

Aus dem Institut für Molekular- und Zellphysiologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

**Einfluss des Nukleotidstatus von Tubulin auf
die Tau-Mikrotubuli-Interaktion**

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Avesta Jalal-Ebrahimi

Hannover 2020

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am:
01.06.2021

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Professor Dr. med. Michael P. Manns

Betreuer der Arbeit: Prof. in Dr. rer. nat. Theresia Kraft

Referent/Referentin:

1. Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. Georgios Tsiavaliaris

2. Referent/in: Prof. Dr. med. Günter Höglinger

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2021

Prüfungsmitglieder:

Vorsitz: Prof. Dr. rer. nat. Evgeni Ponimaskin

1. Prüfer/in: Prof. in Dr. rer. nat. Rita Gerardy-Schahn

2. Prüfer/in: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schwinzer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	6
1.1. Mikrotubuli	6
1.1.1 Aufbau und Funktion	6
1.1.2 Modifikationen im Mikrotubulus-Aufbau	9
1.2 Mikrotubuli-assoziierte Proteine	10
1.3 Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau	11
1.3.1 Proteinaufbau	11
1.3.2 Lokalisation und Funktion von Tau	14
1.3.3 Tau-Transport und Tauopathien	16
1.4 Zielsetzung / Fragestellung	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Proteine	21
2.1.2 Antikörper	22
2.1.3 Puffer und Lösungen	22
2.1.4 Farbstoffe	23
2.1.5 Chemikalien	24
2.1.6 Software	24
2.1.7 Geräte	24
2.1.9 Sonstige Produkte	25
2.2. Methoden	25
2.2.1 Cy5-GTP-Taxol-Mikrotubuli	25
2.2.2 Cy5-GTP-Taxol-reduzierte Mikrotubuli	25
2.2.3 Cy5-GMPCPP-Mikrotubuli	26
2.2.4 Cy5-GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli	26
2.2.5 Cy5-GMPCPP-Taxol-reduzierte Mikrotubuli	26
2.2.6 Totale Interne Reflexions Fluoreszenz (TIRF)-Mikroskopie	27
2.2.7 Auswertung	32
2.2.8 Statistische Auswertung	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Kolokalisation	34
3.2 Auswertungsmethodik der Tau-Mikrotubuli-Interaktion	36

3.3 Bestimmung einer geeigneten Konzentration zur Beobachtung einzelner Tau-Moleküle	38
3.4 Charakterisierung der Bewegung von hTau40 entlang der Mikrotubuli-Achse.....	39
3.4.1 Charakterisierung der Diffusion	41
3.4.2 Einfluss der Ionenstärke auf die Diffusion von hTau40	51
3.4.2 Gesamtanzahl Tau-Moleküle und Verhältnis mobil zu stationär	53
3.5 Tau-Verhalten auf GMPCPP-Mikrotubuli im GTP-Zustand	56
3.5.1 Diffusionseigenschaften von Tau entlang von GMPCPP-Mikrotubuli	56
3.5.2 Gesamtanzahl Tau-Moleküle und Verhältnis mobil zu stationär auf GMPCPP-Mikrotubuli	60
3.6 Einfluss des Stabilisierungs-Agens Taxol auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion	61
3.6.1 Vergleich der Diffusionseigenschaften von Tau entlang von GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli in Abhängigkeit unterschiedlicher Taxol-Konzentrationen	61
3.6.2 Vergleich der Gesamtmenge Tau und des Anteils mobiler Tau-Moleküle auf GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli in Abhängigkeit unterschiedlicher Taxol-Konzentrationen	71
4. Diskussion	78
4.1 Ionenstärke und Tau-Diffusion	79
4.2 Unterschiede im Tau-Verhalten auf GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli	79
4.3 Einfluss von Taxol auf die hTau40 Diffusion.....	84
4.4 Fazit und Ausblick.....	91
5. Zusammenfassung	94
6. Literaturverzeichnis	96
7. Curriculum Vitae	105
8. Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nm. 6 und 7 der Promotionsordnung	106
9. Publikationsliste	107
10. Erklärung über für Publikationen genutzte Teilergebnisse dieser Arbeit..	108
11. Danksagung	109

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AOM	Akusto-optischer Modulator
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	arbitrary units; frei gewählte Einheiten
DNA	Desoxiribonucleic Acid, Desoxiribonukleinsäure
EMCCD	Electron multiplying charge-coupled device
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanodindiphosphat
GMPCPP	Guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate
GTP	Guanodintriphosphat
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTOC	Mikrotubuliorganisationszellzentrum
NFT	Neurofibrillary tangle
Tab.	Tabelle
TIRF	Totale interne Reflexions Fluoreszenz
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Nervenzellen bestehen aus einem Zellkörper (bzw. Soma), der unter anderem den Zellkern, den Synthese- und Golgiapparat und viele Mitochondrien enthält, und zwei verschiedenen Zellfortsatztypen, den Dendriten und den Neuriten (bzw. das Axon). Form und Festigkeit werden den Zellen durch das Zusammenspiel von Aktin- und Intermediärfilamenten und Mikrotubuli vermittelt, die in ihrer Gesamtheit als das Zytoskelett bezeichnet werden. Neben ihrer wichtigen Stützfunktion erfolgt auch der Transport vieler Bestandteile aus dem Soma in die Peripherie entlang der Filamente des Zytoskeletts. Die Mikrotubuli des Zytoskeletts spielen eine wichtige dynamische und strukturelle Rolle. Das Zusammenspiel von Mikrotubuli und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen wie Regulator- oder Motorproteinen ist für die Aufrechterhaltung vieler essentieller Zellfunktionen von großer Bedeutung.

1.1. Mikrotubuli

1.1.1 Aufbau und Funktion

Mikrotubuli sind dynamische, röhrenförmige Strukturen, die aus Tubulin-Dimeren gebildet werden (1). Tubulin-Dimere sind zusammengesetzte Heterodimere aus alpha- und beta-Tubulin (2), wobei ein monomeres Tubulin aus 450 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa aufweist (3,4). Die Heterodimere setzen sich zu einem linearen, nicht-kovalenten Polymer/Protofilament zusammen (Abb. 1.1), aus mehreren seitlich aneinander gelagerten Protofilamenten geht schließlich ein Mikrotubulus hervor (2).

Jedes Tubulin-Dimer verfügt über zwei GTP-Bindungsstellen (1). Während sich an der alpha-Untereinheit eine nicht-austauschbare Stelle, die stets ein GTP-Molekül beinhaltet, befindet, ist an der beta-Untereinheit eine austauschbare Stelle, die sogenannte E-site vorhanden (5–8). Die Polymerisation der Mikrotubuli erfolgt in Zellen strahlenförmig ausgehend von einem Mikrotubuliorganisationszentrum (MTOC), dem Zentrosom heraus. In tierischen Zellen besteht dieses Zentrum aus einem Zentriolenpaar, das sich aus neun Mikrotubuli-Triplets zusammensetzt. Zur Mikrotubuli-Bildung kommt es durch Nukleation an das gamma-Tubulin des MTOC (6), an dem sich die alpha-Tubulinkomponente eines Dimers anlagert (6,9).

Über die beta-Tubulin-Komponente des Dimers erfolgt durch GTP-Bindung, welches später zu GDP hydrolysiert wird (5), die Elongation des Mikrotubulus. Das am alpha-Tubulin gebundene GTP wird nicht hydrolysiert. Es wird vielmehr durch die Lage im Dimer vor jeglicher Hydrolyse geschützt. Am beta-Tubulin ist die GTP-Bindungsstelle nach außen exponiert (5,6,7). Das Wachstum der Mikrotubuli ist nur durch den Einbau der Tubulin-Dimere mit beta-Tubulin gebundenem GTP, das in der Polymerisationsreaktion hydrolysiert wird, möglich (1). Bei der Mikrotubuli-Bildung entsteht dadurch eine Filament-Polarität. Das Ende mit alpha-Tubulin, das meist zum MTOC zeigt, wird als langsam wachsendes Minus-Ende und das Ende mit beta-Tubulin, das meist in die Peripherie zeigt, als schnell wachsendes Plus-Ende bezeichnet (9,11). GTP-Tubulin-Dimere sind ausschließlich am Mikrotubuli-Plus-Ende anzutreffen (6,7).

Die Assemblierung/Polymerisierung und die GTP-Hydrolyse finden unabhängig voneinander statt, sie sind kinetisch nicht gekoppelt. Bei der Polymerisation steht mehr die GTP-Bindung als die GTP-Hydrolyse als ausschlaggebender Schritt für die Assemblierung im Vordergrund (8). Die Hydrolyse erfolgt mit einer gewissen Zeitverzögerung (2,8). Das Hydrolyse-Produkt GDP verbleibt an der Stelle im Tubulin, welche anschließend im Mikrotubulus-Gitter inkorporiert wird. Bei der Depolymerisation werden die interprotofilamentären Bindungen geschwächt. Schwächung oder Verlust der lateralen Kontakte der Tubulin-Untereinheiten destabilisiert das Mikrotubulus-Gitter. Das Mikrotubulus-Ende nimmt eine gebogene Formation an, die das Gleichgewicht weg von der Assemblierung in Richtung Disassemblierung verschiebt (12). Das Einleiten der rapiden Disassemblierung des Mikrotubulus findet dann durch ein nach außen gerichtetes „Abrollen“ der Protofilamente statt, es erfolgt ein Anstieg der Krümmung der Protofilamente (Abb. 1.1). Während die GTP-Hydrolyse bei der Tubulinpolymerisation nicht zwingend erforderlich ist, ist sie für die Depolymerisation und in der Konsequenz für die sogenannte dynamische Instabilität der Mikrotubuli unabdingbar (9). Da es sich bei der dynamischen Instabilität der Mikrotubuli um Nicht-Gleichgewichtsbedingungen/-reaktionen handelt, besteht die Notwendigkeit der GTP-Hydrolyse als Energielieferant.

Die GTP-Hydrolyse erfolgt während oder nach der Polymerisation an der E-site des beta-Tubulins (2). Freie alpha/beta-Tubulindimere können an der E-site gebundenes GDP gegen GTP austauschen und anschließend für die Polymerisation verwenden (13). Eine uneingeschränkte Funktion der Mikrotubuli neuronaler Zellen ist für die Gehirnentwicklung und -funktion essentiell, wobei das neuronale Zytoskelett insbesondere bei der neuronalen Migration, Differenzierung und Reifung beansprucht wird (14). Die Polarität der Mikrotubuli spielt bei den meisten wichtigen Funktionen im Zusammenspiel mit anderen Proteinen eine große Rolle. Darunter fällt beispielsweise die Beteiligung von Mikrotubuli am Transport von Vesikeln und Organellen mit Hilfe von Motorproteinen wie Kinesinen oder Dynein, die Organisation des Golgi-Apparats und des Endoplasmatischen Retikulums und der Aufbau des Spindelapparats während der Mitose (10,15,16).

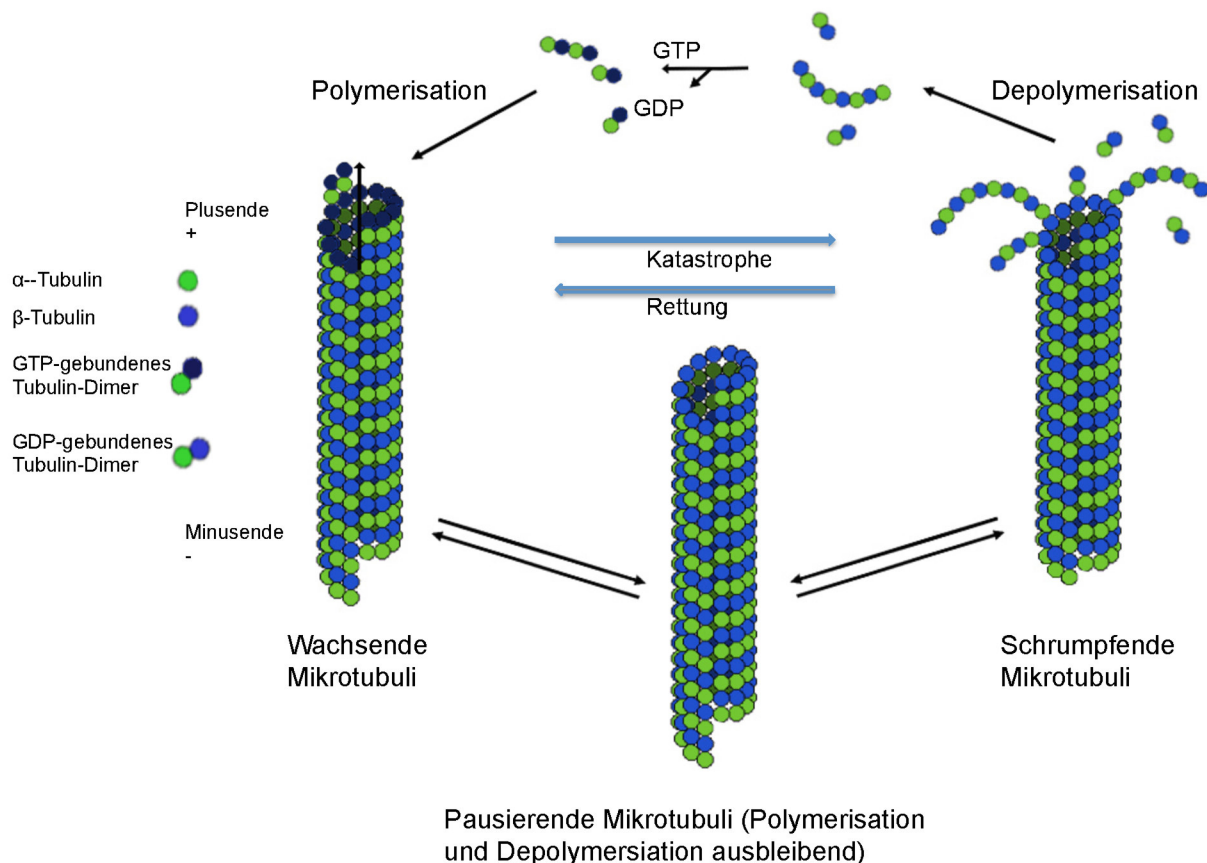


Abbildung 1.1 Mikrotubulus-Aufbau

Ein Mikrotubulus wird aus mehreren Protofilamenten gebildet. Die Polymerisation erfolgt durch neu anbindende alpha-/beta-Tubulindimere am schnellwachsenden Plus-Ende. Die dynamische Instabilität der Mikrotubuli spiegelt sich in dem Kreislauf aus Polymerisation und Depolymerisation wie auch der pausierenden Phase wider. Verändert nach Wikipedia (17) (<https://de.wikipedia.org/wiki/Mikrotubulus>, 23.07.2016), Farben teilweise verändert, Beschriftung ins Deutsche übersetzt.

1.1.2 Modifikationen im Mikrotubulus-Aufbau

In vivo und in vitro existieren Mikrotubuli in unterschiedlichen Konfigurationen. Es sind z.B. Unterschiede in der Anzahl der Protofilamente, in der spiralförmigen Ausrichtung, der Ganghöhe der Tubulindimere und im Schrägstellwinkel (skew angle) der Protofilamente unter Einbehaltung der Hauptachse (main tube axis) vorhanden (18). Die unterschiedlichen Konfigurationen können durch die Expression von unterschiedlichen alpha- und beta-Tubulin Isoformen (19) oder durch posttranslationale Modifikationen erzeugt werden (20).

Posttranslationale Modifikationen bedeuten, dass die Proteine nach der Translation z.B. enzymatisch verändert werden. Sie können u.a. acetyliert, tyrosiniert und detyrosiniert, delta-2 modifiziert, polyglutamyliert, polyglycinyliert, palmitoyliert oder phosphoryliert werden (20). Polyaminierungen beispielsweise verhindern die GTP-Hydrolyse im beta-Tubulin, wodurch Mikrotubuli im GTP-Nukleotidzustand verbleiben (21). Inwiefern der Nukleotidstatus von Tubulin funktionelle Auswirkungen auf zelluläre Prozesse haben kann, zeigten eine signifikant höhere Steifheit von GMPCPP-Mikrotubuli im Vergleich zu GDP-Mikrotubuli und eine um 30 % schnellere Transportrate von GMPCPP-Tubulin-Mikrotubuli im Vergleich zu GDP-Tubulin-Mikrotubuli durch das Motorprotein Kinesin (22,23). Eine funktionelle in vitro Untersuchung von Mikrotubuli des GTP-Nukleotidstatus kann durch Verwendung des GTP-Analogons GMPCPP erreicht werden.

Beim GTP-Analogen GMPCPP handelt es sich um Guanylyl-(alpha,beta)-methylenediphosphonate (GMPCPP). Das besagte Analogon kann an der sogenannten E-site gebunden werden, an der die Nukleotide frei austauschbar sind, ist jedoch nicht durch Tubulin hydrolysierbar (7,24,25). Die Bindungsaffinität des Analogons GMPCPP zum Tubulin liegt im Vergleich zum GTP um vier bis achtfach niedriger (26). Die Polymerisationsrate der GMPCPP-Mikrotubuli ist der Polymerisationsrate des GDP-Tubulins sehr ähnlich (26). Im Vergleich zu GDP-Mikrotubuli ist allerdings die Depolymerisationsrate der GMPCPP-Mikrotubuli vernachlässigbar klein, sodass die Anwesenheit vom GMPCPP zu Mikrotubuli mit einer erhöhten Stabilität führt.

Eine weitere Form der Variabilität von Mikrotubuli stellt die Anzahl der Protofilamente eines Mikrotubulus dar.

Meist bilden dreizehn oder vierzehn Protofilamente einen röhrenförmigen Mikrotubulus, da der gamma-Tubulin Ringkomplex durch ein Nukleations-template für dreizehn Protofilamente die Basis für solch einen Mikrotubulus schafft (27,28). Für verschiedene Nukleotidzustände des Tubulins wurden bisher noch keine Präferenzen bezüglich der Protofilamentzahl beschrieben.

Die Regulierung der mechanischen Eigenschaften von Mikrotubuli erfolgt unter anderem über den sogenannten Krümmungsradius, welcher aus den lateralen und longitudinalen Krümmungsradien, die wiederum durch die Querverbindungen zwischen den Tubulindimeren entstehen, definiert wird (29–31). Die Zelle besitzt die Fähigkeit die Mikrotubulus-Struktur/-Architektur je nach Bedarf anzupassen. Die komplexe Funktionsweise, die zusätzlich vorliegende Variabilität in der Anzahl der Protofilamente, die unterschiedlichen Formen von posttranslationalen Modifikationen, die heterogene Verteilung der Mikrotubuli und die Unterschiede im Nukleotidstatus von Tubulin zeigen nur einen kleinen Teil der Möglichkeiten, zelluläre Funktionen zu steuern.

1.2 Mikrotubuli-assoziierte Proteine

Mikrotubuli-assoziierte Proteine umfassen Proteine, die auf unterschiedliche Art und Weisen mit Mikrotubuli in Zellen interagieren. Die Unterteilung der Mikrotubuli-assoziierten Proteine erfolgt in unterschiedliche funktionelle Gruppen:

Zur einen Gruppe gehören die Motorproteine, die in zwei Familien (Dynein und Kinesine) unterteilt werden und sich unter ATP-Verbrauch entlang von Mikrotubuli bewegen können (15). Dynein bewegt sich dabei in Minus-Richtung entlang von Mikrotubuli, während sich die meisten Vertreter der Kinesin-Superfamilie in Plus-Richtung entlang von Mikrotubuli bewegen (15,23,32–34). Eine andere Gruppe setzt sich aus sehr heterogenen Proteinen zusammen. Darunter fallen unter anderem die glykolytischen Enzyme wie zum Beispiel die GAPDH, Kinasen wie Proteinkinase A, Ribonukleoproteine, die mRNA transportieren und noch einige andere (23).

Eine weitere Gruppe, die sich wiederum in Untergruppen mit hoher und mit niedriger molekularer Masse gliedern, umfasst Proteine, die der Stabilisation der dynamischen Mikrotubuli dienen. Zur Gruppe mit hoher molekularer Masse (280-340 kDa) gehören die Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) MAP1a und b, MAP2 und MAP4 (35,36). Zur Untergruppe mit niedriger molekularer Masse (55-62 kDa) zählen die verschiedenen Isoformen des Proteins Tau (3,37).

Tau und MAP2 sind vorwiegend in Nervenzellen beziehungsweise in Dendriten und im Axon über die Bindung an den C-Terminus des Tubulins lokalisiert (37–39).

1.3 Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau

1.3.1 Proteinaufbau

Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP), hydrophil, gut löslich und natürlicherweise größtenteils ungeordnet, von dem bisher keine Sekundärstruktur ermittelt werden konnte (37,40). Die nativ vorkommende, weitestgehend ungefaltete Struktur beinhaltet eine random coil mit nur wenigen alpha- Helices und beta-Strukturen (40). Auf Chromosom 17 codiert nur ein Gen für die insgesamt sechs verschiedenen humanen Isoformen des Tau-Proteins des zentralen Nervensystems (Abb. 1.2). Diese sechs Isoformen mit 352-441 Aminosäuren gehen aus den ursprünglich 15 Exons durch alternatives Splicing der Exons 2, 3 und 10 hervor (41,42). Die Expression der spezifischen Tau-Isoformen ist entwicklungspezifisch determiniert und von der topographischen Lage der Nervenzellen im ZNS abhängig (43). Im adulten Gehirn sind alle sechs Isoformen vertreten während im fetalen nur die kürzeste Isoform exprimiert wird. Stärker phosphorylierte und kürzere Isoformen des Tau-Proteins kommen in unreifen Nervenzellen vor. Bei den ausgereiften Nervenzellen verschiebt sich das Verhältnis in Richtung geringerer Phosphorylierungsgrade und längeren Isoformen (38,44,45).

In dieser Arbeit wurde die längste, adulte Isoform des humanen Tau-Proteins, hTau40 mit 441 Aminosäuren, verwendet. Tau setzt sich aus zwei verschiedenen Hauptdomänen zusammen (Abb. 1.2). Die N-terminale Domäne wird als Projektionsdomäne und die C-terminale als Mikrotubuli-Bindungs-/Assemblierungsdomäne bezeichnet (46,47).

Die Projektionsdomäne, die unter anderem eine Funktion als Abstandshalter zwischen einzelnen Mikrotubuli haben soll (48) kann durch die An- und Abwesenheit der codierten Bereiche von Exon 2 und 3 in drei verschiedenen Längen vorkommen.

Von kurzen Projektionsdomänen spricht man, wenn die codierten Bereiche von beiden Exons fehlen, von mittellangen, wenn der codierte Bereich von Exon 2 vorhanden ist und von langen, wenn sowohl der codierte Bereich von Exon 2 als auch 3 anwesend sind.

Die Mikrotubuli-Bindungsdomänen verfügen über drei oder vier Mikrotubuli-Bindungsgebiete, die jeweils von einem Zwischenbereich unterbrochen werden. Ein Mikrotubuli-Bindungsgebiet setzt sich aus 18 und ein Zwischenbereich aus 13-14 Aminosäuren zusammen. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz der Mikrotubuli-Bindungsgebiete spricht man von diesen Bereichen als sogenannte repeats und in der Konsequenz von 3Repeat (R) - oder 4R-Tau.

Die besagten drei oder vier Mikrotubuli-Bindungsgebiete, die durch die Zwischenbereiche miteinander in Verbindung stehen, tragen durch van der Waals-Wechselwirkungen sowie durch stark abgeschirmte elektrostatische Wechselwirkungen ungefähr im gleichen Maße zur Mikrotubuli-Bindung bei (49). Die Ab- oder Anwesenheit des von Exon 10 kodierten Proteinbereichs (Repeat 2) unterteilt die Tau-Moleküle in zwei Gruppen, eine mit drei und eine mit vier Bindungsdomänen. Je nachdem, ob drei oder vier Mikrotubuli-Bindungsgebiete vorhanden sind, wird die Affinität von Tau zum Mikrotubulus, die sich um etwa das 40-fache unterscheidet, reguliert (49–52).

Die Rolle der Zwischenbereiche und deren Beitrag zur Mikrotubuli-Bindung werden ebenfalls diskutiert. Eine hohe Affinität zu Mikrotubuli zeigt vor allem der erste Inter-Repeat. Dieser wird sogar im Vergleich zu den Mikrotubuli-Bindungsgebieten als stärker deklariert (50). In der unmittelbaren Nachbarschaft der Mikrotubuli-Bindungsgebiete existieren sowohl N- als auch C-terminal basische, Prolin-reiche Regionen. Beide zusammen bilden die sogenannten flankierenden Regionen (23). Die flankierenden Regionen verstärken die Bindung der Mikrotubuli-Bindungsgebiete und sind imstande, auch in Abwesenheit der Mikrotubuli-Bindungsgebiete an Mikrotubuli zu binden (53).

Dadurch leisten die flankierenden Regionen einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung von Mikrotubuli (49,54). Besonders der basische Aminosäuren-Überschuss der Mikrotubulus-Bindungsdomänen trägt zur Interaktion mit dem negativ geladenen C-Terminus der Tubulinmoleküle bei (55).

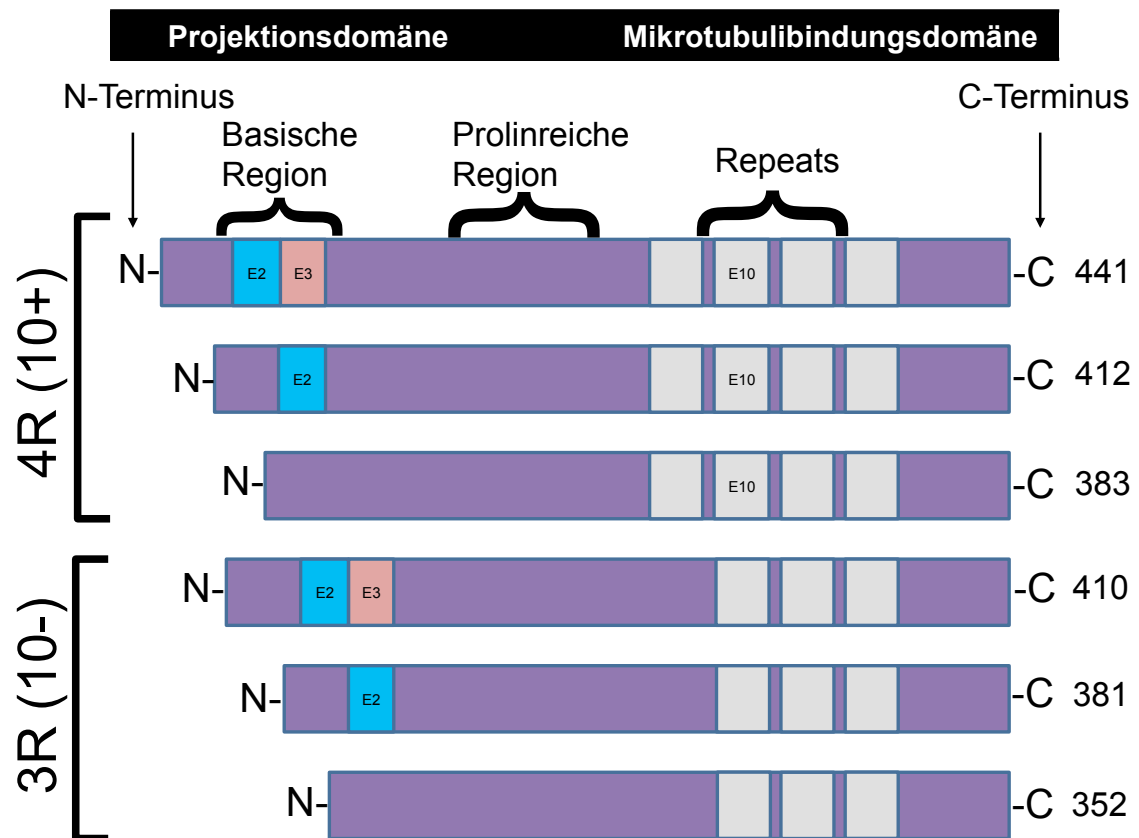


Abbildung 1.2 Tau-Isoformen

Durch alternatives Spleißen von Exon E2, E3 und E10 entstehen 6 Tau-Isoformen. Die N-terminale Projektionsdomäne kann dabei durch An- oder Abwesenheit von Exon 2 und 3 in drei verschiedenen Längen vorkommen. Die C-Terminale Mikrotubulus-Bindungsdomäne beinhaltet mindestens drei Bindungsdomänen in allen sechs Isoformen. Die Ab- oder Anwesenheit von Exon 10 (Repeat 2) unterteilt die Tau-Moleküle in zwei Gruppen mit nur drei oder mit vier Bindungsdomänen. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz der Mikrotubuli-Bindungsbereiche spricht man von diesen Bereichen als sogenannte repeats und in der Konsequenz von 3Repeat (R) - oder 4R-Tau.

1.3.2 Lokalisation und Funktion von Tau

Als Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das hauptsächlich in den Axonen (Neuriten) von Nervenzellen des Gehirns vorkommt (38,56) ist die physiologische Funktion von Tau die Bindung und Stabilisierung von Mikrotubuli (3). In geringem Maße wird das Tau-Vorkommen in Astrozyten und Oligodendrozyten (57) in Dendriten und eine spezielle Form sogar im Zellkern erwähnt (58,59).

Unter physiologischen Bedingungen liegt zellulär eine heterogene, axonal betonte Tau-Verteilung vor (38). Im Axon selbst ist sowohl die Rede von einer gleichmäßigen Verteilung über das gesamte Axon (60) als auch von einer Zunahme der Tau-Dichte von proximal nach distal (61). Obwohl die Mikrotubulus-Struktur bereits gut bekannt ist, existieren über die Beschaffenheit und Lokalisation der Tau-Bindungsstellen auf Mikrotubuli keine eindeutigen Aussagen (7).

Diskutiert werden sowohl eine Bindung auf der äußeren Oberfläche der Mikrotubuli, vermutlich an oder in der Nähe des Tubulin-C-Terminus (62,63) als auch eine Bindung auf der inneren Oberfläche, nahe der ebenfalls innen liegenden Taxol-Bindungsstelle (11,64,65). Die innere Bindungsstelle ist nur zugänglich, wenn Tau bereits in der Polymerisationsphase der Mikrotubuli vorhanden ist. Tau-Moleküle, die an der inneren Bindungsstelle gebunden sind, können anschließend nicht gegen Tau-Moleküle aus der Umgebung ausgetauscht werden (52,65).

Die auf der äußeren Oberfläche liegende Bindungsstellen ermöglichen den positiv geladenen Mikrotubuli-Bindungsbereichen des Tau-Proteins die Interaktion mit dem C-Terminus der Mikrotubuli (62).

Es wird eine sättigende Phase und eine nicht sättigende Phase beschrieben (66). In der sättigenden Phase, die über eine begrenzte Anzahl von Bindungsplätzen verfügt, bindet Tau mit hoher Affinität, während in der nicht sättigenden Phase eine undefinierte Anzahl an Bindungsplätzen mit niedriger Tau-Bindungsaffinität vorliegt. Die Ermittlung der exakten Bindungsstellen von Tau auf Mikrotubuli ist durch dessen unstrukturierte und sehr variable Form erschwert. Es wird angenommen, dass Tau unterschiedliche Konformationen aufweist (49,52,62,65).

Die Bindung von Tau an Mikrotubuli ist nicht kooperativ (67). Die Mikrotubulus-Tau-Interaktion beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen (67,68).

Dies trifft sogar im gebundenen Zustand von Tau am Mikrotubulus zu (69), wobei sich gebundenes und ungebundenes Tau im dynamischen Gleichgewicht befinden (70,71). Der negativ geladene E-hook des Tubulins dient als Bindungspartner (67). Die bisher ermittelten Dissoziationskonstanten von Tau auf Mikrotubuli konnten in einem Messbereich von 14 nM bis 1 μ M (37,49,50,52) gezeigt werden. Die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten können auf die Art der Untersuchungsmethoden, proteintypische Eigenschaften wie Tau-Isoformen, Phosphorylierungsgrade, Mutationen und weiteren Modifikationen zurückgeführt werden. Über die Phosphorylierung an den potentiellen Serin- und Threonin-Phosphatakzeptorstellen beispielsweise wird eine Verminderung der Bindungsaffinität von Tau zu Mikrotubuli bis hin zur vollständigen Dissoziation vom Mikrotubulus bewirkt (72,73).

Die Tau-Mikrotubuli-Interaktion, die primär die Mikrotubuli-Bindungsdomänen mit den repeats und den flankierenden Bereichen betrifft, wird in eine direkte und indirekte unterteilt (74). Die primäre, direkte Funktion von Tau dient der Stabilisierung der Mikrotubuli und der Unterstützung der Mikrotubuli-Polymerisation, die durch Erhöhung der Wachstumsrate und Verringerung der Depolymerisationsrate erzielt wird (37,38,75,76). Neben der Mikrotubulus-Stabilisierung spielt Tau eine Rolle beim Motorprotein-abhängigen axonalen Transport von Vesikeln, Neurofilamenten und anderen Zellorganellen (77). Die dynamische Instabilität der Mikrotubuli (78,79) und deren posttranslationale Modifikationen werden ebenfalls von Tau beeinflusst (80). In der Polymerisationsphase fördert Tau die Selbst-Assemblierung der alpha- und beta-Heterodimere des Tubulins zu Mikrotubuli (81,82). Die Domänen und Regionen des Tau-Proteins können einzeln oder in ihrer Gesamtheit einen Einfluss nehmen. Eine effektive Polymerisation beispielsweise wird durch das Vorhandensein der Mikrotubuli-Bindungsgebiete und der flankierenden Regionen zusammen erreicht. Einzeln betrachtet können weder die flankierenden Regionen allein, die wie eine Klammer die Mikrotubuli umfassen (81,82), zu einer Mikrotubuli-Polymerisation führen (53) noch die Mikrotubuli-Bindungsgebiete diese erreichen.

Die flankierenden Bereiche von Tau sind für eine deutliche Zunahme der Mikrotubulus-Steifheit verantwortlich (83), während die Projektionsdomäne, deren Länge bei 15-30 nm liegt, den Abstand zwischen einzelnen Mikrotubuli in Axonen (48) bestimmt und vermutlich für die Verbindung zwischen Mikrotubuli und den Membranstrukturen zuständig ist (84).

Unter indirekten, sekundären Funktionen fallen all diejenigen, die andere Proteine betreffen, wobei Tau mit seiner Projektionsdomäne entweder eine Art Vermittlerrolle übernimmt oder selber andere Proteine in ihrer Wirkung in Bezug auf die Mikrotubulus-Interaktion beeinflusst (74). Ein Beispiel ist die Inhibition des anterograden Motor-Protein-abhängigen Transportes (68,85,86). Ursächlich dafür sollen die gleichen Bindungsstellen für MAPs und den Motorproteinen, Kinesin und Dynein, auf der Mikrotubulus-Oberfläche sein (85–87). Tau und andere MAPs, die im Zytosol verteilt sind, bieten Verankerungsmöglichkeiten für weitere Zellkomponenten, insbesondere für Kinasen, die im Bereich der MAP-Bindungsberiche der Mikrotubuli angereichert sind (74).

Tau wird während der neuronalen Entwicklung stärker exprimiert (38). Die Funktionen zeigen sich sowohl in neuronalen Zellen als auch in nicht-neuronalen Zellen. In den nicht-neuronalen Zellen führt die Expression von Tau zur Ausbildung von Neuriten-ähnlichen Ausstülpungen mit parallel verlaufenden Mikrotubuli-Bündeln (88,89).

1.3.3 Tau-Transport und Tauopathien

Die in großen Teilen noch ungeklärte Ursache der heterogenen zellulären Tau-Verteilung unter physiologischen Bedingungen wird in unterschiedlichen Möglichkeiten des Tau-Transportes und unterschiedlichen Regulationseinflüssen vermutet. Diskutiert werden eine Verteilung von Tau bereits in der mRNA-Form (90), ein direkter aktiver Transport von Tau entlang von Mikrotubuli (91), ein gemeinsamer Transport mit Tubulin bzw. Mikrotubulistücken, die drei-dimensionale Tau-Diffusion im Zytosol (92) oder die eindimensionale Diffusion von Tau entlang von Mikrotubuli (68) um nur einige der vielen Möglichkeiten aufzuzählen (93).

