

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Biochemie und Signaltransduktion

Prof. Dr. med. Georg W. Mayr

Einfluss von DIAPH1 auf das metastatische Potential von Kolonkarzinomzellen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jana Nele Leandra Jopp-Saile
Frankfurt am Main

Hamburg 2016

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.11.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Sabine Windhorst

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Stefan Linder

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
0 Arbeitshypothese und Fragestellung.....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Entstehung von Tumorzellen und Tumoren.....	2
1.2 Aktindynamik des Zytoskeletts.....	5
1.2.1 Einfluss von ABPs auf das Zytoskelett.....	7
1.3 Mikrotubulidynamik des Zytoskeletts.....	9
1.3.1 Motorproteine Kinesine und Dyneine.....	11
1.4 Interaktionen der Mikrotubuli und Aktinfilamente.....	12
1.4.1 Vesikeltransport.....	13
1.4.2 Einfluss von Rho-GTPasen auf das Zytoskelett.....	14
1.5 Auswirkungen von DIAPH1 auf das Zytoskelett.....	15
1.6 Zielsetzung.....	20
2 Material.....	21
2.1 Zelllinie.....	21
2.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	21
2.2.1 Zellmedium für HROC24.....	21
2.3 Protein-Molekulargewichtstandard.....	21
2.4 Puffer und Lösungen.....	22
2.4.1 Allgemein.....	22
2.4.2 Western Blot.....	22
2.4.3 SDS-PAGE.....	22
2.4.4 DNase Assay.....	23
2.5 Kits.....	23
2.6 Reagenzien.....	23
2.7 Antikörper.....	24
2.7.1 Primärantikörper.....	24
2.7.2 Sekundärantikörper.....	24
2.8 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.9 Geräte.....	25
2.10 Software.....	26
3 Methoden.....	27
3.1 Zellbiologische Arbeitstechnik.....	27
3.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	27
3.3 Quantifizierung des Knock-downs.....	28
3.3.1 Zellaufschluss und Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	28
3.3.2 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE.....	29
3.3.3 Spezifischer Proteinnachweis mittels Western Blot.....	30

3.4	Fluoreszenzfärbungen	31
3.4.1	Fixierung.....	31
3.4.2	Immunfluoreszenz.....	32
3.4.3	Färbung des Aktin-Zytoskeletts.....	32
3.5	DNase Assay zur Bestimmung der intrazellulären Aktinverteilung	33
3.6	Herstellung von Sphäroiden	34
3.7	Live Cell Imaging	34
3.8	Statistik	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Quantifizierung des DIAPH1 Knock-downs.....	36
4.2	Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf die Zellmorphologie.....	37
4.3	Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf die Aktinstruktur in Filopodien	41
4.4	Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf das intrazelluläre Verhältnis von G- zu F-Aktin	43
4.5	Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf die membranständige E-Cadherin Lokalisation.....	44
4.5.1	Einzelzellen	45
4.5.2	Zellaggregate	46
4.6	Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf den endosomalen Vesikeltransport.....	48
4.7	Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf Zelldynamik und Invasionsverhalten	50
5	Diskussionen	54
5.1	Autoinhibiertes DIAPH1 verstärkt Filopodien-Formation	55
5.2	Autoinhibiertes DIAPH1 verstärkt endosomalen Vesikeltransport.....	56
5.3	Autoinhibiertes DIAPH1 steigert membranständige E-Cadherin Lokalisation.....	57
5.4	Autoinhibiertes DIAPH1 steigert Invasionsverhalten der HROC24.....	59
6	Ausblick	61
7	Zusammenfassung	62
8	Summary	63
9	Literaturverzeichnis	64
10	Danksagung	71
11	Eidesstattliche Erklärung	72

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABD	Aktin-bindende Domäne
ABP	Aktin-bindendes Protein
ADF	Aktin-depolymerisierender Faktor
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arp2/3	<i>actin related protein 2/3</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
c	centi
CC	<i>coiled coil</i>
Cdc42	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
DAD	Diaphanous autoregulatorische Domäne
DD	Dimerisierungsdomäne
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
DIAPH1	Diaphanous Homolog 1
DID	Diaphanous inhibitorische Domäne
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DRF	Dianpahnous-verwandtes Formin (<i>Diaphanous-related formin</i>)
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
et al.	und andere (<i>et altera</i>)
F-Aktin	filamentöses Aktin
FH1	<i>formin homology 1</i>
FH2	<i>formin homology 2</i>
FKS	fetales Kälberserum
G-Aktin	globuläres Aktin
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GBD	GTPase-bindende Domäne
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HROC24	Zelllinie „Hansestadt Rostock Colonkarzinom 24“
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horsesradish peroxidase</i>)
HSC70	Hitzeschockprotein (<i>heat shock cognate 70 kDa protein</i>)
k	Kilo
kDA	Kilodalton
l	Liter
LPA	Lysophosphatidsäure
m	Milli

M	Mol pro Liter
M-PER	<i>Mammalian Protein Extraction Reagent</i>
mDia	murine, äquivalente Form zu DIAPH
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
Min.	Minute(n)
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
MRTF-A	<i>myocardin-related transcription factor A</i>
MTOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum
n	Nano
NC-Membran	Nitrocellulose-Membran
Nr.	Nummer
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PH	Proteinmotiv (<i>pleckstrin homology</i>)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RhoA	<i>Ras homologue A</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Seite
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
shRNA	<i>small hairpin</i> RNA
Std.	Stunde(n)
t	Zeit (<i>time</i>)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween 20
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-Monolaurat
U	Enzymeinheit
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/o	ohne (<i>without</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen
μ	Mikro

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1: Prozess der Metastasierung** 3
Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008) Molecular Biology of the Cell, 5th Edition, Garland Science, New York, U.S.A., Abingdon, U.K.; Steps in the porcess of metastasis, S. 1221. Weitergeführt durch Übersetzung und Ergänzung der Bildbeschriftungen.
- Abbildung 1-2: Aktin-reiche Protrusionen ermöglichen Invasion und Migration von Tumorzellen** 5
Nürnberg, A., Kitzing, T., Grosse, R. (2011) Nucleating actin for invasion. Nat. Rev. Cancer 11(3):177-187; Typical protrusive structures in invasive cancer cells, S. 179. Weitergeführt durch Übersetzung und Ergänzung der Bildbeschriftungen.
- Abbildung 1-3: Aktin-Nukleation und Turnover** 6
Nürnberg, A., Kitzing, T., Grosse, R. (2011) Nucleating actin for invasion. Nat. Rev. Cancer 11(3):177-187; Actin nucleation and trunover, S. 178. Weitergeführt durch Übersetzung und Ergänzung der Bildbeschriftungen.
- Abbildung 1-4: Aktinstruktur eines Lamellipodiums und Filopodiums** 8
Kovar, D. R. (2006) Molecular details of formin-mediated actin assembly. Curr. Opin. Cell Biol. 18(1):11-17; Differential regulation allows formins to manufacture long filaments that are crosslinked into polar bundles at specific cellular locations, S. 15. Weitergeführt durch vergrößerte Darstellung eines Bildausschnitts sowie Übersetzung und Ergänzung der Bildbeschriftungen.
- Abbildung 1-5: Aufbau und Struktur eines Mikrotubulus** 11
Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008) Molecular Biology of the Cell, 5th Edition, Garland Science, New York, U.S.A., Abingdon, U.K.; The structure of a microtubule and its subunits (A, B, C), S. 974 und Dynamic instability due to the structural differences between a growing and a shrinking microtubule end (C), S. 981. Weitergeführt durch Übersetzung und Ergänzung der Bildbeschriftungen.
- Abbildung 1-6: Interaktionen der Aktinfilamente und Mikrotubuli während der Zellmigration** 13
Narumiya, S., Tanji, M., Ishizaki, T. (2009) Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. Cancer Metastasis Rev. 28(1-2):65-76; Cell migration in two-dimensional culture (a), S. 68. Weitergeführt durch Übersetzung der Bildbeschriftungen.
- Abbildung 1-7: Auswirkungen von DIAPH1 auf das Zytoskelett in Anwesenheit von LPA** 16
Houben, A. J., Moolenaar, W. H. (2011) Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. Cancer Metastasis Rev. 30(3-4):557-565; Autotaxin-LPA receptor signaling, S. 558. Weitergeführt durch Übersetzung der Bildbeschriftungen und zur Anschauung erweitert um die Beschriftung RhoA und DIPAH1.
- Abbildung 1-8: Schematische Darstellung der DIAPH1 Domänen** 17
- Abbildung 1-9: Mechanismus der DIAPH1-induzierten Aktin-Polymerisation** 18
Campellone, K. G., Welch, M. D. (2010) A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11(4):237-251; Formin-mediated actin polymerization, S.29. Weitergeführt durch Bearbeitung der Bildbeschriftungen.

Abbildung 4-1: Protein- und Ladekontrollbanden zur Bestimmung des DIAPH1 Knock-down	36
Abbildung 4-2: Quantitative Darstellung der DIAPH1 Expression	37
Abbildung 4-3: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Morphologie	38
Abbildung 4-4: Verteilung der Zellform	38
Abbildung 4-5: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellausläufer	40
Abbildung 4-6: Ausprägung der Zellausläufer	41
Abbildung 4-7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Phalloidin-gefärbten Aktinstruktur	42
Abbildung 4-8: Ausprägung der Filopodien	43
Abbildung 4-9: Prozentualer intrazellulärer F-Aktinanteil	44
Abbildung 4-10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der membranständigen E-Cadherin Lokalisation bei Einzelzellen	45
Abbildung 4-11: Verteilung der membranständigen E-Cadherin Lokalisation bei Einzelzellen	46
Abbildung 4-12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der membranständigen E-Cadherin Lokalisation bei Zellaggregaten	47
Abbildung 4-13: Verteilung der membranständige E-Cadherin Lokalisation bei Zellaggregaten	47
Abbildung 4-14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Endosomen und endosomalen Cluster	49
Abbildung 4-15: Anzahl früher Endosomen und deren Fusion zu Clustern	50
Abbildung 4-16: Live Cell Imaging der HROC24 Kontroll-Zellen	51
Abbildung 4-17: Live Cell Imaging der HROC24 Knock-down-Zellen	52
Abbildung 4-18: Vergrößerter Ausschnitt des Live Cell Imagings der HROC24 Knock-down-Zellen	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der Kollagenmischung.....	35
Tabelle 4-1: Prozentuale Verteilung morphologischer Zellkriterien	38
Tabelle 4-2: Prozentuale Verteilung morphologischer Zellausläuferkriterien	41
Tabelle 4-3: Prozentuale Verteilung ausgeprägter Filopodien.....	42
Tabelle 4-4: Prozentualer F-Aktinanteil bezogen auf die gesamte intrazelluläre Aktinmenge	44
Tabelle 4-5: Prozentuale Verteilung membranständiger E-Cadherin Signale bei Einzelzellen	45
Tabelle 4-6: Prozentuale Verteilung membranständiger E-Cadherin Signale bei Zellaggregaten.....	47
Tabelle 4-7: Prozentuale Verteilung endosomaler Signale (EEA1)	49

0 Arbeitshypothese und Fragestellung

Kolorektale Karzinome gehören zu den häufigsten Tumorerkrankungen von Frauen und Männern in Industrieländern und stellen weltweit ein immer größer werdendes Problem dar. In den meisten Fällen ist die Metastasierung von kolorektalen Karzinomen nicht heilbar, sodass es notwendig ist, neue Therapieansätze zu entwickeln. Eine große Chance in der zukünftigen Tumorthherapie bieten die Identifikation und die gezielte Hemmung von metastasierungsfördernden Proteinen. Zu dieser Proteingruppe gehören Aktin-bindende Proteine (ABPs), welche die Aktindynamik von migrierenden Zellen direkt beeinflussen. Bei einigen humanen Karzinomen konnte eine Korrelation zwischen der malignen Transformation und der Überexpression von aktiviertem Diaphanous Homolog 1 (DIAPH1), einem ABP, festgestellt werden. Zu beachten ist, dass DIAPH1 in Anwesenheit von Lysophosphatidsäure (LPA) aktiviert wird und direkt die zelluläre Aktindynamik und die Stabilisierung der Mikrotubuli fördert, jedoch im autoinhibierten Zustand nur Letzteres beeinflusst.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, ob DIAPH1 im autoinhibierten Zustand ebenfalls grundlegende Schritte der Metastasierung bei HROC24 Kolonkarzinomzellen beeinflusst. Um dies zu prüfen, wurden die Auswirkungen des DIAPH1 Knock-downs auf das Aktin-Zytoskelett und auf zelluläre Vorgänge, welche entscheidend bei der Metastasierung sind, festgestellt. Hierzu wurden Morphologie, intrazelluläre Aktinverteilung, Zell-Zell-Kontakte, Filopodien-Formation, endosomaler Vesikeltransport und Invasionsverhalten untersucht. Zur Beurteilung der Auswirkungen des DIAPH1 Knock-downs wurden alle Ergebnisse denen der Kontroll-Zellen gegenübergestellt. Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse des Knock-downs zusammengefasst: erstens eine schwächere Ausprägung der Filopodien, zweitens eine reduzierte membranständige E-Cadherin Lokalisation bei Zellaggregaten und drittens eine geringere Anzahl früher Endosomen. Weiterhin wurde festgestellt, dass autoinhibiertes DIAPH1 weder die intrazelluläre Aktinverteilung noch die Morphologie der Zellen beeinflusst und somit keinen Einfluss auf die Aktindynamik hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass autoinhibiertes DIAPH1 zelluläre Vorgänge unabhängig von den Aktin-nukleierenden Eigenschaften direkt beeinflusst und darüber möglicherweise das metastatische Potential der HROC24 Kolonkarzinomzellen fördert. Dies macht DIAPH1 nicht nur im aktivierten, sondern auch im autoinhibierten Zustand zu einem interessanten Target für die individuelle Tumorthherapie.

1 Einleitung

1.1 Entstehung von Tumorzellen und Tumoren

Während der Karzinogenese ist der Mechanismus der Metastasierung ein relevanter klinischer Schritt, der wegen des mehrstufigen Prozesses schwierig zu erfassen ist. Sind Tumorzellen einmal metastasiert, ist es fast unmöglich, den Tumor komplett zu entfernen. Dies führt häufig zum Tod des Patienten (Christofori, 2006).

Tumore entstehen durch persistierende Mutationen in einer Zelle, jedoch müssen die Nachkommen dieser Zelle weitere Veränderungen durchlaufen, um zu Tumorzellen zu transformieren. Dafür sind viele zusätzliche Mutationen und epigenetische Veränderungen erforderlich. Ein wichtiger Faktor der Tumorentstehung sind Veränderungen innerhalb der Signalwege, welche unter physiologischen Umständen Zellproliferation und Zytokinese regulieren oder Apoptose induzieren. Diese Veränderungen fördern Zellüberleben und Proliferation von Tumorzellen. Klone aberranter Zellen zeigen eine genetische Instabilität, wodurch die Akkumulation weiterer genetischer und epigenetischer Veränderungen beschleunigt und die Tumorprogression gefördert wird. Jedoch ist die Tumorentwicklung nicht nur von Veränderung innerhalb der Tumorzellen abhängig, sondern wird zudem durch Zellen aus der Umgebung des Tumors beeinflusst (vgl. zu diesem Abschnitt: Alberts et al., 2008; Weinberg, 2014).

Während der Invasion und Metastasierung besitzen Tumorzellen eine große Beweglichkeit. Diese kommt durch die Veränderung des Phänotyps von unbeweglich epithelialen zu beweglich mesenchymalen Zellen zustande und wird durch extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren und Hormone, induziert (Weinberg, 2008). Der beschriebene Prozess wird als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet und befähigt Tumorzellen, sich an die extrazelluläre Matrix (ECM) anzuhafte (Lee et al., 2006; Liang, 2011; Yilmaz and Christofori, 2009). Tumorzellen können Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sezernieren, welche den Abbau der ECM durch Spaltung von Peptidbindungen fördern und dadurch die Migration in das angrenzende Gewebe erleichtern (Jacob and Prekeris, 2015; Weinberg, 2008; Yilmaz and Christofori, 2009). Für die Formation und Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten sind E-Cadherine entscheidend, welche die Ausbildung der meisten Epithelschichten bewirken. Der Verlust von E-Cadherinen ermöglicht durch defekte

epitheliale Zell-Zell-Kontakte, dass sich einzelnen Zellen oder Zellgruppen aus dem Gewebeverband lösen und die ECM durchdringen können. (Cavallaro and Christofori, 2004; Christofori, 2006; Conacci-Sorrell et al., 2002; Perl et al., 1998). Alternativ zur EMT existiert der Prozess der kollektiven Migration. Bei der kollektiven Migration ziehen epitheliale Tumorzellen beim Loslösen vom Primärtumor benachbarte Zellen mit sich und dringen als Kollektiv in das angrenzende Geweben ein (Cai et al., 2014). Dafür sind E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte entscheidend. Diese befähigen das Zellkollektiv, Signale der führenden Leading-Zelle an die nachfolgenden Zellen zu transmittieren und eine übergreifende Zellpolarität auszubilden (Cai et al., 2014). Die grundlegende Einheit für die adhärenenten Verbindungen ist der Cadherin-Catenin-Komplex, der über Rho-GTPasen, insbesondere *Ras homologue A* (RhoA), *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) und *cell division control protein 42 homolog* (Cdc42), reguliert wird (Fukata and Kaibuchi, 2001). Eine Interaktion zu Aktinfilamenten kann durch α -Catenin Homodimere (Weis and Nelson, 2012) und p120-Catenin (Boguslavsky et al., 2007) aufgebaut werden. Zudem kann der Cadherin-Catenin-Komplex auch mit Mikrotubuli, einem weiteren Bestandteil des Zytoskeletts, interagieren (Chen et al., 2003; Ligon et al., 2001; Yanagisawa et al., 2004).

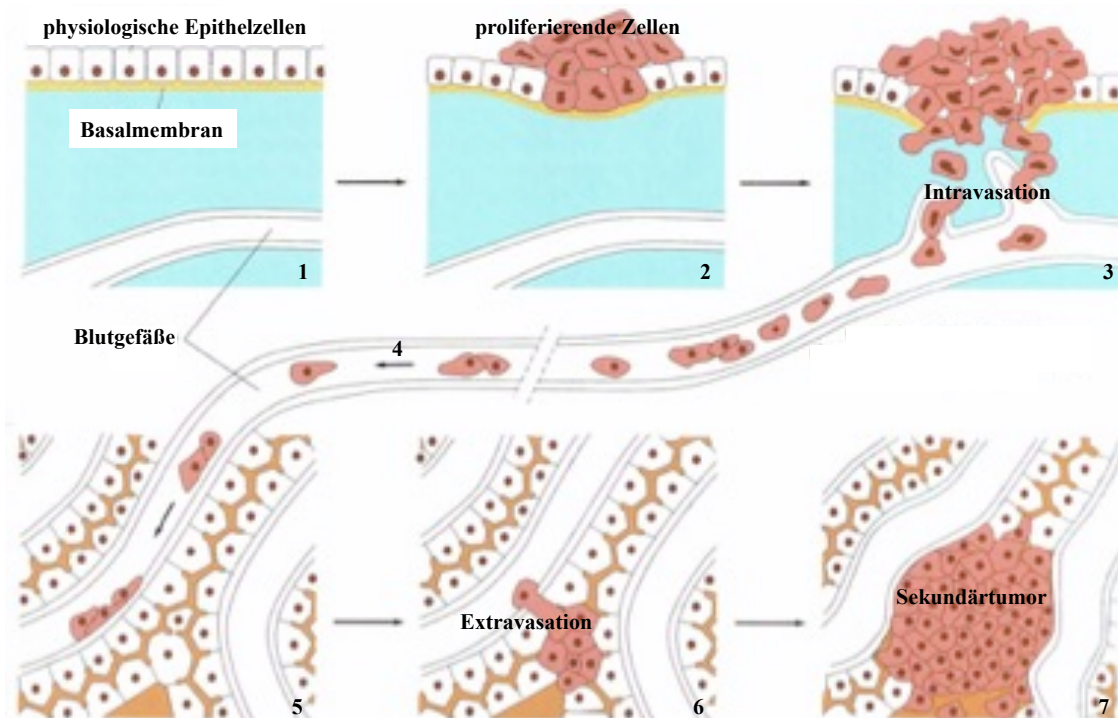


Abbildung 1-1: Prozess der Metastasierung. 1) Physiologische Epithelzellen 2) Zellproliferation von Epithelzellen fördert benigne Tumorentstehung 3) Tumorzellen durchdringen ECM und migrieren in Blutgefäße (Intravasation) 4) Tumorzellen zirkulieren mit Blutfluss 5) Tumorzellen binden an luminalen Endothelzellen 6) Tumorzellen durchdringen Blutgefäße (Extravasation) und bilden Mikrometastasen 7) Bildung von Metastasen (Sekundärtumor).

Gelangen Tumorzellen zu den Blutgefäßen, können sie in diese eindringen und mit dem Blutfluss zirkulieren (Intravasation) (Weinberg, 2008). Um ein Organ zu besiedeln und Metastasen zu bilden, müssen Tumorzellen die Blutgefäße wieder verlassen (Extravasation) (Christofori, 2006; Weinberg, 2008). Während der Extravasation werden zirkulierende Tumorzellen durch den Blutstrom verlangsamt. Sie binden an die luminalen Seite des vaskulären Endothels und werden während der Adhäsion abgeflacht (Alberts et al., 2008; Weinberg, 2008). Nach Verlassen der Blutgefäße können sich Tumorzellen im Gewebe ausbreiten und durchlaufen bei der Bildung von Metastasen eine mesenchymale-epitheliale Transition (MET) (Chaffer et al., 2007) (Abbildung 1-1). Zum Wachsen benötigen Tumore eine adäquate Blutversorgung. Dafür sezernieren Tumorzellen Angiogenese-Signale, welche die Ausbildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) induzieren (Alberts et al., 2008; Christofori, 2006).

Den ersten Schritt der Metastasierung stellen die zellulären Interaktionen von Tumorzellen mit der ECM dar. Um an die ECM zu binden, bilden Zellen Filopodien und fokale Adhäsionen aus (Ciobanasu et al., 2012). Filopodien sind fadenförmige Aktin-reiche Plasmaausstülpungen, welche während der Zellmigration mit ihrem Leitsaum die Umgebung nach geeigneten Anheftungsbedingungen absuchen (Le Clainche and Carlier, 2008). Anschließend bilden sie über fokale Komplexe Kontakte zur ECM aus (Goh and Ahmed, 2012; Le Clainche and Carlier, 2008). Fokale Adhäsionen bestehen hauptsächlich aus Integrinen, welche als transmembrane Glykoproteine fest in der Zellmembran verankert sind und über Bindungsstellen mit Proteinkinasen und über Gerüstproteine mit ABPs interagieren. Dies ermöglicht Integrinen, zum einen an die ECM und zum anderen an die Aktinstruktur von Filopodien zu binden, wodurch Zell-Matrix-Kontakte entstehen (Ciobanasu et al., 2012). Durch die transmembrane Verbindung der ECM und des Zytoskeletts sind Integrine befähigt, Signale in beide Richtungen über die Plasmamembran zu transportieren. Dadurch können Zellproliferation, Zelldifferenzierung und verschiedene Signalkaskaden beeinflusst werden (Alberts et al., 2008).

Die Integrin-vermittelte Signaltransduktion induziert nach ausgebildetem Zellkontakt mit der ECM die Formation von Invadopodien. Diese Aktin-reichen, quervernetzten Membranprotrusionen (Nürnberg et al., 2011) können MMPs sezernieren (Jacob and Prekeris, 2015). Durch die Degeneration der ECM gelangen Tumorzellen unter die endotheliale Schicht. Nach Durchdringen der ECM werden Lamellipodien oder blasenartige Ausstülpungen (Blebs) für die Fortbewegung benötigt. Lamellipodien sind

zweidimensionale Zellausstülpungen, die den Zellen durch die quervernetzten Aktinbündel Zugfähigkeit bei der mesenchymalen Migration durch das Bindegewebe verleihen (Le Clainche and Carlier, 2008; Nürnberg et al., 2011). Alternativ werden bei der amöboiden Migration blasenartige Ausstülpungen gebildet (Nürnberg et al., 2011) (Abbildung 1-2). Die Kontraktion des Zellkörpers erfolgt durch Aktin-Myosin-vermittelte Kontraktion der Aktinbündel und ermöglicht dadurch die vorwärts gerichtete Bewegung (Le Clainche and Carlier, 2008).

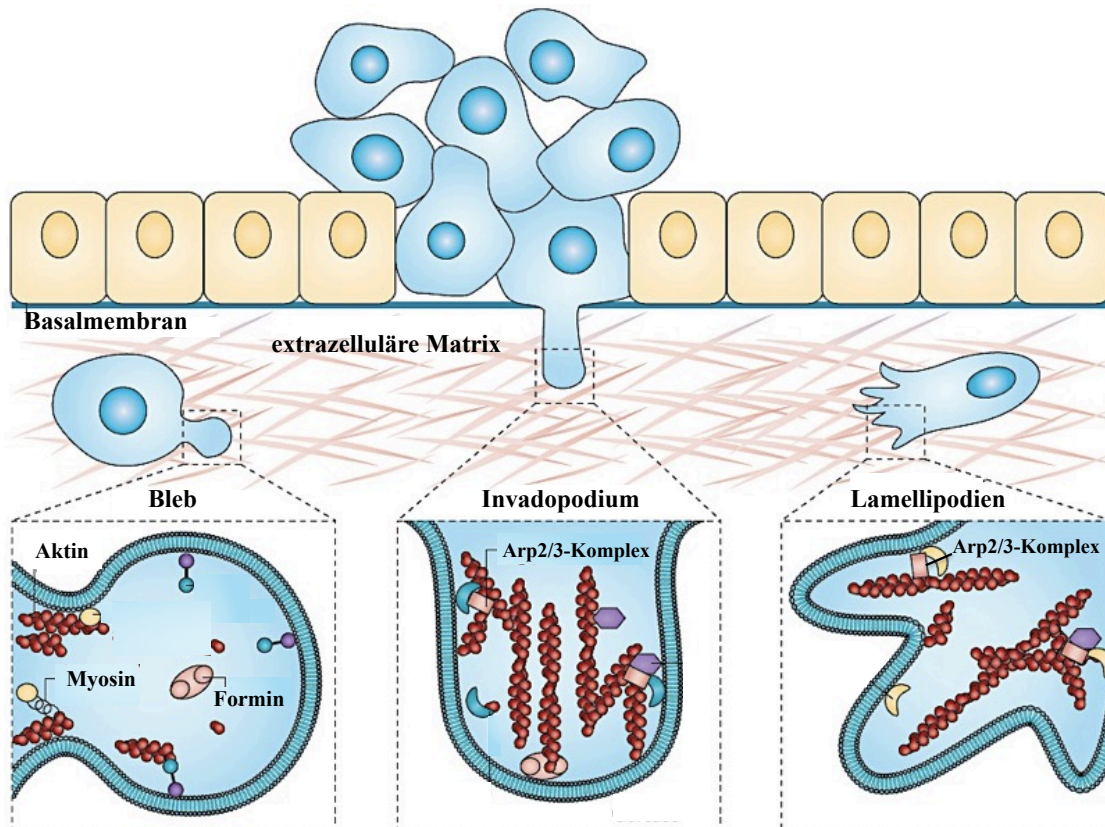


Abbildung 1-2: Aktin-reiche Protrusionen ermöglichen Invasion und Migration von Tumorzellen. Bei der Invasion bilden Tumorzellen typische Protrusionen aus, wie Blebs, Invadopodien oder Lamellipodien. Invadopodien bewirken die Degeneration der ECM, Lamellipodien und Blebs sind für die Migration erforderlich. Diese Aktin-reichen Membranausstülpungen sind abhängig von der Nukleation und Anordnung der Aktinfilamente, welche durch ABPs beeinflusst werden.

