UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für experimentelle Medizin Institut für Biochemie und Signaltransduktion

Prof. Dr. rer. nat. Aymelt Itzen

Effekt von autoinhibiertem DIAPH1 auf die Mikrotubuli-Dynamik

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Jessica Ecem Nojszewski aus Tarsus

Hamburg 2022

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.01.2023

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Linda Diehl

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Sabine Windhorst

Arbeitshypothese und Fragestellung

Das metastatische Potenzial des Kolonkarzinoms wird durch die Mikrotubuli-vermittelte Adhäsion beeinflusst (Lin et al. 2015). Hierbei nimmt das Protein DIAPH1 durch seine Mikrotubuli-regulierende Aktivität eine wichtige Rolle ein. Untersuchungen von Lin et al. zeigten, dass die Stabilisierung von Mikrotubuli und (2015)damit die Mikrotubuli-abhängige Adhäsion durch das DIAPH1-Protein keine Anwesenheit von Stimuli erfordert. Inwieweit DIAPH1 in autoinhibiertem Zustand mit den Mikrotubuli interagiert, wurde in-vitro bislang noch nicht erforscht und ist Thema der vorliegenden Arbeit. Für die DIAPH2-Isoform wurde bereits gezeigt, dass das Protein in der autoinhibierten Form an Mikrotubuli bindet und eine FH2-deletierte Mutante des Proteins größere Effekte auf die Mikrotubuli hervorruft als die FH2-Domäne allein (Grueb et al. 2019). Damit konnte gezeigt werden, dass DIAPH2 in kolorektalen Karzinomen die Dynamik der Mikrotubuli unabhängig von der FH2-Domäne kontrolliert. Der Grund hierfür wird auf eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne außerhalb der FH2-Domäne zurückgeführt (Grueb et al. 2019). Ausgehend von diesem Ergebnis stellt sich die Frage, ob auch in DIAPH1 eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne außer der FH2-Domäne existiert. Die Existenz einer möglichen zweiten Mikrotubuli-Bindedomäne näher zu untersuchen, ist eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit. Die Beantwortung der obengenannten Fragestellungen erfordert zunächst die Klonierung und anschließend die bakterielle Expression der bisher bekannten FH2-Domäne, des Proteins mit deletierter FH2-Domäne (fortan als Δ FH2 bezeichnet) und des Volllängenproteins (DIAPH1). Die Auswirkungen von DIAPH1, Δ FH2 und der FH2-Domäne auf die Mikrotubuli-Polymerisierung werden dann durch in-vitro-Experimente analysiert und quantifiziert. Sollte sich die Vermutung über das Vorliegen einer zweiten Mikrotubuli-Bindedomäne in DIAPH1 tatsächlich bestätigen, ist es für die spätere therapeutische Hemmung der onkogenen Aktivität von DIAPH1 essenziell, diese Domäne zu identifizieren.

Inhaltsverzeichnis

Aı	rbeitshypothese und Fragestellung	I
1.	Einleitung – medizinischer Kontext	1
	1.1. Funktion von DIAPH1 in der Metastasierungskaskade	1
	1.1.1. Mikrotubuli-abhängige Adhäsion während der Metastasierung	3
	1.1.2. Zellausläufer – Motor der Tumorzellen	4
	1.1.3. Zusammenhang zwischen DIAPH1 und Zytoskelett	6
	1.2. Mikrotubuli – Autobahnen der Zelle	7
	1.3. DIAPH1 (DIA1, mDia1, DRF1) – Ein Formin	12
	1.3.1. Aufbau	12
	1.3.2. Aktin-regulierende Aktivität	13
	1.3.3. Mikrotubuli-regulierende Aktivität	14
	1.4. Arbeitshypothese und Fragestellung	16
2.	Material und Methoden	17
	2.1. Klonierung	21
	2.1.1. Vervielfältigung der DNA	21
	2.1.2. Zwischenklonierung in den <i>p-GEM</i> [®] - <i>T Easy</i> – Vektor	22
	2.1.3. Klonierung in den Zielvektor <i>pGEX-6P-2A</i>	25
	2.2. Bakterielle Expression der <i>fh2</i> -Domäne und der Volllänge (<i>diaph1</i>)	27
	2.2.1. Rekombinante Expression von gst-fh2	27
	2.2.1.1. Transformation	27
	2.2.1.2. Herstellen der Vor- und Hauptkulturen	27
	2.2.1.3. Induktion mit unterschiedlichen Bakterienstämmen	28
	2.2.1.4. Überprüfung der Induktion mittels SDS-PAGE	28
	2.2.1.5. Testen unterschiedlicher Induktionsbedingungen	30
	2.2.1.6. Herstellen der Proteinlysate	30
	2.2.1.7. Kopplung von GST-FH2 an die GST-Beads	32
	2.2.1.8. Reinigung der Beads	32
	2.2.1.9. Elution des Fusionsproteins	33

	2.2.2. Rekombinante Expression von gst-diaph1 in BL21(DE3)pLysS-Ecoli	33
	2.2.2.1. Induktion der Genexpression	33
	2.2.2.2. Herstellen der Proteinlysate	34
	2.2.2.3. Kopplung von GST-DIAPH1 an die GST-Beads	34
	2.2.2.4. Reinigung der <i>Beads</i>	34
	2.2.2.5. Elution des Fusionsproteins	34
	2.2.2.6. Überprüfung der Induktion und Elution	35
	2.2.3. Kopplungsvariationen von GST-DIAPH1 an die GST-Beads	35
	2.2.3.1. Kopplung von GST-DIAPH1 an die Beads	35
	2.2.3.2. Reinigung der <i>Beads</i> und Elution	36
	2.3. In-vitro-Versuche mit Mikrotubuli	37
	2.3.1. Messung der Mikrotubuli-Polymerisierung	37
	2.3.2. Herstellung von polymerisierten und Taxol-stabilisierten Mikrotubuli fü	r die
	Analyse der Mikrotubuli-Struktur	38
	2.3.2.1. Analyse der Mikrotubuli-Struktur mittels	
	Fluoreszenzmikroskopie	39
	2.3.2.2. Analyse der Mikrotubuli-Struktur mittels Fluoreszenzmikrosko	pie
	bei cold-induced-depolymerization	40
	2.4. statistische Analyse	41
3.	Ergebnisse	42
	3.1. Klonierung	43
	3.1.1. Amplifikation der <i>fh2</i> -Domäne durch PCR und Klonierung in den	
	$pGEM^{\text{®}}$ -T easy – Vektor	43
	3.1.2. Klonierung der <i>fh2</i> -Domäne in den Zielvektor	45
	3.2. Bakterielle Expression der Konstrukte (<i>fh2</i> -Domäne und <i>diaph1</i>)	
	3.2.1. Rekombinante Expression von <i>gst-fh2</i>	49
	3.2.1.1. Induktion mit unterschiedlichen Bakterienstämmen	49
	3.2.1.2. Testen unterschiedlicher Induktionsbedingungen	
	3.2.1.3. Elution des Fusionsproteins	
	3.2.2. Rekombinante Expression von <i>gst-diaph1</i> in <i>BL21(DE3)pLvsS-Ecoli</i>	53
	 3.2.1.2. Testen unterschledlicher induktionsbedingungen 3.2.1.3. Elution des Fusionsproteins 3.2.2. Rekombinante Expression von <i>gst-diaph1</i> in <i>BL21(DE3)pLysS-Ecoli</i> 	50 51 53

	3.2.3. Kopplungsvariationen von GST-DIAPH1 an die GST-Beads	54
	3.3. In-vitro-Versuche mit Mikrotubuli	56
	3.3.1. Effekt von DIAPH1, FH2 und Δ FH2 auf die	
	Mikrotubuli-Polymerisierung	56
	3.3.2. Effekte von DIAPH1, FH2 und Δ FH2 auf die Struktur der Mikrotubuli	57
	3.3.3. Effekte von DIAPH1, FH2 und Δ FH2 auf die Struktur der Mikrotubuli	
	bei cold-induced-depolymerization	61
4.	Diskussion	. 65
	4.1. Zusammenfassung der in-vitro-Versuche	65
	4.2. Diskussion der Ergebnisse	66
	4.2.1. Die FH2-Domäne von DIAPH1 polymerisiert Mikrotubuli und erhöht die	
	dynamische Instabilität von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli	66
	4.2.2. DIAPH1 und das ΔFH2-Protein stabilisieren Mikrotubuli in Anwesenheit	von
	Taxol	68
	4.2.3. Fazit	72
	4.3. Eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne?	73
	4.4. Ausblick auf mögliche zukünftige Entwicklungen und Implikationen	
	für die Medizin	74
	4.4.1. Pharmakologische Inhibition von DIAPH1	74
	4.4.2. Pharmakologische Aktivierung von DIAPH1	75
	4.4.3. Therapie – Inhibition oder Aktivierung?	78
5.	Zusammenfassung	. 80
6.	Abstract	. 81
7.	Anhang	.VI
	7.1. Vektorkarte <i>pGEM</i> [®] - <i>T easy</i> mit SP6 und T7-Sequenzierungsprimer	VI
	7.2. Vektorkarte <i>pGEX-6P-2A</i> mit <i>fh2</i> -Domäne	.VII
	7.3. Primerliste	VIII

	7.4. Proteinkonstrukte	VIII
	7.5. Sequenzierungsergebnis von Klon 1 nach der Zwischenklonierung	IX
	7.6. Sequenzierungsergebnis von Klon 1 nach der Klonierung ins Zielvektor.	XII
	7.7. Tabellenverzeichnis	XIV
	7.8. Abbildungsverzeichnis	XV
	7.9. Abkürzungsverzeichnis	XVII
8.	Literaturverzeichnis	XX
9.	Danksagung	XXVII
10		XXVIII
10	. Ledenslauf	,2828 7 111

1. Einleitung – medizinischer Kontext

Das Protein *Diaphanous Homolog 1* (DIAPH1) weist eine hohe Syntheserate in kolorektalen Tumorzellen auf, welche stark mit dem Auftreten von Lungenmetastasen korreliert (Lin et al. 2014). Mit einer hohen Inzidenz und Mortalität gehört das kolorektale Karzinom weltweit zu den häufigsten Krebserkrankungen und stellt ein globales Gesundheitsproblem dar (Bray et al. 2018; Vuik et al. 2019; Siegel et al. 2020). Durch Interaktion mit dem Zytoskelett der Zelle fungiert DIAPH1 als Verstärker der Metastasierungskaskade und erlangt im Zusammenhang mit invasiven Karzinomen klinische Relevanz. Im Mausmodell konnte durch Depletion des Proteins in kolorektalen Tumorzellen eine fast vollständige Blockade der Metastasierung erreicht werden (Lin et al. 2014; Lin et al. 2015). Damit stellt die therapeutische Hemmung der onkogenen Aktivität von DIAPH1 einen möglichen pharmakologischen Angriffspunkt für invasive kolorektale Karzinome dar.

1.1. Funktion von DIAPH1 in der Metastasierungskaskade

Die Metastasierung, als die am meisten gefürchtete Komplikation von Tumoren, ist die Hauptursache für Todesfälle von Krebspatienten und kennzeichnet den letalen Aspekt vieler Krebserkrankungen, gegen den es zurzeit nur begrenzt therapeutische Strategien gibt (Fidler & Kripke 2015). Die Bildung von Metastasen ist abhängig von der Beweglichkeit der Tumorzellen, die es den Zellen erlaubt ins Blut bzw. in die Lymphe zu gelangen, sich zu verteilen, der Entdeckung durch Immunzellen auszuweichen, zu überleben, zu proliferieren und schließlich neue Umgebungen zu kolonisieren (Chambers et al. 2002; Nguyen et al. 2009). Ausgehend vom originalen Tumorgewebe erfolgt die Metastasierung schrittweise, indem die Tumorzellen sich vom primären Tumor ablösen, die Basalmembran durchbrechen und durch die extrazelluläre Matrix (ECM) und das bindegewebige Stützgerüst (Stroma) migrieren (Liotta 1986; Fife et al. 2014). Die invasiven Tumorzellen werden durch die Gefäße, im Falle des Kolonkarzinoms z.B. zur Lunge, transportiert und bilden dort Kolonien, die zu sekundären Tumoren heranwachsen (Saxena & Christofori 2013). Diese Art der metastatischen Kaskade ist in Abb. 1 dargestellt.



Abb. 1: Die Metastasierungskaskade (Saxena & Christofori 2013). Die proliferierten Tumorzellen durchbrechen die Basalmembran. Es kommt zur lokalen Invasion ins umliegende Gewebe und die Zellen gelangen in die Blutbahn (Intravasation). Die disseminierten Tumorzellen treten aus der Blutbahn heraus (Extravasation) und besiedeln andere Organe, indem sie Kolonien bzw. Mikrometastasen bilden, die im Verlauf stark proliferieren.

1.1.1. Mikrotubuli-abhängige Adhäsion während der Metastasierung

Nach der Proliferation des Primärtumors bilden die Tumorzellen zum Durchdringen der Basalmembran fokale Adhäsionen (FAs) aus (Haier et al. 1999; Fife et al. 2014; Lin & Windhorst 2016). Dies beschreibt das Anhaften der Tumorzellen an die ECM (Abb. 2). Die Bildung fokaler Adhäsionen erfolgt hauptsächlich über Integrine (Haier et al. 1999; Etienne-Manneville 2013). Über diese Adhäsionsproteine wird der Kontakt zur ECM hergestellt und damit der erste Schritt der Metastasierung initiiert.



Abb. 2: Bildung von fokalen Adhäsionen (Lin & Windhorst 2016). Tumorzellen bilden fokale Adhäsionen (orange) aus und haften damit an die ECM. Es kommt zur Verformung dieser Zellen. Erst die Adhäsion ermöglicht das Verlassen der lokalen Tumorumgebung und damit die Invasion der Tumorzellen. Die Adhäsion ist der erste und wichtigste Schritt der Metastasierung.

Experimente von Lin et al. (2015) belegten, dass die Adhäsion durch Mikrotubuli vermittelt wird. Die Mikrotubuli formen während der Interphase von den Zentrosomen ausgehend ein Netzwerk, welches den vesikulären Transport mithilfe der Motorproteine Kinesin und Dynein innerhalb der Zelle gewährleistet (Etienne-Manneville 2013; Fife et al. 2014; Hohmann & Dehghani 2019). Verstärkt wird der Vesikeltransport in Tumorzellen durch DIAPH1, indem das Protein an die Mikrotubuli bindet und diese stabilisiert (Lin & Windhorst 2016). Hierdurch wird der Transport von Vesikeln erleichtert und es kommt zur lokalen Ansammlung des Adhäsionsproteins Integrin- β 1 an der Plasmamembran (s. Abb. 3). Durch den Integrin- β 1-vermittelten Kontakt zur ECM wird das Entstehen von FAs, und damit der erste Schritt der Metastasierung, begünstigt.



Abb. 3: DIAPH1-vermittelter Transport der Integrin- β 1-Vesikel (Lin & Windhorst 2016). DIAPH1 bindet an die Mikrotubuli und stabilisiert diese. Vesikel mit Integrin- β 1 werden entlang der Mikrotubuli durch das Motorprotein Kinesin an die Zellmembran transportiert. An der Außenseite der Zelle angekommen, fusionieren die Vesikel mit der Plasmamembran und Integrin- β 1 wird an der Plasmamembran integriert. Die Adhäsion wird mithilfe des Adhäsionsproteins durch den Kontakt der Zelle zur ECM vermittelt. Dieser Vorgang stellt den ersten Schritt in der Metastasierungskaskade dar.

1.1.2. Zellausläufer – Motor der Tumorzellen

Metastasierende Tumorzellen zeichnen sich im Gegensatz zu normalen bzw. nichtmetastasierenden Tumorzellen durch ihre hohe Invasivität aus. Zu dieser Eigenschaft tragen auch Zellausläufer (Abb. 4 und 5) bei, die aus Aktinfilamenten zusammengesetzt sind (Le Clainche & Carlier 2008; Nürnberg et al. 2011; Jacquemet et al. 2015). Je nach Funktion werden diese unterschiedlich bezeichnet: Adhäsion (Filopodien), Protrusion (Lamellipodien) und Invasion (Invadopodien). Durch diese Strukturen erlangt die Zelle ihre Beweglichkeit und kann in andere Zellumgebungen eindringen. Dabei setzt die Invadopodiaformation Matrix-Metalloproteasen (MMPs) frei, die die ECM abbauen und zerstören (Nürnberg et al. 2011; Etienne-Manneville 2013).



Abb. 4: Zellausläufer für Adhäsion, Protrusion und Invasion (Abbildung verändert aus Chesarone et al. 2010). Die Zelle bildet Zellausläufer aus, die die Adhäsion an die Basalmembran und die Invasion durch die ECM ermöglichen. Zu diesen Ausläufern zählen Lamellipodien, Invadopodien (hier nicht abgebildet) und Filopodien, welche aus Aktinfilamenten aufgebaut sind.



Abb. 5: Typische Strukturen in invasiven Zellen (Nürnberg et al. 2011). Zur Adhäsion und zum Durchdringen der ECM werden Zellausläufer ausgebildet. Zu diesen Ausläufern zählen unter anderem Lamellipodien, Invadopodien und Filopodien, welche aus Aktinfilamenten (rot) aufgebaut sind. Die ECM-Degradation erfolgt mithilfe von Invadopodien. Einige Begleit- und Bindeproteine (z.B. Cortactin) beeinflussen die Aktin-Dynamik und damit auch das Ausbilden dieser Strukturen.

1.1.3. Zusammenhang zwischen DIAPH1 und dem Zytoskelett

Das Zytoskelett bildet in der Zelle ein komplexes Netzwerk aus (Abb. 6) und ist für viele zelluläre Funktionen wie Zellteilung, Zellmotilität und Gewebemorphologie essenziell (Goode & Eck 2007; Nürnberg et al. 2011; Chesarone et al. 2010). Unterschieden werden Aktin, Intermediärfilamente und Mikrotubuli (Hohmann & Dehghani 2019). Da die zellulären Strukturen (Lamellipodien, Filopodien und Invadopodien) der Tumorzellen aus Aktinfilamenten bestehen und die Integrine über Mikrotubuli an die ECM gelangen (s.o.), ist eine genaue Regulation der Zytoskelett-Dynamik erforderlich (Le Clainche & Carlier 2008; Nürnberg et al. 2011; Fife et al. 2014). Die Dynamik von Aktin- und Mikrotubuli wird durch Begleit- bzw. Bindeproteine reguliert. Vermehrte Expression dieser Proteine wie z.B. von DIAPH1 kann den ersten Schritt der Metastasierungskaskade begünstigen. Dies wird durch die Stabilisierung der Mikrotubuli bzw. durch die Stimulierung der Bildung von Aktinfilamenten für Filopodien, Invadopodien und Lamellipodien vermittelt (s.o.).



Abb. 6: Organisation und Struktur des Zytoskeletts (Hohmann & Dehghani 2019). Das Zytoskelett ist nicht nur das Grundgerüst der Zelle, sondern ist auch an vielen intrazellulären Prozessen beteiligt. Alle Zytoskelettproteine interagieren miteinander und bilden komplexe Netzwerke aus.

1.2. Mikrotubuli – Autobahnen der Zelle

Als essenzielle Bestandteile des Zytoskeletts kommen Mikrotubuli in allen eukaryotischen Zellen vor und sind an vielen Vorgängen der Zelle, wie z.B. Migration, Vesikeltransport, Zellwachstum und Chromosomenauftrennung in der Mitose, beteiligt (Wade 2009; Etienne-Manneville 2013; Fife et al. 2014). Sie sind zylinderförmig aufgebaut und gehören mit 25 nm Durchmesser zu den größten Strukturen des Zytoskeletts (Hohmann & Dehghani 2019). Mikrotubuli setzen sich aus α - und β -Tubulin zusammen (Abb. 7, A). Durch nicht-kovalente Wechselwirkungen der beiden Monomere entstehen Heterodimere, die sich zu einem hohlförmigen Polymer aus typischerweise 13 Protofilamenten zusammenlagern (Desai & Mitchison 1997; Downing 2000).



Abb. 7: Aufbau (A) und Dynamik (B) der Mikrotubuli (Kline-Smith & Walczak 2004). Mit einem Durchmesser von 25 nm gehören Mikrotubuli zu den größten Strukturen des Zytoskeletts. Bestehend aus αund β-Tubulin formen sie Polymere (A). Die Polymerisierung erfolgt durch die Rekrutierung von neuen Tubulin-Dimeren und zeitlich versetzter GTP-Hydrolyse (B). Es erfolgt ein ständiger Wechsel zwischen Aufund Abbau der Mikrotubuli (Polymerisation und Depolymerisation). Der abrupte Wechsel zwischen diesen beiden Zuständen wird als dynamische Instabilität bezeichnet. Das Aneinanderlagern mehrerer α - β -Tubulin-Heterodimere ans Mikrotubulus-Ende wird als Polymerisierung und das Auseinanderfallen als Depolymerisierung bezeichnet (Downing 2000). Zur Polymerisierung wird das GTP des ß-Tubulins nach Hinzufügen der Tubulin-Dimere ans Mikrotubulus-Ende unter Freisetzung des Phosphats hydrolysiert (Abb. 7, B). Nach der Hydrolyse des GTPs zu GDP verbleibt GDP an der ß-Tubulin – Untereinheit des α - β -Tubulin – Heterodimers. Prinzipiell ist der Auf- und Abbau an beiden Enden eines Mikrotubulus möglich. Die Anordnung der α-β-Tubulin-Heterodimere (Orientierung des β-Tubulins zum Plus-Ende) bewirkt jedoch eine polare Ausrichtung (Desai & Mitchison 1997). Als Konsequenz dieser Polarität ergeben sich jeweils unterschiedliche Wachstumsbzw. Zerfallsgeschwindigkeiten an beiden Enden der Mikrotubuli: Das Ende, an dem die Polymerisierung oder Depolymerisierung durch Hinzufügen oder Entfernen von Tubulin-Dimeren schneller voranschreitet, wird Plus-Ende genannt, wohingegen das Minus-Ende langsamer wächst und stabiler ist (Wade 2009). Die GTP-Hydrolyse erfolgt mit dem Aneinanderlagern der Tubulin-Dimere an das Ende der Mikrotubuli nicht zeitgleich, sondern erst im Anschluss. Mit der Rekrutierung neuer Tubulin-Dimere am wachsenden Ende der Mikrotubuli entsteht dadurch ein GTP-Tubulin-cap, (Carlier et al. 1984; Desai & Mitchison 1997; Brouhard & Rice 2014). Diese sog. "GTP-Kappe" stabilisiert die Form der Mikrotubuli. Der Verlust der GTP-Kappe führt zur Depolymerisierung, da die GTP-Hydrolyse schneller fortschreitet als das Hinzufügen der Tubulin-Dimere (Abb. 7, B und Abb. 8). Hierbei nehmen die Mikrotubuli durch die Relaxierung der Protofilamente und durch den Verlust von Zwischenbindungen eine kurvige Konformation ein. GDP-Tubulin dissoziiert von den Mikrotubuli und diese beginnen zu schrumpfen ("catastrophe"). Der ,,*catastrophe*" – Vorgang (Übergang der Polymerisierungsphase die in Depolymerisierungsphase) kann aber auch mit dem zunehmenden Wachstum der Mikrotubuli (Polymerisierung) begründet werden (Brouhard 2015): Die zunehmende Polymerisierung bewirkt analog zum Verlust der GTP-Kappe eine Krümmung der Mikrotubuli, die zum Verlust der lateralen Kontakte führt. Mit der kurvigen Konformation einhergehend verlieren die Mikrotubuli an Stabilität und die Depolymerisierung wird initiiert.



Abb. 8: Dynamik der Mikrotubuli und GTP-Tubulin-*cap* (Brouhard & Rice 2014). Solange das Ende der Mikrotubuli mit GTP-beladenen Dimeren besetzt ist, wird das Wachstum bzw. die Polymerisierung der Mikrotubuli fortgesetzt, indem die Heterodimere ans Mikrotubulus-Ende schneller rekrutiert werden als die GTP-Hydrolyse fortschreitet. Geht die schützende GTP-Kappe verloren, wird die Reaktion in Richtung Depolymerisierung verschoben (*catastrophe*). In dieser Phase hydrolysiert das GTP schneller als neue Tubulin-Dimere rekrutiert werden. Der Mikrotubulus nimmt eine kurvige Konformation an, wird instabil und zerfällt. Der Vorgang, bei dem die Gleichgewichtsreaktion erneut in Richtung Polymerisierung verlagert wird, wird als "*rescue*" bezeichnet.

Depolymerisierende Mikrotubuli können erneut polymerisieren ("*rescue*"). Dimitrov et al. (2008) zeigten in ihrer Untersuchung, dass die Regeneration der Mikrotubuli aus dem "*catastrophe*" (= "*rescue*") auf sog. GTP – "*remnants*" zurückgeführt werden kann, die aus der unvollständigen GTP-Hydrolyse während der Polymerisierung entstehen und damit Entstehungsorte für eine erneute Tubulin-Addition darstellen (s. Abb. 9). Der exakte Mechanismus von "*catastrophe*" und "*rescue*" blieben bislang jedoch ungeklärt.