Der Transport von Tau in der mRNA-Form ermöglicht durch lokale Translation die gleichmäßige Verteilung im Axon (90). Der Nachweis der Tau-mRNA im proximalen Anteil des Axons verstärkt die Theorie über die selektive Tau-Anreicherung im Axon (94). In P19-Zellen liegt die transportierte mRNA in einem Komplex mit dem Protein HuD sowie Kinesin KIF3A vor, wobei das KIF3A zusammen mit KIF3B für den anterograden Transport von membranumhüllten Organellen verantwortlich ist (95).

Der Tau-Transport über Motorproteine gewinnt bei langen Wegstrecken an Bedeutung. Bei der Beobachtung der Transportzeiten von radioaktiv-markierten endogenen Proteinen im Sehnerv von Tieren wurde eine Transportgeschwindigkeit von 0,2-0,4 mm/d festgestellt (96). Die typischen Transportgeschwindigkeiten der anderen MAPs über Motorproteine sind im Vergleich dazu wesentlich schneller.

Der langsamere Tau-Transport wird damit begründet, dass Motorproteine einen diskontinuierlichen Transportweg mit Stop-and-Go Phasen einschlagen können (97) und dass Tau reversibel an Mikrotubuli bindet und dissoziiert, und dadurch die Transportgeschwindigkeit in der Gesamtbilanz geringer ausfällt (93). Da Tubulin mit 0,1-0,2 mm/d eine viel geringere Transportgeschwindigkeit aufweist, wird die Möglichkeit eines gemeinsamen Tau-Tubulin-Transportes damit unwahrscheinlicher.

Es wurden Netto-Transportgeschwindigkeiten in Höhe von 1 mm/d für GFP-markiertes 3R-Tau und 4R-Tau in kultivierten Neuronen beobachtet (98), die für eine Kombination aus einer schnellen und langsamen Transportphase sprachen.

Die Geschwindigkeit der schnellen Bewegung, die sich auf ca. 1µm/s beläuft, entspricht der Geschwindigkeit des durch Motorproteine vermittelten schnellen axonalen Transportes. Die Anzahl der Mikrotubuli-Bindungsgebiete spielte bei der Transportgeschwindigkeit keine Rolle (98). Die Verlangsamung des antero- wie auch retrograden Transportes über Kinesin oder Dynein wird durch Tau, das nicht ausschließlich in Form einer Fracht transportiert wird, sondern vielmehr durch die gleichen Mikrotubulus-Bindungsstellen mit den Motorproteinen ein kompetitives Verhalten aufweist, verursacht (86,87). Der axonale Transport wird durch eine Tau-Überexpression behindert und der Transport von Mitochondrien und Vesikeln beeinträchtigt. Dennoch liegt Tau auch unter solchen Bedingungen gleichmäßig im Axon verteilt vor (73,86,98). Die anhaltende Mikrotubulus-Stabilisierung im Axon deutet, neben Tau-Transport durch Motorproteine, auf die Möglichkeit weiterer Verteilungsmöglichkeiten von Tau hin (99).

In einer Arbeit konnte Tau-Diffusion im Zytosol gezeigt und ein Diffusionskoeffizient von ca. $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt werden (92). Die zelluläre Diffusion von Tau unterliegt ebenfalls Regulationsmechanismen, beispielsweise in Form von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen (92,100,101). Ein steigender Phosphorylierungsgrad von Tau ging mit einer reduzierten Mikrotubulus-Affinität, einer erhöhten Ablösungsrate von Tau von Mikrotubuli und daraus folgend einem erhöhten zellulären Diffusionskoeffizienten sowie auch einer verringerten axonalen Lokalisation einher (92).

Die freie Tau-Diffusion im Zytosol als Transportform ist unter physiologischen Bedingungen wie auch unter pathologischen Bedingungen äußerst wichtig. Über eine retrograde Diffusionsbarriere, die Tau den Eintritt in das Axon ermöglicht, wird ein Rückfluss ins Soma und in die Dendriten verhindert (102). Pathologisch erhöhte Phosphorylierungsraten von Tau im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen heben diese Barriere auf und sorgen für das unphysiologische Vorkommen von Tau in den Dendriten und im Soma. Ähnlich der beschriebenen Diffusion eines Kinesins, dem Kinesin-13 (MCAK), auf der Mikrotubulus-Oberfläche (103) wurde auch für Taumoleküle Diffusion entlang von Mikrotubuli gezeigt (68).

Unter dem Begriff der Tauopathien versteht man eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, denen eine pathologische Tau-Funktion wie auch die Bildung von filamentösen Tau-Ablagerungen, die mikroskopisch in Neuronen und/oder Gliazellen nachweisbar sind, zugrunde liegt (104–106). Stärker exprimiertes und mislokalisiertes Tau im Rahmen des pathologischen Erscheinungsbildes wird für das Absterben der Nervenzellen und das Fortschreiten der Krankheiten verantwortlich gemacht (107). Ein veränderter Tau-Metabolismus lässt sich neben der erwähnten stärkeren Expression und Mislokalisation auch auf eine Mutation, posttranskriptionale Modifikation in Form der Hyper-Phosphorylierung, gesteigerte Aggregation oder einer geänderten Expression der verschiedenen Tau-Isoformen zurückführen (108,109).

Die bekannteste Tauopathie ist der Morbus Alzheimer (110), eine altersabhängige Demenz (111).

Weitere Tauopathien (106) sind beispielsweise die Pick'sche Erkrankung (112), die frontotemporale Demenz (113), die progressive supranukleäre Blickparese (114) und die kortikobasale Degeneration (112). Beim Morbus Alzheimer handelt es sich um einen sehr langsamen neurodegenerativen Prozess, welcher mit dem Verlust der kognitiven Fähigkeiten und korrespondierenden Veränderungen im Gehirn einhergeht (115). Es treten Aggregate aus extrazellulärem Amyloid beta-Peptid vorwiegend im postsynaptischen Kompartiment (116) und aus intrazellulärem Tau, das sich zu paarweisen helikalen Filamenten zusammenlagert, in den dystrophierten Neuronen auf (117,118). Schreitet die Erkrankung weiter voran kommt es zum Zelltod der Neuronen, wobei zusätzlich auch extrazelluläre „Knäuel“ auftreten (108).

1.4 Zielsetzung / Fragestellung

Unter physiologischen Bedingungen ist das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau in Neuronen heterogen und axonal betont verteilt. Im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen liegt Tau z.T. jedoch mislokalisiert und stärker exprimiert vor, was in der Folge zum Absterben der Neurone beitragen soll.

In Zellen kommen Mikrotubuli in unterschiedlichen Kompartimenten in unterschiedlichen Zuständen vor (18–20). So kommen in Axonen von Nervenzellen vermehrt Mikrotubuli vor, die, anders als zum Beispiel in den Dendriten, reich an Tubulin im GTP-Zustand sind (21,119), was zu einem vermehrten Binden von Kinesin-1 führen soll (119). Das legt einen Einfluss des Nukleotidzustandes von in Mikrotubuli inkorporiertem Tubulin auf das Bindeverhalten von assoziierten Proteinen nahe.

Durch Charakterisierung der Tau-Mikrotubuli-Interaktion auf der Ebene einzelner Tau-Moleküle konnte Diffusion von Tau entlang von Mikrotubuli als eine Möglichkeit der Tau-Verteilung gezeigt werden (68).

Es stellte sich daher die Frage, ob der Nukleotidzustand von Mikrotubuli oder andere zellulär relevante Faktoren wie die Ionenstärke ebenfalls einen Einfluss auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion haben und so gegebenenfalls eine Rolle bei der zellulären heterogenen Tau-Verteilung spielen könnten.

Die beiden Hauptfragen dieser Arbeit zur Tau-Mikrotubuli-Interaktion sind daher folgende:

1. Beeinflusst der Nukleotidstatus von in Mikrotubuli inkorporiertem Tubulin die Interaktion mit Tau im Hinblick auf das Diffusionsverhalten, die Gesamtanzahl gebundener Tau-Moleküle und das Verhältnis von mobilen zu stationären Tau-Molekülen?
2. Gibt es andere zellulär relevante Faktoren wie Ionenstärke, die einen Einfluss auf die beschriebene Diffusion von Tau entlang von Mikrotubuli ausüben?

Zur Beantwortung dieser Fragen soll in dieser Arbeit das Verhalten einzelner Tau-Moleküle bei unterschiedlichen Ionenstärken und auf GTP-Taxol-Mikrotubuli, die den GDP-Status, und auf GMPCPP-Mikrotubuli, die den GTP-Status von Mikrotubuli widerspiegeln sollen, verglichen werden. In beiden Fällen soll die längste, adulte Isoform von Tau hTau40 verwendet werden, da sich in ausgereiften Nervenzellen das Verhältnis in Richtung längere Isoformen verschiebt und sich Isoformen mit vier Mikrotubulus-Bindungsbereichen häufiger in pathologischen Tau-Filamenten wiederfinden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Proteine

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, A6003
Glukoseoxidase aus <i>Aspergillus niger</i> Typ II-S	Sigma
Katalase aus Rinderleber	Sigma, C-100
hTau40 hTau40-TMR	humanes Tau mit 441 Aminosäuren, 0,3 mM (13,9 mg/ml, MW 46400 Da) zur Verfügung gestellt von E. Mandelkow, MPI Hamburg und DZNE Bonn, vgl. Gustke et al. (1994), Präparation von Dr. J. Biernat, DZNE Konzentration von 67 μ M des TMR- markierten hTau40 bei einem Markierungsgrad von 200 % (T. Scholz, MHH).
Tubulin Cy5-markiertes Tubulin	Tubulin (55 kDa) aus Gehirn vom Schwein. In nativer Form aus dem Gewebe in einer Konzentration von etwa 15 mg/ml aufgereinigt (von Maike Hinrichs, Physiologie, MHH). Fluoreszenzmarkierung des Tubulins mit Cy5-NHS Ester. Verwendete Tubulin-Konzentration von 20 mg/ml mit einem Markierungsgrad (markiertes Protein / Gesamtprotein) von 70 %. In Mikrotubuli Verhältnis von unmarkiertem zu markiertem Tubulin 5:1 (68,120)

2.1.2 Antikörper

Tub2.1 monoklonal Maus anti β -Tubulin	Novus Biologicals NB 120-11308 β -tubulinspezifischer, monoklonaler IgG-Antikörper, Santa Cruz.
--	--

2.1.3 Puffer und Lösungen

BRB12	12 mM K-PIPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, pH 6,8 (KOH)
BRB80	80 mM K-PIPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, pH 6,8 (KOH)

Angesetzte Puffer und Lösungen zur Tau-Messung am TIRF-Mikroskop (Inkubationsmethode)

Anti-bleach	8 μ l Glucoseoxidase (Sigma, 2,89 mg in 10 μ l (5000 Units), verdünnt in HPLC-Wasser) 40 μ l DTT (Sigma, 1M Verdünnung mit BRB12) 3,8 μ l Katalase (Sigma)
BRB12 + Taxol	199,8 μ l BRB12 0,2 μ l Taxol (1 mM in DMSO, Sigma)
Puffer 1	197,2 μ l BRB12 2,6 μ l anti-bleach 0,2 μ l Taxol (1 mM in DMSO, Sigma)
Puffer 2	0,5 μ l BSA (100 mg / 1000 μ l, verdünnt in BRB12) x μ l Tau (je nachdem, welche Konzentration erreicht werden sollte) y μ l (100 μ l - x μ l Tau - 0,5 μ l BSA) Puffer 1

1. hTau40 final 80 pM Ausgangskonzentration = 9,1µM	(1a) Volumen Tau-Stocklösung in 25 µl Inkubationslösung: 2,2 µl einer 1:10000 Vorverdünnung mit BRB12 (1b) Tau-Volumen im Puffer 2 (100µl) 0,88 µl einer 1:1000 Vorverdünnung mit BRB12
2. hTau40 final 50 pM Ausgangskonzentration = 9,1µM	(2) Volumen Tau-Stocklösung in 25 µl Inkubationslösung: 1,37 µl einer 1:10000 Vorverdünnung mit BRB12 (1b) Tau-Volumen im Puffer 2 (100µl) 0,549 µl zu einer 1:1000 Verdünnung mit BRB12
Mikrotubuli 50 nM	1. Konzentrationsbestimmung mittels Bradford in µg/ml 2. Berechnung des Verdünnungsfaktors a - Verdünnung GTP-Taxol-Mikrotubuli und Taxol-red. mit BRB12 + Taxol bzw. Taxol-red. b - Verdünnung GMPCPP-Mikrotubuli mit BRB12, BRB12 + Taxol bzw. Taxol-red.

2.1.4 Farbstoffe

Cy5 NHS Ester, PA 15101	GE Healthcare
5`Tetramethylrhodamin-maleimid (5`-TMR), T6027	Invitrogen
Rhodamin-succinimidylester, C1171	Invitrogen

2.1.5 Chemikalien

Bradford-Reagenz (Protein-Reagenz)	BioRad
Dichlordimethylsilanlösung	Fluka
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
Ethanol (99,9%)	Baker
Glycerol (100%)	Sigma
GTP (Guanisintriphosphat)	Sigma, AppliChem
Kaliumchlorid, KCl	Merck
Kaliumhydroxid, KOH	Merck
Pluronic F-127	Sigma
Salpetersäure, HNO ₃ , 10M	Merck
Taxol	Sigma
Wasser, HPLC	Baker

2.1.6 Software

Word	Microsoft
Excel	Microsoft
Power Point	Microsoft
Andor Solis Version 4.13.3	Andor Inc.
Origin 7G	OriginLab Corporation, Microcal
R	R Core Team
ImageJ 1.43u	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA,

2.1.7 Geräte

Ultrazentrifuge TL-100 - Rotor TLA-100.2 Optima Max-XP-Ultrazentrifuge - Rotor TLA 120.2	Beckmann
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin
Wärmebad RTE-110	Neslab

2.1.9 Sonstige Produkte

Deckgläser 24x24mm, #1	Menzel Gläser
Deckgläser 24x36mm, #1	Menzel Gläser

2.2. Methoden

2.2.1 Cy5-GTP-Taxol-Mikrotubuli

40 µl Polymerisationspuffer, bestehend aus 80 µl BRB80, 10 µl Glycerol und 10 µl 40 mM GTP, wurden mit 20 µl Tubulin (7,8mg/ml) und 3 µl Cy5-Tubulin (15mg/ml) gemischt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren des Inkubationsansatzes mit 70000 rpm bei 2 °C für 15 Minuten (Beckmann Optima Max-XP-UZ, Rotor TLA120.2). Nach dem Zentrifugieren wurde der abgenommene Überstand von 60 µl bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss setzte man weitere 140 µl Stopp-Puffer (3 µl 1 mM Taxol + 297 µl BRB80) zur Stabilisierung der zuvor polymerisierten Mikrotubuli zu. Unter vorsichtigem Mischen wurde die Lösung auf vorgewärmten 450 µl BRB80 mit 40 % Glycerol geschichtet und nach erneutem Zentrifugieren mit 50000 rpm bei 35 °C für 15 Minuten (Beckmann Tisch-UZ, Rotor TLA100.2) der Überstand verworfen. Das aus dem zweiten Zentrifugierungsprozess entstandene Mikrotubuli-Pellet wurde mit Wasser, das auf 37 °C vorgewärmt war, gewaschen und in 100 µl Stopp-Puffer (3 µl 1 mM Taxol + 297 µl BRB80) für 10 Minuten inkubiert und danach vorsichtig resuspendiert. Zur Bestimmung der Konzentration der Mikrotubuli bzw. des Tubulins wurden 5 µl der Mikrotubuli-Suspension mit 15 µl BRB80 verdünnt und mit 1000 µl Bradford-Reagenz (bereits 1:5 verdünnt) versetzt. Bei 595 nm wurde die Absorption nach 10 Minuten gemessen. Als Referenz (Leerwert) dienten 5 µl des Stopp-Puffer verdünnt mit 15 µl BRB80 und 1000 µl Bradford-Reagenz. Die Konzentration wurde über eine BSA-Standardkurve berechnet.

2.2.2 Cy5-GTP-Taxol-reduzierte Mikrotubuli

Die Mikrotubuli-Polymerisation erfolgte, wie bereits unter **2.2.1** beschrieben.

Der Unterschied zu **2.2.1** lag in der auf 1 µM reduzierten Taxol-Konzentration, die aus einer Verdünnung von 1:10 (10 µl 1 mM Taxol + 90 µl DMSO) hervorging.

2.2.3 Cy5-GMPCPP-Mikrotubuli

77 µl Polymerisationspuffer, bestehend aus 67 µl BRB80 und 10 µl 10 mM GMPCPP, wurden mit 20 µl Tubulin (7,8 mg/ml) und 3 µl Cy5-Tubulin (15 mg/ml) gemischt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert (jetzt: 1 mM GMPCPP und 2 mg/ml Tubulin). Anschließend wurde mit 70000 rpm bei 2°C 15 Minuten lang zentrifugiert (Beckmann Optima Max-XP-UZ, Rotor TLA120.2). Der abgenommene Überstand von 100 µl wurde weiterverwendet, vorsichtig mit 300 µl kaltem BRB80 gemischt und für 45 Minuten bei 37 °C polymerisiert. Nach der Polymerisation wurde die Lösung auf vorgewärmten 450 µl BRB80 mit 40 % Glycerol geschichtet und nach erneutem Zentrifugieren mit 50000 rpm bei 35 °C und 15 Minuten (Beckmann Tisch-UZ, Rotor TLA100.2) der Überstand verworfen.

Das entstandene Pellet wurde mit Wasser, das auf 37°C vorgewärmt war, gewaschen und mit 100 µl BRB80 überschichtet. Nach mindestens 15 Minuten erfolgte vorsichtig die Resuspension. Ab diesem Zeitpunkt befanden sich Mikrotubuli wie auch alle weiteren eingesetzten Lösungen im 35°C-warmen Heizblock.

Zur Bestimmung der Konzentration des Tubulins wurden 5 µl der Mikrotubuli-Suspension mit 15 µl BRB80 verdünnt und mit 1000 µl Bradford-Reagenz (bereits 1:5 verdünnt) versetzt. Bei 595 nm wurde die Absorption nach 10 Minuten gemessen.

Als Referenz (Leerwert) dienten 20 µl BRB80 und 1000 µl Bradford-Reagenz. Die Konzentration wurde ebenfalls über die BSA-Standardkurve berechnet.

2.2.4 Cy5-GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli

Die Herstellung von GMPCPP-Mikrotubuli erfolgte, wie unter 2.2.3 beschrieben.

Taxol wurde erst nach der erfolgten Polymerisation der GMPCPP-Mikrotubuli hinzugegeben.

2.2.5 Cy5-GMPCPP-Taxol-reduzierte Mikrotubuli

Die Herstellung der GMPCPP-Mikrotubuli erfolgte ebenfalls, wie unter 2.2.3 beschrieben. Die auf 1 µM reduzierte Taxol-Konzentration (Vorverdünnung: 10 µl 1 mM Taxol + 90 µl DMSO) wurde nach der erfolgten Polymerisation der GMPCPP-Mikrotubuli hinzugegeben.

2.2.6 Totale Interne Reflexions Fluoreszenz (TIRF)-Mikroskopie

Bei der internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie handelt es sich um eine besondere Form der Fluoreszenzmikroskopie, bei der die Fluoreszenz der Fluorophore über ein evaneszentes Feld, das bei der Totalreflexion von Licht an einer Oberfläche (z.B. Grenze Deckglas zum wässrigen Präparat) entstehen kann, angeregt wird. Die auf eine Grenzfläche auftreffenden Lichtstrahlen werden beim Übergang zwischen zwei Medien verschiedener Brechungsindizes gebrochen. Bei gegebenen Brechungsindizes hängt die Stärke der Brechung vom Winkel der auftretenden Strahlung zum Lot der Grenzfläche ab. Bei der TIRF-Mikroskopie (TIRFM) wird ein Winkel größer als der sogenannte kritische Winkel gewählt, ab dem die Brechung des Lichts vom Lot weg zu keinem Übergang von Lichtstrahlen aus dem optisch dichteren in das optisch dünnere Medium erfolgt und so das Licht an der Glas-Wasser-Grenzfläche total reflektiert wird. Im optisch weniger dichten Medium bildet sich, aufgrund der Wellennatur des Lichts, ein evaneszentes Feld, dessen Intensität exponentiell innerhalb der Probe (mit zunehmendem Abstand von der Grenzfläche) innerhalb von wenigen Hundert Nanometern abfällt (121).

Beim Übergang vom Deckglas der Messkammer zur Flüssigkeitslösung in der Messkammer kommt es zur Totalreflexion der einfallenden Lichtstrahlen, wodurch direkt oberhalb des Deckglases in der Messkammerlösung ein evaneszentes Feld entsteht, das fluoreszierende Moleküle, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren können, zur Emission von Fluoreszenzlicht anregt. Das von den angeregten Fluorophoren emittierte Licht wird vom Objektiv eingefangen und auf die nachfolgende Kamera gelenkt. Die erzeugte Fluoreszenz begrenzt sich auf Grenzflächen-nahe Bereiche, so dass ein deutlich besseres Signal-zu-Rauschverhältnis durch den Wegfall der störenden Fluoreszenz von Fluorophoren im Hintergrund gewährleistet ist. Dadurch können auch sehr geringe Mengen bis hin zu einzelnen Fluorophoren dargestellt werden. Allerdings kann auch nur die Schicht direkt an der Grenzfläche zum Glas untersucht werden.

Der Aufbau des verwendeten TIRF-Mikroskops richtet sich, bis auf kleine Modifikationen (Abb. 2.1), weitestgehend nach dem Aufbauprinzip einer Vorarbeit des Instituts (122).

Laserstrahlen von zwei Lasern verschiedener Wellenlängen	1. 633 nm, 25 mW, HeNe, 05-LHP-928, Melles Griot mit PM Single Mode Fiber, Schäfer und Kirchof 2. 532 nm, 50 mW, Nd: YAG DPSS mit PM Single Mode Fiber, Schäfer und Kirchoff
Zwei polychromatische akustisch-optische Modulatoren (AOM)	Model: N48062-2.5-55; RF-Driver Module no. N64040-75-1-4CH-5-M, NEOS Technologies
Objektiv	Plan Apo 60x, NA 1,45, Öl: Olympus
Sperrfilter	Notch Filter von Semrock für: 1. 633 nm NF01-633-U 2. 532 nm NF01-532-U 3. 473 nm RS 473CP (Razor-Edge-Sperrfilter)
dichroitischer Spiegel	M _D 550DCXR, Chroma
CCD (Electron multiplying charge-coupled device) Kamera	Andor iXon DV887DCS-BV backilluminated CCD
Fluoreszenzfilter	Filterrad mit FF01-697/75 und FF01-582/75, Semrock
z-Positionierer	P-723 PIFOC Microscope Objective NanoPositioner, maximale Hubhöhe 360 µm, Controller E-662, Physik Instrumente
Piezotisch	P-730.20 PZT, Maximum 50 µm Controller E-500.00, Physik Instrumente

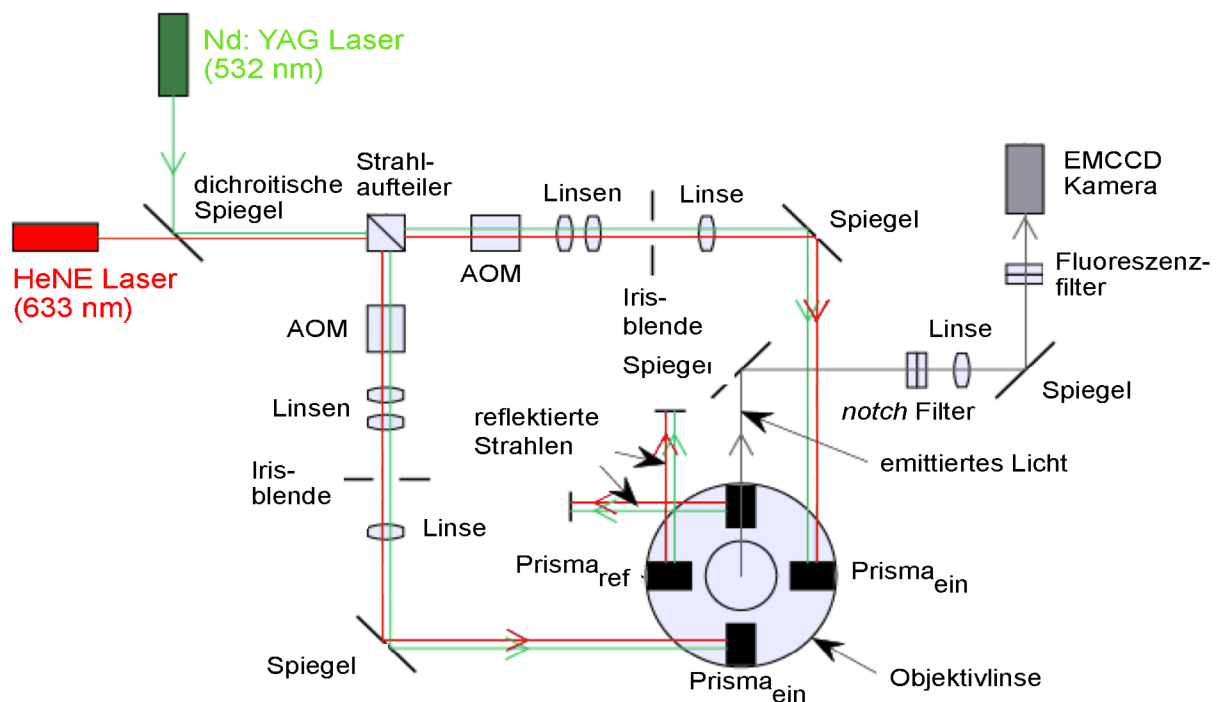


Abbildung 2.1 Schematische Zeichnung des hier verwendeten TIRF-Mikroskops

Eine Linse fokussiert die linear polarisierten Laserstrahlen auf die hintere Brennebene des Objektivs. Prismen lenken die einfallenden und reflektierten Strahlen in bzw. aus dem Objektiv. Durch verschiedene in ein Filterrad integrierte Fluoreszenzfilter im Emissions-Strahlengang erfolgte die Auswahl der mit der EMCCD-Kamera detektierten Fluoreszenzsignale (Cy5 bei 670 nm und TMR bei 573 nm).

Licht der verschiedenfarbigen Strahlen von den oben genannten Lasern wurde mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels überlagert und mittels eines Strahlauhteilers in zwei senkrecht zueinander verlaufende Strahlengänge aufgeteilt. Dadurch ließen sich zwei senkrecht zueinanderstehende Anregungsfelder erzeugen und so eine gleichmäßige Anregung der Fluorophore unabhängig von der Orientierung der dazugehörigen Absorptions-Dipole gewährleisten. Die individuelle Einstellung der Intensitäten für jede einzelne Wellenlänge in beiden Strahlengängen wurde durch akusto-optische Modulatoren (AOM) im jeweiligen Lichtweg ermöglicht. Nach Strahlaufweitung durch eine Doppellinse wurden die linear polarisierten Strahlen mit einer achromatischen Linse auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert. Durch Irisblenden konnten die Durchmesser der ausgeleuchteten Fläche in der Objektivenebene reguliert werden.

Durch zur optischen Achse parallele Verschiebung der Anregungslichtstrahlen bestimmten Umlenk-Spiegel in beiden Strahlengängen den Grad der Kippung der die Objektivlinse verlassenden polarisierten Strahlen zur optischen Achse. Ein bestimmter Verkippungsgrad ermöglichte die Totalreflexion an der Grenze zwischen Deckglas und Messkammervolumen. Über Prismen wurden die einfallenden Strahlen in das Objektiv und die reflektierten aus dem Objekt gelenkt. Die x/y-Feinpositionierung erfolgte über einen Piezotisch und die Präparatfokussierung über einen z-Positionierer, auf dem das Objektiv befestigt war.

Sperrfilter (notch Filter) vor der EMCCD-Kamera wurden zur Blockierung von Streulicht der anregenden Laserstrahlen eingesetzt. Durch verschiedene in ein Filterrad integrierte Bandpassfilter im Emissions-Strahlengang erfolgte die Auswahl der Emission von Cy5 bei 670 nm und TMR bei 573 nm.

Vor Durchführung der Experimente wurden die Deckgläser der Messkammer speziell nach einem Protokoll gereinigt, um einzelne Fluorophore / einzelne fluorophormarkierte Proteine beobachtbar machen zu können. Zunächst durchliefen die für die Messkammer verwendeten großen (24x36 mm) und kleinen Deckgläser (24x24 mm) einen gemeinsamen Waschvorgang. Dazu wurden die Deckgläser nacheinander für je 15 Minuten mit 10 M Salpetersäure, 0,1 M KOH, Ethanol sowie HPLC-Wasser im Ultraschallbad sonifiziert. Zwischen den Waschvorgängen mit Salpetersäure, KOH und Ethanol erfolgte jeweils ein Spülschritt mit doppelt destilliertem Wasser.

Im Anschluss wurden die Gläser mindestens für 6-7 Stunden bei 85 °C im Wärmeschrank getrocknet. Die größeren Deckgläser (24x36 mm) erfuhren noch im Vakuum eine weitere Beschichtung mit Dichlordimethylsilan (103). Die Messkammern wurden aus jeweils einem kleinen und einem großen Deckglas mit doppelseitigem Klebeband hergestellt. Die Herstellung erfolgte für jede einzelne Messung neu (Abb. 2.2).

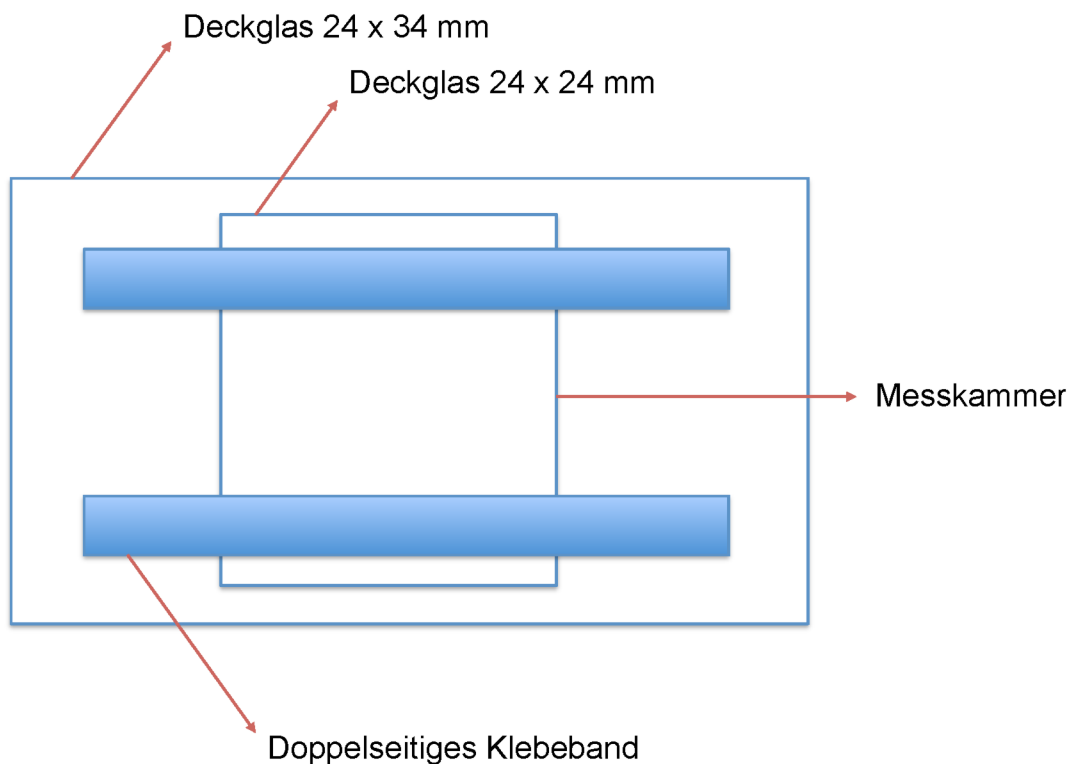


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Messkammer:

Aus zwei verschieden großen Deckgläsern (24 x 34 und 24 x 24 mm) wurde mittels doppelseitigen Klebebandes eine Messkammer hergestellt.

Experimente zur Tau-Diffusion entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli:

Nach der Kammervorbereitung und dem Ansetzen der Puffer (siehe 2.1.3) wurden im ersten Schritt 5 µl Tubulin-Antikörper (1:50 verdünnt in BRB80) in die Kammer eingespült und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels dieses Tubulin-Antikörpers konnten die später eingespülten Mikrotubuli an das silanisierte Glas der konstruierten Messkammer gebunden werden. Im zweiten Schritt wurde mit 15 µl einer 1%-tigen Pluronic F-127-Lösung die Kammer durchgespült. Während der fünfminütigen Inkubationsdauer des Pluronic in der Kammer wurde der 25 µl Inkubationsansatz vom GTP-Taxol-Mikrotubuli und Tau bei 35 °C vorinkubiert. Vorweg wurden die jeweiligen Verdünnungsfaktoren berechnet und die Vorverdünnungen für Mikrotubuli mit BRB12+Taxol und für hTau40 mit BRB12 angesetzt. Nach Einspülen in die Messkammer und Ablauf von fünf Minuten Inkubation wurde die Kammer final mit 15 µl Puffer 2 durchgespült.

Diffusion von Taumolekülen entlang von Mikrotubuli wurde bei einer durch Peltier-Elemente eingestellten Temperatur von 23 °C registriert. Pro Messkammer wurden jeweils drei bis vier Aufnahmeserien erstellt, wobei sich eine Serie aus jeweils einem Einzelbild der Cy5-markierten Mikrotubuli und einer anschließenden 60-sekündigen Aufnahme (300 Bilder mit 5 Bildern pro Sekunde) des TMR-markierten hTau40 an derselben Stelle zusammensetzte.

Experimente zur Tau-Diffusion entlang von GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli:

Die experimentelle Durchführung erfolgte grundsätzlich wie mit GTP-Taxol-Mikrotubuli allerdings in Gegenwart einer reduzierten Taxol-Konzentration auf 1 µM (Vorverdünnung (1:10): 10 µl 1 mM Taxol + 90 µl DMSO). Sowohl bei der Mikrotubuli-Polymerisation als auch in der darauffolgenden experimentellen Phase wurde mit der reduzierten Taxol-Konzentration weitergearbeitet.

Experimente zur Tau-Diffusion entlang von GMPCPP-Mikrotubuli:

Bis auf die Abwesenheit von Taxol in allen Pufferlösungen entsprachen alle weiteren Schritte zur Tau-Untersuchung denen von GTP-Taxol-Mikrotubuli.

Experimente zur Tau-Diffusion entlang von GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli:

Der Unterschied zu den Experimenten auf GMPCPP-Mikrotubuli lag ausschließlich in der Verwendung von 10 µM Taxol in den Pufferlösungen.

Experimente zur Tau-Diffusion entlang von GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli:

Äquivalent zu GMPCPP-Mikrotubuli mit Taxol galten hier ebenfalls die gleichen Versuchsbedingungen, allerdings mit dem Unterschied, dass Taxol auf 1 µM reduziert wurde.

2.2.7 Auswertung

Die mit dem Programm Andor SOLIS (Programm zur Kamerasteuerung) gefertigten Aufnahmen wurden zur Auswertung in ein TIF-Format konvertiert (im 16-bit Modus), um als Bilddateien auch für andere Programme wie ImageJ zugänglich gemacht werden zu können. Die angefertigten Aufnahmen von hTau40 und den entsprechenden Mikrotubuli (siehe 2.2.1-2.2.5) wurden mit dem Programm ImageJ analysiert.

Die Mikrotubulus-Achse wurde dazu mit einer Linie (segmented line, ImageJ) nachempfunden und die Koordinaten dieser in die hTau40-TMR-Aufnahme übertragen, um die Diffusion einzelner Tau-Moleküle im Anschluss auf dem jeweiligen Mikrotubulus als sogenannten Kymographen qualitativ darstellen zu können. Außerdem wurden in einem sowohl örtlich als auch zeitlich möglichst begrenzten Bereich um diesen Mikrotubulus die Positionen einzelner Tau-Moleküle mit dem Particle Tracker-Zusatzprogramm (erstellt von Guy Levy und gepflegt von Janick Cardinale in der MOSAIC Gruppe, ETH Zürich, vgl. Sbalzarini und Koumoutsakos, Journal of Structural Biology, 2005) über die Zeit als sogenannte Trajektorie verfolgt. Aus den dabei durch ImageJ generierten Positions-Zeit-Daten wurde die jeweils zurückgelegte Strecke und daraus das mittlere Verschiebungsquadrat berechnet und in Excel ein Punkt-Linien-Diagramm im Zeitintervall von 0,2-1 ms angelegt. Aus der halben Steigung der daraus resultierenden Regressionsgerade ließ sich der Diffusionskoeffizient für jedes analysierte diffundierende Tau-Partikel entnehmen (siehe 3.4). Die Diffusionsdauer und der maximale End-zu-End-Abstand (Interaktionsdistanz) einer Bewegungsbahn wurden ebenfalls aus den Trajektorien ermittelt.

2.2.8 Statistische Auswertung

Mithilfe der Analyse- und Darstellungsprogramme Origin und R wurde die weitere Auswertung durchgeführt. Die erhaltenen und graphisch dargestellten Daten wurden gemäß Shapiro-Wilk-Test in Origin auf eine Normalverteilung überprüft. Lag eine Normalverteilung vor, wurde die Signifikanz mit dem Two-sample independent t-Test ebenfalls in Origin überprüft. Konnte gemäß Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung nachgewiesen werden, wurde zur Signifikanzüberprüfung der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test in R verwendet. Die Signifikanzwerte, die sogenannten p-Werte, wurden in drei verschiedene Niveaus, $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,005$, eingeteilt.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das Interaktions-Verhalten von Tau mit Mikrotubuli auf Ebene einzelner Moleküle untersucht. Im Hinblick auf Diffusion entlang von Mikrotubuli als eine Möglichkeit der Interaktion wurde der Einfluss äußerer Parameter wie der Ionenstärke charakterisiert. Da Mikrotubuli in vitro und in vivo in unterschiedlichen Modifikationen existieren können (18–20) stellte sich im Verlauf der Arbeit die Frage, ob und inwiefern der Tubulin-Nukleotidzustand einen Einfluss auf das Verhalten von Tau haben könnte.

3.1 Kolokalisation

Entsprechend dem Versuchsaufbau unter Punkt 2.2.7 wurden mit Tau inkubierte Mikrotubuli auf dem Boden einer individuell hergestellten Messkammer mittels eines tubulinspezifischen Antikörpers fixiert und anschließend unter Verwendung der Totalen internen Reflexions Fluoreszenz (TIRF) Mikroskopie beobachtet (Abb. 3.1-3.3). Im Vorfeld wurden die verwendeten Proteine Tubulin und Tau spezifisch fluoreszenzmarkiert.

Das in dieser Arbeit verwendete Tubulin entstammte dem Gehirn vom Schwein und wurde mit Cy5-NHS Ester fluoreszenzmarkiert. Sowohl die Aufreinigung des Tubulins in nativer Form als auch dessen Fluoreszenzmarkierung mit Cy5-NHS Ester wurden von M. Hinrichs und T. Scholz (Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Molekular- und Zellphysiologie) durchgeführt.

Das in den Versuchen eingesetzte Tau-Protein wurde von E. Mandelkow (Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg, und DZNE, Bonn) zur Verfügung gestellt und von M. Hinrichs und T. Scholz (Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Molekular- und Zellphysiologie) mit 5`Tetramethylrhodamin (5`TMR)-maleimid markiert. Zur Fluoreszenzmarkierung wurden die Cystein-Reste an den Positionen 291 und 322 von hTau40 genutzt (68). Anhand der unten aufgeführten Abbildung 3.1 A-C konnte durch Kolokalisation TMR-markierter hTau40-Proteine (grün) und den am Boden der Probekammer immobilisierten Cy5-markierten Mikrotubuli (rot) eine deutliche Anreicherung der hTau40-Moleküle und somit die Bindung an Mikrotubuli gezeigt werden.

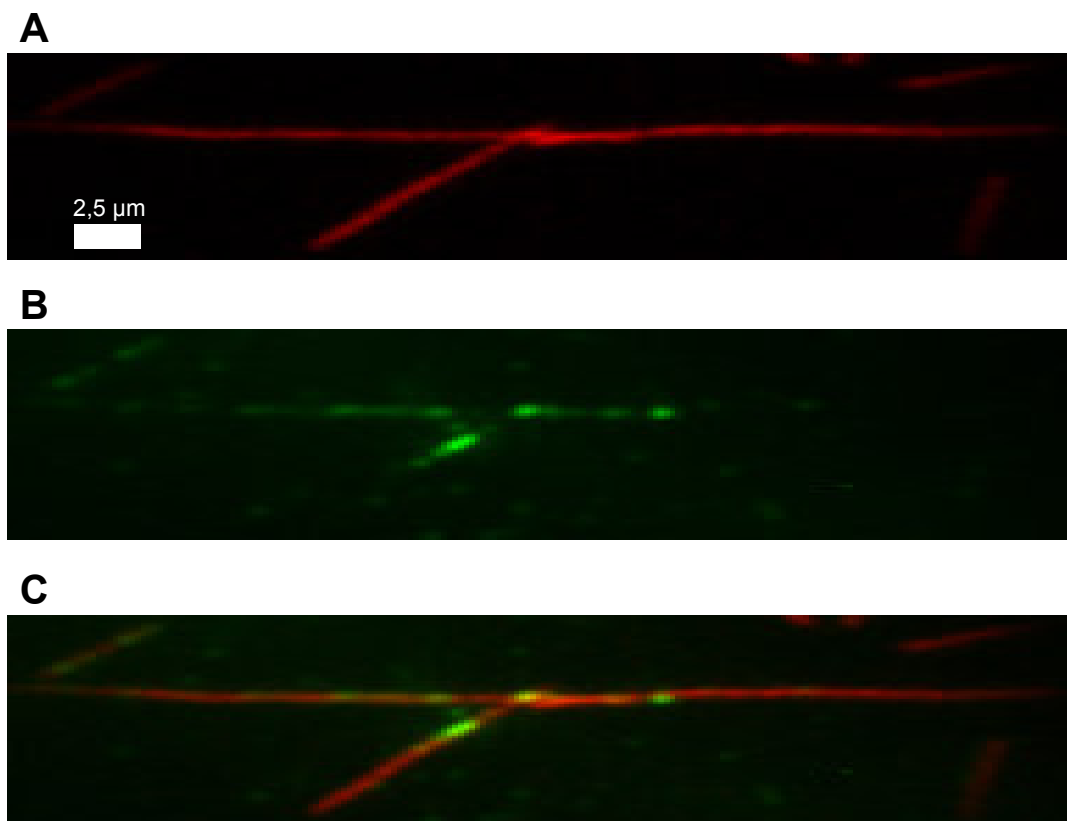


Abbildung 3.1 Kolokalisation

A Am Boden der Probekammer immobilisierte Cy5-markierte Mikrotubuli (rot). **B** TMR-markiertes hTau40 (grün). **C** Darstellung der Kolokalisation der hTau40-Proteine (grün) auf Cy5-markierte Mikrotubuli (rot) durch Überlagerung von A und B.

3.2 Auswertungsmethodik der Tau-Mikrotubuli-Interaktion

Um neben der Präsenz auch eine mögliche Bewegung einzelner hTau40-Moleküle entlang von Mikrotubuli untersuchen zu können, wurde die Darstellung in Form von Kymographen gewählt. Dazu wurden pro Messkammer jeweils drei bis vier Aufnahmeserien durchgeführt, wobei sich eine Serie aus jeweils einer einzelnen Standbild-Aufnahme der Mikrotubuli und einer anschließenden Film-Aufnahme des hTau40 an derselben Stelle zusammensetzte.

Die Aufnahme des hTau40 erfolgte mit fünf Hertz über 60 Sekunden (300 frames). Die Position eines hTau40-Moleküls entlang der Mikrotubulus-Achse (x-Achse im Kymographen) wurde für eine solche Aufnahme gegen die Zeit (y-Achse) aufgetragen. Tau-Moleküle, die während der gesamten Interaktionszeit mit dem Mikrotubulus an exakt der gleichen Stelle verblieben und daher ihre Position über die Zeit nicht veränderten, stellten sich im Kymographen als vertikale Linien dar.

Handelte es sich hingegen um mobile Tau-Moleküle, die ihre Position über die Zeit änderten, waren auf dem Kymographen seitliche Abweichungen beobachtbar (Abb. 3.2 B). Die seitlichen Abweichungen gingen dabei in beide Richtungen.

Generell galt, je flacher der Linienvverlauf desto größer die Positionsänderung innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls und desto schneller die Bewegung. Abbildung 3.2 B veranschaulicht die Auswertungsmethode der Tau-Bewegung mit Hilfe der exemplarischen Einzelbilder einer Aufnahme, die im Abstand einer Sekunde erfolgten. In diesem Beispiel bewegte sich das schematisch blau markierte Tau-Molekül entlang des pink markierten Mikrotubulus.

Die Mikrotubulus-Länge, die in Pixel bestimmt wurde, wurde mit dem Umrechnungsfaktor $0,163 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ in μm umgerechnet. Für die Abbildung 3.2 B errechnete sich dadurch eine Mikrotubulus-Länge von $31,62 \mu\text{m}$ ($194 \text{ Pixel} \times 0,163 \mu\text{m}/\text{Pixel}$). In dem Ausschnitt der Abbildung 3.2 B wurde für das untersuchte Tau-Molekül eine zurückgelegte Strecke von $2,06 \mu\text{m}$ gemessen (grüner Messbalken).

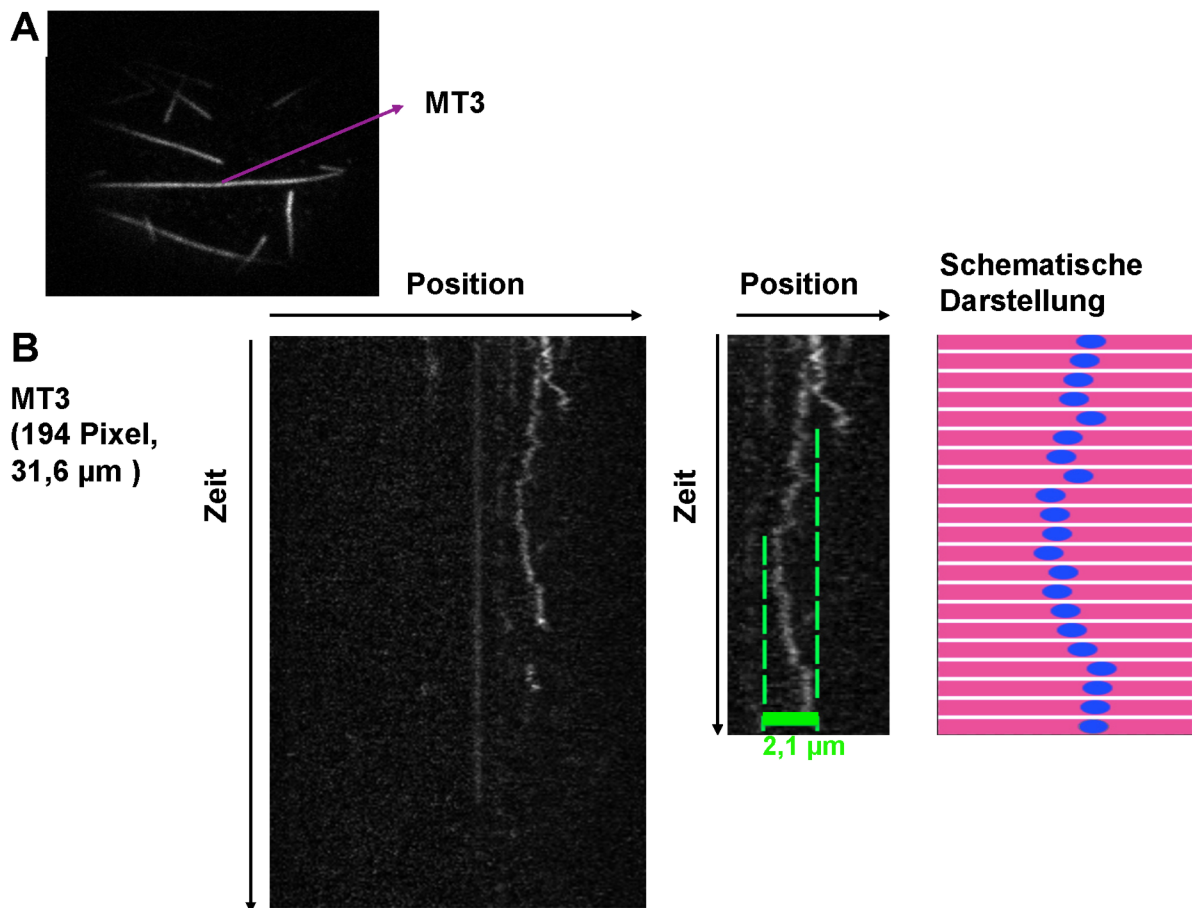


Abbildung 3.2 Kymographische Darstellung der Taubewegung

A Kammer mit 50 nM immobilisierten Mikrotubuli (weiß) und 80 pM hTau40 (nicht dargestellt). **B** Der Kymograph entlang dieses 31,62 μm langen Mikrotubulus zeigt einen vertikalen (mittig) und einen zickzackartigen (rechts) Linienverlauf. Stationäre Tau-Moleküle zeichneten sich durch den vertikalen und mobile durch einen zickzackartigen Linienverlauf auf dem Kymographen aus. Die zweite kymographische Darstellung ist ein Ausschnitt aus dem ersten Kymographen. Dieser Ausschnitt wurde zusätzlich schematisch dargestellt. Die blauen Punkte symbolisieren das Tau-Molekül, das sich zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb der Interaktionszeit an einem bestimmten Punkt des Mikrotubulus befand. Das untersuchte Tau-Molekül legte eine Strecke von 2,06 μm zurück.

3.3 Bestimmung einer geeigneten Konzentration zur Beobachtung einzelner Tau-Moleküle

Zur optimalen Darstellung und Untersuchung des Verhaltens von fluoreszenzmarkierten hTau40-TMR-Molekülen auf immobilisierten Mikrotubuli wurden verschiedene Tau- und Mikrotubulikonzentrationen getestet. Ziel war die Bestimmung einer optimalen Tau-Konzentration, um eine maximale Anzahl bei ausreichender Auswertbarkeit einzelner Tau-Moleküle möglichst ohne örtliche Überschneidungen mit anderen Tau-Molekülen zu ermitteln.

Aus diesen Voruntersuchungen ergab sich anschließend für die oben aufgeführten Kriterien ein optimaler Konzentrationsbereich von 50-80 pM für hTau40 bei 50 nM Mikrotubuli (Abb. 3.2 mit 80 pM). Bei höheren Tau-Konzentrationen waren einzelne Tau Moleküle nicht mehr voneinander abgrenzbar (Abb. 3.3 mit 200 pM hTau40).

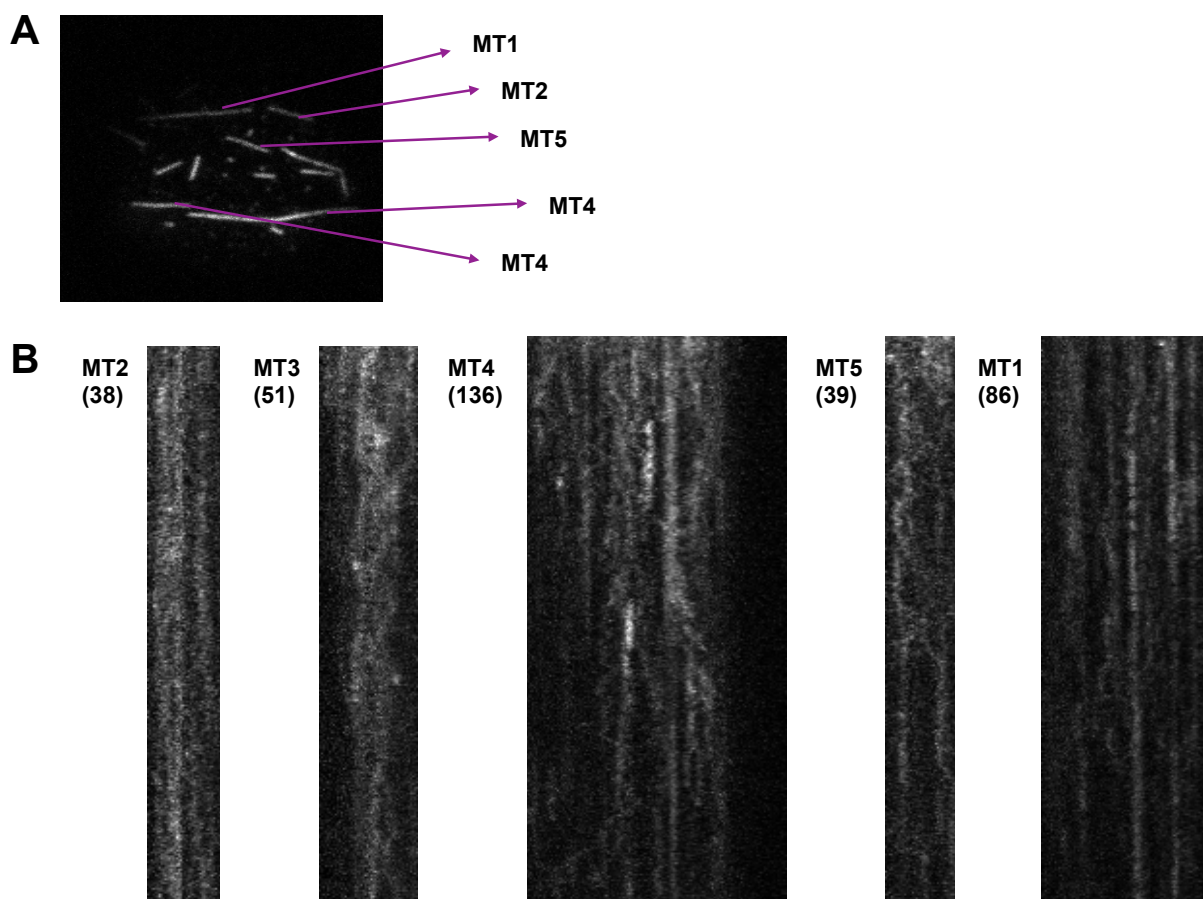


Abbildung 3.3 Unterschiedliche Tau-Konzentrationen

A Messkammer mit 50 nM Mikrotubuli und **B** die entsprechend zum gekennzeichneten Mikrotubulus gehörenden 200 pM TMR-hTau40-Protein. Einzelne Moleküle sind aufgrund der hohen Konzentration an hTau40 entlang von Mikrotubuli schwerer erkenn- und auswertbar.

3.4 Charakterisierung der Bewegung von hTau40 entlang der Mikrotubuli-Achse

Die bisher vorherrschende Annahme, das gebundene Tau-Molekül sei auf Mikrotubuli ausschließlich stationär (3,49,52,65,71) wurde widerlegt (68). Mit Hilfe des TIRF-Mikroskops konnten in dieser Arbeit einzelne Tau-Moleküle visualisiert werden. Neben stationären Tau-Molekülen, die während der gesamten Interaktionszeit mit Mikrotubuli an exakt der gleichen Stelle verblieben, traten ebenfalls mobile Tau-Moleküle, die ihre Position über die Zeit änderten, auf.

Die seitlichen Abweichungen gingen dabei in beide Richtungen. Diese ungerichtete Bewegung (Abb. 3.4) sprach für Diffusion entlang des Mikrotubulus-Gitters (68,103).

Zur quantitativen Charakterisierung der Bewegung von hTau40 entlang der Mikrotubulus-Achse diente die mittlere quadratische Verschiebung (mean squared displacement). Ein lineares Verhältnis der mittleren quadratischen Verschiebung mit dem Zeitinkrement spricht dabei für Diffusion. Aus der Auftragung der zurückgelegten Strecken in bestimmten Zeitintervallen kann der dazugehörige Diffusionskoeffizient aus der Steigung ermittelt werden.

In der zugrundeliegenden Formel des Fick'schen Diffusionsgesetzes $\langle x^2 \rangle = 2Dt$ steht dabei das $\langle x^2 \rangle$ für das mittlere Verschiebungsquadrat. Die dabei zurückgelegte Strecke des beobachteten Moleküls innerhalb eines Zeitintervalls (oder auch Zeitinkrements zwischen den Zeitpunkten t und $t + \tau$) ist x .

Am Zeitpunkt t , der beliebig festgelegt werden kann, begann die Beobachtung des Moleküls. Der zweite Zeitpunkt τ beziehungsweise das Ende des Zeitintervalls entsprach der Aufnahmedauer eines Einzelbildes oder einem Vielfachen davon. Das mittlere Verschiebungsquadrat wurde dabei für jedes Molekül als gleitender Mittelwert der Verschiebungsquadrate für jedes t und $t + \tau$ berechnet. Stellt man das mittlere Verschiebungsquadrat $\langle x^2 \rangle$ mobiler Tau-Moleküle graphisch gegen das Zeitinkrement dar, resultiert daraus ein linearer Datenverlauf, der kennzeichnend für Diffusion ist (Abb. 3.4).

Anschließend wurde der Diffusionskoeffizient durch eine lineare Regression ermittelt. Dazu wurden die ersten mindestens fünf Werte (Zeitinkremente 0,2 - minimal 1 oder maximal 3 s) verwendet.

Für die jeweiligen beobachteten Moleküle konnte man dann den Diffusionskoeffizienten wegen $\langle x^2 \rangle = 2Dt$ als halbe Steigung der Geraden ermitteln. Bei gerichteter Bewegung hingegen, wie sie z. B. bei dem Motorprotein Kinesin beobachtet werden kann, wird durch die lineare Zunahme von x mit fortschreitendem t die lineare Bewegung nach Quadrieren einen parabelförmigen Verlauf aufweisen. Abbildung 3.4 stellt die ungerichtete Bewegung eines einzelnen Tau-Moleküls (Diffusion) der linearen (gerichteten) Bewegung eines Kinesinmoleküls gegenüber.

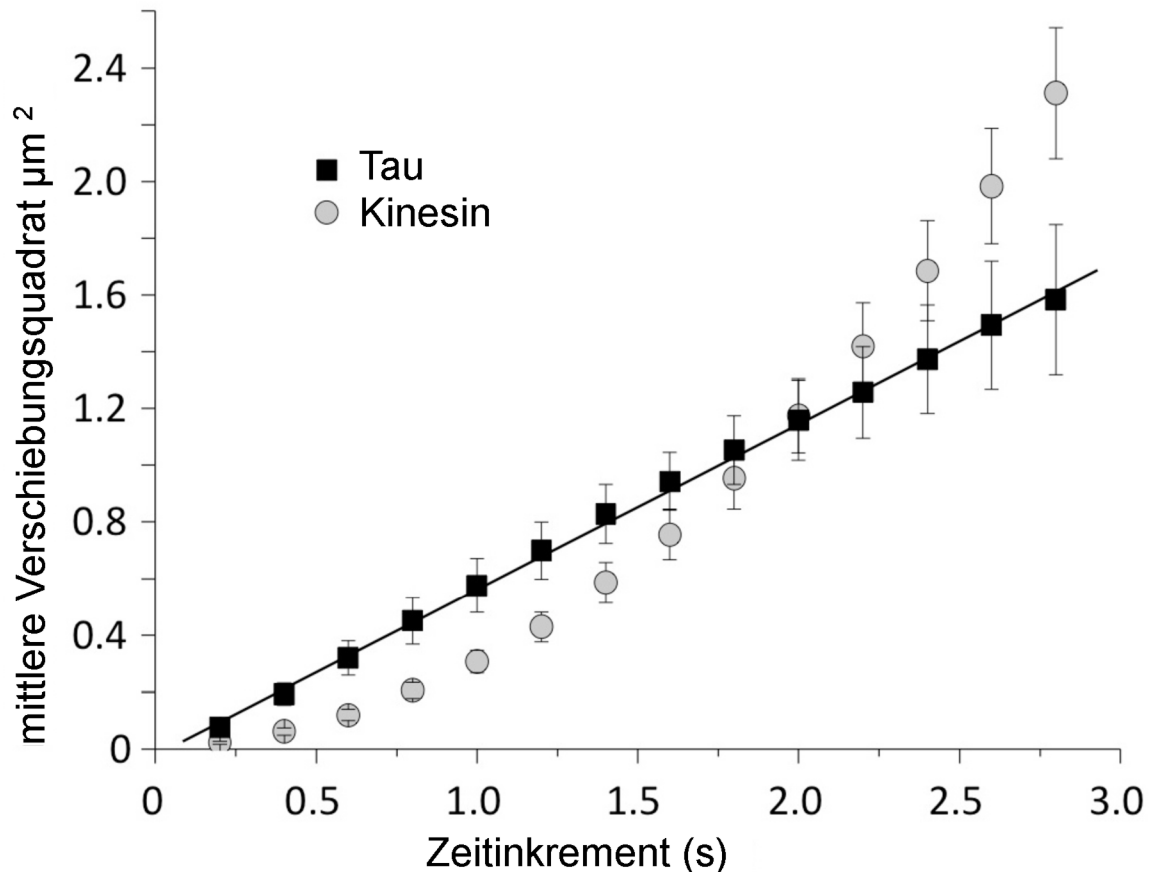


Abbildung 3.4 Vergleich ungerichtete und gerichtete Bewegung

Der unterschiedliche Kurvenverlauf von Diffusion am Beispiel eines Tau-Moleküls mit einem geraden Kurvenverlauf und einer gerichteten Bewegung am Beispiel eines Kinesin-Moleküls mit einem parabelförmigen Kurvenverlauf ist im Zeit-Verschiebungsquadrat-Plot deutlich erkennbar (verändert nach Hinrichs et al. (2012), Beschriftung ins Deutsche übersetzt).

3.4.1 Charakterisierung der Diffusion

Zur Charakterisierung der Diffusionseigenschaften einzelner Tau-Moleküle wurden folgende Parameter herangezogen:

- 1) der Diffusionskoeffizient,
- 2) die Interaktionszeit mit Mikrotubuli,
- 3) die Interaktionsdistanz mobiler Tau-Moleküle

(1) Der Diffusionskoeffizient von Tau-Molekülen:

Zur Ermittlung des Diffusionskoeffizienten von hTau40-Molekülen entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli wurden ausnahmslos alle Bewegungsläufe, sowohl von Molekülen, die während der gesamten sichtbaren Diffusion auswertbar waren, als auch von Molekülen, bei denen temporäre Überschneidungen mit anderen Molekülen vorlagen (GTP-Taxol-Mikrotubuli / hTau-40-Interaktion: $n=134$) miteinbezogen (Abb. 3.5). Die Moleküle, die sich allerdings in der unmittelbaren Nähe von Mikrotubuli-Enden befanden, wurden nicht berücksichtigt, da deren Diffusion mutmaßlich durch das Ende des Mikrotubulus eingeschränkt wurde. Da sich die ermittelten Diffusionskoeffizienten der individuellen hTau40-Moleküle gemäß Shapiro-Wilk-Test (Origin) nicht normal verteilten, wurde der Median als Angabe des Diffusionskoeffizienten gewählt. Der Diffusionskoeffizient belief sich auf $0,104 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=134$) (Abb. 3.5, 3.18 A, C, Tab. 3.4).

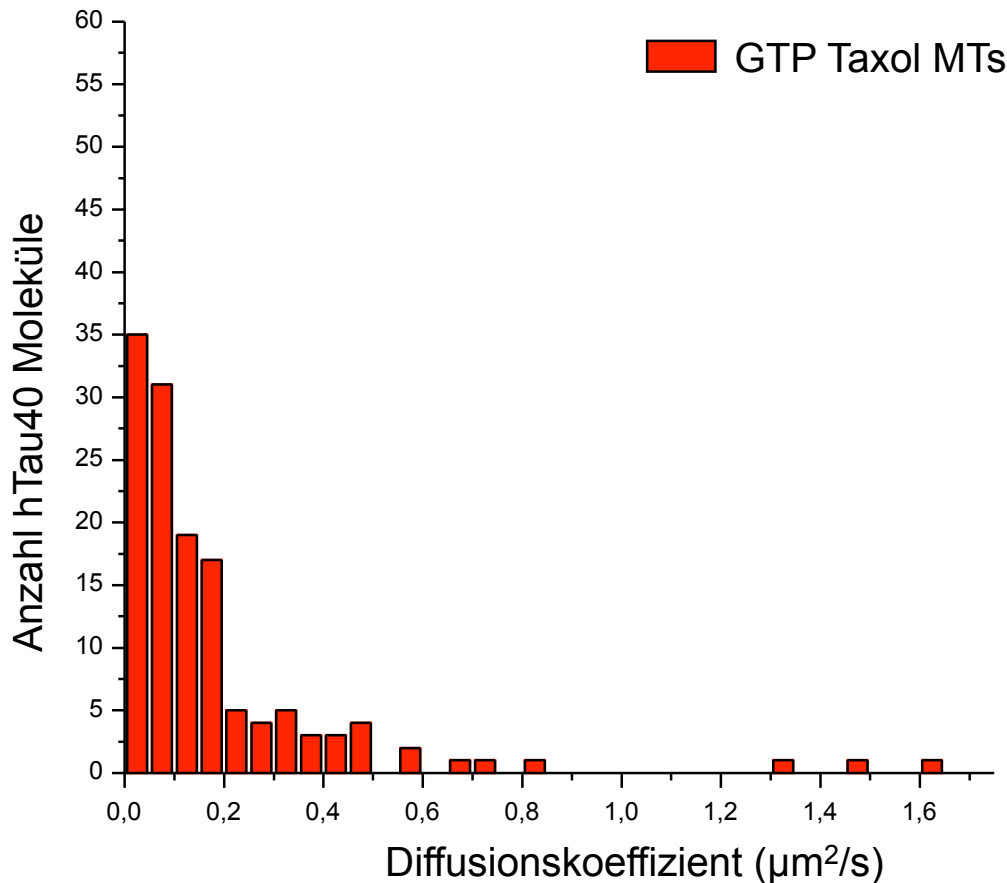


Abbildung 3.5 Diffusionskoeffizienten einzelner Tau-Moleküle entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli

Auf der x-Achse ist der Diffusionskoeffizient in $\mu\text{m}^2/\text{s}$ und auf der y-Achse die Anzahl der hTau40-Moleküle aufgetragen. Zur Ermittlung der Diffusionskoeffizienten wurden ausnahmslos alle Bewegungsläufe miteinbezogen und daraus der Median von $0,104 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Abb. 3.28) errechnet.

Abb. 3.6 und 3.7 zeigen Beispiele eines langsam und eines schnell diffundierenden Tau-Moleküls. Der jeweilige Diffusionskoeffizient wurde wie beschrieben nach dem Plotten des Zeitinkrements gegen die mittleren Verschiebungsquadrate als halbe Steigung der linearen Regression über die ersten fünf Werte (0,2-1 s) ermittelt (Diffusionskoeffizient, $2Dt$).

Um sicherzustellen, dass es sich bei den ausgewerteten Molekülen um einzelne Tau-Moleküle handelte und keine Bildung von Tau-Aggregaten vorlag, wurde bei der Auswertung neben der Kontrolle der Tau-Molekülhelligkeit zusätzlich der Molekülhelligkeitsverlauf über die Beobachtungszeit als eine objektive Bleichkontrolle durchgeführt.

Wie unter Punkt 3.1 beschrieben, wurde in dieser Arbeit hTau40 verwendet, welches mit Cysteinen an Position 291 und 322 maximal zwei Fluorophore aufweisen konnte (68). Einzelne Moleküle durften somit maximal in zwei Stufen ausbleichen. Bei den untersuchten Molekülen konnte kein mehr als zweistufiger Bleichvorgang beobachtet werden, was nahelegt, dass die zur Analyse herangezogenen Bewegungsmuster einzelne Moleküle darstellten.

In Abb. 3.6 und 3.7 wurde jeweils die messbare Fluoreszenzintensität (in Tausend a.u.) eines diffundierenden Tau-Moleküls gegen die Zeit (in s) aufgetragen.

Da neben stationären auch langsam und schnell diffundierende Tau-Moleküle beobachtet werden konnten, wurde exemplarisch für zwei verschiedene Fälle, ein langsam und ein schnell diffundierendes Tau-Molekül, die jeweilige Bleichkontrolle zur Verdeutlichung des Einzel-Molekül-Assays durchgeführt. An der Stelle, an der es im Kymographen zu einer kurzzeitigen Unterbrechung des Trackingvorgangs kam (Abb. 3.6 A oberer roter Pfeil), konnte ein kurzzeitiger Abfall im Intensitätsprofil des besagten Tau-Moleküls (Abb. 3.6 C erster roter Pfeil) verzeichnet werden.

Einem solch plötzlichen Intensitätsabfall können verschiedene Ursachen zugrunde liegen: es kann zu einem Verlust eines vorhandenen Fluorophors / eines TMR's kommen, das diffundierende Molekül kann einfach vom Mikrotubulus dissoziieren oder es findet Fluorophor-Blinking statt, bei dem die Intensität auf das 1-Fluorophor-Niveau abfällt.

In diesem Fall ist eher vom Letzteren auszugehen, da das Molekül ein paar frames später wieder getrackt werden konnte und das Intensitätsprofil zwischenzeitlich nicht auf 0 abfiel. Bei einem Verlust des vorhandenen Fluorophors oder bei einer Dissoziation würde die Intensität auf 0 runtergehen. Im weiteren Verlauf kam es zu einem erneuten, nun dauerhaften Abfall im Intensitätsprofil, der ebenfalls am Kymographen beobachtbar war (zweiter roter Pfeil, erstes TMR bei ~200 frames gebleicht).

Es handelte sich sehr wahrscheinlich um einen einstufigen Bleichvorgang, einem Verlust des Fluorophors, wobei die Intensität gegenüber dem Hintergrund erneut abfiel.

Einige frames später kam es zu einem weiteren Intensitätsverlust (grüner Pfeil, zweites TMR bei ~257 frames gebleicht). Ab diesem Punkt war das Molekül für das Trackingprogramm nicht mehr fassbar (blauer Pfeil).

Inwieweit ein Fluorophor zur Gesamtintensität beiträgt und ob zwei Fluorophore einen gleichwertigen Beitrag dabei leisten, ist nicht bekannt, da die Farbstoffe innerhalb eines Proteins jeweils unterschiedlichen Umgebungen ausgesetzt sind und unterschiedliche Positionen der Dipolmomente unterschiedlich starke Anregungen verursachen können (68).

Abb. 3.7 zeigt die Bleichkontrolle eines schnell diffundierenden Tau-Moleküls, das ab einem bestimmten frame plötzlich und ohne weiteren Intensitätsabfall für das Trackingprogramm nicht mehr fassbar war. Da ein Abgang von zwei Farbstoffen absolut gleichzeitig sehr unwahrscheinlich ist und die Intensität ab einem bestimmten frame 0 betrug, kann man in diesem Beispiel von Dissoziation des Tau-Moleküls vom Mikrotubulus ausgehen. Auch konnte gezeigt werden, dass es sich in Abb. 3.6 um ein einzelnes Molekül mit zwei Fluorophoren handelte.

Insgesamt wurde für alle diffundierenden Tau-Moleküle ein Intensitätsprofil in einem Bereich von etwa 2000-3500 a.u. ermittelt.

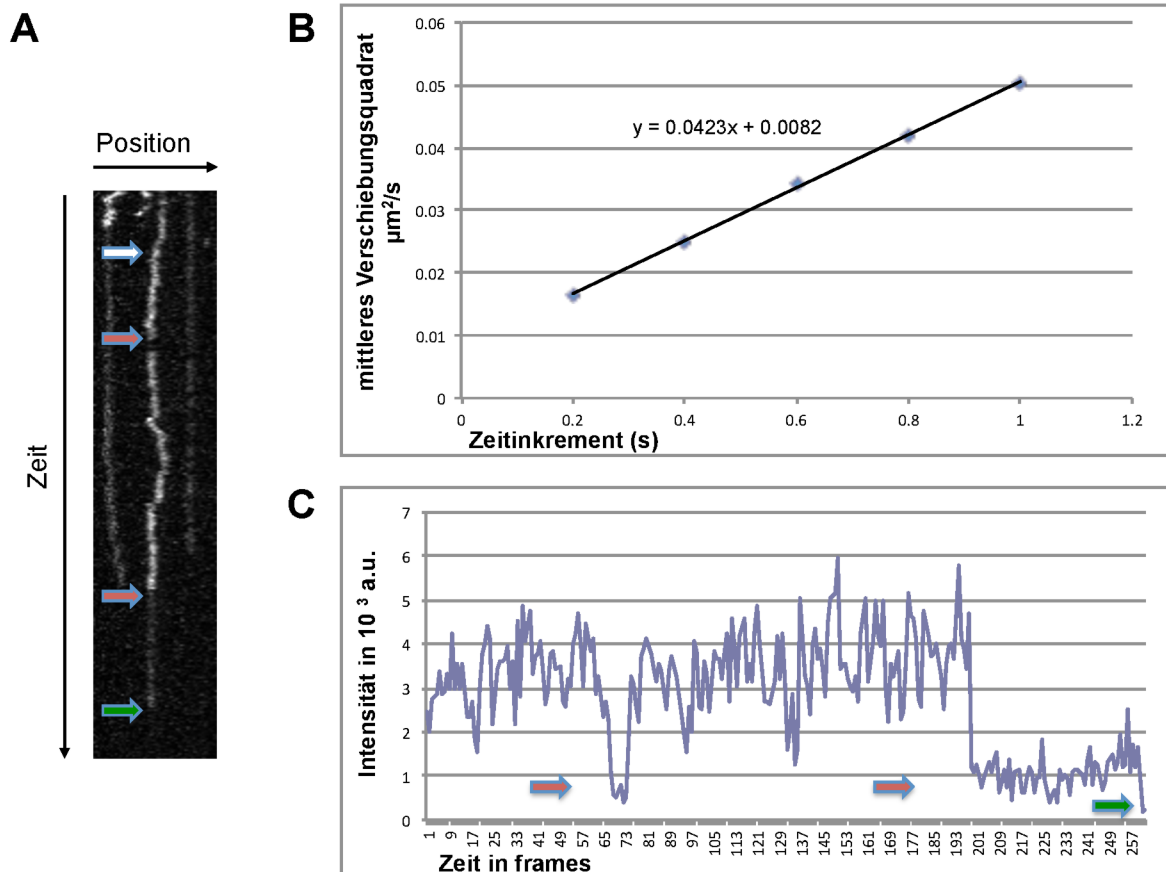


Abbildung 3.6 Beispiel eines langsam diffundierenden Tau-Moleküls

A Das untersuchte Tau-Molekül ist auf dem Kymographen mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. Die gemessene Interaktionszeit belief sich auf 52,20 s. Die Mikrotubulus-Länge betrug 10,27 μm (Gesamtbreite des Kymographen). **B** Aus dem Plot des Zeitinkrements gegen die mittleren Verschiebungsquadrate ging über lineare Regression ein Diffusionskoeffizient von 0,02 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (D entspricht 1/2 Steigung) hervor. **C** Das Intensitätsprofil (y-Achse TMR-Fluoreszenzintensität in 10^3 a.u.), das gegen den Zeitpunkt der Aufnahme (x-Achse in frames) des diffundierenden Tau-Moleküls aufgetragen wurde, fiel in dem Bereich des Kymographen, in dem das betroffene Tau-Molekül kurzzeitig nicht getrackt werden konnte, auf ein niedrigeres Niveau ab (roter Pfeil). Dieses Niveau wurde äquivalent zum Kymographen an der Stelle, an der das Tau-Molekül einen Intensitätsverlust erfuhr (roter Pfeil), ebenfalls ein zweites Mal erreicht. Nach etwa 257 frames war nach weiterer Intensitätsreduktion auf Hintergrundintensität kein Tracking mehr möglich.

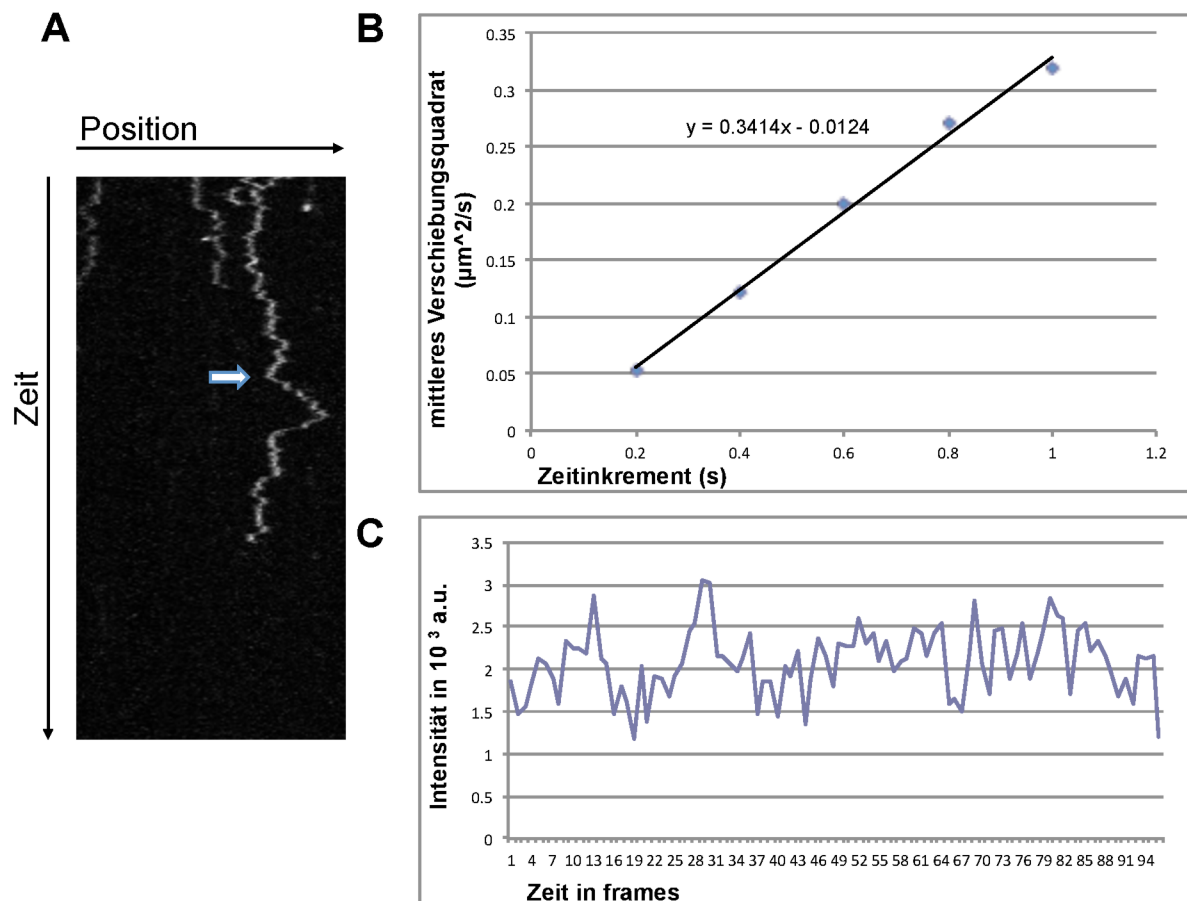


Abbildung 3.7 Beispiel eines schnell diffundierenden Tau-Moleküls

A Kymograph mit vier mobilen Tau-Molekülen. Das in B und C untersuchte Tau-Molekül ist mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. Die Mikrotubulus-Länge betrug 22,66 μm , die Interaktionszeit 19 Sekunden. **B** Aus dem Plot des Zeitinkrements gegen die mittleren Verschiebungsquadratrate wurde durch lineare Regression der Diffusionskoeffizient von 0,16 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (D entspricht $\frac{1}{2}$ Steigung) berechnet. **C** Das Intensitätsprofil befand sich in einem Bereich von etwa 1500 – 3000 a.u. Ab einem bestimmten frame war das Tau-Molekül nicht mehr trackbar, so dass hier durch einen plötzlichen Intensitätsabfall auf 0 a.u. von einer Dissoziation des Tau-Moleküls vom Mikrotubulus ausgegangen werden kann.

(2) Die Tau-Mikrotubulus-Interaktionszeit:

Abbildung 3.8 zeigt die Verteilung der Interaktionszeiten einzelner Tau-Moleküle mit Mikrotubuli. Diese Verteilung lässt sich durch eine Funktion exponentieller Abnahme erster Ordnung beschreiben (roter Fit).

Im Gegensatz zum Diffusionskoeffizienten, bei dem ausnahmslos alle Bewegungsläufe berücksichtigt werden konnten, ging die Abklingkonstante ausschließlich aus Tau-Molekülen, die während ihrer gesamten sichtbaren Diffusion auswertbar waren, hervor. Für die Diffusion von hTau40-Molekülen entlang von mit GTP polymerisierten Taxol-stabilisierten Mikrotubuli (GTP-Taxol-Mikrotubuli: $n=134$) wurde eine Abklingkonstante von $12,2 \text{ s} (\pm 1,06 \text{ s})$ ermittelt (Abb. 3.8, Tab. 3.4). Insgesamt konnte mit einer Beobachtungsdauer von 60 Sekunden ein Abfall der Interaktionszeit/Abklingkonstante auf ca. 10 % des Anfangswertes registriert werden. Da kürzere Interaktionszeiten zahlenmäßig weniger detektiert werden als längere, weil sie unter Umständen zeitlich oder örtlich unter die experimentelle Auflösung (Minimum 3 Bilder zu je 0,2 Sekunden bzw. 3 Pixel zu je $\sim 0,170 \text{ }\mu\text{m}$) fallen und dadurch nicht alle erfassbar sind, wurden sie in der ersten Säule zwar dargestellt, im Fit aber nicht berücksichtigt.

Mit der Ermittlung des Bleichverhaltens konnte gezeigt werden, dass es sich bei den analysierten Molekülen um Einzelmoleküle handelte (Abb. 3.6 C). Da jedoch auch beide Fluorophore eines Tau-Moleküls ausbleichen könnten, und Tau in Falle einer weiteren Interaktion mit Mikrotubuli nicht mehr detektier- und trackbar wäre, wurde angenommen, dass die ermittelte Interaktionszeit nicht der realen Interaktionszeit entsprach. Die reale Interaktionszeit musste dementsprechend mit Hilfe eines Bleichfaktors korrigiert werden. Die gemessene Abklingkonstante τ_b der Fluoreszenz von am Messkammerboden immobilisierten TMR-Farbstoffen belief sich auf $78,3 \text{ s} (\pm 25,7 \text{ s})$. Unter Berücksichtigung der gemessenen Abklingkonstante τ_{obs} konnte durch die Formel $1/\tau_{obs} = 1/\tau_b + 1/\tau_D$ (103) die Zeitdauer bis zur Dissoziation (τ_D) berechnet werden. Aus der Korrektur mit der Bleichabklingkonstante ging für hTau40 entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli eine Dissoziationskonstante von $14,5 \text{ s} (\pm 1,11 \text{ s})$ hervor (Tab. 3.1).

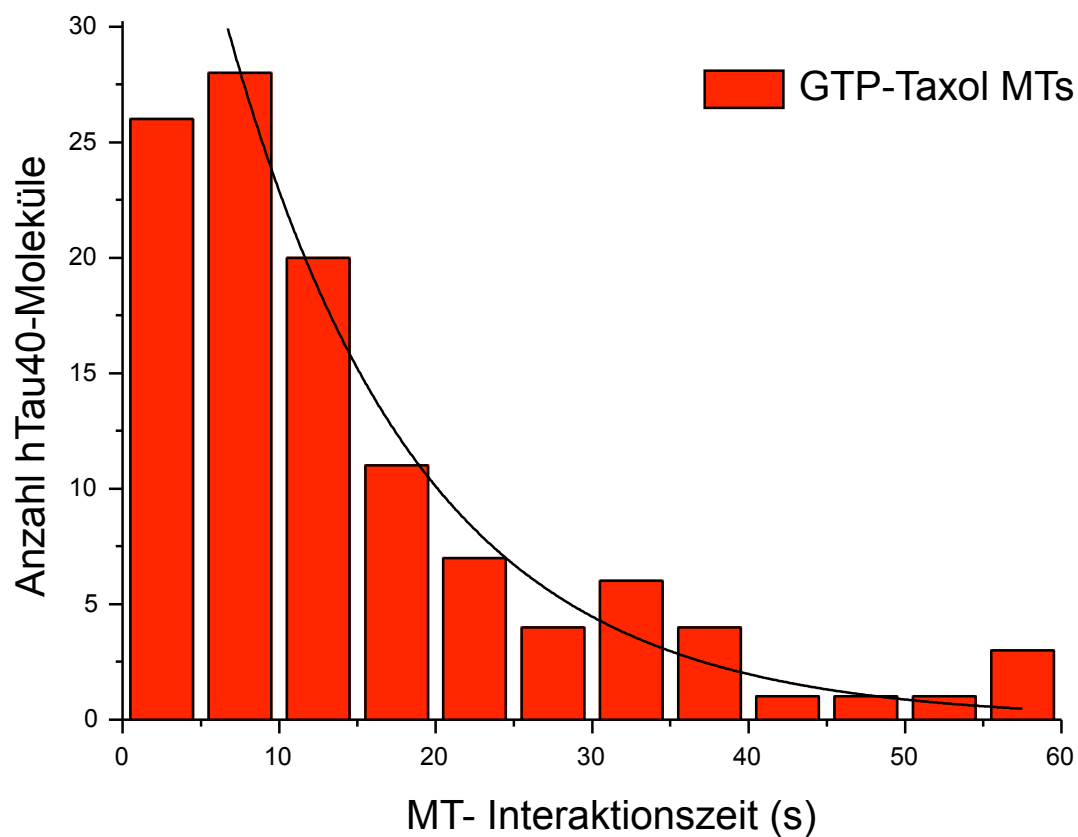


Abbildung 3.8 Verteilung der Interaktionszeiten von Tau auf GTP-Taxol-Mikrotubuli

Gemessene Interaktionszeiten von hTau40 auf GTP-Taxol-Mikrotubuli (n=134). Die rote Linie entspricht dem Fit einer exponentiellen Abnahme erster Ordnung mit der Abklingkonstante von 12,2 s.

Tabelle 3.1 Übersicht der Abklingkonstanten von hTau40-Molekülen entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli vor und nach der Korrektur für Fluorophorbleichen:

	Gemessene Abklingkonstante in s	Fitfehler	Bleichabklingkonstante TMR in s	Fitfehler	Korrigierte Dissoziationskonstante in s	Fitfehler
hTau40-Moleküle auf GTP-Taxol-Mikrotubuli	12,2	1,06	78,3	25,7	14,5	1,11

(3) Interaktionsdistanz der Tau-Mikrotubulus-Interaktion:

Die Interaktionsdistanz beschreibt als ein weiterer Parameter der Diffusionseigenschaften die Länge des Mikrotubulusabschnitts, mit dem ein diffundierendes Tau-Molekül interagiert.

Die durchschnittliche Interaktionsdistanz lässt sich entweder aus dem Diffusionskoeffizienten und der Interaktionszeit mit der folgenden Formel: $d = \sqrt{2Dt}$ berechnen oder direkt messen (Abb. 3.9, Tab. 3.4). In dem oben aufgeführten Beispiel (Abb. 3.2 A-B) wurde die Interaktionsdistanz direkt gemessen, sie belief sich auf 2 μm . Zur Kontrolle wurde die Interaktionsdistanz mit der Formel $d = \sqrt{2Dt}$ ebenfalls errechnet. Daraus ergab sich eine Strecke von 1,7 μm ($\sqrt{0,05 \mu\text{m}^2/\text{s} \times 28 \text{ s}}$, D bestimmt mit 0,05). Der gemessene und der errechnete Wert lagen nah beieinander, so dass beide Methoden zur Ermittlung der Interaktionsdistanz verwendbar schienen. Für Tau-Moleküle entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli wurde eine Interaktionsdistanz von 1,74 μm ($\pm 0,25$ Fit-Fehler) aus dem Median des Diffusionskoeffizienten und der Interaktionszeit berechnet.

Die zur Berechnung der Interaktionsdistanz verwendete Interaktionszeit wurde zuvor um den Bleichfaktor korrigiert (siehe Tab. 3.1). Der an den unkorrigierten Interaktionsdistanzen angelegte Gaussfit ergab eine gemessene Interaktionsdistanz von 1634 nm $\pm$ 54 nm (Abb. 3.9 rote Kurve).

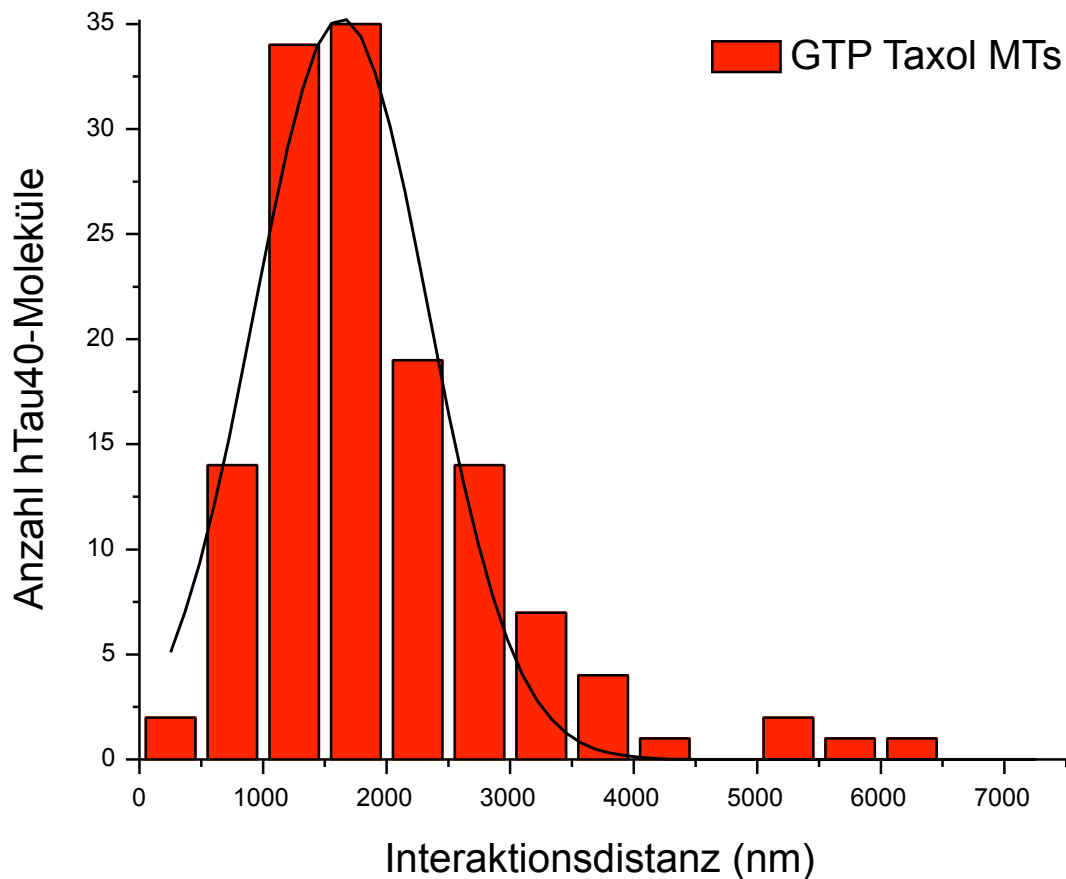


Abb. 3.9 Verteilung gemessener Interaktionsdistanzen einzelner Tau-Moleküle auf Mikrotubuli

Die Mikrotubulus-Länge, mit der einzelne diffundierende Tau-Moleküle interagierten, berechnete sich aus dem zuvor bestimmten Median der Diffusionskoeffizienten und der um den Bleichfaktor korrigierten Diffusionsdauer. Der berechnete Wert von 1733 nm (± 245 nm) stimmte gut mit dem Gaussfit (1634 nm ± 54 nm, rote Kurve) an die gemessenen unkorrigierten Interaktionsdistanzen (rote Säulen) überein.

3.4.2 Einfluss der Ionenstärke auf die Diffusion von hTau40

Die Theorie der Tau-Diffusion entlang des Mikrotubulus-Gitters mit Beteiligung elektrostatischer Wechselwirkungen konnte in Vorarbeiten gezeigt werden (68). Durch enzymatische Abspaltung des für die elektrostatischen Wechselwirkungen verantwortlichen, negativ geladenen Teil des Tubulins, den C-Terminus beziehungsweise der sogenannten E-hook (103) mithilfe von Subtilisin konnte ein erheblicher Rückgang der Tau-Mikrotubuli-Bindung und –Diffusion beobachtet werden (68). Die meisten Tau-Moleküle blieben dabei stationär.

Es stellte sich die Frage nach dem Einfluss von Ionenstärke und pH-Wert auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Tau und Mikrotubulus (68).

Der folgende Teil der vorliegenden Arbeit trug zu publizierten Ergebnissen einer vorangegangenen Arbeit bei (68). Hierzu wurden die Diffusionsparameter wie Diffusionsgeschwindigkeit, Interaktionszeit und Interaktionsdistanz von hTau40 unter der Zugabe unterschiedlicher Kaliumazetat-Konzentrationen (0 mM – 100 mM) charakterisiert. Durch die schrittweise Erhöhung der Kaliumazetatkonzentrationen auf 100 mM und der im Puffer BRB12 enthaltenen Ionenstärke von 40 mM konnten in dieser Arbeit mit einer Gesamtionenstärke von 140 mM annähernd zelluläre Bedingungen geschaffen werden. Die physiologische Ionenstärke in Zellen liegt bei 150 mM. Die Erhöhung der Ionenstärke durch die Zugabe von Kaliumazetat bewirkte einen Rückgang der Anzahl stationärer sowie auch mobiler Tau-Moleküle (Abb. 3.10).

Mit steigenden Kaliumazetatkonzentrationen war ebenfalls eine Zunahme des Diffusionskoeffizienten bei gleichzeitig abnehmender Interaktionszeit zu beobachten. Die ausführliche Untersuchung des Verhaltens von Tau unter Zugabe unterschiedlicher Kaliumazetatkonzentrationen (0 – 100 mM) wurde veröffentlicht (68) (siehe Abb. 3.10).

Die Ergebnisse zeigten einen Anstieg des mittleren Diffusionskoeffizienten (0 mM: $0,153 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,019$ Fit-Fehler, 100 mM: $0,336 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,062$ Fit-Fehler), und eine Abnahme der Interaktionszeit (0 mM: $19,12 \text{ s} \pm 0,86$, 100 mM: $5,89 \text{ s} \pm 3,82$, jeweils Fehler des exponentiellen Abfalls) und der Interaktionsdistanz (0 mM: $2,419 \mu\text{m} \pm 0,160$, 100 mM: $1,989 \mu\text{m} \pm 0,670$, kombinierte Fehler aus D und t) unter Erhöhung der Ionenstärke.

Der Anteil mobiler Tau-Moleküle in Prozent (0 mM: 53,5 % $\pm$ 1,1, 100 mM: 51,8 % $\pm$ 3,1, jeweils SD) blieb annähernd gleich (68).

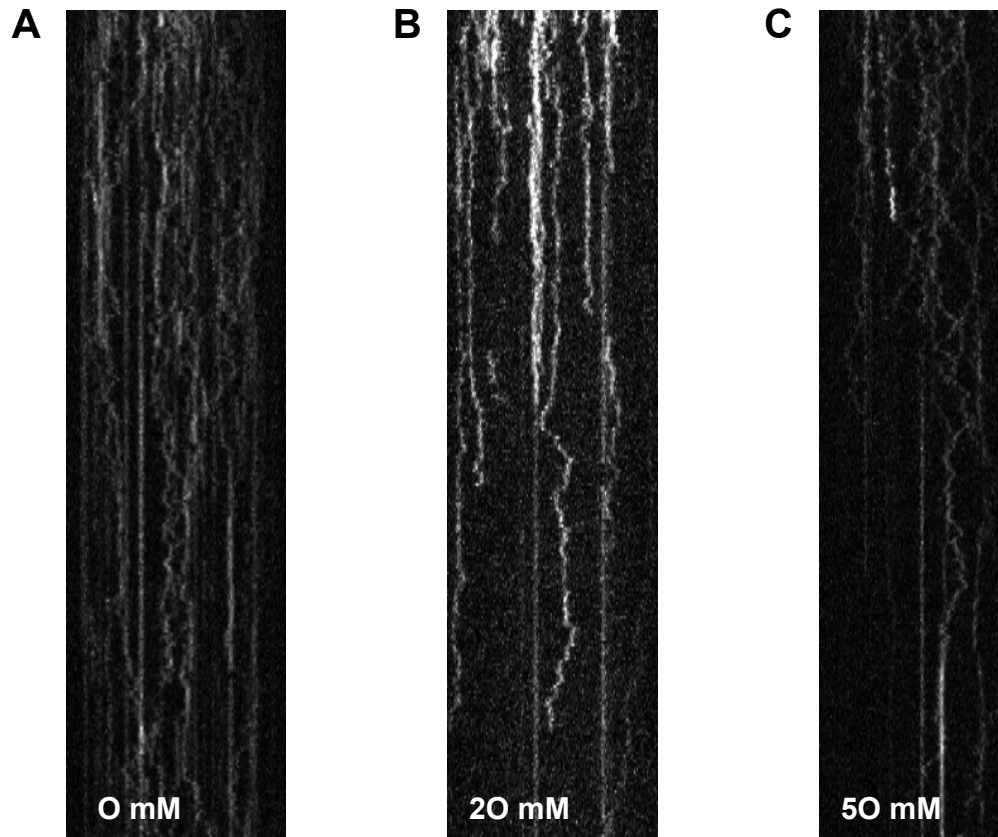


Abbildung 3.10 Einfluss der Ionenstärke auf die Tau-Mikrotubulus-Interaktion

A Bei 0 mM Kaliumazetat in Puffer BRB12 waren vorwiegend langsam diffundierende Tau-Moleküle mit längeren Interaktionszeiten zu beobachten. **B** Bei 20 mM Kaliumazetat in Puffer BRB12 nahm die Anzahl an Tau-Molekülen und die Interaktionszeit ab, während der Diffusionskoeffizient zunahm. **C** In Anwesenheit von 50 mM Kaliumazetat in Puffer BRB12 konnten zunehmend weniger, dafür aber noch schneller diffundierende Tau-Moleküle mit kürzeren Interaktionszeiten beobachtet werden. In **A-C** wurden eine konstante Mikrotubuli-Konzentration von 50 nM und eine konstante hTau40-Konzentration von 80 pM verwendet. BRB12 wies eine Ionenstärke von 40 mM auf.

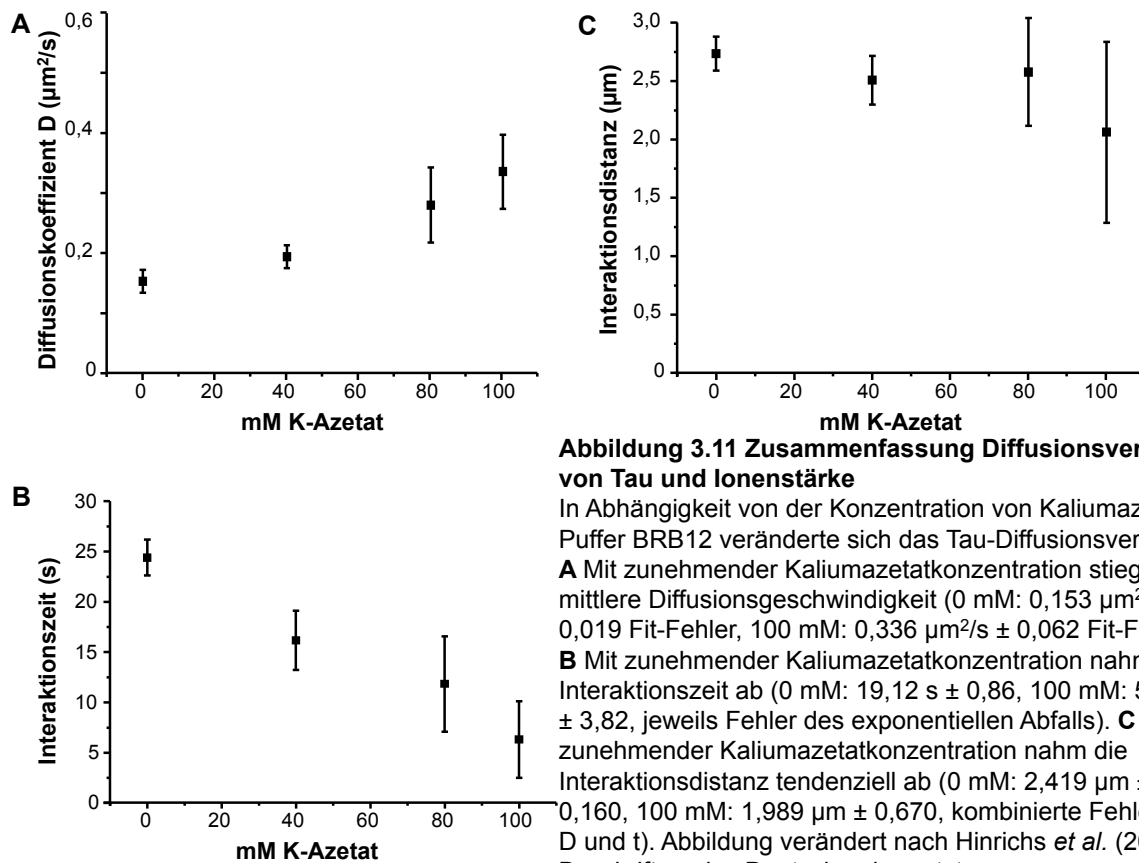


Abbildung 3.11 Zusammenfassung Diffusionsverhalten von Tau und Ionenstärke

In Abhängigkeit von der Konzentration von Kaliumazetat in Puffer BRB12 veränderte sich das Tau-Diffusionsverhalten.

A Mit zunehmender Kaliumazetatkonzentration stieg der mittlere Diffusionsgeschwindigkeit (0 mM: $0,153 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,019$ Fit-Fehler, 100 mM: $0,336 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,062$ Fit-Fehler).

B Mit zunehmender Kaliumazetatkonzentration nahm die Interaktionszeit ab (0 mM: $19,12 \text{ s} \pm 0,86$, 100 mM: $5,89 \text{ s} \pm 3,82$, jeweils Fehler des exponentiellen Abfalls).

C Mit zunehmender Kaliumazetatkonzentration nahm die Interaktionsdistanz tendenziell ab (0 mM: $2,419 \mu\text{m} \pm 0,160$, 100 mM: $1,989 \mu\text{m} \pm 0,670$, kombinierte Fehler aus D und t). Abbildung verändert nach Hinrichs *et al.* (2012), Beschriftung ins Deutsche übersetzt.

3.4.2 Gesamtanzahl Tau-Moleküle und Verhältnis mobil zu stationär

Neben den Diffusionseigenschaften einzelner Moleküle fanden als weitere objektive Vergleichsparameter die Gesamtanzahl und das Verhältnis von mobilen zu stationären Tau-Molekülen Berücksichtigung. Die Anzahl mobiler und stationärer Tau-Moleküle konnten aus den Kymographen bestimmt werden. Dazu wurden alle Tau-Moleküle auf einem Mikrotubulus ausgezählt und die Gesamtanzahl wie auch die Anzahl mobiler im Verhältnis zu stationären Tau-Molekülen statistisch erfasst und prozentual angegeben.

Die Mikrotubulus-Länge wurde anhand der entsprechenden Kymographenbreite ermittelt. Die Gesamtanzahl und die Anzahl stationärer und mobiler Tau-Moleküle wurden normiert pro μm Mikrotubulus-Länge angegeben.

Wie Abb. 3.12 zu entnehmen ist, wurde die Anzahl der registrierten Mikrotubuli (y-Achse) gegen die Anzahl der Tau-Moleküle pro μm Mikrotubulus aufgetragen. Nach der Überprüfung mit dem Shapiro-Wilk-Test lag eine Normalverteilung vor, so dass der Mittelwert gebildet werden konnte.

Die durchschnittliche Gesamtmenge von Tau belief sich auf GTP-Taxol-Mikrotubuli auf 0,45 Tau-Moleküle pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; n=134 Mikrotubuli). Mobil waren davon 0,19 Tau-Moleküle pro μm Mikrotubulus-Länge (SE 0,02; n=134), woraus sich ein prozentualer Anteil der mobilen Tau-Moleküle von 45 % und entsprechend ein prozentualer Anteil der stationären Tau-Moleküle von 55 % ergab (siehe Tab. 3.4).

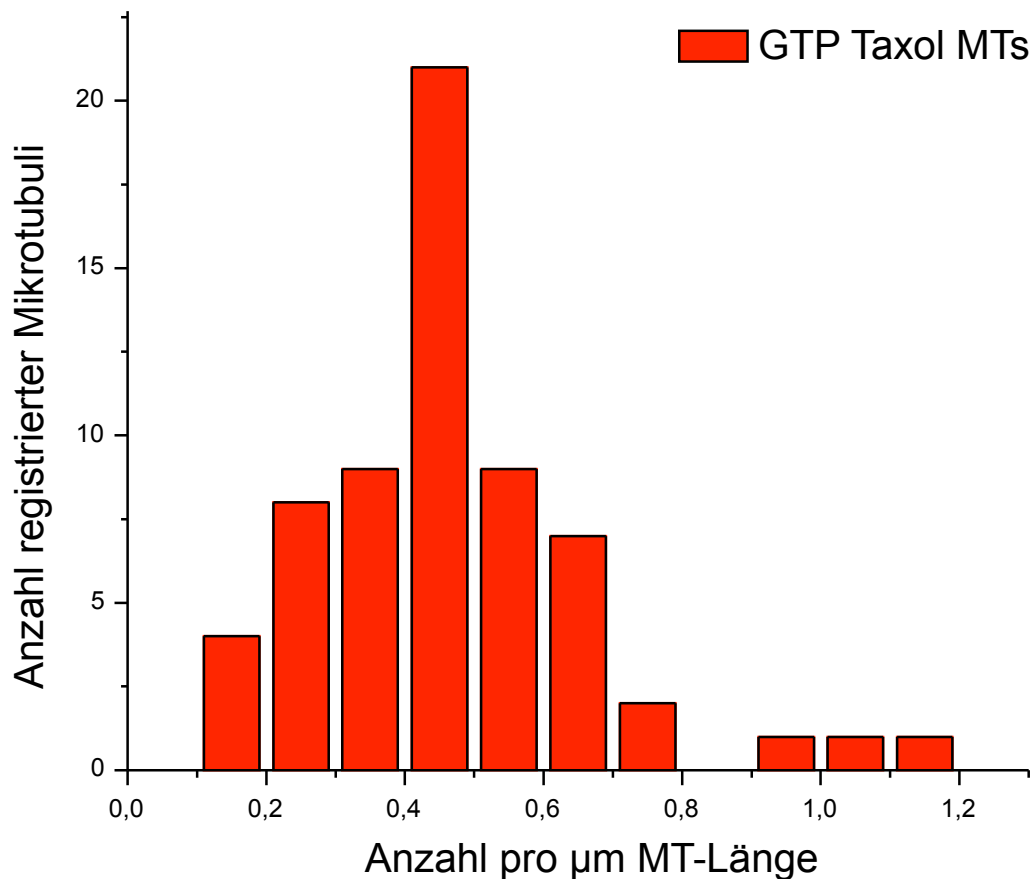


Abbildung 3.12 Gesamtanzahl Taumoleküle auf GTP-Taxol-Mikrotubuli

Die y-Achse (Anzahl) zeigt die Anzahl registrierter Mikrotubuli und die x-Achse die Gesamtanzahl an Tau pro μm Mikrotubulus-Länge. Der Shapiro-Wilk-Test zeigte eine Normalverteilung um einen Mittelwert von insgesamt 0,45 Tau-Molekülen pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; n=134)).

In den Messungen waren manche der beobachteten Tau-Moleküle nicht die gesamte Beobachtungszeit durchgängig mobil oder dauerhaft stationär. Die beobachteten mobilen und stationären Tau-Moleküle konnten ihren Zustand von mobil zu stationär oder von stationär zu mobil ändern (Abb. 3.13), allerdings nur mit einer sehr geringen Häufigkeit von 18 bzw. 20 Transitionen auf 1287 gezählte mobile und stationäre Tau-Moleküle innerhalb einer Aufnahmedauer von 60 Sekunden bzw. einer Rate der Transitionen von $0,015\text{ s}^{-1}$ (68).

Das legt nahe, dass Transitionen von mobil zu stationär und umgekehrt möglich sind, aufgrund ihrer Lebensdauer (Standzeit) in der beschränkten Beobachtungszeit von 60 s allerdings in der Regel nicht erfasst werden könnten (68).

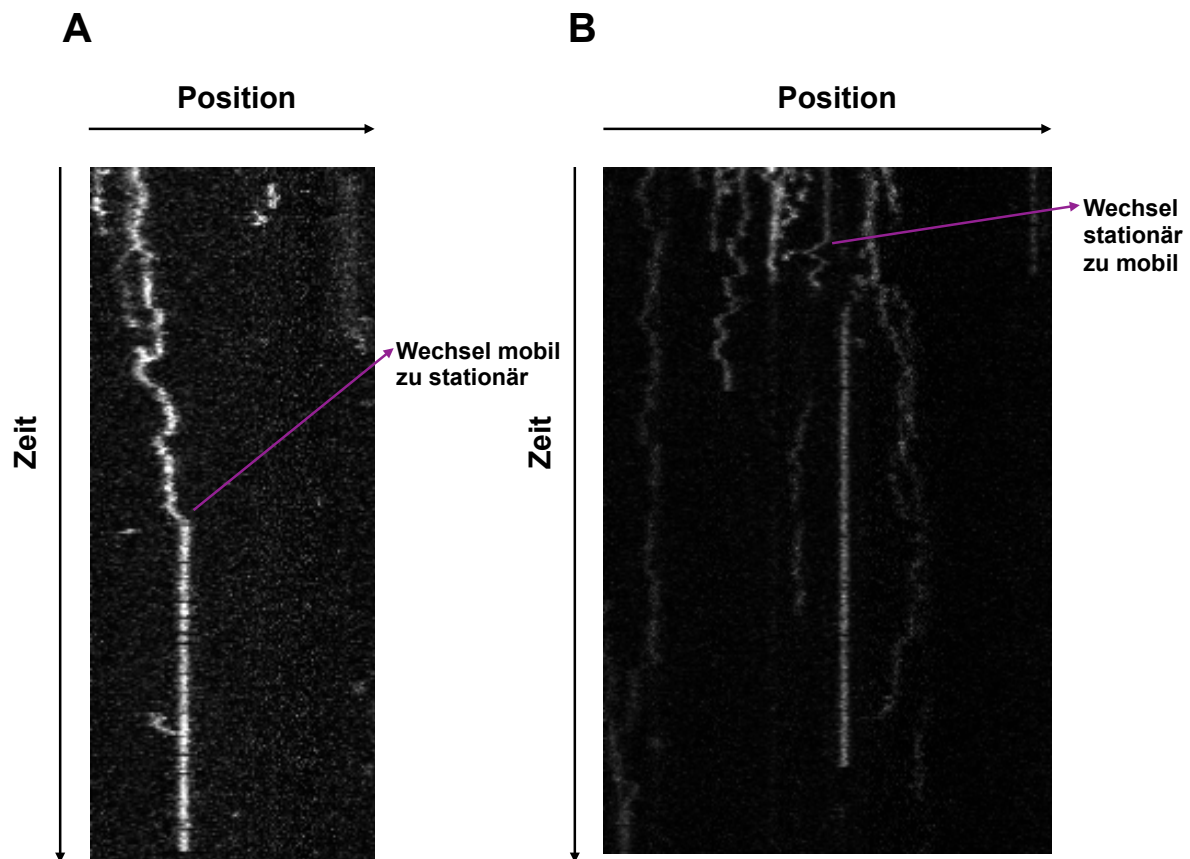


Abbildung 3.13 Transition zwischen mobilem und stationärem Verhalten von Tau

A Dieser Kymograph zeigt drei mobile Tau-Moleküle. Ein mobiles Tau-Molekül (lila Pfeil) ging vom mobilen Zustand in den stationären über. **B** Dieser Mikrotubulus wies acht mobile und vier stationäre Tau-Moleküle auf. Ein stationäres Tau-Molekül wechselte vom stationären in den mobilen Zustand.

3.5 Tau-Verhalten auf GMPCPP-Mikrotubuli im GTP-Zustand

Der Umstand, dass GTP-reiches Tubulin in Mikrotubuli vornehmlich im Axon vorzufinden ist und dass beispielsweise Motorproteine wie Kinesin-1/KIF5 sich dort selektiv anreichern (119) warf die Frage auf, ob und inwiefern der Nukleotidzustand des Tubulins der Mikrotubuli eine Rolle bei der Tau-Verteilung und –Diffusion spielt. Um den Einfluss des Nukleotids zu untersuchen wurde in dieser Arbeit das Verhalten von Tau einerseits auf GTP-Taxol-Mikrotubuli (repräsentieren den GDP-Zustand von Mikrotubuli) und andererseits auf GMPCPP-Mikrotubuli (repräsentieren den GTP-Zustand von Mikrotubuli) im TIRF-Mikroskop unter den gleichen Versuchsbedingungen bestimmt. Dabei wurden Diffusionskoeffizient, Interaktionszeit, Gesamtmenge Tau pro μm Mikrotubulus, prozentuales Verhältnis mobil zu stationär und Gesamtmenge mobile Tau-Moleküle pro μm Mikrotubulus verglichen.

3.5.1 Diffusionseigenschaften von Tau entlang von GMPCPP-Mikrotubuli

Zur Ermittlung des Diffusionskoeffizienten von hTau40 entlang von GMPCPP-stabilisierten Mikrotubuli wurden äquivalent zu GTP-Taxol-Mikrotubuli ausnahmslos alle Bewegungsläufe miteinbezogen, die während ihrer gesamten sichtbaren Diffusion auswertbar waren. Darunter fielen auch die, bei denen temporäre Überschneidungen mit anderen Molekülen vorlagen (Abb. 3.2 B). Um die Diffusion einzelner Tau-Moleküle trotz der temporären Überschneidungen zu ermitteln, wurde das tracking erst nach Beendigung der Überschneidung berücksichtigt. Bei der Interaktionszeit wurde die abgeschnittene Zeit wieder dazu gerechnet. Der Median des Diffusionskoeffizienten (Abb. 3.14, Abb. 3.18 A, Tab. 3.4) von hTau40 auf GMPCPP-Mikrotubuli belief sich auf $0,078 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 344$).

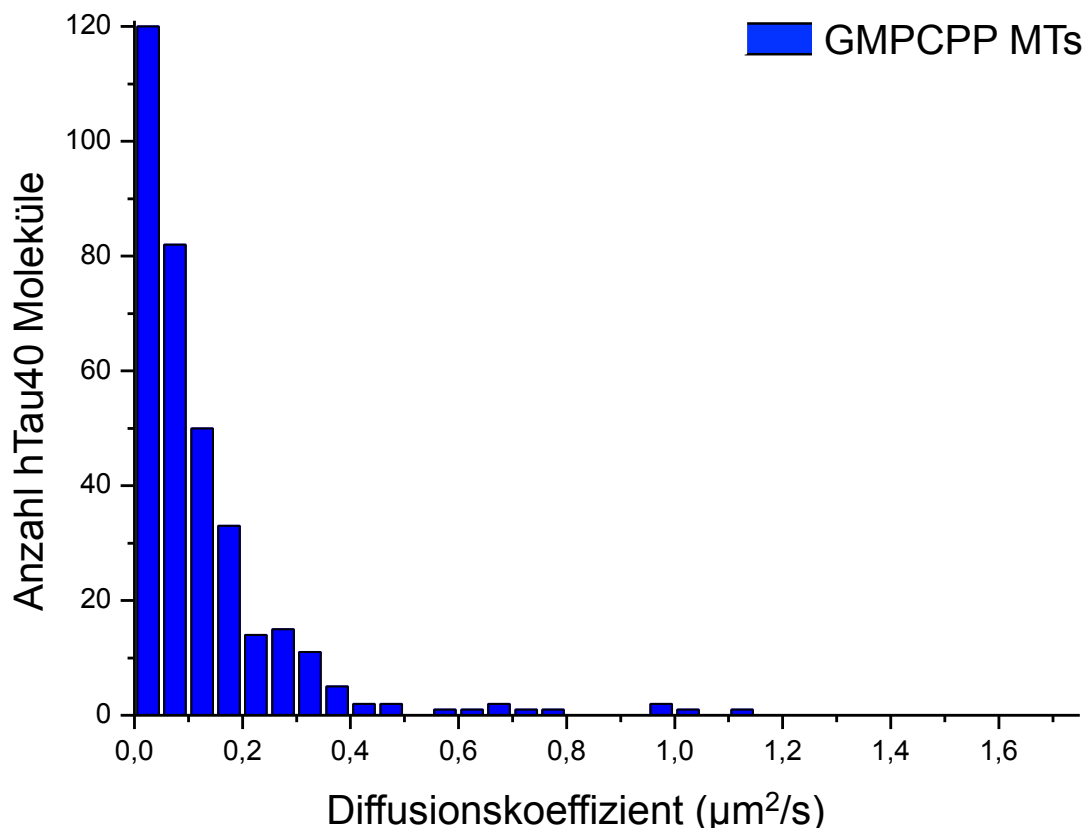


Abbildung 3.14 Verteilung der Diffusionskoeffizienten einzelner Tau-Moleküle entlang von GMPCPP-Mikrotubuli

Anzahl der hTau40-Moleküle (y-Achse) gegen die ermittelten Diffusionskoeffizienten (x-Achse) aufgetragen. Der Median (Abb. 3.18 A) betrug $0,078 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Tab. 3.4).

Die durchschnittliche Interaktionszeit ergab sich aus ausschließlich vollständig, das heißt von Beginn bis Ende der Kolo-kalisation auf den Kymographen abgebildeten Bewegungsläufen. Wie bei GTP-Taxol-Mikrotubuli musste auch eine Korrektur der gemessenen Interaktionszeit von 10,9 s (Abb. 3.15) um den Bleichfaktor vorgenommen werden, wodurch sich eine Dissoziationskonstante für Tau auf GMPCPP-Mikrotubuli von 12,7 s ($\pm 1,81$ s) ergab (Tab. 3.2, Tab. 3.4).

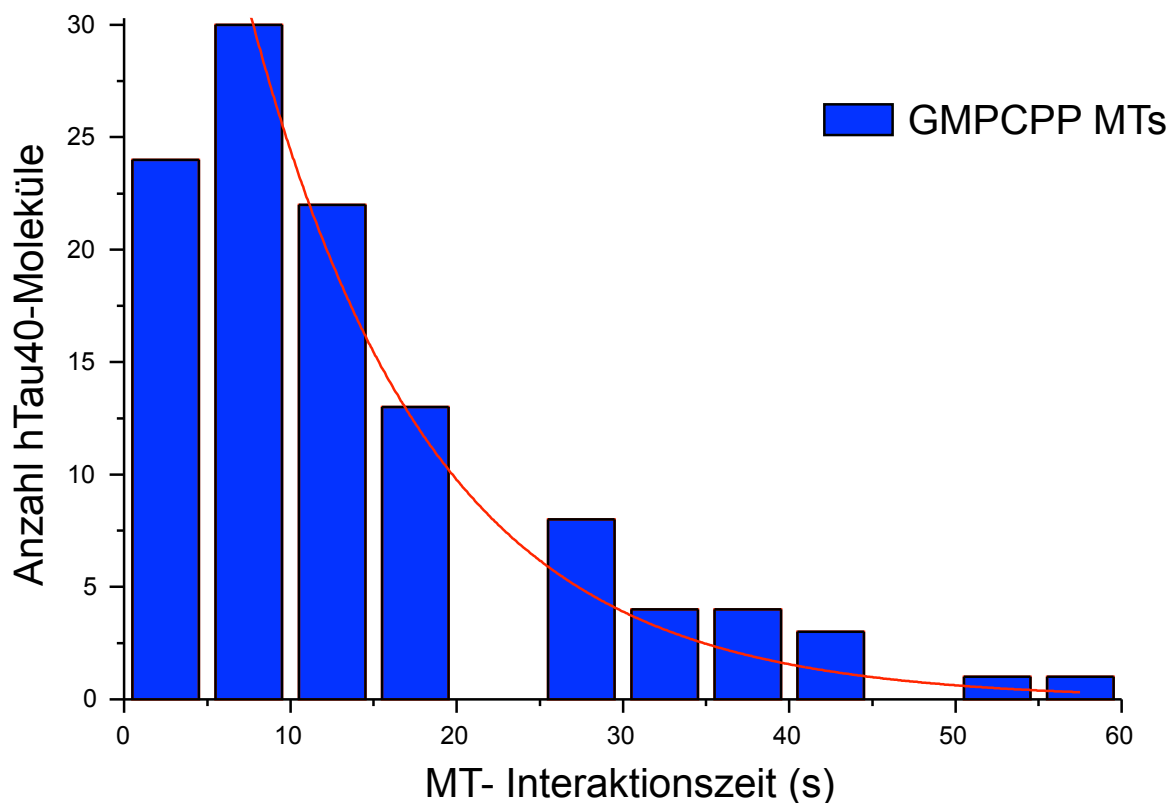


Abbildung 3.15 Interaktionszeit hTau40 mit GMPCPP-Mikrotubuli

Anzahl der hTau40-Moleküle (y-Achse) gegen die ermittelten Interaktionszeiten (x-Achse) aufgetragen (n=134). Die rote Linie entspricht dem Fit einer exponentiellen Abnahme erster Ordnung mit der Abklingkonstante von 10,9 s.

Tabelle 3.2 Übersicht der Abklingkonstanten der hTau40-Proteine auf GMPCPP-Mikrotubuli mit und ohne Korrektur mit dem Bleichfaktor:

	Gemessene Abklingkonstante in s	Fitfehler	Bleichabklingkonstante TMR in s	Fitfehler	Korrigierte Dissoziationskonstante in s	Fitfehler
hTau40-Moleküle auf GMPCPP-Mikrotubuli	10,9	1,77	78,3	25,7	12,7	1,81

Entlang von GMPCPP-Mikrotubuli wurde eine Interaktionsdistanz von 1402 ± 179 nm) aus dem Median des Diffusionskoeffizienten und der bleich-korrigierten Interaktionszeit berechnet (Abb. 3.16, Tab. 3.4).

Der an den unkorrigierten Interaktionsdistanzen angelegte Gaussfit ergab eine gemessene Interaktionsdistanz von $1634 \text{ nm} \pm 54 \text{ nm}$ (Abb. 3.9 rote Kurve)

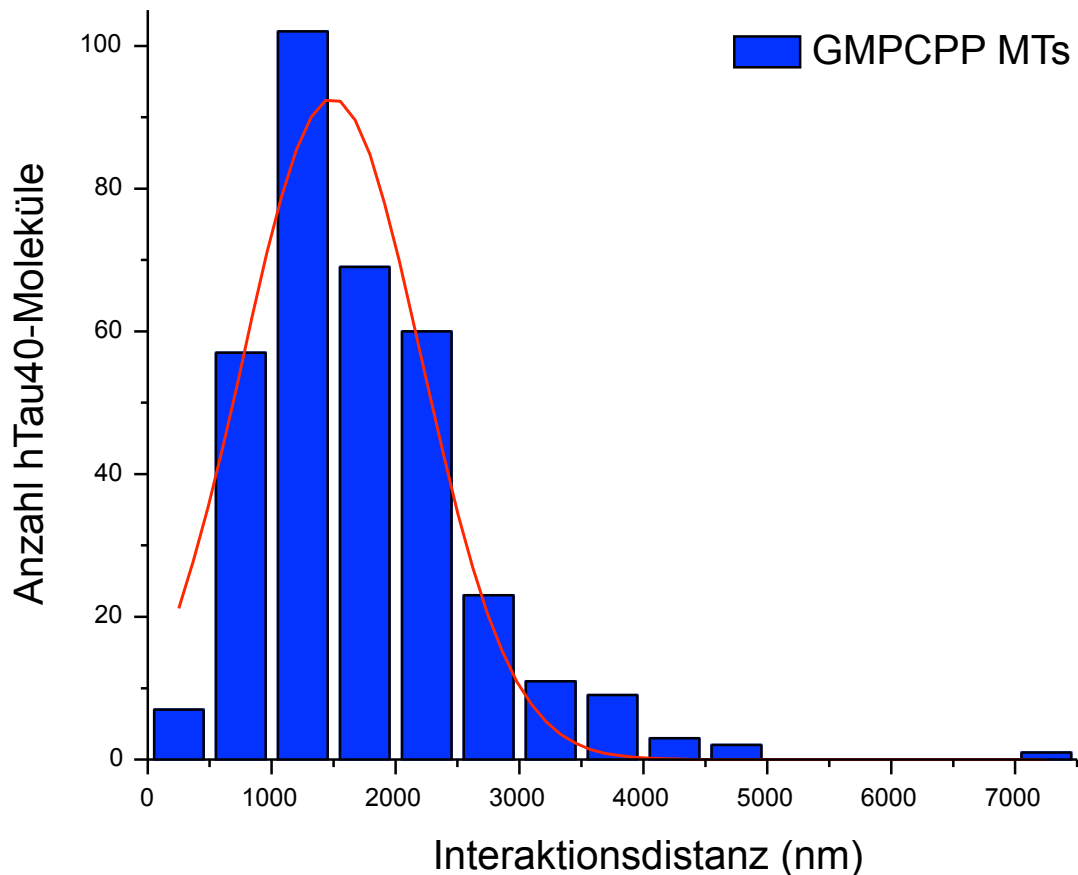


Abbildung 3.16 Verteilung Interaktionsdistanz einzelner Tau-Moleküle auf GMPCPP-Mikrotubuli

Die Mikrotubulus-Länge, die mit einzelnen diffundierenden Tau-Molekülen abgetastet wurde, berechnete sich aus dem Median des Diffusionskoeffizienten und der bleich-korrigierten Diffusionsdauer. Der berechnete Wert von $1402 \text{ nm} (\pm 179 \text{ nm})$ stimmte gut mit dem an die gemessenen, unkorrigierten Interaktionsdistanzen (blaue Säulen) angelegten Gaussfit (rote Kurve) von $1489 \text{ nm} (\pm 60 \text{ nm})$ überein.

3.5.2 Gesamtanzahl Tau-Moleküle und Verhältnis mobil zu stationär auf GMPCPP-Mikrotubuli

Wie Abb. 3.17 zu entnehmen ist, wurde die Anzahl der jeweiligen Mikrotubuli (y-Achse) gegen die Anzahl der Tau-Moleküle pro μm Mikrotubulus aufgetragen. Nach der Überprüfung mit dem Shapiro-Wilk-Test lag eine Normalverteilung vor. Die durchschnittliche Gesamtmenge von Tau (Abb. 3.17, Tab. 3.4) belief sich bei GMPCPP-Mikrotubuli auf 0,54 Tau-Moleküle pro μm Mikrotubulus ($\text{SE} \pm 0,03$; $n=344$). Mobil waren davon 0,34 Tau-Moleküle pro μm Mikrotubulus-Länge ($\text{SE} \pm 0,03$; $n=344$), woraus sich ein prozentualer Anteil mobiler Tau-Moleküle von 61 % ergab.

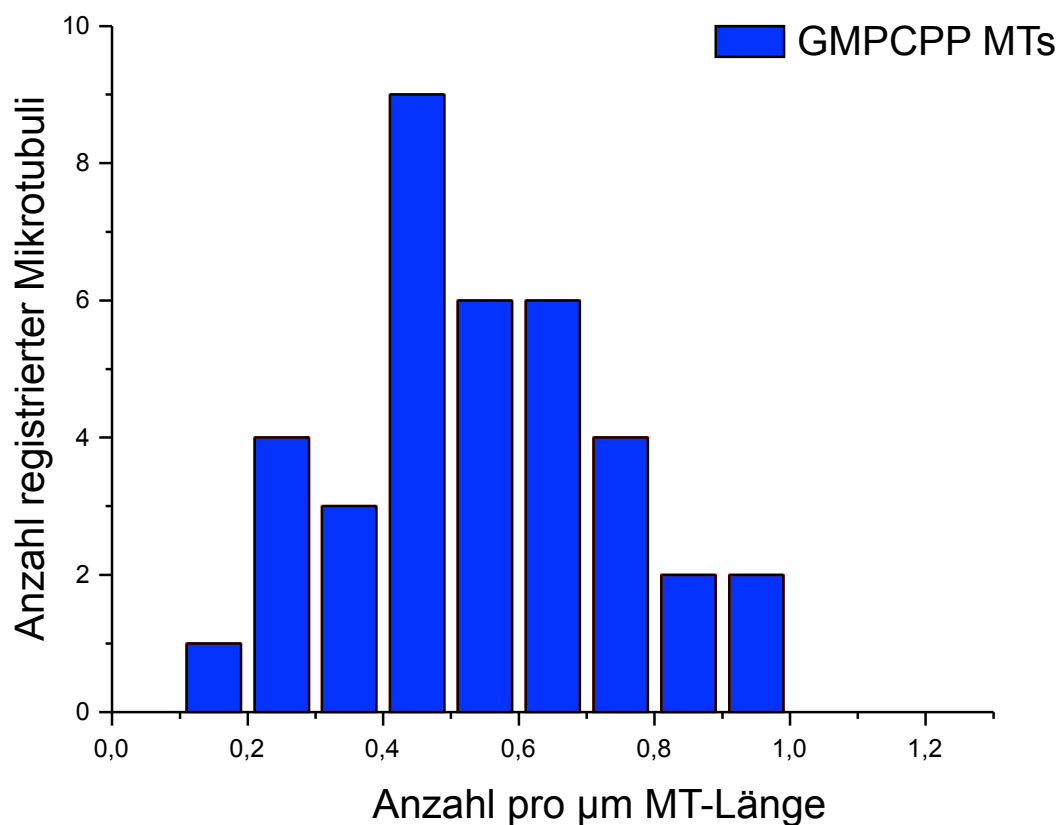


Abbildung 3.17 Gesamtanzahl Tau auf GMPCPP-Mikrotubuli

Die y-Achse zeigt die Anzahl der registrierten Mikrotubuli und die x-Achse die Anzahl an Tau pro μm Mikrotubulus-Länge. Der Shapiro-Wilk-Test zeigte eine Normalverteilung um einen Mittelwert von 0,54 Tau-Molekülen pro μm Mikrotubulus ($\text{SE} \pm 0,03$; $n=344$).

3.6 Einfluss des Stabilisierungs-Agens Taxol auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion

3.6.1 Vergleich der Diffusionseigenschaften von Tau entlang von GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli in Abhängigkeit unterschiedlicher Taxol-Konzentrationen

Abb. 3.18 A zeigt den Vergleich der Mediane der Diffusionskoeffizienten von hTau40 entlang von GTP-Taxol-stabilisierten und von GMPCPP-Mikrotubuli. Der Median des Diffusionskoeffizienten von hTau40 entlang von GTP-Taxol-stabilisierten Mikrotubuli lag mit $0,104 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 134$) höher als der Median des Diffusionskoeffizienten von hTau40 entlang von GMPCPP-Mikrotubuli mit $0,078 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 344$).

Die in der Literatur oftmals miteinander verglichenen GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli wiesen damit einen signifikant unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten auf (U-Test: $p < 0,01$). Mit GTP polymerisierte Mikrotubuli sind in einer Verdünnung ganz ohne Taxol nicht stabil. Um eine Beeinflussung durch Unterschiede in der Taxol-Stabilisierung auszuschließen und um den reinen Nukleotideinfluss des jeweiligen Mikrotubulus zu untersuchen, wurden sowohl GTP- als auch GMPCPP-Mikrotubuli eine gleiche Menge an Taxol zugesetzt. Die zur GDP-Stabilisierung notwendige Taxol-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Taxol wurde auf $1 \mu\text{M}$ reduziert, um sicherzustellen, dass initial beobachtete Unterschiede in den Diffusionskoeffizienten von Tau-Molekülen auf GTP- und GMPCPP-Mikrotubuli nicht durch zu hohe Konzentrationen an dem in der Literatur gelegentlich kritisch diskutierten Mikrotubuli-Stabilisierungsagens Taxol maskiert wurden.

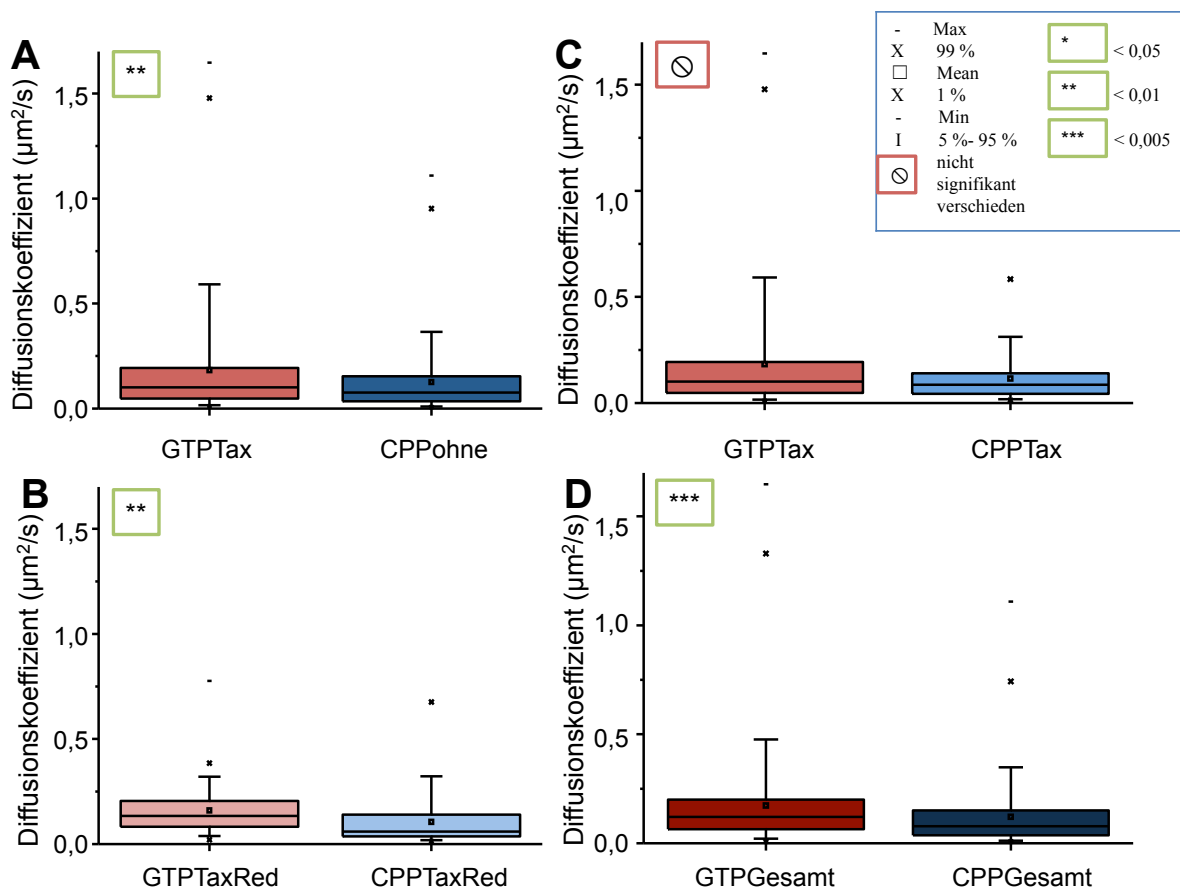
In Anwesenheit einer reduzierten Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Taxol war der Median des Diffusionskoeffizienten von Tau entlang von GTP-Mikrotubuli mit $0,134 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 102$) erneut signifikant höher als der von hTau40 entlang von GMPCPP-Mikrotubuli mit $0,06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 72$) (U-Test: $p < 0,01$).

Beim Vergleich der Diffusionskoeffizienten von hTau40 entlang von GTP-Mikrotubuli und GMPCPP-Mikrotubuli in Anwesenheit der ursprünglich zur Stabilisierung von GTP-Mikrotubuli verwendeten Taxol-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ wurde ein Diffusionskoeffizient von $0,104 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=134$) von hTau40 entlang GTP-Mikrotubuli und ein Diffusionskoeffizient von $0,09 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=85$) von hTau40 entlang GMPCPP-Mikrotubuli festgestellt (Abb. 3.18 C).

Der Unterschied mit einem immer noch leicht reduzierten Diffusionskoeffizienten auf GMPCPP-Mikrotubuli war nicht mehr signifikant (U-Test: $p = 0,12$).

Nach dem Zusammenfassen von GTP-Taxol- und GTP-Taxol-reduzierten Mikrotubuli zu GTP-Gesamt und von GMPCPP-, GMPCPP-Taxol-reduzierten und GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli zu GMPCPP-Gesamt wurde der Diffusionskoeffizient von hTau40 beider Gruppen gegenübergestellt.

Der Diffusionskoeffizient von Tau entlang von GTP-Gesamt-Mikrotubuli lag mit $0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=237$) höher als der Diffusionskoeffizient entlang von GMPCPP-Gesamt-Mikrotubuli mit $0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=501$). Der Unterschied war signifikant (U-Test: $p < 0,002$) (Abb. 3.18).



3.18 A-D Vergleich der Diffusionskoeffizienten (Mediane) von Tau entlang von GTP- und GMPCPP-Mikrotubuli in Anwesenheit unterschiedlicher Taxol-Konzentrationen Im Box-Whisker-Plot ist der Median als Querstrich dargestellt. Die Endpunkte der Whisker (Antennen) umfassen den Bereich des Diffusionskoeffizienten von 5%-95% der hTau40-Moleküle entlang von GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli in Abhängigkeit unterschiedlicher Taxol-Konzentrationen. Unterhalb des Quartils, welches durch das Kreuz symbolisiert wird, liegen 99% der gemessenen Werte und oberhalb 1 %. In Form des Kästchens ist der arithmetische Durchschnitt (Mean) dargestellt. Je weiter Mean und Median auseinanderliegen, umso größer ist die Streuung der Werte des Diffusionskoeffizienten. Die p-values sind als rote und grüne Kästchen dargestellt. Rot steht für einen nicht signifikanten Unterschied und grün für einen signifikanten Unterschied, wobei ein Sternchen eine p-value < 0,05, zwei Sternchen eine p-value < 0,01 und drei Sternchen eine p-value < 0,005 bedeuten. **A** Der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GTP-Taxol (10 μM)-stabilisierten-Mikrotubuli lag mit $0,104 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 134$) signifikant höher als der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GMPCPP-Mikrotubuli mit $0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 344$) (U-Test: $p < 0,01$). **B** Der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GTP-Taxol (1 μM)-reduzierten Mikrotubuli lag mit $0,134 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 102$) signifikant höher als der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli mit $0,06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 72$) (U-Test: $p < 0,01$). **C** Der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli lag mit $0,104 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=134$) nur leicht höher als der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli mit $0,09 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=85$). In Anwesenheit von 10 μM Taxol war der Unterschied nicht signifikant (U-Test: $p = 0,12$). **D** Der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang der GTP-Gesamt-Mikrotubuli war im Vergleich der zu GMPCPP-Gesamt-Mikrotubuli signifikant höher (U-Test: $p = 0,002$).

Innerhalb einer Nukleotidreihe erhöhte sich der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GTP-Taxol-stabilisierten Mikrotubuli bei Reduktion der Taxolmenge von 10 auf 1 μM signifikant (U-Test: $p < 0,05$). Der Diffusionskoeffizient von hTau40 auf GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli lag mit $0,134 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=102$) höher als auf GTP-Taxol-stabilisierten-Mikrotubuli wie oben dargestellt mit $0,104 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=134$) (Abb. 3.19).

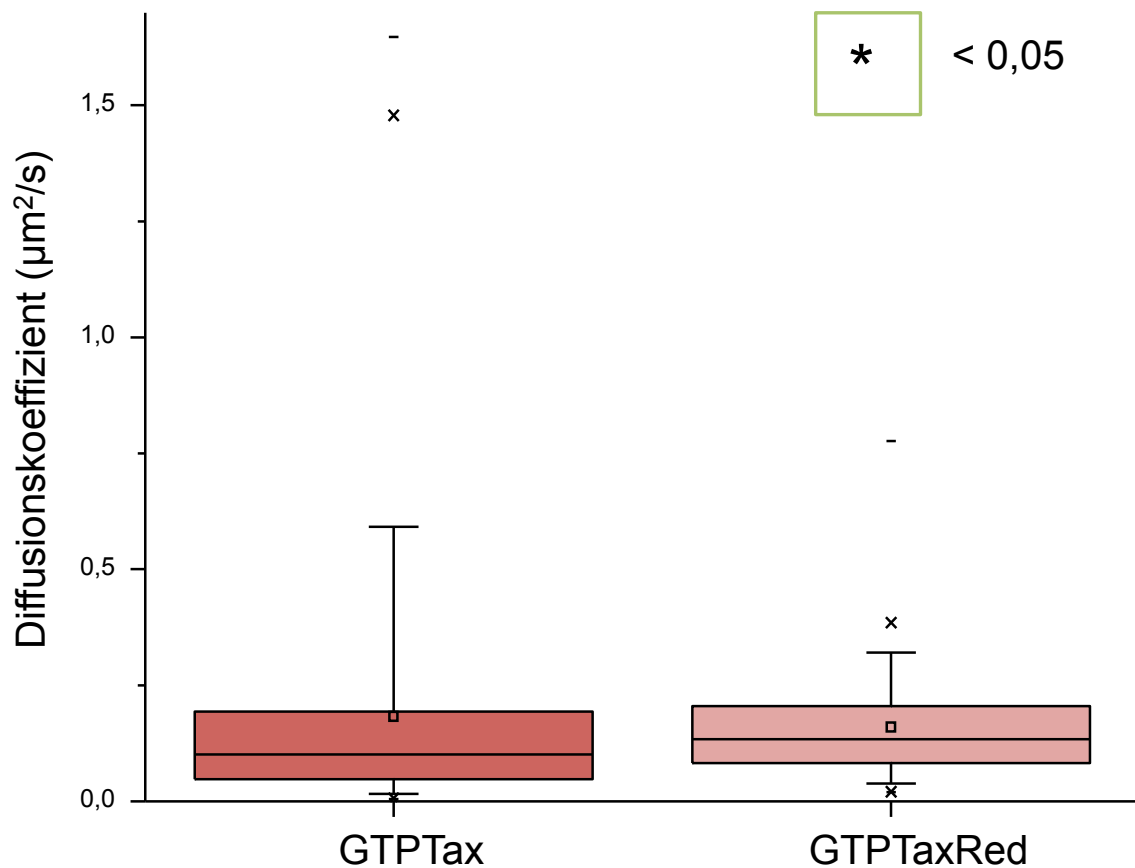


Abbildung 3.19 Vergleich der Diffusionskoeffizienten (Median) von hTau40 auf GTP-Taxol-reduzierten- und GTP-Taxol-Mikrotubuli

Der Diffusionskoeffizient von Tau entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli war mit $0,104 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=134$) signifikant niedriger als der Diffusionskoeffizienten von Tau entlang von GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli mit $0,134 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=102$) (U-Test: $p < 0,05$).

Der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GMPCPP-Mikrotubuli ohne Taxol wick mit $0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=344$) nicht signifikant von dem Diffusionskoeffizienten von hTau40 entlang von GMPCPP in Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ Taxol und $0,06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=72$) ab (U-Test: $p = 0,59$). Auch beim Vergleich des Diffusionskoeffizienten von hTau40 entlang von GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli mit $1 \mu\text{M}$ Taxol und einem Wert von $0,06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=72$) und GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ und einem Wert von $0,09 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n=85$) bestanden keine signifikanten Unterschiede (U-Test: $p=0,346$). Ebenfalls war zwischen GMPCPP ohne Taxol ($0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$) und GMPCPP mit $10 \mu\text{M}$ Taxol kein signifikanter Unterschied vorhanden ($0,09 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (U-Test: $p = 0,54$).

Im Gegensatz zu mit GTP polymerisierten Mikrotubuli waren innerhalb der GMPCPP-Nukleotidreihe demnach keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Diffusionskoeffizienten von hTau40 auf GMPCPP-Mikrotubuli ohne Taxol, mit reduzierter (1 μM) und mit nicht-reduzierter Taxol-Menge (10 μM) zu verzeichnen.

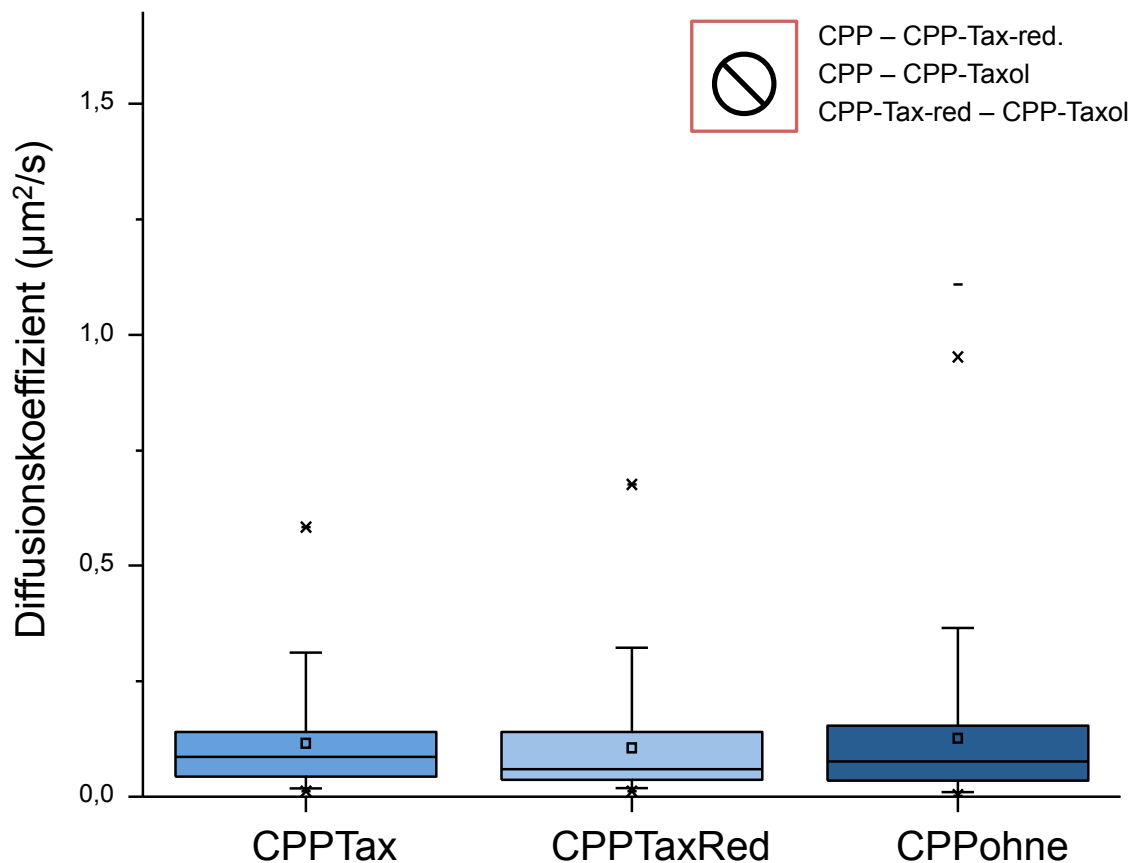


Abb. 3.20 Vergleich der Diffusionskoeffizienten (Median) von hTau40 entlang von GMPCPP-, GMPCPP-Taxol-reduzierten- und GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli

Die Diffusionskoeffizienten von hTau40 entlang von GMPCPP-Mikrotubuli mit 10 μM Taxol und der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GMPCPP-Mikrotubuli mit 10 μM waren nicht signifikant verschieden (U-Test: $p = 0,35$). Der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GMPCPP-Mikrotubuli ohne Taxol wich nicht signifikant von dem Diffusionskoeffizienten von hTau40 entlang von GMPCPP-Mikrotubuli mit 1 μM (U-Test: $p = 0,59$) ab. Der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GMPCPP-Mikrotubuli ohne Taxol und der Diffusionskoeffizient von hTau40 entlang von GMPCPP-Mikrotubuli mit 10 μM Taxol unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,54$) voneinander.

Die Interaktionszeit von hTau40 auf GTP-Taxol-Mikrotubuli lag bei 12,2 s ($\pm 1,06$) und auf GMPCPP-Mikrotubuli bei 10,9 s ($\pm 1,77$). Nach Korrektur des Fluorophor-Bleichens belief sich die korrigierte Dissoziationskonstante auf GTP-Taxol-Mikrotubuli auf 14,5 s ($\pm 1,11$) und auf GMPCPP-Mikrotubuli bei 12,7 s ($\pm 1,81$).

Alle Dissoziationskonstanten wurden um den Bleichfaktor korrigiert (Tab. 3.1 und 3.2) und miteinander verglichen. In Anwesenheit einer reduzierten Taxol-Konzentration von 1 μM war die Interaktionszeit von hTau40 auf GTP-Mikrotubuli mit 19,4 s ($\pm 2,41$ s, n = 102) niedriger als die Interaktionszeit von hTau40 auf GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli mit 44,8 s ($\pm 11,23$ s, n = 72).

Beim Vergleich der Interaktionszeiten in Anwesenheit von 10 μM Taxol wurde ein Wert von 14,5 s ($\pm 1,11$ s) von hTau40 entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli und ein demgegenüber erhöhter Wert von 33,5 s ($\pm 4,76$ s) entlang von GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli festgestellt. Innerhalb der GDP-Nukleotidreihe zeigte sich für GTP-Taxol-Mikrotubuli nach Reduktion der Taxol-Konzentration ein Anstieg in der Dissoziationskonstante von 14,5 s ($\pm 1,11$ s) auf 19,4 s ($\pm 2,41$ s) (Tab. 3.1 und 3.3).

Auf mit GMPCPP polymerisierten Mikrotubuli erhöhte sich in Anwesenheit von Taxol die Interaktionszeiten von 12,7 s ($\pm 1,81$) auf 44,8 s ($\pm 11,23$ s) auf GMPCPP-Taxol-reduzierten Mikrotubuli (1 μM Taxol) und auf 33,5 s ($\pm 4,76$ s) auf GMPCPP-Taxol Mikrotubuli (10 μM Taxol) (Tab. 3.2 und 3.3).

Tabelle 3.3 Übersicht Abklingkonstanten der hTau40-Moleküle auf GTP-Taxol-reduzierten-, GMPCPP-Taxol-reduzierten und GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli vor und nach der Korrektur mit dem Bleichfaktor:

	Gemessene Abklingkonstante in s	Fitfehler	Bleichabklingkonstante TMR in s	Fitfehler	Korrigierte Dissoziationskonstante in s	Fitfehler
hTau40-Moleküle auf GTP-Taxol-reduzierten Mikrotubuli	15,6	2,34	78,3	25,7	19,4	2,41
hTau40-Moleküle auf GMPCPP-Taxol-red.-Mikrotubuli	28,5	9,82	78,3	25,7	44,8	11,23
hTau40-Moleküle auf GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli	23,5	4,49	78,3	25,7	33,5	4,76

Die Mikrotubulus-Länge, mit der einzelne diffundierende Tau-Moleküle interagierten, wurde entweder aus dem zuvor bestimmten Median der Diffusionskoeffizienten und der um den Bleichfaktor korrigierten Diffusionsdauer berechnet oder direkt gemessen. Die berechneten Werte der Interaktionsdistanzen von Tau entlang von GTP-Taxol-reduzierten-, GMPCPP-Taxol-reduzierten- und GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli stimmten nicht mit dem an die gemessenen, unkorrigierten Interaktionsdistanzen angelegten Gaussfit überein (Abb. 3.22, Tab. 3.4).

Die Tau-Mikrotubuli-Interaktionsdistanzen bei Tau-Diffusion entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli (errechnet: 1734 nm ($\pm$ 245 nm), direkt gemessen: 1634 nm ($\pm$ 54 nm)) waren wie unter 3.4 beschrieben sowohl gemessen als auch errechnet größer als entlang von GMPCPP-Mikrotubuli (errechnet: 1402 nm ($\pm$ 179 nm), direkt gemessen: 1489 nm ($\pm$ 60 nm))

Die Interaktionsdistanz von hTau40 entlang von GTP- und GMPCPP-Mikrotubuli in Anwesenheit 1 μM Taxol belief sich auf GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli auf einen errechneten Wert von 2283 nm (± 135 nm) und einen direkt gemessenen Wert von 1713 nm (± 45 nm), und auf GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli auf einen errechneten Wert von 2312 nm (± 336 nm) und einen direkt gemessenen Wert von 1195 nm (± 55 nm) (Abb. 3.21 und 3.22).

Beim Vergleich der Interaktionsdistanzen von hTau40 entlang von GTP-Mikrotubuli und GMPCPP-Mikrotubuli in Anwesenheit von 10 μM Taxol wurde ein errechneter Wert von 1734 nm (± 245 nm) und ein direkt gemessener Wert von 1634 nm (± 54 nm) von hTau40 entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli und ein errechneter Wert von 2407 nm (± 193 nm) und ein direkt gemessener Wert von 1533 nm (± 149 nm) (Abb. 3.21 und 3.22) entlang von GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli festgestellt (Abb. 3.9 und 3.23).

Innerhalb der GTP-Nukleotidreihe erhöhte sich bei Reduktion der Taxol-Konzentration von 10 auf 1 μM die berechnete Interaktionsdistanz von Tau entlang von GTP-Taxol-reduzierten Mikrotubuli von 1734 nm (± 245 nm) auf 2283 nm (± 135 nm), während die direkt gemessene mit 1634 nm (± 54 nm) und 1713 nm (± 45 nm) kaum Unterschiede zeigte (Abb. 3.21, Tab. 3.4).

Innerhalb der GMPCPP-Nukleotidreihe lag nach Zugabe von 1 μM Taxol gegenüber Taxol-freien GMPCPP-Mikrotubuli eine Zunahme des errechneten Wertes von 1402 nm (± 179 nm) auf 2312 nm (± 336 nm) vor. Der direkt gemessene Wert zeigte hingegen nach Taxol-Zugabe eine Abnahme des Wertes von 1489 nm (± 60 nm) auf 1195 nm (± 55 nm). Die Zugabe einer Taxolkonzentration von 10 μM führte gegenüber Taxol-freien GMPCPP-Mikrotubuli im errechneten Wert ebenfalls zu einer Zunahme von 1402 nm (± 179 nm) auf 2407 nm (± 193 nm), während der Unterschied im direkt gemessenen Wert mit 1489 nm (± 60 nm) und 1533 nm (± 149 nm) kaum vorhanden war (Abb. 3.23, Tab. 3.4).

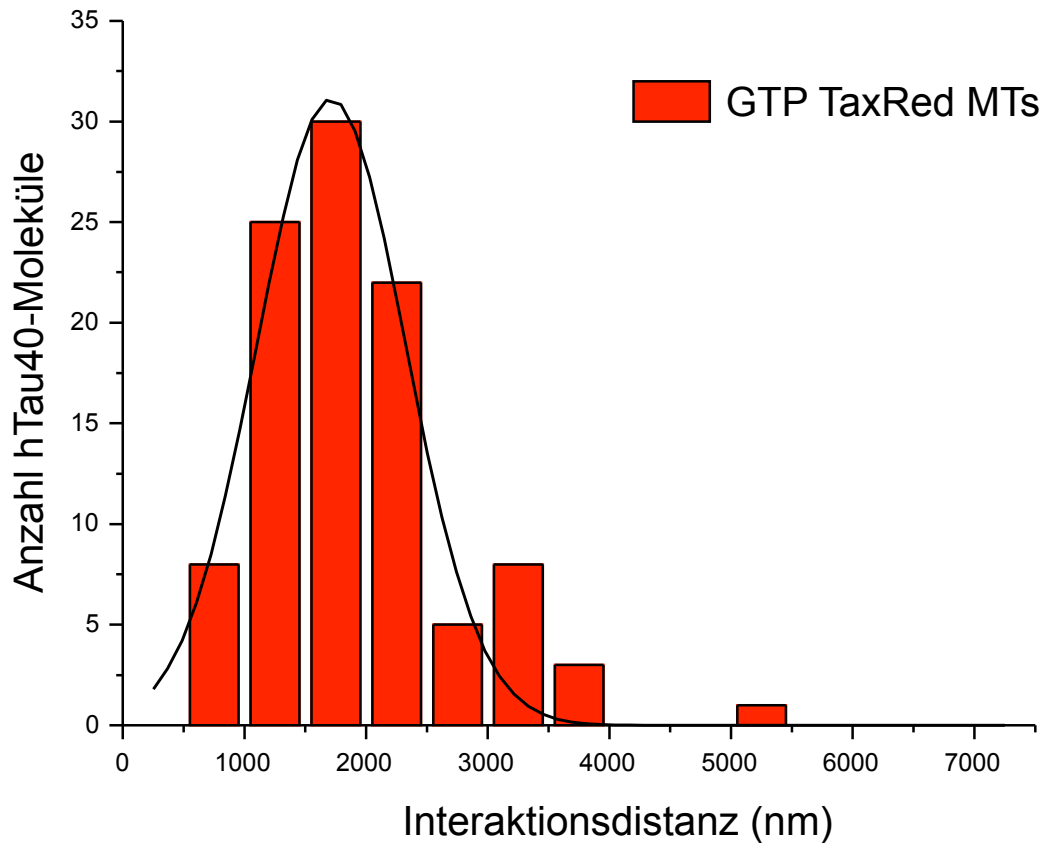


Abb. 3.21 Verteilung zurückgelegter Entfernungen einzelner Tau-Moleküle auf GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli

Die Mikrotubulus-Länge, mit der einzelne diffundierende Tau-Moleküle interagierten, berechnete sich aus dem zuvor bestimmten Median der Diffusionskoeffizienten und der um den Bleichfaktor korrigierten Diffusionsdauer. Der berechnete Wert von 2283 nm (± 135 nm) wich von dem an die gemessenen, unkorrigierten Interaktionsdistanzen (rote Säulen) angelegten Gaussfit (1713 nm ± 45 nm, rote Kurve) ab.

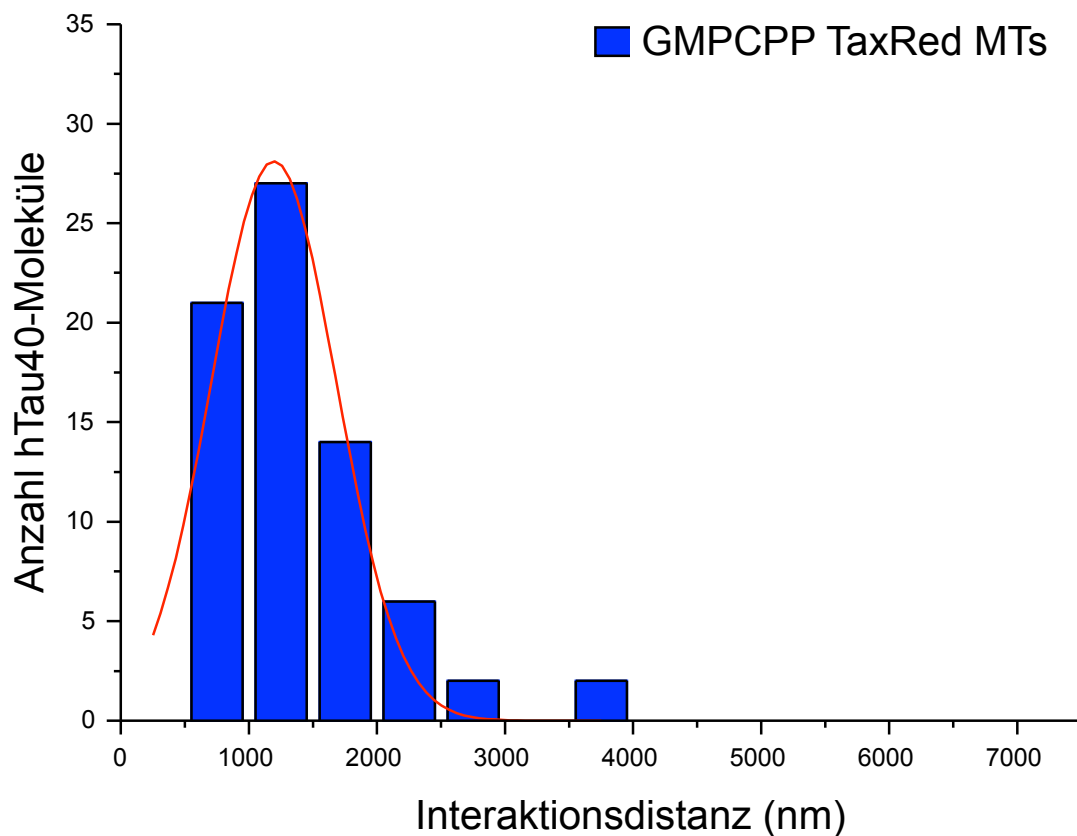


Abb. 3.22 Verteilung zurückgelegter Entfernungen einzelner Tau-Moleküle auf GMPCPP-Taxol-reduzierte-Mikrotubuli

Die Mikrotubulus-Länge, mit der einzelne diffundierende Tau-Moleküle interagierten, berechnete sich aus dem zuvor bestimmten Median der Diffusionskoeffizienten und der um den Bleichfaktor korrigierten Diffusionsdauer. Der berechnete Wert von 2312 nm (± 336 nm) wich von dem an die gemessenen, unkorrigierten Interaktionsdistanzen (blaue Säulen) angelegten Gaussfit (1195 nm ± 55 nm, rote Kurve) ab.

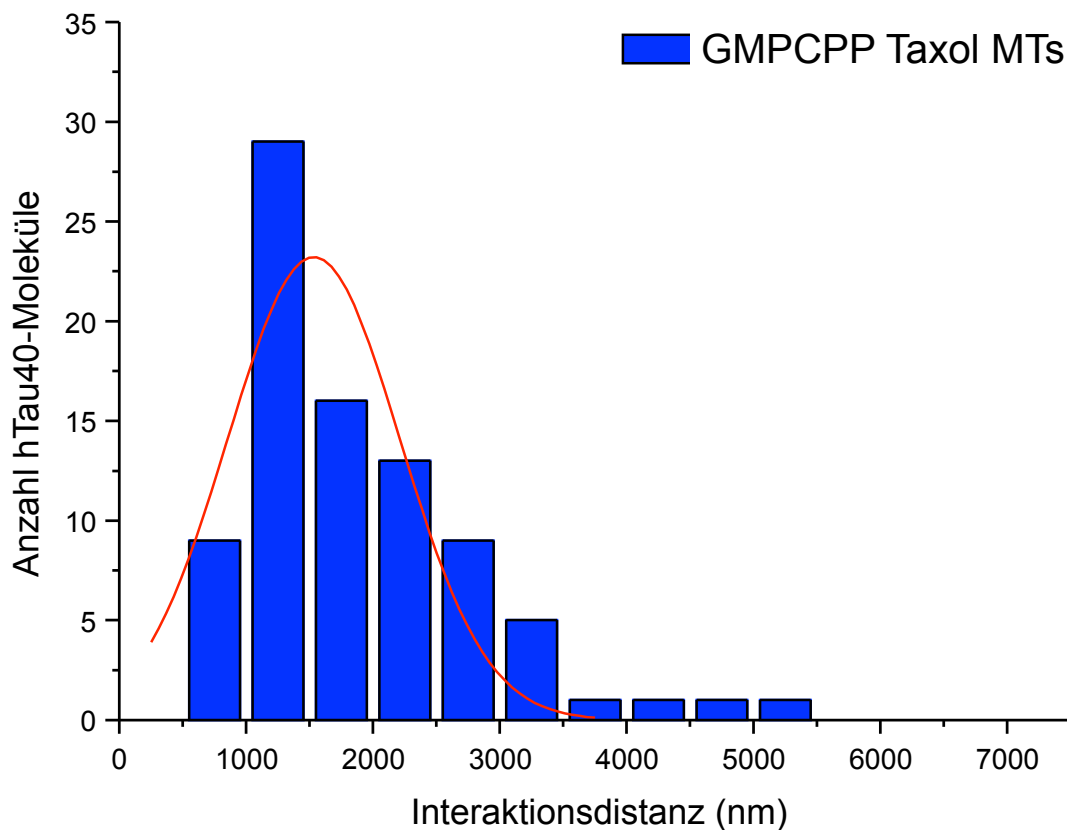


Abb. 3.23 Verteilung zurückgelegter Entfernungen einzelner Tau-Moleküle auf GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli

Die Mikrotubulus-Länge, mit der einzelne diffundierende Tau-Moleküle interagierten, berechnete sich aus dem zuvor bestimmten Median der Diffusionskoeffizienten und der um den Bleichfaktor korrigierten Diffusionsdauer. Der berechnete Wert von 2407 nm (± 193 nm) wich von dem an die gemessenen, unkorrigierten Interaktionsdistanzen (blaue Säulen) angelegten Gaussfit ($1533 \text{ nm} \pm 149 \text{ nm}$, rote Kurve) ab.

3.6.2 Vergleich der Gesamtmenge Tau und des Anteils mobiler Tau-Moleküle auf GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli in Abhängigkeit unterschiedlicher Taxol-Konzentrationen

Im Hinblick auf die durchschnittliche Gesamtmenge von Tau pro μm Mikrotubulus, den prozentualen mobilen Tau-Anteil und die mittlere Anzahl mobiler Tau-Moleküle bei den beiden in der Literatur oftmals miteinander verglichenen GTP-Taxol ($10 \mu\text{M}$)- und GMPCPP-Mikrotubuli waren Unterschiede vorhanden (Abb. 3.24A). Auf GTP-Taxol-Mikrotubuli lag die durchschnittliche Gesamtmenge Tau mit $0,45 \text{ Tau pro } \mu\text{m}$ Mikrotubulus (SE $0,03$; $n=134$) um 18% niedriger als auf Taxol-freien GMPCPP-Mikrotubuli mit $0,54 \text{ Tau pro } \mu\text{m}$ Mikrotubulus (SE $0,03$; $n=344$).

Der Unterschied war signifikant (T-Test: $p < 0,025$). Der prozentuale Anteil der mobilen Tau-Moleküle lag auf GTP-Taxol-Mikrotubuli mit 45 % signifikant niedriger als auf GMPCPP-Mikrotubuli mit 61 % (T-Test: $p < 0,0025$) (Abb. 3.24B). Die Anzahl der mobilen Tau-Moleküle war auf GTP-Taxol-Mikrotubuli mit 0,19 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,02, $n=134$) im Vergleich zu GMPCPP-Mikrotubuli mit 0,34 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; $n=344$) um 43 % signifikant erniedrigt (T-Test: $p < 0,001$).

Nach der Zugabe einer reduzierten Taxol-Menge von 1 μM zu den verschiedenen Mikrotubuli lag bei der durchschnittlichen Gesamtmenge von Tau pro μm Mikrotubulus eine leichte, aber nicht signifikante Abweichung vor (T-Test: $p=0,17$). Die durchschnittliche Gesamtmenge an Tau belief sich auf GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli auf 0,51 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,05; $n=102$) und auf GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli auf 0,62 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,06; $n=72$) (Abb. 3.24C). Der prozentuale Anteil mobiler Tau-Moleküle, der auf GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli bei 45 % und auf GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli bei 35 % lag, war nicht signifikant unterschiedlich (T-Test: $p = 0,09$) (Abb. 3.24 D). Die Anzahl mobiler Tau-Moleküle, die auf GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli bei 0,23 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,04; $n=102$) und auf GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli bei 0,22 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,04; $n=72$) lag, war ebenfalls nicht signifikant verschieden (T-Test: $p= 0,89$).

Auch in Anwesenheit von 10 μM Taxol war bei den Mikrotubuli unterschiedlicher Nukleotidstatus die durchschnittliche Gesamtmenge von Tau pro μm Mikrotubulus nicht signifikant unterschiedlich (T-Test: $p = 0,13$) (Abb. 3.24E).

Der Wert der durchschnittlichen Gesamtmenge Tau betrug auf GTP-Taxol-Mikrotubuli 0,45 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; $n=134$) und auf GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli 0,39 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; $n=85$). Der prozentuale Anteil mobiler Tau-Moleküle wies einen signifikanten Unterschied auf (T-Test: $p < 0,05$). Auf GTP-Taxol-Mikrotubuli lag er bei 45 % und auf GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli bei deutlich reduzierten 28 % (Abb. 3.17 F). Auf GTP-Taxol-Mikrotubuli war die Anzahl mobiler Tau-Moleküle mit 0,19 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,02; $n=134$) signifikant höher als auf GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli mit 0,12 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,02; $n=85$) (T-Test: $p < 0,005$).

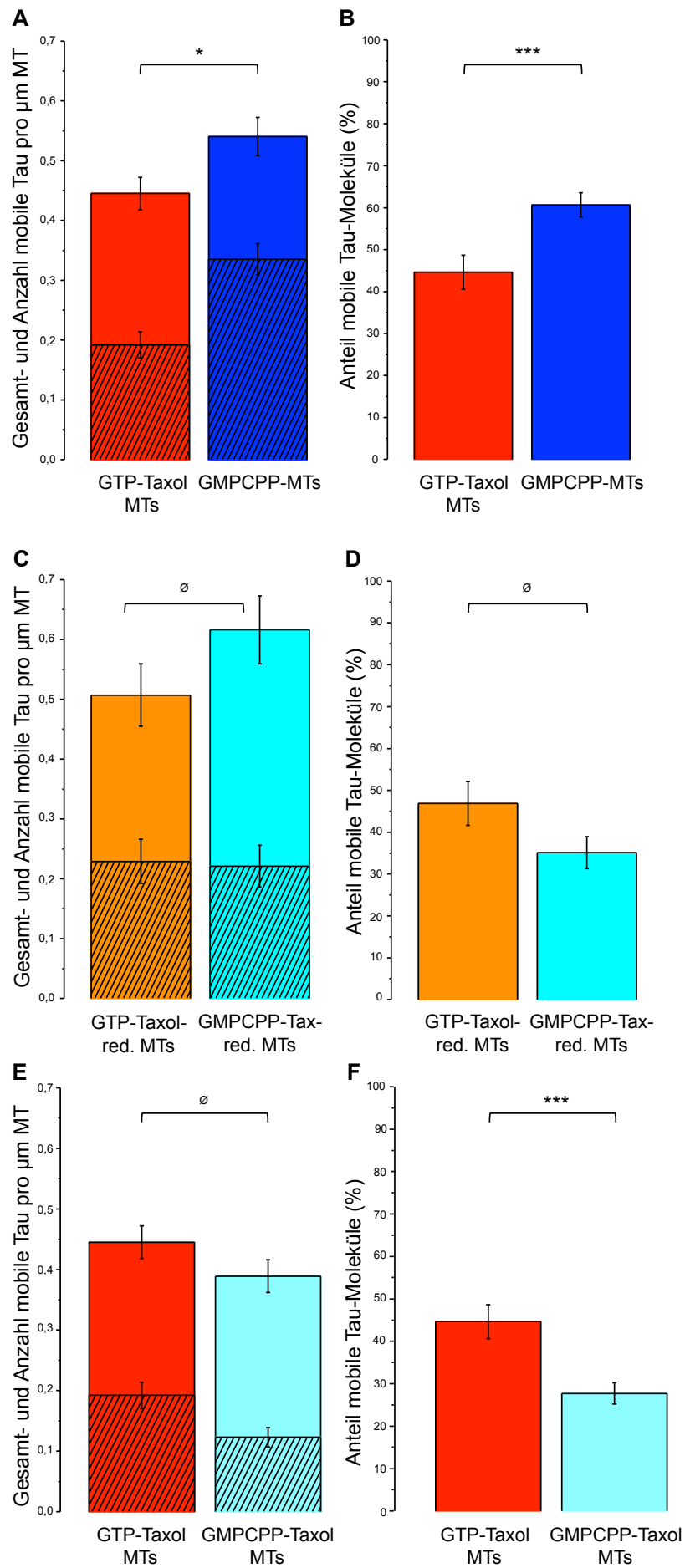


Abbildung 3.24 A-F Vergleich Gesamtanzahl und Anzahl mobiler Tau-Moleküle (gestreift) pro μm GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli in Anwesenheit verschiedener Taxol-Konzentrationen

A Die Gesamtanzahl an Tau auf GTP-Taxol-Mikrotubuli lag mit 0,45 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; n=134)) signifikant niedriger als auf GMPCPP-Mikrotubuli mit 0,54 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; n=344)) (T-Test: $p < 0,025$). Die Anzahl mobiler Tau-Moleküle belief sich auf GTP-Taxol-Mikrotubuli auf 0,19 und auf GMPCPP-Mikrotubuli auf 0,34 Tau pro μm Mikrotubulus. **B** Der prozentuale Anteil mobiler Tau-Moleküle lag auf GTP-Taxol-Mikrotubuli mit 45 % signifikant niedriger als auf GMPCPP-Mikrotubuli mit 61 % (T-Test: $p = 0,0025$). **C** Die Gesamtanzahl Tau auf GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli war mit 0,51 (SE 0,05; n=102)) und auf GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli mit 0,62 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,06; n=72)) nicht signifikant unterschiedlich (T-Test: $p = 0,17$). Die Anzahl mobiler Tau-Moleküle auf GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli lag bei 0,23 und auf GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli bei 0,22 Tau pro μm Mikrotubulus. **D** Der Unterschied im prozentualen Anteil mobiler Tau-Moleküle war auf GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli mit 47 % und auf GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli mit 35 % nicht signifikant (T-Test: $p = 0,09$). **E** Die Gesamtanzahl Tau auf GTP-Taxol-Mikrotubuli unterschied sich mit 0,45 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; n=134)) nicht signifikant vom Wert der GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli mit 0,39 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; n=85)) (T-Test: $p = 0,13$). Die Anzahl mobiler Tau-Moleküle lag auf GTP-Taxol-Mikrotubuli bei 0,19 und auf GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli bei 0,12 Tau pro μm Mikrotubulus. **F** Der Unterschied im prozentualen Anteil mobiler Tau-Moleküle auf GTP-Taxol-Mikrotubuli mit 45 % und auf GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli mit 28 % war signifikant (T-Test: $p < 0,05$).

Innerhalb der GTP-Taxol-Nukleotidreihe wiesen GTP-Taxol-Mikrotubuli mit einer durchschnittlichen Gesamtmenge Tau von 0,45 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; n=134)) signifikant weniger (um 18 % niedriger) Tau als GTP-Taxol-reduzierte-Mikrotubuli mit 0,54 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; n=102)) (T-Test: $p=0,025$) auf. Der Anteil mobiler Tau-Moleküle in Prozent lag auf GTP-Taxol-Mikrotubuli bei 45 % und auf GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli bei 47 % (Abb. 3.25).

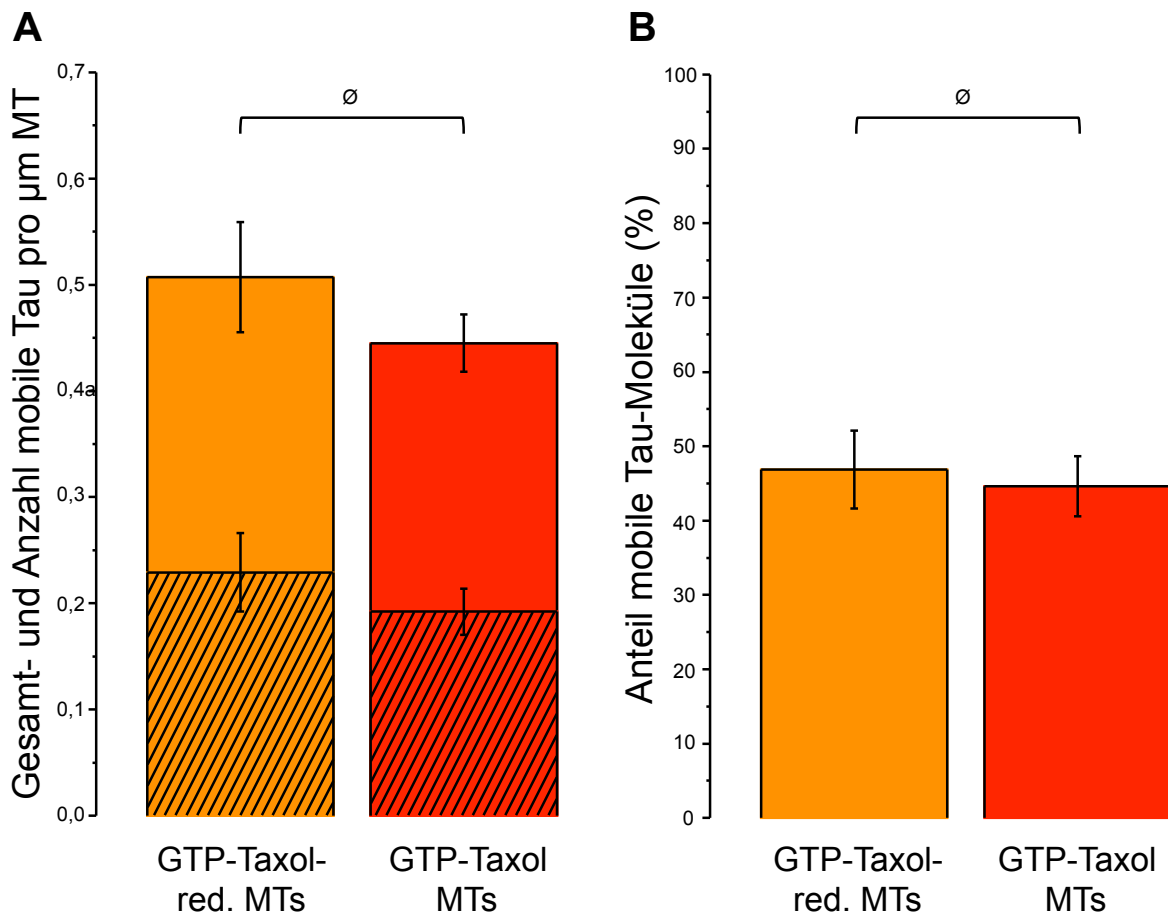


Abbildung 3.25 Vergleich Gesamtanzahl und Anzahl mobiler Tau-Moleküle (gestreift) pro μm GTP-Taxol-reduziert- und GTP-Taxol-Mikrotubuli

A Auf GTP-Taxol-Mikrotubuli war die durchschnittliche Gesamtmenge Tau mit 0,45 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; n=134) nicht signifikant (T-Test: $p = 0,025$) niedriger als auf

GTP-Taxol-reduzierten Mikrotubuli mit 0,54 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; n=102). **B** Der Anteil mobiler Tau-Moleküle in Prozent lag auf GTP-Taxol-Mikrotubuli bei 45 % und auf GTP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli bei 47 %. Der Unterschied war nicht signifikant.

Die durchschnittliche Gesamtmenge von Tau pro μm Mikrotubulus zeigte auf GMPCPP-Mikrotubuli eine Abhängigkeit von der Taxolkonzentration (Abb. 3.26). Während bei GMPCPP-Mikrotubuli (0,54 Tau pro μm Mikrotubulus) im Vergleich zu GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli (0,62 Tau pro μm Mikrotubulus) in der Gesamtanzahl der Tau-Moleküle noch kein signifikanter Unterschied bestand (T-Test: $p = 0,22$), trat ein signifikanter Abfall bei weiterer Erhöhung der Taxol-Konzentration auf. Die Gesamtanzahl von Tau belief sich bei GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli auf 0,39 Tau pro μm Mikrotubulus. Beim Vergleich der Gesamtanzahl von

Tau auf GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli und GMPCPP-Mikrotubuli lag eine signifikante Erniedrigung vor (T-Test: $p < 0,0005$).

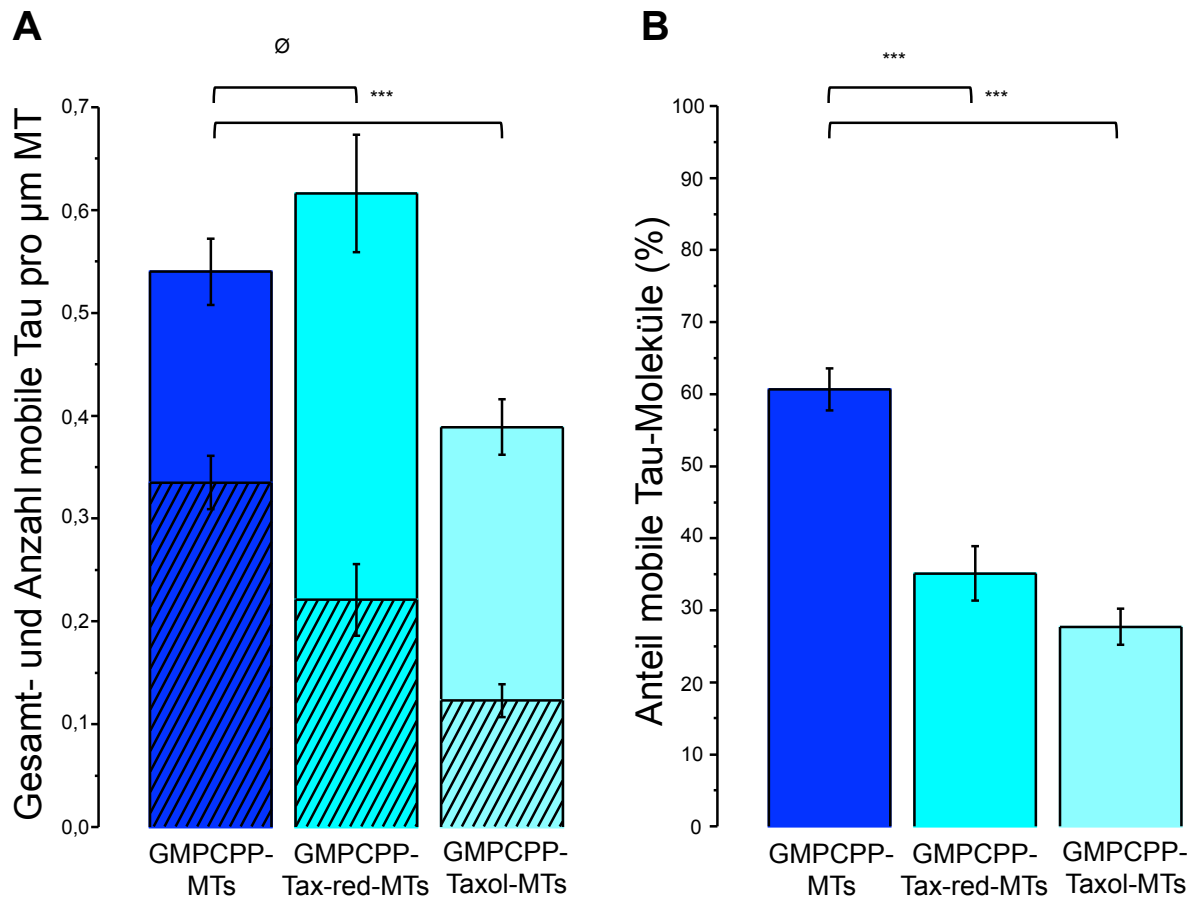


Abbildung 3.26 Vergleich Gesamtanzahl und Anteil mobiler Tau-Moleküle (gestreift) pro μm GMPCPP-, GMPCPP-Taxol-reduziert- und GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli in Prozent

A Auf GMPCPP-Mikrotubuli (0,54 Tau pro μm Mikrotubulus) bestand im Vergleich zu GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli (0,62 Tau pro μm Mikrotubulus) in der Gesamtanzahl der Tau-Moleküle kein signifikanter Unterschied (T-Test: $p = 0,22$). Beim GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli (0,39 Tau pro μm Mikrotubulus) mit GMPCPP-Mikrotubuli ohne Taxol (0,54 Tau pro μm Mikrotubulus) lag in der Gesamtanzahl von Tau eine signifikante Erniedrigung vor (T-Test: $p < 0,001$). **B** Der mobile Anteil Tau in Prozent war auf GMPCPP-Mikrotubuli mit 61 % signifikant höher als auf GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli mit 35 % (T-Test: $p < 0,01$). Der Wert auf GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli war mit 28 % signifikant niedriger als bei GMPCPP-Mikrotubuli mit 61 % (T-Test: $p < 0,001$). Die Anzahl mobiler Tau-Moleküle lag auf GMPCPP-Mikrotubuli bei 0,34, auf GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli bei 0,22 Tau und auf GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli bei 0,12 Tau pro μm Mikrotubulus.

Beim Anteil mobiler Tau-Moleküle in Prozent waren bereits bei reduzierter Taxol-Zugabe signifikante Unterschiede vorzufinden. Der Wert des mobilen Anteils von Tau in Prozent lag bei GMPCPP-Mikrotubuli bei 61 % und reduzierte sich signifikant auf

GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli auf 35 % (T-Test: $p < 0,01$).

Dieser signifikante Unterschied erhöhte sich nach Erhöhung der Taxol-Zugabe (T-Test: $p < 0,001$).

Auf GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli lag der mobile Tau-Anteil in Prozent nur noch bei 27,70 %. Die Anzahl mobiler Tau-Moleküle lag bei GMPCPP-Mikrotubuli bei 0,34 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,03; $n=344$), bei GMPCPP-Taxol-reduzierten-Mikrotubuli bei 0,22 (SE 0,04; $n=72$) und bei GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli bei weiter reduzierten 0,12 Tau pro μm Mikrotubulus (SE 0,02; $n=85$).

In der folgenden Tabelle 3.5 sollen zur besseren Übersicht die erhaltenen Werte zur Diffusion einzelner hTau40-Moleküle entlang von Mikrotubuli im GDP- (repräsentiert durch mit GTP polymerisierte Mikrotubuli) und im GTP-Zustand (repräsentiert durch mit GMPCPP polymerisierte Mikrotubuli), zur Gesamtanzahl von Tau pro μm Mikrotubulus wie auch des Anteils von mobilen und stationären Tau-Molekülen pro μm Mikrotubulus in Gegenwart verschiedener Taxolkonzentrationen dargestellt werden.

Tabelle 3.4 der zusammengefassten Ergebnisse

hTau40-Diffusion entlang von Mikrotubuli:	GTP-Taxol-reduziert (1 μM Taxol)	GTP-Taxol (10 μM Taxol)	GMPCPP	GMPCPP-Taxol-reduziert (1 μM Taxol)	GMPCPP-Taxol (10 μM Taxol)
Diffusionskoeffizient D (Median)	0,13 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0,10 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0,08 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0,06 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0,09 $\mu\text{m}^2/\text{s}$
Interaktionszeit t (bleich-korrigiert)	19,4 s $\pm$ 2,41 s	14,5 s $\pm$ 1,11 s	12,7 s $\pm$ 1,81 s	44,8 s $\pm$ 11,23 s	33,4 s $\pm$ 4,76 s
Interaktionsdistanz (scanned distance) errechnet	2283 nm $\pm$ 135 nm	1734 nm $\pm$ 245 nm	1402 nm $\pm$ 179 nm	2312 nm $\pm$ 336 nm	2407 nm $\pm$ 193 nm
Interaktionsdistanz (scanned distance) gemessen	1713 nm $\pm$ 45 nm	1634 nm $\pm$ 54 nm	1489 nm $\pm$ 60 nm	1195 nm $\pm$ 55 nm	1533 nm $\pm$ 149 nm
Gesamtanzahl Taumoleküle pro μm Mikrotubulus	0,51 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,06	0,39 $\pm$ 0,03
Anteil mobiler Tau-Moleküle in Prozent	45 %	45 %	61 %	35 %	28 %
Mittlere Anzahl Tau mobil pro μm Mikrotubulus	0,23 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,02

4. Diskussion

Die unter physiologischen Bedingungen heterogene Verteilung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins (MAP) Tau in Neuronen sowie die Existenz unterschiedlicher Mikrotubuli-Zustände in unterschiedlichen Zell-Kompartimenten führten in dieser Arbeit zu der Fragestellung, ob und inwieweit der Nukleotidstatus von Tubulin die Tau-Mikrotubuli-Interaktion beeinflusst. Außerdem sollte geklärt werden, ob auch andere zellulär relevante Faktoren wie die Ionenstärke ebenfalls einen Einfluss auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion haben könnten. Als funktionelle Parameter von Tau wurden der Diffusionskoeffizient einzelner Tau-Moleküle entlang von Mikrotubuli, die Interaktionszeit und –distanz mit Mikrotubuli, die Gesamtanzahl Tau sowie auch das Verhältnis von mobilen zu stationären Tau-Molekülen auf Mikrotubuli unterschiedlicher Nukleotidzustände ermittelt und miteinander verglichen.

Unterschiedliche Nukleotidzustände von in Mikrotubuli inkorporiertem Tubulin bzw. die dynamische Instabilität der Mikrotubuli dienen unter anderem der Steuerung Mikrotubulus-abhängiger Zellfunktionen (123). Der ständige Umbauprozess von Mikrotubuli in Zellen wird durch die Bindung und Hydrolyse von GTP generiert (9). Dabei kommt es zu Hydrolyse-bedingten Konformationsänderungen des Tubulins, die sich entlang des Mikrotubuli-Gitters ausbreiten und auch Bereiche betreffen können, die für die Interaktion mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen wichtig sind (13,62,124,125). Die Existenz von Neuronenabschnitten, deren Mikrotubuli beispielsweise durch Polyaminierungen im GTP-Nukleotidstatus verbleiben (21) und der Umstand, dass bestimmte Motorproteine sich bevorzugt an GTP-reichen Mikrotubuli des Axons anreichern (119), sprechen für die Möglichkeit einer Mikrotubulus Nukleotidzustand-abhängigen, heterogenen Verteilung auch anderer Mikrotubuli-assoziierten Proteine.

Um den Einfluss des Nukleotidzustandes der Mikrotubuli auf die Verteilung und das Verhalten von Tau zu ermitteln, wurde die Tau-Mikrotubuli-Interaktion in dieser Arbeit auf zwei im gebundenen Nukleotid unterschiedlichen Mikrotubuli untersucht. Mit dem nicht hydrolysierbaren GTP-Analogen GMPCPP polymerisierte Mikrotubuli repräsentierten dabei den GTP-Zustand von Tubulin, mit hydrolysierbarem GTP polymerisierte, Taxol-stabilisierte GTP-Taxol-Mikrotubuli repräsentierten den GDP-Zustand von Tubulin. Tabelle 3.4 zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit gewonnenen Daten.

4.1 Ionenstärke und Tau-Diffusion

Die in Vorarbeiten beschriebene Tau-Mikrotubuli-Interaktion mittels Diffusion führte zu der Fragestellung, ob diese Interaktion durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt wird und somit eine Abhängigkeit von der Ionenstärke existieren könnte. Dazu wurde die Tau-Mikrotubulus-Interaktion in Gegenwart zunehmender Kaliumacetat-Konzentrationen (0 – 100 mM) untersucht. Mit zunehmender Ionenstärke durch Erhöhung der Kaliumazetatkonzentration wurde ein Rückgang der Gesamtanzahl Tau sowie eine Zunahme des Diffusionskoeffizienten bei gleichzeitig abnehmender Interaktionszeit auf GTP-Taxol-Mikrotubuli beobachtet (siehe Abb. 3.10 und 3.11).

Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Tau-Mikrotubuli-Interaktion mittels Diffusion auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht, was durch die ebenfalls beschriebene Abhängigkeit von der Anwesenheit von Tubulins negativ geladenem C-Terminus unterstützt wird (68). Die beschriebene Tau-Diffusion entlang von Mikrotubuli ist auch bei physiologischer Ionenstärke zu beobachten (Kaliumazetatkonzentration von 100 mM, Gesamtionenstärke ~140mM), was die physiologische Relevanz der Tau-Diffusion entlang von Mikrotubuli nahelegt.

Diese Ergebnisse wurden in einer vorangegangenen Arbeit publiziert (68).

4.2 Unterschiede im Tau-Verhalten auf GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli

In dieser Arbeit konnten diffundierende und stationäre Tau-Moleküle sowohl auf GTP-Taxol- als auch auf GMPCPP-Mikrotubuli beobachtet werden. Individuelle Tau-Moleküle wiesen auf GTP-Taxol-Mikrotubuli (Tubulin im GDP-Zustand) einen signifikant höheren Diffusionskoeffizienten als auf GMPCPP-Mikrotubuli (Tubulin im GTP-Zustand) auf. Die durchschnittliche Interaktionszeit und -distanz von Tau lagen entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli etwas höher als entlang von GMPCPP-Mikrotubuli. Als Ursache für diese Unterschiede wird in dieser Arbeit die Sensitivität von Tau gegenüber Nukleotid-bedingten Änderungen in der Mikrotubulus-Gitterstruktur diskutiert.

Der Einfluss Nukleotid-bedingter Änderungen in der Mikrotubulus-Gitterstruktur auf das Verhalten von Tau-Molekülen wurde ebenfalls in anderen Arbeiten untersucht. Zusätzlich dazu wurde ein möglicher Einfluss der Tau-Isoform auf die Tau-Mikrotubulus-Interaktion ebenfalls eruiert (126).

Es wurden die Tau-Isoformen 3-RS (repeat short) und 4-RL (repeat long, entsprechend dem hier verwendeten hTau40) und GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli verwendet. Der Diffusionskoeffizient der 4RL-Taumoleküle entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli belief sich auf $0,12 \pm 0,02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und entlang von GMPCPP-Mikrotubuli auf $0,15 \pm 0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (126). Die Konzentration der jeweiligen Tau-Isoform war mit 500 pM auf 1500 nM Mikrotubuli (1:3000) gegenüber der in dieser Arbeit verwendeten (1:625) erniedrigt.

Die Interaktionszeit der diffundierenden 4RL-Taumoleküle auf GTP-Taxol-Mikrotubuli lag bei $3,87 \pm 0,57 \text{ s}$ und auf GMPCPP-Mikrotubuli bei $6,65 \pm 2,38 \text{ s}$ (126). Wie in dieser Arbeit wurden Unterschiede im Diffusionskoeffizienten und in der Interaktionszeit im Vergleich GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli vorgefunden. Die Unterschiede im Diffusionskoeffizienten und der Interaktionszeit waren allerdings den Ergebnissen dieser Arbeit entgegengesetzt.

Die beobachteten Diffusionskoeffizienten lagen im Vergleich zu dieser Arbeit deutlich höher, wobei Tau entlang von GMPCPP-Mikrotubuli signifikant schneller diffundierte als entlang von GTP-Taxol-Mikrotubuli. Die ermittelten Interaktionszeiten waren im Vergleich zu den Interaktionszeiten dieser Arbeit deutlich niedriger.

Die Unterschiede sind auf verschiedene Faktoren, unter anderem unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen. Als Versuchspuffer wurde BRB80 (mit 80 mM PIPES statt in der vorgelegten Arbeit 12 mM) verwendet, so dass in den Versuchsbedingungen eine Ionenstärke von 140 mM vorlag (126). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, stieg mit zunehmender Ionenstärke der Diffusionskoeffizient während die Interaktionszeit und -distanz abnahmen (Abb. 3.10 und 3.11). Bei der Verwendung einer Kaliumazetatkonzentration von 100 mM, das heißt unter einer Ionenstärke von 140 mM konnten ein Diffusionskoeffizient von $0,336 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,062$, eine Interaktionszeit von $5,89 \text{ s} \pm 3,82$ und eine Interaktionsdistanz von $1,989 \mu\text{m} \pm 0,670$ auf GTP-Taxol-Mikrotubuli beobachtet werden (68). Unter ähnlicheren Versuchsbedingungen lag in der vorliegenden Arbeit im Vergleich ein höherer Diffusionskoeffizient von Tau auf GTP-Taxol-Mikrotubuli vor, die Interaktionszeit war leicht höher (Abb. 3.11).

Der Diffusionskoeffizient von Tau auf GMPCPP-Mikrotubuli wäre erst nach Verwendung der gleichen Ionenstärke vergleichbar. Mit der Schaffung gleicher Versuchsbedingungen unter Verwendung gleicher Ionenstärken könnte man nicht nur den Einfluss des Nukleotidzustandes von Mikrotubuli auf das Diffusionsverhalten von Tau, sondern auch eine mögliche, unterschiedliche Abhängigkeit des Nukleotidzustandes von unterschiedlichen Ionenstärken untersuchen.

Beim Vergleich der Gesamtmenge von Tau und der Anzahl diffundierender Tau-Moleküle war in der vorliegenden Arbeit auf GMPCPP-Mikrotubuli eine signifikant höhere Anzahl von Tau als auf GTP-Taxol-Mikrotubuli vorzufinden. Der Anteil mobiler Tau-Moleküle lag auf GMPCPP-Mikrotubuli bei 61 % und auf GTP-Taxol-Mikrotubuli bei 45 %. Andere Arbeiten zeigten mit 79 % diffundierenden und 21 % stationären 4RL-Tau-Molekülen auf GMPCPP-Mikrotubuli und 51 % diffundierenden und 49 % stationären auf GTP-Taxol-Mikrotubuli ähnliche Ergebnisse (126).

Hinsichtlich des Einflusses der Tau-Isoform auf die Tau-Mikrotubulus-Interaktion konnten ebenfalls Unterschiede gezeigt werden (126). Während 3RS-Tau auf GTP-Taxol-Mikrotubuli eher stationär war und Aggregate aus 2-3 Tau-Molekülen bildete (126) wies 4RL-Tau entsprechend der vorangegangenen publizierten Arbeit (68) einzelne Moleküle auf, die sich in einem Gleichgewicht zwischen diffundierend und stationär befanden. Auf GMPCPP-Mikrotubuli waren bei beiden Isoformen ausschließlich einzelne Moleküle vorzufinden, die den diffundierenden Zustand bevorzugten. Die Tau-Isoformen waren im Stande zwischen dem stationären und diffundierenden Zustand zu wechseln (Abb. 3.13).

Der Umstand, dass beide Tau-Isoformen auf GMPCPP-Mikrotubuli den diffundierenden Zustand bevorzugten, führte zur Annahme, dass Nukleotid-bedingte Änderungen im Mikrotubulus-Gitter diese erhöhte Tau-Diffusion bewirkten (126). Hinsichtlich des Einflusses der Tau-Konzentration auf die Tau-Mikrotubulus-Interaktion wurde bei Erhöhung der Tau-Konzentration auf 300 nM (bei 1500 nM Mikrotubuli; Verhältnis 1:5) eine Zunahme des stationären Anteils festgestellt während der Diffusionskoeffizient abnahm (126).

In der vorliegenden Arbeit ging es hauptsächlich um die Untersuchung des Tau-Verhaltens im Hinblick auf den Nukleotidstatus.

Es wurde eine Konzentration gewählt, bei der einzelne Moleküle beobachtbar waren.

Die Versuchsbedingungen dieser Arbeit entsprachen denen der vorangegangenen Arbeit (68), in der gezeigt werden konnte, dass trotz zunehmender Tau-Konzentration auf Mikrotubuli der End-zu-End-Abstand (Interaktionsdistanz) und die Interaktionszeit der Tau-Moleküle in einem Konzentrationsbereich von 0 – 10 nM unverändert blieben. Im Hinblick auf das Verhältnis von diffundierenden zu stationären Tau-Molekülen bei steigender Gesamtkonzentration konnten bis auf einen leichten Trend zur Abnahme des diffundierenden Anteils von Tau (Verhältnis diffundierend: stationär von 60:40 nach Erhöhung der Tau-Konzentration bei 50:50) keine signifikanten Änderungen festgestellt werden (68). Da bis zu einer Konzentration von 10 nM Tau (bei 50 nM Mikrotubuli; Verhältnis 1:5) kein kooperatives oder anti-kooperatives Verhalten von diffundierenden und stationären Tau-Molekülen festgestellt werden konnte (68) und die eingesetzte Tau-Konzentration der vorliegenden Arbeit bei 80 pM lag, fand keine weitere Überprüfung der Ergebnisse dieser Arbeit mit höheren Tau-Konzentrationen statt.

Die Unterschiede zwischen mit GTP und mit GMPCPP polymerisierten Mikrotubuli in den Untersuchungsparametern dieser Arbeit sprachen ebenfalls für strukturelle und mechanische Unterschiede in Abhängigkeit vom Nukleotidzustand von Tubulin. Neben Tau zeigen auch andere Proteine eine selektiv unterschiedliche Anreicherung in Abhängigkeit vom Nukleotidzustand.

Das Mikrotubulus-stabilisierende Protein Doublecortin (DCX) bindet in einer kooperativen Art und Weise an Taxol-stabilisierte-Mikrotubuli und nicht an GMPCPP-Mikrotubuli (14). Das heterogen verteilte Motorprotein Kinesin-1/KIF5 ist hingegen besonders an GTP-reichen Mikrotubuli im Axon vorzufinden (119). Die Motordomäne eines verkürzten KIF5 (= Kinesin-1) ist in der Lage, Mikrotubuli mit den reichhaltigen EB1 Bindungsstellen an der Axonspitze zu erkennen und sich dort selektiv anzureichern. EB1 wird als Marker für das GTP-Cap von Mikrotubuli bezeichnet, sodass am GTP-Cap von Mikrotubuli vermehrt Kinesin-1/KIF5 vorzufinden ist.

Das sogenannte GTP-Cap-Modell suggeriert die Anwesenheit eines Caps bestehend aus Tubulin- β -Untereinheiten, die ihr GTP noch nicht hydrolysiert haben und dadurch Mikrotubuli stabilisieren, indem sie die Depolymerisation verhindern (9).

Unterschiede zwischen dem Cap und dem restlichen Mikrotubulus werden im unterschiedlichen Größenverhältnis (das Cap ist kleiner), der größeren Steifheit, der unterschiedlichen Protofilamentorganisation und dem Abstand zwischen den Monomeren diskutiert. Nukleotidzustand-bedingte Unterschiede wurden in Bezug auf die Mikrotubulus-Struktur und der mechanischen Eigenschaften des jeweiligen Mikrotubulus gefunden (22). GMPCPP-Mikrotubuli weisen eine signifikant größere Steifheit im Vergleich zu GDP-Mikrotubuli auf und verfügen über einen um 21% flacheren Verdrehwinkel. Es wurde angenommen, dass die GTP-Hydrolyse signifikante Änderungen der strukturellen und mechanischen Gegebenheiten verursacht (22). Diese wiederum umfassen die Mikrotubulus-Oberfläche, wo die überwiegende Mehrheit Mikrotubuli-assoziiierender Proteine und Motoren interagieren (13).

Bei den Nukleotid-bedingten Verschiebungen im Bereich des alpha-Tubulins der Intermediären-Domäne wird sogar eine signifikante Rolle in der Plus-End-Erkennung spekuliert (13). Bei Kinesin bewirken strukturelle und mechanische Veränderungen unter sättigender ATP-Konzentration eine um etwa 30 %, und damit signifikant schnellere Transportrate entlang von GMPCPP-Mikrotubuli im Vergleich zu GDP-Mikrotubuli (22).

Auch bei Tau ist anzunehmen, dass eine Sensitivität gegenüber den strukturellen und mechanischen Veränderungen in Abhängigkeit vom Nukleotidzustand vorliegt. Der Nukleotidzustand von in Mikrotubuli inkorporiertem Tubulin zeigte hinsichtlich der Tau-Mikrotubuli-Interaktion Unterschiede im Diffusionsverhalten, in der Gesamtanzahl gebundener Tau-Moleküle und im Verhältnis von diffundierenden zu stationären Tau-Molekülen. Tau diffundierte auf Mikrotubuli im GDP-Nukleotidzustand schneller und dissoziierte langsamer, während mutmaßlich durch gesteigerte Assoziation insgesamt mehr wie auch anteilig mehr mobile Tau-Moleküle auf Mikrotubuli im GTP-Nukleotidzustand vorlagen. Nukleotid-bedingte Änderungen im Bereich der C-terminalen Region (13) werden für die Unterschiede in den oben genannten funktionellen Parametern diskutiert.

4.3 Einfluss von Taxol auf die hTau40 Diffusion

Um den Nukleotideinfluss hinsichtlich der Tau-Mikrotubuli-Interaktion zu untersuchen und dabei einen zusätzlichen Einfluss des bei GTP polymerisierten Mikrotubuli in vitro zwingend notwendigen Stabilisierungsmittels Taxol auszuschließen bzw. zu charakterisieren, wurden beide Mikrotubuli-Zustände unter exakt gleichen Versuchsbedingungen untersucht. Da bei der Verwendung von mit GTP polymerisierten Mikrotubuli nicht auf Taxol verzichtet werden konnte, wurde alternativ GMPCPP-Mikrotubuli Taxol zugesetzt. Es wurde zusätzlich zu der standardmäßig verwendeten Konzentration von 10 μM eine reduzierte Taxol-Konzentration von 1 μM eingesetzt (siehe 2.2.2 und 2.2.5).

Taxol, eine niedermolekulare, neutrale Verbindung, wird aus der Pflanze *Taxus brevifolia* (Pazifische Eibe), die zu der Familie der Eibengewächse gehört, gewonnen. Bei Taxol handelt es sich um keinen physiologischen Bestandteil von Nervenzellen. Neben einem antikanzerogenen Effekt (127) hat Taxol auch zahlreiche andere Eigenschaften in Bezug auf Zytosekelett und Mikrotubuli. Taxol reduziert die Latenzzeit für die Mikrotubuliassemblierung und verschiebt das Gleichgewicht zugunsten der Mikrotubuli-Assemblierung (128).

Die Mikrotubulus-Stabilisierung wird durch die Verlangsamung des Abbaus, der sogenannten "Katastrophe", durch die Bindung an die im Mikrotubulus innenliegende Bindungsstelle des β -Tubulins erreicht (11,64). Sowohl GTP, GMPCPP als auch Taxol interagieren mit der core-helix von β -Tubulin (129). Die Bindungsstelle von Taxol liegt distal der E-site zwischen der Nukleotidbindungs- und der intermediären Domäne (11). Die Stabilisierung von Mikrotubuli wird von der Konformation der Untereinheiten im Mikrotubulus-Gitter bestimmt. Während das Nukleotid, GTP oder das Analogon GMPCPP, die intraprotofilamentären Bindungen direkt verstärken, stabilisiert Taxol die lateralen Filamentinteraktionen (29).

Die Bindungsstelle, die der inneren Oberfläche der bereits prä-assemblierten Mikrotubuli zugewandt ist, wird relativ schnell von Taxol besetzt. Taxol soll sogenannte Fugen oder Säume im Mikrotubulus-Gitter, die sich periodisch öffnen, durchqueren (130). Das Eintreten durch eine Lücke/einen Spalt zwischen den einzelnen Protofilamenten des Mikrotubulus wird ebenfalls diskutiert (129).

Die Reihenfolge der Zugabe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen und Taxol bezüglich des Taxol-Einflusses auf die Kinetik des Mikrotubulus-Wachstums und auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion wird in vorangegangenen Studien kontrovers diskutiert. Eine Polymerisation von Tubulin in Gegenwart von Taxol führt zu einer Tubulinassemblierung selbst in Abwesenheit von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen.

Bei einer gleichzeitigen Präsenz von Taxol und MAP2 während der Polymerisation des Tubulins sind die Effekte von Taxol sogar bestimmend (131). Kommt gereinigtes Tubulin hingegen zuerst mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen in Berührung, ruft Taxol bei nachträglicher Zugabe keine signifikanten Veränderungen in der Kinetik des Mikrotubulus-Wachstums hervor (131). Unabhängig von dem möglichen Taxol-Einfluss auf die Kinetik des Mikrotubulus-Wachstums in der Herstellungsphase der Mikrotubuli zeigten Studien in Anwesenheit von 20 μM Taxol eine um 20% verminderte Bindung von 3R-Tau und eine um 12 % verminderte Bindung von 4R-Tau an Mikrotubuli (65). Unter Zugabe von 1 μM Taxol zu Tau-GFP exprimierenden *Xenopus* Zellen wurde eine nahezu vollständige Dissoziation von Tau-GFP von Mikrotubuli bereits nach wenigen Minuten beobachtet (71).

Andere Studien hingegen zeigten, dass bei vorab polymerisierten Mikrotubuli keine Änderungen der Tau-Interaktion mit Mikrotubuli, die in An- oder Abwesenheit von Taxol polymerisiert wurden, beobachtbar waren (52,132). Eine Tau-Isoform mit vier MTBR konnte sogar den Effekt von Taxol auf die Flexibilität von Mikrotubuli wieder rückgängig machen oder zumindest maskieren (133). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Tau-Isoform mit vier MTBR eingesetzt. Die Mikrotubuli-Polymerisation fand hier initial ganz ohne Taxol oder MAPs statt, erst nach Polymerisation wurde Taxol und anschließend Tau zugesetzt.

Unter gleichen Versuchsbedingungen waren im Nukleotidvergleich weiterhin Unterschiede in der Tau-Mikrotubuli-Interaktion zu beobachten. Bei der reduzierten Taxol-Konzentration von 1 μM waren anteilig mehr diffundierende Tau-Moleküle auf Mikrotubuli im GDP-Zustand (GTP-Taxol-reduzierte Mikrotubuli) vorzufinden, während eine langsamere Tau-Dissoziation von Mikrotubuli im GTP-Zustand (GMPCPP-Taxol-reduzierte Mikrotubuli) vorlag.

Tau diffundierte bei einer Taxol-Konzentration von 1 μM auf Mikrotubuli im GDP-Zustand schneller als auf Mikrotubuli im GTP-Zustand. Der Nukleotidvergleich bei einer höheren Taxol-Konzentration (10 μM) zeigte hingegen ähnlich schnelle Tau-Moleküle. Die Unterschiede hinsichtlich des höheren Anteils diffundierender Tau-Moleküle auf Mikrotubuli im GDP-Zustand und der langsameren Dissoziation von Tau von Mikrotubuli im GTP-Zustand blieben äquivalent zur reduzierten Taxol-Konzentration von 1 μM auch weiterhin bei der höheren Taxol-Konzentration von 10 μM bestehen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass unter gleichen Versuchsbedingungen der Nukleotidzustand einen Unterschied macht und die Nukleotidsensitivität von Tau für einen höheren Anteil diffundierender Tau-Moleküle auf Mikrotubuli im GDP-Zustand und einer langsameren Dissoziation von Tau von Mikrotubuli im GTP-Zustand verantwortlich ist.

Innerhalb der GMPCPP-Nukleotidreihe zeigte sich der Einfluss des Nukleotids auf den Diffusionskoeffizienten. Unabhängig von der eingesetzten Taxol-Konzentration lag im Vergleich zur GTP-Nukleotidreihe (Mikrotubuli im GDP-Zustand) eine langsamere Tau-Diffusion auf Mikrotubuli im GTP-Nukleotidzustand (GMPCPP-Mikrotubuli) vor. Der langsamere Diffusionskoeffizient, bedingt durch den dominanten Nukleotideinfluss, konnte durch Taxol nicht weiter verlangsamt werden.

Die beobachteten Unterschiede spiegelten zwar nicht die Unterschiede aus dem Vergleich GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli wider, allerdings waren sie in Bezug auf den Einfluss des Nukleotidstatus aussagekräftiger, da erst gleiche Versuchsbedingungen den Einfluss des Nukleotidzustandes ermitteln können.

Innerhalb der GTP-Nukleotidreihe (Mikrotubuli im GDP-Zustand) zeigte sich der Einfluss von Taxol auf den Diffusionskoeffizienten von Tau. Obwohl die hier verwendete Methode zur Polymerisation von Mikrotubuli einer Publikation ähnlich war, die keinen Einfluss von Taxol auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion feststellte (132), konnte in der vorliegenden Arbeit ein Einfluss von Taxol auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion gezeigt werden.

Die Unterschiede im Diffusionskoeffizienten von Tau auf Mikrotubuli waren nicht ausschließlich auf den Nukleotidzustand zurückzuführen. Die Erhöhung der Taxol-Konzentration von 1 auf 10 μM führte zu einer Verlangsamung der Tau-Diffusion entlang von Mikrotubuli.

Es ist anzunehmen, dass eine weitere Reduktion der Taxol-Konzentration vermutlich zu einem weiteren Anstieg des Diffusionskoeffizienten von Tau auf GTP-Taxol-Mikrotubuli führen würde und eine Erhöhung der Taxol-Konzentration eine weitere Verlangsamung verursachen könnte. Taxol schien auf Mikrotubuli im GDP-Zustand die auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhende Diffusionsgeschwindigkeit in irgendeiner Weise zu beeinträchtigen.

Die Dissoziationskonstante von Tau vom Mikrotubulus wurde in Abhängigkeit vom Nukleotidzustand ebenfalls von Taxol beeinflusst. Während auf GMPCPP-Mikrotubuli nach Taxol-Zugabe ein deutlicher Anstieg der Dissoziationskonstante von Tau zu beobachten war, zeigte sich dieser auf GTP-Taxol-Mikrotubuli erst nach Reduktion der Taxol-Konzentration (siehe Tabelle 3.4). Auf GMPCPP-Mikrotubuli könnten Taxol-bedingte Umstrukturierungen im Mikrotubulusgitter den Nukleotideinfluss dominieren und eine langsamere Tau-Dissoziation bewirken. Der Taxol-Einfluss im Mikrotubulus-Gitter von GTP-Taxol-Mikrotubuli hingegen zeigte eine schnellere Dissoziation von Tau vom Mikrotubulus.

Erst nach Reduktion der Taxol-Konzentration kam es zu einer langsameren Dissoziation. Der GDP-Nukleotidzustand schien durch die reduzierte Taxol-Konzentration weniger stark von Taxol maskiert zu werden. Eine weitere Reduktion der Taxol-Konzentration sollte dementsprechend zu einer weiteren Erhöhung der Interaktionszeit führen.

Die Stabilisierung von Mikrotubuli über die Konformation der Untereinheiten im Mikrotubulus-Gitter erfolgt in Abhängigkeit vom Nukleotidzustand und von Taxol über zwei verschiedene Ansatzpunkte (29). Diese unterschiedlichen Ansatzpunkte wiederum könnten durch unterschiedliche Umstrukturierungen im Mikrotubulus-Gitter auch für Unterschiede in den funktionellen Parametern verantwortlich sein. Inwieweit dabei Nukleotid und Taxol bedingte Einflüsse genau eine Rolle spielen, dominieren, sich gegenseitig verstärken, schwächen oder gar unabhängig voneinander agieren, blieb allerdings ungeklärt.

Bei der Ermittlung der Interaktionsdistanzen fielen starke Schwankungen auf GTP-Taxol-reduzierten-, GMPCPP-Taxol-reduzierten und GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli hinsichtlich der eingesetzten Methode auf.

Die Interaktionsdistanz, die entweder aus dem Diffusionskoeffizienten und der Interaktionszeit berechnet oder direkt gemessen wurde, zeigte auf GTP-Taxol- und GMPCPP-Mikrotubuli ähnliche Werte, sodass beide Methoden zur Ermittlung der Interaktionsdistanz in Frage kamen (Abb. 3.9, Tab. 3.4).

Die berechneten Werte der Interaktionsdistanzen von Tau entlang von GTP-Taxol-reduzierten-, GMPCPP-Taxol-reduzierten- und GMPCPP-Taxol-Mikrotubuli hingegen stimmten nicht mit dem an die gemessenen, unkorrigierten Interaktionsdistanzen angelegten Gaussfit überein. Die Unterschiede könnten unter anderem auf die geringere Anzahl der Moleküle und die dadurch bedingte höhere Fehleranfälligkeit der Ergebnisse zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zum Diffusionskoeffizienten, bei dem ausnahmslos alle Bewegungsläufe berücksichtigt wurden, konnte die Abklingkonstante ausschließlich aus Tau-Molekülen, die während ihrer gesamten sichtbaren Diffusion auswertbar waren, ermittelt werden. Die Verteilung der Interaktionszeiten ließ sich zudem nicht durch einen Gaussfit, sondern durch eine Funktion exponentieller Abnahme erster Ordnung beschreiben. Da kürzere Interaktionszeiten zahlenmäßig weniger detektiert werden als längere, weil sie unter Umständen zeitlich und örtlich unter die exponentielle Auflösung fallen und nicht mehr alle erfassbar sind, werden sie zwar graphisch dargestellt, im Fit aber nicht berücksichtigt. Daher ist davon auszugehen, dass die errechneten Werte überschätzt und die direkt gemessenen unterschätzt werden, sodass die errechneten Interaktionsdistanzen ebenfalls Schwankungen unterliegen und somit eine Aussage über den Einfluss des Nukleotidzustandes und / oder der Taxol-Konzentration auf die Interaktionsdistanz erschwert wird. In der Tabelle 3.4 sind sowohl die errechneten wie auch die direkt gemessenen Interaktionsdistanzen aufgeführt.

Der erhöhte Anteil diffundierender Tau-Moleküle in Abhängigkeit von Nukleotid-bedingten Änderungen im Mikrotubulus-Gitter konnte bereits gezeigt werden (126). In einem Konzentrationsbereich von 1-10 μM Taxol schien der unterschiedliche Nukleotidstatus ebenfalls eine Abhängigkeit von der eingesetzten Taxol-Konzentration aufzuweisen.

Im Vergleich zu GMPCPP- Mikrotubuli weisen GTP-Taxol-stabilisierte Mikrotubuli ein deutlich größeres Volumen durch Taxol auf der Oberfläche auf, sodass die Erhöhung des Volumens als spezifische Taxol-Eigenschaft angesehen werden kann (13). Taxol soll wie ein Keil wirken und das Volumen im Bereich der Taxol-Bindungsseite durch leichte Umlagerungen erhöhen.

Die Konformationsänderung des Tubulins, die durch die GTP-Hydrolyse erfolgt, soll durch Taxol allosterisch umgekehrt werden und sich auf die MAP-interagierenden Domänen der C-terminalen Region erstrecken können (13). Dabei soll eine Erweiterung der E-Site sowie auch eine Umkehrung in der Bewegung der Zwischendomäne im alpha-Tubulin stattfinden. Da bestimmte Nukleotid-Bindungsloops nicht in den GTP-Zustand zurückkehren, wird davon ausgegangen, dass ein anderer Mechanismus der Öffnung der E-Site durch Taxol zugrunde liegt (13).

Die Tau-Mikrotubuli-Interaktion mittels Diffusion beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen und es konnte eine Abhängigkeit von der Anwesenheit von Tubulins negativ geladenem C-Terminus gezeigt werden (68). Der unterschiedliche Mechanismus zur Öffnung der E-Site durch Taxol und die Volumenerhöhung durch leichte Umlagerungen im Bereich der Taxol-Bindungsseite (13) könnten zu einer größeren Abschirmung des negativ geladenen C-Terminus führen und als Ursache für den Rückgang der Gesamtanzahl Tau wie auch der Anzahl diffundierender Tau-Moleküle auf GMPCPP-Mikrotubuli diskutiert werden.

Je höher die eingesetzte Taxol-Konzentration umso stärker reduzierte sich der Anteil diffundierender Tau-Moleküle. Die Gesamtanzahl Tau auf GMPCPP hingegen reduzierte sich erst deutlich bei einer höheren Taxol-Konzentration (Tab. 3.4). Die Reduktion der Taxol-Konzentration auf Mikrotubuli im GDP-Zustand könnte dementsprechend eine geringere Abschirmung der C-terminalen Region bewirken und für den tendenziellen Anstieg der Gesamtanzahl Tau verantwortlich sein. Auch hier sollte eine weitere Reduktion der Taxol-Konzentration die Gesamtanzahl Tau erhöhen.

Ein weiteres Charakteristikum der strukturellen Unterschiede ist die Steifheit/Rigidität bzw. die Biegefestigkeit des Mikrotubulus. Mikrotubuli sind keine homogen plastischen Balken, da die longitudinalen Bindungen zwischen zwei Tubulindimeren im Protofilament wesentlich stärker als die lateralen interprotofilamentären Bindungen sind (134,135).

Der Taxol-Einfluss auf die Steifheit/Rigidität wird kontrovers diskutiert. Während einige Arbeiten eine leichte Erhöhung der Mikrotubuli-Steifheit/Festigkeit durch Taxol feststellten (136), zeigten andere eine Reduktion der Steifheit der aus dem Axonem hervorgehenden Mikrotubuli sowie eine Erhöhung der Flexibilität durch Taxol (18,83,137). Wie eventuelle Änderungen der Mikrotubulus-Steifheit einen Einfluss auf das Diffusionsverhalten von Tau haben könnten, ist fraglich.

Bezüglich der Morphologie und der Biegefestigkeit konnten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen GTP-Taxol-stabilisierten und GMPCPP-Mikrotubuli gezeigt werden (18). Die Diskussion über die Unterschiede in der Steifheit/Rigidität von Mikrotubuli in Anwesenheit von Taxol wurden in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt, da durch die Immobilisierung der Mikrotubuli gemäß dem Versuchsaufbau unter Punkt 2.2.7 diese Eigenschaft nicht untersucht wurde.

Obwohl die oben genannten Parameter nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, zeigen sie dennoch, dass strukturelle und mechanische Unterschiede mit Einfluss auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion vorliegen können. Die Unterschiede im Tau-Verhalten, die in dieser Arbeit im Hinblick auf den Nukleotidzustand aufgeführt wurden, scheinen ebenfalls eine Abhängigkeit von der Taxol-Konzentration aufzuweisen und den Nukleotidzustand zu maskieren oder umzukehren. Daher sollten Studien, die den Einfluss des Nukleotidzustandes hinsichtlich der MAP-Mikrotubuli-Interaktion auf unterschiedlichen Mikrotubulipopulationen vergleichen und ausschließlich bei Mikrotubuli im GDP-Zustand Taxol als Stabilisierungsmittel verwenden, kritisch betrachtet werden.

4.4 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Einfluss des Nukleotidzustandes auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion gezeigt werden. Die Nukleotid-bedingten strukturellen und mechanischen Unterschiede äußerten sich im Diffusionsverhalten, in der Gesamtanzahl und dem mobilen Anteil Tau. Neben dem Nukleotidzustand zeigte die Verwendung des in vitro in der Regel notwendigen Stabilisierungsgens Taxol ebenfalls einen Einfluss auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion.

Entgegen der bisherigen Annahme, Taxol könnte bei vorab polymerisierten Mikrotubuli, die in Anwesenheit oder in Abwesenheit von Taxol polymerisiert wurden, keine Änderungen der Tau-Interaktion mit Mikrotubuli verursachen (52,132), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Taxol-Zugabe selbst nach der Polymerisation der Mikrotubuli einen Unterschied machte. Weniger Taxol bedeutete für den GDP-Nukleotidstatus langsamer dissoziierende, schneller diffundierende und tendenziell mehr Tau-Moleküle auf Mikrotubuli. Auf Mikrotubuli im GTP-Zustand bewirkte Taxol eine langsamere Dissoziation sowie eine starke Reduktion der Gesamtanzahl Tau und der Anzahl diffundierender Tau-Moleküle. Studien, die den Einfluss des Nukleotidzustandes hinsichtlich der MAP-Mikrotubuli-Interaktion auf unterschiedlichen Mikrotubulipopulationen vergleichen und ausschließlich bei Mikrotubuli im GDP-Zustand Taxol als Stabilisierungsgens verwenden, sollten daher kritisch betrachtet werden.

Da im Fall von GTP-polymerisierten Mikrotubuli beim Verdünnen und Temperaturen unter Körpertemperatur nicht gänzlich auf Taxol verzichtet werden kann, wäre zu überlegen die Taxol-Menge unter Erhöhung der Versuchstemperatur mit Annäherung an 37°C Körpertemperatur weiter zu reduzieren.

Der Vergleich von Mikrotubuli in Anwesenheit gleicher, möglichst niedriger Taxol-Konzentrationen scheint sinnvoller zur Beurteilung der Einflüsse des Nukleotidzustandes von Tubulin. In der vorliegenden Arbeit betrug die niedrigste Taxol-Konzentration, die eingesetzt wurde, 1 μM .

Um den Taxol-Einfluss weiter charakterisieren zu können, wäre es sinnvoll auch höhere Taxol-Konzentrationen einzusetzen. Sowohl auf Mikrotubuli im GDP- als auch im GTP-Zustand konnten in Abhängigkeit von der eingesetzten Taxol-Konzentration Unterschiede in den funktionellen Parametern festgestellt werden.

Mit steigender Taxol-Konzentration reduzierte sich beispielsweise der Anteil diffundierender Tau-Moleküle auf Mikrotubuli im GTP-Zustand. In der vorliegenden Arbeit war die höchste Taxol-Konzentration, die standardmäßig verwendete von 10 μM .

In Bezug auf die Gesamtanzahl Tau und dem Verhältnis von diffundierenden zu stationären Tau-Molekülen könnte untersucht werden, ob eine Änderung der Parameter auftritt, wenn Tau bereits bei der Polymerisation verwendet wird.

Das Mikrotubulus-Wachstum erfolgt hauptsächlich am Plus-Ende (9,11). Eine erhöhte Tau-Konzentration konnte am Plus-Ende eines Mikrotubulus nachgewiesen werden (61). Da Tau der Stabilisierung der Mikrotubuli und der Unterstützung der Mikrotubulus-Polymerisation dient, sind unter physiologischen Bedingungen die inneren Bindungsstellen besetzt (65). Die äußeren Bindungsstellen können vom freien Tau besetzt werden, um durch Diffusion schneller die Plus-Enden zu kommen und die inneren Bindungsstellen zu erreichen. Die Anwesenheit von Tau bei der Polymerisation kann einen höheren Anteil an stationären Tau-Molekülen bewirken.

Da in dieser Arbeit Tau erst nach der Mikrotubulus-Polymerisation hinzugegeben wurde, ist davon auszugehen, dass bevorzugt die äußeren Bindungsstellen besetzt wurden. Darüber hinaus sinkt die Wahrscheinlichkeit des Durchdiffundierens von Tau zu den inneren Bindungsstellen bei längeren Mikrotubuli (68).

Es wäre interessant zu untersuchen, inwiefern sich die Gesamtmenge und vor allem das Verhältnis von mobilen zu stationären Tau-Molekülen ändern, wenn Tau bereits bei der Polymerisation eingesetzt wird.

Zudem könnte untersucht werden, ob und inwieweit der Taxol-Einfluss beeinträchtigt wird, wenn mehr Tau die inneren Bindungsstellen, die sich nahe der ebenfalls innen liegenden Taxol-Bindungsstellen befinden, besetzt.

Hinsichtlich des Einflusses der Tau-Konzentration auf die Tau-Mikrotubulus-Interaktion ab einer der Tau-Konzentration über 300 nM (126) wäre es außerdem interessant zu wissen, ob sich mit höheren Tau-Konzentrationen über 10 nM (pro 50 μM Tubulin) die Unabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten (68) bestätigen ließe und inwieweit das Verhältnis von diffundierenden zu stationären Tau-Molekülen bei Konzentrationserhöhung beeinflusst wäre.

Da Tau-Diffusion entlang von Mikrotubuli auch bei physiologischer Ionenstärke zu beobachten war, wäre es interessant Mikrotubuli im GTP-Zustand (GMPCPP) im Hinblick auf die Tau-Mikrotubulus-Interaktion unter verschiedenen Ionenstärken zu untersuchen.

Die Untersuchung weiterer physiologischer post-translationalen Mikrotubulus-Modifikationen im Hinblick auf die Tau-Mikrotubulus-Interaktion erscheint ebenfalls sinnvoll, um mehr Erkenntnisse über das zelluläre Tau-Verhalten zu gewinnen.

5. Zusammenfassung

Mikrotubuli bilden zusammen mit Intermediär- und Aktinfilamenten das Zytoskelett eukaryotischer Zellen. Sie sind essentiell am Motorprotein-vermittelten Transport von Vesikeln und Organellen, der Organisation des Golgi-Apparats und des Endoplasmatischen Retikulums sowie dem Aufbau des Spindelapparats während der Mitose beteiligt.

Unter physiologischen Bedingungen unterstützt das vor allem in Nervenzellen vorkommende Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau die Polymerisation von Mikrotubuli, schützt sie vor der Disassemblierung und fördert die parallele Anordnung von Mikrotubuli-Bündeln. Eine physiologische Funktion des Tau-Proteins ist somit für die Mikrotubulus-Stabilisierung und Aufrechterhaltung neurozellulärer Funktionen wichtig. Eine unphysiologische Tau-Funktion hingegen, welche beispielsweise im Rahmen der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Alzheimer mit stärker exprimiertem und zellulär mislokalisiertem Tau vorliegt, kann letztendlich zum Absterben der Neurone führen.

Diffusion von Tau entlang von Mikrotubuli ist eine Möglichkeit der Tau-Verteilung. In dieser Arbeit wurde die Tau-Mikrotubuli-Interaktion unter verschiedenen Ionenstärken untersucht. Durch die Zugabe unterschiedlicher Kaliumazetat-Konzentrationen (0 mM – 100 mM) kam es mit zunehmender Ionenstärke zum Anstieg des Diffusionskoeffizienten einzelner Tau-Moleküle entlang von Mikrotubuli. Gleichzeitig nahm die Interaktionszeit und die Anzahl stationärer sowie mobiler Tau-Moleküle ab.

Tau kommt in Nervenzellen axonal betont vor. Die in Zellen vorkommenden verschiedenen Modifizierungen von Mikrotubuli führten zu der Fragestellung, ob diese einen Einfluss auf das Verhalten und die zelluläre Verteilung von Tau haben könnten. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss des Nukleotidstatus von Mikrotubuli auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion untersucht. Mithilfe der Totalen internen Reflexions Fluoreszenz (TIRF)-Mikroskopie wurde auf Einzelmolekülebene das Verhalten von Tau-Molekülen auf zwei bezüglich ihres Nukleotidstatus unterschiedlichen Mikrotubulipopulationen, mit hydrolysierbarem GTP sowie mit dem durch Tubulin nicht hydrolysierbarem GTP-Analogon GMPCPP, beobachtet. Mittels Taxol stabilisierte GTP-Mikrotubuli spiegelten dabei den GDP-Zustand von Tubulin wider. Bei GMPCPP handelte es sich um ein nicht-hydrolysierbares GTP-Analogon, welches den GTP-Zustand von Mikrotubuli darstellte.

Sowohl entlang von GTP- als auch entlang von GMPCPP-Mikrotubuli konnte Diffusion einzelner Tau-Moleküle nachgewiesen werden. Die beobachteten mobilen Tau-Moleküle wiesen in Bezug auf den Diffusionskoeffizienten, der Gesamtmenge Tau und des auf Mikrotubuli mobilen Anteils signifikante Unterschiede auf: Tau diffundierte entlang von GTP-Mikrotubuli mit einem Diffusionskoeffizienten von $0,104 \mu\text{m}^2/\text{s}$ signifikant schneller als entlang von GMPCPP-Mikrotubuli mit einem Diffusionskoeffizienten von $0,078 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Die Gesamtmenge an Tau pro Mikrometer Mikrotubulus-Länge war auf GMPCPP mit 0,54 Tau-Molekülen pro Mikrometer signifikant höher als auf GTP-Mikrotubuli mit 0,45 Tau-Molekülen pro Mikrometer Mikrotubulus.

Neben einer größeren Gesamtmenge an Tau war ein signifikant höherer Anteil der Tau-Moleküle auf GMPCPP-Mikrotubuli mobil. Der prozentuale Anteil der mobilen Tau-Moleküle wies bei GMPCPP-Mikrotubuli einen Wert von 61 % und bei GTP-Mikrotubuli einen Wert von 45 % auf.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass der Nukleotidstatus von Mikrotubuli einen signifikanten Einfluss auf das Verhalten von Tau bezüglich des Diffusionskoeffizienten, der Gesamtmenge an Tau auf Mikrotubuli und des mobilen Anteils hat. Neben dem Einfluss des Nukleotidstatus von Mikrotubuli zeigte sich außerdem ein Einfluss des Stabilisierungs-Agens Taxol auf die Interaktion von Tau und Mikrotubuli. Die Zugabe unterschiedlicher Taxol-Konzentrationen zu vorab polymerisierten GTP- oder GMPCPP-Mikrotubuli führte zu Änderungen im Diffusionsverhalten, der Gesamtanzahl und des Verhältnisses von mobilen zu stationären Tau-Molekülen.

6. Literaturverzeichnis

1. Desai A, Mitchison T. Microtubule Polymerization. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997; 13:83-117.
2. Kirschner MW. Microtubule Assembly and Nucleation. *Int Rev Cytol.* 1978; 54:1-71.
3. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72(5):1858-1862.
4. Cleveland DW, Sullivan KF. Molecular Biology and Genetics of Tubulin. *Annu Rev Biochem.* 1985; 54:331-365.
5. Erickson HP, O'Brien ET. Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.* 1992; 21:145-166.
6. Howard J, Hyman AA. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature.* 2003; 422(6933):753-758.
7. Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. High-resolution model of the microtubule. *Cell.* 1999; 96(1):79-88.
8. Carrier MF. Role of Nucleotide Hydrolysis in the Dynamics of Actin Filaments and Microtubules. *Int Rev Cytol.* 1989; 115:139-170.
9. Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 1984; 312(5991):237-242.
10. Howard J, Hudspeth AJ, Vale RD. Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature.* 1989; 342(6246):154-8.
11. Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.* 1998; 391(6663):199-203.
12. Melki R, Carrier MF, Pantaloni D, Timasheff SN. Cold Depolymerization of Microtubules to Double Rings: Geometric Stabilization of Assemblies. *Biochemistry.* 1989; 28(23):9143-9152.
13. Alushin GM, Lander GC, Kellogg EH, Zhang R, Baker D, Nogales E. High-Resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell.* 2014; 157(5):1117-1129.
14. Bechstedt S, Brouhard GJ. Doublecortin Recognizes the 13-Protofilament Microtubule Cooperatively and Tracks Microtubule Ends. *Dev Cell.* 2012; 23(1):181-192.
15. Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science.* 1998; 279(5350):519-526.
16. Valiron O, Caudron N, Job D. Microtubule dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2001; 58(14):2069-2084.
17. <https://de.wikipedia.org/wiki/Mikrotubulus>, 2016.
18. Donhauser ZJ, Jobs WB, Binka EC. Mechanics of microtubules: Effects of protofilament orientation. *Biophys J.* 2010; 99(5):1668-1675.

19. Ludueña RF. Multiple forms of tubulin: Different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol.* 1997; 178:207-275.
20. Fukushima N, Furuta D, Hidaka Y, Moriyama R, Tsujiuchi T. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem.* 2009; 109(3):683-693.
21. Song Y, Kirkpatrick LL, Schilling AB, Helseth DL, Chabot N, Keillor JW, et al. Transglutaminase and Polyamination of Tubulin: Posttranslational Modification for Stabilizing Axonal Microtubules. *Neuron.* 2013; 78(1):109-123.
22. Vale RD, Coppin CM, Malik F, Kull FJ, Milligan RA. Tubulin GTP hydrolysis influences the structure, mechanical properties, and kinesin-driven transport of microtubules. *J Biol Chem.* 1994; 269(38):23769-23775.
23. Mandelkow E, Mandelkow EM. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1995; 7(1):72-81.
24. Mitchison TJ. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science (80-).* 1993; 261(5124):1044-1047.
25. Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.* 2001; 69:277-302.
26. Hyman AA, Salser S, Drechsel DN, Unwin N, Mitchison TJ. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: Information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell.* 1992; 3(10):1155-1167.
27. Evans L, Mitchison T, Kirschner M. Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J Cell Biol.* 1985; 100(4):1185-1191.
28. Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T. Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature.* 1995; 378(6557):578-583.
29. Mandelkow EM, Mandelkow E, Milligan RA. Microtubule dynamics and microtubule caps: A time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol.* 1991; 114(5):977-991.
30. Kueh HY, Mitchison TJ. Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. *Science.* 2009; 325(5943):960-963.
31. Sui H, Downing KH. Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. *Structure.* 2010; 18(8):1022-1031.
32. Ray S, Meyhöfer E, Milligan RA, Howard J. Kinesin follows the microtubule's protofilament axis. *J Cell Biol.* 1993; 121(5):1083-1093.
33. Middleton K, Carbon J. KAR3-encoded kinesin is a minus-end-directed motor that functions with centromere binding proteins (CBF3) on an in vitro yeast kinetochore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(15):7212-7216.
34. Mallik R, Gross SP. Molecular motors: Strategies to get along. *Current Biology.* 2004; 14(22):R971-82.
35. Tucker RP. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Research Reviews.* 1990; 15(2):101-120.

36. Hirokawa N. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1994; 6(1):74-81.
37. Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol.* 1977; 116(2):227-247.
38. Drubin DG, Kirschner MW. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol.* 1986; 103(6 Pt 2):2739-2746.
39. Schoenfeld TA, Obar RA. Diverse Distribution and Function of Fibrous Microtubule-Associated Proteins in the Nervous System. *Int Rev Cytol.* 1994; 1:67-137.
40. Schweers O, Schönbrunn-Hanebeck E, Marx A, Mandelkow E. Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for β -structure. *J Biol Chem.* 1994; 69(39):24290-24297.
41. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* 1989; 3(4):519-526.
42. Friedhoff P, Von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E. Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease.* 2000; 1502(1):122-132.
43. Brandt R. The tau proteins in neuronal growth and development. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 1996; 1:d118-30.
44. Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 1990; 9(13):4225-4230.
45. Lee Virginia MY, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L, Miller BI, et al. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* (80-). 1998; 282(5395):1914-1917.
46. Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol.* 1988; 107(4):1449-1459.
47. Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, et al. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca^{2+} -calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *EMBO J.* 1990; 9(11):3539-3544.
48. Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature.* 1992; 360(6405):674-677.
49. Butner KA, Kirschner MW. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol.* 1991; 115(3):717-730.
50. Goode BL, Feinstein SC. Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol.* 1994; 124(5):769-782.

51. Panda D, Goode BL, Feinstein SC, Wilson L. Kinetic Stabilization of Microtubule Dynamics at Steady State by Tau and Microtubule-Binding Domains of Tau. *Biochemistry*. 1995; 34(35):11117-11127.
52. Makrides V, Massie MR, Feinstein SC, Lew J. Evidence for two distinct binding sites for tau on microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(17):6746-6751.
53. Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Domains of τ Protein and Interactions with Microtubules. *Biochemistry*. 1994; 33(32):9511-9522.
54. Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow E, Mandelkow EM. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell*. 1995; 6(12):1887-1902.
55. Littauer UZ, Givon D, Thierauf M, Ginzburg I, Ponstingl H. Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83(19):7162-7166.
56. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous central nervous. *J Cell Biol*. 1985; 101(4):1371-1378.
57. Migheli A, Butler M, Brown K, Shelanski ML. Light and electron microscope localization of the microtubule-associated tau protein in rat brain. *J Neurosci*. 1988; 8(6):1846-1851.
58. Papasozomenos SC, Binder LI. Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1987; 8(3):210-226.
59. Wang Y, Loomis PA, Zinkowski RP, Binder LI. A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *J Cell Biol*. 1993; 121(2):257-267.
60. Sloboda RD, Rosenbaum JL. Decoration and Stabilization of Intact, Smooth-Walled Microtubules with Microtubule-Associated Proteins. *Biochemistry*. 1979; 18(1):48-55.
61. Black MM, Slaughter T, Moshiah S, Obrocka M, Fischer I. Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J Neurosci*. 1996; 16(11):3601-3619.
62. Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol*. 2002; 157(7):1187-1196.
63. Santarella RA, Skiniotis G, Goldie KN, Tittmann P, Gross H, Mandelkow EM, et al. Surface-decoration of microtubules by human tau. *J Mol Biol*. 2004; 339(3):539-553.
64. Amos LA, Löwe J. How Taxol® stabilises microtubule structure. *Chemistry and Biology*. 1999; 6(3):R65-9.
65. Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M, Amos LA. Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J*. 2003; 22(1):70-77.

66. Ackmann M, Wiech H, Mandelkow E. Nonsaturable binding indicates clustering of Tau on the microtubule surface in a paired helical filament-like conformation. *J Biol Chem.* 2000; 275(39):30335-30343.
67. Biernat J, Mandelkow EM, Schröter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, et al. The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J.* 1992; 11(4):1593-1597.
68. Hinrichs MH, Jalal A, Brenner B, Mandelkow E, Kumar S, Scholz T. Tau protein diffuses along the microtubule lattice. *J Biol Chem.* 2012; 287(46):38559-38568.
69. Woody RW, Clark DC, Roberts GCK, Martin SR, Bayley PM. Molecular Flexibility in Microtubule Proteins: Proton Nuclear Magnetic Resonance Characterization. *Biochemistry.* 1983; 22(9):2186-2192.
70. Lu M, Kosik KS. Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol Biol Cell.* 2001; 12(1):171-184.
71. Samsonov A, Yu JZ, Rasenick M, Popov S V. Tau interaction with microtubules in vivo. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt 25):6129-6141.
72. Drewes G, Ebner A, Mandelkow EM. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23(8):307-311.
73. Mandelkow EM, Thies E, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow E. MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J Cell Biol.* 2004; 167(1):99-110
74. Mandelkow EM, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of Tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2012; 2(7):a006247.
75. Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell.* 1992; 3(10):1141-1154.
76. Montejó de Garcini E, de la Luna S, Dominguez JE, Avila J. Overexpression of tau protein in COS-1 cells results in the stabilization of centrosome-independent microtubules and extension of cytoplasmic processes. *Mol Cell Biochem.* 1994; 130(2):187-196.
77. Saxton WM, Hollenbeck PJ. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci.* 2012; 125(Pt 9):2095-2104.
78. Panda D, Samuel JC, Massie M, Feinstein SC, Wilson L. Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: Implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(16):9548-9553.
79. Thies E, Mandelkow EM. Misrouting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1. *J Neurosci.* 2007; 27(11):2896-2907.

80. Perez M, Santa-Maria I, De Barreda EG, Zhu X, Cuadros R, Cabrero JR, et al. Tau - An inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J Neurochem.* 2009; 109(6):1756-1766.
81. Brandt R, Lee G. Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *J Biol Chem.* 1993; 268(5):3414-3419.
82. Brandt R, Lee G. Orientation, assembly, and stability of microtubule bundles induced by a fragment of tau protein. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1994; 28(2):143-154.
83. Felgner H, Frank R, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, Ludin B, et al. Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J Cell Biol.* 1997; 138(5):1067-1075.
84. Brandt R, Léger J, Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol.* 1995; 131(5):1327-1340.
85. Seitz A, Kojima H, Oiwa K, Mandelkow EM, Song YH, Mandelkow E. Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *EMBO J.* 2002; 21(18):4896-4905.
86. Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol.* 2002; 156(6):1051-1063.
87. Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur ELF. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* (80-). 2008; 319(5866):1086-1089.
88. Baas PW, Pienkowski TP, Kosik KS. Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization. *J Cell Biol.* 1991; 115(5):1333-1344.
89. Knops J, Kosik KS, Lee G, Pardee JD, Cohen-Gould L, McConlogue L. Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol.* 1991; 114(4):725-733.
90. Aronov S, Aranda G, Behar L, Ginzburg I. Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci.* 2002; 115(Pt 19):3817-3827.
91. Hirokawa N, Funakoshi T, Sato-Harada R, Kanai Y. Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J Cell Biol.* 1996; 132(4):667-679.
92. Konzack S, Thies E, Marx A, Mandelkow EM, Mandelkow E. Swimming against the tide: Mobility of the microtubule-associated protein tau in neurons. *J Neurosci.* 2007; 27(37):9916-9927.
93. Scholz T, Mandelkow E. Transport and diffusion of Tau protein in neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2014; 71(16):3139-3150.

94. Litman P, Barg J, Rindzoonski L, Ginzburg I. Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: Implications for neuronal polarity. *Neuron*. 1993; 10(4):627-638.
95. Yamazaki H, Nakata T, Okada Y, Hirokawa N. KIF3A/B: A heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. *J Cell Biol*. 1995; 130(6):1387-1399.
96. Mercken M, Fischer I, Kosik KS, Nixon RA. Three distinct axonal transport rates for tau, tubulin, and other microtubule-associated proteins: Evidence for dynamic interactions of tau with microtubules in vivo. *J Neurosci*. 1995; 15(12):8259-8267.
97. Utton MA, Noble WJ, Hill JE, Anderton BH, Hanger DP. Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and α -synuclein. *J Cell Sci*. 2005; 118(Pt 20):4645-4654.
98. Utton MA, Connell J, Asuni AA, Van Slegtenhorst M, Hutton M, De Silva R, et al. The slow axonal transport of the microtubule-associated protein tau and the transport rates of different isoforms and mutants in cultured neurons. *J Neurosci*. 2002; 22(15):6394-6400.
99. Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E. Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. In: *Neurobiology of Aging*. 2003; 24(8):1079-1085.
100. Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow E, Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*. 1993; 11(1):153-163.
101. Ballatore C, Lee VMY, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007; 8(9):663-672.
102. Li X, Kumar Y, Zempel H, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E. Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *EMBO J*. 2011; 30(23):4825-4837.
103. Helenius J, Brouhard G, Kalaidzidis Y, Diez S, Howard J. The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends. *Nature*. 2006; 441(7089):115-119.
104. Berry RW, Quinn B, Johnson N, Cochran EJ, Ghoshal N, Binder LI. Pathological glial tau accumulations in neurodegenerative disease: Review and case report. *Neurochem Int*. 2001; 39(5-6):469-479.
105. Tolnay M, Probst A. The neuropathological spectrum of neurodegenerative tauopathies. *IUBMB Life*. 2003; 55(6):299-305.
106. Williams DR. Tauopathies: Classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. *Internal Medicine Journal*. 2006; 36(10):652-660.

107. Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, et al. Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron*. 2010; 68(6):1067-1081.
108. Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau as a marker for Alzheimer's disease. *Trends Biochem Sci*. 1993; 18(12):480-483.
109. Hernández F, Avila J. Tauopathies. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007; 64(17):2219-2233.
110. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr f Psychiatr u Psych-Gerichtl Med*. 1907; 64(1-2):146-148.
111. Lee VM-Y, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative Tauopathies. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24:1121-1159.
112. Buée-Scherrer V, Hof PR, Buée L, Leveugle B, Vermersch P, Perl DP, et al. Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol*. 1996; 91(4):351-359.
113. Kovacs GG, Majtenyi K, Spina S, Murrell JR, Gelpi E, Hoftberger R, et al. White matter tauopathy with globular glial inclusions: A distinct sporadic frontotemporal lobar degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008; 67(10):963-975.
114. Vermersch P, Wattez A, Delacourte A, Robitaille Y, Bernier L, Gauvreau D. Biochemical mapping of neurofibrillary degeneration in a case of progressive supranuclear palsy: evidence for general cortical involvement. *Acta Neuropathol*. 1994; 87(6):572-577.
115. Braak H, Braak E. [Morphological changes in the human cerebral cortex in dementia]. *J Hirnforsch*. 1991; 32(3):277-282.
116. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002; 298(5594):789-791.
117. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002; 297(5580):353-356.
118. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's Disease: The many paths to brain failure supplementary appendix. *N Engl J Med*. 2010; 362(4):329-344.
119. Nakata T, Niwa S, Okada Y, Perez F, Hirokawa N. Preferential binding of a kinesin-1 motor to GTP-tubulin-rich microtubules underlies polarized vesicle transport. *J Cell Biol*. 2011; 194(2):245-255.
120. Desai A, Mitchison TJ. [12] Preparation and characterization of caged fluorescein tubulin. *Methods Enzymol*. 1998; 298:125-132.
121. Thompson NL, Burghardt TP, Axelrod D. Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. *Biophys J*. 1981; 33(3):435-454.
122. Amrute-Nayak M, Antognozzi M, Scholz T, Kojima H, Brenner B. Inorganic phosphate binds to the empty nucleotide binding pocket of conventional myosin II. *J Biol Chem*. 2008; 283(7):3773-3781.

123. Kirschner M, Mitchison T. Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. *Cell*. 1986; 45(3):329-342.
124. Sindelar C V., Downing KH. An atomic-level mechanism for activation of the kinesin molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(9):4111-4116.
125. Redwine WB, Hernández-López R, Zou S, Huang J, Reck-Peterson SL, Leschziner AE. Structural basis for microtubule binding and release by dynein. *Science* (80-). 2012; 337(6101):1532-1536.
126. Mcvicker DP, Hoeprich GJ, Thompson AR, Berger CL. Tau interconverts between diffusive and stable populations on the microtubule surface in an isoform and lattice specific manner. *Cytoskeleton*. 2014; 71(3):184-194.
127. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, Mcphail AT. Plant Antitumor Agents.VI.The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*2. *J Am Chem Soc*. 1971; 93(9):2325-2327.
128. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol [19]. *Nature*. 1979; 277(5698):665-667.
129. Amos LA. Focusing-in on microtubules. *Current Opinion in Structural Biology*. 2000; 10(2):236-241.
130. Díaz JF, Valpuesta JM, Chacón P, Diakun G, Andreu JM. Changes in microtubule protofilament number induced by taxol binding to an easily accessible site: Internal microtubule dynamics. *J Biol Chem*. 1998; 273(50):33803-33810.
131. Kumar N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *J Biol Chem*. 1981; 256(20):10435-10441.
132. Ross JL, Santangelo CD, Makrides V, Fygenson DK. Tau induces cooperative Taxol binding to microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(35):12910-12915.
133. Peck A, Sargin ME, LaPointe NE, Rose K, Manjunath BS, Feinstein SC, et al. Tau isoform-specific modulation of kinesin-driven microtubule gliding rates and trajectories as determined with tau-stabilized microtubules. *Cytoskeleton*. 2011; 68(1):44-55.
134. Li C, Ru CQ, Mioduchowski A. Length-dependence of flexural rigidity as a result of anisotropic elastic properties of microtubules. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 349(3):1145-1150.
135. Kawaguchi K, Yamaguchi A. Temperature dependence rigidity of non-taxol stabilized single microtubules. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 402(1):66-69.
136. Gittes F, Mickey B, Nettleton J, Howard J. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol*. 1993; 120(4):923-934.
137. Dye RB, Fink SP, Williams RC. Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. *J Biol Chem*. 1993; 268(10):6847-6850.

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nm. 6 und 7 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, dass ich die in der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Einfluss des Nukleotidstatus von Tubulin auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion

In dem Institut für Molekular- und Zellphysiologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung und Unterstützung von Herrn Dr. rer. nat. Tim Scholz ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Hannover, den

9. Publikationsliste

Originalarbeiten

Maik H. Hinrichs, Avesta Jalal, Bernhard Brenner, Eckhard Mandelkow, Satish Kumar, Tim Scholz. Tau protein diffuses along the microtubule lattice. J Biol Chem 2012 Nov 9;287(46):38559-38568.

Publizierte Kongressbeiträge/Poster

2012 Posterpräsentation 56. Jahrestagung der Biophysical Society, 25. – 29. Februar 2012, San Diego, USA.

Maik H. Hinrichs, Avesta Jalal, Bernhard Brenner, Eckhard Mandelkow, Tim Scholz. One-Dimensional Diffusion of Tau Protein Guided by the Microtubule Lattice. Biophysical Journal 102(3) pp. 700a.

2015 Posterpräsentation Symposium 50 Jahre MHH

Maik H. Hinrichs, Hanna S. Müller, Avesta Jalal, Bernhard Brenner, Eckhard Mandelkow, Tim Scholz. Tau protein diffuses along the microtubule lattice – a single molecule study

10. Erklärung über für Publikationen genutzte Teilergebnisse dieser Arbeit

Hiermit erkläre ich, welche Daten der vorliegenden Doktorarbeit bereits in dem begutachteten und publizierten wissenschaftlichen Artikel Hinrichs et al., 2012 „Tau protein diffuses along the microtubule lattice“ verwendet wurden.

- Abbildung 1D in Hinrichs et al. (Tau molecules diffuses along MTs) und Abbildung 3.4 in dieser Arbeit (Vergleich ungerichtete und gerichtete Bewegung): Beschriftung wurde ins Deutsche übersetzt.

- Abbildung 4 A-D in Hinrichs et al. (The diffusion of Tau molecules along MTs is sensitive to ionic strength and pH) und Abbildung 3.11 in dieser Arbeit (Zusammenfassung Diffusionsverhalten von Tau und Ionenstärke): ein Ausschnitt der Abbildung wurde verwendet und ins Deutsche übersetzt.

- In dieser Arbeit 3.4.2 (Einfluss der Ionenstärke auf die Diffusion von hTau40): Unter Zugabe unterschiedlicher Kaliumazetatkonzentrationen (0 – 100 mM) wurden in Hinrichs et al. die Werte für den mittleren Diffusionskoeffizienten, die Interaktionszeit und -distanz publiziert und Diffusion unter physiologischer Ionenstärke gezeigt.

11. Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Theresia Kraft für die Möglichkeit meine Dissertation in ihrem Institut für Molekular- und Zellphysiologie durchführen zu können.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Tim Scholz für die Bereitstellung des Themas und die außerordentlich gute Betreuung, Hilfe, Unterstützung und Geduld während der gesamten Promotionszeit, die zum Gelingen dieser wissenschaftlichen Arbeit beigetragen hat.

Frau Dr. Maike Hinrichs und Petra Uta möchte ich für die gute Zusammenarbeit, die Einarbeitung und Unterstützung im Labor danken. Für die technische Betreuung und Instandhaltung des TIRF-Mikroskops danke ich Torsten Beier.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinem Ehemann, meiner wundervollen Tochter Liah und meinen Eltern für die stete Unterstützung in allen Lebenslagen und ihren Glauben an mich. Vielen Dank für die Geduld und Unterstützung während des Examens, der kieferorthopädischen Weiterbildung und der Promotion.