1.2 Aktindynamik des Zytoskeletts

Die Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts in eukaryotischen Zellen bewirkt eine dynamische Veränderung der Morphologie und ermöglicht den Zellen, gerichtete Bewegungen auszuführen. Diese dynamischen Veränderungen bewirken nicht nur eine Transformation der Zellstrukturen, sondern auch die Translokation des gesamten Zellkörpers (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Le Clainche and Carlier, 2008; Mitchison and Cramer, 1996). Grundlegend hierfür ist das Aktin-Zytoskelett, ein

komplexes Netzwerk aus Proteinfilamenten, welches ständig dynamischen Umbauprozessen unterliegt (Le Clainche & Carlier 2008). Dadurch spielt das Aktin-Zytoskelett bei vielen zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle. Dazu gehören unter anderem Morphologie, mechanische Zellstabilität, Proliferation, Adhäsion, Migration und Transportvorgänge (Alberts et al., 2008).

Das Aktin-Zytoskelett besteht aus filamentösen Aktinsträngen (F-Aktin), welche ATP-abhängig aus monomerem Aktin (G-Aktin) polymerisiert werden (Alberts et al., 2008). Zwei Ketten aus polymerisiertem G-Aktin bilden die helikale Struktur eines F-Aktinstrangs. F-Aktin besitzt ein schnell wachsendes Plus-Ende, das ATP-gebundenes G-Aktin einbaut. Am gegenüberliegenden Minus-Ende dissoziiert ADP-gebundenes G-Aktin, da hier die Hydrolyse von ATP zu ADP schneller abläuft als der Einbau von ATP-gebundenem G-Aktin. Liegt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation vor, spricht man von einem Tretmühlenmechanismus. Bei diesem Zustand entspricht die Polymerisierungsrate am Plus-Ende ungefähr der Depolymerisierungsrate am Minus-Ende, sodass kein Nettowachstum erfolgt (Le Clainche and Carlier, 2008; Watanabe, 2010).

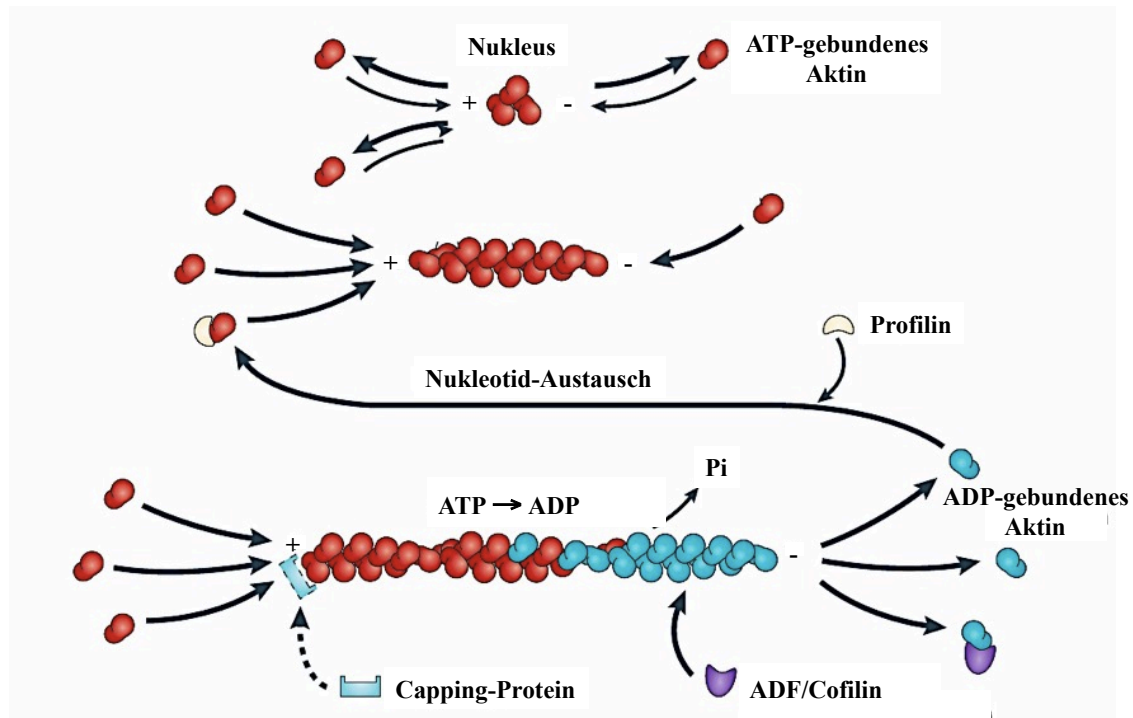


Abbildung 1-3: Aktin-Nukleation und Turnover. Nachdem ein Aktin-Nukleus geformt ist, lagert sich monomeres Aktin an das Plus-Ende, welches schneller wächst als das gegenüberliegende Minus-Ende. Die ATPase-Aktivität von Aktin fördert das Wachstum der Filamente, wohingegen die spontane ATP-Hydrolyse eine Destabilisierung der Filamente bewirkt. ADF/Cofilin unterstützen den Abbau von Aktin. Profilin bindet dissoziiertes ADP-gebundenes Aktin, fördert den Nukleotid-Austausch und kontrolliert den Einbau von ATP-gebundenem Aktin am Plus-Ende. Capping-Proteine können sich an das Plus-Ende anlagern und die ATP-Elongation inhibieren. Das Gleichgewicht von Polymerisation am Plus-Ende und Depolymerisation am Minus-Ende wird als Tretmühlenmechanismus bezeichnet.

Die Kinetik des Auf- und Abbaus der Filamente kann durch ABPs und akzessorische Proteine beschleunigt und verlangsamt werden. Diese Proteine binden entweder an die freie Aktinuntereinheit oder direkt an die Filamente (Le Clainche and Carlier, 2008; Nürnberg et al., 2011) (Abbildung 1-3). Die Vielfalt dieser Proteine spiegelt sich in den unterschiedlichen Strukturen und Funktionen des Aktin-Zytoskeletts wieder. Dabei spielt die Regulation von Prozessen, welche die Nukleation neuer Aktinfilamente initiieren, eine entscheidende Rolle (Campellone and Welch, 2010). Zur Initiation der Polymerisation werden zusätzlich Nukleationskeime benötigt, die konzentrationsabhängig aus G-Aktin entstehen oder durch Nukleator-Proteine vermittelt werden (Campellone and Welch, 2010; Nürnberg et al., 2011). Die Nukleation der meisten Aktinfilamente ist in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert (Alberts et al., 2008).

1.2.1 Einfluss von ABPs auf das Zytoskelett

Die dynamische Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts wird bei zellulären, Aktin-abhängigen Prozessen durch ABPs und akzessorischen Proteinen reguliert (Campellone and Welch, 2010; Le Clainche and Carlier, 2008). Zu dieser großen Gruppe gehören Proteine, welche Aktin polymerisieren (Aktin-Nukleatoren), Aktin depolymerisieren (z.B. Aktin-depolymerisierender Faktor (ADF) und Cofilin), Aktinfilamente bündeln und / oder quervernetzen (z.B. Filamine und Fimbrin) oder die Kontraktion von Aktin-Myosin-Filamenten stimulieren (nicht-muskuläres Myosin II) (Alberts et al., 2008; Bernstein and Bamberg, 2011; Campellone and Welch, 2010; Ono, 2007; Vicente-Manzanares et al., 2009).

Die zwei bekanntesten Gruppen von Aktin-Nukleatoren sind *actin related protein 2/3* (Arp2/3-Komplex) und Formine (DIAPH1-3), die auf unterschiedliche Weise die Struktur und Formation der Aktinfilamente beeinflussen (Campellone and Welch, 2010). Formine bilden lange gerade Aktinfilamente aus, die durch Proteine, wie z.B. Fimbrin, α -Aktinin oder Spektrin, zu parallel angeordneten, eindimensionalen Bündeln vernetzt werden (Alberts et al., 2008). Filopodien, welche an den Enden von Lamellipodien lokalisiert sind, stellen ein Beispiel für die Formin-induzierte Aktin-Nukleation dar (Le Clainche and Carlier, 2008). Der zweite bekannte Aktin-Nukleator, Arp2/3-Komplex, bildet eine komplexe netzartige Struktur, die durch Proteine, wie z.B. Filamine, querverbunden wird und somit ein lockeres Netzwerk aus Aktinfilamenten bildet (Alberts et al., 2008). Diese Art des Zytoskeletts befindet sich in Lamellipodien

und Invadopodien (Nürnberg et al., 2011). Die zwei unterschiedlichen Filament-vernetzenden Proteingruppen bewirken entweder das Bündeln von Aktinfilamenten, z.B. in Filopodien oder die Ausbildung eines Aktin-Netzwerks, z.B. in Lamellipodien (Alberts et al., 2008) (Abbildung 1-4).

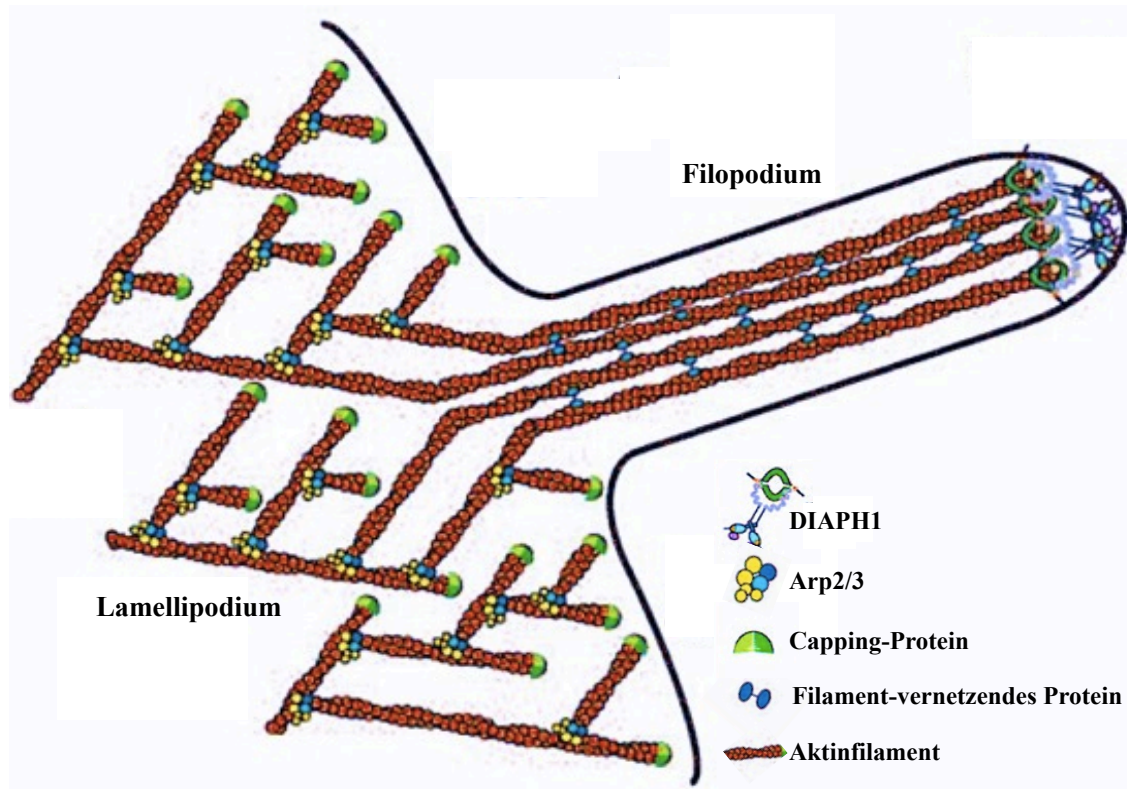


Abbildung 1-4: Aktinstruktur eines Lamellipodiums und Filopodiums. Der Arp2/3-Komplex bildet in Lamellipodien eine komplexe, netzartige Aktinstruktur, welche durch Filament-vernetzende Proteine querverbunden wird. An den Enden von Lamellipodien sind Filopodien lokalisiert. Die Aktinstruktur der Filopodien wird durch Formine wie DIAPH1 gebildet und besteht aus langen Aktinfilamenten, welche durch Filament-vernetzende Proteine parallel gebündelt werden. Capping-Proteine binden vorwiegend an das schnell wachsende Plus-Ende und verhindern den Einbau von Aktinmonomeren.

Weiterhin ist der Auf- und Abbau der Aktinfilamente abhängig von Elongations-fördernden ABPs, destabilisierenden ABPs und Capping-Proteinen.

Profilin ist ein Elongations-förderndes Protein, das entscheidend die Formin-induzierte Aktin-Polymerisation beeinflusst, da hierfür Profilin-gebundenes Aktin benötigt wird (Alberts et al., 2008; Le Clainche and Carlier, 2008; Nürnberg et al., 2011). Durch das Binden von Profilin an G-Aktin wird der Austausch von ADP zu ATP erleichtert (Le Clainche and Carlier, 2008) und die Aktinbindestelle, die mit dem Minus-Ende des F-Aktinstrangs assoziiert ist, blockiert. Dadurch kann der Profilin-Aktin-Komplex nur an das Plus-Ende des F-Aktinstrangs angelagert werden und fördert dort die Elongation der Filamente. Der Einbau von G-Aktin bewirkt eine Konformationsänderung des Aktinmoleküls, wodurch die Affinität zu Profilin gesenkt wird und dieses dissoziiert (Alberts et al., 2008).

Im Gegensatz zu den Elongations-fördernden ABPs gehören ADF/Cofilin zu den destabilisierenden ABPs, welche den Abbau des Aktinstrangs bewirken (Bernstein and Bamburg, 2011; Ono, 2007). Ungewöhnlich ist, dass ADF/Cofilin sowohl an Aktinfilamente als auch an freie Aktinuntereinheiten der Filamente binden. Durch das Binden von ADF/Cofilin an die Aktinuntereinheiten wird die Aktin-Helix stärker gewunden. Dies bewirkt eine Schwächung der Filamentstruktur, sodass ADP-gebundenes Aktin leichter vom Minus-Ende dissoziieren kann (Alberts et al., 2008).

Zudem können Capping-Proteine den Einbau von Aktinmonomeren verhindern, indem sie an das schnell wachsende Plus-Ende der Aktinfilamente binden. Durch das inaktive Plus-Ende wird die Polymerisation und Depolymerisation stark verlangsamt (Alberts et al., 2008; Le Clainche and Carlier, 2008).

Festzustellen ist, dass für einen effektiven Aktinumbau und eine präzise Modulation der Aktinfilamente die Regulation und Koordination der ABPs und akzessorischen Proteine entscheidend sind. Ist das Zusammenspiel dieser Proteine gestört, oder bleiben stimulierende Reize aus, ist die Aktindynamik beeinträchtigt und wirkt sich negativ auf Adhäsion, Migration und Invasion aus. Fehlregulationen des Aktin-Zytoskeletts können Dysplasien im Gewebe und Prozesse der Karzinogenese fördern (Kanaan et al., 2010; Nürnberg et al., 2011).

1.3 Mikrotubulidynamik des Zytoskeletts

Mikrotubuli bilden neben Aktin- und Intermediärfilamenten das Zytoskelett in eukaryotischen Zellen und sind entscheidend für die mechanische Zellstabilität und Aufrechterhaltung der Zellform. Zudem beeinflussen Mikrotubuli im Zusammenhang mit weiteren Motorproteinen sowohl die Aufrechterhaltung der Membranprotrusionen am vorderen Zellende als auch die Retraktion des hinteren Zellendes, den Aufbau der Zellpolarität sowie die Regulation von Adhäsionen, Vesikeltransporten und Recyclingprozessen (Etienne-Manneville, 2013; Watanabe et al., 2005). Durch Modulation dieser Prozesse wird die gerichtete Zellmigration durch Mikrotubuli gezielt beeinflusst.

Mikrotubuli sind aus Tubulin-Heterodimeren aufgebaut, die aus α - und β -Tubulin bestehen und über kovalente Verbindungen eng miteinander verbunden sind. Jedes α - und β -Monomer besitzt eine Bindungsstelle für GTP. Im Unterschied zu α -Tubulin kann β -Tubulin GTP hydrolysieren und beeinflusst dadurch entscheidend die Dynamik

der Mikrotubuli. Die röhrenförmige Struktur der Mikrotubuli basiert auf 13 parallel angeordneten Protofilamenten, die aus Heterodimeren aufgebaut sind und abwechselnd α - und β -Tubulin aufweisen. Für die Formation der Mikrotubuli bilden die Tubulin-Heterodimere longitudinale Verbindungen zwischen α - und β -Tubulin der angrenzenden Heterodimere. Die entstandenen Protofilamente werden durch Verbindungen zwischen benachbarten Monomeren desselben Subtyps (α - α und β - β) vernetzt. Die Verbindungen innerhalb der Mikrotubuli bewirken, dass dynamische Ein- und Abbauprozesse der Heterodimere ausschließlich an den Mikrotubuli-Enden stattfinden, wodurch die Stabilität der Mikrotubuli begünstigt wird. Die strukturelle Polarität der Mikrotubuli basiert auf der parallelen Ausrichtung der Protofilamente und der richtungsgleichen Anordnung der Heterodimere, wobei α -Tubulin am Minus- und β -Tubulin am Plus-Ende exponiert wird. Analog zu F-Aktin besitzen auch Mikrotubuli ein schnell wachsendes dynamisches Plus-Ende. Dieses ist bei Mikrotubuli in der Zellperipherie lokalisiert, wohingegen das Minus-Ende im Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) nahe des Zellkerns aufzufinden ist. Die dynamische Instabilität der Mikrotubuli basiert auf dem konzentrationsabhängigen Ein- und Abbau der Heterodimere, der bevorzugt am Plus-Ende erfolgt. Oberhalb der kritischen Konzentration werden GTP-gebundene Heterodimere polymerisiert, wobei GTP zu GDP hydrolysiert wird. Dadurch entsteht am Plus-Ende eine Kappe aus GTP-gebundenen Heterodimeren, woran eine Kette aus GDP-gebundenen Untereinheiten in Richtung des negativen Endes folgt. Die Depolymerisierung erfolgt, wenn die Hydrolyse schneller abläuft, als der Einbau von GTP-gebundenen Heterodimeren. In diesem Fall kommt es zum Zerfall des zuletzt gebundenen Heterodimers am Plus-Ende. Dieser Vorgang wird unterbrochen, wenn sich GTP-gebundene Homodimere an den depolymerisierenden Mikrotubulistrang anlagern und eine neue Kappe ausbilden (Abbildung 1-5). Die Stabilisierung der Mikrotubuli kann durch das Binden von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen an das Plus-Ende unterstützt werden. (vgl. zu diesem Abschnitt: Nogales, 2001; Desai & Mitchison, 1997; Alberts et al., 2008)

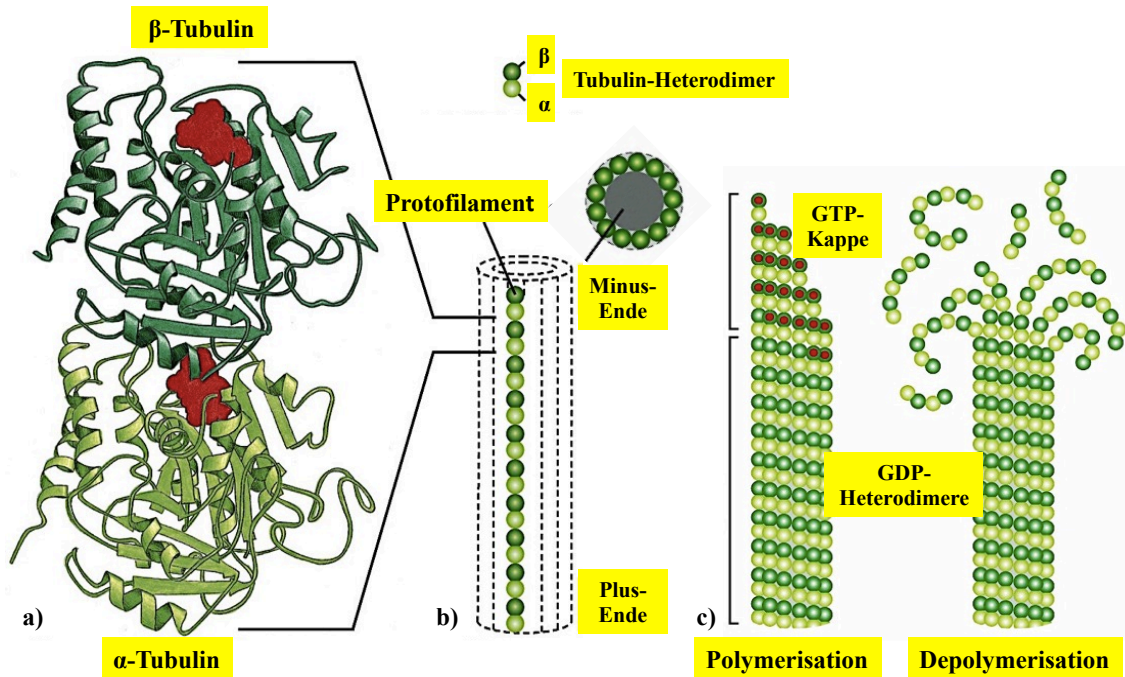


Abbildung 1-5: Aufbau und Struktur eines Mikrotubulus. a) Ein Tubulin-Heterodimer besteht aus α - und β -Tubulin, welche durch kovalente Bindungen eng miteinander verbunden sind. GTP wird sowohl von α -Tubulin als auch von β -Tubulin gebunden. In α -Tubulin ist das GTP-Molekül so fest gebunden, dass es als integraler Bestandteil des Proteins angesehen werden kann, wohingegen in β -Tubulin das GTP-Molekül weniger fest gebunden ist und entscheidend die Dynamik der Mikrotubuli beeinflusst. Nukleotide sind rot dargestellt. b) Die drei schematischen Darstellungen zeigen ein Tubulin-Heterodimer, ein Protofilament und die Querschnittsaufsicht eines Mikrotubulus. Ein Protofilament ist aus Heterodimeren aufgebaut, welche dieselbe Ausrichtung aufweisen. 13 parallel angeordnete Protofilamente bilden die röhrenförmige Struktur eines Mikrotubulus. c) Die dynamische Instabilität der Mikrotubuli basiert auf dem konzentrationsabhängigen Ein- und Abbau von Heterodimeren. Die GTP-Kappe am Plus-Ende eines Mikrotubulus, welche aus GTP-gebundenen Heterodimeren besteht, verleiht dem Mikrotubulus Stabilität. Danach folgen die Proteinfilamente, die aus GDP-gebundenen Heterodimeren aufgebaut sind. Die verschiedenen Verbindungen der Heterodimere innerhalb des Mikrotubulus stabilisieren die lineare Konformation. Der Einbau von GTP-gebundenen Heterodimeren bewirkt das Wachstum des Mikrotubulus am Plus-Ende. Die Depolymerisation des Mikrotubulus erfolgt, wenn die Hydrolyse schneller abläuft, als der Einbau von GTP-gebundenen Heterodimeren.

1.3.1 Motorproteine Kinesine und Dyneine

Kinesine und Dyneine sind Motorproteine, die an Mikrotubuli binden und unter ATP-Verbrauch Vesikel und Zellorganellen transportieren (Hirokawa, 1998; Vale, 2003).

Kinesine transportieren Vesikel und Zellorganellen meist vom Minus- zum Plus-Ende der Mikrotubuli und bewerkstelligen somit den gerichteten Transport vom Zellkern in die Zellperipherie bzw. an die Zellmembran (anterograder Transport) (Hirokawa, 1998; Hirokawa et al., 2009; Vale, 2003). Einige Kinesine, wie Kinesin-14, bilden eine Ausnahme für die Transportrichtung, da sie das Transportgut vom Plus- zum Minus-Ende der Mikrotubuli befördern (Alberts et al., 2008). Neben dem Vesikeltransport besitzen Kinesine zudem eine spezifische Rolle bei der Spindelbildung und der Separierung von Chromosomen während der Zytokinese

(Goshima and Vale, 2005). Dyneine ermöglichen den Transport in entgegengesetzter Richtung zu den Kinesinen. Hier erfolgt der gerichtete Transport vom Plus- zum Minus-Ende der Mikrotubuli, wodurch Vesikel und Zellorganellen von der Zellmembran bzw. Zellperipherie zum MTOC transportiert werden (retrograder Transport) (Hirokawa, 1998; Kikkawa, 2013; Vale, 2003; Xiang et al., 2015).

Beide Motorproteine bilden Dimere und besitzen eine Kopf- bzw. Motordomäne und eine Schwanzdomäne. Mit der Motordomäne binden Kinesine und Dyneine an die Mikrotubulifilamente. Innerhalb der Motordomäne befindet sich die katalytische Domäne, die durch ATP-Hydrolyse die benötigte Energie für den Transport bereitstellt. Die ATP-Hydrolyse bewirkt eine Konformationsänderung der Motordomäne, wodurch die Bewegung des Motorproteins entlang der Mikrotubuli in die entsprechende Richtung erfolgt. Die Schwanzdomäne besitzt eine Bindungsstelle für die zu transportierenden Vesikel und Zellorganellen (vgl. zu diesem Abschnitt: Vale, 2003; Alberts et al., 2008).

1.4 Interaktionen der Mikrotubuli und Aktinfilamente

Viele grundlegende zelluläre Prozesse wie Motilität, Zytokinese, gerichtete Migration, Transportvorgänge und Wundheilung werden durch Interaktionen von Mikrotubuli und Aktinfilamenten ermöglicht (Rodriguez et al., 2003; Schober et al., 2007). Sowohl Mikrotubuli als auch Aktinfilamente bewirken durch ihre polarisierte Struktur intrazelluläre Reorganisation, Veränderungen der Zellform und Anpassung der Migrationsrichtung an extrazelluläre Bedingungen (Rodriguez et al., 2003). Die Zellmotilität basiert auf dem Zusammenspiel beider Filamentsysteme und ist entscheidend bei der Formation von Membranprotrusionen und der Regulation von Zellretraktion (Schober et al., 2007) (Abbildung 1-6). Durch die Koordination dieser Filamentsysteme und den Aufbau einer polarisierten Zellmorphologie wird die gerichtete Zellbewegung entscheidend beeinflusst (Ishizaki et al., 2001; Rodriguez et al., 2003) und ermöglicht die Invasion von Tumorzellen.

Die Interaktionen der Mikrotubuli und Aktinfilamente basieren auf regulatorischen Effekten durch die jeweiligen Signalkaskaden und auf strukturellen Verbindungen durch die statische oder dynamische Kopplung beider Filamentsysteme (Rodriguez et al., 2003). Kleine Rho-GTPasen sind ein gutes Beispiel für die regulatorischen Interaktionen der Mikrotubuli und Aktinfilamente. RhoA reguliert durch die

Aktivierung von DIAPH1 zum einen die Aktin-Polymerisation und vermittelt zum anderen die Stabilisierung der Mikrotubuli (Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001).

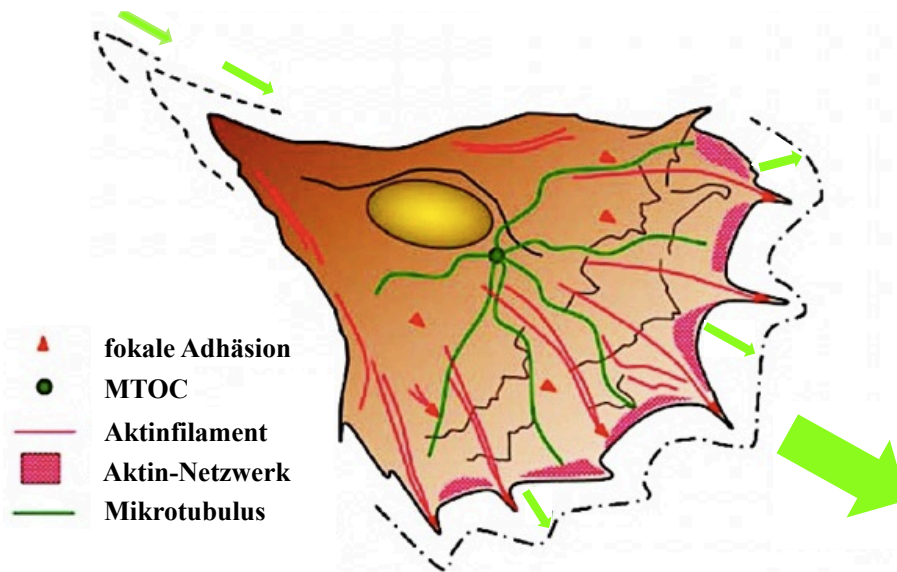


Abbildung 1-6: Interaktionen der Aktinfilamente und Mikrotubuli während der Zellmigration. Bei der Zellmigration polarisiert die Zelle in Migrationsrichtung, dies ist visualisiert durch grüne Pfeile. An der Zellfront werden Membranprotrusionen und in der Schwanzregion Retraktionen ausgebildet. Mikrotubuli polymerisieren vom MTOC, welches meist vor dem Nukleus lokalisiert ist, zur Zellfront. Dort werden die Plus-Enden der Mikrotubuli stabilisiert und interagieren mit Aktinfilamenten von Lamellipodien und Filopodien.