Abb. 9: GTP- "*remnant*" – Modell (Abbildung verändert aus Dimitrov et al. 2008). Während der Polymerisierung (P) entsteht am Mikrotubulus-Ende ein GTP-*cap* bestehend aus GTP-Tubulin (rot). Durch die unvollständige Hydrolyse des GTPs sind auch in inneren Regionen des Mikrotubulus GTP-Tubulin bzw. eine unvollständige GTP-Kappe lokalisiert (GTP- "*remnants*"). Der Verlust der eigentlichen GTP-Kappe erhöht die Wahrscheinlichkeit für "*catastrophe*" (C) und der Mikrotubuli depolymerisiert (D) bis ein GTP- *remnant*" erreicht ist (rot). Das Mikrotubulus-Ende ist erneut von einer GTP-Kappe umgeben und die Wahrscheinlichkeit für Polymerisierung steigt ("*rescue*" = R).

Bedingt durch den Wechsel zwischen Polymerisierung und Depolymerisierung sind Mikrotubuli dynamische Strukturen. Der abrupte Wechsel zwischen den beiden Zuständen wird als dynamische Instabilität bezeichnet (Mitchison & Kirschner 1984; Desai & Mitchison 1997; Downing 2000; Brouhard 2015). Veränderungen der Mikrotubuli-Dynamik bzw. der Verlust der Fähigkeit von Mikrotubuli, in einer regulierten Art und Weise zu polymerisieren und zu depolymerisieren, können zelluläre Funktionen beeinträchtigen (Fife et al. 2014; Hohmann & Dehghani 2019).

Mikrotubuli wachsen und schrumpfen stochastisch und können autonom zwischen Polymerisierung und Depolymerisierung wechseln (Desai & Mitchison 1997; Downing 2000). Diese Dynamik kann jedoch auch von diversen Proteinen beeinflusst werden. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem MAPs (*Microtubule-associated proteins*), die an die Mikrotubuli binden und deren Struktur beeinflussen, + TIPs (*plus-end tracking proteins*),

die die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikrotubuli erhöhen, Motorproteine Kinesin und Dynein, die Mikrotubuli als Transportwege nutzen und für den intrazellulären Transport notwendig sind (Wade 2009; Mohan & John 2015), aber auch Formine (Bartolini & Gunderson 2010) wie das DIAPH1-Protein. Einige aus Pflanzen isolierte Stoffe wie Taxol, Colchicin und Vinblastin beeinflussen die Mikrotubuli ebenfalls und wirken antimitotisch (Schiff et al. 1979; Downing 2000; Wade 2009). Damit finden diese Stoffe bei einigen Erkrankungen klinische Anwendung.

1.3. DIAPH1 (DIA1, mDia1, DRF1) – Ein Formin

Die DIAPH-Proteine gehören zu der Familie der Diaphanous-related formins (DRFs). Als Zytoskelett-regulierende Proteine sind Formine sowohl an der Regulierung des Aktins als auch an der Regulierung der Mikrotubuli beteiligt (Chesarone et al. 2010; Breitsprecher & Goode 2013). Damit beeinflusst auch das Protein Diaphanous Homolog 1 (DIAPH1) viele intrazelluläre Prozesse und nimmt bei zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen (z.B. Tumorzellmigration und -invasion) eine wichtige Rolle ein (DeWard et al. 2009; Breitsprecher & Goode 2013). Beispiele für diverse zelluläre Funktionen, die durch Formine reguliert werden, sind unter anderem Zellform, Zellteilung, Zellbewegung, Zelladhäsion, Vesikeltransport und Zellmigration (Wasserman 1998; Faix & Grosse 2006; Barlink et al. 2010; Kühn & Geyer 2014). Das Gen, welches DIAPH1 codiert, ist auf Chromosom 5 lokalisiert (Lynch et al. 1997).

1.3.1. Aufbau

In Säugetierzellen sind drei Isoformen von DIAPH bekannt, die jeweils unterschiedliche Bezeichnungen haben: DIAPH1 (mDia1, m = Mausproteinvariante), DIAPH2 (mDia3) und DIAPH3 (mDia2). Fast alle Formine besitzen einen ähnlichen schematischen Aufbau und sind durch zwei wichtige Domänen gekennzeichnet: die FH1- und die FH2-Domäne (*Formin homology* 1- and 2 - domain) (Faix & Grosse 2006; Goode & Eck 2007; Paul & Pollard 2009; Maiti et al. 2012). Sie sind Effektor-Proteine verschiedener GTPasen wie Rho, Rac und Cdc42 (Wasserman 1998; Kühn & Geyer 2014). In Abwesenheit solcher Stimuli sind DRFs und die meisten anderen Formine autoinhibiert. Die Hemmung der Proteinaktivität wird durch die Interaktion der DID-Domäne (*Diaphanous inhibitory domain*) am N-Terminus und der DAD-Domäne (*Diaphanous autoregulatory domain*) am C-Terminus initiiert (Abb. 10). Erst die Bindung von GTP gebundenem Rho (Rho-GTP) an die GBD-Domäne (GTPase-binding domain) von DIAPH1 unterbricht die "DID-DAD"-Interaktion und das Protein wird in den aktiven Zustand überführt (Chesarone et al. 2010; Maiti et al. 2012; Kühn & Geyer 2014). Dabei wird zwischen der Aktin- und Mikrotubuliregulierenden Aktivität unterschieden.



Abb. 10: Schematischer Aufbau von DIAPH1 (Abbildung verändert aus Goode & Eck 2007). In Abwesenheit von extrazellulären Stimuli ist DIAPH1 autoinhibiert. Dabei bindet die DAD-Domäne an die DID-Domäne. Erst die Bindung von Rho-GTP an die GBD-Domäne führt durch die Unterbrechung der "DID-DAD"-Interaktion zur Aktivierung des Proteins. Abkürzungen: GBD – GTPase-binding domain, DID – Diaphanous inhibitory domain, DD – Dimerization domain, CC – Coiled-coil domain, FH1- und FH2 – Formin homology 1- and 2 - domain, DAD – Diaphanous autoregulatory domain

1.3.2. Aktin-regulierende Aktivität

Aktin ist neben vielen wichtigen zellulären Funktionen auch an pathophysiologischen Prozessen wie Migration und Invasion der Tumorzellen beteiligt (Nürnberg et al. 2011; Fife et al. 2014). Wie in 1.1.2. bereits beschrieben, dienen Formine als sog. Aktin-Bindeproteine (ABPs) der Entstehung von Filopodien und anderen Zellausläufern, indem sie die Formierung von Aktinfilamenten verstärken (Le Clainche & Carlier 2008). Auch DRFs sind an der Formation linearer Aktinfilamente beteiligt (Kovar 2007; Goode & Eck 2007; Paul & Pollard 2009). Dabei interagiert die prolinreiche FH1-Domäne mit dem ABP Profilin, welches Aktin-Monomere (G-Aktin) bindet (Wasserman 1998; Kovar 2006; Chesarone et al. 2010; Breitsprecher & Goode 2013; Hohmann & Dehghani 2019). Gleichzeitig wird mit der FH2-Domäne G-Aktin zu filamentösem Aktin (F-Aktin) geformt und es kommt zur Elongation der Aktinfilamente (Abb. 11, b). Klinisch relevant ist, dass DIAPH1 von allen ABPs die höchste Syntheserate in kolorektalen Tumorzellen aufweist (Lin et al. 2014). Für die Entstehung von Aktinfilamenten muss das Protein in dimerisierter Form vorliegen (Xu et al. 2004; Maiti et al. 2012). Die Dimerisierung erfolgt in Anwesenheit eines Stimulators (Rho-GTP) mit den DD- und den FH2-Domänen zweier Proteine derselben Isoforms (Homodimere, s. Abb. 11, a), wobei die FH2-Domäne antiparallel dimerisiert (Xu et al. 2004; Barlink et al. 2010).



Abb. 11: Aktin-regulierende Aktivität von DIAPH1 (Chesarone et al. 2010). a) Domänenstruktur und Dimerisierung. Charakteristisch sind die FH1- und FH2-Domäne, die für die Aktin-regulierende Aktivität des Proteins verantwortlich sind. Einige Proteine binden spezifisch an bestimmte Domänen (z.B. Rho an RBD-Domäne, Profilin an FH1-Domäne etc.). Auffällig ist die Donut-ähnliche Form der FH2-Domäne. B) Entstehung von Aktinfilamenten. Die FH1-Domäne interagiert mit dem ABP Profilin, welches Aktin-Monomere (G-Aktin) bindet. Zugleich wird G-Aktin durch die FH2-Domäne zu filamentösem Aktin (F-Aktin) polymerisiert.

1.3.3. Mikrotubuli-regulierende Aktivität

Als ein ABP weist DIAPH1 wie einige andere Formine eine Besonderheit auf, denn einige Formine können auch unabhängig von der Aktinpolymerisierungsaktivität Bindungen zu den Mikrotubuli vermitteln (Bartolini et al. 2008; Breitsprecher & Goode 2013). Am genauesten ist bislang die Formin-Mikrotubuli-Interaktion von mDia2 (DIAPH3) charakterisiert (Bartolini & Gunderson 2010): mDia2 bindet direkt an die Mikrotubuli und stabilisiert diese. Die Stabilisierung ist dabei nicht auf das vermehrte Wachstum der Mikrotubuli, sondern auf die niedrigere Zerfallsrate der Tubulin-Untereinheiten in Gegenwart des Formins zurückzuführen (Palazzo et al. 2001; Bartolini & Gunderson 2010). mDia-Formine fungieren hierbei als eine Art Kappe (Abb. 12).



Abb. 12: Mikrotubuli-regulierende Aktivität von mDia (Palazzo et al. 2001). Dargestellt ist die Aktivierung des Formins durch das G-Protein Rho und der Effekt auf die Mikrotubuli. mDia-Formine binden direkt an die Mikrotubuli und weisen eine "*capping*"-Aktivität auf. Die Kappe stabilisiert die Mikrotubuli.

Bisher ist bekannt, dass die Bindung an die Mikrotubuli durch die FH2-Domäne vermittelt wird (Ishizaki et al. 2001; Bartolini & Gunderson 2010). Lin et al. (2015) konnten zeigen, dass die Mikrotubuli-abhängige Adhäsion durch DIAPH1 auch in Abwesenheit von extrazellulären Stimuli erfolgt. Bei der DIAPH2-Isoform konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Mikrotubuli-Dynamik unabhängig von der FH2-Domäne kontrolliert wird (Grueb et al. 2019). Der Mechanismus der Interaktion von DIAPH1 mit den Mikrotubuli, ist weniger genau untersucht und von in-vitro-Effekten auf die Dynamik der Mikrotubuli anderer Formine wurde bislang wenig berichtet (Bartolini et al. 2008; Bartolini & Gunderson 2010). Die Mikrotubuli-regulierende Aktivität von DIAPH1 wird für die Mikrotubuli-abhängige Adhäsion benötigt (s.o.). Eine Blockade der "DIAPH1-Mikrotubuli"-Interaktion würde durch den Verlust der Mikrotubuli-stabilisierenden Funktion zu einer Hemmung der Mikrotubuli-vermittelten Adhäsion von Tumorzellen führen. Dieser Schritt vermittelt den Einstieg in die Metastasierungskaskade.

1.4. Arbeitshypothese und Fragestellung

Das metastatische Potenzial des Kolonkarzinoms wird durch die Mikrotubuli-vermittelte Adhäsion beeinflusst (Lin et al. 2015). Hierbei nimmt das Protein DIAPH1 durch seine Mikrotubuli-regulierende Aktivität eine wichtige Rolle ein. Untersuchungen von Lin et al. zeigten, dass die Stabilisierung von Mikrotubuli und damit (2015)die Mikrotubuli-abhängige Adhäsion durch das DIAPH1-Protein keine Anwesenheit von Stimuli erfordert. Inwieweit DIAPH1 in autoinhibiertem Zustand mit den Mikrotubuli interagiert, wurde in-vitro bislang noch nicht erforscht und ist Thema der vorliegenden Arbeit. Für die DIAPH2-Isoform wurde bereits gezeigt, dass das Protein in der autoinhibierten Form an Mikrotubuli bindet und eine FH2-deletierte Mutante des Proteins größere Effekte auf die Mikrotubuli hervorruft als die FH2-Domäne allein (Grueb et al. 2019). Damit konnte gezeigt werden, dass DIAPH2 in kolorektalen Karzinomen die Dynamik der Mikrotubuli unabhängig von der FH2-Domäne kontrolliert. Der Grund hierfür wird auf eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne außerhalb der FH2-Domäne zurückgeführt (Grueb et al. 2019). Ausgehend von diesem Ergebnis stellt sich die Frage, ob auch in DIAPH1 eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne außer der FH2-Domäne existiert. Die Existenz einer möglichen zweiten Mikrotubuli-Bindedomäne näher zu untersuchen, ist eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit. Die Beantwortung der obengenannten Fragestellungen erfordert zunächst die Klonierung und anschließend die bakterielle Expression der bisher bekannten FH2-Domäne, des Proteins mit deletierter FH2-Domäne (fortan als ΔFH2 bezeichnet) und des Volllängenproteins (DIAPH1). Die Auswirkungen von DIAPH1, Δ FH2 und der FH2-Domäne auf die Mikrotubuli-Polymerisierung werden dann durch in-vitro-Experimente analysiert und quantifiziert. Sollte sich die Vermutung über das Vorliegen einer zweiten Mikrotubuli-Bindedomäne in DIAPH1 tatsächlich bestätigen, ist es für die spätere therapeutische Hemmung der onkogenen Aktivität von DIAPH1 essenziell, diese Domäne zu identifizieren.

2. Material und Methoden

Tab. 1: Laborgeräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	Systec
Bakterienschüttler	New Brunswick
Heizblock ThermoStat plus und Thermomixer comfort	Eppendorf
Inkubator	Thermo Scientific [™] , Binder
Fluoreszenzmikroskop	Keyence
Magnetrührer	Heidolph
Mikrowelle	Severin
Nanodrop (Mikrovolumen-Spektralphotometer)	Thermo Scientific
pH-Meter	WTW
Photometer	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfen (Pipetus®) accu-jet	Hirschmann, Brand
Sonifier Ultraschallgerät	Branson
Sterilwerkbank	Thermo Scientific TM
Mikroplattenreader	Tecan
Thermocycler	Eppendorf
Rotatorscheibe	Stuart
Überkopfschüttler	IKA
UV-Transilluminator	UVP
Vortex (Genie2 TM)	Scientific Industries
Waage	Sartorius
Wasserbad	Memmert
Wippschüttler	Heidolph
Zentrifugen	Heraeus, Hermle, Eppendorf, Thermo Scientific™, Sorvall

	•	D	•
'l'ah	·	Roou	on710n
1 a.v.	4.	ncag	CHLICH

Reagenzien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	Serva
Agarose	Serva
APS (Ammonium Persulfate)	Thermo Scientific
Ampicillin	Thermo Scientific
BSA (Bovines Serumalbumin)	Thermo Scientific
dATP (Desoxyadenosintriphosphat)	BioLabs
DTT (Dithiothreitol)	BioRad
1 kb DNA- <i>Ladder</i>	BioLabs
dNTPs (Desoxynucleosidtriphosphate)	Sigma-Aldrich
GST-Beads (Glutathion-Sepharose-Tag-Beads)	GE Healthcare, Sigma-Aldrich
Glycerin	Chemsolute
GTP (Guanosintriphosphat;100 mM)	Cytoskeleton, Inc.
HMW (high molecular weight) -Marker	Thermo Scientific
ITPG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Roth
LB (lysogeny broth) -Medium	Roth
GSH (L-Glutathion)	Sigma-Aldrich
NaOH (Natriumhydroxid)	Sigma-Aldrich
TEMED (NNN'N'-Tetramethylethylenediamine)	Thermo Scientific
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Roti®-Blue-quick (Protein-Färbelösung)	Roth
Roti®-GelStain	Roth
SDS (Sodium dodecly sulfate)	Serva
Taxol	Sigma-Aldrich
Tubulin (> 99% pure): <i>porcine brain</i>	Cytoskeleton, Inc.
Tubulin (rhodamine): porcine brain	Cytoskeleton, Inc.
6x DNA-Loading-Dye	PeqLab

Puffer	Hersteller
5x High-Fidelity (HF) – Puffer	Thermo Scientific
5x Taq-DNA-Polymerase-Puffer	Promega
2x Ligationspuffer	Promega
NE-Buffer 3:1	BioLabs

Tab. 3: verwendete Puffer bei der Klonierung

Tab. 4: Enzyme

Enzym	Sequenz	Hersteller
XhoI	CTCGAG	New England BioLabs
NotI	GCGGCCG	New England BioLabs
Phusion-DNA-Polymerase		Thermo Scientific
Taq-DNA-Polymerase		New England BioLabs
T4 Ligase		Promega

Tab. 5: Bakterienstämme

Stamm	Verwendungszweck
XL1-Blue-Ecoli	Klonierung
BL21(DE3)pLysS-Ecoli	diaph1- und fh2-Expression
C41(DE)pLysS-Ecoli	fh2-Expression
C43(DE)pLysS-Ecoli	fh2-Expression
Rosetta(DE3)pLysS-Ecoli	fh2-Expression

Tab. 6: Vektoren

Vektoren	Resistenz
pGEM®-T Easy	Ampicillin
pGEX-6P-2A	Ampicillin

Tab. 7: Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin [®] Gel- und PCR – <i>Clean-Up</i>	Macherey-Nagel
Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep-Kit	JenaBioscience

Tab. 8: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
µ-slide-8-well (8er-Chamber-Slides)	Ibidi
96-well-plates	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße	Sarstedt, Eppendorf
Skalpell	Braun
Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm)	Sarstedt
Plating beads	Rattler
Einmal-Feindosierspritzen	Braun
Vivaspin 500 Zentrifugalfilter	Sartorius
OD-Küvetten	Sarstedt

Tab. 9: verwendete Software

Software	Verwendungszweck
BZ Analyzer, BZ Viewer	Analyse von mikroskopischen Aufnahmen am Keyence
Zotero	Verwaltung von Literatur
ImageJ	Auswertung von mikroskopischen Aufnahmen
NanoDrop 2000/2000c	Bestimmung der DNA-Konzentration
SigmaPlot	Datenauswertung und Erstellen von Diagrammen
SnapGene, Serial Cloner	Tool für virtuelles Klonieren, Analyse von DNA-Sequenzen

Anmerkung: Das Fusionsgen *gst-diaph1* und das Δ FH2-Protein wurde von Shumin Miao zur Verfügung gestellt.

2.1. Klonierung

2.1.1. Vervielfältigung der DNA

Zu Beginn der Klonierung mussten die Restriktionsschnittstellen XhoI und NotI in die *fh2*-Domäne eingebaut werden. Hierzu erfolgte eine Amplifizierung mittels PCR (*polymerase chain reaction*). Die Primer wurden dabei so gewählt, dass sie die gewünschten Restriktionsschnittstellen beinhalten (Sequenzen s. Anhang). Für die PCR wurde zunächst ein Reaktionsmix auf Eis zusammenpipettiert (Tab. 10) und der PCR-Ansatz anschließend in einem Eppendorf Thermocycler inkubiert, welcher das in Tab. 11 dargestellte PCR-Programm durchlief.

Tab. 10: Bestandteile der PCR

5x High-Fidelity(HF) – Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
<i>fh2</i> -Fw-Primer (10 µM), Schnittstelle: XhoI	1 µl
fh2-Rv-Primer (10 µM), Schnittstelle: NotI	1 µl
Template-DNA (10 ng/µl)	1 µl
Phusion-DNA-Polymerase (2 U/µl)	1 µl
destilliertes Wasser	35 µl

Tab. 11: PCR-Programm

30 s	98 °C	Initiale Denaturierung	
15 s	98 °C	Denaturierung	
60 s	68 °C	Annealing-Temperatur der Primer	→ 30 Zyklen
60 s	72 °C	Elongation	
300 s	72 °C	Finale Elongation	
∞	4 °C	Abkühlung/Lagerung	

Zur Kontrolle, ob das Transgen (*insert*) erfolgreich amplifiziert wurde, eignete sich ein 1 %iges Agarosegel.

Hierzu wurden 0,5 g Agarose in 50 ml des 1:10 verdünnten TAE-Puffer (Tab. 12) aufgekocht, bis die Suspension durchsichtig und klar wurde. Um die DNA anzufärben, wurden zur aufgekochten Lösung 3 μ l Roti®-GelStain hinzugegeben. Die Lösung wurde anschließend in eine Gießschiene gegossen und zum Herstellen der Gel-Taschen wurde ein passender Kamm in das noch flüssige Gel hineingesteckt.

Tab. 12: Zusammensetzung des Tris-Acetat-EDTA-Puffers (TAE-Puffer)

Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	2 M
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	0,1 M

Nach dem Verfestigen des Gels wurden $10 \,\mu$ l des PCR-Ansatzes mit $2 \,\mu$ l 6x DNA-*Loading-Dye* versetzt und hiermit eine Gel-Tasche beladen. Daneben wurde $10 \,\mu$ l vom 1 kb(Kilobasen)- DNA-*Ladder* als Größenstandard aufgetragen und die Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V gestartet. Das Gel wirkte dabei wie ein molekulares Sieb, bei dem kürzere DNA-Fragmente durch das elektrische Feld angetrieben weiter zur Anode wanderten als längere. Nach 30 min Laufzeit wurden die DNA-Banden mit dem UV-Transilluminator UVP sichtbar gemacht. Zum Schluss wurde die DNA (die restlichen 40 μ l aus der PCR-Reaktion) mit dem NucleoSpin[®] Gel- und PCR-*Clean-up*-Kit nach dem Protokoll von Macherey-Nagel gereinigt und mit dem im Kit enthaltenen *NE-Buffer* in einem Gesamtvolumen von 20 μ l eluiert.

2.1.2. Zwischenklonierung in den *p-GEM®-T Easy* – Vektor

XhoI und NotI gehören zu den Typ II- Restriktionsenzymen (Tamulaitiene & Siksnys, 2008; Datenbank Uniprot), die innerhalb der Erkennungssequenz vorzugsweise durch Ansetzen an einer stabilen Bindestelle schneiden. Nach der **PCR-Reaktion** waren die Restriktionsschnittstellen am Ende der amplifizierten DNA-Stränge lokalisiert. Dadurch verringerte sich die Wahrscheinlichkeit einer stabilen Bindung der Enzyme an die DNA und hiermit die Entstehung von komplementären "sticky ends", welche die Ligation erleichtern. Um diesem Problem entgegenzuwirken und damit die Wahrscheinlichkeit der Ligation des PCR-Produkts in den Zielvektor zu steigern, wurde eine Zwischenklonierung durchgeführt.

Hierbei wurde der $pGEM^{\circledast}$ -T easy – Vektor als Zwischenvektor genutzt, welcher einen Poly-T-Überhang besitzt (s. Vektorkarte im Anhang). Vor der Ligation in $pGEM^{\circledast}$ -T easy wurde zur *fh2*-Domäne ein Poly-A-Schwanz hinzugefügt (Polyadenylierung). Damit konnte die *fh2*-Domäne, durch die komplementäre Übereinstimmung des Poly-A-Schwanzes zum Poly-T-Überhang des Vektors, in den $pGEM^{\circledast}$ -T easy integriert werden. Hierzu wurde ein Reaktionsmix pipettiert (Tab. 13), welcher bei 72 °C für 30 min im Heizblock ThermoStat plus inkubiert wurde.

Tab. 13: Einfügen des Poly-A-Schwanzes (Polyadenylierung)

Eluat des PCR-Clean-ups	13 µl
5x Taq-DNA-Polymerase-Puffer	4 µl
dATP (2 mM)	2 µl
Taq-DNA-Polymerase	2 µl

Im Anschluss an die Polyadenylierung wurde der $pGEM^{\otimes}$ -*T easy* – Ligationsansatz hergestellt (Tab. 14) und dieser über Nacht bei 4 °C in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert.

Tab. 14: *pGEM*[®]-*T* easy – Ligation

2x Ligationspuffer	7 μl
PA-Tailing Ansatz	5 µl
pGEM [®] -T easy	1 µl
T4 Ligase	1 µl

Nach der Ligation wurde die DNA am nächsten Tag in *XL1-Blue-E.-coli* eingebracht (Transformation). Dazu mussten die zuvor bei -80 °C gelagerten 100 μ l *XL-1-Blue* – Zellen zunächst für ca. 7 min auf Eis aufgetaut werden. Zu den aufgetauten Bakterienzellen wurden 10 μ l Ligationsansatz (*pGEM*[®]-*T easy* mit inserierter *fh2*-Domäne) pipettiert. Dieser Mix wurde für weitere 30 min auf Eis gelagert und anschließend wurde ein Hitzeschock für eine Minute bei 42 °C im Heizblock durchgeführt. Die Zellen wurden direkt danach eine Minute erneut aufs Eis gestellt und mit 900 μ l antibiotikafreiem LB-Medium versetzt. Die Bakteriensuspension wurde bei 37 °C und 800 rpm für 1 h in einem Eppendorf Thermomixer

inkubiert und anschließend auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte durchs Schwenken mit *plating beads* (kleine Kügelchen) verteilt. Die abschließende Inkubation der Agarplatte erfolgte über Nacht bei 37 °C im Binder Inkubator. Am nächsten Tag wurden acht Kolonien gepickt und diese jeweils in 6 ml LB-Medium (zuvor mit 1 mM Ampicillin verdünnt) im selben Inkubator bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde im Anschluss mit dem Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit von Jena Bioscience isoliert und zum Überprüfen der Zwischenklonierung wurde ein analytischer Verdau durchgeführt (Tab. 15). Hierzu wurde ein Mix aus Plasmid-DNA, *NE-Buffer* und destilliertes Wasser in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß hergestellt. Zuletzt wurden die Restriktionsenzyme XhoI und NotI hinzugegeben und der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C im Eppendorf Thermomixer inkubiert.

