



Institut für Biochemie und Signaltransduktion AG Cytoskeletal Dynamics

# Funktion der Mikrotubuli-modulierenden Aktivität von DIAPH2 beim Chromosomen-Alignment

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines *Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)* im Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

> vorgelegt von Saskia Sybille Grüb

> > Hamburg, 2019

Tag der Disputation: 15.03.2019

Datum der Freigabe: 15.03.2019

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sascha Rohn und PD. Dr. rer. nat. Sabine Windhorst

Diese Dissertation wurde von April 2016 bis Januar 2019 bei Frau PD. Dr. Sabine Windhorst im Laboratorium für *Cytoskeletal Dynamics*, dem Institut für Biochemie und Signaltransduktion des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) durchgeführt.

UKE, Gebäude N45 Rothe-Geussenhainer-Haus, Martinistraße 52, 20246 Hamburg

# Inhaltsverzeichnis

| I.   | Pub         | likationen und Präsentationen   | VI    |  |
|------|-------------|---|-------|--|
| II.  | Abk         | ürzungsverzeichnis  | . VII |  |
| III. | Abb         | AbbildungsvrzeichnisX   |       |  |
| IV.  | Tab         | TabellenverzeichnisXII  |       |  |
| 1    | Zusa        | ammenfassung  | 1     |  |
| 2    | Abst        | tract   | 2     |  |
| 3    | Einl        | eitung und Theorie  | 3     |  |
| 3.1  | Der         | eukaryotische Zellzyklus im Überblick   | 3     |  |
|      | 3.1.1       | Die eukaryotische Mitose  | 4     |  |
|      | 3.1.2       | Der Aufbau und die Regulation von MTs   | 7     |  |
|      | 3.1.3       | MT-Dynamik und Regulation in der Mitose   | 8     |  |
| 3.2  | MT-         | -Zytoskelett assoziierte Proteine   | 10    |  |
| 3.3  | Das         | Aktin-Zytoskelett   | 13    |  |
|      | 3.3.1       | Aktindynamik des Zytoskeletts   | 13    |  |
| 3.4  | Form        | nine  | 16    |  |
|      | 3.4.1       | Relevanz von Forminen für die Entstehung von Krebserkrankungen                                      | 17    |  |
|      | 3.4.2       | DIAPH-Proteine  | 17    |  |
| 3.5  | DIA         | PH2 (mDia3)   | 21    |  |
| 4    | Ziels       | setzung   | 23    |  |
| 5    | Erge        | ebnisse   | 24    |  |
| 5.1  | DIA         | PH2 in kolorektalen Karzinomzellen  | 24    |  |
|      | 5.1.1       | DIAPH2 kontrolliert die Chromosomenausrichtung in kolorektalen<br>Karzinomzellen                    | 24    |  |
|      | 5.1.2       | Der Einfluss von DIAPH2 auf die Chromosomenkinetik  | 28    |  |
|      | 5.1.3       | DIAPH2 kolokalisiert mit MT-Spindeln und verändert die Spindel-MT-                                  |       |  |
|      | 01110       | Dynamik   | 32    |  |
|      | 5.1.4       | Effekt der DIAPH2-Stimulation auf die Spindeldynamik  | 36    |  |
| 5.2  | In V        | <i>itro</i> -Analysen von DIAPH2, DIAPH2-FH2-Domäne und ΔFH2-DIAPH2 .                               | 37    |  |
|      | 5.2.1       | Bakterielle Expression und intrazelluläres Verhältnis von DIAPH2                                    | 37    |  |
|      | 5.2.2       | DIAPH2 beeinflusst die MT-Polymerisation  | 40    |  |
|      | 5.2.3       | DIAPH2 verändert die MT-Struktur  | 41    |  |
|      | 5.2.4       | DIAPH2-Proteine schützen MTs gegen eine kälteinduzierte Depolymerisation                            | on48  |  |
| 6    | Disk        | xussion   | 50    |  |
| 6.1  | DIA<br>Mito | PH2 steuert die Spindel-MT-Dynamik und die korrekte Anbindung der<br>ose-Spindel an die Chromosomen | 50    |  |

| 6.2 | Ein verminderter DIAPH2-Gehalt führt zu einer verlängerten Mitose durch die<br>Inhibierung der Spindel-Alignment-Checkpoints51 |  |         |
|-----|--|--|---------|
| 6.3 | Ein v<br>Proli   | verminderter DIAPH2-Gehalt führt zu einer verringerten Migration une<br>iferation der Kolonkarzinom-Zellen | d<br>52 |
| 6.4 | DIAPH2 reguliert die Spindel-MT-Dynamik unabhängig von Cdc42   |  |         |
| 6.5 | <i>In vitro</i> stabilisieren oder polymerisieren DIAPH2, DIAPH2-FH2-Domäne und<br><b>AFH2-DIAPH2 MT-Filamente</b> 5           |  |         |
| 6.6 | DIAPH2 bindet MTs durch eine zweite, bisher nicht charakterisierte MT-<br>Bindungsdomäne                                       |  |         |
| 7   | Zusa   | mmenfassung und Ausblick   | 57      |
| 8   | Mate   | erial und Methoden   | 58      |
| 8.1 | Mate   | erialien und Geräte  | 58      |
|     | 8.1.1  | Chemikalien  | 58      |
|     | 8.1.1  | Laborgeräte  | 59      |
| 8.2 | Vert   | prauchsmaterialien   | 60      |
|     | 8.2.1  | Puffer und Lösungen  | 61      |
|     | 8.2.2  | Kits   | 62      |
|     | 8.2.3  | Bakterienstämme und Enzyme   | 63      |
|     | 8.2.1  | Antikörper   | 63      |
|     | 8.2.2  | Expressionskonstrukte  | 65      |
|     | 8.2.3  | Software   | 66      |
| 8.3 | Mole   | ekularbiologische Arbeiten   | 66      |
|     | 8.3.1  | Klonierung   | 66      |
|     | 8.3.2  | Vervielfältigung der DNA   | 67      |
|     | 8.3.3  | PA-Tailing   | 68      |
|     | 8.3.4  | <i>pGEM</i> <sup>®</sup> - <i>T Easy</i> Ligation  | 68      |
|     | 8.3.5  | Transformation von Plasmid-DNA in <i>Ecoli</i>   | 69      |
|     | 8.3.6  | DNA-Isolierung aus <i>Ecoli</i>  | 69      |
|     | 8.3.7  | Restriktionsverdau und Isolation von Insert und Vektor-Backbone  | 69      |
|     | 8.3.8  | Ligation in den pGEX-6P-2A-Vektor  | 70      |
|     | 8.3.9  | Quickchange-Mutagenese für DIAPH2-Domänen  | 71      |
| 8.4 | In vi  | <i>tro</i> -Versuche mit rekombinantem DIAPH2, FH2 und ΔFH2  | 73      |
|     | 8.4.1  | Rekombinante Expression in BL21(DE3)pLysS-Ecoli  | 73      |
|     | 8.4.2  | Pyren-Aktin-Polymerisierung und -Depolymerisierung   | 74      |
|     | 8.4.3  | Aktin-Polymerisations-Visualisierung   | 74      |
|     | 8.4.4  | Protein-MT-Interaktion und Bindung   | 75      |
|     | 8.4.5  | Protein-MT-Bündelung   | 75      |

|      | 8.4.6  | Analyse der MT-Polymerisation  | . 76 |
|------|--------|--|------|
|      | 8.4.7  | Analyse von Rhodamin-konjugierten MTs per Fluoreszenz-Mikroskopie      | . 76 |
| 8.5  | Zellb  | iologische Methoden  | . 77 |
|      | 8.5.1  | Zellen und Zellkultur  | . 77 |
|      | 8.5.2  | Herstellung lentiviral-transduzierter DIAPH2-KO Zellen                 | . 78 |
|      | 8.5.3  | Quantifikation des mRNA Levels   | . 79 |
|      | 8.5.4  | Proliferations- und Apoptosemessung                                    | . 80 |
|      | 8.5.5  | Adhäsion der Zellen  | . 80 |
|      | 8.5.6  | Migration der Zellen   | . 80 |
|      | 8.5.7  | Analyse des Koloniebildungspotentials                                  | . 81 |
|      | 8.5.8  | Synchronisation der Zellen zur Bestimmung des chromosomalen Alignments | 81   |
|      | 8.5.9  | Metaphase-Chromosomen Präparation                                      | . 82 |
|      | 8.5.10 | Messung der Mitosedauer; H2B-gelabelte Histone in der Zellteilung      | . 82 |
| 8.6  | Prote  | einchemische Arbeitsmethoden   | . 82 |
|      | 8.6.1  | Herstellung von Protein-Lysaten für den Western-Blot                   | . 82 |
|      | 8.6.2  | Western-Blot (WB)  | . 83 |
|      | 8.6.3  | Messung der Cdc42-Aktivität durch den PAK-Pull-down                    | . 83 |
|      | 8.6.4  | Analyse von stabilisierten MTs per WB                                  | . 84 |
| 8.7  | Imm    | unfluoreszenzfärbung   | . 84 |
|      | 8.7.1  | PFA-Fixierung und Färben von Immunfluoreszenz-Proben                   | . 84 |
|      | 8.7.2  | Methanol-Fixierung zur Färbung der detyrMTs                            | . 84 |
| 8.8  | Statis | stische Analyse  | . 85 |
| 9    | Liter  | atur   | . 86 |
| 10   | Anha   | ng   | . 96 |
| 10.1 | Vekt   | orkarten   | . 96 |
|      | 10.1.1 | <i>pGEM</i> <sup>®</sup> - <i>T Easy</i> -Vektoren                     | . 96 |
|      | 10.1.2 | pGEX-6P-2A-Vektoren  | . 99 |
| 10.2 | Siche  | rheit und Entsorgung1  | 103  |
|      | 10.2.1 | Verwendete Gefahrstoffe  | 103  |
|      | 10.2.2 | Schlüssel für H-Sätze 1  | 105  |
|      | 10.2.3 | Schlüssel für P-Sätze  | 106  |
| 11   | Dank   | sagung1  | 108  |
| 12   | Eides  | sstattliche Erklärung 1  | 110  |

# I. Publikationen und Präsentationen

# **Eigene Publikationen**

- Grüb S.S., Muhs S., Schmitt S., Geyer M., Lin Y.N. und Windhorst S.; "The formin DIAPH2 controls microtubule dynamics in colorectal cancer cells independent of its FH2-domain" nach Revision erneut zur Begutachtung bei "Scientific Reports"
- Bäder S., Glaubke E., Grüb S., Muhs S., Wellbrock J., Nalaskowski M., Lange T., und Windhorst S.; "Effect of the actin- and calcium-regulating activities of ITPKB on the metastatic potential of lung cancer cells" Biochemical Journal Jun 2018, doi: 10.1042/BCJ20180238
- 3. Di Lorenzo G., Velho R.V., Winter D., Thelen M., Ahmadi S., Schweizer M., De Pace R., Cornils K., Yorgan T.A., Grüb S., Hermans-Borgmeyer I., Schinke T., Müller-Loennies S., Braulke T. und Pohl S.; "Lysosomal Proteome and Secretome Analysis Identifies Missorted Enzymes and Their Nondegraded Substrates in Mucolipidosis III Mouse Cells" Mol Cell Proteomics Aug 2018 doi: 10.1074/mcp.RA118.000720
- Heinz L.S., Muhs S., Schiewek J., Grüb S., Nalaskowski M., Lin Y.N., Wikman H., Oliveira-Ferrer L., Lange T., Wellbrock J., Konietzny A., Mikhaylova M., und Windhorst S.; "Strong fascin expression promotes metastasis independent of its F-actin bundling activity" Oncotarget. Nov 2017, doi: 10.18632/oncotarget.22249

# Eigene Vorträge

2018

Retreat des Universitäres Cancer Center Hamburg in Jesteburg mit dem Vortrag: "DIAPH2 controls microtubule dynamics in colorectal cancer cells independent of its FH2-domain"

# **Eigene Poster Präsentationen**

2018

Rom, internationale Konferenz "*Cancer and Oncotherapie*" Von der Scientifictree Group **Posterpreis** für die Posterpräsentation "**DIAPH2 controls microtubule dynamics in colorectal cancer cells independent of its FH2-domain**"

2017

Berlin, internationale Konferenz "Sharing radically novel visions in Cancer" und "Young Scientists in Cancer Research" Satellite PhD Symposium

Des Molecular Cancer Research Center (MKFZ) der Charité-University Medical Center Posterpräsentation über **"Role of the formin DIAPH2 in CIN"** 

# II. Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung   |
|-----------|---|
| °C        | Grad Celsius  |
| A. dest.  | Destilliertes Wasser                                |
| aa        | Aminosäure (Aminoacid)                              |
| ABP       | Aktinbindeprotein                                   |
| ADP       | Adenosindiphosphat                                  |
| Amp       | Ampicillin  |
| APC       | Adenomatous-polyposis-coli                          |
| APS       | Ammonium <b>p</b> ersulfat                          |
| Arp2/3    | Actin-related protein 2/3                           |
| AseI      | Restriktionsenzym, spaltet DNA der Sequenz: ATTAAT  |
| ATCC      | American Type tissue Culture Collection             |
| ATP       | Adenosintriphosphat                                 |
| Bni1      | Bud neck involved protein                           |
| bp        | Basenpaar   |
| BSA       | Bovines Serumalbumin                                |
| Cdc42     | Cell division control protein 42 homolog            |
| cDNA      | Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary |
|           | deoxyribonucleic acid)                              |
| CIN       | Chromosomale Instabilität                           |
| Cobl      | Cordon-bleu protein                                 |
| Ct        | Cycle of threshold                                  |
| Daam      | Dishevelled-associated activator of morphogenesis   |
| DAD       | Diaphanous autoregulatorische Domäne                |
| DAPI      | 4',6-diamidino-2-phenylindole                       |
| DD        | Dimerisierungs-Domäne                               |
| DetyrMT   | Detyrosinierte Mikrotubuli                          |
| DIAPH     | Drosophila-homolog von <b>Diaph</b> anous           |
| DID       | Diaphanous inhibitorische Domäne                    |
| DMEM      | Dulbecco's modified Eagle's medium                  |
| DMSO      | Dimethylsulfoxid                                    |
| DNA       | Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)      |

| DpnI             | Restriktionsenzym, spaltet methylierte DNA                       |
|------------------|--|
| Dr. rer. nat.    | Doctor rerum naturalium  |
| DTT              | Dithiothreitol   |
| EB1              | End-binding protein 1  |
| ECM              | Extrazelluläre Matrix <i>(extracellular matrix)</i>              |
| EcoRI            | Restriktionsenzym, spaltet DNA der Sequenz: GAATTC               |
| EDTA             | Ethylenediaminetetraacetic acid                                  |
| ESPL1            | Separase (Extra spindle poles-like 1 protein)                    |
| F-Aktin          | Filamentöses Aktin   |
| FCS              | Fötales Kälberserum (fetal calf serum)                           |
| FH1/2/3          | Formin-homologe Domäne1/2/3                                      |
| FHOD             | Formin-Domänen homologes Protein                                 |
| FMN              | Formin   |
| FRL              | Formin-related in leukocytes                                     |
| FW-Primer        | Vorwärts Primer (forward)  |
| G-Aktin          | Globuläres Aktin   |
| GBD              | Rho-GTPase-Bindungsdomäne  |
| GDP              | Guanosindiphosphat   |
| G-Puffer         | General-Aktin-Puffer   |
| GST              | Glutathion-Sepharose-Tag   |
| GTP              | Guanosintriphosphat  |
| <b>GT-Puffer</b> | General-Tubulin-Puffer   |
| НЕК-Т293         | Humane embryonale Nieren-Zelllinie (human embryonic kidney)      |
| HeLa             | Humane Zervixkarzinom-Zelllinie (von Henrietta Lachs)            |
| HEPES            | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure            |
| HIV-Pol          | Human immunodeficiency virus DNA polymerase                      |
| HRP              | Horseradish Peroxidase   |
| НТ29             | Kolon-Adenokarzinom Zelllinie                                    |
| IF               | Immunofluoreszenz-Mikroskopie                                    |
| In vitro         | Im Reagenzglas, hier gleichbedeutend mit zellfreien-Experimenten |
| INF              | Inverted Formin  |
| ІРЗК-А           | Inositol-Trisphosphate 3-Kinase A                                |
| IPTG             | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid                               |
| JMY              | Junction mediating regulatory-protein                            |

| KCl              | Kaliumchlorid   |
|------------------|---|
| kDa              | Kilodalton  |
| LB-Medium        | Lysogeny Broth-(oder Luria-Bertani-) Medium                           |
| M.Sc.            | Master of Science, Akademischer Ausbildungsgrad                       |
| MAP              | Mikrotubuli-assoziiertes Protein                                      |
| MCAK             | Mitotic centromere-associated kinesin                                 |
| mDia             | <i>m</i> urine <i>Dia</i> phanous                                     |
| mol              | Mol, Stoffmengeneinheit (6,0221415*10 <sup>23</sup> Teilchen)         |
| M-Phase          | Mitose-Phase  |
| mRNA             | Boten-Ribonukleinsäure (messenger-ribonucleic acid)                   |
| MT               | Mikrotubuli   |
| МТОС             | Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (microtubule organizing center)   |
| NotI             | Restriktionsenzym, spaltet DNA der Sequenz: GCGGCCGC                  |
| N-WASP           | Neuronales-WASP   |
| OD               | Optische Dichte (optical density)                                     |
| р                | Signifikanz   |
| PAGE             | Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese (polyacrylamide gelelectrophoresis)  |
| РАК              | Human <b>p</b> 21- <b>a</b> ctivated- <b>k</b> inase-1-protein        |
| panMT            | Entspricht hier: gesamt MT  |
| PBD              | Rac/Cdc42 (p21)-Binde-Domäne  |
| PBS              | Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)            |
| PCR              | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)                 |
| Pen/Strep        | Penicillin/Streptomycin   |
| PFA              | Paraformaldehyd   |
| PMSF             | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| qPCR             | Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (quantitative polymerase chain |
|                  | reaction)   |
| Rac              | Protein der Rho-GTPase-Protein-Familie                                |
| RNA              | Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)                                   |
| Rpm              | Umdrehungen pro minute (rounds per minute)                            |
| RT               | Raumtemperatur, 24 °C (room temperature)                              |
| RT-PCR           | Reverse-Transkriptase-PCR   |
| <b>RV-Primer</b> | Rückwärts Primer (reverse)  |
| SD               | Standardabweichung (Standard deviation)                               |

| SDS     | Sodium-Dodecyl-Sulfat                                     |
|---------|---|
| shRNA   | Short hairpin RNA   |
| TBS     | Tris-gepufferte Saline (Tris buffered saline)             |
| TEMED   | NNN'N'-tetramethylethylenediamine                         |
| TPX2    | Targeting protein for Xklp2 (MT Nukleationsfaktor)        |
| Tris    | Tris-hydroxymethyl-aminomethan                            |
| UKE     | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf                    |
| UMIF    | UKE "Microscopy Imaging Facility"                         |
| VL/FL   | Volllängen Protein/Full-length protein                    |
| VSV     | Vesicular stomatitis virus                                |
| VSV-G   | Glykoprotein des Vesicular stomatitis virus               |
| WASH    | WASP/Scar homolog   |
| WASP    | Wiskott-aldrich syndrome protein                          |
| WAVE    | WASP-verprolin homologous                                 |
| WB      | Western-Blot  |
| WHAMM   | WASP homologue associated with actin, membranes, and MTs  |
| XhoI    | Restriktionsenzym, spaltet DNA der Sequenz: CTCGAG        |
| XMAP215 | Microtubule-associated protein 215 (MT Nukleationsfaktor) |
| ΔFH2    | Protein mit deletierter (Δ)FH2-Domäne                     |

# III. Abbildungsvrzeichnis

| Abbildung 1:  | Der Zellzyklus von Eukaryoten.   | 3   |
|---------------|--|-----|
| Abbildung 2:  | Die eukaryotische Mitose   | 4   |
| Abbildung 3:  | Arten des korrekten und nicht korrekten Kinetochor-Attachments während d | ler |
|               | Mitose   | 6   |
| Abbildung 4:  | Modellhafte Darstellung der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli     | 7   |
| Abbildung 5:  | Die mitotische Spindel   | 9   |
| Abbildung 6:  | Midbody während der Zytokinese   | 10  |
| Abbildung 7:  | Bidirektionaler Transport von Vesikeln oder Proteinen durch die          |     |
|               | MT-assoziierten Motorproteine Dynein und Kinesin                         | 11  |
| Abbildung 8:  | Chemische Modifikation von Mikrotubuli in Abhängigkeit von Lokalisation  |     |
|               | und Zellzyklus-Stadium   | 12  |
| Abbildung 9:  | Mikroskopische Aufnahmen der gefärbten Zytoskelett-Filamente in der      |     |
|               | Interphase und während der Mitose  | 13  |
| Abbildung 10: | Schematische Darstellung der Lokalisation und Funktion von Aktin.        | 14  |
| Abbildung 11: | Metastasierung von Tumorzellen   | 16  |
| Abbildung 12: | Domänenstruktur von Forminen mit Aktin regulierender Aktivität           | 18  |
| Abbildung 13: | Schematische Abbildung von DIAPH2.                                       | 19  |
| Abbildung 14: | Schematische Abbildung der Formin-MT-Interaktion.                        | 20  |
| Abbildung 15: | DIAPH2-Protein mit Domänengrenzen.                                       | 22  |
| Abbildung 16: | Stabile Herunterregulierung von DIAPH2 in HT29-Zellen durch shRNA        | 24  |
| Abbildung 17: | DIAPH2-Färbung in HT29-Kontroll- und DIAPH2-depletierten-Zellen          | 25  |
| Abbildung 18: | DIAPH2 reguliert das chromosomale Alignment.                             | 26  |
| Abbildung 19: | Bestimmung der Chromosomenanzahl von HT29-wt-Zellen.                     | 27  |
| Abbildung 20: | Bestimmung der Chromosomenanzahl in DIAPH2-depletierten- und             |     |
| -             | Kontroll-HT29-Zellen   | 28  |
| Abbildung 21: | Chromosomenbewegung während der Mitose in DIAPH2-depletierten und        |     |
| -             | Kontroll-HT29-Zellen   | 29  |
| Abbildung 22: | DIAPH2 kontrolliert die Dauer der Mitose in HT29-Zellen                  | 29  |
| Abbildung 23: | DIAPH2 kontrolliert Proliferation und Koloniebildung hat jedoch keinen   |     |
|               | Einfluss auf die Apoptose in HT29-Zellen.                                | 30  |
| Abbildung 24: | DIAPH2 kontrolliert die Migration im Scratch-Assay, zeigt jedoch keinen  |     |
| _             | Einfluss auf die Adhäsion in HT29-Zellen.                                | 31  |
| Abbildung 25: | DIAPH2 ist an den Spindel-MTs in HT29-Kontrollzellen lokalisiert         | 32  |
| Abbildung 26: | DIAPH2 kontrolliert die Spindeldynamik in HT29-Zellen.                   | 34  |
| Abbildung 27: | DIAPH2 beeinflusst Mitose Checkpoint-Inhibition in HT29-Zellen           | 35  |
| Abbildung 28: | Effekt der Cdc42-Stimulation und DIAPH2-Depletion auf die                |     |
| -             | MT-Dynamik.  | 36  |
| Abbildung 29: | DIAPH2 und FH2-Expressionskonstrukte.                                    | 38  |
| Abbildung 30: | Effekt der DIAPH2-VL auf die in vitro Aktin-Polymerisierung und          |     |
| C             | Depolymerisierung.   | 38  |
| Abbildung 31: | Bestimmung der intrazellulären DIAPH2- und MT-Konzentration.             | 39  |
| Abbildung 32: | Die Volllänge von DIAPH2 stimuliert die MT-Polymerisation.               | 40  |
| Abbildung 33: | VL-DIAPH2 und FH2-Domäne erhöhen Länge und Dichte der                    |     |
| 0-0           | polymerisierten MTs  | 42  |
| Abbildung 34: | Schematische Darstellung der in der Arbeit verwendeten                   |     |
| 0             | DIAPH2-Konstrukte.   | 43  |
|               |  | -   |

| Abbildung 35: I | DIAPH2 kontrolliert die MT-Bindung und Polymerisierung unabhängig                        |                |
|-----------------|--|----------------|
| ,               | von seiner FH2-Domäne  | 44             |
| Abbildung 36: I | Die MT-Polymerisierung von DIAPH2  | 45             |
| Abbildung 37: I | DIAPH2 kontrolliert die Initiation der MT-Polymerisierung unabhängig                     |                |
| ,               | von seiner FH2-Domäne  | 46             |
| Abbildung 38: I | DIAPH2 fördert die MT-Polymerisierung und Bündelung unabhängig                           |                |
| ,               | von seiner FH2 Domäne  | 47             |
| Abbildung 39: A | Alle DIAPH2-Konstruke (DIAPH2-VL, ∆FH2-DIAPH2 und die                                    |                |
| ]               | FH2-Domäne) schützen MTs vor der kälteinduzierten Depolymerisation4                      | <del>1</del> 9 |
| Abbildung 40: S | Schematische Darstellung des Arbeitsmodells der Bindung von DIAPH2                       |                |
| 1               | in seiner dimerisierten und autoinhibierten Form an MTs                                  | 55             |
| Abbildung 41: V | Virtueller Verdau von DIAPH2 in <i>pGEM</i> <sup>®</sup> -T Easy durch Serial Cloner     | 70             |
| Abbildung 42: V | Vektorkarte des Plasmids <i>pGEM</i> <sup>®</sup> - <i>T Easy</i> (Promega)              | 96             |
| Abbildung 43: V | Vektorkarte des Plasmids <i>pGEM</i> <sup>®</sup> - <i>T Easy</i> mit DIAPH2-VL-Insert   | <del>)</del> 7 |
| Abbildung 44: V | Vektorkarte des Plasmids <i>pGEM</i> <sup>®</sup> - <i>T Easy</i> mit DIAPH2-∆FH2-Insert | <del>)</del> 8 |
| Abbildung 45: V | Vektorkarte des Plasmids pGEX-6P-2A  | <del>)</del> 9 |
| Abbildung 46: V | Vektorkarte des Plasmids pGEX-6P-2A mit DIAPH2-VL als Insert10                           | )0             |
| Abbildung 47: V | Vektorkarte des Plasmids pGEX-6P-2A mit DIAPH2-ΔFH2 als Insert 10                        | )1             |
| Abbildung 48: V | Vektorkarte des Plasmids pGEX4T1-N-GST mit der FH2-Domäne                                |                |
|                 | (aa 624-1049) codierend für ein GST-FH2-Fusionsprotein                                   | )2             |

# IV. Tabellenverzeichnis

| Tabelle 1:  | Bestimmung des intrazellulären Verhältnis der MT zu DIAPH2-Ratio        | 39 |
|-------------|---|----|
| Tabelle 2:  | Verwendete Chemikalien.   | 58 |
| Tabelle 3:  | Verwendete Laborgeräte.   | 59 |
| Tabelle 4:  | Verwendete Verbrauchsmaterialien.                                       | 61 |
| Tabelle 5:  | Verwendete Puffer.  | 61 |
| Tabelle 6:  | Verwendete Kits   | 62 |
| Tabelle 7:  | Verwendete Enzyme.  | 63 |
| Tabelle 8:  | Verwendete Primärantikörper.  | 64 |
| Tabelle 9:  | Verwendete Sekundärantikörper   | 64 |
| Tabelle 10: | Auflistung der verwendeten Expressionskonstrukte.                       | 65 |
| Tabelle 11: | Auflistung verwendeter Software   | 66 |
| Tabelle 12: | Verwendete Sequenzierungsprimer.  | 66 |
| Tabelle 13: | Auflistung verwendeter Primer und dazugehöriger Restriktionsenzyme      | 67 |
| Tabelle 14: | PCR-Zusammensetzung.  | 67 |
| Tabelle 15: | PCR-Programm  | 68 |
| Tabelle 16: | Zusammensetzung PA-Tailing.   | 68 |
| Tabelle 17: | Zusammensetzung der <i>pGEM</i> <sup>®</sup> - <i>T Easy</i> Ligation   | 69 |
| Tabelle 18: | Zusammensetzung des Ligationsansatzes zur Klonierung in den             |    |
|             | pGEX-6P-Vektor  | 70 |
| Tabelle 19: | Zusammensetzung des Sequenzieransatzes.                                 | 71 |
| Tabelle 20: | Quickchange-Mutagenese PCR-Zusammensetzung.                             | 72 |
| Tabelle 21: | Quickchange Mutagenese PCR-Programm                                     | 72 |
| Tabelle 22: | Auflistung verwendeter Zelllinien mit verwendetem Zellkulturmedium      | 78 |
| Tabelle 23: | Zusammensetzung der Transfektion von HEK-T293-Zellen zur Produktion von |    |
|             | Lentiviren.   | 78 |
| Tabelle 24: | Auflistung der verwendeten qPCR Primer                                  | 80 |
| Tabelle 25: | Gefahrensymbole, H- und P-Sätze der verwendeten Gefahrstoffe 1          | 03 |

# 1 Zusammenfassung

Die Forminfamilie DIAPH (*Drosophila-homolog* von *Diaphanous*) besteht aus drei Isoformen. Alle drei DIAPH-Isoformen nukleieren Aktin und stabilisieren Mikrotubuli (MTs), verknüpfen also beide zytoskeletale Strukturen. DIAPH1 wurde bereits charakterisiert und beschrieben, dass es das metastatische Potential von kolorektalen Karzinomzellen durch die Stabilisierung von MTs fördert. Bisher ist bekannt, dass die Bindung von DIAPH-Proteinen an MTs über die FH2-Domänen erfolgt.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Isoform DIAPH2 für die Teilung von Kolonkarzinom-Zellen untersucht. Eine stabile Depletion der DIAPH2 Expression in HT29-Zellen hatte ein fehlerhaftes Chromosomen-Alignment und eine reduzierte Geschwindigkeit der Chromosomen-Separation während der Mitose zufolge. Dadurch bedingt war die Proliferationsrate, das Potential aus Einzelzellen Kolonien zu bilden sowie die Migration in DIAPH2-depletierten HT29-Zellen verringert. Mechanistische Untersuchungen zeigten, dass DIAPH2 diffus im Zytosol von Interphase-Zellen lokalisiert ist, aber in der Metaphase eine eindeutige Kolokalisation mit Spindel-MTs aufweist. Die DIAPH2-Depletion sowie dessen Stimulation durch Cdc42 veränderte die Dynamik der Spindel-MTs signifikant. Dies beweist, dass ein ausgewogenes Gleichgewicht an DIAPH2-Aktivität notwendig ist, um die Spindel-MT-Dynamik präzise zu regulieren. Zellfreie in vitro-Analysen zeigten, dass bakteriell produziertes DIAPH2-VL-Protein die MT-Dynamik sogar ohne die Aktivierung durch Cdc42 beeinflusst. Das DIAPH2-VL-Protein steigerte die MT-Polymerisierung im Vergleich zur DIAPH2-FH2-Domäne um das 10-fache. Unerwarteterweise erhöhte eine DIAPH2-Mutante mit deletierter FH2-Domäne (DIAPH2- $\Delta$ FH2) die MT-Polymerisierung ähnlich stark wie die DIAPH2-FH2-Domäne. Dies beweist, dass neben der bereits bekannten FH2-Domäne noch eine weitere MT-binde-Domäne im DIAPH2-Molekül vorhanden ist. Des Weiteren verändern das DIAPH2-VL-Protein und die DIAPH2-FH2-Domäne die Dichte von Taxol-stabilisierten MTs. Die  $\Delta$ FH2-Mutante hatte jedoch keinen Effekt auf die MT-Struktur. Die FH2-Domäne und eine weitere DIAPH2-Domäne scheinen daher die MT-Dynamik über verschiedene Mechanismen zu vermitteln. Zusammengefasst zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass DIAPH2 Cdc42-stimulations-unabhängig die Mitose-Progression durch die Regulation der Spindel-MTs kontrolliert. Zusätzlich zur bereits bekannten MT-bindenden FH2-Domäne konnte gezeigt werden, dass eine weitere Domäne von DIAPH2 für die Kontrolle der MT-Dynamik benötigt wird.

# 2 Abstract

The protein family of DIAPH (Drosophila homologue of Diaphanous) formins is comprised of three isoforms. They are all known to nucleate actin and stabilize microtubules (MTs) and can serve as a link between both cytoskeleton structures. DIAPH1 has already been shown to promote the metastatic potential of colorectal carcinoma cells by stabilizing microtubules. It had been shown that DIAPH-proteins bind MTs via their FH2 domain.

In this thesis, the role of the isoform DIAPH2 for division of colon carcinoma cells was investigated. It was found that stable depletion of DIAPH2 expression in HT29 colon cancer cells led to a defective chromosomal alignment and reduced the speed of chromosomal separation during mitosis. Furthermore, DIAPH2 knock down cells exhibited a reduced proliferation rate, a decreased potential of single cells to form colonies and a weakened invasiveness into a scratch wound. Localization studies showed that DIAPH2 was diffusely localized in the cytosol of interphase cells. In metaphase cells, however, the protein demonstrated a clear co-localization with spindle microtubules. DIAPH2 depletion as well as stimulation of DIAPH2 by Cdc42 significantly altered the dynamics of spindle MTs. These results indicate the necessity of a tightly balanced DIAPH2 activity to control spindle MT-dynamics. In vitro, cell free analysis revealed that recombinantly expressed full-length (VL)-DIAPH2 strongly influenced MT-dynamics. Even without Cdc42-mediated stimulation, DIAPH2-VL protein increased MT polymerization 10-fold compared to the DIAPH2-FH2 domain. Interestingly, a DIAPH2 mutant lacking the FH2 domain (DIAPH2- $\Delta$ FH2), revealed an increased MT polymerization, comparable to the activity of the DIAPH2-FH2 domain. This demonstrates, that in addition to the already characterized FH2 domain, a further MT-binding domain is present in the DIAPH2 molecule. Additionally, the DIAPH2-VL protein and the DIAPH2-FH2 domain altered the density of taxol-stabilized MTs, which was not the case for the  $\Delta$ FH2 mutant of DIAPH2. The FH2 domain and another DIAPH2 domain thus seemed to mediate MT dynamics via different not yet clearified mechanisms. Concluding, the data obtained in this study indicate that DIAPH2 controls mitosis progression independently of stimulation, by regulating the stability of spindle MT. Furthermore this work provides evidence for an additional MT-binding domain in the DIAPH2 protein that regulates MT dynamics by a different mechanism than the already characterized FH2 domain.

# **3** Einleitung und Theorie

Um die Rolle von DIAPH2 in eukaryotischen Zellen zu verstehen, sind grundlegende Hintergrundinformationen wie der Zellzyklus, die Mitose und die Rolle des Mikrotubuli- sowie Aktin-Zytoskeletts unabdingbar und werden im Folgenden erklärt.

# 3.1 Der eukaryotische Zellzyklus im Überblick

Der Zellzyklus von Eukaryoten dient der Vervielfältigung von Zellen. Ist das feine Gleichgewicht von regulatorischen Molekülen verändert, kann es zur ungehemmten Teilung der Zellen und damit zur Entstehung von Karzinomen kommen. Der Zellzyklus kann in vier Phasen unterteilt werden (Abbildung 1). Die G1-Phase (*gap*; engl. "Lücke"), die S-Phase (Synthesephase) sowie die G2-Phase werden zusammen als Interphase bezeichnet. Des Weiteren existiert die Mitosephase, in welcher sich die Zelle in zwei identische Tochterzellen teilt (Lodish 2004; Howard & Pelc 1986; Schmitz 2011).



**Abbildung 1: Der Zellzyklus von Eukaryoten.** Der eukaryotische Zellzyklus wird in die Interphase und Mitosephase unterteilt. Die Interphase wird weiter unterteilt in die G1 ("*gap*"; für engl.: "Lücke")-, S (Synthese)-, und G2-Phase. Die M-Phase (Mitose) beinhaltet die Kernteilung, welche sich wiederum in Pro (P)-, Prometa (PM)-, Meta (M)-, Ana (A)- und Telophase (T) unterteilen lässt. Danach schließt sich die Zellteilung (Zytokinese, C) als letzter Teil der M-Phase an. Aus der G1-Phase können Zellen in die G0-Phase (Ruhephase) und auch wieder zurück in die G1- Phase gelangen (Stolz 2010).

Die G1-Phase dient der Vorbereitung für die DNA-Replikation. Dabei werden Zellorganellen und Zytoplasma vermehrt, was zum Wachstum der Zelle führt. Fehlen Wachstumsfaktoren oder dedifferenziert die Zelle, tritt diese aus der G1-Phase in eine Ruhephase (G0) ein. Dieser Prozess ist reversibel und die Zellen können durch Stimulation wieder in die G1-Phase geleitet werden. Im Gegensatz dazu steht die Seneszenz, bei der die Zellen nicht mehr auf Wachstumssignale reagieren können und permanent in der G0-Phase verbleiben. In der S-Phase, auch Synthesephase genannt, erfolgen die DNA-Replikation sowie die Duplikation des Centrosoms. Im Anschluss folgt die G2-Phase, in der zellteilungsspezifische Proteine synthetisiert werden und sich das Endoplasmatische Retikulum auflöst. Bereits in der G2-Phase wird eine räumliche Orientierung (Polarisierung) der Zelle und damit auch die Teilungsebene für die Mitose festgelegt. Der Zellzyklus G1/S/G2 dauert je nach Zellart in etwa 19-40 Stunden (Sankaran & Parvin 2006).

#### 3.1.1 Die eukaryotische Mitose

Die Mitose ist mit 20 bis 60 Minuten die kürzeste aller Zellzyklus-Phasen. Sie wird, wie in Abbildung 1 und Abbildung 2 dargestellt, weiter in fünf Unterphasen eingeteilt: in die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase (Uetake & Sluder 2004).



Abbildung 2: Die eukaryotische Mitose. In der Prophase erfolgen die Kondensation der Chromosomen und die Auflösung der Kernmembran. Die Spindelpole bilden sich aus. Danach bildet sich in der Prometaphase der Spindelapparat aus und die Chromosomen werden von Spindel-MT an ihren Kinetochoren gebunden. Die Metaphase dient der Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle, um die Tochterchromatide in der Anaphase zu den entgegengesetzten Zellpolen zu transportieren. In der Telophase dekondensieren die Chromatiden und es bildet sich eine neue Kernmembran um die Zellkerne der beiden Tochterzellen in der Zytokinese aus. Die Zelle verlässt die Mitose und der Zellzyklus kann von neuem beginnen. (Gadde & Heald 2004).

Die Prophase ist das erste Stadium der Mitose. In diesem finden die Kondensation der Chromosomen sowie die Aufteilung der duplizierten Centrosomen zu den gegenüberliegenden Spindelpolen statt (Blangy et al. 1995; Nigg 2001; Sluder & Khodjakov 2010). An den Centrosomen beginnt durch die Polymerisierung von MTs das Wachstum des mitotischen Spindelapparates (Hirota et al. 2003; Marumoto, Zhang & Saya 2005; Lukasiewicz & Lingle 2009). In der Prometaphase wird die Kernmembran aufgelöst und Kinetochor-Proteine lagern sich an den Centromeren der DNA an (Cheeseman & Desai 2008). Die Anlagerung der Spindel-MTs an die Kinetochore wird von diversen Proteinen mediiert (Cheeseman, Chappie, Wilson-Kubalek & Desai 2006; Cheeseman & Desai 2008; Maiato & Sunkel 2004; Przewloka & Glover 2009; Sakuno, Tada & Watanabe 2009). Die Chromosomen werden in der Metaphase in der Äquatorialebene, der Mitte zwischen beiden Zellpolen, angeordnet. Dabei regulieren verschiedenste Proteine die Stabilität und Dynamik der mitotischen Spindel (Schuyler & Pellman 2001; Gadde & Heald 2004; van der Vaart, Akhmanova & Straube 2009). Die Schwester-Chromatiden werden durch den Cohesin-Komplex bis zum Eintritt in die Anaphase zusammengehalten (Peters, Tedeschi & Schmitz 2008; Przewloka & Glover 2009; Michaelis, Ciosk & Nasmyth 1997). Wenn die Chromosomen in der Äquatorialebene angeordnet und beide Schwester-Kinetochore bipolar bzw. amphitelisch an Mikrotubuli von gegenüberliegenden Spindelpolen gebunden sind (Abbildung 3), wird das Enzym Separase (ESPL1, extra spindle pole bodies homolog 1) aktiviert und spaltet den Cohesin-Komplex (Nasmyth 2000; Pines 2006; Peters, Tedeschi & Schmitz 2008).

Ist nur einer der beiden Schwester-Kinetochoren an ein Spindel-MT befestigt, wird von einem monotelischen Attachment (Abbildung 3) gesprochen. Dieses Zwischenstadium kann durch die Anheftung eines weiteren Spindel-MT an das andere Schwester-Kinetochor aufgelöst werden. Fehlerhafte Kinetochor-Attachments können in zwei Arten unterschieden werden: syntelische Attachments (bei denen beide Schwesterkinetochoren mit Mikrotubuli interagieren, die vom selben Spindelpol ausgehen) und merotelische Attachments (bei denen ein einzelnes Kinetochor mit beiden Spindelpolen verbunden ist). Sind die Chromosomen monotelisch oder syntelisch an einen Spindelpol gebunden, werden diese als mono-orientiert bezeichnet (Ng, Waples, Lavoie & Biggins 2009; Schuyler, Wu & Kuan 2012; Gregan et al. 2011). Amphitelisch oder merotelisch mit beiden Spindelpolen verbundene Schwester-Kinetochoren sind dagegen biorientierte Kinetochore. Um die Chromosomen korrekt auf die Tochterzellen aufzuteilen, sollten fehlerhafte Kinetochore-Attachments korrigiert und ein amphitelischer Zustand stabilisiert werden (Gregan et al. 2011). Ein Mitose-Kontroll-Checkpunkt ist dabei die

Phosphorylierung von Bub1 und BubR1 nach fehlerhaften, nicht-ausgeglichen-amphitelischen Attachments der Schwester-Kinetochoren (Bolanos-Garcia & Blundell 2011; Ji et al. 2017).



TRENDS in Cell Biology

Abbildung 3: Arten des korrekten und nicht korrekten Kinetochor-Attachments während der Mitose. Während bei dem monotelischen Attachment nur eines der beiden Schwester-Kinetochoren an den Mikrotubuli der Spindel befestigt ist, sind beide Schwester-Kinetochore im amphitelischen Zustand an Mikrotubuli von gegenüberliegenden Spindelpolen gebunden. Es gibt zwei Arten von fehlerhaften Kinetochor-Attachments: syntelische Attachments, bei denen beide Schwester-Kinetochore mit Mikrotubuli interagieren, die vom selben Spindelpol ausgehen, und merotelische Attachments, bei denen ein einzelner Kinetochor mit beiden Spindelpolen verbunden ist. Chromosomen mit monotelischen oder syntelischen Bindungen an den Spindelpol werden auch als mono-orientiert bezeichnet, während solche mit amphitelischen oder merotelischen Bindungen als bi-orientiert bezeichnet werden. Um Chromosomen richtig zu trennen, müssen fehlerhafte Kinetochore-Attachments korrigiert und amphitelische Bindungen etabliert werden. Abbildung angepasst nach (Gregan et al. 2011).

Durch die Verkürzung der Kinetochor-MTs werden korrekt amphitelisch verknüpfte Chromosomen getrennt und die Schwester-Chromatiden zu den beiden Spindelpolen auseinander gezogen.

Bereits in der Anaphase beginnt die Zytokinese durch die Ausbildung eines Aktin/MyosinII-Filament-Ringes sowie durch Einschnürung des Zytoplasmas. In der Telophase bilden sich die Kernmembranen um die Tochterzellkerne aus und die Chromosomen dekondensieren. In der späten Telophase depolymerisiert die mitotische Spindel letztendlich.

#### 3.1.2 Der Aufbau und die Regulation von MTs

Die Mikrotubuli-Dynamik und ihre Regulation ist für viele zelluläre Prozesse wichtig, wie z. B. die Trennung der Chromosomen in der Mitose, Zell-Migration und intrazellulärer Transport (van der Vaart, Akhmanova & Straube 2009; Desai & Mitchison 1997; Leguy, Melki, Pantaloni & Carlier 2000; Moritz & Agard 2001; Ludueña 2013; Fife, McCarroll & Kavallaris 2014; Field, Collins & Lee 1984). MTs sind eine Art Gerüstsubstanz der Zelle. Aufgebaut aus  $\alpha$ -/ $\beta$ -Tubulin-Heterodimeren bilden sie Polymere und hohlzylindrische Filamente, welche zu einem röhrenförmigen Tubulus mit 13 Protofilamenten im Querschnitt aufgebaut sind (Mollinedo & Gajate 2003; Wade 2009; Etienne-Manneville 2013; Kirschner & Mitchison 1986).



Abbildung 4: Modellhafte Darstellung der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli. (1) Mikrotubuli polymerisieren durch Anlagerung mit GTP-Tubulin-Dimeren am Plus-Ende, diese bilden die sogenannte GTP-Kappe. (2) Es entsteht ein metastabiles MT-Zwischenprodukt. (3) Ohne die GTP-Tubulin Kappe am Plus-Ende kommt es zum Auseinanderfallen der MTs, der *"catastrophe"*, dabei depolymerisieren GDP-Tubulin Dimere am Plus-Ende. (4) Das Zerfallen/Depolymerisieren kann durch den Einbau von neuem GTP-Tubulin am Plus-Ende gestoppt werden. Bei einer erneut erfolgenden MT-Polymerisation wird vom *"rescue"*-Ereignis gesprochen. Abbildung verändert aus (Dráber, Sulimenko & Dráberová 2012).

Durch den gerichteten Einbau von  $\alpha$ -/ $\beta$ -Tubulin-Dimeren entsteht eine polare Orientierung (Howard & Hyman 2003), wobei das α-Tubulin zum Minus-Ende der MTs und β-Tubulin zum Plus-Ende orientiert ist. Guanosintriphosphat (GTP), welches an α-Tubulin gebunden ist, kann nicht hydrolysiert werden. Im Gegensatz dazu steht das GTP des β-Tubulins, welches zu GDP hydrolysiert werden kann (Lodish 2004; Margolis & Wilson 1998; Grego, Cantillana & Salmon 2001). Zur Polymerisierung der Filamente werden GTP gebundene  $\alpha$ -/ $\beta$ -Tubulin-Dimere an das MT-Plus-Ende rekrutiert und bilden dort vorerst eine stabile GTP-Kappe (Abbildung 4). Diese verleiht Stabilität und erschwert die MT-Depolymerisation (Wiese & Zheng 1999; Moritz et al. 2000; Howard & Hyman 2003). MT-Minus-Enden verbleiben am Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC), während das Plus-Ende davon entfernt aufgebaut wird und durch γ-Tubulin daran verankert sind (Howard & Hyman 2003; Mitchison & Kirschner 1984). In vitro wechseln Mikrotubuli zwischen langsamer Polymerisation (genannt rescue oder Rettung) und schneller Depolymerisation (genannt catastrophe oder Katastrophe). Dieser Prozess wurde als dynamische Instabilität beschrieben (Mitchison & Kirschner 1984; Pasquier & Kavallaris 2008). Die dynamische Instabilität wird durch den Austausch von GTP/GDP vermittelt (Kirschner & Mitchison 1986; Kerstin Steinhäuser 2016) und ist in Abbildung 4 dargestellt.

#### 3.1.3 MT-Dynamik und Regulation in der Mitose

Neben dem Vesikeltransport steuern Kinesine die Entwicklung, Orientierung und Elongation der mitotischen Spindel und sind MT-assoziierte Motoren beim Alignment und der Segregation der Chromosomen. Dyneine sind an der Orientierung der mitotischen Spindel in der Mitose und an der Zytokinese beteiligt (Goshima & Vale 2003; Zhu et al. 2005). Viele weitere MAPs sind zusätzlich in die Bildung und Funktion des Spindelapparats involviert (Abbildung 5). Dies führt unter anderem dazu, dass während der Mitose die MT Dynamik um das 20- bis 100-fache im Vergleich zur Interphase erhöht ist (Honore, Pasquier & Braguer 2005; Mitchison & Kirschner 1984; Saxton et al. 1984; Belmont, Hyman, Sawin & Mitchison 1990; Hayden, Bowser & Rieder 1990; Piehl, Tulu, Wadsworth & Cassimeris 2004). Der Wechsel zwischen Polymerisation und Depolymerisation ermöglicht das Wachsen und Schrumpfen der Spindel-MTs beim Suchen und Finden (*"search and capture"*) der Kinetochore durch die MTs (Gadde & Heald 2004). Wie in Abbildung 5 dargestellt, werden durch die Dynamik der Spindel-MTs die gepaarten Schwesternchromatiden während der Metaphase in der äquatorialen Zellmitte angeordnet. Erst nachdem alle Chromosomen bipolar an die Spindel MTs, von den beiden entgegengesetzten Spindelpolen ausgehend, angeheftet sind, kann die Mitose voranschreiten.

In der Anaphase erfolgt anschließend der Transport der Chromosomen zu den Spindelpolen durch die Depolymerisierung der MTs (Kline-Smith & Walczak 2004). Der Aufbau der Kinetochore ist gut erforscht, jedoch ist die genaue Rolle der über 100 beteiligten Proteine nicht vollständig geklärt. Nach Lokalisation und Funktion wurden die Kinetochor-Proteine in drei Kategorien eingeteilt. Dabei steuern die inneren Kinetochor-Proteine die Bindung zur chromosomalen DNA und die äußeren Kinetochor-Proteine das Anheften der Spindel-MTs. Weitere regulatorische Proteine übernehmen funktionelle Aufgaben für den Ablauf der Mitose (Tanaka 2013; Cheeseman 2014).



Abbildung 5: Die mitotische Spindel. Abbildung der polaren Ausrichtung der MT-Minus-Enden zu den Centrosomen (MTOC), während die MT-Plus-Enden davon weg ausgerichtet sind. Astral-MTs sind Richtung Zellmembran ausgerichtete MTs und dienen der Verankerung der mitotischen Spindel in der Mitte der Zelle. Kinetochore-MTs ragen in die äquatoriale Ebene und sind über die Kinetochore an den Chromosomen verankert. Abbildung aus (Prosser & Pelletier 2017).

In vielen Krebszellen ist die Expression von MT-assoziierten Proteinen (MAPs) gestört (Bhat & Setaluri 2007; Parker, Kavallaris & McCarroll 2014), was eine veränderte MT-Polymerisation zur Folge haben kann. Dadurch bedingt kann es zu einer fehlerhaften Segregation sowie einer daraus resultierenden Fehlverteilung von Chromosomen während der Mitose kommen. Die Folge ist eine Chromosomale Instabilität (CIN) der Tumorzellen. Beispielsweise besitzen humane Tumore mit CIN-Zellen aneuploide Karyotypen (eine untypische Chromosomenanzahl abweichend von 46 Chromosomen im Menschen) und zeigen häufig Chromosomenbrüche mit Verlust oder Zugewinn von chromosomalem Material

(Stolz 2010). Dabei gehen Informationen für Zellzyklusregulatoren verloren oder liegen vielfach vor, was eine unkontrollierte Proliferation und dadurch eine Progression der Tumore zur Folge hat (Bläker, Warth, Kloor & Schirmacher 2011). Die CIN der Zellen ist entscheidend bei der Progression von Tumoren (Ertych et al. 2014; Liu et al. 2016).

Eine weitere Funktion des MT-Zytoskelettes ist die Trennung der zwei durch die Mitose entstandenen Tochterzellen. Dabei wird in der Telophase der Mittelkörper (*Midbody*) ausgebildet. Die Zellen werden abgeschnürt, wobei eine brückenförmige Struktur aus vielen parallel angeordneten MTs zwischen den Tochterzellen entsteht (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: *Midbody* während der Zytokinese. Die getrennten Zellkerne liegen in beiden noch nicht vollständig getrennten Tochterzellen vor. Der Mittelkörper (*Midbody*) erhält seine Stabilität über die MT-Filamente im Inneren der sich gerade abschnürenden Zellen. Er dient der Abtrennung beider Zellen voneinander. Quelle: (D'Avino & Capalbo 2016).

Die komplette *Midbody*-Zusammensetzung und dessen Regulation sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt (Tamir, Elad & Medalia 2011; Hu, Coughlin & Mitchison 2012; Dionne, Wang & Prekeris 2015; Kuo et al. 2011).

## **3.2 MT-Zytoskelett assoziierte Proteine**

MTs werden von MT-assoziierten Proteinen gebunden. Dadurch kann die Stabilität sowie die Dynamik der MTs verändert werden (Akhmanova & Steinmetz 2015). Sie können je nach Funktion und Lokalisation in mehrere Gruppen unterteilt werden. Strukturelle MAPs wie beispielsweise Tau (Yoshida & Goedert 2012) beeinflussen Polymerisierung und Stabilität von Mikrotubuli durch Bindungen an MTs. Sie besitzen keine enzymatische Aktivität. Andere können als Adapterproteine agieren und weitere MAPs rekrutieren. MT-Plus-End-,,*tracking*"-Proteine (+TIPs) wie das *End-binding* Protein-1 (EB1) (Gireesh et al. 2018; Akhmanova &

Steinmetz 2015) und *Mitotic centromere-associated kinesin (*MCAK) (D'Angelo, Myer & Myers 2017) gehören ebenso zu den strukturellen MAPs. Sie vermitteln eine dynamische Regulation von Wachstum (EB1) und Zerfall (MCAK) der MTs. Des Weiteren existieren die Aktin-Mikrotubuli kombinierenden Proteine, wie beispielsweise Spectraplakin (Akhmanova & Steinmetz 2015), Fascin (Heinz et al. 2017) oder DIAPH Proteine (Moseley, Maiti & Goode 2006).

Andere MAPs sind MT-Motorproteine wie Kinesine und Dyneine. Diese Motorproteine vermitteln den Transport von Vesikeln, Proteinen oder *messenger* RNA (mRNA) in der Zelle. Sie weisen eine einseitig orientierte Bewegung unter ATP Hydrolyse auf. Kinesine bewegen sich in Richtung Plus-Ende der MTs, während Dyneine den Transport zum Minus Ende der MTs vermitteln (siehe Abbildung 7) (Hirokawa, Noda & Okada 1998; Etienne-Manneville 2013; Franker & Hoogenraad 2013).



Abbildung 7: Bidirektionaler Transport von Vesikeln oder Proteinen durch die MT-assoziierten Motorproteine Dynein und Kinesin. Kinesine bewegen sich unter ATP-Verbrauch in Richtung Plus-Ende der MTs, während Dyneine den gerichteten Transport Richtung Minus-Ende der MTs übernehmen. Abbildung verändert aus (Franker & Hoogenraad 2013).

Neben den MAPs existieren noch weitere Möglichkeiten die Stabilität und Dynamik der MTs zu beeinflussen. Ein Beispiel ist die chemische Modifikation der Tubulin-Untereinheiten durch Tubulin-posttranslational-modifizierende-Enzyme (Yu, Garnham & Roll-Mecak 2015). Dabei gibt es verschiedenste Möglichkeiten der chemischen Modifikation, diese sind: Phosphorylierung (Eipper 1972), Acetylierung (Chu et al. 2011), Palmitoylierung (Caron 1997), Sumoylierung (Rosas-Acosta et al. 2005), Polyaminierung (Song et al. 2013), S-Nitrosylierung (Jaffrey et al. 2001), Detyrosinierung/Tyrosinierung am α-Tubulin (Barra,

Rodriguez, Arce & Caputto 1973) sowie Glutamylierung und Glycylierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin an C-Terminalen Resten (Eddé et al. 1990; Redeker et al. 1992; Redeker et al. 1994), wobei die meisten Modifikationen reversibel sind.

Wie in Abbildung 8 (Yu, Garnham & Roll-Mecak 2015) dargestellt, ist die Art der Modifikation stereotypisch für bestimmte Funktionen und wird in Abhängigkeit der Lokalisation der MTs sowie zellzyklusabhängig reguliert. Interphase-Mikrotubuli sind angereichert mit tyrosinierten MTs (Webster, Gundersen, Bulinski & Borisy 1987), während Kinetochor-MTs und *Midbody*-MTs mehr detyronisierte und glutamylierte MTs aufweisen (Abbildung 8) (Bobinnec et al. 1998; Lacroix et al. 2010; Yu, Garnham & Roll-Mecak 2015).



Abbildung 8: Chemische Modifikation von Mikrotubuli in Abhängigkeit von Lokalisation und Zellzyklus-Stadium. (A) Interphase Zelle. (B) Mitotische Spindel. (C) *Midbody*. Mikrotubuli sind in grün, Mikrotubuli-Plus-Enden in hellgrün und Kerne/Chromosomen in blau dargestellt. Die Verteilung von posttranslational modifizierten MTs – Art der Modifikationen an den Mikrotubuli sind an den betreffenden Positionen durch eine Lupe mit den entsprechenden Farben (pink – Acetylierung, rot – Glutamylierung, cyan – Glycylierung, orange – Tyrosinierung) gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach (Yu, Garnham & Roll-Mecak 2015).

Ein effizientes Ziel für Chemotherapeutika ist die fein gesteuerte Regulation der Dynamik von Mikrotubuli. Dabei können die MT-basierten Chemotherapeutika in zwei Wirkarten unterteilt werden. MT-destabilisierende Wirkstoffe hemmen die MT-Polymerisation (z. B. Vincaalkaloide), während Taxane MTs stabilisieren (z. B. Paclitaxel (Taxol)). Diese Zytostatika können über die Missregulation von MTs das Wachstum und die Ausbreitung von Krebszellen hemmen und zudem die Apoptose (gerichteter Zelltod) fördern (Cortes & Baselga 2007; Nürnberg, Kitzing & Grosse 2011; Fife, McCarroll & Kavallaris 2014; Mukhtar, Adhami & Mukhtar 2014).

## 3.3 Das Aktin-Zytoskelett

Neben den bereits erwähnten Mikrotubuli besteht das Zytoskelett aus Aktin- und Intermediär-Filamenten. Das Zusammenspiel von Aktin-Zytoskelett und MTs ist essentiell für die Zellteilung, das Zellwachstum, die Zellmotilität und den intrazellulären Transport.



Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen der gefärbten Zytoskelett-Filamente in der Interphase und während der Mitose. (A) Gefärbte Interphase-Endothelzellen mit MTs (grün), Aktin (rot) und Zellkernen (blau) (Beispielbilder ImageJ Abrufdatum 2018). (B) HT29-wt mit gefärbter mitotischer Metaphase-Spindel durch MTs (rot) und kondensierten Chromosomen durch DAPI (blau). Quelle: eigene Abbildung (UKE).

In Abbildung 9 sind das Aktin- und das MT-Zytoskelett in der Interphase (Abbildung 9A) und das MT-Zytoskelett in der Mitose (Abbildung 9B) veranschaulicht (Fife, McCarroll & Kavallaris 2014).

## 3.3.1 Aktindynamik des Zytoskeletts

Aus den Monomeren des globulären (G-)Aktin können polymere Aktin-Filamente (F-Aktin) aufgebaut werden (Wessler, Gimona & Rieder 2011). Dabei binden die Aktinmonomere ATP, welches bei der Polymerisierung zu ADP hydrolysiert wird. Es gibt eine Vielzahl an Proteinen, welche die Aktin Polymerisierung oder Stabilisierung fördern (Breitsprecher & Goode 2013). Zudem dienen weitere Proteine der Verzweigung, Bündelung oder Verankerung der Aktin-Filamente mit anderen zellulären Bestandteilen. Ein Überblick dazu ist in Abbildung 10 gezeigt (Campellone & Welch 2010).



Abbildung 10: Schematische Darstellung der Lokalisation und Funktion von Aktin. Aktin-Filamente (rot) werden durch Formine und andere Nukleatoren polymerisiert und durch den Arp2/3-Komplex in verzweigte Netzwerke organisiert. Funktionelle Rollen für verschiedene Nukleationsfaktoren werden während der Phagozytose, dem Aufbau von Zell-Zell-Kontakten, der Endozytose, der Lamellipodiendynamik, Filopodienbildung, Golgi und Vesikelmembrandynamik sowie Stressfaserbildung in einer Säugetierzelle gezeigt. DIAPH-Proteine sind durch orangene Markierungen hervorgehoben. Fragezeichen (?) zeigen an, dass die genaue Rolle für das abgebildete Protein noch unklar ist. Abkürzungen: Arp2/3 – actin-related protein 2/3, Cobl – cordon-bleu, Daam – Dishevelled-associated activator of morphogenesis, FHOD – formin homology domain, FMN – formin, FRL – formin-related in leukocytes, INF - inverted formin, JMY - junction mediating regulatory, mDia - murine Diaphanous, N-WASP – neuronal-WASP, WASP – Wiskott-aldrich syndrome protein, WASH – WASP/Scar homolog, WAVE – WASP-verprolin homologous, WHAMM – WASP homologue associated with actin, membranes and microtubules. Abbildung aus (Campellone & Welch 2010).

Aktin-Filamente bilden die Gerüststrukturen von verschiedensten zellulären Strukturen sowie von Zell-Ausläufern. In sogenannten Stressfasern, welche die Zelle durchspannen, liegen faserig parallele Aktinbündel vor. Diese können durch das Motorprotein Myosin kontrahieren, was zur Migration/Fortbewegung von Tumorzellen führt. Fokale Adhäsionsproteine, z. B. Vinculin, verbinden Aktin-Filamente mit der Zellmembran und dienen einer orientierten und gerichteten Bewegung (Ridley et al. 2003; Fife, McCarroll & Kavallaris 2014). Die Bildung und Instandhaltung der zuvor erwähnten Zellausläufer werden durch Aktinbindeproteine (ABPs) gesteuert, was in Abbildung 10 schematisch dargestellt ist. ABPs ermöglichen eine Vielfalt an zellulären, Aktin-abhängigen Strukturen. Dabei wird das Aktin-Zytoskelett

polymerisiert, depolymerisiert, gebündelt, separiert und verzweigt (dos Remedios et al. 2003; Le Clainche & Carlier 2008; Gunning, O'Neill & Hardeman 2008). Aktin-abhängige zelluläre Ausläufer sind beispielsweise Podosomen, Lamellipodien, Filopodien, Mikrovilli und Membran-Ruffles, wie in Abbildung 10 gezeigt (Taylor, Koyuncu & Enquist 2011; Wessler, Gimona & Rieder 2011; Rottner et al. 2017). Dünne durch F-Aktin geformte "Stacheln" sind sogenannte Filopodien. Einen ähnlichen stachelförmigen Aufbau besitzen Fokal Adhesions. Diese steuern eine chemotaktisch abhängige Bewegung bei der Invasion und mediieren die initiale Adhäsion der Tumorzelle an die Extrazelluläre Matrix (ECM) über Selektine. Lamellipodien sind flache blattartige Membranvorsprünge, die der zellulären Migration/Bewegung dienen. Podosomen sind aktinreiche Ausläufer zur Anheftung an die Zellumgebung, während Invadopodien ECM abbauende Enzyme zum Durchdringen dieser sekretieren (Ridley et al. 2003; Fife, McCarroll & Kavallaris 2014).

Der Abbau der ECM erleichtert dabei die Überwindung physiologischer Barrieren der Tumorumgebung während der Intra- und Extravasation (Yamaguchi & Condeelis 2007; Fife, McCarroll & Kavallaris 2014; Rottner et al. 2017).

Eine veränderte ABP-Expression führt zur Deregulation der zellulären Strukturen und Ausläufer, beispielsweise beim Durchdringen der Basalmembran (Filopodien), der Extravasation aus dem Gewebe (Invadopodien) (Windhorst et al. 2010; Windhorst, Song & Gazdar 2017), der Intravasation in die Blut und Lymphgefäße, dem Abrollen und Anheften an die Blut- und Lymphgefäße und dem Einnisten in die neue Umgebung.



Abbildung 11: Metastasierung von Tumorzellen. Abhängig von extrazellulären Stimuli adhärieren (a) die Zellen aus dem Primärtumor zunächst an Epithelzellen der umliegenden Gefäße und durchdringen dann die Basalmembran und ECM (b), um in Blut- oder Lymphgefäße einzuwandern (c). In den Blutgefäßen können die Zellen über Adhäsionsmoleküle an die Endothelzellen anheften, (d) es kommt zur Extravasation (f und g) und der Ausbildung einer Metastase (Schroeder et al. 2011).

Wie in Abbildung 11 dargestellt, sind diese zellulären Strukturen und Aktin-gesteuerten Mechanismen Voraussetzung für eine erfolgreiche Metastasierung (Nürnberg, Kitzing & Grosse 2011; Gross 2013; Heinz et al. 2017).

#### 3.4 Formine

Wie bereits in Abbildung 10 gezeigt, wird das Aktin- und MT-Zytoskelett durch regulatorische Proteine beeinflusst. Eine entscheidende Proteinfamilie dabei sind die Formine, welche mit dem Aktin-Zytoskelett interagieren und wichtig für die Zellmotilität, Teilung und Morphogenese sind (Breitsprecher & Goode 2013). Innerhalb von Eukaryoten sind Formine und vor allem die FH1- und FH2-Domänen konserviert (Moseley, Maiti & Goode 2006; Moseley et al. 2004). Derzeit sind 15 Formine mit einer funktionalen FH2-Domäne bekannt. Sie können in sechs Familien aufgeteilt werden. Diese Familien sind DIAPH (*Diaphanous* homologe Proteine), FRL (*Formin-related* Proteine in Leukozyten), DAAM (*Dishelleved*-assoziierte Aktivierer der Morphogenese), FHOD (Formin Homologie Domänen Protein), FMN (Formine), Delphilin und INF (Invertiertes Formin) (Faix & Grosse 2006).

#### 3.4.1 Relevanz von Forminen für die Entstehung von Krebserkrankungen

Formine besitzen essentielle Funktionen, welche die Zellmorphologie und die Migration steuern. Aus diesem Grund werden sie mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht. Eine Überexpression des Formin-ähnlichen Protein 1 (FMNL1) kann mit Leukämie und dem Non-Hodgekin Lymphom assoziiert werden, während die FMNL2-Überexpression die Metastasierung im Kolonkarzinom fördert. Eine Depletion von DIAPH1 reduziert die Invasion von Melanom-Zellen und ist mit hämatopoetischen Krankheiten (Leukämien) assoziiert (Bartolini & Gundersen 2010; Yamana et al. 2006; Su et al. 2004; Narumiya, Tanji & Ishizaki 2009; Lizárraga et al. 2009). Lin et al. fanden heraus, dass eine Inhibition der DIAPH1-Tubulin-Interaktion einen vielversprechenden Ansatz zur Unterbindung der Metastasierung von Darmkrebs darstellt (Lin et al. 2014). Sie wiesen eine spezifische Hochregulierung von DIAPH1 in Patientenproben von kolorektalen Karzinomen nach und zeigten eine positive Korrelation zwischen der **DIAPH1-Expression** und der Entwicklung von Kolonkarzinom-Metastasen. Weitere mechanistische Studien zeigten, dass eine stabile Herunterregulation von DIAPH1 in Kolonkarzinomzellen die Metastasierung bei SCID-Mäusen durch die Regulierung der MT-abhängigen Zelladhäsion nahezu vollständig verhinderte (Lin et al. 2015).

# 3.4.2 DIAPH-Proteine

DIAPH-Proteine gehören zur Familie der Formine. Diese kontrollieren sowohl die Aktin-Polymerisierung als auch die MT-Stabilisierung (Higgs 2005; Bartolini et al. 2008). Für mDia1 und Bni1 sind die funktionellen und strukturellen Domänen und deren Domänengrenzen bereits charakterisiert (Goode & Eck 2007). Die Domänengrenzen davon sind in Abbildung 12 schematisch dargestellt.



**Abbildung 12: Domänenstruktur von Forminen mit Aktin-regulierender Aktivität.** Die Domänengrenzen entsprechen dem Model von mDia1 (oben) und Bni1 (unten). Die Autoinhibition wird durch intramolekulare Wechselwirkungen zwischen dem C-terminalen DAD (gelb) und dem N-terminalen DID (blau) aufrechterhalten. Durch die Bindung von GTP-gebundenem Rho-Protein (GTP Rho) an die GBD-Domäne kann die Autoinhibition aufgehoben werden. Die FH2-Domäne initiiert die Aktin-Filament-Polymerisierung durch Bindung und Stabilisierung von Aktin-Di- oder -Trimeren und bleibt während der Polymerisierung mit dem Plus-Ende des Aktin-Filaments verbunden. FH1 interagiert mit Profilin-gebundenem Aktin (P-Aktin) und beschleunigen die Elongation des Filaments. Abkürzungen: CC – *Coiled-Coil*-Domäne, DAD – autoregulatorische *Diaphanous* Domäne, DD – Dimerisierungsdomäne, DID – inhibitorische *Diaphanous* Domäne, FH1 und FH2 – Formin Homologie 1 und 2, GAP – G-Protein-aktivierendes Protein, GBD – GTPase-Bindungs-Domäne, GEF – Guaninnukleotid-Austauschfaktor (Goode & Eck 2007).

Ohne extrazelluläre Stimuli liegt die Aktin-Polymerisierungs-Aktivität von DIAPH-Forminen autoinhibiert vor (Bartolini & Gundersen 2010; Campellone & Welch 2010; Nürnberg, Kitzing & Grosse 2011; Higgs 2005; Le Clainche & Carlier 2008). Durch Wechselwirkung der N-terminalen DID- (Diaphanous Inhibitorische Domäne) mit der C-terminalen DAD-Domäne Autoregulatorische Domäne) ist die Konformation (Diaphanous verändert, die Dimerisierungsdomänen maskiert und das Protein kann kein aktives Dimer bilden. Durch die GTPasen & Balch 2006)der Interaktion von (Hall, Der mit GBD (Rho-GTPase-Bindungs-Domäne) im N-Terminus kann diese Autoinhibition aufgelöst werden und ein Homodimer zwischen jeweils zwei Dimerisierungs-Domänen (DD) und den dazugehörigen zwei FH2-(Formin Homologie 2) Domänen gebildet werden. Durch die Interaktion kann das in Abbildung 13 dargestellte DIAPH-Dimer mit dem typischen ring/ donut-förmigen aktiven Zentrum ausgebildet werden (Le Clainche & Carlier 2008; Higgs

2005). Für die Aktin-Polymerisierung binden die dimerisierten FH2-Domänen an die Plus-Enden der Aktin-Filamente. Zeitgleich binden die konservierten FH1-Domänen an Profilin, welches ATP-G-Aktin gebunden hat und rekrutiert Profilin-G-Aktin zum Aktin-Filament. Durch diesen Schritt wird das Aktin-Filament verlängert. Die Bindung des Formins an F-Aktin schützt dieses zusätzlich vor dem Capping und der Depolymerisierung.



**Abbildung 13: Schematische Abbildung von DIAPH2.** FH1-Domäne rekrutiert G-Aktin über die Interaktion mit Profilin, welches G-Aktin gebunden hat. Die FH2-Domäne bindet ein Aktin-Filament, welches durch die G-Aktin-Einheiten erweitert/polymerisiert wird. Zusätzlich dient die Bindung des Formins der Stabilisierung des Aktin-Filaments (Chesarone, DuPage & Goode 2010).

Außerdem ist bekannt, dass DIAPH1 und DIAPH3 mit MTs interagieren (Rosales-Nieves et al. 2006; Bartolini et al. 2008) und dabei die FH2-Domäne an das Plus-Ende der Mikrotubuli (MTs) bindet sowie diese stabilisiert (Bartolini & Gundersen 2010; Palazzo, Cook, Alberts & Gundersen 2001; Gaillard et al. 2011; Cheng et al. 2011).

In Bindungsstudien von Bartolini (Bartolini et al. 2008) wurde gezeigt, dass ein Konstrukt aus FH1- und FH2-Domänen von DIAPH3 an MTs in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:4,7 (DIAPH3 zu Tubulin) bindet. Dies weist auf eine Verknüpfung mehrerer Tubuline durch DIAPH3 hin. Die MT-Stabilisierung ist dabei unabhängig von der Aktin-Polymerisierungs-Aktivität. Zudem bündelt die FH1-/FH2-Domäne von DIAPH3 in hohen Konzentrationen auch MTs (Bartolini & Gundersen 2010).



Abbildung 14: Schematische Abbildung der Formin-MT-Interaktion. (I) Formine interagieren mit MT-Plus-Enden während der Migration und (II) mit den neu wachsenden MT-Plus-Enden am Centrosom; (III) Formine können mit MT-Filamenten interagieren und diese stabilisieren; (IV) Formine interagieren mit MT-Plus-Enden an den Kinetochoren während der Mitose; (V) Formine interagieren und stabilisieren MT-Bündel während der Zytokinese (Bartolini & Gundersen 2010).

In Abbildung 14 sind nachgewiesene Interaktionen von Forminen mit MTs abgebildet, jedoch sind der genaue Mechanismus sowie die Bindungsstellen noch nicht bekannt.

In Säugetierzellen wurden drei unterschiedliche Isoformen von DIAPH identifiziert: DIAPH1-3. Das humane Protein DIAPH1 entspricht mDia1, DIAPH2 mDia3 und DIAPH3 mDia2 (Campellone & Welch 2010; Nürnberg, Kitzing & Grosse 2011). Die Isoformen sind sehr homolog und es ist unklar, warum in eukaryotischen Zellen drei verschiedene DIAPH-Formen exprimiert werden. In den letzten Jahren wurde DIAPH1 als Schlüsselmolekül identifiziert, da es eine Vielzahl zellulärer und morphologischer Funktionen sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Zuständen kontrolliert (Faix & Grosse 2006; Narumiya, Tanji & Ishizaki 2009).

## 3.5 DIAPH2 (mDia3)

DIAPH2 ist ein 126 kDa schweres Protein, welches in unstimulierten Zellen im Zytosol lokalisiert ist. Nach Stimulation mit GTPasen wie RhoD oder Cdc42 kann es an frühe Endosomen rekrutiert werden. Durch dieselben GTPasen kann die Aktin-polymerisierende Aktivität von DIAPH2, wie in Abbildung 12 bereits allgemein für DIAPH-Proteine beschrieben wurde, aktiviert werden (Gasman, Kalaidzidis & Zerial 2003). Im Gegensatz zu DIAPH1 ist die Relevanz von DIAPH2 in der Krebsentstehung und Progression noch wenig untersucht.

DIAPH2 liegt in Zellen im Komplex mit den +TIP-MT-binde-Proteinen EB1 und *Adenomatous-polyposis-coli* (APC) vor und stabilisiert dabei MTs (Cheng et al. 2011).

Es ist bekannt, dass Cdc42–mDia3 eine wichtige Rolle für das stabile und vor allem korrekte Chromosomen-Alignment mit amphitelischen/bipolaren Spindel-MTs und der anschließenden Segregation in HeLa-Zellen spielen (Yasuda et al. 2004; Cheng et al. 2011). Cheng et al. zeigten dazu, dass der Effekt des MT-Chromosomen-Alignments abhängig von DIAPH2 ist, die Aktin nukleierende DIAPH2 Funktion allerdings keine Rolle spielt (Cheng et al. 2011).

Die MT-bindende FH2-Domäne von DIAPH2 wird durch die Aurora-B-Kinase *in vitro* phosphoryliert. Die nicht phosphorylierbare DIAPH2-Mutante kann Chromosomen nicht an der Metaphasenplatte positionieren. Dabei besitzt DIAPH2, welches durch Aurora-B phosphoryliert wurde, eine herabgesetzte Fähigkeit Mikrotubuli zu binden und diese gegen den kälteinduzierten Abbau *in vitro* zu stabilisieren. Zellen mit Expression einer phosphomimetischen DIAPH2-Mutante bilden keine stabilen Kinetochor-Mikrotubuli; obwohl sie in der Lage sind Chromosomen in der Metaphasenplatte anzuordnen (Cheng et al. 2011). Wie der Mechanismus der direkten Bindung von DIAPH2 an MTs vermittelt wird, welche Domänen die Interaktion mediieren und inwiefern die Polymerisierung und Stabilisierung abhängig von der Aktivierung durch Cdc42 sind, wurde bisher nicht vollständig geklärt.

Für mDia1 sind die Grenzen funktioneller Domänen bereits charakterisiert (Goode & Eck 2007). Nach einem Alignment zwischen mDia1 und DIAPH2 wurden die Domänengrenzen für DIAPH2 abgeleitet und in Abbildung 15 schematisch dargestellt.



**Abbildung 15: DIAPH2-Protein mit Domänengrenzen.** Domänengrenzen von mDia1 (Goode & Eck 2007) wurden durch ein Alignment für DIAPH2 abgeleitet und Modellhaft dargestellt. **Abkürzungen:** CC – *Coiled-Coil*-Domäne, DAD – autoregulatorische *Diaphanous* Domäne, DD – Dimerisierungs-Domäne, DID – inhibitorische *Diaphanous* Domäne, FH1 und FH2 – *Formin Homologie* 1 und 2 und GBD – *GTPase-Bindungs-Domäne*. Quelle: eigene Abbildung.

Zusammengefasst dient DIAPH2 der Chromosomenausrichtung durch Stabilisierung von Spindel-MTs und ist dadurch für eine korrekte Chromosomenausrichtung essentiell.
### 4 Zielsetzung

Die Chromosomale Instabilität (CIN) von Zellen gilt als "*Hallmark of cancer*". Fehler bei der Chromosomenausrichtung führen zu einer ungleichen Verteilung der Chromosomen und damit zu einer CIN. Eine Ursache für CIN ist die fehlerhafte Anlagerung der Spindel-MTs an die Kinetochore der Chromosomen. In HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass DIAPH2 an diesem Prozess beteiligt ist (Ertych et al. 2014). Daher war das Ziel dieser Arbeit aufzuklären, ob DIAPH2 die CIN beziehungsweise die Spindeldynamik in Kolorektalen-Karzinomzellen reguliert. In der vorliegenden Dissertation wurden hierfür die folgenden Aspekte genauer untersucht:

- Auswirkung der Depletion von DIAPH2 auf das Chromosomenalignment während der Mitose
- 2. Einfluss der Depletion von DIAPH2 auf die Chromosomenverteilung während der Mitose
- 3. Auswirkung der Depletion von DIAPH2 auf Migration, Proliferation und Koloniebildungspotential der Kolorektalen-Karzinomzellen
- 4. Analyse der genauen Lokalisation von DIAPH2 in der Zelle
- 5. Einfluss der Depletion und Aktivierung auf die Stabilität der Spindel-MTs in der Mitose
- 6. Auswirkung der Depletion von DIAPH2 auf die Aktivierung des Spindel-Alignment Checkpoints in der Mitose
- 7. Zellfreie *in vitro*-Untersuchungen von DIAPH2 und dessen Einfluss auf die MT-Dynamik (Bindung, Bündelung, Polymerisierung und Stabilisierung)

Die korrekte Regulation der Spindel-MT-Dynamik während der Zellteilung ist essentiell, um CIN, Progression und Metastasierung von Karzinomen vorzubeugen. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden dazu beitragen die Funktion von DIAPH2 als MAP und dessen essentieller Rolle in der Spindel-MT-Dynamik aufzuklären.

#### 5 Ergebnisse

#### 5.1 DIAPH2 in kolorektalen Karzinomzellen

## 5.1.1 DIAPH2 kontrolliert die Chromosomenausrichtung in kolorektalen Karzinomzellen

Um die Rolle von DIAPH2 bei der CIN und der Spindeldynamik in kolorektalen Karzinomzellen zu untersuchen, wurde das DIAPH2-Level von diversen kolorektalen Karzinomzelllinien mittels Western-Blot bestimmt (nicht gezeigt). Die Zelllinie HT29 wurde aufgrund ihrer hohen endogenen DIAPH2-Expression ausgewählt.



Abbildung 16: Stabile Herunterregulierung von DIAPH2 in HT29-Zellen durch shRNA. mRNA oder Proteinlysate von lentiviral, mit shRNAs gegen DIAPH2 (k.d. 1 + 4) oder *scrambled* shRNAs (Kontrolle) behandelten HT29-Zellen wurden per *realtime* PCR (mRNA) oder durch Western-Blot (Protein) auf deren DIAPH2 Transkription (A) bzw. Proteinbiosynthese analysiert (B und C). DIAPH2 hat ein Molekulargewicht von 126 kDa und Hsc70 ca. 70 kDa. Die Werte für die HT29-Kontrolle wurden auf eins gesetzt und die anderen daran normiert (B). Abgebildet sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten + SD, \* bedeutet p < 0,05.

Das Protein wurde in HT29-Zellen unter Verwendung eines lentiviralen Vektors stabil depletiert. Der Erfolg dieser Depletion wurde durch eine quantitative-*realtime*-PCR und per Western-Blot auf mRNA und Proteinebene nachgewiesen (Abbildung 16). Zusätzlich sind in Abbildung 17 die Proteinlevel mittels Immunofluoreszenz-Färbung von DIAPH2 und Referenzproteinen (Tubulin) in HT29-Zellen während der Mitose abgebildet.



Abbildung 17: DIAPH2-Färbung in HT29-Kontroll- und DIAPH2-depletierten-Zellen. HT29-Zellen die stabil shRNAs gegen DIAPH2 (k.d. 1 + 4) oder *scrambled* shRNAs (Kontrolle) exprimieren, wurden fixiert und DIAPH2 und MTs mittels Antikörpern gegen DIAPH2 (grün) und MT (rot) gefärbt. Kern-DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

In HT29-Zellen war die DIAPH2-Konzentration im Vergleich zu *scrambled* Kontrollzellen um 80 % (k.d. 1 = knock-down 1) oder 95 % (k.d. 4 = knock-down 4) verringert. Für alle weiteren Experimente wurden *scrambled* Kontrollzellen und DIAPH2 k.d. 1 und k.d. 4 Zellen verwendet.

In HeLa-Zellen wird DIAPH2 für die korrekte Ausrichtung der Chromosomen durch Stabilisierung der Kinetochor-Spindeln benötigt (Ertych et al. 2014; Cheng et al. 2011). Um zu überprüfen, ob dies auch bei kolorektalen Karzinomzellen der Fall ist, wurden HT29-Zellen mit DIAPH2-Depletion und *scrambled* Kontrollzellen in der Mitose-Phase synchronisiert und fixiert.



Abbildung 18: DIAPH2 reguliert das chromosomale Alignment. (A) Zellen wurden in der Mitose-Phase synchronisiert und mit DAPI (blau) und einem  $\beta$ -Tubulin-spezifischen Alexa-fluor-568-konjugierten Antikörper (rot) gefärbt, welcher die Spindelfasern anfärbt. Abgebildet sind repräsentative Zellen, welche korrekt *alignte* und nicht korrekt *alignte* Chromosomen zeigen. (B) Die Anzahl der Zellen mit korrekt *alignten* und nicht *alignten* Chromosomen wurde in Kontroll- und DIAPH2-depletierten Zellen (k.d. 1 und k.d. 4) bestimmt und eine Ratio aus Zellen mit korrekt *alignten* zu nicht *alignten* Chromosomen gebildet. Abgebildet sind Mittelwerte des Ratios + SD von mindestens 30 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. \* bedeutet p < 0,05.

Die Chromosomen und MTs wurden mit DAPI bzw. mit einem MT-spezifischen Antikörper angefärbt. Anschließend wurde die korrekte Chromosomenausrichtung und Anheftung der Kinetochor-Spindeln an die Chromosomen mittels Immunfluoreszenz-Aufnahmen analysiert. In Abbildung 18 A sind Beispiele von korrekt ausgerichteten und nicht korrekt ausgerichteten Chromosomen gezeigt. Die Korrektheit der Alignments wurde in DIAPH2-depletierten und *scrambled* Kontrollzellen bestimmt und das Verhältnis von Zellen mit korrekt ausgerichteten zu Zellen mit nicht vollständig korrekt ausgerichteten Chromosomen berechnet. Die Depletion von DIAPH2 reduziert die Anzahl der Zellen mit korrekt ausgerichteten Chromosomen in HT29-Zellen um 20 % in k.d. 1 und um 30 % in k.d. 4. DIAPH2, scheint also tatsächlich an der Chromosomenausrichtung in kolorektalen Karzinomzellen beteiligt zu sein.

HT29 wt Ø 63 Chromosomen ± 2



Abbildung 19: Bestimmung der Chromosomenanzahl von HT29-wt-Zellen. Chromosomen wurden aus Metaphase HT29-wt Zellen isoliert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Eine repräsentative Abbildung ist dargestellt.

Um zu analysieren, ob das chromosomale Missalignment in DIAPH2-depletierten HT29-Zellen zu einer ungleichen Verteilung von Chromosomen nach der Zellteilung führte, wurde die Anzahl von Chromosomen in Kontroll- und DIAPH2-depletierten Zellen bestimmt (Abbildung 19).

In diesem Zusammenhang ist es wichtig anzumerken, dass HT29-Zellen generell chromosomal instabil sind (Lengauer, Kinzler & Vogelstein 1997). Die Depletion von DIAPH2 in HT29-Zellen hatte allerdings keinen detektierbaren Einfluss auf die Anzahl der Chromosomen (Abbildung 20).



Abbildung 20: Bestimmung der Chromosomenanzahl in DIAPH2-depletierten- und Kontroll-HT29-Zellen. (A) Chromosomen wurden aus Metaphase HT29-Zellen isoliert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Eine repräsentative Abbildung der Kontroll-Zellen ist dargestellt. (B) Die Chromosomenanzahl wurde von 30 Zellen jeweils ausgezählt und in einem Boxplot +/- SD aufgetragen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Depletion von DIAPH2 zu einer chromosomalen Fehlausrichtung führt, aber keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der Chromosomen in HT29-Zellen hatte. Dieses Ergebnis weißt stark darauf hin, dass DIAPH2 in HT29-Zellen nicht an der Regulation von CIN beteiligt ist.

#### 5.1.2 Der Einfluss von DIAPH2 auf die Chromosomenkinetik

Da die Chromosomenkinetik von einer genau regulierten MT-Dynamik abhängig ist (Tanaka 2013; Cheeseman 2014), war es möglich, dass DIAPH2 hierfür von Bedeutung ist, obwohl es die Verteilung der Chromosomen nicht beeinflusst hat. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden die HT29-Kontrollzellen und DIAPH2-depletierte Zellen mit einem pH2B-EYFP-Vektor, bereitgestellt von Prof. Dr. Wikmann (UKE Tumorbiologie), transfiziert und die Chromosomenkinetik in der M-Phase durch Live-Cell-Imaging analysiert (Abbildung 21). Aus den erhaltenen Daten konnte die Dauer der Mitose bestimmt werden. Dabei konnte eine signifikant verlängerte M-Phase-Progression in DIAPH2-Depletierten-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden (Abbildung 22 A). Zusätzlich konnte anhand der per Live-Cell-Imaging erhaltenen Bilder (Beispiele dazu in Abbildung 21) nachgewiesen werden, dass DIAPH2-depletierten-Zellen in der Anaphase bei mehr Zellen herausstehende, nicht alignte Chromosomen aufweisen, als HT29-Kontroll-Zellen (Abbildung 22 B).



Abbildung 21: Chromosomenbewegung während der Mitose in DIAPH2-depletierten und Kontroll-HT29-Zellen. HT29-Zellen wurden mit einem Vektor, welcher pH2B-EYFP kodiert, transfiziert. 12 h nach der Transfektion wurde die pH2B-EYFP Fluoreszenz mittels *Live-Cell-Imaging* aufgenommen. Die Zeit (*t*) ist jeweils in Minuten angezeigt.



Abbildung 22: DIAPH2 kontrolliert die Dauer der Mitose in HT29-Zellen. (A) HT29-Zellen wurden mit einem Vektor, welcher für pH2B-EYFP kodiert, transfiziert. 12 h nach der Transfektion wurde die pH2B-EYFP Fluoreszenz mittels *Live-Cell-Imaging* aufgenommen. Die Dauer von Anfang bis Ende der Mitose wurde von 30 Zellen bestimmt und in der Abbildung als Boxplot +/- SD aufgetragen. \* bedeutet p-< 0,05. (B) Die Anzahl der Zellen mit korrekt *alignten* und nicht korrekt *alignten* Chromosomen in der Anaphase wurde in Kontroll- und DIAPH2 depletierten Zellen (k.d. 1 und k.d. 4) bestimmt und eine Ratio aus Zellen mit korrekt *alignten* zu nicht korrekt *alignten* Chromosomen in der Anaphase wurde gebildet. Abgebildet sind Mittelwerte des Ratios aus jeweils 10 Zellen.

Die Auswertung der Daten ergab, dass die DIAPH2-Depletion die Dauer der Anordnung der Chromosomen in der Metaphase-Ebene und die daraus resultierende Geschwindigkeit der Chromosomenbewegung signifikant verlangsamt, was zu einer verlängerten Mitose führte (Abbildung 21 und Abbildung 22 A). Es war in den DIAPH2-depletierten-Zellen häufiger zu beobachten, dass die Zellen die Chromosomen nicht korrekt in der Metaphase-Ebene *alignen* können und dies während der Progression zwischen Meta- und Anaphase nicht zu einem korrekten Alignment korrigiert werden konnte.

Um zu analysieren, ob eine verlängerte M-Phase die Proliferation, Apoptose, Wundheilung (Migration in eine *Scratch-Wunde*), Adhäsion oder Koloniebildung beeinflusst, wurden diese zellulären Prozesse in Kontroll-Zellen und DIAPH2-depletierten-Zellen analysiert.



Abbildung 23: DIAPH2 kontrolliert Proliferation und Koloniebildung hat jedoch keinen Einfluss auf die Apoptose in HT29-Zellen. (A) Um das Koloniebildungspotential zu bestimmen wurden 1000 Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät und inkubiert. Nach zehn Tagen wurden die Kolonien fixiert, mit Giemsa gefärbt und ausgezählt (B) Die Anzahl der Kolonien wurde auf die HT29-Kontroll-Zellen normiert und diese auf 100 % gesetzt. (C) Die Zellproliferation wurde mittels *Live-Cell-Imaging* in der durchgeführt. (D) Zellen wurden mit Caspase-3/7-Red-Apoptosis-Assay Reagent (IncuCyte<sup>®</sup>) inkubiert, um apoptotische Zellen mittels *Live-Cell-Imaging* in der IncuCyte<sup>®</sup> zu detektieren. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Experimenten. \* bedeutet p < 0,05.

Die erhaltenen Daten zeigten, dass sowohl die Proliferation (Abbildung 23 C) als auch die Koloniebildung (Abbildung 23 A und B) in DIAPH2-depletierten Zellen um 20 % verringert waren. Die Apoptose-Rate (Abbildung 23 D) blieb in DIAPH2-depletierten im Vergleich zu *scrambled* Kontroll-Zellen unverändert.



Abbildung 24: DIAPH2 kontrolliert die Migration im *Scratch*-Assay, zeigt jedoch keinen Einfluss auf die Adhäsion in HT29-Zellen. (A) Die Mobilität der Zellen beim Einwachsen einer durch den IncuCyte<sup>®</sup>-*Wound-Maker* erzeugten Wunde wurde mittels *Live-Cell-Imaging* in der IncuCyte<sup>®</sup> durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. (B) 3,5\*10<sup>4</sup> Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichtete 8er-*Chamber-Slides* ausgesät und inkubiert. Nach 4 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen fixiert, gefärbt und die adhärenten Zellen ausgezählt. Abgebildet sind Durchschnittswerte + SD von drei unabhängigen Experimenten.

Im Wundheilungs-Assay (Abbildung 24 A) konnte eine DIAPH2-Expressions-abhängige Migration in den *Scratch* beobachtet werden. Die Kontrollzellen besiedeln den *Scratch* viel schneller als die DIAPH2-depletierten Zellen. Beim Migrations-Assay wachsen die HT29-DIAPH2-k.d. 1 mit ca. 20 % verbleibender DIAPH2-Expression schneller in den *Scratch* als HT29-DIAPH2-k.d. 4 mit ca. 10 % verbleibender DIAPH2-Expression. Die DIAPH2-depletierten Zellen zeigen eine leicht erhöhte Adhäsion (Abbildung 24 B) welche jedoch nicht signifikant ist.

Zusammenfassend führte die Depletion von DIAPH2 zu einem erhöhten Anteil an Zellen mit chromosomalem-Missalignment und dadurch zu einer verlängerten Mitose-Progression. Eine verringerte DIAPH2-Produktion in den Zellen führte dabei zu einer verminderten Migration, einem verringerten Koloniebildungspotential sowie einer verringerten Proliferation. Da die Apoptose und Adhäsion in den HT29-Zellen nicht beeinflusst wurden, kann folglich eine verminderte DIAPH2-Expression das Zellwachstum verlangsamen. Die verlängerte Mitose induzierte jedoch weder die Apoptose noch beeinflusste sie die Adhäsion.

## 5.1.3 DIAPH2 kolokalisiert mit MT-Spindeln und verändert die Spindel-MT-Dynamik

Das Chromosomen-Alignment in HeLa-Zellen wird durch DIAPH2 über die Stabilisierung der Kinetochore-MT reguliert (Yasuda et al. 2004). Sollte dies auch in HT29-Zellen der Fall sein, war zu erwarten, dass DIAPH2 in HT29-Zellen in der M-Phase an Spindel-MTs lokalisiert ist. Um dies zu überprüfen, wurde die Lokalisation von DIAPH2 in der Interphase und in der Mitose von HT29-Zellen mit einem DIAPH2-spezifischen Alexa-fluor488-(grün)und β-Tubulin-spezifischen Alexa-fluor568-(rot)-konjugierten Antikörper analysiert (Abbildung 25 A und B).



Abbildung 25: DIAPH2 ist an den Spindel-MTs in HT29-Kontrollzellen lokalisiert. (A und B) Kontroll-HT29-Zellen wurden gefärbt mit: einem Alexa-fluor-488-konjugierten Antikörper gegen DIAPH2 (grün), mit einem Alexa-fluor-568-konjugierten Antikörper gegen ß-Tubulin (rot) und mit DAPI, um die DNA im Zellkern respektive die Chromosomen zu färben (blau). (A) Mitosezellen und (B) Interphasezellen wurden an der UMIF am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (TCS SP8) analysiert. (C) Zell-Lysate von Kontroll und DIAPH2-herunterregulierten HT29-Zellen wurden mittels Western-Blot aufgetrennt und danach mit Antikörpern gegen detyrosinierte sowie gegen ß-Tubulin analysiert. Abgebildet ist der Mittelwert von detyrMT/ß-Tubulin + SD von jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Wie in Abbildung 25 gezeigt, ist DIAPH2 diffus in Clustern innerhalb des Zytoplasmas in Interphase-Zellen verteilt, zeigt aber keine eindeutige Kolokalisation mit MTs. In Metaphase-Zellen konnte eine Kolokalisation zwischen Spindel-MTs und DIAPH2 nachgewiesen werden (Abbildung 25 (A) und in Abbildung 17 (DIAPH2-Färbung)). Im Vergleich zur Kinetochor-MT-Lokalisation von DIAPH2 in HeLa-Zellen (Yasuda et al. 2004) liegt DIAPH2 in den HT29-Zellen kolokalisiert mit Spindel-MTs vor. Die Kolokalisation in HT29-Zellen liegt dabei verstärkt in der Nähe der Spindelpole vor, was die Annahme stützt, dass DIAPH2 die Spindel-MT-Dynamik kontrolliert (Abbildung 25).

Um zu analysieren, ob DIAPH2 die MT-Dynamik kontrolliert, wurden Lysate aus Kontrollund DIAPH2-depletierten Zellen mittels Western-Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen detyrosinierte (stabilisierte) MTs (detyrMT) und zur Normalisierung gegen ß-Tubulin analysiert. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten von detyrMTs/ß-Tubulin zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und DIAPH2-depletierten Zellen.

Da DIAPH2 sehr deutlich an den Spindel-MTs lokalisiert vorlag (Abbildung 25 A), war es wahrscheinlich, dass das Protein nicht die zelluläre MT-Dynamik im Allgemeinen, sondern nur die von Spindel-MTs kontrollierte. Aufgrunddessen wurden Metaphase-Zellen mit Antikörpern gegen ß-Tubulin und detyrMT-Antikörper (Abbildung 26 A) gefärbt. Über die Fluoreszenzintensität wurde eine Ratio von detyrMTs zu ß-Tubulin bestimmt (Abbildung 26 B). Dabei zeigte sich, dass in DIAPH2-depletierten HT29-Zellen die Detyrosinierung (Stabilisierung) der Spindel MTs, im Vergleich zu HT29-Kontrollzellen, um das 1,5-2-fache gesteigert ist. Bestätigt werden konnte dieses Ergebnis durch eine Quantifikation der Zellen über detyr MT-Fluoreszenz-Signale im MTOC (Spindelpol) und den Spindelfasern (Abbildung 26 C).



Abbildung 26: DIAPH2 kontrolliert die Spindeldynamik in HT29-Zellen. (A) Immunofluoreszenz-Signale von detyrosinierten MTs und  $\beta$ -Tubulin (panMT) von 30 Zellen aus zwei verschiedenen Experimenten wurden mit ImageJ quantifiziert und die Ratio aus detyrMT/panMT berechnet und in (B) abgebildet. (C) HT29-Zellen wurden nach Lokalisation einer starken detyrMT-Färbung eingeordnet in: Hintergrund, MTOC oder eindeutig erkennbare Spindelfasern. Der prozentuale Anteil der Zellen mit Spindel-detyr-MTs wurde von mindestens 30 Zellen bestimmt. \* bedeutet p < 0,05.

Diese Auswertung zeigte, dass in DIAPH2-depletierten Zellen die Anzahl der Zellen mit stabilen Spindel-MTs um 60 % erhöht war. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass DIAPH2 die MT-Stabilität von Spindelfasern erhöht.

Die DIAPH2-Spindel-MTs-Lokalisation sowie das verlangsamte und fehlerhafte Chromosomen-Alignment der DIAPH2-depletierten-Zellen weisen auf ein beeinträchtigtes Spindel-Attachment an die Kinetochore durch die Verminderung des DIAPH2-Levels in den HT29-Zellen hin.



Abbildung 27: DIAPH2 beeinflusst Mitose Checkpoint-Inhibition in HT29-Zellen. (A) Das Proteinlevel von BubR1 sowie die Konzentration von phospho-Bub1 Tyr680 (pBubR1) wurden mittels Western-Blot von DIAPH2-depletierten- und Kontroll-HT29-Zellen bestimmt. Abgebildet ist ein representativer Blot. (B) Bandenintensitäten von vier verschiedenen Zelllysaten wurden bestimmt und die Ratio von pBubR1/BubR1 in den Zellen bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte + SD. \* bedeutet p < 0,05.

Um zu zeigen, ob die fehlerhafte Spindeldynamik der HT29-DIAPH2 depletierten Zellen zur Aktivierung von Spindel-Checkpoint-Proteinen führt wurde die Phosphorylierung von BubR1 analysiert. BubR1 ist ein Mitose-Checkpoint-Protein, welches die korrekte Spindel-Zusammensetzung kontrolliert. Ist das Spindel-Attachment fehlerhaft, wird BubR1 phosphoryliert. Um zu analysieren, ob das fehlerhafte Chromosomen-Alignment zur Phosphorylierung von BubR1 und folglich zum Mitose-Stopp führte, wurde der Phospho-Tyr680-Anteil der Kontroll-Zellen im Vergleich zu den DIAPH2-depletierten-Zellen bestimmt. Mittels Western-Blot wurden die Protein-Level von Phospho-BubR1 und BubR1 bestimmt (Abbildung 27). Im Vergleich zu den Kontrollzell-Lysaten war die Phosphorylierung von BubR1 in Zelllysaten von DIAPH2-depletierten Zellen signifikant erhöht.

Zusammenfassend steuert DIAPH2 die Spindel-MT-Dynamik und infolgedessen das Anbinden der Chromosomen an die Mitose-Spindel in kolorektalen Karzinomzellen. Durch das Fehlen von DIAPH2 wird der Mitose-Checkpoint BubR1 phosphoryliert und die Korrektur des Attachments aktiviert. Dies hat eine verlängerte Mitose zur Folge.

35

#### 5.1.4 Effekt der DIAPH2-Stimulation auf die Spindeldynamik

Die Ergebnisse, welche zeigen, dass DIAPH2 die MT-Dynamik der Spindeln steuerte, wurden in nicht-stimulierten Zellen durchgeführt. Yasuda et al. (Yasuda et al. 2004) zeigten eine Cdc42-Abhängigkeit der Spindel-Dynamik. Um den Einfluss der Cdc42-Aktivität auf die DIAPH2-regulierte MT-Spindel-Dynamik zu bestimmen, wurden nicht-stimulierte Zellen mit ML141 behandelt.



Abbildung 28: Effekt der Cdc42-Stimulation und DIAPH2-Depletion auf die MT-Dynamik. (A) HT29-Kontrollzellen und DIAPH2\_defiziente-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen ML141 (20 und 50  $\mu$ M) für (2 bzw. 4 h) behandelt. DMSO behandelte Zellen dienen als Lösungsmittel-Kontrolle. GTP-gebundenes-Cdc42 wurde mittels PAK-GST-*Beads* aus den Zelllysaten isoliert, durch Western-Blot und Quantifizierung der Cdc42-Banden analysiert. (B) HT29-Kontroll- und DIAPH2\_defiziente-Zellen wurden mit 20  $\mu$ M für 4 h behandelt (+) sowie gleiche Volumen DMSO für 4 h dienten der Lösungsmittel-Kontrolle (-). Zellen wurden fixiert, mit Antikörpern gegen detyrMT und  $\beta$ -Tubulin gefärbt. Immunofluoreszenz-Signale von detyrosinierten MTs und  $\beta$ -Tubulin (panMT) von 30-Zellen aus zwei verschiedenen Experimenten wurden mit ImageJ quantifiziert und die Ratio aus detyrMT/panMT berechnet und abgebildet. Gezeigt sind Mittelwerte + SD. \* bedeutet p < 0,05.

In nicht-stimulierten HT29-Kontrollzellen bewirken geringe Konzentrationen von ML141 (50 µM und 20 µM für 2 oder 4 h) einen Anstieg des aktiven, GTP-gebundenen Cdc42 (Abbildung 28 A). Die HT29-Kontrollzellen und DIAPH2-depletierte Zellen wurden für 4 h mit 20 µM ML141 behandelt, fixiert und danach mit Antikörpern gegen β-Tubulin und detyrMT gefärbt (Abbildung 28 B). Die Fluoreszenzintensität beider Färbungen wurde quantifiziert und eine Ratio von detyrMTs zu β-Tubulin bestimmt. Dabei zeigte sich, dass in HT29-Kontrollzellen der detyrMT-Anteil nach der Cdc42-Stimulation 1,5-fach gesteigert war (Abbildung 28 B). In DIAPH2-depletierten HT29-Zellen hatte die Aktivierung von Cdc42 keine Veränderung der MT-Detyrosinierung zur Folge. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass der Cdc42 vermittelte Effekt auf die MT- Stabilisierung abhängig von DIAPH2 ist. Zudem haben die Depletion von DIAPH2 und die Stimulation von DIAPH2 durch Cdc42 einen ähnlichen Effekt auf die MT-Stabilisierung. Dies zeigt, dass sowohl ein reduziertes DIAPH2-Level, als auch eine gesteigerte DIAPH2-Aktivität die Spindel-Dynamik beeinträchtigen.

## 5.2 In Vitro-Analysen von DIAPH2, DIAPH2-FH2-Domäne und ΔFH2-DIAPH2

Da DIAPH2 die Spindel-MT-Dynamik auch in nicht-stimulierten Zellen kontrolliert, scheint die nicht-GTPase-gebundene, Aktin-Polymerisierungs-autoinhibierte Form (Bartolini & Gundersen 2010; Campellone & Welch 2010; Nürnberg, Kitzing & Grosse 2011) von DIAPH2 zusätzlich die MTs-Dynamik zu regulieren.

#### 5.2.1 Bakterielle Expression und intrazelluläres Verhältnis von DIAPH2

Um diese Schlussfolgerung zu prüfen wurden das Volllängen-Protein (VL) von DIAPH2 sowie die FH2-Domäne (siehe Domänen-Aufbau in Abbildung 29) als Kontrolle in Bakterien als GST-Fusionsproteine exprimiert und durch eine Glutathionmatrix gereinigt. *In vitro*-Versuche im zellfreien System wurden durchgeführt, um den Einfluss des DIAPH2-Proteins ohne äußere zelluläre Einflüsse und Regulatoren zu untersuchen (Abbildung 30). Kontrollexperimente bestätigten, dass die Aktin-Nukleationsaktivität von VL-DIAPH2 autoinhibiert wurde, während die FH2-Domäne erwartungsgemäß die Aktin-Polymerisation erhöhte (Abbildung 30 A und B).



**Abbildung 29: DIAPH2 und FH2-Expressionskonstrukte.** In der Abbildung sind die DIAPH2-VL und das FH2-Expressionskonstrukt mit den jeweiligen funktionellen Domänen dargestellt. **Abkürzungen:** CC – *Coiled-Coil*-Domäne, DAD – autoregulatorische *Diaphanous* Domäne, DD – Dimerisierungs-Domäne, DID – inhibitorische *Diaphanous* Domäne, FH1 und FH2 – Formin Homologie 1 und 2 und GBD – GTPase-Bindungs-Domäne. Quelle: eigene Abbildung.



Abbildung 30: Effekt der DIAPH2-VL auf die *in vitro* Aktin-Polymerisierung und Depolymerisierung. (A) Die DIAPH2-Volllängen-Form und die FH2-Domäne wurden in Bakterien als GST-Fusionsprotein exprimiert und nach deren Aufreinigung deren Effekt auf die spontane Aktinpolymerisation durch Inkubation von DIAPH2 mit Phalloidin-iFluor488-gelabeltem Aktin untersucht. (B) Die spontane Aktinpolymerisation wurde durch den Pyrene-Aktin-Polymerisations-Assay im Tecan Reader bestimmt. (C) Die Depolymerisation wurde durch Verdünnung von F-Aktin auf 0,55 µg ebenfalls im Tecan Reader durch den Pyren-Assay gemessen. Beide Versuche wurden in drei voneinander unabhängigen Messungen analysiert.

Interessanterweise stabilisiert und strukturiert das autoinhibierte DIAPH2-Volllängen-Protein die bereits entstandenen Aktin-Filamente (Abbildung 30 A). Ebenso schützt es gegen den Verdünnungs-induzierten-Abbau von F-Aktin, während die DIAPH2-FH2-Domäne die Depolymerisation fördert (Abbildung 30 C). Offensichtlich ist die DIAPH2-VL zwar nicht dazu in der Lage Aktin zu nukleieren, kann aber bereits polymerisiertes Aktin stabilisieren und strukturieren.

Nachdem verifiziert wurde, dass die Aktin nukleierende-Aktivität von DIAPH2 autoinhibiert war, wurde nun geprüft, ob die DIAPH2-VL die MT-Dynamik beeinflusst (Abbildung 30 B).

Um diese Untersuchungen so physiologisch wie möglich zu gestalten, wurden die intrazelluläre DIAPH2-Konzentration und das Verhältnis von DIAPH2 zu MTs in HT29-Kontrollzellen bestimmt. Dazu wurden Zelllysate und ein DIAPH2-Standard des bakteriell exprimierten GST-DIAPH2 sowie ein Tubulin-Standard mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 31). Es wurden ähnlich intensiv gefärbte Banden genutzt und über deren Intensität, die Protein-Konzentration pro µg zellulärem Protein berechnet.



**Abbildung 31: Bestimmung der intrazellulären DIAPH2- und MT-Konzentration.** Aufgereinigtes GST-DIAPH2 wurde als Standard, zusammen mit HT29-Zelllysaten von 2 x HT29-Kontroll und 1 x HT29 DIAPH2 k.d. 1 mittels Western-Blot analysiert, wobei Hsc70 als Ladekontrolle diente. Aufgereinigtes Tubulin wurde zusammen mit vier HT29-Kontroll-Zelllysaten per Western-Blot analysiert.

| Protein   | Konzentration im Lysat      |
|-----------|-----------------------------|
| β-Tubulin | 5,9 ng/µg Protein im Lysat  |
| Diaph2    | 0,62 ng/µg Protein im Lysat |

| Tabelle 1: Bestimmung des intrazellulärer | Verhältnis der MT zu DIAPH2-Ratio. |
|---|------------------------------------|
|---|------------------------------------|

Die Bandenintensitäten wurden mittels ImageJ ausgewertet und eine MT zu DIAPH2-Ratio bestimmt, indem das intrazelluläre Verhältnis pro µg Gesamtprotein bestimmt wurde. Daraus ergab sich ein Tubulin zu DIAPH2-Verhältnis von ca. 10:1, welches in allen weiteren *in vitro*-Versuchen verwendet wurde.

#### 5.2.2 DIAPH2 beeinflusst die MT-Polymerisation

Um zu analysieren, ob DIAPH2-VL an MTs binden kann, wurden MTs über einen MT-spezifischen Antikörper an Sepharose-G-*Beads* gebunden und mit den DIAPH2-Proteinen (DIAPH2-VL und die FH2-Domäne) inkubiert.



Abbildung 32: Die Volllänge von DIAPH2 stimuliert die MT-Polymerisation. (A) Die Bindung von DIAPH2 an MTs wurde durch die Kopplung von MTs an Sepharose-G-*Beads* mit anschließender Inkubation mit DIAPH2-Protein analysiert. Nach dem Abkochen der Sepharose-G-*Beads* kann gezeigt werden, dass DIAPH2 und FH2 spezifisch an MT enthaltende Sepharose-G-*Beads* binden. (B) Vorpolymerisierte MTs und aufgereinigtes VL-DIAPH2 oder die FH2-Domäne von DIAPH2 wurden mittels Ultrazentrifugation bei 100.000 x g und SDS-PAGE analysiert. Zur Kontrolle wurden VL-DIAPH2 oder die FH2-Domäne ohne Mikrotubuli ultrazentrifugiert. (C) Die Polymerisierung von nicht gelabelten und nicht Taxol-stabilisierten MTs wurde in einem Tecan-Reader bei 340 nm gemessen. Abgebildet sind Mittelwerte aus drei Experimenten.

Nach ausgiebigem waschen der Sepharose-G-*Beads*, wurden die Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Abbildung 32 A). Um dies zu bestätigen wurde ein *Pulldown*-Assay durchgeführt. Dazu wurden vorpolymerisierte MTs mit der DIAPH2-VL und der FH2-Domäne von DIAPH2 inkubiert und durch Ultrazentrifugation die MT-gebundenen DIAPH2-Proteine pelletiert. Das Pellet wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Die DIAPH2-VL und FH2-Domänen-Kontrolle pelletieren nur zusammen mit

Mikrotubuli, was die Bindung der nicht stimulierten DIAPH2-VL an MTs beweist (Abbildung 32 B).

Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl die FH2-Domäne als auch VL-DIAPH2 an MTs binden. Um zu zeigen, ob VL-DIAPH2 die MT-Dynamik verändert, wurde die MT-Polymerisation durch die Messung der Absorption bei 340 nm bestimmt (Abbildung 32 C). Da die Messung der Kontrollen: GST und der GT-Puffer (General-Tubulin-Puffer) keine Unterschiede zeigten, wurden im Folgenden die Pufferkontrolle als negativ-Kontrolle und die FH2-Domäne als positiv-Kontrolle verwendet. Das Ergebnis zeigte, dass VL-DIAPH2 die Geschwindigkeit der MT-Polymerisation nicht nur im Vergleich zur Kontrolle, sondern auch im Vergleich zur FH2-Domäne, erhöht. Die FH2-Domäne erhöhte die MT-Polymerisation, im Vergleich zur Kontrolle, 4-fach, VL-DIAPH2 sogar 40-fach (Abbildung 32 C und Abbildung 38). Die Geschwindigkeit der MT-Polymerisation stieg im Vergleich zur FH2-Domäne um das 10-fache. Zusätzlich steigt die Polymerisierungsrate sofort nach Zugabe der DIAPH2-VL, während bei der Zugabe der DIAPH2-FH2-Domäne die Polymerisierungsrate langsam und stetig ansteigt. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass VL-DIAPH2 nicht nur die MTs polymerisiert, sondern auch die MT-Nukleation fördert.

Zusammengefasst zeigen die Versuche, dass das Formin DIAPH2 an MTs sogar in seiner Aktin-Polymerisierungs-autoinhibierten Form bindet und zusätzlich die Geschwindigkeit der MT-Polymerisation wesentlich schneller erhöht als die FH2-Domäne allein.

#### 5.2.3 DIAPH2 verändert die MT-Struktur

Die Beobachtung, dass die VL-Form von DIAPH2 eine viel stärkere Wirkung auf die MT-Polymerisation hat als die FH2-Domäne, führte zu der Frage, ob die Struktur von MTs auch durch VL-DIAPH2 verändert wird.



Abbildung 33: VL-DIAPH2 und FH2-Domäne erhöhen Länge und Dichte der polymerisierten MTs. (A) Rhodamin-gelabelte MTs, mit oder ohne Taxol vorbehandelt, wurden mit VL-DIAPH2 (FL-*full-length*) oder mit der FH2-Domäne von DIAPH2 inkubiert, auf *Chamber-Slides* aufgetragen und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. (B) Fluoreszenz-Intensitäten wurden aus drei verschiedenen Präparaten jeweils mit ImageJ ermittelt und normiert. Gezeigt sind Mittelwerte + SD. \* bedeutet p < 0.05.

Zu diesem Zweck wurde die Polymerisierung von MTs durch die FH2-Domäne und die VL-DIAPH2 durch Rhodamin-konjugierten MTs mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. In Abbildung 33 A (oben) sind MTs ohne Taxol und (unten) mit Taxol zur MT-Stabilisierung gezeigt. Taxol ist ein sogenanntes *"small molecule*", welches spezifisch an MTs bindet und diese stabilisiert und bündelt. Außerdem fördert Taxol die MT-Polymerisierung, indem es die Dissoziation von GDP-β-Tubulin inhibiert (Needleman et al. 2005; Parness & Horwitz 1981).

In Abwesenheit von Taxol sind in dem Kontroll-Versuch keine MTs und in Anwesenheit der FH2-Domäne nur kurze MTs zu sehen. Bei der Inkubation der DIAPH2-VL mit Rhodamin-konjugierten MTs wurden lange MT-Filamente gebildet. In Gegenwart von Taxol waren MT-Länge und -Dichte schon im Kontroll-Ansatz erhöht. Die DIAPH2-FH2-Domäne und auch das DIAPH2-VL-Protein steigerten somit Dichte und Länge der MTs. Jedoch die VL-Form von DIAPH2 erhöhte Länge und Dichte von MTs stärker als die FH2-Domäne allein (Abbildung 33 A). Dieses Ergebnis bestätigt, dass DIAPH2-VL-Protein die Polymerisierung von MTs effizienter fördert als die FH2-Domäne. Durch die Messung der Fluoreszenzintensität konnte diese Beobachtungen quantifiziert und somit bestätigt werden (Abbildung 33 B).

DIAPH2 erhöht die MT-Polymerisation unabhängig von seiner FH2-Domäne. Zudem stabilisieren beide untersuchten DIAPH2-Formen (DIAPH2-VL und FH2-Domäne) MTs. Da die Wirkung von DIAPH2-VL auf die MT-Polymerisation stärker war als die der FH2-Domäne allein, konnte angenommen werden, dass DIAPH2 die MT-Polymerisation unabhängig von seiner FH2-Domäne beeinflusst. Um diese Annahme zu beweisen, wurde ein GST-DIAPH2-Fusions-Protein mit deletierter FH2-Domäne ( $\Delta$  aa 627-1048),  $\Delta$ FH2-DIAPH2 genannt, hergestellt (Abbildung 34).



Abbildung 34: Schematische Darstellung der in der Arbeit verwendeten DIAPH2-Konstrukte. Darstellung der DIAPH2-VL, ΔFH2-DIAPH2 und der FH2-Domäne von DIAPH2 inklusive Domänen und Domänengrenzen. Abkürzungen: CC – *Coiled-Coil*-Domäne, DAD – autoregulatorische *Diaphanous* Domäne, DD – Dimerisierungs-Domäne, DID – inhibitorische *Diaphanous* Domäne, FH1 und FH2 Formin Homologie 1 und 2 und GBD – GTPase-Bindungs-Domäne. Quelle: eigene Abbildung. Zuerst wurde durch Analyse der Bindung der DIAPH2-Proteine an MT-gekoppelte Sepharose-G-*Beads* (Abbildung 35 A und B) bestätigt, dass  $\Delta$ FH2-DIAPH2 an MT bindet. Dieses Experiment zeigte, vergleichbar mit dem VL-DIAPH2-Protein und der FH2-Domäne, dass  $\Delta$ FH2-DIAPH2 an MTs bindet (Abbildung 35 B).



Abbildung 35: DIAPH2 kontrolliert die MT-Bindung und Polymerisierung unabhängig von seiner FH2-Domäne. (A) Die Bindung von DIAPH2- $\Delta$ FH2 an MTs wurde analysiert, indem wie bereits die VL und FH2 in Abbildung 32 mit MTs an Sepharose-G-*Beads* gekoppelt wurden. Die Eluate wurden mittels Coomassie gefärbter SDS-PAGE aufgetrennt und DIAPH2- $\Delta$ FH2 an MTs gebunden analysiert. (B) Vorpolymerisierte MTs und aufgereinigtes VL-DIAPH2 oder die FH2-Domäne von DIAPH2 wurden mittels Ultrazentrifugation bei 100.000 x g und SDS-PAGE analysiert. Als Kontrolle wurden VL-DIAPH2 oder die FH2-Domäne ohne Mikrotubuli ultrazentrifugiert. (C) Die Polymerisierung von nicht-gelabelten-und nicht-Taxol-stabilisierten-MTs wurde mittels Absorptionsmessung in einem Tecan-Reader bei 340 nm gemessen. Abgebildet ist der Mittelwert aus drei Experimenten.

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von  $\Delta$ FH2-DIAPH2 auf die MT-Polymerisation analysiert.  $\Delta$ FH2-DIAPH2 steigert die MT-Polymerisation im Vergleich zur Kontrolle um das 6-fache (Abbildung 35 C und Abbildung 36). Um die Wirkung von  $\Delta$ FH2-DIAPH2 mit der FH2-Domäne und VL-DIAPH2 auf die MT-Polymerisierung zu vergleichen, wurden alle DIAPH2-Proteine zusammen im Absorptions-Assay gemessen und dargestellt (Abbildung 36).



Abbildung 36: Die MT-Polymerisierung von DIAPH2. Zusammengefasster Versuch der MT-Polymerisierung aller in der Arbeit verwendeten DIAPH2-Proteinkonstrukte. (A) Anfangssteigung der ersten 30 Minuten. (B) Verlauf der MT-Polymerisation für einen Zeitraum von 100 Minuten. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei Versuchen.

Konträr zu diesem Ergebnis war die Länge von Taxol-behandelten Rhodamin-konjugierten MTs in Gegenwart von ΔFH2-DIAPH2, im Vergleich zum Kontrollansatz, kaum verändert (Abbildung 37 A). Die Anzahl an kurzen MTs, kurze polymere Initiations-Keime, war jedoch signifikant erhöht (Abbildung 37 B). Aus diesem Ergebnis kann abgeleitet werden, dass eine zweite MT-Bindedomäne, neben der FH2-Domäne, die MT-Polymerisierung durch einen zu der FH2-Domäne abweichenden unterschiedlichen Mechanismus fördert.



Abbildung 37: DIAPH2 kontrolliert die Initiation der MT-Polymerisierung unabhängig von seiner FH2-Domäne. (A) Rhodamin-gelabelte, mit Taxol vorbehandelt MTs wurden mit  $\Delta$ FH2-DIAPH2 inkubiert, auf *Chamber-Slides* aufgetragen und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. (B) Die Anzahl der MT-Filamente und Initiationskeime wurde von drei verschiedenen Präparaten jeweils ausgezählt und normiert. Gezeigt sind Mittelwerte + SD. \* bedeutet p < 0,05.

DeltaFH2

Kontale

0

Des Weiteren konnte der Einfluss, der drei in der Arbeit verwendeten DIAPH2-Konstrukte, auf die MT-Bündelung bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden MTs durch 4000 x g herunterzentrifugiert. Pellet (MT-Bündel) und Überstand S/N (Tubulin-Monomere bzw. kleine Multimere) wurden durch Coomassie-gefärbte SDS-PAGE analysiert (Abbildung 38 A). Die jeweiligen Banden-Intensitäten der Pellets sowie der Überstände von DIAPH2-VL, DIAPH2-FH2 und  $\Delta$ FH2-DIAPH2 zeigen im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede. Dies ist der Beweis, dass alle in der Arbeit getesteten DIAPH2-Varianten in einem Verhältnis von 1:10 (Protein zu MTs) keine MTs bündeln (Abbildung 38 A und B).



Abbildung 38: DIAPH2 fördert die MT-Polymerisierung und Bündelung unabhängig von seiner FH2 Domäne. (A) Für den Bündelungsversuch wurden MTs im physiologischen Verhältnis von 10:1 mit den drei Varianten: DIAPH2-VL,  $\Delta$ FH2-DIAPH2 und der FH2-Domäne von DIAPH2 inkubiert und bei 4000 x g zentrifugiert. Pellet und Überstand wurden per Coomassie gefärbter SDS-PAGE analysiert. (B) Mittelwerte der Verhältnisse sind dargestellt. (C) Um den Effekt von DIAPH2 zu analysieren wurden die DIAPH2-Proteine in einem Verhältnis von 1:1 (jeweils 1 µg Protein) eingesetzt und wie in A pelletiert. (D) Die Bandenintensitäten von drei unabhängigen Experimenten von Pellet und Überstand wurden bestimmt und die Mittelwerte der Ratio + SD aufgetragen. \* bedeutet p < 0,05.

Um den Einfluss der Proteine in einer höheren Konzentration zu bestimmen, wurden jeweils 1 µg MTs und DIAPH2-Proteine im MT-Bündel-Versuch eingesetzt und per SDS-PAGE analysiert (Abbildung 38 C). Bandenintensitäten wurden quantifiziert und die Verhältnisse von Pellet/Überstand zwischen Kontroll- und DIAPH2-Isoformen verglichen. Diese Auswertung zeigte, dass die Bandenintensität aller DIAPH2-Formen im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher war, während unter den verschiedenen DIAPH2-Formen keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden (Abbildung 38 D). DIAPH2 scheint MTs also erst bei einer hohen, unphysiologischen Proteinkonzentration zu steigern. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass VL-DIAPH2 die MT-Polymerisation und Bündelung unabhängig von der FH2-Domäne fördert, was stark auf die Existenz einer zweiten MT-Bindungsdomäne außerhalb der FH2-Domäne hinweist.

# 5.2.4 DIAPH2-Proteine schützen MTs gegen eine kälteinduzierte Depolymerisation

Ein Anstieg der MT-Polymerisation kann durch eine erneute Anlagerung von GTP- $\beta$ -Tubulin zu MTs oder durch die MT-Stabilisierung, mittels Hemmung der Katastrophe, von MT-plus-Enden verursacht werden (Akhmanova & Steinmetz 2015). Da bereits gezeigt wurde, dass die DIAPH2-FH1/FH2-Domänen MTs in hohen Konzentrationen stabilisieren (Cheng et al. 2011), wurde untersucht, ob dies auch für VL-DIAPH2 und  $\Delta$ FH2-DIAPH2 der Fall ist.

Zu diesem Zweck wurden mit Taxol-behandelte Rhodamin-konjugierte MTs zuerst mit oder ohne DIAPH2-Proteine, im Verhältnis von MT zu DIAPH2 10:1, polymerisiert und die erfolgreiche Polymerisation am Mikroskop kontrolliert. Danach wurden, durch Inkubation bei 4 °C und vortexen, die MTs destabilisiert.

Bei allen Ansätzen waren die MTs nach der Inkubation bei 4 °C kürzer. Wie in Abbildung 39 A und B gezeigt, ist die Anzahl der kurzen MTs nach der Destabilisierung in den Versuchsansätzen mit den DIAPH2-Proteinen höher als im Kontrollansatz. Dieses Ergebnis zeigt, dass in geringen Konzentrationen alle DIAPH2-Proteine einen geringen stabilisierenden Effekt haben.



Abbildung 39: Alle DIAPH2-Konstruke (DIAPH2-VL,  $\Delta$ FH2-DIAPH2 und die FH2-Domäne) schützen MTs vor der kälteinduzierten Depolymerisation. (A) Rhodamin-gelabelte MTs, mit Taxol vorbehandelt, wurden mit den DIAPH2-Konstrukten (DIAPH2-VL (FL – *full-length*),  $\Delta$ FH2-DIAPH2 und FH2-Domäne) erst 20 min bei 37 °C, danach 15 min bei 4 °C inkubiert, auf *Chamber-Slides* aufgetragen und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. (B) Anzahl der MTs pro Bild wurde jeweils aus drei verschiedenen Präparaten ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte + SD. \* bedeutet p < 0,05.

Zusammenfassend ist die Wirkung von DIAPH2 auf MTs abhängig von der FH2-Domäne und einer weiteren, noch nicht identifizierten, MT-Bindedomäne.

#### 6 Diskussion

Abhängig von diversen MAPs wird in der Mitose die bipolare mitotische Spindel (Gadde & Heald 2004) gebildet. Daher ist die feine Regulation der MT-Dynamik von großer Bedeutung für eine fehlerfreie Progression der Mitose. Die unvollständige Anbindung der Spindel-MTs an die Chromosomen in der Mitose kann nach der Zellteilung entweder zu einem Verlust oder zu einem Zugewinn an Chromosomen führen (CIN), was zur Stimulation der Tumorgenese führen kann (Lengauer, Kinzler & Vogelstein 1997; Ertych et al. 2014). Eine gezielte Hemmung von tumor-assoziierten Spindel-MT-MAPs würde es ermöglichen, die Bindung von Spindel-MTs an die Chromosomen zu hemmen und damit die Teilung von Tumorzellen zu inhibieren (Bhat & Setaluri 2007).

DIAPH-Formine gehören zu den Spindel-MT-MAPs. Neben ihrer Aktin-nukleierenden Funktion ist beschrieben, dass sie MTs binden und stabilisieren. Da bereits nachgewiesen wurde, dass DIPAH2 in HeLa-Zellen essentiell für die korrekte Ausrichtung der Chromosomen (Chromosomen-Alignment) ist, indem es die Spindel-MT Dynamik reguliert (Cheng & Mao 2011; Cheng et al. 2011) wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert, ob dies auch für kolorektale Karzinomzellen der Fall ist. Die Hypothese war, dass die DIAPH2-kontrollierte Spindel-MT-Dynamik wichtig für die chromosomal Stabilität von kolorektalen Karzinomzellen ist. Es konnte zwar tatsächlich gezeigt werden, das DIAPH2 essentiell für das Chromosomen-Alignment ist, indem es die Spindel-MT Dynamik und hierdurch die Mitose-Dauer kontrolliert, allerdings führte die DIAPH2-Depletion nicht zur ungleichmäßigen Verteilung der Chromosomen nach der Zellteilung. Über diese zellbiologischen Untersuchungen hinaus, wurden detaillierte molekularbiologische Analysen zur DIAPH2-kontrolllierten MT-Dynamik durchgeführt, innerhalb derer es gelang eine weitere, bisher nicht charakterisierte MT-Bindedomäne zu identifizieren.

# 6.1 DIAPH2 steuert die Spindel-MT-Dynamik und die korrekte Anbindung der Mitose-Spindel an die Chromosomen

Da DIAPH2 in HeLa-Zellen essentiell für die korrekte Chromosomenausrichtung in der Metaphase ist (Yasuda et al. 2004; Cheng et al. 2011), wurde zunächst untersucht, ob dies auch für Kolonkarzinom-Zellen der Fall ist. Eigene Experimente zeigten tatsächlich, dass die Depletion von DIAPH2 zu einer fehlerhaften Chromosomenausrichtung während der Metaphase in HT29-Zellen führte. Dies zeigt sich durch nicht an die Mitose-Spindel angebundene Chromosomen und Chromosomen, welche aus der Metaphase-Ebene *alignter*-Chromosomen herausstehen. Durch die hohe Anzahl an Zellen mit nicht korrekt *alignten* Chromosomen (in Metaphase und Anaphase) in DIAPH2-depletierten-Zellen wäre eine veränderte Chromosomen-Anzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen zu erwarten gewesen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein verminderter DIAPH2-Gehalt in HT29-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Chromosomen hatte. Allerdings ist eine veränderte Chromosomenanzahl in HT29-Zellen generell schwer detektierbar, da diese chromosomal-instabil sind (Lengauer, Kinzler & Vogelstein 1997). Die Zellen weisen bereits eine erhöhte Anzahl von Chromosomen auf (im Mittel 63 Chromosomen  $\pm$  54), deren Anzahl zwischen den einzelnen Zellen stark schwankt. Aus diesem Grund wäre nur ein sehr starker Effekt detektierbar gewesen. Zukünftig sollten Untersuchungen an chromosomal stabilen Zelllinien oder primären Zellen wiederholt und ergänzt werden, um den Einfluss von DIAPH2 auf die Entstehung von CIN tiefergehend zu analysieren.

# 6.2 Ein verminderter DIAPH2-Gehalt führt zu einer verlängerten Mitose durch die Inhibierung der Spindel-Alignment-Checkpoints

Aufgrund der Daten, dass die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen trotz misalignter Chromosomen nicht verändert war, wäre es möglich, dass in den DIAPH2-depletieren HT29-Zellen ein Reparatur-Mechanismus aktiviert wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die BubR1-Phosphorylierung zwischen Kontrollund DIAPH2-depletieren HT29-Zellen untersucht. Eine gesteigerte BubR1-Phosphorylierung ist ein Mitose-Checkpoint, welcher die Mitose unterbricht und einen Reparaturvorgang zum korrekten-Chromosomen-Attachment und Alignment einleitet. Es konnte tatsächlich gezeigt werden, dass die BubR1-Phosphorylierung in den DIAPH2-depletierten-Zellen im Vergleich zu den HT29-Kontroll-Zellen signifikant erhöht war. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch ein Live-Cell-Imaging Experiment, innerhalb dessen die Dauer der Chromosomenseparation in pH2B-EYFP transfizierten HT29-Zellen bestimmt wurde. Es zeigte sich, dass die Depletion von DIAPH2 die Dauer des Auseinanderziehens der Chromosomen verlangsamte, was zu einer verlangsamten Mitose und somit zu einer geringeren Proliferationsrate führte. Eine weitere Möglichkeit die nicht veränderte Anzahl der Chromosomenanzahl zu erklären, wäre, dass Zellen mit aberranter Chromosomenanzahl oder einer verlängerten Mitose durch Apoptose zu Grunde gehen. Jedoch konnte kein gesteigertes Apoptose-Level nachgewiesen werden. Zusammenfassend ist aufgrund der aktuellen Datenlange anzunehmen, dass die durch DIAPH2-Depletion entstandenen Schäden in der Mitose repariert werden, was zu einer verlangsamten Mitose führt, aber eine Ungleichverteilung der Chromosomen verhindert.

# 6.3 Ein verminderter DIAPH2-Gehalt führt zu einer verringerten Migration und Proliferation der Kolonkarzinom-Zellen

Neben der verminderten Proliferation führte die DIAPH2-Depletion in den HT29-Zellen zur reduzierten Migration sowie zu einer verringerten Bildung von Kolonien aus Einzelzellen. Die verminderte Koloniebildung kann mit der DIAPH2-kontrollierten Mitosedauer erklärt werden. Die DIAPH2-Depletion verlängert die Mitosedauer und verlangsamt hierdurch die Zellteilung, was zu einer verringerten Bildung von Kolonien aus Einzelzellen führen kann.

In dieser Arbeit wurde die zelluläre Migration durch einen sog. Wundheilungs-Assay, bei dem die Zellen in eine gesetzte Wunde wandern, analysiert. Dieser Assay erlaub es nicht zu unterscheiden, ob die Zellen aktiv in die Wunde hineingewandert sind oder ob sich die Wunde durch Hineinwachsen der Zellen geschlossen hat. Da der Wundheilungs-Assay mittels IncuCyte<sup>®</sup> im *Live-Cell* Modus durchgeführt wurde, war es möglich das Verhalten der Zellen zu beobachten. Hierbei war kein aktives migrieren der HT29-Zellen in die Wunde zu detektieren, weshalb die Wunde wahrscheinlich durch Teilung der Zellen geschlossen wurde. Um diese Beobachtung zu bestätigen, sollten zukünftig einzelne Zellen markiert und die Bewegung dieser Zellen per *Live-Cell-Imaging* und anschließender Software-basierter Analyse weiter untersucht werden. Erst dann kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob DIAPH2 tatsächlich die Beweglichkeit der Zellen kontrolliert.

#### 6.4 DIAPH2 reguliert die Spindel-MT-Dynamik unabhängig von Cdc42

Vorherige Untersuchungen zeigten eine Lokalisation von DIAPH2 an der Spindel-Kinetochor-MT-Verbindung in HeLa-Zellen (Cheng & Mao 2011; Cheng et al. 2011). Die Autoren nehmen an, dass DIAPH2 die Verbindung zwischen Chromosomen und MTs stabilisiert. Anhand von eigenen Immunfluoreszenzfärbungen konnte eine DIAPH2-Lokalisation an Spindel-MTs nahe der Zellpole gezeigt werden, jedoch keine Lokalisation an den Kinetochoren. Da die Depletion von DIAPH2 die Spindel-MT-Dynamik veränderte, ist anzunehmen, dass DIAPH2 in HT29-Zellen nicht die Kinetochor-MT-Verbindung stabilisiert, sondern die Dynamik der Spindel-MTs kontrolliert. Hierdurch wäre auch die DIAPH2 gesteuerte Chromosomenkinetik zu erklären.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Depletion von DIAPH2 die Spindel-MT-Stabilität auch in nicht-stimulierten HT29-Zellen kontrollierte, also offensichtlich unabhängig von Cdc42 an MTs bindet. Dieses Ergebnis war unerwartet, da DIAPH-Formine in Abwesenheit von Rho-GTPasen in einer Konformation vorliegen, in welcher die Aktin bindende FH1- sowie die Aktin und MT-bindende FH2-Domäne durch benachbarte Proteindomänen nach außen abgeschirmt werden. Die Aktin-nukleierende Aktivität von Forminen ist in dieser Konformation nachweislich autoinhibiert (Higgs 2005; Bartolini et al. 2008). Es war allerdings nicht bekannt, ob auch die MT-modulierende Aktivität von Forminen in dieser Konformation autoinhibiert ist.

## 6.5 *In vitro* stabilisieren oder polymerisieren DIAPH2, DIAPH2-FH2-Domäne und ΔFH2-DIAPH2 MT-Filamente

Um untersuchen zu können, ob DIAPH2 die MT-Dynamik tatsächlich in Abwesenheit von GTP-Cdc42 kontrolliert, wurde das Protein, sowie DIAPH2-Mutanten rekombinant in Bakterien exprimiert und gereinigt. Neben dem Volllängen-Protein (DIAPH2-VL) wurde die isolierte FH2-Domäne, für welche bekannt war, dass sie Aktin nukleiert und MTs bindet, gereinigt und als Kontrolle eingesetzt. Darüber hinaus erfolgt die Reinigung einer Mutante mit deletierter FH2 Domäne ( $\Delta$ FH2-DIAPH2).

Um die Aktivität des bakteriell produzierten DIAPH2 zu testen, wurden zuerst Aktin-Polymerisierungs-Assays durchgeführt. Die Aktin-nukleierende Aktivität von DIAPH2-VL war wie erwartet in Abwesenheit von GTP-Cdc42 autoinhibiert, während die FH2-Domäne Aktivität aufwies. Allerding zeigte sich durch Anfärben der Aktin-Filamente, dass die DIAPH2-VL Aktin-Filamente stabilisiert und zu polarisierten Strukturen verbindet. Dies weist auf eine Interaktion zwischen DIAPH2 und F-Aktin hin, welche vermutlich durch eine Domäne vermittelt wird, die nicht essentiell für die Aktinnukleation und Polymerisierung ist.

Die Analyse der DIAPH2 kontrollierten MT-Dynamik zeigte ebenfalls, dass DIAPH2 diesen Prozess auch in Abwesenheit von GTP-Cdc42 stark beeinflusst. Interessanterweise war die Geschwindigkeit der MT-Polymerisierung im Vergleich zur FH2-Domäne um das 10-fache gesteigert. Der schnelle Anstieg der MT-Polymerisierung in Gegenwart des DIAPH2-VL-Proteins lässt dabei auf eine MT-nukleierende-Aktivität von DIAPH2 schließen. Diese MT-nukleierende-Aktivität wurde bei TPX2 und XMAP215 durch die beschleunigte Bildung und Stabilisierung des +-Endes von MTs nachgewiesen (Wieczorek, Bechstedt, Chaaban & Brouhard 2015). Zukünftige Experimente werden zeigen, ob im Fall von DIAPH2 ein ähnlicher Mechanismus vorliegt.

Zudem induzierten das DIAPH2-VL-Protein und dessen FH2-Domäne die Bildung von Taxolstabilisierten-MT-Netzwerken. Taxol selbst führt bereits zur Bildung von MT-Filamenten und Bündeln (Needleman et al. 2005; Parness & Horwitz 1981). Durch Interaktion zwischen DIAPH-Molekülen könnte eine Verknüpfung der MT-Bündel erfolgen, die zur Vernetzung führt. Ein solches Modell wäre nur denkbar, wenn das DIAPH2-VL-Protein Dimere oder Polymere bildet, wie es für FH2-Domänen bereits beschrieben ist (Chesarone, DuPage & Goode 2010; Cheng et al. 2011). Um diese Frage zu klären, sollten sowohl das DIAPH2-VL-Protein als auch die FH2-Domäne per Größenausschluss-Chromatographie analysiert werden. Die Untersuchung der unterschiedlichen Fraktionen wird dann zeigen, ob das DIAPH2-VL-Protein Dimere oder Polymere bildet.

## 6.6 DIAPH2 bindet MTs durch eine zweite, bisher nicht charakterisierte MT-Bindungsdomäne

Zusätzlich zu diesen neuen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass nicht nur die FH2-Domäne von DIAPH2 an der MT-Polymerisierung beteiligt ist, sondern auch eine Domäne außerhalb der FH2-Domäne. Dieses Ergebnis erklärt, warum die Volllängen-Form von DIAPH2 die MT-Polymerisation effizienter stimuliert als die FH2-Domäne allein.

Eine DIAPH2-Mutante mit deletierter FH2-Domäne ( $\Delta$ FH2-DIAPH2) polymerisierte MTs ähnlich effizient wie die FH2-Domäne. Die Bildung von Taxol-stabilisierten-MT-Netzwerken unterblieb allerdings in Gegenwart von  $\Delta$ FH2-DIAPH2. Dies deutet darauf hin, dass  $\Delta$ FH2-DIAPH2 keine Polymere bildet und die MT-Polymerisierung durch einen von der FH2-Domäne abweichenden Mechanismus stimuliert. Folgendes Modell würde die MT-modulierende Aktivität der Volllängen-Form von DIAPH2 erklären. Die DIAPH2-VL bindet als Dimer über die FH2-Domäne an MTs und eine nicht dimerisierte Domäne rekrutiert  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin oder kurze MT-Filamente an das wachsende MT-Filament (Abbildung 40 B). Dieses Modell setzt allerding voraus, dass DIAPH2 in der "nicht-autoinhibierten Form" vorliegt. In der "autoinhibierten Form" wäre die FH2-Domäne vermutlich nicht dazu in der Lage MTs zu binden, weil sie durch die DID- und die DAD-Domäne verdeckt wäre. Allerdings wurde durch (Kato et al. 2001) beschrieben, dass eine Domäne C-Terminal von der DAD-Domäne (aa 1048-1101) zur MT-Bindung von mDia beiträgt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein weiteres Fragment C-Terminal zur GBD-Domäne (aa 156-455) für die Lokalisation von mDia1 an Spindel-MTs erforderlich ist.



Abbildung 40: Schematische Darstellung des Arbeitsmodells der Bindung von DIAPH2 in seiner dimerisierten und autoinhibierten Form an MTs. (A) Ergebnis des MT-Polymerisierungs-Assay der Pufferkontrolle, der FH2-Domäne von DIAPH2 und der DIAPH2-VL (FL - full-length). (B) Bindung von DIAPH2-VL in seiner dimerisierten Form über zweite MT-Bindedomänen an MTs. (C) Erwartete Bindung der autoinhibierten DIAPH2-VL über eine bisher unidentifizierte zweite Bindedomäne, welche vermutlich im C-Terminus lokalisiert vorliegt. Abkürzungen: DAD – autoregulatorische Diaphanous Domäne, FH1 und FH2 – Formin Homologie 1 und 2, CC – Coiled-Coil-Domäne, DD – Dimerisierungs-Domäne, DID – inhibitorische Diaphanous Domäne und GBD – GTPase-Bindungs-Domäne. Quelle: eigene Abbildungen.

Es ist daher denkbar, dass DIAPH2 in Abwesenheit von Rho-GTPasen über diese Fragmente an MTs bindet und  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Dimere und/oder kurze MT-Fragmente an MTs rekrutiert (schematisch in Abbildung 40 C aufgezeigt). Um dieses Modell zu verifizieren, müssten die jeweils dazu homologen Fragmente in DIAPH2 bakteriell exprimiert, gereinigt und deren Einfluss auf die MT-Dynamik geprüft werden. Um allerdings abschließend zu verstehen, wie das Volllängen-Protein von DIAPH2 MTs bindet und beeinflusst, wäre es erforderlich, die 3-D-Struktur der DIAPH2-MT-Komplexe jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit von Cdc42 aufzuklären. Bisher ist allerdings nur die Struktur der FH2-Domäne von mDia1 aufgeklärt (Shimada et al. 2004). Zukünftig sollte versucht werden das DIAPH2-VL-Protein in ausreichender Menge und Reinheit zu produzieren, um Kristallisationsansätze durchführen zu können. Ziel wäre es die Struktur des DIAPH2-VL-Proteins jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit von Aktin, MTs und Rho-GTPasen weitergehend zu analysieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Depletion von DIAPH2 eine Reduktion der Stabilität der Spindel-MTs zur Folge hat. Detaillierte *in vitro*-Analysen ergaben, dass DIAPH2 auch in Abwesenheit von Cdc42 die MT-Dynamik beeinflusst, indem es die MT-Polymerisierung und -Vernetzung stimuliert. Es ist anzunehmen, dass Cdc42 den Einfluss von DIAPH2 auf die MT-Dynamik ändert und hierdurch die DIAPH2-kontrollierte MT-Dynamik moduliert. Überträgt man dieses Modell auf Tumorzellen, würde eine fein gesteuerte, zeitweilige Cdc42-Aktivierung von DIAPH2 eine präzise MT-Spindel-Dynamik-Regulation ermöglichen.

#### 7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde die Funktion von DIAPH2 in Kolonkarzinom-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von DIAPH2 in HT29-Kolonkarzinomzellen zu einer fehlerhaften Chromosomenausrichtung führte. Diese fehlerhafte Chromosomenausrichtung hatte eine verlängerte Mitose zufolge, beeinflusste jedoch nicht die Chromosomenanzahl. Zudem ergaben die Analysen DIAPH2-depletierter Zellen ein verringertes Koloniebildungspotential, eine verminderte Proliferationsrate und eine reduzierte Migrationsrate im Scratch-Assay. Aufgrund von Immunofluoreszenz-Lokalisationsstudien konnte eine DIAPH2-Lokalisation an Spindel-MTs nachgewiesen werden. Ergänzend wurde in weiteren Analysen gezeigt, dass die Depletion von DIAPH2 die Spindel-MT-Stabilität auch in nicht-stimulierten HT29-Zellen kontrollierte. Um die genaue Funktion von DIAPH2 für die MT-Dynamik zu untersuchen, wurden in vitro-Versuche durchgeführt.

Durch zellfreie Assays wurde nachgewiesen, dass DIAPH2-VL, eine DIAPH2 Mutante mit deletierter FH2-Domäne ( $\Delta$ FH2-DIAPH2) sowie die FH2-Domäne an MTs binden und deren Polymerisierung stimulieren. Hierbei hatte das DIAPH2-VL-Protein den stärksten Effekt. Bisher war bekannt, dass die FH2-Domäne Aktin und MTs bindet und deren Polymerisierung stimuliert. Außerdem wurde vermutet, dass die DIAPH2-VL in einer Konformation vorliegt, die es unmöglich macht, einen Einfluss auf die MT-Dynamik auszuüben. Nach aktuellem Stand der Literatur führt erst die Bindung von Cdc42 an DIAPH2 zur einer aktiven Proteinkonformation, welche die FH2-Domäne freisetzt und die Bindung von Aktin und MTs ermöglicht. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen nun erstmals, dass DIAPH2-VL auch in Abwesenheit von Cdc42 an MTs bindet und deren Dynamik kontrolliert. DIAPH2-VL zeigte einen 10-mal stärkeren Effekt auf die MT-Polymerisierung als die FH2-Domäne allein. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine DIAPH2-Domäne außerhalb der FH2-Domäne ebenfalls zur Stimulation der MT-Polymerisierung beiträgt. Aus den vorliegenden Daten wurde ein Arbeitsmodell abgeleitet, nachdem das DIAPH2-VL-Protein über ein Fragment außerhalb der FH2-Domäne an MT-Dimere oder -Polymere bindet und diese an MTs rekrutiert. Zukünftige Studien werden zeigen, ob sich dieses Arbeitsmodell bestätigt. Da gezeigt werden konnte, dass DIAPH-Proteine eine essentielle Funktion bei der Metastasierung von Kolonkarzinomzellen spielen, wäre es medizinisch von großem Interesse, die genaue Funktion von DIAPH-Proteinen bei der MT-Dynamik vollständig aufzuklären, um therapeutisch in diesen Prozess eingreifen zu können.

## 8 Material und Methoden

## 8.1 Materialien und Geräte

### 8.1.1 Chemikalien

Verwendete Chemikalien wurden von den unten aufgelisteten Firmen in der höchsten Qualitätsstufe bezogen:

| Tabelle 2: V | <i>'erwendete</i> | Chemikalien. |
|--------------|-------------------|--------------|
|--------------|-------------------|--------------|

| Chemikalie  | Firma                      |
|---|----------------------------|
| 2-Mercaptoethanol   | Sigma                      |
| 4-[4,5-Dihydro-5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-1H-             | Sigma-Aldrich              |
| pyrazol-1-yl]-benzenesulfonamide (ML141)                    |                            |
| 4',6-Diamino-2-phenylindol (DAPI)                           | Roth                       |
| Acrylamid/Bisacrylamid                                      | Serva                      |
| Adenosine 5' -triphosphate disodium salt (ATP)              | Sigma                      |
| Agar  | Invitrogen, BD Biosciences |
| Aktin   | Cytoskeleton, Inc.         |
| Albumin Standard  | Pierce                     |
| Ammonium Persulfate (APS)                                   | Bio-Rad                    |
| Bio-Rad Protein Assay (Bradford-Assay)                      | Bio-Rad                    |
| Bovines Serumalbumin (BSA)                                  | Biomol                     |
| Caspase-3/7-Red-Apoptosis-Assay-Reagenz                     | Essen Bioscience           |
| CASY-Ton  | OLS OMNI Life Science      |
| Chemiluminescence-Entwickler-Reagenz (ECL                   | GE Healthcare Bio-Sciences |
| Prime Western-Blot Detection Reagent)                       |                            |
| cOmplete <sup>®</sup> , Mini, EDTA-free protease-inhibitor- | Roche                      |
| cocktail  |                            |
| Cryo Safe (Einfriermedium)                                  | CCpro                      |
| Dimethylsulfoxide (DMSO)                                    | Sigma                      |
| Dithiothreitol (DTT)  | Sigma                      |
| Entellan <sup>®</sup>                                       | Merck                      |
| Ethidiumbromid  | Sigma                      |
| FuGENE <sup>®</sup> HD                                      | Promega                    |
| Giemsas Azur-Eosine-Methylblaulösung                         | Merck                                 |
|--|---------------------------------------|
| Glutathion-Sepharose-Beads (GST-Beads)                       | GE Healthcare                         |
| GTP: 100mM stock   | Cytoskeleton, Inc.                    |
| LB-Medium  | Roth                                  |
| Lipofectamine <sup>®</sup> LTX mit Plus <sup>™</sup> Reagenz | Thermo Fisher Scientific <sup>™</sup> |
| Milchpulver (non-fat dry)                                    | Roth                                  |
| M-PER <sup>™</sup> Mammalian Protein Extraction Reagent      | Thermo Scientific <sup>™</sup>        |
| Natriumhypochloritlösung 12 %                                | Roth                                  |
| NNN'N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)                    | Sigma                                 |
| Paraformaldehyd (PFA)  | Sigma                                 |
| Poly-L-Lysin MW 150.000-300.000                              | Sigma                                 |
| Protein Marker (Spectra BR)                                  | Thermo Scientific <sup>™</sup>        |
| Puromycin dihydrochloride                                    | Sigma                                 |
| Pyren-Aktin  | Cytoskeleton, Inc.                    |
| qPCR Mastermix (FastStart SYBR Green)                        | Roche                                 |
| Roti <sup>®</sup> -Blue-quick (Protein Färbe Lösung)         | Roth                                  |
| Sepharose-G-Beads  | Sigma-Aldrich                         |
| Sodium dodecyl sulfate (SDS)                                 | Serva                                 |
| Sucrose  | Merck                                 |
| Triton X-100   | Sigma                                 |
| Tubulin Protein (>99% pure): porcine brain                   | Cytoskeleton, Inc.                    |
| Tubulin Protein (rhodamine): porcine brain                   | Cytoskeleton, Inc.                    |
| Tween <sup>TM</sup> 20                                       | Roth                                  |

# 8.1.1 Laborgeräte

# Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte.

| Gerät (Model)                         | Firma                          |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| Bakterienschüttler                    | Brunswick                      |
| CASY <sup>®</sup> Zellzählgerät       | Schärfe System                 |
| Elektrophorese Kammer                 | Amersham Bioscience            |
| Fluorometer/Photometer (Multiscan FC) | Thermo Scientific <sup>™</sup> |
| Flüssiger Stickstoff Behälter         | KGW Isotherm                   |
| Heizblock                             | Eppendorf                      |

| Imager (LAS4000)                                      | GE Healthcare                   |
|---|---------------------------------|
| IncuCyte <sup>®</sup> Wound-Maker                     | Essen Bioscience                |
| Inkubator (Heracell <sup>TM</sup> 240i)               | Thermo Scientific <sup>TM</sup> |
| Inverted Mikroskop (Diavert)                          | Leitz                           |
| Keyence Mikroskop                                     | Keyence                         |
| Konfokales Laserscanning Mikroskop (TCS SP8)          | Leica                           |
| Magnetrührer  | Heidolph                        |
| Mikrowelle  | Bosch                           |
| Nanodrop (Mikrovolumen-Spektralphotometer)            | Peqlab                          |
| pH-Meter  | WTW                             |
| Photometer  | Eppendorf                       |
| Pipetten  | Eppendorf                       |
| Pipettierhilfen (Pipetus®)                            | Hirschmann, Brand               |
| Sonifier Ultraschallgerät                             | Branson                         |
| Tecan (infinite 200i)                                 | Tecan                           |
| Thermocycler (Gradient/Personal)                      | Eppendorf                       |
| Thermocycler Light Cycler <sup>®</sup> 2.0 Instrument | Roche                           |
| Transferkammer Western-Blot                           | Biorad                          |
| Ultrazentrifuge (Optima TL)                           | Beckmann                        |
| UV-Tisch  | Bachhofer                       |
| Visitron Spinning disk-TIRF                           | Improvision                     |
| Vortex (Genie2 <sup>TM</sup> )                        | Scientific Industries           |
| Waage   | Mettler-Toledo, Sartorius       |
| Wärmeschrank  | Memmert                         |
| Wasserbad   | Memmert                         |
| Wippschüttler   | Heidolph, Stuart                |
| Zentrifugen   | Heraeus, Hermle, Thermo         |
|   | Scientific™                     |

# 8.2 Verbrauchsmaterialien

Verwendete Verbrauchsmaterialien wurden von den unten aufgelisteten Firmen bezogen:

| Tabelle 4: Verwe | endete Verbra | uchsmaterialien. |
|------------------|---------------|------------------|
|------------------|---------------|------------------|

| Verbrauchsmaterial                         | Firma                      |
|--|----------------------------|
| μ-slide-8-well (8er-Chamber-Slides)        | Ibidi                      |
| Blot-Papier                                | Roth                       |
| CASY-Röhrchen                              | OLS OMNI Life Science      |
| Cryo-Aufbewahrungsgefäße                   | Sarstedt, Nunc             |
| Gel-Glas Platten und Gel-Zubehör           | Amersham Bioscience        |
| Küvetten                                   | Sarstedt                   |
| low protein binding micro-Reaktionsgefäßen | Sarstedt                   |
| Nitrocellulose Membran                     | GE Healthcare              |
| Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße        | Sarstedt, Eppendorf        |
| Skalpell                                   | Braun                      |
| Spritzen                                   | Braun                      |
| Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm)            | Sarstedt                   |
| Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur   | BD, Falcon, Sarstedt, Nunc |
| Zell-Schaber                               | Braun                      |
| Vivaspin500 Zentrifugen-Konzentratoren     | Sigma-Aldrich              |

# 8.2.1 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden in zweifach destilliertem Wasser angesetzt und filtriert. Wenn notwendig wurden die Lösungen und Puffer sterilfiltriert und 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Der pH-Wert wurde, sofern nicht anders vermerkt, mit 1 M NaOH oder 1 M HCl eingestellt.

# Tabelle 5: Verwendete Puffer.

| Puffer                     | Zusammensetzung                                    |
|----------------------------|--|
| 10x Aktin-Polymerisations- | 500 mM KCl, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM ATP    |
| Puffer                     |  |
| 4x SDS-Probenpuffer        | 250 mM Tris, pH 6,8, 4 % SDS, 30 % Glycerol, 1,3 % |
|                            | Bromphenolblau, 20 % Mercaptoethanol               |
| Elutionspuffer             | Lysepuffer mit 30 mM GSH, pH = 8                   |
| General-Aktin-Puffer       | 5 mM Tris-HCl pH = 8 und 0,2 mM $CaCl_2$           |
| (G-Puffer)                 |  |

| General-Tubulin-Puffer      | $80 \text{ mM PIPES pH} = 6,9; 2 \text{ mM MgCl}_2 \text{ und } 0,5 \text{ mM}$    |
|-----------------------------|--|
| (GT-Puffer)                 | EGTA   |
| Lysepuffer                  | PBS, 10 % Glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5   |
|                             | mg/ml Lysozym, 0,5 mM PMSF und 1x Protease-  |
|                             | Inhibitor-Cocktail   |
| PAK-Lysepuffer              | 50 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 1 mM EDTA, 150 mM  |
|                             | NaCl, 1 % (v/v) NP-40 (IGEPAL CA 360), 1 mM  |
|                             | PMSF   |
| PBS-Puffer                  | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O, |
|                             | $pH = 7,4, 1,5 \text{ mM } KH_2PO_4$   |
| Running-Puffer              | 20 mM HEPES,150 mM KCl, 10 % Glycerol, 1 mM  |
|                             | DTT und Protease-Inhibitor-Cocktail  |
| TBS-Puffer                  | 150 mM NaCl, 7,7 mM Tris-HCl, pH = 7,5   |
| Western-Blot-Laufpuffer     | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS   |
| Western-Blot-Transferpuffer | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol   |

# 8.2.2 Kits

In der vorliegen Dissertation wurden folgende Kits verwendet. Durchführung jeweils immer nach den Protokollen, sofern nicht anders vermerkt.

| Kit   | Verwendungszweck                                | Firma            |
|---|---|------------------|
| Apoptose Kit                                    | Apoptose IncuCyte <sup>®</sup>                  | Essen Bioscience |
| NucleoBond <sup>®</sup> Xtra Midi EF            | Isolation großer<br>DNA-Mengen                  | Macherey-Nagel   |
| NucleoSpin <sup>®</sup> RNA Kit                 | mRNA-Isolation                                  | Macherey-Nagel   |
| NucleoSpin <sup>®</sup> Gel und PCR<br>Clean-up | Aufreinigung von DNA aus<br>Gel und Umpufferung | Macherey-Nagel   |
| pGEM <sup>®</sup> -T Easy-Vector Systems        | Zwischenklonierung und<br>Vervielfältigung DNA  | Promega          |
| Phosphatase, Alkaline from calf intestine       | Dephosphorylierung von<br>Vektoren              | Sigma            |

### Tabelle 6: Verwendete Kits.

| Plasmid Miniprep Kit,<br>NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid (NoLid) | Isolation kleiner<br>DNA-Mengen            | Monarch <sup>®</sup> ,<br>Macherey-Nagel |
|--|--|--|
| Subcellular Fractionation  | Fraktionierung von<br>Membran & Cytoplasma | Thermo<br>Scientific™                    |
| SuperScript <sup>™</sup> III Reverse Transcriptase               | Reverse Transkription von mRNA in cDNA     | invitrogene                              |
| LightCycler <sup>®</sup> FastStart DNA Master<br>SYBR Green I    | Durchführung einer qPCR                    | Roche                                    |

### 8.2.3 Bakterienstämme und Enzyme

Es wurden die Baktierenstämme *XL1-Blue-E.-coli* und *BL21(DE3)pLysS-E.-coli* aus dem Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie des UKEs verwendet. Alle verwendeten Enzyme stammen von New England Biolabs, Fermentas oder Thermo Scientific<sup>™</sup>.

 Tabelle 7: Verwendete Enzyme.

| Enzym | Verwendung                             | Sequenz                 |
|-------|--|-------------------------|
| AseI  | pGEM <sup>®</sup> -T Easy zerschneiden | ATTAAT                  |
| DpnI  | Verdau von Ausgangsplasmid bei QC      | Verdau methylierter DNA |
| NotI  | DIAPH2 in pGEX-6P-2A                   | GCGGCCGC                |
| XhoI  | DIAPH2 in pGEX-6P-2A                   | CTCGAG                  |

# 8.2.1 Antikörper

Die im Folgenden aufgelisteten primären und sekundären Antikörper (AK) wurden für Western-Blot Analysen (WB) und für Immunfluoreszenz (IF)-Anwendungen eingesetzt.

| Primär AK     | Spezies   | Blocken | Verdünnung | Verdünnung | Firma                 |
|---------------|-----------|---------|------------|------------|-----------------------|
|               |           | WB      | WB         | IF         |                       |
| Aktin         | Maus      | 2,5 %   | 1:10.000   | -          | Sigma-Aldrich         |
|               |           | BSA     |            |            | #A2066                |
| BubR1         | Kaninchen | 5 % MP  | 1:2000     | -          | Abcam                 |
|               |           |         |            |            | #ab172581             |
| Cdc42         | Maus      | 2,5 %   | 1:2000     |            | <b>BD</b> Biosciences |
|               |           | BSA     |            |            | #610928               |
| detyrosinated | Kaninchen | 2,5 %   | 1:2000     | 1:200      | Abcam                 |
| α-Tubulin     |           | BSA     |            |            | #ab48389              |
| DIAPH2        | Kaninchen | 5 % MP  | 1:1000     | 1:100      | Sigma-Aldrich         |
|               |           |         |            |            | #HPA005647            |
| E-Cadherin    | Kaninchen | 2,5 %   | 1:2500     | 1:150      | Cell Signaling        |
|               |           | BSA     |            |            | #3195S                |
| EGFR          | Maus      | 5 % MP  | 1:1000     | -          | Santa Cruz            |
|               |           |         |            |            | #sc-373746            |
| HSC70         | Kaninchen | 5 % MP  | 1:6000     | -          | Santa Cruz            |
|               |           |         |            |            | #sc-7298              |
| Phalloidin    | -         |         | -          | 1:1000     | Abcam                 |
| iFluor488     |           |         |            |            | #ab176753             |
| Phospho-      | Kaninchen | 5 % MP  | 1:2000     | -          | Abcam                 |
| BubR1         |           |         |            |            | #ab200061             |
| ß-Tubulin     | Kaninchen | 2,5 %   | 1:1000     | 1:200      | Sigma-Aldrich         |
|               |           | BSA     |            |            | #T4026                |

Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper.

Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper.

| Sekundär Antikörper                               | Verdünnung | Firma               |
|---|------------|---------------------|
| Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 goat anti-rabbit IgG | IF 1:2000  | Invitrogen #A-11008 |
| Alexa Fluor <sup>®</sup> 546 goat anti-mouse IgG  | IF 1:2000  | Invitrogen #A-11030 |
| HRP-conjugated goat anti-mouse IgG                | WB 1:10000 | Abcam #ab205719     |
| HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG               | WB 1:10000 | Abcam #ab205718     |
| HRP-conjugated donkey anti-goat IgG               | WB 1:5000  | Santa Cruz #sc-2354 |

### 8.2.2 Expressionskonstrukte

Die folgenden Plasmide enthalten humane cDNA zur Expression in eukaryotischen Zellen oder Bakterien. Mit #-Nummer gekennzeichnete Plasmide und Konstrukte sind auf der Seite: https://www.addgene.org/ inklusive Sequenzinformationen und Resistenzgen zu finden.

| Tabelle 10: Auflistung der | r verwendeten | Expressionskonstrukte. |
|----------------------------|---------------|------------------------|
|----------------------------|---------------|------------------------|

| Konstrukt (#Addgene)      | Expression von/ | Vektor      | Ierkunft               |  |
|---------------------------|-----------------|-------------|------------------------|--|
|                           | Fusionsprotein  | (Resistenz) |                        |  |
| IRCM_DIAPH2               | DIAPH2          | IRCM (Kana) | Source BioScience      |  |
| (human)                   |                 |             |                        |  |
| IMAGE ID #40125965        |                 |             |                        |  |
| pGEM <sup>®</sup> -T Easy | -               | (Amp)       | Promega                |  |
| pGEX-4T1-N-GST-FH2        | GST-FH2         | pGEX-4T1-N- | Dr. Schmidt (Bonn,     |  |
|                           |                 | GST (Amp)   | Structural Immunology) |  |
| pGEX-6P-2A                | GST + Insert    | (Amp)       | Prof. Kindler          |  |
|                           |                 |             | (UKE - Humangenetik)   |  |
| pH2B-EYFP #51002          | pH2B-EYFP       | pEYFP-N1    | Prof. Wikmann          |  |
|                           |                 | (Kana)      | (UKE - Tumorrbiologie) |  |
| pLKO.1 shRNA-Plasmid      | Puro +          | (Amp)       | Sigma                  |  |
| pMD2.G #12259             | VSV-G           | (Amp)       | Prof. Jücker           |  |
|                           |                 |             | (UKE - IBS)            |  |
| psPAX2 #12260             | HIV-1 gag und   | (Amp)       | Prof. Jücker           |  |
|                           | pol             |             | (UKE - IBS)            |  |

In der Tabelle aufgeführte Plasmide wurden dankenswerter Weise von Prof. Dr. M. Geyer sowie Dr. Schmidt (Bonn, Structural Immunology), Prof. Dr. S. Kindler (UKE - Humangenetik), Prof. Dr. H. Wikmann (UKE - Tumorbiologie) und Prof. Dr. M. Jücker (UKE - IBS) zur Verfügung gestellt. Die genutzten Resistenzantibiotika wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml Ampicillin (Amp) und 50 µg/ml Kanamycin (Kana) eingesetzt.

# 8.2.3 Software

In der Arbeit wurde folgende aufgelistete Software verwendet:

| Tabelle 11: Auflistung | verwendeter Software. |
|------------------------|-----------------------|
|------------------------|-----------------------|

| Name                             | Anwendung  |  |  |  |  |
|----------------------------------|--|--|--|--|--|
| ImageJ/FIJI                      | Bild- und Bildsequenzauswertung in XYZ-Ebene           |  |  |  |  |
| IncuCyte <sup>®</sup> Zoom 2016B | Zellanalyse, Auswertung von Proliferation, Scratch und |  |  |  |  |
|                                  | Apoptose-Assays  |  |  |  |  |
| Keyence                          | Auswertung und Messung von mikroskopischen             |  |  |  |  |
|                                  | Aufnahmen  |  |  |  |  |
| Light-Cycler-Software-3.5        | Analyse der qPCR-Daten                                 |  |  |  |  |
| (Roche)                          |  |  |  |  |  |
| MATLAB                           | Statistische Auswertung von Daten und Abbildung von    |  |  |  |  |
|                                  | mathematischen Datensätzen                             |  |  |  |  |
| Office                           | Kalkulation und Normierung der erzeugten Datensätze    |  |  |  |  |
| Serial Cloner und SnapGene       | Klonierung und Analyse von DNA Sequenzen               |  |  |  |  |

# 8.3 Molekularbiologische Arbeiten

# 8.3.1 Klonierung

Tabelle 12: Verwendete Sequenzierungsprimer.

| Primer                       | Sequenz $(5' \rightarrow 3')$ | Tm      |
|------------------------------|-------------------------------|---------|
| DIAPH2 Seq_1000 fw           | 5'-TGCCCTTGTCACTTCTCCTTA      | 61,6 °C |
| DIAPH2 Seq_1500 fw           | 5'-AAGAAGTTCGATGAAGAATTC      | 54,1 °C |
| DIAPH2 Seq_2000 fw           | 5'-CAGATCTCTTTGCCAAATTGG      | 57,8 °C |
| DIAPH2 Seq_2500 fw           | 5'-GAGTTAGTTCTTCTTGTTGGA      | 55,5 °C |
| DIAPH2 Seq_3000 fw           | 5'-AGTGAGAGAAAAACAATAAGAG     | 53,2 °C |
| DIAPH2 Seq_500 fw            | 5'-TCATGAATTACGATCGGGTAT      | 56,9 °C |
| DIAPH2 Seq_600 rv            | 5'-CCAAGACCTTCATGGCCAAAG      | 62,0 °C |
| pGEM <sup>®</sup> -T-Easy NP | 5'-GACGTTGTAAAAACGACGGCCAGTG  | 66,8 °C |
| pGEM <sup>®</sup> -T-Easy RP | 5'-AACAGCTATGACCATGATTACGCC   | 63,4 °C |

Der IMAGE-Klon (IMAGE: 40125965) der DIAPH2-cDNA wurde von "Source BioScience Life Sciences" erworben. Zuerst wurde die gesamte DIAPH2-Sequenz mittels Sequenzierungsprimern (Tabelle 12) kontrolliert. Anschließend wurden Klonierungsprimer hergestellt, durch welche das Gen in diverse Vektoren eingebracht oder modifiziert werden konnte. Weitere Aufgaben der Klonierungsprimer sind das Einfügen von Restriktionsenzym-Schnittstellen, Start-/Stopcodon und eventuell Basen zum Überbrücken des Leserasters von Fusionsproteinen (Tabelle 13). Zur bakteriellen, rekombinanten Expression von DIAPH2 in pGEX-6P-2A wurde die DIAPH2 cDNA zuerst in den Zwischenklonierungsvektor  $pGEM^{\mbox{\sc B}}$ -T Easy-Vektor kloniert und vervielfältigt.

Tabelle 13: Auflistung verwendeter Primer und dazugehöriger Restriktionsenzyme.

| Plasmid    | Primer   | Enzym  |
|------------|--|--------|
| pGEX-4T1-  | Bezogen von Sebastian Schmitt und Matthias Geyer aus der | EcoRI, |
| N-GST      | "Biochemistry and Structural Immunology" aus Bonn        | NotI   |
| pGEX-6P-2A | FW: CTCGAGATATGGAGCAGCCCGGGGGGGGGGGG                     | XhoI,  |
| DIAPH2     | RV: TTATGTAGCTGATCTTGGATTCGCCGGCG                        | NotI   |
| pGEX-6P-2A | Qickchange pGEX-6P-2A DIAPH2- ΔFH2 (624-1049)            | XhoI,  |
| DIAPH2-    | FW: GAGTTCCTCCTCCCCCACTCATTGATATAAACAA                   | NotI   |
| AFH2       | RV: TTGTTTATATCAATGAGTGGGGGGGGGGGGGGGAGGAACTC            |        |

# 8.3.2 Vervielfältigung der DNA

Tabelle 14: PCR-Zusammensetzung.

| Bestandteil der PCR          | Menge |
|------------------------------|-------|
| 5x High Fidelity (HF)-Puffer | 10 µl |
| dNTPs (10 mM)                | 1 µl  |
| Primer FW (10 µM)            | 1 µl  |
| Primer RV (10 µM)            | 1 µl  |
| DNA-Template (10ng/µl)       | 1 µl  |
| Phusion (DNA-Polymerase)     | 1 µl  |
| A. dest.                     | 35 µl |

|      | Temperatur | Dauer            | Schritt                  |
|------|------------|------------------|--------------------------|
| 1.   | 98 °C      | 30 s             | Initiale Denaturierung   |
| 2.   | 98 °C      | 15 s             | Denaturierung            |
| 3.   | 65 °C      | 30 s             | Annealing der Primer     |
| 4.   | 72 °C      | 120 s            | Elongation (bei Phusion) |
| 5.   | 72 °C      | 600 s            | Finale Elongation        |
| 6.   | 4 °C       | $\infty$         | Lagerung                 |
| 2 4. |            | 30 x Wiederholen | Vervielfältigung der DNA |

Tabelle 15: PCR-Programm.

Das per PCR, nach den Protokollen aus Tabelle 14 und Tabelle 15, amplifizierte Konstrukt wurde mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Gel und PCR *Clean-up* -Kit nach dem Protokoll von Macherey-Nagel durchgeführt und die DNA in 20 µl NE-Puffer eluiert. Die DNA wurde zur Überprüfung der Amplifikation auf einem 1 %-igem Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

# 8.3.3 PA-Tailing

# Tabelle 16: Zusammensetzung PA-Tailing.

| Bestandteil des PA-Tailings   | Menge |
|-------------------------------|-------|
| Eluat des PCR Clean up        | 13 µl |
| 50mM MgCl <sub>2</sub>        | 1 µl  |
| 2mM dATP                      | 2 µl  |
| 10x Taq-DNA-Polymerase Puffer | 2 µl  |
| Taq-DNA-Polymerase            | 2 µl  |

Der PA-Tailing-Ansatz wurde zum Anfügen eines Poly-A-Schwanzes 30 min bei 72 °C inkubiert.

### 8.3.4 *pGEM*<sup>®</sup>-*T Easy* Ligation

Die Vektorkarte des pGEM<sup>®</sup>-T Easy ist im Anhang im Abschnitt 10.1.1 aufgelistet. Der pGEM<sup>®</sup>-T Easy-Vektor besitzt in der geöffneten Multiple-Cloning-Site einen Poly-T-Überhang, mit welchem das Insert über den Poly-A-Schwanzes interagieren und dadurch mittels einer T4-Ligase integriert werden kann.

| Bestandteil der pGEM <sup>®</sup> -T Easy Ligation | Menge |
|--|-------|
| 2x Ligations-Puffer                                | 5 µl  |
| pGEM <sup>®</sup> -T easy                          | 1 µl  |
| PA-Tailing Ansatz                                  | 2 µl  |
| A. dest.   | 1 µl  |
| T4 Ligase  | 1 µl  |

 Tabelle 17: Zusammensetzung der pGEM<sup>®</sup>-T Easy Ligation.

Der pGEM<sup>®</sup>-T Easy Ligations-Ansatz wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert.

# 8.3.5 Transformation von Plasmid-DNA in E.-coli

Der komplette Ligationsansatz oder die zu vervielfältigende DNA wurden zu 100  $\mu$ l der kompetenten *XL1-Blue-E.-coli* Suspension hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min. Nach der Zugabe von 900  $\mu$ l antibiotikafreiem-LB-Medium wurden die transformierten Zellen für 90 min bei 37 °C und 350 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension mit 900  $\mu$ l Medium auf LB-Amp (100  $\mu$ g/ml)-Agarplatten pipettiert und durch schwenken verteilt. Die Platten wurden für ca. 1 h unter der Bakterienwerkbank getrocknet und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

# 8.3.6 DNA-Isolierung aus E.-coli

Zur Isolierung der Plasmid DNA wurden sechs Klone gepickt. Jeweils eine 6 ml Übernachtkultur in LB mit Amp (100  $\mu$ g/ml) angesetzt und nach 18 h schütteln bei 37 °C die Plasmid DNA der Bakterien mit dem DNA Mini-Isolierungs-Kit (Macherey-Nagel oder Monarch) nach dem Protokoll isoliert.

### 8.3.7 Restriktionsverdau und Isolation von Insert und Vektor-Backbone

Die DNA wurde isoliert und 3 µg DNA mit den durch die PCR eingefügten Klonierungs-Restriktionsenzymen XhoI und NotI geschnitten. Da der  $pGEM^{\mathbb{R}}$ -*T Easy* mit knapp über 3 kb ungefähr dieselbe Größe hat wie DIAPH2 mit 3,3 kb, wurde das  $pGEM^{\mathbb{R}}$ -*T Easy*-Rückgrat jeweils mit AseI in 2 Teile gespalten.

| Restrict<br>Incubate | ion analys<br>d with Not | is<br>I + | of pGEMTeasy_Sequen<br>XhoI + AseI | ızDIA | PH2pGex.xdna | [Circular] | 10000        | _          |
|----------------------|--------------------------|-----------|------------------------------------|-------|--------------|------------|--------------|------------|
| 5 fragme             | nts genera               | ted       |                                    |       |              |            | 8000         |            |
| 1 <b>:</b>           | 3.343 bp                 | -         | From XhoI[42]                      | То    | NotI[3385]   |            | 5000<br>4000 | =          |
| 2:                   | 1.476 bp                 | -         | From AseI[4890]                    | То    | XhoI[42]     |            | 3000         |            |
| 3:                   | 1.235 bp                 |           | From AseI[3655]                    | То    | AseI[4890]   |            | 2000<br>1500 | $\equiv$ _ |
| 4:                   | 211 bp                   | -         | From NotI[3385]                    | То    | AseI[3596]   |            | 1000         |            |
| 5:                   | 59 bp                    | -         | From AseI[3596]                    | То    | AseI[3655]   |            |              |            |
|                      |                          |           |                                    |       |              |            | 500          | —          |

Abbildung 41: Virtueller Verdau von DIAPH2 in pGEM®-T Easy durch Serial Cloner. Durch die Vektorkarte kann die Sequenz analysiert, die Schnittstellen der Restriktionsenzyme von XhoI, NotI und AseI detektiert und die Länge der Teilstücke vorhergesagt werden.

Der Restriktionsverdau wurde auf ein 1,5 %-iges Agarosegel mit 10 µl Ethidiumbromid pro 100 µl Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die detektierten Banden entsprachen der Vorhersage aus Abbildung 41. Die DIAPH2-Bande mit 3,3 kb wurde ausgeschnitten und mittels Gel- und PCR-Clean-Up-Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Die Vektorkarte des pGEX-6P-2A ist im Anhang im Abschnitt 10.1.2 aufgelistet. Der Vektor pGEX-6P-2A wurde ebenso mit XhoI und NotI-Enzymen geschnitten auf dem 1,5 %-igen Agarosegel aufgetrennt, die Bande bei ca. 5 kb ausgeschnitten und per Gel- und PCR-Clean-Up Kit aufgereinigt.

#### Ligation in den pGEX-6P-2A-Vektor 8.3.8

### Tabelle 18: Zusammensetzung des Ligationsansatzes zur Klonierung in den pGEX-6P-Vektor.

| Bestandteil der pGEX-6P-2A-Ligation | Menge |
|-------------------------------------|-------|
| 10x Ligations-Puffer                | 1 µl  |
| pGEX-6P-2A-Vektor                   | 1 µl  |
| Insert-DNA                          | 7 µl  |
| T4 Ligase                           | 1 µl  |

Der pGEX-6P-2A-Ligations-Ansatz wurde bei 16 °C für 20 h inkubiert. Der vollständige Ligationsansatz wurde nach der Ligation in kompetente *XL1-Blue-E.-coli* transformiert, inkubiert und die vervielfältigte DNA isoliert.

Durch einen erneuten Verdau der Plasmide mit den Restriktionsenzymen, die der Ligation dienten, konnten durch ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel überprüft werden, ob das Insert in das Plasmid integriert wurde. Zusätzlich wurde das unverdaute Plasmid mit aufgetragen, um zu sehen, ob die Größe des Leerplasmids inklusive Insert stimmt und nicht eventuell zwei Inserts in dem Plasmid integriert sind. Ebenfalls wurden im Anschluss die Plasmide komplett sequenziert, um Mutationen ausschließen zu können.

| <b>Tabelle 19: Zusammensetzung</b> | des Sequenzieransatzes. |
|------------------------------------|-------------------------|
|------------------------------------|-------------------------|

| Bestandteil des Sequenzieransatzes | Menge  |
|------------------------------------|--------|
| Plasmid DNA                        | 1,2 µg |
| Primer (10 pmol)                   | 3 µl   |
| Insert                             | 7 µl   |
| A. dest.                           | 1 µl   |

Das Endvolumen des Sequenzieransatzes wird auf 15  $\mu$ l in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefüllt und bei Seqlab sequenziert. Die FH2-Domäne (aa 624-1049) wurde von S. Schmidt in den pGEX-4T1-N-GST kloniert und zur Verfügung gestellt.

#### 8.3.9 Quickchange-Mutagenese für DIAPH2-Domänen

Durch eine *Quickchange*-Mutagenese wurde die cDNA von DIAPH2 im  $pGEM^{\text{®}}$ -T Easy um die Aminosäuren von 624 bis 1049 ( $\Delta$ FH2) verkürzt. Ein sequenzüberspannender Primer mit je 17 Aminosäuren vor und nach der deletierten Sequenz wurde entworfen:

**FW DIAPH2 ΔFH2(624-1049):** GAGTTCCTCCTCCCCCACTCATTGATATAAACAA **RV DIAPH2 ΔFH2(624-1049):** TTGTTTATATCAATGAGTGGGGGGGGGGGGGGAGGAACTC

| Bestandteile der PCR                      | Menge   |
|---|---------|
| 5x GC-PCR-Puffer                          | 5 µl    |
| dNTPs (10 mM)                             | 0,5 µl  |
| Je 1 Ansatz pro Primer FW oder RV (10 µM) | 1 µl    |
| DNA-Template (10 ng/µl)                   | 2,5 µl  |
| Phusion (DNA-Polymerase)                  | 0,5 µl  |
| A. dest.                                  | 13,5 µl |
| DMSO                                      | 2 µl    |

Tabelle 20: Quickchange-Mutagenese PCR-Zusammensetzung.

Die PCR wurde in 2 Ansätzen, wie in Tabelle 20 aufgelistet, mit jeweils einem Ansatz pro Primer zusammengesetzt und nach dem Protokoll aus Tabelle 21 als Gradienten-PCR gestartet. Der GC-Puffer wurde verwendet, da die Primer hohe *Annealing*-Temperaturen haben und dieser Puffer besser dafür geeignet ist.

|      | Temperatur | Dauer            | Schritt                  |
|------|------------|------------------|--------------------------|
| 1.   | 98 °C      | 30 s             | Initiale Denaturierung   |
| 2.   | 98 °C      | 15 s             | Denaturierung            |
| 3.   | 65-72 °C   | 30 s             | Annealing der Primer mit |
| 5.   | 03 12 0    | 505              | Temperaturgradient       |
| 4.   | 72 °C      | 120 s            | Elongation (bei Phusion) |
| 5.   | 72 °C      | 600 s            | Finale Elongation        |
| 6.   | 4 °C       | $\infty$         | Lagerung                 |
| 2 4. |            | 10 x wiederholen | Vervielfältigung der DNA |

#### Tabelle 21: Quickchange-Mutagenese PCR-Programm.

Danach wurden beide Ansätze mit jeweils FW- und RV-Primer (Tabelle 13) zusammengegeben und das gleiche Programm wurde 18 weitere Zyklen laufen gelassen. Die Template-DNA wurde mit DpnI verdaut. DpnI verdaut methylierte DNA, wordurch das PCR-Produkt unverdaut bleibt und die Template-DNA abgebaut wird. Eine Probe vor und nach dem Verdau wurde jeweils auf ein Ethidiumbromid-Gel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die PCR und der Verdau erfolgreich waren. Nach dem positiven Ergebnis des Gels, wurden 10 µl Plasmid-DNA aus der Quickchange-Mutagenese-PCR, in kompetente *XL1-Blue-E.-coli* transformiert und vervielfältigt. Per DNA-Mini-Isolierungs-Kit wurden die gewonnenen Plasmide isoliert und die Deletion in der Sequenz konnte per Gel visualisiert sowie per Sequenzierung überprüft werden.

### 8.4 In vitro-Versuche mit rekombinantem DIAPH2, FH2 und ΔFH2

#### 8.4.1 Rekombinante Expression in *BL21(DE3)pLysS-E.-coli*

Für die Transformation wurden zunächst je 200 ng pGEX-6P-2A-Plasmid-DNA der DIAPH2-Volllänge (VL) (Abbildung 46), DIAPH2-ΔFH2 (Abbildung 47) oder pGEX4T1-N-GST-FH2-624-1049-DIAPH2 (Abbildung 48) zu 100 µl der kompetenten BL21(DE3)pLysS-E.-coli-Suspension hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 1 min. Nach der Zugabe von 900 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) wurden die transformierten Zellen für 90 min bei 37 °C und 750 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Nach der Inkubation wurden 100 µl der Bakterien-Suspension mit 900 µl Medium auf LB-Amp-Agarplatten pipettiert und durch Schwenken auf der gesamten Oberfläche verteilt. Die Platten wurden für ca. 1 h unter der Bakterienwerkbank getrocknet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Inkulturnahme der transformierten E.-coli-Zellen wurde mit einer Pipettenspitze eine Kolonie gepickt, in ein Schüttelröhrchen mit 6 ml LB-Medium mit Amp überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in 500 ml LB-Medium mit Amp überführt. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 300 rpm bis zu einer OD 600 von 0,8 inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte danach mit 0,7 mM Isopropyl-β-Dthiogalactopyranosid (IPTG) über Nacht bei einer 20 °C und 300 rpm Inkubation. Die Zellen wurden bei 4500 x g für 10 min bei 4 °C pelettiert, in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Lysepuffer (Tabelle 5) aufgenommen und drei Mal für 60 s sonifiziert. Die Lysate wurden 45 min bei 4 °C und 48.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem 0,45 µM Spritzenvorsatzfilter filtriert. Glutathion-Sepharose-Tag-Beads (GST-Beads (Tabelle 2)) wurden drei Mal mit Running-Puffer (Tabelle 5) äquilibriert und jeweils bei 300 x g für 3 min zentrifugiert. Die Lysate und die gleiche Menge Running-Puffer wurden jeweils auf die GST-Beads geladen und für 2 h in 50 ml Reaktionsgefäßen bei RT kopfüber rotiert. Anschließend wurden die GST-Beads jeweils bei 300 x g für 5 min zentrifugiert und drei Mal mit Lysepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (Tabelle 5). Dabei wurden die GST-Beads drei Mal jeweils 10 min bei RT kopfüber rotiert, bei 300 x g für 5 min herunterzentrifugiert und der Überstand jeweils als Elutionsfraktion gesammelt. Die Proteinmenge der Elutionsfraktionen und die noch verbleibende Proteinmenge auf den GST-Beads wurde nach der Auftrennung auf einer SDS-PAGE- mit Roti<sup>®</sup>-Blue-quick gefärbt und quantifiziert. Die Proteinelutionen wurden bei 4 °C auf Eis gelagert, um die Proteinaktivität zu erhalten. Bei einer Lagerung bei -20 °C geht die Aktivität von DIAPH-Proteinen verloren.

#### 8.4.2 Pyren-Aktin-Polymerisierung und -Depolymerisierung

Polymerisation: Durch Pyren gelabeltes Aktin kann die Polymerisierung von Aktin gemessen werden. Aufgrund der räumlichen Annäherung der Pyren-Reste steigt die Fluoreszenz dieser und stellt ein Maß der Polymerisierung dar. Pyren-Aktin (1 µg/µl) und ungelabeltes Aktin (0,1 µg/µl) von (Tabelle 2) wurden in G-Puffer (General-Aktin-Puffer (Tabelle 5)) mit 0,2 mM ATP und 1 mM DTT versetzt. Um bereits polymerisiertes F-Aktin zu pelletieren, wurde das Aktin 1 h auf Eis gelagert, danach für 15 min bei 14.000 x g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand für die Messungen verwendet. Für die Messung wurden 5 µg Aktin, 0,5 µg Pyren-Aktin mit jeweils 5 µg DIAPH2-VL-Protein, DIAPH2-FH2-Domäne oder DIAPH2-∆FH2 in **G-Puffer** schwarze 96-Well-Platten in pipettiert. Im Fluoreszenzspektrometer (Tecan Reader) wurde mit 10 Messungen im Fluoreszenz-Kanal eine Basislinie aufgenommen. Danach wurden, um die Polymerisierung durch die Zugabe von Salzen und ATP zu starten, 20 µl eines 10x Aktin-Polymerisations-Puffer zu jedem Well hinzufügt und gleichmäßig durchmischt. Die Wells wurden alle 30 s über einen Zeitraum von 1 h gemessen.

**Depolymerisation:** Der Einfluss der Proteine auf die Depolymerisationsrate wurde durch eine 1:10 Verdünnung mit G-Puffer nach der Polymerisationsmessung durchgeführt. Erneut wurde die Platte nach der Verdünnung für 1 h gemessen.

# 8.4.3 Aktin-Polymerisations-Visualisierung

Aktin (1 mg/ml) wurde in G-Puffer mit 0,2 mM ATP und 1 mM DTT gelöst. Um bereits polymerisiertes F-Aktin zu pelletieren, wurde es für 1 h auf Eis gelagert und danach für 15 min bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weiteren Experimente verwendet. 18  $\mu$ l (1  $\mu$ g) DIAPH2-VL-Protein, DIAPH2-FH2-Domäne oder DIAPH2- $\Delta$ FH2 in G-Puffer mit 200  $\mu$ M ATP und 1 mM DTT, 2  $\mu$ l Aktin, 2,5  $\mu$ l Phalloidin-iFluor488 (Tabelle 8) (1:25 Verdünnung in PBS) sowie 2,5  $\mu$ l 10-fach Assay-Puffer wurden dazu gegeben und auf einem, zuvor für 30 min Poly-L-Lysin (Tabelle 2) beschichteten und getrocknetem *Chamber-Slide* verteilt. Nach 20 min wurden Aktin-Bündel und vernetzte Aktin-Strukturen im Fluoreszenzmikroskop bei einer 60 fachen Vergrößerung analysiert.

#### 8.4.4 Protein-MT-Interaktion und Bindung

Um die Bindung der DIAPH2-Proteine an Mikrotubuli zu untersuchen, wurden die Proteine mit MTs inkubiert und konnten anschließend durch eine Ultrazentrifugation als Komplex im Pellet nachgewiesen werden. Zuerst wurde lyophylisiertes Tubulin-Protein (Tabelle 2) auf 10 mg/ml (0,2 mM) in General-Tubulin-Puffer (GT-Puffer (Tabelle 5)) mit 1 mM GTP gelöst, auf 10 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff (N2) eingefroren und bei -80 °C gelagert. Danach wurden die MTs mit 1 mM GTP für 5 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, um polymerisierte MT-Filamente herzustellen. DIAPH2-Proteine (DIAPH2-VL, DIAPH2-FH2-Domäne und DIAPH2- $\Delta$ FH2) wurden 15 min bei 15.000 x g und 4 °C herunterzentrifugiert, um unlösliches, denaturiertes Protein zu pelletieren, damit die MT-Bindung nicht gestört und die Pelletierung des MT-Protein-Komplex nicht verfälscht wird. Vorpolymerisierte Mikrotubuli 1 µl (0,2 mM MTs) und 49 µl (4 µM Protein) DIAPH2-VL-Protein, DIAPH2-FH2-Domäne oder DIAPH2-AFH2 wurden für 5 min bei RT inkubiert. Danach für 30 min bei 100.000 x g bei 25 °C inkubiert und die Pellets in SDS Probenpuffer aufgekocht. Als Negativkontrollen dienten die Proteine ohne MTs, zentrifugiert bei gleichen Bedingungen, um auszuschließen, dass die Proteine unspezifisch ohne MTs pelletieren. Auf einer SDS-PAGE wurden die Proben aufgetrennt und mit Roti<sup>®</sup>-Blue-quick gefärbt. Die Banden-Intensität wurde mit ImageJ ausgewertet.

Eine weitere Methode die Bindung von Proteinen an Mikrotubuli nachzuweisen, ist über eine Immunpräzipitation. Tubulin wurde bei 37 °C aufgetaut und auf 0,1 mg/ml in GT-Puffer verdünnt. Danach wurde es mit 20  $\mu$ M Taxol und 1 mM GTP für 20 min bei 37 °C inkubiert. 4  $\mu$ g MTs wurden mit dem  $\beta$ -Tubulin Antikörper für 30 min auf einem Rotor überkopf geschüttelt, inkubiert. 100  $\mu$ l Protein Sepharose-G-*Beads* (Tabelle 2) wurden hinzugefügt und für 30 min inkubiert. Danach wurden 2  $\mu$ g DIAPH2-VL-Protein, DIAPH2-FH2-Domäne oder DIAPH2- $\Delta$ FH2 dazugegeben und weiter für 1 h inkubiert. Die Sepharose-G-*Beads* wurden herunterzentrifugiert und fünf Mal mit Lysepuffer (siehe Absatz 8.4.1) gewaschen. Danach wurden die Sepharose-G-*Beads* in SDS-Probenpuffer aufgekocht, auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Roti<sup>®</sup>-Blue-quick gefärbt. Die Banden-Intensität wurde mit ImageJ ausgewertet.

#### 8.4.5 Protein-MT-Bündelung

Gelöstes Tubulin wurde bei 37 °C aufgetaut, in GT-Puffer mit 20 µM Taxol und 1 mM GTP verdünnt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die entstandenen MT weiter für 5 h bei 37 °C inkubiert, um lange MT-Filamente vorzupolymerisieren. 0,1 µM

DIAPH2-VL-Protein, DIAPH2-FH2-Domäne oder DIAPH2- $\Delta$ FH2 wurden zusammen mit 1  $\mu$ M vorpolymerisierten MTs in "low protein binding micro"-Reaktionsgefäßen (Tabelle 4) 30 min bei 37 °C inkubiert und für 10 min bei 4000 x g zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, per SDS-PAGE aufgetrennt und durch Roti<sup>®</sup>-Blue-quick gefärbt. Die Bandenintensität wurde mit ImageJ ausgewertet.

Um den Einfluss der DIAPH2-Konzentration auf die MT-Bündelung zu testen, wurden die DIAPH2-Proteine im gleichen Verhältnis zu den MTs eingesetzt. Tubulin wurde bei 37 °C aufgetaut und auf 0,1 mg/ml in GT-Puffer mit 20 µM Taxol und 1 mM GTP verdünnt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. 1 µg DIAPH2-Protein wurde mit 1 µg vorpolymerisierten Mikrotubuli für 30 min bei RT in "*low protein binding micro-*" Reaktionsgefäßen inkubiert und für 10 min bei 4000 x g zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, per SDS-PAGE aufgetrennt und durch Roti<sup>®</sup>-Blue-quick gefärbt. Die Bandenintensität wurde mit ImageJ ausgewertet.

#### 8.4.6 Analyse der MT-Polymerisation

Shelanski und Lee (Shelanski, Gaskin & Cantor 1973; Lee & Timasheff 1977) beschrieben einen Versuch, bei dem Licht einer Wellenlänge von 340 nm proportional zum Wachstum von Mikrotubuli gestreut wird. Die Messungen repräsentieren daher die MT-Nukleierung und das daraus resultierende Wachstum aus dem Gleichgewicht von Katastrophe und Polymerisierung der Mikrotubuli. Um den Einfluss von DIAPH2 auf die MT-Polymerisiserungs-Rate zu untersuchen, wurden DIAPH2-VL, DIAPH2- $\Delta$ FH2 und die FH2-Domäne in Vivaspin500 Zentrifugen-Konzentratoren (Tabelle 4) aufkonzentriert und in GT-Puffer mit zusätzlich 10 % Glycerol und 1 mM GTP aufgenommen. 0,2  $\mu$ M DIAPH2-VL-Protein, DIAPH2-FH2-Domäne oder DIAPH2- $\Delta$ FH2 wurden mit 2  $\mu$ M ungelabeltem Tubulin in GT-Puffer mit 10 % Glycerol und 1 mM GTP versetzt. Anschließend wurde die Polymerisation in vorgewärmten (37 °C), durchsichtigen 96-well-Platten im Tecan-Reader bei 340 nm, 37 °C für 6 h in 200  $\mu$ l Volumen gemessen.

#### 8.4.7 Analyse von Rhodamin-konjugierten MTs per Fluoreszenz-Mikroskopie

Um den Einfluss der Proteine auf die MT-Polymerisierung sichtbar zu machen, wurde ein Versuch zum Polymerisations-Imaging, beschrieben in Heinz et al. (Heinz et al. 2017) durchgeführt. Zuerst wurden Taxol-stabilisierte MTs hergestellt: Tubulin (6 mg/ml), Rhodamin-gelabeltes Tubulin (0,6 mg/ml), DTT (0,8 mM), GTP (1 mM) wurden in GT-Puffer gelöst, in 5 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur

Visualisierung der MT-Formation wurde GT-Puffer mit 1 mM GTP und 20 mM Taxol versetzt und zusammen mit den zuvor hergestellten Taxol-stabilisierten MTs (6 mg/ml) für 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. 1 µl der vorinkubierten MTs wurden mit 360 µl warmem GT-Puffer (0,017 mg/ml MTs) über Nacht bei RT inkubiert. Erneut wurden die MTs für 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. 0,1 µM der Rhodamin-gelabelten vorpolymerisierten MT-Lösung wurden mit 0,01 µM DIAPH2-VL-Protein, DIAPH2-FH2-Domäne oder DIAPH2-ΔFH2 für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die MTs wurden auf ein Poly-L-Lysin beschichtetes *Chamber-Slide* pipettiert und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie bei einer 60-fachen Vergrößerung analysiert.

Zur kälteinduzierten Depolymerisation wurden  $0,01 \,\mu\text{M}$  DIAPH2-VL-Protein, DIAPH2-FH2-Domäne oder DIAPH2- $\Delta$ FH2 mit  $0,1 \,\mu\text{M}$  der Rhodamin-gelabelten, vorpolymerisierten MT-Lösung für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach 20 min bei 4 °C depolymerisieren lassen und vor der fluoreszenzmikroskopischen Analyse gevortext. Die Analyse der MTs erfolgte, wie bereits zuvor beschrieben, auf *Chamber-Slides* mittels Fluoreszenz-Mikroskopie.

#### 8.5 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer sterilen Sicherheitswerkbank, um eine sterile Kultivierung der Zellen zu gewährleisten. Der Arbeitsplatz und alle Verbrauchsmaterialien wurden mit 70 % Ethanol gereinigt, um eine Bakterien- oder Pilzkontamination zu vermeiden. Ausschließlich sterile Verbrauchsmaterialien und Reagenzien wurden für zellbiologische Arbeiten verwendet.

#### 8.5.1 Zellen und Zellkultur

Medien und Lösungen für die Zellkultur: DMEM Medium und Gibco RPMI-Medium, Trypsin/EDTA (0,05 %), Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Pen und 10 mg/ml Strep), Puromycin (2  $\mu$ g/ml), Phosphat-gepufferte Saline (PBS) und Fötales Kälberserum (FCS) wurden für die Zellkultur verwendet. Zum Auftauen der Zellen wurden diese in 9 ml Medium in Zellkulturflaschen überführt und am nächsten Tag das Medium gewechselt. Sobald die Zellen angewachsen waren, konnten sie für Versuche verwendet werden.

HT29-Zellen sind aus humanen Kolonkarzinomen gewonnene, adhärente Zelllinien, erhalten aus dem Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie, bezogen von der *American Type tissue Culture Collection* (ATCC<sup>®</sup>) durch die *European Tissue Culture Collection*. Als Expressionssystem für Viruspartikel wurden adhärente HEK-T293-Zellen verwendet, welche ebenfalls vom Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie zur Verfügung gestellt wurden.

Tabelle 22: Auflistung verwendeter Zelllinien mit verwendetem Zellkulturmedium.

| Zelllinie | Zelltyp               | Medium |
|-----------|-----------------------|--------|
| HT29      | Humanes Kolonkarzinom | RPMI   |
| НЕК-Т293  | Humane Nierenzellen   | DMEM   |

Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 %  $CO_2$  mit 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator in Zellkulturflaschen und dazugehörigem-Medium mit Zusatz von 10 % FCS, 1 x Pen/Strep kultiviert.

Um den Einfluss einer Herunterregulierung von DIAPH2 auf humane Zellen zu untersuchen, wurden lentivirale Plasmide in HT29-Zellen eingebracht.

# 8.5.2 Herstellung lentiviral-transduzierter DIAPH2-KO Zellen

Die Herunterregulierung der DIAPH2-Expression in HT29-Zellen wurde über eine lentivirale Transduktion, wie in Windhorst et al. beschrieben, durchgeführt (Windhorst et al. 2010; Windhorst, Song & Gazdar 2017). Dazu wurden fünf Vektoren (Mission shRNA Plasmid DNA pLKO.1 shRNA NM\_006729) von Sigma erworben und getestet. Eine Kontroll-*scrambled* shRNA wurde ebenfalls von Sigma bezogen. Die shRNA Plasmide kodieren für verschiedene shRNAs gegen diverse exonüberspannende cDNA-Sequenzen von DIAPH2.

| Reagenz                     | Beschreibung   |
|-----------------------------|--|
| 1 µg pLKO.1                 | shRNA-Plasmid  |
| 0,75 µg psPAX2              | Plasmid kodiert für VSV-G (Verpackungsprotein)   |
| 0,25 µg pMD2.G              | Plasmid kodiert für HIV-1-Gag (Hüllprotein) und HIV-1-Pol<br>(Reverse Transkriptase und Integrase) |
| 6 μl FuGENE <sup>®</sup> HD | Transfektionsreagenz   |
| 200 µl OptiMEM              | Medium zum Verdünnen   |

| Tabelle  | 23: | Zusammensetzung | der | Transfektion | von | HEK-T293-Zellen | zur | Produktion | von |
|----------|-----|-----------------|-----|--------------|-----|-----------------|-----|------------|-----|
| Lentivir | en. |                 |     |              |     |                 |     |            |     |

Um die Lentiviren zu produzieren, wurden die in Tabelle 23 aufgelisteten Reagenzien zusammengemischt, für 5 min bei RT inkubiert und danach auf die HEK-T293-Zellen getropft. Nach 24 h und 48 h Inkubation wurde der Überstand der HEK-T293 Zellen abgenommen, durch einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert und der Überstand jeweils mit 8 µg/ml Polybrene (Sigma) auf HT29-Zellen gegeben. 72 h nach der zweiten Virusgabe wurden die viral transduzierten Zellen durch 2 µg/ml Puromycin im Medium selektiert. Nach Selektion mit Puromycin zeigten HT29 DIAPH2 k.d. 1 eine um 90 % und HT29 DIAPH2 k.d. 4 eine um 95 % reduzierte DIAPH2-Expression. Als Kontrollzellen dienen HT29-Zellen mit stabiler Expression einer *scrambled* shRNA, welche ein nicht in Säugetierzellen exprimiertes Gen als shRNA Target besitzt. Alle *in vitro*-Daten wurden in HT29 DIAPH2 k.d. 1 und DIAPH2 k.d. 4 gezeigt, sofern nicht anders dargestellt.

**Kryokonservierung der Zellen:** Um Langzeitkulturen herzustellen wurden 1 bis 2\*10<sup>6</sup> Zellen für 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium (Tabelle 2) resuspendiert. Die Zellen wurden in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

# 8.5.3 Quantifikation des mRNA Levels

Um das mRNA Expressionslevel von DIAPH2 in den Zellen zu analysieren, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde zuerst die mRNA durch das NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Kit (Tabelle 6) extrahiert. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde im Nanodrop (Tabelle 3) bestimmt. Mit der SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase (Tabelle 6) wurde 1 µg mRNA in cDNA umgeschrieben. Die quantitative RT-PCR wurde im LightCycler<sup>®</sup> 2.0 Instrument (Tabelle 3) mit dem Mastermix LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR Green I

(Tabelle 6) durchgeführt. Die Proben wurden in Duplikaten mit der Light Cycler Software 3.5 (Tabelle 11) vermessen und durch die  $\Delta\Delta$ Ct-Methode ausgewertet. Dabei wurden die HT29-DIAPH2-Kontroll-Zellen als Referenzprobe verwendet. Die folgend gelisteten Primer (Tabelle 24) wurden designt, um Sequenzen zwischen 90 und 200 bp zu amplifizieren. Ausgewählt wurden exonübergreifende Sequenzen, um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden.

| Primer       | Sequenz (5'→3')            | Länge  |
|--------------|----------------------------|--------|
| GAPDH FW:    | AGTCCCTGCCACACTCAG         | 123 bp |
| GAPDH RV:    | TACTTTATTGATGGTACATGACAAGG |        |
| DIAPH2_3 FW: | AAACCTGAAGTGTCCATGAAGAG    | 174 bp |
| DIAPH2_3 RV  | TGCTTCTGCGTTCTTTTGAACT     |        |
| DIAPH2_4 FW: | ACCCTTTTGCATTTTATTGCCG     | 89 bp  |
| DIAPH2_4 RV: | GCACTTTCTACGTGTTCCAGTT     |        |

Tabelle 24: Auflistung der verwendeten qPCR Primer.

### 8.5.4 Proliferations- und Apoptosemessung

Eine erhöhte Proliferationsrate und verringerte Apoptoserate sind "*Hallmarks of Cancer*". Um den Einfluss der DIAPH2-Expression auf Proliferation und Apoptose zu analysieren, wurden Proliferation und Apoptose im Zellkulturmodell mit Herunterregulierung der Expression von DIAPH2 getestet. Die Proliferationsrate wurde mittels Bildanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Konfluenz der Zellen durch die Software IncuCyte<sup>®</sup> Zoom 2016B (Tabelle 11) erfasst. Die Apoptoserate wurde durch den Caspase 3/7-Assay im IncuCyte<sup>®</sup> System bestimmt. Dazu wurde 5 µM Caspase-3/7-Red-Apoptosis-Assay-Reagenz in das Medium der Zellen gegeben und im IncuCyte<sup>®</sup> System die Fluoreszens bestimmt. In apoptotischen Zellen wird das Reagenz durch aktive Caspasen gespalten, was eine Aktivierung des Fluoreszenzfarbstoffs zur Folge hat. Die rot fluoreszierenden, apoptotischen Zellen wurden so detektiert und durch die Software IncuCyte<sup>®</sup> Zoom 2016B analysiert.

### 8.5.5 Adhäsion der Zellen

Die Adhäsion ist eine grundlegende Eigenschaft von metastasierenden Tumorzellen. Um die Adhäsionsrate zu bestimmen wurden 3\*10<sup>4</sup> HT29-Zellen in *Chamber-Slides*, welche zuvor 30 min bei RT mit Poly-L-Lysin (Tabelle 2) beschichtet und getrocknet wurden, ausgesät. Nach 3 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd und 4% Sucrose-Lösung fixiert (10 min bei 37 °C). Die Zellen wurden mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 1:2000 in PBS 10 min bei 37 °C gefärbt. Die adhärierten Zellen wurden durch die DAPI Färbung mittels *Hybrid-Cell-Count*-Funktion am Keyence BZ-9000 ausgezählt und auf die HT29-Kontrollzellen normiert.

#### 8.5.6 Migration der Zellen

Neben der Adhäsion müssen die Zellen bei der Metastasierung in das Gewebe einwandern können. Dies setzt die Beweglichkeit/Migration der Zellen voraus. Die Migration der Zellen

wurde mittels Bildanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Besiedelung der Zellen von einer freien Fläche durch die Software IncuCyte<sup>®</sup> Zoom 2016B in Konfluent gewachsene Zellen erfasst. Durch den IncuCyte<sup>®</sup> *Wound-Maker* (Tabelle 3) wurden in jedes Well eine Wunde eingefügt (in einer definierten Breite die Zellen entfernt). Mittels *Live-Cell-Imaging-Analyse* kann das Einwanderungsverhalten der Zellen analysiert werden. Das IncuCyte<sup>®</sup>System detektiert hierbei die prozentuale Konfluenz der zuwachsenden Fläche, welche durch die IncuCyte<sup>®</sup> Software IncuCyte<sup>®</sup> Zoom 2016B ausgewertet wurde.

### 8.5.7 Analyse des Koloniebildungspotentials

Das Potential der Zellen aus Einzelzellen Kolonien zu bilden, ist ein wichtiger Hinweis für die Selbsterneuerung und die Möglichkeit der uneingeschränkten Selbstvervielfältigung der Zellen. Dies sind wichtige Eigenschaften welche zum Metastasierungspotential der Zellen beitragen. Um das Koloniebildungspotential zu untersuchen wurden 1000 Einzelzellen in 2 ml Zellkulturmedium (DMEM oder RPMI/10 % FCS) in eine 6-Well Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden für ca. 10 Tage inkubiert, bis sich Kolonien aus den Einzelzellen gebildet haben. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd/4 % Sucrose-Lösung 20 min bei 37 °C fixiert. Nach dem waschen mit A. dest. wurden die Kolonien mit 500 µl Giemsa- (Giemsas Azur-Eosine-Methylblaulösung) Färbelösung 1:10 in A. dest. für 10 min gefärbt. Nach drei weiteren Waschschritten in A. dest. wurden die Platten getrocknet und die Kolonien ausgezählt.

# 8.5.8 Synchronisation der Zellen zur Bestimmung des chromosomalen Alignments

Um das chromosomale Alignment zu visualisieren, wurden die Zellen mit einem doppelten Thymidin-Block synchronisiert und in der Mitose fixiert (Bánfalvi 2011). Zu diesem Zweck wurden die Zellen 16 h in Medium mit 2 mM Thymidin inkubiert. Eine hohe Konzentration an intrazellulärem Thymidin blockiert die DNA Neusynthese, somit auch die Replikation und hält die Zellen in der G-Phase. Im Anschluss wurde den Zellen für 9 h frisches Medium gegeben, um die synchronisierte Replikation zuzulassen. Danach wurden die Zellen erneut mit 2 mM Thymidin für 15 h inkubiert, um sie erneut in der G-Phase anzureichern. Nach einer 6 stündigen Inkubation in normalem Zellkulturmedium (Release) befanden sich ca. 20 % der Zellen in der Mitose.

Die Zellen wurden nach der Synchronisation mit 4 % Paraformaldehyd und 4 % Sucrose 10 min bei 37 °C fixiert, mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), einem primären β-Tubulin-Antikörper (Tabelle 8) und dem entsprechenden Alexa-fluor-gekoppelten 568 nm Sekundärantikörper α-Kaninchen (Tabelle 9) gefärbt. Die *Chamber-Slides* wurden im Keyence Mikroskop bei einer 60-fachen Vergrößerung analysiert, Chromosomen und MTs sowie Bilder mit beiden übereinander gelegten Färbungen wurden dokumentiert.

### 8.5.9 Metaphase-Chromosomen Präparation

Zellen wurden mit Democolchicine  $(0,3 \ \mu g/ml)$  inkubiert, um einen Metaphase-Stopp zu erreichen. Nach 6 h wurden die Zellen mit Trypsin für 5 min bei 37 °C inkubiert, in ein Reaktionsgefäß überführt, bei 300 x g für 5 min bei 4 °C herunterzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Die Zellen schwollen durch eine Inkubation mit 75 mM KCI-Lösung an, bei 300 x g für 5 min bei 4 °C und im Anschluss zwei Mal tropfenweise mit 10 ml Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1 (während ständigem, langsamem vortexen) fixiert. Zellen wurden bei 300 x g für 5 min bei 4 °C herunterzentrifugiert und in 1 ml Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1 aufgenommen. Die Zell-Lösung wurde aus ca. 10 cm Entfernung auf einen Objektträger aufgetropft und mit frischem Giemsa 1:8 in eiskaltem PBS für 20 min gefärbt. Mit Leitungswasser wurde der Hintergrund leicht entfärbt und der Objektträger nach dem trocknen mit Entellan<sup>®</sup> eingedeckelt. Die Chromosomen wurden mit dem Keyence Mikroskop bei einer 60-fachen Vergrößerung analysiert, Abbildungen davon aufgenommen und ausgezählt.

### 8.5.10 Messung der Mitosedauer; H2B-gelabelte Histone in der Zellteilung

Die Zellen wurden mit pH2B-EYFP mittels Lipofectamine<sup>®</sup> LTX mit Plus<sup>TM</sup> Reagenz (Tabelle 2) transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in 5 min-Intervallen mit dem Visitron Spinning disk-TIRF, in einer Vorrichtung mit 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> mittels *Live-Cell-Imaging* bei einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen. Mit Hilfe der FIJI-Imaging Software wurden die Datensätze analysiert und die Zeit vom Start bis zum Ende der Mitose bestimmt.

#### 8.6 Proteinchemische Arbeitsmethoden

#### 8.6.1 Herstellung von Protein-Lysaten für den Western-Blot

Zellen, ausgesät in 10 cm Petrischalen (Tabelle 4), wurden zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 500  $\mu$ l M-PER<sup>TM</sup> und Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Tabelle 2) mit einem Zell-Schaber abgeschabt, in Reaktionsmikrogefäße überführt, gevortext und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Lysate für 20 min bei 13.000 x g und 4 °C herunterzentrifugiert. Im Überstand befinden sich lösliche Proteine, dessen

Konzentration durch einen Bradford-Assay bestimmt wurde. Daraufhin wurde eine  $1 \mu g/\mu l$ Proteinlösung in SDS-Probenpuffer hergestellt. Diese wurde bei 95 °C für 5 min aufgekocht und 30  $\mu l$  davon in der SDS-PAGE für den WB eingesetzt.

#### 8.6.2 Western-Blot (WB)

Zelllysat, mit einem Gehalt von 25  $\mu$ g Protein, wurde auf einer SDS-PAGE zuerst bei 80 V einlaufen lassen und anschließend bei 120 V aufgetrennt. Danach wurden die Proteine 3 h bei 10 °C und 45 V auf eine Nitrocellulose-Membran (Tabelle 4) geblottet. Die Membran wurde 30 min bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver in einer *Tris-buffered saline* mit Tween 20 (TBST) geblockt.

Antikörperfärbung: Im Anschluss wurden die Membranen mit den entsprechenden Antikörpern in 5 % Milchpulver oder 2,5 %TBST-Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Genutzte Antikörper und die dazugehörigen Verdünnungen sind in Tabelle 8 "Verwendete Primärantikörper." und Tabelle 9 "Verwendete Sekundärantikörper." zu finden. Sekundärantikörper wurden für 1 h bei Raumtemperatur in TBST inkubiert. Die Entwicklung der Blots erfolgte durch das Chemiluminescence-Entwickler-Reagenz (Tabelle 2) am ImageQuant LAS 4000 (Tabelle 3). Die Bandenintensität wurde mittels ImageJ-Software ausgewertet und als prozentuale Intensität auf eine Kontrollprobe normiert.

#### 8.6.3 Messung der Cdc42-Aktivität durch den PAK-Pull-down

Die Rac/Cdc42 (p21) Binde-Domäne (PBD) des *humanen p21-activated-kinase*-1-Proteins (PAK) bindet spezifisch an GTP-gebundenes (aktiviertes) Rac beziehungsweise Cdc42. Für den Versuch wurde die PAK-PBD-Domäne als GST-Fusionsprotein in *E.-coli* wie in Kapitel 8.4.1 beschrieben produziert und an GST-*Beads* gekoppelt (PAK-GST-*Beads*). Um GTP-gebundenes Rac1 und Cdc42 aus HT29-Zellen zu isolieren, wurden die Zellen auf 10 cm-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % wachsen gelassen. Nach der Inkubation mit dem Cdc42-stimulierenden Reagenz ML141 konnten die Zellen geerntet werden. Dazu wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS und zugesetztem 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> sowie 1 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen. In 1 ml PAK-Lysepuffer (Tabelle 5) wurden die Zellen mit einem Zell-Schaber abgekratzt und bei -20 °C zur besseren Lyse eingefroren. Nach dem Auftauen und Vortexen wurden Zelltrümmer bei 13.000 x g, 15 min und 4 °C abzentrifugiert. Nach der Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay wurden gleiche Mengen Proteinlysat in 1 ml PAK-Lysepuffer auf 20 µl PAK-GST-*Beads* geladen und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden für 2 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand

verworfen. Die PAK-GST-*Beads* wurden dreimal mit Lysepuffer gewaschen, danach in SDS-Probenpuffer aufgenommen und per Western-Blot analysiert.

#### 8.6.4 Analyse von stabilisierten MTs per WB

25 μg Proteinlysat wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern gegen detyrosinierte (stabilisierte) MT und β-Tubulin (panMT) analysiert. Dabei wurden die Banden quantifiziert und eine Ratio aus β-Tubulin und den detyrosinierten MT gebildet.

#### 8.7 Immunfluoreszenzfärbung

#### 8.7.1 PFA-Fixierung und Färben von Immunfluoreszenz-Proben

2,5\*10<sup>5</sup> Zellen wurden in einer Kammer eines Chamber-Slides, beschichtet mit Poly-L-Lysin, ausgesät und bis zu einer gewünschten Konfluenz wachsen gelassen. Anschließend wurden 37 °C diese mit warmem PBS gewaschen und mit vorgewärmtem (37 °C) 4 % Paraformaldehyd/DMEM/4 % FCS für 15 min bei 37 °C fixiert. Im Anschluss drei Mal für 5 min mit 0,1 % Triton-X-100/PBS bei Raumtemperatur die Membranen der Zellen permeabilisiert und drei Mal mit PBS gewaschen. Die Primärantikörper (Tabelle 8) wurden in einer 1:200 Verdünnung in PBS mit 4 % FCS bei RT für 1-2 h inkubiert. Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper (Tabelle 9) wurden 1:2000 in PBS mit 4 % FCS für 1-5 h bei RT inkubiert. Nach dem waschen mit PBS, wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Um F-Aktin zu färben, wurden fixierte und permeabilisierte Zellen mit Phalloidin-iFluor488 1:2000 verdünnt, in PBS bei RT für 30 min inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI 1:2000 in PBS für 5 min bei RT inkubiert. Für Kolokalisations-Studien mit DIAPH2, Aktin und Tubulin wurde das Konfokal-Mikroskop TCS SP8 (Leica) bei einer 60-fachen Vergrößerung verwendet.

#### 8.7.2 Methanol-Fixierung zur Färbung der detyrMTs

Die behandelten oder unbehandelten Zellen wurden auf Eis für 10 min in 100 % Methanol (-20 °C kalt) inkubiert und danach getrocknet. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Proben mit 2,5 % BSA in PBS 20 min bei Raumtemperatur geblockt. Der primäre Antikörper wurde 1:200 in 0,7 % BSA/PBS verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Nach drei Mal waschen, wurde der sekundäre Antikörper 1:2000 in 0,7 % BSA/PBS für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgten drei weitere Waschschritte mit PBS im Dunkeln.

# 8.8 Statistische Analyse

Die Versuche wurden als Duplikate immer in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Versuche mit Zellen wurden mit jeweils 30 Zellen in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Kontrollzellen immer als 100 % gesetzt. Zur statistischen Analyse der normalisierten Werte wurde der Student's *t*-test für ungepaarte Proben verwendet. Werte  $\leq 0,05$ , mit \* angezeigt, wurden als signifikant angenommen.

# 9 Literatur

- Akhmanova, A. & Steinmetz, M.O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *16*(12), 711–726.
- Bánfalvi, G. (Hrsg.) (2011). *Cell Cycle Synchronization. Methods and Protocols,* Totowa, NJ: Humana Press.
- Barra, H.S., Rodriguez, J.A., Arce, C.A. & Caputto, R. (1973). A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins (14 C)arginine by a ribonuclease-sensitive system and (14 C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *Journal of neurochemistry*, 20(1), 97–108.
- Bartolini, F. & Gundersen, G.G. (2010). Formins and microtubules. *Biochimica et biophysica acta*, 1803(2), 164–173.
- Bartolini, F., Moseley, J.B., Schmoranzer, J., Cassimeris, L., Goode, B.L. & Gundersen, G.G. (2008). The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. *The Journal of cell biology*, 181(3), 523–536.
- Beispielbilder ImageJ (Abrufdatum 2018). Endothelial fluorescent cell. https://imagej.nih.gov/ij/images/FluorescentCells.jpg.
- Belmont, L.D., Hyman, A.A., Sawin, K.E. & Mitchison, T.J. (1990). Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. *Cell*, 62(3), 579–589.
- Bhat, K.M.R. & Setaluri, V. (2007). Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(10), 2849–2854.
- Bläker, H., Warth, A., Kloor, M. & Schirmacher, P. (2011). Chromosomale Instabilität, Mikrosatelliteninstabilität und "CpG island methylator phenotype": Rolle in der Dünndarmkarzinogenese. Der Pathologe, 32 Suppl 2, 181–184.
- Blangy, A., Lane, H.A., d'Hérin, P., Harper, M., Kress, M. & Nigg, E.A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell*, *83*(7), 1159–1169.
- Bobinnec, Y., Moudjou, M., Fouquet, J.P., Desbruyères, E., Eddé, B. & Bornens, M. (1998). Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell motility and the cytoskeleton*, 39(3), 223–232.
- Bolanos-Garcia, V.M. & Blundell, T.L. (2011). BUB1 and BUBR1: multifaceted kinases of the cell cycle. *Trends in biochemical sciences*, *36*(3), 141–150.
- Breitsprecher, D. & Goode, B.L. (2013). Formins at a glance. *Journal of cell science*, *126*(Pt 1), 1–7.
- Campellone, K.G. & Welch, M.D. (2010). A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(4), 237–251.

- Caron, J.M. (1997). Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. In vivo and cell-free studies. *Molecular biology of the cell*, 8(4), 621–636.
- Cheeseman, I.M. (2014). The kinetochore. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(7), a015826.
- Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M. & Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*, *127*(5), 983–997.
- Cheeseman, I.M. & Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *9*(1), 33–46.
- Cheng, L. & Mao, Y. (2011). mDia3-EB1-APC: A connection between kinetochores and microtubule plus ends. *Communicative & integrative biology*, 4(4), 480–482.
- Cheng, L., Zhang, J., Ahmad, S., Rozier, L., Yu, H., Deng, H. & Mao, Y. (2011). Aurora B regulates formin mDia3 in achieving metaphase chromosome alignment. *Developmental cell*, 20(3), 342–352.
- Chesarone, M.A., DuPage, A.G. & Goode, B.L. (2010). Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(1), 62–74.
- Chu, C.-W., Hou, F., Zhang, J., Phu, L., Loktev, A.V., Kirkpatrick, D.S., Jackson, P.K., Zhao, Y. & Zou, H. (2011). A novel acetylation of β-tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Molecular biology of the cell*, 22(4), 448–456.
- Cortes, J. & Baselga, J. (2007). Targeting the microtubules in breast cancer beyond taxanes: the epothilones. *The oncologist*, *12*(3), 271–280.
- D'Angelo, L., Myer, N.M. & Myers, K.A. (2017). MCAK-mediated regulation of endothelial cell microtubule dynamics is mechanosensitive to myosin-II contractility. *Molecular biology of the cell*, 28(9), 1223–1237.
- D'Avino, P.P. & Capalbo, L. (2016). Regulation of midbody formation and function by mitotic kinases. *Seminars in cell & developmental biology*, *53*, 57–63.
- Desai, A. & Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*, *13*, 83–117.
- Dionne, L.K., Wang, X.-J. & Prekeris, R. (2015). Midbody: From Cellular Junk to Regulator of Cell Polarity and Cell Fate. *Current opinion in cell biology*, *35*, 51–58.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A. & Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological reviews*, *83*(2), 433–473.
- Dráber, P., Sulimenko, V. & Dráberová, E. (2012). Cytoskeleton in Mast Cell Signaling. *Frontiers in Immunology*, 3.

- Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J.P., Desbruyères, E., Gros, F. & Denoulet, P. (1990). Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4938), 83–85.
- Eipper, B.A. (1972). Rat Brain Microtubule Protein: Purification and Determination of Covalently Bound Phosphate and Carbohydrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2283–2287.
- Ertych, N., Stolz, A., Stenzinger, A., Weichert, W., Kaulfuß, S., Burfeind, P., Aigner, A., Wordeman, L. & Bastians, H. (2014). Increased microtubule assembly rates influence chromosomal instability in colorectal cancer cells. *Nature Cell Biology*, *16*, 779 EP -.
- Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology*, 29, 471–499.
- Faix, J. & Grosse, R. (2006). Staying in shape with formins. *Developmental cell*, 10(6), 693–706.
- Field, D.J., Collins, R.A. & Lee, J.C. (1984). Heterogeneity of vertebrate brain tubulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(13), 4041–4045.
- Fife, C.M., McCarroll, J.A. & Kavallaris, M. (2014). Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *British journal of pharmacology*, *171*(24), 5507–5523.
- Franker, M.A.M. & Hoogenraad, C.C. (2013). Microtubule-based transport basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. *Journal of cell science*, 126(Pt 11), 2319–2329.
- Gadde, S. & Heald, R. (2004). Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Current biology* : CB, 14(18), R797-805.
- Gaillard, J., Ramabhadran, V., Neumanne, E., Gurel, P., Blanchoin, L., Vantard, M. & Higgs, H.N. (2011). Differential interactions of the formins INF2, mDia1, and mDia2 with microtubules. *Molecular biology of the cell*, 22(23), 4575–4587.
- Gasman, S., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. (2003). RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nature Cell Biology*, *5*(3), 195–204.
- Gireesh, K.K., Shine, A., Lakshmi, R.B., Vijayan, V. & Manna, T.K. (2018). GTP-binding facilitates EB1 recruitment onto microtubules by relieving its auto-inhibition. *Scientific reports*, 8(1), 9792.
- Goode, B.L. & Eck, M.J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual review of biochemistry*, 76, 593–627.
- Goshima, G. & Vale, R.D. (2003). The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the Drosophila S2 cell line. *The Journal of cell biology*, *162*(6), 1003–1016.
- Gregan, J., Polakova, S., Zhang, L., Tolić-Nørrelykke, I.M. & Cimini, D. (2011). Merotelic kinetochore attachment: causes and effects. *Trends in cell biology*, *21*(6), 374–381.

- Grego, S., Cantillana, V. & Salmon, E.D. (2001). Microtubule treadmilling in vitro investigated by fluorescence speckle and confocal microscopy. *Biophysical journal*, *81*(1), 66–78.
- Gross, S.R. (2013). Actin binding proteins: their ups and downs in metastatic life. *Cell adhesion & migration*, 7(2), 199–213.
- Gunning, P., O'Neill, G. & Hardeman, E. (2008). Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiological reviews*, 88(1), 1–35.
- Hall, A., Der, C.J. & Balch, W.E. (Hrsg.) (2006). *Regulators and effectors of small GTPases*. *Rho family*, Amsterdam, Boston, s.l.: Elsevier.
- Hayden, J.H., Bowser, S.S. & Rieder, C.L. (1990). Kinetochores capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells. *The Journal of cell biology*, 111(3), 1039–1045.
- Heinz, L.S., Muhs, S., Schiewek, J., Grüb, S., Nalaskowski, M., Lin, Y.-N., Wikman, H., Oliveira-Ferrer, L., Lange, T., Wellbrock, J., Konietzny, A., Mikhaylova, M. & Windhorst, S. (2017). Strong fascin expression promotes metastasis independent of its F-actin bundling activity. *Oncotarget*, 8(66), 110077–110091.
- Higgs, H.N. (2005). Formin proteins: a domain-based approach. *Trends in biochemical sciences*, 30(6), 342–353.
- Hirokawa, N., Noda, Y. & Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Current opinion in cell biology*, *10*(1), 60–73.
- Hirota, S., Ohashi, A., Nishida, T., Isozaki, K., Kinoshita, K., Shinomura, Y. & Kitamura, Y. (2003). Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology*, 125(3), 660–667.
- Honore, S., Pasquier, E. & Braguer, D. (2005). Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(24), 3039–3056.
- Howard, A. & Pelc, S.R. (1986). Synthesis of Desoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 49(2), 207–218.
- Howard, J. & Hyman, A.A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, 422(6933), 753–758.
- Hu, C.-K., Coughlin, M. & Mitchison, T.J. (2012). Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Molecular biology of the cell*, 23(6), 1024–1034.
- Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D., Tempst, P. & Snyder, S.H. (2001). Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature Cell Biology*, 3(2), 193–197.
- Ji, Z., Gao, H., Jia, L., Li, B. & Yu, H. (2017). A sequential multi-target Mps1 phosphorylation cascade promotes spindle checkpoint signaling. *eLife*, *6*.

- Kato, T., Watanabe, N., Morishima, Y., Fujita, A., Ishizaki, T. & Narumiya, S. (2001). Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells. *Journal of cell science*, *114*(Pt 4), 775–784.
- Kerstin Steinhäuser (2016). Funktion und Regulation des neuen Tubulin -assoziierten Proteins *RITA*. Dissertation. Technischen Universität Darmstadt.
- Kirschner, M.W. & Mitchison, T. (1986). Microtubule dynamics. Nature, 324(6098), 621.
- Kline-Smith, S.L. & Walczak, C.E. (2004). Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. *Molecular cell*, 15(3), 317–327.
- Kuo, T.-C., Chen, C.-T., Baron, D., Onder, T.T., Loewer, S., Almeida, S., Weismann, C., Xu, P., Houghton, J.-M., Gao, F.-B., Daley, G.Q. & Doxsey, S. (2011). Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nature Cell Biology*, 13(10), 1214–1223.
- Lacroix, B., van Dijk, J., Gold, N.D., Guizetti, J., Aldrian-Herrada, G., Rogowski, K., Gerlich, D.W. & Janke, C. (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *The Journal of cell biology*, 189(6), 945–954.
- Le Clainche, C. & Carlier, M.-F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews*, 88(2), 489–513.
- Lee, J.C. & Timasheff, S.N. (1977). In vitro reconstitution of calf brain microtubules: effects of solution variables. *Biochemistry*, *16*(8), 1754–1764.
- Leguy, R., Melki, R., Pantaloni, D. & Carlier, M.F. (2000). Monomeric gamma -tubulin nucleates microtubules. *The Journal of biological chemistry*, 275(29), 21975–21980.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, *386*(6625), 623–627.
- Lin, Y.-N., Bhuwania, R., Gromova, K., Failla, A.V., Lange, T., Riecken, K., Linder, S., Kneussel, M., Izbicki, J.R. & Windhorst, S. (2015). Drosophila homologue of Diaphanous 1 (DIAPH1) controls the metastatic potential of colon cancer cells by regulating microtubule-dependent adhesion. *Oncotarget*, 6(21), 18577–18589.
- Lin, Y.-N., Izbicki, J.R., König, A., Habermann, J.K., Blechner, C., Lange, T., Schumacher, U. & Windhorst, S. (2014). Expression of DIAPH1 is up-regulated in colorectal cancer and its down-regulation strongly reduces the metastatic capacity of colon carcinoma cells. *International journal of cancer*, 134(7), 1571–1582.
- Liu, C., Srihari, S., Lal, S., Gautier, B., Simpson, P.T., Khanna, K.K., Ragan, M.A. & Lê Cao, K.-A. (2016). Personalised pathway analysis reveals association between DNA repair pathway dysregulation and chromosomal instability in sporadic breast cancer. *Molecular oncology*, 10(1), 179–193.
- Lizárraga, F., Poincloux, R., Romao, M., Montagnac, G., Le Dez, G., Bonne, I., Rigaill, G., Raposo, G. & Chavrier, P. (2009). Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer research*, 69(7), 2792–2800.
- Lodish, H.F. (2004). Molecular cell biology, New York: W.H. Freeman and Company.

- Ludueña, R.F. (2013). A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *International review* of cell and molecular biology, 302, 41–185.
- Lukasiewicz, K.B. & Lingle, W.L. (2009). Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle. *Environmental and molecular mutagenesis*, *50*(8), 602–619.
- Maiato, H. & Sunkel, C.E. (2004). Kinetochore-microtubule interactions during cell division. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology, 12*(6), 585–597.
- Margolis, R.L. & Wilson, L. (1998). Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *BioEssays*, 20(10), 830–836.
- Marumoto, T., Zhang, D. & Saya, H. (2005). Aurora-A a guardian of poles. *Nature reviews*. *Cancer*, *5*(1), 42–50.
- Michaelis, C., Ciosk, R. & Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, *91*(1), 35–45.
- Mitchison, T. & Kirschner, M. (1984). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature*, *312*(5991), 232–237.
- Mollinedo, F. & Gajate, C. (2003). Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 8(5), 413–450.
- Moritz, M. & Agard, D.A. (2001). Gamma-tubulin complexes and microtubule nucleation. *Current opinion in structural biology*, 11(2), 174–181.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Guénebaut, V., Heuser, J. & Agard, D.A. (2000). Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nature Cell Biology*, 2(6), 365–370.
- Moseley, J.B., Maiti, S. & Goode, B.L. (2006). Formin proteins: purification and measurement of effects on actin assembly. *Methods in enzymology*, 406, 215–234.
- Moseley, J.B., Sagot, I., Manning, A.L., Xu, Y., Eck, M.J., Pellman, D. & Goode, B.L. (2004). A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Molecular biology of the cell*, 15(2), 896–907.
- Mukhtar, E., Adhami, V.M. & Mukhtar, H. (2014). Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Molecular cancer therapeutics*, *13*(2), 275–284.
- Narumiya, S., Tanji, M. & Ishizaki, T. (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer metastasis reviews*, 28(1-2), 65–76.
- Nasmyth, K. (2000). Splitting the Chromosome: Cutting the Ties That Bind Sister Chromatids. *Science*, *288*(5470), 1379–1384.
- Ng, T.M., Waples, W.G., Lavoie, B.D. & Biggins, S. (2009). Pericentromeric Sister Chromatid Cohesion Promotes Kinetochore Biorientation. *Molecular biology of the cell*, 20(17), 3818– 3827.
- Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(1), 21–32.

- Nürnberg, A., Kitzing, T. & Grosse, R. (2011). Nucleating actin for invasion. *Nature reviews*. *Cancer*, *11*(3), 177–187.
- Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S. & Gundersen, G.G. (2001). mDia mediates Rhoregulated formation and orientation of stable microtubules. *Nature Cell Biology*, *3*, 723 EP -.
- Parker, A.L., Kavallaris, M. & McCarroll, J.A. (2014). Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Frontiers in oncology*, *4*, 153.
- Pasquier, E. & Kavallaris, M. (2008). Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB life*, *60*(3), 165–170.
- Peters, J.-M., Tedeschi, A. & Schmitz, J. (2008). The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes & development*, 22(22), 3089–3114.
- Piehl, M., Tulu, U.S., Wadsworth, P. & Cassimeris, L. (2004). Centrosome maturation: measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(6), 1584–1588.
- Pines, J. (2006). Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends in cell biology*, *16*(1), 55–63.
- Prosser, S.L. & Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(3), 187–201.
- Przewloka, M.R. & Glover, D.M. (2009). The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship. *Annual review of genetics*, 43, 439–465.
- Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J.M., Le Caer, J.P., Rossier, J., Adoutte, A. & Bré, M.H. (1994). Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5191), 1688–1691.
- Redeker, V., Melki, R., Promé, D., Le Caer, J.P. & Rossier, J. (1992). Structure of tubulin C-terminal domain obtained by subtilisin treatment. The major alpha and beta tubulin isotypes from pig brain are glutamylated. *FEBS letters*, *313*(2), 185–192.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T. & Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* (*New York*, *N.Y.*), 302(5651), 1704–1709.
- Rosales-Nieves, A.E., Johndrow, J.E., Keller, L.C., Magie, C.R., Pinto-Santini, D.M. & Parkhurst, S.M. (2006). Coordination of microtubule and microfilament dynamics by Drosophila Rho1, Spire and Cappuccino. *Nature Cell Biology*, 8(4), 367–376.
- Rosas-Acosta, G., Russell, W.K., Deyrieux, A., Russell, D.H. & van Wilson, G. (2005). A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 4(1), 56–72.
- Rottner, K., Faix, J., Bogdan, S., Linder, S. & Kerkhoff, E. (2017). Actin assembly mechanisms at a glance. *Journal of cell science*, *130*(20), 3427–3435.

- Sakuno, T., Tada, K. & Watanabe, Y. (2009). Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature*, *458*(7240), 852–858.
- Sankaran, S. & Parvin, J.D. (2006). Centrosome function in normal and tumor cells. *Journal of cellular biochemistry*, 99(5), 1240–1250.
- Saxton, W.M., Stemple, D.L., Leslie, R.J., Salmon, E.D., Zavortink, M. & McIntosh, J.R. (1984). Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *The Journal of cell biology*, *99*(6), 2175–2186.
- Schmitz, S. (2011). *Der Experimentator: Zellkultur,* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Schroeder, A., Heller, D.A., Winslow, M.M., Dahlman, J.E., Pratt, G.W., Langer, R., Jacks, T. & Anderson, D.G. (2011). Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature reviews*. *Cancer*, 12(1), 39–50.
- Schuyler, S.C. & Pellman, D. (2001). Search, capture and signal: games microtubules and centrosomes play. *Journal of cell science*, 114(Pt 2), 247–255.
- Schuyler, S.C., Wu, Y.-F. & Kuan, V.J.-W. (2012). The Mad1-Mad2 balancing act--a damaged spindle checkpoint in chromosome instability and cancer. *Journal of cell science*, 125(Pt 18), 4197–4206.
- Shelanski, M.L., Gaskin, F. & Cantor, C.R. (1973). Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(3), 765–768.
- Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I.R., Kühlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M.A.
  & Wittinghofer, A. (2004). The Core FH2 Domain of Diaphanous-Related Formins Is an Elongated Actin Binding Protein that Inhibits Polymerization. *Molecular cell*, 13(4), 511–522.
- Sluder, G. & Khodjakov, A. (2010). Centriole duplication: analogue control in a digital age. *Cell biology international*, *34*(12), 1239–1245.
- Song, Y., Kirkpatrick, L.L., Schilling, A.B., Helseth, D.L., Chabot, N., Keillor, J.W., Johnson, G.V.W. & Brady, S.T. (2013). Transglutaminase and Polyamination of Tubulin: Posttranslational Modification for Stabilizing Axonal Microtubules. *Neuron*, 78(1), 109– 123.
- Stolz, A. (2010). Molekulare Mechanismen der Spindel-Kontrollpunkt- Inhibierung und der chromosomalen Instabilität. Dissertation. Philipps Universität Marburg.
- Su, A.I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K.A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M.P., Walker, J.R. & Hogenesch, J.B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 6062–6067.
- Tamir, A., Elad, N. & Medalia, O. (2011). Assembly and breakdown of microtubules within the midbody. *Communicative & integrative biology*, 4(5), 552–553.

- Tanaka, K. (2013). Regulatory mechanisms of kinetochore-microtubule interaction in mitosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(4), 559–579.
- Taylor, M.P., Koyuncu, O.O. & Enquist, L.W. (2011). Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nature reviews*. *Microbiology*, *9*(6), 427–439.
- Uetake, Y. & Sluder, G. (2004). Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint". *The Journal of cell biology*, *165*(5), 609–615.
- van der Vaart, B., Akhmanova, A. & Straube, A. (2009). Regulation of microtubule dynamic instability. *Biochemical Society transactions*, *37*(Pt 5), 1007–1013.
- Wade, R.H. (2009). On and around microtubules: an overview. *Molecular biotechnology*, 43(2), 177–191.
- Webster, D.R., Gundersen, G.G., Bulinski, J.C. & Borisy, G.G. (1987). Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(24), 9040–9044.
- Wessler, S., Gimona, M. & Rieder, G. (2011). Regulation of the actin cytoskeleton in Helicobacter pylori-induced migration and invasive growth of gastric epithelial cells. *Cell communication and signaling* : CCS, 9(1), 27.
- Wieczorek, M., Bechstedt, S., Chaaban, S. & Brouhard, G.J. (2015). Microtubule-associated proteins control the kinetics of microtubule nucleation. *Nature Cell Biology*, *17*(7), 907–916.
- Wiese, C. & Zheng, Y. (1999). Gamma-tubulin complexes and their interaction with microtubule-organizing centers. *Current opinion in structural biology*, 9(2), 250–259.
- Windhorst, S., Fliegert, R., Blechner, C., Möllmann, K., Hosseini, Z., Günther, T., Eiben, M., Chang, L., Lin, H.-Y., Fanick, W., Schumacher, U., Brandt, B. & Mayr, G.W. (2010). Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase-A is a new cell motility-promoting protein that increases the metastatic potential of tumor cells by two functional activities. *The Journal of biological chemistry*, 285(8), 5541–5554.
- Windhorst, S., Song, K. & Gazdar, A.F. (2017). Inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase-A (ITPKA) is frequently over-expressed and functions as an oncogene in several tumor types. *Biochemical pharmacology*, *137*, 1–9.
- Yamaguchi, H. & Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(5), 642–652.
- Yamana, N., Arakawa, Y., Nishino, T., Kurokawa, K., Tanji, M., Itoh, R.E., Monypenny, J., Ishizaki, T., Bito, H., Nozaki, K., Hashimoto, N., Matsuda, M. & Narumiya, S. (2006). The Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src. *Molecular and cellular biology*, 26(18), 6844–6858.
- Yasuda, S., Oceguera-Yanez, F., Kato, T., Okamoto, M., Yonemura, S., Terada, Y., Ishizaki, T. & Narumiya, S. (2004). Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature*, 428, 767 EP -.
- Yoshida, H. & Goedert, M. (2012). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by AMPK-related kinases. *Journal of neurochemistry*, *120*(1), 165–176.
- Yu, I., Garnham, C.P. & Roll-Mecak, A. (2015). Writing and Reading the Tubulin Code. *The Journal of biological chemistry*, 290(28), 17163–17172.
- Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Leverson, J.D., Bossy-Wetzel, E., Fan, J.-B., Abraham, R.T. & Jiang, W. (2005). Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Molecular biology of the cell*, 16(7), 3187–3199.

## 10 Anhang

## 10.1 Vektorkarten

#### 10.1.1 pGEM<sup>®</sup>-T Easy-Vektoren



Abbildung 42: Vektorkarte des Plasmids *pGEM*<sup>®</sup>-*T Easy* (Promega). Die multiple Klonierungsstelle befindet sich im lacZ-Gen, in dieser wird das Insert über die A/T-Überhänge in den Vektor ligiert.



Abbildung 43: Vektorkarte des Plasmids *pGEM*<sup>®</sup>-*T Easy* mit DIAPH2-VL-Insert. Nach erfolgreicher Ligation der DIAPH2-VL in die Klonierungsstelle über die A/T-Überhänge in den *pGEM*<sup>®</sup>-*T Easy*. Das Insert ist in pink markiert. Das *pGEM*<sup>®</sup>-*T Easy*-Plasmid stammt von Promega. Diese Abbildung wurde in Snapgene designed.



Abbildung 44: Vektorkarte des Plasmids  $pGEM^{\text{®}}$ -T Easy mit DIAPH2- $\Delta$ FH2-Insert. Abbildung des DIAPH2- $\Delta$ FH2  $pGEM^{\text{®}}$ -T Easy nach erfolgter Deletion der FH2-Domäne mittels *Quickchange*-Mutagenese. Das Insert ist in pink markiert. Das  $pGEM^{\text{®}}$ -T Easy-Plasmid stammt von Promega. Diese Abbildung wurde in Snapgene designed.

## 10.1.2 pGEX-6P-2A-Vektoren



Abbildung 45: Vektorkarte des Plasmids pGEX-6P-2A. Die Einbringung des Inserts erfolgt nach der GST und PreScission-Site.

#### pGEX-6P-2A DIAPH2-VL



**Abbildung 46: Vektorkarte des Plasmids pGEX-6P-2A mit DIAPH2-VL als Insert.** Der Vektor kodiert für ein GST-DIAPH2-VL-Fusionsprotein, welches in *BL21(DE3)pLysS-E.-coli* durch Induktion der Expression über IPTG produziert werden kann. Das Insert ist in pink und GST-Tag in blau markiert. Das *pGEM*<sup>®</sup>-*T Easy*-Plasmid stammt von Promega. Diese Abbildung wurde in Snapgene designed.

#### pGEX-6P-2A DIAPH2-AFH2



Abbildung 47: Vektorkarte des Plasmids pGEX-6P-2A mit DIAPH2- $\Delta$ FH2 als Insert. Der Vektor kodiert für ein GST-DIAPH2- $\Delta$ FH2-Fusionsprotein, welches in *BL21(DE3)pLysS-E.-coli* durch Induktion der Expression über IPTG produziert werden kann. Das Insert ist in pink und GST-Tag in blau markiert. Das *pGEM*<sup>®</sup>-*T Easy*-Plasmid stammt von Promega. Diese Abbildung wurde in Snapgene designed.

#### pGEX4T1-N-GST-FH2-624-1049-DIAPH2



Abbildung 48: Vektorkarte des Plasmids pGEX4T1-N-GST mit der FH2-Domäne (aa 624-1049) codierend für ein GST-FH2-Fusionsprotein. Der Vektor kodiert für ein GST-FH2-Fusionsprotein, welches in BL21(DE3)pLysS-E.-coli durch Induktion der Expression über IPTG produziert werden kann. Das Insert ist in pink und GST-Tag in grün markiert. Das  $pGEM^{\mbox{\sc B}}-T$  Easy-Plasmid stammt von Promega. Diese Abbildung wurde in Snapgene designed.

#### 10.2 Sicherheit und Entsorgung

Alle Bakterien- und Zellkulturen sowie kontaminierte Materialien wurden vor dem Entsorgen autoklaviert. Mit Viren kontaminierte Flüssigkeiten wurden mit Natriumhypochlorit versetzt und zusätzlich autoklaviert. Der Umgang mit Chemikalien erfolgte unter Beachtung der jeweiligen, aktuellen Sicherheitsdatenblätter. Substanzen deren Gefährdungspotential noch nicht ermittelt wurde, wurden als potentiell gesundheitsschädliche Substanzen behandelt. Puffer mit Methanol wurden in den entsprechenden Abfallbehältern für organische Lösungsmittel entsorgt. Gefahrstoffe und Chemikalien, welche aus der angefügten Liste zu entnehmen sind, wurden mit Vorsicht behandelt und entsprechend des Sicherheitsdatenblattes entsorgt.

#### 10.2.1 Verwendete Gefahrstoffe

| Chemikalie  | Gefahrensymbol               | H-Sätze   | P-Sätze   |
|---|------------------------------|---|---|
| 2-Propanol<br>(Isopropanol)   |                              | H: 225, 319,<br>336                                     | P: 210, 261, 305, 351, 338                            |
| Acrylamid/Bis-<br>Lösung, 30%   | <u>(</u> )                   | H: 302, 312,<br>315, 319,<br>317, 340,<br>350, 361, 372 | P: 260, 280, 281, 305, 351, 338, 405, 501             |
| Ammonium-<br>persulfat (APS)  |                              | H: 272, 302,<br>315, 317,<br>319, 334, 335              | P: 221, 210, 285, 405<br>305, 351, 338, 501           |
| Ampicillin trihydrate   | (!)                          | H: 317-334  | P: 261-280-305, 338-<br>342, 311, 351                 |
| cOmplete <sup>®</sup> , Mini,<br>EDTA-freier<br>Protease-Inhibitor-<br>Cocktail | <b>()</b>                    | H: 315, 319   | P: 264, 280, 302, 313, 332, 337, 352, 362, 364        |
| Dithiothreitol (DTT)  | $\langle \mathbf{I} \rangle$ | H: 302-315-<br>319                                      | P: 302, 352-305, 351, 338                             |
| Entellan®   |                              | H: 226-312,<br>332, 315                                 | P: 210-302, 352-304, 340:                             |
| Essigsäure<br>( <i>Acetic acid</i> )  |                              | H: 226-290-<br>314                                      | P: 210-280-301, 330,<br>331-305, 351, 338-308,<br>310 |
| Ethanol   |                              | H: 225-319  | P: 210-240-305, 351, 338-403, 233                     |

Tabelle 25: Gefahrensymbole, H- und P-Sätze der verwendeten Gefahrstoffe.

| Ethidiumbromid                              |                                    | H: 331, 341                                | P: 261-281-311  |
|---|------------------------------------|--|---|
| Ethylenediamin<br>tetraaceticacid<br>(EDTA) |                                    | Н: 319                                     | P: 305, 351, 338  |
| Giemsas Azur-Eosin-<br>Methylenblaulösung   |                                    | H: 225-301,<br>311, 331-370                | P: 301, 310 302, 350<br>304, 340 311                              |
| Kaliumdi-<br>hydrogenphosphat<br>(KH2PO4)   |                                    | -  | P: 260  |
| Kohlenstoffdioxid<br>(CO <sub>2</sub> )     | $\diamond$                         | H: 280                                     | P: 403  |
| Methanol, reinst                            |                                    | H: 225-331-<br>311-301-370                 | P: 210-233-280-302, 352   |
| ML141                                       |                                    | -  | -   |
| N,N,N',N'-Tetra-<br>methylethylen-          |                                    | H: 225, 332,<br>302, 314                   | P: 210, 233, 280, 301,<br>330, 331, 305, 351, 338,<br>308, 310    |
| diamin (TENIED)                             |                                    |  | ,<br>   |
| Natriumazid                                 |                                    | H: 300-400-<br>410                         | P: 273–309-310  |
| Natriumhypochlorit                          |                                    | H: 314 - 400                               | P: 260 - 280 -303, 361,<br>353 - 304, 340, 310 -<br>305, 351, 338 |
| NP-40/IGEPAL CA-<br>630                     |                                    | H: 302-318-<br>400                         | P: 273-280-305, 351, 338  |
| Paraformaldehyd                             |                                    | H: 228-302-<br>332-351-335-<br>315-319-317 | P: 281-302, 352-305,<br>351, 338-308, 313-304,<br>340             |
| Penicillin                                  | $\langle \mathbf{\dot{l}} \rangle$ | H: 317                                     | P: 280  |
| Phalloidin-iFluor488                        |                                    | H: 300-310-<br>330                         | P: 260-264-280-284-301, 310-302, 350                              |
| Phenylmethyl-<br>sulfonylfluorid<br>(PMSF)  |                                    | H: 301-314                                 | P: 280-305, 351, 338-310  |

| Puromycin<br>dihydrochlorid   | $\langle i \rangle$                | H: 302                                      | P: 264 -270 -301, 312 -<br>330-501                                   |
|-------------------------------|------------------------------------|---|--|
| Salzsäure                     |                                    | H: 290-314-<br>335                          | P: 234 -260-304, 340-<br>303, 361, 353-305, 351,<br>338-309, 311-501 |
| Sodiumdodecyl<br>sulfat (SDS) |                                    | H: 228, 302,<br>332, 315,<br>318, 335, 412  | P: 210, 261, 280, 302, 352, 305, 351, 338, 312                       |
| Sodiumhydroxid<br>(NaOH)      |                                    | H: 290-314                                  | P: 280–301, 330, 331-<br>309–310-305, 351, 338                       |
| Stickstoff, flüssig<br>(N2)   | $\diamond$                         | H: 281                                      | P: 282, 336, 315, 403  |
| Streptomycin                  | ()                                 | H: 302-361                                  | P: 281   |
| TRIS                          |                                    | H: 315-319-<br>335                          | P: 261-305, 351, 338   |
| Triton X-100                  | $\langle \mathbf{\hat{v}} \rangle$ | H: 302-318-<br>411                          | P: 273-280-305, 351, 338   |
| Trypsin                       |                                    | H: 319-335-<br>315-334                      | P: 285-261-305, 351, 338-321-405-501                                 |
| β-Mercaptoethanol             |                                    | H: 301, 331-<br>310-315-317-<br>318-373-410 | P: 273-280-302, 352-<br>304, 340-305, 351, 338-<br>308, 310          |

## 10.2.2 Schlüssel für H-Sätze

#### H-Satz Gefährdung

- 225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
- 226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
- 228 Entzündbarer Feststoff.
- 242 Erwärmung kann Brand verursachen.
- 271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
- 272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel
- 280 Enthält Gas unterDruck; kann bei Erwärmung explodieren.
- 290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
- 300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
- 301 Giftig bei Verschlucken.
- 302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- 310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- 311 Giftig bei Hautkontakt.

- 312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- 314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwereAugenschäden.
- 315 Verursacht Hautreizungen.
- 317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- 318 Verursacht schwere Augenschäden.
- 319 Verursacht schwere Augenreizung.
- 320 Verursacht Augenreizung.
- 330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- 331 Giftig bei Einatmen.
- 332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- 334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- 335 Kann die Atemwege reizen.
- 336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- 340 Kann genetische Defekte verursachen.
- 341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
- 350 Kann Krebs erzeugen.
- 351 Kann vermutlich Krebs erzeugen.
- 360d Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- 360f Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- 361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
- 361f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- 370 Schädigt die Organe.
- 372 Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
- 373 Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
- 400 Sehr giftig für Wasserorganismen.
- 410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
- 411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- 412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

# 10.2.3 Schlüssel für P-Sätze

# P-Satz Sicherheitshinweis

- 201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- 210 Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
- 220 Von Kleidung / brennbaren Materialien fernhalten /entfernt aufbewahren.
- 233 Behälter dicht verschlossen halten.
- 234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- 260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
- 261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
- 262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
- 264 Nach Gebrauch gründlich waschen.
- 270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
- 273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
- 280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
- 284 Atemschutz tragen.
- 301 Bei Verschlucken:
- 302 Bei Berührung mit der Haut:

- 303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
- 304 Bei Einatmen:
- 305 Bei Kontakt mit den Augen:
- 308 Bei Exposition oder falls betroffen:
- 309 Bei Exposition oder Unwohlsein:
- 310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- 311 Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- 312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- 313 Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- 315 Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- 320 Besondere Behandlung dringend erforderlich
- 330 Mund ausspülen.
- 331 Kein Erbrechen herbeiführen.
- 332 Bei Hautreizung:
- 337 Bei anhaltender Augenreizung:
- 338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeitentfernen. Weiter ausspülen.
- 340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- 341 Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- 342 Bei Symptomen der Atemwege:
- 350 Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- 352 Mit viel Wasser und Seife waschen.
- 353 Haut mit Wasser abwaschen / duschen.
- 361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- 403 An eine gut belüfteten Ort aufbewahren.
- 405 Unter Verschluss aufbewahren.
- 410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- 501 Inhalt / Behälter der entsprechenden Entsorgung zuführen.

# 11 Danksagung

Ein großes Dankeschön geht an PD Dr. Sabine Windhorst, für die Möglichkeit ein Teil dieser Forschungsgruppe zu sein. Dadurch konnte ich viele neue Methoden, Eigenständigkeit und den Austausch mit Kooperationsgruppen erlernen und weiterentwickeln. Zudem hast du mir in Momenten der Unsicherheit auf den Weg zurück geholfen, wenn ich davon abgekommen war. Die Erweiterung meiner Erfahrungen in Anträgen, Vorträgen und dem wissenschaftlichen Schreiben und vor allem das Paper, was dabei rausgekommen ist, lassen mich ein stolzer Teil der AG Cytoskeletal Dynamics sein.

Der klinische Bezug ist auf den Grundlagen von Yuan Na Lin entstanden. Danke für die Mitbetreuung und viele weitere Ideen, die das Projekt haben wachsen lassen.

Vielen Dank Christine, es tat immer sehr gut, sich auf deine Unterstützung und Hilfe verlassen zu können. Zudem hattest du immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme.

Danke auch an meine Prüfer und Gutachter Prof. Dr. Sascha Rohn, Prof. Dr. Hartmut Schlüter, Prof. Dr. Ralph Holl und auch an PD Dr. SabineWindhorst, ich freue mich sehr über Ihr Feedback sowie gute und inspirierende Diskussionen.

Sehr viel Wissen und Know-How über die Expression und Aufreinigung von Forminen habe ich in Bonn von Sebastian Schmitt und Matthias Geyer während meines Aufenthalts in der AG "Biochemistry and Structural Immunology" erlernt.

Des Weiteren danke ich PD Dr. Markus Nalaskowski und PD Dr. Kristoffer Riecken (Klonierung), Dr. Markus Geißen (qPCR), Alexandra Zielinski (Karyogramm), Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher aus der Tumorbiologie (H2B-EYFP-Vektor), Prof. Dr. Stefan Kindler aus der Humangenetik (pGEX-6P-2A-Vektor) und Prof. Dr. Manfred Jücker (virales-shRNA-Expressionssystem) und allen anderen beteiligten Mitarbeitern des UKE für das Vermitteln von Techniken, Know-How und Vektoren, die mir bei meinem Projekt sehr weitergeholfen haben.

Einige der wunderschönen Abbildungen wären ohne die Hilfe der UMIF nicht möglich gewesen. Danke an Virgilio und Bernd für das vermitteln des Wissens über Mikroskope, mikroskopische Aufnahmen und deren Auswertung.

Zudem möchte ich die Else Kröner-Fresenius-Stiftung erwähnen, welche die finanziellen Mittel für diese Arbeit bereitgestellt hat.

Ich möchte mich für die hilfreiche Unterstützung von Steffi und den beiden HiWi-Studenten Yannes und Annika bedanken. Ebenso möchte ich meine Freunde und Komilitonen, im speziellen die "Zytoskeletties" erwähnen: Johanna, Selina und Steffi. Ihr habt mir gerne den Arbeitsalltag versüßt. Ich möchte euch für die Essens-Diskussionsrunden und lustigen Stunden in und außerhalb der Arbeitszeit danken.

*Last but not least* danke ich meiner Familie, speziell meiner Mutter und meinem Freund Steven, die mich während meines Studiums immer gerne tatkräftig unterstützt und motiviert haben. Eine große Hilfe war auch das Korrekturlesen dieser Arbeit. Eure Unterstützung und Ermutigung hat mir über Tiefpunkte hinweg geholfen, mir den Mut gegeben neue Berge zu erklimmen.

# 12 Eidesstattliche Erklärung

"Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde."

Ort, Datum

Saskia Sybille Grüb