1.4.1 Vesikeltransport

Ein intakter Vesikeltransport ist sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei der Metastasierung von entscheidender Bedeutung.

Vesikel können entlang der Mikrotubuli und Aktinfilamente transportiert werden und nahtlos zwischen beiden Filamentsystemen wechseln (Apodaca, 2001; Bryant and Stow, 2004; Caswell et al., 2009; Goode et al., 2000). Generell werden Mikrotubuli für weitreichende, Zell-durchquerende Transporte verwendet, wohingegen Aktinfilamente für kurze Transportwege unterhalb des Zellkortex zur Verfügung stehen (Goode et al., 2000). Der Transport entlang der Filamente erfolgt durch Motorproteine (Vale, 2003).

Unter physiologischen Bedingungen sind Vesikeltransporte unter anderem wichtig für Endozytose, Exozytose, den richtigen Einbau von Proteinen in die Zellmembran, insbesondere von Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen, sowie die anschließenden Recyclingvorgänge (Bryant and Stow, 2004; Goode et al., 2000; Matteoni and Kreis, 1987; Stehbens and Wittmann, 2012; Stehbens et al., 2006). Bei Exozytose und Endozytose spielt der Vesikeltransport entlang der Mikrotubuli eine entscheidende

Rolle. Durch den Vorgang der Endozytose wird zellfremdes Material in Transportvesikel aufgenommen, die zu Endosomen fusionieren. Für den Transport müssen Endosomen zunächst entlang der subkortikalen Aktinfilamente zu tiefer gelegenen Mikrotubuli transportiert werden (Fernandez-Borja et al., 2005). Anschließend werden diese entlang der Mikrotubuli durch die Interaktion mit Dynein ins Zellinnere transportiert (Alberts et al., 2008; Xiang et al., 2015). Dort verschmelzen Endosomen entweder mit Lysosomen, wodurch der Abbau bzw. die Freisetzung von intravesikulären Stoffen bewerkstelligt wird, oder sie werden über einen weiteren Mechanismus recycelt, erreichen wieder die Zellmembran und verschmelzen mit dieser (Alberts et al., 2008). Weiterhin können Mikrotubuli-abhängige Recyclingvorgänge fokale Adhäsionen modulieren, wodurch das Binden von Zellen an die ECM während der gerichteten Zellmigration beeinflusst wird (Etienne-Manneville, 2013; Stehbens and Wittmann, 2012; Yamana et al., 2006).

Analog zu normalen Zellen spielen gerichtete Vesikeltransporte von Adhäsionsmolekülen und Recyclingprozessen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion, Migration und Invasion von Tumorzellen (Bryant and Stow, 2004; Stehbens and Wittmann, 2012). Es wurde festgestellt, dass der Vesikeltransport die koordinierte Sekretion von MMPs ermöglicht (Jacob and Prekeris, 2015) und dadurch die Invasion der Tumorzellen erleichtert. Zudem ist der Vesikeltransport entscheidend für die Signaltransduktion und fördert die Kommunikation von Tumorzellen mit ihrer Umgebung.

1.4.2 Einfluss von Rho-GTPasen auf das Zytoskelett

Der Einfluss von kleinen Rho-GTPasen auf die Tumorentstehung basiert auf deren Fehlregulation. Daraus kann eine verstärkte Expression der Rho-GTPasen resultieren, welche die Ausbildung maligner Phänotypen fördert (Prendergast, 2001). In vielen Karzinomen konnte diese Korrelation festgestellt werden (Zhao et al., 2010).

Rho-GTPasen sind kleine, monomere GTPasen, welche zur Superfamilie der Ras-GTPasen gehören und extrazelluläre Signale durch Zelloberflächenrezeptoren ins Zellinnere übertragen. Dadurch sind GTPasen der Rho-Familie bei verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt. Dazu gehören Wachstum, Differenzierung, Proliferation, Adhäsion, Migration, Vesikeltransport sowie Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität (Bishop and Hall, 2000; Prendergast, 2001; Ridley, 2001). Die Regulation der Rho-GTPasen erfolgt über den molekularen Wechsel zwischen einem

GDP-gebundenem inaktiven Zustand und einem GTP-gebundenem aktiven Zustand (Bishop and Hall, 2000; Ridley, 2001). Zu den bekanntesten Vertretern der Rho-GTPasen zählen RhoA, Rac1, und Cdc42 (Alberts et al., 2008).

Rho-GTPasen besitzen eine entscheidende Funktion bei der Regulation des Zytoskeletts von migrierenden Zellen. Diese zytoskelettalen Effekte der Rho-GTPasen basieren zum einen auf der gezielten Modulation des Aktin-Zytoskeletts (Nobes and Hall, 1995; Prendergast, 2001; Ridley and Hall, 1992; Ridley, 2001; Tapon and Hall, 1997) durch die Aktivierung von ABPs und akzessorischen Proteinen. Zum anderen werden diese Effekte durch die Stabilisierung der Mikrotubuli durch DIAPH1 (Bartolini and Gundersen, 2010; Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001; Watanabe et al., 2005) und Mikrotubuli-assoziierte Proteinen ausgelöst. Direkte Auswirkungen auf die Aktindynamik besitzen die Cdc42-induzierte Ausbildung der Filopodien am Leitsaum von migrierenden Zellen, die Rac1-regulierte Formation des komplexen Aktin-Netzwerkes in den anschließenden Lamellipodien und die RhoA-vermittelte Aktin-Polymerisation von kontraktile Stressfasern im hinteren Teil der Zelle (Nobes and Hall, 1995). Zudem beeinflussen Rac, Cdc42 und Rho den Aufbau fokaler Komplexe zwischen Aktin-reichen Membranprotrusionen, wie Lamellipodien und Filopodien, und der Plasmamembran (Nobes and Hall, 1995). Neben den Aktin-modulierenden Eigenschaften von Rho-GTPasen beeinflussen diese auch die Stabilisierung der Mikrotubuli. Cdc42 wird für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität in vielen Zellen benötigt und funktioniert als Sensor, um die Richtung der Zellmigration zu bestimmen (Watanabe et al., 2005). Für die gerichtete Migration werden Rac und Cdc42 im führenden Zellende aktiviert und regulieren dort Wachstum und Dynamik an den Plus-Enden der Mikrotubuli (Etienne-Manneville, 2013; Watanabe et al., 2005). Weiterhin ist RhoA durch seinen Effektor DIAPH1 für die Stabilisierung der Mikrotubuli erforderlich und beeinflusst zudem über diesen die Aktindynamik (Ishizaki et al., 2001; Watanabe et al., 2005).

1.5 Auswirkungen von DIAPH1 auf das Zytoskelett

DIAPH1 ist ein Multidomänen-Protein und gehört zur Proteinfamilie der Formine. Das murine Äquivalent zu DIAPH1 wird mDial genannt. In der aktuellen Literatur findet sich eine bedeutend größere Anzahl an Forschungsergebnissen bezüglich mDial verglichen mit den Publikationen zu DIAPH1. Aufgrund der großen Ähnlichkeit

zwischen der murinen und humanen Form (Ishizaki et al., 2001; Lin et al., 2015; Lin et al., 2014; Narumiya et al., 2009; Palazzo et al., 2001) dient der aktuelle Forschungsstand von mDial als Grundlage der hier vorliegenden Arbeit.

DIAPH1 kann durch einen Signalweg, welcher durch LPA vermittelt wird, aktiviert werden (Palazzo et al., 2001; Wen et al., 2004). LPA ist ein bioaktives Serum-Phospholipid und besitzt für viele Zellen Wachstumsfaktor-ähnliche Aktivität (Mills and Moolenaar, 2003). Das Enzym Autotaxin (ATX) generiert extrazellulär LPA durch Abspaltung der Aminosäuregruppe Cholin von Lysophosphatidylcholin (LPC) (Houben and Moolenaar, 2011; Willier et al., 2013). Über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an der Zelloberfläche aktiviert LPA weitere Zielmoleküle, insbesondere kleine Rho-GTPasen, wodurch entscheidende Schritte der Tumorgenese und Metastasierung beeinflusst werden (Houben and Moolenaar, 2011; Mills and Moolenaar, 2003; Panupinthu et al., 2010; Willier et al., 2013) (Abbildung 1-7).

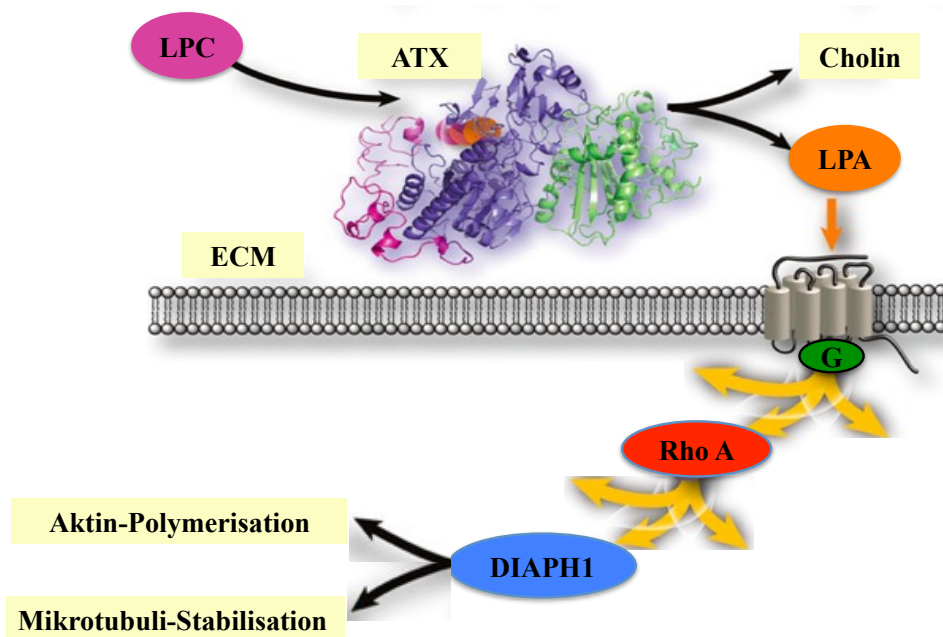


Abbildung 1-7: Auswirkungen von DIAPH1 auf das Zytoskelett in Anwesenheit von LPA. ATX hydrolysiert extrazelluläres LPC zu bioaktivem LPA unter Abspaltung von Cholin. LPA aktiviert über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren weitere Zielmoleküle, unter anderem die kleine Rho-GTPase RhoA, welche DIAPH1 aktiviert. Im aktivierten Zustand fördert DIAPH1 die Aktin-Polymerisation und Mikrotubuli-Stabilisierung.

Entsprechend wurde eine abnormale Expression von LPA-Rezeptoren und ATX in einigen humanen Karzinomen festgestellt (Houben and Moolenaar, 2011; Mills and Moolenaar, 2003; Gay and Felding-Habermann, 2011; Shida et al., 2003; Willier et al., 2013). LPA hat neben seiner Relevanz für die maligne Transformation von Zellen auch entscheidenden Einfluss auf physiologischer Prozesse. Unter anderem ist LPA bei der

Wundheilung, der Aktivierung von Blutplättchen, der Kontraktion glatter Muskelzellen und Vorgängen wie Proliferation, Migration oder Chemotaxis von Bedeutung (Aikawa et al., 2015; Goulimari et al., 2005; Sheng et al., 2015; Siess et al., 1999).

DIAPH1 wird in dem zuvor beschriebenen Signalweg durch RhoA aktiviert und beeinflusst im aktivierten Zustand direkt die Mikrotubuli-Stabilisierung und Aktin-Nukleation (Bartolini and Gundersen, 2010; Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001), wohingegen im autoinhibierten Zustand nur Auswirkungen auf die Stabilisierung der Mikrotubuli festgestellt wurden (Lin et al., 2015). Im autoinhibierten Zustand besteht eine Interaktion zwischen der GTPase-bindenden Diaphanous inhibitorischen Domäne (GBD-DID) und der Diaphanous autoregulatorischen Domäne (DAD). Diese Interaktion verhindert, dass G-Aktin an die *formin homology 1* Domäne (FH1) und F-Aktin an die *formin homology 2* Domäne (FH2) bindet (Campellone and Welch, 2010). Durch das Binden von RhoA an die GBD-Domäne wird die Interaktion der DIAPH1-Domänen unterbrochen, sodass die FH1- und FH2-Domäne freigegeben werden und G- und F-Aktin binden können (Campellone and Welch, 2010; Higgs, 2005; Kovar, 2006; Le Clainche and Carlier, 2008) (Abbildung 1-8).

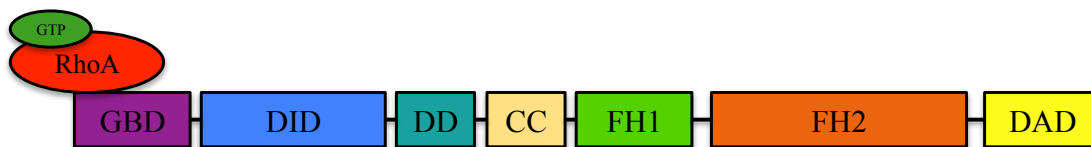


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung der DIAPH1 Domänen. Das Binden von RhoA an die GTPase-bindende Domäne unterbricht die Interaktion der DIAPH1 Domänen und bewirkt, dass DIAPH1 in aktivierter Konformation vorliegt. Einzelne Domänen: GBD (GTPase-bindende Domäne); DID (Diaphanous inhibitorische Domäne); DD (Dimerisierungsdomäne); CC (coiled coil); FH1 und FH2 (formin homology); DAD (Diaphanous autoregulatorische Domäne).

Nach Aktivierung dimerisieren die FH2-Domänen und assoziieren mit dem Plus-Ende der Aktinfilamente, wodurch das Binden von Capping-Proteinen verhindert und der Einbau von Aktin ermöglicht wird (Higgs, 2005; Kovar, 2006; Le Clainche and Carlier, 2008). Die FH1-Domäne bildet keine Homodimere, sondern bindet mit jeder Domäne ein Profilin-gebundenes G-Aktin und transportiert dieses zum wachsenden Plus-Ende (Higgs, 2005; Kovar, 2006; Le Clainche and Carlier, 2008). Dadurch wird die Aktin-Polymerisation stimuliert, wodurch polarisierte, lineare Aktinfilamente gebildet werden (Campellone and Welch, 2010; Higgs, 2005; Kovar, 2006; Le Clainche and Carlier, 2008) (Abbildung 1-9). Eine entscheidende Rolle besitzt aktiviertes DIAPH1 bei der Ausbildung linearer Aktinstrukturen in Filopodien (Le Clainche and Carlier, 2008).

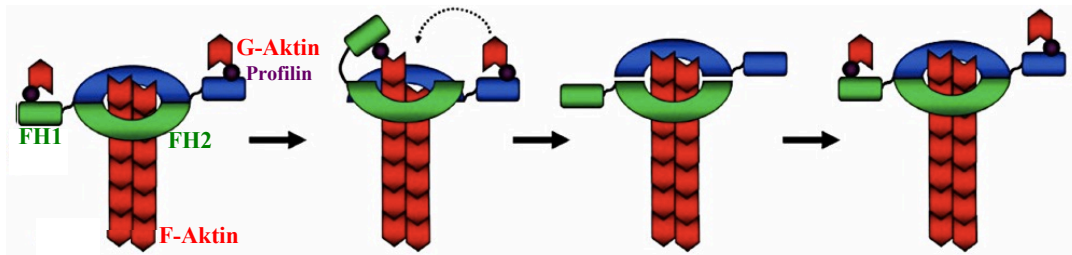


Abbildung 1-9: Mechanismus der DIAPH1-induzierten Aktin-Polymerisation. Einzelne Schritte: 1) Anlagerung des FH2-Dimers an das Plus-Ende des Aktinfilaments, währenddessen rekrutiert die FH1-Domäne Profilin-gebundenes G-Aktin 2) FH1-Domäne überträgt Profilin-gebundenes G-Aktin auf das Plus-Ende 3) Zweite FH2-Domäne wiederholt diesen Vorgang 4) Geschlossene Formin-Konformation verhindert das Anlagern von Capping-Proteinen.

Neben den Aktin-modulierenden Effekten beeinflusst DIAPH1 in Anwesenheit von LPA und somit im aktivierten Zustand zudem die Stabilisierung der Mikrotubuli durch die Interaktion der FH2-Domäne mit Tubulin. (Bartolini and Gundersen, 2010; Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001). *In vivo* fungiert DIAPH1 als Gerüstprotein zur Stabilisierung der Mikrotubuli und bindet die Proteine *adenomatous polyposis coli* (APC) und *end-binding protein 1* (EB1) (Wen et al., 2004). Möglicherweise bilden diese Proteine einen stabilen Komplex am Plus-Ende der Mikrotubuli, welcher durch aktiviertes DIAPH1 reguliert wird (Wen et al., 2004). Nach Aktivierung von DIAPH1 binden EB1 und APC an die exponierte FH1- und FH2-Domäne und fördern darüber die Stabilisierung der Mikrotubuli (Wen et al., 2004). Die durch DIAPH1 stabilisierten Mikrotubuli beeinflussen die Organisation des meiotischen (Kwon et al., 2011; Zhang et al., 2015) und mitotischen (Kato et al., 2001; Rundle et al., 2004) Spindelapparats, die Modulation der Zellpolarität während der gerichteten Zellmigration (Goulimari et al., 2008, 2005; Ishizaki et al., 2001), den zellulären Vesikeltransport (Stehbens and Wittmann, 2012; Yamana et al., 2006) und die Ausbildung fokaler Adhäsion (Lin et al., 2015).

In Abwesenheit von LPA wird DIAPH1 in den Zellen nicht aktiviert und liegt in autoinhibierter Konformation vor, wodurch die Aktin-Nukleation verhindert, jedoch die Stabilisierung der Mikrotubuli aufrechterhalten wird (Lin et al., 2015). Dadurch sind die Mikrotubuli-abhängigen Vorgänge, welche zuvor anhand von aktiviertem DIAPH1 beschrieben wurden, auch durch autoinhibiertes DIAPH1 beeinflussbar.

Neben den modulierenden Eigenschaften des Zytoskeletts reguliert aktiviertes DIAPH1 auch die Aktivität des Transkriptionsfaktor serum response factor (SRF) (Copeland and Treisman, 2002; Geneste et al., 2002). Für die vollständige SRF-Aktivierung wird der Ko-Aktivator *myocardin-related transcription factor-A* (MRTF-A) benötigt, welcher durch die Interaktion mit G-Aktin im Zytosol lokalisiert ist. Die DIAPH1-induzierte

Aktin-Polymerisation führt zur Abnahme des zytosolischen G-Aktins, wodurch der Ko-Aktivator MRTF-A vom Zytosol in den Nukleus transloziert wird und dort die SRF-abhängige Transkription aktiviert. Damit führt die DIAPH1-vermittelte Abnahme der zellulären G-Aktinkonzentration zur verstärkten SRF-induzierten Transkription von Genen, welche Zelldynamik und Adhäsion regulieren (Copeland and Treisman, 2002; Geneste et al., 2002).

DIAPH1 ist sowohl in physiologische als auch in pathologische Zellprozesse involviert, welche Aktin- und / oder Tubulin-abhängig sind. Unter physiologischen Bedingungen wird DIAPH1 in Immunzellen (Naj et al., 2013; Sakata et al., 2007; Eisenmann et al., 2007) und Fibroblasten (Goulimari et al., 2005; Palazzo et al., 2001; Wen et al., 2004) exprimiert. In Immunzellen beeinflusst aktiviertes DIAPH1 entscheidende Vorgänge der Immunantwort. Beispiele hierfür sind der Prozess der Phagozytose sowie die Aktivierung von Immunzellen und deren chemotaktische Migration, welche durch Aktin-reiche Protrusionen und zytoskelettale Umgestaltungen reguliert werden (Naj et al., 2013; Eisenmann et al., 2007). Während der Wundheilung ermöglicht aktiviertes DIAPH1 durch Mikrotubuli-stabilisierende Effekte außerdem die gerichtete Migration der Fibroblasten zum Wundort (Goulimari et al., 2005; Palazzo et al., 2001; Wen et al., 2004), wo diese zur Ausbildung des Granulationsgewebes beitragen. Nicht nur in Immunzellen, sondern auch in Tumorzellen ist aktiviertes DIAPH1 entscheidend an der Formation der Membranprotrusionen beteiligt (Narumiya et al., 2009; Naj et al., 2013). Im Falle eines Tumors gelangen Tumorzellen gezielt zur Stelle der Wundheilung, wo die Invasion in das angrenzende Gewebe erleichtert ist (Weinberg, 2014). Demzufolge konnte eine erhöhte DIAPH1 Expression in verschiedenen Tumoren lokalisiert werden. Bei Mammatumoren wurde gezeigt, dass DIAPH1 für die Invadopodien-Formation benötigt wird und darüber das Invasionsverhalten beeinflusst (Lizárraga et al., 2009). Weiterhin wurde mDia1 bei Gliomen identifiziert (Khalil and El-Sibai, 2012) und dessen essentielle Rolle für die gerichtete Migration dieser Tumorzellen festgestellt (Yamana et al., 2006). Eine DIAPH1 Überexpression wurde bei oralen Plattenepithelkarzinomen verzeichnet (Chakraborty et al., 2010). Unterstützend konnte bei HCT116, HT29 und HROC24 Kolonkarzinomzellen eine verstärkte DIAPH1 Expression aufgezeigt werden (Lin et al., 2014).

Dies zeigt, dass DIAPH1 möglicherweise ein metastatisches Potential besitzt, da es sowohl im aktivierten, als auch im autoinhibierten Zustand das Zytoskelett und damit einhergehende dynamische zelluläre Prozesse beeinflusst.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war aufzuzeigen, ob DIAPH1 in Abwesenheit von LPA und somit im autoinhibierten Zustand das metastatische Potential der HROC24 Kolonkarzinomzellen beeinflusst. Zu untersuchen galt, ob autoinhibiertes DIAPH1 durch Auswirkungen auf das Aktin-Zytoskelett und durch Modulation zellulärer Vorgänge in relevante Prozesse der Metastasierung eingreifen kann.

Zunächst sollten mögliche Effekte des DIAPH1 Knock-downs auf die Aktindynamik durch Untersuchung der intrazellulären Aktinverteilung und der Zellmorphologie bestimmt werden. Um festzustellen, ob autoinhibiertes DIAPH1 weitere zelluläre Vorgänge beeinflusst, sollten Zell-Zell-Kontakte, Filopodien-Formation, endosomaler Vesikeltransport und Invasionsverhalten untersucht werden. Zur Beurteilung der Auswirkungen des DIAPH1 Knock-downs wurden alle Ergebnisse denen der Kontrollzellen gegenübergestellt. Anzumerken ist, dass die untersuchten zellulären Vorgänge häufig bei der Metastasierung von Zellen verändert sind und somit Aufschluss über das metastatische Potential geben können.

2 Material

2.1 Zelllinie

Zelllinie	Beschreibung
HROC24	HROC24 ist eine primäre Zelllinie aus einem sporadischen, schlecht differenzierten, humanen kolorektalen Adenokarzinom. Diese epitheliale, adhärenente, stabile Kolonkarzinomzelllinie besitzt ein nachgewiesenes hohes Migrationspotential. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Michael Linnebacher aus der Universitätsmedizin Rostock (Abteilung für molekulare Onkologie und Immuntherapie) zur Verfügung gestellt.

2.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Medien und Lösungen für die Zellkultur	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): F-12 1:1 Mixture w/15mM Hepes, L-Gln 500 ml	Lonza (Katalognr: BE12-719F)
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	BioWhittaker
10 % (v/v) fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Penicillin (100 U/ml)	Invitrogen
Streptomycin (100 µg/ml)	Invitrogen
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (0,05 %/0,02 % (w/v))	Invitrogen
1.5 µg/ml Puromycin	Sigma-Aldrich
CASYton für Zellzähler <i>CASY</i>	Schärfe System

2.2.1 Zellmedium für HROC24

Zelllinie	Zusammensetzung
HROC24	DMEM: F-12 1:1 Mixture w/15mM Hepes, L-Gln 500 ml 10 % (v/v) FKS 100 µg/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin

2.3 Protein-Molekulargewichtstandard

Protein-Molekulargewichtstandard	Hersteller
Full-Range Rainbow Marker	GE Healthcare (Katalognr: RPN800E)

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 Allgemein

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (1x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) (10x)	20 mM Tris/HCl 0,9 % (w/v) NaCl pH 7,4
TBS mit Tween 20 (TBST) (1x)	1x TBS 0,1 % (v/v) Tween 20

2.4.2 Western Blot

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Blotpuffer (1x)	2,5 mM Tris/HCL (pH 7,0-7,5) 19,2 mM Glycin vor Verwendung Zugabe von: 20 % (v/v) Methanol
Blockierlösung	2,5 % (w/v) BSA in TBS

2.4.3 SDS-PAGE

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris/HCl (pH 8,5) 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (6x ohne Glycerin)	75 % (w/v) Tris/HCl (pH 6,8) 6 % β-Mercaptoethanol 6 % (w/v) SDS 0,18 % Bromphenolblau 12,82 % dest. H ₂ O SDS-Probenpuffer entsprechend auf 4x verdünnen und 20 % (v/v) Glycerin zu- geben
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgellösung	11,6 ml dest. H ₂ O 6,4 ml Acrylamid 6 ml Sammelgelpuffer (4x)

2.4.4 DNase Assay

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Lysispuffer	10 mM K ₂ HPO ₄ 100 mM NaF 50 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 0,2 mM DTT 0,5 % Triton-X-100 1 M Sucrose (pH 7,0)
Guanidiniumchloridpuffer	1,5 M Guanidiniumchlorid 1 M Natriumacetat 1 mM CaCl ₂ 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM ATP frisch vor Gebrauch dazugeben
DNase I-Lösung	0,1 mg/ml DNase I 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM PMSF 0,5 mM CaCl ₂ pH 7,5
DNA-Lösung	40 µg/ml DNA 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) 4 mM MgSO ₄ 1,8 mM CaCl ₂ pH 7,5

2.5 Kits

Kits	Hersteller
ECL™ Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare

2.6 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Agar Noble	BD Difco
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	Invitrogen
Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) 10 % (w/v)	Merck
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
Kollagen Typ I	BD Biosciences
Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER)	Thermo Scientific
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin-Lösung (TEMED) (10 % (v/v))	Roth

Natriumhydrogencarbonat (7,5 %)	Biomedicals
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom
Rinderserumalbumin (BSA) Standard (0,1 mg/ml)	Pierce

2.7 Antikörper

2.7.1 Primärantikörper

2.7.1.1 Western Blot

Antigen	Spezies	Verdünnung	Klonalität	Hersteller	Katalognr.
DIAPH1	Kaninchen	1:1000	polyklonal	abcam	ab11173
HSC70	Maus	1:6000	monoklonal	Santa Cruz	sc-7298

2.7.1.2 Immunfluoreszenz

Antigen	Spezies	Verdünnung	Klonalität	Hersteller	Katalognr.
E-Cadherin	Maus	1:200	monoklonal	BD Biosciences	BD 610181
EEA1	Kaninchen	1:200	polyklonal	abcam	ab2900

2.7.2 Sekundärantikörper

2.7.2.1 Western Blot

Antigen	Spezies	Verdünnung	Konjugat	Hersteller	Katalognr.
Kaninchen	Ziege	1:2500	HRP	Dako	P0449
Maus	Ziege	1:5000	HRP	Santa Cruz	sc-2005

2.7.2.2 Immunfluoreszenz

Antigen	Spezies	Verdünnung	Konjugat	Hersteller	Katalognr.
Kaninchen	Ziege	1:3000	Alexa Fluor [®] 488	Invitrogen	31212
Maus	Ziege	1:3000	Alexa Fluor [®] 488	Invitrogen	A10535

2.8 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Blot-Filterpapier	Whatman
Casy Cups mit Deckel	Roche
Combi-Tip (steril)	Eppendorf
Culture-Insert StemCell, µ-Dish 35 mm (steril)	ibidi

Micro Well Module, 16-Well Riegel	Nunc
Microscopy Chamber Slide, 8 Kammern mit Kollagen IV beschichtet	ibidi
Nitrocellulose Transfermembran, Protran BA 85	BioScience
Pipettenspitzen (0,1 µl -1000 µl)	Greiner
Probenröhrchen mit Schraubverschluss aus Polypropylen (steril, 15 ml, 20 ml)	Greiner
Reaktionsgefäße aus Polypropylen (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Serologische Pipetten (steril, 25 ml)	Sarstedt
Spacer für SDS-PAA-Gel (Dicke: 1,5 mm)	GE Healthcare
Zellkulturflaschen mit Filterdeckel (75 cm ²)	Greiner
Zellkulturplatten aus Polystyrol (steril, 6 Well)	Greiner
Zellkulturplatten aus Polystyrol (steril, 96 Well)	Greiner
Zellkulturschalen (Durchmesser: 5 cm, 10 cm, 15 cm)	Sarstedt
Zellschaber	Costar

2.9 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage <i>LC 620 S</i>	Sartorius
Autoklav <i>3150 EL</i>	Systec
CO ₂ -Inkubator für Zellkultur <i>Heracell 240i</i>	Thermo Scientific
Elisa-Reader <i>Multiscan FC</i>	Thermo Scientific
Fluoreszenzmikroskop <i>Biorevo</i>	Keyence
Gelkammer für vertikale Elektrophorese	Amersham Biosciences
Gießstand Dual Gel Caster für PAA-Gel	Amersham Biosciences
Heizblock <i>Thermomixer 5436</i>	Eppendorf
Heizblock <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf
Klimakammer <i>INU</i>	Tokai Hit
Lichtmikroskop <i>Diavert</i>	Leitz
Mikropipette, Modell <i>Reference</i> , (0,5-10 µl)	Eppendorf
Mikropipette, Modell <i>Reference</i> , (10-100 µl)	Eppendorf
Mikropipette, Modell <i>Reference</i> , (20-200 µl)	Eppendorf
Mikropipette, Modell <i>Reference</i> , (100-1000 µl)	Eppendorf
Mikroliter Syringes Pipette	Hamilton
Multipipette, Modell <i>Transferpette</i> , (20-200 µl)	Brand
Netzgerät <i>Power Pac</i>	Bio-Rad
Pipettierhilfe <i>accu-jet</i>	Brand
Pipettierhilfe <i>pipettus-akku</i>	Hirschmann Laborgeräte
Quarzküvette	Suprasil
Semi-Dry-Elektroblotter <i>TE77 PWR</i>	Amersham Biosciences
Sterile Werkbank <i>Herasafe</i>	Heraeus
Sonifier <i>UW70</i>	Bandelin
Tischzentrifuge <i>Biofuge pico</i> und <i>Biofuge fresco</i>	Heraeus
Tischzentrifuge <i>Z216 MK</i>	Hermle
Taumler <i>Duomax 1030</i>	Heidolph Instruments
UV/Vis Spectrophotometer <i>Lamda 2</i>	PerkinElmer

Vortexer <i>VF2</i>	Janke&Kunkel IKA Labortechnik
Wasserbad	Memmert
Western Blot Imager <i>Las-3000</i>	Fujifilm
Western Blot Imager <i>Stella</i>	Raytest
Zellzähler <i>CASY</i>	Schärfe System
Zellkulturflaschen (75 cm ² , mit Filterdeckel)	Greiner
Zentrifuge <i>Labofuge GL</i>	Hermle

2.10 Software

Software	Hersteller
Aida Image Analyzer	Raytest
Axio Vision	Zeiss
BZ Analyzer	Keyence
BZ Viewer	Keyence
Magellan™	TECAN
Microsoft Exil	Microsoft
SigmaPlot	Systat Software Inc.
UV WinLab	PerkinElmer

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Arbeitstechnik

Vor der Verwendung werden alle Lösungen, Medien, Glaswaren, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen bei 121 °C und 1,2 bar für 35 Min. autoklaviert. Die Arbeitsflächen und Geräte werden vor dem Gebrauch mit 70 %igem Ethanol desinfiziert.

3.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der HROC24 Kolonkarzinomzellen erfolgt in Zellkulturflaschen (75 cm² mit Filterdeckel) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator. Das Zellmedium ist mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FKS) sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt. Die Zellen werden mit FKS kultiviert, um eine Aktivierung von DIAPH1 durch Rho-Aktivatoren im Zellmedium auszuschließen. Im Folgenden wird diese Zusammensetzung als Vollmedium bezeichnet (Abschnitt 2.2.1). Zur Selektion der transfizierten Kontroll- und Knock-down-Zellen wird das Vollmedium mit 1,5 mg/ml Puromycin versetzt. Für alle weiteren Versuche werden die selektierten, adhärenen Zellen mit Vollmedium kultiviert und ca. alle 3 Tage passagiert. Das Arbeiten erfolgt unter der sterilen Werkbank, alle Lösungen werden vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

Für das Passagieren der Zellen wird das Medium in der Kulturflasche abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml 1 x Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 2 ml 0,05 % Trypsin/EDTA versetzt und für 5 Min. bei 37 °C inkubiert. Durch Beklopfen der Zellkulturflasche wird das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden verstärkt. Im Anschluss werden die Zellen mit 8 ml 1 x PBS mehrfach resuspendiert. Die zu entnehmende Menge an Zellsuspension richtet sich nach der Zelldichte. Beim Passagieren im Abstand von 3 Tagen werden 8 ml Zellsuspension entnommen, welche anschließend zur Weiterverwendung zu Verfügung steht. Zu den in der Kulturflasche verbliebenen 2 ml Zellsuspension werden 10 ml Vollmedium gegeben und im Inkubator weiter kultiviert.

3.3 Quantifizierung des Knock-downs

Zu Beginn der Arbeit wird verifiziert, ob der DIAPH1 Knock-down erwartungsgemäß funktioniert hat. Dazu wird die Proteinkonzentration von autoinhibiertem DIAPH1 in Kontroll-Zellen mit der in Knock-down-Zellen verglichen.

Der Knock-down wird mittels shRNA durchgeführt, die komplementär zu einem Teil der mRNA von autoinhibiertem DIAPH1 ist und über RNA Interferenz zu deren Abbau führt. Kontroll-Zellen erfahren die gleiche Behandlung wie Knock-down-Zellen, allerdings wird in diesem Fall keine spezifische, zur Zielstruktur komplementäre shRNA verwendet. Die shRNA hat vielmehr eine zufällige Abfolge von Basen (scrambled). Dadurch wird überprüft, ob der Knock-down spezifisch auf das Zielprodukt wirkt oder möglicherweise durch sekundäre Effekte verursacht wird.

Zur Berechnung der Effizienz des Knock-downs werden die Zellen lysiert und das gewonnene Protein mittels Western Blot detektiert (Abschnitt 3.3.1 und 3.3.3). Der Quotient aus den Intensitäten der Knock-down-Bande und der dazugehörigen Ladekontrollbande des Hitzeschockproteins (HSC70) gibt bei Gegenüberstellung des entsprechend errechneten Quotienten der Kontroll-Zellen Aufschluss über die Effizienz des Knock-downs. Anschließend kann die durchschnittliche DIAPH1 Expression in Knock-down-Zellen in Bezug zur Expression in Kontroll-Zellen berechnet werden. Sollte bei gleicher Proteinkonzentration die Intensität der Knock-down- und Kontroll-Bande ähnlich sein, muss der Versuch überprüft und gegebenenfalls verändert werden.

3.3.1 Zellaufschluss und Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode, welche zur Quantifizierung von Proteinkonzentrationen im Bereich Mikrogramm pro Milliliter verwendet wird.

Für die Proteinbestimmung im Bradford-Test muss zunächst das Protein aus der abgenommenen Zellsuspension gewonnen werden. Durch wiederholtes Zentrifugieren der Zellsuspension bei 1500 rpm, anschließendes Waschen und Resuspendieren mit 1 x PBS erhält man im letzten Schritt durch erneutes Zentrifugieren ein Zellpellet, das mit 100 µl *Mammalian Protein Extraction Reagent* (M-PER) versetzt wird. Anschließend werden die Zellen durch Einfrieren und Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen, sodass das Protein in Suspension vorliegt. Das Arbeiten mit Proteinen erfolgt immer auf Eis.

Nach erneutem Zentrifugieren wird das Pellet entsorgt, der Überstand wird 1:200 mit dest. H₂O verdünnt und es werden jeweils 50 µl pro Kammer in ein Modul der 16-Kammer-Mikromodule pipettiert. Die Konzentration des Proteins wird mit Hilfe von 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA)-Standard bestimmt, welches ein Standardprotein zur Kalibrierung von Proteinkonzentrationen ist. Dafür wird 0,1 mg/ml BSA-Standard mit dest. H₂O auf einen BSA-Konzentrationsgradient von 0,25 µg bis 3 µg in einem Gesamtvolumen von 50 µl verdünnt. Zusätzlich wird der Leerwert bestimmt. Zu jeder Kammer werden 200 µl Bio-Rad-Reagenz in einer 1:3 Verdünnung mit dest. H₂O gegeben. Nach 5 Min. Inkubationszeit wird der Proteingehalt bei einer Wellenlänge von 625 nm im Elisa-Reader Multiscan FC gemessen. Der Kalibrierungsgraph ermittelt sich durch das Auftragen der Extinktion gegen die Proteinkonzentration. Anschließend wird die Extinktion der Proben gemessen und durch den Kalibrierungsgraphen dividiert, um die gesamte Proteinmenge zu erhalten.

3.3.2 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE

Das Verfahren der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht durch die ausgebildete Netzstruktur des Gels die Auftrennung der Proteine anhand ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld.

Zunächst wird das 12 %ige Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) in einer geeigneten Vorrichtung (Gießstand Dual Gel Caster für PAA-Gele) angefertigt. Pro Trenngel wird ein Volumen von 6 ml verwendet, die Zusammensetzung besteht aus 2,4 ml 30 % (w/v) Acrylamid, 4 x 1,5 ml Trenngelpuffer und 2,1 ml dest. H₂O. Zur Einleitung der Polymerisation werden 5 µl 10 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin-Lösung (TEMED) und 60 µl 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) dazu gegeben, wobei TEMED als Katalysator und APS als Initiator wirkt. Die Gelmischung wird in den Gießstand gegossen, mit 1-2 ml Isopropanol überschichtet und für 45 Min. auspolymerisiert. Nach Entfernung des Isopropanols wird das 12 % Trenngel mit einem 4 % Sammelgel überschichtet. Die Zusammensetzung des Sammelgels besteht aus 1,1 ml 30 % (w/v) Acrylamid, 4 x 1 ml Sammelgelpuffer und 1,9 ml dest. H₂O. Zur Einleitung der Polymerisation werden 5 µl 10 % TEMED und 40 µl 10 % (w/v) APS dazu gegeben. Das Endvolumen beträgt 4 ml. Ein entsprechender Taschenkamm wird appliziert. Das Gel polymerisiert für 20 Min. aus. Anschließend wird das PAA-Gel in die mit SDS-Laufpuffer gefüllte Gelelektrophorese-Kammer eingespannt.

Die zuvor gewonnenen Proteinproben werden mit Probenpuffer versetzt und 5 Min. bei 95 °C denaturiert. Nach dem Abkühlen werden die Taschen des Gels mit jeweils 20 µl Proteinlösung in einer Konzentration von 1 µg/ml bestückt. Der Marker des Proteinkmolekulargewichtsstandards (Abschnitt 2.3) wird zur Bestimmung der Proteingröße in einer separaten Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt zunächst durch das Anlegen eines elektrischen Felds von 100 V für 30 Min. zum Sammeln der Proteine. Anschließend wird die Spannung zur Auftrennung der Proteine auf 140 V erhöht.

Der Einsatz von SDS, einem anionischen Detergens, führt zur Denaturierung und zur Maskierung der Eigenladung der Proteine. Die negative Ladung der Sulfatgruppe von SDS bewirkt eine Abstoßung der Proteine untereinander und damit eine Linearisierung. Die Proteine wandern anhand ihrer Kettenlänge proportional zur Molekülmasse unterschiedlich weit auf dem PAA-Gel in Richtung der Anode. Längere Proteine werden stärker zurückgehalten.

3.3.3 Spezifischer Proteinnachweis mittels Western Blot

Western Blot ist ein molekularbiologisches Verfahren zum immunologischen Nachweis von Proteinen. Dabei werden die Proteine auf eine Trägermembran übertragen (geblottet) und anschließend mit Hilfe von Primär- und Sekundärantikörpern gezielt nachgewiesen.

Nach Auftrennung der Proteine durch das Verfahren der SDS-PAGE können diese auf eine Nitrocellulose-Membran (NC) geblottet werden. Dafür wird eine Schichtung vorgenommen von mehreren in 1 x Blotpuffer getränkten Filterpapieren, der ebenfalls in 1 x Blotpuffer getränkten NC-Membran, dem PAA-Gel und weiteren in 1 x Blotpuffer getränkten Filterpapieren. Dieser Stapel wird auf die Anode platziert. Auf dem oberen Filterpapier des Stapels wird die Kathode positioniert und ein elektrisches Feld von 70 mA pro Blot für 75 Min. senkrecht zum Gel angelegt. Dies bewirkt, dass die negativ geladenen Proteine durch die NC-Membran in Richtung der Anode wandern. Anschließend wird die Membran für 60 Min. bei Raumtemperatur (RT) mit Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern an freien Bindungsstellen zu verhindern. Der Primärantikörper wird über Nacht hinzugegeben und bindet mit hoher Affinität an sein Zielmolekül. Durch mehrmaliges Waschen mit TBST über 90 Min. werden alle ungebundenen Antikörper entfernt. Anschließend wird der Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierte Sekundärantikörper, der mit 2,5 % BSA in 1 x PBS verdünnt ist, dazu gegeben. Dieser bindet gezielt an den

Primärantikörper. Nach 60 Min. Inkubationszeit bei RT werden alle überschüssigen Antikörper durch erneutes Waschen mit TBST für 90 Min. entfernt. Durch Zugabe des Substrats, welches aus Lösung A und B des ECLTMPlus Western Blotting Detection Systems besteht, wird nach 3 Min. Inkubationszeit ein chemolumineszierendes Signal durch den Western Blot Imager LAS-3000 aufgezeichnet. Dabei reagiert das Substrat mit dem Marker-Enzym HRP, welches an den Sekundärantikörper gekoppelt ist. HRP katalysiert durch die Peroxidase-Reaktion die Umsetzung von Luminol, dessen Chemolumineszenz erfasst werden kann. Dadurch wird die Bande, in welcher das Protein vorhanden ist, sichtbar gemacht.

Mit einer Ladekontrolle wird geprüft, ob jeweils gleiche Proteinkonzentrationen aufgetragen wurden. Dafür wird der Blot nochmals gewaschen und mit Antikörpern gegen HSC70 versetzt. Dabei wird sich zu Nutze gemacht, dass HSC70 unter physiologischen Bedingungen konstitutiv in Zellen exprimiert wird und somit zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinkonzentration geeignet ist.

Die Bandenintensitäten werden mit dem Programm AIDA Image Analyzer (Raytest) gemessen.

3.4 Fluoreszenzfärbungen

3.4.1 Fixierung

Vor der Fluoreszenzfärbung werden die Zellen fixiert. Dies ermöglicht eine längere Aufbewahrungsdauer der Zellen und verleiht diesen eine bessere Stabilität. Das Prinzip basiert auf der Vernetzung benachbarter Proteine durch die Ausbildung kovalenter Bindungen an freien Aminogruppen.

Für die Fixierung der Zellen werden $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Kammer in Kollagenbeschichteten Mikroskopie-Objektträgern ausgesät. Nach zwei Tagen wird die Zellsuspension abgenommen. Anschließend werden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgt mit 3 %igem Paraformaldehyd in 1 x PBS für 10 Min. im Brutschrank bei 37 °C. Anschließend werden die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen und stehen für weitere Arbeitsschritte bereit.

3.4.2 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz ist eine Methode, welche die Detektion und genaue Lokalisation von Proteinen in Zellen ermöglicht und Rückschlüsse auf Strukturen, Adhäsionsverhalten und Transportvorgänge ermöglicht. Dabei bindet der Primärantikörper spezifisch an das Zielmolekül und wird anschließend durch einen fluoreszierenden Sekundärantikörper detektiert. Fluoreszenz entsteht, wenn ein angeregtes Elektron eines Moleküls in seinen Grundzustand relaxiert und dabei ein Photon emittiert. Zuvor wurde das Elektron durch energiereiches, kurzwelliges Licht in einen energetisch höheren Zustand versetzt. Das bei der Emission ausgesendete Photon besitzt eine größere Wellenlänge als die benötigte Energie zur Anregung, da ein Teil dieser Energie als Wärme an die Umgebung freigegeben wird (Alberts et al., 2008; Valeur and Berberan-Santos, 2011). Spezielle Filter des Immunfluoreszenzmikroskops erfassen nur das emittierte Licht und machen dieses sichtbar.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wird zunächst das vorhandene PBS von den fixierten Zellen abgenommen. Anschließend werden die Zellen mit 0,3 % Triton für 5 Min. versetzt, um die Zellmembran für Antikörper permeabel zu machen. Die Zellen werden für 20 Min. bei RT mit Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern an freien Bindungsstellen zu verhindern. Nach gründlichem Waschen mit 1 x PBS wird der Primärantikörper, welcher 1:200 mit 1 %igem BSA in 1 x PBS verdünnt ist, dazugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dieser bindet mit hoher Affinität an sein Zielmolekül. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wird der fluoreszierende Sekundärantikörper, der 1:3000 mit 1 x PBS verdünnt ist, dazugegeben und im Dunklen bei RT für 60 Min. inkubiert. Nach erneutem Waschen werden die Zellen für die Weiterverwendung mit 1 x PBS bedeckt. Die fluoreszierenden Signale werden mittels des Mikroskops BZ-9000 (Keyence) erfasst.

3.4.3 Färbung des Aktin-Zytoskeletts

Phalloidin, das Gift des grünen Knollenblätterpilzes, bindet mit einer hohen Selektivität an F-Aktin. Durch die Kopplung von Phalloidin an den fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor® 488 können zytoskelettale Strukturen, welche aus F-Aktin bestehen, mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht werden.

Für die Phalloidin-Färbung wird zunächst das vorhandene PBS von den fixierten Zellen abgenommen. Die Zellen werden mit Alexa Fluor® 488 in einer 1:1000 Verdünnung

mit 1 x PBS für 10 Min. im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und zur Lagerung mit 200 µl 1 x PBS bedeckt. Die Phalloidin-Färbung wird im Dunklen bei 4 °C aufbewahrt. Die fluoreszierenden Signale werden mittels Mikroskop erfasst.

3.5 DNase Assay zur Bestimmung der intrazellulären Aktinverteilung

Durch den DNase Assay kann das Verhältnis des intrazellulären G- und F-Aktins mit Hilfe des Spektrophotometers bestimmt werden. Das grundlegende Prinzip des DNase Assays basiert auf der Inhibition der Desoxyribonuklease I (DNase I) durch intrazelluläres G-Aktin, wohingegen F-Aktin keine Auswirkungen auf die Enzymaktivität hat. Die Hemmung der DNase I wird photometrisch gemessen und bietet somit direkten Rückschluss auf den intrazellulären Anteil von G-Aktin im Zellysate. Um die gesamte Aktinmenge zu bestimmen, wird das Zellysate mit Guanidiniumchlorid versetzt, sodass F-Aktin zu G-Aktin depolymerisiert wird. Anschließend kann der Anteil von F-Aktin (F) durch Subtraktion von G-Aktin (G) an der gesamten intrazellulären Aktinmenge (T) bestimmt werden ($F = T - G$). Die erhobenen Ergebnisse werden durch den Gesamtproteingehalt geteilt und der prozentuale Anteil von G- und F-Aktin berechnet (vgl. zu diesem Abschnitt: Windhorst et al., 2010).

Die Messungen werden mit dem UV/Vis Spectrophotometer Lambda 2 (PerkinElmer) bei 260 nm durchgeführt und durch das Programm UV WinLab (PerkinElmer) aufgezeichnet. Vor jeder Messung wird einmal blank gegen die Quarzküvette gemessen. Anschließend wird die Basislinie ermittelt. Dafür wird 1 ml DNA-Lösung für 3 Min. bei 30 °C in der Küvette inkubiert und anschließend für 2 Min. die Basislinie erfasst. Zur Bestimmung des Normgraphens werden 10 µl Lysispuffer und 10 µl DNase I-Lösung zur inkubierten DNA-Lösung in die Quarzküvette pipettiert, resuspendiert und die Extinktion wird gemessen. Das Gemisch enthält wegen der fehlenden Zellen kein Aktin, daher spiegelt der Graph die ungehemmte Aktivität der DNase I-Lösung wieder. Die Extinktion der Graphen wird für 20 Min. aufgezeichnet.

Für die Herstellung der Proben werden 5×10^6 Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, anschließend für 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert und mit 100 µl Lysispuffer versetzt, sodass G- und F-Aktin in Suspension vorliegen. Anschließend werden die jeweiligen Proben nochmals 1:10 mit Lysispuffer verdünnt.

Zur Bestimmung der intrazellulären G-Aktinmenge werden 10 μl Lysat und 10 μl DNase I-Lösung für 5 Min. inkubiert. Anschließend wird dies zur DNA-Lösung in die Quarzküvette pipettiert und resuspendiert. Die Extinktion wird gemessen. Zur Bestimmung der intrazellulären F-Aktinmenge muss F-Aktin zunächst zu G-Aktin depolymerisiert werden. Dazu werden 10 μl Lysat und 10 μl Guanidiniumchlorid für 20 Min. bei RT inkubiert und anschließend für 5 Min. mit 10 μl DNase I-Lösung versetzt. Davon werden 20 μl zur inkubierten DNA-Lösung in die Quarzküvette pipettiert, resuspendiert und die Extinktion wird gemessen.

Mit Hilfe des Programms UV WinLab kann die Steigung der Graphen über ein identisches Zeitintervall bestimmt und der F-Aktin Gehalt berechnet werden.

3.6 Herstellung von Sphäroiden

Sphäroide sind dreidimensionale Zellkulturen, die sich durch Anhäufung von mehreren tausend Tumorzellen zu kugelförmigen Aggregaten zusammenlagern. Durch die dreidimensionale Anordnung bewahren die Zellen in Sphäroiden viele ihrer biochemischen und morphologischen Eigenschaften. Demzufolge ähneln sie stärker der *in vivo* Situation als Zellen in Monolayer-Kulturen, die wegen ihrer reduzierten Zell-Zell-Kontakte einige phänotypische Eigenschaften verlieren.

Für die Herstellung der Sphäroide werden sterile 96-Kammer-Zellkulturplatten aus Polystyrol verwendet. Zunächst wird 0,5 g des 1,5 %igen Agar Nobel mit 33 ml PBS Dulbecco w/o Ca^{2+} und Mg^{2+} ca. 60 Min. autoklaviert. Mit einem sterilen Kombitip wird jede Kammer mit 100 μl flüssigem Agar beschichtet. Nach dem Abkühlen werden diese mit 50 μl Vollmedium über Nacht inkubiert, um den Zellen einen optimalen Nährboden bereitzustellen. Anschließend wird das Vollmedium abgenommen und in jede Kammer wird die theoretisch optimale Zellzahl von 5000 Zellen pro 200 μl Zellmedium hinzugefügt. Nach ca. 5 Tagen Lagerung im Inkubator bei 37 °C haben sich Sphäroide gebildet.

3.7 Live Cell Imaging

Das Live Cell Imaging wird angewendet, um Zelldynamik und Invasionsverhalten an lebenden Zellen und Zellaggregaten in verschiedenen Dimensionen mit dem Zeitraffermikroskop zu beobachten. Die Aufnahmen im Multipoint-Modus des

Programms BZ Viewer (Keyence) ermöglichen die gleichzeitig Darstellung in verschiedenen Ebenen eines Sphäroids. Die Aufnahmen werden in einem Zeitrafferabstand von 5 Min. über 18 Std. durchgeführt.

Zunächst werden die hergestellten Sphäroide mit Hilfe einer abgeschnittenen 100-1000 µl Mikropipettenspitze aus dem Agar entfernt und in einer Petrischale zwischengelagert. Mit Hilfe einer 0,1-10 µl Mikropipettenspitze wird das Sphäroid angesaugt und möglichst mittig in eine sterile Mikro-Zellkulturschale mit 35 mm Durchmesser platziert. Anschließend wird jedes Sphäroid mit 3 µl Kollagenmixture (Tabelle 3-1) überschichtet und für 15 Min. im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wird jedes Sphäroid mit 180 µl Vollmedium bedeckt und in der Inkubationskammer des Mikroskops BZ-9000 bei 37 °C und 5 % CO₂ platziert, wodurch die Umgebungsbedingungen im physiologischen Bereich aufrechterhalten werden.

Durch das Programm BZ Viewer werden Zelldynamik und Invasionsverhalten der Zellen in die Kollagenmatrix aufgezeichnet.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der Kollagenmixture. Diese ist festgelegt durch die aufgeführten Mengenangaben in der Tabelle. Alle Medien werden auf Eis gekühlt und chronologisch nach der tabellarischen Auflistung in ein steriles Probenröhrchen aus Polystyrol gegeben. Nach jedem Zwischenschritt wird die Lösung im Probenröhrchen gemischt, wobei Luftblasen zu vermeiden sind. Das Arbeiten erfolgt unter der sterilen Werkbank.

Menge [µl]	Medien für die Kollagenmixture (gekühlt)
2000	Kollagen Typ I
240	Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)
47	200 mM L-Glutamin
17	7,5 % Natriumhydrogencarbonat
264	FKS
14	7,5 % Natriumhydrogencarbonat
13	7,5 % Natriumhydrogencarbonat

3.8 Statistik

Die Signifikanz der einzelnen Versuche wird mit Hilfe des T-Tests durch das Programm SigmaPlot (Systat Software Inc.) durchgeführt. Bei einem p-Wert $\leq 0,05$ werden die Ergebnisse als signifikant betrachtet. Diese sind in den Balkendiagrammen des Ergebnisteils durch das Zeichen * gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

Um den Einfluss von autoinhibiertem DIAPH1 auf mögliche metastatisch relevante Prozesse der HROC24 Kolonkarzinomzellen zu untersuchen, befasste sich diese Arbeit mit der detaillierten Gegenüberstellung der Auswirkungen von DIAPH1 in Kontroll- und Knock-down-Zellen. Die Charakterisierung dieser Zellen erfolgte größtenteils durch Immunfluoreszenz. Dabei wurden an fixierten Kontroll- und Knock-down-Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie die Aktinstruktur von Filopodien, die membranständige E-Cadherin Lokalisation und der endosomale Vesikeltransport untersucht. Die Zellmorphologie wurde durch Lichtmikroskopie bestimmt. Durch den DNase Assay (Abschnitt 3.5) konnte das intrazelluläre Verhältnis von G- zu F-Aktin der Zellen bestimmt werden. Dies ermöglichte Rückschlüsse auf die Aktivität von ABPs und weiteren relevanten Aktin-beeinflussenden Genen. Die Methode des Live Cell Imagings ermöglichte im Zeitraffer die Analyse der Zelldynamik und des Invasionsverhalten. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargelegt.

4.1 Quantifizierung des DIAPH1 Knock-downs

Um die oben genannten Fragestellungen bearbeiten zu können, wurde DIAPH1 mittels shRNA depletiert. Hierzu wurden die zur Verfügung gestellten Zellen transfiziert, lysiert, das gewonnene Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Molekulargewicht von DIAPH1 bei ungefähr 140 kDa (vgl. UniProtKB - O60610 (DIAP1_HUMAN)) mit Hilfe des Western Blots bestimmt (Abbildung 4-1). Um den Erfolg des DIAPH1 Knock-downs zu prüfen, wurde eine HSC70 Ladekontrolle durchgeführt. Die Quantifizierung des Knock-downs ergab eine DIAPH1 Depletion von 63 % (Abbildung 4-2). Dieses Ergebnis ist Grundlage für die folgenden Experimente und stützt das Weiterarbeiten mit HROC24 Knock-down-Zellen.

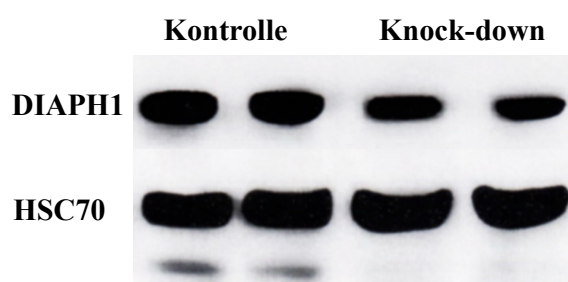


Abbildung 4-1: Protein- und Ladekontrollbanden zur Bestimmung des DIAPH1 Knock-downs. Proben der Kontroll- und Knock-down-Zellen wurden doppelt aufgetragen. Mit Hilfe des Western Blots konnten die DIAPH1 Proteinbanden nachgewiesen werden. Knock-down-Zellen zeigten eine reduzierte DIAPH1 Expression. Durch die HSC70 Ladekontrolle wurde die Menge der applizierten Konzentrationen geprüft.

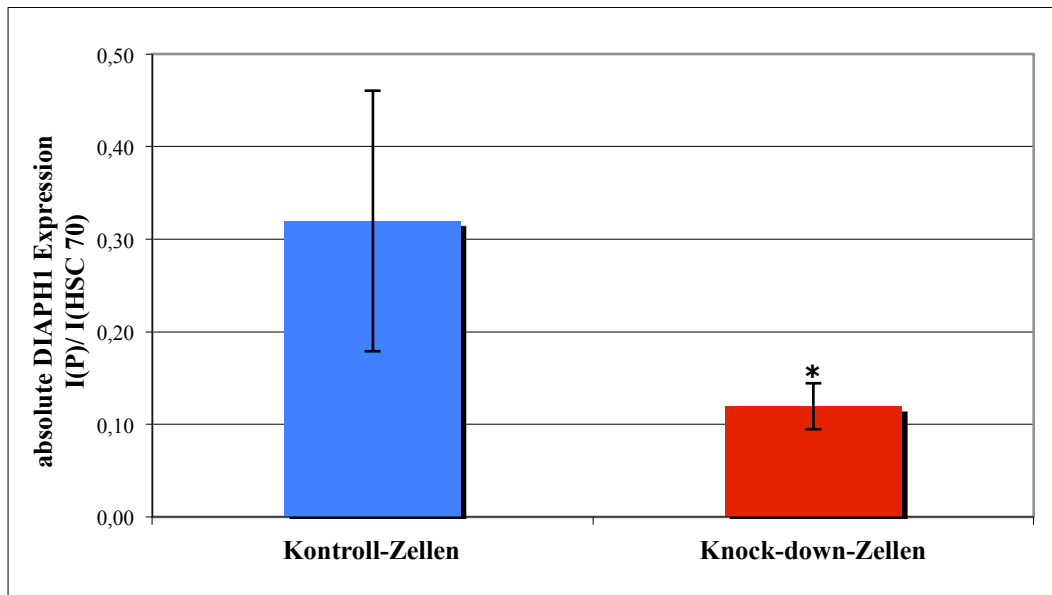


Abbildung 4-2: Quantitative Darstellung der DIAPH1 Expression in HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen. Zur Quantifizierung des Knock-downs wurde der Quotient aus der Intensität des Proteins I(P) und der HSC70 Ladekontrolle I(HSC70) ermittelt. Anschließend wurde die durchschnittliche DIAPH1 Expression in Knock-down-Zellen bestimmt, welche im Vergleich zu Kontroll-Zellen um 63 % verringert war. n = 4

4.2 Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf die Zellmorphologie

Die zellmorphologischen Untersuchungen wurden durchgeführt, um festzustellen, ob autoinhibiertes DIAPH1 die Zellform und Zellausläufer von HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen beeinflusst. Dafür wurden die Zellen fixiert und anschließend bei 20-facher Vergrößerung im Lichtmikroskopmodus untersucht.

Zur Bestimmung der Zellform wurden im fortlaufenden Prozess der Zellkultivierung pro Untersuchungsreihe 50 Einzelzellen mikroskopiert. Die Charakterisierung erfolgte nach drei morphologischen Kriterien: rund, spindelförmig und rhomboid. Die Ergebnisse der mikroskopischen Bildanalyse zeigen, dass die Zellen beider Kulturen mehrheitlich eine kleine, rundliche Form aufwiesen (Abbildung 4-3). Bei Kontroll-Zellen betrug der Anteil dieser Zellen 64 % der untersuchten Zellzahl, wohingegen Knock-down-Zellen einen Anteil von 58 % aufzeigten (Tabelle 4-1, Abbildung 4-4). Demzufolge waren spindelförmige und rhomboide Zellen in einem deutlich geringeren Maß ausgeprägt. Durch Auswerten der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkultivierung konnte kein signifikanter Unterschied der Zellform zwischen Kontroll- und Knock-down-Zellen festgestellt werden.

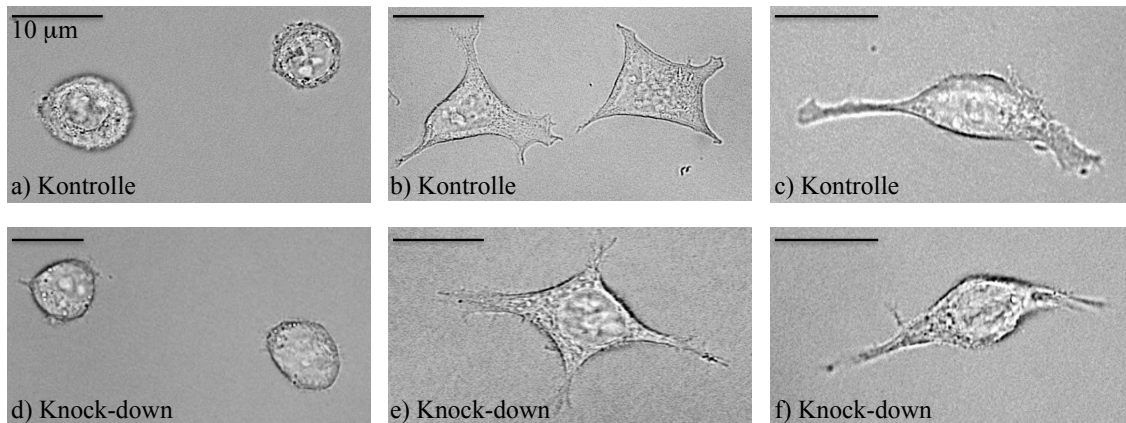


Abbildung 4-3: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Morphologie von HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen wurden in 20-facher Vergrößerung aufgezeichnet. Die Klassifizierung der Zellform wurde in rund, spindelförmig und rhomboid unterteilt. Diese Merkmale waren in beiden Zellkulturen ausgeprägt. Exemplarische Beispiele: a) runde Kontroll-Zellen; b) spindelförmige Kontroll-Zellen; c) rhomboide Kontroll-Zellen; d) runde Knock-down-Zellen; e) spindelförmige Knock-down-Zellen; f) rhomboide Knock-down-Zellen. Die Größenbalken der Aufnahmen betragen 10 µm.

Tabelle 4-1: Prozentuale Verteilung morphologischer Zellkriterien bei HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen mit dazugehöriger Standardabweichung (SD) gemäß Abbildung 4-4. n = 150

Zellform	Kontrolle [%]	SD [+/-]	Knock-down [%]	SD [+/-]
rund	64	2,00	58	3,79
spindelförmig	18	2,08	26	5,29
rhomboid	18	1,53	16	2,08

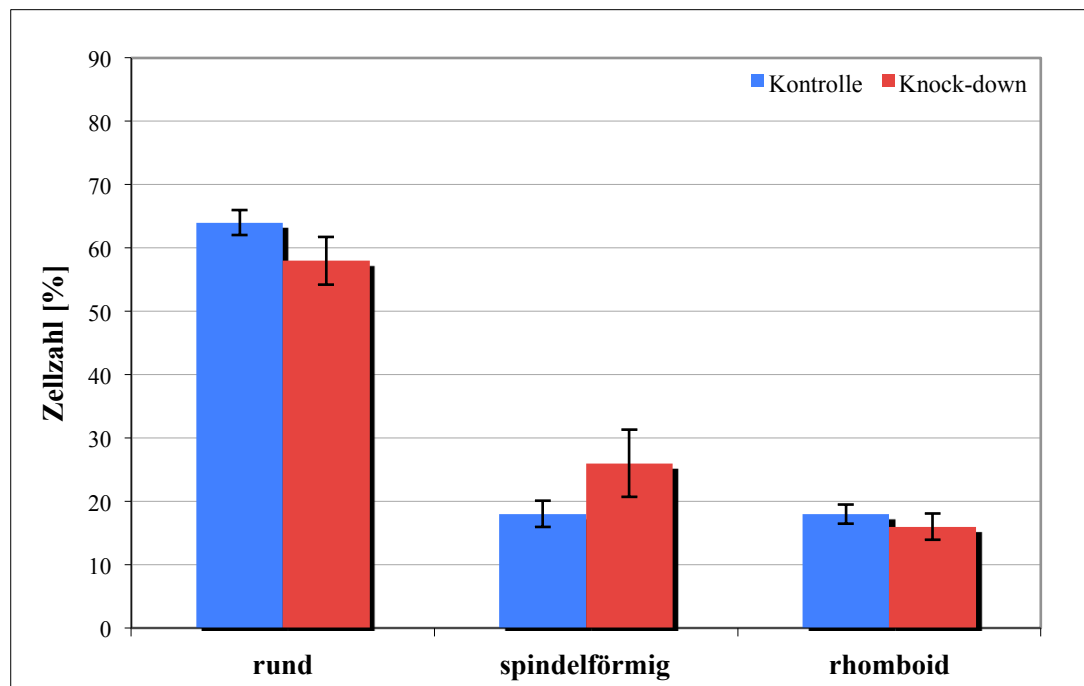
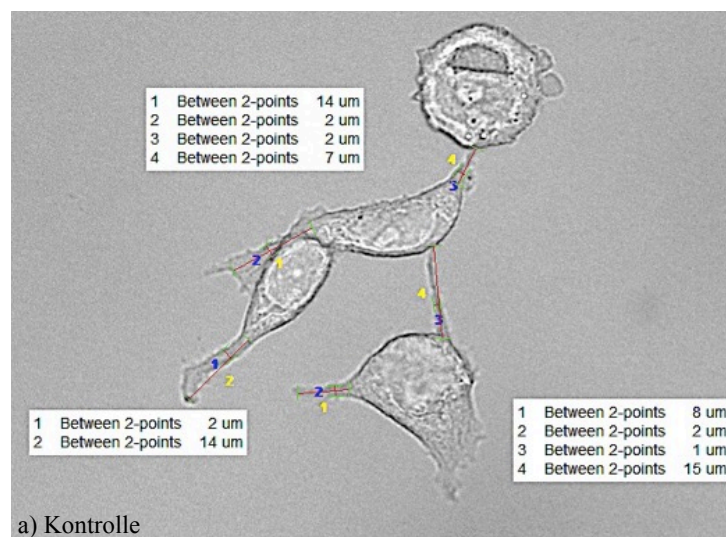


Abbildung 4-4: Verteilung der Zellform bei HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen. Bestimmt durch morphologische Kriterien: rund, spindelförmig und rhomboid. Die Auswertungen erfolgten anhand von lichtmikroskopischen Aufnahmen der fixierten HROC24 Kolonkarzinomzellen in 20-facher Vergrößerung. n = 150

Für die Charakterisierung der Zellausläufer wurden im fortlaufenden Prozess der Zellkultivierung pro Untersuchungsreihe 100 Einzelzellen mikroskopiert. Dabei wurde zuerst das Vorhandensein der Zellausläufer festgestellt und anschließend die Länge und Breite der Zellausläufer mit Hilfe des Programms BZ Analyzer (Keyence) bestimmt. Die Länge der Zellausläufer wurde in $\geq 10,5 \mu\text{m}$ und $\leq 10,5 \mu\text{m}$ eingeteilt. Die Breite der Zellausläufer wurde in $\geq 2,5 \mu\text{m}$ und $\leq 2,5 \mu\text{m}$ festgelegt (Abbildung 4-5). Anzumerken ist, dass Zellausläufer während der Fortbewegung einer ständigen dynamischen Umgestaltung ihres Halte- und Stützgerüsts unterliegen und somit Länge und Breite der Ausläufer nicht konstant sind. Die Auswertungen spiegeln daher eine Momentaufnahme der Zellmigration wider. Bei 95 % der Kontroll- und Knock-down-Zellen wurden Zellausläufer festgestellt, wobei die Länge und Breite stark variierten (Tabelle 4-2, Abbildung 4-6).

Durch Auswerten der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkultivierung konnte kein signifikanter Unterschied der Zellausläufer zwischen Kontroll- und Knock-down-Zellen festgestellt werden.



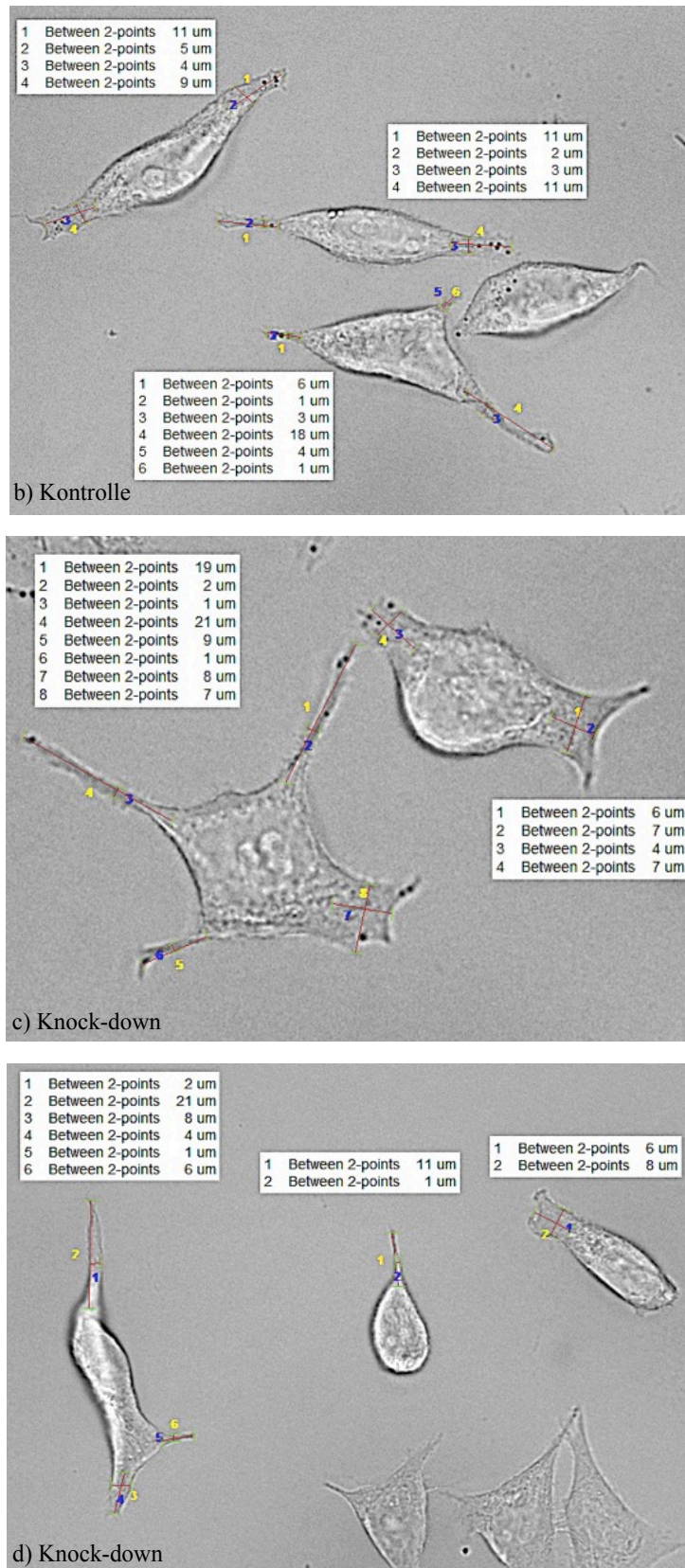


Abbildung 4-5: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellausläufer von HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen. Die Messungen der Zellausläufer wurden durch das Programm BZ Analyzer an 20-fach vergrößerten Aufnahmen durchgeführt. *Between 2-points* gibt die Ausmaße der Länge oder Breite der Zellausläufer an und wurde automatisch in die Aufnahmen eingefügt. Exemplarische Beispiele zeigen große Variation der Ausläufer: a) Kontroll-Zellen; b) Kontroll-Zellen; c) Knock-down-Zellen; d) Knock-down-Zellen.

Tabelle 4-2: Prozentuale Verteilung morphologischer Zellausläuferkriterien bei HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen mit dazugehöriger SD gemäß Abbildung 4-6. n = 300

Zellausläufer	Kontrolle [%]	SD [+/-]	Knock-down [%]	SD [+/-]
Länge $\geq 10,5 \mu\text{m}$	56	21,57	66	7,81
Länge $\leq 10,5 \mu\text{m}$	44	9,29	36	12,58
Breite $\geq 2,5 \mu\text{m}$	39	4,36	35	12,50
Breite $\leq 2,5 \mu\text{m}$	57	12,77	66	17,62
nicht vorhanden	5	2,08	5	1,53

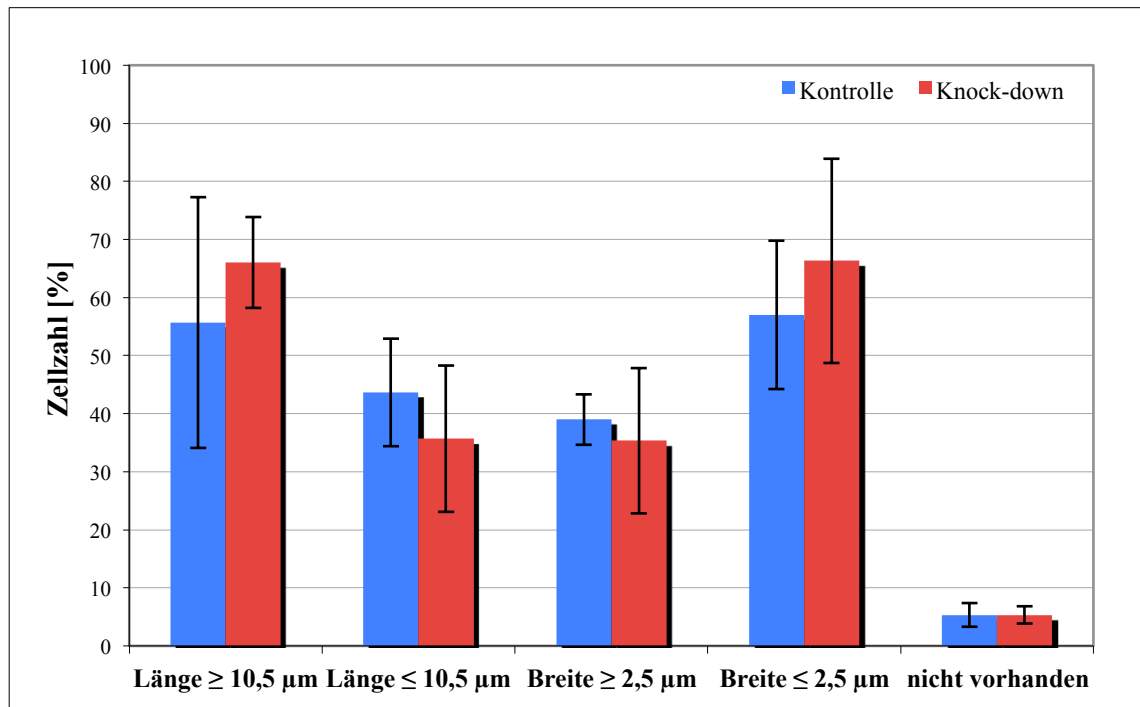


Abbildung 4-6: Ausprägung der Zellausläufer bei HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen bestimmt durch Berechnung von Länge und Breite mit Hilfe des Programms BZ Analyzer. Die Auswertungen erfolgten anhand von lichtmikroskopischen Aufnahmen der fixierten HROC24 Kolonkarzinomzellen in 20-facher Vergrößerung. Die ermittelten Werte müssen jeweils separat betrachtet werden, da die meisten Zellen eine Kombination der Eigenschaften aufwiesen. n = 300

4.3 Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf die Aktinstruktur in Filopodien

Die Untersuchungen der Filopodien konzentrierten sich auf die Fragestellung, ob autoinhibiertes DIAPH1 die Aktinstruktur, Formation und Ausprägung der Filopodien in HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen beeinflusst. Um die Filopodien bei Kontroll- und Knock-down-Zellen zu untersuchen, wurden diese fixiert und die Aktinstruktur der Filopodien mit Phalloidin angefärbt. Im fortlaufenden Prozess der Zellkultivierung wurden bei 100 Zellen pro Untersuchungsreihe die fluoreszierenden

Signale der Phalloidin-Färbung mikroskopisch erfasst, untersucht und anschließend kategorisiert.

Die Phalloidin-gefärbten Zellen wiesen alle Filopodien auf, jedoch unterschied sich die intrazelluläre Aktinstruktur in ihrer Intensität und Ausprägung (Abbildung 4-7). Für die Auswertungen wurden die Länge der Filopodien mit dem Programm BZ Analyzer gemessen. Darauf basierend wurde die Ausprägung der Filopodien durch die Kriterien schwach ausgeprägt ($\leq 1 \mu\text{m}$) und deutlich ausgeprägt ($\geq 1 \mu\text{m}$) beurteilt. Bei Knock-down-Zellen betrug der Anteil der schwach ausgeprägten Filopodien 73 % der untersuchten Zellzahl, wohingegen Kontroll-Zellen einen Anteil von 52 % aufzeigten (Tabelle 4-3, Abbildung 4-8).

Die Auswertungen, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zell-Kultivierung erfolgten, zeigen eine signifikant schwächere Ausprägung der Filopodien-Formation bei Knock-down-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

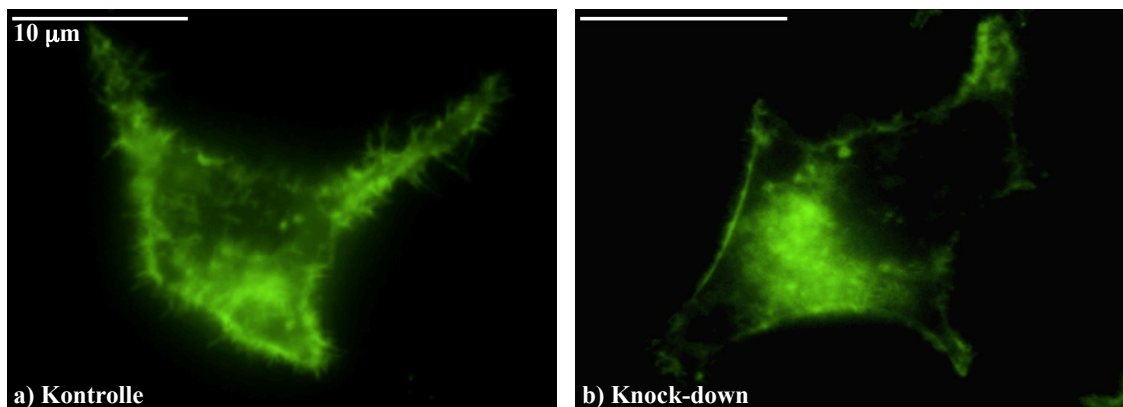


Abbildung 4-7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Phalloidin-gefärbten Aktinstruktur in HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen. Zur Beurteilung der Filopodien wurden Messungen durch das Programm BZ Analyzer an 60-fach vergrößerten Aufnahmen durchgeführt. Exemplarische Beispiele a) Kontroll-Zelle mit Filopodien $\geq 1 \mu\text{m}$; b) Knock-down-Zelle mit Filopodien $\leq 1 \mu\text{m}$. Die Größenbalken der Aufnahmen betragen $10 \mu\text{m}$.

Tabelle 4-3: Prozentuale Verteilung ausgeprägter Filopodien bei HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen mit dazugehöriger SD gemäß Abbildung 4-8. n = 200

Ausprägung der Filopodien	Kontrolle [%]	SD [+/-]	Knock-down [%]	SD [+/-]
schwach ($\leq 1 \mu\text{m}$)	52	5,32	73	5,32
deutlich ($\geq 1 \mu\text{m}$)	48	4,35	27	4,43

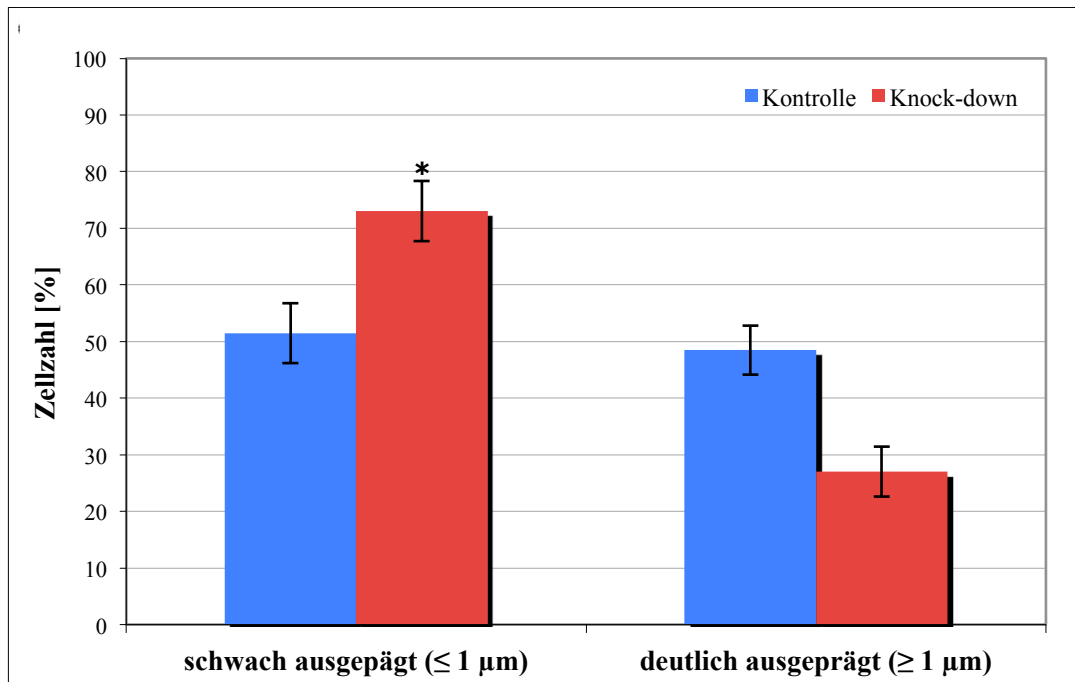


Abbildung 4-8: Ausprägung der Filopodien bei HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen, bestimmt durch strukturelle Kriterien: schwach ausgeprägt ($\leq 1 \mu\text{m}$) und deutlich ausgeprägt ($\geq 1 \mu\text{m}$). Die Auswertungen erfolgten anhand von 60-fach vergrößerten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Phalloidin-gefärbten HROC24 Kolonkarzinomzellen durch das Programm BZ Analyzer. n = 200

4.4 Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf das intrazelluläre Verhältnis von G- zu F-Aktin

Der DNase Assay wurde durchgeführt, um den zellulären Anteil von F-Aktin in Kontroll- und Knock-down-Zellen zu quantifizieren und mögliche Auswirkungen von DIAPH1 auf die Aktin-Polymerisation festzustellen (Abschnitt 3.5).

Für die Ergebnisse wurde der prozentuale F-Aktinanteil (F) berechnet, welcher auf die gesamte Aktinmenge (T) bezogen wurde. Bei Kontroll-Zellen betrug der F-Aktinanteil 85 % und bei Knock-down-Zellen 76 %. Mit einer Standardabweichung von 9,76 % bei Kontroll-Zellen und 5,78 % bei Knock-down-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 4-4, Abbildung 4-9).

Daraus kann abgeleitet werden, dass autoinhibiertes DIAPH1 das prozentuale Verhältnis von G- zu F-Aktin bei Kontroll- und Knock-down-Zellen nicht beeinflusste und keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Aktinverteilung hatte.

Tabelle 4-4: Prozentualer F-Aktinanteil bezogen auf die gesamte intrazelluläre Aktinmenge bei HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen mit dazugehöriger SD gemäß Abbildung 4-9. Die Ergebnisse wurden durch den DNase Assay erfasst und basieren auf spektrophotometrischen Messungen des monomeren G-Aktins und des gesamten depolymerisierten intrazellulären Aktins. n = 4

Aktinanteil bezogen auf gesamtes intrazelluläres Aktin	Kontrolle [%]	SD [+/-]	Knock-down [%]	SD [+/-]
F-Aktin, (<i>F</i>) von (<i>T</i>)	85	9,76	76	5,78

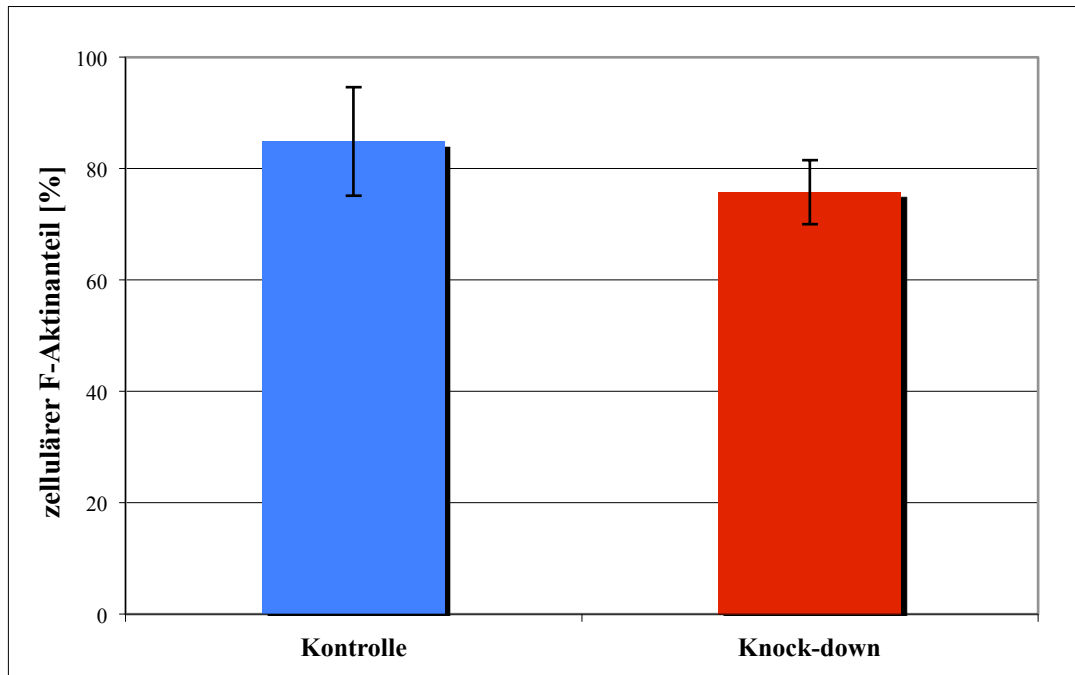


Abbildung 4-9: Prozentualer intrazellulärer F-Aktinanteil von HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen, bezogen auf die gesamte intrazelluläre Aktinmenge. Erfasst wurden die Ergebnisse durch den DNase Assay. n = 4

4.5 Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf die membranständige E-Cadherin Lokalisation

Die durchgeführten E-Cadherin Versuche ermöglichten durch die Fluoreszenzemission des Sekundärantikörpers, die membranständige Lokalisation von E-Cadherin in fixierten HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen zu untersuchen. Dafür wurden im fortlaufenden Prozess der Zellkultivierung bei 50 Zellen pro Untersuchungsreihe die fluoreszierenden Signale der E-Cadherin Färbung mikroskopisch erfasst. Die E-Cadherin Signale der Einzelzellen und Zellaggregate wurden mit Hilfe folgender Klassifizierung charakterisiert: kontinuierliches, diskontinuierliches und lokalisiertes Signal. Zu beachten ist, dass E-Cadherin eine entscheidende Rolle bei Zell-Zell-Kontakten spielt und eventuell nur eine geringe Auswirkung auf Einzelzellen besitzt.

4.5.1 Einzelzellen

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass Einzelzellen beider Kulturen mehrheitlich ein diskontinuierliches E-Cadherin Signal an der Zellmembran aufwiesen (Abbildung 4-10). Bezogen auf die untersuchte Zellzahl betrug der Anteil dieser Zellen bei Kontroll-Zellen 52 % und bei Knock-down-Zellen 54 % (Tabelle 4-5, Abbildung 4-11). Demzufolge war in beiden Kulturen das kontinuierliche und lokalisierte Signal deutlich geringer ausgeprägt.

Durch Auswerten der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkultivierung konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der E-Cadherin Fluoreszenz an der Zellmembran zwischen Kontroll- und Knock-down-Zellen festgestellt werden.

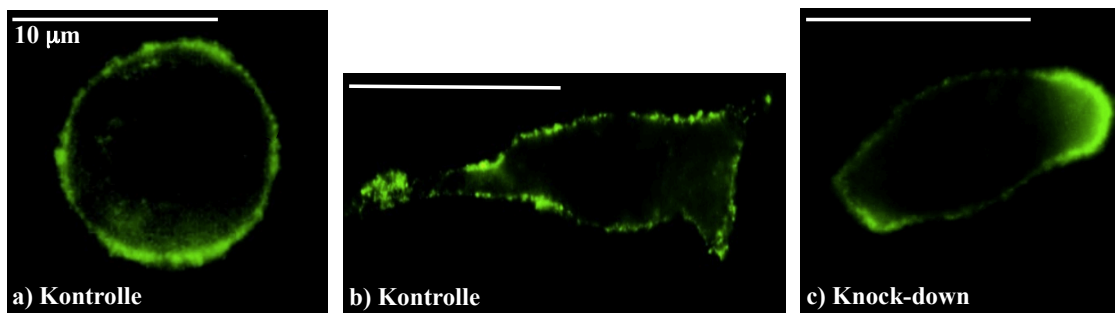


Abbildung 4-10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der membranständigen E-Cadherin Lokalisation bei Einzelzellen. Dafür wurden HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen in 60-facher Vergrößerung aufgezeichnet. Die fluorometrische Klassifizierung der detektierten E-Cadherin Signale wurde in kontinuierlich, diskontinuierlich und lokalisiert unterteilt. Die Merkmale waren in beiden Zellkulturen ausgeprägt. Exemplarische Beispiele: a) Kontroll-Zelle mit kontinuierlichem Signal; b) Kontroll-Zelle mit diskontinuierlichem Signal; c) Knock-down-Zelle mit lokalisiertem Signal. Die Größenbalken der Aufnahmen betragen 10 µm.

Tabelle 4-5: Prozentuale Verteilung membranständiger E-Cadherin Signale bei Einzelzellen von HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen mit dazugehöriger SD gemäß Abbildung 4-11. n = 100

Ausprägung der E-Cadherin Signale	Kontrolle [%]	SD [+/-]	Knock-down [%]	SD [+/-]
kontinuierlich	22	1,41	26	2,83
diskontinuierlich	52	1,41	54	1,41
lokalisiert	26	2,83	20	1,41

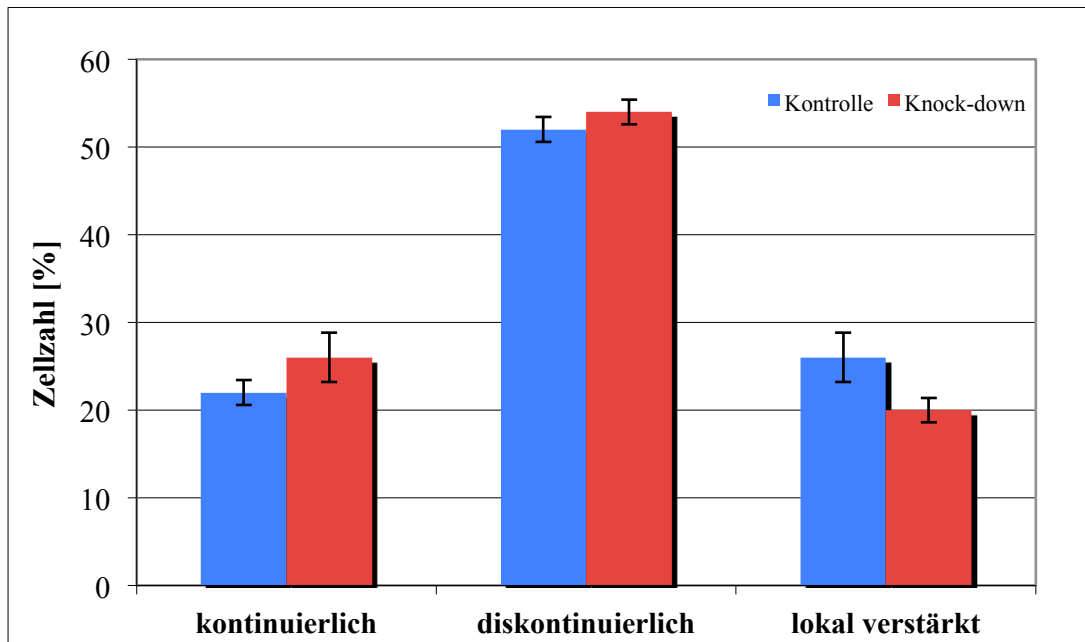


Abbildung 4-11: Verteilung der membranständigen E-Cadherin Lokalisation bei Einzelzellen von HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen. Bestimmt durch die Signalcharakterisierung: kontinuierlich, diskontinuierlich und lokalisiert. Die Auswertungen erfolgten an Hand von 60-fach vergrößerten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der E-Cadherin-gefärbten HROC24 Kolonkarzinomzellen. Dafür wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die E-Cadherin Lokalisation durch Immunhistologie nachgewiesen. n = 100

4.5.2 Zellaggregate

Die untersuchten Zellaggregate zeigten, dass Kontroll- und Knock-down-Zellen mehrheitlich ein kontinuierliches E-Cadherin Signal an der Zellmembran aufwiesen (Abbildung 4-12). Bei Kontroll-Zellen betrug der Anteil dieser Zellen 78 % der untersuchten Zellzahl, bei Knock-down-Zellen 65 %. Die Standardabweichung betrug bei Kontroll- und Knock-down-Zellen 2,12 %. Demzufolge war in beiden Kulturen das diskontinuierliche und lokalisierte Signal in der Zellmembran deutlich geringer ausgeprägt. Bei Kontroll-Zellen zeigten 15 % der Zellen ein diskontinuierliches Signal mit einer Standardabweichung von 1,41 %. Bei Knock-down-Zellen betrug der Anteil dieser Zellen 28 % mit einer Standardabweichung von 0,71 % (Tabelle 4-6, Abbildung 4-13). Durch Auswerten der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkultivierung konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der kontinuierlichen E-Cadherin Lokalisation bei Kontroll-Zellen und der diskontinuierlichen E-Cadherin Lokalisation bei Knock-down-Zellen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde kein Unterschied bei der lokal verstärkten E-Cadherin Lokalisation aufgezeigt. Die Ergebnisse zeigen, dass Knock-down-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen eine signifikant reduzierte membranständige E-Cadherin Lokalisation aufzeigten.

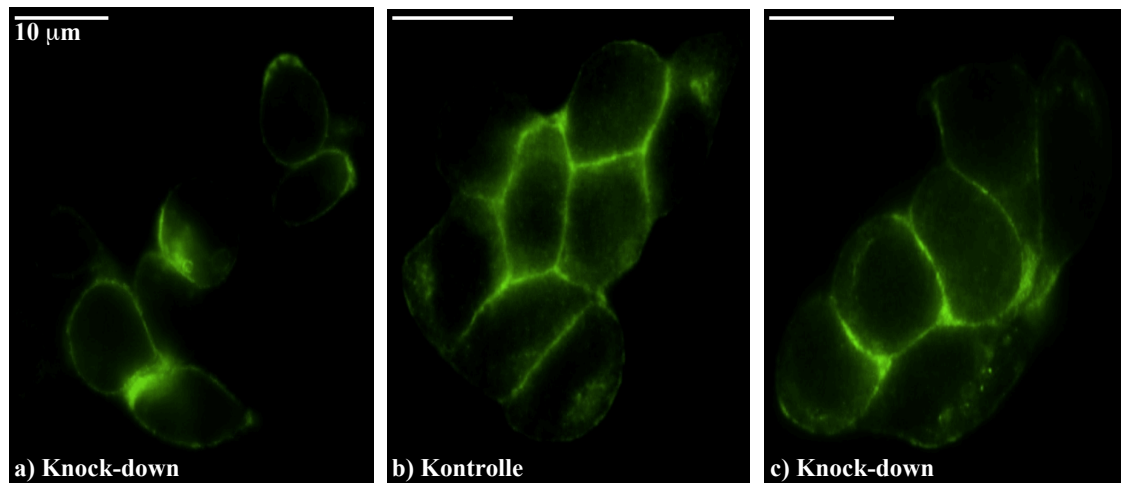


Abbildung 4-12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der membranständigen E-Cadherin Lokalisation bei Zellaggregaten. Dafür wurden HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen in 60-facher Vergrößerung aufgezeichnet. Die fluorometrische Klassifizierung der E-Cadherin Signale wurde in kontinuierlich, diskontinuierlich und lokalisiert unterteilt. Diese Merkmale waren in beiden Zellkulturen ausgeprägt. Exemplarische Beispiele: a) Kontroll-Zellen mit kontinuierlichen, diskontinuierlichen und lokalisierten Signalen; b) Kontroll-Zellen mit kontinuierlichen Signalen; c) Knock-down-Zellen mit kontinuierlichen Signalen. Die Größenbalken der Aufnahmen betragen 10 µm.

Tabelle 4-6: Prozentuale Verteilung membranständiger E-Cadherin Signale bei Zellaggregaten von HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen mit dazugehöriger SD gemäß Abbildung 4-13. n = 100

Ausprägung des E-Cadherin Signals	Kontrolle [%]	SD [+/-]	Knock-down [%]	SD [+/-]
kontinuierlich	78	2,12	65	2,12
diskontinuierlich	15	1,41	28	0,71
lokalisiert	7	0,71	7	2,21

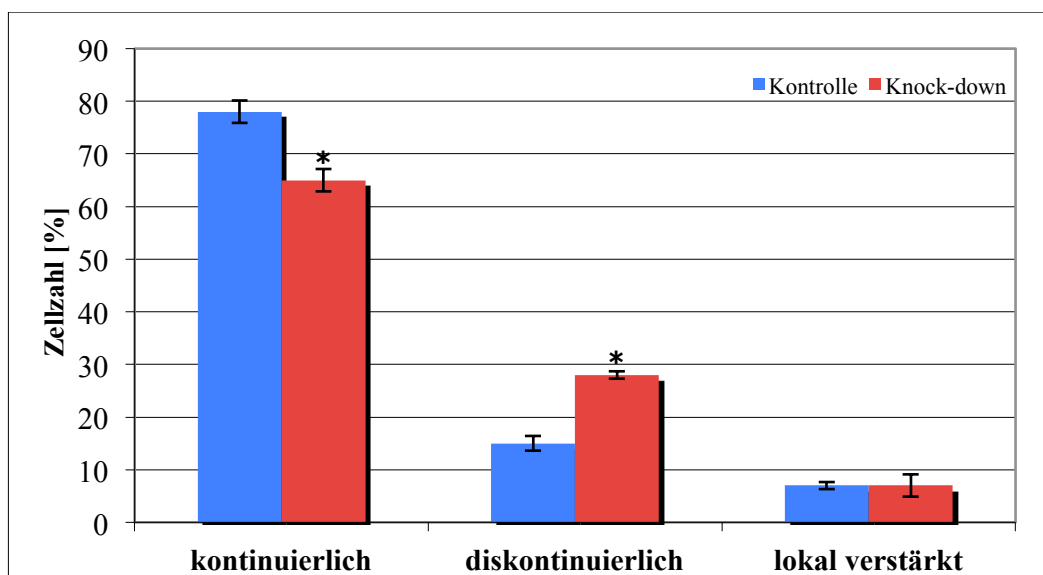


Abbildung 4-13: Verteilung der membranständigen E-Cadherin Lokalisation bei Zellaggregaten von HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen, bestimmt durch die Signalcharakterisierung: kontinuierlich, diskontinuierlich und lokalisiert. Die Auswertungen erfolgten anhand von 60-fach vergrößerten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der E-Cadherin-gefärbten HROC24 Zellaggregaten. Dafür wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die E-Cadherin Lokalisation durch Immunhistologie nachgewiesen. n = 100

4.6 Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf den endosomalen Vesikeltransport

Durch die Fluoreszenzdetektion des Antiköpers, welcher in fixierten HROC24 Kolonkarzinomzellen an *early endosome antigen 1* (EEA1) gebunden hatte, konnte die Lokalisation und Akkumulation der frühen Endosomen bestimmt werden. Dafür wurden im fortlaufenden Prozess der Zellkultivierung bei 50 Zellen pro Untersuchungsreihe die fluoreszierenden Signale der EEA1-Färbung mikroskopisch erfasst. Zur Auswertung wurden HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen zunächst in zwei übergeordnete Kategorien eingeteilt, wodurch die Zellen anhand des Vorhandenseins von Vesikeln oder Clustern unterschieden wurden. Als Cluster wurde die Akkumulation mehrerer Vesikel definiert, welche nicht voneinander zu differenzieren waren und sich als geschlossene Einheit abgrenzten. Innerhalb der zwei Kategorien wurde nochmals anhand der Vesikel bzw. Cluster in folgende Subkategorien unterschieden: ≥ 10 Vesikel; ≤ 10 Vesikel; keine Vesikel; ≥ 10 Cluster; ≤ 10 Cluster; keine Cluster.

Die Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigte, dass alle Zellen frühe Endosomen aufwiesen. Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Anzahl früher Endosomen bei Kontroll- und Knock-down-Zellen festgestellt werden (Abbildung 4-14). Bezogen auf die untersuchte Zellzahl zeigten 64 % der Kontroll-Zellen einen verstärkten Vesikeltransport von ≥ 10 Vesikel pro Zelle, wohingegen die Anzahl bei Knock-down-Zellen 41 % betrug (Tabelle 4-7, Abbildung 4-15). Durch Auswerten der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkultivierung konnte ein signifikanter Unterschied der Anzahl an Vesikeln pro Zelle festgestellt werden.

Betrachtet man die Häufung der Cluster pro Zelle, ist festzustellen, dass ein Fünftel der Zellen keine Cluster aufwiesen (Kontrolle 18 %; Knock-down 23 %). Bei Zellen beider Kulturen war mehrheitlich eine geringe Anzahl an Clustern mit ≤ 10 Clustern zu vermerken. Bei Kontroll-Zellen betrug der Anteil dieser Zellen 64 % der untersuchten Zellzahl, bei Knock-down-Zellen 70 % (Tabelle 4-7, Abbildung 4-15).

Die Ergebnisse zeigen, dass Knock-down-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen eine signifikant geringere Anzahl an Endosomen aufzeigten. Innerhalb der Cluster wurden keine Unterschiede verzeichnet.

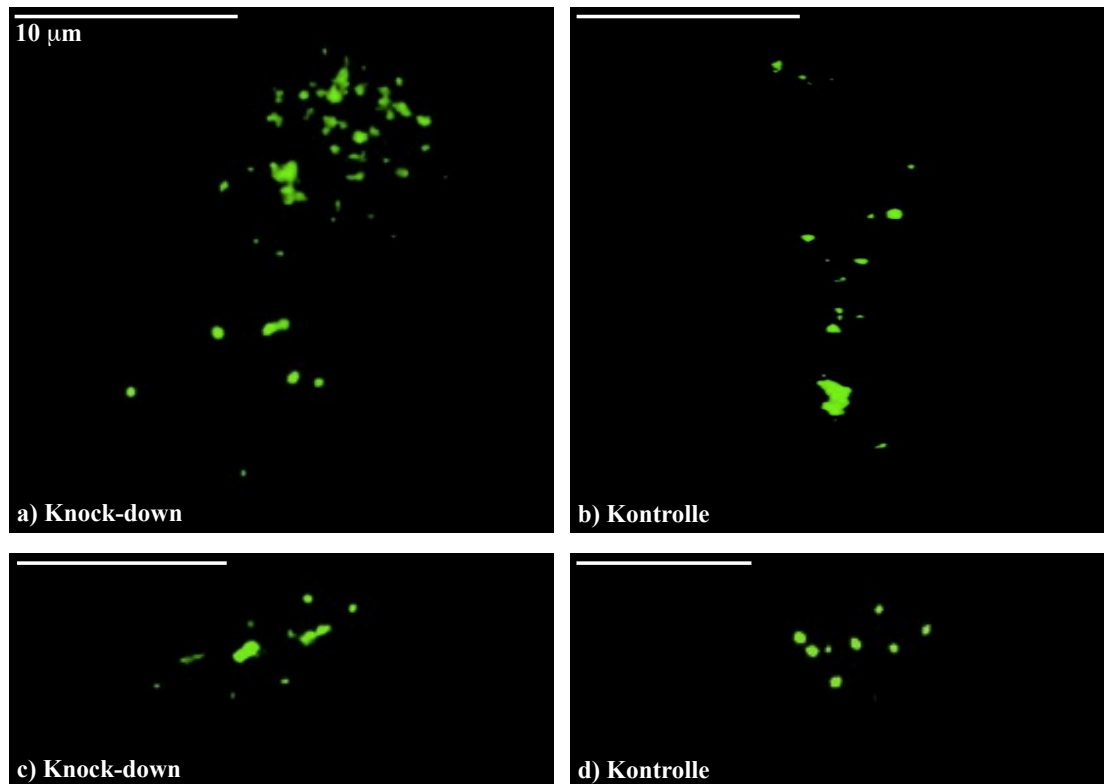


Abbildung 4-14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Endosomen und endosomalen Cluster in HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zellen. Diese wurden in 60-facher Vergrößerung aufgezeichnet. Exemplarische Beispiele: a) Knock-down-Zelle mit ≥ 10 Vesikeln und ≥ 10 Clustern; b) Knock-down-Zelle mit ≥ 10 Vesikeln und ≤ 10 Clustern; c) Knock-down-Zelle mit ≤ 10 Vesikeln und ≤ 10 Clustern; d) Kontrolle-Zelle mit ≤ 10 Vesikeln und keinen Clustern. Die Größenbalken der Aufnahmen betragen $10 \mu\text{m}$.

Tabelle 4-7: Prozentuale Verteilung endosomaler Signale (EEA1) pro HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zelle mit dazugehöriger SD gemäß Abbildung 4-15. n = 100

Anzahl an Endosomen (pro Zelle)	Kontrolle [%]	SD [+/-]	Knock-down [%]	SD [+/-]
≥ 10 Vesikel	64	2,83	41	2,12
≤ 10 Vesikel	36	2,83	59	2,12
keine Vesikel	0	0	0	0
≥ 10 Cluster	18	5,66	7	0,71
≤ 10 Cluster	64	1,41	70	0,71
keine Cluster	18	7,07	23	0,71

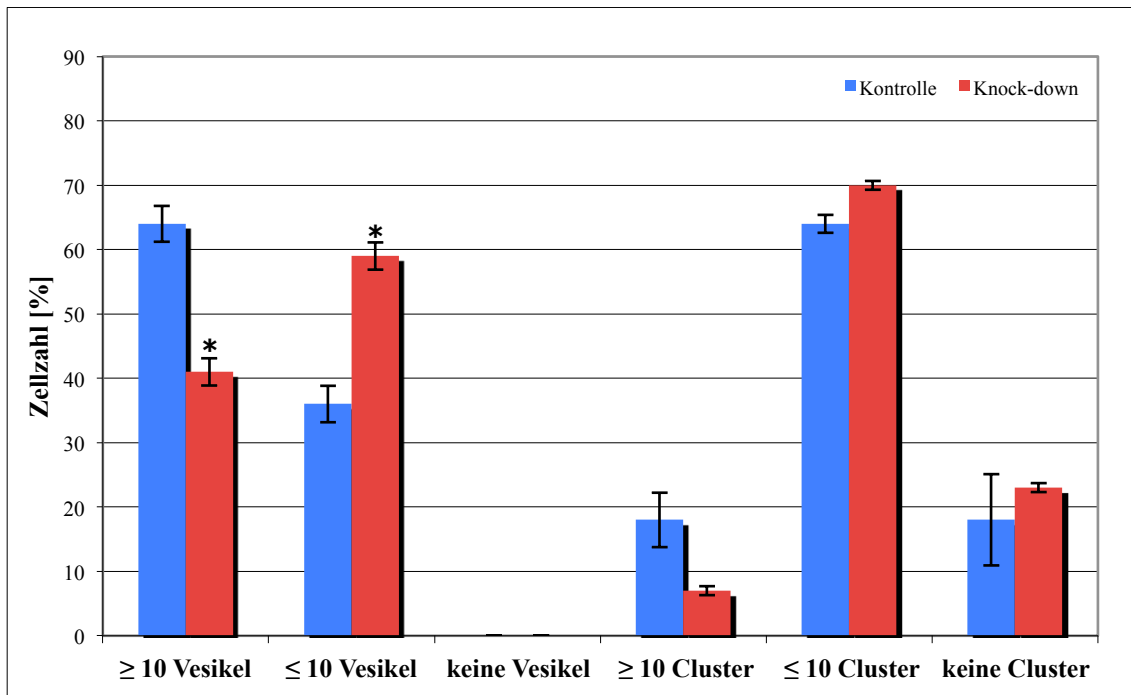


Abbildung 4-15: Anzahl früher Endosomen und deren Fusion zu Clustern pro HROC24 Kontroll- und Knock-down-Zelle. Bestimmt durch die Signalcharakterisierung: ≥ 10 Vesikel; ≤ 10 Vesikel; keine Vesikel; ≥ 10 Cluster; ≤ 10 Cluster; keine Cluster. Die Auswertungen erfolgten anhand von 60-fach vergrößerten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der EEA1-gefärbten HROC24 Kolonkarzinomzellen. Dafür wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die EEA1 Lokalisation durch Immunhistologie nachgewiesen. $n = 100$

4.7 Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf Zelldynamik und Invasionsverhalten

Das Live Cell Imaging wurde bei HROC24 Kontroll- und Knock-down-Sphäroiden durchgeführt, um die Zelldynamik und das Invasionsverhalten in verschiedenen Dimensionen über einen bestimmten Zeitraum zu beobachten. Sphäroide sind dreidimensionale Zellaggregate, welche durch den Erhalt von vielen biochemischen und morphologischen Zelleigenschaften ein *in vivo* ähnliches Modell darstellen.

Die Messungen wurden bei Kontroll- und Knock-down-Sphäroiden im Multipoint-Modus in einem Zeitrasterabstand von 5 Min. über 18 Stunden durch das Programm BZ Viewer aufgezeichnet. Die Auswertungen erfolgten an 2D-Bildern, welche auf verschiedenen Höhen in der vertikalen Ebene einer Zelle aufgenommen wurden. Um die Umgebungsbedingungen im physiologischen Bereich aufrechtzuerhalten, wurden die Sphäroide mit Vollmedium beschichtet und in der Inkubationskammer des Mikroskops bei 37 °C und 5 % CO₂ positioniert.

Die Analyse des Live Cell Imagings der HROC24 Kontroll-Zellen zeigte erste sichtbare dynamische Veränderungen nach 2 Stunden durch plötzliches Ablösen mehrerer Zellen

und Zell-Clustern aus den akkumulierten Zellen des Sphäroids. Dies wird durch rote Pfeile in der Zeitrafferaufnahme nach 2 Stunden ($t = 2$) verdeutlicht (Abbildung 4-16). Bis zur 10. Stunde konnte eine zunehmende Auflockerung des zellulären Sphäroidrands verzeichnet werden. Nach 10 Stunden war erneut das Ablösen einzelner Zellen aus dem Sphäroidrand zu sehen. Dies wird durch rote Pfeile in der Zeitrafferaufnahme nach 10 Stunden ($t = 10$) veranschaulicht (Abbildung 4-16). In den darauf folgenden Stunden wurden keine weiteren sichtbaren Veränderungen des Sphäroids wahrgenommen.

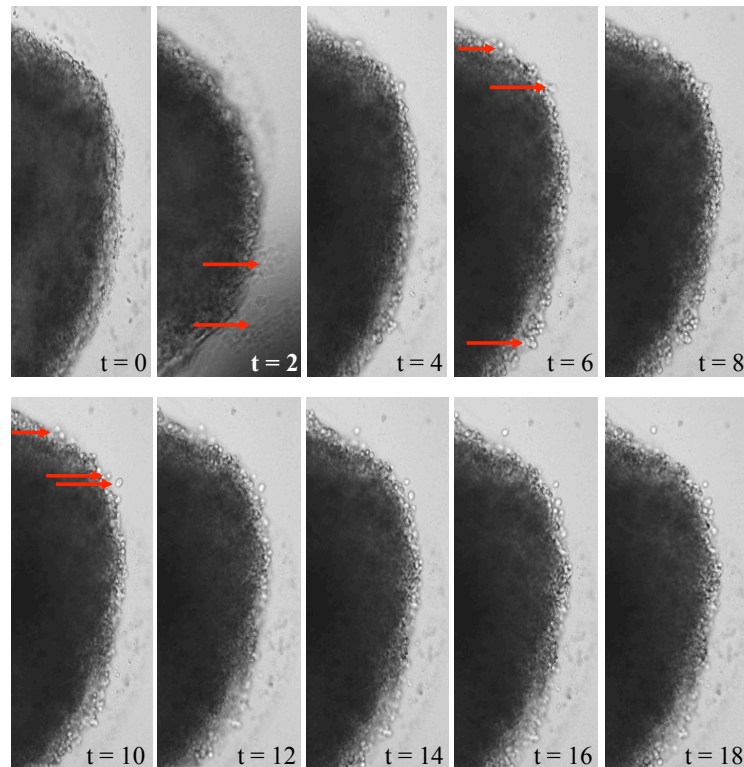


Abbildung 4-16: Live Cell Imaging der HROC24 Kontroll-Zellen. Der Zeitrafferabstand betrug 5 Min. über 18 Stunden. Dargestellt sind Momentaufnahmen mit einem 2-stündigen Zeitabstand des identischen Sphäroidausschnitts mit Ausnahme von $t = 2$ zur Verdeutlichung des Zellverhaltens. t in Stunden angegeben: $t = 0$: Ausgangssituation; $t = 2$: plötzliches Ablösen der Zellen und Zell-Clustern aus dem Sphäroidrand, gekennzeichnet durch rote Pfeile; $t = 4$: Auflockerung des zellulären Sphäroidrands; $t = 6$: fortschreitende Auflockerung des Sphäroidrands, exemplarisch gekennzeichnet durch rote Pfeile; $t = 8$: keine sichtbaren Veränderungen; $t = 10$: Ablösen einzelner Zellen vom Sphäroidrand, gekennzeichnet durch rote Pfeile; $t = 12$ bis $t = 18$: keine sichtbaren Veränderungen

Zusammenfassend ist festzustellen, dass nach einer 2-stündigen Initialphase ein Zellausbruch aus dem Sphäroidrand der Kontroll-Zellen zu verzeichnen war. Anschließend lockerte sich der Sphäroidrand auf. Weitere vereinzelte Zellablöseprozesse wurden nach 10 Stunden beobachtet. Danach wurden keine Veränderungen festgestellt.

Die Analyse des Live Cell Imagings der HROC24 Knock-down-Zellen zeigte im Vergleich zu Kontroll-Zellen ein weniger dynamisches Zellverhalten. Nach 4 Stunden wurde eine Auflockerung des Sphäroidrands sichtbar. Zusätzlich wurde eine Akkumulation der Zellen in der Peripherie des Sphäroids festgestellt, die zu Ausstülpungen des Sphäroidrands führte. Diese Veränderungen wurden bis zur 6. Stunde beobachtet und sind durch rote Pfeile in den Zeitrafferaufnahmen nach 4 Stunden ($t = 4$) und 6 Stunden ($t = 6$) verdeutlicht (Abbildung 4-17). Nach 10 Stunden wurde ein Längenwachstum der zellulären Ausstülpungen des Sphäroids sichtbar, das durch den roten Pfeil in der Zeitrafferaufnahme nach 10 Stunden ($t = 10$) visualisiert wird (Abbildung 4-17). Nach 12 Stunden lockerten sich die Zellstrukturen am Sphäroidrand und in den Ausstülpungen auf, jedoch konnten keine Ablöseprozesse der Zellen oder Zell-Cluster verzeichnet werden.

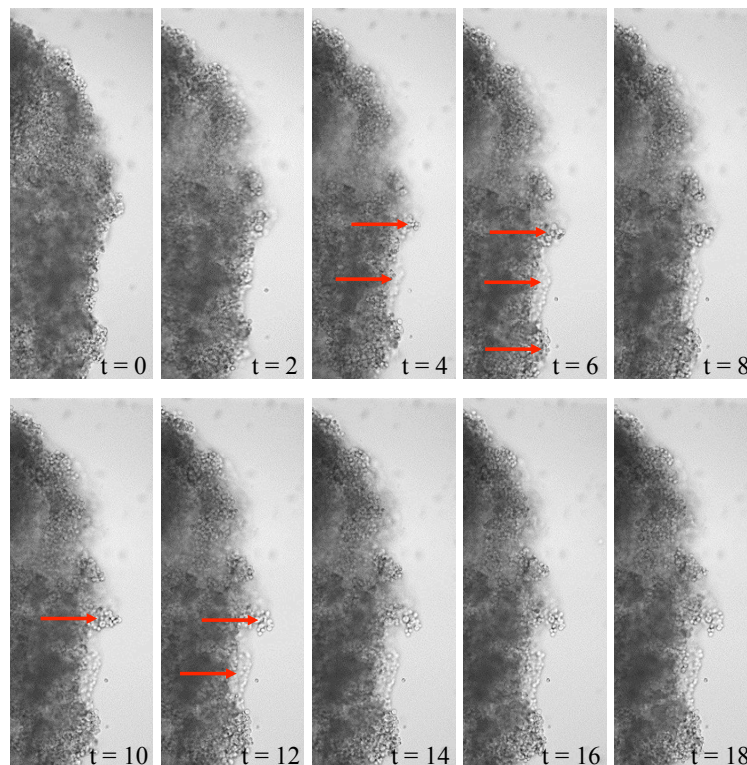


Abbildung 4-17: Live Cell Imaging der HROC24 Knock-down-Zellen. Der Zeitrafferabstand betrug 5 Min. über 18 Stunden. Dargestellt sind Momentaufnahmen mit einem 2-stündigen Zeitabstand des identischen Sphäroidausschnitts. t in Stunden angegeben: $t = 0$: Ausgangssituation, $t = 2$: keine sichtbaren Veränderungen; $t = 4$: Auflockerung des zellulären Sphäroidrands und Akkumulation der Zellen zu Ausstülpungen, gekennzeichnet durch rote Pfeile; $t = 6$: fortschreitende zelluläre Auflockerung und Akkumulation, gekennzeichnet durch rote Pfeile; $t = 8$: keine sichtbaren Veränderungen; $t = 10$: Längenzuwachs der Ausstülpungen, gekennzeichnet durch roten Pfeil; $t = 12$: Auflockerung der Zellstrukturen des Sphäroidrands und der Ausstülpungen, gekennzeichnet durch rote Pfeile; $t = 14$ bis $t = 18$: keine sichtbaren Veränderungen

Anzumerken ist, dass sich die Morphologie des hier abgebildeten Kontroll- und Knock-down-Sphäroids unterscheidet. Jedoch ist dies nicht relevant für die Untersuchungen, da Sphäroide eine große Variation aufzeigen. Entscheidend ist, dass gleiche Zeitabstände zwischen Kontroll- und Knock-down-Zellen miteinander verglichen werden.

Durch genaues Beobachten einzelner Ausschnitte des Knock-down-Sphäroids konnte nach 12 Stunden eine strangförmige Zellanordnung innerhalb der Ausstülpungen des Sphäroids beobachtet werden. Diese Anordnung wird durch eine geschwungene Klammer in der Zeitrafferaufnahme nach 12 Stunden ($t = 12$) verdeutlicht (Abbildung 4-18). Nach 16 Stunden lockerte sich die Zellstruktur geringfügig auf, jedoch blieben die Zellen bis zum Versuchsabbruch nach 18 Stunden in ihrer strangförmigen Anordnung (Abbildung 4-18).

Festzustellen ist, dass nach 4 bis 6 Stunden eine Auflockerung des Sphäroidrands und eine periphere Akkumulation der Zellen zu kleinen zellulären Ausstülpungen sichtbar wurde. Nach 10 Stunden konnte eine Verlängerung der Ausstülpungen verzeichnet werden, welche nach 2 weiteren Stunden eine strangförmige zelluläre Anordnung aufzeigten. Das Ablösen der Zellen aus dem Sphäroid wurde nicht beobachtet.

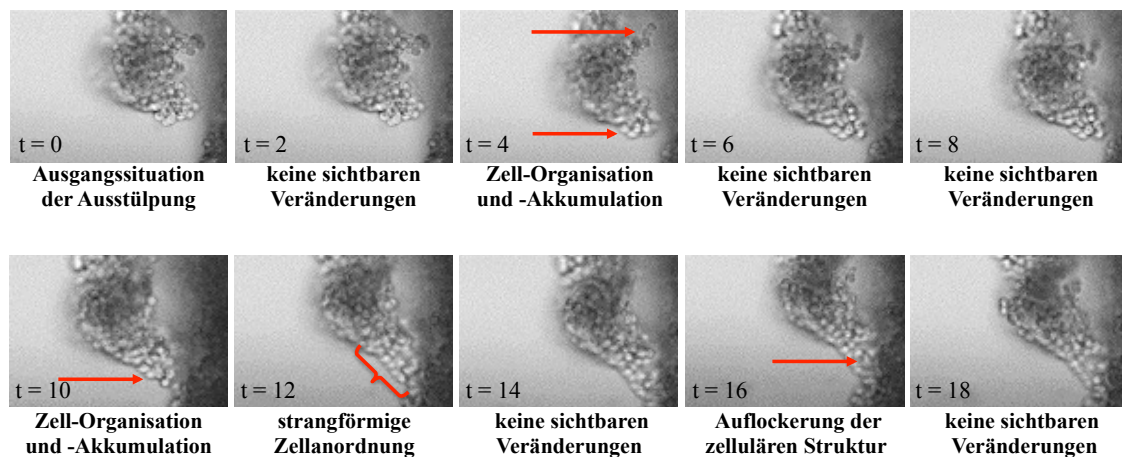


Abbildung 4-18: Vergrößerter Ausschnitt des Live Cell Imagings der HROC24 Knock-down-Zellen zur Verdeutlichung des Zellverhaltens. Der Zeitrafferabstand betrug 5 Min. über 18 Stunden. Dargestellt sind Momentaufnahmen mit einem 2-stündigen Zeitabstand des identischen Sphäroidausschnitts.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse des Live Cell Imagings darauf hin, dass Zelldynamik und Invasionspotential durch den DIAPH1 Knock-down gehemmt wurden. Bei Knock-down-Sphäroiden konnte kein Ablöseprozess der Zellen verzeichnet werden, wohingegen bei Kontroll-Sphäroiden das Ablösen von Zellen und Zell-Clustern beobachtet wurde. Um eine fundierte Aussage zu treffen, muss der Versuch noch mehrmals wiederholt werden.

5 Diskussionen

In der hier vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob autoinhibiertes DIAPH1 durch Auswirkungen auf das Aktin-Zytoskelett und auf zelluläre Vorgänge das metastatische Potential der HROC24 Kolonkarzinomzellen fördert. Dies würde implizieren, dass DIAPH1 auch im autoinhibierten Zustand die Metastasierung begünstigt.

Zum aktuellen Zeitpunkt sind neben den Aktin-nukleierenden Eigenschaften auch Mikrotubuli-stabilisierende Effekte von DIAPH1 untersucht worden. Jedoch liegen in der Literatur fast ausschließlich Erkenntnisse zu Mikrotubuli-stabilisierenden Effekten von aktiviertem DIAPH1 vor (Wen et al. 2004; Palazzo et al. 2001; Goulimari et al. 2005). Erste Forschungsergebnisse zu autoinhibiertem DIAPH1 wurden bei einer weiteren Kolonkarzinomzelllinie, HCT116, durch Lin et al. festgestellt. Gezeigt wurde, dass autoinhibiertes DIAPH1 ausschließlich Effekte auf die Stabilisierung der Mikrotubuli hat. Detailliert wurde aufgezeigt, dass autoinhibiertes DIAPH1 sowohl den Vesikeltransport als auch die Translokation von Integrin $\beta 1$ zu fokalen Adhäsionen durch Stabilisierung der Mikrotubuli fördert und darüber Adhäsion und Migration beeinflussen kann (Lin et al., 2015).

Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften der HCT116 Kolonkarzinomzellen und der in dieser Arbeit untersuchten HROC24 Kolonkarzinomzellen ist anzunehmen, dass DIAPH1 im autoinhibierten Zustand ebenfalls die Stabilisierung der Mikrotubuli fördert und dadurch möglicherweise das metastatische Potential begünstigt.

Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die Rolle von autoinhibiertem DIAPH1 bei der Metastasierung von HROC24 Kolonkarzinomzellen besser zu verstehen. Durch die Gegenüberstellung der Kontroll- und Knock-down-Zellen konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse des Knock-downs zusammengefasst: erstens eine schwächere Ausprägung der Filopodien, zweitens eine reduzierte membranständige E-Cadherin Lokalisation bei Zellaggregaten und drittens eine geringere Anzahl früher Endosomen. Es konnten keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Verteilung von monomerem und filamentösem Aktin verzeichnet werden. Weiterhin wurden keine morphologischen Veränderungen in Zellform und Zellausläufern festgestellt. Die beiden letzteren Ergebnisse bestätigen, dass autoinhibiertes DIAPH1 keine Auswirkungen auf die Aktin-Polymerisation besitzt, da sowohl die intrazelluläre Aktinverteilung als auch morphologische Veränderungen auf Umgestaltungsprozessen des Aktin-Zytoskeletts basieren (Watanabe, 2010). Beide

Prozesse wurden jedoch nicht von autoinhibiertem DIAPH1 beeinflusst. Somit ist anzunehmen, dass DIAPH1 im autoinhibierten Zustand nicht als Aktin-Nukleator agiert. Hingegen ist es am wahrscheinlichsten, dass autoinhibiertes DIAPH1 durch seine Mikrotubuli-stabilisierenden Effekte zelluläre Prozesse direkt beeinflussen kann.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird im Folgenden diskutiert, ob DIAPH1 Auswirkungen auf Adhäsion, Migration und Invasion haben könnte und durch Stabilisierung der Mikrotubuli möglicherweise das metastatische Potential der HROC24 Kolonkarzinomzellen fördert.

5.1 Autoinhibiertes DIAPH1 verstärkt Filopodien-Formation

Die zentrale Fragestellung der Filopodien-Untersuchungen ist, ob DIAPH1 im autoinhibierten Zustand die Formation der Aktin-reichen Filopodien fördert. Dies beleuchtet einen interessanten Ansatz, da der zugrunde liegende Mechanismus auf einer Interaktion zwischen der Aktinstruktur der Filopodien und dem Zytoskelett der Mikrotubuli basieren müsste. Veränderungen in der Filopodien-Formation könnten durch ihre Relevanz bei entscheidenden Schritten der Zellmigration Auswirkungen auf das metastatische Potential der HROC24 Kolonkarzinomzellen haben.

Die Versuchsergebnisse zeigen eine signifikant schwächere Filopodien-Ausprägung bei HROC24 Knock-down-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Festzustellen ist, dass trotz des Knock-downs alle Zellen Filopodien aufzeigten. In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass autoinhibiertes DIAPH1 keinen Einfluss auf die Aktindynamik hat (Abschnitt 4.4). Somit basieren die deutlich ausgeprägten Filopodien der Kontroll-Zellen nicht auf Aktin-nukleierenden Wirkungen. Vielmehr sind sie am wahrscheinlichsten auf Mikrotubuli-stabilisierende Effekte des autoinhibierten DIAPH1 zurückzuführen. Weiterhin wird deutlich, dass der Prozess der Filopodien-Formation durch weitere Faktoren beeinflusst werden muss. Dies wurde durch eine eingeschränkte, jedoch nicht ausbleibende Filopodien-Formation bei Knock-down-Zellen deutlich.

Unterstützend zu diesen Ergebnissen wurde durch die Forschungsgruppe Tanizaki et al. an dendritischen mDia1 Knock-down-Zellen ebenfalls eine verminderte Formation von Filopodien festgestellt. Jedoch wurden auch hier trotz des Knock-downs Filopodien ausgebildet und aufrechterhalten (Tanizaki et al., 2010). Weitere Forschungsgruppen konnten eine direkte Interaktion zwischen den Mikrotubuli und der Aktinstruktur der Filopodien feststellen (Schaefer et al., 2002; Schober et al., 2007). Demnach strahlen

Mikrotubuli in Lamellipodien bis an die Basis der Filopodien und teilweise über diese Basis hinaus in Filopodien ein (Schober et al., 2007). Dabei tritt das Plus-Ende der Mikrotubuli unter anderem in direkten Kontakt mit der Aktinstruktur der Filopodien, wodurch deren Dynamik und die gerichtete Zellbewegung beeinflusst werden (Schaefer et al., 2002; Schober et al., 2007). Zudem zeigten Forschungsgruppen, dass die Entkopplung von interagierenden Mikrotubuli und Aktin-reichen Filopodien die Dichte der Filopodien beeinflusst (Goldberg and Burmeister, 1992; Schober et al., 2007). Dies verdeutlicht, dass ein Mikrotubuli-abhängiger Mechanismus für die Kontrolle und Reorganisation der Filopodien mitverantwortlich ist.

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass autoinhibiertes DIAPH1 essentiell für die Filopodien-Formation der HROC24 Kolonkarzinomzellen ist. Folglich würde eine verstärkte Filopodien-Formation die Zellen befähigen ihre Umgebung besser nach geeigneten Anheftungsbedingungen abzusuchen, um anschließend Zell-Matrix-Kontakte zur ECM aufzubauen. Unterstützend zeigten Lin et al., dass autoinhibiertes DIAPH1 die Zell-Matrix-Kontakte durch Stabilisierung der Mikrotubuli fördert (Lin et al., 2015). Naheliegend ist, dass die verstärkte Filopodien-Formation die Ausbildung der Zell-Matrix-Kontakte begünstigt und somit anfängliche Prozesse der Zellmigration direkt beeinflusst. Möglicherweise können dadurch Zelldynamik und Invasionsverhalten der HROC24 Kolonkarzinomzellen gefördert werden.

5.2 Autoinhibiertes DIAPH1 verstärkt endosomalen Vesikeltransport

Zu überprüfen galt, ob autoinhibiertes DIAPH1 den endosomalen Vesikeltransport durch Stabilisierung der Mikrotubuli in HROC24 Kolonkarzinomzellen beeinflusst. Endosomen sind eine interessante Zielstruktur für Mikrotubuli-stabilisierende Effekte, da sie durch Interaktion mit dem Motorprotein Dynein entlang der Mikrotubuli ins Zellinnere transportiert werden (Xiang et al., 2015). Weiterhin sind Endosomen entscheidend für die Signaltransduktion und Kommunikation der Zellen mit ihrer Umgebung (Alberts et al., 2008). Eine veränderte Anzahl an Endosomen könnte intrazelluläre Prozesse und die Kommunikation der HROC24 Kolonkarzinomzellen mit ihrer Mikroumgebung verstärken bzw. hemmen, wodurch möglicherweise der Prozess der Metastasierung beeinflusst wird.

Die Ergebnisse zeigen eine signifikant verminderte Anzahl an Endosomen bei Knock-down-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Dabei wurde die Anzahl an

Endosomen pro Zelle betrachtet. Die Auswertungen der Cluster pro Zelle basieren auf der Verschmelzung von Endosomen und zeigen keine signifikanten Unterschiede. Auch hier kann der Einfluss von DIAPH1 auf die Anzahl an Endosomen pro Zelle nur auf Mikrotubuli-stabilisierende Effekte zurückgeführt werden. Anzunehmen ist, dass DIAPH1 im autoinhibierten Zustand die Anzahl an Endosomen pro Kontroll-Zelle durch ein stabiles Netzwerk der Mikrotubuli fördert.

Unterstützend konnte die Forschungsgruppe Fernandez-Borja et al. zeigen, dass autoinhibiertes DIAPH1 den Transport der Endosomen entlang der Mikrotubuli ins Zellinnere ermöglicht (Fernandez-Borja et al., 2005). Weitere Forschungsgruppen konnten im Umkehrschluss zeigen, dass die Depolymerisation bzw. Destabilisierung der Mikrotubuli den endosomalen Vesikeltransport hemmt (Apodaca, 2001; Matteoni and Kreis, 1987). Möglicherweise ist der endosomale Vesikeltransport sogar nur Tubulin-abhängig (Lin et al., 2015), ohne Beteiligung von Mikro- und Intermediärfilamenten (Matteoni and Kreis, 1987).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der DIAPH1 Knock-down eine signifikant verminderte Anzahl an Endosomen in HROC24 Kolonkarzinomzellen bewirkt. Dies basiert wahrscheinlich auf eingeschränkten Mikrotubuli-stabilisierenden Effekten, wodurch der endosomale Vesikeltransport erschwert wird. Hingegen kann bei Kontroll-Zellen der gesteigerte endosomale Vesikeltransport zu einer verstärkten Signaltransduktion führen. Möglicherweise wird dadurch die Kommunikation der HROC24 Kolonkarzinomzellen mit ihrer Mikroumgebung verstärkt und das metastatische Potential durch gezieltes Einwirken erhöht. Weiterhin ist naheliegend, dass durch die Stabilisierung der Mikrotubuli nicht nur die Endozytose, sondern auch die Exozytose gefördert und dadurch der gesamte zelluläre Vesikeltransport beeinflusst wird (Bryant and Stow, 2004; Etienne-Manneville, 2013; Stehbens and Wittmann, 2012; Watanabe et al., 2005).

5.3 Autoinhibiertes DIAPH1 steigert membranständige E-Cadherin Lokalisation

Viele invasive Tumorzellen bewegen sich als kollektiver Zellverband und sind über E-Cadherine verbunden, wodurch innerhalb des Zellkollektivs eine Polarität aufgebaut und aufrechterhalten wird (Cai et al., 2014). Basierend auf diesen Erkenntnissen können E-Cadherine möglicherweise zum metastatischen Potential der HROC24 Kolonkarzinomzellen beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob

autoinhibiertes DIAPH1 die membranständige E-Cadherin Lokalisation und somit den Aufbau der Zell-Zell-Kontakte bei HROC24 Kolonkarzinomzellen beeinflusst. Veränderungen in der membranständigen E-Cadherin Lokalisation könnten sich auf das Invasionsverhalten der Zellen auswirken.

Die Ergebnisse zeigen, dass Knock-down-Zellaggregate im Vergleich zu Kontroll-Zellaggregaten eine signifikant geringere membranständige E-Cadherin Lokalisation aufwiesen. Dies wurde bei der Auswertung der Knock-down-Zellaggregate durch ein diskontinuierliches E-Cadherin Signal an der Zellmembran bestätigt. Anzumerken ist, dass bei Einzelzellen keine Unterschiede der E-Cadherin Lokalisation festgestellt wurden. Mögliche Ursache könnte die entscheidende Rolle der E-Cadherine bei der kollektiven Migration von Tumorzellen spielen, wodurch der Zellzusammenhalt und die Organisation zu einem Zellkollektiv gewährleistet werden (Cai et al., 2014). Dies würde erklären, warum die Versuchsergebnisse der Einzelzellen keine signifikanten Unterschiede aufzeigten.

Folglich ist anzunehmen, dass die diskontinuierliche membranständige E-Cadherin Lokalisation bei Knock-down-Zellaggregaten zu einer schwächeren Ausprägung, oder teilweise zum gänzlichen Verlust von Zell-Zell-Kontakten führt. Der zugrunde liegende Mechanismus kann nicht auf Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts zurückgeführt werden. Diese Annahme basiert auf den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, welche zeigen, dass DIAPH1 keinen Einfluss auf die Aktindynamik hat (Abschnitt 4.4). Am wahrscheinlichsten ist, dass die reduzierte membranständige E-Cadherin Lokalisation der Knock-down-Zellaggregate durch eingeschränkte Mikrotubuli-stabilisierende Effekte beeinflusst wird.

Unterstützend zeigten Lin et al., dass in HCT116 Kolonkarzinomzellen der Vesikeltransport und die Translokation von Integrin $\beta 1$ zu fokalen Kontakten ausschließlich Tubulin-abhängig ist (Lin et al., 2015). Anzunehmen ist, dass den Adhäsionsmolekülen Integrin und E-Cadherin ein ähnlicher Transportmechanismus in Kolonkarzinomzellen zugrunde liegt und die Auswirkungen von DIAPH1 auf diese Prozesse übertragbar sind. Dies würde implizieren, dass autoinhibiertes DIAPH1 den gerichteten Vesikeltransport und den membranständigen Einbau von E-Cadherin einschränkt. Folglich könnten sich verminderte Zell-Zell-Kontakte hemmend auf das kollektive Migrationsverhalten der HROC24 Kolonkarzinomzellen auswirken. Ursache hierfür wäre der geringere Zusammenhalt des Zellkollektivs durch reduzierte adhärente Kontakte.

Weitere Studien konnten die Relevanz der Mikrotubuli bei der E-Cadherin Lokalisation und Konzentration durch molekulare Mechanismen zwischen dem Cadherin-Catenin-Komplex und den Mikrotubuli bestätigen (Chen et al., 2003; Ligon et al., 2001; Yanagisawa et al., 2004). Die Arbeitsgruppe Stehbens et al. zeigte, dass Subpopulationen von Mikrotubuli mit ihrem Plus-Ende radial in E-Cadherin-basierende Zell-Zell-Kontakte einstrahlen und I an diesen Kontaktpunkten die E-Cadherin Konzentration steigern (Stehbens et al., 2006). Dies deutet darauf hin, dass dynamische Mikrotubuli die E-Cadherin Konzentration an Zell-Zell-Kontakten durch die regionale E-Cadherin Verteilung nach Erreichen der Zelloberfläche regulieren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der DIAPH1 Knock-down die membranständige E-Cadherin Lokalisation bei HROC24 Zelleaggregaten signifikant verringert. Anzunehmen ist, dass dies auf die verminderte Stabilisierung der Mikrotubuli durch den Knock-down zurück zu führen ist. Zudem wären unter diesen Bedingungen alle einhergehenden intrazellulären Prozesse, welche Mikrotubuli-abhängig sind, eingeschränkt. Hingegen kann bei Kontroll-Zellen durch die Stabilisierung der Mikrotubuli ein intakter E-Cadherin Vesikeltransport gewährleistet werden, worüber die Lokalisation und Konzentration von E-Cadherin gesteigert wird. Dadurch können vermehrt Zell-Zell-Kontakte ausgebildet werden, die einen besseren Zusammenhalt zwischen den Zellen bewirken und möglicherweise darüber die kollektive Migration und Invasion der HROC24 Kolonkarzinomzellen steigern.

5.4 Autoinhibiertes DIAPH1 steigert Invasionsverhalten der HROC24

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass DIAPH1 im autoinhibierten Zustand das metastatische Potential der HROC24 Kolonkarzinomzellen beeinflussen kann. Dies wurde bestätigt durch die reduzierte Zelldynamik und das verminderte Invasionsverhalten der Knock-down-Zellen in die Kollagenmatrix, welche stellvertretend für die ECM steht. Bei Knock-down Zellen konnte kein Ablöseprozess aus dem Sphäroid verzeichnet werden, wohingegen bei Kontroll-Zellen eine Tendenz zur Invasion und Zellmobilität von kleinen runden Zellen erfasst wurde. Dies zeigte sich durch einen Ausbruch von Einzelzellen und kollektiven Zellverbänden nach einer Initialphase von 2 Stunden. Weiterhin wurde ein erneutes Ablösen der Einzelzellen nach 10 Stunden aufgezeigt. Mit den vorliegenden Daten kann nicht abschließend

beurteilt werden, ob die einzelnen Randzellen als Einzelzellen invadieren, oder möglicherweise als Leading-Zellen fungieren und weitere Zellen mit sich ziehen.

Um die Auswirkungen des autoinhibierten DIAPH1 auf das Invasionsverhalten zu verstehen, ist es entscheidend, dass die Ergebnisse dieser Arbeit nicht auf Aktin-nukleierenden Wirkungen von DIAPH1 basieren (Abschnitt 4.4). Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und der vorangegangenen Diskussionen ist anzunehmen, dass durch die Stabilisierung der Mikrotubuli ein verstärktes Invasionsverhalten in Kontroll-Zellen bewirkt wird.

Unterstützend zeigten Lin et al. bei DIAPH1-depletierten HCT116 Kolonkarzinomzellen ein vermindertes Adhäsions-, Migrations- und Invasionsverhalten (Lin et al., 2014). Diese zellulären Prozesse sind entscheidend an der Invasion beteiligt und werden möglicherweise auch bei HROC24 Kolonkarzinomzellen durch autoinhibiertes DIAPH1 moduliert, wodurch das Invasionspotential gesteigert werden könnte.

Anzumerken ist, dass der Versuch noch mehrmals wiederholt und statistisch ausgewertet werden muss, um eine signifikante Aussage über die Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf das Invasionsverhalten der HROC24 Kolonkarzinomzellen zu treffen. Zusätzlich müssen weitere Faktoren einbezogen werden, um den Mechanismus der Tumorzellinvasion aufzuklären. Wichtige Faktoren wären unter anderem die Untersuchung der Invadopodien und die Effekte der MMPs auf die ECM.

Zusammenfassend und bezugnehmend zu den vorangegangenen Diskussionen ist festzustellen, dass autoinhibiertes DIAPH1 zelluläre Prozesse der HROC24 Kolonkarzinomzellen direkt beeinflusst. Zunächst konnte ausgeschlossen werden, dass die Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 durch Aktin-nukleierende Eigenschaften zustande kommen. Dennoch wurde bei Knock-down-Zellen eine schwächere Ausbildung der Filopodien (Abschnitt 5.1), eine reduzierte membranständige E-Cadherin Lokalisation (Abschnitt 5.3) und eine geringere Anzahl früher Endosomen (Abschnitt 5.2) festgestellt. Diese Auswirkungen sind wahrscheinlich auf Mikrotubuli-stabilisierende Effekte von autoinhibiertem DIAPH1 zurückzuführen. Dadurch können die gerichtete Migration, der Zell-Zell-Kontakt, die kollektive Invasion, der endosomale Vesikeltransport und die Zellkommunikation beeinflusst werden. Anzunehmen ist, dass autoinhibiertes DIAPH1 durch die Modulation dieser Prozesse das metastatische Potential der HROC24 Kolonkarzinomzellen steigert.

6 Ausblick

Bis heute können gestreute Metastasen im Gegensatz zu lokal begrenzten Tumoren nicht vollständig chirurgisch entfernt werden. Ist das Stadium der Metastasierung erreicht, wird dem Patienten meistens eine Chemo- bzw. Radiochemotherapie empfohlen, welche immer ein hohes Risiko an schweren Nebenwirkungen beinhaltet. In den meisten Fällen sind metastasierte Tumore nicht heilbar. Zudem stellen Tumorerkrankungen in den letzten Jahren weltweit ein steigendes Problem dar. Ursache hierfür sind die wachsende und alternde Population sowie die steigende Prävalenz von Tumor-begünstigenden Risikofaktoren wie Tabak und Übergewicht (Siegel et al., 2014; Torre et al., 2015). Daher ist es notwendig, neue Therapieansätze zu entwickeln. Ein Beispiel dafür sind Proteine, die direkt in den Prozess der Invasion und Metastasierung eingreifen und somit ein Target für die Tumorthherapie darstellen. Die negativen Effekte des DIAPH1 Knock-downs auf das metastatische Potential der HROC24 Kolonkarzinomzellen machen das Protein durch sein direktes Eingreifen in den Prozess zu einem interessanten therapeutischen Zielmolekül der individuellen Tumorthherapie. Weitere Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um die genauen Mechanismen von DIAPH1 während der Metastasierung zu verstehen und die Eignungsfähigkeit des Proteins für die Tumorthherapie zu prüfen.

Ein Ansatz stellt die Entwicklung von zielgerichteten Substanzen gegen die FH2-Domäne von DIAPH1 dar. Diese würden die Interaktionen der FH2-Domäne sowohl mit Mikrotubuli als auch mit F-Aktin blockieren und somit gezielt die Mikrotubuli-Stabilisierung und Aktin-Nukleation über die dafür essentiell wichtige FH2-Domäne inhibieren. Folglich würde das metastatische Potential von DIAPH1 im aktivierten und autoinhibierten Zustand gehemmt werden. Zusätzlich könnten Substanzen, die sich gegen die FH1-bindende G-Aktin-Domäne oder gegen die GTPase-bindende RhoA-Domäne richten, die metastasierungsfördernde Wirkung von DIAPH1 reduzieren. Über diese Ansätze könnte die Metastasierung von HROC24 Kolonkarzinomzellen direkt inhibiert werden, da gezielt die essentiellen Proteindomänen von DIAPH1, welche die Stabilisierung der Mikrotubuli und die Aktin-Nukleation modulieren, blockiert werden würden.

7 Zusammenfassung

Durch diese Arbeit sollte der Einfluss von autoinhibiertem DIAPH1 auf das metastatische Potential der HROC24 Kolonkarzinomzellen untersucht werden.

Hierzu wurden durch Immunfluoreszenz die Filopodien-Formation, die membranständige E-Cadherin Lokalisation und der endosomale Vesikeltransport untersucht. Die Zellmorphologie wurde lichtmikroskopisch bestimmt. Durch einen DNase Assay wurde die intrazelluläre Aktinverteilung ermittelt. Zelldynamik und Invasionspotential wurden mit einer Zeitreihe von lichtmikroskopischen Bildern analysiert. Die Ergebnisse basieren auf der detaillierten Gegenüberstellung von DIAPH1 Kontroll- und Knock-down-Zellen.

Gezeigt wurde, dass autoinhibiertes DIAPH1 nicht als Aktin-Nukleator agierte. Weder die intrazelluläre Aktinverteilung noch die Morphologie der Kontroll- und Knock-down-Zellen wurden beeinflusst. Dennoch wurden bei Knock-down-Zellen eine schwächere Ausbildung der Filopodien, eine reduzierte membranständige E-Cadherin Lokalisation und eine geringere Anzahl an Endosomen festgestellt. Um eine definitive Aussage über die Auswirkungen von autoinhibiertem DIAPH1 auf das Invasionspotential der HROC24 Kolonkarzinomzellen zu treffen, muss der Live Cell Imaging Versuch noch mehrmals wiederholt und durch weitere Untersuchungen ergänzt werden. Anzunehmen ist, dass diese Ergebnisse auf Mikrotubuli-stabilisierenden Effekten von autoinhibiertem DIAPH1 basieren. Bezugnehmend zu HCT116 Kolonkarzinomzellen könnte autoinhibiertes DIAPH1 folgende Auswirkungen auf relevante Prozesse der Metastasierung haben: Durch eine verstärkte Filopodien-Formation könnten mehr Zell-Matrix-Kontakte ausgebildet werden und dadurch anfängliche Prozesse der Zellmigration direkt beeinflusst werden. Zudem fördert möglicherweise eine verstärkte E-Cadherin Lokalisation durch ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte die kollektive Invasion. Weiterhin ist durch die gesteigerte Anzahl an Endosomen anzunehmen, dass allgemein Mikrotubuli-bedingte Transportvorgänge durch autoinhibiertes DIAPH1 beeinflusst werden und die Zellkommunikation gesteigert wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass autoinhibiertes DIAPH1 durch gezieltes Modulieren zellulärer Prozesse das metastatische Potential der HROC24 Kolonkarzinomzellen steigert. Der zugrunde liegende Mechanismus von autoinhibiertem DIAPH1 basiert nicht auf Aktin-nukleierenden Wirkungen, sondern ist wahrscheinlich auf dessen Mikrotubuli-stabilisierende Effekte zurückzuführen.

8 Summary

The intent of this work was to investigate the influence of autoinhibited DIAPH1 on the metastatic potential of HROC24 colon carcinoma cells.

In doing so, formation of filopodia, localisation of membrane-bound E-Cadherin and endosomal vesicle trafficking were investigated through immunofluorescence. Cell morphology was determined by light microscopy. With the help of a DNase assay the intracellular distribution of actin was calculated. Cell dynamics and invasive potential were analysed with a time series of photos taken with a light microscope. The results are based on comparing DIAPH1 control and knockdown cells.

It was shown that autoinhibited DIAPH1 was not operating as an actin nucleator. Neither the intracellular distribution of actin nor the morphology of control and knockdown cells were influenced. However, knockdown cells showed a weaker development of filopodia, a reduced localisation of membrane-bound E-Cadherin and a diminished number of endosomes. In providing evidence to the question of how autoinhibited DIAPH1 affects the cell invasion of HROC24 colon carcinoma cells, the Live Cell Imaging experiment must be repeated several times and complemented by further examinations.

Presumably, these results are based on the microtubule stabilising effects enacted by autoinhibited DIAPH1. With references to HCT116 colon carcinoma cells, autoinhibited DIAPH1 could have following impact on relevant processes of the metastasis; due to an increased formation of filopodia more cell-matrix contacts could be established and, as such, the initial processes of cell migration could be influenced directly. Furthermore, a strengthened localisation of membrane-bound E-Cadherin could support collective invasion through distinct cell-cell contacts. Moreover, the enhanced number of endosomes in control cells indicates that autoinhibited DIAPH1 influences transport processes of microtubule in general. This implies an intensification of cell communication.

In conclusion, the results show that autoinhibited DIAPH1 increases the metastatic potential of HROC24 colon carcinoma cells by modulating cellular processes. While the underlying mechanism of autoinhibited DIAPH1 does not affect the actin nucleation, it might be influenced by DIAPH1's effects on the stabilisation of microtubule.

9 Literaturverzeichnis

- Aikawa, S., Hashimoto, T., Kano, K., Aoki, J. (2015) Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *J. Biochem.* 157(2):81–89.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008) *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition, Garland Science, New York, U.S.A., Abingdon, U.K., 585–589, 749–766, 787–799, 965–1052, 1169–1178, 1205–1256.
- Apodaca, G. (2001) Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2(3):149–159.
- Bartolini, F., Gundersen, G. G. (2010) Formins and microtubules. *Biochim. Biophys. Acta* 1803(2):164–173.
- Bernstein, B. W., Bamburg, J. R. (2010) ADF/Cofilin: A Functional Node in Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 20(4):187–195.
- Bishop, A. L., Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348(2):241–255.
- Boguslavsky, S., Grosheva, I., Landau, E., Shtutman, M., Cohen, M., Arnold, K., Feinstein, E., Geiger, B., Bershadsky, A. (2007) p120 catenin regulates lamellipodial dynamics and cell adhesion in cooperation with cortactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(26):10882–10887.
- Bryant, D. M., Stow, J. L. (2004) The ins and outs of E-cadherin trafficking. *Trends Cell Biol.* 14(8):427–434.
- Cai, D., Chen, S. C., Prasad, M., He, L., Wang, X., Choessel-Cadamuro, V., Sawyer, J. K., Danuser, G., Montell, D. J. (2014) Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell* 157(5):1146–1159.
- Campellone, K. G., Welch, M. D. (2010) A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11(4):237–251.
- Caswell, P. T., Vadrevu, S., Norman, J. C. (2009) Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(12):843–853.
- Cavallaro, U., Christofori, G. (2004) Multitasking in tumor progression: Signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014:58–66.
- Chaffer, C. L., Thompson, E. W., Williams, E.D. (2007) Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* 185(1-3):7–19.
- Chakraborty, S., Nagashri, M. N., Mohiyuddin, S. M., Gopinath, K. S., Kumar, A. (2010) Gene Expression Profiling of Oral Squamous Cell Carcinoma by Differential Display RT-PCR and Identification of Tumor Biomarkers. *Indian J. Surg. Oncol.* 1(4):284–293.

- Chen, X., Kojima, S. I., Borisy, G. G., Green, K. J. (2003) p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J. Cell Biol.* 163(3):547–557.
- Christofori, G. (2006) New signals from the invasive front. *Nature* 441(7092):444–450.
- Ciobanasu, C., Faivre, B., Le Clainche, C. (2012) Actin dynamics associated with focal adhesions. *Int. J. Cell Biol.* 2012: 941292
- Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., Ben-Ze'ev, A. (2002) The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J. Clin. Invest.* 109(8):987–991.
- Cook, T. A., Nagasaki, T., Gundersen, G. G. (1998) Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J. Cell Biol.* 141(1):175–185.
- Copeland, J. W., Treisman, R. (2002) The diaphanous-related formin mDia1 controls serum response factor activity through its effects on actin polymerization. *Mol. Biol. Cell* 13(11):4088–4099.
- Desai, A., Mitchison, T. J. (1997) Microtubule Polymerization Dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 83–117.
- Eisenmann, K. M., West, R. A., Hildebrand, D., Kitchen, S. M., Peng, J., Sigler, R., Zhang, J., Siminovitch, K. A., Alberts, A. S. (2007) T cell responses in mammalian diaphanous-related formin mDia1 knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 282(34):25152–25158.
- Etienne-Manneville, S. (2013) Microtubules in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29:471–99.
- Fernandez-Borja, M., Janssen, L., Verwoerd, D., Hordijk, P., Neefjes, J. (2005) RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1. *J. Cell Sci.* 118(12):2661–2670.
- Fukata, M., Kaibuchi, K. (2001) Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2(12):887–897.
- Gay, L. J., Felding-Habermann, B. (2011) Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 11(2):123–134.
- Geneste, O., Copeland, J. W., Treisman, R. (2002) LIM kinase and diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *J. Cell Biol.* 157(5):831–838.
- Goh, W. I., Ahmed, S. (2012) mDia1-3 in mammalian filopodia. *Commun. Integr. Biol.* 5(4):340–344.
- Goldberg, D. J., Burmeister, D. W. (1992) Microtubule-based filopodium-like protrusions form after axotomy. *J. Neurosci.* 12(12):4800–4807.
- Goode, B. L., Drubin, D. G., Barnes, G. (2000) Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12(1):63–71.

- Goshima, G., Vale, R. D. (2005) Cell Cycle-dependent Dynamics and Regulation of Mitotic Kinesins in *Drosophila* S2 Cells. *Mol. Biol. Cell* 16(8):3896–3907.
- Goulimari, P., Kitzing, T. M., Knieling, H., Brandt, D. T., Offermanns, S., Grosse, R. (2005) $G\alpha_{12/13}$ Is Essential for Directed Cell Migration and Localized Rho-Dial Function. *J. Biol. Chem.* 280(51):42242–42251.
- Goulimari, P., Knieling, H., Engel, U., Grosse, R. (2008) LARG and mDial Link $G\alpha_{12/13}$ to Cell Polarity and Microtubule Dynamics. *Mol. Biol. Cell* 19(1):30–40.
- Higgs, H. N. (2005) Formin proteins : a domain-based approach. *Trends Biochem. Sci.* 30(6):342-353.
- Hirokawa, N. (1998) Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport. *Science* 279(5350):519-526.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., Niwa, S. (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(10):682–696.
- Houben, A. J., Moolenaar, W. H. (2011) Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 30(3-4):557–565.
- Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T., Narumiya, S. (2001) Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDial1. *Nat. Cell Biol.* 3(1):8–14.
- Jacob, A., Prekeris, R. (2015) The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *Front. Cell Dev. Biol.* 3:4.
- Kanaan, Z., Qadan, M., Eichenberger, M. R., Galandiuk, S. (2010) The Actin-Cytoskeleton Pathway and Its Potential Role in Inflammatory Bowel Disease-Associated Human Colorectal Cancer. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 14(3):347–353.
- Kato, T., Watanabe, N., Morishima, Y., Fujita, A., Ishizaki, T., Narumiya, S. (2001) Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDial1, to the mitotic spindle in HeLa cells. *J. Cell Sci.* 114(4):775–784.
- Khalil, B. D., El-Sibai, M. (2012) Rho GTPases in primary brain tumor malignancy and invasion. *J. Neurooncol.* 108(3):333-339
- Kikkawa, M. (2013) Big steps toward understanding dynein. *J. Cell Biol.* 202(1):15–23.
- Kovar, D. R. (2006) Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18(1):11–17.
- Kwon, S., Shin, H., Lim, H. J. (2011) Dynamic interaction of formin proteins and cytoskeleton in mouse oocytes during meiotic maturation. *Mol. Hum. Reprod.* 17(5):317–327.
- Lauffenburger, D. A., Horwitz, A. F. (1996) Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* 84(3):359–369.

- Le Clainche, C., Carlier, M. F. (2008) Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* 88(2):489–513.
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., Thompson, E. W. (2006) The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 172(7):973–981.
- Liang, X. (2011) EMT: New signals from the invasive front. *Oral Oncol.* 47(8):686–687.
- Ligon, L. A., Karki, S., Tokito, M., Holzbaur, E. L. (2001) Dynein binds to β -catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat. Cell Biol.* 3(10):913–917.
- Lin, Y. N., Izbicki, J. R., König, A., Habermann, J. K., Blechner, C., Lange, T., Schumacher, U., Windhorst, S. (2014) Expression of DIAPH1 is up-regulated in colorectal cancer and its down-regulation strongly reduces the metastatic capacity of colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 134(7):1571–1582.
- Lin, Y. N., Bhuwania, R., Gromova, K., Failla, A. V., Lange, T., Riecken, K., Linder, S., Kneussel, M., Izbicki, J. R., Windhorst, S. (2015) Drosophila homologue of Diaphanous 1 (DIAPH1) controls the metastatic potential of colon cancer cells by regulating microtubule-dependent adhesion. *Oncotarget* 6(21):18577-18589.
- Lizárraga, F., Poincloux, R., Romão, M., Montagnac, G., Le Dez, G., Bonne, I., Rigail, G., Raposo, G., Chavrier, P. (2009) Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer Res.* 69(7):2792–2800.
- Matteoni, R., Kreis, T. E. (1987) Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J. Cell Biol.* 105(3):1253–1265.
- Mills, G. B., Moolenaar, W. H. (2003) The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3(8):582–591.
- Mitchison, T. J., Cramer, L. P. (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84(3):371–379.
- Nagasaki, T., Gundersen, G. G. (1996) Depletion of lysophosphatidic acid triggers a loss of oriented deetyrosinated microtubules in motile fibroblasts. *J. Cell Sci.* 109(10):2461–2469.
- Naj, X., Hoffmann, A. K., Himmel, M., Linder, S. (2013) The formins FMNL1 and mDia1 regulate coiling phagocytosis of *borrelia burgdorferi* by primary human macrophages. *Infect. Immun.* 81(5):1683–1695.
- Narumiya, S., Tanji, M., Ishizaki, T. (2009) Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28(1-2):65-76.
- Nobes, C. D., Hall, A. (1995) Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81(1):53–62.
- Nogales, E. (2000) Structural Insights into Microtubule Funktion. *Annu. Rev. Biochem* 69:277–302.

- Nürnberg, A., Kitzing, T., Grosse, R. (2011) Nucleating actin for invasion. *Nat. Rev. Cancer* 11(3):177–187.
- Ono, S. (2007) Mechanism of Depolymerization and Severing of Actin Filaments and Its Significance in Cytoskeletal Dynamics. *Int. Rev. Cytol.* 258:1-82.
- Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S., Gundersen, G. G. (2001) mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* 3(8):723–729.
- Panupinthu, N., Lee, H. Y., Mills, G. B. (2010) Lysophosphatidic acid production and action: critical new players in breast cancer initiation and progression. *Br. J. Cancer* 102(6):941–946.
- Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., Christofori, G. (1998) A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392(6672):190–193.
- Prendergast, G. C. (2001) Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 1(2):162–168.
- Ridley, A. J. (2001) Rho family proteins: coordinating Cell Responses. *Trends in Cell Biol.* 11(12):471–477.
- Ridley, A. J., Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70(3):389–399.
- Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., Forscher, P., Bement, W. M., Waterman-Storer, C. M. (2003) Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 5(7):599–609.
- Rundle, D. R., Gorbsky, G., Tsiokas, L. (2004) PKD2 interacts and co-localizes with mDia1 to mitotic spindles of dividing cells: Role of mDia1 in PKD2 localization to mitotic spindles. *J. Biol. Chem.* 279(28):29728–29739.
- Sakata, D., Taniguchi, H., Yasuda, S., Adachi-Morishima, A., Hamazaki, Y., Nakayama, R., Miki, T., Minato, N., Narumiya, S. (2007) Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *J. Exp. Med.* 204(9):2031–2038.
- Schaefer, A. W., Kabir, N., Forscher, P. (2002) Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J. Cell Biol.* 158(1):139–152.
- Schober, J. M., Komarova, Y. A., Chaga, O. Y., Akhmanova, A., Borisy, G. G. (2007) Microtubule-targeting-dependent reorganization of filopodia. *J. Cell Sci.* 120(7):1235–1244.
- Sheng, X., Yung, Y. C., Chen, A., Chun, J. (2015) Lysophosphatidic acid signalling in development. *Development* 142(8):1390–1395.

- Shida, D., Kitayama, J., Yamaguchi, H., Okaji, Y., Tsuno, N. H., Watanabe, T., Takuwa, Y., Nagawa H., (2003) Lysophosphatidic Acid (LPA) Enhances the Metastatic Potential of Human Colon Carcinoma DLD1 Cells through LPA1. *Cancer Res.* 63(7):1706–1711.
- Siegel, R., Desantis, C., Jemal, A. (2014) Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* 64 (2):104–117.
- Siess, W., Zangl, K. J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G., Aepfelbacher, M. (1999) Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(12):6931–6936.
- Stehbens, S., Wittmann, T. (2012) Targeting and transport: How microtubules control focal adhesion dynamics. *J. Cell Biol.* 198(4):481–489.
- Stehbens, S. J., Paterson, A. D., Crampton, M. S., Shewan, A. M., Ferguson, C., Akhmanova, A., Parton, R. G., Yap, A. S. (2006) Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *J. Cell Sci.* 119(9):1801–1811.
- Tanizaki, H., Egawa, G., Inaba, K., Honda, T., Nakajima, S., Moniaga, C. S., Otsuka, A., Ishizaki, T., Tomura, M., Watanabe, T., Miyachi, Y., Narumiya, S., Okada, T., Kabashima, K. (2010) Rho-mDial pathway is required for adhesion, migration, and T-cell stimulation in dendritic cells. *Blood* 116(26):5875–5884.
- Tapon, N., Hall, A. (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9(1):86–92.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 65(2):87–108.
- Vale, R. D. (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112(4):467–480.
- Valeur, B., Berberan-Santos, M. N. (2011). A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *J. Chem. Educ.* 88(6):731–738.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S., Horwitz, A. R. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(11):778–790.
- Watanabe, N. (2010) Inside view of cell locomotion through single-molecule: fast F-/G-actin cycle and G-actin regulation of polymer restoration. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 86(1):62–83.
- Watanabe, T., Noritake, J., Kaibuchi, K. (2005) Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* 15(2):76–83.
- Weinberg, R. A. (2008) Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis* 29(6):1092–1095.

- Weinberg, R. A (2014) *The Biology of Cancer*, Second Edition, Garland Science, New York, U.S.A., Abingdon, U.K., 31–69, 439–508, 577–721.
- Weis, W. I., Nelson, W. J. (2006) Re-solving the Cadherin-Catenin-Actin Conundrum. *J. Biol. Chem.* 281(47):35593–35597.
- Wen, Y., Eng, C. H., Schmoranzler, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E. J., Chen, M., Wallar, B. J., Alberts, A. S., Gundersen, G. G. (2004) EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* 6(9):820–830.
- Willier, S., Butt, E., Grunewald, T. G. (2013) Lysophosphatidic acid (LPA) signalling in cell migration and cancer invasion: A focussed review and analysis of LPA receptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. *Biol. Cell* 105(8):317–333.
- Windhorst, S., Fliegert, R., Blechner, C., Möllmann, K., Hosseini, Z., Günther, T., Eiben, M., Chang, L., Lin, H. Y., Fanick, W., Schumacher, U., Brandt, B., Mayr, G. W. (2010) Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase-A is a new cell motility-promoting protein that increases the metastatic potential of tumor cells by two functional activities. *J. Biol. Chem.* 285(8):5541–5554.
- Xiang, X., Qiu, R., Yao, X., Arst, H. N., Peñalva, M. A., Zhang, J. (2015) Cytoplasmic dynein and early endosome transport. *Cell. Mol. Life Sci.* 72(17):3267–3280.
- Yamana, N., Arakawa, Y., Nishino, T., Kurokawa, K., Tanji, M., Itoh, R. E., Monypenny, J., Ishizaki, T., Bito, H., Nozaki, K., Hashimoto, N., Matsuda, M., Narumiya, S. (2006) The Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src. *Mol. Cell. Biol.* 26(18):6844–6858.
- Yanagisawa, M., Kaverina, I. N., Wang, A., Fujita, Y., Reynolds, A. B., Anastasiadis, P. Z. (2004) A Novel Interaction between Kinesin and p120 Modulates p120 Localization and Function. *J. Biol. Chem.* 279(10):9512–9521.
- Yilmaz, M., Christofori, G. (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28(1-2):15–33.
- Zhang, Y., Wang, F., Niu, Y. J., Liu, H. L., Rui, R., Cui, X. S., Kim, N. H., Sun, S. C. (2015) Formin mDia1, a downstream molecule of FMNL1, regulates Profilin1 for actin assembly and spindle organization during mouse oocyte meiosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1853(2):317–327.
- Zhao, X., Lu, L., Pokhriyal, N., Ma, H., Duan, L., Lin, S., Band, H., Band, V. (2009) Overexpression of RhoA Induces Preneoplastic Transformation of Primary Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* 69(12):483–491.

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biochemie und Signaltransduktion am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Arbeitskreis von Frau PD Dr. rer. nat. Sabine Windhorst.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Dr. Windhorst für die umfassende Betreuung. Danke für das spannende Thema, die Annahme der Arbeit als Erstgutachterin, die gute Zusammenarbeit, die zielorientierte Anleitung und die konstruktive Kritik.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stefan Linder danke ich für die Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön richte ich an Frau Christine Blechner für das geduldige Beantworten all meiner Fragen, die Hilfsbereitschaft und die lehrreichen Einweisungen im Labor.

Ganz besonders danke ich meiner Schwester Lea Jopp-Saile und Maximilian Rüppel, die mich mit vielen hilfreichen Anmerkungen beim wissenschaftlichen Schreiben der Dissertation unterstützten.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meines Studiums stets mit absoluter Selbstverständlichkeit unterstützt haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

11 Eidesstattliche Erklärung

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: