. Dr. Keiko Hirose (AIST, Japan) hat mir Datensätze zu den Kryo-EM-Modellen der Kar3-Motordomäne gebunden an Mikrotubuli übermittelt.

Prof. Dietmar J. Manstein (Medizinische Hochschule Hannover) und Prof. Andreas Herrmann (Humboldt-Universität zu Berlin) danke ich für ihre Beiträge in meinem *Thesis Committee*.

Nicht zuletzt möchte ich den Sekretärinnen Andrea Steuer, Alex Kiesling und Heidi Petschick danken. Ihr macht einen ganz tollen Job und behaltet alles im Überblick.

Barth, Stefan und Britta möchte ich ausdrücklich für kritische Hinweise und konstruktive Ratschläge bei der Erstellung dieser Dissertation danken. Dr. Nikolaus Loening fungierte dankenswerterweise als Lektor der englischen Zusammenfassung.

Meiner Familie, insbesondere meinem Mann Nico möchte ich für ihre grenzenlose Unterstützung danken.

Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes in der Online-Version nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, August 2011

.....

Janet Zapke