Tab. 15: Analytischer Verdau

Plasmid-DNA	1 μg
NE-Buffer 3:1	2 µl
Restriktionsenzyme	je 0,5 µl
destilliertes Wasser	Auffüllen auf 20 µl

Der analytische Verdau wurde durch ein 0,8 %iges Agarosegel kontrolliert (Gelherstellung s.o.). Um abschließend mögliche Rasterschubmutationen und andere Fehler in der Gensequenz auszuschließen, wurde die Plasmid-DNA sequenziert (Tab. 16).

Tab. 16: Sequenzierung der in pGEM®-T easy inserierten fh2-Domäne

Plasmid-DNA aus Mini-Prep	1,2 µg
Primer T7 und SP6 (Zugabe durch SeqLab)	3 µl
destilliertes Wasser	Auffüllen auf 12 µl

Die Zugabe der Sequenzierungsprimer T7 und SP6 erfolgte zum Schluss durch das Sequenzierungslabor (Bindestellen s. Vektorkarte im Anhang). Die Sequenzen der Klone wurden mithilfe der Software SnapGene und der Datenbank BLAST mit der Originalsequenz verglichen und auf Vollständigkeit überprüft, bevor die Klonierung in den Expressionsplasmid *pGEX-6P-2A* fortgesetzt wurde.

2.1.3. Klonierung in den Zielvektor pGEX-6P-2A

Die *fh2*-Domäne lag nicht isoliert vor, sondern befand sich im *pGEM*[®]-*T easy*-Plasmid. Im Zielvektor war zusätzlich ein anderes Gen (*itpka*) integriert. Folglich erforderte die Insertion der *fh2*-Domäne in den Zielvektor zunächst einen präparativen Verdau, da die Komponenten bereitgestellt werden mussten (*fh2*-Domäne und Zielvektor *pGEX-6P-2A*). Hierzu wurden zwei getrennte Ansätze, die sich ausschließlich bzgl. der Plasmid-DNA unterscheiden, mit jeweils gleichen Volumina zubereitet und bei 37 °C für 3 h inkubiert (Tab. 17).

Tab. 17: Präparativer Verdau für Ansatz 1 und 2

Plasmid-DNA: <i>pGEM</i> [®] - <i>T easy</i> mit <i>fh2</i> -Domäne (Ansatz 1), <i>pGEX-6P-2A</i> mit <i>itpka</i> (Ansatz 2)	2 µg
NE-Buffer 3:1	2 µ1
Restriktionsenzyme (XhoI und NotI)	je 0,5 µl
destilliertes Wasser	Auffüllen auf 20 µl

Die Ansätze wurden in ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und nach 30 min Laufzeit wurden die gewünschten DNA-Banden (Zielvektor *pGEX-6P-2A* und *fh*2-Domäne) mithilfe eines Skalpells herausgeschnitten. *pGEX-6P-2A* und die *fh*2-Domäne wurden in je ein 1,5 ml – umfassendes Reaktionsgefäß überführt und mit dem NucleoSpin[®] Gel- und PCR-*Clean-up*-Kit nach dem Protokoll von Macherey-Nagel aus dem Gel extrahiert. Der Ligationsansatz wurde gemäß Tab. 18 hergestellt und bei 16 °C über Nacht im Eppendorf Thermomixer inkubiert.

Tab. 18: Ligation in den Zielvektor

2x Ligationspuffer	7 µl
Insert	5 µl
Vektor <i>pGEX-6P-2A</i>	1 µl
T4 Ligase	1 µl

Am nächsten Tag erfolgte eine Transformation in *Xl-1-Blue-E.-coli* (Durchführung s. Zwischenklonierung).

Ab hier war die Klonierung, bis auf den präparativen Verdau (dieser war nicht mehr notwendig), mit der Zwischenklonierung identisch. Zur Sequenzierung (Tab. 19) wurden Primer entworfen, die vor und nach der *gst*-PreScission-Stelle binden, um den Sequenzübergang von *gst* zur *fh2*-Domäne zu überprüfen (Bindestellen und Sequenzen s. Anhang).

Tab. 19: Sequenzierung der in pGEX-6P-2A inserierter fh2-Domäne

Plasmid-DNA aus Mini-Prep	1,2 µg
gst-fh2-Fw-Primer	3 µl
gst-fh2-Rv-Primer	3 µl
destilliertes Wasser	Auffüllen auf 15 µl

2.2. Bakterielle Expression der *fh2*-Domäne und der Volllänge (*diaph1*)

Die Genexpression wurde für zwei Protein-Konstrukte durchgeführt: die FH2-Domäne und das Volllängen-Protein (Skizzen s. Anhang). Sowohl die *fh2*-Domäne als auch *diaph1* wurden als GST-Fusionsproteine (GST-FH2 und GST-DIAPH1) exprimiert. Die in pGEX-6P-2A vorhandene Glutathion-S-Transferase (GST) eignete sich dabei als Protein-Tag, welches ein Molekulargewicht von ca. 26 kDa aufweist.

2.2.1. Rekombinante Expression von gst-fh2

2.2.1.1. Transformation

Die Expression der in *pGEX-6P-2A* inserierter *fh2*-Domäne erforderte zunächst eine Transformation. Da für die Expression der *fh2*-Domäne kein etabliertes Protokoll vorlag, wurden vier verschiedene Bakterienstämme untersucht (*BL21(DE3)pLysS-E.-coli*, *C41(DE)pLysS-E.-coli*, *C43(DE)pLysS-E.-coli* und *Rosetta(DE3)pLysS_E.-coli*). Für die Transformation mussten die bei zuvor -80 °C gelagerten Bakterienzellen für ca. 10 min auf Eis aufgetaut werden. Zu den Zellen wurde dann pro Bakterienstamm 1 µl Ligationsansatz (*pGEX-6P-2A*-Plasmid-DNA mit gst*-fh2*) pipettiert. Das "Bakterien-Ligations-Gemisch" wurde für weitere 30 min auf Eis gelagert und es wurde ein Hitzeschock für eine Minute bei 42 °C durchgeführt. Die Zellen wurden direkt danach für eine Minute erneut aufs Eis gestellt, bevor sie mit 900 µl antibiotikafreiem LB-Medium versetzt und bei 37 °C und 800 rpm für 1 h in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert wurden. Nach dem Ausplattieren der vier Bakteriensuspensionen auf LB-Ampicillin-Agarplatten erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C in einem Thermo ScientificTM Inkubator.

2.2.1.2. Herstellen der Vor- und Hauptkulturen

Zum Herstellen der Vorkulturen wurde im selben Inkubator pro Bakterienstamm eine Übernachtkultur bei 37 °C angesetzt. Hierzu wurden pro Stamm einzelne Bakterienkolonien abgenommen und diese in je 6 ml LB-Medium transferiert, welches zuvor mit 6 µl Ampicillin (100 μ g/ml) versetzt wurde. Am nächsten Tag wurden die Vorkulturen jeweils in 50 ml eines 1:1000 mit Ampicillin verdünnten LB-Mediums überführt (Herstellen der Hauptkulturen). Die Inkubation der Hauptkulturen erfolgte bei 37 °C und 180 rpm im Bakterienschüttler vom Herstellertyp New Brunswick bis ein OD₆₀₀-Wert von 0,5-0,8 erreicht wurde.

2.2.1.3. Induktion mit unterschiedlichen Bakterienstämmen

Zur Induktion der Genexpression wurde zu den Bakterien je 0,7 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) hinzugefügt und die Bakterien bei 20 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Modell von Jacob & Monod (1961) wird durch die Zugabe von IPTG die Expression des *lac*-Operons (s. Vektorkarte *pGEX-6P-2A* im Anhang) induziert, indem IPTG an den Repressor bindet und damit eine Konformationsänderung initiiert. Folglich dissoziiert der Repressor vom Operator (LacO) und das bakterielle Strukturgen LacZ des *lac*-Operons (s. Vektorkarte) kann durch die RNA-Polymerase abgelesen werden. Mit der IPTG-Substratinduktion konnte die Transkription von *gst-fh2* ausgehend vom *tac*-Promotor des *pGEX-6P-2A* – Vektors initiiert werden. Da der *pGEX-6P-2A* – Vektor im Vergleich zum allgemein bekannten *lac*-Operon kein LacY- und LacA-Gen enthält und auch keine Terminatorregion aufweist (s. Vektorkarte), wurde die Transkription nicht wie üblich nach dem *lac*-Operon, sondern erst nach der Transkription von *gst-fh2* gestoppt.

2.2.1.4. Überprüfung der Induktion mittels SDS-PAGE

Die Induktion der Genexpression wurde mittels SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) analysiert. Hierzu wurde ein 10 %iges SDS-Gel nach Laemmli (1970) hergestellt, indem zunächst das Trenngel und anschließend das Sammelgel vorbereitet wurde. Für ein Trenngel wurden 1,5 ml vom 4x Trenngelpuffer, 2,5 ml destilliertes Wasser und 2 ml Acrylamid in eine 15 ml – Eppendorf Tube pipettiert (Tab. 20). Hiernach wurden 60 μ l APS (Ammonium Persulfate) und 2,5 μ l TEMED (NNN'N'-Tetramethylethylenediamine) für den Start der Polymerisierung hinzugegeben.

Die Mischung wurde nach der Zugabe von APS und TEMED invertiert und unverzüglich zwischen zwei Glasplatten, die zuvor in einem Ständer befestigt und abgedichtet wurden, luftblasenfrei gegossen. Um das Austrocknen des Trenngels während einer Polymerisierungszeit von ca. 30 min bei Raumtemperatur zu vermeiden, wurde das Gel mit 1 ml Isopropanol beschichtet. Für das Sammelgel wurden 4 ml des 4x Sammelgelpuffers in eine 15 ml – Eppendorf Tube pipettiert. Nach der Zugabe von 40 µl APS und 5 µl TEMED (Tab. 20), wurde die Mischung invertiert und nach dem Ausschütten des Isopropanols luftblasenfrei zum polymerisierten Trenngel gegossen. Der Kamm wurde unmittelbar nach dem Einfüllen des Sammelgels luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gesteckt und das Sammelgel für 30 min bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Vor der Verwendung des SDS-Gels wurde der Kamm herausgenommen und die Probetaschen mit den Proben der Induktion beladen.

4x Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris	1,5 M
	SDS	0,4 %
4x Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris	0,5 M
	SDS	0,4%
10x SDS-Laufpuffer (pH 8,8)	Tris	0,25 M
	Glycin	1,92 M
	SDS	1 %
6x SDS-Probenpuffer	Tris (pH 6,8)	75 %
	SDS	6 %
	ß-Mercaptoethanol	6 %
	Bromphenolblau	0,18 %
4x SDS-Probenpuffer	6x SDS-Probenpuffer	6 ml
	Destilliertes Wasser	900 µ1
	Glycerin	20 %

Tab. 20: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE

Dazu wurden die Proben der Induktion (je $20 \ \mu l$) mit je $10 \ \mu l$ 4x Probenpuffer versetzt (Tab. 20). Hierunter umgab das im Probenpuffer enthaltene SDS die Proteine mit negativen
Ladungen und gewährleistete damit, dass alle Proteine zur Anode und nicht zur Kathode wanderten. Zusätzlich wurden die Proben vor der Beladung des Gels bei 95 °C für 5 min abgekocht. Durch die Hitze induzierte Denaturierung konnten molekulare Wechselwirkungen von GST-FH2 (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, Disulfidbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenbindungen), die die Sekundär- und Tertiärstruktur bestimmen, aufgehoben werden. Auf diese Weise war es möglich, die Proteine ausschließlich nach Größe und nicht nach Proteinstruktur durch die vertikale Laufrichtung zur Anode, aufzutrennen. Die Proben der Induktion wurden nach dem Abkochen und nach der Auspolymerisierung des Sammelgels in die Taschen gefüllt. Daneben wurde der HMW (high molecular weight) -Marker als Größenstandard aufgetragen. Zum Schluss wurde die Gelelektrophorese nach der Zugabe von 1:10 verdünntem Laufpuffer (Tab. 20) bei 80 V gestartet. Nach einer Einlaufzeit von ca. 20 min wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Proteine wurden für ca. 2 h aufgetrennt. Die Färbung der Gele wurde über Nacht mit der Roti®-Blue-quick Protein-Färbelösung durchgeführt.

2.2.1.5. Testen unterschiedlicher Induktionsbedingungen

Nach der Analyse der Induktion mittels SDS-PAGE wurden zusätzlich zwei unterschiedliche Induktionsbedingungen pro Bakterienstamm miteinander verglichen: Induktion bei 20 °C über Nacht und Induktion bei 37 °C für zwei Stunden. Hierzu wurde erneut eine Transformation durchgeführt und die Genexpression mit IPTG induziert (Durchführung s.o.). Die Bakterien mussten nach der Induktion bis zur weiteren Verwendung (Herstellen der Proteinlysate) bei -80 °C aufbewahrt werden, um zunächst die Expressionsbedingungen mittels SDS-PAGE zu untersuchen (Durchführung s.o.).

2.2.1.6. Herstellen der Proteinlysate

Für das Herstellen der Proteinlysate wurden zwei Bakterienstämme mit jeweils verschiedenen Induktionsbedingungen ausgewählt (*Rosetta*(*DE3*)*pLysS-E.-coli*, Induktion bei 20 °C über Nacht und *C43*(*DE*)*pLysS-E.-coli*, Induktion bei 37 °C für 2 h).

Dazu mussten die bei -80 °C gelagerten Bakterien zuerst aufgetaut und dann 15 min bei 4 °C und 4000 rpm auf einer Thermo ScientificTM Zentrifuge geerntet werden. Der zum Pellet abzugrenzende Überstand wurde verworfen und das Pellet mit je 10 ml PBS resuspendiert (Tab. 21). Die Suspension wurde in je 15 ml – Zentrifugenröhrchen umgefüllt und für 20 min erneut bei gleicher Temperatur und Umdrehungsgeschwindigkeit zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet mit je 10 ml Lysepuffer (enthielt zusätzlich Protease-Inhibitoren) durch Auf- und Abpipettieren gelöst (Tab. 21). Damit sollten die Bakterien chemisch aufgeschlossen werden. Das 3-malige, abwechselnde Sonofizieren für je 60 s mit dem Sonifier Ultraschallgerät von Branson bewirkte den mechanischen Zellaufschluss. Zur Trennung der bakteriellen Proteine von den Bakterienzelltrümmern wurden die Lysate mit der Sorvall RC-6 Plus Zentrifuge (Rotor: SS-34) bei 20.000 rpm und 4 °C für 45 min zentrifugiert. Die Filtration des entstandenen Überstands mit einem 0,45 µm – Spritzenvorsatzfilter in je ein 15 ml – Zentrifugenröhrchen ermöglichte als weiteres mechanisches Trennverfahren eine zusätzliche Reinigung.

1 v Phosphatgenufferte	NaCl	137 mM
Salzlösung (PBS)	KCl	2,7 mM
рН 7,4	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	PBS	1x
Lysepuffer pH 7,5	Glycerol	10 %
	EDTA	1mM
	DTT	1mM
	Lysozym	25 µl/20ml Puffer
	Protease-Inhibitor-Mix	500 µl/20 ml Zelllysat
Protease-Inhibitor-Mix (für 20 ml Zelllysat)	PMSF	1 mM
	DTT	1 mM
	EDTA	1 mM
	Benzamidin	0,5 mM

Tab. 21: Pufferzusammensetzung zum Herstellen der Proteinlysate

2.2.1.7. Kopplung von GST-FH2 an die GST-Beads

Während der Zentrifugation der Lysate im SS-34-Rotor wurde pro Lysat eine dreimalige Äquilibrierung von je 1 ml der 50 % Glutathion-Sepharose-*Tag-Beads* (GST-*Beads*) vorgenommen. Hierzu wurde zu den *Beads* je 1 ml Gefi-Laufpuffer pipettiert (Tab. 22) und die *Beads* wurden bei 2000 rpm und 4 °C für 5 min auf der Heraeus Tischzentrifuge zentrifugiert. Die äquilibrierten GST-*Beads* wurden mit abgeschnittener Pipettenspitze auf die filtrierten Lysate gegeben. Die Kopplung von GST-FH2 an die GST-*Beads* erforderte zusätzlich die Zugabe von einer gleichen Menge an Gefi-Laufpuffer wie die filtrierten Lysatvolumina (in diesem Fall bei 7 ml Filtrat: 7 ml Puffer). Damit war gewährleistet, dass die *Beads* während einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler IKA nicht an der Wand des Röhrchens klebten, sondern sich durchgehend in der Lysat-Lösung befanden und an das Fusionsprotein binden konnten.

Tast 221 Dasamintenstellang ats Oth Daarparters (pri	~)
HEPES	20 mM
KCl	150 mM
Glycerol	10 %
DTT	1 mM

Tab. 22: Zusammensetzung des Gefi-Laufpuffers (pH 8)

2.2.1.8. Reinigung der Beads

Nach der Inkubation wurden die mit dem Fusionsprotein gekoppelten GST-*Beads* bei 500 g und 4 °C für 5 min auf der Thermo ScientificTM Zentrifuge abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in neue 15 ml – Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C auf Eis aufbewahrt für den Fall, dass die Kopplung nicht funktioniert hatte. Zu den abzentrifugierten *Beads* wurden je 10 ml Lysepuffer hinzugegeben (Tab. 21) und die *Beads* wurden auf derselben Zentrifuge bei gleichbleibenden Einstellungen zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde zwei Mal wiederholt und die *Beads* wurden zum Schluss mit abgeschnittener Pipettenspitze in je ein 2 ml – umfassendes Reaktionsgefäß transferiert.

2.2.1.9. Elution des Fusionsproteins

Während der Reinigung der *Beads* wurde parallel der Elutionspuffer vorbereitet. Hierzu wurden 0,09 g reduziertes Glutathion mit 10 ml Lysepuffer (Tab. 21) durchmischt und der pH-Wert mit NaOH auf 8 eingestellt. Zur Elution von GST-FH2 wurde zu den GST-*Beads* je 1 ml Elutionspuffer pipettiert und die *Beads* 10 min bei Raumtemperatur und 11 rpm auf der Stuart Rotatorscheibe kopfüber rotiert. Die *Beads* wurden im Anschluss auf der Heraeus Zentrifuge bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der abzugrenzende Überstand enthielt das GST-FH2-Fusionsprotein, welches separat nach jeder Elution als Elutionsfraktion in je einer 1 ml – umfassendes Eppendorf Tube gesammelt wurde. Zur Analyse der Elutionen eignete sich die Auftrennung mittels 10 %iger SDS-PAGE. Um der Inaktivierung des Proteins vorzubeugen, erfolgte die Lagerung der Elutionen bei 4 °C auf Eis.

2.2.2. Rekombinante Expression von gst-diaph1 in BL21(DE3)pLysS-E.-coli

Für gst-*diaph1* lag ein etabliertes Expressionsprotokoll mit dem Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS-E.-coli vor, sodass unterschiedliche Bakterienstämme und Induktionsbedingungen nicht getestet werden mussten. Die Expression von *gst-diaph1* und die anschließende Elution des Fusionsproteins war bis auf die verwendeten Volumina und einigen Zentrifugen mit den Versuchsschritten von der FH2-Domäne identisch. Analog zu der Expression der *fh2*-Domäne wurde auch bei diesem Konstrukt zu Beginn eine Transformation durchgeführt (Durchführung s.o.).

2.2.2.1. Induktion der Genexpression

Für die Induktion wurden die Vorkulturen in 400 ml mit 1 mM Ampicillin (100 μ g/ml) verdünntes LB-Medium überführt (Hauptkultur). Die Bakterien wurden dann bei 37 °C und 180 rpm im Bakterienschüttler vom Herstellertyp New Brunswick inkubiert, bis ein OD₆₀₀-Wert von 0,5-0,8 erreicht wurde. Abschließend erfolgte nach der Zugabe von 0,7 mM IPTG eine Inkubation bei 20 °C über Nacht.

2.2.2.2. Herstellen der Proteinlysate

Die Bakterien wurden auf der Sorvall RC-5 Plus Zentrifuge (GSA-Rotor) für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C geerntet. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde eine Resuspension mit 20 ml kaltem PBS pro Zentrifugenröhrchen durchgeführt (s. Tab. 21). Die Suspension wurde in zwei 50 ml – Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C und 4000 rpm für 20 min auf der Thermo Scientific[™] Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde verworfen und das entstandene Zellpellet mit je 20 ml Lysepuffer gelöst (Tab. 21). Anschließend erfolgte eine dreimalige Sonifikation für je 60 s mit dem Sonifier Ultraschallgerät von Branson. Die Lysate wurden bei 20.000 rpm und 4 °C für 45 min mit der Sorvall RC-6 Plus Zentrifuge (Rotor: SS-34) zentrifugiert und der Überstand wurde mit einem 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter in je 50 ml – Zentrifugenröhrchen gefiltert.

2.2.2.3. Kopplung von GST-DIAPH1 an die GST-Beads

Die Kopplung von GST-DIAPH1 an die GST-*Beads* wurde analog zu der Kopplung von GST-FH2 an die GST-*Beads* durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.1.7.). Hier wurde jedoch bei der Zugabe des Gefi-Laufpuffers ein Volumen von 20 ml pipettiert.

2.2.2.4. Reinigung der Beads

Nach der Zentrifugation der gekoppelten GST-*Beads* bei 500 g und 4 °C für 5 min auf der Thermo Scientific[™] Zentrifuge, wurde der abzugrenzende Überstand in neue 50 ml – Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C auf Eis aufbewahrt (wichtig für den Versuch in 2.2.3.: Kopplungsvariationen von GST-DIAPH1 an die GST-*Beads*). Die weiteren Reinigungsschritte wurden analog zu der Reinigung der GST-FH2-*Beads* durchgeführt (s. 2.2.1.8.)

2.2.2.5. Elution des Fusionsproteins

Die Elution von GST-DIAPH1 war zu der Elution von GST-FH2 identisch (s. 2.2.1.9.).

2.2.2.6. Überprüfung der Induktion und Elution

Da DIAPH1 ein höheres Molekulargewicht aufweist als die FH2-Domäne, musste die Induktion der *diaph1*-Expression und die Elution des Proteins mit einem 8 %igen statt einem 10 %igen SDS-Gel überprüft werden. Hierzu wurden für das Trenngel 1,6 ml Acrylamid, 1,5 ml des 4x Trenngelpuffers und 2,9 ml destilliertes Wasser verwendet. Die Volumina für APS und TEMED und die Mengen für das Herstellen des Sammelgels blieben unverändert (Details zur Gelherstellung und Probenvorbereitung s. Abschnitt 2.2.1.4.).

2.2.3. Kopplungsvariationen von GST-DIAPH1 an die GST-Beads

Um GST-DIAPH1 von anderen Proteinen, die unspezifisch und leicht an GST-DIAPH1 gebunden hatten und folglich miteluiert wurden, zu trennen, wurden unterschiedliche Kopplungsbedingungen von GST-DIAPH1 an die GST-*Beads* getestet.

2.2.3.1. Kopplung von GST-DIAPH1 an die Beads

Hierzu wurden die zwei Überstände verwendet, die nach der ersten Zentrifugation der gekoppelten GST-*Beads* bei 4 °C aufbewahrt wurden (s. Reinigung der *Beads* in 2.2.2.4.). Diese wurden zunächst in vier 50 ml – Zentrifugenröhrchen gleichmäßig in je 20 ml aufgeteilt. Anschließend wurden zwei der Zentrifugenröhrchen mit den bereits eluierten GST-*Beads* versetzt (s. 2.2.2.5.). Zugleich wurden für die restlichen zwei Zentrifugenröhrchen je 1 ml GST-*Beads* äquilibriert (Durchführung s.o.). Nach der Zugabe der *Beads* wurden zu allen Röhrchen 20 ml Gefi-Laufpuffer (Tab. 22) pipettiert. Zwei der Zentrifugenröhrchen (eins mit bereits eluierten *Beads* und eins mit frisch äquilibrierten *Beads*), wurden zunächst bei 37 °C für 30 min im Thermo Scientific[™] Inkubator inkubiert. Die kurzfristige Hitze diente der Mobilisierung und der physikalischen Denaturierung der kleineren Proteine, sodass die meisten dieser Proteine sich von GST-DIAPH1 lösen konnten. Im Anschluss erfolgte eine zusätzliche Inkubation bei 4 °C über Nacht auf dem Überkopfschüttler IKA.

Die Inkubation der zwei restlichen Zentrifugenröhrchen, fand ausschließlich bei 4 °C über Nacht statt.

2.2.3.2. Reinigung der Beads und Elution

Am nächsten Tag erfolgte die Reinigung der *Beads* und die Elution des Proteins wie oben beschrieben (s. 2.2.2.8. und 2.2.2.9.) Zur Analyse der Elutionen wurde eine 8 %ige SDS-PAGE durchgeführt.

2.3. In-vitro-Versuche mit Mikrotubuli

Die Untersuchung der in der vorliegenden Arbeit aufgeworfenen Fragestellung erforderte die Durchführung von in-vitro-Versuchen mit drei unterschiedlichen Protein-Konstrukten: FH2-Domäne (FH2), Volllänge (DIAPH1) und Protein mit der deletierten FH2-Domäne (Δ FH2). Hierzu wurden *gst-diaph1* und *gst-fh2* bakteriell exprimiert. Das Fusionsprotein GST- Δ FH2 wurde für die Experimente zur Verfügung gestellt.

2.3.1. Messung der Mikrotubuli-Polymerisierung

Um die Messung der Mikrotubuli-Polymerisierung möglichst genau zu gestalten und Störungsanfälligkeiten aufgrund von Zeitverzögerungen durch mehrmaliges Pipettieren zu minimieren, wurde der Versuch pro Tag mit je einem Konstrukt durchgeführt. Insgesamt wurden pro Konstrukt zwei Einzelexperimente jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Vor dem Versuch wurde das zu untersuchende Protein jeweils mit dem TPB-Puffer (Tab. 23) umgepuffert und auf eine Konzentration von 5 μ g umgestellt.

PIPES	80 mM
EDTA	0,5 mM
MgCl ₂	2 mM
GTP	1 mM
Glycerin	11 %

Tab. 23: Zusammensetzung des TPB-Puffers (tubulin polymerization buffer, pH 6,9)

Für die Mikrotubuli-Polymerisierung wurden zunächst der TPB-Puffer, die Proteine (je 5 μ g GST-DIAPH1, GST-FH2 und GST- Δ FH2) und eine 96-*Well*-Platte für 10 min bei 37 °C vorgewärmt. Währenddessen wurde das zuvor bei -80 °C gelagerte Tubulin auf Eis aufgetaut. Nach dem Pipettieren von 5 μ g Protein und 50 μ g Tubulin, wurden die *Wells* auf 100 μ l mit TPB-Puffer aufgefüllt und die Messung bei 37 °C und 340 nm im Tecan Mikroplattenreader (Programm: Tecan i-control, shaking 5 s) unverzüglich gestartet.

Die Absorption des Lichts bei einer bestimmten Wellenlänge (hier 340 nm) verhält sich proportional zur Polymerisierung der Mikrotubuli (Shelanski et al. 1973). Dadurch konnte nach der Messung der resultierende Anstieg der Mikrotubuli aus dem Gleichgewicht der Polymerisierung und Depolymerisierung visualisiert werden. Die im TPB-Puffer enthaltenen Bestandteile Glycerol und GTP beschleunigten die Mikrotubuli-Polymerisierung zusätzlich. Die Messung wurde für ca. 9 h durchgeführt und die gewonnenen Daten wurden abschließend mit der Software SigmaPlot ausgewertet.

2.3.2. Herstellung von polymerisierten und Taxol-stabilisierten Mikrotubuli für die Analyse der Mikrotubuli-Struktur

Um die Struktur der Mikrotubuli im Fluoreszenzmikroskop zu untersuchen, mussten zunächst polymerisierte Mikrotubuli vorliegen, die mit einem Fluoreszenzmolekül markiert waren. Hierzu wurde zunächst ein mit Rhodamin-gelabeltes Alliquot (6,25 mg/ml) auf Eis aufgetaut und mit 0,7 µl Taxol gemischt. Nach Zugabe des Taxols (stabilisiert polymerisierte Mikrotubuli, Schiff et al. 1979) wurde das Tubulin-Taxol-Gemisch für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Parallel wurde der MT-Puffer (Zusammensetzung s. Tab. 24) vorbereitet (Tab. 25).

PIPES	80 mM
EDTA	0,5 mM
MgCl ₂	2 mM
GTP	1 mM

Tab. 24: Zusammensetzung des MT-Puffers (pH 6,9)

Tab. 25: Ansetzen des MT-Puffers

MT-Puffer (Tab. 24)	500 µl
Taxol (200 μM)	50 µ1
GTP (100 mM)	5 µl

Aus diesem Puffermix (Tab. 25) wurden $360 \,\mu$ l entnommen und in ein neues 1,5 ml – umfassendes Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach der 30-minütigen Inkubation wurde 1 μ l von dem Tubulin-Taxol-Gemisch zum 360 μ l Puffermix gegeben. Zum Schluss wurde eine Inkubation im Wasserbad bei 37 °C für 20 min durchgeführt und die polymerisierten Mikrotubuli wurden über Nacht bei Raumtemperatur gelagert.

2.3.2.1. Analyse der Mikrotubuli-Struktur mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte die Visualisierung der Mikrotubuli, indem das emittierte Licht des Fluoreszenzmarkers Rhodamin sichtbar gemacht wurde, welches durch die Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge entstand. Für dieses Experiment erfolgte zunächst eine 15-minütige Inkubation des MT – Puffers (Tab. 25), der jeweiligen Proteinkonstrukte und der oben beschriebenen hergestellten Mikrotubuli bei 37 °C in einem Wasserbad. Anschließend wurden je 10 μ l Protein und Mikrotubuli in eine 1,5 ml – Eppendorf Tube pipettiert und für 15 min bei 37 °C gemeinsam inkubiert. Zeitgleich wurde eine Kontrolle angesetzt (Mikrotubuli mit 10 μ l Puffer statt Protein) und diese ebenfalls unter denselben Bedingungen inkubiert (schematische Übersicht der Versuchsdurchführung s. Abb. 13).



Abb. 13: Analyse der Mikrotubuli-Struktur. Abgebildet ist eine Übersicht des Versuchsablaufs. Die Mikrotubuli wurden nach der Inkubation mit den jeweiligen Proteinkonstrukten mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert.

Jessica Ecem Nojszewski | Institut für Biochemie & Signaltransduktion | UKE

Für die Mikroskopie wurde in ein mit Polylysin beschichtetes 8-*well-plate* auf jedes *Well* 10 µl vom inkubierten Mikrotubuli-Protein-Gemisch bzw. Mikrotubuli-Puffermix platziert. Die Mikrotubuli wurden abschließend im Keyence-Mikroskop bei 60-facher Vergrößerung (Fluoreszenzkanal: CH2 (Fluorescense Cherry)) im BZ Viewer analysiert und mit den Programmen BZ Analyzer und ImageJ ausgewertet.

2.3.2.2. Analyse der Mikrotubuli-Struktur mittels Fluoreszenzmikroskopie bei cold-induced-depolymerization

Bartolini et al. (2008) beobachteten, dass die FH1FH2-Domäne von mDia2 (DIAPH3) die Mikrotubuli gegen die *cold-induced-depolymerization* schützt. Um diesen Effekt auch für DIAPH1, FH2 und Δ FH2 zu untersuchen, erfolgte zunächst eine 15-minütige Vorinkubation der Proteinkonstrukte, des MT-Puffers und der in 2.3.2. beschriebenen hergestellten Mikrotubuli bei 37 °C in einem Wasserbad. Hiernach wurden je 10 µl Protein und Mikrotubuli in ein 1,5 ml – Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Damit sollte die Bindung der Proteine an Mikrotubuli ermöglicht werden. Zeitgleich wurde in einem separaten 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß eine Kontrolle angesetzt (Mikrotubuli mit 10 µl Puffer statt Protein) und diese ebenfalls unter denselben Bedingungen inkubiert. Für die *cold-induced-depolymerization* erfolgte eine Inkubation bei 4 °C für 20 min. Hierunter wurde, durch die Kälte, die Depolymerisierung der Mikrotubuli induziert. Während der 20-minütigen Inkubationszeit wurden die Ansätze alle 5 min für 10 sec gevortext, um die Mikrotubuli zusätzlich mechanisch zu zerlegen (zur Visualisierung des Versuchsablaufs s. Abb. 14). Die Effekte auf die Mikrotubuli wurden analog zu 2.3.2.1. mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert und ausgewertet.



Abb. 14: Analyse der Mikrotubuli-Struktur bei *cold-induced-depolymerization*. Abgebildet ist eine Übersicht des Versuchsablaufs. Die Mikrotubuli mit den jeweiligen Proteinkonstrukten wurden nach Inkubation bei Raumtemperatur zusätzlich bei 4 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen gevortext. Nach der Kälte-induzierten Depolymerisierung wurden die Mikrotubuli mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert.

2.4. Statistische Analyse

Die Kontrollen wurden immer als 100 % gesetzt und die Werte normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurde der *t*-test für ungepaarte Proben mit der Software SigmaPlot verwendet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angenommen und mit * gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war herauszufinden, inwieweit autoinhibiertes DIAPH1 mit Mikrotubuli interagiert und ob in DIAPH1 eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne existiert. Um die notwendigen in-vitro-Versuche zur Beantwortung dieser Fragestellung durchzuführen, wurden drei Proteinkonstrukte verwendet (s. Abb. 15).



Abb. 15: DIAPH1 (Volllänge), FH2-Domäne und Protein mit deletierter FH2-Domäne (Δ FH2). Die autoinhibitorischen Domänen (DID und DAD) sind blau hervorgehoben und die FH2-Domäne ist grün von den anderen Domänen abgegrenzt. In Δ FH2 ist die DAD-Domäne neben der FH1-Domäne lokalisiert. Abkürzungen: GBD – GTPase-binding domain, DID – Diaphanous inhibitory domain, DD – Dimerization domain, CC – Coiled-coil domain, FH1- und FH2 – Formin homology 1- and 2 - domain, DAD – Diaphanous autoregulatory domain

Diese Konstrukte mussten zunächst kloniert und anschließend bakteriell exprimiert werden (Das Fusionsgen *gst-diaph1* und das Δ FH2-Protein wurde von Shumin Miao zur Verfügung gestellt). Nach der Expression wurde die Mikrotubuli-Polymerisierung in Anwesenheit der drei verschiedenen Proteine gemessen und die Effekte dieser Proteine auf die Struktur der Mikrotubuli wurden per Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Analyse der Mikrotubuli-Struktur erfolgte zusätzlich auch bei *cold-induced-depolymerization*.

3.1. Klonierung

3.1.1. Amplifikation der *fh2*-Domäne durch PCR und Klonierung in den *pGEM*[®]-*T easy* – Vektor

Zu Beginn der Klonierung mussten die Restriktionsschnittstellen XhoI und NotI in die *fh2*-Domäne eingefügt und die *fh2*-Domäne vervielfältigt werden. Hierzu wurde eine PCR durchgeführt und die amplifizierte DNA zur Kontrolle mit der Agarose-Gelelektrophorese visualisiert.

In Abb. 16, A ist das Ergebnis der Amplifikation dargestellt: Die Bande der amplifizierten *fh2*-Domäne ist zwischen 1000 und 1500 bp (Basenpaare) lokalisiert. Diese Position passte zu der tatsächlichen Länge der *fh2*-Domäne (1317 Basenpaare) und bewies die gelungene Amplifikation des Transgens mittels PCR.



Abb. 16: A) Vervielfältigung der *fh2*-Domäne. Die amplifizierte DNA wurde neben dem Marker auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die vervielfältigte *fh2*-Domäne befindet sich zwischen 1000- und 1500 bp. Diese Position entspricht der erwarteten Länge der *fh2*-Domäne (1317 bp). B) Analytischer Verdau zum Überprüfen der Zwischenklonierung. Die Restriktionsenzyme XhoI und NotI konnten bei den Klonen 1 und 3 die *fh2*-Domäne aus dem $pGEM^{\circledast}$ - *easy* – Vektor (3015 bp) entfernen. Dies beweist den Einbau der Restriktionschnittsstellen in die *fh2*-Domäne, die erfolgreiche Insertion der *fh2*-Domäne in den Vektor und das Aufnehmen der Plasmid-DNA in die Bakterien. Bei Klon 2 hatte der analytische Verdau nicht funktioniert. Abkürzungen: bp = Basenpaare, M = Marker, f = fh2-Domäne, V₁ = Vektor 1 (*pGEM*[®] - *easy*), 1 = Klon 1, 2 = Klon 2, 3 = Klon 3

Die vervielfältigte fh2-Domäne wurde daraufhin in den $pGEM^{\otimes}$ -T easy-Vektor zwischenkloniert.

Um den Erfolg der Zwischenklonierung zu überprüfen, wurde ein analytischer Verdau für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Hierzu wurden die Restriktionsenzyme XhoI und NotI verwendet, die auch für das Einfügen der Restriktionsschnittstellen in die *fh2*-Domäne genutzt wurden (s.o.).

Abb. 16, B zeigt das Ergebnis des analytischen Verdau: Bei zwei Klonen (1 und 3) sind jeweils zwei getrennte DNA-Banden mit unterschiedlicher Länge zu erkennen. Die untere Bande entspricht der *fh2*-Domäne (1317 bp) und die obere Bande dem $pGEM^{\textcircled{0}}$ -*T easy* – Vektor (3015 bp). Dieses Ergebnis zeigt, dass nach der Zugabe der Restriktionsenzyme zur Plasmid-DNA, die *fh2*-Domäne aus dem $pGEM^{\textcircled{0}}$ -*T easy* – Vektor herausgeschnitten wurde. Daher ist davon auszugehen, dass bei diesen Klonen die Restriktionsschnittstellen zu Beginn der Klonierung korrekt eingefügt worden sind, die *fh2*-Domäne in den Zwischenvektor ligiert wurde und die Plasmid-DNA in die Bakterien aufgenommen wurde (gelungene Transformation). Beim 2. Klon ist die Bande der *fh2*-Domäne nicht abgebildet. Die fehlende *fh2*-Domäne bei diesem Klon zeigt, dass Pipettierfehler bei Zugabe der Restriktionsenzyme gemacht wurden und/oder die Ligation der Domäne in den Vektor nicht gelungen ist.

Um mögliche Punktmutationen in der DNA-Sequenz der eingebauten fh2-Domäne auszuschließen, wurden die Klone 1 und 3 sequenziert. Hierzu wurden zur Plasmid-DNA die $pGEM^{\circledast}$ -T easy – spezifischen Primer T7 und SP6 durch das Sequenzierungslabor hinzugegeben. Die Sequenzen der Klone wurden mit der Software SnapGene dargestellt und mit der Datenbank BLAST auf Vollständigkeit überprüft, indem sie mit der Originalsequenz der fh2-Domäne verglichen wurden. Der Klon weist 1317 bp auf (s. Anhang 7.5., untere Reihen in blauer Schrift), die mit den Basenpaaren des Originals (obere Reihen in roter Schrift) identisch sind. Daraus geht hervor, dass die fh2-Domäne vollständig und fehlerfrei in den Zwischenvektor kloniert wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zu Beginn der Klonierung die Restriktionsschnittstellen XhoI und NotI in die *fh2*-Domäne korrekt eingefügt wurden und die Zwischenklonierung bei den Klonen 1 und 3 funktioniert hat.

3.1.2. Klonierung der fh2-Domäne in den Zielvektor

Um die Komponenten für die Klonierung in den Zielvektor (*fh2*-Domäne und pGEX-6P-2A) bereitzustellen, wurde ein präparativer Verdau durchgeführt. Hierzu wurden zum Klon 1 (s. Abb. 16, B) und dem Zielvektor pGEX-6P-2A jeweils die Restriktionsenzyme XhoI und NotI hinzugegeben. Beide Ansätze wurden für 3 h bei 37°C inkubiert und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Ziel war es, die Banden des pGEX-6P-2A und der *fh2*-Domäne von den Banden des $pGEM^{\ensuremath{\mathbb{R}}}$ -T easy – Vektors und *itpka* (Gen, welches für das Aktin-Bindeprotein ITPKA kodiert) zu isolieren.

Abb. 17, A zeigt die Auftrennung der *fh2*-Domäne und des *pGEM*[®]-*T easy* – Vektors in Spur 1 und von *itpka* und des Zielvektors *pGEX-6P-2A* in Spur 2.



Abb. 17: A) Präparativer Verdau des $pGEM^{\circledast}$ -T easy – Vektors mit der fh2-Domäne und des Zielvektors mit *itpka*. Durch die Restriktionsenzyme XhoI und NotI konnte die fh2-Domäne aus dem $pGEM^{\circledast}$ -T easy – Vektor und *iptka* aus dem pGEX-6P-2A – Vektor (4985 bp) entfernt werden. Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA mithilfe der Gelelektrophorese. B) Herausgeschnittene Banden (fh2-Domäne und Zielvektor) nach der Auftrennung im Agarose-Gel. Die fh2-Domäne und der Zielvektor wurden nach der Gelelektrophorese mithilfe eines Skalpells herausgeschnitten. Auf dem Gel sind folglich nur noch der $pGEM^{\circledast}$ - easy – Vektor und *itpka* zu erkennen. Abkürzungen: bp = Basenpaare, M = Marker, f = fh2-Domäne, V_1 = Vektor 1 ($pGEM^{\circledast}$ - easy), V_2 = Vektor 2 (pGEX-6P-2A), 1 = Spur 1 mit $pGEM^{\circledast}$ - easy und fh2-Domäne, 2 = Spur 2 mit Zielvektor pGEX-6P-2A und iptka

Die Banden des $pGEM^{\otimes}$ -*T* easy – Vektors und der *fh2*-Domäne sind wie beim analytischen Verdau korrekt aufgetrennt.

Jessica Ecem Nojszewski | Institut für Biochemie & Signaltransduktion | UKE

Der Zielvektor befindet sich an der Position zwischen 4000 und 5000 bp. Diese Lokalisation entspricht der tatsächlichen Größe von pGEX-6P-2A (4985 bp). Daraus ergibt sich, dass der präparative Verdau funktioniert hat und die gewünschten Banden durch die Zugabe der Restriktionsenzyme und der nachfolgenden Gelelektrophorese isoliert wurden. Für die Ligation der *fh2*-Domäne in den Zielvektor wurden die Banden der *fh2*-Domäne und des Zielvektors mithilfe eines Skalpells herausgeschnitten (s. Abb. 17, B). Folglich sind diese Banden auf dem Gel nicht mehr abgebildet. Die Bande der *fh2*-Domäne und des *pGEX-6P-2A* – Vektors wurden aus dem Gel extrahiert und die *fh2*-Domäne wurde in den Zielvektor ligiert.

Um den Erfolg der Klonierung in den Zielvektor zu überprüfen, wurde ein analytischer Verdau für 1 h bei 37 °C durchgeführt.

Abb. 18 bestätigt, dass der analytische Verdau bei einem Klon (Klon 1) funktioniert hatte.



Abb. 18: Analytischer Verdau zur Kontrolle der Klonierung in den Zielvektor. Beim 1. Klon ist die Auftrennung der *fh2*-Domäne und des Zielvektors zu sehen. Analog zum analytischen Verdau in der Zwischenklonierung ist auch in Klon 1 das Herausschneiden der *fh2*-Domäne aus dem Vektor mithilfe der Restriktionsenzyme XhoI und NotI gelungen (Banden des Zielvektors und der *fh2*-Domäne auf erwarteter Höhe). Bei den Klonen 2,3 und 4 hat der analytische Verdau nicht funktioniert. Abkürzungen: bp = Basenpaare, M = Marker, f = fh2-Domäne, V₂ = Vektor 2 (*pGEX-6P-2A*), 1 = Klon 1, 2 = Klon 2, 3 = Klon 3, 4 = Klon 4

Durch die Zugabe der Restriktionsenzyme XhoI und NotI wurde die *fh2*-Domäne aus dem Zielvektor herausgeschnitten und die DNA-Fragmente wurden im Agarose-Gel nach der Größe aufgetrennt. Hieraus ergibt sich, analog zur Zwischenklonierung, dass die *fh2*-Domäne in den Zielvektor ligiert worden ist und die darauffolgende Transformation gelungen ist. In Klon 2,3 und 4 hingegen hat der analytische Verdau nicht funktioniert.

Das Fehlen der *fh2*-Bande in diesen Klonen lässt sich auf die nicht korrekte Ligation der *fh2*-Domäne in den Zielvektor oder auf mögliche Pipettierfehler bei Zugabe der Restriktionsenzyme zurückführen.

Um Rasterschubmutationen und andere Fehler in der Gensequenz auszuschließen, wurde vom ersten Klon eine Sequenzierung durchgeführt. Hierzu wurden Primer entworfen, die vor und nach der *gst*-PreScission-Stelle binden, um den Sequenzübergang von *gst* zur *fh2*-Domäne zu überprüfen (Bindestellen und Sequenzen s. Anhang). Analog zu der Zwischenklonierung stimmt die sequenzierte DNA des Klons mit den Originalsequenzen des pGEX-6P-2A – Vektors und der *fh2*-Domäne überein und es sind keine Punktmutationen vorhanden (s. Anhang, 7.6.).

Das Vorliegen von Rasterschubmutationen ist mit dem Ergebnis von BLAST nicht beurteilbar. Um diese auszuschließen, wurde die verglichene Sequenz zusätzlich mit der Software SnapGene analysiert. Hierzu wurden die Software-internen Funktionen genutzt (Erkennen von Vektor-spezifischen Sequenzen, Darstellen der Aminosäuresequenz).

In Abb. 19 ist ein Ausschnitt der auf SnapGene eingegebenen Gensequenz gezeigt. Die fh2-Domäne befindet sich in "frame" (s. rote Umrandung). Daraus ergibt sich, dass die Aminosäuresequenz des Klons mit der Originalaminosäuresequenz der fh2-Domäne übereinstimmt und es sich um das gleiche Protein mit derselben Primärstruktur handelt.



Abb. 19: Analyse der Gensequenz von Klon 1 auf SnapGene. Der Übergang von *gst* zur *fh2*-Domäne des ersten Klons wurde mithilfe von SnapGene kontrolliert. Die *fh2*-Domäne ist in dieser Abbildung nach der Restriktionsschnittstelle XhoI lokalisiert und ist leicht an der prolinreichen Aminosäuresequenz ab dem Startcodon ATG (Met) zu erkennen. Die Basen Adenin und Thymin zwischen XhoI und der *fh2*-Domäne wurden zu Beginn der Klonierung beim Primer-Entwurf fürs PCR eingefügt, um eine Verschiebung des Leserasters zu vermeiden. Die Domäne befindet sich in "frame". Damit ist eine Verschiebung des Leserasters ausgeschlossen. Abkürzungen und Beschreibungen: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, Abkürzungen der Aminosäuren = s. Liste im Anhang, grüne Schrift = *fh2*-Domäne (1317 bp)

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Klonierung in den Zielvektor bei einem Klon sicher funktioniert hat. Dieser Klon wurde dementsprechend für die Expression der *fh2*-Domäne verwendet, da in den anderen Klonen die Bande der *fh2*-Domäne nach dem analytischen Verdau nicht vorzufinden war und diese Klone folglich nicht sequenziert wurden.

3.2. Bakterielle Expression der Konstrukte (*fh2*-Domäne und *diaph1*)

3.2.1. Rekombinante Expression von gst-fh2

3.2.1.1. Induktion mit unterschiedlichen Bakterienstämmen

Für die rekombinante Expression von *gst-fh2* wurden vier verschiedene Bakterienstämme (*BL21(DE3)pLysS-E. -coli, C41(DE3)pLysS-E. -coli, C43(DE3)pLysS-E. -coli* und *Rosetta(DE3)pLysS-E. -coli*) getestet, weil für die Expression der *fh2-*Domäne noch kein etabliertes Protokoll vorlag. Hierzu wurde, angelehnt an das Expressionsprotokoll von *gst-diaph1*, die Genexpression von *gst-fh2* mit IPTG über Nacht bei 20 °C induziert und die Induktion mittels SDS-PAGE analysiert.

Abb. 20 zeigt das Ergebnis der Induktion von *gst-fh2* bei den verschiedenen Bakterienstämmen.



Abb. 20: Induktion der Genexpression bei vier verschiedenen Bakterienstämmen. A) Vor Induktion (-IPTG). Die Proben der Hauptkulturen wurden vor der Induktion auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Bande von GST-FH2 ist auf dem Gel nicht vorhanden, da die Expression des Konstrukts mit IPTG zu diesem Zeitpunkt noch nicht induziert war. B) Nach Induktion (+IPTG). Nach der Induktion wurden die Proben mithilfe eines SDS-Gels analysiert. Die Banden von GST-FH2 wurden nach der Induktion bei ca. 76 kDa deutlich sichtbar. Die Genexpression von GST-FH2 wurde erfolgreich induziert und war bei allen verwendeten Bakterienstämmen gleich gut. Abkürzungen: kDa = Kilodalton (= 1000 Da), 1 = Spur 1 (*BL21*), 2 = Spur 2 (*C41*), 3 = Spur 3 (*C43*), 4 = Spur 4 (*Rosetta*).

Auf dem SDS-Gel ist nach der Induktion bei jedem Bakterienstamm eine starke Bande bei ca. 76 kDa erkennbar (Vgl. Spur 1, 2, 3 und 4 in A und B). Diese Banden stimmen mit dem tatsächlichen Molekulargewicht des GST-FH2-Fusionsproteins überein (FH2-Domäne: ca. 50 kDa, GST-Protein: ca. 26 kDa) und sind auf die gelungene Induktion der Genexpression zurückzuführen. Bei genauerer Betrachtung des Gels in Abb. 20, B ließ sich nach der Induktion zwischen den einzelnen Bakterienstämmen kein signifikanter Unterschied feststellen (Spur 1, 2, 3 und 4 nach Induktion). Dies deutet darauf hin, dass die Induktion bei allen Bakterienstämmen gleich gut war.

Insgesamt zeigt die Beurteilung des SDS-Gels, dass das Expressionskonstrukt mit allen vier verwendeten Bakterienstämmen exprimiert werden kann.

3.2.1.2. Testen unterschiedlicher Induktionsbedingungen

Um noch bessere Ergebnisse bei der Induktion zu erzielen und ggf. die lange Induktionszeit zu verkürzen, wurden zusätzlich zwei unterschiedliche Induktionsbedingungen pro Bakterienstamm miteinander verglichen: Induktion bei 20 °C über Nacht und Induktion bei 37 °C für 2 h. Dazu wurde die Genexpression ebenfalls mit IPTG induziert und die Induktionsbedingungen mit einem SDS-Gel untersucht (s. Abb. 21).

Bei der Betrachtung der Gele fällt auf, dass nach der Induktion bei beiden Induktionsbedingungen stark ausgeprägte Banden auf einer Markierungshöhe von ca. 76 kDa sichtbar sind (Abb. 21, B: Spur 1, 2, 3 und 4 bei 37 °C und bei 20 °C). Diese Banden entsprechen dem tatsächlich erwarteten Molekulargewicht des GST-FH2-Fusionsproteins. Der Vergleich zwischen den Gelen von vor- und nach der Induktion bestätigt, dass die Induktion bei beiden Bedingungen funktioniert hat. Bei genauerer Analyse des Gels ließen sich Unterschiede bezüglich der Stärke der Induktionsbanden feststellen: Die am stärksten ausgeprägten Proteinbanden sind in Spur 3 und 4 bei 37 °C und in Spur 4 bei 20 °C abgebildet (s. Abb. 21, B). Daraus ergibt sich, dass gst-fh2 mit C43 und Rosetta bei 37 °C für 2 h (Spur 3 und 4) und mit Rosetta bei 20 °C über Nacht (Spur 4) am besten exprimiert wurde.



Abb. 21: A) Vor Induktion (-IPTG). Die Proben der Hauptkulturen wurden vor der Induktion auf ein SDS-Gel aufgetragen, um die Induktionsbedingungen (2 Stunden bei 37 °C und über Nacht bei 20 °C) bei den vier Bakterienstämmen nach der Induktion miteinander vergleichen zu können. B) Nach Induktion (+IPTG). Die Proben nach der Induktion wurden mithilfe des SDS-PAGE untersucht. Die auffälligsten Induktionsbanden zeigen sich bei 37 °C mit den Bakterienstämmen *C43* und *Rosetta* und bei 20 °C über Nacht mit dem Bakterienstamm *Rosetta*. Die Proben der umrandeten Spur 3 bei 37 °C und Spur 4 bei 20 °C wurden im Anschluss zum Herstellen der Proteinlysate ausgewählt. Abkürzungen: kDa = Kilodalton, ü. N. = über Nacht, 1 = Spur 1 (*BL21*), 2 = Spur 2 (*C41*), 3 = Spur 3 (*C43*), 4 = Spur 4 (*Rosetta*).

3.2.1.3. Elution des Fusionsproteins

Basierend auf den Ergebnissen aus Abschnitt 3.2.1.2. wurden zwei verschiedene Bakterienstämme mit jeweils unterschiedlichen Induktionsbedingungen zum Herstellen der Proteinlysate ausgewählt: *C43* (Induktionsbedingung: 37 °C für 2 h) und *Rosetta* (Induktionsbedingung: 20 °C über Nacht). Für die abschließende Elution des Fusionsproteins wurden die mit GST-FH2 gekoppelten GST-*Beads* nach Zugabe des Elutionspuffers zwei Mal jeweils 10 min bei Raumtemperatur und 11 rpm kopfüber rotiert und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der abzugrenzende Überstand enthielt das GST-FH2-Fusionsprotein, welches separat nach jeder Elution als Elutionsfraktion gesammelt und mithilfe eines SDS-Gels analysiert wurde.

In Abb. 22 ist das Ergebnis der Elutionen dargestellt. Bei der ersten und zweiten Elution (A und B) zeigen sich in Spur 4 auffällig kräftige Banden, die auf Höhe der 76 kDa – Markierung lokalisiert sind.

Diese Banden entsprechen dem Fusionsprotein GST-FH2 und bestätigen damit die erfolgreiche Elution. Im Vergleich dazu, resultierte die Elution von GST-FH2 in Spur 3 zu einer wesentlich geringeren Proteinausbeute (s. A und B). Daraus lässt sich ableiten, dass die Elution des Fusionsproteins mit *Rosetta* bei einer Induktion von 20 °C über Nacht am besten war.



Abb. 22: Elution von GST-FH2. A) 1.Elution. Die Elution von GST-FH2 (s. 76 kDa-Bande) war bei Rosetta mit der Induktionsbedingung 20 °C über Nacht im Vergleich zu der Elution bei C43 am besten. B) 2.Elution. Die Bandenintensität nahm bei der zweiten Elution ab. Auch hier ist der deutliche Unterschied zwischen der Elution in Spur 3 und 4 zu erkennen. Abkürzungen: kDa = Kilodalton, 3 = Spur 3 (C43), 4 = Spur 4(Rosetta).

Die Ergebnisse der rekombinanten Expression von gst-fh2 lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: 1) Die Genexpression kann mit allen Bakterienstämmen induziert werden. 2) Die beste Bedingung für die Induktion ist bei 37 °C für 2 h mit dem Bakterienstamm C43(DE3)pLysS-E. -coli und Rosetta(DE3)pLysS-E. -coli und bei 20 °C über Nacht mit Rosetta(DE3)pLysS-E. -coli. 3) Die Elution von GST-FH2 erfolgt mit Rosetta(DE3)pLysS-E. -coli bei einer Induktion von 20 °C über Nacht am besten. Daraus dass Rosetta(DE3)pLysS-E. -coli ergibt sich, höchstwahrscheinlich der beste Bakterienstamm und 20 °C über Nacht die beste Induktionsbedingung ist.

3.2.2. Rekombinante Expression von gst-diaph1 in BL21(DE3)pLysS-E. -coli

Für *gst-diaph1* lag ein etabliertes Expressionsprotokoll vor, sodass unterschiedliche Bakterienstämme und Expressionsbedingungen nicht untersucht werden mussten. Die Expression dieses Konstrukts erfolgte bei 20 °C über Nacht mit dem Bakterienstamm *BL21(DE3)pLysS-E. -coli*. Hierzu wurde die Genexpression mit IPTG induziert. Nach der Kopplung von GST-DIAPH1 an die GST-*Beads* wurde das Fusionsprotein analog zu GST-FH2 durch die Zugabe von Elutionspuffer eluiert.

Abb. 23 zeigt das Ergebnis der Elution auf einem SDS-Gel. DIAPH1 weist ein Molekulargewicht von ca. 140 kDa auf. Das Fusionsprotein ist dementsprechend erwartungsgemäß bei ca. 170 kDa zu erkennen (genauer: 166 kDa). Die Banden der Elutionen (E1 und E2) zeigen, dass das Protein erfolgreich eluiert wurde. Da die Elution des Fusionsproteins die Genexpression voraussetzt, ist mit diesem Ergebnis dementsprechend auch die gelungene Induktion bewiesen.



Abb. 23: Elution der Volllänge (DIAPH1). Nach der Elution wurden die Proben der Elution auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die gelungene Elution von GST-DIAPH1 ist in beiden Elutionsfraktionen (E1 und E2) auf erwarteter Bandenhöhe (ca. 170 kDa) erkennbar. Damit konnte die Induktion der Volllänge ebenfalls bestätigt werden. Abkürzungen: kDa = Kilodalton, E1 = 1. Elution, E2 = 2. Elution

Zusammengefasst geht aus der Analyse des SDS-Gels hervor, dass die Expression von *gst-diaph1* erfolgreich induziert wurde und die Elution des Fusionsproteins gelungen ist.

3.2.3. Kopplungsvariationen von GST-DIAPH1 an die GST-Beads

Im Vergleich zu den Elutionen von GST-FH2 (Abb. 22) wiesen die Elutionen von GST-DIAPH1 zahlreiche zusätzliche Proteinbanden auf (s. Abb. 23: Spur E1, E2). Demzufolge ist es denkbar, dass GST-DIAPH1 unspezifisch an kleinere Proteine gebunden hatte und diese folglich miteluiert wurden. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Kopplungsbedingungen von GST-DIAPH1 an die GST-Beads getestet mit dem Ziel, kleinere Proteine von GST-DIAPH1 so gut wie möglich zu trennen und reinere Elutionen zu erhalten. Hierzu wurden die Überstände verwendet, die nach der Zentrifugation der gekoppelten GST-Beads bei 4 °C aufbewahrt wurden (s. Materialien und Methoden, Abschnitt 2.2.2.4: Reinigung der Beads). Diese wurden in vier neue 50 ml Zentrifugenröhrchen gleichmäßig aufgeteilt. Zwei dieser Röhrchen wurden mit bereits eluierten Beads versetzt, während zu den anderen beiden frisch äquilibrierte Beads hinzugegeben wurden. Je ein Zentrifugenröhrchen mit bereits eluierten Beads und mit frisch äquilibrierten Beads wurde zunächst bei 37 °C für 30 min und anschließend bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Inkubation der zwei restlichen Zentrifugenröhrchen fand ausschließlich bei 4 °C über Nacht statt. Am nächsten Tag erfolgte die Elution des Fusionsproteins und die Analyse der Elutionen auf einem SDS-Gel.

In Abb. 24 ist das Ergebnis der unterschiedlichen Kopplungsbedingungen abgebildet:



Abb. 24: Unterschiedliche Kopplungsbedingungen von GST-DIAPH1 an die GST-Beads. Durch die zusätzliche Inkubation bei 37 °C für 30 min, sind auf dem Gel reinere Proteinbanden erkennbar. Das beste Ergebnis der Reinigung wurde mit den bereits eluierten *Beads* erzielt (Spur A). Abkürzungen: kDa = Kilodalton, A = Inkubation bei 37 °C für 30 min und anschließend bei 4 °C mit bereits eluierten *Beads*, B = Inkubation bei ausschließlich 4 °C mit bereits eluierten *Beads*, C = Inkubation bei 37 °C für 30 min und anschließend bei 4 °C mit frisch äquilibrierten *Beads*, D = Inkubation bei ausschließlich 4 °C mit frisch äquilibrierten *Beads* Das Gel zeigt, dass mit der zusätzlichen Inkubation bei 37 °C für 30 min eine wesentliche Reinigung der Fusionsproteine erreicht wurde (Spur A und C), während eine Inkubation ausschließlich bei 4 °C keine signifikanten Verbesserungen bewirkte (Spur B und D). Die sauberste Elution ist in Spur A abgebildet. Daraus ergibt sich, dass die Kopplung von GST-DIAPH1 an die bereits eluierten *Beads* bei 37 °C für 30 min und im Anschluss bei 4 °C über Nacht die beste Bedingung ist. Durch dieses Ergebnis konnte gezeigt werden, dass die Temperatur einen ausschlaggebenden Effekt hatte. Die Inkubation bei 37 °C trug wesentlich zu einer sauberen Elutionsfraktion bei, da die meisten kleineren Proteine sowohl im Überstand als auch am GST-DIAPH1 an den *Beads* durch die Hitze denaturiert wurden. In Spur B und D zeigte sich dieser gewünschte Effekt eher gering. Dies ist mit der niedrigen Proteindynamik bei 4 °C zu begründen, sodass die Proteine sich von GST-DIAPH1 unzureichend mobilisieren ließen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Expression von *gst-diaph1*, dass die Induktion mit dem Bakterienstamm *BL21(DE3)pLysS-E. -coli* erfolgreich ist. Darüber hinaus lassen sich durch Kopplungsvariationen von GST-DIAPH1 an die GST-*Beads* reinere Elutionsfraktionen gewinnen. Die Kopplung von GST-DIAPH1 an die bereits eluierten *Beads* bei 37 °C für 30 min und anschließend bei 4 °C über Nacht stellt sich dabei als die beste Bedingung heraus. Die Grundlage hierfür bildet die Thermodynamik.

3.3. In-vitro-Versuche mit Mikrotubuli

3.3.1. Effekt von DIAPH1, FH2 und AFH2 auf die Mikrotubuli-Polymerisierung

Um zu untersuchen, inwieweit die Dynamik der Mikrotubuli in Gegenwart der FH2-Domäne, der Volllänge (DIAPH1) und des Δ FH2-Proteins beeinflusst wird, wurde die Mikrotubuli-Polymerisierung analysiert. Hierzu wurden nicht gelabelte und nicht Taxol-stabilisierte Mikrotubuli verwendet und die Absorption bei 340 nm für 9 h im Tecan Reader gemessen. Die Durchführung dieses Versuchs orientierte sich an Shelanski et al. (1973), bei dem die Absorption sich proportional zur Polymerisierung der Mikrotubuli verhält. Auf diese Weise war es möglich, den aus dem dynamischen Gleichgewicht zwischen Polymerisierung und Depolymerisierung resultierenden Anstieg der Mikrotubuli zu veranschaulichen.

Abb. 25 zeigt den Effekt der einzelnen Proteinkonstrukte auf die Polymerisierung der Mikrotubuli:



Abb. 25: Messung der Mikrotubuli-Polymerisierung in Gegenwart von DIAPH1, FH2 und Δ FH2. Abgebildet sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten jeweils mit Duplikaten. Die Steigung (m) der einzelnen Kurven wurde ermittelt: $m_{Kontrolle} = 0,005$, $m_{DIAPH1} = 0,005$, $m_{FH2} = 0,009$, $m_{dFH2} = 0,004$. Von allen Konstrukten weist die FH2-Domäne im Vergleich zu der Kontrolle die höchste Steigung auf. Abkürzungen: 1 = Kontrolle, 2 = DIAPH1 (Volllänge), 3 = FH2-Domäne, 4 = Δ FH2 (dFH2)

In Gegenwart der FH2-Domäne stieg die Polymerisierung der Mikrotubuli ca. um das 2-fache an (s. Kurve 3). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die FH2-Domäne wesentlich zur Polymerisierung der Mikrotubuli beiträgt (das Gleichgewicht liegt auf der Seite der Polymerisierung). Damit ist anzunehmen, dass die Bindung von DIAPH1 an Mikrotubuli durch die FH2-Domäne vermittelt wird. Im Vergleich dazu. wurde die Mikrotubuli-Polymerisierung in Anwesenheit von DIAPH1 und Δ FH2 nicht beeinflusst (Abb. 25, vgl. Steigungen der Kurven). Daraus ergibt sich, dass DIAPH1 und Δ FH2 in autoinhibiertem Zustand keinen Effekt auf die Polymerisierung der Mikrotubuli ausüben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter dem Einfluss der FH2-Domäne die Polymerisierung der Mikrotubuli um das Doppelte gesteigert werden kann. DIAPH1 und das Δ FH2-Protein üben hingegen keinen Effekt auf die Mikrotubuli-Polymerisierung aus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindung von DIAPH1 an Mikrotubuli über die FH2-Domäne erfolgt.

3.3.2. Effekte von DIAPH1, FH2 und AFH2 auf die Struktur der Mikrotubuli

Zur Bestimmung, ob die Proteinkonstrukte sich nicht nur auf die Polymerisierung, sondern auch tatsächlich auf die Morphologie der Mikrotubuli auswirken, wurden die Mikrotubuli in Anwesenheit der drei Konstrukte mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Hierzu wurden Rhodamin-markierte und Taxol-stabilisierte Mikrotubuli verwendet. Für den Versuch wurden die Proteinkonstrukte, Mikrotubuli und der MT-Puffer zunächst separat bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Mikrotubuli mit den jeweiligen Proteinkonstrukten versetzt und es wurde parallel eine Kontrolle (Mikrotubuli mit MT-Puffer) vorbereitet (Übersicht des Versuchsablaufs s. Abb. 13). Zur Auswertung wurde mithilfe der Software ImageJ die Dichte bestimmt und die Länge der Mikrotubuli mit dem Programm BZ Analyzer gemessen.

In Abb. 26 ist die Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt: Die Inkubation der Mikrotubuli mit der FH2-Domäne hatte eine signifikante Zunahme der Dichte (ca. die doppelte Menge an Mikrotubuli im Vergleich zur Kontrolle) verursacht (vgl. Säule 1 und 3 in A).



Abb. 26: Einfluss der Proteinkonstrukte auf die Mikrotubuli-Struktur. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. A) Dichte der Mikrotubuli. Mikrotubuli wurden von 20 Bildern je Konstrukt mit ImageJ verblindet ausgezählt und anschließend normiert. B) Länge der Mikrotubuli. Die Länge wurde von 4 Bildern pro Konstrukt mit dem Programm BZ Analyzer verblindet gemessen und normiert. Abkürzungen: 1 = Kontrolle, 2 = DIAPH1 (Volllänge), 3 = FH2-Domäne, 4 = Δ FH2 (dFH2), * = p < 0,005, ** = p < 0,005.

Jessica Ecem Nojszewski | Institut für Biochemie & Signaltransduktion | UKE

Zusätzlich verkürzte die Zugabe der FH2-Domäne die Mikrotubuli um ca. 30 % im Vergleich zu der Kontrolle und beeinflusste damit die Länge der Mikrotubuli im Vergleich zu den anderen beiden Konstrukten am stärksten (s. Abb. 26, B). Diese Ergebnisse zeigen, dass unter dem Einfluss der FH2-Domäne die Mikrotubuli eine erhöhte dynamische Instabilität aufweisen. Im Vergleich dazu war in Anwesenheit von DIAPH1 die Länge der Mikrotubuli nicht signifikant verändert (s. B, Säule 2), während die Dichte um 25 % höher war als in der Kontrolle (s. A, Säule 2). Hieraus ergibt sich, dass in Gegenwart von DIAPH1 die Mikrotubuli sich etwas stabiler verhalten als in Gegenwart der FH2-Domäne allein. Dieser Effekt war noch stärker bei den mit Δ FH2-inkubierten Mikrotubuli zu beobachten. Mit dem AFH2-Protein war die Mikrotubulimenge pro Fläche ähnlich wie bei der FH2-Domäne um ca. das 2-fache erhöht (A, Säule 1 und 3), während keine signifikanten Veränderungen der Länge detektiert wurden (s. B, vgl. Säule 1 und 4). Daraus lässt sich ableiten, dass in Anwesenheit von Δ FH2 die Anzahl an stabilen Mikrotubuli zunimmt. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Effekte auf die Mikrotubuli in Gegenwart von AFH2 unabhängig von der FH2-Domäne erfolgt. Die Ergebnisse von DIAPH1 und Δ FH2 deuten zudem darauf hin, dass in Gegenwart von Taxol die Konstrukte auch in autoinhibierter Form Effekte auf die Mikrotubuli ausüben.

Die durch DIAPH1, FH2 und Δ FH2 verursachten Effekte auf die Struktur der Mikrotubuli sind in Abb. 27 visualisiert.



Abb. 27: Struktur der Mikrotubuli in Anwesenheit von DIAPH1, FH2 und Δ FH2. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus jeweils 20 Bildern pro Konstrukt. Rhodamin-markierte und Taxol-stabilisierte Mikrotubuli wurden mit den Proteinkonstrukten inkubiert und auf 8-*well-plates* aufgetragen. Die Mikrotubuli wurden im Keyence-Mikroskop bei 60-facher Vergrößerung untersucht. Auf allen Bildern heben sich die Mikrotubuli als gerade oder gekrümmte Striche deutlich erkennbar vom schwarzen Hintergrund ab. Die Punkte im Hintergrund wurden nicht zu den Mikrotubuli gezählt. Die langen Mikrotubuli in Gegenwart von Δ FH2 und die vielen kurzen Mikrotubuli in Gegenwart der FH2-Domäne stechen besonders aus dem Hintergrund hervor. Abkürzungen: 1 = Kontrolle, 2 = DIAPH1, 3 = FH2-Domäne, 4 = Δ FH2

Fasst man die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zusammen, lässt sich folgendes Fazit ziehen: Unter dem Einfluss der FH2-Domäne sind vermehrt dynamische Mikrotubuli vorzufinden, während in Anwesenheit von DIAPH1 und Δ FH2 die Mikrotubuli stabiler sind. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass DIAPH1 und Δ FH2 in Gegenwart von Taxol auch in autoinhibierter Form die Mikrotubuli-Struktur beeinflussen können. Die Mikrotubuli bekommen vor allem nach Zugabe des Δ FH2-Proteins eine stabilere Struktur und verursachen bzgl. der Stabilität in Abwesenheit der FH2-Domäne im Vergleich zu DIAPH1 den größten Effekt. Damit ist anzunehmen, dass die stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli in Gegenwart von Taxol unabhängig von der FH2-Domäne zustande kommt und folglich in DIAPH1 eine andere Domäne die Stabilität der Mikrotubuli positiv beeinflusst.

3.3.3. Effekte von DIAPH1, FH2 und ΔFH2 auf die Struktur der Mikrotubuli bei *cold-induced-depolymerization*

Bartolini et al. (2008) beobachteten, dass die FH1FH2-Domäne von mDia2 (DIAPH3) die Mikrotubuli bei *cold-induced-depolymerization* stabilisiert und diese vor Depolymerisation schützt. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auch in Gegenwart von DIAPH1, FH2 und Δ FH2 auftritt, wurde für diese Konstrukte eine *cold-induced-depolymerization* durchgeführt. Hierzu wurden Rhodamin-markierte und Taxol-stabilisierte Mikrotubuli mit den Proteinen zunächst 10 min bei Raumtemperatur und anschließend bei 4 °C für 20 min inkubiert. Während der Kälteinkubation wurde alle 5 min für 10 sec gevortext, um eine Depolymerisierung zu initiieren (schematische Übersicht s. Abb. 14). Als Kontrolle diente die zeitgleiche Inkubation der Mikrotubuli mit MT-Puffer statt Protein sowohl mit als auch ohne Kälteinkubation. Abschließend wurden die Mikrotubuli im Fluoreszenzmikroskop visualisiert (Abb. 29) und wie in 3.3.2 beschrieben ausgewertet (Abb. 28).

Die Analyse der Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass eine signifikante Abnahme der Dichte (ca. um 80 %) und Länge (um 50 %) der Mikrotubuli in der 4 °C-Kontrolle nach der *cold-induced-depolymerization* erreicht wurde (s. Abb. 28, A und B, vgl. Säule 1 und 1*).



Abb. 28: Einfluss der Proteinkonstrukte auf die Mikrotubulistruktur während der *cold-induced-depolymerization*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. A) Dichte der Mikrotubuli. Mikrotubuli wurden von 10 Bildern je Konstrukt mit ImageJ verblindet ausgezählt und anschließend normiert. B) Länge der Mikrotubuli. Die Länge wurde von 5 Bildern je Konstrukt mit BZ Analyzer verblindet gemessen und anschließend normiert. Abkürzungen: 1 = Kontrolle 37 °C (ohne Kälteinkubation und Vortexen), 1* = Kontrolle 4 °C, 2 = DIAPH1 (Volllänge), 3 = FH2-Domäne, 4 = Δ FH2 (dFH2), * = p < 0,05, *** = p < 0,005

Jessica Ecem Nojszewski | Institut für Biochemie & Signaltransduktion | UKE

Daraus geht hervor, dass Kälte und mechanischer Stress die Anzahl an stabilen Mikrotubuli reduzieren und das Gleichgewicht stark auf die Seite der Depolymerisierung verschieben. Die induzierte Depolymerisierung ließ Rückschlüsse auf die Kälteresistenz der Mikrotubuli in Gegenwart der Konstrukte zu: In Anwesenheit der FH2-Domäne war die Dichte um ca. 15 % erhöht, während die Mikrotubuli um ca. 30 % kürzer waren als in der 4 °C-Kontrolle (s. Säule 1* und 3 in A und B). Daraus ergibt sich, dass die FH2-Domäne allein Taxol-stabilisierte Mikrotubuli nicht vor der cold-induced-depolymerization schützt. Zusätzlich scheint die Domäne eine synergistische Wirkung mit der Kälte bzw. dem mechanischen Stress aufzuweisen, da die Depolymerisierung mit dem Vorhandensein der FH2-Domäne verstärkt wird. Im Gegensatz dazu, war bei den mit DIAPH1-inkubierten Mikrotubuli eine Verdopplung der Dichte und ein Längenwachstum um 20 % zu beobachten (vgl. Säule 1* und 2 in A und B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Volllänge eine protektive Wirkung auf die Taxol-stabilisierten Mikrotubuli während der kälteinduzierten Depolymerisierung ausübt. Unter dem Einfluss von Δ FH2 erfolgte das Dichtewachstum noch stärker (um 50 %), während bei der Länge keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle detektiert wurden. Daraus lässt sich ableiten, dass der protektive Effekt auf die Taxol-stabilisierten Mikrotubuli unter Δ FH2 schwächer ist als mit DIAPH1 und die Mikrotubuli nicht stabiler sind als in der 4 °C-Kontrolle. Die erhöhte Dichte in Anwesenheit von Δ FH2 kann mit der Neubildung von Mikrotubuli während der mikroskopischen Betrachtung von DIAPH1, der Kontrolle und der FH2-Domäne begründet werden: Obwohl der Versuch bei allen Konstrukten zeitgleich durchgeführt wurde und die mikroskopischen Aufnahmen pro Konstrukt zügig erfolgte, war die verstrichene Zeit um ein paar Minuten ausreichend, um neue Mikrotubuli zu formieren.

Abb. 31 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Mikrotubuli nach der *cold-induced-depolymerization*. Im Fluoreszenzmikroskop betrachtet zeigte sich eine sichtbare Reduktion und Verkürzung der Mikrotubuli in der 4 °C-Kontrolle (vgl. Abb. 27, 1 und Abb. 29, 1) und damit eine sichtbare Veränderung der Morphologie. Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass durch die Kälte und den mechanisch verursachten Stress die Depolymerisierung initiiert wurde und folglich das Gleichgewicht der dynamischen Instabilität auf die Seite der Depolymerisierung verschoben wurde.



Abb. 29: Struktur der Mikrotubuli in Anwesenheit von DIAPH1, FH2 und Δ FH2 bei *cold-induced-depolymerization*. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus jeweils 10 Bildern pro Konstrukt. Rhodamin-markierte und Taxol-stabilisierte Mikrotubuli wurden mit den Proteinkonstrukten bei 4 °C inkubiert, gevortext und anschließend auf 8-*well-plates* aufgetragen. Die Mikrotubuli wurden im Keyence-Mikroskop bei 60-facher Vergrößerung sichtbar gemacht. Abgebildet ist exemplarisch ein Bild der 4 °C-Kontrolle und ein Bild pro Konstrukt. Die Punkte im Hintergrund wurden nicht zu den Mikrotubuli gezählt. Abkürzungen: 1 = Kontrolle 4 °C, 2 = DIAPH1, 3 = FH2-Domäne, 4 = Δ FH2

Zusammenfassend, geht aus dem Experiment der *cold-induced-depolymerization* hervor, dass DIAPH1 in Anwesenheit von Taxol die Mikrotubuli stabilisiert und diese vor Depolymerisierung schützt. Im Gegensatz dazu, ist die FH2-Domäne allein nicht ausreichend, um den protektiven Effekt hervorzurufen. Die Domäne scheint Taxol-stabilisierte Mikrotubuli zusätzlich noch dynamischer zu machen und damit die Depolymerisierung zu verstärken.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Interaktion zwischen autoinhibiertem DIAPH1 und Mikrotubuli in-vitro analysieren und die Existenz einer zu zweiten Mikrotubuli-Bindedomäne in DIAPH1 zu prüfen. Hierzu wurden in E. -coli exprimiertes (FH2 und $\Delta FH2)$ DIAPH1 sowie Mutanten untersucht. indem die Mikrotubuli-Polymerisierung in Gegenwart dieser Konstrukte gemessen und die Struktur von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli im Fluoreszenzmikroskop analysiert wurde. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte zusätzlich bei cold-induced-depolymerization.

4.1. Zusammenfassung der in-vitro-Versuche

Die Ergebnisse der in-vitro-Versuche sind pro Konstrukt in Tab. 26 zur Übersicht zusammenfassend dargestellt (Details s. Ergebnisse):

Tab. 26: Effekte der Konstrukte auf die Mikrotubuli, bezogen auf die Kontrolle bzw. 4 °C-Kontrolle

	FH2	DIAPH1	ΔFH2
Polymerisierung	$\uparrow\uparrow$	=	=
Stabilität in Anwesenheit von Taxol	$\downarrow\downarrow$	1	$\uparrow\uparrow$
Kälteresistenz in Anwesenheit von Taxol	$\downarrow\downarrow$	$\uparrow \uparrow$	=

Die Pfeile unter den jeweiligen Konstrukten beziehen sich auf die Mikrotubuli-Parameter in der ersten Spalte und fassen die wichtigsten Ergebnisse der in-vitro-Versuche zusammen.

Die FH2-Domäne steigert die Polymerisierung von Mikrotubuli. In Anwesenheit von Taxol erhöht die FH2-Domäne die Instabilität und verstärkt bei Kälteeinwirkung die Depolymerisierung von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli. Die Volllänge steigert die Polymerisierung der Mikrotubuli nicht, bewirkt jedoch in Anwesenheit von Taxol einen stabilisierenden Effekt. Zusätzlich erhöht DIAPH1 die Kälteresistenz von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli und wirkt hiermit der Kälte-induzierten-Depolymerisation entgegen. Die stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli zeigt sich unter dem Einfluss des ∆FH2-Proteins noch stärker. Bei Kälte jedoch werden die Taxol-stabilisierten Mikrotubuli auch in Gegenwart von Δ FH2 instabil und depolymerisieren wie bei der 4 °C-Kontrolle.
4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Die FH2-Domäne von DIAPH1 polymerisiert Mikrotubuli und erhöht die dynamische Instabilität von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli

Es ist bereits bekannt, dass die Bindung von Forminen an Mikrotubuli über die FH2-Domäne vermittelt wird (Ishizaki et al. 2001; Bartolini & Gundersen 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die FH2-Domäne von DIAPH1 zusätzlich die Polymerisierung der Mikrotubuli nahezu um das Doppelte erhöht. Daher ist anzunehmen, dass die Steigerung der Polymerisierung über diese Domäne erfolgt. Da ein Effekt der FH2-Domäne auf die Mikrotubuli erst nach ca. 2 Stunden im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden konnte (Vgl. Kurve 1 und 3 in Abb. 25), ist die erhöhte Polymerisierung eher auf die Stabilisierung und nicht auf das vermehrte Wachstum der Mikrotubuli zurückzuführen. Daraus ergibt sich, dass die Stabilisierung analog zu mDia2 (DIAPH3) durch eine niedrigere Zerfallsrate der Tubulin-Untereinheiten in Gegenwart der FH2-Domäne erfolgt. Höchstwahrscheinlich fungiert die FH2-Domäne als eine Art "Mini"-Kappe, die die Depolymerisierung verzögert und damit das Gleichgewicht des Auf-und Abbaus von Mikrotubuli in Richtung Polymerisierung verschiebt.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zeigen allerdings, dass Taxol-stabilisierte Mikrotubuli in Gegenwart der FH2-Domäne eine vermehrte dynamische Instabilität aufweisen: Die Mikrotubuli wurden kürzer und die Dichte von Mikrotubuli pro Fläche war erhöht (s. Abb. 26). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Depolymerisierung von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli in Anwesenheit der FH2-Domäne unter Kälteeinwirkung verstärkt ist. Daraus lässt sich ableiten, dass die FH2-Domäne das Gleichgewicht der dynamischen Instabilität bei Kälte auf die Depolymerisierungsseite (*"catastrophe"*) verlagert (s. Abb. 30). Hierbei kommt es höchstwahrscheinlich während der Kälte-induzierten-Depolymerisierung zum beschleunigten Verlust der schützenden GTP-Kappe der Mikrotubuli. Der genaue Mechanismus der Polymerisierung bzw. der Depolymerisierung durch die FH2-Domäne von DIAPH1 ist bislang jedoch ungeklärt.



Abb. 30: Dynamische Instabilität der Mikrotubuli (Desai & Mitchison 1997). Mikrotubuli sind dynamische Strukturen, die polymerisieren und depolymerisieren. Während der Polymerisierungsphase erfolgt das Anlagern von GTP-Tubulin ans Mikrotubulus-Ende und die Hydrolyse des GTPs zu GDP. Geht die schützende GTP-Kappe verloren, so beginnt der Mikrotubulus zu depolymerisieren (*catastrophe*). Unter geeigneten Bedingungen (z.B. dem Vorliegen von ausreichend GTP-Tubulin und einer optimalen Temperatur) kann der Mikrotubulus erneut polymerisieren (*rescue*). Der abrupte Wechsel zwischen Polymerisierung und Depolymerisierung wird als dynamische Instabilität bezeichnet.

Die verstärkte Depolymerisierung von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli bei Kälte ist mit den Untersuchungen von Bartolini et al. (2008) jedoch nicht vollständig vereinbar: Sie konnten zeigen, dass das FH1FH2-Fragment von mDia2 (DIAPH3) Taxol-stabilisierte Mikrotubuli vor der *cold-induced-depolymerization* schützt. Basierend auf dieser Untersuchung ist davon auszugehen, dass die FH2-Domäne allein nicht ausreicht, um die Mikrotubuli zu stabilisieren. Es lässt sich daher vermuten, dass auch die FH1-Domäne von DIAPH1 notwendig ist, um einen stabilisierenden Effekt auf die Mikrotubuli hervorzurufen. Delaney et al. (2017) konnten zeigen, dass bestimmte Fragmente wie FH1FH2 und FH2CC und einige Domänen allein (FH2, CC und FH1) keinen stabilisierenden Effekt auf die Mikrotubuli konnte in-vitro nicht direkt nachgewiesen werden (Bartolini et al. 2008). Eine Bindung von DIAPH1 an Mikrotubuli durch die FH1-Domäne kann allerdings nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da

den Isoformen und den Spezies (Mensch vs. Maus) nicht zu 100 % identisch sind. DIAPH1 stimmt zu 96 % mit mDia1 überein (Datenbank Uniprot und Vergleich der Sequenzen auf BLAST). Aus diesen kleinen Variationen in der Primärstruktur könnten bei den DIAPH-Proteinen biochemische Unterschiede zwischen den Spezies resultieren: Die Veränderungen in der Aminosäuresequenz könnten analog zu *missense*-Mutationen eine andere Faltung des Proteins bedingen, die mit Verlust der proteolytischen- und/oder thermischen Stabilität und Aggregatbildung einhergehen kann. Daraus lässt sich ableiten, dass das Protein sich in Bezug auf die Mikrotubuli je nach Isoform, Spezies und damit einhergehender Faltung unterschiedlich verhalten kann (Funktionsverlust bzw. Funktionsgewinn). Bartolini et al. (2008) haben z.B. festgestellt, dass mDia2 eine höhere Affinität zu den Mikrotubuli besitzt als mDia1. Gaillard et al. (2011) postulierten, dass mDia2 vermehrt basische Aminosäuren C-Terminal der DAD-Domäne besitzt, die eher mit der sauren Mikrotubuli-Oberfläche interagieren als die gleiche Region des mDia1-Proteins. Inwieweit die FH1-Domäne von DIAPH1 mit Mikrotubuli interagiert, sollte deshalb künftig in weiteren Experimenten untersucht werden.

4.2.2. DIAPH1 und das ΔFH2-Protein stabilisieren Mikrotubuli in Anwesenheit von Taxol

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Δ FH2 die Mikrotubuli in Anwesenheit von Taxol stabilisiert. Daher ist davon auszugehen, dass die stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli analog zur Δ FH2 der DIAPH2-Isoform unabhängig von der FH2-Domäne erfolgt. Die stabilisierende Eigenschaft könnte auf eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne zurückzuführen sein, die in Abwesenheit der FH2-Domäne und damit einhergehender Inhibition der Mikrotubuli-Dynamik eine stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli hervorruft. Diese Vermutung stünde im Einklang mit dem Ergebnis, dass in Gegenwart von Δ FH2 ein stärkerer stabilisierender Effekt beobachtet werden konnte als in Gegenwart von DIAPH1. Unter Kälteeinwirkung waren die Mikrotubuli in Anwesenheit von Δ FH2 jedoch weniger stabil als in Anwesenheit von DIAPH1. Interessanterweise konnten Gould et al. (2011) zeigen, dass die DAD-Domäne von mDial an der Nukleierung von Aktin beteiligt ist und diese sogar steigert, indem die Domäne direkt an Aktin-Monomere bindet. Zusätzlich steigert die DAD-Domäne die Aktivität der FH2-Domäne und beide Domänen fungieren zusammen mit der FH1-Domäne als eine Art "Nukleationsmaschine" (Gould et al. 2011). Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob die DAD-Domäne für die Bindung der Mikrotubuli ebenfalls eine Rolle spielt. Da die DAD-Domäne für die Bindung an die DID-Domäne basische Aminosäuren besitzt (Waller et al. 2005), hat sie eine höhere Wahrscheinlichkeit mit der sauren Mikrotubulioberfläche zu interagieren als die DID-Domäne und kommt aus diesem Grund als eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne am ehesten in Betracht. Ein Vorschlag für eine weiterführende Forschungsarbeit auf diesem Themengebiet wäre demnach die genauere Untersuchung der DAD-Domäne von DIAPH1 in Bezug auf die Mikrotubuli-Bindung.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Volllänge die Mikrotubuli ebenfalls stabilisiert und diese vor Depolymerisation schützt. Die stabilisierende Wirkung war auch bei Kälte zu beobachten. Es ist bereits bekannt, dass die FH1FH2-Domäne von mDia2 die Depolymerisierung bei Kälte reduziert, da das Proteinfragment eine "cap"-ähnliche Aktivität aufweist und Mikrotubuli damit schützend wie eine Kappe umgibt (Bartolini et al. 2008). Ungewöhnlich ist allerdings, dass DIAPH1 und Δ FH2 die Mikrotubuli-Struktur in Gegenwart von Taxol auch in autoinhibierter Form beeinflussen. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bezüglich der stabilisierenden Wirkung von DIAPH1 und Δ FH2 auf Mikrotubuli steht damit mit den Untersuchungen von Bartolini et al. (2008) nicht vollständig im Einklang: Während die FH1FH2-Domäne von mDia2 eine konstitutiv aktive Form des Proteins darstellt, liegen DIAPH1 und AFH2 in Abwesenheit von Rho-GTP in autoinhibierter Konformation vor. Da die Effekte von DIAPH1 und AFH2 auf die Mikrotubuli ausschließlich in Anwesenheit von Taxol auftreten (s. Ergebnisse Abb. 25), wirken diese Konstrukte mit Taxol synergistisch. Es ist daher anzunehmen, dass in Gegenwart von Taxol die "DID-DAD"-Interaktion der Konstrukte durch einen noch unbekannten Mechanismus unterbrochen wird (Autoinhibition: s. Abb. 31).



Abb. 31: mDia1 in aktiver und autoinhibierter Form (Maiti et al. 2012). In autoinhibierter Form (Abwesenheit eines Stimulators) bindet die DAD-Domäne an die DID-Domäne (rechtes Bild). Erst die Auflösung der Interaktion zwischen der DID- und DAD-Domäne überführt das Protein in die aktive Form (linkes Bild). **Abkürzungen:** GBD – GTP*ase-binding domain*, DID – *Diaphanous inhibitory domain*, DD – *Dimerization domain*, CC – *Coiled-coil domain*, FH1- und FH2 – *Formin homology* 1- *and* 2 - *domain*, DAD – *Diaphanous autoregulatory domain*

Möglicherweise fungiert die DIDoder **DAD-Domäne** als eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne, die durch die Bindung an Taxol-stabilisierte Mikrotubuli nicht mehr miteinander wechselwirken können und die Autoinhibition unterbrechen. Falls einer dieser Domänen in Gegenwart von Taxol an Mikrotubuli bindet, wäre die Interaktion der Domänen miteinander nicht mehr optimal und DIAPH1 bzw. Δ FH2 wäre dadurch nicht autoinhibiert, sondern konstitutiv aktiv. Bisher ist bekannt, dass Taxol an ß-Tubulin bindet und Mikrotubuli stabilisiert (Downing 2000). Eine Interaktion von Taxol mit DIAPH1 ist bislang nicht beschrieben.

Interessanterweise konnte in den Untersuchungen von Bartolini et al. (2008) gezeigt werden, dass eine dimerisierungsunfähige und damit inaktive Mutante von mDia2 die Mikrotubuli in Zellen ebenfalls stabilisieren konnte. Daraus lässt sich ableiten, dass das Protein die Mikrotubuli auch in autoinhibierter Form stabilisieren könnte, da die Autoinhibition analog zur dimerisierungsunfähigen Mutante eine inaktive Form des Proteins darstellt. Hieraus ergibt sich, dass eine Aktivierung des Proteins für die Stabilisierung der Mikrotubuli evtl. nicht nötig ist. Tatsächlich ist die Dimerisierung und damit die Aktivierung des Proteins für die Polymerisierung des Aktins notwendig (Bartolini et al. 2008). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass mDia2 Mikrotubuli unabhängig von der Aktin-regulierenden Aktivität stabilisiert (DeWard & Alberts 2008; Bartolini et al. 2008).

Hiermit erfolgt eine klare Trennung zwischen der Aktin- und Mikrotubuli-regulierenden Aktivität, indem die Autoinhibition ausschließlich für die Interaktion mit Aktin unterbrochen wird. Lin et al. (2015) konnten bereits zeigen, dass die Mikrotubuli-abhängige Adhäsion keine Aktivierung von DIAPH1 erfordert. Es liegt deshalb nahe, dass auch DIAPH1 Mikrotubuli in autoinhibiertem Zustand stabilisieren kann. Die Stabilisierung der Mikrotubuli durch DIAPH1 in autoinhibierter Konformation könnte theoretisch wie bei mDia2 mit einer "*capping"* – Aktivität begründet werden. Höchstwahrscheinlich umgeben DIAPH1 und ΔFH2 die Mikrotubuli wie eine Kappe-ähnliche Struktur und stabilisieren diese trotz Autoinhibition. Denkbar ist, dass Formine wie DIAPH1 als eine Art künstliche GTP-Kappe für Mikrotubuli fungieren, die bei Verlust der eigentlichen GTP-Kappe die Form der Mikrotubuli erhalten und eine kurvige Konformationsänderung der Mikrotubuli herauszögern (Details s. Einleitung).

Damit einhergehend würde die "*catastrophe*"-Rate sinken. Gegen diese Hypothese spricht, dass die stabilisierende Wirkung von DIAPH1 auf die Mikrotubuli in Abwesenheit von Taxol jedoch nicht detektiert wurde (s. Abb. 25). Ein Vorschlag für die Überprüfung der Hypothese wäre, die Experimente von Lin et al. (2015) in Anwesenheit von Rho-GTP mit Δ FH2 durchzuführen: Δ FH2 ist nicht nur eine deletierte Mutante, sondern mit dem Fehlen der FH2-Domäne auch eine dimerisierungsunfähige Mutante (Details zur Dimerisierung s. Einleitung). Sollte auch in diesem Fall die Mikrotubuli-abhängige Adhäsion verstärkt beobachtbar sein, ist es naheliegend, dass für die Mikrotubuli-regulierende Aktivität keine Dimerisierung und damit auch keine Aktivierung des Proteins erforderlich ist. Dieses Ergebnis würde auch bestätigen, dass die Stabilisierung der Mikrotubuli unabhängig von der FH2-Domäne erfolgen kann.

Eine andere Hypothese wäre, dass die GBD-Domäne von DIAPH1 bzw. ΔFH2 in Anwesenheit von Taxol an β-Tubulin bindet: Da β-Tubulin zur Hydrolyse des GTPs theoretisch eine GTPase-Aktivität aufweisen müsste, könnte sie Rho-GTP imitieren und das Protein auch in Abwesenheit des G-Proteins Rho in den aktiven Zustand überführen. Der Stimulator/Aktivator wäre in diesem Fall ß-Tubulin selbst, welches eine Aktivierung des Proteins kaschiert bzw. eine nicht vorhandene Autoinhibition suggeriert. In diesem Fall wäre die GBD-Domäne eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne (bzw. Tubulin-Domäne).

Der exakte Mechanismus, wie DIAPH1 in Anwesenheit von Taxol die Mikrotubuli stabilisiert, ist jedoch noch unbekannt.

4.2.3. Fazit

Aus den Ergebnissen der in-vitro-Versuche lassen sich zusammenfassend folgende Schlussfolgerungen ziehen: Die DIAPH1-stimulierte Polymerisierung der Mikrotubuli erfolgt durch die FH2-Domäne. Es konnte gezeigt werden, dass DIAPH1 und Δ FH2 in-vitro auch in Abwesenheit von Rho-GTP Effekte auf Taxol-stabilisierte Mikrotubuli bewirken. Daraus ergibt sich, dass Δ FH2 in Gegenwart von Taxol die Mikrotubuli unabhängig von der FH2-Domäne stabilisiert. Der zugrunde liegende Mechanismus muss allerdings noch aufgeklärt werden.

In Zusammenschau der Ergebnisse und der Literatur ergeben sich für die Effekte von DIAPH1 und Δ FH2 auf Taxol-stabilisierte Mikrotubuli folgende Hypothesen:

1) DIAPH1 und Δ FH2 sind in Anwesenheit von Taxol nicht autoinhibiert, sondern konstitutiv aktiv. Der Grund hierfür könnte die DAD-Domäne sein, die als eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne fungiert und durch eine nicht optimale Interaktion mit der DID-Domäne die Autoinhibition unterbricht.

2) DIAPH1 und ΔFH2 können Mikrotubuli in Anwesenheit von Taxol auch in autoinhibierter Form stabilisieren. Hiermit würde eine klare Trennung zwischen der Aktin- und Mikrotubuli-regulierenden Aktivität erfolgen.

4.3. Eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne?

Wichtig wäre, zu wissen, ob in DIAPH1 tatsächlich eine zweite Mikrotubuli-Domäne existiert. Die Identifikation der zweiten Mikrotubuli-Bindedomäne ist nicht nur aus Sicht der Grundlagenforschung interessant, nämlich dass in Forminen grundsätzlich eine zweite Mikrotubuli-Domäne vorhanden sein kann, sondern auch aus klinischer Sicht: Mit der Identifikation der Domäne könnten sich neue Therapiemöglichkeiten für Krebserkrankungen ergeben. So gibt es z.B. zwei Formine (INF1 und Formin-1), die Sequenzen außerhalb der FH2-Domäne für die Bindung an Mikrotubuli nutzen (Gaillard et al. 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schließen zudem eine Mikrotubuli-Bindedomäne außerhalb der FH2-Domäne nicht aus. Unter den Domänen von DIAPH1 können die DAD- und GBD-Domäne am ehesten in Betracht gezogen werden (s.o.). Eine Mikrotubuli-bindende Eigenschaft der DAD- bzw. der GBD-Domäne ist bisher nicht bekannt. Außer diesen Domänen kommen weitere Regionen für die Bindung von Mikrotubuli in Betracht: die DID-Domäne und die C-terminale Region des Proteins. Gaillard et al. (2011) konnten feststellen, dass die C-terminale Region der Formine mDia2 und INF2 mit niedriger Affinität auch an Mikrotubuli bindet. Eine Interaktion zwischen mDia1 und Mikrotubuli mittels C-Terminus konnte jedoch nicht festgestellt werden (Gaillard et al. 2011). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die verschiedenen Isoformen in ihren Eigenschaften variieren und die Unterschiede zwischen den Spezies nicht zu vernachlässigen sind. Aus diesem Grund sollte der C-Terminus von DIAPH1 ebenfalls näher untersucht und bezüglich der Fragestellung, ob dieser an Mikrotubuli bindet, genauer analysiert werden.

4.4. Ausblick auf mögliche zukünftige Entwicklungen und Implikationen für die Medizin

4.4.1. Pharmakologische Inhibition von DIAPH1

DIAPH1 fördert die Mikrotubuli-abhängige Adhäsion von Tumorzellen während der Metastasierung (Details s. Einleitung). Folglich kann mit der Inhibition dieser Aktivität eine hemmende Wirkung auf die Metastasierungskaskade angenommen werden. Falls eine zweite Mikrotubuli-Bindedomäne in DIAPH1 vorhanden ist, könnte diese damit das Ziel therapeutischer Substanzen sein. Für die FH2-Domäne wurde bereits eine solche Substanz identifiziert. Der "small molecule inhibitor of formin homology 2 domain" (SMIFH2) hemmt die Aktin-Nukleation und -Elongation, die durch die FH2-Domäne vermittelt wird (Rizvi et al. 2009). SMIFH2 zielt allerdings als ein universeller Formin-Inhibitor auf verschiedene Formine gleichzeitig. Um mögliche Nebenwirkungen zu verringern, wäre eine Formin-spezifische Inhibition von Vorteil, da Formine nicht nur an der Metastasierung beteiligt sind, sondern im Körper auch physiologische Funktionen erfüllen. Für mDia1 und mDia2 wurden bereits potente Isoform-spezifische Inhibitoren identifiziert (Gauvin et al. 2009). Durch die Hemmung der mDia-vermittelten Gruppierung des Aktins konnte die Zelladhäsion und Migration unterbunden werden. Die Identifikation der zweiten Mikrotubuli-Bindedomäne könnte helfen, weitere potente Inhibitoren zu entdecken und ggf. domänenspezifische Inhibitoren zu untersuchen. Eine pharmakologische Inhibition von DIAPH1 wäre nicht nur für Karzinome interessant, sondern auch für Viruserkrankungen: Delaney et al. (2017) fanden heraus, dass mDia1 und mDia2 eine HIV-Infektion fördern, indem sie an das Kapsid des human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) binden und durch das Zerlegen des Kapsids die Nucleinsäure des Virus freisetzen (Uncoating). mDia1 und mDia2 induzieren zusätzlich die Stabilisierung der Mikrotubuli und erleichtern damit den Transport viraler Partikel. Daraus ergibt sich, dass die Inhibition dieser Formine die Motilität der intrazellulären Viruspartikel hemmen würde. Die Isoform-spezifischen Inhibitoren von mDia1 und mDia2 (s.o. Gauvin et al. 2009) würden damit nicht nur als Chemotherapeutika, sondern auch als Virostatika fungieren.

DIAPH1 nimmt zusätzlich eine wichtige Rolle bei akuten Myokardischämien ein: Bei DIAPH1 – Knockout-Mäusen konnte eine geringere Infarktgröße und ein geringerer Gewebeverlust im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet werden (O'Shea et al. 2017). Die Anwendung von DIAPH-Inhibitoren nach einem Herzinfarkt wäre dementsprechend eine mögliche zukünftige Entwicklung, um eine Verbesserung der Kontraktilität zu erzielen.

Obwohl die Inaktivierung von DIAPH1 bei bestimmten Erkrankungen therapeutisch genutzt werden könnte (s.o.), ist eine Vererbung von DIAPH1 – Loss- *of- Function*-Mutationen pathologisch: Ercan-Sencicek et al. (2015) und Al-Maawali et al. (2016) konnten zeigen, dass ein homozygoter Verlust von DIAPH1 mit Mikrozephalie und Krampfanfällen assoziiert ist. Für weitere Untersuchungen von DIAPH1-Inhibitoren wäre es deshalb wichtig herauszufinden, ob die Inaktivierung des Proteins möglicherweise auch nicht genetisch bedingte Erkrankungen triggert.

4.4.2. Pharmakologische Aktivierung von DIAPH1

In der vorliegenden Arbeit wurde erörtert, dass DIAPH1 möglicherweise in Anwesenheit von Taxol nicht autoinhibiert ist. Daraus lässt sich ableiten, dass das Protein konstitutiv aktiv wäre und damit einhergehend die Anzahl an stabilen Mikrotubuli zunimmt. Hieraus ergibt sich eine wichtige therapeutische Konsequenz: Um die Chromosomen zu den Tochterzellen zu befördern, muss während der Zellteilung die Mikrotubuli-Dynamik reguliert werden. Demzufolge stellt ein Missverhältnis zwischen stabilen und dynamischen Mikrotubuli einen Störfaktor für die Zellteilung dar. Falls die DAD-Domäne tatsächlich die zweite Mikrotubuli-Bindedomäne ist (s.o.) und die Autoinhibition durch die fehlende bzw. nicht ausreichende Interaktion mit der DID-Domäne unterbrochen wird, wäre die Zellteilung beeinträchtigt. Es ist daher anzunehmen, dass eine konstitutive Aktivierung von DIAPH1 (bzw. ΔFH2) die Proliferation von Tumorzellen hemmt. Damit stellt paradoxerweise (s.o. Inhibition von DIAPH1) auch die Aktivierung des Formins eine Therapiemöglichkeit von Krebserkrankungen dar. Ein möglicher Therapieansatz wäre z.B., verschiedene Wirkverstärker für die DAD-Domäne zu identifizieren und sie dann im Hinblick auf Proliferation der Zellen und Apoptose zu untersuchen.

Lash et al. (2013) analysierten die Hemmung der malignen Progression durch pharmakologische Aktivierung von Forminen. Dabei identifizierten sie zwei sich untereinander chemisch ähnelnde Moleküle für mDia1, die als *"intramimics"* (IMMs) bezeichnet werden. Diese Substanzen (IMM-01 und -02) heben die inhibitorische Interaktion von der DID- und DAD-Domäne auf und aktivieren damit mDia1 (s. Abb. 32). Dies hat zur Folge, dass sich Aktin in den Zellen gruppiert und die Mikrotubuli stabilisiert werden. Es resultiert ein Zell-Zyklus-Arrest und Apoptose aufgrund reduzierter Aktin- und Mikrotubuli-Dynamik. Eine Reduktion des Tumorwachstums konnte bereits durch in-vivo Analysen dieser Moleküle in Xenograft-Mausmodellen des Kolonkarzinoms bestätigt werden (Lash et al. 2013).



Abb. 32: Übersicht der Domänenstruktur von mDia1 und Wirkung der IMMs (Lash et al. 2013). Die IMMs hemmen die Autoinhibition durch die Unterbrechung der "DID-DAD"-Interaktion. Abkürzungen: G - GTP ase-binding domain, DID – Diaphanous inhibitory domain, DD – Dimerization domain, CC – Coiled-coil domain, FH1- und FH2 – Formin homology 1- and 2 - domain, DAD – Diaphanous autoregulatory domain, IMMs = "intramimics", Rho-GTP = GTP-bound Rho

Untersuchungen von Grueb et al. (2019) ergaben, dass DIAPH2 mit den Mikrotubuli des in der Metaphase ausgebildeten Spindelapparats in kolorektalen Tumorzellen kolokalisiert ist. Beobachtungen von Ercan-Sencicek et al. (2015) zeigten, dass DIAPH1 ebenfalls eine Kolokalisation mit Zentrosomen und mitotischen Spindeln in Neuronen-Progenitorzellen aufweist. Basierend auf diesen Beobachtungen könnten *"intramimics"* als neue Strategie zur Krebstherapie genutzt werden, indem auf die Zytoskelett-Remodeling-Maschinerie von Tumorzellen gezielt wird. Die IMMs wären zusätzlich eine Alternative bzw. eine Ergänzung zu Taxol, welches bei einigen Karzinomen als Spindelgift zum Einsatz kommt, aber mit vielen Nebenwirkungen verbunden ist. Es ist davon auszugehen, dass IMMs nebenwirkungsärmer wären, weil keine direkte Bindung zu den Mikrotubuli erfolgt. Eine weitere Möglichkeit eine Aktivierung des Proteins zu erzielen, ohne die Domänenstruktur zu verändern, wäre z.B. die Zugabe von DAD, das eine höhere Affinität zu der DID-Domäne besitzt als die in DIAPH1 vorhandene DAD-Domäne (schematische Darstellung s. Abb. 33). Isolierte Expression der *dad*-Domäne ahmt aktiviertes Rho-GTP nach und steigert das Aktin-Remodeling (Alberts 2000). Damit stellt sich die Frage, ob auch die Mikrotubuli-Dynamik durch die pharmakologische Zugabe von DAD beeinflusst werden kann.



Abb. 33: Modell zur Aktivierung von DIAPH1 durch externe DAD-Peptide. A) Autoinhibiertes DIAPH1. In Abwesenheit von Rho-GTP bindet die DID-Domäne an die DAD-Domäne. In dieser Konstellation liegt DIAPH1 in autoinhibierter Form vor. B) Interaktion von hochaffinen externen DAD-Peptiden mit der DID-Domäne von DIAPH1. Die pharmakologische Zugabe von DAD hemmt die Autoinhibition durch die Unterbrechung der proteininternen DID-DAD-Interaktion. DIAPH1 verharrt dadurch im aktiven Zustand und wirkt auf das Zytoskelett mit IMMs synergistisch. Abkürzungen: G – GTPase-binding domain, DID – Diaphanous inhibitory domain, DD – Dimerization domain, CC – Coiled-coil domain, FH1- und FH2 – Formin homology 1- and 2 - domain, DAD – Diaphanous autoregulatory domain

Höchstwahrscheinlich müssten diese DAD-Peptide mehr basische Aminosäuren besitzen als die DAD-Domänen von DIAPH1. Hiermit wären die DID-Domänen aller DIAPH1-Proteine im menschlichen Körper gesättigt und die proteininternen DAD-Domänen könnten mit den DID-Domänen nicht mehr wechselwirken. Damit wäre die FH2-Domäne durch die DAD-Domäne nicht "verdeckt" und DIAPH1 wäre trotz einer "DID-DAD"-Interaktion nicht autoinhibiert. Wichtig wäre, zu wissen, inwieweit Patienten DIAPH1-Agonisten vertragen würden und bei welchen Patienten diese angewendet werden könnten.

Die Analyse der Literatur zeigt, dass DIAPH1 nicht nur in die Metastasierung, sondern auch in andere pathophysiologische Vorgänge des Körpers involviert ist und je nach Mutation und Aktivitätsstatus unterschiedliche Erkrankungen bzw. Effekte hervorruft: Lynch et al. (1997) konnten z.B. feststellen, dass die konstitutive Aktivierung von mDia1 zu einem Hörverlust führt. Ueyama et al. (2016) stellten fest, dass neben anderen Mutationen auch eine Mutation C-Terminal der DAD-Domäne für den Hörverlust verantwortlich ist, die autosomal dominant vererbt wird. Die exakte Pathogenese ist bisher nicht bekannt. Interessanterweise ist DIAPH1 im alternden temporalen Kortex überexprimiert und in myeloiden Zellen des zentralen Nervensystems (Mikroglia) hochreguliert (Derk et al. 2018). Hieraus resultiert eine Neuroinflammation, die zu Alzheimer führt. Der genaue Mechanismus ist noch unklar. Falls IMMs bzw. andere Aktivatoren von DIAPH1 für die Behandlung von Tumorpatienten in der Zukunft zugelassen werden, wäre es deshalb wichtig herauszufinden, ob sie z.B. bei längerer Anwendung zu Alzheimer führen oder bei kardiovaskulär belasteten Patienten nach stattgefundenem Myokardinfarkt die Kontraktilität des Herzens verschlechtern (s. pharmakologische Inhibition von DIAPH1).

4.4.3. Therapie – Inhibition oder Aktivierung?

Die pharmakologische Inhibition und/oder die pharmakologische Aktivierung von DIAPH1 könnte therapeutisch bei bestimmten Erkrankungen genutzt werden (s.o. z.B. Virusinfektion, Herzinfarkt, Krebs). Bei der Behandlung von Karzinomen würden beide Optionen therapeutische Effekte zeigen (s.o. Inhibition und Aktivierung von DIAPH1). Arden et al. (2015) untersuchte die Inhibition und Aktivierung von mDia1 im Zusammenhang mit der Invasion des Glioblastoms. Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung mit den mDia-Agonisten IMM-01 und -02 einen größeren negativen Effekt auf die Invasion hatte als die Inhibition mit dem Formin-Inhibitor SMIFH2. IMMs konnten die Beweglichkeit und die Migration der Tumorzellen hemmen, während die Inhibition eine Verlangsamung aber keine vollständige Blockade der Invasion bewirkte. Aus diesem Grund wären mDia-Agonisten bei metastasierenden Tumorerkrankungen die Medikamente der Wahl. Diese wären v.a. als Proliferationshemmer geeignete Substanzen, um der Metastasierung vorzubeugen. Obwohl Tumorzellen Formine benötigen, um während der Metastasierung invasive Strukturen auszubilden, die für die Migration wichtig sind, würde mit erliegender Proliferation der Tumorzellen keine Metastasierung erfolgen, da die Proliferation der Migration in der Metastasierungskaskade vorausgeht (s. Einleitung: Metastasierungskaskade).

Darüber hinaus konnte Eisenmann et al. (2009) zeigen, dass DIAPH1 über mehrere Zwischenschritte die *p53*-Expression induziert: Eine Deletion des langen Arms von Chromosom 5 (5q-) bzw. ein kompletter Verlust des Chromosoms bewirkt durch den Verlust von *diaph1* und anderen Formin-Genen, die als Tumorsuppressoren fungieren, eine Entartung von Stammzellen. Bedingt durch diese Chromosomenaberration kommt es zur Proliferation der malignen Stammzellen und es entsteht ein Myelodysplastisches Syndrom (MDS). Die Stimulierung des Tumorsuppressorgens durch die Aktivierung von DIAPH1 könnte dementsprechend die Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika sensibler machen.

Zusammenfassend lässt sich mit Einbezug der Literatur sagen, dass eine pharmakologische Aktivierung von DIAPH1 bzw. die Aktivierung der zweiten Mikrotubuli-Bindedomäne zur Verhinderung der Metastasierung erfolgreicher ist als eine pharmakologische Inhibition. Nichtsdestotrotz gilt es zu beachten, dass die Tumorumgebung bei jedem Menschen individuell ist und Tumore eine heterogene Population von Tumorzellen beinhalten. Mit unterschiedlichen Tumorpopulationen geht eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung einher. Daraus folgt, dass z.B. in einigen Zellen eine andere Isoform von *diaph1* vermehrt exprimiert werden kann und eine formin- bzw. domänenspezifische Aktivierung von DIAPH1 nicht bei allen Tumorzellen dieselbe Wirkung zeigt. Insgesamt zeigt sich jedoch das Erforschen von DIAPH1-Agonisten als ein vielversprechender Ansatz zur Therapie metastasierender Karzinome.

5. Zusammenfassung

DIAPH1 ist in die metastatische Kaskade des kolorektalen Karzinoms involviert, da das Protein die Entstehung fokaler Adhäsionen begünstigt und damit einhergehend den ersten Schritt der Metastasierungskaskade initiiert. Die metastasierungsfördernde Eigenschaft von DIAPH1 wird hauptsächlich durch die Mikrotubuli-stabilisierende Aktivität des Proteins verursacht. Es ist bereits bekannt, dass die Stabilisierung der Mikrotubuli durch das DIAPH1-Protein in-vivo keine Stimuli durch Rho-GTPasen erfordert, DIAPH1 also im autoinhibierten Zustand Mikrotubuli bindet und stabilisiert. Für die Analyse der Interaktion zwischen den Mikrotubuli und autoinhibiertem DIAPH1 sind allerdings bislang keine Experimente in-vitro durchgeführt worden. Dies war das Ziel dieser Arbeit. Hierzu wurden drei Proteinkonstrukte verwendet: DIAPH1 (Volllänge), FH2-Domäne, von der bekannt ist, dass sie Mikrotubuli bindet und das Protein mit deletierter FH2-Domäne (Δ FH2).

Es konnte gezeigt werden, dass die DIAPH1-stimulierte Polymerisierung der Mikrotubuli durch die FH2-Domäne erfolgt. Darüber hinaus übt DIAPH1 in Anwesenheit von Taxol einen stabilisierenden Effekt auf die Mikrotubuli aus. Interessanterweise konnte Δ FH2 in Anwesenheit von Taxol die Mikrotubuli ebenfalls stabilisieren. Damit erfolgt die Stabilisierung der Mikrotubuli unabhängig von der FH2-Domäne. Der zugrunde liegende Mechanismus muss allerdings noch aufgeklärt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass DIAPH1 und Δ FH2 in-vitro auch in Abwesenheit von Rho-GTP Effekte auf Taxol-stabilisierte Mikrotubuli bewirken. Hieraus ergeben sich zwei Hypothesen: DIAPH1 und Δ FH2 liegen in-vitro in Anwesenheit von Taxol nicht, wie bisher angenommen, in autoinhibierter Form vor und sind somit konstitutiv aktiv oder eine Regulierung der Mikrotubuli-Aktivität erfordert in Anwesenheit von Taxol keine Aktivierung dieser Konstrukte. Welche der Hypothesen für die Mikrotubuli-regulierende Aktivität von DIAPH1 zutrifft und welche der Domänen außerhalb der FH2-Domäne an Mikrotubuli bindet, sollte künftig in weiteren Forschungsarbeiten genauer untersucht werden.

6. Abstract

DIAPH1 is involved in the metastatic cascade of colorectal cancer by promoting the formation of focal adhesions. Thus, the protein initiates the first step of the metastatic cascade. DIAPH1 induces the development of metastases mainly via stabilizing microtubules. It has already been shown that microtubule stabilization can occur through DIAPH1 in vivo even without Rho-GTP-mediated stimulation. However, to date no experiments in vitro have been performed to analyze the microtubule interaction with autoinhibited DIAPH1. To analyze this interaction in detail was the aim of this thesis. For this purpose, three protein constructs were employed: DIAPH1 (full length), FH2 domain and the protein with deleted FH2 domain (Δ FH2).

The results reveal that DIAPH1-stimulated polymerization of microtubules is mediated through the FH2 domain. Furthermore, DIAPH1 causes a stabilizing effect on microtubules in the presence of taxol. Interestingly, Δ FH2 could also stabilize microtubules, proving that microtubule stabilization is independent of the FH2 domain. However, the underlying mechanism has to be clarified. Additionally, the results show, that DIAPH1 und Δ FH2 have stabilizing effects on taxol-treated microtubules in vitro even in absence of Rho-GTP. Thus, two theories can be discussed: In vitro, DIAPH1 and Δ FH2 are not autoinhibited in presence of taxol and therefore, they are constitutively active, or regulation of microtubule activity requires no activation of these constructs in presence of taxol. To test which theory is true for the microtubule-regulating activity of DIAPH1 and which of the domains outside the FH2 domain is qualified for microtubule binding, future research is necessary.

7. Anhang

7.1. Vektorkarte pGEM[®]-T easy mit SP6 und T7-Sequenzierungsprimer



Modifiziert nach Promega pGEM[®]-T easy Vector Systems



7.2. Vektorkarte pGEX-6P-2A mit fh2-Domäne

Erstellt mit SnapGene®-Viewer

7.3. Primerliste

Tab. 27: PCR-Primer

Primerbezeichnung	Sequenz
fh2-Fw	$5^{\circ}-CTC$ GAG ATA TGC CTC CAC CTC CCC CAT TTG G
fh2-Rv	5' – GCG GCC GCA TTT GCT CTC TCT TCT GCT GCT TCT CTA GCC

Tab. 28: Sequenzierungsprimer

Primerbezeichnung	Sequenz
Τ7	5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
SP6	5' – ATT TAG GTG ACA CTA TAG
gst-fh2-Fw	5' – GTT TTA TAC ATG GAC CCA ATG TGC CTG G
gst-fh2-Rv	5' – GGC GAA AAG TTC ATT GTT CTC AAA GCG GTC C

7.4. Proteinkonstrukte



$\Delta FH2$ -Protein

Abb. 34: DIAPH1 (Volllänge), FH2-Domäne und Protein mit deletierter FH2-Domäne (Δ FH2). Die autoinhibitorischen Domänen (DID und DAD) sind blau hervorgehoben und die FH2-Domäne ist grün von den anderen Domänen abgegrenzt. In Δ FH2 ist die DAD-Domäne neben der FH1-Domäne lokalisiert. Abkürzungen: GBD – GTPase-binding domain, DID – Diaphanous inhibitory domain, DD – Dimerization domain, CC – Coiled-coil domain, FH1- und FH2 – Formin homology 1- and 2 - domain, DAD – Diaphanous autoregulatory domain

1 1	ATGCCTCCACCTCCCCATTTGGATTTGGAGTTCCTGCAGCCCCAGTTCTGCCATTTGGA	60 60
61 61	TTAACCCCCAAAAAGCTTTATAAGCCAGAGGTGCAGCTCCGGAGGCCAAACTGGTCCAAG	120 120
121 121	CTTGTGGCTGAGGACCTCTCCCAGGACTGCTTCTGGACAAAGGTGAAGGAGGACCGCTTT	180 180
181 181	GAGAACAATGAACTTTTCGCCAAACTTACCCTTACCTTCTCTGCCCAGACCAAGACTTCc	240 240
241 241	aaagccaagaaggatcaagaaggtggagaagaaaagaaa	300 300
301 301	aaagagttaaagGTGTTGGATTCAAAGACAGCCCAGAATCTCTCAATCTTTTTGGGTTCC 	360 360
361 361	TTCCGCATGCCCTATCAAGAGATTAAGAATGTCATCCTGGAGGTGAATGAGGCTGTTCTG	420 420
421 421	ACTGAGTCTATGATCCAGAACCTCATTAAGCAAATGCCAGAGCCAGAGCAGTTAAAAATG	480 480
481 481	CTTTCTGAACTGAAGGATGAATATGATGACCTGGCTGAGTCAGAGCAGTTTGGCGTGGTG	540 540
541 541	ATGGGCACTGTGCCCCGACTGCGGCCTCGCCTCAATGCCATTCTCTTCAAGCTACAATTC	600 600

7.5. Sequenzierungsergebnis von Klon 1 nach der Zwischenklonierung

601 601	AGCGAGCAAGTGGAGAATATCAAGCCAGAGATTGTGTCTGTC	660 660 720
661	TTACGTAAGAGTGAGAGCTTTTCCAATCTCCTAGAGATTACCTTGCTTG	720
721 721	ATGAATGCTGGCTCCAGAAATGCTGGTGCTTTTGGCTTCAATATCAGCTTCCTCTGTAAG	780 780
781 781	CTTCGAGACACCAAGTCCACAGATCAGAAGATGACGTTGTTACACTTCTTGGCTGAGTTG	840 840
841 841	TGTGAGAATGACTATCCCGATGTCCTCAAGTTTCCAGACGAGCTTGCCCATGTGGAGAAA	900 900
901 901	GCCAGCCGAGTTTCTGCTGAAAACTTGCAAAAGAACCTAGATCAGATGAAGAAACAAATT	960 960
961 961	TCTGATGTGGAACGTGATGTTCAGAATTTCCCAGCTGCCACAGATGAAAAAGACAAGTTT 	1020 1020
1021 1021	GTTGAAAAAATGACCAGCTTTGTGAAGGATGCACAGGAACAGTATAACAAGCTGCGGATG	1080 1080
1081 1081	ATGCATTCTAACATGGAGACCCTCTATAAGGAGCTGGGCGAGTACTTCCTCTTTGACCCC	1140 1140
1141 1141	AAGAAGTTGTCTGTTGAAGAATTTTTCATGGATCTTCACAATTTTCGGAATATGTTTTTG 	1200 1200

1201 1201	CAAGCAGTCAAGGAGAACCAGAAGCGGCGGGAGACAGAAGAAGATGAGGCGAGCAAAA	1260 1260
1261 1261	CTAGCCAAGGAGAAGGCAGAGAAGGAGCGGCTAGAGAAGCAGCAGAAGAGAGAG	1317 1317

Die DNA-Sequenz des ersten Klons (Details s. Ergebnisse) wurde mithilfe der Datenbank BLAST mit der Originalsequenz der *fh2*-Domäne verglichen. Die Analyse der Sequenzen auf BLAST zeigt eine 100 %ige Übereinstimmung der Basenpaare. Mit der fehlerfreien Sequenz des Klons ist der Ausschluss von Punktmutationen und die erfolgte Klonierung der *fh2*-Domäne in den Zwischenvektor bewiesen. Abkürzungen und Beschreibungen: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, Zahlen (z.B. 1201) = Anzahl der Basenpaare, rote Schrift = Originalsequenz der *fh2*-Domäne (1317 bp), blaue Schrift = Sequenz des Klons (1317 bp), senkrechte Striche = Übereinstimmungen der Basenpaare des Klons mit dem Original

	tac-Promotor lac-Operon	
1	TTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGT	60
1	TTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGT	60
61		120
61		120
01	CAGGAAACAGIAIICAIGICCCCIAIACIAGGIIAIIGGAAAAIIAAGGGCCIIGIGCAA	120
121	CCCACTCGACTTCTTTGGAATATCTTGAAGAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGC	180
121	CCCACTCGACTTCTTTGGAATATCTTGAAGAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGC	180
181	GATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTT	240
181	GATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTT	240
241	CCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATA	300
241		300
301	GCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTT	360
301	GCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTT	360
361	GAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTT	420
361		420
501		
421	GAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTCGAAGAT	480
421	GAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTCGAAGAT	480
101		540
401		540
481	CGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTG	540
541	TATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAAA	600
541	IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	600

7.6. Sequenzierungsergebnis von Klon 1 nach der Klonierung ins Zielvektor

601 601	TTAGTTTGTTTTAAAAAACGTATTGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCC 	660 660
661	AGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCAT	720
661	AGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCAT	720
	PreScission site	
721	CCTCCAAAA TCGGAT CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCC CTGGGATCCCCAGGAATTCAG IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	780
721	CCTCCAAAATCGGAT <mark>CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCC</mark> CTGGGATCCCCAGGAATTCAG	780
	XhoI <u>fh2</u> -Domäne	
781	TCGA <mark>CTCGAG</mark> AT <mark>ATGCCTCCACCTCCCCCATTTGGATTTGGAGTTCCTGCAGCCCCAGTT</mark>	840
781	TCGA <mark>CTCGAG</mark> AT <mark>ATGCCTCCACCTCCCCCATTTGGATTTGGAGTTCCTGCAGCCCCAGTT</mark>	840
0 4 1		
841	CTGCCATTTGGATTAACCCCCCAAAAAGCTTTATAAGCCAGAGGTGCAGCTCCGGAGGCCA	900
841	CTGCCATTTGGATTAACCCCCCAAAAAGCTTTATAAGCCAGAGGTGCAGCTCCGGAGGCCA	900 900
841	CTGCCATTTGGATTAACCCCCCAAAAAGCTTTATAAGCCAGAGGTGCAGCTCCGGAGGCCA	900 900
841 841 901	CTGCCATTTGGATTAACCCCCCAAAAAGCTTTATAAGCCAGAGGTGCAGCTCCGGAGGCCA CTGCCATTTGGATTAACCCCCCAAAAAGCTTTATAAGCCAGAGGTGCAGCTCCGGAGGCCA AACTGGTCCAAGCTTGTGGGCTGAGGACCTCTCCCAGGACT 940	900 900
841 841 901 901	CTGCCATTTGGATTAACCCCCCAAAAAGCTTTATAAGCCAGAGGTGCAGCTCCGGAGGCCA CTGCCATTTGGATTAACCCCCCAAAAAGCTTTATAAGCCAGAGGTGCAGCTCCGGAGGCCA AACTGGTCCAAGCTTGTGGGCTGAGGACCTCTCCCAGGACT 940 AACTGGTCCAAGCTTGTGGGCTGAGGACCTCTCCCCAGGACT 940	900 900

Ergebnis der Sequenzierung mit dem Reverse-Primer. Der Übergang von *gst* zur *fh2*-Domäne des ersten Klons wurde mithilfe der Datenbank BLAST mit den Teilen der Originalsequenz des *pGEX-6P-2A* – Vektors und mit dem Anfang der *fh2*-Domäne verglichen (Anfangsteil nach *gst*, da nicht die gesamte *fh2*-Domäne sequenziert wurde. Folglich ist der Teil bis zu der Stelle, wo der Reverse-Primer gebunden hat, abgebildet). Die Analyse der Sequenzen auf BLAST zeigt eine 100 %ige Übereinstimmung der Basenpaare. Damit sind Punktmutationen an dieser Stelle des Klons ausgeschlossen und die Klonierung der *fh2*-Domäne in den Zwischenvektor ist bewiesen. **Abkürzungen und Beschreibungen:** A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, Zahlen (z.B. 841) = Anzahl der Basenpaare, rote Schrift (obere Reihe) = Originalsequenz der *fh2*-Domäne (1317 bp), blaue Schrift (untere Reihe) = Sequenz des Klons (1317 bp), senkrechte Striche = Übereinstimmungen der Basenpaare des Klons mit dem Original

7.7. Tabellenverzeichnis

1	Laborgeräte	. 17
2	Reagenzien	18
3	verwendete Puffer bei der Klonierung	19
4	Enzyme	19
5	Bakterienstämme	19
6	Vektoren	19
7	Kits	20
8	Verbrauchsmaterialien	20
9	verwendete Software	20
10	Bestandteile der PCR	21
11	PCR-Programm	21
12	Zusammensetzung des Tris-Acetat-EDTA-Puffers (TAE-Puffer)	22
13	Einfügen des Poly-A-Schwanzes	23
14	pGEM [®] -T easy – Ligation	23
15	Analytischer Verdau	24
16	Sequenzierung der in <i>pGEM</i> [®] - <i>T easy</i> inserierten <i>fh2</i> -Domäne	24
17	präparativer Verdau für Ansatz 1 und 2	25
18	Ligation in den Zielvektor	25
19	Sequenzierung der in <i>pGEX-6P-2A</i> inserierter <i>fh2</i> -Domäne	26
20	Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE	29
21	Pufferzusammensetzung zum Herstellen der Proteinlysate	31
22	Zusammensetzung des Gefi-Laufpuffers (pH 8)	32
23	Zusammensetzung des TPB-Puffers (tubulin polymerization buffer, pH 6,9)	37
24	Zusammensetzung des MT-Puffers (pH 6,9)	38
25	Ansetzen des MT-Puffers	38
26	Effekte der Konstrukte auf die Mikrotubuli bezogen auf die Kontrolle bzw.	
	4 °C-Kontrolle	65
27	PCR-Primer	VIII
28	Sequenzierungsprimer	VIII

7.8. Abbildungsverzeichnis

1	Die Metastasierungskaskade (Saxena & Christofori 2013)2
2	Bildung von fokalen Adhäsionen (Lin & Windhorst 2016)
3	DIAPH1-vermittelter Transport der Integrin- ß1-Vesikel (Lin & Windhorst 2016) 4
4	Zellausläufer für Adhäsion, Protrusion und Invasion (Abbildung verändert aus
	Chesarone et al. 2010)
5	Typische Strukturen in invasiven Zellen (Nürnberg et al. 2011)
6	Organisation und Struktur des Zytoskeletts (Hohmann & Dehghani 2019) 6
7	Aufbau (A) und Dynamik (B) der Mikrotubuli (Kline-Smith & Walczak 2004)7
8	Dynamik der Mikrotubuli und GTP-Tubulin-cap (Brouhard & Rice 2014)9
9	GTP- "remnant" – Modell (Abbildung verändert aus Dimitrov et al. 2008) 10
10	Schematischer Aufbau von DIAPH1 (Abbildung verändert aus
	Goode & Eck 2007)
11	Aktin-regulierende Aktivität von DIAPH1 (Chesarone et al. 2010) 14
12	Mikrotubuli-regulierende Aktivität von mDia (Palazzo et al. 2001)15
13	Analyse der Mikrotubuli-Struktur
14	Analyse der Mikrotubuli-Struktur bei cold-induced-depolymerization
15	DIAPH1 (Volllänge), FH2-Domäne und Protein mit deletierter FH2-Domäne
	(ΔFH2)
16	A) Vervielfältigung der FH2-Domäne, B) Analytischer Verdau zum Überprüfen der
	Zwischenklonierung
17	A) Präparativer Verdau des <i>pGEM</i> [®] - <i>T easy</i> – Vektors mit der <i>fh2</i> -Domäne und des
	Zielvektors mit itpka, B) Herausgeschnittene Banden (fh2-Domäne und
	Zielvektor) nach der Auftrennung im Agarose-Gel 45
18	Analytischer Verdau zur Kontrolle der Klonierung in den Zielvektor 46
19	Analyse der Gensequenz von Klon 1 auf SnapGene
20	Induktion der Genexpression bei vier verschiedenen Bakterienstämmen
21	A) Vor Induktion (-IPTG), B) Nach Induktion (+IPTG)
22	Elution von GST-FH2
23	Elution der Volllänge (DIAPH1)

24	Unterschiedliche Kopplungsbedingungen von GST-DIAPH1 an die GST-Beads.	. 54
25	Messung der Mikrotubuli-Polymerisierung in Gegenwart von DIAPH1, FH2 und	l
	ΔFH2	. 56
26	Einfluss der Proteinkonstrukte auf die Mikrotubuli-Struktur	. 58
27	Struktur der Mikrotubuli in Anwesenheit von DIAPH1, FH2 und Δ FH2	. 60
28	Einfluss der Proteinkonstrukte auf die Mikrotubulistruktur während der	
	cold-induced-depolymerization	. 62
29	Struktur der Mikrotubuli in Anwesenheit von DIAPH1, FH2 und Δ FH2 bei	
	cold-induced-depolymerization	. 64
30	Dynamische Instabilität der Mikrotubuli (Desai & Mitchison 1997)	. 67
31	mDia1 in aktiver und autoinhibierter Form (Maiti et al. 2012)	. 70
32	Übersicht der Domänenstruktur von mDia1 und Wirkung der IMMs	
	(Lash et al. 2013)	. 76
33	Modell zur Aktivierung von DIAPH1 durch externe DAD-Peptide	. 77
34	Proteinkonstrukte: DIAPH1 (Volllänge), FH2-Domäne und Protein mit deletierte	er
	FH2-Domäne (Δ FH2)	٧III

	A 1.1	••			•
7.9.	AD	kurzur	igsver	zeichi	าเร
	~-		-9~ • •		

ABP	actin binding protein
APS	Ammonium Persulfate
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CC	Coiled-coil
Cdc42	Cell division control protein 42
	homolog
DAD	Diaphanous autoregulatory domain
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	Dimerization domain
DIAPH1 (mDia1)	Diaphanous Homolog 1
DIAPH2 (mDia3)	Diaphanous Homolog 2
DIAPH3 (mDia2)	Diaphanous Homolog 3
DID	Diaphanous inhibitory domain
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
DRF	Diaphanous-related formins
DTT	Dithiothreitol
E	Elution
ECM	extrazelluläre Matrix
Ecoli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FA	fokale Adhäsion
F-Aktin	filamentöses Aktin
FH1	Formin homology 1
FH2	Formin homology 2
Fw	forward
G-Aktin	globuläres Aktin
GBD	GTPase-binding domain

GDP	Guanosindiphosphat
Gefi	gefiltert
GSH	L-Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GST-Beads	Glutathion-Sepharose-Tag-Beads
GTP	Guanosintriphosphat
HF	High-Fidelity
HMW	high molecular weight
HIV-1	human immunodeficiency virus type 1
IMMs	intramimics
INF1	Inverted formin-1
INF2	Inverted formin-2
ITPG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LacO	Lac-Operator
MAP	Microtubule-associated protein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MT	Mikrotubuli
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
OD	optische Dichte
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PIPES	piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic
	acid)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RBD	Rho binding domain

Jessica Ecem Nojszewski | Institut für Biochemie & Signaltransduktion | UKE

Rpm	rounds per minute
Rv	reverse
SDS	Sodium dodecly sulfate
SMIFH2	small molecule inhibitor of formin
	homology 2 domain
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	NNN'N'-Tetramethylethylenediamine
TIP	plus-end tracking protein
TPB	tubulin polymerization buffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	ultraviolett
V	Volt
ΔFH2	Protein mit deletierter FH2-Domäne

8. Literaturverzeichnis

- Alberts, Arthur S. "Identification of a Carboxyl-Terminal Diaphanous-Related Formin Homology Protein Autoregulatory Domain". Journal of Biological Chemistry 276, Nr. 4 (26. Januar 2001): 2824–30.
- Al-Maawali, Almundher, Brenda J. Barry, Anna Rajab, Malak El-Quessny, Ann Seman, Stephanie Newton Coury, A. James Barkovich, u. a. "Novel Loss-of-Function Variants in *DIAPH1* Associated with Syndromic Microcephaly, Blindness, and Early Onset Seizures". American Journal of Medical Genetics Part A 170, Nr. 2 (Februar 2016): 435–40.
- Arden, Jessica D., Kari I. Lavik, Kaitlin A. Rubinic, Nicolas Chiaia, Sadik A. Khuder, Marthe J. Howard, Andrea L. Nestor-Kalinoski, Arthur S. Alberts, und Kathryn M. Eisenmann. "Small-Molecule Agonists of Mammalian Diaphanous–Related (MDia) Formins Reveal an Effective Glioblastoma Anti-Invasion Strategy". Herausgegeben von Carole Parent. *Molecular Biology of the Cell* 26, Nr. 21 (November 2015): 3704–18.
- Baarlink, Christian, Dominique Brandt, und Robert Grosse. "SnapShot: Formins". *Cell* 142, Nr. 1 (Juli 2010): 172-172.e1.
- Bartolini, F., und G. G. Gundersen. "Formins and Microtubules". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1803, Nr. 2 (Februar 2010): 164–73.
- Bartolini, Francesca, James B. Moseley, Jan Schmoranzer, Lynne Cassimeris, Bruce L. Goode, und Gregg G. Gundersen. "The Formin MDia2 Stabilizes Microtubules Independently of Its Actin Nucleation Activity". *Journal of Cell Biology* 181, Nr. 3 (5. Mai 2008): 523–36.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, und Ahmedin Jemal. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries". CA: A Cancer Journal for Clinicians 68, Nr. 6 (November 2018): 394– 424.
- Breitsprecher, Dennis, und Bruce L. Goode. "Formins at a Glance". Journal of Cell Science 126, Nr. 1 (1. Januar 2013): 1–7.
- Brouhard, Gary J. **"Dynamic Instability 30 Years Later: Complexities in Microtubule Growth and Catastrophe"**. *Molecular Biology of the Cell* 26, Nr. 7 (1. April 2015): 1207–10.

- Brouhard, Gary J., und Luke M. Rice. **"The Contribution of Aβ-Tubulin Curvature to Microtubule Dynamics"**. *The Journal of Cell Biology* 207, Nr. 3 (10. November 2014): 323–34.
- Carlier, M. F., T. L. Hill, und Y. Chen. "Interference of GTP Hydrolysis in the Mechanism of Microtubule Assembly: An Experimental Study". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81, Nr. 3 (Februar 1984): 771–75.
- Chambers, Ann F., Alan C. Groom, und Ian C. MacDonald. "Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites". *Nature Reviews Cancer* 2, Nr. 8 (August 2002): 563–72.
- Chesarone, Melissa A., Amy Grace DuPage, und Bruce L. Goode. "Unleashing Formins to Remodel the Actin and Microtubule Cytoskeletons". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, Nr. 1 (Januar 2010): 62–74.
- Delaney, Michael Keegan, Viacheslav Malikov, Qingqing Chai, Guangyuan Zhao, und Mojgan H. Naghavi. "Distinct Functions of Diaphanous-Related Formins Regulate HIV-1 Uncoating and Transport". Proceedings of the National Academy of Sciences 114, Nr. 33 (15. August 2017): E6932–41.
- Derk, Julia, Keria Bermudez Hernandez, Moises Rodriguez, Meilun He, Hyunwook Koh, Andisheh Abedini, Huilin Li, David Fenyö, und Ann Marie Schmidt. "Diaphanous 1 (DIAPH1) is Highly Expressed in the Aged Human Medial Temporal Cortex and Upregulated in Myeloid Cells During Alzheimer's Disease". Journal of Alzheimer's Disease 64, Nr. 3 (3. Juli 2018): 995–1007.
- Desai, A., und T. J. Mitchison. "Microtubule Polymerization Dynamics". Annual Review of Cell and Developmental Biology 13 (1997): 83–117.
- DeWard, Aaron D., Kathryn M. Eisenmann, Stephen F. Matheson, und Arthur S. Alberts. "The Role of Formins in Human Disease". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1803, Nr. 2 (Februar 2010): 226–33.
- Dimitrov, Ariane, Mélanie Quesnoit, Sandrine Moutel, Isabelle Cantaloube, Christian Poüs, und Franck Perez. "Detection of GTP-Tubulin Conformation in Vivo Reveals a Role for GTP Remnants in Microtubule Rescues". Science (New York, N.Y.) 322, Nr. 5906 (28. November 2008): 1353–56.
- Downing, K. H. "Structural Basis for the Interaction of Tubulin with Proteins and Drugs That Affect Microtubule Dynamics". Annual Review of Cell and Developmental Biology 16 (2000): 89–111.

- Eisenmann, K M, K J Dykema, S F Matheson, N F Kent, A D DeWard, R A West, R Tibes, K A Furge, und A S Alberts. "5q– Myelodysplastic Syndromes: Chromosome 5q Genes Direct a Tumor-Suppression Network Sensing Actin Dynamics". Oncogene 28, Nr. 39 (Oktober 2009): 3429–41.
- Ercan-Sencicek, A Gulhan, Samira Jambi, Daniel Franjic, Sayoko Nishimura, Mingfeng Li, Paul El-Fishawy, Thomas M Morgan, u. a. "Homozygous Loss of DIAPH1 Is a Novel Cause of Microcephaly in Humans". European Journal of Human Genetics 23, Nr. 2 (Februar 2015): 165–72.
- Etienne-Manneville, Sandrine. "Microtubules in Cell Migration". Annual Review of Cell and Developmental Biology 29 (2013): 471–99.
- Faix, Jan, und Robert Grosse. "Staying in Shape with Formins". *Developmental Cell* 10, Nr. 6 (Juni 2006): 693–706.
- Fidler, Isaiah J., und Margaret L. Kripke. "The Challenge of Targeting Metastasis". *Cancer and Metastasis Reviews* 34, Nr. 4 (Dezember 2015): 635–41.
- Fife, C M, J A McCarroll, und M Kavallaris. "Movers and Shakers: Cell Cytoskeleton in Cancer Metastasis: Cytoskeleton and Cancer Metastasis". *British Journal of Pharmacology* 171, Nr. 24 (Dezember 2014): 5507–23.
- Gaillard, Jeremie, Vinay Ramabhadran, Emmanuelle Neumanne, Pinar Gurel, Laurent Blanchoin, Marylin Vantard, und Henry N. Higgs. "Differential Interactions of the Formins INF2, MDia1, and MDia2 with Microtubules". Herausgegeben von Thomas D. Pollard. *Molecular Biology of the Cell* 22, Nr. 23 (Dezember 2011): 4575–87.
- Gauvin, Timothy J., Jami Fukui, Jeffrey R. Peterson, und Henry N. Higgs. "Isoform-Selective Chemical Inhibition of MDia-Mediated Actin Assembly". *Biochemistry* 48, Nr. 40 (13. Oktober 2009): 9327–29.
- Goode, Bruce L., und Michael J. Eck. "Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly". *Annual Review of Biochemistry* 76 (2007): 593–627.
- Gould, Christopher J., Sankar Maiti, Alphée Michelot, Brian R. Graziano, Laurent Blanchoin, und Bruce L. Goode. "The Formin DAD Domain Plays Dual Roles in Autoinhibition and Actin Nucleation". Current Biology 21, Nr. 5 (März 2011): 384–90.
- Grueb, Saskia S., Stefanie Muhs, Yannes Popp, Sebastian Schmitt, Matthias Geyer, Yuan-Na Lin, und Sabine Windhorst. "The Formin Drosophila Homologue of Diaphanous2 (Diaph2) Controls Microtubule Dynamics in Colorectal Cancer Cells Independent of Its FH2-Domain". Scientific Reports 9, Nr. 1 (29. März 2019): 5352.

- Haier, J, M Nasralla, und G L Nicolson. "Different Adhesion Properties of Highly and Poorly Metastatic HT-29 Colon Carcinoma Cells with Extracellular Matrix Components: Role of Integrin Expression and Cytoskeletal Components". British Journal of Cancer 80, Nr. 12 (August 1999): 1867–74.
- Hohmann, Tim, und Faramarz Dehghani. "The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork". *Cells* 8, Nr. 4 (18 2019).
- Ishizaki, Toshimasa, Yosuke Morishima, Muneo Okamoto, Tomoyuki Furuyashiki, Takayuki Kato, und Shuh Narumiya. "Coordination of Microtubules and the Actin Cytoskeleton by the Rho Effector MDia1". *Nature Cell Biology* 3, Nr. 1 (Januar 2001): 8–14.
- Jacob, F., und J. Monod. "Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins". *Journal of Molecular Biology* 3 (Juni 1961): 318–56.
- Jacquemet, Guillaume, Hellyeh Hamidi, und Johanna Ivaska. "Filopodia in Cell Adhesion, 3D Migration and Cancer Cell Invasion". Current Opinion in Cell Biology 36 (Oktober 2015): 23–31.
- Kline-Smith, Susan L., und Claire E. Walczak. "Mitotic Spindle Assembly and Chromosome Segregation: Refocusing on Microtubule Dynamics". *Molecular Cell* 15, Nr. 3 (13. August 2004): 317–27.
- Kovar, David R. "Molecular Details of Formin-Mediated Actin Assembly". Current Opinion in Cell Biology 18, Nr. 1 (Februar 2006): 11–17.
- Kühn, Sonja, und Matthias Geyer. "Formins as Effector Proteins of Rho GTPases". Small GTPases 5 (2014): e29513.
- Laemmli, U. K. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". *Nature* 227, Nr. 5259 (15. August 1970): 680–85.
- Lash, L. Leanne, Bradley J. Wallar, Julie D. Turner, Steven M. Vroegop, Robert E. Kilkuskie, Susan M. Kitchen-Goosen, H. Eric Xu, und Arthur S. Alberts. "Small-Molecule Intramimics of Formin Autoinhibition: A New Strategy to Target the Cytoskeletal Remodeling Machinery in Cancer Cells". Cancer Research 73, Nr. 22 (15. November 2013): 6793–6803.
- Le Clainche, Christophe, und Marie-France Carlier. "Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration". *Physiological Reviews* 88, Nr. 2 (April 2008): 489–513.

- Lin, Yuan-Na, Ridhirama Bhuwania, Kira Gromova, Antonio Virgilio Failla, Tobias Lange, Kristoffer Riecken, Stefan Linder, Matthias Kneussel, Jakob R. Izbicki, und Sabine Windhorst. "Drosophila Homologue of Diaphanous 1 (DIAPH1) Controls the Metastatic Potential of Colon Cancer Cells by Regulating Microtubule-Dependent Adhesion". Oncotarget 6, Nr. 21 (30. Juli 2015): 18577–89.
- Lin, Yuan-Na, Jakob R. Izbicki, Alexandra König, Jens K. Habermann, Christine Blechner, Tobias Lange, Udo Schumacher, und Sabine Windhorst. "Expression of DIAPH1 Is Up-Regulated in Colorectal Cancer and Its down-Regulation Strongly Reduces the Metastatic Capacity of Colon Carcinoma Cells: DIAPH1-Inhibition of Colon Cancer Cell Metastasis". International Journal of Cancer 134, Nr. 7 (1. April 2014): 1571–82.
- Lin, Yuan-Na, und Sabine Windhorst. "Diaphanous-Related Formin 1 as a Target for Tumor Therapy". Biochemical Society Transactions 44, Nr. 5 (15. Oktober 2016): 1289–93.
- Liotta, L. A. **"Tumor Invasion and Metastases--Role of the Extracellular Matrix: Rhoads Memorial Award Lecture"**. *Cancer Research* 46, Nr. 1 (Januar 1986): 1– 7.
- Lynch, E. D., M. K. Lee, J. E. Morrow, P. L. Welcsh, P. E. León, und M. C. King. "Nonsyndromic Deafness DFNA1 Associated with Mutation of a Human Homolog of the Drosophila Gene Diaphanous". Science (New York, N.Y.) 278, Nr. 5341 (14. November 1997): 1315–18.
- Maiti, Sankar, Alphee Michelot, Christopher Gould, Laurent Blanchoin, Olga Sokolova, und Bruce L. Goode. "Structure and Activity of Full-Length Formin MDia1". *Cytoskeleton* 69, Nr. 6 (Juni 2012): 393–405.
- Mitchison, T., und M. Kirschner. "Dynamic Instability of Microtubule Growth". *Nature* 312, Nr. 5991 (15. November 1984): 237–42.
- Mohan, Renu, und Annie John. "Microtubule-Associated Proteins as Direct Crosslinkers of Actin Filaments and Microtubules". *IUBMB Life* 67, Nr. 6 (Juni 2015): 395–403.
- Nguyen, Don X., Paula D. Bos, und Joan Massagué. "Metastasis: From Dissemination to Organ-Specific Colonization". *Nature Reviews Cancer* 9, Nr. 4 (April 2009): 274–84.
- Nürnberg, Alexander, Thomas Kitzing, und Robert Grosse. "Nucleating Actin for Invasion". *Nature Reviews. Cancer* 11, Nr. 3 (März 2011): 177–87.

- O'Shea, Karen M., Radha Ananthakrishnan, Qing Li, Nosirudeen Quadri, Devi Thiagarajan, Gopalkrishna Sreejit, Lingjie Wang, u. a. "The Formin, DIAPH1, Is a Key Modulator of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury". *EBioMedicine* 26 (Dezember 2017): 165–74.
- Palazzo, Alexander F., Tiffani A. Cook, Arthur S. Alberts, und Gregg G. Gundersen. "MDia Mediates Rho-Regulated Formation and Orientation of Stable Microtubules". Nature Cell Biology 3, Nr. 8 (August 2001): 723–29.
- Paul, Aditya S., und Thomas D. Pollard. "Review of the Mechanism of Processive Actin Filament Elongation by Formins". Cell Motility and the Cytoskeleton 66, Nr. 8 (August 2009): 606–17.
- Rizvi, Syed A., Erin M. Neidt, Jiayue Cui, Zach Feiger, Colleen T. Skau, Margaret L. Gardel, Sergey A. Kozmin, und David R. Kovar. "Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Formin-Mediated Actin Assembly". Chemistry & Biology 16, Nr. 11 (November 2009): 1158–68.
- Saxena, Meera, und Gerhard Christofori. "Rebuilding Cancer Metastasis in the Mouse". *Molecular Oncology* 7, Nr. 2 (April 2013): 283–96.
- Schiff, Peter B., Jane Fant, und Susan B. Horwitz. "Promotion of Microtubule Assembly in Vitro by Taxol". *Nature* 277, Nr. 5698 (Februar 1979): 665–67.
- Shelanski, M. L., F. Gaskin, und C. R. Cantor. "Microtubule Assembly in the Absence of Added Nucleotides". Proceedings of the National Academy of Sciences 70, Nr. 3 (15. März 1973): 765–68.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, und Ahmedin Jemal. "Cancer Statistics, 2020". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 70, Nr. 1 (Januar 2020): 7–30.
- Tamulaitiene, Giedre, und Virginijus Siksnys. **"NotI Is Not Boring"**. *Structure* 16, Nr. 4 (April 2008): 497–98.
- Ueyama, Takehiko, Yuzuru Ninoyu, Shin-Ya Nishio, Takushi Miyoshi, Hiroko Torii, Koji Nishimura, Kazuma Sugahara, u. a. "Constitutive Activation of DIA1 (DIAPH1) via C-Terminal Truncation Causes Human Sensorineural Hearing Loss". *EMBO Molecular Medicine* 8, Nr. 11 (2016): 1310–24.
- Vuik, Fanny ER, Stella AV Nieuwenburg, Marc Bardou, Iris Lansdorp-Vogelaar, Mário Dinis-Ribeiro, Maria J Bento, Vesna Zadnik, u. a. "Increasing Incidence of Colorectal Cancer in Young Adults in Europe over the Last 25 Years". Gut 68, Nr. 10 (Oktober 2019): 1820–26.
- Wade, Richard H. "On and Around Microtubules: An Overview". *Molecular Biotechnology* 43, Nr. 2 (Oktober 2009): 177–91.
- Wallar, B. J. "The Basic Region of the Diaphanous-Autoregulatory Domain (DAD) Is Required for Autoregulatory Interactions with the Diaphanous-Related Formin Inhibitory Domain". *Journal of Biological Chemistry* 281, Nr. 7 (3. Januar 2006): 4300–4307.
- Wasserman, S. "FH Proteins as Cytoskeletal Organizers". *Trends in Cell Biology* 8, Nr. 3 (März 1998): 111–15.
- Xu, Yingwu, James B. Moseley, Isabelle Sagot, Florence Poy, David Pellman, Bruce L. Goode, und Michael J. Eck. "Crystal Structures of a Formin Homology-2 Domain Reveal a Tethered Dimer Architecture". Cell 116, Nr. 5 (5. März 2004): 711–23.

9. Danksagung

Zuallererst möchte ich meiner Doktormutter und Betreuerin Prof. Dr. rer. nat. Sabine Windhorst für das spannende und interessante Thema danken. Du hast meine Arbeit stets mit viel Geduld und Verständnis unterstützt.

Ein großes Dankeschön gilt auch an Christine Blechner für ihre Zeit und Hilfe bei technischen Fragen. Ich möchte mich auch bei Shumin Miao und Themistoklis Paraschiakos bedanken, die mich in verschiedene Methoden eingeführt haben und mir bei technischen Schwierigkeiten zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Stefanie Muhs. Du hast mir mit deinem Wissen und deiner Erfahrung im Labor durch lehrreiche Anweisungen stets geholfen.

Speziell möchte ich mich auch bei Klara Petersmann und Paula Schäfer für das Korrekturlesen und ihre Unterstützung bedanken.

Zum Schluss gebührt der größte Dank meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung mein Studium ermöglichten und meinen Weg durch das Studium begleitet haben.

10. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: